

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.023

建立非均衡竞争叶酸定量测定的化学发光免疫分析法

聂红¹, 陈维贤¹, 赵清¹, 王玘¹, 胡琴¹, 刘萍², 李朴^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院检验科 400000; 2. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司, 天津 300000)

[摘要] **目的** 制备抗人叶酸(FA)抗血清并应用异硫氰酸荧光素(FITC)系统开发新型非均衡竞争技术, 建立可常规应用的定量检测血清 FA 的化学发光免疫分析(CLIA)法。**方法** FITC-FA 类似物、FA 抗体-HRP 依次加入包被有抗 FITC 抗体的化学发光板, 形成 FITC 抗体-FITC-FA 类似物-FA 抗体-HRP 的免疫反应复合物; 并进行方法学评价, 同时与非 FITC 检测系统及罗氏化学发光免疫分析系统检测结果进行比较。**结果** 成功制备 FA 抗血清并建立基于 FITC 系统的非均衡竞争 CLIA; 经方法学评价, 自研法的线性相关系数绝对值大于 0.990 0, 灵敏度 1.21 nmol/L, 线性范围 1.21~38.80 nmol/L, 批内变异系数小于 5%, 自研法定量检测性能优于非 FITC 系统; 与罗氏检测系统结果有较好相关性($R=0.908\ 1$)。**结论** 建立的非均衡竞争定量检测血清 FA 的 CLIA 法, 具有良好的检测灵敏度与特异性, 可应用于常规检测。

[关键词] FITC; 非均衡竞争; 叶酸; 化学发光免疫分析法

[中图分类号] R915

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)06-0792-04

A method of human serum folic acid detection by non-equilibrium competitive immunoassay using FITC detecting system

Nie Hong¹, Chen Weixian¹, Zhao Qin¹, Wang Ding¹, Hu Qin¹, Liu Ping², Li Pu^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Bioscience (Tianjin) Diagnostic Technology Limited Company, Tianjin 300000, China)

[Abstract] **Objective** To prepare anti-folic acid (FA) polyclonal antibody and develop a new non-balanced competing chemiluminescence analysis for clinical detection of FA. **Methods** Established the detection method by added FITC-FA-analogs and FA-HRP-antibody in the light emitting plate, which coated with anti-FITC antibody, to form the immune response complex of FITC/antibody-FITC-FA-analogs/FA-antibody-HRP. Then methodology evaluation was performed to evaluate the method performance; and further compared the detecting results with non-FITC system detection system and Electrochemiluminescence system (Roche Elecsys 2010). **Results** The ELISA results showed that the prepared anti-FA antibodies can recognize serum FA specifically. The methodology evaluation indicated that the linear correlation coefficient of the standard curve was 0.990 0; the analytical sensitivity was 1.21 ng/mL; the range of linear detection was 1.21~38.80 ng/mL; The coefficient variability of intra-assay was <5%, which was better than the results of non-FITC detection system; and the correlation coefficient was 0.908 1 compared with the Elecsys-2010 detection system. **Conclusion** The established chemiluminescence immunoassay for human serum FA has a good sensitivity and specificity, and suitable for clinical serum FA quantitative detecting.

[Key words] FITC; non-equilibrium competition; folic acid; chemiluminescence immunoassay

叶酸(folic acid, FA)是人体必需的营养物质, 主要促进骨髓中幼稚细胞成熟^[1]。FA 缺乏可引起巨幼红细胞性贫血以及白细胞减少症^[1-2]。此外, FA 对孕妇极为重要, FA 缺乏可导致胎儿神经管发育缺陷, 增加裂脑儿发生率^[3-4]。因此, 定量测定血清 FA 水平对预防和判断贫血原因、降低出生缺陷、指导合理膳食结构, 判断疗效及观察病情变化等具有重要的临床价值^[1,5-7]。化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)是采用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法, CLIA 具有检测灵敏度与特异性高、线性范围宽、无放射性污染等优势, 已逐步作为临床定量检测的首选方法^[8-9]。但 CLIA 检测成本较高, 限制了其临床广泛应用。

本研究在前期工作的基础上^[10-11], 拟进一步采用抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)抗体包被发光微孔板, FITC-FA 类似物取代 FA 作为竞争抗原^[12], 增加了 FA 校准品或样品与辣根过氧化物酶(HRP)标记 FA 抗体结合能力; 以基于 FITC 检测系统为平台, 建立非均衡竞争定量检测血清 FA 的 CLIA 分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料 2~3 kg 健康雄性新西兰大白兔购自重庆医科大学实验动物中心; 弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂、FA 类似物、FA 抗原及 FITC 购自 Sigma 公司, Anti-FITC 抗血清购自 Fitzgerald 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Abnova 公司。Hi TrapTM Protein A 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司。微孔板发光分析仪(Bioscience PETECK96-1)、微孔板脱水机(BIOS-401)为博奥赛斯(天津)生物有限公司产品。自动酶免分析仪(SM-3)由 Thermo 公司提供。紫外分光光度计为上海光谱仪器有限公司产品。Western blot 所需相关试剂均购自碧云天, 聚偏氯乙烯(PVDF)膜购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫原及抗人 FA 抗血清的制备与纯化 参考文献^[13], 采用长程免疫方案。主要步骤如下: 将甲酯化-FA 和牛血清清蛋白(BSA)、牛 γ 球蛋白(BGG)耦联(碳化二亚胺法)。另将 1 mg FA-BSA 溶于 1 mL 无菌水后与等体积弗氏完全佐剂充分混合乳化, 于家兔背部、足垫、皮下等多点注射; 采用相

同方法,分别于第 14 天与第 28 天用弗氏不完全佐剂加强免疫;第 35 天经兔耳缘静脉取血,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)法检测抗血清效价;第 42 天用 1.0 mg 纯蛋白注射入兔腹股沟肌肉加强免疫。于末次加强免疫 1 周后颈动脉放血,37 ℃ 分离血清;经 Protein A 亲和层析、超滤管超滤脱盐;Bradford 法测定 Anti-FA 抗体浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定纯化后抗血清纯度。将纯 FA 蛋白(1 mg/ml)及人血清稀释 20 倍后进行 SDS-PAGE,采用 Western blot 分析制备的抗血清识别人血清中 FA 的特异性。制备的 FA 抗血清加入适量甘油与叠氮钠后于 -80 ℃ 保存备用。

1.2.2 FA CLIA

1.2.2.1 FITC 系统 CLIA 检测方法 参考文献并略作改进^[14-16],将抗 FITC 抗体用包被缓冲液稀释成 5 μg/ml 的溶液包被化学发光微孔板,每孔加 50 μL FITC-FA 类似物,50 μL 样品,50 μL 过碘酸钠氧化法制备的酶结合抗体;同时设置高值、中值、低值质控品(Bio-rad),震荡混匀,37 ℃ 孵育 1 h。自动洗板仪洗板后加入 100 μL 发光底物液,避光反应 10 min 后采用微孔板发光分析仪读取发光值。

1.2.2.2 非 FITC 系统 CLIA 检测法 将 FA-BGG 用包被缓冲液稀释至 2.5 μg/ml,参考文献制备包被板^[16],每孔加入 50 μL 校准品或样品,50 μL 酶结合抗体,混匀后 37 ℃ 孵育 1 h。自动洗板仪洗板,加入 100 μL 发光底物液,避光反应 10 min 后微孔板发光分析仪读取发光值。

1.2.3 检测方法线性范围与灵敏度 用去离子水将高值浓度的 FA 进行对倍稀释后检测,用 logit-log 数学模型进行线性回归处理分析。测定 10 孔零值发光值,并取其平均值,求得标准差(*s*),然后代入标准曲线,所得即为分析灵敏度。

1.2.4 检测方法精密度 取 10 孔分析高值和 10 孔分析低值,分别计算出 10 孔高值和 10 孔低值的浓度平均值、标准差(*s*)、变异系数(CV)值,计算 CV 值作为批内精密度;选取不同专业实验员每天检测 1 次,3 d 共 30 孔的值求出的 CV 值即为批间精密度。

1.2.5 检测方法特异性 血清 FA 定量分析的主要非特异性交叉反应因子为氨嘌呤、亚叶酸、甲氨嘌呤。将上述干扰物质稀释成相应的浓度梯度(氨嘌呤:0.5、1.0 mmol/L;亚叶酸:10、100 mg;甲氨嘌呤:0.5、1.0 mmol/L),加入相应的检测血样中,采用本检测系统定量检测 FA,分析检测方法的交叉反应性(即检测方法的特异性)。

1.2.6 建立本检测方法的人血清 FA 参考区间 符合要求的健康体检者血清样本(空腹抽取静脉血,无溶血、脂血或黄疸)150 例,男 75 例,平均年龄 40 岁,女 75 例,平均年龄 43 岁。所有血样于 30 min 内离心(3 000 r/min,5 min)分离获取血清,-20 ℃ 分装保存。分析前置冰上复融后混匀,2 h 内检测完毕。根据定量检测结果初步确定该检测方法的 FA 参考范围。

1.2.7 与罗氏 CLIA 定量检测系统比较 随机选取 130 份血样,采用建立的检测方法 with 罗氏 CLIA 检测方法对血清样本中 FA 同时进行检测,将所得检测结果进行相关性分析。

1.2.8 检测稳定性 将相同批次试剂分别置 37 ℃ 烘箱和 4 ℃ 冰箱保存 7 d,随后取出平衡至室温,同时测定相同的 FA 标准品,建立标准曲线,分析比较二者的检测结果有无差异。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件分析数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对两组数据进行配对 *t* 检验、以及线性相关和

回归分析;检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 anti-FA 抗血清的制备与纯化 ELISA 检测结果显示,经抗原长程免疫后血清效价为 1:1000 000。采用 Protein A 亲和层析法纯化血清中抗体;抗体洗脱液经超滤浓缩脱盐,定量检测浓度为 5 mg/ml;取适量进行 SDS-PAGE,结果表明抗体蛋白在约 55×10^3 与 25×10^3 处可见预期蛋白带(图 1A 箭头所指处),表明制备的抗血清纯度较好;Western blot 结果证实,制备的抗血清能特异性识别内源性 FA,可应用于定量检测(图 1B)。

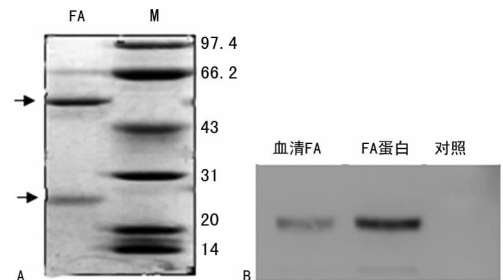


图 1 SDS-PAGE 与 Western blot 检测 FA 抗血清纯度及其识别特异性

2.2 自研法检测线性范围与定量分析灵敏度 应用本定量检测系统的线性范围为 1.21~38.80 ng/ml,以 5 个系列校准品浓度和一个零值校准品点建立标准曲线(图 2),线性相关系数的绝对值 $|R|=0.9986$,检测灵敏度为 1.20 ng/ml。而非 FITC 系统 CLIA 检测试剂的线性相关系数的绝对值 $|R|=0.9974$,分析灵敏度为 3.5 ng/ml。检测结果表明,与非 FITC 系统化学发光检测方法相比,FITC 检测系统的定量分析灵敏度显著提高($P<0.01$)。

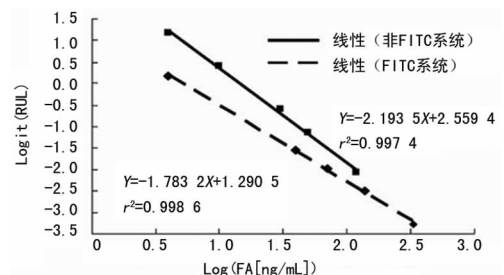


图 2 FITC 化学发光免疫分析方法测定 FA 的标准曲线

2.3 自研法检测系统分析精密度 本实验所建立的基于 FITC CLIA 分析系统测定血清 FA 的精密度优于非 FITC 系统 CLIA 法(表 1),其批内 CV 小于 5%;而采用非 FITC 系统 CLIA 测定的结果批内 CV 大于 10%($P<0.05$)。同时应用 FITC 系统 CLIA 测定 FA 的 QcL、QcH 批间 CV 分别为 4.27%、4.69%,而非 FITC 系统 CLIA 测定的批间 CV 接近 10.00%。分析精密度结果表明,自研法与非 FITC 系统 CLIA 相比,采用 FITC 系统(CLIA)精密度较非 FITC 系统(CLIA)检测精密明显提高($P<0.01$)。

2.4 FITC 检测系统分析特异性 已有研究表明,血清 FA 定量检测的干扰因素主要有氨嘌呤、亚叶酸、甲氨嘌呤等,应用建立的基于 FITC 系统 CLIA 测定的交叉反应结果表明氨嘌呤、亚叶酸、甲氨嘌呤的交叉反应性均小于 0.01%,血清中主要的 3 种干扰物对建立的自研法均无明显干扰作用($P>0.05$)。

2.5 自研法检测系统检测人血清 FA 水平参考区间的确定

本实验选择了 150 例健康人群体检合格血样,应用建立的 FITC 系统 CLIA 对 FA 进行定量检测,初步确定本检测方法的血清 FA 临床参考区间(95%CI)为 5.1~16.6 ng/mL。

表 1 FITC 与非 FITC 系统 CLIA 测定血清 FA 的批内精密度($\bar{x}\pm s, n=10$)

批次	FITC 系统		非 FITC 系统	
	QCL($\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$)	CV(%)	QCL($\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$)	CV(%)
第 1 批	27.15±0.97	3.53	26.32±2.09 ^a	11.00
第 2 批	27.28±1.37	4.05	27.20±2.63 ^a	9.68
第 3 批	27.19±1.45	4.35	26.29±2.74 ^a	10.44
第 1 批	186.05±10.08	3.90	181.53±16.14 ^a	8.99
第 2 批	184.37±8.96	3.76	173.97±16.95 ^a	10.26
第 3 批	189.26±11.13	4.18	178.23±18.62 ^a	10.15

^a: $P<0.05$, 与 FITC 系统比较。

2.6 与罗氏 CLIA 测定结果比较 应用本实验建立的基于 FITC 化学发光检测系统与罗氏 Elecsys2010 检测系统同时进行血清 FA 定量测定。方法比较的结果表明两种检测方法的结果差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 两种血清 FA 检测方法测定值比较

组别	FA($\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$)	t	P
罗氏 CLIA	80.40±42.75	1.558	0.128
FITC 系统 CLIA	78.02±52.75		

2.7 FITC 系统检测与进口试剂相关性比较 使用罗氏检测分析系统和自研检测法测定临床血清标本 150 例,以自研法的 FITC 系统 CLIA 测定血清 FA 值为纵坐标,以进口试剂罗氏 CLIA 测定值为横坐标,进行线性回归分析,并进行统计分析(图 3)。所得方程为 $Y=1.1808X-16.79$,线性回归系数为 1.1808, $r=0.9018$ 。经统计分析差异无统计学意义($P<0.01$),表明两种分析方法定量测定的血清 FA 测定值符合性较好。

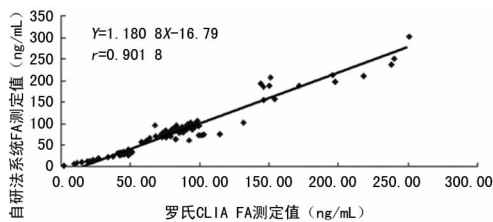


图 3 FITC 系统检测法(自研法)与进口试剂测定临床标本 FA 的相关性分析

2.8 检测系统测定值不一致的分析 表 3 显示 150 例样本中有 6 例测定值结果不一致, χ^2 检验差异无统计学意义($P>0.05$)。对于不符合要求的样本,经进口罗氏 CLIA 和自研法的 FITC 系统 CLIA 重复性检测,检测值无明显改变。进一步使用雅培 FA 定量检测系统进行分析,测得 4 例与罗氏 CLIA 结果一致,2 例与自研法的 FITC 系统 CLIA 测结果一致。配对四格表 χ^2 检验差异无统计学意义($P>0.05$)。经统计分析无规律性的偏差产生,多为临界偏差,产生偏差的原因可能主要由个体差异、两种方法检测原理不同及检测过程中随机误差等导致。

2.9 自研法试剂稳定性 将检测试剂分别于 4℃ 及 37℃ 储存;1 周后对血清 FA 标准品进行检测。检测结果见表 4,经配

对资料 t 检验,差异无统计学意义($t=4.16, P>0.05$)。

表 3 自研法的 FITC 系统 CLIA 与罗氏 CLIA FA 测定值比较

自研法	罗氏 Elecsys 2010		合计	χ^2	P
	阳性	阴性			
阳性	61	2	63	0.178	>0.05
阴性	4	83	87		
合计	65	85	150		

表 4 自研试剂稳定性分析

校准品浓度 (ng/mL)	4℃ 检测值	37℃ 检测值	37℃/4℃(7 d)
0	0	0	
4	4.28	4.18	0.98
40	37.02	35.84	0.97
70	69.13	72.68	1.05
140	132.47	133.21	1.00
330	366.13	357.27	0.97
相关系数	0.9959	0.9971	
回归系数	1.1056	1.0794	

3 讨论

本实验基于非均衡竞争的检测原理,成功建立了检测人血清 FA 的定量分析平台。自研 FA 检测法采用棋盘稀释法将 FITC-抗原间接包被微孔板上,依次加入含有 FA 的血清样品和酶结合物,此时的 FA 抗原不会与包被在发光板上的抗原反应,只有当最后加入酶标记抗体时反应才开始,有效避免了因加样而延迟时间所引起非特异性反应,而对检测结果所造成的影响。此外,本研究将 FA 抗原标记 FITC,间接将 FA 类似物包被在微孔反应板上,与血清 FA 相比,FA 类似物亲和力较高,竞争性结合 Anti-FA-HRP 抗体,显著提高了分析特异性与灵敏度(自研法的 FITC 系统 CLIA 分析灵敏度为 1.20 ng/mL,而非 FITC 系统 CLIA 为 3.50 ng/mL)。另一方面,自研法采用包被 FITC 抗体,提高包被的浓度,与直接包被抗原相比,其精密度明显提高(约 2.5 倍)。采用抗 FITC-FITC 放大系统在 CLIA 中应用具有标记效率高、抗原抗体易于结合与分离,且标记物稳定等优势,从而保证了该检测系统的试剂储存稳定性及检测可靠性。

自研法血清 FA 定量检测系统经方法学评价,结果表明采用自研法的 FITC 系统 CLIA 检测血清 FA 的灵敏度达 1.21 nmol/L,线性检测范围达 1.21~38.80 nmol/L,其检测性能符合常规检测的要求。与非 FITC 化学发光方法检测系统比较,本方法有较好的灵敏度和准确性;整个检测分析过程处于一个封闭流动的环境,最大程度降低了交叉污染和环境污染;该分析方法同时具有检测时间短,结果准确,特异性高,达到同类相关产品的检测水平要求;此外,与进口 FA 检测系统相比,建立的自研法检测费用低廉,易于推广应用。

本研究建立的非均衡竞争 FA CLIA 法在特异性、灵敏度、测定范围、精密性、稳定性、临床符合度及检测费用等方面有一定优势,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, et al. continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects [J]. *Science*, 2013, 339 (6123): 1222-1224.
- [2] Skórka A, Gieruszczak-Bialek D, Piescik M, et al. Effects of prenatal and/or postnatal (maternal and/or child) folic acid supplementation on the mental performance of children [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52(11):959-964.
- [3] 张之南. 血液学诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 北京科技出版社, 2007: 57-61.
- [4] Goonewardene M, Shehata M, Hamad A. Anaemia in pregnancy [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2012, 26(1):3-24.
- [5] Valente E, Scott JM, Ueland PM, et al. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B status in the elderly [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(6):856-863.
- [6] Joosten E. Strategies for the laboratory diagnosis of some common causes of anaemia in elderly patients [J]. *Gerontology*, 2004, 50(2):49-56.
- [7] 王秀婷. 血清叶酸和维生素 B₁₂ 测定及其在贫血中的应用 [J]. *中华血液学杂志*, 1991, 12(6):316-317.
- [8] Ghosh S, Howlett M, Boag D, et al. Interference in free thyroxine immunoassay [J]. *Eur J Intern Med*, 2008, 19: 221-222.
- [9] Yang H, Lou C, Xu M, et al. Investigation of folate-conjugated Fluorescent silica nanoparticles for targeting delivery to folate receptor-positive tumors and their internalization mechanism [J]. *Int J Nano Medicine*, 2011, 6(15): 2023-2032.
- [10] Li P, Shi J, Guo BQ, et al. Development of a chemiluminescence immunoassay for serum YB-1 and its clinical application as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepat Mon*, 2013, 13(7):e8918.
- [11] 孔海霞, 刘洋, 田云霞, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争游离三碘甲腺氨酸(FT3) 化学发光法 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(3):201-205.
- [12] 周新, 涂值光. 临床生物化学和生物化学检测 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006:385-386.
- [13] 李朴, 史静, 成凤, 等. Y 盒结合蛋白 1 单克隆抗体的研制、表位测定及其免疫学应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(6):13-19.
- [14] 曾建明, 雷鹏, 孔海霞, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争孕酮化学发光法 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(15):813-1814.
- [15] 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术 [M]. 成都: 四川科技出版社, 1994:45-60.
- [16] 董雪, 钟青萍, 黄安诚, 等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究 [J]. *现代食品科技*, 2009, 25(8):977-981.
- (收稿日期:2016-10-30 修回日期:2016-11-28)
-
- (上接第 791 页)
- [9] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会. 突发性聋的诊断和治疗指南 (2005 年, 济南) [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006, 41(8):569.
- [10] Wilson WR, Byl FM, Laird N. The efficacy of steroids in the treatment of idiopathic sudden hearing loss. A double-blind clinical study [J]. *Arch Otolaryngol*, 1980, 106(12): 772-776.
- [11] Silverstein H, Choo D, Rosengerg SI, et al. Intratympanic steroid treatment of inner ear disease and tinnitus (preliminary report) [J]. *Ear Nose Throat*, 1996, 75 (8): 468-471.
- [12] Parnes LS, Sun AH, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application [J]. *Laryngoscope*, 1999, 109 (7Pt2):1-17.
- [13] Bird PA, Begg EJ, Zhang M, et al. Intratympanic versus intravenous delivery of methylprednisolone to cochlear perilymph [J]. *Otol Neurotol*, 2007, 28(8):1124-1130.
- [14] Gundogan O, Pinar E, Imre A, et al. Therapeutic efficacy of the combination of intratympanic methylprednisolone and oral steroid for idiopathic sudden deafness [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 149(5):753-758.
- [15] Battaglia A, Burchette R, Cueva R. Combination therapy (intratympanic dexamethasone + high-dose prednisone taper) for the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss [J]. *Otol Neurotol*, 2008, 29(4):453-460.
- [16] Koltsidopoulos P, Bibas A, Sismanis A, et al. Intratympanic and systemic steroids for sudden hearing loss [J]. *Otol Neurotol*, 2013, 34(4):771-776.
- [17] Chandrasekhar SS. Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss: clinical and laboratory evaluation [J]. *Neurotol*, 2001, 22(1):18-23.
- [18] Alexander TH, Harris JP, Nguyen QT, et al. Dose effect of intratympanic dexamethasone for idiopathic sudden sensorineural hearing loss; 24 mg/mL is superior to 10 mg/mL [J]. *Otol Neurotol*, 2015, 36(8):1321-1327.
- [19] Hargunani CA, Kempton JB, DeGagne JM, et al. Intratympanic injection of dexamethasone time course of inner ear distribution and conversion to its active form [J]. *Otol Neurotol*, 2006, 27(4):564-569.
- [20] 傅窃窃, 张天宇, 赵晖. 地塞米松鼓室内注射后在大鼠耳蜗中的分布 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(4):237.
- [21] 王亚林, 汪银凤. 不同浓度甲泼尼龙琥珀酸钠鼓室给药后在豚鼠血浆和外淋巴中的代谢 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(10):853.
- (收稿日期:2016-10-22 修回日期:2016-11-20)