



ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年1月 第12卷 第1期 总第65期

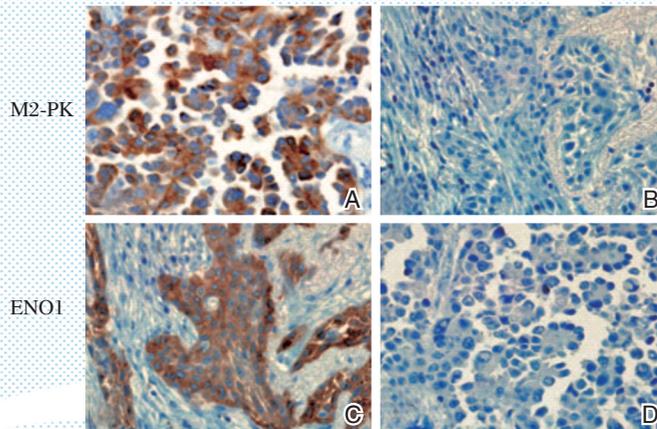
JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 1 January 2020

肺癌组织

肺良性病变组织



注:A. M2-PK在肺癌组织中的表达; B. M2-PK在肺良性病变组织中的表达; C. ENO1在肺癌组织中的表达; D. ENO1在肺良性病变组织中的表达。

图(P81) M2-PK、ENO1在肺组织中的免疫组化分析(×40)

Figure(P81) Immunohistochemical analysis of and in lung tissues (×40)

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库CMCC收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库CMCI收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



分子诊断与治疗杂志

二〇二〇年一月

第十二卷 第一期

中山大学

王凯教授



山东大学博士研究生毕业,医学博士学位,博士研究生毕业后在中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所从事博士后研究工作,导师为国家最高科学技术奖获得者侯云德院士。

主任医师,二级教授,博士生导师,山东大学肝病研究所所长,国家卫生计生委合理用药专家委员会抗菌药物专业组专家,中华医学会医学病毒学分会委员,中国医师协会感染科医师分会常务委员,中国微生物学会干扰素与细胞因子专业委员会副主任委员,中国生命关怀协会无创大健康大数据专业委员会副主任委员,国家肿瘤微创治疗产业技术创新战略联盟副主任委员,中国研究型医院学会感染病学专业委员会常务委员,山东省医学会医学病毒学分会主任委员,山东省医学会感染病学分会名誉主任委员,山东省医师协会感染科医师分会名誉主任委员,第十届吴阶平医学研究奖-保罗·杨森药学研究奖获得者,国内外多家杂志审稿专家或编委。

王凯教授长期从事肝脏疾病的诊断和治疗相关临床和科研工作。临床方面,王凯教授在慢性乙型肝炎、丙型肝炎、肝衰竭、肝硬化、肝癌、药物性肝病、脂肪肝及自身免疫性肝病等疾病的诊治方面具有丰富的临床经验,对晚期肝癌用中西医结合治疗,改善了病人的生活质量,延长了带瘤生存期。科研方面,王凯教授建立了DNA甲基化分子标志物为基础的肝衰竭诊断标准和评估体系,采用包括激素在内的综合治疗方案,提高了肝衰竭的个体化诊疗水平;系统开展乙型肝炎综合治疗研究,优化了乙型肝炎的抗病毒治疗方案,提高乙型肝炎表面抗原转阴率。承担国家科技重大专项、国家自然科学基金、973项目子课题等多项课题。获国家发明专利10项,近年来以第一完成人获山东省科技进步奖二等奖2项。在国内外学术核心期刊发表学术论文135篇,其中SCI收录71篇,主编《中西医结合肝胆病治疗学》、《肝胆病学》、《临床肝病治疗学》、《简明临床肝病学》专著4部。截止目前,共培养博士21名及硕士研究生41名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2020年1月 第12卷 第1期 总第65期 Bimonthly Volume 12 Number 1 January 2020

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 刘清群
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)
电话	(020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2020年1月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan LI Caizhen LIU Qingqun</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2020.1.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》

版权归《分子诊断与治疗杂志》所有,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点,除非特别声明。



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

分子诊断与治疗杂志

经过多项学术指标综合评定及同行专家
评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期
刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038 www.istic.ac.cn

2019年11月

证书编号：2018-G556-0387
有效期至：2020年12月



分子诊断与治疗杂志

双月刊 2020年1月 第12卷 第1期

目次

述评

原发性肝癌的分子诊断标记物研究进展 王凯 高帅(1)

论著

耳聋基因突变检测国家参考品的研制 于婷 孙楠 曲守方等(6)

广州市地区7234例新生儿耳聋基因突变分析

..... 李玛 叶燕绸 何国炜等(11)

自贡地区HBV基因BCP区1762/1764及前C区1896位点突变与HBV相关性肝癌的相关性研究

..... 邱顺华 张德文 刘勇(16)

基于Taqman荧光ARMS-PCR技术检测CYP3A5基因多态性方法的建立

..... 朱小亚 黄志文 蒋析文(22)

贝赫切特综合征患者肠道菌群微生物宏基因组学分析 刘秀梅 张成伟 刘森(27)

急性心肌梗死PCI术后患者的血清NT-proBNP、ICTP、MMP-9水平及其临床意义研究

..... 李小娟 曹劝省 汪砚雨(31)

MG患者外周血单个核细胞TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF的变化与其病情程度的关系

..... 刘新华 邓建中 范仲鹏(35)

TGF- β 1、MMP-3及Collagen III在POP患者子宫主韧带组织中的表达及意义

..... 张凯 薛惠英 张雪芹(39)

一种国产血液核酸检测系统的性能验证研究 郑旭焱(44)

携带NDM-1基因合并膜孔蛋白OmpK36缺失肺炎克雷伯菌耐药性分析

..... 涂海健 黄亚雨 陈淑娟等(49)

脂蛋白相关磷酸酶A2和炎性蛋白在诊断脑梗死后血管性痴呆及判断预后中的应用

..... 贾东佩 朱凤俊 任应国(55)

非梗阻性无精子症患者X染色体连锁的TEX11基因多态性研究

..... 罗招云 李绪杰 林芬等(59)

血常规参数、血浆D-二聚体在败血症诊断及预后应用 徐玉秀 张成伟 鹿勇(64)

mFOLFOX6化疗联合射频消融治疗原发性肝癌的疗效及机制研究

..... 符白玉 林怡 徐琪等(69)

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2020年1月 第12卷 第1期

目次

- miR-219a-5p对皮肤鳞状细胞癌细胞凋亡的影响及机制 林永丽 杨灿 李艳(74)
肺癌组织中 M2-PK、和 ENO1 的表达水平及对其生存期的预测价值
..... 范华颖 张家艳 方怡 等(79)
膜联蛋白 A1、sd-LDL、Angptl2 与冠心病及对冠状动脉粥样硬化病变程度的诊断价值
..... 吴威 衣欣 蒙奕兵 等(84)
应用 QF-PCR 和 CNV-seq 以及染色体核型分析检测羊水的染色体畸变及结果分析
..... 乔金平 胡文君 陈薇 等(89)
血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 在重症颅脑损伤患者中的表达及预后价值
..... 洪明 赵蕾蕾 陈国金(93)
血尿酸淀粉酶、CRP、Card9 蛋白在 AP 患者中的变化及其意义 王长起 李凯 索胜利(99)
AMI 患者发病后血浆 UCA1、CK-MB、cTnI 变化及其诊断价值分析
..... 肖丹丹 张勇 陈秀红 等(103)
急性髓细胞白血病患者 miR-126 表达水平与预后的关系研究 容蓉 班奕 周肖滢 等(108)
一株红霉素耐药百日咳鲍特菌的完整基因组分析 于丹 栗东芳 袁林 等(113)
大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭疗效及对患者血清 HCY、Gal-3、NT-proBNP
水平的影响 张志亮 张鑫 高卫芳 等(118)

综 述

- MALDI-TOF MS 在药物基因组学检测中的应用及展望 曹书娟 刘彬 朱安娜(123)
基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用
..... 田彩平 杨碎胜 袁红霞 等(128)
原发性胆汁性胆管炎易感基因多态性的研究现状 高琪 张华(134)

专家风采

- 王凯 (封二)

实验室巡礼

- 山东大学肝病研究所实验室巡礼 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 12 Number 1 January 2020

CONTENTS

COMMENTS

- Research progress of molecular diagnostic markers for primary hepatocellular carcinoma
WANG Kai, GAO Shuai (1)

ORIGINAL ARTICLES

- Development of national reference for deafness gene mutation detection
YU Ting, SUN Nan, QU Shoufang, HUANG Jie (6)
- Screening and analysis of deafness gene mutations among 7 234 newborns in Guangzhou area
LI Ma, YE Yanchou, HE Guowei, DONG Huimin, LI Lin, HU Bo, ZHANG Jun (11)
- Correlation between HBV gene BCP region 1762/1764 and pre-C region 1896 mutation and HBV-associated liver cancer in Zigong, West China
QIU Shunhua, ZHANG Dewen, LIU Yong (16)
- Establishment of Taqman ARMS-PCR Method for Detection of *CYP3A5* gene Polymorphism
ZHU Xiaoya, HUANG Zhiwen, JIANG Xiwen (22)
- Metagenomics analysis of intestinal flora microbes in patients with Behcet Syndrome
LIU Xiumei, ZHANG Chengwei, LIU Miao (27)
- Predictive value of early detection of serum NT-proBNP, ICTP and MMP-9 levels in patients with acute myocardial infarction after PCI
LI Xiaojuan, CAO Quanxing, WANG Yanyu (31)
- Relationship between changes of TNIP1 protein, serum AGR and plasma PDGF in peripheral blood mononuclear cells of MG patients and their severity
LIU Xinhua, DENG Jianzhong, FAN Zhongpeng (35)
- Expression and significance of TGF- β 1, MMP-3 and Collagen III in uterine main ligament tissue of POP patients
ZHANG Kai, XUE Huiying, ZHANG Xueqin (39)
- Performance verification of a domestic blood nucleic acid detection system
ZHENG Xuyan (44)
- Analysis of drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* carrying *NDM-1* gene and *OmpK36* deletion
TU Haijian, HUANG Yayu, CHEN Shujuan, XU Guanghui (49)
- Application of lipoprotein-associated phosphatase A2 and inflammatory proteins in diagnosing vascular dementia and predicting prognosis after cerebral infarction
JIA Dongpei, ZHU Fengjun, REN Yingguo (55)
- Study on X chromosome-linked *TEX11* gene polymorphisms in non-obstructive azoospermia patients
LUO Zhaoyun, LI Xujie, LIN Fen, ZHA Guangcai, YANG Liye (59)
- Application value of blood routine parameters and plasma D-dimer in diagnosis and prognosis of sepsis
XU Yuxiu, ZHANG Chengwei, LU Yong (64)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 12 Number 1 January 2020

CONTENTS

Curative effect and mechanism of mFOLFOX6 chemotherapy combined with radiofrequency ablation on primary liver cancer <i>FU Baiyu, LIN Yi, XU Qi, ZHANG Jiewei</i>	(69)
Effect of miR-219a-5p on apoptosis of skin squamous cell carcinoma and its mechanism <i>LIN Yongli, YANG Can, LI Yan</i>	(74)
Expression levels of M2-PK and ENO1 in lung cancer tissues and their predictive value on survival <i>FAN Huaying, ZHANG Jiayan, FANG Yi, GAO Yang</i>	(79)
The relationship between annexin A1, sd-LDL, Angptl2 and the severity of coronary heart disease and its diagnostic value for severe coronary atherosclerosis <i>WU Wei, YI Xin, MENG Yibing, ZHANG Xue</i>	(84)
Using QF-PCR, CNV-seq and karyotype analysis to detect chromosomal aberrations in 106 amniotic fluids and comparing the results <i>QIAO Jinping, HU Wenjun, CHEN Wei, LIU Hui, ZHANG Xiaopeng, DAI Yaqian, PENG Liduo, XU Yuanhong, FANG Huiqin, YUAN Jing</i>	(89)
Expression of serum HMGB1, IGF-1 and ficolin-3 in patients with severe head injury and their prognostic value analysis <i>HONG Ming, ZHAO Leilei, CHEN Guojin</i>	(93)
Changes and significance of hematuria, amylase, CRP and Card9 protein in patients with acute pancreatitis <i>WANG Zhangqi, LI Kai, SUO Shengli</i>	(99)
Changes of Plasma UCA1, CK-MB and cTnl in Patients with AMI after Onset and Their Diagnostic Value <i>XIAO Dandan, ZHANG Yong, CHEN Xiuhong, SU Ya, HUANG Zhiping</i>	(103)
Relationship between miR-126 Expression and Prognosis in Children with Acute Myeloid Leukemia <i>RONG Rong, BAN Yi, ZHOU Xiaoying, WANG Xiaoping, WANG Xiaoming</i>	(108)
Whole-genome Sequencing And Analysis Of an Erythromycin Resistant Boredetella Pertussis Isolate <i>YU Dan, LI Dongfang, YUAN Lin, FENG Xin, SHI Wei, YAO Kaihu</i>	(113)
Efficacy of Sofren injection in the treatment of coronary heart disease with heart failure and its effects on levels of serum HCY, Gal-3 and NT-proBNP <i>ZHANG Zhiliang, ZHANG Xin, GAO Weifang, YUAN Yu</i>	(118)
REVIEWS	
Application and prospect of MALDI-TOF MS in pharmacogenomics <i>CAO Shujuan, LIU Bin, ZHU Anna</i>	(123)
The application of nucleic acid aptamers based on Cell-SELEX in tumor diagnosis and treatment <i>TIAN Caiping, YANG Suisheng, YUAN Hongxia, SUN Jingyang, WANG Weijun, XU Jinling, LIAO Shiqi</i>	(128)
Polymorphisms of Susceptibility Genes in Primary Biliary Cholangitis <i>GAO Qi, ZHANG Hua</i>	(135)

原发性肝癌的分子诊断标记物研究进展

王凯* 高帅

[摘要] 在我国,原发性肝癌具有较高的发病率和死亡率,严重威胁我国人民的生命和健康。对肝癌高危人群进行筛查,早期发现、早期诊断、早期治疗,是提高肝癌疗效的关键。肝癌特异性的血清分子诊断标记物是当前肝癌早期筛查的重要手段,已广泛应用于临床工作中。随着新的研究技术的不断应用和肝肿瘤发生机制认识的不断深入,有越来越多的原发性肝癌相关分子被认识并有望成为肝癌早期诊断和预后判断的标记物。本文就近年来原发性肝癌分子诊断标记物的研究进展及潜在临床应用价值进行简要综述。

[关键词] 原发性肝癌;分子诊断;筛查;早期诊断;预后判断

Research progress of molecular diagnostic markers for primary hepatocellular carcinoma

WANG Kai*, GAO Shuai

(Department of Hepatology, Qilu Hospital of Shandong University, Hepatology Institute of Shandong University, Jinan, Shandong, China, 250012)

[ABSTRACT] In China, primary liver cancer has a high morbidity and mortality, which seriously threatens the life and health of people. Screening of high-risk patients of liver cancer and detection, diagnosis and treatment at early stage are the keys to improving the treatment efficacy of hepatocellular carcinoma. Cancer-specific serum molecular diagnostic markers are an important method for early screening of hepatocellular carcinoma, and have been widely used in clinical practice. With the continuous application of new research techniques and the deepening understanding of the mechanism of liver tumorigenesis, more and more molecules related to hepatocellular carcinoma have been recognized and are expected to become markers for early diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. This article briefly reviews the research progress and potential clinical application value of molecular diagnostic markers for primary liver cancer in recent years.

[KEY WORDS] Hepatocellular carcinoma; Molecular diagnosis; Screening; Early diagnosis; Prognosis prediction

原发性肝癌是目前我国第四位的常见恶性肿瘤及第三位的肿瘤致死病因,严重威胁我国人民的生命和健康^[1]。在我国,肝癌的高危人群主要包括:感染乙型肝炎病毒和(或)丙型肝炎病毒、长期酗酒、非酒精性脂肪性肝炎、食用被黄曲霉毒素污

染食物、各种原因引起的肝硬化以及有肝癌家族史等的人群,尤其是年龄40岁以上的男性风险更大。外科手术治疗是肝癌的主要治疗方式之一。然而,大部分患者确诊时已达中晚期,能获得手术切除机会的患者仅有20%~30%^[2]。对肝癌高危人

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10301406, 2017ZX10202202)

作者单位:山东大学齐鲁医院肝病科,山东大学肝病研究所,山东,济南 250012

*通信作者:王凯, E-mail: wangdoc876@126.com; wangdoc2010@163.com

群进行筛查,早期发现、早期诊断、早期治疗小肝癌,是提高肝癌疗效的关键。影像学检查和血清分子诊断标记物是当前肝癌早期筛查的主要手段。影像学检查主要包括B超、CT和磁共振等,通过直观的肝脏占位性肿瘤包块来判断肝癌^[3]。分子诊断标记物的检测在原发性肝癌的筛查、早期诊断、预后判断、复发检测等方面发挥着重要作用。

近年来,随着分子生物学、细胞生物学和人类基因组学、蛋白质组学等基础学科向癌症研究领域的延伸,肝癌分子诊断标记物的研究取得了巨大的进展。本文将对近年来肝癌分子诊断标记物的研究做一综述,以期对后期的临床工作和科学研究提供指导。

1 肝癌相关基因

正常细胞的生长与增殖受两大类基因调控。原癌基因提供正向调控信号,其可促进肿瘤细胞生长和增殖,并且阻止其发生终末分化倾向。抑癌基因提供负向调控信号,促使细胞成熟、终末分化和细胞凋亡。正常情况下这两类信号保持着动态平衡,精准地调控细胞增殖和成熟。一旦这两类信号中有一类信号过强或过弱均会使细胞生长失控而导致恶变。研究显示,多种致癌基因参与了肝癌的发生、发展。这些基因改变与肿瘤抑制基因、癌基因、发育途径的激活、生长因子及其受体相关,导致肝癌在细胞水平上保持异常高的复制水平,并使细胞避免凋亡的过程。

其中,具有代表性的基因如 *PTEN* 基因、*p53* 基因、*IGF-2* 基因、*TGF- α* 基因、*c-myc* 基因、*ras* 基因等,直接参与介导肝癌的发生、发展,并可作为肝癌早期诊断的特异性分子标记物^[4]。Chen 等人的研究中发现,大约 50.3% 的肝癌组织中可检测到 *PTEN* 基因的低表达,与 *CD133*、*EpCAM* 和 *CK19* 的高表达呈正相关。*PTEN* 基因低表达是肝癌复发和总体生存率的独立预测因素^[5]。Liao 等人通过加权基因共表达网络研究发现,*P53* 基因相关信号通路是导致乙型肝炎相关肝癌发生、发展的核心通路之一^[6]。另一项研究显示,*c-myc* 可与 *HBx* 协同诱导非经典前折叠素 RPB5 相互作用因子 1 (UR11) 蛋白的表达升高,从而促进原发性肝癌

的发生、发展^[7]。Ha 等人的研究中,*IGF-2* 介导的 E-cadherin 蛋白缺失是导致小鼠肝肿大和肝癌细胞异常生长的关键因素。*HBx* 诱导的 *IGF-2* 是可作为肝癌的潜在生物标记物,也是肝癌的治疗靶点之一^[8]。

2 DNA 甲基化标记物

表观遗传学是指非遗传改变(DNA 甲基化、组蛋白修饰以及 miRNA 等非编码 RNA 等)对基因表达调控,这种调节不依赖基因序列的改变且可遗传,其中 DNA 甲基化是最常见的表观遗传现象。DNA 甲基化是表观遗传学的重要调控机制之一,它是以 S-腺苷蛋氨酸为甲基供体,在 DNA 甲基转移酶 (*DNMT*) 介导下,将甲基基团转移到 DNA 某些碱基上的过程。DNA 甲基化多发生在 CpG 岛上,是一种转录水平的 DNA 修饰方式,它能调节基因表达,并且在维持细胞正常分化、疾病的发生和发展中起重要作用。基因启动子区域的 DNA 甲基化可抑制基因表达,在恶性疾病的早期诊断、风险评估、早期复发预测、治疗反应监测及预后判断中发挥重要作用,是目前的研究热点方向。异常的 DNA 甲基化位点已经成为恶性肿瘤最有前景的分子标记物之一^[9]。

有研究发现,基因组中常见的重复序列如 *LINE-1* 和 *Alu* 在肝癌患者中存在明显的甲基化异常,或可作为肝癌诊断的标记物 and 治疗的靶点^[10]。我们的研究也发现,原发性肝癌具有特异的基因甲基化特征。在一项研究中,我们分析了 178 例手术切除的肝癌组织和 20 例正常肝组织中 *TFPI2* 基因的甲基化状况。结果显示,*TFPI2* 基因在肝癌组织中的甲基化率为 44.9%,癌旁组织中的甲基化率为 10.7%,正常肝组织中的甲基化率为 5.0%。同时,*TFPI2* 基因甲基化与肿瘤复发和预后差明显相关^[11]。另一项研究中,我们分析了血清游离 DNA 中 *IGFBP7* 基因的启动子甲基化状态,结果显示,肝癌患者血清游离 DNA 中的 *IGFBP7* 基因存在明显的甲基化,*IGFBP7* 基因甲基化与肝癌患者氧化损伤状况、术后总体生存率及早期复发率有关^[12]。联合应用 *IGFBP7* 基因甲基化和 AFP 用于肝癌诊断时,其诊断效能明显高于单独应用 AFP^[13]。我们进一步分析了肝癌患者外周血

单个核细胞中基因的甲基化状况,结果显示,肝癌患者外周血单个核细胞中 *NKG2D* 基因启动子区域程度明显高于慢性肝炎患者和正常对照者, *NKG2D* 基因可作为肝癌诊断的良好生物标记物^[14]。

3 miRNA

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性短链(17-25个核苷酸)非编码 RNA,其可以与信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的 3' 非编码区结合诱导其降解。目前已有约 500 个 miRNA 基因被发现,其具有广泛的生物学功能,可以调控细胞重要的生理过程。miRNA 既可以作为原癌基因,也可以作为抑癌基因行使功能^[15]。在肝癌中,miRNA 参与调节细胞增殖分化及凋亡、上皮间充质转化、转移、血管新生等肿瘤相关病理过程。因此,miRNA 的水平与肝癌的发生和进展密切相关,可作为诊断肝癌的候选标记物。

已有研究发现一些 miRNA 具有较好的诊断效能。例如,有研究发现 *miR-122* 的水平在肝癌中显著上调,在健康人群中应用 *miR-122* 诊断肝癌的敏感性为 90.0%,特异性为 94.0%,AUC 为 0.954,而 *miR-122* 鉴别良恶性肝脏肿瘤的敏感性为 64%,特异性为 62%,AUC 为 0.667^[16]。此外,*miR-148a* 被认为是一种肝癌特异性 miRNA,与肝硬化患者相比,肝癌患者血浆 *miR-148a* 的水平显著降低,应用血浆 *miR-148* 水平从肝硬化患者中诊断肝癌的敏感性为 89.6%,特异性为 89.0%,AUC 为 0.919,而在 AFP 水平较低的肝癌患者中,*miR-148* 诊断肝癌的敏感性可达 90.6%,特异性可达 92.6%,AUC 为 0.949^[17]。一项荟萃分析发现,miR-125b 诊断 HBV 相关肝癌的敏感性达 95%,特异性达 0.79%,AUC 为 0.95^[18]。对于此类诊断敏感性较高的 miRNA,可用于筛查早期肝癌,特别是在 AFP 水平较低的患者中更具意义。与单个 miRNA 相比,多种 miRNA 的组合可显著提高其诊断效能。在一项纳入 934 例受试者的研究中,*miR-122*、*miR-192*、*miR-21*、*miR-223*、*miR-26a*、*miR-27a* 及 *miR-801* 的组合对于 HBV 相关肝癌的诊断具有较高的诊断价值,其从 CHB 患者和肝硬化患者中诊断肝癌的 AUC 分别为 0.842 和 0.884,而对于

早期肝癌(BCLC 0 期和 A 期),该组合的诊断 AUC 达 0.884^[19]。

近年来,外泌体 miRNA 在肝癌中的功能日益受到关注。一些特定的 miRNA 可在外泌体中富集,参与细胞间的信号传递。而外泌体的磷脂膜结构可以使包裹的 miRNA 在血液中更加稳定,具有较高的无创诊断价值^[20]。有研究发现,与 CHB 及肝硬化患者相比,肝癌患者血清外泌体 miRNA 水平发生显著变化,其中,*miR-18a*、*miR-221*、*miR-222* 及 *miR-224* 水平显著上调,而 *miR-101*、*miR-106b*、*miR-122* 及 *miR-195* 水平显著下调^[20]。另一项研究发现,与肝硬化相比在肝癌中,血清外泌体 *miR-122*、*miR-148a* 及 *miR-1246* 水平显著上调,其诊断 AUC 分别为 0.816、0.891、0.785^[21]。外泌体 miRNA 在肝癌早期诊断中的应用仍有待于进一步研究和验证。

4 LncRNA

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA,约占 RNA 分子的 68%^[22]。lncRNA 可与转录因子相互作用影响其与靶基因的结合,也可参与染色质重排发挥增强子作用或作为分子海绵与 miRNA 或蛋白结合,在转录、转录后及翻译等多个水平发挥其调控作用^[23]。在肝癌中,与 miRNA 类似,lncRNA 也可参与细胞增殖分化及凋亡、上皮间充质转化、侵袭和转移等多个肿瘤生物学过程^[24]。

研究表明,多个 lncRNA 在肝癌表达异常或功能失调,如 *HOTAIR*、*MALAT-1*、*HOTTIP*、*H19*、*UCA1*、*HULC*、*GAS5*、*MEG3* 等^[25]。其在肝癌中表达水平的差异为其作为候选诊断标记物提供了可能。例如,*HEIH* 作为一种原癌 lncRNA,不仅在肝癌肝组织中高表达,其在 HCV 相关肝癌患者血清中表达也异常升高^[26]。Xu 等研究了两种血清外泌体 lncRNA *ENSG00000258332.1* 和 *LINC00635* 用于肝癌诊断的准确性。研究发现,与 CHB 患者及肝硬化患者相比,这两种血清外泌体 lncRNA 在肝癌患者血清中均呈高表达。其中,*ENSG00000258332.1* 从 CHB 患者中诊断肝癌的敏感性为 71.6%,特异性为 83.4%,AUC 为 0.719;而

LINC00635用于诊断的敏感性为76.2%,特异性为77.7%,AUC为0.750,均优于AFP(敏感性为54.7%,特异性为75.3%,AUC为0.666),而三者联合用于诊断AUC可达0.894(敏感性为83.6%,特异性为87.7%)^[27]。这些发现表明利用lncRNA作为无创诊断标记物具有广阔的应用前景。lncRNA应用于肝癌早期诊断有待更多大样本临床研究进行验证。

5 蛋白标记物

AFP仍然是目前应用最广泛的肝癌诊断标记物,以20 ng/mL为诊断阈值用于早期肝癌诊断,只有大约1/3患者可以得到诊断。其低敏感性限制了其作为早期肝癌筛查标记物的应用价值。而以较低诊断阈值用于早期肝癌诊断,AFP可能获得更好的敏感性,因此确定AFP的最优诊断阈值仍有待于更多研究证据。为提高AFP的诊断准确性,AFP可与其他诊断指标联合应用。除AFP以外,其他用于肝癌诊断的蛋白标记物也得到了广泛研究。

AFP具有3种糖化类型,与扁豆凝集素的结合能力不同,分别为AFP-L1、AFP-L2和AFP-L3。其中,AFP-L3仅来源于肿瘤细胞,因此被认为对于肝癌具有更好的特异性。AFP-L3的水平与AFP水平高度相关,但由于其更高的特异性,可用于AFP的替代检测。在一项纵向研究中,研究者发现AFP-L3对于早期肝癌的诊断效能并不优于AFP(AUC 0.77 vs 0.73),而AFP和AFP-L3联合检测可获得更好的诊断效能(AUC 0.83),以AFP 5 ng/mL及AFP-L3 4%为诊断截点,二者联合检测的敏感性和特异性可分别达到79%和97%^[28]。

维生素K缺乏或拮抗剂Ⅱ诱导蛋白(protein induced by vitamin K absence or antagonist-Ⅱ, PIVKA-Ⅱ)是因维生素K缺乏诱导产生的一种异常凝血酶原。在肝细胞恶性转化过程中,维生素K依赖羧化酶系统功能受损,诱导了PIVKA-Ⅱ的产生^[29]。在肝癌发生过程中,其水平显著升高,因此可作为早期肝癌的筛查标记物。在一项来自国内的队列研究中,Wu等发现PIVKA-Ⅱ诊断肝癌的效能优于AFP(敏感性76.92% vs 64.34%,特异性

86.26% vs 73.28%),血清PIVKA-Ⅱ的水平与肿瘤大小、分化程度及BCLC分期等均显著相关,而对于早期肝癌的诊断,联合PIVKA-Ⅱ(AUC 0.812)和AFP(AUC 0.797)可得到更高的诊断效能(AUC 0.849)^[30]。

高尔基蛋白73(Golgi protein-73, GP73)是一种2型高尔基体特异性膜蛋白,广泛表达于各种组织上皮细胞中,而肝细胞中表达量较少。然而在肝癌患者中,血清GP73水平显著升高^[31]。Jing等的研究发现GP73诊断肝癌的敏感性和特异性分别为92.31%和83.87%,阳性预测值为87.8%,阴性预测值为89.7%,具有较高的诊断价值^[32]。

鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCCA)是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的成员,广泛表达于鳞状上皮中。其在上皮来源的肿瘤中呈高表达,可使肿瘤细胞逃避凋亡^[33]。由于SCCA的表达是肿瘤细胞去分化的结果,因此被认为是肝癌的潜在标记物。Yu等的一项荟萃分析发现,SCCA诊断肝癌的敏感性为0.61,特异性为0.80,AUC为0.76^[34]。此外,在肿瘤发生的早期,由于SCCA的表达升高,其可与IgM结合形成免疫复合物(SCCA-IgM)。Liu等的一项荟萃分析发现,对于肝癌的诊断,SCCA-IgM的准确性与SCCA相当(0.77 vs 0.80),但其与AFP联合应用可获得更高的诊断准确性(AUC 0.90)^[35]。

6 小结与展望

肝癌起病隐匿,大多数患者在确诊时已错过手术或治疗最佳时机^[36]。因此,肝癌的筛查和早期诊断对于治疗和预后具有十分重要的意义。由于肝癌高度的异质性,传统的诊断手段具有一定的局限性。随着分子生物学的不断发展,我们得以从分子层面窥见肝癌更微观的生物学特征。高通量测序、RT-PCR、芯片技术等分子诊断技术的发展使我们能够检测遗传及表观遗传学上DNA、RNA及蛋白水平的改变,并开发新的无创诊断标记物。本文中,我们主要从肝癌相关基因、DNA甲基化标记物、miRNA、lncRNA,以及蛋白标记物等方面展现了当前肝癌分子诊断标记物的研究进展。上述研究中我们可以看出,不同类型诊断标记物分别具有不同的临床应用特点,可分别用于

肝癌的早期诊断、治疗方案选择、预后判断、复发预测等方面。同时,不同类型肝癌诊断标记物之间的联合应用,可增加它们的诊断效能。然而,尽管与传统诊断标记物相比,许多新型分子诊断标记物展现出更好的诊断效能,具有较好的转化价值和临床应用前景,但仍需要大量高质量的临床研究进行验证,为更好的临床应用提供坚实的证据和更优的联合策略。因而,发掘更多的特异性分子诊断标记物并加以验证,充分利用这些标记物的优势,取长补短,为肝癌的临床诊断、疗效监测、预后判断等服务,仍是当前一段时间临床研究的重要方向。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(12): 886-895.
- [3] Goldberg DS, Taddei TH, Serper M, et al. Identifying barriers to hepatocellular carcinoma surveillance in a national sample of patients with cirrhosis [J]. Hepatology, 2017, 65(3): 864-874.
- [4] Khalid A, Hussain T, Manzoor S, et al. PTEN: A potential prognostic marker in virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. Tumor Biology, 2017, 39(6): 1010428317705754.
- [5] Chen D, Li Z, Cheng Q, et al. Genetic alterations and expression of PTEN and its relationship with cancer stem cell markers to investigate pathogenesis and to evaluate prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Clinical Pathology, 2019, 72(9): 588-596.
- [6] Liao X, Yu T, Yang C, et al. Comprehensive investigation of key biomarkers and pathways in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Cancer, 2019(23): 5689-5704.
- [7] Tsuchiya H, Amisaki M, Takenaga A, et al. HBx and c-MYC Cooperate to Induce URI1 Expression in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma [J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(22): 5714.
- [8] Ha HL, Kwon T, Bak IS, et al. IGF-II induced by hepatitis B virus X protein regulates EMT via SUMO mediated loss of E-cadherin in mice [J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56944-56957.
- [9] Kisiel JB, Dukek BA, VSR Kanipakam R, et al. Hepatocellular Carcinoma Detection by Plasma Methylated DNA: Discovery, Phase I Pilot, and Phase II Clinical Validation [J]. Hepatology, 2019, 69(3): 1180-1192.
- [10] Zheng Y, Hlady RA, Joyce BT, et al. DNA methylation of individual repetitive elements in hepatitis C virus infection-induced hepatocellular carcinoma [J]. Clinical epigenetics, 2019, 11(1): 145.
- [11] Sun FK, Sun Q, Fan YC, et al. Methylation of tissue factor pathway inhibitor 2 as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2016, 31(2): 484-492.
- [12] Li F, Qiao CY, Gao S, et al. Circulating cell-free DNA of methylated insulin-like growth factor-binding protein 7 predicts a poor prognosis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. Free Radical Research, 2018, 52(4): 455-464.
- [13] Tao LP, Fan XP, Fan YC, et al. Combined detection of insulin-like growth factor-binding protein 7 promoter methylation improves the diagnostic efficacy of AFP in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. Pathology - Research and Practice, 2018, 214(1): 144-150.
- [14] Zhao NH, Qian Y, Wu CS, et al. Diagnostic value of NKG2D promoter methylation in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. Biomarkers in Medicine, 2019, 13(13): 1093-1105.
- [15] Stavast CJ, Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation [J]. Cells, 2019, 8(11).
- [16] Dai M, Li L, Qin X. Clinical value of miRNA-122 in the diagnosis and prognosis of various types of cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 17(4): 3919-3929.
- [17] Han J, Li J, Qian Y, et al. Identification of plasma miR-148a as a noninvasive biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2019, 43(5): 585-593.
- [18] Jin X, Cai C, Qiu Y. Diagnostic Value of Circulating microRNAs in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. J Cancer, 2019, 10(20): 4754-4764.
- [19] Xu X, Tao Y, Shan L, et al. The Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma [J]. J Cancer, 2018, 9(19): 3557-3569.
- [20] Jun L, Yang G, Zhisu L. The utility of serum exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 1221-1227.
- [21] Wang Y, Zhang C, Zhang P, et al. Serum exosomal microRNAs combined with alpha-fetoprotein as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Med, 2018, 7(5): 1670-1679.
- [22] McDonel P, Guttman M. Approaches for Understanding the Mechanisms of Long Noncoding RNA Regulation of Gene Expression [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11(12).

耳聋基因突变检测国家参考品的研制

于婷 孙楠 曲守方* 黄杰*

[摘要] **目的** 建立耳聋基因突变检测国家参考品。**方法** 收集健康人及含20种不同耳聋基因突变位点的志愿者血清,通过Sanger测序,从中筛选出野生型和突变型的血清样本,分装制备成一套含23份样本的候选耳聋基因突变检测国家参考品。用6个厂家8个耳聋基因突变检测试剂盒对参考品进行验证。参考品的均匀性和稳定性通过联合探针锚定聚合测序法进行检测。**结果** 各家试剂对大部分参考品的验证结果基本一致。本实验室对参考品在验证过程中新出现的突变位点进行了测序确认。参考品的均匀性和稳定性满足要求。**结论** 通过协作验证以及均匀性、稳定性评价,该耳聋基因突变检测国家参考品可用于耳聋基因突变检测试剂盒的质量评价。

[关键词] 耳聋基因突变;国家参考品;微阵列芯片法;飞行时间质谱法;联合探针锚定聚合测序法;荧光PCR法

Development of national reference for deafness gene mutation detection

YU Ting, SUN Nan, QU Shoufang*, HUANG Jie*

(The Key Laboratory of Biotechnology Product Test Method and Its Standardization of the Ministry of Health, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a national reference for detection of deafness gene mutations. **Methods** Serum samples from healthy people and volunteers with 20 different mutation sites of deafness gene were collected. And wild type and mutant serum samples were screened out by sanger sequencing, and a set of 23 samples of candidate deafness gene mutation detection was prepared as a National Reference. 8 kinds of deafness gene mutation detection kits from 6 manufacturers were used to verify the candidate reference. The homogeneity and stability of the reference were detected by the combined probe-anchored polymer sequencing method. **Results** The validation results of most reagents for most reference materials were basically the same. Some new mutation sites found in the validation process of reference were sequenced and verified in our laboratory. The homogeneity and stability of candidate reference meets the requirement. **Conclusion** Through the collaborative verification and the evaluation of homogeneity and stability, the national reference for deafness mutation detection can be used for the quality evaluation of deafness mutation detection kit.

[KEY WORDS] National reference material; Deafness gene mutations; Microarray; Time-of-flight mass spectrometry; Combinatorial probe-anchor synthesis; Fluorescent PCR

分子流行病学调查显示,在我国最常见的四个耳聋基因是 *GJB2* 基因、*GJB3* 基因、*SLC26A4* 基因和线粒体 12S rRNA 基因。*GJB2* 基因是中国人 群中常见的非综合征性耳聋致病基因,其中 235delC 是 *GJB2* 基因常见的突变形式。*GJB3* 基因突变可以引起常染色体显性或者隐性遗传性非

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划,2011AA02A115)

作者单位:中国食品药品检定研究院,卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京 100050

*通信作者:曲守方, E-mail: qushoufang@126.com; 黄杰, E-mail: jhuang5522@126.com

注:于婷和孙楠为并列第一作者

综合征型耳聋。*SLC26A4* 基因上 IVS7-2 A>G 突变是中国人前庭水管综合征中的热点突变。线粒体上的 1555 A>G 突变与氨基糖甙类抗生素所致的听力下降密切相关。临床上采用听力筛查与基因检测相结合的方法^[1], 有助于早期发现耳聋型高危患者, 通过及时干预与治疗以降低高危人群的发病率。

目前在临床上, 耳聋基因突变检测的应用已经越来越普遍, 并且随着二胎计划及国人对优生优育认识程度的增加, 该检测项目将会在更大范围推广应用。由于现有耳聋基因检测试剂盒的检测方法多种, 包括微阵列芯片法、飞行时间质谱法、联合探针锚定聚合测序法、荧光 PCR 法等, 如何评价这类试剂盒的性能指标, 保障临床样本检测结果的准确性、有效性。采用耳聋基因突变参考品进行验证是一个比较直接的办法。中国食品药品检定研究院 2016 年起开始研制耳聋基因突变检测性能评估的国家参考品, 涵盖上述 4 个耳聋基因 20 个碱基位点, 为相关试剂盒的注册检测及临床检验室间质评等提供可靠的参考品。

1 材料与方法

1.1 样本

血样来自济宁妇幼保健院、天津华大临检中心、绍兴市妇幼保健院、北京 301 医院和台州医院。

1.2 验证试剂

十五项遗传性耳聋相关基因检测试剂盒(微阵列芯片法)购自北京博奥生物有限公司; 二十项遗传性耳聋基因突变检测试剂盒(飞行时间质谱法)购自广州市达瑞生物技术股份有限公司; 耳聋基因突变检测试剂盒(联合探针锚定聚合测序法)购自华大生物科技(武汉)有限公司; 耳聋易感基因检测试剂盒(PCR+导流杂交法)购自潮州凯普生物化学有限公司; 先天性耳聋基因检测试剂盒(荧光 PCR 法)、药物性耳聋基因检测试剂盒(荧光 PCR 法)和 PDS 基因检测试剂盒(荧光 PCR 法)均购自济南英盛生物技术有限公司; 4 项耳聋基因检测试剂盒(ARMS-PCR 法)购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.3 主要检测仪器

晶芯® LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪(北京博奥生物有限公司生产并提供)、DR MassARRAY 飞行时间质谱检测系统(广州市达瑞生物技

术股份有限公司生产并提供)、BGISEQ-500 基因测序仪(华大生物科技(武汉)有限公司生产并提供)、HB 2012A 导流杂交仪(潮州凯普生物化学有限公司生产并提供)、ABI 7300 荧光 PCR 仪(美国 ABI 生产, 济南英盛生物技术有限公司提供)、Bio-Rad S1000PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司生产, 中生北控生物科技股份有限公司提供)。

1.4 方法

1.4.1 样本筛选及采集

根据目标检测的 4 个基因(*GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4* 和线粒体 12S rRNA)的 20 个位点(*GJB2* 基因的 c.235 delC、299_300 del AT、c.35 delG、c.176_191 del 16 突变, *GJB3* 基因的 c.538 C>T、c.547 G>A 突变, *SLC26A4* 基因上的 IVS7-2A>G、c.2168 A>G、c.1174 A>T、c.1229 C>T、c.1226 G>A、c.1975 G>C、c.2027 T>A、c.2162 C>T、c.281 C>T、c.589 G>A、IVS15+5G>A 突变, 及线粒体 12S rRNA 基因的 1095 T>C、1494 C>T 和 1555 A>G 突变)的序列设计了 10 对 PCR 扩增引物, 对每个样本进行 PCR 反应, 将获得的基因扩增片段进行 Sanger 测序。确认为野生型或突变类型后, 按照临床外周血采集方法, 采用 EDTA 抗凝真空采血管采集满足要求的外周血(30 mL/人), 于 -80℃ 保存。本研究的临床基本信息收集和临床血样的采集均获得了患者或其家属的同意, 并签署了知情同意书。

1.4.2 国家参考品制备

将含野生型或突变型耳聋基因的外周血样本置于室温融化后混匀, 取 50 μL 血液样本滴加到 903 滤纸上, 血液均匀扩散为圆形, 形成血斑, 自然晾干呈深褐色后, 封装入含有干燥剂的密封袋内, 并贴上标签。混匀全血时应尽量轻柔, 以减少溶血。每次仅制备一个样本的干血片, 以防样本间混淆。样本编号一一核对, 干血片组装为两人复核, 保证组装正确。因部分耳聋基因突变样本未收集到, 暂时采用 DNA 样本, 用 Tris 缓冲液稀释后进行分装, 25 μL/支。

1.4.3 参考品验证

采用 6 个厂家 8 个试剂盒对参考品进行耳聋基因突变位点的验证, 这些试剂包含 6 种检测原理, 各家检测范围不完全一致。根据各企业说明书要求, 对每份样本提取的 DNA 及稀释至 1 ng/μL 的 DNA 进行检测, 若 1 ng/μL 浓度的 DNA 样本未能检出相关的突变位点, 则按照企业说明书声称的

检测限浓度进行复测。对于检测结果,要求应检出试剂盒检测范围内的突变位点;检测范围外的突变位点结果应为野生型。

1.4.4 国家参考品稳定性和均匀性验证

随机取4套参考品,分别于37℃放置1、2、3、4周后,采用联合探针锚定聚合测序法进行检测,上述稳定性数据同时作为均匀性数据。

2 结果

2.1 参考品组成

共筛选出18个位点突变阳性的临床样本及3例阴性样本(上述20个位点均为野生型)。因SLC26A4基因的1229位点(19号样本)和线粒体1494位点(20号样本)突变的阳性样本未收集到,只能采用DNA样本,用Tris缓冲液稀释后进行分装,25 μL/支,最终形成23份/套的耳聋基因突变检测国家参考品,具体样本信息表详见表1。

表1 耳聋基因突变检测国家参考品样本信息表
Table 1 The information list of the national reference material of detection of deafness gene mutations

基因	位点	国家参考品编号
GJB2	c.35 del G	P01
	c.176_191 del16	P02
	c.235 del C	P03
	299_300 del AT	P04
GJB3	c.538 C>T	P05
	c.547 G>A	P06
SLC26A4	c.281 C>T	P07
	c.589 G>A	P08
	IVS7-2 A>G	P09
	c.1174 A>T	P10
	c.1226 G>A	P11
	IVS15+5 G>A	P12
	c.1975 G>C	P13
	c.2027 T>A	P14
	c.2162 C>T	P15
	c.2168 A>G	P16
c.1229 C>T	P19	
12S rRNA	c.1095 T>C	P17
	c.1555 A>G	P18
	c.1494 C>T	P20

2.2 国家参考品验证结果

对于试剂盒检测范围内的突变位点,大部分试剂盒均能检出样本的突变位点,但以下样本,出现双突变位点或三突变位点情况:P4,除已知突变位点外,多数试剂还检出299_300 del AT;P10、P11、P17,除已知突变位点外,多数试剂还检出IVS7-2杂合突变;P19情况最复杂,各家结果不一,厂家1和厂家5-2除已知突变位点外,还检出IVS7-2杂合突变,厂家2仅检出已知突变,经其测序验证无SLC26A4:IVS7-2A>G。厂家3采用2种方法通过2次试验,均检出c.1229C>T杂合突变,但IVS7-2A>G位点在不同检测浓度检测结果不一致:采用测序法,P19样本DNA原浓度未检出,稀释至1 ng/μL后可检出,详见表2;当采用飞行时间质谱法,均出现IVS7-2突变碱基峰,但低于野生型峰。厂家4采用的是PCR+导流杂交法,检出了3个位点突变情况,包括1229M杂合突变、IVS-M杂合突变以及299M杂合突变。厂家5-1、5-3以及厂家6,1229C>T和IVS7-2A>G均不在其检测范围内,均表现为野生型;对于P9、P14、P16,厂家4检出了1555突变,但经测序验证均无1555突变。

表2 厂家3采用测序法测定的P19样本SLC26A4基因IVS7-2A>G突变位点结果

Table 2 Results of IVS7-2A>G mutation site of SLC26A4 gene in P19 sample determined by manufacturer 3 with sequencing method

样本编号	结果类型	第1次	第2次
P19-原浓度	检测结果	AA	AA
	突变类型	野生型	野生型
	分型深度	16478;3954	13691;3250
P19-1 ng/μL	检测结果	AG	AG
	突变类型	杂合突变	杂合突变
	分型深度	14394;4805	11469;3708
	分型质量	99	99

对于不同检测浓度样本,大部分厂家的试剂均可检出,仅厂家6在检测1 ng/μL浓度的参考品样本时,部分未检出,按照试剂盒的检出限稀释样本至5 ng/μL时,可检出。

最终:本批次国家参考品协作验证的全部结果汇总见下表3。

表3 耳聋基因突变检测国家参考品验证结果汇总表

Table 3 The summary of validation results for the national reference material of detection of deafness gene mutations

样品	厂家1	厂家2	厂家3	厂家4	厂家5-1	厂家5-2	厂家5-3	厂家6
P01	√	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P02	√	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	√	范围外,野生型
P03	√	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	√	√
P04	双杂, c.176_191 del16 杂合突变	双杂, c.176_191 del16 杂合突变	双杂, c.176_191 del16 杂合突变	双杂, c.176_191 del16 杂合突变	范围外,野生型	范围外,野生型	双杂, c.176_191 del16 杂合突变	范围外,野生型
P05	√	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P06	范围外,野生型	√	√	范围外,野生型	范围外,	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P07	范围外,野生型	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P08	范围外,野生型	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P09	√	√	√	双杂,1555 异质突变	范围外,野生型	√	范围外,野生型	√
P10	双杂, IVS7-2 杂合突变	双杂, IVS7-2 杂合突变	双杂, IVS7-2 杂合突变	c.1174 A>T 为范围外,野生型, IVS-M 杂合突变	范围外,野生型	双杂, IVS7-2 杂合突变	范围外,野生型	c.1174 A>T 为范围外,野生型, IVS7-2 杂合突变
P11	双杂, IVS7-2 杂合突变	双杂, IVS7-2 杂合突变	双杂, IVS7-2 杂合突变	c.1226 G>A 为范围外,野生型, IVS-M 杂合突变	范围外,野生型	c.1226 G>A 为范围外,野生型, IVS7-2 杂合突变	范围外,野生型	c.1226 G>A 为范围外,野生型, IVS7-2 杂合突变
P12	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P13	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P14	√	√	√	1555 异质突变	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P15	范围外,野生型	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型	范围外,野生型
P16	√	√	√	双杂,1555 异质突变	范围外,野生型	√	范围外,野生型	范围外,野生型
P17	c.1095 T>C 为范围外,野生型; IVS7-2 杂合突变	双杂, IVS7-2 杂合突变	双杂, IVS7-2 杂合突变	c.1095 T>C 为范围外,野生型; IVS-M 杂合突变	范围外,野生型	c.1095 T>C 为范围外,野生型; IVS7-2 杂合突变	范围外,野生型	c.1095 T>C 为范围外,野生型; IVS7-2 杂合突变
P18	√	√	√	√	√	范围外,野生型	范围外,野生型	√
P19	双杂, IVS7-2 杂合突变	√	双杂, IVS7-2 杂合突变?	三杂, 1229 M 杂合突变, IVS-M 杂合突变, 299M 杂合突变	范围外,野生型	双杂, IVS7-2 杂合突变	范围外,野生型	范围外,野生型
P20	双杂, 235 杂合突变	双杂, 235 杂合突变	双杂, 235 杂合突变	双杂, 235 杂合突变	√	范围外,野生型	1494 C>T 为范围外,野生型; 235 杂合突变	双杂, 235 杂合突变

注：“√”代表突变位点检出；“范围外,野生型”代表突变位点不在试剂盒检测范围内,结果显示为野生型；“?”代表不确定；“双杂”代表具有两个突变位点；“三杂”代表具有三个突变位点；“双/三杂, **杂合突变”代表除检出已知突变位点,还检出1或2个突变位点。

2.3 参考品稳定性结果

对37℃放置1、2、3、4周后的参考品进行检测,结果显示,该4套参考品的突变位点的检测结果与该公司检测正常保存样本结果一致。后在使用过程中,将定期对该国家参考品进行期间核查及长期稳定性研究。

2.4 国家参考品各位点汇总及质量标准的确定

通过6个厂家8个试剂盒的验证,最终确认耳聋基因突变检测国家参考品中:N1~N3未检测到以上20个突变位点。P4增加c.176_191 del 16位点缺失突变,P10、P11和P17增加IVS7-2 A>G位点突变,P20增加c.235 del C缺失突变。各家对P19样本中的IVS7-2 A>G位点检测结果存在一定争议,分析可能存在杂合突变或者样本被污染。最终P19定为:若c.1229 C>T为试剂盒检测范围内的位点,可仅检出该突变。不对IVS7-2 A>G缺失突变作要求。此外,因P19和P20样本未采集到血样,采用的是DNA参考品,各家测定浓度差异较大。因此在实际检测之前,需对两样本的DNA浓度进行测定,若浓度低于试剂盒声称的检测限,允许检测范围内的位点检测结果为野生型。

通过以上结果确认采用此套参考品的质量标准:试剂盒检测范围内的位点应检出;检测范围外的位点应为野生型。DNA参考品(P19和P20)浓度若低于试剂盒声称的检测限,允许检测范围内的位点检测结果为野生型。P19参考品,若1229 C>T为试剂盒检测范围内的位点,可仅检出该突变。

3 讨论

耳聋是人类最常见的感觉缺陷型疾病之一。耳聋的致病因素主要有环境因素、遗传因素,或二者共同存在,据报道有超过65%的耳聋是由遗传缺陷引起的^[2-5]。我国每年新增约30 000例先天性耳聋患儿^[6]。大部分为重度、极重度感音神经性耳聋,这严重影响了患者的交流和认知能力,也对个人、家庭及社会造成了巨大的经济和生活负担,所以耳聋早期诊断、早期干预和早期治疗的工作非常重要。

目前已有注册证的各类耳聋基因突变检测试剂盒有多种^[7-12],因其方法原理不尽相同,试剂盒的准确性、特异性、检测限等性能必然有所差异,这些差异会不会对临床结果有影响?有效评价方法之一,就是建立耳聋基因突变检测参考品。根据《医疗器械监督管理条例》《体外诊断试剂注册

管理办法》(国家食品药品监督管理总局令第5号)精神,将“组织体外诊断试剂国家标准品、参考品的制备和标定工作”的责任主体明确为中检院,以及参考上述研究背景,我院开展了耳聋基因突变检测国家参考品的研制工作。通过分子流行病学调研,采集了我国最常见的耳聋基因为GJB2基因、GJB3基因、SLC26A4基因和线粒体12S rRNA基因相关突变位点阳性的外周血,制备成国家标准品。6个厂家8个试剂盒的协作验证,大部分参考品的各突变位点均能被检出,而且部分参考品还检出了新的突变位点。一方面表明国家标准品适用性良好,另一方面,新突变位点的检出应是受限于所选用的方法和现有的认识,在研制的时候,不一定能完全给出其全部突变位点信息,通过协作验证,使得参考品的突变位点信息更为完善。验证过程中,也发现存在一些问题,某检测试剂在多个参考品中检出了12S rRNA的1555 A>G位点的突变,而测序结果表明无该位点突变。这就需要该检测试剂厂家主动找原因进行分析,是试验过程中污染还是试剂设计问题?对于3个阴性样本(N1~N3),限于目前技术原因和认识水平,目前只确认此20个突变基因位点为野生型,但不排除有其他突变基因位点存在,这个将随着参考品在实际应用过程中及时进行更新。

从DNA测序技术应用在遗传性耳聋的分子病因检测以来,已经发现超过220个耳聋基因^[13],而且最新的遗传信息学表明,与遗传性聋相关的基因达300~500个^[14]。但多数相关基因突变所致的发病率并不高,因此要制备数量如此多的以全血为基质的耳聋基因国家参考品盘,必然是一个耗时和昂贵的工程。但就目前来说,这套国家参考品突变位点虽仅为20个常见突变位点,但也基本涵盖了市场上所有具有注册证的耳聋基因突变检测试剂盒所检测的突变位点类型,可以满足评价现阶段各试剂盒基本性能的要求,并且将在今后根据需要逐步扩充新的耳聋基因突变位点。这套参考品必将为我国耳聋的早期防治工作发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 周学军, 欧阳小梅, 刘学忠. 常见遗传性聋致病基因研究进展及基因诊断的临床应用[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2011, 19(1): 73-77.

(下转第15页)

广州市地区 7 234 例新生儿耳聋基因突变分析

李玛¹ 叶燕绸² 何国炜¹ 董慧敏¹ 李林¹ 胡波¹ 章钧^{2*}

【摘要】 目的 分析广州地区 7 234 例新生儿 4 个常见遗传性耳聋基因热点突变情况,为广州地区遗传性耳聋的防治提供依据。方法 收集广州市天河区中山大学附属第三医院 2015 年 6 月至 2019 年 1 月分娩的 7 234 例新生儿脐带血液标本进行耳聋基因热点检测,基因突变新生儿行 Sanger 测序验证及基因外显子测序。结果 检测到耳聋基因突变携带者 266 例(3.68%),其中 *GJB2* 基因突变 159 例(22.0%), *SLC26A4* 基因突变 85 例(1.18%)。在 266 例的基因携带者中,*GJB2* c.235delC 杂合突变占 49.6%(132/266), *SLC26A4* IVS7-2A>G 突变占 28.2%(75/266),其余位点占 22.2%。携带者一代测序验证结果与耳聋基因筛查结果一致,基因外显子测序中发现有 3 名双重突变患儿,两例为 *GJB2* c.235 del C 与 *GJB2* c.109G>A 双重杂合突变患儿,另一例为 *SLC26A4* IVS 7-2 A>G 与 *SLC26A4* c.1983C>A 双重杂合突变患儿,3 例患儿经父母血液标本验证,双重杂合位点分别遗传自父母。结论 本研究 7 234 例新生儿耳聋基因筛查中,*GJB2* 基因突变频率最高,其次是 *SLC26A4* 基因,为耳聋儿童的早期发现与早期干预提供参考与指导。现行热点突变检测位点可能漏检其他突变位点,可根据本地检测情况调整或者制定适合本地的筛查方案。

【关键词】 新生儿耳聋基因筛查;热点突变;*GJB2*基因;*SLC26A4*基因;Sanger 测序

Screening and analysis of deafness gene mutations among 7 234 newborns in Guangzhou area

LI Ma¹, YE Yanchou², HE Guowei¹, DONG HuiMin¹, LI Lin¹, HU Bo¹, ZHANG Jun^{2*}

(1. The third affiliated hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630; 2. Obstetric Laboratory of the Third Affiliated Hospital of Sun Yat sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the spectrum and incidence of 4 hot-pot deafness gene mutations, and establish a suitable screening and diagnosis program of hereditary deafness in Guangzhou. Methods

We collected the cord blood samples of 7 234 newborns in the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from June 2013 to January 2018. The hot-pot deafness gene mutations, were detected by polymerase chain reaction and microarray. Results 266 cases (3.68%) with deafness gene mutation were detected, including 159 cases (22.0%) with *GJB2* gene mutation and 85 cases (1.18%) with *SLC26A4* gene mutation. Among 266 positive gene mutation, *GJB2* c. 235 del C heterozygous mutation accounted for 49.6% (132 / 266), *SLC26A4* IVS7-2 A>G mutation accounted for 28.2% (75 / 266), and the rest accounted for 22.2%. The results of the first generation sequencing of positive gene mutation were consistent with the results of deafness gene screening. Three children with double mutation were found in exon sequencing, two children with *GJB2* c.235 del C and *GJB2* c.109 G > A double heterozygous mutation, the other one with *SLC26A4* IVS 7-2 A > G and *SLC26A4* c.1983c>a double heterozygous mutation. Three children with double heterozygous mutation were identified by their parents' blood samples. Conclusion The *GJB2* and *SLC26A4* mutations are the main mutation genes. It can provide the reference and guidance for early detection and intervention of newborn with deafness. The current hot-spot mutation detection sites may miss other mutation sites, which can be adjusted according to the local detection situation or develop a suitable screening program.

【KEY WORDS】 Hereditary deafness gene screening; Hot mutations; *GJB2*; *SLC26A4*; Sanger sequencing

基金项目:广州市科技产学研协同创新重大专项(201704020114)

作者单位:1. 中山大学附属第三医院检验科,广东,广州 510630

2. 中山大学附属第三医院产科实验室,广东,广州 510630

*通信作者:章钧, E-mail: 16879288@qq.com

我国每年约有2 000万新生儿出生,新生儿先天性耳聋的发生率在0.93%~7.7%不等^[1],新生儿中耳聋基因携带率达4.70%^[2]。我国耳聋出生缺陷严峻,每年约有4万聋儿出生,导致耳聋的因素很复杂,包括遗传因素、环境因素等。环境因素导致的耳聋随着社会的发展和国民保健水平的提高得到了很大的改善。遗传因素逐渐成为耳聋患儿出生的主要原因,流行病学研究发现中国人群的耳聋主要由*GJB2*、*SLC26A4*、线粒体12S rRNA等基因突变引起,但不同的地区热点突变存在差异^[3-4]。本研究采用微阵列基因芯片技术,对本院新出生的7 234名新生儿开展*GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4*和线粒体12S rRNA的4个基因9个热点的耳聋基因检测,并对266例携带者进行位点验证及基因外显子测序,为基因突变携带者或患者提供监控预防指导以及父母再生育的遗传咨询,对其他位点的挖掘以期建立一套适合本地区的筛查及诊断方案。

1 材料与方法

1.1 标本采集与DNA提取

经患者知情同意后,采集本院产科2015年6月至2019年1月分娩分娩的7 234例新生儿脐带血2 mL,EDTA.K2抗凝剂抗凝。使用DNA提取试剂盒按说明书进行DNA提取,测定DNA样本的OD260 nm/OD280 nm比值应在1.6~2.0之间,OD260 nm/OD230 nm比值需 ≥ 2.0 , -20°C 保存备用。

1.2 试剂与仪器

DNA提取试剂盒:Qiamp mini kit, Qiagen(德国,货号:51306)基因检测试剂盒:晶芯®九项遗传性耳聋基因检测芯片试剂盒,博奥生物有限公司(北京,货号:300065)PCR master mix 试剂盒: Takara(日本,货号:9152A);离心机:Eppendorf,(5424R 德国);PCR扩增仪:ABI9700(美国);芯片杂交仪:晶芯 BioMixer II(博奥生物有限公司,北京);芯片扫描仪:晶芯®LuxScanTM10K-B(博奥生物有限公司,北京)。

1.3 耳聋芯片检测与结果解读

采用晶芯®九项遗传性耳聋基因检测芯片试剂盒检测与分析常见的9个非综合征型耳聋基因突变热点。简明操作流程为PCR反应、杂交与洗片、芯片扫描判读。芯片杂交结果经扫描后在同位点中探针W出现阳性信号,判读为该位点野生型;M出现阳性信号,判读为该位点纯合突变型;两者均出现阳性信号,判读为该位点杂合突变型。对于线粒体12S rRNA基因突变位点,M出现阳性信号判读为同质突变,两者均出现阳性信号判读为异质突变。

1.4 PCR测序验证

根据基因芯片扫描检出的阳性突变位点分别进行PCR扩增验证。PCR引物采用Primer 3.0在线引物设计软件设计并由上海生物工程公司合成,引物序列、退火温度及扩增片段长度,见表1。PCR反应体系采用PCR master mix 试剂盒按说明

表1 引物列表

Table1 *GJB2*、*SLC26A4*、Mitochondria 12 SRNA Primers list

引物名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(°C)
GJB2	TTGGTGTTCGCTCAGGAAGA	GGCCTACAGGGGTTTCAAAT	960	58
SLC26A4-1	CTCCGATCGTCTCGCTTACCG	CGAGACTGATGGAGCCACCCCTC	424	58
SLC26A4-2	GCAAATTGGTTGTGACTGAG	GAAGGGTAAGCAACCATCTGTCCAC	294	58
SLC26A4-3	CCATTGTAAGTTGAGGACTTTCTG	CCAACCTAATAGAGGTATAATGCAC	272	58
SLC26A4-4	CCTATGCAGACACATTGAACATTTG	TGAGCCTTAATAAGTGGGGTCTTG	442	58
SLC26A4-5	GGTTTCTATCTCAGGCAAACAT	ATTGTTTCTGGAATGAACAGTGACC	270	58
SLC26A4-6	CATGGTTTTTCATGTGGGAAGATTC	AGACTGACTTACTGACTTAATGT	502	58
SLC26A4-7	GTGGTCAAATCTTCACAGCA	CCCTTCTTTAGCTGACACCA	283	58
SLC26A4-8	AAATACTCAGCGAAGGTCTTGC	CGAGCCTTCTCTGTTGC	250	58
SLC26A4-9	TTTTATAGGTAGTTATCACATGATGG	TGGTATAAGGAAGCTCAGAGTGTGTT	245	58
SLC26A4-10	CAAAACACCAGAATGATGGGCTC	CGTAAAATGGAGCTGCTGAAACTTC	245	58
SLC26A4-11	AGTTGAGTGCTGCTACCCAGCTC	GCTATTCCCTGATTGGACC	312	58
SLC26A4-12	TTGAGAAATAGCCTTTCCAGAT	GACCCCTAAGTCTCTCATCA	250	58
SLC26A4-13	CCAAGGAACAGTGTGTAGGTC	CCCATGTATTTGCCCTGTTGC	423	58
SLC26A4-14	GCTGGATGTTGCCATCTCTTGAG	CCACAGTCCCAGATAGGAGAAAGG	335	58
SLC26A4-15	TCACTTGAAGTTGGGACGCGGA	CAACAGCTAGACTAGACTTGTG	383	58
SLC26A4-16	CAGTTCACCTTTCAATGTGC	TGCTATGAAGCCATCTTTTCTGC	418	58
SLC26A4-17	ACACCTAAGATGAGTAGCAG	CTAGAAGCAGTCTTAGTGCT	282	58
MT	CGCCATCTTCAGCAAACCCT	TGCGCCAGGTTTCAATTTCTATC	511	58

书进行扩增,产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定后纯化测序,测序结果使用chromas软件(Technelysium, Australia)分析。

2 结果

2.1 耳聋基因芯片检测结果

7 234名普通新生儿中筛查出基因突变数为266,人群携带率为3.68%(266/7 234)。*GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4*和线粒体12S rRNA基因携带率见表2。*GJB2* c.235 del C、*SLC26A4* IVS7-2 A>G、*GJB2* c.299 del AT、线粒体12S rRNA 1555 A>G、*SLC26A4*: c.2168 A>G、*GJB3* c.538 C>T、*GJB2* c.176 del 16 1.9%、*GJB2* c.35 del G和线粒体12S rRNA 1494 C>T各突变频率,见表3。

表2 7 234例样本中4个突变基因的人群携带率 [n(%)]

突变所在基因	基因突变数	携带率
<i>GJB2</i>	159	2.2
<i>GJB3</i>	8	0.1
<i>SLC26A4</i>	85	1.18
线粒体12S rRNA	14	0.2
总携带率		3.68

表3 9个突变位点突变频率比较 [n(%)]

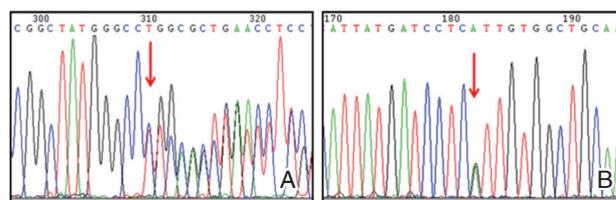
Table 3 Comparison of mutation frequencies in 9 mutations [n(%)]

突变所在基因	突变所在位点	突变位点描述	突变例数	突变频率
<i>GJB2</i>	35	c.35 del G	1	0.3
	176	c.176 del 16	5	1.9
	235	c.235 del C	132	49.6
	299	c.299 del AT	21	7.9
<i>GJB3</i>	538	c.538 C>T	8	3.0
	2168	c.2168 A>G	10	3.8
<i>SLC26A4</i>	IVS 7-2	IVS 7-2 A>G	75	28.2
	线粒体12S rRNA	1494 C>T	1	0.3
	1555	1555 A>G	13	4.9
合计			266	

2.2 DNA测序验证

基因芯片筛查出基因突变数为266例,且9个突变位点均出现阳性病例,在相应基因外显子测序验证过程中发现,基因芯片筛查出的突变位点与测序结果全部符合。2名新生儿发现同一新的位点突

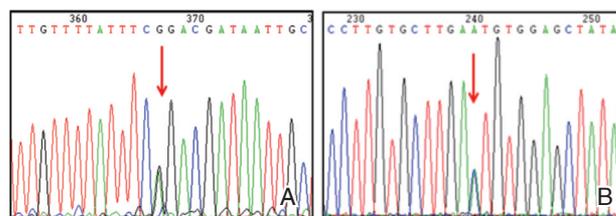
变,即基因芯片检测为*GJB2* c.235 del C杂合突变,测序结果为*GJB2* c.235 del C与c.109 G>A双重杂合突变。病例1中*GJB2* c.109 G>A杂合突变,遗传来源母亲;*GJB2* c.235 del C杂合突变,遗传来源父亲,见图1。病例2中*GJB2* c.109 G>A杂合突变,遗传来源父亲;*GJB2* c.235 del C杂合突变,遗传来源母亲。病例3基因芯片检测为*SLC26A4* IVS 7-2A>G杂合突变,测序结果为*SLC26A4* IVS7-2 A>G与c.1983 C>A双重杂合突变,见图2。该新生儿*SLC26A4* IVS7-2 A>G杂合突变,遗传来源母亲;*SLC26A4* c.1983 C>A杂合突变,遗传来源父亲。



注:A图为*GJB2* c.235 del C,遗传自父亲;B图为*GJB2* c.109 G>A,遗传自母亲。

图1 病例1 *GJB2*基因外显子测序结果

Figure 1 *GJB2* coding sequencing result in patient 1



注:A图为*SLC26A4* IVS7-2 A>G,遗传自母亲;B图为*SLC26A4* c.1983 C>A,遗传自父亲。

图2 病例3 *SLC26A4*基因外显子测序结果

Figure 2 *SLC26A4* coding sequencing result in patient 3

3 讨论

耳聋是人类最常见的感觉神经系统障碍,根据2006年第二次全国残疾人抽样调查,推算出我国有听力残疾2004万人,占残疾人总数的24.16%,其中6~14岁的听力障碍儿童达11万^[5-6]。耳聋已经严重影响了我国的人口素质,增加了国民经济、医疗负担,粗略估计大约有50%的学语前听力障碍都是由遗传因素引起^[7]。*GJB2*是导致遗传性非综合征型耳聋最常见的基因,21%先天性耳聋患者与该基因有关^[8],其次为*SLC26A4*基因14.5%,再次为导致药物中毒性耳聋的线粒

体 12S rRNA 基因突变 4.0%^[9] 及 *GJB3* 基因突变等。本次研究中发现 *GJB2* 基因的突变携带率为 2.2% (159/7 234), 占基因突变数的 59.8% (159/266), c.235delC 杂合突变占 *GJB2* 基因突变的 83% (132/159), 突变频率最高。研究数据与其他学者的研究结果 *GJB2* 基因阳性率 2.6%~3.2%, c.235delC 杂合突变占 *GJB2* 基因突变 54.9%~76.2% 接近^[10-12], 其次 c.299 del AT 杂合突变 13.4%。对携带者进行外显子测序验证中发现 2 名携带 *GJB2* c.235 del C 新生儿同时携带 *GJB2* c.109G>GA 杂合突变, 该突变位点被临床变异位点数据库 (ClinVar)、人类基因突变数据库 (Human Gene Mutation Database, HGMD) 及耳聋变异位点数据库 (Deafness Variation Database, DVD) 数据库中收录, 依据美国医学遗传学与基因组学学会 (The American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 遗传变异分类标准与指南评分^[13], 该变异被分类为“可能致病性”。*GJB2* 导致的非综合征型耳聋为常染色体隐性遗传病, 可能致病位点的纯合突变或者复合杂合突变可引起非综合征型耳聋。两名新生儿电生理耳聋筛查表现为耳声发射和自动听性脑干反应听力筛查未通过, 结合耳聋基因检测结果, 两名新生儿为先天性聋儿。因此, 将对这 2 例新生儿进行病例随访, 以进一步分析 *GJB2* c.109 G>A 在广州市的致聋性, 为广州市下一步开展耳聋基因筛查是否增加 *GJB2* c.109 G>A 做出指导。

SLC26A4 基因突变与 Pendred 综合征 (前庭导水管扩大或伴内耳畸形、神经性聋和甲状腺肿) 和单纯前庭导水管扩大和 (或) 内耳畸形有密切关系^[14-15]。东亚人群中最常见的是外显子 8 上游的 IVS 7-2 A>G 和外显子 19 的 c.2168 A>G 突变类型^[16]。本次研究中发现 *SLC26A4* 基因的突变携带率为 1.18% (85/7 234), 与王秋菊等^[17] 在 460 例新生儿中筛查的 *SLC26A4* 致病基因携带率 1.13% 基本一致, 占基因突变数的 32.0% (85/266)。对携带者进行外显子测序验证中发现 1 名患儿携带 *SLC26A4*: IVS7-2 A > G 同时携带 c.1983 C>A 杂合突变。*SLC26A4* c.1983 C>A 在 ClinVar、HGMD、DVD 数据库中收录, ACMG 遗传变异分类标准与指南评分, 该变异被分类为“可能致病性”, 导致的非综合征型耳聋为常染色体隐性遗传病, 可能致病位点的纯合突变或者复合杂合突变可引起大前厅导水管综合征。临床上早期发现该基因突变患

者, 结合影像资料, 可以通过医生的指导、严格的活动限制和密切的观察来保存患者的残存听力, 避免引起颅内压变化的因素, 例如感冒发热、不健康的生活方式及头部撞击或外伤等^[18]。因此, *SLC26A4* 基因的检测, 对于预防该基因引起的耳聋和耳聋的恶化有很重要的意义。

GJB3 基因突变可导致常染色体隐性遗传性耳聋和常染色体显性遗传性耳聋^[19]。*GJB3* c.538C>T 杂合突变携带者临床可表现为迟发型高频听力下降^[20]。本次研究中 *GJB3* 基因突变的携带率为 0.1% (8/7 234), 占基因突变数的 3.0% (8/266), 建议携带者定期监测听力功能, 尽早发现和干预听力功能下降的问题。

大量研究证实, 线粒体的突变与耳聋密切相关, 确定的与药物性耳聋关系密切的突变是线粒体 12S rRNA 1555A>G 和 1494C>T^[21-23], 突变的个体对氨基糖甙类抗生素耳毒性具有高度的敏感性。由于线粒体的基因突变引起的感音神经性耳聋可以出现在婴幼儿, 少年或成年期, 且应用单次剂量即可导致携带此突变个体的重度听力损失, 不可逆转, 必须尽量避免使用氨基糖甙类抗生素。

广州市天河区单一医院新生儿耳聋基因人群携带率为 3.68%, 与中国人群的携带率基本一致^[24], 新生儿耳聋基因筛查可以有效的筛查出人群中的基因携带者。耳聋基因筛查能够从分子水平发现可能存在听力障碍的新生儿, 基因携带的情况下继续进行基因检测, 能有效发现患儿, 为耳聋儿童的早期发现与早期干预提供参考与指导, 也可为患儿父母的再生育提供优生优育指导。

参考文献

- [1] 王秋菊. 新生儿聋病基因筛查——悄然的革命[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2008, 16(2): 83-88.
- [2] 韩萍, 邵瑜. 北京市海淀区 2012-2014 年新生儿耳聋基因筛查管理现状分析[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2015, 6(3): 62-65.
- [3] 柯肖枚, 路远, 刘玉和, 等. connexin 26 基因突变与国人遗传性无综合征耳聋相关性分析[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001, 36(3): 7-9.
- [4] Liu Y, Hu C, Liu C, et al. A rapid improved multiplex ligation detection reaction method for the identification of gene mutations in hereditary hearing loss[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e215212
- [5] 薛静. 第二次全国残疾人抽样调查最新数据公报[J]. 中国听力语言康复科学, 2007, 5(1): 38.

- [6] 袁慧军,卢宇. 新一代测序技术在遗传性耳聋基因研究及诊断中的应用[J]. 遗传, 2014, 36(11): 1112-1120.
- [7] 丁红珂,尹爱华. 非综合征性遗传性耳聋的基因诊断进展[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2015, 7(4): 48-53.
- [8] Li Q, Dai P, Huang DL, et al. Prevalence of GJB2 mutations in Uigur and Han ethnic populations with deafness in Xinjiang region of China[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, 87(42), 2977-2981.
- [9] 韩明显,戴朴. 我国耳聋基因诊断的临床应用进展[J]. 北京医学, 2011, 33(5): 419-421.
- [10] 杨晶群,余红. 2623例新生儿听力筛查和GJB2基因检测结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(12): 80-81.
- [11] 林彩娟,罗超,李旺,等. 5545例新生儿耳聋基因检测结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(34): 6007-6009.
- [12] 胡华梅,胡华,董艳玲,等. 新生儿中常见的9个耳聋基因突变位点筛查分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(2): 96-98.
- [13] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing [J]. Genet Med, 2013, 15(9): 733-747.
- [14] 彭新,关兵,徐英,等. 扬州市278例非综合征性耳聋患者常见耳聋基因突变检测结果分析[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2013, 13(4): 254-257.
- [15] Yazdanpanahi N, Chaleshtori MH, Tabatabaiefar MA, et al. Two novel SLC26A4 mutations in Iranian families with autosomal recessive hearing loss[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2012, 76(6): 845-850.
- [16] 朱庆文,戴朴,韩东一,等. 河南省安阳市特殊教育学校非综合征型聋生SLC26A4基因突变热点区域的分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(3): 181-183.
- [17] 王秋菊,赵亚丽,兰兰,等. 新生儿聋病基因筛查实施方案与策略研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 42(11): 809-813.
- [18] 赵连爽,陈昕,代娣,等. 沈阳地区非综合征性耳聋患者的基因芯片检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(8): 1018-1019.
- [19] Li Y, Zhu B. Genotypes and phenotypes of a family with a deaf child carrying combined heterozygous mutations in SLC26A4 and GJB3 genes [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 319-324.
- [20] 唐俊湘,孙玉秀,王朝红,等. 2363例新生儿4个常见遗传性耳聋基因突变筛查结果分析[J]. 山东医药, 2015, 55(32): 76-78.
- [21] Tian G, Liu YH, Ma YN, et al. Molecular genetic analysis of mitochondrial DNA C1494T mutation in non-syndromic hearing loss of Chinese population [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2007, 24(4): 464-466.
- [22] Qi L, Ping L, Xue-jun D, et al. A Novel Method for Detection the Deafness - Associated Mitochondrial A1555G and C1494T Mutations [J]. Clin Lab, 2016, 62(3): 477-481.
- [23] Guo YF, Liu XW, Guan J, et al. GJB2, SLC26A4 and mitochondrial DNA A1555G mutations in prelingual deafness in Northern Chinese subjects [J]. Acta Otolaryngol, 2008, 128(3): 297-303.
- [24] Peng Q, Huang S, Liang Y, et al. Concurrent genetic and standard screening for hearing impairment in 9317 Southern Chinese newborns [J]. Genet Test Mol Bio-markers, 2016, 20(10): 603-608.

(上接第10页)

- [2] 崔庆佳,黄丽辉,阮宇,等. 915例新生儿GJB基因筛查单杂合突变测序结果分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(13): 1164-1167.
- [3] Huang S, Huang B, Wang G, et al. The relationship between the GJB3 c. 538 C>T variant and hearing phenotype in the Chinese population [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2017, 102: 67-70.
- [4] CHEN J, WEI Q, YAO J, et al. Identification of two heterozygous deafness mutations in SLC26A4 (PDS) in a Chinese family with two siblings [J]. International Journal of Audiology, 2013, 52(2): 134-138.
- [5] 王蒙,周枫,王兴君,等. 广东地区非综合征型耳聋突变基因流行病学调查[J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(5): 644-648.
- [6] WANG QJ, ZHAO YL, RAO SQ, et al. Newborn hearing concurrent gene screening can improve care for hearing loss: a study on 14 913 Chinese newborns [J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2011, 75(4): 535-542.
- [7] 刘亚兰,汪俊程,邓宇元,等. 荧光PCR法在非综合征型遗传性耳聋基因诊断中的应用研究[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 2016, 22(5): 345-348, 352.
- [8] 袁慧军,卢宇. 新一代测序技术在遗传性耳聋基因研究及诊断中的应用[J]. 遗传, 2014, 36(11): 1112-1120.
- [9] 苏钰,汤文学,代志瑶,等. 目标序列捕获及平行测序在临床耳聋基因诊断中的应用[J]. 中华耳科学杂志, 2014, 12(1): 45-49.
- [10] 王国建,张冠斌,袁永一,等. 十五项遗传性耳聋基因突变微阵列诊断芯片的临床应用研究[J]. 中华耳科学杂志, 2014, 12(1): 6-10.
- [11] 司艳梅,李珊珊,张萌,等. 常见耳聋基因筛查在孕期妇女中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(7): 11-13.
- [12] 赵娟,邹玲仟,冯永,等. 变性高效液相色谱法分析非综合征型耳聋人群SLC26A4基因突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(1): 21-25.
- [13] 袁慧军,卢宇. 新一代测序技术在遗传性耳聋基因研究及诊断中的应用[J]. 遗传, 2014, 36(11): 1112-1120.
- [14] 王秋菊. 精准医学与聋病防控[J]. 中华耳科学杂志, 2015, 13(2): 191-196.

自贡地区HBV基因BCP区1762/1764及前C区1896位点突变与HBV相关性肝癌的相关性研究

邱顺华^{1*} 张德文¹ 刘勇²

[摘要] **目的** 通过分析自贡地区乙肝患者乙型肝炎病毒HBV基因BCP区1762/1764及前C区1896位点的突变情况,探讨其与HBV相关性肝癌的关系。**方法** 收集2015年9月至2018年6月141例经本院确诊的乙肝性相关疾病患者血清标本(HBV DNA $\geq 10^3$ IU/mL):慢性乙肝(CHB组)50例、肝硬化(LC组)45例、肝癌(HCC组)46例,并收集临床相关资料。采用荧光定量PCR法检测患者的HBV DNA水平,多通道荧光PCR法检测HBV基因型,然后采用ARMS-PCR法检测HBV基因BCP区1762/1764及前C区1896突变情况。采用SPSS17.0软件对数据进行统计学分析。**结果** HCC组和CHB组在e抗原阳性率、HBV DNA水平及HBV DNA $>10^5$ IU/mL方面对比发现差异均具有统计学意义($P < 0.05$);HCC组和LC组在e抗原阳性率方面比较发现差异无统计学意义($P > 0.05$),而HBV DNA水平方面差异具有统计学意义($P < 0.05$)。男性、女性乙肝患者HBV基因BCP区1762/1764位点突变率分别为67.0%、57.1%($P > 0.05$),前C区1896位点突变率分别为61.6%、66.7%($P > 0.05$)。HCC组患者、LC组患者、CHB组患者的HBV基因BCP区1762/1764突变率分别为91.3%、84.4%、22%,HCC组与CHB组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),而HCC组与LC组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);HBV基因前C区1896突变率分别为84.8%、62.2%、42.0%,HCC组与CHB组、LC组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。HCC组患者的HBV基因前C区1896和BCP区1762/1764位点同时突变率为78.3%,要高于LC组和CHB组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。HBV基因型方面比较,无论是基因B型还是C型的乙肝相关患者,疾病进程较重(HCC组、LC组)的受试者携带BCP区1762/1764突变型或前C区1896突变型的比例都要高于慢性乙肝患者(CHB组)。**结论** 自贡地区HBV基因BCP区1762/1764和前C区1896突变率高,无性别和基因型差异,其中HBV基因BCP区1762/1764位点和前C区1896位点联合突变与HBV相关性HCC发生可能存在一定关系。

[关键词] 乙型肝炎病毒;BCP区1762/1764;前C区1896;乙肝相关性肝癌

Correlation between HBV gene BCP region 1762/1764 and pre-C region 1896 mutation and HBV-associated liver cancer in Zigong, West China

QIU Shunhua^{1*}, ZHANG Dewen¹, LIU Yong²

(1. Department of Clinical Laboratory, Zigong third people's hospital, Zigong, Sichuan, China, 643020;
2. Department of Cardiology, Zigong third people's hospital, Zigong, Sichuan, China, 643020)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the mutations of HBV gene BCP region 1762/1764 and pre-C region 1896 in patients with hepatitis B in Zigong area, and to explore its relationship with HBV-related liver

基金项目:自贡市卫生和计划生育委员会重点立项项目(自卫办发[2015]70号08);自贡市科技局项目(自科发[2016]39号ZC201609)。

作者单位:1. 自贡市第三人民医院检验科,四川,自贡 643020
2. 自贡市第三人民医院心内科,四川,自贡 643020

*通信作者:邱顺华, E-mail:515603446@qq.com

cancer. **Methods** 141 cases of hepatitis B related diseases with HBV DNA level $\geq 10^3$ IU/mL from September 2015 to June 2018 were collected: 50 cases of chronic hepatitis B (CHB), 45 cases of liver cirrhosis (LC), and 46 cases of HBV HCC. HBV DNA level was detected by fluorescence quantitative PCR, HBV genotype was detected by multi-channel fluorescence PCR, and HBV gene mutations in BCP 1762/1764 and PC 1896 were detected by ARMS-PCR. Software SPSS 17.0 was used for statistical analysis. **Results** There were significant differences in e-antigen (HBeAg) positive rate, HBV DNA level and HBV DNA $>10^5$ IU/mL percent between HCC and CHB group ($P < 0.05$). There was no significant difference in e-antigen positive rate between HCC and LC group ($P > 0.05$), while the difference in HBV DNA level and DNA $>10^5$ IU/mL percent was statistically significant ($P < 0.05$). The mutation rates of male and female hepatitis B patients in the BCP region of the HBV gene at 1762/1764 were 67.0% and 57.1% ($P > 0.05$), and the mutation rates at the 1896 site in the former C region were 61.6% and 66.7% ($P > 0.05$). The 1762/1764 mutation rates in the BCP region of the HBV gene of patients in the HCC group, LC group, and CHB group were 91.3%, 84.4%, and 22.0%, respectively. The difference between the HCC group and the CHB group was statistically significant ($P < 0.05$). And there was no statistically significant difference between the HCC group and the LC group ($P > 0.05$). The 1896 mutation rates in the pre-C region of the HBV gene were 84.8%, 62.2%, and 42.0%, respectively. The PC 1896 mutation rate of HCC was markedly different with that of CHB and LC ($P < 0.05$). In HCC group, 78.3% of patients had both HBV gene PC 1896 mutations and BCP 1762/1764 mutations, which were significantly higher than 48.9% and 0.00% in CHB group and LC group ($P < 0.05$). In chronic HBV infection patients with genotype B and genotype C, the mutation rates of HBV BCP1762/1764 and PC 1896 in LC patients and HCC patients were higher than those in CHB patients. **Conclusion** The mutation rate of HBV BCP 1762/1764 and PC1896 was high in Zigong area, and there was no gender or genotype difference. The combined mutation of HBV gene BCP 1762/1764 and PC1896 may correlate with HBV-HCC.

[KEY WORDS] HBV; BCP1762/1764; Pre-core 1896; HBV related HCC

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)的感染仍是全球性的问题,乙肝病毒感染的三部曲:慢性乙肝(Chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化(liver cirrhosis, LC)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),是严重影响乙肝患者健康和经济的重大疾病。全球约有2.4亿慢性乙肝患者,这也是HCC发生的主要致病因素^[1-2]。HCC是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,发病率居恶性肿瘤的第六位,死亡率居癌症患者死亡原因的第三位^[3]。HCC居自贡地区恶性肿瘤发病率和死亡率的第二位,严重危害当地居民的生命和健康^[4]。

HBV复制要经过逆转录,而逆转录酶缺乏有效的碱基校正修复功能,容易发生自然变异,发生变异后容易对药物耐药及危害加大^[5]。HBV核心启动子(basal core promoter, BCP)区1762/1764突变的HBV较野生型HBV具有更强的复制能力及对药物的低敏感性,与活动性肝炎、肝硬化、HCC、急性肝功能衰竭等相关^[6-7]。HBV前C区(pre-core, PC)1896是HBV的常见变异,是影响药物持

续疗效的一个重要因素^[8]。同时有研究表明HBV BCP区1762/1764突变、前C区1896位点突变与乙肝患者病情正相关^[9],但也有报道这些HBV基因突变与HCC的关系存在争议。HBV基因型的分布存在着地理性差异,与HCC的关系尚未完全明确^[10]。

本文对自贡地区CHB、LC和HCC患者的HBV基因型、BCP区1762/1764及前C区1896位点基因突变进行检测,探索HBV基因型及基因突变与本地区HCC的关系,对指导自贡地区HBV相关性HCC的临床早期诊断与提前干预提供一定的科学依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料

标本收集本院2015年9月至2018年6月门诊和住院患者,经本院确诊的乙肝性相关疾病患者:慢性乙肝患者(CHB组)50例,肝硬化(LC组)45例,肝癌(HCC组)46例,且患者血清HBV-DNA水平 $\geq 10^3$ IU/mL,男性患者99例,女性患者42例,平

均年龄(52.57±12.44)岁,其中HCC组、LC组、CHB组患者的平均年龄分别为(56.54±12.15)岁、(55.80±9.17)岁、(46.00±12.76)岁。乙肝相关疾病患者的诊断根据《慢性乙型肝炎诊断标准(2015年版)》^[11]。排除标准:①重叠或合并感染其他肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒;②转移性肝癌;③其他非HBV感染导致的肝癌;④伴有其他恶性肿瘤病史。

1.2 仪器与试剂

主要仪器:SLAN-96P实时荧光定量PCR仪(上海宏石医疗科技有限公司),生物安全柜(博科控股集团有限公司),冷冻高速离心机TGL-16R(珠海黑马医学仪器有限公司)。试剂:乙型肝炎病毒前C区1896位点基因突变检测试剂盒和乙型肝炎病毒BCP区1762/1764位点基因突变检测试剂盒由武汉百泰基因工程有限公司提供,乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒由湖南圣湘生物科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 研究标本的收集

收集CHB、乙肝相关性LC、乙肝相关性HCC患者的血清作为研究标本,首先用红头管采集3 mL左右血液,然后4 000 r/min离心5 min分离血清,收集500 μL左右血清标本分装于1.5 mL离心管内,置于-20℃保存备用。

1.3.2 HBV基因分型检测

HBV基因分型检测采用多通道荧光PCR法。检测原理:采用核酸释放剂快速裂解和释放血清样本中的乙型肝炎病毒DNA,针对乙型肝炎病毒B、C和D型序列设计3套特异性引物及荧光探针,配成PCR反应液,然后在实时荧光定量PCR仪上,采用多通道荧光PCR法对B、C和D基因型进行分型检测。实验操作严格按照试剂盒说明书

进行。

1.3.3 HBV前C区1896位点及BCP区1762/1764位点基因突变检测

HBV基因位点突变检测采用扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)荧光PCR法(ARMS-PCR)^[12]。检测原理:设计两条特异性引物A和B,对野生型和突变型序列的扩增效率不同,造成样本在两种PCR反应液下得到的Ct值也不同。实验操作严格按照试剂盒说明书进行:首先采用热裂解法提取HBV DNA,然后在PCR反应液A和反应液B中进行荧光PCR扩增,扩增结束后,分别记录PCR反应液A和反应液B扩增所得Ct值,记为Ct(A)和Ct(B)。若|Ct(A)-Ct(B)|≤7.00,则该对应的基因位点存在突变;若|Ct(A)-Ct(B)|>7.00,则该对应的基因位点未突变或突变型含量低于检测下限。

1.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行分析。计数资料用n(%)表示;计量资料用($\bar{x} \pm s$),用卡方检验。两组间采用t检验;P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性乙肝组、肝硬化组与乙肝相关性肝癌组一般资料比较结果

e抗原阳性率方面比较,HCC组低于CHB组,差异具有统计学意义(P<0.05);HCC组也低于LC组,但差异无统计学意义(P>0.05)。HBV DNA含量水平比较,HCC组均低于CHB组和LC组,差异均具有统计学意义(P<0.05);HBV DNA>10⁵%比较,HCC组也均低于CHB组和LC组(P<0.05),见表1。

表1 慢性乙肝组、肝硬化组与乙肝相关性肝癌组一般资料比较情况 [n(%)]
Table 1 The general clinical data of CHB group, LC group and HBV-HCC group [n(%)]

一般资料	CHB组 (n=50)	LC组 (n=45)	HCC组 (n=46)	HCC与CHB比较		HCC与LC比较	
				t/χ ² 值	P值	t/χ ² 值	P值
e抗原阳性率	19(38.00)	8(17.78)	6(13.04)	7.748	0.005	0.392	0.531
HBV DNA的log值	6.27±1.41	5.34±1.17	4.59±0.97	6.865	<0.001	3.357	0.001
HBV DNA>10 ⁵ %	40(80.00)	30(66.67)	16(34.78)	20.154	<0.001	9.251	0.002

2.2 乙肝相关疾病患者 HBV BCP 区 1762/1764 位点突变情况

乙肝相关患者中,男性与女性患者间的 HBV BCP 区 1762/1764 位点突变率差异无统计学意义

($P>0.05$)。HBV BCP 区 1762/1764 位点突变率在 HCC 组与 CHB 组间的差异具有统计学意义($P<0.05$),而 LC 组与 HCC 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 乙肝相关疾病患者 HBV BCP 区 1762/1764 位点突变情况 [n(%)]
Table 2 Mutations of HBV BCP 1762/1764 in hepatitis B-related patients [n(%)]

HBV 基因突变类型	性别分组		乙肝相关疾病分组		
	男性(n=99)	女性(n=42)	CHB 组(n=50)	LC 组(n=45)	HCC 组(n=46)
BCP 区 1762/1764	67(67.0)	24(57.1)	11(22.0)	38(84.4)	42(91.3)
χ^2 值	1.249		46.535 ^a	1.007 ^b	
P 值	0.264		<0.001 ^a	0.316 ^b	

注: ^a表示 HCC 组与 CHB 组比较, ^b表示 HCC 组与 LC 组比较。

2.3 乙肝相关疾病患者 HBV 前 C 区 1896 位点情况

乙肝相关患者中,HBV 前 C 区 1896 位点突变

率在男性与女性患者间的差异无统计学意义($P>0.05$);而在 HCC 组与 CHB 组间和 HCC 组与 LC 组间的差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 乙肝相关疾病患者 HBV 前 C 区 1896 位点突变情况 [n(%)]
Table 3 Mutations of HBV PC1896 in hepatitis B-related patients [n(%)]

HBV 基因突变类型	性别分组		乙肝相关疾病分组		
	男性(n=99)	女性(n=42)	CHB 组(n=50)	LC 组(n=45)	HCC 组(n=46)
前 C 区 1896	61(61.6)	28(66.7)	21(42.0)	28(62.2)	39(84.8)
χ^2 值	0.323		18.710 ^a	5.962 ^b	
P 值	0.570		<0.001 ^a	0.015 ^b	

注: ^a表示 HCC 组与 CHB 组比较, ^b表示 HCC 组与 LC 组比较。

2.4 乙肝相关疾病患者 HBV BCP 区 1762/1764 位点及前 C 区 1896 位点突变情况

HCC 患者组 HBV 前 C 区 1896 和 BCP 区 1762/1764 位点同时突变率为 78.3%,明显高于 CHB 组患者,差异具有统计学意义($P<0.05$);同时

也高于 LC 组患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。而 BCP 区 1762/1764 单一突变型,主要存在于 LC 患者中;前 C 区 1896 单一突变型和野生型,主要存在于 CHB 患者中,见表 4。

表 4 慢性乙肝、肝硬化及肝癌患者 HBV BCP 区 1762/1764 位点及前 C 区 1896 位点突变分析 [n(%)]
Table 4 Analysis of HBV BCP 1762/1764 and PC1896 mutation in HCC, LC and CHB patients [n(%)]

HBV 基因突变类型	HCC 组(n=46)	LC 组(n=45)	CHB 组(n=50)	χ^2 值	P 值	
BCP wild + PC wild	1(2.2)	1(2.2)	17(34.0)	0.000 ^a	15.929 ^b	0.987 ^a <0.001 ^b
BCP wild + PC mutants	3(6.5)	6(13.3)	22(44.0)	1.184 ^a	17.473 ^b	0.276 ^a <0.001 ^b
BCP mutants + PC wild	6(13.0)	16(35.6)	11(22.0)	6.289 ^a	1.319 ^b	0.012 ^a 0.251 ^b
BCP mutants + PC mutants	36(78.3)	22(48.9)	0(0.00)	8.491 ^a	62.609 ^b	0.004 ^a <0.001 ^b

注: ^a表示 HCC 组与 LC 组比较, ^b表示 HCC 组与 CHB 组比较; BCP wild-: BCP 区 1762/1764 未突变, PC wild-: 前 C 区 1896 未突变, BCP mutants: BCP 区 1762/1764 突变, PC mutants: 前 C 区 1896 突变。

2.5 乙肝相关患者不同HBV基因型的BCP区及前C区突变情况

CHB组、LC组和HCC组乙肝患者中,不同HBV基因型的BCP区1762/1764和前C区1896突变率差异均无统计学意义($P>0.05$)。同时可以看出,无论是B型还是C型的乙肝相关患者,疾病进

程较重(HCC组,LC组)的受试者携带BCP区1762/1764突变型或前C区1896突变型的比例均高于慢性乙肝患者(CHB组)。各组乙肝患者B基因型与C基因型的BCP1762/1764及PC1896位点突变率比较, $P>0.05$ 差异无统计学意义见表5。

表5 乙肝相关患者不同HBV基因型的BCP区及前C区突变情况 [n(%)]
Table 5 Association of BCP and PC mutations with HBV genotype [n(%)]

HBV 基因突变类型	CHB 组(n=50)		LC 组(n=45)		HCC 组(n=46)	
	B 型(n=41)	C 型(n=9)	B 型(n=33)	C 型(n=12)	B 型(n=26)	C 型(n=20)
BCP 区 1762/1764	8(19.5)	3(33.3)	29(87.9)	9(75.0)	24(92.3)	18(90.0)
前 C 区 1896	17(41.5)	4(44.4)	21(63.6)	7(58.3)	22(84.6)	17(85.0)

3 讨论

乙肝相关性 HCC 的发病机制涉及因素较多,HBV 感染慢性化是导致 HCC 发生的重要原因之一,HBV 在慢性持续感染过程中,在机体自身免疫及药物的作用下,基因易发生突变,从而使病毒具有更强的致病性,最终导致乙肝慢性化、严重化,甚至可能导致癌变^[13-14]。本文研究显示 HCC 组患者更容易出现血清学 HBeAg 为阴性,同时 HCC 组患者 HBV DNA 含量水平低于 CHB 组和 LC 组,可能原因有:①CHB 发展到 HCC 一般需要一个漫长过程,肝细胞内 HBV DNA 分布从弥散向局灶演变,而外周血释放 HBV 的特点为低复制、高积累、低排除;②HBV 基因整合到肝细胞基因组,从而降低 HBV 复制能力^[15]。

HBV 基因突变在肝癌发展过程中起到重要作用,与 HCC 发展密切相关的 HBV 基因突变区域有核心启动子区域(BCP)、前 S 基因系列、前 C 区等^[16-17]。Fang 等^[18]前瞻性研究发现 HBV BCP 区 1762/1764 突变者患 HCC 的发病率要远高于未突变者。Xu 等^[19]研究表明 HBV 携带者,疾病进程较重的受试者携带 HBV BCP 区 1762/1764 突变型的比例明显增高。本文研究显示,自贡地区 HCC 患者 HBV BCP 区 1762/1764 突变率高于 CHB 组患者,而与 LC 组比较差异无统计学意义,该结果表明 HBV BCP 区 1762/1764 突变与肝癌和肝硬化的发生密切相关;但 HBV BCP 区 1762/

1764 突变不能作为区分肝硬化进展为肝癌的标记物,与闪明海等^[20]研究结论存在一定差别;同时本研究结果表明 HBV 基因 BCP 区突变是慢性乙肝进展为肝硬化的致病因素,但可能不是肝癌的主要致病因素^[21]。HBV 前 C 区 1896 位点突变是 HBV 的常见突变位点, Malik A 等^[22]研究发现 HBV 前 C 区 1896 突变率在 CHB、LC 及 HCC 患者中逐渐升高。本文研究提示自贡地区 HCC 患者 HBV 前 C 区 1896 突变率高于 CHB 组和 LC 组患者,结果表明 HBV 前 C 区 1896 突变可能与 HCC 发生密切相关。

本文研究还发现,HCC 组 HBV 前 C 区 1896 和 BCP 区 1762/1764 位点同时突变率最高,结果表明 HBV 两个基因位点同时突变可能导致慢性 HBV 感染患者病情更易严重化,与 HCC 的发生可能存在一定关系。HBV 基因型的分布存在地域和人种的差异^[10]。本文研究结果显示无论是 B 型还是 C 型的乙肝相关患者,疾病进程较重(HCC 组、LC 组)的患者携带 BCP 区 1762/1764 突变型或前 C 区 1896 突变型的比例明显高于 CHB 组患者,但是乙肝患者各个阶段 HBV 基因 B 型和 C 型的两个区域突变比例差异均无统计学意义,与徐君等^[23]研究江苏地区情况不一致,可能原因:①不同地区 HBV 基因亚型不一样,②生活习惯或环境可能会影响 HBV 突变,③可能存在其他基因区域合并突变,④本文研究对象 CHB 样本量相对较少,有待于进一步提高样本量深入研究。

综上所述,本文从HBV基因型及基因变异角度阐述了CHB、LC与HCC之间的关系。本文研究结果对了解自贡地区HBV相关性肝癌的发病病因提供了有意义的资料,对指导本地区HBV相关性HCC的临床治疗、早期诊断与提前干预提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 386(10003): 1546-1555.
- [2] Fako V, Wang XW. Molecular Carcinogenesis of HBV-Related HCC [M]. *Hepatitis B Virus and Liver Disease*, 2018: 143-162.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015 [J]. *A Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [4] 刘军,晏军. 2004-2014年自贡市第一人民医院恶性肿瘤住院患者疾病谱及病死率分析[J]. *职业与健康*, 2015, 31(19):2722-2724.
- [5] 李健,曾小平. HBV逆转录酶区基因耐药变异的研究现状[J]. *实验与检验医学*, 2017, 35(1):64-67.
- [6] Wei F, Zheng Q, Li M, et al. The association between hepatitis B mutants and hepatocellular carcinoma: A meta-analysis [J]. *Medicine*, 2017, 96(19):e6835.
- [7] Hakami A, Ali A. Effects of hepatitis B virus mutations on its replication and liver disease severity [J]. *Open Virol J*, 2013, 7:12-19.
- [8] Castelain S, Descamps V, Brochot E, et al. High association of T1858-G1896 precore mutations with impaired base pairing and high hepatitis B virus DNA levels in HBeAg-negative chronically infected patients [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(7):1-8.
- [9] 邓拥军,钱军. 慢性HBV感染者HBV前C区/基本核心启动子区基因突变与临床应用[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2015, 25(4):239-241.
- [10] 王金霞,赵玉良,马景臣. 乙型肝炎病毒基因型研究进展[J]. *实用预防医学*, 2017, 24(12): 1539-1542.
- [11] 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2015年版)[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2015, 25(6):384.
- [12] 程鹏飞,刘绪,余敏,等. 乙型肝炎病毒基因组C区启动子突变位点新型检测方法的建立、验证及初步应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(10):1313-1320.
- [13] Liu S, Zhang H, Gu C, et al. Association between hepatitis B virus mutations and the risks of hepatocellular carcinoma: a meta analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(15):1066-1082.
- [14] 董绍斌,王富珍,张爽,等. 原发性肝癌合并HBV感染者的HBV基因特征分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2017, 31(2):92-97.
- [15] An P, Xu J, Yu Y, et al. Host and Viral Genetic Variation in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma [J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 261.
- [16] 张原青,郭津生. 乙型肝炎病毒促进肝细胞性肝癌发生的机制[J]. *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(2):152-156.
- [17] Wu HC, Tsai HW, Teng CF, et al. Ground-glass hepatocytes co-expressing hepatitis B virus X protein and surface antigens exhibit enhanced oncogenic effects and tumorigenesis [J]. *Human Pathology*, 2014, 45(6):1294-1301.
- [18] Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study [J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2008, 103(9):2254-2262.
- [19] 徐丹丹,张曼,吴黎黎. 乙型肝炎病毒基本核心启动子区A1762T/G1764A突变检测的意义[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(1):32-34.
- [20] 闪明海,胡爱丽,杨琴,等. 宁夏地区乙型肝炎病毒基因BCP区A1762T/G1764A突变与肝细胞癌的相关性[J]. *宁夏医科大学学报*, 2014, 36(2):148-150.
- [21] Chu CM, Lin CC, Chen YC, et al. Basal core promoter mutation is associated with progression to cirrhosis rather than hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection [J]. *British Journal of Cancer*, 2012, 107(12):2010-2015.
- [22] Malik A, Kumar D, Khan AA, et al. Hepatitis B virus precore G1896A mutation in chronic liver disease patients with HBeAg negative serology from North India [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018, 25(7):1257-1262.
- [23] 徐君,张园海,郑中伟,等. 乙型肝炎病毒基本核心启动子区1762/1764双突变与基因型和HBeAg血清学转换的关系[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2013, 23(6): 493-497.

基于Taqman荧光ARMS-PCR技术检测CYP3A5基因多态性方法的建立

朱小亚 黄志文 蒋析文*

[摘要] 目的 建立一种基于Taqman荧光的ARMS-PCR技术检测人外周全血样本CYP3A5*3(rs776746)基因多态性的新方法。方法 根据CYP3A5和内参基因的保守序列分别设计特异性引物及探针,建立CYP3A5*1和CYP3A5*3 Taqman荧光ARMS-PCR检测体系及其测序体系,并对200例人外周全血样本进行检测及金标准测序对比验证,分析2种检测方法的一致性,并统计分析CYP3A5*3基因多态性的分布。结果 该方法可检测人外周全血样本CYP3A5*3(rs776746)基因多态性,其检测结果与sanger测序一致性为100%。200例外周血样本CYP3A5*3基因型分布:*1/*1型19例(9.5%),*1/*3型为62例(31.0%),*3/*3型为119例(59.5%)。结论 本研究建立的基于Taqman荧光ARMS-PCR技术的检测方法能够简单、快速、准确地检测CYP3A5*3基因型,适用于临床推广。

[关键词] ARMS-PCR; CYP3A5; 基因多态性

Establishment of Taqman ARMS-PCR Method for Detection of CYP3A5 gene Polymorphism

ZHU Xiaoya, HUANG Zhiwen, JIANG Xiwen*

(Research Center of Medical and Pharmaceutical Bioengineering, Ministry of Health, National and Regional Joint Engineering Laboratory for Clinical Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Province Nucleic Acid Molecular Diagnostics Engineering Technology Research Center, Guangdong Provincial Clinical Medical Molecular Diagnostics Engineering Technology Center, DAAN Gene Co., Ltd. Of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] Objective To establish a new method based on Taqman's fluorescent ARMS-PCR technique for detecting the CYP3A5*3 polymorphism in human peripheral whole blood samples. Methods Specific primers and probes were designed based on the conserved sequences of CYP3A5 and internal reference genes (GAPDH). Two Taqman's fluorescent ARMS-PCR detection systems and sequencing systems were established for CYP3A5*1 and CYP3A5*3 detection. 200 human peripheral blood samples were tested and analyzed by gold standard gene sequencing. The consistency of two detection methods and distribution of CYP3A5*3 gene polymorphism were analyzed. Results This method can detect CYP3A5*3 (rs776746) gene polymorphisms in human peripheral whole blood samples, and the detection results are 100% consistent with sanger sequencing. CYP3A5*3 genotype distribution in 200 cases of peripheral blood samples: 19 cases (9.5%) of *1/*1 type, 62 cases (31%) of *1/*3 type, and 119 cases (59.5%) of *3/*3 type. Conclusion Taqman's fluorescent ARMS-PCR can detect CYP3A5*3 genotype simply, quickly and accurately, which is suitable for clinical application.

[KEY WORDS] ARMS-PCR; CYP3A5; Gene polymorphism

基金项目:广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项(2016DAGZKJ007)

作者单位:卫生部医药生物工程技术研究中心,临床医学分子诊断国家地方联合工程实验室,广东省核酸分子诊断工程技术研究中心,广东省临床医学分子诊断工程技术中心,中山大学达安基因股份有限公司,广东,广州510665

*通信作者:蒋析文, E-mail:jiangxiwen@daangene.com

注:朱小亚和黄志文为并列第一作者

人类 *CYP3A5* 基因位于第 7 号染色体,全长 31.8 kb,包含 13 个外显子,编码的蛋白由 502 个氨基酸组成。*CYP3A5* 野生型为 *CYP3A5*1*,研究表明,携带 *CYP3A5*1* 等位基因的个体,*CYP3A5* 蛋白表达水平及蛋白活性显著高于纯合突变型个体^[1]。*CYP3A5* 基因存在多个等位基因的突变,如 *CYP3A5*2*、*CYP3A5*3*、*CYP3A5*4*、*CYP3A5*5*、*CYP3A5*6* 等,其中,*CYP3A5*3*(A>G,SNP 登记号:rs776746)在各种族中发生突变频率最高^[2-6]。该等位基因位于第 3 内含子 6 986 位核苷酸,当 6 986 位核苷酸突变为 G(*CYP3A5*3*)时可形成一个隐含的受体剪接位点,直接导致终止密码子提前,使 *CYP3A5* 蛋白质无法表达,最终使 *CYP3A5* 酶活性明显降低甚至消失^[7-8]。研究表明 *CYP3A5* 在他克莫司的代谢中有着重要作用,其活性降低可导致他克莫司的血药浓度升高^[9]。他克莫司(tacrolimus,FK506)为大环内酯类免疫抑制剂,临床上广泛用于肝、肾、心、肺、胰等器官移植患者的免疫抑制治疗。器官移植患者应用他克莫司后血药浓度偏低可导致急性排斥反应和药物敏感性降低;血药浓度偏高则容易发生肾毒性、神经毒性、糖尿病、高血脂症、高血压和胃肠道紊乱等不良反应,导致他克莫司毒副作用的发生。CPIC 指南建议携带 *CYP3A5*3/*3* 基因型的移植患者减少他克莫司的用药剂量,以避免发生药物不良反应。本研究基于 Taqman 荧光 ARMS-PCR 技术,建立一种 *CYP3A5*3* 基因多态性的检测方法对于临床指导器官移植患者服用他克莫司剂量具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

HotStart Taq Master Mix、2×Taq PCR Master Mix(购自天根生化科技(北京)有限公司);DL1000 DNA Marker、*CYP3A5*1/*1* 型、*CYP3A5*3/*3* 型人工合成质粒(购自生工生物工程(上海)股份有限公司);核酸提取或纯化试剂(磁珠法)(货号:DA0643)(由本公司提供);ABI7500 Real-time PCR 仪、Nanodrop2000 超微量分光光度计(均购自美国 Thermo Scientific 公司);水平电泳仪(购自北京六一仪器厂);凝胶成像系统(购自美国 eAlpha Innotch 公司)。

1.2 临床样本

200 例乙二胺四乙酸(ethylene diamine tet-

raacetic acid,EDTA)抗凝外周全血样本由广州达安临床检验中心有限公司提供。

1.3 引物与探针

根据 NCBI 数据库提供的 *CYP3A5*3*(rs776746)等位基因序列(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs776746)及内参基因 *GAPDH* 的序列([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY340484.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=86&RID=M24C6HSE01N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY340484.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=86&RID=M24C6HSE01N));GeneBank 序列号:AY340484.1),采用 Primer premier 5.0 设计 Taqman 荧光 PCR 特异性扩增引物和探针,产物长度为 80~150 bp 左右。为了提高 ARMS-PCR 引物的特异性,在 *CYP3A5*3* 和 *CYP3A5*1* 检测上游引物 3' 端 SNP 位点的临近位置引入错配核苷酸,如表 1 中加粗斜体字母所示。检测 *CYP3A5*3* 等位基因的 Taqman 探针 5' 端采用 FAM 荧光报告基团进行标记,3' 端采用 BHQ1 荧光淬灭基团进行标记。检测内参基因 *GAPDH* 的 Taqman 探针 5' 端采用 VIC 荧光报告基团进行标记,3' 端采用 BHQ1 荧光淬灭基团进行标记。同时采用 Primer premier 5.0 设计 *CYP3A5*3* 的金标准 Sanger 测序引物,产物长度为 300~400 bp。引物和探针均由上海生工生物股份有限公司合成。具体序列特征和探针标记见表 1。

1.4 全血样本基因组 DNA 提取

采用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(磁珠法),按试剂盒说明书进行操作。提取后的核酸置于 -20℃ 冰箱中保存,并通过分光光度计测定其浓度。

1.5 Taqman 荧光 ARMS-PCR 法检测 *CYP3A5*1* 和 *CYP3A5*3* 体系的建立

1.5.1 *CYP3A5*1* PCR 反应体系

25 μL *CYP3A5*1* PCR 反应体系包含 0.1 μL *CYP3A5*1* 上游引物(50 μmol/L)、0.1 μL *CYP3A5* 共用下游引物(50 μmol/L)、0.1 μL *CYP3A5* 共用探针(25 μmol/L)、0.1 μL *GAPDH* 上游引物(50 μmol/L)、0.1 μL *GAPDH* 下游引物(50 μmol/L)及 0.1 μL *GAPDH* 探针(25 μmol/L)。12.5 μL 2×Hot-Start Taq Master Mix、5 μL DNA 模板(分别为 *CYP3A5*1/*1* 型人工合成质粒,*CYP3A5*3/*3* 型人工合成质粒,人类基因组 DNA),6.9 μL 灭菌蒸馏水。反应扩增条件:95℃ 3 min;94℃ 15 s,55℃ 35 s;40 个循环。

表1 引物及探针序列表
Table 1 Sequences of primers and probes

名称	序列
CYP3A5*1 型上游引物	AAGAGCTCTTTTGTCTTCGAA
CYP3A5*3 型上游引物	AAGAGCTCTTTTGTCTTCGAG
CYP3A5 共用下游引物	TTTGGACCACATTACCCTTCAT
CYP3A5 共用探针	5'-FAM-AGGTTCTAGTTCATTAGGGT-BHQ1-3'
GAPDH 上游引物	ACAACAGCCTCAAGATCATCAG
GAPDH 下游引物	GGTGCTAAGCAGTTGGTGG
GAPDH 探针	5'-HEX-CCTGGCACCCCTATGGACACGC-BHQ1-3'
CYP3A5 测序上游引物	ATTTAGTCCTTGTGAGCACTTG
CYP3A5 测序下游引物	GTATGAAGGTCAACTCCCTGT

1.5.2 CYP3A5*3 PCR 反应体系

25 μL CYP3A5*3 PCR 反应体系包含 0.1 μL CYP3A5*3 上游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$)、0.1 μL CYP3A5 共用下游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$)、0.1 μL CYP3A5 共用探针 (25 $\mu\text{mol/L}$)、0.1 μL GAPDH 上游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$)、0.1 μL GAPDH 下游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$) 及 0.1 μL GAPDH 探针 (25 $\mu\text{mol/L}$)。12.5 μL 2 \times Hot-Start Taq Master Mix、5 μL DNA 模板 (分别为 CYP3A5*1/*1 型人工合成质粒, CYP3A5*3/*3 型人工合成质粒, 人类基因组 DNA), 6.9 μL 灭菌蒸馏水。反应扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 35 s; 40 个循环。

1.5.3 CYP3A5*1 和 CYP3A5*3 测序体系的建立

25 μL PCR 反应体系包含 0.1 μL CYP3A5 测序上游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$)、0.1 μL CYP3A5 测序下游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$)、12.5 μL 2 \times Taq PCR Master Mix、5 μL DNA 模板 (分别为 CYP3A5*1/*1 型人工合成质粒, CYP3A5*3/*3 型人工合成质粒, 人类基因组 DNA)、7.3 μL 灭菌蒸馏水。反应扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 40 个循环。扩增结束后, 取 5 μL PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 并在凝胶成像系统中拍照。将剩余 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 采用 Bio-edit 分析软件比对分析测序结果与目的序列的一致性。

1.6 全血临床样本检测

采用本研究所建立的体系对 200 例全血临床样本进行 PCR 检测及测序验证, 分析两种方法的一致性, 统计分析 CYP3A5*3 基因多态性的分布。

2 结果

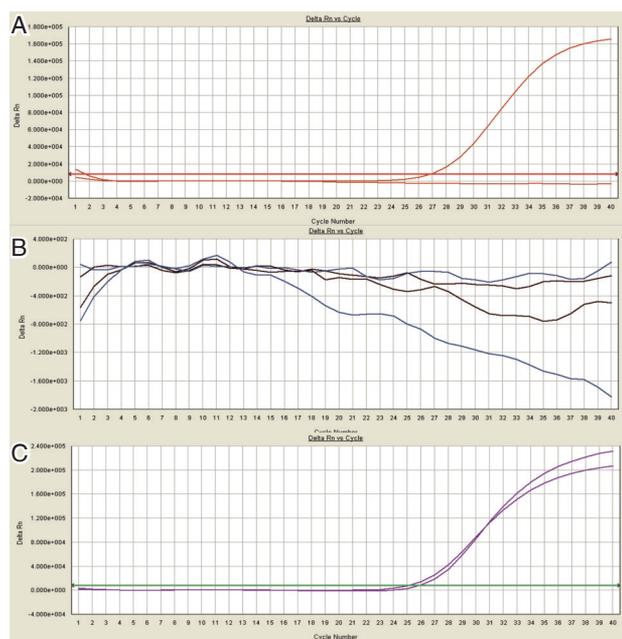
2.1 Taqman 荧光 ARMS-PCR 法检测 CYP3A5*1、CYP3A5*3 体系的建立

配制 CYP3A5*1 检测体系, 对 CYP3A5*1/*1 型、CYP3A5*3/*3 型人工合成质粒及携带 CYP3A5*1 型人类基因组 DNA 进行检测。检测 CYP3A5*1/*1 型人工合成质粒, FAM 通道扩增曲线呈 S 型, 曲线光滑, Ct 值 < 35, VIC 通道无明显扩增曲线 (图 1A); 检测 CYP3A5*3/*3 型人工合成质粒, FAM 和 VIC 通道均无明显扩增曲线 (图 1B); 检测 10 ng/ μL CYP3A5*1/*3 型人类基因组 DNA, FAM 通道和 VIC 通道扩增曲线呈 S 型, 曲线光滑, Ct 值为 28 左右 (图 1C)。

配制 CYP3A5*3 检测体系, 对 CYP3A5*1/*1 型、CYP3A5*3/*3 型人工合成质粒及 CYP3A5*1/*3 型人类基因组 DNA 进行检测。检测 CYP3A5*1/*1 型人工合成质粒, FAM 和 VIC 通道均无明显扩增曲线 (图 2A); 检测 CYP3A5*3/*3 型人工合成质粒, FAM 通道扩增曲线呈 S 型, 曲线光滑, Ct 值 < 35, VIC 通道无明显扩增曲线 (图 2B); 检测 10 ng/ μL CYP3A5*1/*3 型人类基因组 DNA 样本, FAM 通道和 VIC 通道均有明显扩增曲线, VIC 通道扩增曲线呈 S 型, 曲线光滑, Ct 值为 28 左右 (图 2C)。

2.2 CYP3A5 测序 PCR 扩增体系的建立

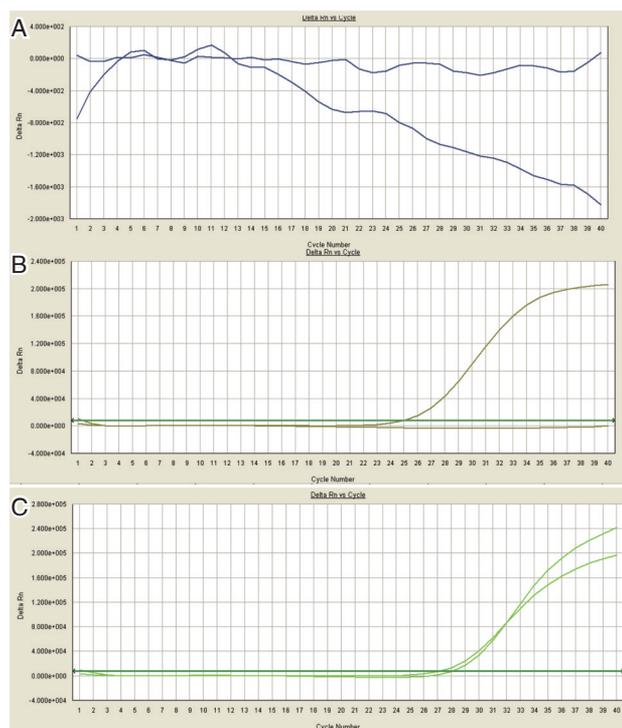
配制 CYP3A5 测序 PCR 反应体系, 对 CYP3A5*1/*1 型、CYP3A5*3/*3 型和人类基因组 DNA 进行检测。PCR 扩增完成后进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统进行拍照, 根据有无条带, 条带大小初步筛选出 PCR 扩增体系, 结果如图 3 所示, 扩增条带为 300 bp 左右, 与目的片段大小一



注:A为CYP3A5*1/*1质粒检测结果图;B为CYP3A5*3/*3型人工合成质粒检测结果图;C为10 ng/μL CYP3A5*1/*3人类基因组DNA检测结果图。

图1 CYP3A5*1反应体系检测结果

Figure 1 Detection results of CYP3A5*1 reaction system

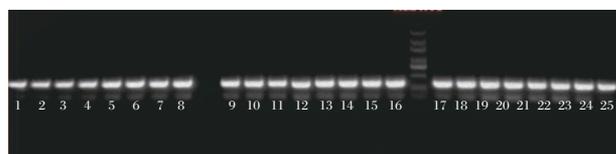


注:A为CYP3A5*1/*1型人工合成质粒检测结果;B为CYP3A5*3/*3型人工合成质粒检测结果图;C为10 ng/μL CYP3A5*1/*3人类基因组DNA检测结果图。

图2 CYP3A5*3反应体系检测结果

Figure 2 Detection results of CYP3A5*3 reaction system

致。将条带大小一致的剩余反应产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。Bio-edit 比对分析测序结果与目的序列一致,测序峰图良好,各碱基信号值较强,多态性位点及临近片段无杂峰、套峰等现象,且背景信号较低(图4),表明CYP3A5测序PCR体系良好。



注:1~8泳道为CYP3A5*1/*1型质粒;9~16泳道为CYP3A5*3/*3型质粒;17泳道为DL1000 DNA Marker;18~25泳道为人类基因组DNA。

图3 CYP3A5 PCR产物电泳图

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of CYP3A5 PCR products

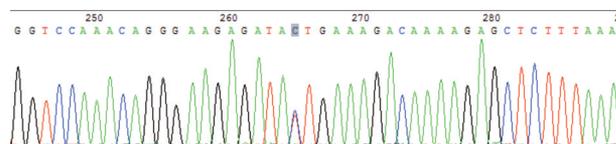


图4 CYP3A5 PCR产物测序峰图

Figure 4 Sequencing peak map of CYP3A5 PCR products

2.3 临床样本检测及多态性分析

提取200例外周血样本基因组DNA,进行CYP3A5基因多态性检测,并采用金标准sanger测序法进行验证。结果显示,本研究建立的基于Taqman荧光ARMS-PCR CYP3A5*1和CYP3A5*3体系与测序法有较好的一致性,所有样本型别检测结果完全一致。具体型别分布为:CYP3A5*1/*1 19例(9.5%),CYP3A5*1/*3 62例(31%),CYP3A5*3/*3 119例(59.5%),CYP3A5*3等位基因突变频率为75%。

3 讨论

CYP3A5基因多态性是造成个体间CYP3A活性差异(相差约10~40倍)及CYP3A代谢药物疗效和个体间不良反应差异的最重要因素^[10-12]。大量研究发现,CYP3A5*3基因多态性是影响器官移植受体他克莫司(FK506)血药浓度的重要因素^[13-15]。CYP3A5在他克莫司的代谢中起重要作用,其活性降低可导致他克莫司的血药浓度升高,不良反应增加。同时研究发现携带野生CYP3A5*1型患者需要比CYP3A5*3/*3型高2倍的剂量才能达到目标血药浓度^[16-17]。

目前常用的用于检测 *CYP3A5* 基因多态性的方法包括 DNA 测序法 (DNA sequencing analysis)、限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、高效液相色谱分析 (High performance liquid chromatography, HPLC)、毛细管电泳法 (Capillary Electrophoresis, CE) 等,但这些方法均存在操作复杂、耗时较长、成本高、检测灵敏度低且容易造成假阳性或假阴性等弊端^[18-20]。另外,传统 ARMS-PCR 也被广泛用于 *CYP3A5* 基因多态性检测,虽然特异性较强,检测灵敏度较高,但检测过程涉及到琼脂糖凝胶电泳等过程,操作复杂且需要接触到 EB 染料等强致癌物,对人造成一定危害^[21]。本研究基于 Taqman 荧光 ARMS-PCR 技术,设计特异性引物,并在靠近引物 3' 端不同位置引入错配碱基,筛选出最优引物,对靶序列进行高精度 PCR 扩增放大,与此同时,利用探针扩增产物进行检测,在实时荧光定量 PCR 平台上实现对样品 *CYP3A5* 多态性的检测。其检测过程简单快捷,仅需 1 个小时即可完成所有检测,有效避免接触 EB 染料,同时保证较高特异性和灵敏度。在 200 例临床样本检测中,本方法检测结果和金标准 sanger 测序法一致性为 100%,表明其准确性较高。

因此,本研究建立的基于 Taqman 荧光 ARMS-PCR 技术检测 *CYP3A5* 基因多态性方法具有较高的准确性、特异性和灵敏度,且其操作简便快速、自动化程度高、结果判读直观,在指导器官移植患者服用他克莫司药物治疗的起始剂量中具有好的临床应用前景,便于临床的推广。

参考文献

- [1] Busi F, Cresteil T. *CYP3A5* mRNA degradation by nonsense-mediated mRNA decay [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(3): 808-815.
- [2] Zhu W, Xue L, Peng H, et al. Tacrolimus population pharmacokinetic models according to *CYP3A5/CYP3A4/POR* genotypes in Chinese Han renal transplant patients [J]. *Pharmacogenomics*, 2018, 19(13):1013-1025.
- [3] Lucy C, Ramesh PGV. *CYP3A5* polymorphisms in renal transplant recipients: influence on tacrolimus treatment [J]. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2018, 11:23-33.
- [4] Kim KA, Park IB, Park JY. Effects of *CYP2D6* and *CYP3A5* genetic polymorphisms on steady-state pharmacokinetics and hemodynamic effects of tamsulosin in humans [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2018, 74(10):1281-1289.
- [5] Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* in the Croatian population [J]. *Drug Metab Pers Ther*, 2017, 32(1):11-21.
- [6] Park SY, Kang YS, Jeong MS, et al. Frequencies of *CYP3A5* genotypes and haplotypes in a Korean population [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2008, 33(1):61-65.
- [7] Elmachad M, Elkabbaj D, Elkerch F, et al. Frequencies of *CYP3A5*1/*3* variants in a Moroccan population and effect on tacrolimus daily dose requirements in renal transplant patients [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 16(6):644-647.
- [8] Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, et al. Effect of *CYP3A5*3* on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *The Pharmacogenomics Journal*, 2015, 15(1):38-48.
- [9] Yaowakulpatana K, Vadcharavivad S, Ingsathit A, et al. Impact of *CYP3A5* polymorphism on trough concentrations and outcomes of tacrolimus minimization during the early period after kidney transplantation [J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2016, 72(3):277-283.
- [10] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic *CYP3A5* expression [J]. *Nature Genetics*, 2001, 27(4):383-391.
- [11] Haufroid V, Van Kerckhove V, et al. *CYP3A5* and *ABCB1* polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study [J]. *American Journal of Transplantation*, 2006, 6(11):2706-2713.
- [12] Shilbayeh S, Zmeili R, Alwardini RI. The impact of *CYP3A5* and *MDR1* polymorphisms on tacrolimus dosage requirements and trough concentrations in pediatric renal transplant recipients [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2013, 24(6):1125-1136.
- [13] Zhu L, Song HT, Wang QH, et al. Effect of *CYP3A4*18B*, *CYP3A5*3* gene polymorphism on dosage and concentration of tacrolimus in renal transplant patients [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2012, 47(7):878-883.
- [14] Htun YY, Swe HK, Saw TM. *CYP3A5*3* Genetic Polymorphism and Tacrolimus Concentration in Myanmar Renal Transplant Patients [J]. *Transplant Proc*, 2018, 50(4):1034-1040.
- [15] Zhang HY, Zhang XM, Wu XL, et al. Effect of *CYP3A5* genetic polymorphism on blood drug concentration and efficacy of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients [J]. *Organ Transplantation*, 2011, 13(2/4):173-177.

(下转第 43 页)

贝赫切特综合征患者肠道菌群微生物宏基因组学分析

刘秀梅* 张成伟 刘淼

[摘要] **目的** 采用宏基因组学分析贝赫切特综合征(BD)患者肠道菌群微生物特征。**方法** 选取2016年1月至2018年1月的BD患者18例,另选取性别、年龄、BMI相匹配的健康人群24例作为对照,收集BD患者与健康人群新鲜粪便提取DNA,进行宏基因组测序及生物信息学分析。**结果** BD患者与正常人优势菌群主要是硬壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)。BD患者中Bacteroidetes占4.21%,远低于正常人,BD患者中Proteobacteria占42.80%,远高于正常人;BD患者与正常人胃肠道微生物在属水平上有194个菌属存在差异,在种水平上有887个菌种存在差异;BD患者优势菌包括Collinsella Spp.、Bilophila spp.及Bacteroides spp.等,正常人优势菌包括Clostridium spp.、Roseburia spp.、Methanogens等。**结论** BD患者肠道菌群微生物群发生改变,产乳酸菌Collinsella Spp.和硫酸盐还原菌Bilophila spp.增多,产丁酸菌Clostridium spp.和Roseburia spp.减少,可能为引起BD发病的机制之一。

[关键词] 贝赫切特综合征;肠道菌群微生物;宏基因组学;优势菌

Metagenomics analysis of intestinal flora microbes in patients with Behcet Syndrome

LIU Xiumei*, ZHANG Chengwei, LIU Miao

(Department of Clinical Laboratory, Fuxin Mine General Hospital of Liaoning Provincial Health Industry Group, Fuxin, Liaoning, China, 123000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the microbial characteristics of intestinal flora in patients with Behcet syndrome (BD) analyzed by metagenomics. **Methods** Eighteen BD patients from January 2016 to January 2018 were selected, and another 24 healthy people matched with gender, age, and BMI were selected as controls. DNA was extracted from fresh feces of BD patients and healthy people for metagenome sequencing and bioinformatics analysis. **Results** The dominant floras in BD patients and normal people were mainly Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria. The proportion of Bacteroidetes with 4.21% in BD patients was much lower than that in healthy controls while the proportions of Proteobacteria with 42.80% in BD patients was much higher than that in controls. There were differences between BD patients and controls in the 194 genera at the genus level and 887 strains at species level of gastrointestinal microbes. The dominant floras in BD patients included Collinsella Spp., Bilophila spp. and Bacteroides spp., etc. The dominant floras in healthy controls included Clostridium spp., Roseburia spp., Methanogens. **Conclusion** The microbial population of intestinal flora is changed in BD patients. The increases of the lactic acid-producing bacteria Collinsella Spp. and the sulfate-reducing bacteria Bilophila spp. and the decreases of the butyric acid-producing bacteria Clostridium spp. and Roseburia spp. may be one of the mechanisms of causing BD.

[KEY WORDS] Behcet syndrome; Intestinal flora microbes; Metagenomics; Dominant floras

作者单位:辽宁省健康产业集团阜新矿总医院检验科,辽宁,阜新 123000

*通信作者:刘秀梅, E-mail: zhanggegehao@126.com

贝赫切特综合征(Behcet syndrome, BD),即白塞病,是一种可侵害人体皮肤、口腔、血管、肺等多个器官的全身免疫系统疾病,临床以口腔溃疡反复发生、葡萄膜炎、皮肤损害为特征,青壮年为多发群体,若不及时治疗,可能会引起患者肠穿孔、失明,甚至死亡^[1-2]。既往研究认为,BD发生与自身炎症反应和遗传因素有关^[3],而近期研究发现,肠道微生物异常可通过调节T免疫细胞亚群参与BD等许多免疫系统疾病的发生^[4]。宏基因组学是通过环境样品构建宏基因组文库,研究环境样品中所有微生物构成及功能的新方法^[5]。本研究采用宏基因组高通量测序技术分析BD患者肠道微生物群改变,初步探讨肠道微生物群改变在BD发生中的可能机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2018年1月本院收治的BD患者18例。纳入标准:①符合BD诊断标准^[6];②均为活动期患者;③入组前1个月未服用相关药物治疗;④患者均知情同意。排除标准:①合并心血管疾病、糖尿病等其他全身疾病;②合并肿瘤者;③合并药物相关性结肠炎、非特异性结肠炎、合并克罗恩病等肠道疾病。BD组中男性14例,女性4例,年龄21~55岁,平均(38.27±8.58)岁,身体质量指数(Body Mass Index, BMI):(18.57~26.93) kg/m²,平均(23.02±2.89) kg/m²。另选取本院性别、年龄、BMI相匹配的健康人群24例作为对照,其中男性19例,女性5例,年龄18~52岁,平均(36.61±8.02)岁, BMI:(18.34~27.11) kg/m²,平均(23.25±3.10) kg/m²。本研究获得本院伦理委员会批准同意。

1.2 方法

1.2.1 样品采集及宏基因组DNA提取

留取所有受试者新鲜粪便,立即送到实验室,在2 h内进行宏基因组DNA提取。严格按照QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(北京博迈斯科技发展有限公司)说明书步骤完成粪便DNA提取,然后通过凝胶电泳检测DNA完整性, Nano Drop微量紫外分光光度计(Thermo Scientific,美国)检测DNA纯度,采用Qubit荧光计(Life Technologies,美国)检测DNA浓度。

1.2.2 文库构建及测序

取2.5 μg样品DNA于500 μL打断管中,加入

0.1×TE溶液65 μL,于超声破碎仪(sonics,美国)中打断,然后进行末端修复、连接接头,将连接接头产物浓缩30 min,凝胶电泳后回收620 bp大小的条带,进行PCR扩增,扩增条件:95℃预变性30 s,1个循环,95℃变性10 s,65℃退火30 s,72℃延伸30 s,15个循环,72℃延伸5 min,1个循环,4℃保存10 min。PCR产物凝胶电泳后进行回收。向反应管中加入4种dNTP(荧光标记)、DNA聚合酶、扩增产物,每次循环掺入一种碱基,扩增过程中收集荧光信号;恢复3'端粘性后,再掺入第二种碱基,依次类推,获得DNA片段序列。

1.2.3 测序数据处理与基因比对

高通量测序所得数据去除接头引物、去除Human序列、去除低质量短读码框(reads),最终得到高质量reads。具体方法:将含有Adaptor接头序列污染、含有N碱基数目≥3的reads去除,截切序列3'端,将质量值<20的碱基,过滤截切后长度不足60%原长的reads去除;若样品来源于宿主,尽可能找到与宿主亲缘关系较近物种的基因组或宿主基因组,将含有宿主序列污染的reads去除。随后将正常人与BD患者测序结果与人类肠道宏基因组进行比对。采用一致性>90%的质量控制,即错比碱基数不超过总碱基数的10%。

1.2.4 物种注释

通过SOAPaligner 2.21软件将高质量reads与NCBI数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)已知的微生物(细菌、病毒、真菌、古细菌)序列进行比对,在界门、纲、目、科、属、种等各水平进行分类,并统计丰度。

1.2.5 物种LEfSe差异分析

组间群落差异分析(LDA EffectSize, LEfSe)对丰度差异的检测是采用非参数秩和检验,能发现丰度差异明显的菌群,用LDA表示物种丰度对差异的影响。

2 结果

2.1 基因集构建

BD组插入片段平均长度为1 892 bp,平均测得reads数为1 983 721 8,平均高质量reads数占比95.16%。对照组插入片段平均长度为1 956 bp,平均测得reads数为5 467 342 0,平均高质量reads数占比95.73%。

2.2 BD患者与正常人细菌门类分布差异

BD患者与正常人的优势菌群主要是硬壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)。BD患者中Bacteroidetes占4.21%,远低于正常人,BD患者中Proteobacteria占42.80%,远高于正常人,详见表1。

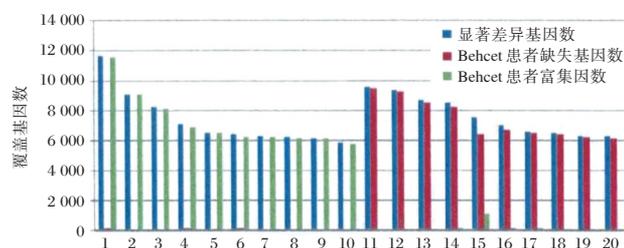
表1 BD患者与正常人细菌门类分布比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of distribution of bacterial phylum categories between BD patients and normal people [n(%)]

细菌(门)	正常人基因覆盖数	BD患者基因覆盖数	总基因覆盖数
Firmicutes	27 622(37.55)	21 283(43.43)	48 905(39.90)
Bacteroidetes	39 461(53.64)	2 063(4.21)	41 524(33.88)
Proteobacteria	2 567(3.49)	20 976(42.80)	23 543(19.21)
Actinobacteria	782(1.06)	4 093(8.35)	4 875(3.98)
Fusobacteria	931(1.26)	105(0.21)	1 036(0.85)
其他	2 207(3.00)	490(1.00)	2 697(2.20)
总计	73 570	49 010	122 580

2.3 BD患者与正常人肠道微生物属种差异

BD患者与正常人胃肠道微生物在属水平上有194个菌属存在差异,在种水平上有887个菌种存在差异。覆盖基因最多的前20种优势菌在种水平上分布差异见图1,其中BD患者优势菌包括Collinsella Spp.、Bilophila spp.及Bacteroides spp.等,正常人优势菌包括Clostridium spp.、Roseburia spp.、Methanogens等。



注:1. Collinsella aerofaciens; 2. Bilophila wadaworthia; 3. Bacteroides coprophilus CAG: 333; 4. Bacteroides faecichinchillae; 5. Clostridium sp. ATCC 29733; 6. Candidatus Alistipes marseilloanorexicus; 7. Collinsella sp.CAG: 166; 8. Rikeneila microfusius; 9. Mitsuokella multacida; 10. Bacteroids sp.CAG: 770; 11. Acidiphilium; 12. Candidatus Methanomethylophilus; 13. Clostridium cellulovorans; 14. Clostridium perfringens; 15. Roseburia; 16. Methanoculleus; 17. Bacteroides sp.D1; 18. Bacteroides eggerthii; 19. Clostridium sp. CAG: 75; 20. Bacteroides vulgates.

图1 BD患者与正常人胃肠道微生物在种水平上分布差异
Figure 1 Distribution of gastrointestinal microbes at species level between BD patients and normal people

2.4 LEfSe分析肠道微生物种属差异

LEfSe分析结果显示,BD患者显著富集菌包括Mitsuokella、Bacteroides、Clostridium、Bacteroides、Candidatus、Rikenella、Collinsella、Bilophila,正常人显著富集菌包括Methanomethylophilus、Acidiphilium、Clostridium、Methanoculleus、Bacteroides、Roseburia、acteroides等,见图2。

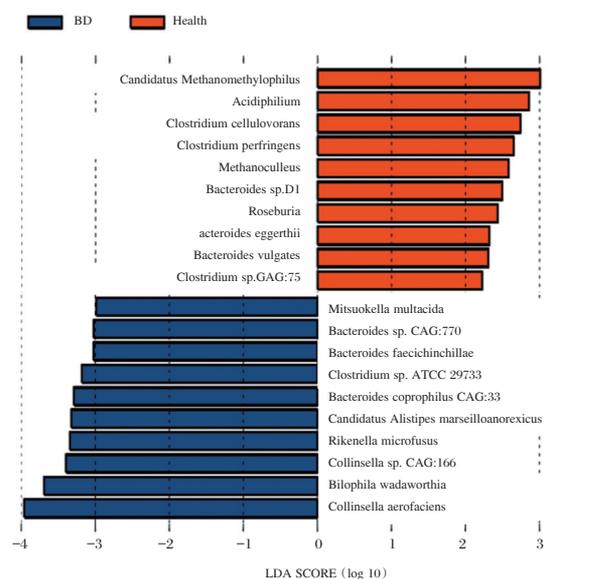


图2 BD患者与正常人胃肠道微生物LEfSe分析结果
Figure 2 LEfSe analysis results of gastrointestinal microbes between BD patients and normal people

3 讨论

BD是一种受遗传和环境因素影响的系统性血管疾病。肠道菌群作为一种宿主因子,近年来因其在BD发病机制中的潜在作用而受到广泛关注^[7],但与BD发生发展的关系尚未阐明。本研究采用宏基因组学方法分析BD相关肠道菌群微生物特征,结果发现,相较于正常人,在门水平上,BD患者肠道Proteobacteria增多,而Bacteroidetes减少;在属种水平上,大部分BD患者优势菌属于Proteobacteria,BD患者肠道富集菌还包括Collinsella Spp.、Bilophila spp.及Bacteroides spp.,大部分正常人优势菌属于Bacteroidetes,如Clostridium spp.、Roseburia spp.、Methanogens。以上结果提示BD患者肠道微生物缺乏产甲烷菌、产丁酸菌,富集产乳酸菌、硫酸盐还原菌,与Shimizu^[9]以日本BD患者为研究对象,采用16s RNA测序结果一致。但Consolandi^[8]等人以意大利BD患者为研究

对象,结果显示,相对于正常人,BD患者 *Roseburia* 和 *Subdoligranulum* 菌属相对丰度下降,丁酸盐含量减少,与本研究结果稍有偏差,说明种族和地区可能会对BD患者肠道微生物改变造成影响。产乳酸菌 *Collinsella Spp.* 属于革兰阳性菌,谢佳^[10]等人认为乳酸菌可作为益生菌调节肠道菌群平衡,有助于肠黏膜的修复,广泛用于消化不良、便秘等消化道系统疾病治疗。Liu^[11]等人从类风湿关节炎患者和健康人粪便中提取细菌DNA,分析两组肠道菌群的丰度、乳酸菌群落结构发现,风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者粪便菌群中乳酸菌(10.62 ± 1.72)拷贝/g明显多于健康组(8.93 ± 1.60)拷贝/g,RA患者在丰度、均匀度方面均有显著增加,认为乳酸菌群落与类风湿关节炎的发生发展之间存在潜在关系。类风湿关节炎发生机制可能与乳酸菌肽聚糖生物学活性有关,肽聚糖作为乳酸菌细胞壁成分之一,可诱导机体产生特异性或非特异性免疫反应,并诱导产生抗炎或促炎细胞因子^[12-13]。肽聚糖是Toll样受体2(Toll-like receptor 2, TLR2)的配体,Liang^[14]等人研究发现,与健康对照组相比,活动期BD患者肽聚糖水平明显增加,认为TLR2信号通路可能与BD发病有关。结合本文研究结果,推测乳酸菌可能通过细胞壁的肽聚糖,激活TLR2信号通路而引发BD。

硫酸盐还原菌 *Bilophila spp.* 在人体肠道内广泛存在,是以无机或有机化合物作为电子供体产生硫化氢的厌氧微生物。已有研究发现,其与结肠疾病的发生相关^[15]。硫酸盐还原菌作为革兰阴性菌,可通过产生脂多糖诱发炎症,另外,还能抑制丁酸盐氧化,使丁酸盐含量减少,而产丁酸菌 *Clostridium spp.* 和 *Roseburia spp.* 对肠上皮屏障具有保护作用,对机体免疫状态具有维稳作用,所以丁酸盐的减少会引起肠上皮屏障受损,有助于致病分子入侵^[16]。本研究认为,BD的发生可能与硫酸盐还原菌破坏肠上皮屏障、抑制丁酸盐氧化有关。

综上所述, *Collinsella Spp.*、*Clostridium spp.* 和 *Roseburia spp.* 有利于机体免疫稳态的维持,但肠道微生物过度生长的 *Bilophila spp.* 可能会打破这种平衡,使 *Collinsella Spp.* 过度生长,而 *Clostridium spp.* 和 *Roseburia spp.* 生长抑制,从而损伤肠上皮细胞,促进脂多糖、肽聚糖等致病分子入侵肠上

皮细胞,并通过TLR2信号通路引起T细胞亚群失调,引发BD。

参考文献

- [1] 赵瑞,邵壮,蔡青,等. 白塞病血管病变41例回顾性临床研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(7):440-445.
- [2] 魏玉桢,刘永红,周安娜,等. 7例神经白塞氏病临床和影像特点分析[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24(5):369-371.
- [3] 邵壮,蔡青. 微小RNA在白塞病免疫调控机制中的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2017, 21(9):644-646.
- [4] Zi Y, Ni Z, Wu C, et al. A metagenomic study of the gut microbiome in Behcet's disease [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1):135-147.
- [5] 王庆忠,范云,沈祁烨. 人类微生物组学与健康及其临床检验的需求[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1):67-72.
- [6] 中华医学会风湿病学分会. 白塞病诊断和治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(5):345-347.
- [7] Yavuz S, Akdeniz T, Hancer V. Dual effects of testosterone in Behcet's disease: implications for a role in disease pathogenesis [J]. *Genes & Immunity*, 2016, 17(6):335-341.
- [8] Consolandi C, Turroni S, Emmi G, et al. Behçet syndrome patients exhibit specific microbiome signature [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(4): 269-276.
- [9] Shimizu J, Kubota T, Takada E, et al. Bifidobacteria Abundance-Featured Gut Microbiota Compositional Change in Patients with Behcet's Disease [J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(4): e0153746.
- [10] 谢佳,凌涛,杨兵. 益生菌辅助治疗消化性溃疡的研究进展[J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 22(4):343-346.
- [11] LIU X, Zou Q, Zeng B, et al. Analysis of Fecal Lactobacillus Community Structure in Patients with Early Rheumatoid Arthritis [J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(2):170-176.
- [12] 刘朝. 乳酸菌肽聚糖的研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1):188-197.
- [13] 迟琼,邹泽红,傅意玲,等. 乳酸菌免疫调节功能的研究进展[J]. 中华生物医学工程杂志, 2011, 17(4):377-380.
- [14] Liang L, Tan X, Zhou Q, et al. IL-1 β triggered by peptidoglycan and lipopolysaccharide through TLR2/4 and ROS-NLRP3 inflammasome-dependent pathways is involved in ocular Behçet's disease [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2013, 54(1):402-414.
- [15] 陈坤. 溃疡性结肠炎患者肠道硫酸盐还原菌的检测[D]. 上海交通大学, 2014.
- [16] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells [J]. *Nature*, 2013, 504(7480):446-450.

· 论 著 ·

急性心肌梗死 PCI 术后患者的血清 NT-proBNP、ICTP、MMP-9 水平及其临床意义研究

李小娟^{1*} 曹劝省² 汪砚雨³

[摘要] 目的 分析急性心肌梗死 PCI 术后患者的血清 NT-proBNP、ICTP、MMP-9 水平,并分析其临床意义。方法 选取 2016 年 2 月至 2018 年 8 月因急性心肌梗死在本院行 PCI 手术的 300 例患者为研究对象,根据术后是否发生心血管不良事件分为发生组和未发生组。比较不同临床特征患者心血管不良事件发生率的差异,分析影响心血管不良事件发生的危险因素。结果 300 例急性心肌梗死 PCI 术后患者发生心血管不良事件的例数为 40 例,心血管不良事件发生率为 13.33%;BMI ≥ 24 kg/m²、合并高脂血症、置入支架数目 ≥ 2 个、支架直径 ≥ 3 mm 的急性心肌梗死 PCI 术后患者发生心血管不良事件发生率较高,发生心血管不良事件的患者 NT-proBNP 较高、MMP-9 水平较低,不同年龄、性别、饮酒史、吸烟史、糖尿病史、卒中史、ICTP 水平的患者心血管不良事件发生率差别无统计学意义;将单因素分析有统计学差异的因素作为自变量,将是否发生血栓作为因变量,进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示置入支架数目和 MMP-9 水平的 OR 值分别为 5.204 和 4.342。结论 置入支架数目和 MMP-9 水平是影响急性心肌梗死 PCI 术后患者心血管不良事件发生的独立危险因素,提示临床应早期监测血清 MMP-9 等指标。

[关键词] 心肌梗死;心血管不良事件;危险因素;回归分析

Predictive value of early detection of serum NT-proBNP, ICTP and MMP-9 levels in patients with acute myocardial infarction after PCI

LI Xiaojuan^{1*}, CAO Quanxing², WANG Yanyu³

(1. Department of Disinfection Supply Center, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471003; 2. Department of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471003; 3. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471003)

[ABSTRACT] Objective To analyze the serum levels of NT-proBNP, ICTP and MMP-9 in patients with acute myocardial infarction after PCI, and to analyze its clinical significance. Methods Patients who underwent PCI in our hospital from February 2016 to August 2018 due to acute myocardial infarction were enrolled in the study. According to whether there were cardiovascular adverse events after operation, they were divided into the occurrence group and the non-occurring group. To compare the differences in the incidence of cardiovascular adverse events in patients with different clinical characteristics, and to analyze the risk factors affecting the occurrence of cardiovascular adverse events. Results The number of cardiovascular adverse events in 300 patients with acute myocardial infarction was 40, and the incidence of cardiovascular adverse

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201706213)

作者单位 1. 河南科技大学第一附属医院消毒供应中心,河南,洛阳 471003

2. 河南科技大学第一附属医院心血管外科,河南,洛阳 471003

3. 河南科技大学第一附属医院心血管内科,河南,洛阳 471003

*通信作者:李小娟, E-mail: liuhailaa@163.com

events was 13.33%. BMI \geq 24 kg/m², hyperlipidemia, and number of stents \geq 2 The incidence of cardiovascular adverse events was higher in patients with acute myocardial infarction with stent diameter \geq 3 mm. Patients with cardiovascular adverse events had higher NT-proBNP and lower MMP-9 levels, different ages, genders, and alcohol consumption. There was no statistically significant difference in the incidence of cardiovascular adverse events among patients with medical history, smoking history, diabetes history, stroke history, and ICTP level; factors with statistical differences in univariate analysis were used as independent variables, and the occurrence of thrombus was used as the dependent variable. Multivariate Logistic regression analysis showed that the OR values of the number of stent placement and MMP-9 levels were 5.204 and 4.342, respectively. **Conclusion** The number of stents and MMP-9 levels are independent risk factors for cardiovascular adverse events in patients with acute myocardial infarction after PCI, suggesting that serum MMP-9 should be monitored early in the clinic.

[KEY WORDS] Myocardial infarction; Cardiovascular adverse events; Risk factors; Regression analysis

临床上急性心肌梗死(Percutaneous transluminal coronary intervention, PCI)的发生,能够导致患者短期内病死风险的显著上升,同时患者不良心血管临床结局的发生风险也显著上升^[1-2]。对于急性心肌梗死患者临床结局的预测具有重要的价值,其能够在急性心肌梗死患者的临床治疗方案的选择及出院后的随访方面发挥作用。细胞因子能够在心血管疾病的诊疗过程中发挥重要的评估和预测价值。I型胶原羧基末端肽(Carboxy-terminal telopeptide I collagen, ICTP)能够通过反应心肌细胞损伤糖蛋白的释放情况,进而评估心肌梗死的程度和心血管临床结局风险^[3];N末端B型脑钠肽前体(N terminal pro B type natriuretic peptide, NT-proBNP)是反应心力衰竭的指标,在心肌细胞舒张功能减退或者心肌细胞损伤的过程中,其表达水平可明显上升^[4];基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein 9, MMP-9)作为炎症性相关因子,其能够通过促进心肌细胞间质成分的分解,从而参与到心血管疾病的炎症损伤过程^[5]。本实验揭示了 NT-proBNP、ICTP、MMP-9 的浓度与心肌梗死的病情关系。

1 对象与方法

1.1 一般资料

选取2016年2月至2018年8月在本院接受治疗的急性心肌梗死PCI术后患者为研究对象。纳入标准:①年龄 \geq 18周岁;②符合急性心肌梗死的诊断标准^[6];③无其他严重基础疾病者;排除标准:①临床资料不全者;②患者近期接受其他介入手术治疗者。根据标准共纳入病例数300例,其中发

生心血管不良事件(死亡、非致死性心肌梗死和靶血管再次血运重建)者40例,其中男23例,女17例,年龄50~78岁,平均(63.44 \pm 3.08)岁;未发生心血管不良事件者260例,其中男150例,女110例,年龄52~76岁,平均(63.47 \pm 4.11)岁。两组患者年龄、性别等一般资料差异无统计学意义,具有可比性。患者及家属签署知情同意书。本研究经医院伦理委员会评审通过。

1.2 采用ELISA法进行NT-proBNP、ICTP、MMP-9的检测

采用患者的肘部静脉血5 mL,1 000 r/min离心10 min,取上清液待测。实验板条空白孔中加入样品或者稀释液100 μ L孔,检测孔中加入标本100 μ L/孔,胶纸封闭实验表条孔,36 $^{\circ}$ C条件下孵育60~90 min,磷酸盐缓冲液清洗5次,空白对照孔中加入生物素抗体稀释液100 μ L,检测孔中加入生物素抗体检测液100 μ L,胶纸封闭实验表条孔,36 $^{\circ}$ C条件下孵育30~60 min,空白对照孔中加入酶结合稀释液100 μ L,检测孔中加入酶结合检测液100 μ L,胶纸封闭实验表条孔,磷酸盐缓冲液清洗5次,加入TMB显色底液(品牌:YS-RIBIO 湖州英创生物科技公司),避光36 $^{\circ}$ C孵育15 min,加入终止液100 μ L,3 min内检测OD450值,BioTek酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

1.3 资料收集

采用调查问卷的方式进行相关资料的收集整理,调查的内容包括:年龄、性别、饮酒史、吸烟史、糖尿病史、卒中史、ICTP水平、体重指数、置入支架的数量及直径,同时包括患者其他基础性合并症如高血脂症等。

1.4 评价指标

比较不同临床特征患者心血管不良事件发生率的差异,分析影响急性心肌梗死 PCI 术后患者心血管不良事件的危险因素。

1.5 统计学处理

数据采用 Excel 录入后,采用 SPSS 11.5 软件分析。计数资料以 n 表示,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$,用 t 检验和卡方检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性心肌梗死 PCI 术后患者心血管不良事件发生率的观察

300 例急性心肌梗死 PCI 术后患者发生心血管不良事件的例数为 40 例,心血管不良事件发生率为 13.33%。

2.2 不同临床特征患者短期心血管事件发生率的比较

$\geq 24 \text{ kg/m}^2$ 、合并高脂血症、置入支架数目 ≥ 2 个、支架直径 $\geq 3 \text{ mm}$ 的急性心肌梗死 PCI 术后患者发生心血管不良事件发生率较高,发生心血管不良事件的患者 NT-proBNP 较高、MMP-9 水平较低,不同年龄、性别、饮酒史、吸烟史、糖尿病史、卒中史、ICTP 水平的患者心血管不良事件发生率差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 影响性心肌梗死 PCI 术后患者心血管不良事件的危险因素

将单因素分析有意义的因素作为自变量,将心血管不良事件作为因变量,进行多因素 Logistic 回归分析,结果置入支架数目和 MMP-9 水平进入回归方程,其 OR 值分别为 5.204 和 4.342。见表 2。

3 讨论

冠状动脉粥样硬化性改变导致的血管内皮细胞的损伤,粥样斑块的形成及继发性血栓形成,均能够促进急性心肌梗死的发生。部分流行病学研究发现,急性心肌梗死患者内短期内不良心血管临床结局的发生,能够导致生存时间的下降及致残率的显著上升^[7]。对于急性心肌梗死患者不良心血管临床结局的预测,能够在疾病的高危随访、治疗结局的评估及后续治疗方案的选择方面提供

表 1 不同临床特征患者短期心血管事件发生率的比较

Table 1 Comparison of short-term cardiovascular events in patients with different clinical characteristics

项目	发生组	未发生组	χ^2 值	P 值
性别				
男	23	150	0.001	0.982
女	17	110		
年龄				
≥ 65 岁	25	170	0.127	0.722
< 65 岁	15	90		
BMI				
$\geq 24 \text{ kg/m}^2$	30	100	18.848	< 0.001
$< 24 \text{ kg/m}^2$	10	160		
饮酒史				
是	22	108	2.558	0.110
否	18	152		
吸烟史				
是	25	160	0.014	0.907
否	15	100		
糖尿病				
是	24	150	0.076	0.783
否	16	110		
高血脂				
是	29	120	9.626	< 0.001
否	11	140		
卒中史				
是	26	130	3.125	0.077
否	14	130		
置入支架数目				
≥ 2 个	30	120	11.539	< 0.001
< 2 个	10	140		
支架直径				
$\geq 3 \text{ mm}$	28	125	6.667	0.010
$< 3 \text{ mm}$	12	135		
NT-proBNP (ng/L)	995.24 \pm 9.35	623.48 \pm 7.46	283.030	< 0.001
ICTP ($\mu\text{g/L}$)	4.53 \pm 1.02	4.51 \pm 1.14	0.105	0.458
MMP-9 (ng/L)	298.47 \pm 15.83	385.24 \pm 12.72	-38.792	< 0.001

表 2 影响性心肌梗死 PCI 术后患者心血管不良事件的危险因素

Table 2 risk factors of cardiovascular adverse events in patients with myocardial infarction after PCI

因素	B 值	Wald	P 值	OR 值	95%CI
置入支架数目	1.836	13.345	0.012	5.204	1.344~12.155
MMP-9 (ng/L)	1.532	9.245	0.025	4.342	1.124~11.327

参考。影像学检查虽然能够在疾病短期内心血管临床结局的评估方面发挥作用,但依靠心脏超声等检查评估急性心肌梗死患者临床结局的滞后性较为明显,对于患者心血管临床结局预测的灵敏度较低。血清肌钙蛋白能够在急性心肌梗死的诊断过程中发挥作用,但依靠肌钙蛋白评估急性心肌梗死临床结局的特异度较低,其对于患者短期内恶性心血管结局评估的一致性率不超过40%^[8]。

NT-proBNP 是反应心肌细胞舒张储备功能的指标,在心力衰竭、心肌梗死或者急性冠脉综合征患者中,其表达浓度可明显上升^[4];ICTP 是羧基末端成分,在心肌细胞膜破裂或者细胞凋亡的过程中,ICTP 可显著分解释放,从而导致外周血中 ICTP 的上升^[9];MMP-9 是金属蛋白相关因子,其能够通过诱导下游氧化应激因子,提高游离自由基的释放程度,加剧心血管系统的损伤^[5-12]。

本次研究发现,所有的心肌梗死患者中,不良心血管临床结局的发生率接近在13%左右,这与多数研究报道的平均发病率较为接近。具体分析可以发现,BMI ≥ 24 kg/m²、合并高脂血症、置入支架数目 ≥ 2 个、支架直径 ≥ 3 mm 的急性心肌梗死患者,其PCI术后发生心血管不良事件的风险较高,提示了基础性临床特征对于不良心血管临床结局的影响,这主要由于体重指数较高的患者或者高脂血症的患者,其冠状动脉内皮细胞的氧化应激性损伤较为明显,内皮细胞的凋亡及继发性皮下血栓形成的风险较高,最终促进了不良结局的发生;支架数目较多或者支架直径较长的患者,其冠状动脉损伤程度较高,动脉血管的狭窄相对较为严重,其远期血管再次发生病变的风险也明显上升。本次研究还重点探讨了NT-proBNP、ICTP、MMP-9的变化情况,发现在不良心血管临床结局的患者中,NT-proBNP的表达浓度较高,MMP-9的表达浓度较低,提示NT-proBNP、MMP-9的异常改变能够显著影响到心血管临床结局的发生。分析其具体的原因,主要由于NT-proBNP、MMP-9的表达改变,能够加剧心血管系统的氧化应激性损伤,提高心力衰竭的风险,并降低心肌细胞的储备能力,最终促进了不良结局的发生^[13-14]。但本次研究并未发现NT-proBNP、ICTP的表达差异,提示NT-proBNP、ICTP的表达并不会影响到心肌

梗死患者临床结局,这与ICTP的基础方面认知存在一定差别,考虑由于本次研究入组病例数量不足有关。于洪伟等^[15]研究者也发现,在发生了血管再次狭窄或者不良结局的患者中,MMP-9的表达浓度可显著上升,特别是在MMP-9持续性上升的患者中,心肌梗死患者短期内临床结局的恶化更为明显。危险因素分析也可见,置入支架数目和MMP-9是影响心血管短期结局的独立危险因素。

置入支架数目和MMP-9水平是影响急性心肌梗死PCI术后患者心血管不良事件的危险因素,临床应早期监测血清MMP-9等指标,进而为心肌梗死临床预后的预测提供依据。

参考文献

- [1] Ding Y, Svingen GFT, Pedersen ER, et al. Plasma Glycine and Risk of Acute Myocardial Infarction in Patients With Suspected Stable Angina Pectoris [J]. Journal of the American Heart Association, 2016, 5(1): 102-106.
- [2] Lexis CPH, van der Horst-Schrivers ANA, Lipsic E, et al. The effect of metformin on cardiovascular risk profile in patients without diabetes presenting with acute myocardial infarction: data from the Glycometabolic Intervention as adjunct to Primary Coronary Intervention in ST Elevation Myocardial Infarction (GIPS-III) trial [J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2015, 3(1): 90-93.
- [3] 艾文婷,傅莹莹,李瑞,等.急性冠状动脉综合征患者血清I CTP、III CTP水平与TIMI危险评分的相关性分析[J].临床急诊杂志,2017,18(6):433-436.
- [4] 卢慧玲,刘亚萍,胡秀芬.N端脑钠肽前体在早期预测川崎病冠状动脉病变中的意义[J].中华儿科杂志,2015,53(4):300-303.
- [5] 马伟利,张月兰,宝凤梅,等.血浆基质金属蛋白酶-9与H型高血压及冠状动脉病变程度的相关性研究[J].中国循证心血管医学杂志,2018,10(12):1576-1578.
- [6] 柯元南,陈纪林.不稳定性心绞痛和非ST段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(4):295-304.
- [7] Jackson JL. Capsule Commentary on Duan-Porter, et al. Control Beliefs and Risk for Death, Stroke and Myocardial Infarction in Middle-aged and Older Adults: An Observational Study [J]. Journal of General Internal Medicine, 2015, 30(8): 1189-1194.
- [8] 陈学,龙静,韩朝辉,等.和肽素脑钠肽及高敏肌钙蛋白T在急性心肌梗死中的早期诊断价值[J].中国急救医学,2016,36(7):634-638.
- [9] 田祥全,万小松,杨纪才,等.血清I型胶原羧基末端肽、基质金属蛋白-2水平与冠状动脉病变的关系[J].中国循证心血管医学杂志,2016,8(5):553-555. (下转第48页)

· 论 著 ·

MG患者外周血单个核细胞TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF的变化与其病情程度的关系

刘新华 邓建中* 范仲鹏

【摘要】目的 探讨重症肌无力(MG)病情与外周血单个核细胞中肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3交互作用蛋白1(TNIP1)蛋白、血清白球蛋白比值(AGR)、血浆血小板源性生长因子(PDGF)变化的关系。方法 选取本院2014年1月至2017年1月收集的90例MG患者(MG组)、选取健康体检对象90例(对照组),检测并比较两组对象的外周血单个核细胞中TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF,并分析上述指标在不同类型MG患者中的差异及与重症肌无力定量评分(QMGS)的相关性。结果 MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平均显著的低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);眼肌型MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平均显著的高于全身型MG患者,差异具有统计学意义($P<0.05$),眼肌型MG患者QMGS评分显著的低于全身型MG患者($P<0.05$);MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平与患者的QMGS评分均呈显著的负相关关系($P<0.05$);采用多元线性回归分析,QMGS评分=38.062-5.571(TNIP1蛋白)-2.664(AGR)-0.883(PDGF)。结论 MG患者外周血TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平降低显著,并且与患者病情加重有关。

【关键词】 重症肌无力; TNIP1蛋白、白球蛋白比值; 血小板源性生长因子

Relationship between changes of TNIP1 protein, serum AGR and plasma PDGF in peripheral blood mononuclear cells of MG patients and their severity

LIU Xinhua, DENG Jianzhong*, FAN Zhongpeng

(Department of Psychiatry, Anyang Hospital, Puyang, Henan, 455000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the changes of myasthenia gravis (MG) and tumor necrosis factor α -inducing protein 3 interaction protein 1 (TNIP1) in peripheral blood mononuclear cells, serum albumin ratio (AGR), and platelet-derived growth factor (PDGF). Methods 90 MG patients (MG group) were collected from our hospital from January 2014 to January 2017, and 90 healthy control subjects (control group). TNIP1 in peripheral blood mononuclear cells, serum AGR, and plasma PDGF were detected and compared between the two groups of subjects, and the differences between the above indicators in different types of MG patients and their correlation with quantitative myasthenia gravis score (QMGS) were analyzed. Results The patients in the MG group of TNIP1, serum AGR and plasma PDGF levels were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). MG group of patients with ocular type TNIP1, serum AGR and plasma PDGF levels were significantly higher than that in patients with systemic MG, the differences were statistically significant ($P<0.05$), QMGS patients with ophthalmoplegia MG score was significantly lower than that of patients with systemic MG ($P<0.05$). The levels of TNIP1 protein, serum AGR, and plasma PDGF in patients in the MG group were significantly negatively correlated with the patients' QMGS scores ($P<0.05$). Using multiple linear regression analysis, QMGS score is 38.062-5.571 (TNIP1 protein) - 2.664

基金项目:河南省科技发展计划项目(163102511322)

作者单位:濮阳市安阳地区医院神内一科,河南,濮阳 455000

*通信作者:邓建中, E-mail: liu6531315xinhua@163.com

(AGR) -0.883 (PDGF). Conclusion The levels of TNIP1 in the peripheral blood, serum AGR and plasma PDGF of MG patients were significantly decreased, and were related to the worsening of the patient's condition.

[KEY WORDS] Myasthenia gravis; TNIP1 protein; White globulin ratio; Platelet derived growth factor

重症肌无力(Myasthenia gravis, MG)属于获得性自身免疫性疾病,病变常累及神经、肌肉接头突触后膜,使其信号传递发生障碍,进而出现骨骼肌收缩无力。随着病情的进展,可出现肢体无力、眼睑下垂、吞咽困难、构音障碍等,严重影响患者的身心健康^[1]。目前临床对于MG的发病机制尚未完全阐明,尚缺乏彻底根治MG的方法,已有的研究认为与携带易感基因、环境因素等有关^[2]。

目前临床上缺乏MG早期诊断的敏感实验室指标,已有的研究认为MG的发生受到多种神经细胞因子的调控^[3]。外周血单个核细胞中肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3交互作用蛋白1(TNIP1)蛋白可抑制NF- κ B细胞,可保护神经细胞,并抑制其凋亡^[4]。血清白球蛋白比值(Albumin globulin ratio, AGR)反应机体抗氧化、抗炎能力^[5]。血浆血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)可调节细胞增殖、分化和迁移过程,促进髓鞘再生,与多种神经系统免疫性疾病有关^[6]。本研究探讨了MG患者外周血单个核细胞中TNIP1蛋白、AGR、PDGF的变化及与患者病情的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2014年1月至2017年1月在本院收集的90例MG患者(MG组)、选取健康体检对象90例(对照组)。MG组,年龄26~75岁,平均(51.3±11.3)岁;男42例、女48例,病程3个月至6年,平均(2.8±1.4)年;MG分型:眼肌型51例、全身型39例。对照组,年龄25~79岁,平均(50.4±13.0)岁;男45例、女45例。两组对象的年龄、性别比较,差异不具有统计学意义,具有可比性。

纳入标准:①MG患者的诊断标准参考《中国重症肌无力诊断和治疗指南2015年版》^[7]中的标准;②纳入对象年龄19~79岁;③患者入院后经肌电图检测确诊;④本研究取得研究对象的知情同意及医学伦理委员会的批准。

排除标准:①妊娠及哺乳期妇女;②近3个月服用激素、免疫抑制剂药物;③脑卒中病史;④头颅外伤病史;⑤神经系统病史;⑥恶性肿瘤。

1.2 指标检测方法

抽取研究对象空腹静脉血,3 000 r/min离心分离血清。采用溴甲酚氯染料结合法检测血清总蛋白、白蛋白水平。AGR=白蛋白/(总蛋白-白蛋白)。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测血清TNIP1蛋白、PDGF。检测仪器为美国伯腾全自动酶标仪,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 QMGS评分标准

重症肌无力定量评分(QMGS)^[3]包括复视、睑下垂、面肌、吞咽、发音、左右上肢、肺活量、左右手握力、抬头、左右腿测试,总分0~39分,评分越高表示患者的病情越严重。

1.4 统计学方法

统计软件采用SPSS 16.0版本,计量资料用($\bar{x} \pm s$)的表示,两组间比较采用 t 检验,组间比较采用 χ^2 检验;数据之间的相关性采用Pearson线性相关分析法,多因素分析采用多元线性回归分析法; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组对象的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF比较

MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平均显著的低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 2组对象的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF比较
[$n=90, (\bar{x} \pm s)$]

组别	TNIP1蛋白(相对表达)	AGR	PDGF(pg/mL)
MG组	0.52±0.16	1.39±0.17	6.32±1.80
对照组	0.81±0.10	1.83±0.20	10.57±1.16
t 值	14.581	15.902	18.828
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同类型MG患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF比较

眼肌型MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平均显著的高于全身型MG患者,差异具

有统计学意义($P<0.05$),眼肌型MG患者QMGS评分显著的低于全身型MG患者($P<0.05$);(表2)。

表2 不同类型MG患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of TNIP1 protein, serum AGR and plasma PDGF in different types of MG patients [$n, (\bar{x} \pm s)$]

分型	n	TNIP1 蛋白 相对表达	AGR	PDGF (pg/mL)	QMGS 评分(分)
眼肌型	51	0.64±0.12	1.48±0.11	7.15±1.65	18.4±1.4
全身型	39	0.43±0.15	1.28±0.14	5.60±1.73	22.8±2.7
t 值		10.371	10.657	6.151	6.151
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 MG患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF与患者病情的关系

MG组患者的TNIP1蛋白($r=-0.682, P<0.001$)、血清AGR($r=-0.558, P<0.001$)、血浆PDGF($r=-0.629, P<0.001$)水平与患者的QMGS评分均呈显著的负相关关系($P<0.05$)。采用多元线性回归分析, QMGS评分=38.062-5.571(TNIP1蛋白)-2.664(AGR)-0.883(PDGF)。

3 讨论

MG是临床常见的获得性自身免疫性疾病,发病原因不明,可能与自身免疫异常、感染、药物、环境等诸多因素有关^[8]。目前多数学者认同MG是携带易感基因的个体在环境影响下出现免疫异常,产生抗体攻击神经肌肉接头突触后膜,进而引起骨骼肌无力。MG不仅可影响运动神经系统而致残,随着病程进展还可影响心脏功能而导致患者死亡^[9]。

有研究认为, MG的发病与自身反应性B细胞活化为浆细胞后分泌自身抗体有关,因此80%以上的MG患者合并胸腺瘤、胸腺增生等胸腺异常情况^[10]。因此临床上常采用胸腺切除术治疗MG,大多数患者病情可以得到良好的控制^[11]。目前临床对于MG的临床诊断以新斯的明试验、胸腺CT、MRI、肌电图、乙酰胆碱受体抗体滴度检查等为主,常采取多个检查结果相结合进行诊断,尚缺乏特异性好、灵敏度高的实验室诊断指标^[12]。

TNIP1蛋白在NF- κ B信号通路中起到负反馈调节作用。有研究发现, NF- κ B细胞激活后进入细胞核,促进增殖细胞因子合成。而TNIP1蛋白可抑制NF- κ B的上述作用,对炎症性疾病产生一定的保护作用^[13]。本研究中MG患者的TNIP1蛋

白水平显著的低于健康人群。这一结果提示, MG患者外周血TNIP1蛋白水平显著降低,可将其作为MG诊断的辅助指标之一。MG患者TNIP1蛋白水平较低,在NF- κ B信号通路中的负反馈调节作用减弱,不能抑制炎症性疾病的发生。

白蛋白是由肝脏合成的重要蛋白,参与机体抗氧化、抗炎过程,对自身免疫反应进行调节。免疫性疾病患者免疫球蛋白水平升高,白蛋白降低,由此导致血清AGR下降^[14]。本研究中MG患者的血清AGR水平显著的低于健康人群。这一结果提示, MG患者外周血清AGR水平显著降低,可将其作为MG诊断的辅助指标之一。MG患者肝脏合成白蛋白减少,对自身免疫反应的调节作用减弱,这可能是MG患者自身免疫功能异常的原因之一。

PDGF是人体重要的生长因子,与受体结合后启动多种信号通路,参与细胞增殖、分化、迁移。有研究发现, PDGF可调节少突胶质细胞向脱髓鞘部位迁移而促进髓鞘修复^[15]。本研究中MG患者的PDGF水平均显著的低于健康人群。这一结果提示, MG患者外周血PDGF水平显著降低,可将其作为MG诊断的辅助指标之一。MG患者PDGF水平下降,影响多种信号通路,不能较好的调节少突胶质细胞向脱髓鞘部位迁移,不利于髓鞘修复而致肌无力。

根据病变的严重程度可将MG患者分为眼肌型MG和全身型MG。眼肌型MG患者的病情较轻,病变仅局限于眼肌周围。而全身型MG患者病情较重,已累及全身骨骼肌。本研究发现,眼肌型MG患者QMGS评分显著的低于全身型MG患者,这一结果也证实,全身型MG患者的病情更加严重。本研究还细化分析了不同病变程度的MG患者TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平的变化,发现眼肌型MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平均显著的高于全身型MG患者,这一结果提示,随着MG病情的进展,患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平均进一步下降。相关性检查结果也证实, MG组患者的TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平与患者的QMGS评分均呈显著的负相关关系。这一结果提示, MG患者外周血TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平的下降与患者病情加重有关,可将其作为评估MG病情和预后的指标。

综上所述, MG患者外周血TNIP1蛋白、血清AGR、血浆PDGF水平降低显著,并且与患者病情加重有关。

参考文献

- [1] 翦凡,王化冰,陈娜,等.远端型重症肌无力的临床和电生理观察[J].中华医学杂志,2017,97(37):2894-2897.
- [2] 杨玲,王国防,丁意平,等.重症肌无力伴胸腺瘤或胸腺增生的临床特征及预后[J].中国康复理论与实践,2017,23(12):1425-1430.
- [3] 范文君,林宏,常婷等.胸腺切除术治疗重症肌无力的疗效及其影响因素分析[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2016,23(1):1-4.
- [4] 耿英才,宋宇,张真铭,等.TNIP1在胸腺瘤患者重症肌无力发病中的作用[J].中华医学遗传学杂志,2016,33(5):615-618.
- [5] 杨德壕,苏中钱,陈颖,等.血清白球蛋白比值在评估重症肌无力患者病情严重程度及预后中的价值[J].中华医学杂志,2016,96(9):697-701.
- [6] 王健健,张荟雪,周雪灵,等.重症肌无力患者血浆中血小板源性生长因子的表达及其临床意义[J].中华医学杂志,2017,97(37):2890-2893.
- [7] 中华医学会神经病学分会神经免疫学组,中国免疫学会神经免疫学分会.中国重症肌无力诊断和治疗指南2015[J].中华神经科杂志,2015,48(11):934-940.
- [8] 雷霖,笱宇威.难治性重症肌无力治疗的研究进展[J].中华神经医学杂志,2016,15(3):319-321.
- [9] 胡裕翔,吴晓蓉,邵毅,等.眼外肌在重症肌无力中选择性受累机制研究进展[J].山东医药,2016,56(42):109-112.
- [10] 李千,王丽华,王健健,等.重症肌无力患者胸腺组织中mi-croRNA-27a-3p的表达水平及其临床意义[J].中华神经科杂志,2016,49(4):302-306.
- [11] 张文军,范军,马冬春,等.胸腔镜与胸骨正中劈开胸腺扩大切除治疗重症肌无力并胸腺瘤的比较[J].安徽医科大学学报,2016,51(5):755-758,759.
- [12] Boldingh MI, Maniaol AH, Brunborg C, et al. Geographical Distribution of Myasthenia Gravis in Northern Europe - Results from a Population-Based Study from Two Countries[J]. Neuroepidemiology, 2015, 44(4): 221-231.
- [13] 吴明乐,汪华,陈旭,等.重症肌无力患者胸腺切除手术前后外周血单个核细胞中TNIP1mRNA和蛋白表达水平变化的临床研究[J].实用医院临床杂志,2017,14(5):164-167.
- [14] Tremolizzo L, Giopato F, Piatti ML, et al. Myasthenia gravis mimicking stroke: a case series with sudden onset dysarthria [J]. Neurological sciences, 2015, 36(6): 895-898.
- [15] 毛利靖,叶洁瑜,梁恩瑜,等.PDGF-BB促粒细胞/巨核细胞生长及其作用机制的研究[J].中国实验血液学杂志,2017,25(2):555-561.
- [23] Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 272-283.
- [24] Qiu L, Tang Q, Li G, et al. Long non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets: Recent insights into hepatocellular carcinoma [J]. Life Sci, 2017, 191: 273-282.
- [25] Hu X, Jiang J, Xu Q, et al. A Systematic Review of Long Noncoding RNAs in Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanism and Clinical Implications[J]. BioMed research international, 2018; 8126208.
- [26] Zhang C, Yang X, Qi Q, et al. lncRNA-HEIH in serum and exosomes as a potential biomarker in the HCV-related hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biomark, 2018, 21(3): 651-659.
- [27] Xu H, Chen Y, Dong X, et al. Serum Exosomal Long Non-coding RNAs ENSG00000258332.1 and LINC00635 for the Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2018, 27(6): 710-716.
- [28] Choi J, Kim GA, Han S, et al. Longitudinal Assessment of Three Serum Biomarkers to Detect Very Early-Stage Hepatocellular Carcinoma [J]. Hepatology, 2019, 69(5): 1983-1994.
- [29] Dong R, Wang N, Yang Y, et al. Review on Vitamin K Deficiency and its Biomarkers: Focus on the Novel Application of PIVKA-II in Clinical Practice [J]. Clin Lab, 2018, 64(4): 413-424.
- [30] Wu J, Xiang Z, Bai L, et al. Diagnostic value of serum PIVKA-II levels for BCLC early hepatocellular carcinoma and correlation with HBV DNA [J]. Cancer Biomark, 2018, 23(2): 235-242.
- [31] Liu C, Wen C, Wang X, et al. Golgi membrane protein GP73 modified-liposome mediates the antitumor effect of survivin promoter-driven HSVtk in hepatocellular carcinoma [J]. Exp Cell Res, 2019, 383(1): 111496.
- [32] Jing JS, Ye W, Jiang YK, et al. The Value of GPC3 and GP73 in Clinical Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma [J]. Clin Lab, 2017, 63(11): 1903-1909.
- [33] Salvatici M, Achilarrre MT, Sandri MT, et al. Squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag) during follow-up of cervical cancer patients: Role in the early diagnosis of recurrence [J]. Gynecol Oncol, 2016, 142(1): 115-119.
- [34] Yu J, Wang ZJ, Chen LH, et al. Diagnostic value of serum squamous cell carcinoma antigen for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2017, 77(1): 8-14.
- [35] Liu CH, Gil-Gomez A, Ampuero J, et al. Diagnostic accuracy of SCCA and SCCA-IgM for hepatocellular carcinoma: A meta-analysis [J]. Liver Int, 2018, 38(10): 1820-1831.
- [36] 史俊英,王晔,陈文,等.GeXP多重分析技术检测肝癌组织长链非编码RNA表达的实验研究[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(1):9-16.

(上接第5页)

· 论 著 ·

TGF- β 1、MMP-3及Collagen III在POP患者子宫主韧带组织中的表达及意义

张凯 薛惠英 张雪芹*

[摘要] 目的 探讨转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)及胶原蛋白III型(Collagen III)在盆腔器官脱垂(POP)患者子宫主韧带组织中的表达及意义。方法 选取2017年1月至2018年5月治疗的POP患者45例(POP组),其中III期25例,IV期20例,同时选取无POP患者50例作为对照组,采用免疫组化染色分析子宫主韧带组织中TGF- β 1、MMP-3及Collagen III表达情况,Western blot检测各指标表达的灰度值。结果 POP组TGF- β 1和Collagen III阳性表达率及平均灰度值均明显低于对照组($P<0.05$),而MMP-3阳性表达率及平均灰度值明显高于对照组($P<0.05$)。POP组绝经前后患者TGF- β 1、Collagen III、MMP-3阳性表达率及平均灰度值差异具有统计学意义($P<0.05$)。POP组III期和IV期患者TGF- β 1、Collagen III、MMP-3阳性表达率及平均灰度值差异具有统计学意义($P<0.05$)。POP患者TGF- β 1、Collagen III与MMP-3呈负相关($r=-0.563, -0.677, P<0.05$),TGF- β 1与Collagen III呈正相关($r=0.441, P<0.05$)。结论 POP患者子宫主韧带组织中MMP-3呈高表达,而TGF- β 1与Collagen III呈低表达,与绝经状况及病情程度可能有一定关系,且3者间表达有相关性。

[关键词] 转化生长因子 β 1;基质金属蛋白酶3;胶原蛋白;III型;盆腔器官脱垂

Expression and significance of TGF- β 1, MMP-3 and Collagen III in uterine main ligament tissue of POP patients

ZHANG Kai, XUE Huiying, ZHANG Xueqin*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Anyang People's Hospital, Anyang, Henan, China, 455000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and significance of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and collagen type III (Collagen III) in uterine main ligament tissue of patients with pelvic organ prolapse (POP). Methods 45 cases of POP patients (POP group) treated from January 2017 to May 2018 were selected, of which 25 were in stage III and 20 were in stage IV. At the same time, 50 patients without POP were selected as the control group, and the uterus was analyzed by immunohistochemical staining. The expression of TGF- β 1, MMP-3 and Collagen III in the main ligament tissue was detected by Western blot. Results The positive expression rates and average gray value of TGF- β 1 and Collagen III in POP group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$), however, the positive expression rate and average gray value of MMP-3 were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The differences in positive expression rate and average gray value of TGF- β 1, Collagen III, MMP-3 in patients with POP before and after menopause were statistically significant ($P<0.05$). The differences in the positive expression rates and average gray values of TGF- β 1, Collagen III, and MMP-3 in patients with stage III and IV in the POP group were statistically significant ($P<0.05$). POP patients had a negative correlation between TGF- β 1, Collagen III and MMP-3 ($r = -0.563, -0.677, P<0.05$), and had a positive correlation

基金项目:河南省科技攻关计划项目(152102512373)

作者单位:安阳市人民医院妇产科,河南,安阳 455000

*通信作者:张雪芹, E-mail: zhangxueqin@163.com

between TGF-β1 and Collagen III ($r=0.441, P<0.05$). Conclusion MMP-3 is highly expressed in the uterine main ligament tissue of POP patients, while TGF-β1 and Collagen III are low expressed, which may be related to the menopausal status and disease severity, and the expression of the three is correlated.

[KEY WORDS] Transforming growth factor-β1; Matrix metalloproteinase-3; Collagen type III; Pelvic organ prolapse

流行病学研究证实,盆腔器官脱垂(pelvic organ prolapse, POP)的发病率可超过473~684/1万女性左右^[1]。临床上POP的发生,能够导致子宫脱垂、阴道前后壁脱垂及压力性尿失禁的发生,导致女性患者生活质量的显著下降^[2]。

对于POP的病因探讨具有重要的意义,其能够深入揭示POP的发病机制,从而为疾病的预防提供理论参考。生物学因子指标的表达,能够通过影响到盆腔内韧带的张力、纤维组织的顺应性及胶原纤维的修复,进而参与到女性POP的发生过程。转化生长因子-1(Transforming growth factor, TGF-β1)能够促进盆地纤维细胞的损伤修复,促进间质细胞增生,提高盆底组织的抗张力和抗机械性应力的能力^[3];基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的表达,能够通过促进细胞间质成分蛋白酶的激活,促进细胞间质的分解,导致细胞间质成分中胶原成分的降解,导致盆底脏器组织脱垂风险的上升^[4];胶原蛋白III型(Collagen III)的表达浓度的上升能够降低韧带组织的韧性,提高韧带组织对于子宫及阴道前后壁的支撑能力,增加组织的抗张力强度^[5]。为了揭示TGF-β1、MMP-3及Collagen III的表达与POP的关系,从而为临床上POP的诊疗提供理论方面的参考,本次研究搜集POP患者45例,探讨了TGF-β1、MMP-3及Collagen III在主韧带组织中的表达情况,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2018年5月在本院治疗的POP患者45例(POP组),其中III期25例,IV期20例。纳入标准:①诊断符合盆腔器官脱垂定量分期法(Quantitative staging of pelvic organ prolapse, POP-Q)中的III和IV期患者;②经尿动力学检查无尿失禁;③在我院行手术治疗;④术后病理证实为非子宫内膜异位症等雌激素相关疾病;⑤患者及家属知情同意。排除标准:①有松皮病、肺气肿等弹

性纤维异常疾病;②有生殖道、泌尿系统感染;③近期3个月服用过激素类药物。同时选取因宫颈上皮内瘤变或良性肿瘤行子宫切除的无POP患者50例作为对照组,观察组和对照组年龄、产次等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本次研究所有患者均知情同意,并获得医院伦理委员会批准。

表1 两组一般资料比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of basic data in 2 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	年龄 (岁)	产次	体重指数 (kg/m ²)	绝经情况	
					绝经前	绝经后
POP组	45	54.92±8.29	1.78±0.47	22.98±3.20	26	19
对照组	50	55.10±9.10	1.70±0.50	23.01±3.11	30	20
t/χ ² 值		0.100	0.801	0.046	0.048	
P值		0.920	0.425	0.963	0.826	

1.2 实验方法

免疫组化法检测TGF-β1、MMP-3及Collagen III的表达:采用石蜡包埋组织进行连续性切片,脱蜡至水后采用H₂O₂室温下孵育10 min,磷酸盐缓冲液冲洗3次,每次3~5 min,8%的蛋白粉封闭液(商品名:BSA购自南京博奥生物科技公司),封闭2 h,倒去封闭液后加入TGF-β1、MMP-3及Collagen III一抗(兔来源 浓度1:1 000~1 500 其中TGF-β1、MMP-3抗体购自abcam公司, Collagen III抗体购自上海泰康生物公司),4℃冰箱过夜,磷酸盐缓冲液冲洗3次,每次3~5 min,加入二抗(鼠来源 1:400~500 购自南京博奥生物公司),室温孵育20~30 min,冲洗3次,每次3~5 min,加入辣根酶或碱性磷酸酶的标记物,室温孵育10 min,冲洗3次,每次3~5 min,滴加显色剂(DAB购自南京博奥生物科技公司),复染,脱水,封片。

读片评分标准:①根据着色强度:0分为无色、1分为淡黄色、2分为棕黄色、3分为褐色、黑色;②根据阳性细胞比例:阳性细胞数目所占比例≤10%为1分、阳性细胞所占比例11%~50%为2分、

阳性细胞数 51%~75%为 3 分、阳性细胞数所占比例 >75% 为 4 分, 两种积分相乘总分 <3 分为阴性、≥3 分为阳性。

Western blot 检测相关指标的表达灰度值: 将所研磨的子宫韧带组织蛋白与上样缓冲液以 5:1 的浓度相互混合, 80~100℃ 煮沸 5 min。根据不同的蛋白分子量水平, 配制并灌注相应的 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 按 15 g/孔蛋白量进行组织蛋白的上样, 进行 SDS.PAGE 电泳, 电泳后根据条带进行切胶, 半湿法转移至硝酸纤维素膜, BSA 蛋白封闭 2 h, 加入含 10% BSA 一抗及二抗 (1:1 000), 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min, 采用仪器读取平均灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件, 计数资料比较使用 χ^2 检验, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较使用 t 检验, 相关性采用 pearson 相关分析, 检验水准 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 POP 组和对照组 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 表达比较

POP 组 TGF- β 1 和 Collagen III 阳性表达率明显低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 而 MMP-3 阳性表达率明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2, POP 组 TGF- β 1 和 Collagen III 表达平均灰度值明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 MMP-3 平均灰度值明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 3。TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 的阳性着色均表达于细胞质, 呈黄色、棕黄色、褐色表达, 见图 1。

表 2 POP 组和对照组 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 阳性表达情况比较 [n(%)]

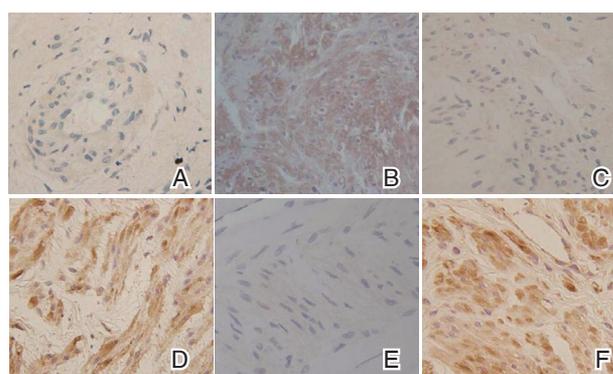
Table 2 Comparison of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III positive expression between pop group and control group [n(%)]

组别	n	TGF- β 1	MMP-3	Collagen III
POP 组	45	15 (33.33)	35 (77.78)	20 (44.44)
对照组	50	35 (70.00)	16 (32.00)	41 (82.00)
χ^2 值		12.772	19.961	14.536
P 值		0.000	0.000	0.000

表 3 POP 组和对照组 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 表达灰度值比较

Table 3 Comparison of expression gray values of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III between pop group and control group

组别	n	TGF- β 1	MMP-3	Collagen III
POP 组	45	48.29±12.10	60.29±10.02	41.44±11.20
对照组	50	91.11±11.40	32.10±9.12	99.15±10.33
t 值		17.756	14.356	26.125
P 值		0.000	0.000	0.000



注: A、B 和 C 分别为 POP 组子宫主韧带组织中 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 表达; D、E 和 F 分别为对照组子宫主韧带组织中 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 表达 ($\times 400$)。

图 1 各组子宫主韧带组织中 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 表达免疫组化图

Figure 1 expression of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III in the main ligament of uterus of each group

2.2 POP 组绝经前及绝经后 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 表达比较

POP 组绝经后患者 TGF- β 1 和 Collagen III 阳性表达率明显低于绝经前患者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 MMP-3 阳性表达率明显高于绝经前患者, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 4。

表 4 POP 组绝经前及绝经后 TGF- β 1、MMP-3 及 Collagen III 阳性表达率比较 [n(%)]

Table 4 Comparison of the expression of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III in the pop group before and after menopause [n(%)]

绝经情况	n	TGF- β 1	MMP-3	Collagen III
绝经前	26	13 (50.00)	17 (65.38)	16 (61.54)
绝经后	19	2 (10.53)	18 (94.74)	4 (21.05)
χ^2 值		7.697	5.472	7.287
P 值		0.006	0.019	0.007

POP组绝经后患者TGF- β 1和Collagen III表达平均灰度值明显低于绝经前患者,而MMP-3平均灰度值明显高于绝经前患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表5。

表5 POP组绝经前及绝经后TGF- β 1、MMP-3及Collagen III表达灰度值比较 [$n(\%)$]

Table 5 Comparison of expression gray values of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III in pop group before and after menopause [$n(\%)$]

绝经情况	<i>n</i>	TGF- β 1	MMP-3	Collagen III
绝经前	26	54.02 \pm 10.33	52.10 \pm 8.84	50.02 \pm 8.22
绝经后	19	41.15 \pm 9.70	69.02 \pm 10.05	32.20 \pm 6.44
<i>t</i> 值		4.234	5.986	7.845
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.3 POP组不同分期患者TGF- β 1、MMP-3及Collagen III表达比较

POP组IV期患者TGF- β 1和Collagen III阳性表达率明显低于III期患者,有统计学意义($P < 0.05$),而MMP-3阳性表达率明显高于III期患者,有统计学意义($P < 0.05$),见表6。POP组IV期患者TGF- β 1和Collagen III表达平均灰度值明显低于III期患者,有统计学意义($P < 0.05$),而MMP-3平均灰度值明显高于III期患者,有统计学意义($P < 0.05$),见表7。

表6 POP组不同分期患者TGF- β 1、MMP-3及Collagen III阳性率比较 [$n(\%)$]

Table 6 Comparison of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III expression in different stages of pop group [$n(\%)$]

POP-Q分期	<i>n</i>	TGF- β 1	MMP-3	Collagen III
III期	25	12(48.00)	16(64.00)	15(60.00)
IV期	20	3(15.00)	19(95.00)	5(25.00)
χ^2 值		5.445	6.178	5.512
<i>P</i> 值		0.020	0.013	0.019

表7 POP组不同分期患者TGF- β 1、MMP-3及Collagen III表达灰度值比较 [$n(\%)$]

Table 7 Comparison of expression gray values of TGF- β 1, MMP-3 and collagen III in pop group at different stages [$n(\%)$]

POP-Q分期	<i>n</i>	TGF- β 1	MMP-3	Collagen III
III期	25	53.02 \pm 9.14	54.22 \pm 7.82	48.11 \pm 7.47
IV期	20	42.12 \pm 9.81	70.12 \pm 9.66	33.47 \pm 8.10
<i>t</i> 值		3.848	6.105	6.293
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.4 相关分析

将POP患者TGF- β 1、MMP-3及Collagen III表达灰度值进行相关分析,结果显示:TGF- β 1、Collagen III与MMP-3呈负相关($r = -0.563, -0.677; P < 0.05$),TGF- β 1与Collagen III呈正相关($r = 0.441, P < 0.05$)。

3 讨论

子宫主韧带是维持子宫盆腔内脏器位置,支持子宫及阴道前后壁解剖结构的重要韧带,子宫主韧带张力的下降或者韧带组织的松弛,能够显著促进POP的发生,导致子宫脱垂和阴道前后壁脱垂的发生。不同的生物学机制,均能够促进子宫主韧带张力和抗机械性应力能力的改变,导致韧带弹性的下降。TGF- β 1是生长因子家族成员,其能够通过促进韧带间质细胞的增生和修复,提高韧带的纤维细胞密度,改善韧带的弹性和张力;MMP-3是金属基质蛋白酶超家族成员,其能够参与到炎症、自身免疫性疾病或者恶性肿瘤的发生过程,其表达浓度的上升能够促进主韧带间质细胞的分解,导致胶原细胞含量的减少,胶原密度的下降,从而促进了脏器脱垂的发生^[9];Collagen III是维持盆底支持结构的重要细胞间质成分,其能够稳定胶原纤维的张力,提高子宫主韧带的顺应性^[10]。

本次研究发现在子宫主韧带组织中,TGF- β 1、Collagen III的表达阳性率及平均灰度值均较未脱垂的女性明显下降,而MMP-3的表达阳性率及平均灰度值则明显上升,提示了TGF- β 1、MMP-3及Collagen III的表达异常均能够参与到POP的发生发展过程。这主要由于TGF- β 1、MMP-3及Collagen III的病理性作用有关^[11-12]:①TGF- β 1或者Collagen III的下降,能够导致子宫主韧带间质细胞成分中胶原蛋白IV、VI及VIII新生能力的不足,导致胶原蛋白抗张力能力的下降;②MMP-3的上升,能够通过诱导细胞间质胶原蛋白酶的激活,促进胶原蛋白的分解,导致主韧带组织中胶原厚度和数量的减少,从而促进了POP的发生^[13]。随后的研究发现,TGF- β 1、MMP-3及Collagen III等主要表达于子宫韧带组织细胞质中,推测相关指标主要通过影响到韧带组织细胞内细胞器的功能,进而影响到了POP的病情进展。在绝经后的患者中,TGF- β 1及Collagen III的表达阳性率及平均灰度值明显的下降,而MMP-3的表达阳性率及平均灰度值明显的

上升,提示绝经对于POP女性主韧带组织中不同生物学因子的影响,这主要由于绝经后,体内性激素水平的波动,能够降低主韧带组织中胶原纤维的分化能力,抑制了TGF- β 1及Collagen III的合成。临床分期较晚的患者,其TGF- β 1及Collagen III的表达阳性率及平均灰度值明显下降,而MMP-3的表达阳性率及平均灰度值明显上升,提示了相关因子与POP患者的病情严重程度之间存在一定的联系,这主要由于脱垂情况越为严重,间质细胞的修复能力越低,TGF- β 1越低,胶原蛋白的含量越少,Collagen III也越少^[14]。

本次研究的创新性在于揭示了POP患者主韧带组织中TGF- β 1、Collagen III与MMP-3的表达与绝经和临床分期的关系。综上所述,在POP患者中,TGF- β 1、Collagen III的表达明显下降,MMP-3的表达明显上升,同时在绝经或者临床分期较晚的患者中,相关因子的差异性表达更为明显。

[参考文献]

- [1] Baubil F, Guerby P, Léonard F, et al. Évolution des pratiques dans la chirurgie du prolapsus au sein d'une école gynécologiste sur la période 2010-2015[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018, 34(6): 103-104.
- [2] 丘媚妮, 饶煌珍. Prolift 盆底重建术治疗盆腔脏器脱垂的疗效分析[J]. 现代仪器与医疗, 2016, 22(1): 67-69.
- [3] 洪莉, 张小红, 刘志红. TGF- β 1、MMP-2、TIMP-2与子宫脱垂发生的相关性[J]. 中国性科学, 2016, 25(7): 35-38.
- [4] 李环, 古漪玲, 胡艳, 等. MMP-1、TIMP-1在盆腔脏器脱垂患者阴道前壁组织中的表达及意义[J]. 中国妇产科临床杂志, 2016, 17(6): 544-546.
- [5] 麦月施, 夏志军. 伴宫颈增大的盆腔脏器脱垂患者宫颈周围立体环结构中胶原蛋白表达变化及机制[J]. 山东医药, 2017, 57(25): 98-100.
- [6] Lo TS, Chua S, Uy-Patrimonio MC, et al. Clinical outcomes of detrusor underactivity in female with advanced pelvic organ prolapse following vaginal pelvic reconstructive surgery[J]. Neurourol Urodyn, 2018, 37(7): 2242-2248.
- [7] Meriwether KV, Antosh DD, Olivera CK, et al. Uterine preservation vs hysterectomy in pelvic organ prolapse surgery: a systematic review with meta-analysis and clinical practice guidelines[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 219(2): 129-146.
- [8] Gosselink MP. Commentary on 'Short- and long-term clinical and patient-reported outcomes following laparoscopic ventral mesh rectopexy using biological mesh for pelvic organ prolapse: a prospective cohort study of 224 consecutive patients'[J]. Colo Dis, 2018, 20(5): 436-437.
- [9] 姜智慧, 薛华, 王海燕, 等. 基质金属蛋白酶-1在女性盆腔脏器官脱垂中的表达及意义[J]. 安徽医药, 2016, 20(3): 522-524.
- [10] 艾阳, 薛丽霞, 陈滢, 等. 补中益气汤对转化生长因子 β_3 及I III型胶原蛋白的影响及其治疗盆腔脏器脱垂的机制研究[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(1): 41-43.
- [11] 李秉枢, 洪莉, 程丽薇, 等. 机械力对盆底成纤维细胞的双向作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2018, 28(3): 365-368.
- [12] 袁晓军, 舒敏锐, 李刚, 等. 金属钴、铬离子对成骨细胞增殖及I型胶原蛋白表达功能的影响[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(2): 158-160.
- [13] 朱雅佩, 孙智晶, 朱兰, 等. 盆底结缔组织的分子生物学变化在盆腔脏器官脱垂发病机制中的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(11): 785-788.
- [14] 杨青, 刘成, 李秉枢, 等. 氧化应激对盆底脏器官脱垂患者子宫旁韧带组织细胞细胞外基质代谢的影响[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(1): 53-57.

(上接第26页)

- [16] Chandel N, Aggarwal PK, Minz M, et al. CYP3A5*1/*3 genotype influences the blood concentration of tacrolimus in response to metabolic inhibition by ketoconazole[J]. Pharmacogenetics & Genomics, 2009, 19(6): 458-463.
- [17] Meur Y, Djebli N, Szelag J, et al. CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2006, 80(1): 51-60.
- [18] Li B, Li JZ. A general framework for analyzing tumor subclonality using SNP array and DNA sequencing data[J]. Genome Biology, 2014, 15(9): 473.
- [19] Han W, Yip SP, Wang J, et al. Using denaturing HPLC for SNP discovery and genotyping, and establishing the linkage disequilibrium pattern for the all-trans-retinol dehydrogenase (RDH8) gene[J]. Journal of Human Genetics, 2004, 49(1): 16-23.
- [20] Cheng YH. A Novel Teaching-Learning-Based Optimization for Improved Mutagenic Primer Design in Mismatch PCR-RFLP SNP Genotyping[J]. IEEE/ACM Transactions on Computational Biology & Bioinformatics, 2016, 13(1): 86-98.
- [21] Li M, Sun X, Jiang J, et al. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: An example from SIRT2[J]. Analytical Methods, 2014, 6(6): 1835-1840.

一种国产血液核酸检测系统的性能验证研究

郑旭焱*

[摘要] 目的 对一种国产血液核酸检测系统在本实验室进行献血者乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)、丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV RNA)、人类免疫缺陷病毒核糖核酸(HIV RNA)检测的性能进行研究,确定该系统是否稳定、准确、可靠。方法 根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)的相关文件要求,对一种国产血液核酸检测系统HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA项目的检测灵敏度、准确度、精密度、抗交叉污染、抗干扰及稳定性进行验证。结果 该国产血液核酸检测系统HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA的95%检出限分别为4.87(3.84~8.22)IU/mL、7.29(5.68~13.89)IU/mL、30.22(22.90~60.17)IU/mL;对16例阳性样本和32例阴性样本进行混样检测,结果均为反应性,拆分检测阴性样本和阳性样本的检测符合率均为100%;HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA阳性样本重复检测的变异系数(CV)分别为4.29%、1.51%、3.73%;将10个阴性样本和10个阳性样本进行阴阳交叉排列单检结果无交叉污染;低浓度HBV(10 IU/mL)、HCV(10 IU/mL)、HIV(40 IU/mL)样本在溶血样本[血红蛋白(Hb)含量为12 g/L]和脂肪样本[甘油三酯(TG)含量为6.13 mmol/L]中的检出均无显著影响;当溶血样本中Hb含量提高至24 g/L、脂肪样本中TG含量提高至11.85 mmol/L时,低浓度样本的检出会受到影响;经过2017年仪器设备的日常核酸检测情况分析,该国产血液核酸检测系统稳定性良好。结论 该国产血液核酸检测系统的检测灵敏度、准确度、精密度和抗交叉污染等均达到生产商的检测性能的要求,在标本Hb≤12 g/L以及TG≤6.13 mmol/L时,对低浓度HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA的检测无显著影响,满足本实验室检测需求。

[关键词] 核酸检测;性能验证;灵敏度;准确度;重复性;交叉污染;抗干扰;稳定性

Performance verification of a domestic blood nucleic acid detection system

ZHENG Xuyan*

(Luzhou Blood Center, Luzhou, Sichuan, China, 646000)

[ABSTRACT] Objective A domestic blood nucleic acid detection system was used to detect blood donors' hepatitis B virus DNA (HBV DNA), hepatitis C virus RNA (HCV RNA), and human immunodeficiency virus RNA and perform performance research to determine whether the system is stable, accurate, and reliable. Methods The detection limits, accuracy, precision, anti-cross-contamination, anti-interference and stability of the HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA projects in the Domestic Blood Nucleic Acid Detection System were verified with reference to the requirements of the relevant documents of the American clinical laboratory standardization association (CLSI) and combined with the actual work. Results The 95% detection limits of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA in the Domestic blood nucleic acid detection system were 4.87 (3.84~8.22) IU/mL, 7.29 (5.68~13.89) IU/mL, and 30.22 (22.90~60.17) IU/mL. 16 positive samples and 32 negative samples were arranged at intervals and then tested in 8-in-1 mixed mode, The results were all reactive. The detection coincidence rate of negative samples and positive samples was 100%; and the coefficient of variation for repeated detection of HBV DNA, HCV RNA, and HIV RNA positive samples were 4.29%, 1.51%, and 3.73%, respectively. There were no cross-contamination between the 10 negative samples and 10 positive samples, and the detection of low concentration HBV (10 IU/mL),

作者单位:泸州市中心血站检验科,四川,泸州 646000

*通信作者:郑旭焱, E-mail:448333240@qq.com

HCV (10 IU/mL) and HIV (40 IU/mL) samples in hemolytic samples (the content of hemoglobin was 12 g/L) and fat samples (the content of triglyceride was 6.13 mmol/L) had no significant impact. When the hemoglobin content in the hemolyzed sample is increased to 24 g/L and the triglyceride content in the fat sample is increased to 11.85 mmol/L, the detection of low-concentration samples will be affected. The stability of the domestic nucleic acid detection system is good after analyzing the daily nucleic acid detection of instrument and equipment in 2017. **Conclusion** The detection sensitivity, accuracy, precision and anti-cross-contamination performance of the Domestic Blood Nucleic Acid Detection System meet the requirements of the manufacturer's detection performance. The anti-interference test confirmed that the detection of low concentrations of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA had no significant effect on the samples $Hb \leq 12$ g/L and $TG \leq 6.13$ mmol/L, and The Domestic Blood Nucleic Acid Detection System can meet the needs of the daily nucleic acid testing work of the laboratory.

[KEY WORDS] Nucleic acid test; Performance verification; Sensitivity; Accuracy; Reproducibility; Cross-contamination; Anti-interference; stability

核酸检测技术(Nucleic Acid Technology, NAT)具有更短的病毒“窗口期”和更优的检测性能,能够与酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA)形成一个互补的检测模式,进一步提高血液安全^[1]。由于中国核酸检测系统的具体操作、性能评价和数据分析等信息几乎都由生产商提供,技术参数主要来源于生产商在最理想的测试条件下生成,为了保证检测质量,应对各自血液核酸检测系统性能重新进行评估,并建立属于自己的性能参数,才能有效保证核酸检测结果,满足检测需求^[2]。根据美国病理学家协会(College of American Pathologists, CAP)认可和国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)起草的ISO15189相关文件的要求,可以查询到定量检测性能验证的要求和说明,国内一些专家学者认为,定性检测的性能验证中准确性、精密度、检出限最为重要^[3]。因此本次研究主要参照美国临床实验室标准化协会(American Society for clinical laboratory standardization, CLSI)要求,针对检测灵敏度、准确度、精密度、抗交叉污染、抗干扰、稳定性这六个方面进行性能评估,现做如下报告。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

本单位有资质的采血护士采集献血者的血液,留取ELISA和NAT样本各5 mL(2017年1月4日至2018年4月30日,ELISA无反应56 010例,有反应812例,共计56 822例)。阴性样本:本实

验室使用两种ELISA试剂检测乙肝表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg,初检试剂科华、复检试剂伯乐)、丙型肝炎病毒抗体(Hepatitis C virus antibody, HCV Ab,初检试剂科华、复检试剂 ORTHO)、人类免疫缺陷病毒抗体(Human immunodeficiency virus antibody, HIV Ab,初检试剂科华、复检试剂伯乐)、梅毒螺旋体特异性抗体(*Treponema pallidum* specific antibody, TP Ab,初检试剂科华、复检试剂万泰);NAT试剂对乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(Hepatitis B virus DNA, HBV DNA)、丙型肝炎病毒核糖核酸(Hepatitis C virus RNA, HCV RNA)、人类免疫缺陷病毒核糖核酸(Human immunodeficiency virus RNA, HIV RNA)进行检测;两种不同方法学检测结果均无反应性;HBV阳性样本:HBsAg双试剂反应性;HCV阳性样本:HCV Ab双试剂反应性;HIV阳性样本:HIV Ab双试剂反应性,且经HIV确证实验室确认试验结果阳性;溶血样本[血红蛋白(Hemoglobin, Hb)浓度:12 g/L、24 g/L]及脂肪样本[甘油三酯(Triglyceride, TG)浓度:6.13 mmol/L、11.85 mmol/L]由本实验室自行制备。

1.1.2 主要仪器与试剂

某国产全自动核酸提取仪、PCR仪、酶免检测系统、真空采血管脱盖机、生物安全柜、冷冻离心机、生化分析仪、血细胞分析仪;某国产提供HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA核酸检测试剂盒(PCR-荧光法);某国产提供核酸质控品,质控品浓度:HBV(500 IU/mL)、HCV(2 500 IU/mL)、HIV(2 500 IU/mL)。甘油三酯(Triglyceride, TG)试剂盒,血细胞分析仪试剂。

1.2 方法

1.2.1 灵敏度验证

将核酸质控品用厂家提供的阴性血浆进行梯度倍比稀释,HBV DNA 系列浓度为:20.00、10.00、5.00、2.50、1.25 IU/mL; HCV RNA 系列浓度为:20.00、10.00、5.00、2.50、1.25 IU/mL; HIV RNA 系列浓度为:80.00、40.00、20.00、10.00、5.00 IU/mL;以上所有样本使用该国产核酸检测系统的单检模式检测,3个项目每个浓度梯度重复检测10次。

1.2.2 准确度验证

选用8例HBV阳性样本、4例HCV阳性样本、4例HIV阳性样本与32例阴性样本进行随机交叉排列。初检采用混检模式检测,若呈反应性结果再进行拆分,统计阳性和阴性样本检测结果的符合率。

1.2.3 精密度验证

将质控品稀释至100%检出限HBV(20 IU/mL)、HCV(100 IU/mL)、HIV(100 IU/mL)。每次实验将该质控品视为常规标本重复检测4次,连续重复检测5d,记录阳性质控品反应性结果的循环阈值(cycle threshold, Ct值),参照相关文献^[4]并计算每个项目Ct值的标准差和变异系数(Coefficient of Variation, CV值),再与生产商允许的CV值标准进行比较。

1.2.4 抗交叉污染验证

将4例HBV阳性样本、3例HCV阳性样本、3例HIV阳性样本和10例阴性样本进行阴阳交叉排列,在该国产核酸检测系统中对这些样本进行单检模式检测,分析检测结果阴性样本和阳性样本的检出率符合情况。

1.2.5 抗干扰验证

将质控品按比例分别加入到不同浓度的溶血血浆(血红蛋白含量:12、24 g/L)、脂血血浆(甘油三酯:6.13、11.85 mmol/L)及阴性合格血浆中,使目标病毒在血浆中的最终浓度为:HBV(10 IU/mL)、HCV(10 IU/mL)、HIV(40 IU/mL)。制备好的待检品与阴性样本进行混检模式检测20次。统计阳性质控品的检出情况。

1.2.6 稳定性验证

在核酸实验室通过验收合格的条件下,该国产核酸检测系统稳定运行一段时间,分析该系统1年的运行数据,主要统计仪器设备故障情况,无效检测的情况,综合评价该系统在长时间检测

(一个工作年)的稳定性。

1.2.7 质控标准

所有实验过程中均需要检测核酸检测试剂盒中的内标(Internal control, IC)、阴性质控品(Negative control, NC)和阳性质控品(Positive control, PC),以及第三方阳性质控品(Quality control, QC)(浓度为2~5倍的厂家提供的最低检出限)。每次实验结果中的IC、NC、PC和QC质控结果均符合试剂说明书和实验室核酸检测结果判别操作手册要求时,实验中的结果有效,否则需要进行重新检测。

1.2.8 统计方法

检测灵敏度应用SPSS19.0统计软件的概率单位法(Probability unit, PROBIT)工具分析计算该系统的95%检出限及其置信区间。通过统计阴性和阳性检出率验证准确度和抗交叉污染;通过统计分析Ct值的标准差和变异系数(CV值)验证检测系统的精密度;通过不同浓度的溶血标本和脂血标本与正常阴性标本的低浓度样本检出率进行 χ^2 检验验证抗干扰能力。

2 结果

2.1 灵敏度(检出限)验证结果

对HBV、HCV、HIV标本检测结果进行统计学分析得出3个项目的95%检出限及其置信区间,具体结果见表1。

表1 某国产核酸检测系统检测HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA灵敏度验证结果[n, (IU/mL)]

Table 1 Validation results of detection limits for HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA by a domestic nucleic acid detection system [n, (IU/mL)]

检测项目	检测数量	95%检出限和置信区间	生产商提供的最低检出限
HBV DNA	50	4.87(3.84~8.22)	10
HCV RNA	50	7.29(5.68~13.89)	10
HIV RNA	50	30.22(22.90~60.17)	40

2.2 准确度验证结果

16例阳性样本和32例阴性样本混检结果为反应性,拆分单检结果中无反应性结果有32例,阴性样本检测符合率100%;反应性结果有16例,分别是8例HBV、4例HCV、4例HIV,阳性样本检测符合率为100%。

2.3 精密度验证结果

3个项目检测结果均为反应性,检测结果均优于生产商要求允许的CV值标准(10%以内),具体结果见表2。

表2 某国产核酸检测系统检测HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA精密度验证结果 [n(%)]

Table 2 Verification results of the accuracy of detection of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA by a domestic nucleic acid detection system [n(%)]

检测项目	n	Ct值		
		均值	标准差	变异系数(CV)
HBV DNA(20 IU/mL)	20	36.83	1.58	4.29
HCV RNA(100 IU/mL)	20	34.52	0.52	1.51
HIV RNA(100 IU/mL)	20	39.17	1.46	3.73

表3 某国产核酸检测系统对不同浓度溶血血浆和脂肪血浆干扰能力验证结果 [n(%)]

Table 3 Validation results of interference ability of a domestic nucleic acid detection system to different concentrations of hemolytic plasma and adipose plasma [n(%)]

检测样本	HBV DNA (10 IU/mL)			HCV RNA (10 IU/mL)			HIV RNA (40 IU/mL)		
	χ ² 值	P值		χ ² 值	P值		χ ² 值	P值	
溶血血浆 12 g/L	20(100)	-	-	20(100)	-	-	18(90)	0.36	>0.05
溶血血浆 24 g/L	8(40)	17.14	<0.01	7(35)	19.26	<0.01	4(20)	26.67	<0.01
脂肪血浆 6.13 mmol/L	19(95)	1.03	>0.05	18(90)	2.11	>0.05	16(80)	2.06	>0.05
脂肪血浆 11.85 mmol/L	5(25)	24.00	<0.01	6(30)	21.54	<0.01	2(10)	32.73	<0.01
正常阴性血浆	20(100)			20(100)			19(95)		

0.05);24 g/L时,3项指标的检出率与正常外观样本检出率比较,差异显著有统计学意义($P<0.01$)。脂血样本检测结果TG:6.13 mmol/L时,3个项目的检出率与正常外观样本检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);11.85 mmol/L时,3个项目的检出率与正常外观样本检出率比较,差异显著有统计学意义($P<0.01$)。

2.6 稳定性验证结果

2017年1月至2017年12月共计检测41444例献血者样本,无效结果pools数90个,无效测试率1.74%,仪器故障共计15次,平均每个月仪器故障次数1.25次。

3 讨论

较早开展核酸检测的葛红卫^[5]等提出:为了保证检测结果的准确和稳定,在血液核酸检测前,应对核酸检测系统检测环境条件、仪器设备性能、检测试

2.4 抗交叉污染验证结果

阴性样本和阳性样本间隔排列检测结果显示,10例阴性样本的结果均为无反应性,阴性符合率100%;10例阳性样本中4例HBV样本、3例HCV样本和3例HIV样本的检测结果均为反应性,阳性符合率为100%,没有出现检测样本之间的相互交叉污染情况。

2.5 抗干扰能力验证结果

添加低浓度HBV、HCV、HIV质控品的溶血样本(血红蛋白Hb含量12、24 g/L)、脂血样本(甘油三酯TG含量6.13、11.85 mmol/L)及正常外观样本检测结果,见表3。

溶血样本检测结果:血浆血红蛋白(Hemoglobin, Hb)浓度:12 g/L时,3个项目的检出率与正常外观样本检出率比较,差异无统计学意义($P>$

剂性能进行确认,定期对已经通过确认的核酸检测系统再次进行性能验证,识别使用过程中产生的性能偏差。本次研究对某国产血液核酸检测系统HBV/HCV/HIV项目的灵敏度、准确度、精密度、抗交叉污染、抗干扰及稳定性这六个方面进行验证。

检测灵敏度的结果显示该国产血液核酸检测系统HBV/HCV/HIV 3个项目的95%检出限满足美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)对血液病毒核酸筛查HBV(100 copies/mL)、HCV(100 copies/mL)、HIV(100 copies/mL)分析灵敏度(单检)的各项要求^[6],同时均明显优于生产商提供的最低检出限,符合相关法规对血站核酸检测性能的要求。曹谊^[7]等同行认为各个实验室实际研究结果数据与生产商提供的性能参数不完全相同,其主要原因可能是由于生产商在进行相关性能验证时,使用的样本是国际标准品和采用大样本数量检测评估。检测灵敏度与同类产品,

ChiTaS BSS1200 血液核酸检测系统^[6],科华 V2.2 核酸检测系统^[8],cobas s201 核酸检测系统^[9]相似。

准确度通常采用阴性、阳性结果检出的符合率来进行验证^[10-11]。实验结果中未出现一例假阳性,准确度符合率 100%,与抗交叉污染实验共同确证了系统的抗交叉污染性能的优异性。同时也验证了该国产核酸检测系统的全封闭设计、高效过滤和紫外消毒模块、合理空间分隔等设计特点是进行高效污染控制的主要因素。

本次研究中也发现,该国产核酸检测系统的抗干扰能力较强,在标本 Hb≤12 g/L 以及 TG≤6.13 mmol/L 时对 HBV/HCV/HIV 的检测无显著影响,这与国内同行的研究报道一致^[12-13]。但是当 Hb≥24 g/L 以及 TG≥11.85 mmol/L 时对 3 个项目的检测存在一定影响。庄养林^[14-15]等同行认为溶血标本中的血红蛋白 Hb 浓度大于一定数值时会影响 NAT 检测。脂血标本容易凝固形成胶冻状,导致仪器加样故障,实验无效;脂肪颗粒对标本的病毒会产生稀释和阻隔,导致低病毒浓度标本漏检。

稳定性的验证结果显示该系统全年运行稳定,故障率较低。最常见的故障是系统控制软件与硬件匹配性差,偶尔会出现死机状况和试剂标本异常的报警^[16],分析可能的原因是核酸检测的步骤和中间环节多,操作相对复杂,一方面是仪器自身和检测环境条件的异常,另一方面也有实验人员操作的问题。

综上所述,本次研究验证了该国产血液核酸检测系统在本实验室运行情况良好,并具有比较优异的检测灵敏度、准确度、精密度、抗交叉污染、抗干扰能力及稳定性,各项指标均可达到或优于预期的标准,能够满足本站对样本进行血液核酸检测要求。

参考文献

[1] 曾少丽. 核酸检测在献血者乙型肝炎病毒筛查中的应用[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2017, 15(5): 28-29.

[2] 赵芹, 辛青松, 李峥嵘, 等. ABI ViiA7TaqmanHBV-DNA 检测系统性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(5): 669-670.

[3] 李金明. 定性测定的性能验证. 中华医学会第九次全国检验医学学术会议暨中国医院协会临床检验管理专业委员会第六届全国临床检验实验室管理学术会议论文集汇编[C], 2011.

[4] 王薇, 王治国, 李少男. 临床实验室对厂家声明的精密度和真实度的性能验证要求[J]. 检验医学, 2010, 25(12): 1001-1005.

[5] 葛红卫, 王鸿捷. 血站实验室血液检测方法确认的技术实践[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(4): 345-348.

[6] 聂湘辉, 刘丽华, 胡莅鸿. ChiTaS BSS1200 血液核酸检测系统的分析性能验证[J]. 广州医药, 2016, 47(4): 68-70.

[7] 曹谊, 王凯, 王玲玲, 等. HBV/HCV/HIV 血液核酸筛查试剂的性能验证研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(Suppl.2): 90-92.

[8] 朱姗姗, 朱绍汶, 蒋昵真, 等. 科华 V2.2 核酸检测系统灵敏度验证[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(1): 70-72.

[9] 黄力勤, 刘正敏, 冷婵, 等. cobas s201 核酸检测系统使用前性能验证[J]. 中国输血杂志, 2016, 36(1): 1339-1343.

[10] 臧亮, 王东, 邓雪莲, 等. ISO15189 在酶联免疫检测性能验证方法的探讨[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(7): 689-691.

[11] 江涛, 李军, 王昌富, 等. 基于 ISO15189 要求的免疫学定性试验性能验证方法的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(3): 332-333.

[12] 张龙穆, 杨忠思, 袁欣没, 等. 脂血对血液核酸检测结果的影响评价[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(1): 55-57.

[13] 于倩, 杜菁, 王蓓. 溶血和脂血两种因素对 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 方法的影响[J]. 中外医学研究, 2015, 13(6): 58-59.

[14] 庄养林, 熊丽红, 张鹏飞, 等. 溶血、脂肪血及保存条件对 HBV DNA、HIV RNA 核酸检测的影响[J]. 天津医药, 2017, 45(10): 1025-1028.

[15] 庄养林, 熊丽红, 张鹏飞, 等. 标本因素及保存条件对 HCV RNA 检测的影响[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(2): 228-230.

[16] 丁威, 吕蒙恩, 吴丹青, 等. 核酸检测系统无效原因分析[J]. 中国输血杂志, 2017, 30(7): 810-812.

(上接第 34 页)

[10] 王海莹, 涂晓文. 血浆 N 末端 B 型利钠肽前体水平对非 ST 段抬高型心肌梗死患者经皮冠状动脉介入术造影剂肾病的早期预测价值研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(15): 1768-1773.

[11] Da Costa Gurgel Castelo M, Montenegro R, Ponte C, et al. Cardiovascular risk factors in patients with premature myocardial infarction and in their first-degree relatives[J]. Diabetology & Metabolic Syndrome, 2015, 7(Suppl.1): 162-164.

[12] 姚宇, 刘兆军, 赵雅琳. 急性冠脉综合征血浆 Nt-proCNP 水平的变化[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2015, 7(3): 351-

352.

[13] 郁怡, 孙锐. 基质金属蛋白酶 9 与 2 型糖尿病并发冠状动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中国心血管杂志, 2017, 22(2): 147-150.

[14] 钟远伦, 罗昭琴. 不稳定性心绞痛冠状动脉介入治疗对患者血浆氨基末端脑钠肽前体水平和心功能的影响[J]. 中国心血管杂志, 2016, 21(3): 223-225.

[15] 于洪伟, 刘奇峰, 王玉亭, 等. 骨桥蛋白和基质金属蛋白酶-9 对经皮冠状动脉介入治疗后支架内再狭窄的诊断价值[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(7): 635-638.

· 论 著 ·

携带 *NDM-1* 基因合并膜孔蛋白 *OmpK36* 缺失肺炎克雷伯菌耐药性分析

涂海健^{1,2*} 黄亚雨¹ 陈淑娟¹ 许光辉¹

[摘要] 目的 对产新德里金属 β -内酰胺酶(*NDM-1*)肺炎克雷伯菌耐药情况、分子分型特点,携带耐药基因、传播方式,及其膜孔蛋白表达情况进行分析,以探讨产*NDM-1*酶肺炎克雷伯菌耐药机制。方法 实验菌分离自前列腺增生患者尿液的标本,对其进行细菌鉴定和药敏试验、改良Hodge试验、EDTA协同试验和多位点序列分型(MLST);采用聚合酶链技术检测 β -内酰胺酶相关耐药基因和膜孔蛋白*OmpK35*、*OmpK36*基因,并对*NDM-1*和膜孔蛋白*OmpK35*、*OmpK36*基因进行序列分析;利用SDS-PAGE电泳检测膜孔蛋白*OmpK35*、*OmpK36*;菌株质粒接合实验分析传播方式,对受体菌和接合子进行药敏结果比较。结果 实验菌改良Hodge试验阴性、EDTA协同试验阳性,鉴定为耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)株,对13种常见抗生素耐药,MLST基因分子分型为ST15;PCR检测其携带*NDM-1*基因,经序列测定比对确认,同时该菌株还携带*KPC*基因及*SHV*基因,未检测到*VIM*、*IMP*、*OXA-48*、*GES*、*GIM*基因;*OmpK35*、*OmpK36*基因存正点突变及片段缺失的现象,SDS-PAGE分析发现膜孔蛋白*OmpK36*缺失;质粒接合实验阳性,接合子E.coliJ53对3种碳青霉烯类药物的抑菌圈明显减小。结论 了解*NDM-1*肺炎克雷伯菌携带耐药基因类型及传播方式、膜孔蛋白是否缺失以及分子分型,为指导临床正确使用抗菌药物及流行病学调查具有重要意义。

[关键词] 肺炎克雷伯菌; *NDM-1*; 多位点序列分型; 质粒转导; 多重耐药

Analysis of drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* carrying *NDM-1* gene and *OmpK36* deletion

TU Haijian^{1,2*}, HUANG Yayu¹, CHEN Shujuan¹, XU Guanghui¹

(1. Department of Clinical Laboratory in Affiliated Hospital of Putian University, Putian, Fujian, China, 351100; 2. Key Laboratory of Medical Microecology (Putian University), Fujian Province University, Putian, Fujian, China, 351100)

[ABSTRACT] Objective Drug resistance and molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* producing *NDM-1* were analyzed. Drug resistance genes, transmission modes and expression of membrane pore proteins were carried out to explore the drug resistance mechanism of *Klebsiella pneumoniae* producing *NDM-1* enzyme. Methods The bacterial identification and drug susceptibility test, modified Hodge test, EDTA synergistic test and multilocus sequencing typing (MLST) were performed. The bacteria were isolated from urine samples of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) in the Department of Urology in affiliated hospital of Putian University in 2017. The bacterial identification and drug susceptibility test, modified Hodge test, EDTA synergistic test and multilocus sequencing typing were performed. Polymerase chain reaction was used to detect the resistance genes related to beta-lactamase and membrane porin *OmpK35*, *OmpK36* genes,

基金项目:福建省自然科学基金项目(2015J0105)

作者单位:1. 莆田学院附属医院检验科,福建,莆田 351100

2. 医学微生态学福建省高校重点实验室,福建,莆田 351100

*通信作者:涂海健, E-mail: tufangshu@126.com

and the sequences of *NDM-1*, membrane porin *OmpK35* and *OmpK36* genes were analyzed. Membrane porin *OmpK35* and *OmpK36* were detected by SDS-PAGE electrophoresis. Plasmid conjugation assay was used to analyze the mode of transmission of the strain. The sensitivity of the receptor and the zygote were compared. **Results** The strain was identified as carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with negative modified Hodge test and positive EDTA synergistic test. It resistant to 13 common antibiotics. MLST genotype was ST15. The *NDM-1*, *KPC* and *SHV* gene were detected by PCR. *VIM*, *IMP*, *OXA-48*, *GES* and *GIM* genes were not detected. The *NDM-1* gene was confirmed and the existence of positive mutation and deletion of *OmpK35* and *OmpK36* genes were found by Sequencing analysis. Membrane porin *OmpK36* was deleted by SDS-PAGE, plasmid conjugation test was positive, and the inhibitory circle of conjugator *E.coli* J53 on three carbapenems was reduced significantly. **Conclusion** To understand the type and mode of transmission of drug-resistant genes, the deletion of membrane porin and molecular typing of *NDM-1* producing *Klebsiella pneumoniae*, it is great significance to guide the correct use of antibiotics in clinical and epidemiological investigation.

[KEY WORDS] *Klebsiella pneumoniae*; *NDM-1*; Multilocus sequencing typing; Plasmid transduction; Multidrug resistance

自从2009年Dongun首例报道从印裔瑞士旅游者尿路感染标本中分离出携带产新德里金属β-内酰胺酶(New Delhi metallo-beta-lactamase 1, NDM-1)肺炎克雷伯菌,也被称之为“超级细菌”后,因产NDM-1型金属β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌对青霉素类,一至四代头孢菌素、碳青霉烯类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类药物高度的耐药性已引起全球广泛关注^[1]。近来研究发现,NDM共17个基因突变体,主要由大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、阴沟肠杆菌、革兰氏阴性非发酵菌、假单胞菌属和鲍曼不动杆菌携带,NDM基因主要通过质粒在细菌属内及属间传播^[2-3]。我国多个城市都有产NDM型β-内酰胺酶耐药菌报道,其中北京、上海、海口、厦门等一线和沿海城市阳性率较高,且检出携带NDM基因菌逐年升高的趋势,产NDM型β-内酰胺酶菌都是多重耐药菌或为泛耐药菌^[4]。越来越多的数据表明产NDM型β-内酰胺酶耐药菌已在全球范围流行并引发多种类型感染,是威胁人类健康的主要公共卫生问题之一^[2],及时准确了解产NDM型β-内酰胺酶菌耐药机制、流行现状和特点,是预防和控制产NDM耐药菌感染的关键所在。本文对从前列腺增生患者尿液标本中分离出的1株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*, CRKP),对其耐药情况、分子多位点序列分型,携带耐药基因、传播方式,膜孔蛋白表达情况进行研究,旨在了解本地区携带NDM-1基因肺炎克雷伯菌耐药、分子流行特点及耐药机制,为临床抗菌治疗和医院内感染

控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

实验菌为2017年分离自莆田学院附属医院泌尿外科前列腺增生患者尿液标本中分离出1株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌。质控标准菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705、ATCC BAA-1706、大肠杆菌 J53 购置于中国工业微生物菌种保藏管理中心,ATCC25922, ATCC13883 标准菌株购置于卫计委临床检验中心。

1.2 药敏试验、EDTA 协同试验、改良 Hodge 试验

药敏试验实验采用法国梅里埃公司 VITEK 2 compact 系统及配套 GN-13 药敏卡进行药敏 MIC 值检测,对亚胺培南耐药的菌株鉴定为耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌。EDTA 协同试验、改良 Hodge 试验按文献报道^[5-6]进行。

1.3 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)检测

按 MLST website (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>)要求对肺炎克雷伯菌的7个保守管家基因(*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* 和 *tonB*)设计引物(表1)进行PCR扩增,产物纯化后上 ABI3730XL 测序,结果用 Polyphred 软件分析。

1.4 β-内酰胺酶相关耐药基因和膜孔蛋白 *OmpK35*、*OmpK36* 基因检测

提取靶基因用PCR技术扩增相关β-内酰胺酶基

表1 肺炎克雷伯菌的7个保守管家基因PCR及测序引物

Table 1 7 PCR and sequencing primers for housekeeping genes of *Klebsiella pneumoniae*

目的基因	PCR 引物 5'-3'	测序引物 5'-3'
<i>rpoB</i>	F GGCGAAATGGCWGAGAACCA R GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	rpoB-F GGCGAAATGGCWGAGAACCA
<i>gapA</i>	F TGAAATATGACTCCACTCACGG R CTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	gapA-F TGAAATATGACTCCACTCACGG
<i>mdh</i>	F CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG R CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	mdh-F CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG
<i>pgi</i>	F GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC R CGCGCCACGCTTATAGCGGTTAAT	pgi-F GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC
<i>phoE</i>	F ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG R TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	phoE-F ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG
<i>infB</i>	F CTCGCTGCTGGACTATATTTCG R CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	infB-F CTCGCTGCTGGACTATATTTCG
<i>tonB</i>	F CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT R ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	tonB-F CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT

表2 β-内酰胺酶相关耐药基因和膜孔蛋白 *OmpK35*、*OmpK36* 基因扩增引物及片段

Table 2 Amplification primers and fragments of beta-lactamase-related drug resistance genes and membrane porin

OmpK35 and *OmpK36* genes

序号	目的基因	引物序列 5'-3'	扩增片段大小(bp)
1	<i>KPC</i>	F CGTCTAGTCTGCTGTCTTG R CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798
2	<i>GES</i>	F ATGCGCTTCATTCACGCAC R CTATTTGTCCGTGCTCAGG	864
3	<i>IMP</i>	F CTACCGCAGCAGAGTCTTTG R AACCAGTTTTGCCTTACCAT	587
4	<i>NDM-1</i>	F CTCGCACCGAATGTCTGGC R CATTGGCGGCGAAAGTCA	340
5	<i>VIM-1</i>	F TTATGGAGCAGCAACCGATGT R CAAAAGTCCCGCTCCAACGA	920
6	<i>GIM</i>	F AGAACCTTGACCGAACGCAG R ACTCATGACTCCTCACGAGG	753
7	<i>OXA-48</i>	F TTGGTGGCATCGATTATCGG R GAGCACTTCTTTGTGATGGC	743
8	<i>SHV</i>	F AGGATTGACTGCCTTTTTG R ATTTGCTGATTTTCGCTCG	392
9	<i>OmpK35</i>	F ATGATGAAGCGCAATATTCTGGCAGTGG R TCGGCTTTGTGCCATTGCCGTCA	684
10	<i>OmpK36</i>	F CAGCACAATGAATATAGCCGAC R GCTGTTGTCTCCAGCAGGTTG	1 115

因和膜孔蛋白 *OmpK35*、*OmpK36* 基因,引物如表2所示,扩增后的产物,经2%琼脂凝胶电泳后观察结果。

1.5 *NDM-1* 和 *OmpK35*、*OmpK36* 基因序列分析

取 *NDM-1* 和 *OmpK35*、*OmpK36* 基因PCR扩增产物,进行纯化后用ABI3730XL进行测序,结果在

Genbank 网站上进行Blast分析。

1.6 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS - PAGE)检测膜孔蛋白 *OmpK35*、*OmpK36*

取20 mL对数期生长的肉汤培养细菌进行超

声波破碎,采用超高速离心法提取膜蛋白,具体参数按文献^[7]进行,取 20 μg 含膜孔蛋白悬液上胶进行 SDS-PAGE 电泳,最后经考马斯亮蓝染色并脱色后观察结果。

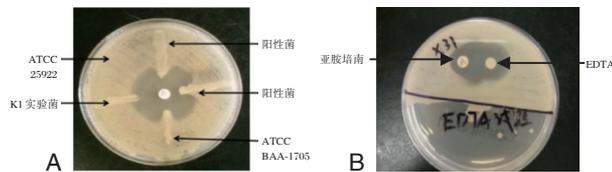
1.7 质粒接合试验

以产 NDM-1 肺炎克雷伯菌为供体菌,用耐叠氮钠的大肠杆菌 J53 作为受体菌,各取 0.5 mL 肉汤中培养的供体菌和受体菌混匀,后置于 4 mL LB 肉汤中 35℃ 静置过夜,取以上菌液涂布于含 100 μg/mL 叠氮钠和 0.5 μg/mL 亚胺培南的 MAC 培养基进行筛选,对筛选出阳性菌即接合子用纸片琼脂扩散法(Kirby-Bauer disc agar diffusion method, K-B)检测 3 种碳青霉烯类药物美罗培南、亚胺培南、厄他培南的抑菌大小以判断其耐药情况。美罗培南、亚胺培南、厄他培南药敏纸片购置英国 Oxiod 公司。

2 结果

2.1 产 NDM-1 酶肺炎克雷伯菌耐药情况及 EDTA 协同试验、改良 Hodge 试验结果

产 NDM-1 酶肺炎克雷伯菌对所有 β-内酰胺类药物包含加酶抑制剂及碳青霉烯类药物耐药,合并对氨基糖苷类、氟喹诺酮类药物耐药,表现多重耐药的现象具体见表 3, EDTA 协同试验阳性、改良 Hodge 试验阴性,见图 1。



注:A. 待测菌株线与大肠杆菌 ATCC25922 抑菌圈交汇处,出现大肠杆菌生长增强现象,为改良 Hodge 试验结果阳性即产碳青霉烯酶,否则为阴性菌。ATCC BAA-1705 为产碳青霉烯酶阳性对照菌,K1 实验菌改良 Hodge 试验结果阴性。B. 在含有待测菌的 MH 琼脂平板上,亚胺培南纸片与 EDTA 的纸片间出现协同抑菌作用,认为该菌产生含金属的碳青霉烯酶。

图 1 改良 Hodge 试验和 EDTA 协同试验结果

Figure 1 Results of EDTA synergistic test and modified Hodge test

2.2 MLST 基因分子分型结果

实验菌检测出的等位基因谱为 *gapA*, 1; *infB*, 1; *mdh*, 1; *pgi*, 1; *phoE*, 1; *rpoB*, 1; 和 *tonB*, 1; 故该株 MLST 基因分子分型为 ST15 型。

表 3 产 NDM-1 酶肺炎克雷伯菌耐药情况及 EDTA 协同试验、改良 Hodge 试验结果 (μg/mL)

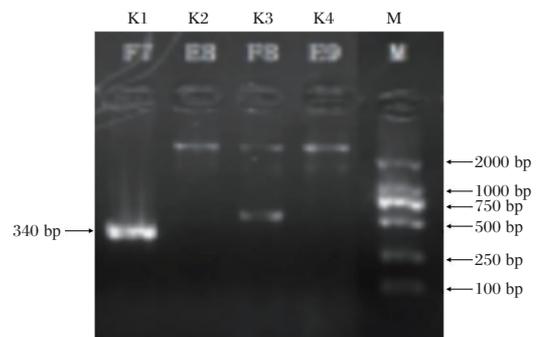
Table 3 Drug resistance of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and results of EDTA synergistic test and modified Hodge test (μg/mL)

抗生素	MIC			结果
	敏感	中介	耐药	
氨苄西林	≤8	16	≥32	R
头孢替坦	≤16	32	≥64	R
头孢曲松	≤1	2	≥4	R
头孢唑啉	≤2	4	≥8	R
头孢吡肟	≤2	4-8	≥16	R
头孢他啶	≤4	8	≥16	R
氨苄西林/舒巴坦	≤8/4	16/8	≥32/16	R
哌拉西林/他唑巴	≤16/2	32/4-64/4	≥128/4	R
亚胺培南	≤1	2	≥4	R
丁胺卡那霉素	≤16	32	≥64	S
左旋氧氟沙星	≤2	4	≥8	R
环丙沙星	≤1	2	≥4	R
妥布霉素	≤4	8	≥16	R
复方新诺明	≤2/38	-	≥4/76	S
庆大霉素	≤4	8	≥16	R
呋喃妥因	≤32	64	≥256	M
改良 Hodge 实验				阴性
EDTA 协同实验				阳性

注:R 为耐药,S 为敏感,M 为中介。

2.3 β-内酰胺酶基因和膜孔蛋白 *OmpK35*、*OmpK36* 基因检测结果

该菌株 PCR 检测出携带 *NDM-1*、*KPC* 及 *SHV* 基因,未检测到 *VIM*、*IMP*、*OXA-48*、*GES*、*GIM* 基因;检测出膜孔蛋白 *OmpK35*、*OmpK36* 基因。*NDM-1* 阳性结果,如图 2 所示。



注: K1 为 *NDM-1* 基因 PCR 扩增产物电泳图,在 340 bp 处显示阳性条带。

图 2 *NDM-1* 基因 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 2 Electrophoresis results of *NDM-1* gene amplified by PCR

2.4 NDM-1 和 *OmpK35*、*OmpK36* 基因序列分析

PCR 检测 *NDM-1* 阳性的产物进行测序, 结果见图 3, 序列通过 NCBIblast 比对确认为目标序列; *OmpK35*、*OmpK36* 基因序列比对后发现存在点突变及片段缺失的现象。

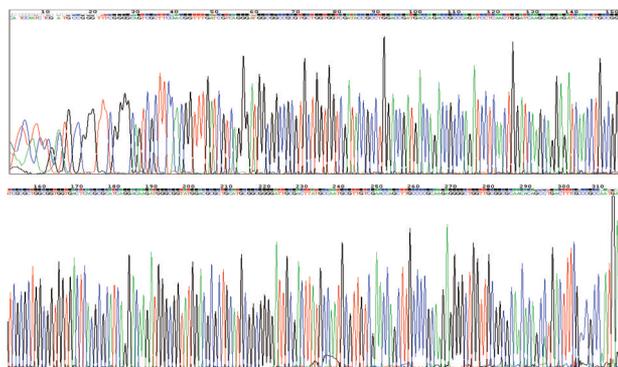
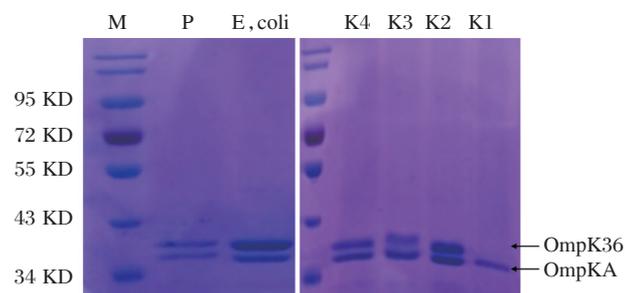


图 3 *NDM-1* 基因 PCR 扩增产物经测序确认结果

Figure 3 The amplified products of *NDM-1* gene by PCR were confirmed by sequencing

2.5 *OmpK35*、*OmpK36* 膜孔蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

膜孔蛋白 SDS-PAGE 电泳显示泳带分子量在 34 kDa 和 43 kDa 之间, 对照组显示两条泳带 *OmpK36* (38.7 kDa) 及 *OmpAk* (36.0 kDa), 而携带 *NDM-1* 基因菌株标本只显示一条泳带 *OmpKA* (36.0 kDa), 另一条 *OmpK36* 缺失, 见图 4。



注: M 是 Marker; P 为膜孔蛋白阳性菌株 ATCC13883; E, coli 为大肠埃希氏菌标准菌株 ATCC25922; K1 为携带 *NDM-1* 基因肺炎克雷伯菌; K2-K4 为非携带 *NDM-1* 基因的肺炎克雷伯菌。

图 4 膜孔蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Figure 4 SDS-PAGE electrophoresis of membrane pore protein

2.6 质粒结合试验及接合子药敏鉴定结果

对筛选出阳性的大肠杆菌 J53 受体菌, 用 PCR 扩增验证发现经质粒结合试验后受体菌携带有 *NDM-1* 基因; 并且其对 3 种碳青霉烯类药物美罗

培南、亚胺培南、厄他培南的抑菌圈分别缩小 3.1 (31/10) 倍、2.3 (28/12) 倍、5.3 (32/6) 倍, 见图 5。

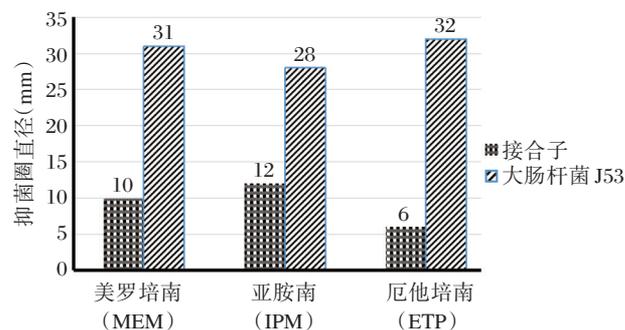


图 5 大肠杆菌 J53 接合试验前后对碳青霉烯类药物抑菌比较

Figure 5 Comparison of bacteriostasis to carbapenems before and after conjugation test of *Escherichia coli* J53

3 讨论

随着碳青霉烯类药物在临床的普遍使用, 细菌对其耐药也日趋严重, 目前认为细菌产碳青霉烯酶是产生耐药的主要原因^[8], 碳青霉烯酶是一类能水解碳青霉烯类药物的 β -内酰胺酶。NDM-1 为含金属的 β -内酰胺酶, 因产生此酶的细菌表现为对抗生素高度耐药, 所以其一经出现引起全球关注, 给临床抗感染提出严峻的考验。

现在国内外产 NDM-1 细菌的报道越来越多, 甚至有暴发流行的报道^[9-10], 本研究的菌种是从前列腺增生患者尿液标本培养分离对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌株, 改良 Hodge 试验阴性, 而 EDTA 协同实验为阳性; 虽然改良 Hodge 试验阴性, 仍推测实验菌为产金属 β -内酰胺酶的碳青霉烯类药物耐药的肺炎克雷伯菌, 有报道认为改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶敏感度、特异性低的缺点, 易出现假阴性^[11-12], 本例改良 Hodge 试验阴性, 可能也是该原因导致。进一步采用 PCR 对相关 β -内酰胺酶基因检测发现该菌除携带 *NDM-1* 基因外还携带 *KPC*、*SHV* 基因, *NDM-1* 的基因经序列分析比对确认, 最终认定实验菌产 NDM-1 型金属 β -内酰胺酶。该菌株表现对所有 β -内酰胺类药物包含加酶抑制剂及碳青霉烯类药物耐药, 仅对丁胺卡那霉素、复方新诺明敏感, 呋喃妥因中介, 临床抗菌治疗面临严重的挑战, 所以应加强对该菌的认识和提高监控能力显得十分重要^[13]。

肺炎克雷伯菌膜孔蛋白在细菌耐药中起重要作用^[14],肺炎克雷伯菌除了主要的膜孔蛋白OmpK35、OmpK36外仍表达其他膜孔蛋白如OmpK37、OmpKA、PhoE和LamB等。不同的报道SDS-PAGE检出膜孔蛋白成份存在差异,García-Sureda等^[15]研究中检测出OmpK36和LamB膜孔蛋白,同时认为LamB存在与OmpK36缺失相关;而意大利学者采用SDS-PAGE方法检测出OmpK35、OmpK36、OmpKA以及变异的OmpK36V^[16]。本研究采用SDS-PAGE电泳分析肺炎克雷伯菌膜孔蛋白阳性标准菌株ATCC13883及其他对照株,检出膜孔蛋白OmpK36和OmpKA,但未检出膜孔蛋白OmpK35,这与David等^[17]的报道结果一致,未检出膜孔蛋白OmpK35。也有报道认为MALDI-TOFMS和SDS-PAGE方法检测肺炎克雷伯菌膜孔蛋白时敏感性不够导致膜孔蛋白OmpK35易漏检^[18]。而携带NDM-1基因的实验菌膜孔蛋白SDS-PAGE电泳只检测到OmpKA,故认为实验菌膜孔蛋白OmpK36缺失,进一步对其膜孔蛋白OmpK35、OmpK36基因进行序列分析发现存在点突变或片段缺失,认为这可能是导致膜孔蛋白OmpK36缺失的主要原因。携带NDM-1基因伴膜孔蛋白OmpK36缺失肺炎克雷伯菌株是本地区首次报道,表现多重耐药特点。

MLST基因分子分型提示实验菌为ST15型;而本院同时期其他耐碳青霉烯类药物肺炎克雷伯菌为ST11型,表明该时期我院耐碳青霉烯类药物肺炎克雷伯菌的主要流行株为ST11,这与国内相关报道^[19]认为ST11是耐碳青霉烯类药物肺炎克雷伯菌的主要基因分子分型,而产NDM-1肺炎克雷伯菌MLST基因分子分型呈多样化相一致;提示携带NDM-1基因菌株遗传背景与医院流行株差异大,为本院菌株突变而来的概率低,当然也不排除为不同种属细菌通过质粒转移接合等方式传播而获得NDM-1基因,本文没有扩大菌种范围进行分析,有待进一步深入研究确认。

报道认为NDM-1基因是以质粒的方式,可在同种或不同种细菌间传播^[20]。本研究通过质粒接合试验显示供体菌的NDM-1基因通过质粒传导给受体菌,受体菌获得NDM-1基因后对碳青霉烯类药物敏感性发生改变,表现为对3种碳青霉烯类药物美罗培南、亚胺培南、厄他培南耐药,证明了NDM-1基因以质粒方式传播,也为阻遏携带NDM-1基因细菌之间传导以免暴发性流行提供依据。

参考文献

- [1] Dongeun Y, Mark A, Christian G, et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India [J]. Antimicrobial agent and chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [2] Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of new delhi metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health [J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 101.
- [3] Khajuria A, Prahraj AK, Kumar M, et al. Presence of a novel variant NDM-10, of the new delhi metallo-beta-lactamase in a kKlebsiella pneumoniae isolate [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2016, 34(1): 121-123.
- [4] 胡晓丰,邱少富,张传福,等.产新德里金属β-内酰胺酶耐药菌感染治疗的研究进展[J].生物技术通讯,2017,28(2):162-168.
- [5] 朱水荣,商小春,帅慧群,等.浙江省首次检出1株携带NDM-1基因的肺炎克雷伯菌[J].中国人兽共患病学报,2015,31(1):30-34.
- [6] Ana PC, Denise A, Múrcia M, et al. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out klebsiella pneumoniae carbapenemase [J]. Clinics (Sao Paulo), 2012, 67(12): 1427-1431.
- [7] Zhang Y, Jiang X, Wang Y, et al. Contribution of β-lactamases and porin proteins OmpK35 and OmpK36 to carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae [J]. 2014, 58(2): 1214-1217.
- [8] Ye Y, Xu L, Han Y, et al. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 1143-1149.
- [9] 贾楠,李延年,董丹丹,等.携带NDM-1基因ST571型肺炎克雷伯菌引起新生儿医院感染暴发的研究[J].中国实验诊断学,2017,21(11):1873-1876.
- [10] 王盛书,孙金柱,苏文莉,等.我国携带NDM-1基因耐药菌流行现状分析[J].军事医学,2015,39(11):825-830.
- [11] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 477-479.
- [12] 马玉兰,宋文杰,梁屹,等. CIM与mCIM筛选肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶能力比较[J].河北医科大学学报,2018,39(8):943-948.
- [13] 张焯,董方,宋文琪,等.产NDM-1型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌儿童血流感染的临床特征及细菌耐药性分析[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(5):516-522.
- [14] Wise M, Horvath E, Young K, et al. Global survey of Klebsiella pneumoniae major porins from ertapenem non-susceptible isolates lacking carbapenemases [J]. J Med Microbiol, 2018, 67(3): 289-295.

(下转第63页)

· 论 著 ·

脂蛋白相关磷酸酶 A2 和炎性蛋白在诊断脑梗死后血管性痴呆及判断预后中的应用

贾东佩* 朱风俊 任应国

[摘要] 目的 探讨脂蛋白相关磷酸酶 A2(Lp-PLA2)、炎性蛋白[超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)]在脑梗死后血管性痴呆(VD)诊断及预后中的应用价值。方法 选取2018年6月至2019年7月本院收治的75例单纯脑梗死患者(无VD组)及60例脑梗死后VD患者(VD组),比较两组临床资料,通过酶联免疫吸附法检测血清Lp-PLA2、IL-6水平,通过干式免疫层析技术检测血清hs-CRP水平,采用 Logistic 回归性分析影响脑梗死后VD发生的危险因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)分析各指标诊断脑梗死后VD的价值,采用 Pearson 分析各指标与美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)、日常生活活动力量表评分(ADL)之间的相关性。结果 VD组NIHSS、ADL评分及血清Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6均较无VD组高($P<0.05$);年龄、Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6均为影响脑梗死后VD发生的相关危险因素($P<0.05$);诊断脑梗死后VD的AUC IL-6>hs-CRP>Lp-PLA2;Lp-PLA2、hs-CRP和IL-6与NIHSS评分呈正相关($P<0.05$),与ADL评分呈负相关($P<0.05$)。结论 Lp-PLA2、hs-CRP和IL-6在脑梗死后VD患者中高表达,且明显与患者预后评分相关,可辅助VD诊断及评估患者功能预后。

[关键词] Lp-PLA2; hs-CRP; IL-6; 脑梗死; 血管性痴呆

Application of lipoprotein - associated phosphatase A2 and inflammatory proteins in diagnosing vascular dementia and predicting prognosis after cerebral infarction

JIA Dongpei*, ZHU Fengjun, REN Yingguo

(Department of neurology, Nanyang central hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

[ABSTRACT] Objective To investigate lipoprotein - associated phosphatase A2 (Lp - PLA2), inflammatory proteins [high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), interleukin-6 (IL-6)] and vascular dementia (VD) after cerebral infarction application value in diagnosis and prognosis. Methods From June 2018 to July 2019, 75 patients with simple cerebral infarction (without VD group) and 60 patients with VD after cerebral infarction (VD group) were selected, and the clinical data of the two groups were compared. Detection of serum Lp-PLA2 and IL-6 levels by enzyme-linked immunosorbent assay, and detection of serum hs-CRP levels by dry immunochromatographic techniques were performed. Logistic regression analysis was used to analyze the risk factors affecting VD after cerebral infarction. And area under the curve (AUC) were used to analyze the value of VD after diagnosis of cerebral infarction. Pearson analysis was used to analyze the correlation between the indicators and the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and the daily activity ability scale score (ADL). Results The NIHSS, ADL scores, and serum Lp-PLA2, hs-CRP, and IL-6 in the VD group were higher than those in the non-VD group ($P<0.05$). Age, Lp-PLA2, hs-CRP, and IL

基金项目:河南省科技攻关项目(192102310436)

作者单位:南阳市中心医院神经内科,河南,南阳 473000

*通信作者:贾东佩, E-mail: dhwpzr6081853@163.com

-6 all affected cerebral infarction, related risk factors of post-VD ($P<0.05$). AUC IL-6>hs-CRP>Lp-PLA2 of VD after diagnosis of cerebral infarction. Lp-PLA2, hs-CRP and IL-6 were positively correlated with the NIHSS score ($P<0.05$), which was negatively correlated with ADL score ($P<0.05$). **Conclusions** Lp-PLA2, hs-CRP and IL-6 are highly expressed in patients with VD after cerebral infarction, and are significantly related to the prognosis score of patients, which can assist the diagnosis of VD and evaluate the functional prognosis of patients.

[KEY WORDS] Lp-PLA2; Hs-CRP; IL-6; Cerebral infarction; Vascular dementia

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)发病率高居痴呆类疾病第二位,是指由脑梗死等脑血管疾病引起的认知功能异常,以记忆力、认知能力、计算能力减退等为主要表现,严重影响患者生活质量^[1]。目前VD的诊断依赖于神经心理学评估、影像学检查、临床评估等,项目繁杂,且易受主观因素影响,故临床期待新的诊断方法。脂蛋白相关磷酸酶A2(lipoprotein-associated phosphatase A2, Lp-PLA2)是磷脂酶A2超家族中的一员,能促使氧化磷脂水解,已证实是动脉粥样硬化斑块破裂、血栓形成事件的独立风险因子^[2]。根据陈亚南等^[3]报道,血清Lp-PLA2可影响脑梗死患者美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)评分,推测其可能与认知功能受损相关。超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)是由肝脏合成的一种全身性炎症反应急性期敏感型标志物,既往研究证实其与急性脑梗死患者神经功能缺损有关,故可能与VD有关^[4]。白介素-6(Interleukin 6, IL-6)是一种分子量为26kD的蛋白质,由184个氨基酸组成,能刺激参与免疫反应,是一种前炎性细胞因子。动物学研究发现,IL-6在脑梗死大鼠模型中高表达,并可增加神经元的凋亡^[5]。目前关于Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6在脑梗死后VD中应用价值的报道较少。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2018年6月至2019年7月本院收治的135例脑梗死病例,根据是否发生VD分为两组:①无VD组75例,仅有脑梗死,意识清晰,无休克,可伴有不同程度的运动功能障碍;②VD组60例,脑梗死后发生VD患者。根据《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014》^[6]诊断脑梗死,蒙特利尔认知评估量表(Montreal Cognitive Assessment, MoCA)评分 ≥ 26 分,并《卒中后认知障碍管理专

家共识》^[7]诊断VD: MRI可见双侧基底节、脑皮质、白质内多发型长T1、长T2病灶,有记忆力或其他认知功能减退的主诉, Hachinski缺血指数量表评分 ≥ 7 分, MoCA < 26 分,无先天性认知功能障碍,排除脑梗死前存在路易体痴呆、阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、合并脑部肿瘤、发病前存在急慢性感染类疾病者。

收集患者一般资料,包括文化程度、年龄、性别、脑梗死部位、NIHSS评分(满分42分,分值越高,神经功能越差)、日常生活活动能力评分(Activities of daily living, ADL, 满分100分,分值越高,生活能力越强)等,其中NIHSS、ADL评分是临床普遍采用、公认的预后评估量表,均在患者入院后评估。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与检测

①主要试剂:Lp-PLA2试剂盒(上海钰博生物科技有限公司);hs-CRP试剂盒(基蛋生物科技股份有限公司);IL-6试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司)。②检测方法:于患者入院后第2天清晨采集5 mL空腹外周静脉血,3 000 r/min离心后,通过酶联免疫吸附法检测血清Lp-PLA2、IL-6水平,通过干式免疫层析技术检测血清hs-CRP水平。

1.2.2 观察指标

①比较无VD组和VD组性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、合并疾病、文化程度、梗死部位、NIHSS、ADL评分及血清Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6水平。②分析脑梗死后VD发生的相关危险因素。③分析各指标诊断脑梗死后VD的最佳截断值、敏感度、特异度。④分析血清各指标与NIHSS评分相关性。⑤分析血清各指标与ADL评分相关性。

1.2 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,t检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示、 χ^2 检验,采用Logistic回归性分析影响脑梗死后VD发生的因素,采用受试者工作特征曲线(Re-

ceiver Operating Characteristic, ROC)及曲线下面积(Area Under Curve, AUC)分析各指标诊断脑梗死后VD的价值,采用Pearson分析各指标与NIHSS、ADL评分相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较两组临床资料

两组年龄、性别、体质量指数、饮酒史、吸烟史、合并疾病、文化程度、梗死部位比较,无显著差异,无统计学意义($P>0.05$);VD组NIHSS、ADL评分及血清Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6较无VD组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组临床资料对比[n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of clinical data between the 2 groups[n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

资料	无VD组 (n=75)	VD组 (n=60)	$t/\chi^2/u$ 值	P值
年龄(岁)	64.88±2.51	66.79±3.06	3.985	<0.001
性别(男/女)	35/40	31/29	0.334	0.564
体质量指数(kg/m ²)	22.24±1.32	21.97±1.40	1.150	0.252
NIHSS评分	7.24±1.08	8.13±1.05	4.817	<0.001
ADL评分	56.16±8.88	51.08±6.91	3.636	<0.001
饮酒史	7(9.33)	8(13.33)	0.540	0.462
吸烟史	16(21.33)	19(31.67)	1.853	0.173
合并疾病				
冠心病	5(6.67)	6(10.00)	0.495	0.482
高血脂	14(18.67)	16(26.67)	1.234	0.267
高血压	10(13.33)	12(20.00)	1.086	0.297
糖尿病	8(10.67)	10(16.67)	1.039	0.308
文化程度				
小学及以下	30(40.00)	25(41.67)	0.038	0.845
初中	26(34.67)	21(35.00)	0.002	0.968
高中	14(18.67)	11(18.33)	0.003	0.961
大专及以上	5(6.67)	3(5.00)	0.002	0.968
梗死部位				
基底节区	47(62.67)	39(65.00)	0.079	0.779
白质	7(9.33)	5(8.33)	0.041	0.839
脑叶	15(20.00)	11(18.33)	0.060	0.807
脑干	2(2.67)	2(3.33)	0.081	0.777
丘脑	4(5.33)	3(5.00)	0.092	0.761
Lp-PLA2 (ng/mL)	144.97±45.62	189.01±60.21	4.835	<0.001
hs-CRP(mg/L)	4.05±1.21	5.11±1.31	4.875	<0.001
IL-6(pg/mL)	6.47±1.86	8.25±2.11	5.204	<0.001

2.2 脑梗死后VD发生的危险因素

以脑梗死后是否发生VD为因变量,以年龄、

血清各指标为自变量,进行多因素分析发现,年龄、Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6均为影响脑梗死后VD发生的相关危险因素,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 影响脑梗死后VD发生因素的Logistic多元回归方程分析

Table 2 logistic multiple regression equation analysis of factors affecting VD after cerebral infarction

影响因素	β 值	SE值	Wald/ χ^2 值	P值	OR值	95%CI
年龄	0.653	0.301	4.705	0.027	1.921	1.507~2.449
Lp-PLA2	0.919	0.323	8.092	<0.001	2.506	1.346~4.667
hs-CRP	1.290	0.579	4.963	0.018	3.632	3.312~3.984
IL-6	0.448	0.144	9.680	<0.001	1.565	1.315~1.863

2.3 各指标诊断脑梗死后VD的价值

IL-6诊断脑梗死后VD的AUC最大,为0.761,截断值为6.89 pg/mL,敏感度、特异度分别为71.67%、69.33%,见图1。

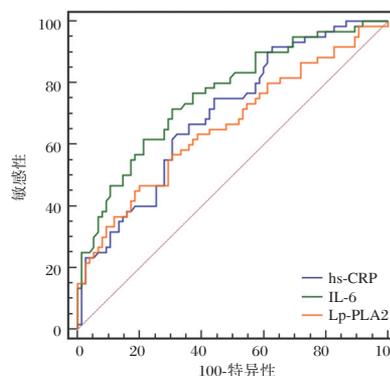


图1 分析各指标诊断脑梗死后VD的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of VD after diagnosis of cerebral infarction

2.4 血清各指标与NIHSS评分、ADL评分相关性

Lp-PLA2、hs-CRP、IL-6均与NIHSS评分呈正相关($P<0.05$),均与ADL评分呈负相关($P<0.05$)。见表3。

表3 血清各指标与NIHSS评分、ADL评分相关性参数

Table 4 Correlation parameters of serum indexes with NIHSS score and ADL score

指标	NIHSS评分		ADL评分	
	r值	P值	r值	P值
Lp-PLA2	0.442	<0.001	-0.487	<0.001
hs-CRP	0.365	0.004	-0.260	0.045
IL-6	0.343	0.007	-0.503	<0.001

3 讨论

脑梗死是引起 VD 主要病因之一,近年来 VD 发病率随脑血管病增加而升高,给家庭、社会带来了沉重的照护、经济负担,是临床研究热点。现阶段普遍认为脑梗死后 VD 是多因素、多环节共同作用的结果,根据孟兰芳等^[8]报道,高龄是其独立影响因素之一,与本研究结论相符。

Lp-PLA2 由血管内膜的淋巴细胞、巨噬细胞分泌,在血浆中以与脂蛋白颗粒结合形式存在,其中 20% 结合高密度脂蛋白,80% 结合低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。Lp-PLA2 可在 LDL 作用下转移至血管壁易损位置,经水解氧化磷脂介导氧化型游离脂肪酸、溶血卵磷脂的产生,促使内膜单核细胞聚集,导致炎症因子活化与慢性炎症,故被视为是血管类疾病的一种炎症标志物^[9]。根据 Hsu PF 等^[10]研究,血管炎性反应可造成认知功能障碍。Lin J 等^[11]报道指出,Lp-PLA2 是短暂性脑缺血发作后复发及轻微脑卒中的危险因素,而脑缺血反复发作是造成 VD 重要诱因。Chen D^[12]、Cai R 等^[13]研究显示,与无认知功能障碍患者相比,存在认知功能障碍患者血清 Lp-PLA2 水平较高,本研究结论与之相符。Lp-PLA2 影响认知功能的机制可能是通过加速血栓的形成、介导脑部血管的损伤实现的。张钱林等^[14]研究显示,Lp-PLA2 诊断 VD 截断值为 164.65 ng/mL,与本研究具体数据存在异质性,考虑与纳入病例病情及数量有关,有待后续扩大样本量进行探讨。

hs-CRP 是一种炎症蛋白,在冠心病、急性心肌梗死、急性脑梗死患者中均呈高表达。Guo J 等^[15]纳入了 311 例中风后认知障碍患者,发现其入院时 hs-CRP 水平与 6 个月认知能力之间具有相关性,hs-CRP 水平越高,认知功能越低。陈建媚等^[16]报道指出,脑小血管病轻度认知功能障碍患者外周血 hs-CRP 较认知功能正常者高,支持本研究结论。hs-CRP 参与脑动脉粥样硬化的病理过程,可导致斑块破裂、血栓形成,并能激活补体系统,产生大量炎症介质,释放氧自由基,造成血管内膜损伤、血管痉挛,导致神经功能受损,故与 VD 发生有关。Adina H 等^[17]采用改良的 Rankin 量表评估脑卒中患者功能,发现功能越差者,hs-CRP 水平越高,佐证了本研究结论。

IL-6 具有多种生物学活性,参与炎症反应、免疫应答等多个过程。Xiang B 等^[18]报道采用小

RNA 技术干扰大鼠脑缺血-再灌注损伤模型核因子- κ B 信号通路表达,发现 IL-6 水平明显降低,脑组织缺血-再灌注损伤改善,呈现出神经保护作用。王晓溪等^[19]研究指出,血清 IL-6 水平与阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患者认知功能障碍具有相关性。吴学平等^[20]报道显示,缺血性卒中后未发生认知障碍患者血清 IL-6 表达低于发生认知功能障碍者,且为认知功能障碍发生相关的独立危险因素,本研究结论与之一致。结合文献分析,IL-6 可激活核因子- κ B 炎症信号通路,促进肿瘤坏死因子- α 等炎性介质的产生,加重脑梗死后神经组织损伤,所以可影响认知功能^[21]。本研究不足之处在于,纳入样本量较小,仍有待后续扩大样本量进行进一步的探讨。

综上所述,Lp-PLA2、hs-CRP 和 IL-6 在脑梗死后 VD 患者中高表达,且明显与患者预后评分相关,可辅助 VD 诊断及评估患者功能预后。

参考文献

- [1] Smith EE. Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(11): 1059-1068.
- [2] 黄瑞瑜,潘广伟,黄伟雄,等. 颈动脉彩超结合 Lp-PLA2 检测在动脉粥样硬化性脑梗死预测及病情评估中的临床应用[J]. 中华生物医学工程杂志, 2017, 23(2): 162-165.
- [3] 陈亚南,王昌铭. 脂蛋白相关性磷脂酶和神经元特异性烯醇化酶在急性脑梗死患者中的动态变化及意义[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(3): 290-293.
- [4] 段圣杰,尚进林,琚小红,等. 急性脑梗死患者血清内皮素、IL-10 及 hs-CRP 水平与神经功能缺损的相关性研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2018, 24(2): 116-120.
- [5] Shi YL, Wang Q, Wei JC. Influence of lncRNA-MALAT1 on neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through regulating the ERK/MAPK signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(18): 8039-8048.
- [6] 中华医学会神经病学分会. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(4): 246-257.
- [7] 中国卒中学会,卒中后认知障碍管理专家委员会. 卒中后认知障碍管理专家共识[J]. 中国卒中杂志, 2017, 12(6): 519-531.
- [8] 孟兰芳,张钱林,赵丽娟,等. 中老年初次脑梗死发作后血管性痴呆的相关影响因素分析[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(5): 492-497.
- [9] Zhu S, Wei X, Yang X, et al. Plasma Lipoprotein-associated Phospholipase A2 and Superoxide Dismutase are Independent Predictors of Cognitive Impairment in Cerebral Small Vessel Disease Patients: Diagnosis and Assessment [J]. Aging Dis, 2019, 10(4): 834-846.
- [10] Hsu PF, Pan WH, Yip BS, et al. C-Reactive Protein Predicts Incidence of Dementia in an Elderly Asian Community Cohort [J]. JAmMedDirAssoc, 2017, 18(3): 277e7-277e11.

(下转第 73 页)

· 论 著 ·

非梗阻性无精子症患者 X 染色体连锁的 *TEX11* 基因多态性研究

罗招云¹ 李绪杰² 林芬¹ 查广才² 杨立业^{1*}

[摘要] **目的** 明确潮州地区男性非梗阻性无精子症患者 X 染色体连锁的 *TEX11* 基因多态性类型及其频率。**方法** 从2012年6月至2018年5月来本院泌尿外科和生殖医学科就诊的患者中收集到217例无精子症患者血液样本,列为实验组的35例患者符合非梗阻性无精子症的诊断标准,以生精(生育能力)正常男性为对照组,应用多重聚合酶链反应(PCR)技术对实验组和对照组的 *TEX11* 基因进行扩增,并通过基因测序检测 *TEX11* 基因多态性情况,采用 Chromas 软件、Nucleotide BLAST 数据库分析比对基因测序结果,对 *TEX11* 基因多态性的位点和类型进行统计。**结果** 实验组 *TEX11* 外显子错义突变点有2处,分别是 Exon 7:c.389 A>G,突变率37.1%;Exon 17:c.1351 G>A,突变率8.6%。对照组中发现 Exon7、Exon 17 也有相同位点突变,突变率分别为:37.5%、8.3%。2组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 在非梗阻性无精子症患者和生精正常男性都发现了 *TEX11* 外显子2个相同单核苷酸多态性(SNP)(Exon 7:c.389 A>G; Exon 17:c.1351 G>A),本研究推论这2种突变不影响 *TEX11* 的功能。

[关键词] 非梗阻性无精子症; X 染色体; *TEX11*; 基因多态性

Study on X chromosome-linked *TEX11* gene polymorphisms in non-obstructive azoospermia patients

LUO Zhaoyun¹, LI Xujie², LIN Fen¹, ZHA Guangcai², YANG Liye^{1*}

(1. Medical Laboratory Center, Affiliated Chaozhou Central Hospital, Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000; 2. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

[ABSTRACT] **Objective** To identify the types and frequencies of X-Linked *TEX11* polymorphisms of male non-obstructive azoospermia patients in Chaozhou. **Methods** From June 2012 to May 2018, 217 patients with azoospermia were collected from patients admitted to the Department of Urology and Reproductive Medicine of our hospital. The 35 patients listed in the experimental group were eligible for non-obstructive azoospermia. The diagnostic criteria were normal men with spermatogenesis (fertility) as the control group. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) technology was used to amplify the *TEX11* gene in the experimental group and the control group, and *TEX11* gene polymorphism was detected by gene sequencing. The Chromas software and Nucleotide BLAST database were used to analyze and compare the results of gene sequencing, and the loci and types of *TEX11* gene polymorphism were counted. Specimens with missense mutations were marked. **Results** In the experimental group, there were two missense mutations in exon *TEX11*, namely Exon 7: c.389 A>G, with a mutation rate of 37.1%; Exon 17: c.1351 G>A, with a mutation rate of 8.6%.

基金项目:潮州市卫生和计划生育局科技计划项目(2017041)

作者单位:1.南方医科大学附属潮州市中心医院中心实验室,广东,潮州 521000

2.韩山师范学院生物系,广东,潮州 521000

*通信作者:杨立业, E-mail: yangleeyee@sina.com

Exon7 and Exon 17 were found to have the same mutations in the control group, with mutation rates of 37.5% and 8.3%, respectively. There was no statistical difference between the two groups. Conclusion Two identical single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *TEX11* exon were found in patients with non-obstructive azoospermia and men with normal spermatogenesis (Exon 7: c.389 A>G; Exon 17: c.1351 G>A). This study concluded that these two mutations did not affect the function of.

[KEY WORDS] Non-obstructive azoospermia; X chromosome; *TEX11*; Gene polymorphisms

在全世界范围内,男性不育无精子症的发病率高达15%~20%,并呈现出快速增长的趋势^[1]。男性不育症已成为一个严重的生殖健康问题^[2]。大多数非阻塞性无精子症的遗传基础还未知^[3]。遗传因素常被认为是无精子症中男性不育的主要原因^[4],X染色体连锁的*TEX11*基因在睾丸中表达,与精子发生功能有关^[5],*TEX11*的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与特发性男性不育密切相关^[6]。*TEX11*缺乏导致减数分裂停滞和雄性不育,对无精子症患者进行*TEX11*突变筛查是为了查明雄性不育潜在的因素^[7]。本研究收集潮州地区35例男性非阻塞性无精子症患者血液标本,进行*TEX11*的SNP检测,探讨其与无精子症发生的关系,对它的发生率及其基因型别进行统计,评估*TEX11*的SNP与无精子症之间的相关性及其可能在中国非阻塞性无精子症患者发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 样本来源

选取2012年6月至2018年5月来我院泌尿外科和生殖医学科就诊的男性患者为实验对象,实验组纳入标准参照文献^[8-9]对无精子症的诊断标准,即射出的精液离心后镜检未观察到精子,且通过3次和3次以上离心镜检,同时排除逆行射精和不射精等,即可诊断为无精子症。离心标准:取出1 mL精液,以3 000 g(4 096 r/min)离心15 min,余下约50 μ L精浆。以纳入标准收集到217例无精子症患者血液样本。排除标准为男性无输精管炎症、睾丸(附睾)炎症、精囊炎、输精管道缺如、输精管道阻塞、Y染色体微缺失。217例无精子症患者筛选出35例非梗阻性无精子症患者为实验对象,年龄20~43岁,平均年龄(30.11 \pm 5.13)岁,平均体重(58.37 \pm 2.43)kg。对35例血液标本进行X染色体上*TEX11*的SNP检测。

收集2018年2月至5月来本院体检中心体检的30例生精正常的男性血液标本作为对照组。年龄26~47岁,平均年龄(32.11 \pm 3.57)岁,平均体重(61.37 \pm 1.82)kg。经详询,30例男性均是在未采取避孕措施下1年内使妻子自然受孕。

1.1.2 仪器与试剂

XP基因扩增仪(型号:TC-XP-D,货号:BYQ602402Y-273)购自杭州博日科技有限公司;电泳仪:电泳槽(型号:DYCP-38B型,货号:No.0838B-191-06)和电泳仪电源(型号:DYY-6C型,出厂编号:15.新6C.1210-11),均购自北京六一生物科技有限公司;凝胶成像系统(Tanon Gellmage System,型号:Tanon-1600,货号:15T5561-313)购自中国上海天能科技有限公司。外周血全血DNA提取试剂盒(型号:全血DNA溶液型,批号:W201708002)购自深圳亚能生物技术有限公司,DNA maker(型号:M1091/M1092,批号:014)购自广州东盛生物科技有限公司,2 \times Tap PCR MasterMix(型号:PC0902,批号:282238AX)购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 外周血DNA提取

外周血DNA的提取严格按照全血DNA提取试剂盒说明书操作,制备好的DNA样品置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.2 引物设计和合成

利用Primer premier 3.0引物设计工具,将29个*TEX11*的基因序列编码外显子序列分段设计合成,其中3个基因序列引物自行设计,见表1;另26个基因序列引物参照参考文献^[3]。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2.3 PCR扩增*TEX11* DNA

在XP基因扩增仪上经过PCR温度梯度实验,逐一确定29对引物扩增合适的退火温度,见表1,PCR扩增的体系参数和反应条件如下:PCR扩增的体系参数:Mix Taq, 12.5 μ L;纯净水, 8.5 μ L;上下

游引物各 1.0 μL ; 总 cDNA, 2.0 μL ; 体系总体积 25.0 μL 。PCR 反应参数设置: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s (温度见表 1), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

50 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5~10 min。在确定各对引物 PCR 扩增退火温度下, 对 35 例非梗阻性无精子症患者的 DNA 标本进行外显子序列分段式扩增。

表 1 *TEX11* 基因的 3 个编码外显子 DNA 引物和 PCR 扩增退火温度Table 1 The 3 coding exon DNA primers of the *TEX11* gene and PCR amplification annealing temperature

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(3'→5')	长度(bp)	温度($^{\circ}\text{C}$)
Exon 3	TGATGCATGTATGAGACTGTGTC	AGGTCAGGAGTTCGAAAGCA	478	63
Exon 10	AGGCTGGAGTGATGTGGC	GCATGTTGGCTTCTGAAGTC	312	63
Exon 16	AGAATCAGGCAGCAGTACCG	CAGCGATGACATTTCCCTACA	483	61

1.2.4 电泳

用 1.5% 琼脂糖凝胶, 200 V 电压, 140 mA 电流, 电泳时间为 25 min, 对 PCR 扩增产物进行电泳, 电泳结束后将凝胶轻置于 Tanon 1600 凝胶成像系统中, 观察 DNA 条带亮度、位置, 拍照记录。

1.2.5 PCR 产物测序

将合格的 PCR 扩增产物送至上海英骏生物技术公司(广州)进行测序。

1.2.6 基因序列比对

根据测序出来的结果, 通过 Chromas 测序分析软件人工查看测序图确认检测结果是否成功, 将测出的正反向基因序列通过 pubmed 的 Nucleotide BLAST 数据库进行比对, 以确定非梗阻性无精子症患者 X 染色体上的 *TEX11* 基因是否发生突变, 突变位点排除杂合子突变。

1.3 统计分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 用卡方

检验对实验组和对照组的突变率进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

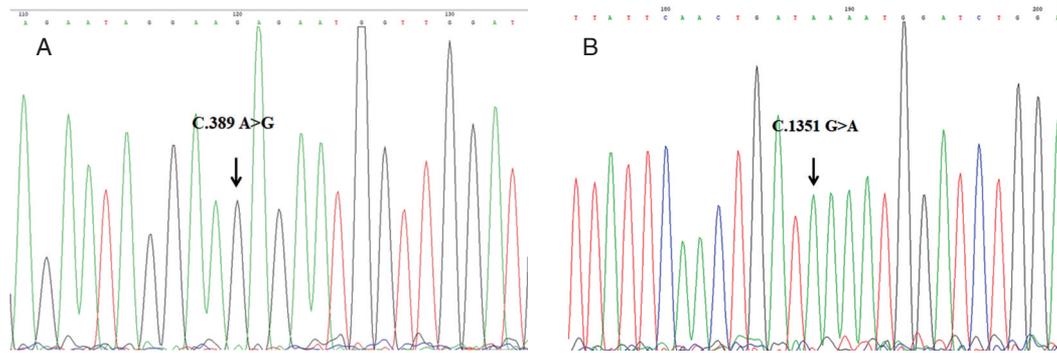
2 结果

2.1 基因测序结果分析

在 35 例实验组患者标本中检测到 2 种错义突变类型, 分别是 Exon 7: c.389 A>G, 突变率 37.1%; Exon 17: c.1351 G>A, 突变率 8.6%。2 种错义突变引起的编码氨基酸变化分别是: c.Lys 130 Arg 和 c. Glu 451 Lys; 在对照组中发现 Exon 7、Exon 17 也有相同位点突变, 突变率分别为: 37.5%、8.3%。此外, 在实验组中发现 2 处同义突变, 分别是 Exon 27: c.2319 T>A, 突变率为 71.4%; Exon 29: c.2541 T>C, 突变率为 20.0%。在实验组和对照组中都发现了 *TEX11* 的 2 个外显子相同位点的突变 (Exon 7: c.389 A>G, Exon 17: c.1351 G>A), 见表 2 和图 1。

表 2 非梗阻性无精子症患者和对照组 *TEX11* 基因外显子编码基因序列突变 [$n(\%)$]Table 2 *TEX11* gene mutation of the exon encoding sequence in males with non-obstructive azoospermia and the control group [$n(\%)$]

外显子区域	突变位点	编码氨基酸的变化	实验组	对照组	χ^2 值	P 值
Exon 7	c.389 A>G	c.Lys 130 Arg			0.001	0.978
	A/A		22(62.9)	15(62.5)		
	G/G		13(37.1)	9(37.5)		
Exon 17	c.1351 G>A	c. Glu 451 Lys			0.001	0.974
	G/G		32(91.4)	22(91.7)		
	A/A		3(8.6)	2(8.3)		
Exon 27	c.2319 T>A	同义突变			8.257	0.004
	T/T		10(28.6)	0(0.0)		
	A/A		25(71.4)	24(100.0)		
Exon 29	c.2541 T>C	同义突变			1.499	0.221
	T/T		28(80.0)	22(92.7)		
	C/C		7(20.0)	2(7.3)		



注: a. Exon 7, c.389 A>G; b. Exon 17, c.1351 G>A。

图1 非梗阻性无精子症患者 *TEX11* 基因的2处错义突变

Figure 1 2 missense mutations in the *TEX11* gene of non-obstructive azoospermia

3 讨论

在成人男性中,高达1%的人群患有无精子症^[10],男性不育患者中有近25%是非梗阻性无精子症导致的^[11]。非梗阻性无精子症是一种多因素疾病,其分子基础仍然大部分未知,几乎一半的男性不育症与遗传缺陷有关^[3]。目前,国内外对男性非梗阻性无精子症的 *TEX11* 基因突变研究报告极少。关于X染色体上的生精基因研究会逐渐成为国际上的研究热点,包括 *TEX11* 基因在内的基因已被报道为无精子症的可能关联因素^[12-13]。*TEX11* 基因表达蛋白是一种X染色体编码的生殖细胞特异性蛋白质,在睾丸中的精原细胞和早期精母细胞中表达量最大^[14]。*TEX11* 基因在精子发生早期扮演一个重要角色^[15]。*TEX11* 基因是减数分裂的一个明确因素^[16]。*TEX11* 基因突变导致减数分裂停滞,是精子形成失败导致非梗阻性无精子症的原因,*TEX11* 基因对精子发生障碍有重要意义^[3-4]。

目前,由基因异常导致的男性不育主要是:性染色体与生精基因的缺失与突变、常染色体基因的缺失与突变^[17]。不少学者研究不育男性X连锁的 *TEX11* 基因突变^[3-4]。目前,共发现 *TEX11* 基因有46个不同突变^[3-4]。*TEX11* 基因突变发生率在德国是2.4%(7/289),在美国无精子症患者中的发生率是14.5%(35/246)^[3-4],本研究 *TEX11* 基因突变发生率是37.1%(13/35)。*TEX11* 基因突变发生率差异可能与种族特点不同有关^[7]。在一项试验中,敲除小鼠 *TEX11* 基因上共30个外显子中的27个,染色体在粗线期不结合使精子发生受损,导致细胞死亡和雄性不育^[16]。Yatsenko等^[3]通过研究发

现6个不同 *TEX11* 基因突变,包括外显子9~11缺失(607del1237 bp),3个剪切突变(c.405C>T, 748+1G>A, 1793+1G>C),2个错义突变(c.466A>G, 2047G>A)。Yang等^[4]发现40个不同 *TEX11* 突变,18个在无精子症患者中检测出,包括5个外显子错义突变(W117R, V142I, Q172R, T244I, V748A),2个外显子无义突变(405C>T, 2319T>C),1个外显子移码突变,10个内含子突变;另22个在正常生育男性中发现,其中4个外显子错义突变(K115R, M152V, E436K, D832E)。日本研究者^[10]对包括 *TEX11* 基因在内的25个相关基因进行突变筛选,发现1个 *TEX11* 突变(c.A511G, Met171Val)。在中国人群中,仅有1篇文献报道1对不育兄弟在 *TEX11* 基因的29号外显子上发现2653 G>T^[7]。本研究的 *TEX11* 基因30个外显子发现4个SNP,2个外显子错义突变(Exon 7: c.389 A>G; Exon 17: c.1351 G>A)和2种无义突变,与上述研究者发现的基因突变位点均不相同,与欧美基因突变位点不同的原因可能是人种不同;与日本研究者的不同,可能与本实验样本例数太少有关。本研究实验组和对照组中都有相同位点2个错义突变,推测这2种突变不影响 *TEX11* 基因的功能,与Yang等^[4]研究的结论基本一致。在正常生育男性中发现 *TEX11* 基因突变,以及大部分 *TEX11* 基因突变准确原因还不明确,可能提示这些突变与无精子生成不相关^[4]。这么丰富的 *TEX11* 突变增加了诊断导致雄性不育的困难^[7]。Zhang等^[6]研究阐述了 *TEX11* 基因的SNP与无精子症具有相关性;*TEX11* 基因突变在男性不育中,特别是与无精子症有密切相关^[7]。

综上所述, *TEX11* 基因的 SNP 在非梗阻性无精子症的临床意义目前是不明确的, 与 Mitchell 等人^[18]的研究结论是一致的, *TEX11* 基因功能目前与男性不育的关系还无定论, 本研究结果的结论也是如此。鉴于本研究样本例数少, 生育男性也发现 *TEX11* 基因突变, 因此在潮州地区人群中 *TEX11* 基因与男性不育的关系还有待更进一步深入研究。在检测 *TEX11* 基因突变时, 结合睾丸组织学活检和不育史家系调查, 更有助于得出 *TEX11* 基因突变与男性不育的相关性^[7]。

参考文献

- [1] Simon L, Wilcox A, Carrell DT. Intracytoplasmic morphology-selected sperm injection[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 92(7):247-256.
- [2] Miyamoto T, Minase G, Okabe K, et al. Male infertility and its genetic causes[J]. *Obstet Gynaecol Res*, 2015, 41(10):1501-1505.
- [3] Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, et al. X-linked *TEX11* mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(22):2097-2107.
- [4] Yang F, Silber S, Leu NA, et al. *TEX11* is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse[J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(9):1198-1210.
- [5] Zheng K, Yang F, Wang PJ. Regulation of male fertility by X-linked genes[J]. *Androl*, 2010, 31(1):79-85.
- [6] Zhang X, Ding M, Ding X, et al. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2015, 61(4):187-193.
- [7] Sha Y, Zheng L, Ji Z, et al. A novel *TEX11* mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review[J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1):63.
- [8] 许蓬, 朱伟杰. 男性生殖基础与临床研究新进展第1版[M]. 北京: 科学出版社, 2018:177-182.
- [9] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册第五版[M]. 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等译. 北京: 人民卫生出版社, 2011:33-43.
- [10] Nakamura S, Miyado M, Saito K, et al. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations[J]. *Andrology*, 2017, 5(4):824-831.
- [11] 闻洋. 中国男性非梗阻性无精子症全基因组拷贝数变异和单核苷酸多态性研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2016:1-122.
- [12] Miyamoto T, Bando Y, Koh E, et al. A *PLK4* mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome[J]. *Andrology*, 2016, 4(1):75-81.
- [13] Boroujeni PB, Sabbaghian M, Totonchi M, et al. Expression analysis of genes encoding *TEX11*, *TEX12*, *TEX14* and *TEX15* in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2018, 22(3):185-192.
- [14] Yu YH, Siao FP, Hsu LC, et al. *TEX11* modulates germ cell proliferation by competing with estrogen receptor β for the binding to HPIP[J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(4):630-642.
- [15] Adelman CA, Petrini JH. *ZIP4H* (*TEX11*) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over[J]. *Plos Genet*, 2008, 4(3):e1000042.
- [16] Yang F, Gell K, van der Heijden GW, et al. Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(5):682-691.
- [17] Robert F, Bey-Omar F, Rollet J, et al. Relation between the anatomical genital phenotype and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in the absence of the vas deferens[J]. *Fertil Steril*, 2002, 77(5):889-896.
- [18] Mitchell MJ, Metzler-Guillemain C, Toure A, et al. Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies[J]. *Clin Genet*, 2017, 91(2):208-216.
- [15] García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in antimicrobial resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(4):1803-1805.
- [16] García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis C, et al. An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel *OmpK36* porin variant[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10):4178-4184.
- [17] David L, Simona B, John Q. Contribution of *OmpK36* to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58(11):1303-1308.
- [18] Pinto NA, D'Souza R, Hwang IS, et al. Whole genome and transcriptome analysis reveal MALDI-TOF MS and SDS-PAGE have limited performance for the detection of the key outer membrane protein in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49):84818-84826.
- [19] 刘婧娴, 俞静, 刘瑛. ST571型产NDM-1肺炎克雷伯菌检出及分子流行病学研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(3):402-408.
- [20] Armin S, Fallah F, Azimi L, et al. Warning: spread of NDM-1 in two border towns of Iran[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(10):125-129.

(上接第54页)

血常规参数、血浆D-二聚体在败血症诊断及预后应用

徐玉秀* 张成伟 鹿勇

[摘要] **目的** 研究血常规参数、血浆D-二聚体(D-D)在败血症诊断及预后的应用价值。**方法** 选取本院2018年1月至2018年12月败血症患者118例作为观察组,另选取同期非败血症患者120例作为对照组,比较两组血常规参数[血小板计数(PLT)、中性粒细胞比例(N%)、白细胞计数(WBC)]及血浆D-D水平,分析血常规参数、血浆D-D诊断价值。根据28d预后情况将观察组分为生存者(97例)、死亡者(21例)。对比两者血常规参数、血浆D-D水平、序贯器官衰竭估计(SOFA)评分、急性生理与慢性健康II(APACHE II)评分,分析血常规参数、血浆D-D与SOFA、APACHE II评分相关性,ROC曲线分析血常规参数、血浆D-D预测预后不良价值。**结果** 观察组PLT低于对照组,N%、WBC、血浆D-D高于对照组($P<0.05$);ROC曲线分析,血浆D-D诊断败血症AUC大于PLT、N%、WBC;治疗3d后生存者PLT高于死亡者,N%、WBC、血浆D-D低于死亡者($P<0.05$);治疗3d后生存者SOFA、APACHE II评分低于死亡者($P<0.05$);PLT与SOFA、APACHE II评分呈负相关,N%、WBC、血浆D-D与SOFA、APACHE II评分呈正相关($P<0.05$);ROC曲线分析,治疗3d后血浆D-D预测预后不良的AUC大于PLT、N%、WBC。**结论** 血常规参数、血浆D-D在败血症中呈异常状态,其中PLT、D-D具有良好的诊断价值,且可作为预后不良的重要预测因子,为临床干预提供参考依据。

[关键词] 败血症; D-二聚体; 血常规; 血小板计数; 中性粒细胞比例; 白细胞计数

Application value of blood routine parameters and plasma D - dimer in diagnosis and prognosis of sepsis

XU Yuxiu*, ZHANG Chengwei, LU Yong

(Department of medical laboratory, Fuxin mine general hospital, Liaoning health industry group, Fuxin Liaoning, China, 123000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the application value of blood routine parameters and plasma D-dimer (D-D) in the diagnosis and prognosis of sepsis. **Methods** 118 cases of sepsis patients in our hospital from January 2018 to December 2018 were selected as the observation group, and 120 cases of non-septic patients in the same period were selected as the control group. The blood routine parameters [platelet count (PLT), neutrophil ratio] (N%), white blood cell count (WBC)] and plasma D-D level were measured, and the blood routine parameters and the diagnostic value of plasma D-D were analyzed. According to the prognosis of 28 days, the observational components were survivors (97 cases) and deceased (21 cases). Compare the blood routine parameters, plasma D-D levels, sequential organ failure estimation (SOFA) score, acute physiology and chronic health II (APACHE II) score, we analyzed the correlation between blood routine parameters, plasma D-D and SOFA, APACHE II score, ROC curve analysis Blood routine parameters and plasma D-D predict poor prognostic value. **Results** The PLT in the observation group was lower than that in the control group, and N%, WBC, and plasma D-D were higher than those in the control group ($P<0.05$). According to ROC curve analysis, the AUC of plasma D-D in the diagnosis of sepsis was greater than PLT, N%, and WBC. The PLT was higher in survivors after 3 days of treatment. N%, WBC, and plasma D-

作者单位:辽宁省健康产业集团阜新矿总医院医学检验科,辽宁,阜新123000

*通信作者:徐玉秀, E-mail: wangty000@163.com

D were lower than those who died ($P<0.05$). SOFA and APACHE II scores were lower in survivors after 3 days of treatment ($P<0.05$). PLT was negatively correlated with SOFA and APACHE II scores. N%, WBC, and plasma D-D were positively correlated with SOFA and APACHE II scores ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC with poor predictive prognosis of plasma D-D after 3 days of treatment was greater than PLT, N%, and WBC. **Conclusion** Blood routine parameters and plasma D-D showed abnormal status in sepsis. Among them, PLT and D-D have good diagnostic value, and can be used as important predictors of poor prognosis, providing reference for clinical intervention.

[KEY WORDS] Sepsis; D-dimer; Blood routine; Platelet count; Neutrophil ratio; White blood cell count

败血症又称脓毒症,具有发病机制复杂、病情凶险等特点,发病过程涉及多种生理病理改变,可导致多器官衰竭,患者预后较差^[1-2]。相关资料数据统计显示,脓症患者病死率高达30%~40%,防治形势严峻^[3]。血小板计数(blood platelet, PLT)降低、中性粒细胞比例(N%)增加、白细胞计数(white blood cell count, WBC)升高是反映感染发生的主要指标,在多种感染性疾病病情评估中具有重要作用^[4-5]。同时,临床实践证实,凝血功能异常贯穿败血症发生与进展整个过程,严重者可引发弥漫性血管内凝血,导致病情恶化,增加预后不良风险^[6]。而D-二聚体(D-dimer, D-D)属于纤溶酶降解产物,是评估凝血功能的特异性标志物^[7]。基于此,本研究对血常规参数、血浆D-D在败血症诊断及预后的应用价值进行综合分析,旨在为临床诊治该疾病提供更多途径。详情如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2018年12月败血症患者118例作为观察组,女43例,男75例,年龄30~76岁,平均年龄(60.32±7.11)岁,原发疾病类型:颅内感染3例,尿路感染12例,肺炎94例,胆囊炎3例,其他6例。另选取同期非败血症患者120例作为对照组,女44例,男76例,原发疾病类型:颅内感染2例,尿路感染13例,肺炎96例,胆囊炎5例,其他4例。年龄32~75岁,平均年龄(61.55±6.03)岁。两组年龄、性别、原发疾病等一般资料均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$),且本研究经我院伦理委员会审批通过。

选取标准:①纳入标准:观察组血培养均为阳性,且符合中华医学会重症医学分会制定的《中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)》中败血症相关诊断标准^[8]:感染或可疑感染序贯器官衰竭估计(Sequential organ failure assessment, SOFA)评分>

2分;血压经积极液体复苏后仍需给予升压药才可保持平均动脉压(Mean arterial pressure, MAP)>65 mmHg,血乳酸>2 mmol/L;对照组均存在局部感染,但未达到败血症诊断标准;两组临床资料完整;②排除标准:近期服用抗血小板药物、抗凝药物者;因疾病终末期、肝肾功能障碍等其他原因而致多器官功能衰竭者;存在栓塞性疾病、结缔组织病者;合并人类免疫缺陷病毒感染。两组患者及家属均知情,签订知情承诺书。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

采集2 mL清晨空腹静脉血于EDTA-2K抗凝管中混匀,采用购自日本SYSMES公司的全自动血细胞分析仪(XN-2000)分析静脉血中PLT、N%、WBC水平;采集2.7 mL清晨空腹静脉血于枸橼酸钠抗凝管中混匀,离心速度3 000 r/min,离心15 min,分离血浆,采用日本SYSMES公司的全自动凝血仪(CS-5100)检测血浆D-D水平。

1.2.2 治疗方法

观察组均给予败血症对症治疗,包括机械通气、控制血糖、维持水电解质、酸碱平衡、营养支持、早期使用抗生素、心电监护等治疗措施。

1.3 观察指标

①两组血常规参数、血浆D-D水平。②血常规参数、血浆D-D对败血症诊断价值。③不同预后患者血常规参数、血浆D-D水平。④不同预后患者SOFA、急性生理与慢性健康II(Acute physiology and chronic health II, APACHE II)评分,其中APACHE II包括急性生理学、慢性健康状况、年龄3项内容,总分为0~71分,分值越高,病情越严重,预后越差;SOFA评分包括呼吸、心血管、肝脏、凝血功能、肾脏、神经6项内容,每项0~4分,分值越高则提示病情越严重,预后越差。⑤血常规参数、血浆D-D与SOFA、APACHE II评分相关性。⑥血常规参数、血浆D-D预测预后不良价值。

1.4 统计学处理

数据处理使用SPSS 22.0软件包,计量资料符合正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, t 检验,非正态分布数据经自然对数转换呈正态分布后进行分析,计数资料以 n (%)表示, χ^2 检验,以 Pearson 相关性分析探究血常规参数、血浆 D-D 与 SOFA、APACHE II 评分相关性,受试者工作特征 (Receiver Operating Characteristic, ROC) 曲线分析评价血常规参数、血浆 D-D 对败血症诊断及预测预后价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血常规参数、血浆 D-D 水平

观察组 PLT 低于对照组, N%、WBC、血浆 D-D 高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组血常规参数、血浆 D-D 水平比较
[$n, (\bar{x} \pm s), \text{mg/L}$]

Table 1 Comparison of blood routine parameters and plasma D-D level between the two groups [$n, (\bar{x} \pm s), \text{mg/L}$]

组别	n	PLT ($\times 10^9$)	N%	WBC ($\times 10^9$)	血浆 D-D (mg/L)
观察组	118	136.57 \pm 37.29	88.13 \pm 20.56	13.29 \pm 2.34	3.82 \pm 0.76
对照组	120	172.13 \pm 40.10	67.24 \pm 24.39	11.36 \pm 2.17	2.31 \pm 0.63
t 值		7.082	7.138	6.599	16.699
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血常规参数、血浆 D-D 诊断价值

ROC 曲线分析, 血浆 D-D 诊断败血症 ROC 曲线下的面积 (Area Under Curve, AUC) 为 0.776, > PLT (0.744)、N% (0.708)、WBC (0.682)。根据以上指标单独诊断价值, 选择 D-D、PLT 进行联合诊断, AUC 为 0.790。见图 1~2。

2.3 不同预后患者血常规参数、血浆 D-D 水平

根据 28 d 预后情况将观察组分为生存者 (97

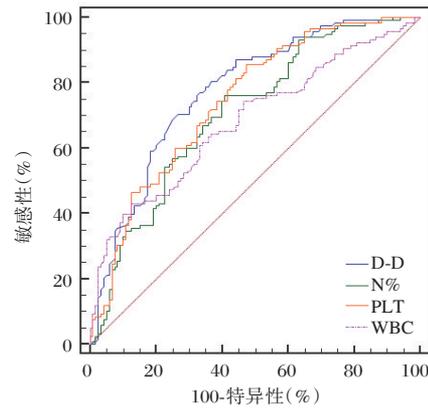


图 1 血常规参数、D-D 诊断价值 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of blood routine parameters and D-D diagnosis value

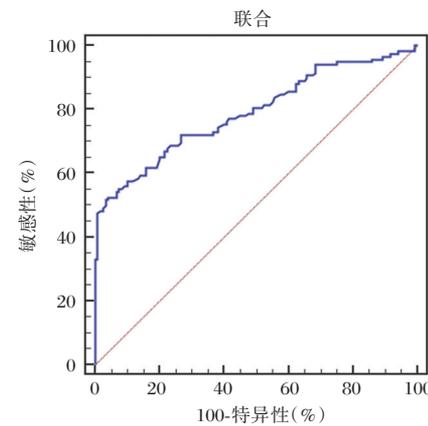


图 2 D-D、PLT 联合诊断 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of combined diagnosis of D-D and PLT

例)、死亡者 (21 例)。治疗 3 d 后生存者 PLT 高于死亡者, N%、WBC、血浆 D-D 低于死亡者 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.4 不同预后患者 SOFA、APACHE II 评分

治疗 3 d 后生存者 SOFA、APACHE II 评分低于死亡者 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 不同预后患者血常规参数、血浆 D-D 水平 [$(\bar{x} \pm s), (\text{mg/L})$]

Table 2 blood routine parameters and plasma D-D level of patients with different prognosis [$(\bar{x} \pm s), (\text{mg/L})$]

时间		n	PLT ($\times 10^9$)	N%	WBC ($\times 10^9$)	血浆 D-D
入院时	生存者	97	135.28 \pm 35.29	88.47 \pm 10.21	13.33 \pm 1.74	3.78 \pm 0.79
	死亡者	21	142.53 \pm 39.11	86.56 \pm 12.38	13.11 \pm 1.52	4.00 \pm 0.83
	t 值		0.837	0.748	0.536	1.147
	P 值		0.404	0.456	0.593	0.254
治疗 3 d 后	生存者	97	165.51 \pm 39.14	78.96 \pm 10.23	11.27 \pm 1.03	2.45 \pm 0.81
	死亡者	21	127.49 \pm 42.34	88.14 \pm 12.60	12.05 \pm 1.22	3.34 \pm 1.09
	t 值		3.978	3.573	3.043	4.276
	P 值		<0.001	<0.001	0.003	<0.001

表3 不同预后患者SOFA、APACHE II评分 ($\bar{x} \pm s$, score)

Table 3 scores of sofa and Apache II in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	n	SOFA 评分		APACHE II 评分	
		入院时	治疗3 d后	入院时	治疗3 d后
生存者	97	8.83±1.37	6.65±1.10	26.30±3.11	17.31±3.07
死亡者	21	8.65±1.44	9.31±1.68	26.12±2.97	27.19±3.16
t 值		0.541	9.060	0.242	13.303
P 值		0.590	<0.001	0.809	<0.001

2.5 血常规参数、D-D与SOFA、APACHE II评分相关性

Pearson 相关性分析显示, PLT 与 SOFA、

APACHE II 评分呈负相关, N%、WBC、血浆 D-D 与 SOFA、APACHE II 评分呈正相关 ($P < 0.05$), 见表4。

表4 血常规参数、D-D与SOFA、APACHE II评分相关性

Table 4 Correlation of blood routine parameters, D-D, sofa and Apache II scores

评分	PLT		N%		WBC		D-D	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
SOFA	-0.448	0.001	0.416	0.001	0.377	0.001	0.703	0.001
APACHE II	-0.527	0.001	0.459	0.001	0.405	0.001	0.681	0.001

2.6 血常规参数、血浆 D-D 预测预后不良价值

ROC 曲线分析, 治疗3 d后血浆 D-D 预测预后不良的 AUC 为 0.818, 大于 PLT (0.798)、N% (0.783)、WBC (0.727)。根据以上指标单独诊断价值, 选择治疗3 d后 D-D、PLT 进行联合预测, AUC 为 0.871, 见图3, 4。

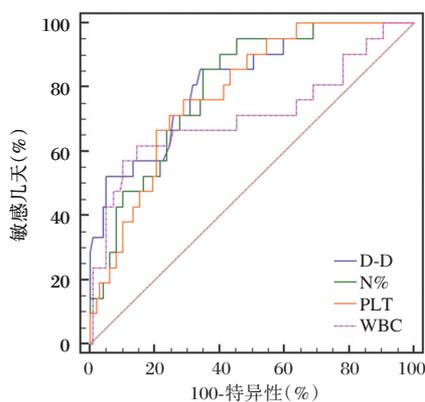


图3 血常规参数、D-D 预测预后不良 ROC 曲线
Figure 3 ROC curve of poor prognosis predicted by blood routine parameters and D-D

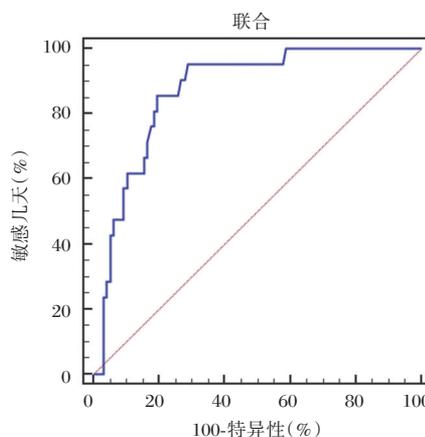


图4 D-D、PLT 联合预测预后不良 ROC 曲线
Figure 4 ROC curve of poor prognosis predicted by combination of D-D and PLT

3 讨论

数据统计显示, 我国每年发生败血症病例在 300 万左右, 全球范围内败血症发病率以每年约 1.5%~8.0% 的速度递增, 对人类生命安全造成严重威胁^[9-10]。目前, 临床治疗败血症患者仍以对症支

持治疗为主, 病死率较高。故积极探索有效、可靠生物学标志物判断疾病发生、病情变化及预后情况极为必要。

李峰等^[11]研究证实, 血常规多项指标在败血症患者中呈现明显改变, 与病情程度密切相关。本研究发现, 败血症患者 PLT 显著降低, N%、WBC 明显升高, 且三者诊断败血症 AUC 以 PLT (0.744) 最高。说明血常规参数在败血症中呈异常状态, 其中 PLT 诊断价值较为可靠。主要是由于败血症早期大量病原微生物、炎症物质进入机体, 促使血小板过度活化, 随之发生黏附、聚集、释放等

一系列改变,加快微血栓形成,进而消耗大量凝血物质及血小板,造成器官功能损伤,最终导致病情恶化^[12]。同时,多项临床研究显示,凝血指标严重异常提示败血症病情加重,早期检测凝血指标对诊断、治疗具有重要意义^[13]。败血症患者通过释放相关组织因子启动凝血机制,形成广泛微血栓,导致纤溶亢进,从而造成凝血功能紊乱,约99.7%的患者会出现血浆D-D含量不同程度升高现象^[14]。本研究中,观察组血浆D-D水平高于对照组($P < 0.05$),与上述研究相符。此外,ROC曲线分析,血浆D-D诊断败血症AUC为0.882,具有最佳诊断价值。因此,临床可早期检测血浆D-D、PLT等凝血指标,为早期诊断、合理治疗提供可靠依据,有利于预防微小血管痉挛、微血栓形成,避免病情恶化。

在预后方面,治疗3d后生存者PLT高于死亡者,N%、WBC、血浆D-D低于死亡者,说明血常规参数、血浆D-D水平与败血症预后之间具有密切关联性。目前,SOFA评分是败血症最新诊断工具,亦可反映病情程度。有文献指出,SOFA评分与败血症预后具有较好相关性,分值越高,患者死亡风险越高^[15]。APACHE II评分是临床重症科室应用最广泛的评分系统,其总分值可评价病情程度、预后及死亡风险^[16]。本研究数据亦证实SOFA、APACHE II评分可有效评估败血症患者预后情况。在此基础上进行Pearson相关性分析,结果表明,PLT与SOFA、APACHE II评分呈负相关,N%、WBC、血浆D-D与SOFA、APACHE II评分呈正相关。推测其原因,PLT进行性下降、N%、WBC、血浆D-D持续性升高通常是败血症病情不断加重、恶化的重要表现,病情缓解后各指标呈现不同程度改善。此外,张怡等^[17]报道中对败血症患者血常规进行动态监测,发现PLT是其死亡的独立预测因素。ROC曲线分析,预测预后不良的AUC血浆D-D(0.818) > PLT(0.798) > N%(0.783) > WBC(0.727),提示上述各指标均可预测预后不良结局,且血浆D-D、PLT在预测预后方面具有明显优势。故临床可于治疗期间监测血常规参数、血浆D-D水平变化情况评估疗效、预测预后结局,以及时调整治疗方案,为预后改善创造良好条件。

综上所述,血常规参数、血浆D-D在败血症中呈现异常,其中PLT、D-D具有良好诊断价值,可作为预后不良的重要预测因子,为临床干预提供参考依据。

参考文献

- [1] 樊兵,胥顺.血清脂联素、TNF- α 、CRP联合检测在脓毒症患者中的临床应用价值[J].分子诊断与治疗杂志,2015,7(6):383-386.
- [2] Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis[J]. N Engl J Med, 2017,376(23):2235-2244.
- [3] 洪峰,周大勇.降钙素原、血小板及D-二聚体检测在脓毒症预后中的价值[J].蚌埠医学院学报,2018,43(11):77-79.
- [4] Næser E, Møller H, Fredberg U, et al. Routine blood tests and probability of cancer in patients referred with non-specific serious symptoms: a cohort study[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1):817.
- [5] 刘凤玲,祝峰,许璐,等.降钙素原、C反应蛋白及血常规对77例早期细菌感染的联合检测[J].武警医学,2018,29(3):299-300.
- [6] 王力军,王镜媛,郭菲,等.NETs与脓毒症及其凝血功能障碍的研究进展[J].医学综述,2018,24(21):28-31,37.
- [7] Ryu JA, Bang OY, Lee GH. D-dimer levels and cerebral infarction in critically ill cancer patients [J]. BMC Cancer, 2017,17(1):591.
- [8] 中华医学会重症医学分会.中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[J].中华危重病急救医学,2015,27(6):401-426.
- [9] 潘永,马明远,江皓波.不同液体对脓症患者血流动力学的影响[J].重庆医学,2012,41(2):172-174.
- [10] Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update [J]. Crit Care Med, 2018, 46(6): 997-1000.
- [11] 李峰,尹会男.血常规参数在脓毒症及感染性疾病评估中的作用[J].医学综述,2017,23(12):2370-2373.
- [12] Ates S, Oksuz H, Dogu B, et al. Can mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio be used as a diagnostic marker for sepsis and systemic inflammatory response syndrome[J]. Saudi Med J, 2015,36(10):1186-1190.
- [13] 张军,杨晓明,卫晓丽.脓毒症病人凝血指标改变的临床意义[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(20):137-139.
- [14] Jaimes FA, De La Rosa GD, Valencia ML, et al. A latent class approach for sepsis diagnosis supports use of procalcitonin in the emergency room for diagnosis of severe sepsis [J]. BMC Anesthesiol, 2013,13(1):23.
- [15] 梁鹏飞,李曦,肖敏,等.脓症患者血清炎症因子与SOFA评分的关系研究[J].现代生物医学进展,2017,17(19):3719-3721.
- [16] 刘波,单南冰.ICU危重患者APACHE II评分变化率和临床预后的关系[J].内科急危重症杂志,2017,23(2):142-144.
- [17] 张怡,宗媛,武敏,等.脓症患者血常规动态变化及预后相关性分析[J].重庆医学,2018,47(35):110-112.

mFOLFOX6 化疗联合射频消融治疗原发性肝癌的疗效及机制研究

符白玉* 林怡 徐琪 张杰伟

[摘要] 目的 探讨mFOLFOX6化疗联合射频消融(RFA)治疗原发性肝癌的疗效及作用机制。
方法 随机数字表格法将94例原发性肝癌患者分为观察组与对照组,观察组行mFOLFOX6(奥沙利铂+亚叶酸钙+氟尿嘧啶)联合RFA治疗,对照组仅给予RFA治疗,评价各组近期疗效及不良反应,测定各组治疗前后血清血管内皮生长因子(VEGF)、血清碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、糖类抗原199(CA199)及甲胎蛋白(AFP)水平,且于治疗后7d通过逆转录-聚合酶链式反应法(RT-PCR)测定10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)通路相关基因PTEN、VEGF及缺氧诱导因子-1(HIF-1)mRNA表达。
结果 观察组治疗有效率(RR)、疾病控制率(DCR)分别为68.09%、91.49%,均显著高于对照组的44.68%、74.47%($P<0.05$);2组治疗后血清VEGF、bFGF、CA199、AFP水平比治疗前均显著下降($P<0.05$),观察组治疗后上述血清指标均显著低于对照组($P<0.05$);观察组治疗后VEGF、HIF-1 mRNA表达高于对照组,PTEN mRNA表达低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);均无严重RFA相关不良反应发生,观察组出现白细胞计数减少、轻度肝功能损害分别1例、3例。
结论 mFOLFOX6化疗联合RFA能协同降低bFGF、CA199等肿瘤相关血清指标水平,调节PTEN通路信号,近期疗效明确,安全较好。

[关键词] 原发性肝癌; mFOLFOX6化疗; 射频消融; 碱性成纤维细胞生长因子; PTEN通路

Curative effect and mechanism of mFOLFOX6 chemotherapy combined with radiofrequency ablation on primary liver cancer

FU Baiyu*, LIN Yi, XU Qi, ZHANG Jiewei

(Department of Gastroenterology and Hepatology, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China, 570102)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the curative effect and mechanism of mFOLFOX6 chemotherapy combined with radiofrequency ablation (RFA) on primary liver cancer. **Methods** 94 patients with primary liver cancer were divided into the observation group and the control group by random number table method. The observation group was treated with mFOLFOX6 (oxaliplatin and calcium folinate with fluorouracil) combined with RFA, while the control group was treated with RFA alone. The short-term curative effect and adverse reactions of both groups were evaluated. Levels of serum vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), carbohydrate antigen 199 (CA199) and alpha fetoprotein (AFP) of both groups were determined before and after treatment. The mRNA expression of related genes PTEN, VEGF and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) of Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) pathway which were absence in chromosome 10 was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at 7 days after treatment. **Results** The response rate (RR) and disease control rate (DCR) in the observation group (68.09% and 91.49%) were significantly

基金项目:海南省医药卫生科研项目(14A210216)

作者单位:海南医学院第一附属医院消化内科,海南,海口 570102

*通信作者:符白玉, E-mail: thbt5j@sina.com

higher than those in the control group (44.68% and 74.47%) ($P<0.05$). The levels of serum VEGF, bFGF, CA199 and AFP in both groups were significantly decreased after treatment ($P<0.05$), and the above levels in observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The mRNA expression of VEGF and HIF-1 in the observation group was higher than that in the control group, while the mRNA expression of PTEN was lower than that in the control group ($P<0.05$). There was no severe RFA related adverse reactions. In the observation group, there was a decrease in white blood count and mild liver damage in 1 case and 3 cases respectively. **Conclusion** mFOLFOX6 chemotherapy combined with RFA can synergistically decrease the levels of tumor-related serum indicators such as bFGF and CA199, and regulate the signal of PTEN pathway, with good short-term curative effect and safety.

[KEY WORDS] Primary liver cancer; mFOLFOX6 chemotherapy; Radiofrequency ablation; Basic fibroblast growth factor; PTEN pathway

原发性肝癌发病隐匿,临床确诊时多处于中晚期,大多数失去手术切除机会。射频消融(radiofrequency ablation, RFA)为临床新型微创技术之一,能局部彻底杀灭肿瘤细胞,疗效明确且患者耐受性好^[1],在各种实体肿瘤中应用较多,特别是原发性肝癌,被认为是继手术切除、介入治疗后治疗肝癌的第三大方法,且其治疗小肝癌疗效与手术切除相当^[2]。但受肿瘤大小、位置等影响,RFA治疗范围受限,可能影响原发性肝癌整体疗效。mFOLFOX6为新辅助化疗方案之一,通过调整药物剂量以达到杀灭肿瘤细胞、增强肿瘤细胞药物敏感度的目的。目前临床关于mFOLFOX6化疗+RFA治疗原发性肝癌相关报道尚少,基于此,本研究通过对照试验分析mFOLFOX6化疗联合RFA治疗原发性肝癌的疗效及对相关血清指标及10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物((phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)通路相关基因表达的影响,以为临床肝癌治疗提供新方向,改善患者预后。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

抽取本院2014年1月至2017年1月收治的原发性肝癌患者94例,随机数字表格法将其分为观察组与对照组,各47例。观察组中男30例,女17例;年龄33~67岁,平均(47.62±10.34)岁;肿瘤直径≥5 cm者33例,<5 cm者14例;其中单发37例,多发10例。对照组中男28例,女19例;年龄34~68岁,平均(48.10±10.58)岁;肿瘤直径≥5 cm者30例,<5 cm者17例;其中单发35例,多发12例。上述一般资料2组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),有可比性。本次研究经医院伦理委员会批

准,患者均知情同意。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:符合原发性肝癌诊断标准^[2];肿瘤数目不超过3个;未累及邻近器官、无远处转移;符合RFA适应证;均在本院接受治疗。排除标准:凝血机制异常;黄疸、肝外组织器官转移;肝肾原发性疾病;RFA禁忌症;相关药物过敏;相关资料不全者。

1.3 试剂与仪器

奥沙利铂购自南京制药厂有限公司,国药准字H20000686;亚叶酸钙购自江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字H20000584;氟尿嘧啶购自上海旭东海普药业有限公司,国药准字H31020593;血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、糖类抗原199(carbohydrate antigen199, CA199)及甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司,分别为a12871、JL10364、0-009644、JL23952;RNA提取试剂盒购自美国Sigma公司,货号为T9424;RT试剂盒购自美国Roche公司,货号为4655885001;RITA1500X射频消融治疗系统购自美国RITA公司,包括射频发生器、负极板、射频电极等,输出频率460 kHz±5%;ZF-6紫外分析仪购自上海市金鹏分析仪器有限公司,波长254 nm、365 nm;RDY-SP8型琼脂糖电泳仪购自上海市金鹏分析仪器有限公司,包括凝胶板、缓冲液、电泳槽等;PTEN、VEGF与缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)引物均购自美国Proteintech公司。

1.4 治疗方法

观察组行mFOLFOX6化疗联合RFA治疗,先给予RFA处理:根据患者肿瘤位置选择合适体位

及进针路线,确定穿刺点及深度,局部麻醉成功后于超声或计算机断层扫描(computerized tomography, CT)引导下将射频针穿刺到肿瘤靶位置,依据肿瘤直径及位置确定消融相关参数:温度80℃~100℃,时间10~30 min;通常消融范围为肿瘤及正常肝组织(0.5~1.0)cm。RFA治疗7 d后给予mFOLFOX6化疗:奥沙利铂85 mg/m²静滴,第1 d;亚叶酸钙400 mg/m²静滴,第1 d;氟尿嘧啶500 mg/m²静滴,第1、2 d。1个化疗周期2周,连续干预3个周期。对照组仅给予RFA治疗,操作方法同观察组。

1.5 观察指标

1.5.1 近期疗效

以实体瘤疗效评价标准^[3]为依据,完全缓解(complete remission, CR):靶病灶全部消失,肿瘤标志物水平降至正常范围,且持续至少4周;部分缓解(partial remission, PR):病灶长径总和缩小30%以上,且持续至少4周;稳定(stable disease, SD):介于PR与疾病进展(progression disease, PD)间;PD:病灶长径总和增大20%以上,或新病灶出现。有效率(response rate, RR)=CR率+PR率;疾病控制率(disease control rate, DCR)=100%-PD率。

1.5.2 血清指标测定

分别于治疗前、治疗后2周空腹抽取患者外周静脉血3 mL,以2 000 r/min速率常规离心,离心15 min,血清提取后保存待测。均通过ELISA测定2组患者血清VEGF、bFGF、CA199及AFP水平,严格按照ELISA试剂盒说明书操作。

1.5.3 PTEN通路相关基因测定

包括PTEN、VEGF与HIF-1 mRNA表达,于治疗后7 d行肿瘤组织活检,检测方法为逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR):依据RNA提取试剂盒说明书提取肝组织标本总RNA,采用紫外分析仪、琼脂糖电泳仪分别对总RNA浓度、完整性进行检测。按照RT试剂盒说明书将总RNA反转录成cDNA。

1.6 统计学处理

应用SPSS 20.0软件处理数据,计数资料以率表示,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效

观察组RR、DCR均高于对照组,差异均有统

计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 2组近期疗效比较 [$n=47, (%)$]

Table 1 Comparison of short-term curative effect between the 2 groups [$n=47, (%)$]

组别	观察组	对照组	χ^2 值	P 值
CR	1(2.13)	0(0.00)		
PR	31(65.96)	21(44.68)		
SD	11(23.40)	14(29.79)		
PD	4(8.51)	12(25.53)		
RR	68.09	44.68	5.234	0.022
DCR	91.49	74.47	4.820	0.028

2.2 血清VEGF、bFGF水平变化

与治疗前比较,2组治疗后血清VEGF、bFGF水平均明显下降($P < 0.05$);观察组治疗后血清VEGF、bFGF水平均明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 2组治疗前后血清VEGF、bFGF水平比较 [$(\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}), (n=47)$]

Table 2 Comparison of serum VEGF and bFGF levels before and after treatment in the 2 groups [$(\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}), (n=47)$]

组别	时间	VEGF	bFGF
观察组	治疗前	283.57±20.21	8.69±5.02
	治疗后	175.34±20.16 ^{ab}	3.45±4.06 ^{ab}
对照组	治疗前	284.28±21.49	8.71±4.83
	治疗后	228.32±19.34 ^a	6.06±4.31 ^a

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$;与对照组治疗后比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 血清CA199、AFP水平变化

与治疗前比较,2组治疗后血清CA199、AFP水平均明显下降差异具有统计学意义($P < 0.05$);观察组治疗后血清CA199、AFP水平均明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 2组治疗前后血清CA199、AFP水平比较 [$n=47, (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Comparison of serum CA199 and AFP levels before and after treatment in the 2 groups [$n=47, (\bar{x} \pm s)$]

组别	时间	CA199(U/L)	AFP(ng/mL)
观察组	治疗前	80.15±9.31	183.16±35.24
	治疗后	34.26±5.10 ^{ab}	73.17±9.38 ^{ab}
对照组	治疗前	79.87±10.00	182.94±37.02
	治疗后	64.13±7.89 ^a	130.25±20.11 ^a

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$;与对照组治疗后比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 肝组织 PTEN 通路相关基因表达

观察组治疗后 PTEN mRNA 表达比对照组高, 而 VEGF、HIF-1 mRNA 表达比对照组低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 2 组治疗后 PTEN、VEGF 与 HIF-1 mRNA 表达量比较 [$n=47, (\bar{x} \pm s)$]

Table 4 Comparison of PTEN, VEGF and HIF-1 mRNA expression after treatment in the 2 groups [$n=47, (\bar{x} \pm s)$]

组别	PTEN	VEGF	HIF-1
观察组	142.69±19.26	70.23±8.13	68.09±7.26
对照组	100.02±11.95	100.12±11.70	100.01±9.87
<i>t</i> 值	12.906	14.383	17.860
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.5 不良反应情况

所有患者均无严重 RFA 相关不良反应发生。观察组化疗期间发生白细胞计数减少 1 例, 轻度肝功能损害 3 例。

3 讨论

临床发现, 受肝动脉解剖、侧支循环形成等多种因素影响, 肝动脉化疗栓塞(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)治疗原发性肝癌远期疗效不理想^[4]。对此建议寻找新的手段或联合 RFA 及其他方法治疗^[5-7]。

RFA 以超声或 CT 为引导, 可直接将电极引入肿瘤内部, 经由高频电流生热让局部肿瘤细胞蛋白质变性及凝固性坏死, 最终致使肿瘤组织脱落, 达到彻底杀伤肿瘤细胞的目的^[8]。若温度不能促使肿瘤组织坏死, 肿瘤内附近血管组织因射频作用会形成反应带(约 10 mm), 对肿瘤血液供应阻断, 以诱导癌组织死亡, 减少转移风险^[9]。苗同国等^[10]研究表明 RFA 能有效改善原发性肝癌患者细胞免疫功能。由于 RFA 治疗范围有限, 为进一步提高原发性肝癌疗效, 我们采取 RFA 联合化疗方案治疗。mFOLFOX6 化疗方案包括奥沙利铂、亚叶酸钙、氟尿嘧啶成分, 其中氟尿嘧啶于细胞内转化成脱氧核苷酸, 抑制并破坏 DNA 之胸苷酸合成酶合成, 且氟尿嘧啶通过转化进入核糖核酸, 对蛋白质合成影响, 可对细胞形成各时期作用。临床发现氟尿嘧啶与奥沙利铂、亚叶酸钙合用相对单药干预效果明显, 且不显著增加化疗不良反应^[11]。

本研究结果显示相比单纯 RFA 治疗, RFA 联合 mFOLFOX6 化疗治疗近期疗效显著, 与胡十齐等^[12]研究结果相符。表明 RFA 联合化疗治疗原发性肝癌疗效更好, 这是因为 RFA 通过高频电流杀灭肿瘤细胞, 联合化疗药物能更彻底的杀灭肿瘤细胞。同时本研究发现联合治疗不显著增加化疗毒副作用, 患者可耐受。本研究还从血清分子指标及肿瘤生长信号通路方面评价原发性肝癌治疗效果及预后。血清指标指标方面, VEGF 为临床常见血管生长因子之一, 对血管内皮细胞特异性作用以参与实体瘤血管新生、侵袭及转移过程。bFGF 除了对正常组织影响外, 还参与肿瘤间质血管新生、侵袭等。张惠洁等^[13]研究发现 TACE 联合索拉非尼相比单纯 TACE 能明显降低肝癌患者血清 VEGF、bFGF 水平。本研究结果显示相比单纯 RFA 治疗, RFA 联合 mFOLFOX6 化疗能进一步降低血清 VEGF、bFGF 水平, 抑制癌细胞活性, 阻断其转移。这不但与 RFA 阻断血供, 抑制肿瘤新生血管形成有关, 而且与 mFOLFOX6 化疗药物促使肿瘤细胞死亡, 减轻肿瘤负荷, 进而促使 VEGF、bFGF 水平降低有关。为此笔者认为 VEGF、bFGF 下降可作为原发性肝癌疾病控制评价指标。AFP、CA199 为临床常见肿瘤标记物^[14], 也被认为是肿瘤复发相关指标, 其中 AFP 为原发性肝癌诊断敏感性指标。CA199 常用于消化系统肿瘤诊断及观察, 相关研究发现大部分原发性肝癌患者血清 CA199 水平升高, 认为 CA199 可与 AFP 等指标一同成为原发性肝癌疗效判断指标^[15]。本研究结果显示 RFA 联合 mFOLFOX6 化疗相比 RFA 单独治疗能进一步降低原发性肝癌患者血清 CA199、AFP 水平, 可见联合治疗可彻底杀灭肿瘤细胞, 促使血清肿瘤标记物趋于正常, 也降低了治疗后复发几率。肿瘤生长信号通路方面, PTEN 信号通路被发现参与细胞增殖、凋亡, 在肿瘤血管生成中发挥至关重要的作用^[16]。PTEN 为抑癌基因之一, 大部分肿瘤内其表达下降。VEGF、HIF-1 属于 PTEN 信号通路下游基因, 肿瘤缺氧时, HIF-1 可作为转录激活介质, 结合于 VEGF 启动相关因子, 促 VEGF 表达及 VEGF 受体转录, 进而肿瘤血管新形成^[17]。本研究显示, mFOLFOX6 化疗联合 RFA 治疗能有效增强肝癌组织 PTEN 表达, 抑制 VEGF、HIF-1 基因表达, 阻断肿瘤细胞血液供应, 进而降低血管形成相关指标 VEGF、bFGF 水平,

促肿瘤细胞凋亡及肿瘤标记物下降,提高治疗效果。受观察时间影响,本研究未分析其复发及远期存活率,有待日后通过延长观察时间进一步探究。

综上,mFOLFOX6化疗联合RFA治疗原发性肝癌近期疗效较好,且较安全,能明显降低血清bFGF、CA199水平,调节PTNE信号通路。

参考文献

- [1] 杨昆,王学文,赖钊,等.射频消融联合肝动脉化疗栓塞对HCC患者炎症、氧化应激反应及肿瘤活性因子指标影响[J].海南医学院学报,2017,23(4):531-534,538.
 - [2] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J].中华消化外科杂志,2017,16(7):635-647.
 - [3] 张百红,岳红云.实体瘤疗效评价标准简介[J].国际肿瘤学杂志,2016,43(11):845-847.
 - [4] 李春华,万华,赵年,等.肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌的预后相关因素分析[J].医学综述,2014,20(10):1876-1879.
 - [5] 蒋富强,卢伟,杨超,等.肝动脉化疗栓塞联合射频消融治疗原发性肝癌的疗效及对血清学指标的影响[J].海南医学院学报,2016,22(8):807-810.
 - [6] 黄长山,余伟,王谦,等.索拉菲尼与TACE联合治疗原发性肝癌的临床效果及对bFGF、VEGF水平的影响[J].实用癌症杂志,2017,32(6):943-945.
 - [7] 张伟,陈刚,孙密密,等.经导管肝动脉化疗栓塞联合射频消融治疗原发性肝癌患者临床疗效评价[J].实用肝脏病杂志,2017,20(4):472-476.
 - [8] Hammond JS, Franko J, Holloway SE, et al. Gemcitabine transcatheter arterial c-hemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2014, 61(133):1339-1343.
 - [9] Abe T, Amano H, Takechi H, et al. Late-onset diaphragmatic hernia after percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: a case study[J]. Surg Case Rep, 2016, 2(1):1-4.
 - [10] 苗同国,王立静,马立伟,等.射频消融治疗对原发性肝癌患者T细胞免疫功能的影响[J].中国微创外科杂志,2016,16(6):538-540,543.
 - [11] 赵善琳,韦燕,曾俊韶,等.改良FOLFOX6化疗方案联合奥曲肽对于改善晚期肝癌患者临床症状及生活质量的效果分析[J].实用癌症杂志,2017,32(6):946-949.
 - [12] 胡十齐,封元清,王路瑶.mFOLFOX6化疗联合射频消融治疗原发性肝癌的疗效观察[J].中国肿瘤临床与康复,2017,24(7):797-799.
 - [13] 张惠洁,郭卫东,屈振杰,等.TACE联合索拉菲尼治疗原发性肝癌的疗效观察及血清VEGF、bFGF水平的变化[J].现代肿瘤医学,2015,23(21):3164-3168.
 - [14] 马海梅,涂秀.AFP、CEA、CA199联合检测在原发性肝癌中的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2016,37(12):1663-1664.
 - [15] Tsuchiya K, Asahina Y, Tamaki N, et al. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early-stage hep- atocellular carcinoma[J]. Liver Transpl, 2014, 20(3):291-297.
 - [16] 吴抗源,陈卫,吴鸣宇.腹腔镜下射频消融联合静脉化疗对PTEN通路和Wnt通路介导肝癌细胞生长的影响[J].中国内镜杂志,2017,23(4):67-71.
 - [17] Huang ZJ, Zhu JJ, Yang XY, et al. NEDD4 promotes cell growth and migration via PTEN/PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3):2649-2656.
- (上接第58页)
- [11] Lin J, Zheng H, Cucchiara BL, et al. Association of Lp-PLA2-A and early recurrence of vascular events after TIA and minor stroke[J]. Neurology, 2015,85(18):1585-1591.
 - [12] Chen D, Huang X, Lu S, et al. RBP4/Lp-PLA2/Netrin-1 signaling regulation of cognitive dysfunction in diabetic nephropathy complicated with silent cerebral infarction[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2017,125(8):547-553.
 - [13] Cai R, Huang R, Han J, et al. Lipoprotein-associated Phospholipase A2 Is Associated with Risk of Mild Cognitive Impairment in Chinese Patients with Type 2 Diabetes[J]. Sci Rep, 2017,7(1):12311.
 - [14] 张钱林,鲁平,张杰文.血清脂蛋白相关磷酸酶A2与缺血性脑卒中致血管性痴呆的相关性[J].中华医学杂志,2018,98(15):1171-1175.
 - [15] Guo J, Su W, Fang J, et al. Elevated CRP at admission predicts post-stroke cognitive impairment in Han Chinese patients with intracranial arterial stenosis[J]. Neurol Res, 2018,40(4):292-296.
 - [16] 陈建媚,张旭,茅新蕾.脑小血管病患者轻度认知功能障碍与血浆同型半胱氨酸、hs-CRP水平的相关性研究[J].中华全科医学,2016,14(2):203-205.
 - [17] Adina H, Mihaela I, Rodica B, et al. Predicting functional outcome of ischemic stroke patients in Romania based on plasma CRP, sTNFR-1, D-Dimers, NGAL and NSE measured using a biochip array[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018,39(7):1228-1236.
 - [18] Xiang B, Zhong P, Fang L, et al. miR-183 inhibits microglia activation and expression of inflammatory factors in rats with cerebral ischemia reperfusion via NF-κB signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2019,18(4):2540-2546.
 - [19] 王晓溪,刘俊林.阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患者血清IL-6水平与认知功能障碍的相关性研究[J].中国医师杂志,2016,18(11):1646-1649.
 - [20] 吴学平,杨昌勤,吴学毅,等.血清同型半胱氨酸及白介素-6(IL-6)水平与缺血性卒中患者认知功能障碍的相关性及临床价值[J].中国免疫学杂志,2016,32(5):734-736.
 - [21] 陈杰华,马海燕.硬膜外阻滞麻醉术对结肠癌根治术患者认知功能及炎症蛋白表达的影响研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(4):315-319,337.

miR-219a-5p 对皮肤鳞状细胞癌细胞凋亡的影响及机制

林永丽^{1*} 杨灿¹ 李艳²

[摘要] 目的 探讨 miR-219a-5p 对皮肤鳞状细胞癌细胞凋亡的影响以及潜在的作用机制。方法 设置 miR-con 组、miR-219a-5p 组、anti-miR-con 组、anti-miR-219a-5p 组、miR-219a-5p+pcDNA 组、miR-219a-5p+pcDNA-SMC4 组、miR-con+SMC4-WT 组、miR-con+SMC4-MT 组、miR-219a-5p+SMC4-WT 组、miR-219a-5p+SMC4-MT 组,转染均用脂质体法。qRT-PCR 检测 miR-219a-5p 和 SMC4 mRNA 表达水平;Western Blot 检测蛋白表达;MTT 法检测细胞增殖活性;流式细胞术检测细胞凋亡;双荧光素酶报告基因检测实验检测荧光活性。结果 相较于人正常皮肤细胞 HaCaT,皮肤鳞状细胞癌细胞 HSC-2、Colo-16、SCL-1 中 SMC4 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,miR-219a-5p 表达水平显著降低($P<0.05$)。过表达 miR-219a-5p 可抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖,诱导细胞凋亡;促进 Caspase-3 蛋白表达,抑制 Cyclin D1 蛋白的表达;抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活。miR-219a-5p 靶向负调控 SMC4 的表达,转染 SMC4 野生型表达载体的 HSC-2 细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);而转染 SMC4 突变型表达载体的 HSC-2 细胞荧光素酶活性差异不显著。且过表达 miR-219a-5p,SMC4 表达水平显著降低;抑制 miR-219a-5p 表达,SMC4 表达水平显著升高。过表达 SMC4 能逆转 miR-219a-5p 对皮肤鳞状细胞癌细胞 HSC-2 的增殖抑制和凋亡促进的作用。结论 miR-219a-5p 可抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能与 Wnt/ β -catenin 及 SMC4 信号通路有关,将为皮肤鳞状细胞癌的预防和治疗提供新靶点。

[关键词] miR-219a-5p; SMC4; 皮肤鳞状细胞癌; 凋亡

Effect of miR-219a-5p on apoptosis of skin squamous cell carcinoma and its mechanism

LIN Yongli^{1*}, YANG Can¹, LI Yan²

(1. Department of Dermatology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000;

2. Department of Oncology, Zhengzhou Third People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of miR-219a-5p on apoptosis of cutaneous squamous cell carcinoma cells and its underlying mechanism. Methods Set miR-con group, miR-219a-5p group, anti-miR-con group, anti-miR-219a-5p group, miR-219a-5p+pcDNA group, miR-219a-5p+pcDNA-SMC4 group, miR-con+SMC4-WT group, miR-con+SMC4-MT group, miR-219a-5p+SMC4-WT group, miR-219a-5p+SMC4-MT group, transfection was performed by liposome method. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-219a-5p and SMC4 mRNA. Western Blot was used to detect protein expression. MTT assay was used to detect cell proliferation activity. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect fluorescence activity. Results Compared with human normal skin cells HaCaT, the expression of SMC4 mRNA and protein in cutaneous squamous cell carcinoma cells HSC-2, Colo-16 and SCL-1 were significantly increased, and the expression of miR-219a-5p was significantly

作者单位:1. 驻马店市中心医院皮肤科,河南,驻马店 463000

2. 郑州市第三人民医院肿瘤科,河南,郑州 450000

*通信作者:林永丽, E-mail:lyl830822@163.com

decreased ($P < 0.05$). Overexpression of miR-219a-5p can inhibit the proliferation of cutaneous squamous cell carcinoma cells, induce apoptosis, promote the expression of Caspase-3 protein, inhibit the expression of Cyclin D1 protein, and inhibit the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. miR-219a-5p targets negative regulation of SMC4 expression, the luciferase activity of HSC-2 cells transfected with SMC4 wild-type expression vector was significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in luciferase activity. When HSC-2 cells transfected with SMC4 mutant expression vector the expression of SMC4 was significantly decreased by overexpression of miR-219a-5p; and the expression of SMC4 was significantly increased by inhibition miR-219a-5p. Overexpression of SMC4 reversed the effect of miR-219a-5p on proliferation inhibition and apoptosis promotion of cutaneous squamous cell carcinoma cell line HSC-2.

Conclusion miR-219a-5p can inhibit the proliferation of cutaneous squamous cell carcinoma cells and induce apoptosis, which may be related to SMC4 and Wnt/ β -catenin signaling pathways, which will provide new targets for the prevention and treatment of cutaneous squamous cell carcinoma.

[KEY WORDS] MiR-219a-5p; SMC4; Cutaneous squamous cell carcinoma; Apoptosis

皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, CSCC)是常见的皮肤恶性肿瘤之一。目前的治疗方式还是以手术为主,放化疗为辅^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码RNA,可通过调控靶基因的表达影响细胞增殖、分化和凋亡等生命过程^[2]。据报道miRNA参与了皮肤肿瘤的发生发展,研究miRNA对在其中的作用机制,有利于皮肤肿瘤诊断和治疗^[3]。miR-219a-5p可抑制乳腺癌细胞迁移和上皮-间质转化^[4];miR-219a-5p可抑制恶性黑素瘤的生长和转移^[5]。染色质结构维持蛋白4(structural maintenance of chromosome 4, SMC4)是SMC家族成员之一,主要参与染色体高级结构动态变化,与肿瘤的发生过程有关^[6]。干扰SMC4表达可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力^[7]。Wnt信号通路是一种基础信号通路,调控细胞增殖、分化,影响细胞凋亡^[8];Wnt/ β -catenin是Wnt中重要的信号调节通路,参与多种人类肿瘤的发生发展^[9]。Wnt/ β -catenin信号通路的异常激活可导致鼻咽癌的发生发展^[10];miR-200a抑制Wnt/ β -catenin通路可以缓解肾间质纤维化^[11]。但miR-219a-5p对CSCC增殖、凋亡的影响及其机制是否与SMC4、Wnt/ β -catenin通路有关还尚未清楚,本实验旨在研究miR-219a-5p对CSCC增殖、凋亡的影响以及miR-219a-5p是否通过调控SMC4、Wnt/ β -catenin信号通路影响CSCC的增殖和凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

皮肤鳞状细胞癌细胞HSC-2、Colo-16、SCL-1和人正常皮肤细胞HaCaT均购自中国科学院上海

细胞库;胎牛血清、RPMI-1640培养基购自美国Sigma公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京Solarbio公司;MTT试剂盒、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙锭(PI)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。抗体均购自上海焯翎生物科技有限公司。FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司;Thermo FC酶标仪购自美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

皮肤鳞状细胞癌细胞HSC-2、Colo-16、SCL-1和人正常皮肤细胞HaCaT用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基于37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养,每天换液一次,待细胞融合至80%左右时,加入0.25%的胰蛋白酶进行消化传代,选取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞转染与分组

取对数生长期细胞HSC-2,用无血清培养基同步化12h后,将miR-con、miR-219a-5p、anti-miR-con和anti-miR-219a-5p分别转染至细胞HSC-2中,记为miR-con组、miR-219a-5p组、anti-miR-con组和anti-miR-219a-5p组;未进行任何处理的细胞HSC-2作为空白对照组(NC);将miR-219a-5p分别与pcDNA和pcDNA-SMC4共同转染至细胞HSC-2中,记为miR-219a-5p+pcDNA组和miR-219a-5p+pcDNA-SMC4组,转染均按照Lipofectamine™ 2000试剂盒进行操作,均转染培养48h,每组实验重复3次。

1.2.3 qRT-PCR检测miR-219a-5p和SMC4 mRNA表达水平

收集以上培养48h后的各组细胞,研磨充分

后加入 Trizol 试剂提取总 RNA,微量核酸测定仪检测 RNA 纯度和浓度。使用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,按照 TaKaRa 荧光定量试剂盒使用说明配制反应体系,以 β -actin 为内参进行 PCR 扩增,每个样品重复 3 次,循环条件为 95 °C 3 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环;72 °C 延伸 5 min。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.4 Western blot 检测 SMC4、CyclinD1、Caspase-3、Wnt2、 β -catenin 蛋白的表达

收集以上培养 48 h 后的各组细胞,加入 RIPA 裂解液裂解,4 °C,12 000 g 离心 15 min,收集蛋白上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,5 % 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h。分别加入一抗 (1:1 000),4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜;加入二抗 (1:2 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,后在暗室中曝光显影,再浸入定影,最后洗去残液晾干,将胶片用 Quantity One 凝胶分析软件处理,测定各组蛋白条带的吸光度,以目的条带和 β -actin 条带的比值作为蛋白表达水平。实验重复 3 次。

1.2.5 MTT 检测细胞活性

各组细胞培养至 48 h 时加入 20 μ L 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h;弃去多余培养基并加入 150 μ L DMSO 振荡反应 10 min,酶标仪检测 490 nm 处吸光度 (OD) 值。细胞存活率 (%) = 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 \times 100%。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

用不含 EDTA 的胰酶消化培养 48 h 后的各组细胞后离心收集, PBS 漂洗 2 次,加结合缓冲液重悬细胞。依据试剂盒说明书,先后加入 Annexin V-FITC 和 PI 避光孵育 15 min。流式细胞仪检测激发波长 488 nm 和发射波长 530 nm 处的荧光强度。实验重复 3 次。

1.2.7 荧光素酶报告基因检测实验检测 miR-219a-5p 对 SMC4 的靶向调控

TargetScan 数据库显示 SMC4 3' UTR 区域有 miR-219a-5p 结合位点。构建野生型和突变型基因靶点 SMC4 的 3' UTR 荧光素酶表达载体 (SMC4-WT 和 SMC4-MT),将 SMC4-WT 和 SMC4-MT 载体质粒分别与 miR-con 和 miR-219a-5p 共转染至 HSC-2 细胞中,具体转染步骤按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明进行实验重复 3 次。

1.2.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析。计数资料用 % 表示,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较行 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-219a-5p 和 SMC4 在皮肤鳞状细胞癌细胞株中的表达

与人正常皮肤细胞 HaCaT 相比,皮肤鳞状细胞癌细胞 HSC-2、Colo-16、SCL-1 中 miR-219a-5p 的表达水平显著降低,SMC4 mRNA 和蛋白的表达水平显著升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1,表 1)。

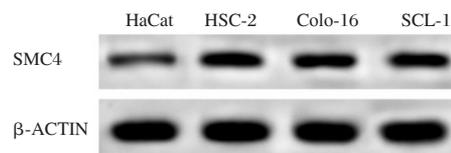


图 1 皮肤鳞状细胞癌细胞株中 SMC4 蛋白表达结果
Figure 1 Expression of SMC4 protein in skin squamous cell carcinoma cell lines

表 1 皮肤鳞状细胞癌细胞株中 miR-219a-5p 和 SMC4 的表达 [$n=9, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Expression of miR-219a-5p and SMC4 in squamous cell carcinoma cell lines [$n=9, (\bar{x} \pm s)$]

分组	miR-219a-5p	SMC4 mRNA	SMC4 protein
HaCaT	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.07
HSC-2	0.35 \pm 0.05 ^a	1.86 \pm 0.09 ^a	2.15 \pm 0.12 ^a
Colo-16	0.25 \pm 0.09 ^a	2.05 \pm 0.12 ^a	2.23 \pm 0.14 ^a
SCL-1	0.41 \pm 0.11 ^a	1.73 \pm 0.13 ^a	2.03 \pm 0.14 ^a
<i>F</i> 值	141.474	188.367	202.928
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:与 HaCaT 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.05$ vs HaCaT group。

2.2 转染 miR-219a-5p 诱导皮肤鳞状细胞癌细胞的凋亡

与 miR-con 组相比,miR-219a-5p 组皮肤鳞状细胞癌中 miR-219a-5p 的表达水平显著升高,Cyclin D1 表达水平显著降低,Caspase-3 表达水平显著升高,细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.3 miR-219a-5p 过表达对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

与 miR-con 组相比,miR-219a-5p 组皮肤鳞状细胞癌中 Wnt2、 β -catenin 表达水平显著降低,GSK3 β 表达水平显著升高 ($P < 0.05$) (表 3)。

表2 转染 miR-219a-5p 对皮肤鳞状细胞癌 HSC-2 细胞中 miR-219a-5p、CyclinD1、Caspase-3 的表达量和凋亡的影响 [n=9, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Effect of transfection of miR-219a-5p on expression of miR-219a-5p, CyclinD1, Caspase-3 and apoptosis in squamous cell carcinoma HSC-2 cells [n=9, ($\bar{x} \pm s$)]

分组	miR-219a-5p	细胞存活率	凋亡率	CyclinD1	Caspase-3
NC	1.00±0.05	99.56±4.36	4.56±1.35	1.00±0.06	1.00±0.08
miR-con	0.92±0.09	89.85±4.02	6.25±1.48	0.85±0.09	1.21±0.11
miR-219a-5p	3.35±0.34 ^a	51.86±3.25 ^a	28.46±1.94 ^a	0.35±0.12 ^a	2.97±0.37
F 值	407.703	375.174	617.640	119.828	203.357
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表3 转染 miR-130a-3p 对皮肤鳞状细胞癌 HSC-2 细胞对 Wnt/β-catenin 信号通路的影响 [n=9, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 3 Effect of transfection of miR-130a-3p on Wnt/β-catenin signaling pathway in squamous cell carcinoma HSC-2 cells [n=9, ($\bar{x} \pm s$)]

分组	miR-219a-5p	Wnt2	β-catenin	GSK3β
NC	1.00±0.03	1.00±0.05	1.00±0.07	1.00±0.04
miR-con	0.99±0.07	0.88±0.09	0.95±0.09	1.05±0.09
miR-219a-5p	5.78±0.58 ^a	0.34±0.06 ^a	0.42±0.13 ^a	2.54±0.21 ^a
F 值	602.182	235.014	93.281	384.273
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-con 组比较,^aP<0.05, ^aP<0.05 vs miR-con group。

表4 miR-con 或 miR-219a-5p 与报告质粒共转染皮肤鳞状细胞癌 HSC-2 细胞后双荧光素酶活性检测 (n=9)

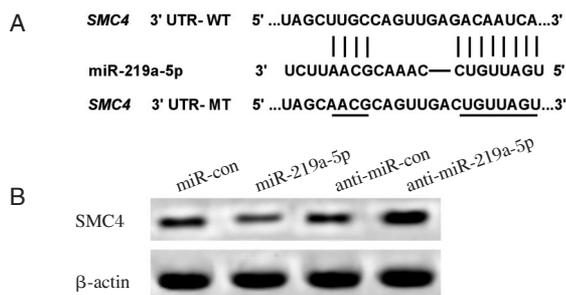
Table 4 Detection of dual luciferase activity after co-transfection of skin squamous cell carcinoma HSC-2 cells with miR-con or miR-219a-5p and reporter plasmid (n=9)

分组	WT 值	MT 值
miR-con	1.00±0.04	0.98±0.06
miR-219a-5p	0.38±0.11 ^a	0.94±0.08
t 值	15.891	1.200
P 值	0.000	0.248

注:与 miR-con 组比较,^aP<0.05, ^aP<0.05 vs miR-con group。

2.4 miR-219a-5p 靶向 SMC4 抑制 SMC4 蛋白的表达

TargetScan 数据库预测到 SMC4 与 miR-219a-5p 存在结合位点(图 4A)。荧光素酶报告基因检测实验结果(表 4)显示,相较于 miR-con 组,miR-219a-5p 组 SMC4-WT 细胞 HSC-2 的荧光素酶活性显著降低(P<0.05);而 SMC4-MT 细胞 HSC-2 的荧光素酶活性差异不显著。Western Blot 检测结果(图 4B)显示,相较于 miR-con 组,miR-219a-5p 组 HSC-2 细胞中 SMC4 表达水平显著降低;相较于 anti-miR-con 组,anti-miR-219a-5p 组 HSC-2 细胞中 SMC4 表达水平显著升高(P<0.05)。



注:A:miR-219a-5p 和 SMC4 的 3'UTR 结合位点;B:Western blot 检测皮肤鳞状细胞癌 HSC-2 细胞中 SMC4。

图4 miR-219a-5p 靶向 SMC4 的蛋白表达结果
Figure 4 miR-219a-5p targets SMC4

2.5 过表达 SMC4 逆转 miR-219a-5p 诱导皮肤鳞状细胞癌的凋亡

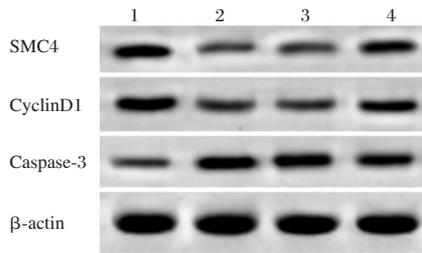
与 miR-con 组相比,miR-219a-5p 组 SMC4、Cyclin D1 表达水平显著降低,Caspase-3 表达水平显著升高,细胞存活率显著降低,细胞凋亡率显著升高(P<0.05);与 miR-219a-5p+pcDNA 组相比,miR-219a-5p+pcDNA-SMC4 组 SMC4、Cyclin D1 表达水平显著升高,Caspase-3 表达水平显著降低,细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低(P<0.05)见表 5,图 5。

表5 Western blot 检测皮肤鳞状细胞癌 HSC-2 细胞中 SMC4 的蛋白表达(n=9)

Table 5 Western blot analysis of SMC4 protein expression in skin squamous cell carcinoma HSC-2 cells (n=9)

分组	SMC4
miR-con	1.00±0.03
miR-219a-5p	0.34±0.08 ^a
anti-miR-con	0.97±0.11
anti-miR-219a-5p	2.04±0.14 ^a
F 值	457.685
P 值	0.000

注:与 miR-con 组比较,^aP<0.05;与 anti-miR-con 组比较,^aP<0.05; ^aP<0.05 vs miR-con group; ^aP<0.05 vs anti-miR-con group。



注: 1. NC; 2. miR-219a-5p; 3. miR-219a-5p+pcDNA; 4. miR-219a-5p+pcDNA-SMC4。

图5 Western blot检测皮肤鳞状细胞癌 HSC-2 细胞中 SMC4、CyclinD1 和 Caspase-3 的表达

Figure 5 Western blot analysis of SMC4, CyclinD1 and Caspase-3 expression in skin squamous cell carcinoma HSC-2 cells

3 讨论

CSCC 发病率逐年上升,且易转移,对人类生命健康威胁极大^[12]。miRNA 在多种恶性肿瘤发生发展中发挥重要作用^[13]。研究发现 miR-219-5p 可抑制非小细胞肺癌的增殖和侵袭并促进其凋亡^[14]。miR-219-5p 过表达通过上调 Cleaved Caspase-3 蛋白表达可抑制胰腺癌细胞增殖和侵袭,并诱导细胞凋亡^[15]。本研究结果表明,miR-219a-5p 在 CSCC 细胞系中均低表达,过表达 miR-219a-5p 可抑制 CSCC 细胞增殖,诱导细胞凋亡;促进 Caspase-3 表达,抑制 Cyclin D1 表达。

SMC4 属于 SMC 染色体 ATP 酶家族,SMC4 在肺腺癌组织中过表达,敲低 SMC4 显著抑制 A549 细胞的增殖和侵袭^[16]。SMC4 的过表达可激活 TGFβ/Smad 信号传导并促进胶质瘤细胞的侵袭^[17];SMC4 在肝癌细胞中上调表达,miR-219 可降低 SMC4 的表达,而 SMC4 又下调 JAK2/Stat3 的表达^[18]。本研究中 SMC4 在 CSCC 中也上调表达,且 miR-219a-5p 也调控 SMC4 的表达,过表达 SMC4 还能逆转 miR-219a-5p 对细胞 HSC-2 的增殖抑制和凋亡促进的作用。

研究发现 Wnt/β-catenin 信号通路可与 miRNA 相互作用、调控进而影响肿瘤的发生发展。有研究报道 miR-219-5p 通过靶向 LRH-1/Wnt/β-catenin 信号通路可抑制胃癌细胞的增殖,迁移和侵袭^[19];miR-219-5p 通过靶向 Twist/Wnt/β-catenin 信号通路也能抑制上皮性卵巢癌细胞的增殖,迁移和侵袭^[20];此外 Sox9 介导 Wnt/β-catenin 信号通路还影响皮肤鳞癌细胞的增殖^[21]。本实验结果表明,miR-219a-5p 过表

达会抑制 CSCC 中 Wnt2、β-catenin 和 Cyclin D1 蛋白表达,Cyclin D1 又是 Wnt/β-catenin 通路下游调控因子,即 miR-219a-5p 过表达会抑制 Wnt/β-catenin 信号通路,提示 miR-219a-5p 过表达影响 CSCC 细胞增殖、凋亡可能与 Wnt/β-catenin 信号通路有关。

综上所述,miR-219a-5p 抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能与 SMC4 及 Wnt/β-catenin 信号通路有关,将可为皮肤鳞状细胞癌的预防和治疗提供新思路和新靶点。

参考文献

- [1] 郭济菡,李青峰.皮肤鳞状细胞癌的研究进展[J].组织工程与重建外科,2018,14(2):59-62.
- [2] 张凌宇,陈昌杰,杨清玲.MiRNA-3p/5p 在肿瘤中的研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2017,9(4):284-288.
- [3] 王莹,康晓静.微RNA在皮肤肿瘤中的研究进展[J].医学综述,2016,22(19):3798-3801.
- [4] ZHUANG C, YUAN Y, SONG T, et al. miR-219a-5p inhibits breast cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition by targeting myocardin-related transcription factor A [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2017, 49 (12): 1112-1121.
- [5] LONG J, MENGGEN Q, WUREN Q, et al. MiR-219-5p Inhibits the Growth and Metastasis of Malignant Melanoma by Targeting BCL-2[J]. BioMed Res Int, 2017, 2017(9):1-7.
- [6] 周波.SMC4 在原发性肝癌中的表达及其临床意义[D].第三军医大学,2011.
- [7] 郑世杨,黄泽楠,李玺.SMC4 对人乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响及其机制研究[J].重庆医学,2018,47(16):2148-2152.
- [8] 吴学伦,王燕,李玉坤.Wnt 信号传导通路与骨重建[J].中华生物医学工程杂志,2014,20(1):75-78.
- [9] 左丽娜,张晓薇,范良生.Wnt2B 及 PAI-1 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J].中华生物医学工程杂志,2014,20(3):219-224.
- [10] 黄孝文,崔伟伟,王宝凤,等.Wnt/β-catenin 信号通路在鼻咽癌组织的异常激活[J].华中科技大学学报(医学版),2017,46(3):295-298.
- [11] 陈华,龚艺,周宝尚,等.MiR-200a 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路缓解肾间质纤维化[J].中国临床药理学与治疗学,2017,22(4):381-386.
- [12] 王鑫,范志霞,王朋敏,等.皮肤鳞状细胞癌的研究进展[J].中国临床研究,2018,31(6):850-852.
- [13] 田玲,王冲.MicroRNA 与肿瘤研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2013,5(3):200-205.
- [14] 李磊,倪正义,汤中文,等.miR-219-5p 对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡与侵袭的影响及其机制[J].临床与病理杂志,2017,37(9):1809-1815.

(下转第 92 页)

· 论 著 ·

肺癌组织中M2-PK、和ENO1的表达水平及其生存期的预测价值

范华颖^{1*} 张家艳¹ 方怡² 高阳³

【摘要】目的 研究肺癌组织中肿瘤型丙酮酸激酶(M2-PK)和烯醇化酶- α (ENO1)的表达对患者生存期的预测价值。方法 采用免疫组织化学染色法分别对182例肺癌患者和68例肺良性病变组织切片进行检测,观察M2-PK和ENO1在肺癌组织和良性病变组织中的表达情况,分析M2-PK和ENO1表达情况与肺癌临床病理特征及患者生存期的关系。结果 肺癌组织中M2-PK和ENO1阳性表达率分别为78.02%、67.58%,高于良性病变组织的32.36%和29.41%,差异具有统计学意义($P<0.001$),其表达与肺癌浸润分期($P=0.027$, $P=0.019$)、分化程度($P=0.041$, $P=0.037$)、淋巴转移($P=0.009$, $P=0.001$)、TNM分期均显著相关($P=0.012$, $P=0.015$);肺癌组织中M2-PK与ENO1表达呈正相关($r=0.769$, $P<0.05$);肺癌组织中M2-PK和ENO1的高表达与患者5年存活率分别为37.35%和32.31%,低于低表达的62.62%和52.99%,差异具有统计学意义($P<0.05$);M2-PK与ENO1共高表达患者5年存活率为28.84%,低于共低表达的59.32%($P<0.05$)。结论 肺癌组织中M2-PK和ENO1的高表达与肺癌的发生、发展及预测患者的生存期有一定的相关性,可能存在临床应用价值。

【关键词】 肿瘤型丙酮酸激酶; 烯醇化酶- α ; 肺癌; 生物标志物; 生存期预测

Expression levels of M2 - PK and ENO1 in lung cancer tissues and their predictive value on survival

FAN Huaying^{1*}, ZHANG Jiayan¹, FANG Yi², GAO Yang³

(1. Department of Respiratory Medicine, The third People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan, China, 610031; 2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041; 3. General medical center, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610072)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the expression levels of tumor M2 pyruvate kinase (M2-PK) and enolase- α (ENO1) in lung cancer tissues and their predictive value on survival time of patients. Methods T Immunohistochemical staining was used to detect 182 lung cancer patients and 68 lung benign lesion tissue sections, respectively, to observe the expression of M2-PK and ENO1 in lung cancer tissue and benign lesion tissue, and to analyze the expression of M2-PK and ENO1. The relationship between the clinicopathological characteristics of lung cancer and the survival time of patients was analyzed. Results The positive expression rates of M2-PK and ENO1 in lung cancer tissues were 78.02% and 67.58% respectively, which were higher than those in benign lesion tissues with 32.36% and 29.41% ($P<0.001$, $P<0.001$). And their expression levels were significantly correlated with lung cancer infiltration staging ($P=0.027$, $P=0.019$), differentiation degree ($P=$

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题项目(18PJ524)

作者单位:1.成都市第三人民医院呼吸内科,四川,成都 610031

2.四川大学华西医院中西医结合科,四川,成都 610041

3.四川省人民医院全科医学中心,四川,成都 610072

*通信作者:范华颖, E-mail: xianrong24786849@sina.com

0.041, $P=0.037$), lymphatic metastasis ($P=0.009$, $P=0.001$) and TNM staging ($P=0.012$, $P=0.015$). ENO1 expression was positively correlated with M2-PK expression in lung cancer tissues ($r=0.769$, $P<0.05$). The 5-year survival rates of patients with high expression of M2-PK or ENO1 in lung cancer tissues were lower than those in patients with low expression [(37.35% and 32.31%) vs (62.62% and 52.99%)] ($P<0.05$). The 5-year survival rate of patients with high expression of ENO1 and M2-PK was lower than that in patients with low expression (28.84% vs 59.32%) ($P<0.05$). **Conclusions** The high expression of M2-PK and ENO1 in lung cancer tissues is related to the occurrence, development of lung cancer, and prediction of patient survival, which may have clinical application value.

[KEY WORDS] Tumor M2 pyruvate kinase; Enolase- α ; Lung cancer; Biological markers; Prediction of survival time

近年来恶性肿瘤成为威胁人类健康的主要疾病之一,其中肺癌已成为我国发病率上升最快的恶性肿瘤,而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是患病比例最高的肺癌类型,约占肺癌患者的90%^[1-2]。随着临床检测技术的不断发展,肿瘤标志物检测已成预测肿瘤发生、诊断及肿瘤治疗效果监测的有效参考指标^[3]。肿瘤型丙酮酸激酶(tumor M2 pyruvate kinase, M2-PK)和烯醇化酶- α (enolase- α , ENO1)是细胞进行有氧糖酵解途径的关键调节酶^[4-5],其在多种肿瘤细胞中存在明显的异常高表达现象,对肿瘤的发生、发展具有重要意义^[6-7]。但关于M2-PK和ENO1在NSCLC患者肺癌组织中的表达,以及对患者生存期预测的研究少有报道。因此,本文以NSCLC患者为研究对象,探讨肺癌患者肺癌组织中M2-PK和ENO1的表达水平与患者临床病理分级及对患者生存期的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2011年1月至2013年6月间本院收治,经病理学检查确诊的182例NSCLC患者。研究组中男性108例,女性74例,患者年龄32~75岁,平均(49.18 \pm 9.67)岁,其中鳞癌128例,腺癌54例;肿瘤分期结果(Tumor Node Metastasis, TNM): I期32例; II期58例, III期52例, IV期40例;高分化87例,低分化95例;其中淋巴结发生转移患者87例;浸润深度T1和T2共97例, T3和T4共85例。对照组选择68例同期医院就诊的肺良性病变患者,男性35例,女性33例,患者年龄31~74岁,平均(48.68 \pm 9.52)岁,疾病类型为慢性支气管炎32例,支气管扩张22例,肺结核14例。2组入选患者年龄、性别等信息资料差异无统计学意义($P>0.05$),

具有可比性。

1.2 纳入排除标准

肺癌患者纳入标准:患者经病理学诊断标准^[8]确诊为NSCLC患者;入院治疗前未接受放疗、化疗、手术和靶向药物等治疗;术前均存在可测量病灶,临床资料完整。排除标准:患者存在肿瘤转移或患有其他肿瘤;合并有其他器官功能异常及严重心血管疾病;患有先天性肺功能异常或畸形患者。肺良性病变纳入标准:经医院诊断确诊为慢性支气管炎、支气管扩张、肺结核的患者;无其他重大疾病患者;近3个月未发生严重感染患者。排除标准:患者存在其他肿瘤;肺部存在严重感染或损伤。所有入选对象均签署知情同意书,自愿参与本课题研究。

1.2 材料与方法

1.2.1 试剂及仪器

兔抗人ENO1抗体购自美国Proteintech Group公司,货号:55237-1-AP;兔抗人M2-PK抗体购自中国北京博奥森有限公司,货号:bs-0101R;图像采集成像系统(chemiDocTM)及图像分析系统(Quantity One 1-D分析软件)购自美国Bio-Rad Laboratories公司。

1.2.2 免疫组化分析

将患者进行病理学诊断时获得的病理组织由石蜡包埋后连续切片,固定于载玻片上,50 $^{\circ}$ C烘箱中烘1 h后,二甲苯、100%乙醇、95%乙醇、80%乙醇及75%乙醇依次进行水化,蒸馏水洗涤3次,然后置于柠檬酸钠溶液中加热2次,每次8 min, PBS洗涤3次,3% H₂O₂溶液中浸10 min, PBS洗涤3次后,滴加ENO1抗体和M2-PK抗体稀释液,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗涤3次后用羊抗兔二抗室温孵育1 h, PBS洗涤3次,免疫组化染色,苏木精复染,0.1% HCl分化,蓝化,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.2.3 数据对比分析

免疫组化结果评估由两名专业病理人员采用双盲法进行判定,每张组织切片高倍镜下随机选取5个视野区,每个视野区计100个肿瘤细胞,根据M2-PK蛋白和ENO1蛋白定位结果,进行结果分析,结果一致则记录结果;不一致则由2人相同意见或第3位更加权威的医师确定。其中M2-PK定位与胞浆或胞核,ENO1定位与胞浆或胞膜。阳性结果判读采用免疫组化半定量分析,阳性细胞比例评定>5%患者检测为阳性^[8,9]。

1.2.4 随访及信息统计

所有患者以门诊、住院复查的方式由主治医师定期随访,随访内容包括患者治疗方案、复查信息、肺部电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检测、生存信息统计等。时间起始于患者入院治疗,随访5年,统计患者5年内的存活情况。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计学软件进行分析,对于服从正态分布的连续型资料,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA);计数资料以率(%)表示,组间比较应用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

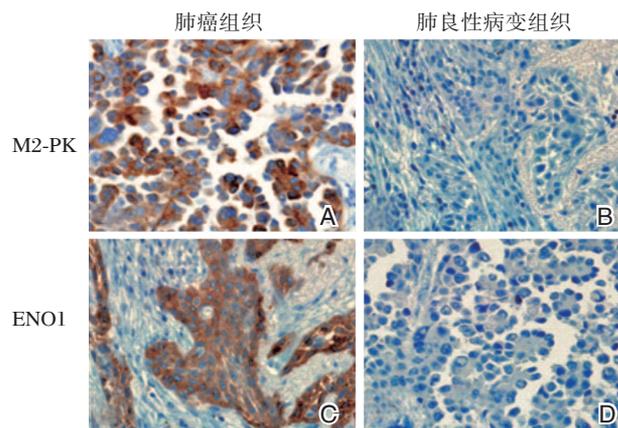
2 结果

2.1 肺组织中M2-PK和ENO1的表达

M2-PK在肺良性病变组织中的阳性表达22例,阳性率为32.36%;在肺癌组织中阳性表达142例,阳性率为78.02%,显著高于肺良性病变患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。ENO1在肺良性病变组织中的阳性表达20例,阳性率为29.41%;在肺癌组织中阳性表达123例,阳性率为67.58%,显著高于肺良性病变患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1,图1。

表1 M2-PK、ENO1在肺良性病变组织和肺癌组织中的表达 [n(%)]

组别	肺癌组织		肺良性病变组织		χ^2 值	P值
	n	阳性	n	阳性		
M2-PK	182	142(78.02)	68	22(32.35)	25.752	0.000
ENO1	182	123(67.58)	68	20(29.41)	22.469	0.000



注:A. M2-PK在肺癌组织中的表达; B. M2-PK在肺良性病变组织中的表达; C. ENO1在肺癌组织中的表达; D. ENO1在肺良性病变组织中的表达。

图1 M2-PK、ENO1在肺组织中的免疫组化分析(×40)

Figure 1 Immunohistochemical analysis of and in lung tissues (×40)

2.2 肺癌组织中M2-PK、ENO1表达与临床病理特征的关系

分析患者的临床病理特征与肺癌组织中ENO1、M2-PK表达,结果显示,肺癌组织中ENO1、M2-PK表达与肺癌的分化程度、浸润、TNM分期、淋巴结转移差异有统计学意义($P < 0.05$),与患者的年龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 M2-PK、ENO1表达与肺癌临床病理特征的关系 [n(%)]

Table 2 Relationship between expression of M2-PK and ENO1 and clinicopathological features of lung cancer [n(%)]

组别	n	M2-PK	P值	ENO1	P值
年龄			0.572		0.497
≥55岁	106	83(78.30)		72(67.92)	
<55岁	76	59(77.63)		51(67.10)	
性别			0.564		0.317
男	108	84(77.78)		74(68.52)	
女	74	58(78.37)		49(66.22)	
分化等级			0.041		0.037
低	112	78(69.64)		67(59.82)	
高	70	64(91.42)		63(90.00)	
浸润分期			0.027		0.019
T1+T2	97	65(67.01)		49(50.52)	
T3+T4	85	77(90.58)		74(87.06)	
淋巴结转移			0.009		0.011
是	87	82(94.25)		79(90.80)	
否	95	40(42.11)		44(46.31)	
TNM分期			0.012		0.015
T1~T2	90	35(38.89)		42(46.67)	
T3~T4	92	87(94.57)		81(88.04)	

2.3 肺癌组织中 M2-PK、ENO1 表达相关性

肺癌组织中共 111 例 M2-PK、ENO1 共阳性表达, 28 例 M2-PK、ENO1 共阴性表达, M2-PK 单阳性 31 例, ENO1 单阳性 12 例, 相关性分析结果显示 M2-PK 与 ENO1 表达呈正相关($r=0.769, P<0.05$)。

2.4 肺癌组织中 M2-PK 和 ENO1 高表达与患者生存期的关系

阳性细胞比例达 50% 以上为高表达, 不表达或低于 50% 为低表达, 分析 2 种蛋白高、低表达对患者 5 年生存的影响, 结果显示, M2-PK 阳性细胞比例 $\geq 50\%$ 共 83 例, 患者 5 年存活 31 例, 存活率为 37.35%; M2-PK 低表达 99 例, 患者 5 年存活 62 例, 存活率为 62.62%, 显著高于 M2-PK 高表达患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。ENO1 阳性细胞比例 $\geq 50\%$ 共 65 例, 患者 5 年存活 21 例, 存活率为 32.31%; ENO1 低表达 117 例, 患者 5 年存活 62 例, 存活率为 52.99%, 显著高于 ENO1 高表达患者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 肺癌组织中 M2-PK、ENO1 高表达与患者生存期的关系

选择 ENO1 和 M2-PK 共表达的 111 例患者为研究对线, 2 种蛋白阳性细胞比例均在 50% 以上为共高表达, 均低于 50% 为低表达, 分析 2 种蛋白高表达对患者 5 年生存率的影响, 结果显示, M2-PK 和 ENO1 共高表达患者 52 例, 5 年存活患者 15 例, 存活率为 28.84%; 共低表达患者 59 例, 5 年存活患者 35 例, 存活率为 59.32%, 显著高于 M2-PK 和 ENO1 共高表达患者, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 2。

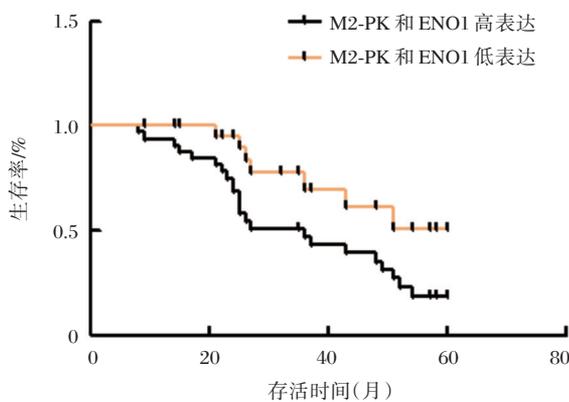


图 2 肺癌组织中 M2-PK、ENO1 高表达与患者 5 生存期的关系

Figure 2 Relationship between high expression of M2-PK and ENO1 and 5-year survival time in lung cancer tissues

3 讨论

M2-PK 是丙酮酸激酶的一种同工酶, 对三磷酸腺苷的合成起着重要作用, 当 M2-PK 以二聚体存在时主要调节机体碳水化合物的合成转态; 以四聚体形式存在时调节机体糖酵解的产能状态^[9]。在肿瘤的发生发展过程中, 初始组织特异性的丙酮酸激酶会逐渐被 M2 代替, 并以二聚体形式存在于肿瘤细胞中, 促使和增强肿瘤糖酵解途径, 在肿瘤细胞增殖与代谢过程中发挥重要作用^[10-11]。研究发现正常人血清中 M2-PK 水平很低, 而在肿瘤患者血清中显著升高, 临床显示其在肺癌、乳腺癌、宫颈癌等实体肿瘤的诊断中具有重要作用^[12-13]。在黑色素瘤的研究发现, M2-PK 水平不仅与患者的临床分期有关, 同时而还能在预测患者生存预后发挥重要价值^[14]。

ENO1 是一种高度保守磷酸烯醇化酶, 该蛋白在胞浆中的表达主要作用是参与细胞的糖酵解途径发挥催化作用, 促进磷酸化烯醇式丙酮酸的形成^[15], 参与体内多种生物学活动, 如低氧耐受及炎症反应。此外许多报道表明, ENO1 与肿瘤的发生发展密切相关, 如乳腺癌、肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤中存在异常高表达现象^[16]。Yu 等^[17]人的研究发现 ENO1 可以作为早期肺癌诊断标志物。在非小细胞肺癌中, ENO1 能够通过抑制 ERK 的磷酸化抑制肺癌细胞的上皮间质转化^[18]。在对前列腺癌的研究发现, ENO1 能够刺激血纤维蛋白溶酶体受体的活化促进癌细胞的迁移^[17], 而肿瘤的侵袭和签署是患者治疗和预后的重要因素^[19]。

由于肿瘤细胞在快速增殖过程中的能量代谢主要依赖于葡萄糖的糖酵解途径, M2-PK 和 ENO1 作为糖酵解途径的关键酶, 其表达水平与肿瘤细胞的增殖密切相关。此外, 在实体肿瘤组织中, 由于肿瘤细胞的快速增殖, 往往会造成组织处于低氧状态促进缺氧诱导因子的表达, 进而增强细胞的糖酵解途径^[20-21], 在对 M2-PK、ENO1 的基因研究发现, 两者的启动区均存在缺氧反应原件; 同时缺氧诱导因子的表达能够促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 而 ENO1 在细胞表面的高表达能够增强细胞的侵袭能力。本文对 NSCLC 患者肺癌组织中表达水平分析显示, M2-PK、ENO1 肺癌组织中阳性率显著高于肺良性病变患者($P<0.05$); 与 Yu 等^[22]和 Kobierzycki 等^[23]的关于 M2-PK、ENO1 在 NSCLC 患者中的表达结果一致。

研究证实由于 M2-PK 和 ENO1 蛋白能够通过肿瘤细胞的坏死与细胞更新,分泌到细胞外,其表达水平只与肿瘤的病征有关。本文对 2 种蛋白的表达相关性分析发现与 Gu 等^[23]的研究结果一致,这可能与两者均为糖酵解途径中的关键酶有关。同时本文也首次研究患者治疗前 M2-PK 和 ENO1 共表达水平与患者 5 年存活率的关系,结果显示 M2-PK 和 ENO1 高表达患者的 5 年存活率均显著低于 M2-PK 和 ENO1 低表达患者($P < 0.05$),其原因可能是 M2-PK 和 ENO1 高表达水平预示着肿瘤细胞处于较高的增殖活性,患者的肿瘤分化差、晚期患者比例高、远处转移风险高,治疗难度大,不利于患者的预后和长期生存^[25]。

综上所述,肺癌组织中 M2-PK、ENO1 的高水平表达与肺癌的发生、发展及预测患者的生存期有一定指导意义。

参考文献

- [1] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2016, 893(9):1-19.
- [2] 臧瑜,于虹,李妍,等. 肺癌患者症状群的调查研究[J]. *中华护理杂志*, 2016, 51(3):316-320.
- [3] 倪军,郭子健,张力,等. 单独与联合检测四项肺癌血清肿瘤标志物在肺癌诊断中的价值[J]. *中华内科杂志*, 2016, 55(1):25-30.
- [4] Haramipapp H, Pongor LS, Munkácsy G, et al. TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41):67183-67195.
- [5] Prakasam G, Iqbal MA, Bamezai R, et al. Posttranslational modifications of pyruvate kinase M2: tweaks that benefit cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2018, 8(22):1-12.
- [6] 宋烨琼,董倩,梁迎春,等. 人 α -磷酸丙酮酸水合酶原核表达载体的构建及蛋白纯化[J]. *军事医学*, 2016, 40(5):384-386.
- [7] 曾龙飞,田刚,姚健. Logistic 回归和 PLS-DA 模型评价肿瘤标志物对结肠癌的诊断价值[J]. *重庆医学*, 2017, 46(8):1038-1041.
- [8] 汪硕敏,顾康生. 血清癌胚抗原、铁蛋白和糖基抗原 199 在非小细胞肺癌诊断中的临床价值[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(9):126-129.
- [9] Shan S, Shi J, Yang P, et al. Apigenin restrains colon cancer cell proliferation via targeted blocking of pyruvate kinase M2-dependent glycolysis [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2017, 65(37):8136-8144.
- [10] Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71(14):2577-2604.
- [11] Yin L, Wang X, Luo C, et al. The Value of Expression of M2-PK and VEGF in Patients with Advanced Gastric Cancer [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013, 67(3):1033-1039.
- [12] Li YG, Zhang N. Clinical significance of serum tumour M2-PK and CA19-9 detection in the diagnosis of cholangiocarcinoma [J]. *Digestive & Liver Disease Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology & the Italian Association for the Study of the Liver*, 2009, 41(8):605-608.
- [13] Kaura B, Bagga R, Patel FD. Evaluation of the pyruvate kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma [J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2004, 30(3):193-196.
- [14] Ugurel S, Bell N, Sucker A, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma [J]. *International Journal of Cancer*, 2005, 117(5):825-830.
- [15] 卢军峰,解乃昌,马艳红,等. 甲状腺乳头状癌组织中 BRAF 基因突变及 CyclinD1 蛋白表达的临床意义[J]. *山东医药*, 2016, 31(4):36-37.
- [16] Tu SH, Chang CC, Chen CS, et al. Increased expression of enolase alpha in human breast cancer confers tamoxifen resistance in human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2010, 121(3):539-553.
- [17] Yu L, Shi J, Cheng S, et al. Estrogen promotes prostate cancer cell migration via paracrine release of ENO1 from stromal cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2012, 26(9):1521-1530.
- [18] Zhou X, Zhang Y, Han N, et al. α -Enolase (ENO1) inhibits epithelial-mesenchymal transition in the A549 cell line by suppressing ERK1/2 phosphorylation [J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2013, 16(5):221-226.
- [19] Wang X, Fan J, Yu F, et al. Decreased MALL expression negatively impacts colorectal cancer patient survival [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16):22911-22927.
- [20] Peng F, Wang JH, Fan WJ, et al. Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia [J]. *Oncogene*, 2017, 37(8):1062-1074.
- [21] Zhu G, Peng F, Gong W, et al. Hypoxia promotes migration/invasion and glycolysis in head and neck squamous cell carcinoma via an HIF-1 α -MTDH loop [J]. *Oncology Reports*, 2017, 38(5):2893-2900.
- [22] Yu L, Shen J, Mannoor K, et al. Identification of ENO1 as a potential sputum biomarker for early-stage lung cancer by shotgun proteomics [J]. *Clinical Lung Cancer*, 2014, 15(5):372-378.
- [23] Kobierzycki C, Pula B, Werynska B, et al. The lack of evidence for correlation of pyruvate kinase M2 expression with tumor grade in non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Research*, 2014, 34(7):3811-3817.
- [24] Gu Z, Xia J, Xu H, et al. NEK2 promotes aerobic glycolysis in multiple myeloma through regulating splicing of pyruvate kinase [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2017, 10(1):17-21.
- [25] Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, et al. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma [J]. *Haematologica*, 2012, 97(7):1080-1084.

膜联蛋白 A1、sd-LDL、Angptl2 与冠心病及对冠状动脉粥样硬化病变程度的诊断价值

吴威^{1*} 衣欣¹ 蒙奕兵² 张雪¹

[摘要] 目的 探讨膜联蛋白 A1 (AnxA1)、小而密低密度脂蛋白 (sd-LDL)、血管生成素样蛋白 2 (Angptl2) 与冠心病 (CHD) 病变程度的关系及对冠状动脉粥样硬化严重病变的诊断价值。方法 选取本院 2017 年 8 月至 2019 年 8 月 102 例 CHD 患者作为研究对象。比较不同临床特征患者血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 水平, Pearson 相关性分析各血清因子与 Gensini 评分、冠状动脉病变支数相关性, 应用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 对冠状动脉粥样硬化严重病变的诊断价值。结果 不同疾病类型、Gensini 评分、冠状动脉病变支数患者血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 水平存在显著差异, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 与 Gensini 评分呈正相关 ($P < 0.05$); 血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 与冠状动脉病变支数呈正相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 血清 AnxA1 诊断冠状动脉粥样硬化严重病变的 Roc 曲线下的面积 (AUC) 值为 0.791, 大于血清 sd-LDL、Angptl2; 血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 联合诊断冠状动脉粥样硬化严重病变的 AUC 值为 0.895。结论 CHD 患者存在血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 异常表达情况, 且与冠脉病变严重程度关系密切, 3 者联合检测在 CHD 患者冠脉严重病变诊断中价值最高, 可为临床诊断、完善治疗方案提供数据参考。

[关键词] 膜联蛋白 A1; 小而密低密度脂蛋白; 血管生成素样蛋白 2; 冠心病; 冠状动脉狭窄; 受试者工作特征曲线

The relationship between annexin A1, sd-LDL, Angptl2 and the severity of coronary heart disease and its diagnostic value for severe coronary atherosclerosis

WU Wei^{1*}, YI Xin¹, MENG Yibing², ZHANG Xue¹

(1. Department of cardiovascular medicine, Beijing Huimin hospital, Beijing, China, 100054; 2. Department of endocrinology, Nanyuan Hospital, Fengtai district, Beijing, China, 100076)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between annexin A1 (AnxA1), small and dense low-density lipoprotein (sd-LDL), angiopoietin-like protein 2 (Angptl2), and the degree of coronary heart disease (CHD) lesions, and to coronary atherosclerosis diagnostic value of severe sclerosis. Methods A total of 102 patients with CHD in our hospital from August 2017 to August 2019 were selected as the research subjects. Compare the serum levels of AnxA1, sd-LDL, and Angptl2 in patients with different clinical characteristics, and analyze the correlation between each serum factor and the Gensini score and the number of coronary lesions by Pearson correlation analysis, the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic value of serum AnxA1, sd-LDL, and Angptl2 for severe coronary atherosclerosis. Results The serum levels of AnxA1, sd-LDL, and Angptl2 in patients with different

基金项目:首都医学发展科研计划项目(1001690245)

作者单位:1.北京市回民医院心血管内科,北京 100054

2.北京市丰台区南苑医院内分泌科,北京 100076

*通信作者:吴威, E-mail:wj486101@163.com

disease types, Gensini scores, and number of coronary artery lesions were significantly different ($P<0.05$). Serum AnxA1, sd-LDL, and Angptl2 were positively correlated with Gensini scores ($P<0.05$). Serum AnxA1, sd-LDL, and Angptl2 were positively correlated with the number of coronary artery lesions, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The AUC value of serum AnxA1 in the diagnosis of severe coronary atherosclerosis was 0.791, which was greater than that of serum sd-LDL and Angptl2. The AUC value of serum AnxA1, sd-LDL and Angptl2 in the diagnosis of severe coronary atherosclerosis was 0.895. **Conclusion** CHD patients have abnormal expressions of serum AnxA1, sd-LDL, and Angptl2, and are closely related to the severity of coronary lesions. The combined detection of the three has the highest value in the diagnosis of severe coronary lesions in CHD patients, which can provide clinical diagnosis and improve the treatment plan data reference.

[KEY WORDS] Annexin A1; Small and dense low-density lipoprotein; Angiogenin-like protein 2; Coronary heart disease; Coronary artery stenosis; Receiver operating characteristic curve

冠心病(Coronary heart disease, CHD)作为日益增长的公共健康问题,已发展成严重威胁中老年群体健康的首要病因^[1]。临床加强CHD病情评估,并针对性治疗是改善预后、降低住院率、病死率的关键环节。低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein, LDL)表达异常已成为医学界公认的CHD独立危险因素^[2]。近年随血脂蛋白研究深入发现,不同形态LDL诱发动脉粥样硬化能力存在差异性,其中以小而密低密度脂蛋白(sd-LDL)与CHD发病发展关系最为密切^[3];此外,基础研究显示,血清膜联蛋白A1(AnxA1)与冠状动脉粥样硬化形成存在一定关联性,可作为评价斑块性质的特异性指标^[4];血管生成素样蛋白2(Angptl2)是一种内脏脂肪细胞分泌蛋白,与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、炎症反应等病理生理有关,但与CHD患者冠脉病变严重程度的报道鲜见^[5]。基于此,本研究通过分析血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2与CHD患者冠状动脉狭窄演化的关联性,旨在为临床完善诊断、治疗方案提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2017年8月至2019年8月102例CHD患者作为研究对象。符合CHD诊断标准^[6];查体、超声心动图诊断确诊;首次发病,既往无相关治疗史;入组前3个月内未服用影响血脂药物;患者、家属知情研究签署同意书。排除标准:伴其他心血管疾病者;合并严重感染性疾病者;存在恶性肿瘤疾病者;伴血液系统疾病者。本研究经医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2水平检测。

①样本采集:晨空腹坐位以非抗凝真空管取肘静脉血2 mL,静置10 min,离心9 min(半径8 cm,转速3 500 r/min),分离血清保存至液氮待测。②检测:取血清室温解冻(避免反复融冻)用全自动生化分析系统(西门子,型号:Adiva 2400)以过氧化酶法测sd-LDL;以酶联免疫吸附法测AnxA1、Angptl2水平。试剂、试剂盒均为上海纪宁实业有限公司提供。相同资深专科医师参考试剂盒说明书规范完成。

1.3 观察指标

①不同临床特征患者血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2水平。②血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2与Gensini评分相关性。Gensini评分标准^[7]:狭窄<25%计1分;25%~50%计2分;51%~75%计4分;76%~90%计8分;91%~99%计16分;100%计32分。不同病变节段冠状动脉×对应系数:左主干病变×5。左前降支近段×2.5、中段×1.5、远段×1,左回旋支近段×2.5、远段、后降支×1,后侧支×0.5,第一对角支×1,第二对角支×0.5,右冠进/中/远段×1。各分支积分相加为总分。③血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2与冠状动脉病变支数相关性。④血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2对冠状动脉粥样硬化严重病变的诊断价值。⑤血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2联合对冠状动脉粥样硬化严重病变的诊断价值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计分析软件,计数资料以%表示,两组间比较采用 χ^2 检验;相关性以Pearson分析;符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 t 检验;应用受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线分析血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2对冠状动脉粥样硬化严重病变的诊断价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同临床特征患者血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 水平

不同年龄、性别患者血清 AnxA1、sd-LDL、

Angptl2 水平相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 不同疾病类型、Gensini 评分、冠状动脉病变支数患者血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 水平存在显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同临床特征患者血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of serum ANXA1, SD LDL and Angptl2 levels in patients with different clinical characteristics [$n, (\bar{x} \pm s)$]

临床病理特征	<i>n</i>	AnxA1 ($\mu\text{g/L}$)	<i>t/F/P</i> 值	sd-LDL (mmol/L)	<i>t/F/P</i> 值	Angptl2 (ng/mL)	<i>t/F/P</i> 值
年龄(岁)							0.515/0.608
<60	55	1.55±0.40	-1.044/0.299	1.27±0.30	-0.351/0.726	2.30±0.42	0.419/0.676
≥60	47	1.59±0.38		1.29±0.27		2.21±0.45	
性别							
男	53	1.56±0.33	-0.293/0.770	1.26±0.28	-0.759/0.450	2.28±0.50	-108.006/<0.001
女	49	1.58±0.36		1.30±0.25		2.24±0.46	
疾病类型(例)							
稳定型心绞痛	46	1.17±0.20	-63.411/<0.001	1.02±0.16	-53.079/<0.001	1.41±0.37	-69.042/<0.001
不稳定型心绞痛	22	1.49±0.35		1.27±0.20		2.53±0.64	
急性心肌梗死	34	2.16±0.57		1.64±0.39		3.24±0.70	
Gensini 评分(分)							
0~20	38	1.20±0.22	-41.118/<0.001	1.04±0.12	-68.751/<0.001	1.42±0.40	-125.570/<0.001
21~60	34	1.54±0.38		1.33±0.18		2.38±0.61	
>60	30	2.07±0.55		1.52±0.21		3.19±0.83	
冠状动脉病变支数(支)							
1	57	1.31±0.24	-76.518/<0.001	1.08±0.17	-78.045/<0.001	1.57±0.39	
2	29	1.62±0.32		1.35±0.24		2.76±0.57	
≥3	16	2.41±0.50		1.87±0.35		3.81±0.86	

2.2 血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 与 Gensini 评分相关性

Pearson 相关系数分析血清 AnxA1 ($r=0.723$)、

sd-LDL ($r=0.784$)、Angptl2 ($r=0.644$) 与 Gensini 评分呈正相关, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 图 1~3。

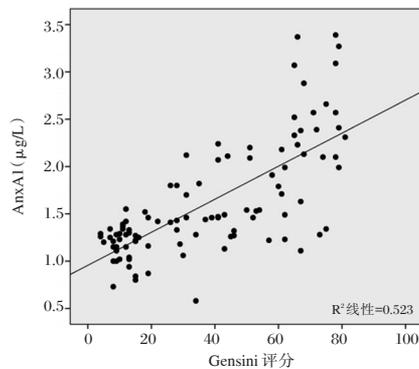


图 1 血清 AnxA1 与 Gensini 评分相关性

Figure 1 correlation between serum ANXA1 and Gensini score

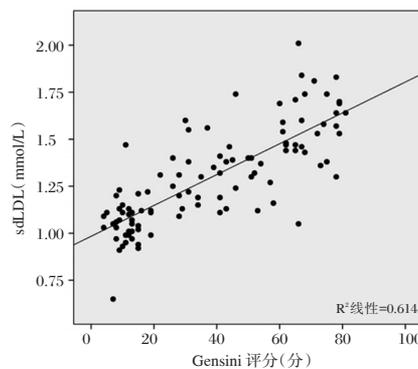


图 2 血清 sd-LDL 与 Gensini 评分相关性

Figure 2 correlation between serum SD LDL and Gensini score

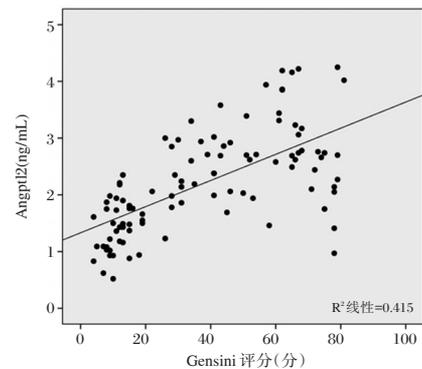


图 3 血清 Angptl2 与 Gensini 评分相关性

Figure 3 correlation between serum Angptl2 and Gensini score

2.3 血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 与冠状动脉病变支数相关性

Pearson 相关系数分析血清 AnxA1 ($r=0.787$)、

sd-LDL ($r=0.780$)、Angptl2 ($r=0.855$) 与冠状动脉病变支数呈正相关, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 图 4~6。

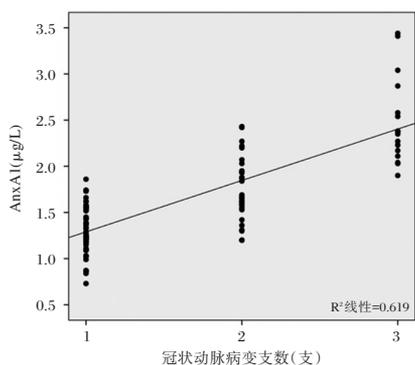


图 4 血清 AnxA1 与冠脉病变支数相关性

Figure 4 correlation between serum ANXA1 and number of coronary lesions

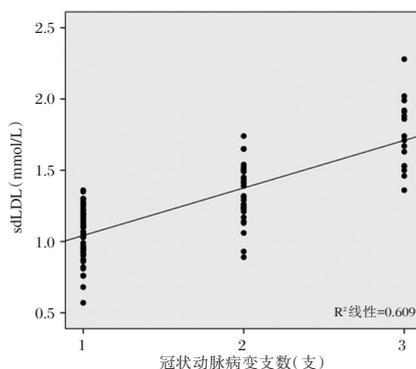


图 5 血清 sd-LDL 与冠脉病变支数相关性

Figure 5 correlation between serum SD LDL and number of coronary lesions

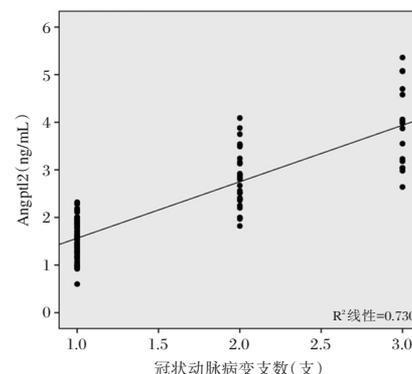


图 6 血清 Angptl2 与冠脉病变支数相关性

Figure 6 correlation between serum Angptl2 and number of coronary lesions

2.4 血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 对冠状动脉粥样硬化严重病变的诊断价值

将 Gensini 评分 >60 分定义为冠状动脉粥样硬化严重病变。ROC 曲线分析显示, 血清 AnxA1 诊

断冠状动脉粥样硬化严重病变的 ROC 曲线下的面积 (Area Under Curve, AUC) 值为 0.791, 大于血清 sd-LDL、Angptl2, 当截断值 >1.61 µg/L 时, 敏感度为 84.72%, 特异度为 66.67%。见表 4。

表 4 ROC 分析结果 (%)

Table 4 ROC analysis results (%)

指标	AUC	95%CI	Z 统计	P 值	截断值	截断值敏感度	截断值特异度
AnxA1	0.791	0.699~0.865	5.391	<0.001	>1.61 µg/L	84.72	66.67
sd-LDL	0.710	0.612~0.796	3.262	0.001	>1.33 mmol/L	86.11	56.67
Angptl2	0.723	0.626~0.807	3.961	<0.001	>2.87 ng/mL	76.39	63.33

2.5 三者联合诊断

血清 AnxA1、sd-LDL、Angptl2 联合诊断冠状动脉粥样硬化严重病变 AUC 为 0.895, 95% CI 为 0.819~0.947, 诊断敏感度为 79.17%, 特异度为 90.00%, 见图 7。

3 讨论

sd-LDL 是 LDL 主要类型之一, 有学者对 sd-LDL 与 CHD 间关系进行研究, B 型分布的血清 LDL 是独立于年龄、体质量、性别之外的独立危险因素, 可使 CHD 患者继发心肌梗死风险提高 3 倍^[9]。学者孙爱梅等^[10]研究表明, 血清 LDL 在不稳定型心绞痛、在急性心肌梗死患者中表达异常升高, 经多因素回归分析其表达与高血压史、腰臀比有关, 但校正上述因素后, 与健康群体对比, 血

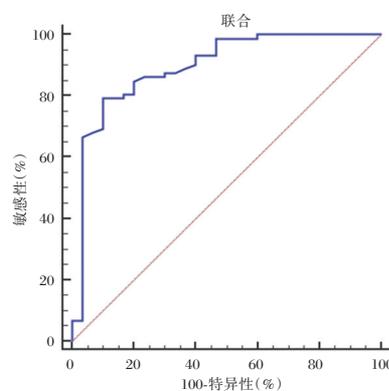


图 7 三者联合诊断 ROC 曲线

Figure 7 ROC curve of 3 combined diagnosis

清 sd-LDL 表达仍与急性冠状动脉综合征存在相关性。本研究结果显示, 不同疾病类型、Gensini 评分、冠状动脉病变支数患者血清 AnxA1 存在显著

差异($P<0.05$),其介导冠状动脉病变的机制可能是sd-LDL氧化活性强,血浆清除缓慢,与血管壁粘附后易进入动脉壁内并不断积聚,致动脉壁氧化损伤,加重斑块不稳定性^[11]。学者秦明明等^[12]研究显示,血清sd-LDL诊断动脉粥样硬化的敏感度73.6%。本研究显示,血清AnxA1诊断冠状动脉粥样硬化严重病变的AUC值最大,为0.791,最佳敏感度为84.72%,略高于上述研究,可能是因本研究采取ROC曲线分析可连续性、动态分析诊断效能,更接近实际诊断价值。

Angptl2是一种分泌型糖蛋白,具有广泛性生物学作用,绝大多数介导血管生成,少量参与血糖、脂质代谢过程^[13]。病理研究显示,Angptl2能通过加重胰岛素抵抗,促进血小板凝聚进一步恶化机体炎症反应^[14]。炎症反应与CHD发病关系密切,已得到临床广泛性证实。因此推测:Angptl2可能通过激活、强化机体炎症反应过程加重冠脉血管斑块形成,诱发CHD发生。本研究检测发现,CHD患者普遍存在血清Angptl2高表达状态,且不同冠脉病变类型患者间表达存在显著差异($P<0.05$)。Angptl2与Toll样受体4配体结合后可通过整合素有关途径大量激活炎症细胞因子表达,继而产生抗血管内皮细胞损伤效应,促进血管壁重塑,介导动脉粥样硬化形成,且会增加斑块不稳定性,加重病情。学者何攀文等^[15]研究显示,随CHD患者Gensini评分升高,血清Angptl2表达呈上升趋势。本研究结果显示,血清Angptl2表达与CHD患者Gensini评分呈正相关($P<0.05$),与上述研究结果近似,同时本研究还发现,血清Angptl2表达与冠状动脉病变支数存在密切关系,进一步ROC曲线分析显示,血清Angptl2诊断冠状动脉粥样硬化严重病变的AUC值为0.723,可为临床诊断提供参考数据。

AnxA1是重要炎症调控蛋白之一,在人体大多数组织细胞,尤其是单核细胞、粒细胞中呈强阳性表达,参与中性粒细胞/单核细胞、炎症代谢产物与血管内皮细胞的黏附过程^[16]。学者霍倩倩等^[17]采取RT-PCR技术、Western blot探究AnxA1与颈动脉粥样硬化斑块间关系,发现无论是基因层面还是AnxA1蛋白表达层面,粥样硬化斑块患者均显著升高。与本研究结果一致,学者梁蓉^[18]研究显示,AnxA1基因组异常改变、编码蛋白质失活与动脉粥样硬化斑块稳定性关系密切。但以往研究中未见血清

AnxA1对CHD诊断价值分析,本研究ROC曲线分析结果表明,血清AnxA1诊断冠状动脉粥样硬化严重病变的敏感度为84.72%,特异度为66.67%,能有效诊断冠状动脉粥样硬化,但特异性欠佳,可能存在误诊情况,临床需首先排除肿瘤、其他血管疾病或辅助其他诊断手段。

综上所述,CHD患者存在血清AnxA1、sd-LDL、Angptl2异常表达情况,且与冠脉病变严重程度关系密切,3者联合检测在CHD患者冠脉严重病变诊断中价值最高,可为临床诊断、完善治疗方案提供数据参考。

参考文献

- [1] Anderson L, Oldridge N, Thompson DR, et al. Exercise-Based Cardiac Rehabilitation for Coronary Heart Disease: Cochrane Systematic Review and Meta-Analysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 67(1): 1-12.
- [2] Zhu L, Lu Z, Zhu L, et al. Plasma lipoprotein (a) levels are associated with the severity of coronary heart disease in Han Chinese people[J]. Turk J Med Sci, 2016, 46(4): 1033-1041.
- [3] Galve E, Cordero A, Cequier A, et al. Degree of Lipid Control in Patients With Coronary Heart Disease and Measures Adopted by Physicians. REPAR Study [J]. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016, 69(10): 931-938.
- [4] 林志勇,葛捍伟,薛继阳,等. 消退素D1对大鼠肺缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(7): 790-795.
- [5] Hoang TT, Johnson DA, Raines RT, et al. Angiogenic activates the astrocytic Nrf2/antioxidant-response element pathway and thereby protects murine neurons from oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2019, 294(41): 15095-15103.
- [6] 中国医疗保健国际交流促进会,血管疾病高血压分会专家共识组. 冠心病合并颈动脉狭窄的处理策略专家共识[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(12): 1150-1156.
- [7] 陈刚,丁彦春. 冠心病患者亚临床甲状腺功能减退症与冠状动脉Gensini评分的相关性研究[J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(3): 254-257.
- [8] 龚倩,胡月明,王金金. 小而密低密度脂蛋白及常见血脂指标与冠心病的相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(8): 845-849.
- [9] 孙爱梅,刘婷,陈还珍. 可溶性ST2对冠心病的危险分层价值及其与心功能的关系[J]. 中国心血管杂志, 2017, 22(1): 19-23.
- [10] Iribarren C, Chandra M, Rana JS, et al. High-sensitivity cardiac troponin I and incident coronary heart disease among asymptomatic older adults [J]. Heart, 2016, 102(15): 1177-1182.

(下转第98页)

· 论 著 ·

应用 QF-PCR 和 CNV-seq 以及染色体核型分析检测羊水的染色体畸变及结果分析

乔金平¹ 胡文君¹ 陈薇² 刘慧² 张小鹏² 代雅倩¹ 彭丽朵¹ 徐元宏¹ 方慧琴^{2*}
袁静^{2*}

[摘要] 目的 评价定量荧光 PCR (QF-PCR) 在染色体畸变中诊断的准确性, 探讨 QF-PCR、基因组拷贝数变异测序 (CNV-seq) 和染色体核型分析 (核型分析) 这 3 种技术在染色体畸变的产前诊断中的应用价值以及多方法联合诊断的优势和必要性。方法 采用 QF-PCR 检测 106 例产前筛查高风险孕妇的产前羊水的染色体畸变, 同时使用 CNV-seq (102 例) 及核型分析 (4 例) 检测; 统计 QF-PCR 与后两者之间的阳性符合率。结果 在 21、18、13、X、Y 共 5 种染色体非整倍体检测方面, QF-PCR 与 CNV-seq 及核型分析的阳性符合率均为 100%。对于所有 46 条染色体畸变的检测, CNV-seq 阳性但 QF-PCR 无法检出的共 21 例, 其中 20 例微缺失或微重复均小于 5 Mb, 核型分析可能均无法检出。结论 QF-PCR 对 5 种染色体非整倍体的检测具有很高的准确性。QF-PCR 结合 CNV-seq, 相互补充和印证, 快速且覆盖面广, 具有部分替代核型分析的潜力; 多方法联合诊断对染色体畸变的检出具有很大的优势和必要性。

[关键词] QF-PCR; CNV-seq; 染色体核型分析; 产前诊断; 染色体畸变

Using QF-PCR, CNV-seq and karyotype analysis to detect chromosomal aberrations in 106 amniotic fluids and comparing the results

QIAO Jinping¹, HU Wenjun¹, CHEN Wei², LIU Hui², ZHANG Xiaopeng², DAI Yaqian¹, PENG Liduo¹, XU Yuanhong¹, FANG Huiqin^{2*}, YUAN Jing^{2*}

(1. Department of clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230022; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230022)

[ABSTRACT] Objectives To evaluate the accuracy of quantitative fluorescence PCR (QF-PCR) in chromosomal aberrations. To discuss the application value of the three methods (QF-PCR, genomic copy number variation sequencing, and karyotype analysis) in prenatal diagnosis of chromosomal aberrations. To explore the advantages and necessity of multi-method joint diagnosis. Methods QF-PCR was used to detect the chromosomal aberrations of prenatal amniotic fluid samples from 106 prenatal screening high-risk pregnant women. CNV-seq (102 cases) and karyotype analysis techniques (4 cases) were used at the same time. Calculate the positive coincidence rate between the QF-PCR and the latter two. Results In the detection of aneuploidy of 5 chromosomes (21, 18, 13, X, and Y), compared with CNV-seq and karyotype analysis, the positive coincidence rate of QF-PCR was 100%. For the detection of distortions in all 46 chromosomes, 21 cases were positive for CNV-seq but not detectable by QF-PCR. Among them, 20 cases of microdeletions or microduplications were less than 5 Mb, and may not be detectable by karyotype analysis. Conclusion QF-

基金项目: 国家自然科学基金(81771653, 81501187); 安徽省自然科学基金(1508085QH173)

作者单位: 1. 安徽医科大学第一附属医院检验科, 安徽, 合肥 230022

2. 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 安徽, 合肥 230022

*通信作者: 袁静, E-mail: yuanjing_ahmu@163.com; 方慧琴, E-mail: fanghq1965@126.com

PCR has high accuracy for the detection of five chromosome aneuploidies. QF-PCR combined with CNV-seq, complement and confirmed with each other, rapid and broad coverage, and has the potential to replace karyotype analysis partially. Multi-method joint diagnosis has great advantages and necessity for the detection of chromosomal aberrations.

[KEY WORDS] QF-PCR; CNV-seq; karyotype analysis; prenatal diagnosis; chromosomal aberration

出生缺陷在我国的发生率约5.6%,而以染色体数目异常、大片段缺失或重复及致病性基因组致病性拷贝数变异(Copy Number Variation, CNV)等为主的染色体畸变约占出生缺陷的遗传学病因的80%以上^[1-2]。染色体核型分析技术(下文简称为核型分析),是染色体疾病确诊的金标准之一,但需要细胞培养,存在检测时间长、通量低、分辨率较低(无法检出5 Mb以下的CNV)等诸多不足,已无法满足日益增长的产前诊断需求^[2]。基于低深度全基因组测序的基因组拷贝数变异测序(Copy Number Variation Sequencing, CNV-seq)技术由于其具有检测覆盖面广、通量高、易操作、所需DNA样本量低等诸多优点已被广泛应用于包括非整倍体、微缺失、微重复等在内的染色体畸变的检测^[1]。基于短串联重复序列(Short Tandem Repeat, STR)为核心的定量荧光PCR(Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction, QF-PCR)技术具有通量高、速度快(可以在数小时内完成检测并出具报告)、可检测母血污染、准确性高[能诊断出99.2%~100.0%目标染色体(21、18、13、X和Y共5种染色体)的非整倍体异常]^[3-4]等特点。结合各自的优势和互补性,QF-PCR和CNV-seq的联合使用可用于替代核型分析已成为专家共识^[1],因此这两种技术的联合使用已逐渐普及,为有产前诊断需求的人群,特别是无法做核型培养的人群提供了较好的选择。本研究通过对比分析本院106例QF-PCR联合102例CNV-seq及4例核型分析的检测情况,探讨这些技术在染色体畸变诊断中的临床应用价值及联合检测的优势。

1 材料与方法

1.1 材料

2019年5月至2019年9月因高龄、血清学唐氏筛查异常、B超异常或无创产前检查(Noninvasive Prenatal Testing, NIPT)高风险等来本院产前诊断中心进行有创产前诊断,均对其进行各种产前诊断方法的介绍,填写知情同意书、自愿选择相

应的检测。105位孕妇,共抽取羊水106例(1例为双胞胎),其中CNV-seq(102例)、核型分析(4例),所有106例样本均同时进行了QF-PCR检测。

1.2 试剂与仪器

21、18、13及性染色体非整倍体检测试剂盒(荧光PCR毛细管电泳法)购自中山大学达安基因股份有限公司以及广州市达瑞生物技术股份有限公司,甲酰胺、Liz600、ABI3500DX测序仪和GeneMapper5.0软件均购自美国赛默飞世尔科技有限公司,K5800微量分光光度计购自北京凯奥公司。

1.3 方法

1.3.1 羊水QF-PCR检测

在检验科分子诊断室,使用核酸提取和QF-PCR试剂盒,大体步骤如下。羊水DNA提取:取1.9 mL羊水离心去上清,沉淀使用核酸提取试剂盒提取羊水基因组DNA,K5800微量分光光度计检测DNA的质量和浓度,-20℃保存;QF-PCR检测分析:前89例采用达安试剂盒(15个STR位点),后17例采用达瑞试剂盒(20个STR位点);PCR扩增均参照对应试剂盒说明书;扩增后取1 μL PCR产物和13.5 μL甲酰胺、0.5 μL Liz600混合,ABI3500DX进行片段分析,GeneMapper5.0分析数据。

1.3.2 羊水CNV-seq检测

本检测抽取待检孕妇的羊水和抗凝全血交由湖南家辉遗传专科医院进行检测,参照文献中的方法^[5],大体步骤如下:提取羊水DNA,限制性内切酶水解获得平均大小为200 bp的DNA片段,采用PCR-free方法制备文库(北京贝瑞和康生物技术有限公司),连接接头,在NextSeq CN500高通量测序平台,36 bp单端测序,测序深度0.1 X。所有测定序列,通过平行比对软件与hg19人类基因组进行完全比对分析。以100 kb为基本分析单元,将人类基因组划分为若干个连续区域,统计每个区域内样本完全匹配的uniq reads序列数。采用专用算法判读样本的CNV,根据统计结果,以标准化测序拷贝数为y轴,以每条染色体连续的100 kb

分析单元为x轴,绘制 CNV-seq 检测结果图,判断待测样本的染色体情况。通过检索 CNV 比对常用数据库最新公布数据进行 CNV 临床意义的确定^[5]。

1.3.3 羊水染色体核型分析

在本院产前诊断中心,按常规方法对 10 mL 羊水离心,取沉淀中的羊水细胞培养,制备染色体 G 显带,参照 ISCN (2016) 标准进行核型分析。

2 结果

2.1 QF-PCR 与 CNV-seq 及染色体核型分析结果的对比

将 QF-PCR 测定的核型正常作为阴性,异常作为阳性,在 21、18、13、X、Y 共 5 种染色体(下文中均简称为 5 种染色体)的非整倍体检测方面,QF-PCR 与 CNV-seq 和染色体核型对比,依据 QF-PCR 测得的核型分,结果如下:46XX QF-PCR 43 例,CNV-seq 符合 42 例,核型分析符合 1 例,符合率均为 100%;46XY QF-PCR 49 例,CNV-seq 符合 48 例,核型分析符合 1 例,符合率均为 100%;

47XX+18 QF-PCR 3 例,CNV-seq 符合 2 例,核型分析符合 1 例,符合率均为 100%;47XY+18 QF-PCR 1 例,CNV-seq 符合 1 例,符合率为 100%;47XX+21 QF-PCR 6 例,CNV-seq 符合 5 例,核型分析符合 1 例,符合率均为 100%;47XXY QF-PCR 3 例,CNV-seq 符合 3 例,符合率为 100%;47XY Y QF-PCR 1 例,CNV-seq 符合 1 例,符合率为 100%。因此,QF-PCR 与 CNV-seq 及核型分析的阳性符合率、阴性符合率、总符合率均为 100%。

2.2 CNV-seq 阳性,但 QF-PCR 无法检出的标本统计

CNV-seq 检出阳性但 QF-PCR 无法检出的共 21 例,其中,CNV 多态性 7 例,致病性未知 3 例,明确致病 11 例,见表 1。

2.3 CNV-seq 检出阳性,但染色体核型无法检出的标本统计

CNV-seq 检出阳性,而 QF-PCR 无法检出的标本共 21 例,其中 1 例 2 号染色体 q33.1-q37.3 处重复 39.48 Mb,染色体核型是能检测的,其余 20 例标本的微缺失或微重复均小于 4 Mb,未达到染色体核型的分辨率(5 Mb),见表 1。

表 1 CNV 检出阳性,但 QF-PCR 无法检出的标本统计

Table 1 The specimen (CNV detected positive, but QF-PCR could not detect) statistics

QF-PCR 测得型别	5 种染色体 CNV 阳性致病	其他染色体 CNV 阳性且致病	其他染色体 CNV 阳性且致病性未知	其他染色体 CNV 阳性多态性
46XX	1 例 ^a X 染色体 p22.31 缺失 1.68 Mb	4 例 12 号 p13.33 缺失 0.54 Mb 8 号 p12 缺失 2.14 Mb 16 号 p13.3 重复 1.44 Mb 2 号 q33.1-q37.3 重复 39.48 Mb	\	2 例 17 号 p11.2-p11.1 重复 0.50 Mb 7 号 p21.1 重复 0.62 Mb \ \
46XY	3 例 ^b 18 号 q22.1 缺失 3.66 Mb 18 号 q22.1- q22.2 缺失 3.20 Mb X 染色体 p22.31 缺失 1.68 Mb	2 例 2 号 q34 重复 1.20 Mb 16 号 p13.11 缺失 1.14 Mb	2 例 7 号 p21.3 缺失 1.76 Mb 10 号 q26.2 重复 1.00 Mb	5 例 22 号 q11.23-q12.1 重复 0.3 Mb 5 号 p12-p11 重复 0.54 Mb 2 号 p24.3 重复 0.74 Mb 同时 19 号 p12 重复 0.74 Mb 12 号 p11.1 重复 0.48 Mb 8 号 p23.2 重复 2.00 Mb
47XX+21	\	1 例 ^c 21 三体合并 1 号 q21.1 缺失 0.14 Mb	1 例 ^c 21 三体合并 8 号 p23.3-p23.2 缺失 3.56 Mb	\ \
合计	4 例	7 例	3 例	7 例

注:^a其中 1 例为 X 染色体有微缺失,QF-PCR 无法检出。^b其中 1 例为 18 号染色体有微缺失,QF-PCR 无法检出。^c21 三体阳性 QF-PCR 可检出,但其他染色体同时有微缺失,QF-PCR 无法检出。

3 讨论

本研究由于病例数较少,所以各种方法比较时所得的阳性符合率只能部分提示该方法的真实能力。

在本研究中,在5种染色体非整倍体检测方面,QF-PCR与CNV-seq及核型分析相比,结果完全一致,提示QF-PCR作为产前诊断项目,其准确性符合要求,这和指南及文献是一致的^[3-4]。

在全部染色体检测方面,本研究中,除CNV-seq多态性外,CNV-seq阳性但QF-PCR无法检出的14例标本如果未做CNV-seq,而只做QF-PCR,可能就全部漏诊了,文献也报道了类似的情况^[6-7]。上述结果也部分提示产前筛查高风险的标本发生CNV-seq异常的可能性也许会更高,例如唐筛21三体阳性的孕妇在只做QF-PCR验证是否为21三体的同时,应同时选择CNV-seq或核型分析排除其他染色体的异常。

虽然核型分析是目前染色体疾病诊断的金标准之一,但其分辨率较低,为5 Mb左右,因此本研究中,除了两例21三体阳性合并其他染色体微缺失的,其他18例如果只做核型分析,很可能均无法检出,而这其中,CNV-seq阳性且明确致病的有9例。此结果显示了CNV-seq较之核型分析技术的优势。

综上所述,QF-PCR技术准确性高、速度快,可大大缩短报告的等待时间,缓解孕妇及家属的焦虑情绪。但由于其局限性,在产前诊断时,需要和CNV-seq或核型分析等联合检测,这样才能更好的

发挥各自的优势。CNV-seq作为覆盖面广的产前诊断,也其必须使用QF-PCR进行母体细胞污染鉴别。因此,QF-PCR和CNV-seq联合检测具有速度快、通量高、覆盖广的优势,已逐渐成为产前诊断的一线方法。

参考文献

- [1] 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组,中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会,中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组.低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(4):293-296.
- [2] Evans MI, Wapner RJ, Berkowitz RL. Noninvasive prenatal screening or advanced diagnostic testing: caveat emptor [J]. Am J Obstet Gynecol, 2016, 215(3):298-305.
- [3] Speevak MD, McGowan-Jordan J, Chun K. The detection of chromosome anomalies by QF-PCR and residual risks as compared to G-banded analysis [J]. Prenat Diagn, 2011, 31(5):454-458.
- [4] 荧光定量PCR技术在产前诊断中的应用协作组.荧光定量PCR技术在产前诊断中的应用专家共识[J].中华妇产科杂志,2016,51(5):321-324.
- [5] Liang D, Peng Y, Lv W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes [J]. J Mol Diagn, 2014, 16(5):519-526.
- [6] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis [J]. N Engl J Med, 2012, 367(23):2175-2184.
- [7] Callaway JL, Shaffer LG, Chitty LS, et al. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature [J]. Prenat Diagn, 2013, 33(12):1119-1123.

(上接第78页)

- [15] 李丽平,徐丹,叶俊,等. miR-219-5p对胰腺癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响及机制[J]. 山东医药, 2017, 57(25):12-15.
- [16] ZHANG C, KUANG M, LI M, et al. SMC4, which is essentially involved in lung development, is associated with lung adenocarcinoma progression [J]. Sci Rep, 2016, 6(1):34508.
- [17] JIANG L, ZHOU J, ZHONG D, et al. Overexpression of SMC4 activates TGF β /Smad signaling and promotes aggressive phenotype in glioma cells [J]. Oncogenesis, 2017, 6(3):e301.
- [18] ZHOU B, CHEN H, WEI D, et al. A novel miR-219-SMC4-JAK2/Stat3 regulatory pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clinical Cancer Res, 2014, 33(1):55.
- [19] LI C, DONG J, HAN Z, et al. MicroRNA-219-5p represses the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by targeting the LRH-1/Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Oncol Res, 2016, 25(4):617-627.
- [20] WEI C, ZHANG X, HE S, et al. MicroRNA-219-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of epithelial ovarian cancer cells by targeting the Twist/Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Gene, 2017, 637:25-32.
- [21] 李雪梅. Sox9介导Wnt/ β -catenin信号通路影响皮肤鳞癌细胞增殖的机制[D]. 辽宁:大连医科大学, 2015.

· 论 著 ·

血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 在重症颅脑损伤患者中的表达及预后价值

洪明^{1*} 赵蕾蕾² 陈国金²

[摘要] 目的 探究高迁移率族蛋白1(HMGB1)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、纤维胶凝蛋白3(ficolin-3)在重症颅脑损伤患者中的表达及预测预后价值。方法 选取本院2017年6月至2019年6月重症颅脑损伤患者62例作为观察组,另选取同期轻中度颅脑损伤患者65例作为对照组。统计对比两组血清HMGB1、IGF-1、ficolin-3水平,并随访28d,比较不同Rankin量表(MRS)及格拉斯哥预后(GOS)评分患者各血清水平,Spearman等级相关分析各血清与MRS、GOS评分相关性,受试者工作特征(ROC)曲线分析预后预测价值,Kaplan-Meier(KM)曲线分析生存状况。结果 观察组血清HMGB1水平高于对照组,IGF-1、ficolin-3水平低于对照组($P<0.05$);入院第3、5d神经功能恢复良好者血清HMGB1水平低于神经功能恢复不良者,IGF-1、ficolin-3水平高于神经功能恢复不良者($P<0.05$);入院第3、5d预后良好者血清HMGB1水平低于预后不良者,IGF-1、ficolin-3水平高于预后不良者($P<0.05$);血清HMGB1与MRS评分呈正相关,与GOS评分呈负相关,血清IGF-1、ficolin-3与MRS评分呈负相关,与GOS评分呈正相关($P<0.05$);ROC曲线分析显示,血清HMGB1、IGF-1、ficolin-3水平入院后第5d AUC大于入院第3d;经KM曲线分析显示,血清HMGB1、IGF-1、ficolin-3高危组、低危组生存曲线存在差异,有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清HMGB1、IGF-1、ficolin-3水平在重症颅脑损伤中呈异常表达状态,与神经功能损伤密切相关,动态监测上述血清水平,可为临床评估脑损伤程度、预测预后提供科学指导。

[关键词] 高迁移率族蛋白1;胰岛素样生长因子-1;纤维胶凝蛋白3;重症颅脑损伤;神经功能;生存曲线

Expression of serum HMGB1, IGF-1 and ficolin-3 in patients with severe head injury and their prognostic value analysis

HONG Ming^{1*}, ZHAO Leilei², CHEN Guojin²

(1. Department of neurosurgery, Fuxin mine general hospital, Liaoning health industry group, Fuxin, Liaoning, China, 123000; 2. Department of pediatrics, Fuxin mine general hospital, Liaoning health industry group, Fuxin, Liaoning, China, 123000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and prognostic value of high mobility group box 1 (HMGB1), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and fibronectin-3 in patients with severe head injury. Methods 65 patients with severe craniocerebral injury from June 2017 to June 2019 in our hospital were selected as the observation group, and 65 patients with mild to moderate craniocerebral injury were selected as the control group. The serum levels of HMGB1, IGF-1 and ficolin-3 were measured and compared for 28 days. The serum levels of patients with different Rankin scale (MRS) and Glasgow prognosis (GOS) scores were compared. Spearman rank correlation analysis was used to correlate the sera with MRS and GOS scores, the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the prognostic value, and the Kaplan-Meier

作者单位:1. 辽宁省健康产业集团阜新矿总医院神经外科,辽宁,阜新 123000

2. 辽宁省健康产业集团阜新矿总医院儿科,辽宁,阜新 123000

*通信作者:洪明, E-mail:95156000@qq.com

curve was used to analyze the survival status. **Results** The serum HMGB1 level in the observation group was higher than that in the control group, and the levels of IGF-1 and ficolin-3 were lower than those in the control group ($P<0.05$). The serum HMGB1 levels in patients with good neurological function recovery on the 3rd and 5th day after admission were lower than those with poor neurological function recovery. The levels of IGF-1 and ficolin-3 were higher than those with poor neurological function ($P<0.05$). The serum HMGB1 levels were lower in patients with good prognosis on the 3rd and 5th day after admission, and the levels of IGF-1 and ficolin-3 were higher than those with poor prognosis ($P<0.05$). Serum HMGB1 was positively correlated with MRS score and negatively correlated with GOS score. Serum IGF-1 and ficolin-3 were negatively correlated with MRS score, and positively correlated with GOS score ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that serum HMGB1, IGF-1, and ficolin-3 levels were higher on the 5th day after admission than on the 3rd day after admission; The KM curve analysis showed that there were differences in the survival curves of serum HMGB1, IGF-1, ficolin-3 high-risk group and low-risk group, which was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Serum HMGB1, IGF-1, and ficolin-3 levels are abnormally expressed in severe craniocerebral injury, and are closely related to neurological impairment. Dynamic monitoring of the above serum levels can provide scientific guidance for clinical assessment of the degree of brain injury and prediction of prognosis.

[KEY WORDS] high mobility group protein 1; insulin-like growth factor-1; fibrin-3; severe craniocerebral injury; neurological function; survival curve

近年来,随医疗救治水平提高,重症颅脑损伤急性期病死率呈降低趋势,但仍会引起颅内炎症反应,延迟神经元死亡,遗留认知功能障碍、情绪异常等永久性功能障碍^[1-2],数据统计,>50.0%重症患者因长期认知功能障碍而预后不良^[3]。研究表明,炎性反应在急性颅脑损伤后继发性颅脑损伤中具有促进作用,可分泌高迁移率族蛋白1(High mobility group box protein 1, HMGB1)、胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-1, IGF-1)等细胞因子,导致细胞再生或死亡^[4]。同时,文献还指出, ficolin 介导补体凝集素途径激活,能促进大脑损伤炎症反应^[5]。但临床尚缺乏血清 HMGB1、IGF-1、纤维胶凝蛋白3(ficolin-3)水平与重症颅脑损伤预后关联性研究。基于此,本研究首次以血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平为观察指标,旨在探讨其在重症颅脑损伤患者中的表达水平及预测预后价值,为临床治疗提供新方向。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2017年6月至2019年6月收治的重症颅脑损伤患者62例作为观察组,另选取同期轻中度颅脑损伤患者65例作为对照组。两组基本资料(性别、年龄、受伤至就诊时间、受伤原因)均衡可比,差异无统计学意义($P>0.05$)见表1。本研究经本院医学伦理委员会批准。

表1 两组一般资料比较 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Comparison of general data between two groups [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

一般资料	观察组 ($n=62$)	对照组 ($n=65$)	t/χ^2 值	P 值
性别(男/女)	32/30	33/32	0.009	0.924
年龄(岁)	(48.15±5.88)	(47.96±6.34)	0.175	0.861
受伤至就诊时间(h)	(5.89±0.48)	(5.93±0.52)	0.450	0.654
受伤原因				
车祸伤	40(64.52)	41(63.08)	0.029	0.866
打击伤	5(8.06)	6(9.23)	0.055	0.815
高空坠落伤	10(16.13)	12(18.46)	0.121	0.728
跌伤	7(11.29)	6(9.23)	0.147	0.702

1.2 选取标准

纳入标准:①均符合《2015 成人颅脑损伤治疗指南》中颅脑损伤诊断标准^[6],并经头颅CT、磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)等影像学检查证实为颅脑损伤;②重症颅脑损伤格拉斯哥昏迷指数(Glasgow Coma Scale, GCS)3~8分,轻中度颅脑损伤GCS评分>8分;③家属知情并签署同意书。排除标准:①开放性颅脑损伤者;②合并脑出血、脑梗死、脑疝等原发性疾病者;③伴有复合伤或多发伤者;④合并失语症或精神行为异常者。

1.3 方法

1.3.1 检测及治疗方法

空腹取4 mL外周静脉血,离心10 min,4 000

r/min, 分离取血清, 置于 -20°C 下保存待检: ①以化学发光法检测血清 IGF-1 水平, 试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司; ②以免疫放射分析法检测血清 HMGB1 水平, 试剂盒购自北京博蕾德科技发展有限公司; ③以酶联免疫吸附试验检测血清 ficolin-3 水平, 试剂盒购自上海嵘崑达实业有限公司, 上述操作均严格按照试剂盒说明书执行。62 例重症颅脑损伤均接受开颅手术治疗。

1.4 观察指标

①对比两组治疗前血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平。②随访 28 d, 采用改良 Rankin 量表 (Modified Rankin Scale, MRS) 对比入院时、入院第 3、5 d 不同神经功能恢复患者血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平, 其中 MRS 评分 0~2 分为神经功能恢复良好; MRS 评分 3~6 分为神经功能恢复不良。③随访 28 d, 根据 GOS 对比入院时、入院第 3、5 d 不同预后患者血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平, 其中预后不良: GOS 为 1~3 级; 预后良好: GOS 为 4~5 级。④分析血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平与 MRS、GOS 评分相关性。⑤分析血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 预测预后价值及与预后关系。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件分析处理数据, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, t 检验, 采用 Spearman 等级相关分析相关性, 采用受试者工作特征曲线 (Receiver Op-

erating Characteristic, ROC) 分析预后预测价值, 采用 Kaplan 进行生存曲线分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平比较

观察组血清 HMGB1 水平高于对照组, IGF-1、ficolin-3 水平低于对照组, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 两组血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平
[$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 serum levels of HMGB1, IGF-1 and ficolin-3 in the two groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	HMGB1 (mg/L)	IGF-1 (nmol/L)	ficolin-3 ($\mu\text{g/mL}$)
观察组	62	7.90 \pm 1.26	29.34 \pm 7.18	13.27 \pm 2.41
对照组	65	5.70 \pm 1.03	38.47 \pm 8.52	16.86 \pm 3.05
t 值		10.795	6.515	7.337
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同神经功能恢复患者各血清水平

随访 28 d, 神经功能恢复良好 42 例, 神经功能恢复不良 20 例。入院第 3、5 d 神经功能恢复良好者血清 HMGB1 水平低于神经功能恢复不良者, IGF-1、ficolin-3 水平高于神经功能恢复不良者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 不同神经功能恢复血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Levels of HMGB1, IGF-1 and ficolin-3 in different neurological recovery serum [$n, (\bar{x} \pm s)$]

时间	组别	n	HMGB1 (mg/L)	IGF-1 (nmol/L)	ficolin-3 ($\mu\text{g/mL}$)
入院时	神经功能恢复良好者	42	7.82 \pm 1.17	28.75 \pm 6.90	13.31 \pm 2.32
	神经功能恢复不良者	20	8.07 \pm 1.33	30.58 \pm 8.25	13.19 \pm 2.10
	t 值		0.753	0.916	0.196
	P 值		0.456	0.363	0.845
入院第 3 d	神经功能恢复良好者	42	6.36 \pm 1.71	33.29 \pm 4.06	14.20 \pm 1.47
	神经功能恢复不良者	20	7.72 \pm 1.89	30.22 \pm 3.12	13.15 \pm 1.24
	t 值		2.830	2.983	2.758
	P 值		0.006	0.004	0.008
入院第 5 d	神经功能恢复良好者	42	5.38 \pm 1.72	38.51 \pm 8.26	15.55 \pm 1.88
	神经功能恢复不良者	20	7.49 \pm 2.34	31.19 \pm 7.30	14.06 \pm 1.62
	t 值		4.160	3.381	3.044
	P 值		<0.001	0.001	0.004

2.3 不同预后各血清水平

随访 28 d, 预后良好者 38 例, 预后不良者 24 例。入院第 3、5 d 预后良好者血清 HMGB1 水

平低于预后不良者, IGF-1、ficolin-3 水平高于预后不良者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

表4 不同预后各血清水平 [n, (x̄±s)]

Table 4 serum levels in different prognosis [n, (x̄±s)]

时间	组别	n	HMGB1 (mg/L)	IGF-1 (nmol/L)	ficolin-3 (μg/mL)
入院时	预后良好者	38	7.79±1.69	28.36±7.11	13.44±2.05
	预后不良者	24	8.07±2.00	30.89±8.08	13.00±1.92
	t值		0.592	1.294	0.843
	P值		0.556	0.201	0.402
入院第3 d	预后良好者	38	6.15±1.87	33.10±3.12	14.29±1.41
	预后不良者	24	7.82±2.13	31.03±2.76	13.17±1.23
	t值		3.245	2.658	3.197
	P值		0.002	0.010	0.002
入院第5 d	预后良好者	38	5.22±1.74	38.74±7.45	15.80±2.02
	预后不良者	24	7.38±2.25	32.05±7.04	13.91±1.84
	t值		4.246	3.516	3.712
	P值		<0.001	0.001	0.001

2.4 相关性

经 Spearman 等级相关分析,血清 HMGB1 与 MRS 评分呈正相关,与 GOS 评分呈负相关(P<

0.05);血清 IGF-1、ficolin-3 与 MRS 呈负相关,与 GOS 评分呈正相关(P<0.05),见表 5。

表5 血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平与 MRS、GOS 评分相关性

Table 5 Correlation between serum HMGB1, IGF-1, ficolin-3 levels and MRS, GOS scores

项目		HMGB1			IGF-1			ficolin-3		
		入院时	入院第3 d	入院第5 d	入院时	入院第3 d	入院第5 d	入院时	入院第3 d	入院第5 d
MRS 评分	r 值	0.181	0.406	0.473	-0.203	-0.397	-0.419	-0.211	-0.381	-0.407
	P 值	>0.05	0.011	>0.001	>0.05	0.015	0.008	>0.05	0.017	0.010
GOS 评分	r 值	-0.196	-0.425	-0.502	0.207	0.410	0.443	0.219	0.392	0.423
	P 值	>0.05	0.006	>0.001	>0.05	0.013	>0.001	>0.05	0.015	0.006

2.5 预后预测价值

ROC 曲线分析显示,血清 HMGB1、IGF-

1、ficolin-3 水平 ROC 曲线下的面积(Area Under Curve, AUC)大于入院第3 d。见图 1~2。

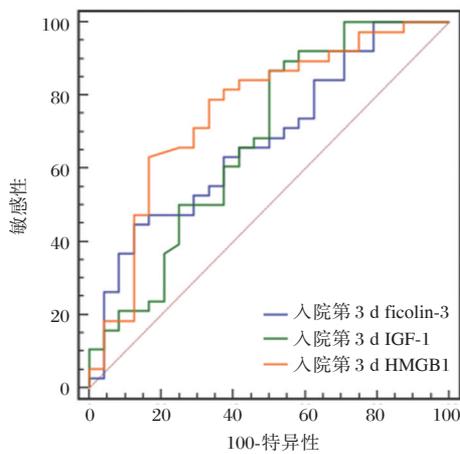


图1 入院第3 d 各血清 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of each serum on the 3rd day after admission

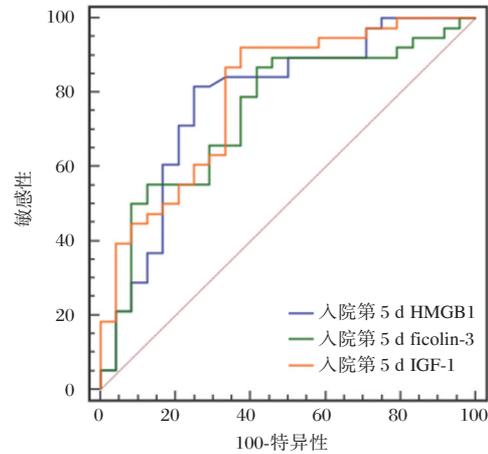


图2 入院第5 d 各血清 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of each serum on the 5th day after admission

2.6 生存分析

随访 28 d, 以 ROC 曲线最佳截断值分为低危组、高危组, KM 曲线分析显示, 血清 HMGB1、IGF-

ficolin-3 高危组、低危组生存曲线对比, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.533, 9.626, 6.345; P=0.033, 0.002, 0.012$)。见图 3, 图 4, 图 5。

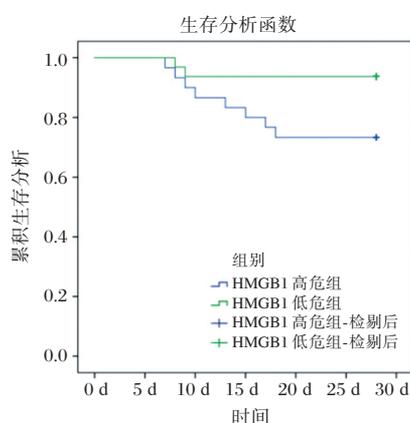


图 3 KM 生存曲线(HMGB1)

Figure 3 KM survival curve (HMGB1)

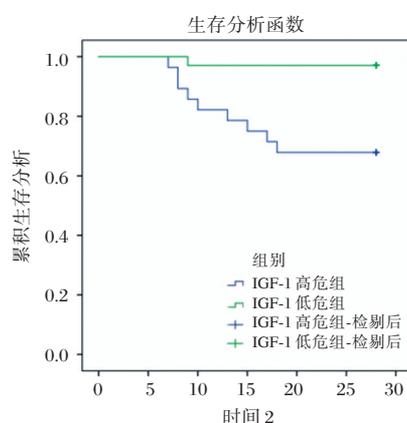


图 4 KM 生存曲线(IGF-1)

Figure 4 KM survival curve (IGF-1)

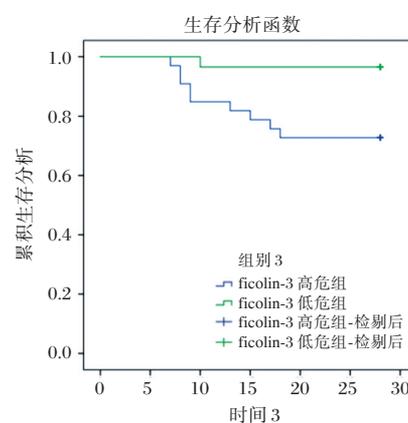


图 5 KM 生存曲线(ficolin-3)

Figure 5 KM survival curve (ficolin-3)

3 讨论

据统计,我国每年颅脑损伤人数>100万,病死率高达 58.0%,可减少脑血流量,诱导脑细胞死亡,危及生命安全^[7]。研究认为,炎症反应介导脑缺血再灌注损伤是重症颅脑损伤患者脑缺血缺氧原因之一^[8]。因此监测炎症因子水平变化,了解其在重症颅脑损伤中作用机制,有助于评估脑损害程度,判断预后效果。

HMGB1 可作用于 Toll 样受体 2、TLR4 激活核因子 κ B, 参与颅脑损伤发生、发展。本研究结果显示,血清 HMGB1 水平在重症颅脑损伤患者中呈异常高表达状态,从而说明重症颅脑损伤患者发生脑组织破坏、细胞坏死、凋亡等病理变化时,可上调 HMGB1 水平,引发 TLR4、TLR9 等介导病原分子模式,加重炎症反应损伤,引发脑组织二次损伤。进一步经相关性分析显示,血清 HMGB1 与 MRS 评分存在正相关关系,与 GOS 评分存在负相关关系。Xia P 等^[9]研究通过给脑损伤模型小鼠注射 HMGB1 抗体推测 HMGB1 可通过激活神经胶质细胞,加重神经细胞损伤,促进神经细胞凋亡,影响预后改善。

郭义君等^[10]通过研究 86 例急性颅脑损伤患者 IGF-1 水平也发现,在发病后 1、3、5 d 血清 IGF-1 水平均呈低表达状态,可见重症颅脑损伤能损伤下丘脑-垂体轴及其相关结构,减少生长激素水

平,降低外周血 IGF-1 含量。本研究数据显示,血清 IGF-1 水平在入院第 3、5 d 神经功能恢复良好者中呈高表达状态,并与 GOS 评分密切相关,与 Kostereva NV 等^[11]研究相似。分析发现 IGF-1 高表达水平能减轻血管阻力,减少神经细胞继发性损伤,抑制细胞凋亡^[12]。本研究进一步经 ROC 曲线分析显示,入院第 5 d 血清 IGF-1 水平 AUC 为 0.794,高于其他血清指标,说明通过测定患者 IGF-1 水平变化可对预后效果进行预测,提示 IGF-1 为重症颅脑损伤预后的潜在预测指标。

研究证实,血清 ficolin-3 水平在严重颅脑损伤患者中呈异常低表达状态,并与 GCS 呈负相关关系,原因分析,激活 ficolin 介导的补体凝集素途径一定程度可促进颅脑损伤补体依赖性炎症过程,调节机体天然免疫^[13]。杨永康等^[14]通过对 67 例创伤性脑损伤患者血清 ficolin-3 水平检测发现,预后良好者发病后 24、48、72、120 h 血清 ficolin-3 水平出现上升趋势,进一步经 ROC 曲线分析发现,血清 ficolin-3 水平诊断敏感度、特异度分别为 82.19%、60.036%,与本研究观点一致,说明血清 ficolin-3 水平在评估重症颅脑损伤预后具有一定预测价值。

基于上述研究进一步经 KM 曲线分析发现,血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 异常表达可增加重症颅脑损伤患者死亡风险,应及时予以患者针对性治疗方案。

综上可知,血清 HMGB1、IGF-1、ficolin-3 水平在重症颅脑损伤中呈异常表达状态,并与神经功能损伤密切相关,动态监测上述血清水平,可为临床评估脑损伤程度、判断预后提供科学指导。

参考文献

- [1] Jiang WW, Wang QH, Liao YJ, et al. Effects of dexmedetomidine on TNF- α and interleukin-2 in serum of rats with severe craniocerebral injury [J]. BMC Anesthesiol, 2017, 17(1):130.
- [2] 张明哲,郭洪,孙昭胜,等.静息态功能磁共振在创伤性颅脑损伤昏迷患者损伤评估及预后预测中的研究[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(3):340-345.
- [3] 武晓灵,喻莉,龙鼎,等. suPAR 及 D-二聚体对创伤性颅脑损伤患者病情严重程度及预后的判断价值[J].实用医学杂志,2017,33(2):234-237.
- [4] 安吉洋,庞宏刚,宋锦宁.抑制 JAK2/STAT3 下调 HMGB1 表达及核转位减轻蛛网膜下腔出血后早期脑损伤[J].中华神经医学杂志,2018,17(4):356-363.
- [5] 桂新,刘士平,徐裕海,等.原发性高血压患者血清 ficolin-3、免疫球蛋白、补体及 CRP 水平研究[J].大连医科大学学报,2016,38(4):367-370.
- [6] Firsching R, Rickels E, Mauer UM, et al. Guidelines for the Treatment of Head Injury in Adults[J]. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2017, 78(5):478-487.
- [7] 薛元峰,赵鹏来,杨平来,等.不同 GCS 评分颅脑损伤患者血清及 CSF 中 tau 及 A β 42 水平及其临床意义[J].卒中与神经疾病,2017,24(3):189-192.
- [8] 王宝,孙媛,宋康,等.应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(1):39-43.
- [9] Xia P, Pan Y, Zhang F, et al. Pioglitazone Confers Neuroprotection Against Ischemia-Induced Pyroptosis due to its Inhibitory Effects on HMGB-1/RAGE and Rac1/ROS Pathway by Activating PPAR- γ [J]. Cell Physiol and Biochem, 2018, 45(6):2351-2368.
- [10] 郭义君,郑平,童武松,等.急性颅脑损伤病人血清 IGF-1 动态变化与认知功能障碍的相关性研究[J].中国微侵袭神经外科杂志,2017,22(6):241-244.
- [11] Kostereva NV, Wang Y, Fletcher DR, et al. IGF-1 and Chondroitinase ABC Augment Nerve Regeneration after Vascularized Composite Limb Allotransplantation [J]. PLoS One, 2016, 11(6):e0156149.
- [12] 黄从刚,段发亮,吴京雷,等.颅脑损伤患者 Homer1a 蛋白表达及其与神经元损伤、凋亡的关系研究[J].中华神经医学杂志,2017,16(6):595-598.
- [13] Pan JW, Gao XW, Jiang H, et al. Low serum ficolin-3 levels are associated with severity and poor outcome in traumatic brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12(1):226.
- [14] 杨永康,张亦文.创伤性脑损伤患者血清 ficolin-3 水平与损伤程度和预后的相关性分析[J].医学临床研究,2018,35(7):1423-1425.
- [11] 秦明明,黄雨馨,陈雪梅,等. LP-PLA2 与 sd-LDL 联合检测对动脉粥样硬化的辅助诊断价值[J].中华检验医学杂志,2019,42(1):38-43.
- [12] Gellen B, Thorin-Trescases N, Sosner P, et al. ANGPTL2 is associated with an increased risk of cardiovascular events and death in diabetic patients [J]. Diabetologia, 2016, 59(11):2321-2330.
- [13] 孙清森,孙连生,徐建利,等.结肠癌患者组织中 AKT2、Annexin A1 表达水平及其临床意义[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):194-197,208.
- [14] 何攀文,黄玲,李霞,等.血清脂联素、瘦素及两者比值与冠状动脉病变的相关性研究[J].现代医学,2016,44(5):670-672.
- [15] He J, Yi B, Chen Y, et al. The ET-1-mediated carbonylation and degradation of ANXA1 induce inflammatory phenotype and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in HPS[J]. PLoS One, 2017, 12(4):e0175443.
- [16] 霍倩倩,孔营.利伐沙班对 apoE $^{-/-}$ 小鼠颈动脉粥样硬化斑块内炎症因子表达的影响[J].心脏杂志,2016,28(5):531-533.
- [17] 梁蓉.颈动脉超声联合血清五聚素 3、脂蛋白相关磷脂酶 A2 检测对动脉粥样硬化脑梗死的诊断价值[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(9):791-795.

(上接第 88 页)

血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白在AP患者中的变化及其意义

王长起¹ 李凯¹ 索胜利^{2*}

[摘要] **目的** 探讨血尿酸淀粉酶、C反应蛋白(CRP)、胱天蛋白酶募集域蛋白9(Card9)在急性胰腺炎(AP)患者中的表达及其意义。**方法** 选取本院2014年6月至2016年12月确诊的128例AP患者(AP组)、年龄及性别相匹配的健康自愿者64例(对照组),采用全自动生化法检测两组的血尿酸淀粉酶、血清CRP水平,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测两组外周血单核细胞中Card9蛋白表达水平,并根据AP患者病情分为轻症AP、重症AP进行分层分析。**结果** AP组患者的血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平均显著的高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);重症AP组患者的血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平均显著的高于轻症AP组患者,差异具有统计学意义($P<0.05$);AP组患者的血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平与Ranson评分均呈显著的正相关关系($P<0.05$)。**结论** AP患者血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平升高显著,并且与病情的严重程度具有一定的相关性。

[关键词] 淀粉酶; C反应蛋白; 胱天蛋白酶募集域蛋白9; 急性胰腺炎

Changes and significance of hematuria, amylase, CRP and Card9 protein in patients with acute pancreatitis

WANG Zhangqi¹, LI Kai¹, SUO Shengli^{2*}

(1. Department of general surgery, Nanyang Oilfield General Hospital, Nanyang, Henan, China, 473132;

2. Department of clinical laboratory, Nanyang Oilfield General Hospital, Nanyang, Henan, China, 473132)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and significance of hematuria, CRP and Card9 in patients with AP. **Methods** A total of 128 AP patients (AP group) confirmed to be diagnosed from June 2014 to December 2016 in our hospital and 64 healthy volunteers (control group) matched with age and gender were recruited. The levels of hematuria amylase and serum CRP were detected by automatic biochemical method. The expression of Card9 protein in peripheral blood mononuclear cells was detected by ELISA. According to the condition of AP patients, they were divided into mild AP and severe AP for stratified analysis. **Results** The levels of hematuria amylase, CRP and Card9 protein in the AP group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of hematuria amylase, CRP, and Card9 protein in the severe AP group were significantly higher than those in the mild AP group ($P<0.05$). The serum urinary amylase, CRP, and Card9 protein levels in the AP group had a significant positive correlation with the Ranson score ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of hematuria amylase, CRP, and Card9 protein in AP patients increased significantly, and there was a certain correlation with the severity of the disease.

[KEY WORDS] Amylase; C-reactive protein; Caspase recruitment domain protein 9; Acute pancreatitis

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201708216)

作者单位:1. 南阳油田总医院普外科, 河南, 南阳 473132

2. 南阳油田总医院检验科, 河南, 南阳 473132

*通信作者:王长起, E-mail: wangfengzx@163.com

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 的发病率维持在 (217~383)/1 万人左右^[1], 在具有不良饮食习惯或者局部胆道系统疾病的人群中, AP 的发病率进一步的上升。AP 的发生能够导致患者多器官功能衰竭的发生, 增加患者的临床预后恶化的风险^[2]。生物学因子的改变能够导致胰腺导管上皮细胞的损伤, 增加腺体导管的张力, 促进胰消化酶对于自身组织的损伤。在胰腺导管破裂的过程中, 淀粉酶的释放能够为早期诊断 AP 提供重要的参考, 同时上升的淀粉酶还能够参与到 AP 患者局部胰腺组织损伤和炎症反应的扩散过程中^[3]; C 反应蛋白 (C reactive protein, CRP) 的上升能够诱导下游单核细胞或者巨噬细胞上调, 促进炎症因子 IL-8 对于胰腺组织的浸润过程^[4]; 胱天蛋白酶募集域蛋白 9 (caspase recruitment domain protein 9, Card9) 的上升能够诱导炎症信号通路的激活, 参与到 AP 患者的病情进展过程中^[5]。为了揭示血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白在 AP 患者中的变化及其意义, 本次研究探讨了不同指标的表达特点及其与患者病情的关系, 从而为临床上 AP 患者的诊疗提供定量化参考指标。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取南阳油田总医院 2014 年 6 月至 2016 年 12 月确诊的 128 例 AP 患者为 AP 组、年龄及性别相匹配的健康自愿者 64 例为对照组。AP 组的年龄 27~65 岁, 平均 (39.9±11.5) 岁, 男性 70 例、女性 58 例, 其中轻症 AP 患者 96 例 (Ranson 评分 <3 分)、重症 AP 患者 32 例 (Ranson 评分 ≥3 分), 入院时 AP 患者的 Ranson 评分 (1.59±0.72) 分。对照组的年龄 25~65 岁, 平均 (41.4±14.0) 岁, 男性 37 例、女性 27 例。两组研究对象的年龄、性别比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

纳入标准: ① AP 患者的诊断及病情分级标准参考中华医学会制定的《急性胰腺炎诊治指南 2014 年版》标准^[5]; ② 患者年龄范围 19~65 岁; ③ 患者入院后接受内科治疗; ④ 入院后 24 h 内完成本研究相关标本的采集, 本研究获得研究对象或其家属的知情同意。排除标准: ① 胰腺癌; ② 伴有其他部位恶性肿瘤; ③ 伴有免疫性疾病; ④ 伴有感染性疾病; ⑤ 长期酗酒、慢性肝肾功能疾病。

1.2 血尿淀粉酶、CRP 检测方法

清晨采集空腹静脉血, 1 000 r/min 离心 10 min, 分离采集上层血清, 采集标本后检测血尿淀粉酶、CRP。采用全自动生化分析仪 (美国雅培 i2000) 及试剂盒, 检测试剂盒购自福建新大陆生物技术有限公司。

Ranson 评分系统包括入院时的 5 项临床指标和 48 h 的 6 项指标, 各项分别为 1 分, 合计 11 分, 评分在 3 分及以上时即为重症胰腺炎 (Severe acute pancreatitis, SAP)。

1.3 Card9 蛋白的检测

清晨采集空腹静脉血 5 mL, 加入 Card9 蛋白抗体, PBS 液体洗涤 5 min。按照 1:500 的比例加入羊标志的一抗 5 mL, 4℃ 放置过夜, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入鼠来源的二抗 (1:1 000) 2 mL, 室温放置 2 h, PBS 液体洗涤 5 min。加入显色底物, 辣根过氧化物酶会使无色的显色剂现蓝色, 加终止液变黄。在 450 nm 处测 OD 值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件, 计量数据表述采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据统计分析采用 t 检验; 计数资料用 (%) 表示, 采用 χ^2 检验; 相关性分析采用 Pearson 线性相关分析法; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组的血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白水平比较

入院后 AP 组患者的血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白水平均显著的高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

2.2 不同病情程度的 AP 患者血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白水平比较

重症 AP 组患者的血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白水平均显著的高于轻症 AP 组患者, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

2.3 血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白与 Ranson 评分的相关性分析

128 例 AP 患者, 入院 48 h 后 Ranson 评分为 (2.11±0.80) 分, 血尿淀粉酶、CRP、Card9 蛋白水平与 Ranson 评分均呈显著的正相关关系 ($P<0.05$), 见表 3。

表1 两组的血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平比较 [(n, ($\bar{x} \pm s$))]Table 1 Comparison of blood urease amylase, CRP and Card9 protein levels in two groups [(n, ($\bar{x} \pm s$))]

组别	n	血尿酸淀粉酶(U/L)	尿酸淀粉酶(U/L)	CRP(mg/L)	Card9蛋白(相对表达强度)
AP组	128	834.6±149.2	2 115.8±251.8	94.0±26.9	0.92±0.21
对照组	64	71.2±17.8	549.5±106.2	3.2±1.2	0.34±0.11
t值		40.736	47.640	104.357	20.702
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

表2 不同病情程度的AP患者血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平比较 [(n, ($\bar{x} \pm s$))]Table 2 Comparison of serum amylase, CRP and Card9 protein levels in AP patients with different degrees of disease [(n, ($\bar{x} \pm s$))]

组别	n	血尿酸淀粉酶(U/L)	尿酸淀粉酶(U/L)	CRP(mg/L)	Card9蛋白(相对表达强度)
轻症AP组	96	767.2±120.7	1 839.5±239.6	81.5±21.4	0.75±0.18
重症AP组	32	1 044.2±142.8	2 559.2±220.4	120.3±25.0	1.15±0.20
t值		-10.720	-14.998	-8.509	-10.585
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

表3 血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白与Ranson评分的相关性分析

Table 3 correlation analysis between serum and urine amylase, CRP, Card9 protein and Ranson score

指标	Ranson评分	
	r值	P值
血尿酸淀粉酶	0.772	0.00
尿酸淀粉酶	0.753	0.00
CRP	0.628	0.00
Card9蛋白	0.754	0.00

3 讨论

过度饮酒、胆道系统疾病及遗传易感因素等,均可以促进急性胰腺炎的发生发展,特别是在家族史的患者中,胰腺炎的发病率更高,可较普通人群上升3~4倍。胰腺炎特别是重症胰腺炎的远期生存指标较差,五年生存率不足35%,病死率可达15%以上^[6]。通过早期进行诊断,可以提高胰腺炎病情缓解率,降低病死率,并改善远期临床预后指标。临床上主要采用影像学检查的方式进行筛查,但影像学检查难以在基层医院广泛普及,且检查费用相对较高、检查时间较长,临床应用具有一定的局限性。血清学指标检测具有方便、经济、短期内可反复测量的优点,在消化系统疾病的筛查中发挥了重要的作用。

CRP作为炎症反应蛋白家族成员,其能够在促进氧化应激损伤或者加剧细胞膜的不稳定性等方面发挥了重要作用,CRP蛋白还能够通过影响细胞膜上钙离子通道的开放,进一步加剧胰腺组织的缺血再灌注损伤^[7-8];血尿酸淀粉酶的改变能够评估患者体内胰腺导管破裂损伤过程中自身消化酶的释放情况,血尿酸淀粉酶的上升能够在发病早期即可出现显著的改变,同时在评估病情的进展风险方面能够发挥一定的作用^[9-10];Card9蛋白的表达能够诱导体内的炎症信号通路的激活,提高NF-KB的激活程度,增加MAPK信号通路激活过程中炎症因子的合成和释放^[11-12]。基础领域相关的研究还显示,Card9蛋白能够影响诱导巨噬细胞的激活,促进下游炎症性细胞对于胰腺组织的浸润。目前临床上多数研究探讨了CRP或者血尿酸淀粉酶在AP患者中的高表达情况,认为血尿酸淀粉酶或者CRP的上升与AP患者的病情密切相关,但对于Card9蛋白的分析研究较少。

本次研究分析了AP患者血清中相关生物学指标的表达,发现血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白均明显的上升,高于正常对照人群血清学指标,提示了血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白均可能影响到AP的病情发生和进展过程,荟萃国内外相关文献,笔者认为血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白的上升主要与下列几个方面的因素有关^[13-14]:①血尿酸淀粉酶的上升主要考虑与胰腺导管的破坏导致的自身消

化酶的释放有关;②CRP的上升主要由于自身组织损伤过程中诱导的炎症因子的富集过程有关,消化酶对于自身胰腺组织的破坏和分解作用,能够诱导单核细胞的激活,提高CRP的合成和释放的速度;③Card9蛋白是重要的炎症信号通路因子,其对于MAPK信号通路的激活,能够诱导钙离子负载效应,增加胰腺上皮细胞膜完整性的破坏,并能够诱导线粒体的损伤。王海等^[12]研究者在AP中,CRP的上升幅度可超过28%,特别是在合并有自身基础疾病的AP患者,CRP的上升更为明显,远期的多器官功能衰竭或者病死率均可进一步的上升。在不同病情的AP患者中,病情较重的AP患者中,血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白均可进一步的上升,提示了不同指标与AP患者的病情密切相关,这主要由于在腹膜损伤、胰腺组织破坏和继发性的炎症瀑布反应过程中,机体应激状态下的肾上腺髓质系统可显著的激活,巨噬细胞或者间质细胞释放CRP、Card9蛋白的速度可显著的上升。但部分学者并未发现Card9蛋白的表达与AP患者的病情程度具有线性的关系,这可能与Card9蛋白的检测时机或者AP病情的评估标准的不一有关。AP的病情严重程度评分(Ranson评分)是评估患者预后的重要体系,相关关系分析可见,血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平与Ranson评分均呈显著的正相关关系,提示了血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白与AP的病情具有一定的相关性。

本次研究的创新性在于探讨了Card9蛋白的表达与AP患者的临床病理特征的关系。综上所述,AP患者血尿酸淀粉酶、CRP、Card9蛋白水平升高显著,并且与病情的严重程度具有一定的相关性。

参考文献

- [1] Israel JS, Rettammel RJ, Levenson GE, et al. Does Postoperative Drain Amylase Predict Pancreatic Fistula after Pancreatic atectomy[J]. *J Am Coll Surg*, 2014, 218(5): 978-987.
- [2] Carpenter D, Dhar S, Mitchell LM, et al. Obesity, starch digestion and amylase: association between copy number variants at human salivary (AMY1) and pancreatic (AMY2) amylase genes[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(12): 3472-3480.
- [3] Coizet B, Nicoloso L, Marletta D, et al. Variation in Salivary and Pancreatic Alpha-Amylase Genes in Italian Horse Breeds[J]. *J Hered*, 2014, 105(3): 429-435.
- [4] 徐磊,赵荣平,秦蓉,等. C-反应蛋白和降钙素原对急性胰腺炎的诊断效能分析[J]. *上海医学*, 2014, 37(4): 331-335.
- [5] 许宏敏. CARD9在老年急性胰腺炎发病早期阶段的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(17): 4258-4260.
- [6] Dugalic VD. Drain amylase value as an early predictor of pancreatic fistula after cephalic duodenopancreatectomy [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(26): 8691-8693.
- [7] 谢圣高,胡玉倩,饶绘,等. 淀粉酶、脂肪酶和C-反应蛋白检测对急性胰腺炎的诊断意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(20): 2946-2948.
- [8] 吕春阳,陈志勇,王浩. 血清C-反应蛋白与乳酸脱氢酶评价急性胰腺炎预后的临床研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(23): 5809-5811.
- [9] Zhang C, Liu J, Yu W, et al. Susceptibility to corrosion of laser welding composite arch wire in artificial saliva of salivary amylase and pancreatic amylase [J]. *Mater Sci EngC*, 2015, 55(6): 267-271.
- [10] Rompianesi G, Hann A, Komolafe O, et al. Serum amylase and lipase and urinary trypsinogen and amylase for diagnosis of acute pancreatitis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 32(8): 90-93.
- [11] 翁成钊,徐萍,杨志文,等. 胱天蛋白酶募集域蛋白9在急性胰腺炎发病早期的作用机制[J]. *中华消化杂志*, 2015, 35(9): 624-629.
- [12] 王海,张纯,蓝海峰. Card9蛋白的表达在重症急性胰腺炎发病机制中的作用[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2017, 23(4): 265-267.
- [13] 李卫,周筱筠,卢先州,等. 重症急性胰腺炎大鼠血清Ape-lin、C反应蛋白及肿瘤坏死因子- α 水平变化及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(9): 2080-2082.
- [14] 郭湖坤,倪晓斌,彭启全,等. 血清降钙素原和C反应蛋白在重症急性胰腺炎并感染性胰腺坏死中的变化及意义[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(19): 3195-3196.

AMI患者发病后血浆UCA1、CK-MB、cTnI变化及其诊断价值分析

肖丹丹^{1*} 张勇² 陈秀红¹ 苏娅³ 黄志萍⁴

[摘要] 目的 分析急性心肌梗死(AMI)患者发病后血浆尿路上皮癌相关1(UCA1)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)、肌钙蛋白I(cTnI)变化及其诊断价值。方法 选取2016年7月至2017年6月本院收治的80例AMI患者及30例健康志愿者为研究对象,分别纳入AMI组、对照组,采用实时荧光定量聚合酶链反应法(qPCR)检测UCA1,比较两组入院后0~2、2~6、6~12、12~24、24~48、48~72、72~96 h血浆UCA1及CK-MB、cTnI水平,分析AMI组中合并不同基础疾病(高血压、糖尿病、高脂血症)患者UCA1、CK-MB、cTnI水平差异。结果 与对照组比较,AMI组UCA1整体表达水平下调,且AMI组入院后0~48 h UCA1低于对照组($P<0.05$),AMI组中UCA1在6~12 h降至最低($P<0.05$),后升高($P<0.05$),至入院后48~72 h、72~96 h与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);AMI组入院后2~48 h CK-MB、cTnI水平高于对照组($P<0.05$),CK-MB在6~12 h达峰值,cTnI在12~24 h达峰值($P<0.05$);AMI组中单纯AMI、合并高血压、合并糖尿病、合并高脂血症、合并2种及以上患者UCA1、CK-MB、cTnI表达水平分别两两比较差异无统计学意义($P>0.05$);入院后6~12 h UCA1诊断AMI的灵敏度、特异度、准确度、ROC曲线下面积分别为85.42%、83.14%、86.11%、0.954,均较CK-MB、cTnI高。结论 AMI患者发病后血浆UCA1表达水平可作为其潜在诊断标志物及治疗靶点,尤其在入院后6~12 h的UCA1有较高监测价值。

[关键词] AMI; qPCR; UCA1; CK-MB; cTnI

Changes of Plasma UCA1, CK-MB and cTnI in Patients with AMI after Onset and Their Diagnostic Value

XIAO Dandan^{1*}, ZHANG Yong², CHEN Xiuhong¹, SU Ya³, HUANG Zhiping⁴

[1. Physical Examination Center, Hainan Provincial Cadre Sanatorium (Hainan Provincial Geriatric Hospital), Haikou, Hainan, China, 571100; 2. Department of Cardiovascular, Hainan Provincial Cadre Sanatorium (Hainan Provincial Geriatric Hospital), Haikou, Hainan, China, 571100; 3. Department of Nursing, Hainan Provincial Cadre Sanatorium (Hainan Provincial Geriatric Hospital), Haikou, Hainan, China, 571100; 4. Department of Quality Control, Hainan Provincial Cadre Sanatorium (Hainan Provincial Geriatric Hospital), Haikou, Hainan, China, 571100]

[ABSTRACT] Objective To analyze the changes of plasma urothelial carcinoma associated 1 (UCA1), C reatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) and cardiac troponin I (cTnI) in patients with acute myocardial infarction (AMI) after onset and their diagnostic value. Methods 80 cases of AMI patients and

基金项目:海南省自然科学基金面上项目项目任务书(818MS180)

作者单位:1. 海南省干部疗养院(海南省老年病医院)体检中心,海南,海口 571100

2. 海南省干部疗养院(海南省老年病医院)心血管科,海南,海口 571100

3. 海南省干部疗养院(海南省老年病医院)护理部,海南,海口 571100

4. 海南省干部疗养院(海南省老年病医院)质控科,海南,海口 571100

*通信作者:肖丹丹, E-mail:lpvjddxr7xn@sina.com

30 cases of healthy volunteers admitted to the hospital from July 2016 to June 2017 were selected for the study and they were included between the two groups respectively. UCA1 was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The levels of UCA1, CK-MB and cTnI at 0~2, 2~6, 6~12, 12~24, 24~48, 48~72 and 72~96 h after admission were compared between AMI group and the control group. The differences in levels of UCA1, CK-MB and cTnI in patients with AMI combined with different underlying diseases (hypertension, diabetes mellitus, hyperlipemia) were analyzed. The diagnostic value of UCA1, CK-MB and cTnI for AMI was evaluated. **Results** Compared with the control group, the overall expression levels of UCA1 in the AMI group were down-regulated. The UCA1 level in the AMI group within 0~48 h after admission was lower than that in the control group ($P<0.05$). The UCA1 level in AMI group was decreased to the lowest at 6~12 h ($P<0.05$) and then increased ($P<0.05$). There was no significant difference in the UCA1 level at 48~72 and 72~96 h after admission between the two groups ($P>0.05$). The levels of CK-MB and cTnI were higher in the AMI group than in the control group at 2 to 48h after admission ($P<0.05$). The CK-MB reached the peak at 6~12 h and the cTnI reached the peak at 12~24 h in AMI group ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression levels of UCA1, CK-MB and cTnI between patients with simple AMI, complicated with any two or more of hypertension, diabetes mellitus and hyperlipidemia ($P>0.05$). The sensitivity, specificity, accuracy and area under the ROC curve were 85.42%, 83.14%, 86.11% and 0.954 respectively in the diagnosis of AMI by UCA1 at 6~12 h after admission, higher than those by CK-MB and cTnI. **Conclusion** The UCA1 expression level in AMI patients after onset may be a potential diagnostic marker and therapeutic target, especially with high monitoring value when UCA1 is at 6~12 h after admission.

[KEY WORDS] AMI; qPCR; UCA1; CK-MB; cTnI

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是临床主要急诊危重疾病, 其发病率在近年来呈升高及年轻化趋势, AMI 发病后 1 h 内得到救治, 病死率约为 1%, 若在 6 h 后得到救治病死率为 10%~12%^[1]。常用的心肌损伤标志物如肌酸激酶同工酶 MB (creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)、肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 诊断 AMI 缺乏特异性、灵敏度低、检测窗口期短, 在某些心脏及非心脏疾病中可出现假性升高, 因此寻找早期诊断 AMI 的高敏感性与特异性的新标志物十分必要^[2]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lnc RNA) 为一种长度在 200 nt 以上、不编码蛋白质的 RNA, 曾被认为是“基因翻译的噪音”, 无具体生物学功能^[3]。lnc RNA 在调节基因表达的过程中发挥重要作用, 且有编码微肽的潜在潜能^[4], 而尿路上皮癌相关 1 (urothelial carcinoma associated 1, UCA1) 是一种重要的 lnc RNA, 膀胱恶性肿瘤中 UCA1 有促进葡萄糖消耗及乳酸生成作用, 推测 UCA1 在心脏供能中可能也起重要作用, 在 AMI 凋亡或坏死的心肌细胞中可能释放出 UCA1, 并在其血液中检测到^[5]。本文分析 AMI 患者发病后血浆 UCA1 变化及其诊断价值, 现报告如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 2016 年 7 月至 2017 年 6 月本院收治的 AMI 患者 80 例 (AMI 组), 符合相关诊断标准^[6]。AMI 纳入标准: ①有典型 AMI 临床表现、特征性心电图改变、血清心肌标志物水平动态改变, 满足其中 2 项及以上; ②对本研究知情同意并签署知情同意书。排除标准: ①既往有心力衰竭、心肌病、房颤等心脏疾病史; ②合并明确的恶性肿瘤; ③近期内接受过外科手术或有肌肉损伤史等可能影响肌源性 lnc RNAs 水平的因素。另选取同期入院体检的健康志愿者 30 例为对照组, 均于本院行心血管内科冠状动脉造影检查, 排除冠心病的诊断。AMI 组男 47 例, 女 33 例, 年龄 46~59 岁, 平均 (51.25±5.15) 岁; 合并基础疾病: 高血压病史 34 例, 糖尿病病史 21 例, 高脂血症病史 51 例, 合并两者及以上基础疾病 23 例, 对照组男 14 例, 女 16 例, 年龄 45~60 岁, 平均 (51.23±5.13) 岁, 2 组一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 有可比性。本研究获得院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 AMI 基础检查

入院后 24 h 内行病例采集, 包括常规体检、实

实验室检查(血常规、血生化)、心电图与心脏彩超等。

1.2.2 主要仪器与试剂

荧光定量PCR仪(LightCycler 480 II型)购自瑞士Roche公司;全自动生化分析仪(7600型)购自日本Hitachi公司;全自动免疫化学发光仪(ACCESS2型)购自美国Beckman公司。CK-MB、cTnI检测试剂盒均购自基蛋生物科技股份有限公司;Trizol试剂盒、miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRNA荧光定量检测试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2.3 UCA1、CK-MB、cTnI水平测定

1.2.3.1 血样采集 对照组仅取入院0~2 h进行血样采集,AMI组于入院0~2、2~6、6~12、12~24、24~48、48~72、72~96 h进行血样采集。

1.2.3.2 CK-MB、cTnI、UCA1水平测定 将每例研究对象采集到的2管静脉血,一管送检心肌损伤标志物,采用酶法连续监测法以全自动生化分析仪测定CK-MB,应用微粒子化学发光法以全自动免疫化学发光仪测定cTnI。

另一管静置在4℃冷藏30 min用于测定UCA1。测定方法:①取上述血样本,在室温、3 000 rpm离心15 min,留取上层血浆,经1% DEPC水浸泡过夜、消毒、烘干备用;②将分离所得血浆置于冰上融化,取250 μL血浆样品,加入750 μL Trizol,振荡器混匀后静置5 min,加入200 μL 氯仿,振荡器混匀后静置10 min,室温下离心12 000 rpm、10 min,留取上清液并量取体积;③将上清液转移至另一无Rnase的EP管,加入等体积异丙醇混匀,后离心、加入1 mL 75%乙醇、离心、晾干、溶解RNA、分光光度计测定总RNA浓度、纯度;④将RNaseFree的反应管内试剂在68℃水浴箱中静置5 min,取出放入冰盒,配制反应液,短暂离心混匀后置于37℃水浴箱中60 min合成cDNA;⑤冰上融化2×qPCR SuperMix、上游引物及下游引物,配制反应体系(2×qPCR SuperMix 10 μL,上游引物(ACGCTAACTGGCACCTTGTT) 0.5 μL,下游引物(TGGGGATTACTGGGGTAGGG) 0.5 μL,内参照引物:U6 RNA上游引物:GCTTCGGCAG-CACATATACTAAAAT, U6 RNA下游引物:U6 RNA下游引物:CGCTTCACGAATTTGCGTGT-CAT, cDNA模板1 μL, ddH₂O 8 μL),短暂离心混匀,并设定qPCR反应程序(95℃ 1 min, 1次; 95℃

20 s, 61℃ 31 s, 循环45次),测定lnc RNA。UCA1相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算, Ct为目标扩增产物达到设定阈值所经历的循环次数。

1.2.4 AMI治疗

确诊后所有患者卧床3 d以上,均持续心电监护,并对症给予吸氧、镇静止痛、再灌注、抗心律失常等治疗。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行t检验,应用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析UCA1、CK-MB、cTnI对AMI的诊断效能, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMI组、对照组血浆UCA1、CK-MB、cTnI水平比较

与对照组相比,AMI组入院后整体UCA1表达水平先下调,后上调;具体情况。见表1。

2.2 AMI组中合并不同疾病患者UCA1、CK-MB、cTnI表达水平比较

单纯AMI、合并高血压、合并糖尿病、合并高脂血症、合并2种及以上基础疾病患者UCA1、CK-MB、cTnI表达水平分别两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.3 UCA1、CK-MB、cTnI诊断AMI的效能分析

取AMI组入院后6~12 h血浆样本20份,分析UCA1、CK-MB、cTnI水平诊断AMI的效能。结果显示UCA1诊断AMI的灵敏度、特异度、准确度、ROC曲线下面积分别为85.42%、83.14%、86.11%、0.954均高于CK-MB诊断AMI的灵敏度、特异度、准确度、ROC曲线下面积分别为63.45%、78.96%、75.68%、0.769和cTnI诊断AMI的灵敏度、特异度、准确度、ROC曲线下面积分别为67.89%、78.15%、71.57%、0.853。见图1。

3 讨论

传统心电图检查、心肌酶谱是AMI的重要诊断方法,但部分AMI患者心电图早期表现不明显,临床鉴别诊断较困难,难达指南要求^[7]。人类基因组测序结果表明,全基因组中70%~90%基因进行转录,仅不到2%基因最终翻译为蛋白,这些不具有蛋白编码功能的基因组序列曾一度被认为是

表1 AMI组、对照组血浆UCA1、CK-MB、cTnI水平比较
[$n, (\bar{x} \pm s), h$]

Table 1 Comparison of plasma UCA1, CK-MB and cTnI levels between AMI group and control group [$n, (\bar{x} \pm s), h$]

指标	组别	AMI组 ($n=80$)	对照组 ($n=30$)	t 值	P 值
UCA1 表达					
入院后	0~2	0.96±0.09 ^a	1.02±0.11	2.926	0.004
入院后	2~6	0.61±0.08 ^a	1.02±0.11	21.505	0.000
入院后	6~12	0.46±0.05	1.02±0.11	36.708	0.000
入院后	12~24	0.48±0.07 ^a	1.02±0.11	30.513	0.000
入院后	24~48	0.95±0.06 ^a	1.02±0.11	4.263	0.000
入院后	48~72	0.99±0.09 ^a	1.02±0.11	1.463	0.146
入院后	72~96	1.03±0.15 ^a	1.02±0.11	0.333	0.740
CK-MB(U/L)					
入院后	0~2	14.25±1.57 ^a	13.99±1.48	0.785	0.434
入院后	2~6	54.23±5.65 ^a	13.99±1.48	38.416	0.000
入院后	6~12	126.45±14.12	13.99±1.48	43.411	0.000
入院后	12~24	112.14±13.48 ^a	13.99±1.48	39.678	0.000
入院后	24~48	97.56±9.85 ^a	13.99±1.48	46.146	0.000
入院后	48~72	86.54±8.77 ^a	13.99±1.48	44.946	0.000
入院后	72~96	76.98±8.02 ^a	13.99±1.48	42.629	0.000
cTnI(ng/mL)					
入院后	0~2	0.31±0.04 ^b	0.29±0.07	1.874	0.064
入院后	2~6	0.71±0.08 ^b	0.29±0.07	25.333	0.000
入院后	6~12	3.60±0.38 ^b	0.29±0.07	47.279	0.000
入院后	12~24	6.75±0.69	0.29±0.07	51.035	0.000
入院后	24~48	5.87±0.59 ^b	0.29±0.07	51.519	0.000
入院后	48~72	5.43±0.56 ^b	0.29±0.07	49.985	0.000
入院后	72~96	5.10±0.55 ^b	0.29±0.07	47.621	0.000

注:与同组入院后6~12h比较,^a $P<0.05$;与同组入院后12~24h比较,^b $P<0.05$ 。

表2 AMI组中合并不同疾病患者UCA1、CK-MB、cTnI表达水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of UCA1, CK-MB and cTnI expression levels in patients with different diseases in the AMI group [$n, (\bar{x} \pm s)$]

是否合并基础疾病	类型	n	UCA1 表达水平	CK-MB(U/L)	cTnI(ng/mL)
合并	高血压	34	0.47±0.08	110.43±12.59	6.24±0.65
	糖尿病	21	0.49±0.09	109.48±10.29	6.31±0.64
	高脂血症	51	0.51±0.10	111.24±12.39	6.27±0.65
	合并2种及以上	23	0.47±0.07	108.97±11.23	6.30±0.67
不合并	-	29	0.48±0.05	110.18±11.69	6.28±0.65

入院6~48h UCA1 呈明显下调趋势,提示此期AMI患者心肌细胞损伤较严重,而经对症治疗后在48~96h时复常,因此UCA1有望作为诊断AMI的潜在生物学标志物及治疗潜在靶点^[14]。关于UCA1的作用机制,既往Pan等^[15]的研究证实miR-1可能通过影响体内有心肌保护作用的蛋白而加剧心肌损伤,体外实验^[16]发现过多表达的

“垃圾序列”,近年来随研究深入,此“垃圾序列”被重视,其中lncRNA参与X染色体沉默、基因组印记与染色质修饰等多种调控过程^[8]。UCA1是lncRNA中调节胚胎发育及癌症发生发展与侵袭转移的非编码RNA^[9],研究表明UCA1基因高表达开始于受精后早期胚胎发育过程中,在不同器官中表达水平不同,多在膀胱癌、胚胎中表达上调,而成人组织中,UCA1仅在心脏及脾脏中表达,且在心脏中表达水平较高,提示UCA1可能作为一种潜在的心脏特异性标志物,为心血管疾病的诊断及治疗提供更好方案^[10]。有研究表明UCA1还可抑制膀胱癌细胞增殖,促进细胞凋亡,推测UCA1可能也在心脏保护中发挥重要作用^[11]。

心肌酶谱中CK-MB可在AMI发生后4~6h升高,72h恢复正常,而cTnI是存在于心肌细胞中的参与肌肉收缩的重要横纹肌结构蛋白,心肌坏死后cTnI释放入血,在心肌损伤4~6h开始升高^[12]。本研究中结果表明UCA1可能具有更高的诊断价值。

AMI组入院后整体UCA1表达水平先下调,后上调,且AMI组入院后0~48h UCA1变化幅度与对照组比较差异显著,这与Yan等^[13]的报道结果相近,可见UCA1可能在维持AMI患者心脏功能过程中起着重要作用。但上述张滨^[8]也报道AMI患者入院后48~72h内患者UCA1仍较健康对照组下调,与上述不同的是,本研究中患者可能受研究对象年龄、地区、检测方法等因素影响,在

miR-1可促进H₂O₂诱导的心肌细胞凋亡,因此推测UCA1可能通过抑制miR-1表达来起到预防心肌损伤的作用。

比较AMI中合并多种基础疾病患者的UCA1水平,发现AMI组中单纯AMI、合并高血压、糖尿病、合并高脂血症、合并2种及以上基础疾病患者UCA1表达水平两两比较差异无显著性,这与上述

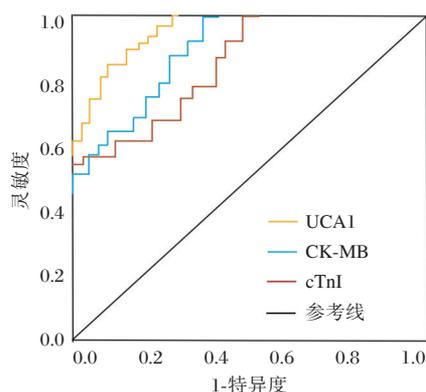


图1 UCA1、CK-MB、cTnI水平诊断AMI的ROC曲线
Figure 1 ROC curve of AMI diagnosed by levels of UCA1, CK-MB and cTnI

张滨^[8]的研究结果相似,进一步明确了高血压、糖尿病等基础疾病对AMI患者UCA1表达无明显影响,有利于提高UCA1诊断AMI的灵敏度、特异度。

ROC曲线分析表明,UCA1诊断AMI的ROC曲线下面积为0.954,与Yan等^[17]学者的报道结果相近,但本研究也显示入院后6~12h UCA1诊断AMI的灵敏度、特异度、准确度相比于CK-MB、cTnI较好,这与上述研究结果不同,考虑与研究中血浆样本选取时间不同有关。国内一项基于Logistic回归和ROC曲线的综合评价^[18]结果发现,CK-MB、cTnI诊断早期AMI的灵敏度分别为62.1%、67.4%,准确度分别为75.5%、71.6%,可见CK-MB、cTnI对AMI诊断灵敏度严重不足,可能是因为心梗发生后0~6h内CK-MB、cTnI尚未释放入血,而UCA1则在发病后立即释放入血。选择AMI患者入院后6~12h血浆进行分析,此期为患者UCA1表达下调期,患者心肌损伤可能是最严重的,因而UCA1变化最明显,故对AMI的诊断价值较高。但在实际工作中也需注意检测准确性,因入院后6~12h血浆样本量中UCA1表达量少,建议多次检测后进行评估。

综上所述,AMI患者发病后UCA1、CK-MB、cTnI表达水平发生明显变化,其UCA1相比于传统CK-MB、cTnI具有更高检测价值,尤其在入院后6~12h UCA1表达水平呈最低状态,提示此期为最佳干预期,同时可将UCA1作为临床潜在治疗靶点。

参考文献

[1] 谢怀全,柴辉,方军.帕罗西汀联合酸枣仁汤治疗急性心肌梗死伴抑郁症的疗效观察[J].国际检验医学杂志,2015,36(2):76-78.

[2] 吴金斌,邹德学,周逵,等.高敏肌钙蛋白T和普通肌钙蛋白I在急性心肌梗死早期诊断中的临床应用价值[J].国际检验医学杂志,2016,37(13):1799-1800,1803.

[3] 刘兵,张爱泓,张贞,等.UCA1、核因子、口腔菌群与口腔癌发生发展的相关性[J].实用癌症杂志,2017,32(9):1423-1426.

[4] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome [J]. Nature, 2014, 509(7502):582-587.

[5] Li Z, Li X, Wu S, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes glycolysis by upregulating hexokinase 2 through the mTOR-STAT3/microRNA143 pathway [J]. Cancer Science, 2014, 105(8):951-955.

[6] 颜红兵.救治的精髓:提高再灌注治疗率,降低死亡率——ESC 2017版ST段抬高型急性心肌梗死管理指南解读[J].中国循环杂志,2017,32(suppl1):64-66.

[7] 闫先侠,孙晓,牛爱军,等.高敏肌钙蛋白T检测在急性心肌梗死诊断中临床应用[J].医学临床研究,2015,32(2):392-394.

[8] 张滨.长链非编码RNA(UCA1)在急性心肌梗死患者血浆中变化水平的研究[D].吉林大学,2015.

[9] 张哲,郭昊,董加强,等.长链非编码RNA UCA1在胃癌多药耐药中的作用研究[J].现代生物医学进展,2015,15(15):2811-2814,2819.

[10] Wang F, Li X, Xie X, et al. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion [J]. Febs Letters, 2008, 582(13):1919-1927.

[11] Wang T, Yuan J, Feng N, et al. Hsa-miR-1 downregulates long non-coding RNA urothelial cancer associated 1 in bladder cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10):10075-10084.

[12] 潘延平,王海燕.床旁快速心梗三合一检查在急性心肌梗死诊断中的临床应用价值[J].陕西医学杂志,2016,45(5):566-567.

[13] Yan Y, Zhang B, Liu N, et al. Circulating long noncoding RNA UCA1 as a novel biomarker of acute myocardial infarction[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016(1):8079372.

[14] 陈君,李蕾,陈国华,等.芪参益气滴丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究[J].中国现代医学杂志,2017,27(12):30-34.

[15] Pan Z, Sun X, Ren J, et al. miR-1 exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury in mouse models[J]. Plos one, 2012, 7(11):505-515.

[16] Tang Y, Zheng J, Sun Y, et al. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2 [J]. International Heart Journal, 2009, 50(3):377-387.

[17] Yan Y, Zhang B, Liu N, et al. Circulating Long Noncoding RNA UCA1 as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Infarction[J]. Biomed Resear ch International, 2016, 2016(1):1-7.

[18] 胡道军,郁淼,张洪磊,等.基于Logistic回归和ROC曲线综合评价IMA, NLR, hs-CRP和CK-MB联合检测对早期急性心肌梗死的诊断价值[J].现代检验医学杂志,2016,31(5):76-80.

急性髓细胞白血病患儿 miR-126 表达水平与预后的关系研究

容蓉 班奕* 周肖滢 王潇婷 王小明

[摘要] 目的 研究急性髓细胞白血病(AML)患儿 miR-126 表达水平与预后的相关性。
方法 选取2014年5月至2016年12月本院收治的AML患儿58例为研究对象,纳入研究组(高危、中危、低危分别16、20、22例),均接受AML标准治疗,同时以本院同期入院的30例非恶性病儿童作为对照组,采用TagMan RT-PCR法检测2组骨髓标本中 miR-126 表达量,依据出院时 miR-126 表达量相对水平将AML患儿分为高表达组、低表达组各29例,比较2组 miR-126 表达量、中位生存时间、无事件生存时间、中位生存率,并根据1年内随访结果将其分为完全缓解组、难治复发组、死亡组,对比3组 miR-126 表达量,同时分析AML患儿 miR-126 表达水平与预后的关系。
结果 研究组 miR-126 表达量明显高于对照组($P<0.05$),且研究组中 miR-126 表达量依次为高危患儿>中危患儿>低危患儿($P<0.05$);miR-126 高表达组 miR-126 表达量(1.52 ± 0.27)高于低表达组,而其中位生存时间(6.21个月)、无事件生存时间(5.34个月)短于低表达组(8.24个月、7.12个月),中位生存率96.55%低于低表达组($P<0.05$);完全缓解组出院时、末次随访时 miR-126 明显低于难治复发组、死亡组,难治复发组、死亡组 miR-126 表达水平差异也有统计学意义($P<0.05$);相关性分析结果显示AML患儿 miR-126 表达水平与中位生存时间、无事件生存时间、中位生存率呈负相关($P<0.05$)。
结论 AML患儿中 miR-126 呈高表达状态,且 miR-126 表达水平与患儿预后关系密切,因而临床可结合 miR-126 基因检测以提高初治AML患儿的预测准确性。

[关键词] 急性髓细胞白血病; miR-126; 中位生存时间; 无事件生存时间; 中位生存率

Relationship between miR-126 Expression and Prognosis in Children with Acute Myeloid Leukemia

RONG Rong, BAN Yi*, ZHOU Xiaoying, WANG Xiaoping, WANG Xiaoming

(Department of Pediatrics, Nanhai People's Hospital, Foshan, Guangdong, China, 528200)

[ABSTRACT] **Objective** To study the correlation between miR-126 expression and prognosis in children with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** 58 children with AML who were admitted to the hospital during the period from May 2014 to December 2016 were included in the study group (16, 20 and 22 cases in the high risk, moderate risk and low risk status). All of them were given standard treatment for AML. The 30 children without malignant disease who were admitted to the hospital during the same period were enrolled as the control group. The expression quantities of miR-126 in bone marrow samples of the two groups were detected by TagMan RT-PCR method. Children with AML were divided into the high expression group and the low expression group according to the relative levels of miR-126 expression quantity at discharge, 29 cases in each group. The miR-126 expression quantities, the median survival time, event-free survival time and median survival rate were compared between the two groups. The children were divided into the complete remission group, refractory recurrence group and death group according to the follow-up results within 1 year. The ex-

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2014A030313120)

作者单位:南海区人民医院儿科,广东,佛山 528200

*通信作者:班奕, E-mail: c7t1pk003e@sina.com

pression quantities of miR-126 were compared among the three groups. The relationship between miR-126 expression level and prognosis in children with AML was analyzed. **Results** The expression quantity of miR-126 in the study group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). In the study group, the expression quantity of miR-126 was the highest in high-risk children, followed by moderate-risk children and low-risk children ($P<0.05$). The miR-126 expression quantity in the high expression group (1.52 ± 0.27) was higher than that in the low expression group. The median survival time (6.21 months) and event-free survival time (5.34 months) were shorter than those in the low expression group (8.24 months, 7.12 months), and the median survival rate (96.55%) was lower than that in the low expression group ($P<0.05$). The miR-126 in complete remission group was significantly lower than that in refractory recurrence group and death group at discharge and at the last follow-up ($P<0.05$). There were significant differences in miR-126 expression level between refractory recurrence group and death group ($P<0.05$). Correlation analysis showed that the expression level of miR-126 in children with AML was negatively correlated with the median survival time, event-free survival time and median survival rate ($P<0.05$). **Conclusions** The miR-126 is highly expressed in AML children, and the expression level of miR-126 is closely related to the prognosis of children. Therefore, the miR-126 gene detection can be combined to improve the prediction accuracy for AML children of the initial treatment.

[KEY WORDS] Acute myeloid leukemia; miR-126; Median survival time; Event-free survival time; Median survival rate

急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)为一种异质性较强的血液系统恶性肿瘤,患者细胞对骨髓的侵袭抑制了红系和巨核系造血祖细胞的增殖,出现贫血及血小板减少。因白血病(acute leukemia, AL)原始细胞形态学相似,单一骨髓细胞显微镜检查诊断率约为80%,无法早期筛查及判断预后,因此明确其发病机制是关键^[1]。microRNA(miRNA,简称miR)参与细胞增殖、分化、凋亡、生长发育及肿瘤发生等众多生物学过程,研究表明miRNA可通过调控耐药相关基因或抑癌基因表达,而在肿瘤细胞化疗敏感性方面发挥重要作用,早期有学者指出miR-181a在急性淋巴细胞白血病患者、miRNA-125b在急性白血病中发挥作用^[2-3]。而miR-126也是miRNA家族中的一员,研究显示脐静脉内皮细胞来源的颗粒携带miRNA-126可促进单核细胞迁移,微颗粒作为载体可携带miRNAs介导细胞间信号传递,但miRNA-126在儿童AML中的表达水平及其与预后的关系研究较少^[4]。本文对miR-126表达水平及miR-126与预后的关系进行分析,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年5月至2016年12月本院收治的AML患儿58例,纳入研究组,均符合《儿童急性髓

细胞白血病诊疗建议》^[5]中AML诊断标准,纳入标准:①均首诊为AML,经骨髓形态学、细胞组织化学染色、细胞免疫分型、细胞遗传学及分子生物学检测确诊;②既往无肿瘤病史,年龄在14岁以下,确诊后采用标准化诱导方案进行化疗;③患儿监护人签署相关知情同意书。排除标准:①治疗相关性白血病、21三体综合征相关性白血病、中枢神经系统白血病、急性早幼粒细胞白血病等;②合并其他肿瘤或未按标准完善相关检查者。同时选取同期入院的非恶性病儿童(特发性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮)30例为对照组,研究组中男31例,女27例;年龄2~13岁,平均年龄(7.45 ± 1.11)岁,对照组中男16例,女14例;年龄1~13岁,平均年龄(7.42 ± 1.15)岁,2组在性别、年龄等一般资料方面对比差异无统计学意义($P>0.05$)。依据出院时miR-126表达量相对水平将58例AML患儿分为高表达组、低表达组各29例,另根据《儿童急性髓细胞白血病诊疗建议》^[5]将AML患儿分为临床高危、中危、低危各16、20、22例,并依据预后情况分为完全缓解组、难治复发组、死亡组各18、26、14例,各亚组间一般资料比较差异也无统计学意义($P>0.05$)。本研究经我院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂/仪器

7300 Real-time PCR仪购自美国 Applied Bio-

systems 公司, Power/PAC200 水平电泳仪购自美国 Bio-RAD 公司, 凝胶成像分析仪购自美国 UVP 公司。miRNA 提取、探针、逆转录试剂盒与 PCR 扩增酶均购自美国 Applied Biosystems 公司; 引物序列购自北京英俊生物技术有限责任公司。

1.2.1 miR-126 表达水平测定

从标本库中抽取其骨髓标本, 采用 TaqMan RT-PCR 法检测 2 组骨髓标本中 miR-126 的表达, 进行总 RNA 抽提及 miR-126 特定的 cDNA 反转录, miR-126 的提取依据试剂盒说明书进行操作, 测定其浓度及 OD260/280, 在 1.8~2.0 者用于实时 PCR 检测, 浓度调整至 2 ng/ μL , 依据 MicroRNA Assays 说明书进行操作, 选择 U6 作为内参照, 引物序列: miR126: 5' UCGUACCGUGAGUAAU-AAUGCG3', U6: 5' CGCTTCACGAATTTGCGT-GTCAT3', 均进行逆转录, 转录条件: 反应体系 15 μL [dNTP (100 mM) 0.15 μL , 逆转录酶 (50 U/ μL) 1.0 μL , 10 \times RT Buffer 1.5 μL , RNA 酶抑制剂 (20 U/ μL) 0.19 μL , 无 RNA 酶水 4.16 μL , RT-miR126/RT-U6 探针 3 μL , RNA 5 μL], 16 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 保持; 反应产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 依据产品说明书进行操作, PCR 扩增总体系: 20 μL [TaqMan 扩增酶 (20 \times) 1 μL , 无 RNA 酶水 7.67 μL , TagMan 2 \times Universal PCR Master Mix (No Amp Erase UNG 10.0 μL , 逆转录产物 1.33 μL], 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 19 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 40 个, 依据 CT 值, 分析以 β -action、U6 为内参照, 利用 Ct 值计算各组 miR-126 表达相对量, 相对量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{试验样本}) - \Delta\text{Ct}(\text{校准样本})$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\beta\text{-action})$, 基因表达差异的倍数即 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.2.2 AML 治疗方案

以柔红霉素 (daunorubicin, DNR)、阿糖胞苷 (cytarabine, Ara-C) [DA, 3+7 方案] 或 DNR、Ara-C 联合依托泊苷 (etoposide, VP16) [DAV, 3+7+3 方案] 进行治疗, 具体为: ① DA 方案: DNR 30 mg/($\text{m}^2 \cdot \text{d}$), 第 (1~3 天); Ara-C 100~200 mg/($\text{m}^2 \cdot \text{d}$), 第 (1~7 天); ② DAV 方案: DNR、Ara-C 同上, 另联合 VP16 100 mg/($\text{m}^2 \cdot \text{d}$), 第 (5~7 天)。待患儿获得骨髓缓解后, 继续按原方案完成 2 疗程巩固治疗; 巩固治疗后, 完成 5~6 次大剂量 Ara-C 为主的强化治疗, 前 3 次连续应用, 后 3 次与标准剂量 Ara-C 交替应用。总疗程 9~12 个月。

1.2.3 随访及预后判断

均完成 1 年随访, 完全缓解 (complete remission, CR)^[6]; 诱导缓解治疗后第 8 复查骨髓达缓解标准, 且持续 3 个月以上未见异常。难治复发性 AML 标准^[7]: ① 标准方案诱导化疗 2 个疗程未获得 CR; ② 第一次 CR 后 6 个月内复发; ③ 第一次 CR 后 6 个月内复发、经原方案再诱导化疗失败; ④ 2 次或 2 次以上复发; ⑤ 髓外白血病持续存在。

1.3 观察指标

① 比较研究组 (分为高危、中危、低危)、对照组入院时骨髓标本中 miR-126 表达量; ② 依据出院时 miR-126 表达量相对水平将 58 例 AML 患儿分为高表达组、低表达组各 29 例, 比较 2 组 miR-126 表达量及中位生存时间、无事件生存时间、中位生存率, 中位生存时间: 自诊断起至死亡或未次随访时间, 无事件生存时间: 诊断至第一次事故发生或未次随访时间, 事故包括复发、死亡与失访; ③ 依据 1 年内随访结果将其分为完全缓解组、难治复发组、死亡组, 比较 3 组入院时、出院时、末次随访时 miR-126 表达量; ④ 分析 AML 患儿 miR-126 表达水平与其预后的关系。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件处理数据, 计数资料以 % 表示, 采取 χ^2 检验, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行 t 检验, 高危、中危、低危患儿 miR-126 表达量及完全缓解组、难治复发组不同时点 miR-126 表达水平采用重复测量数据的方差分析 (F 检验), 相关分析采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组、对照组骨髓标本中 miR-126 表达量

研究组骨髓标本中 miR-126 表达量明显高于对照组 ($P < 0.05$); 研究组中, 高危患儿 miR-126 表达量高于中危、低危患儿, 中危、低危患儿 miR-126 表达量比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 miR-126 高表达组、低表达组 miR-126 表达量及预后情况比较

出院时 miR-126 高表达组 miR-126 表达量高于 miR-126 低表达组, 而中位生存时间、无事件生存时间、中位生存率短/低于低表达组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表1 研究组、对照组骨髓标本中 miR-126 表达量比较

Table 1 Comparison of miR-126 expression in bone marrow samples of study group and control group

组别	类型	n	miR-126	F 值	P 值
研究组	高危	16	1.87±0.25 ^a	60.903	<0.01
	中危	20	1.37±0.16 ^{ab}		
	低危	22	1.10±0.24 ^{abc}		
对照组	-	30	0.51±0.18	-	-

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与同组高危患者比较,^b $P<0.05$;与同组中危患者比较,^c $P<0.05$ 。

2.3 完全缓解组、难治复发组、死亡组患者 miR-126 表达水平比较

3组出院时、末次随访时 miR-126 表达水平均明显低于同组入院时,且完全缓解组出院时、末次

表2 miR-126 高表达组、低表达组 miR-126 表达量及预后情况比较 [n=29, (%)]

Table 2 Comparison of miR-126 expression and prognosis in miR-126 high expression group and low expression group [n=29, (%)]

组别	miR-126 表达量	中位生存时间(个月)	无事件生存时间(个月)	中位生存率 [n(%)]
高表达组	1.52±0.27	6.21	5.34	22(75.86)
低表达组	1.40±0.11	8.24	7.12	28(96.55)
t 值/Z 值	2.217	10.896	6.187	5.220
χ^2 值				
P 值	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05

随访时 miR-126 表达水平较难治复发组、死亡组低,难治复发组、死亡组 miR-126 表达水平差异也有统计学意义($P<0.05$)(表3)。

表3 完全缓解组、难治复发组、死亡组患者 miR-126 表达水平比较 [n, ($\bar{x}\pm s$)]

Table 3 Comparison of miR-126 expression in complete remission group and refractory recurrence group [n, ($\bar{x}\pm s$)]

组别	入院时	出院时	末次随访时
完全缓解组(n=18)	1.78±0.11	1.34±0.25 ^a	1.12±0.13 ^a
难治复发组(n=26)	1.75±0.09	1.54±0.20 ^{ab}	1.24±0.21 ^{ab}
死亡组(n=14)	1.78±0.08	1.67±0.17 ^{abc}	1.41±0.15 ^{abc}
F 值	$F_{交互}=18.976, F_{组间}=7.865, F_{时点}=11.329$		
P 值	$P_{交互}=0.000, P_{组间}=0.004, P_{时点}=0.000$		

注:与同组入院时比较,^a $P<0.05$;与完全缓解组比较,^b $P<0.05$;与难治复发组比较,^c $P<0.05$ 。

2.4 AML 患儿 miR-216 表达水平与其预后的关系分析

相关性分析结果显示,AML 患儿入院时 miR-216 表达水平与其中位生存时间、无事件生存时间、中位生存率呈负相关($P<0.05$)(表4)。

表4 AML 患儿 miR-216 表达水平与其预后的关系分析

Table 4 The relationship between miR-216 expression and prognosis in children with AML

预后指标	R 值	P 值
中位生存时间	-0.322	<0.05
无事件生存时间	-3.361	<0.01
中位生存率	-0.355	<0.01

3 讨论

儿童 AML 可发生在任何年龄,无明显性别差异。国际法美英(French, American and British, FAB)协作组根据形态学将其分为 M0-M7 共 8 种

亚型,其中 M3(急性早幼粒细胞白血病,acute promyelocytic leukemia, APL)是较特殊类型的 AML^[8]。随着化疗药物发展,APL 成为可以治愈的恶性白血病,但超过 1/3 的非 APL 的 AML 患儿预后不良,因此分析疾病相关特征及与患儿预后的关系是儿科医师重点课题^[9-10]。miRNA 为一类长度为 19~25 个核苷酸的内源性非编码小 RNA,在基因网络系统中发挥主要的“调控节点”作用,可在转录或转录后水平调节基因的表达,以抑制翻译或降解蛋白质^[11]。近年来 miRNA 在血液系统疾病造血链分化中的作用及癌基因与抑癌基因的双重作用受到重视^[12]。miR-126 为位于 9q34.3 的内皮细胞特异性 miRNA,可通过靶基因介导血管内皮细胞对内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的反应,在血管生成过程中发挥重要作用。张艳等^[13]的研究结果显示成人 AML 患者骨髓中 miR-126 相对表达水平较正常人群增高,尤其在 M3 型 AML 患者中表达水平明

显低于非M3型,可用于区分AML亚型。但目前关于miR-126在儿童中的表达水平及其与预后的关系研究较少。

Li等^[14]的研究结果显示,miRNA-126与其反义链miRNA-126*在伴有t(8;21)与inv(16)染色体易位的AML中特征性过表达,在t(15;17)染色体变异的AML中,miRNA-126及miRNA-126*则下调。Li的进一步研究结果显示,miRNA-126与AML/*ETO*融合基因协同抑制AML细胞凋亡,提高细胞活力,此外miRNA-126可通过负向调控*PLK2*基因,继而抑制AML恶性细胞凋亡,并促进其增殖。可见miR-126在AML中发生发展中起着重要作用,但其与预后的关系研究较少涉及。本次研究也表明AML患儿miR-126呈高表达状态,且随患儿临床危重程度增加,miR-126表达量升高。可能是因为,经剪切修饰的成熟miR-126进入RNA诱导的沉默复合物中,经结合靶mRNA的3'端非翻译区抑制靶mRNA表达,通过抑制翻译或降解靶mRNA的机制以实现相关调节,且随着临床病情加重这种机制更为明显^[15]。在与预后的关系方面,本研究结果显示,出院时miR-126高表达组中位生存时间、无事件生存时间、中位生存率短/低于miR-126低表达组,表明出院时miR-126水平可较好预测AML患儿预后,低水平miR-126预示着预后更良好,这与Shibayama等^[16]通过研究得出的microRNA-126-5p上调与阿糖胞苷耐药性和不良预后有关的结果相近。但因条件限制,本研究预后评估方面未涉及AML患儿阿糖胞苷的耐药性,且未对miR-126高表达预测不良预后的机制进一步进行分析,因此可将其作为后期进一步研究内容。本研究也显示,在出院时及随访中,完全缓解组miR-126表达水平均低于难治复发组、死亡组,难治复发组、死亡组miR-126表达水平差异也有统计学意义,且相关性分析结果也初步证实AML患儿miR-126表达水平与其预后存在一定关系,这与Li等^[17]通过研究得出的AML患者miR-126高表达与不良生存率有明显相关性的结果一致。考虑是因为miR-126通过靶基因介导血管内皮细胞对内皮细胞生长的反应作用,使血管生成增多,因此miR-126水平高低可反映AML患儿病情并预测其预后水平与化疗疗效^[18-19],对miR-126的深入研究将会揭示AML新的发病机制,为其诊断提供新的分子标志物,为AML的治疗提供新思路。

综上所述,AML患儿miR-126表达水平与其预后密切相关,miR-126表达水平可预测远期预后,因此可将其作为临床治疗靶点及预后监测指标。

参考文献

- [1] 郭斌,谢宁,刘文,等.急性髓细胞白血病免疫分型及骨髓、血常规综合研究[J].国际检验医学杂志,2016,37(19):2710-2712.
- [2] 廖旺,刘晓丹,彭红霞,等.miR-181a在急性淋巴细胞白血病患儿中的表达及其功能研究[J].中华血液学杂志,2015,36(1):53-57.
- [3] 黄伟萍.微小RNA-125b在急性白血病中的表达及作用研究[J].中国优生与遗传杂志,2016,24(2):39-41.
- [4] Wang JN, Yan YY, Guo ZY, et al. Negative association of circulating microRNA-126 with high-sensitive C-reactive protein and vascular cell adhesion molecule-1 in patients with coronary artery disease following percutaneous coronary intervention[J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(23):2786-2791.
- [5] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会.儿童急性髓细胞白血病诊疗建议[J].中华儿科杂志,2006,44(11):877-878.
- [6] 吴思静,杨时佳,张恒,等.复发难治性急性髓系白血病临床高危因素分析及再诱导方案疗效评估[J].白血病·淋巴瘤,2014,23(11):677-680.
- [7] 吴思静.复发难治性急性髓系白血病再诱导疗效分析[D].华中科技大学,2016.
- [8] 朱嘉蔚,蒋慧,陆正华,等.儿童急性髓系白血病的疗效及预后相关因素分析[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2016,21(4):211-215.
- [9] Kaspers GJL, Zimmermann M, Reinhardt D, et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group[J]. 2013,31(5):599-607.
- [10] 高莉,杨静.初治急性髓系白血病患者MDR1和BAALC基因的表达情况及其与预后的关系分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(13):1786-1789.
- [11] 袁冬妹,吴思英,黄素丽,等.血浆miRNA表达与儿童急性淋巴细胞白血病风险的关联研究[J].中华流行病学杂志,2017,38(9):1252-1258.
- [12] 徐丽华,胡绍燕,岑建农,等.初诊儿童急性髓系白血病52例骨髓miR-155的表达及意义[J].中华实用儿科临床杂志,2015,30(9):694-697.
- [13] 张艳,张蕊,王玥,等.miR126在成人急性髓系白血病患者骨髓中的表达[J].中国医科大学学报,2013,42(9):793-795.
- [14] Li Z, Lu J, Sun M, et al. Distinct microRNA expression profiles in a cute myeloid leukemia with common translocations [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2008, 105(40):15535-15540.
- [15] 张艳.急性髓系白血病与SPRED1、miR126的相关性研究[D].中国医科大学,2013.

(下转第133页)

一株红霉素耐药百日咳鲍特菌的完整基因组分析

于丹¹ 栗东芳² 袁林¹ 冯欣² 史伟¹ 姚开虎^{1*}

[摘要] **目的** 明确国内一株红霉素耐药百日咳鲍特菌 P2013109 的全基因组序列,了解其基因特征。**方法** 对一株抗原基因型为 *ptxA1/ptxC1/ptxP1/prn1/fim2-1/fim3-1/tcfA2* 的临床分离红霉素耐药百日咳鲍特菌 P2013109 采用了二代和三代高通量测序技术进行了全基因组测序,对基因组进行组装、基因预测和功能注释,并与包含我国疫苗株 CS、国外疫苗株 Tohama I,以及国外发表临床分离的共 15 株菌的完整基因组序列进行全基因组比较分析。**结果** P2013109 的完整基因组序列总长度 4 126 010 bp, GC 含量为 67.72%,预测基因有 4 085 个。该基因组的所有拷贝 23s rRNA 基因均显示 A2047G 突变。相比 P2013109,其他 15 株菌主要存在三个比较大的缺失区域。另外,将 P2013109 与其他 16 株进行系统发育树分析,显示全部菌株分成 3 个遗传分支。Tohama I 和 CS 这两个疫苗株归类为 I 型,它们与其他 2 个型别相比较呈现 76 个 SNPs。P2013109 独立为 II 型,与其他菌株的进化关系相对较远,相比较其他菌株呈现 25 个 SNPs。国外菌株为 III 型,与其他菌株相比呈现 21 个 SNPs。**结论** 国内当前流行的红霉素耐药百日咳鲍特菌具有独特的系统发育分支,其遗传进化与疫苗株和国外流行菌株不同。

[关键词] 百日咳鲍特菌;基因组序列分析;系统发育树分析

Whole - genome Sequencing And Analysis Of an Erythromycin Resistant *Bordetella Pertussis* Isolate

YU Dan¹, LI Dongfang², YUAN Lin¹, FENG Xin¹, SHI Wei¹, YAO Kaihu^{1*}

(1. Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education/National Key Discipline of Pediatrics (Capital Medical University)/Laboratory of Microbiology, Beijing Pediatric Research Institute/Beijing Children's Hospital, Capital Medical University/National Center for Children's Health, Beijing 100045
2. Department of Microbial Research, WeHealthGene Institute, Shenzhen 518000)

[ABSTRACT] **Objective** Description of the genetic characteristics of an erythromycin resistant *Bordetella pertussis* domestic strain, P2013109 by analysis of its complete genome sequence. **Methods** The strain P2013109 with antigen type *ptxA1/ptxC1/ptxP1/prn1/fim2-1/fim3-1/tcfA2* was sequenced using the Illumina Hiseq 2000 and Pacbio platforms. After complete genome assembly, gene prediction and function annotation were processed for further analysis. 15 other strains containing China vaccine strain CS and Tohama I were then adopted to perform comparison analysis. **Results** The whole genome of P2013109 is 4 126 010 bp with GC content of 67.72%, and 4 085 predicted ORFs encoded. All the 23S rRNA gene locus display the A2047G mutation. Comparing with P2013109, 3 long fragments are missing in the other 15 genomes. The phylogenetic tree analysis showed that all strains exhibited 3 lineages, of which the two vaccine strains CS and Tohama I belonged to lineage I, displaying 76 SNPs in comparison to the other two lineages. However, the

基金项目:国家科学自然科学基金(81973100)

作者单位:1. 国家儿童医学中心/首都医科大学附属北京儿童医院/北京市儿科研究所微生物研究室/儿科学国家重点学科/教育部儿科重大疾病研究重点实验室,北京 100045

2. 深圳市微健康基因研究院微生物研究部,广东,深圳 518129

*通讯作者:姚开虎, E-mail: yaokaihu@bch.com.cn

注:于丹和栗东芳为共同第一作者

lineage II included only P2013109, which was divergent from the others by 25 SNPs. The remaining strains were grouped into lineage III by 21 lineage-specific SNPs. Conclusion The endemic erythromycin resistant *Bordetella pertussis* in China showed a specific phylogenetic lineage, which was different from the vaccine strains and foreign endemic strains in the genetic evolution.

[KEY WORDS] *Bordetella pertussis*; Genome sequence analysis; Phylogenetic tree analysis

百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*, *B. pertussis*)又称为百日咳杆菌,是百日咳的病原菌。20世纪40年代开始推广接种百日咳疫苗后,百日咳发病率明显下降。但20世纪末,一些高疫苗接种率国家陆续报道百日咳发病率再度升高,称为百日咳再现(*pertussis re-emerge*),引起全球广泛关注^[1]。百日咳再现涉及多方面的原因,其中百日咳鲍特菌的适应性变化是重要原因之一,包括对疫苗免疫选择压力和抗生素选择压力的适应性变化^[1]。从不同国家报道数据看,尽管1994年第一例红霉素耐药百日咳鲍特菌出现在美国,但至今只有中国内地报道了红霉素耐药百日咳鲍特菌的广泛流行^[2]。前期,本课题组研究结果提示红霉素耐药百日咳鲍特菌大多具有相同的抗原基因型,均为 *ptxA1/ptxP1/prn1* 型,与之前的研究结果相一致^[3],提示耐药菌株具有相似遗传背景。为进一步明确耐药菌株的基因组特征,本研究对红霉素耐药株 P2013109 进行了完整基因组测序,并与我国疫苗株 CS 等已公开的完整基因组数据比较,为疫苗研究等提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

菌株 P2013109 为本实验室从百日咳患儿鼻咽拭子标本中分离。菌株的特点:药物敏感性检测显示该菌株红霉素最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC) > 256 mg/L,红霉素 KB 纸片(15 μg/片)扩散法检测药物敏感性未见抑菌环,前期研究确定其疫苗相关抗原基因型为 *ptxA1/ptxC1/ptxP1/prn1/fim2-1/fim3-1/tcfA2*^[3]。

1.2 试剂/仪器

硅胶模型 TM 基因组 DNA 提取试剂盒(北京赛百盛公司),碳琼脂培养基(CM0119,英国 OXOID 公司),培养箱,4℃冰箱,-80℃冰箱,离心机。

1.3 细菌培养以及基因组 DNA 提取

冻存菌株标本接种于含 10%羊血的碳琼脂培养基。培养基置于温度为 35℃的培养箱中孵育 3 天后观察菌落特征和纯度,转种一次。刮取琼脂

上的菌落,采用试剂盒提取细菌基因组 DNA。

1.4 基因组测序和组装

将 P2013109 的基因组 DNA 委托上海美吉生物医药公司分别利用二代 Illumina HiSeq 2000 平台和三代 Pacbio 平台进行全基因组测序。采用 SOAPdenovo v2.04 软件对二代测序数据进行初步组装;利用 blasR 将三代测序数据比对到初步组装结果上,并对其进行矫正与纠错;然后利用矫正后的三代测序数据进行组装,使用的软件为 Celera Assembler 8.0。最后再次利用二代测序数据进行校验,同时进行局部内洞填充和碱基校正。

1.5 基因组注释

对组装得到的基因组序列,利用 Glimmer 3.02 软件进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测,并与数据库比对获得蛋白功能注释。利用 Barrnap 0.4.2 和 tRNAscan-SE v1.3.1 软件对基因组中包含的 rRNA 和 tRNA 进行预测。

1.6 比较基因组分析

从 NCBI 下载已完成全基因组测序的 15 株百日咳杆菌及其注释信息(见下表 1),包括中国百日咳疫苗株 CS^[4]、该菌种最早完成测序的 Tohama I 菌株^[5],以及欧美发达国家已经发表的当前流行的 *ptxP3* 型菌株的基因组序列^[6-7]。利用 MUMmer3.23 软件将其他基因组序列与参考基因组序列 Tohama I 进行比对,得到每个基因组的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)信息,去除落在重复序列区域的 SNP 后,将在所有样本中都出现的 SNP 位点来构建系统发育树,采用 TreeBeST 软件中的最大似然法,迭代 1 000 次。用 blast v2.5.0 比对软件将其他菌株比对到菌株 P2013109 上,得到每株菌在 P2013109 的比对上的区域,然后将所有菌的比对结果用 circos 软件做图。

2 结果

2.1 基因组组装与基因组预测

对测序得到的百日咳杆菌 P2013109 二代和三代数据进行质控和组装后,得到一个完整的基因

组序列,总长度 4 126 010 bp,GC 含量为 67.72%,预测 P2013109 的基因共有 4 085 个,基因的总长度为 3 571 551 bp,占全基因组的 86.6%,平均基因长度为 874 bp。基因区 GC 含量为 68.4%,基因间区

GC 含量为 62.8%。共找到 61 个 tRNA 和 3 组 rRNA。P2013109 基因组序列已经提交到 NCBI 的 Genbank 数据库,其登录号为 CP038790。与其他 15 株菌的基因组信息见下表 1。

表 1 百日咳杆菌 P2013109 与其他 15 个菌株基因组的基本特征 [n(%)]
Table 1 The genome characteristics of *B.pertussis* P2013109 and the others [n(%)]

菌株编号	NCBI 登录号	采集时间	采集地点	基因组大小(bp)	GC 含量	基因数目	CDS 数目	ptxA	ptxP	fim3	prn
P2013109	CP038790	2013	中国	4 126 010	67.72	4 085	-	1	1	1	1
CS	NC_017223.1	1951	中国	4 124 236	67.73	3 983	3 634	2	1	1	1
Tohama I	CP002695	1952	日本	4 086 189	67.72	3 856	3 425	2	1	1	1
B1838	CP011440	1999	荷兰	4 108 472	67.71	3 967	3 623	1	3	2	2
B1865	CP011441	1999	荷兰	4 105 363	67.71	3 966	3 620	1	3	2	2
B3405	CP011442	2010	荷兰	4 109 988	67.70	3 978	3 633	1	3	1	2
B3582	CP011443	2009	瑞典	4 104 305	67.71	3 969	3 620	1	3	2	2
B3585	CP011444	2009	瑞典	4 106 388	67.71	3 970	3 627	1	3	1	3
B3621	CP011401	2008	法国	4 100 705	67.70	3 963	3 614	1	3	2	2
B3629	CP011400	2009	法国	4 101 147	67.71	3 966	3 621	1	3	2	2
B3640	CP011445	2010	荷兰	4 110 990	67.70	3 977	3 630	1	3	1	2
B3658	CP011446	2009	挪威	4 103 254	67.71	3 971	3 626	1	3	1	2
B3913	CP011447	2012	荷兰	4 109 548	67.70	3 978	3 630	1	3	1	2
B3921	CP011448	2012	荷兰	4 111 557	67.70	3 980	3 633	1	3	1	2
H321	CP010965	2013	法国	4 079 396	67.71	3 941	3 594	-	-	2	2
I979	CP010966	2013	美国	4 082 551	67.71	3 949	3 600	-	-	1	2

注:-表示基因缺失。

2.2 COG 聚类 and KEGG 代谢通路分析

通过与 String 数据库比对,在 P2013109 基因组上,共有 3 388 个 CDS 获得 COG 和 NOG 功能注释,根据注释结果可以将这些功能归为 4 大类,23 小类。如表 2 所示。在这些注释结果中,与代谢相关的功能最多,主要以氨基酸、无机离子、脂类和碳水化合物的转运和代谢为主;其次是细胞过程与信号传导类的功能,主要以细胞壁/膜/包体的生物合成、翻译后修饰等为主;在信息储存和处理类的功能中,以转录和翻译为主。

通过与 KEGG 数据库比对,在 P2013109 基因组中共找到代谢通路相关的基因 2 160 个。共注释上 41 个类型,归属 6 个大类,即细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、代谢和有机体系统相关的功能。

2.4 比较基因组分析

2.4.1 抗原基因型和耐药基因型确定

比对百日咳鲍特菌 P2013109 抗原基因 *ptxA*、*ptxP*、*fim3* 和 *prn* 的核苷酸序列,得到 P2013109 的基因组的抗原基因型结果,与前期抗原基因型测序结果一致。其他 15 株菌通过搜集文献和比对结

果相结合的方式得到这些抗原基因型的分析结果,见表 1 所示。细菌染色体 23s rRNA 基因有 3 个拷贝,每个拷贝中均具有 A2047G 变异。

2.4.2 全基因组比对

将其他所有菌株与 P2013109 比对结果如下图 1 所示。与 P2013109 相比,其他基因组主要有三个比较大的缺失区域,R1 约 4 kb,编码转座酶;R2 是菌株 H321 和 I979 缺失的一个大约 27 kb 的区域,是编码百日咳毒素和 IV 型分泌系统的区域;R3 区域主要包含 R3-1 和 R3-2 两个子区域,除了 CS 和 Tohama I 菌株外,其他菌株均缺失。R3-1 主要包含 BP1948-1951、BP1953 和 BP1954 等 6 个基因,前 4 个基因涉及支链氨基酸转运底物结合蛋白、转运系统渗透酶、APC 转运体 ATP 结合蛋白;BP1953 和 BP1954,分别编码氧化还原酶和单氧酶。R3-2 区域也包含 4 个基因,BP1959 是 IS1663 的转座酶基因,BP1961 编码一种细胞色素 flavocytochrome, *bfrI* 和 BP1965 分别与铁载体受体和跨膜蛋白有关。

2.4.3 系统发育分析

将这 16 株菌与广东报道的一株百日咳全基因组序列一起做系统发育分析,共得到 326 个 SNPs。

表2 百日咳杆菌 P2013109 基因组的 COG 功能分类

Table 2 Gene distribution based on COG and NOG functional classification of *B. pertussis* P2013109

分类层级一	分类层级二	COG	NOG
代谢	氨基酸转运与代谢	372	6
	能量产生与转换	237	2
	无机离子的转运与代谢	233	2
	脂类的转运和代谢	192	2
	碳水化合物的转运和代谢	136	5
	次级代谢产物的生物合成、转运和代谢	113	1
	辅酶的转运和代谢	96	2
	核苷酸转运与代谢	54	2
	细胞壁/膜/包体的生物合成	179	9
	翻译后修饰、蛋白质周转和分子伴侣	105	13
细胞过程	信号转导机制	88	6
	细胞内运输、分泌和囊泡运输	74	12
	细胞运动	53	0
	细胞周期调控、细胞分裂、颜色提分裂	26	2
	防御机制	21	1
信息储存和处理	细胞骨架	0	3
	转录	270	22
	翻译、核糖体结构和生物合成	164	3
	复制、重组和修复	128	5
	染色质的结果和动态变化	4	0
特征不明显	RNA的过程与修饰	1	0
	一般功能预测	201	42
	功能未知	331	264

基于这些 SNPs 构建系统发育树如图 2 所示,由图可知,这 16 株菌可以分成 3 个型别,Tohama I 和 CS 这两个疫苗株作为 I 型,分别于 1951 和 1952 年分离,与其他 2 个型别有 76 个 SNP 的差异(23.3%),此外,Tohama I 与其他所有菌株比较呈现 54 个 SNPs (16.5%)。P2013109 自成一个分支,并且与其他所有菌株相比,呈现 25 个 SNPs(7.7%)。其他在 2000 年之后采集自国外的菌株自成一个型别,与另外两个型别有 21 个 SNP 的差异(6.4%),其中这 14 株菌又可以分为两个亚型,主要区别是 III a 亚型的 fim3 基因是 2 型,而 III b 型菌株是 1 型。

分支旁的数字为自展 1 000 次的置信值;标尺代表 7% 的序列差异。系统发育树分析时纳入了广东分离株 BP_GD2017,见参考文献^[8]。

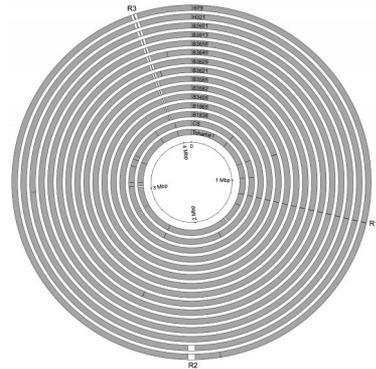


图1 P2013109 与其他 15 株菌的全基因组比较结果
Figure 1 The whole genome comparison analysis of *B. pertussis* P2013109 and the other 15 genomes

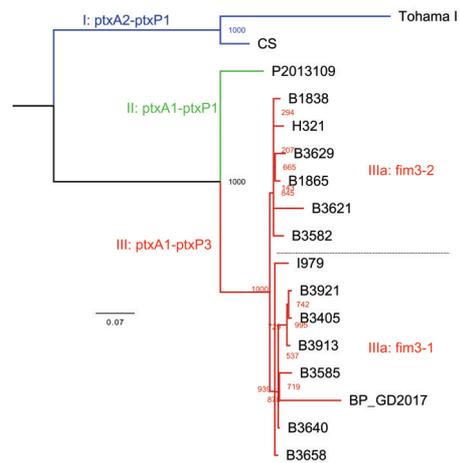


图2 百日咳杆菌 P2013109 与其他百日咳杆菌的全基因组进化树

Figure.3 Genome-wide phylogenetic tree of Genome-wide phylogenetic tree of *Bordetella pertussis* P2013109 and the other genomes (including the BP_GD2017 isolated from Guangdong)

3 讨论

本研究显示百日咳鲍特菌 P2013109 株基因组 4 126 010 bp,与已经报道的百日咳鲍特菌全基因组^[9-10]大小相当。该红霉素耐药株表型明确,全基因组序列也表明,细菌染色体 23S rRNA 基因有 3 个拷贝,三个拷贝中均具有 A2047G 变异。23S rRNA 是核糖体 RNA,核糖体是细胞内蛋白质合成的场所,红霉素可以通过与位于 23S rRNA 区域的肽链形成的部位(肽酰转移酶区域)结合进而抑制蛋白质合成。23S rRNA 突变是目前百日咳鲍特菌耐药的主要机制^[11],基因型与表型相互印证。与 P2013109 株全基因组比较,其他菌株主要有 3 个

缺失区,尤其R1区涉及转座酶。这些基因区在耐药变异过程中是否发挥作用,需要深入研究。基于完整基因组 SNPs 构建系统发育树发现,纳入分析的菌株明确分为三支。分离于20世纪50年代的百日咳流行菌株CS株^[4]和Tohama I株形成独立的进化分支,与当前流行菌株在进化分支上存在较大差异。

近期,广东李柏生等^[8]对广东分离到的1株百日咳鲍特菌BP-GD2017进行全基因组分析报道,该菌株的基因组草图序列数据纳入基因组比较分析发现,该菌株处于国外菌株分支Ⅲ中(见图3),它们的抗原基因型也完全相同,为 $ptxA1/ptxP3$ 。P2013109独属一支,抗原基因型为 $ptxA1/ptxP1$ 。课题组前期检测了99株百日咳鲍特菌的疫苗相关基因型, $ptxA1/ptxP1$ 占91.9%(91/99)^[3]。这些数据明确提示长期疫苗使用之后,百日咳致病菌株百日咳毒素相关基因型发生了明显变化,与既往研究报告^[12-13]相符。提示近年来流行的百日咳菌株的基因改变除了疫苗压力造成相关抗原性发生适应进化,也有可能是在进化分支上出现改变。本课题组前期研究表明,临床分离菌株耐药株抗原基因型均为 $ptxA1/ptxP1$,而基因型 $ptxA1/ptxP3$ 的分离株全部对红霉素敏感,这提示国内外临床分离菌株耐药性的差异,与流行菌株的遗传背景不同相关。

当前百日咳疫苗生产用菌株基本上都是分离自上个世纪。研究已经发现,百日咳疫苗长期使用以后,临床分离菌株的抗原基因型与疫苗株明显不同^[12-13]。尤其在无细胞疫苗使用国家,一些毒力抗原缺失的菌株,如缺失PRN、FIM和PTX的菌株逐渐被发现,甚至出现流行的情况,菌株疫苗抗原的变异和缺失等适应性变化可能是百日咳再现的重要因素^[14]。但课题组在前期研究中没有发现国内百日咳鲍特菌分离株有抗原缺失,与疫苗株比较主要是抗原基因变异^[3]。本研究从基因组序列证明P2013109有抗原基因变异,无缺失,同时与疫苗株比较遗传进化分支明显不同。近期,Xu等^[15]分析了71株中国分离的 $ptxP1$ 菌株(其中包括46株红霉素耐药株)的基因组重测序结果,基于2744个SNPs位点构建遗传进化树,结果发现耐药株只出现在3个遗传分支中,这些耐药株只分离自中国内地,包括香港、台湾在内的其他地区和国家公开的菌株基因组,均没有处于同一遗传支的分离株。

本研究第一次呈现了耐红霉素百日咳鲍特菌 $ptxP1$ 型菌株的完整基因组序列,序列分析明确显示其在遗传学关系上与疫苗株和国外当前主要流行的 $ptxP3$ 型菌株遗传关系较远,属于特有的一个遗传分支。已有基因组重测序研究提示还需要对其他耐药菌株进行完整基因组的构建和研究,才能反映红霉素耐药鲍特菌基因组的全貌,为国内将来新型百日咳疫苗的研发提供基础信息。

志谢:广东省疾病预防控制中心李柏生提供其课题组发表的1株百日咳鲍特菌分离株的全基因组序列数据。

参考文献

- [1] 刘莹,姚开虎.百日咳再现的研究进展[J].中华儿科杂志,2018,56(4):313-316.
- [2] 杨永弘,杨颖.百日咳杆菌耐药[J].中华实用儿科临床杂志,2016,31(4):263-265.
- [3] Yang Y, Yao K, Ma X, et al. Variation in *Bordetella pertussis* susceptibility to erythromycin and virulence-related genotype changes in China (1970-2014) [J]. PLoS One, 2015;10(9):e0138941.
- [4] Zhang S, Xu Y, Zhou Z, et al. Complete genome sequence of *Bordetella pertussis* CS, a Chinese pertussis vaccine strain [J]. J Bacteriol. 2011, 193(15):4017-4018.
- [5] Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* [J]. Nat Genet, 2003, 35(1):32-40.
- [6] Bart MJ, van der Heide HG, Zeddeman A, et al. Complete genome sequences of 11 *Bordetella pertussis* strains representing the pandemic $ptxP3$ lineage [J]. Genome Announc, 2015, 3(6): e01394-15.
- [7] Williams MM, Sen K, Weigand MR, et al. *Bordetella pertussis* strain lacking pertactin and pertussis toxin [J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(2):319-322.
- [8] 李柏生,刘美真,宋铁,等.广东省1株百日咳鲍特菌分离株的全基因组测序分析[J].华南预防医学,2018,44(4):301-305,311.
- [9] Weigand MR, Williams MM, Peng Y, et al. Genomic survey of *Bordetella pertussis* diversity, United States, 2000-2013 [J]. Emerg Infect Dis, 25(4):780-783.
- [10] Harvill ET, Goodfield LL, Ivanov Y et al. Genome sequences of 28 *Bordetella pertussis* U.S. outbreak strains dating from 2010 to 2012 [J]. 2013, 1(6):e01075-13.
- [11] Bartkus JM, Juni BA, Ehresmann K, et al. Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3):1167-1172.

(下转第138页)

大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭疗效及对患者血清HCY、Gal-3、NT-proBNP水平的影响

张志亮¹ 张鑫¹ 高卫芳¹ 袁宇^{2*}

[摘要] **目的** 探讨大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭的临床疗效。**方法** 将104例冠心病合并心力衰竭患者随机分为观察组和对照组各52例。对照组患者予以前列地尔治疗,观察组患者在此基础上予大株红景天注射液治疗。比较两组患者临床疗效,观察治疗前后心功能[左室射血分数(LVEF)、左室舒张末内径(LVEDD)、左室收缩末内径(LVESD)、心排血量(CO)]、心衰标志物[N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)]、内皮功能[内皮素(ET)、一氧化氮(NO)]、氧化应激[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)]以及血清同型半胱氨酸(HCY)、半乳凝集素-3(Gal-3)水平的变化情况。**结果** 观察组患者治疗总有效率高于对照组($P<0.05$);治疗20 d后,两组患者LVEF、CO均较治疗前升高,且观察组高于对照组,LVEDD、LVESD均较治疗前降低,且观察组低于对照组($P<0.05$);治疗20 d后,两组患者血清NT-proBNP、ET、MDA、HCY、Gal-3水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组($P<0.05$),NO、SOD、CAT水平较治疗前升高,且观察组高于对照组($P<0.05$)。**结论** 大株红景天注射液治疗冠心病合并心力衰竭效果显著,可明显改善心功能和内皮功能,减轻心肌损伤,提高抗氧化应激能力,促进疾病转归。

[关键词] 冠心病;心力衰竭;大株红景天注射液;同型半胱氨酸;半乳凝集素-3

Efficacy of Sofren injection in the treatment of coronary heart disease with heart failure and its effects on levels of serum HCY, Gal-3 and NT-proBNP

ZHANG Zhiliang¹, ZHANG Xin¹, GAO Weifang¹, YUAN Yu^{2*}

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100; 2. CCU, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical efficacy of Sofren injection in the treatment of coronary heart disease with heart failure. **Methods** 104 patients with coronary heart disease and heart failure were randomly divided into observation group and control group, with 52 cases in each group. Patients in control group were treated with alprostadil while patients in observation group were treated with Sofren injection on this basis. The clinical efficacy of the two groups was compared, and the cardiac function [left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), cardiac output (CO)], heart failure marker [N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)], endothelial function [endothelin (ET), nitric oxide (NO)], oxidative stress [malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)] and serum homocysteine (HCY) and galectin-3 (Gal-3) were observed before and after treatment. **Results** The total effective rate of treatment

基金项目:2018年河南省医学科技攻关计划项目(2018020972)

作者单位:1. 新乡医学院第一附属医院药剂科,河南,新乡 453100

2. 新乡医学院第一附属医院CCU,河南,新乡 453100

*通信作者:袁宇, E-mail: s40y240uookk6@sina.com

in observation group was higher than that in control group ($P<0.05$). After 20d of treatment, the LVEF and CO in the two groups were increased compared with those before treatment, and the two indexes in observation group were higher than those in control group, and the LVEDD and LVESD were decreased compared with those before treatment, and the two indexes in observation group were lower than those in control group ($P<0.05$). After 20d of treatment, the levels of serum NT-proBNP, ET, MDA, HCY and Gal-3 in the two groups were decreased compared with those before treatment, and the levels in observation group were lower than those in control group ($P<0.05$), and the levels of NO, SOD and CAT were increased compared with those before treatment, and the levels in observation group were higher than those in control group ($P<0.05$). **Conclusion** Sofren injection has significant effects on coronary heart disease with heart failure, and it can significantly improve cardiac function and endothelial function, reduce myocardial damage, improve anti-oxidative stress ability, and promote disease outcomes.

[KEY WORDS] Coronary heart disease; Heart failure; Sofren injection; Homocysteine; Galectin-3

冠心病是临床常见的心血管疾病,若病情持续进展,心肌会因供血供氧不足而发生坏死,心肌收缩、舒张功能被影响,严重者可造成心排出量减少,导致心力衰竭(下文简称心衰)的发生,严重威胁患者生命健康^[1]。冠心病患者发生心衰的几率远远高于正常人群,及时有效地进行抗冠状动脉硬化和抗心衰治疗尤为重要。目前临床对冠心病合并心衰的治疗仍以药物治疗为主,主要目的在于改善心脏血流动力学,减少心肌耗氧,从而减缓心衰进展,提高生存率^[2]。前列地尔是治疗冠心病心衰的常用药物,其具有扩张血管、抑制血小板聚集的作用,往往与其他抗心衰药物联用^[3]。大株红景天注射液通过抗缺血、扩张冠状动脉血管、降低

心脏负荷等作用改善心衰症状,主治心血瘀阻型冠心病^[4]。本研究旨在探讨大株红景天注射液治疗冠心病合并心衰的临床效果,为该疾病的治疗方案选择提供科学依据,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择2017年10月至2019年8月在本院收治的104例冠心病合并心衰患者为研究对象。根据随机分组原则,将患者分为观察组和对照组各52例。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者及家属签署知情同意书。

表1 两组患者一般资料比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of general data between the two groups [n(%)]

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	NYHA 分级(Ⅱ级/Ⅲ级)	冠心病病程(年)
观察组	52	30/22	55.34±8.41	24/28	8.15±2.07
对照组	52	27/25	56.97±9.05	27/25	8.84±2.11
χ^2/t 值		0.349	0.951	0.346	1.683
P 值		0.554	0.344	0.556	0.095

注:NYHA 为美国纽约心脏病学会(New York Heart Association)。

1.1.1 入组标准

①符合《中国心力衰竭诊断和治疗指南2014》^[5]中相关诊断标准;②患者伴有心脏结构改变和典型心衰症状,且经超声心动图检查证实;③无药物禁忌症或过敏史;④依从性良好能配合完成治疗。

1.1.2 排除标准

①近期有急性心肌梗死发作史、手术或创伤者;②其他疾病或因素引起的心衰者;③合并严重

脏器疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病或恶性肿瘤者;④合并严重感染者;⑤合并心肌炎、心包炎、心脏瓣膜病者;⑥合并精神性疾病不能配合治疗者。

1.2 治疗方法

两组患者根据实际病情予以基础治疗:吸氧、强心剂、利尿剂、控制血压和血糖、扩血管,消除心衰诱因,应用抗血小板及他汀类药物进行冠心病二级预防,纠正贫血、电解质紊乱、心律失常,预防

和控制感染。对照组患者予以前列地尔注射液(生产企业:哈药集团生物工程有限公司,规格:1 mL:5 μ g,批准文号:国药准字 H20084565)1~2 mL+10 mL生理盐水静脉注射,1次/d。观察组患者在对照组基础上予以大株红景天注射液(生产企业:通化玉圣药业有限公司,规格:5 mL,批准文号:国药准字 Z20060362)10 mL+250 mL生理盐水静脉滴注,1次/d。两组患者均以10 d为一个疗程,治疗2个疗程后观察疗效。

1.3 评价指标

①疗效评价标准^[6]:显效:临床症状及体征明显完善或完全缓解,心功能改善2级以上;有效:症状及体征有所好转,心功能改善1级;无效:症状及体征无明显改善甚至加重,心功能改善不足1级。总有效率=(显效+有效)/总例数。②心功能:分别于治疗前、治疗20 d后采取超声心动图测定患者心功能各项指标,包括左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室舒张末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左室收缩末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、心排血量(cardiac output, CO)。③心衰标志物:分别于治疗前、治疗20 d后采集患者清晨肘静脉血3 mL,常规离心分离血清待检,用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测N-末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)水平,试剂盒来自上海江莱生物科技有限公司。④内皮功能:同上取血清,用放射免疫法检测内皮素(endothelin, ET),试剂盒来自上海信帆生物科技有限公司;用硝酸还原酶法检测一氧化氮(nitric oxide, NO),试剂盒来自上海恪敏生物科技有限公司。⑤氧化应激水平:同上取血清,用硫代巴比妥酸显色法检

测丙二醛(malonaldehyde, MDA),黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),可见光法测定过氧化氢酶(catalase, CAT),试剂盒来自南京建成生物工程研究所。⑥血清因子:同上取血清,用双抗体夹心法检测同型半胱氨酸(homocysteine, HCY),试剂盒来自上海研谨生物科技有限公司;用ELISA检测半乳凝集素-3(galectin-3, Gal-3),试剂盒来自美国BG medicine公司。

1.4 统计学处理

采用SPSS2.1.0软件来进行统计学分析。计数资料以 n 或(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,同组治疗前后比较采用配对样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床疗效比较

观察组患者治疗总有效率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 两组患者临床疗效比较 [$n=52$, (%)]

Table 2 Comparison of clinical efficacy between the 2 groups [$n=52$, (%)]

组别	显效	有效	无效	总有效
观察组	27(51.92)	22(42.31)	3(5.77)	49(94.23)
对照组	16(30.77)	25(48.08)	11(21.15)	41(78.85)
χ^2 值				5.283
P 值				0.022

2.2 两组患者治疗前后心功能比较

治疗20 d后,两组患者LVEF、CO均较治疗前升高,且观察组高于对照组,LVEDD、LVESD均较治疗前降低,且观察组低于对照组($P < 0.05$),见表3。

表3 两组患者治疗前后心功能比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Comparison of cardiac function before and after treatment between the two groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

指标	时间	观察组($n=52$)	对照组($n=52$)	t 值	P 值
LVEF(%)	治疗前	40.12 \pm 7.24	39.23 \pm 7.05	0.635	0.527
	治疗后	49.62 \pm 8.08 ^a	44.37 \pm 7.39 ^a	3.457	0.001
LVEDD(mm)	治疗前	64.10 \pm 6.84	63.27 \pm 7.12	0.606	0.546
	治疗后	54.48 \pm 6.04 ^a	59.32 \pm 6.45 ^a	3.950	<0.001
LVESD(mm)	治疗前	45.71 \pm 6.37	45.08 \pm 6.51	0.499	0.619
	治疗后	36.27 \pm 5.35 ^a	40.13 \pm 5.98 ^a	3.469	0.001
CO(L/min)	治疗前	5.09 \pm 1.01	5.02 \pm 0.95	0.364	0.717
	治疗后	5.96 \pm 1.02 ^a	5.48 \pm 0.97 ^a	2.459	0.016

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

2.3 两组患者治疗前后心衰标志物、内皮功能比较

治疗20 d后,两组患者血清NT-proBNP、ET

水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组,NO水平较治疗前升高,且观察组高于对照组($P < 0.05$),见表4。

表4 两组患者治疗前后心衰标志物、内皮功能比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of heart failure marker and endothelial function between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

指标	时间	观察组(n=52)	对照组(n=52)	t值	P值
NT-proBNP(mg/L)	治疗前	1.87±0.33	1.80±0.35	1.049	0.296
	治疗后	0.76±0.20 ^a	1.27±0.28 ^a	10.688	<0.001
ET(ng/L)	治疗前	124.32±24.15	120.48±26.24	0.776	0.439
	治疗后	70.12±15.41 ^a	95.34±19.17 ^a	7.394	<0.001
NO(μmol/L)	治疗前	66.47±12.54	68.29±11.47	0.772	0.442
	治疗后	96.12±18.74 ^a	80.12±15.36 ^a	4.762	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

2.4 两组患者治疗前后氧化应激水平比较

治疗20 d后,两组患者血清MDA水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组,SOD、CAT水平均较治疗前升高,且观察组高于对照组($P < 0.05$),见表5。

表5 两组患者治疗前后氧化应激水平比较[$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 5 Comparison of oxidative stress levels between the two groups before and after treatment [$n, (\bar{x} \pm s)$]

指标	时间	观察组(n=52)	对照组(n=52)	t值	P值
MDA (nmol/mL)	治疗前	8.02±1.31	7.91±1.25	0.438	0.662
	治疗后	5.28±0.86 ^a	6.35±1.02 ^a	5.783	<0.001
SOD (U/mL)	治疗前	32.37±5.23	33.19±5.84	0.754	0.452
	治疗后	52.17±8.95 ^a	43.26±7.85 ^a	5.397	<0.001
CAT (U/mL)	治疗前	5.16±0.97	5.37±1.05	1.059	0.292
	治疗后	7.97±1.33 ^a	6.69±1.21 ^a	5.133	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

2.5 两组患者治疗前后血清HCY、Gal-3水平比较

治疗20 d后,两组患者血清HCY、Gal-3水平均较治疗前降低,且观察组低于对照组($P < 0.05$),见表6。

表6 两组患者治疗前后血清HCY、Gal-3水平比较[$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 6 Comparison of levels of serum HCY and Gal-3 between the two groups before and after treatment [$n, (\bar{x} \pm s)$]

指标	时间	观察组(n=52)	对照组(n=52)	t值	P值
HCY (μmol/mL)	治疗前	19.35±2.54	19.84±2.63	0.966	0.336
	治疗后	15.13±2.04 ^a	17.27±2.12 ^a	5.245	<0.001
Gal-3 (μg/L)	治疗前	12.34±2.17	11.87±2.24	1.087	0.280
	治疗后	4.16±1.02 ^a	6.39±1.31 ^a	9.686	<0.001

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

心衰是心脏疾病发展的终末阶段,冠心病是心衰的主要病因,冠心病合并心衰对心脏结构和功能的损伤程度更为严重,增加了治疗难度。多种药物联用扩张冠状动脉血管、增加心肌血氧供应和能量代谢是治疗冠心病合并心衰的主要手段。前列地尔治疗冠心病心衰的有效成分为前列腺素E₁(PGE₁),作为花生四烯酸的衍生物可增强

心肌收缩力,提高心排出量;可扩张冠状动脉及外周血管,改善血管内皮功能,减轻心脏前后负荷;可抑制血小板聚集,改善微循环;可降低血脂、抑制血管平滑肌增生,减轻动脉粥样硬化^[7]。

中医学将冠心病归属于“胸痹”、“真心痛”的范畴,心气不足、心阳不振易引起寒凝气滞,气血运行不畅则淤血阻碍心脉,故以温通心阳、活血化瘀为治则^[8]。大株红景天注射液的有效成分从中药大株红景天中提取,有活血化瘀、通脉止痛、补气等功效,适宜于冠心病的治疗^[9]。现代药理研究表明,大株红景天注射液可扩张冠脉血管、调节心脏血管顺应性、降低心脏后负荷和心肌耗氧量,也具有清除自由基、减少炎症因子的药理活性,因此被广泛应用于心血管疾病的临床治疗^[10]。本研究结果显示,观察组患者疗效明显高于对照组,说明冠心病患者加用大株红景天注射液治疗后临床症状改善更佳。冠心病合并心衰患者往往因心肌损伤而伴有心功能损伤,超声心动图表现为LVEF、CO降低,LVEDD、LVESD升高。本研究中,观察

组患者治疗后上述超声指标明显改善,且改善程度高于对照组,证实大株红景天注射液对冠心病合并心衰患者的心功能改善效果良好。

既往研究表明^[11],血管内皮功能紊乱是冠心病的病理基础之一,参与冠状动脉粥样硬化的始动环节,其中NO有舒张血管的作用,是重要的信息分子和效应分子,而ET在体内含量增加可导致血管内皮功能失衡。NT-proBNP作为临床常用的心衰标志物,广泛应用于心衰诊断、病情评估、治疗指导和预后判断^[12]。李晓霞等学者^[13]认为,心衰患者心脏负荷过重导致左心室舒张期末内径增大、左心室射血分数降低,血管内皮细胞分泌大量缩血管因子,增加血管平滑肌张力,可引起血压升高,因此改善血管内皮功能也有利于缓解心衰症状。本研究对上述指标的检测结果表明,观察组患者血清NO、ET、NT-proBNP治疗后的改善程度明显高于对照组,说明大株红景天注射液治疗冠心病合并心衰的效果显著,与血管内皮功能改善有一定关联。氧化应激在心衰的病理过程中起到关键作用,患者体内自由基产生过多,氧化程度超出氧化物清除,氧化系统和抗氧化系统失衡会导致组织损伤,因此治疗心衰时应加强抗氧化应激治疗,有助于心功能改善^[14]。本研究发现,两组患者血清MDA、SOD、CAT水平均得到明显改善,且观察组改善更显著,表明大株红景天注射液具有较强的抗氧化应激功能,同时也具有一定的抗衰老作用。

相关文献报道称^[15],HCY作为机体内蛋氨酸代谢过程中的一种中间产物,属于冠心病的危险因素,能反映冠脉病变支数和病变程度,其在血清中浓度随病情加重而增加。Gal-3是一种炎症信号分子,在体内参与细胞活化、免疫反应、黏附、生长与凋亡等多种生物活动,尤其在心肌纤维化、重塑过程中发挥关键性作用^[16]。有研究表明,Gal-3参与冠心病的病理过程,可激活动脉粥样硬化斑块内炎症细胞和巨噬细胞,促进单核细胞进入血管壁,抑制平滑肌细胞核基质糖蛋白间黏附,最终导致动脉粥样硬化形成^[17]。本研究检测结果表明,两组患者经治疗后血清HCY、Gal-3水平明显降低,说明冠心病得到有效控制,而观察组变化更为显著,表明大株红景天注射液可有效抑制动脉粥样硬化的发生发展,促进疾病转归。

综上所述,大株红景天注射液治疗冠心病合并心衰效果显著,可明显改善心功能和内皮功能,减轻心肌损伤,提高抗氧化应激能力,促进疾病转归,适宜在临床推广。

参考文献

- [1] Rashid M, Kwok CS, Gale CP. Impact of co-morbid burden on mortality in patients with coronary heart disease, heart failure, and cerebrovascular accident a systematic review and meta-analysis [J]. *European Heart Journal Quality of Care & Clinical Outcomes*, 2017, 3(1):20-36.
- [2] 彭丁,王韶屏,赵东晖,等.高尿酸血症与血运重建术后冠心病心力衰竭患者预后的关系[J].*中华医学杂志*, 2018, 98(17):1337-1341.
- [3] 赖晓菁,康峰,张秀菊,等.大株红景天联合前列地尔治疗冠心病心力衰竭的临床研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(9):1308-1311.
- [4] 戚猛.大株红景天注射液配合西药治疗慢性充血性心力衰竭的效果分析[J].*中国急救医学*, 2016, 36(Suppl.1):153-154.
- [5] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.中国心力衰竭诊断和治疗指南2014[J].*中华心血管病杂志*, 2014, 42(2):98-122.
- [6] 陈文生,杨立明,纪征.大株红景天注射液联合前列地尔治疗冠心病心力衰竭的疗效分析[J].*辽宁中医杂志*, 2016, 43(10):2131-2133.
- [7] 金慧,李猛.前列地尔联合大株红景天注射液治疗冠心病心力衰竭疗效观察[J].*现代中西医结合杂志*, 2016, 25(31):3518-3519, 3531.
- [8] 李雅,贾辛未,刘胜辉,等.益气复脉注射液联合阿伐他汀治疗冠心病慢性心力衰竭疗效及对sCD40、sCD146、PAPP-A的影响[J].*中华中医药学刊*, 2019, 37(5):1225-1228.
- [9] 齐洪娜,关玉龙,张玮,等.大株红景天注射液联合美托洛尔对慢性心力衰竭患者氧化应激及心功能的影响[J].*中国心血管病研究*, 2016, 14(1):59-63.
- [10] 宁小康,王文丽,武向阳,等.大株红景天注射液联合重组人脑利钠肽治疗充血性心力衰竭的临床研究[J].*现代药物与临床*, 2017, 32(12):2339-2343.
- [11] 岑运光,李伟,张旭日,等.银杏叶注射液对老年高血压冠心病患者内皮素及冠脉血流的影响[J].*中华中医药学刊*, 2018, 36(11):2754-2756.
- [12] 韩莉莎,王琼,李丹,等.普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3):224-228.
- [13] 李晓霞,董彬,连亚军,等.通心络胶囊联合芪苈强心胶囊对慢性充血性心力衰竭心功能及血管内皮功能的影响[J].*中华中医药学刊*, 2018, 36(7):1753-1755.
- [14] 栾博,栾梅,邱雅慧.葛根素激活Nrf2通路减轻心力衰竭大鼠氧化应激损伤的研究[J].*现代预防医学*, 2019, 46(10):1852-1856.
- [15] 张韶斌,陈斯亮,罗莞超,等.脑卒中患者血清可溶性CD14、同型半胱氨酸和7项血脂结果分析[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(2):100-103.
- [16] 温晓玲,谢建平,林师宇,等.血清癌胚抗原、甲状腺球蛋白及半乳糖凝集素-3水平在甲状腺癌鉴别诊断中的价值[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(1):58-62.
- [17] 徐向勇.血浆半乳糖凝集素3和N末端B型钠尿肽在冠心病合并心力衰竭患者中的表达及临床意义[J].*海南医学*, 2017, 28(7):1098-1100.

MALDI-TOF MS在药物基因组学检测中的应用及展望

曹书娟^{1*} 刘彬¹ 朱安娜²

[摘要] 药物基因组学是临床基因检测的新兴领域,是个体化医学模式的重要组成部分。药物基因组学检测的结果能够在安全、合理用药中发挥指导作用,这使得越来越多的研究者更加关注遗传信息多态性与个体药物反应差异之间的关系。诞生于上世纪80年代的基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)已成为临床领域进行基因检测的主流技术之一。对于药物基因组学检测中常见的单核苷酸多态性(SNP)、拷贝数变异(CNV)、插入/缺失(In/Del)等分子标记,MALDI-TOF MS均能实现准确检出,同时以其检测的多重性、精准性、简便性、经济性得到越来越多的关注和应用。本文介绍了MALDI-TOF MS的技术原理并总结了MALDI-TOF MS在药物基因组学检测中的多个研究案例,旨在推广该技术在药物基因组研究中的应用,并加深研究者对该技术平台的认识,通过该技术平台的推广促进药物基因组学在临床的转化应用。

[关键词] MALDI-TOF MS; MassARRAY; 药物基因组学

Application and prospect of MALDI-TOF MS in pharmacogenomics

CAO Shujuan^{1*}, LIU Bin¹, ZHU Anna²

(1. Agena Bioscience Co., Ltd., Shanghai, China, 200030; 2. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510670)

[ABSTRACT] Genetic testing promises to improve the quality of care through the development of predictive one-time assays that will allow practitioners to personalize the diagnosis and treatment of health conditions. One of the frontrunners in this burgeoning field is pharmacogenomic (PGx) testing, which uses genetic markers to anticipate patient's responses to medications, thereby improving efficacy and safety. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), which was developed in the 1980s, has become one of the mainstream technologies for genetic detection in the clinic. MALDI-TOF MS can accurately detect molecular markers, such as single nucleotide polymorphisms, copy number variation, and insertions/deletions, commonly used in pharmacogenomic testing. This paper introduces the technical principle of MALDI-TOF MS and summarizes several research cases of MALDI-TOF MS in pharmacogenomics, aiming to promote the application of this technology in pharmacogenomic research and increase researchers' awareness of this technology platform.

[KEY WORDS] MALDI-TOF MS; MassARRAY; Pharmacogenomic

药物基因组学是近年来由药物遗传学发展而来的临床基因检测新兴领域,其研究目的是阐明基因多态性对药物效应和毒性的影响以及对药物作用靶点的确定。不同个体的药物遗传多态性是

药物基因组学的基础,表现为药物代谢酶的多态性、药物受体的多态性以及药物靶标的多态性等。在药物代谢相关途径中的细胞色素P450 (Cytochrome P450 proteins, CYP)酶系是最主要的

基金项目:广州开发区国际科技合作项目(2017GH01);广东特支计划(2017TY04R311)

作者单位:1. 基纳生物技术(上海)有限公司,上海 200030

2. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510670

*通信作者:曹书娟, E-mail: shujuan.cao@agenabio.com

药物代谢酶,目前已发现的CYP基因至少有53个,其中的CYP3A4、CYP2D6、CYP2C19、CYP1A2、CYP2E的编码基因具有较为显著的遗传多态性意义^[1]。在药物受体基因多态性的研究中最为重要的药物受体是G蛋白偶联受体,目前研究较多的是 β 2-肾上腺素受体^[2],另外5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)载体^[3]、维生素D受体(Vitamin D receptor, VDR)^[4]和血管紧张素转换酶等基因多态性^[5]对药物的作用也密切相关。药物转运基因及相关疾病通路基因如ApoE基因^[6]、编码P-糖蛋白的基因^[7]、VKORC1基因的多态性研究^[8]也证实了药物转运基因和疾病通路上的靶点基因与药效之间的密切关系。药物基因组信息是当前个体化精准医疗的一个重要部分,药物基因组学的临床实施可以实现个性化医学,提高治疗的功效,安全性和成本效益。另一方面,通过区分有效适用人群,使得更多的新药能够有效通过临床试验,为治疗提供更多可能。

随着基因检测技术的发展,目前已有多种分子检测平台可应用于药物基因组学的研究,包括基于聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术的荧光定量PCR^[9]、突变扩增阻滞系统荧光定量PCR^[10]、微滴式数字PCR^[11]、生物芯片技术^[12]、Sanger测序技术^[13]和二代测序技术^[14]等。这些技术各具特点,也各有局限性。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)技术的出现和发展克服了PCR技术多重扩增能力不足的问题,解决了药物基因组检测中多个变异位点同时检测的需求;其不依赖于荧光探针和荧光类试剂的检测流程,质谱技术的高准确性和高灵敏度保证了检测的高准确度和重复性;同时其检测成本相比二代测序技术具备更高的性价比。

越来越多的研究者在MALDI-TOF MS技术平台上取得了大量的研究成果,MALDI-TOF MS已经成为分子检测的又一有力工具。本文将系统性的介绍MALDI-TOF MS技术原理和使用该技术开展的药物基因组相关的研究进展。

1 MALDI-TOF MS 技术原理

MALDI-TOF MS出现于20世纪80年代,该技术突破了传统质谱仅可以进行小分子物质分析的局限,使得核酸、蛋白质等生物大分子也可以应用

质谱进行研究^[15],极大推进了基因组学和蛋白质组学的发展,为生物和医学领域带来革命性突破。

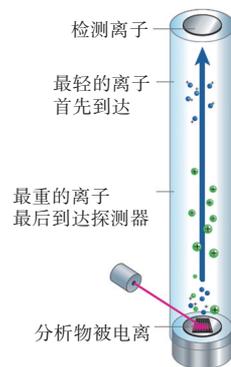


图1 MALDI-TOF 质谱系统原理图示(绘制)

Figure 1 Schematic representation of the MALDI-TOF mass spectrometry system

质谱技术的基本原理是通过将待测样品离子化,产生一系列不同质荷比的离子,质量分析器能够测定该样品中不同种类离子的分子量,按照从小到大的顺序依次排列从而得到一张分子量峰图。质谱仪器可以通过样品进样方式、离子源、质量分析器的类型等方面进行分类。其中,MALDI-TOF MS采用的是样品与基质混合进样,激光解吸电离作为离子源以及飞行时间法进行质量分析。

首先,MALDI-TOF MS的电离过程需要基质参与。基质多采用有机酸^[16],因其具有很强的激光能量吸收能力,能够增强样品对激光的吸收,同时降低激光对样品的破坏,对样品起到保护作用。样品与基质混合后发生共结晶,经激光照射,基质迅速蒸发,其与样品之间的分子间作用力快速减弱,样品分子进而得以释放。与此同时,基质将吸收到的激光能量传递至样品分子并使其带上正电荷。该技术灵敏度极高,仅需pmol-fmol级别的微量样本即可进行检测^[17]。随后,离子化的样品分子进入飞行时间质量分析器,通过脉冲电场对离子化的样品进行加速,不同分子量的离子在真空飞行管内以各自不同的恒定速度向离子检测器飞行,从而可以区分出样品中不同分子量的离子(图1)。在核酸检测的应用中,分子量的检测范围多限制在1 000-10 000 D这个分子量区间内^[18]。在现有的成熟应用中,MALDI-TOF能够检测的变异类型包括单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)、拷贝数变异

(Copy Number Variations, CNVs)、甲基化、插入缺失突变(In/Del)等。

对于药物基因组学检测中常见的变异类型: SNP 和 CNV 的检测, MALDI-TOF 主要通过基于多重 PCR、单碱基延伸及质谱检测相结合的技术来实现。例如在 SNP 检测中,首先通过 PCR 的方法将含有待测 SNP 的目的片段进行扩增,扩增结束后利用虾碱性磷酸酶 (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) 将体系中的剩余的 dNTP 去磷酸化不能够继续与模板结合。然后在反应体系中继续加入 SNP 多态性碱基所对应的单碱基延伸引物 (Unlined base Extension Primer, UEP) 和双脱氧核糖核苷 (Dideoxynucleotide, ddNTP) 等相关成分进行单碱基延伸反应。在这个过程中, UEP 可与待测 SNP 的 5' 端结合且只延伸一个碱基, 根据模板中不同的 SNP 序列即可得到不同的延伸产物。经离子交换树脂脱去反应体系中的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 等离子后, 即可将反应液进点样至 MALDI-TOF MS 专用芯片上进行质谱检测并得到延伸产物的分子量图谱(图 2)。

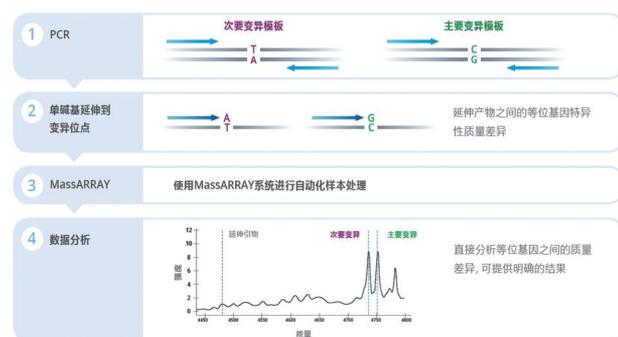


图 2 MALDI-TOF MS 检测实验流程

Figure 2 MALDI-TOF MS workflow

核酸质谱能够实现在同一个反应孔中对多个不同位点同时进行扩增和延伸, 单孔反应最多高达 40 重。因同一 SNP 位点上不同基因型(纯和型或杂合型)对应的碱基不同, 且各个 SNP 位点上所设计的引物序列不同, 即可在结果中以分子量图谱的形式显示出同一位点上的不同基因型, 并区分出不同位点上的延伸产物峰(图 3)。同样的原理在检测基因突变时, 在突变位点上检出的不同碱基即为野生型和突变型。除了基因突变的定性检测, 根据质谱图谱中检测峰的峰面积与该分子量核酸片段的含量成正比的关系, 还能够计算出样本中野生型和突变型在该位点上的比例。目前

MALDI-TOF MS 能够检出最低 0.1% 的突变比例。

一次质谱可以同时分析多至几十个位点的基因分型, 图为 9 个位点同时检测的结果示例^[19]。

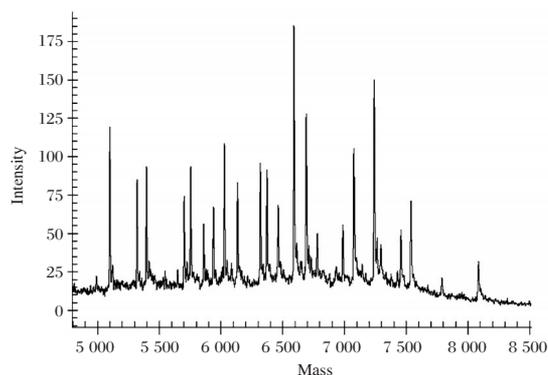


图 3 MALDI-TOF MS 原始数据

Figure 3 MALDI-TOF MS raw data

2 MALDI-TOF MS 在药物基因组相关分子标记检测中的应用

Liu 等研究者为研究相关基因位点对氯吡格雷用药的影响, 在 MassARRAY 核酸质谱和焦磷酸测序两种技术平台上, 在 458 位中国汉族心血管患者群体中, 对 *CYP2C19* (*2, *3, *4, *5, *17) 和 *ABCB1* C3435T 基因上共 6 个 SNP 进行了基因分型检测, 并使用 Sanger 测序作为验证技术。其中有 6 份样本在两种方法中呈现不同结果。经 Sanger 测序验证, MassARRAY 平台的检测结果与 Sanger 测序结果完全一致, 6 个 SNP 的次等位基因频率在该患者群体中分别为 27.1% (*CYP2C19**2), 5.9% (*CYP2C19**3), 0% (*CYP2C19**4), 0% (*CYP2C19**5), 1.1% (*CYP2C19**17), 40.9% (*ABCB1*)。该项研究的研究者认为 MassARRAY 核酸质谱技术平台能够为氯吡格雷相关药物基因组检测提供精准的检测结果, 同时相比于焦磷酸测序 MassARRAY 能够实现高性价比、快速出具报告和更高的检测通量^[20]。奥氮平作为二代抗精神疾病药物, 在精神分裂症的治疗中起到非常重要的作用。但不同患者对奥氮平的应答反应个体差异巨大。Zhou 等研究者使用 MALDI-TOF 技术对两个独立的实验组进行 12 个与奥氮平药物反应相关的 SNP 检测, 结果显示其中有 2 个 SNP 在两个实验组中均与奥氮平的药物应答反应显著相关。并指出这 2 个 SNP 在后续临床开展的奥氮平治疗中起到重要参考作用^[21]。

CYP2D6 基因的 CNV 也是药物基因组学研究中常见的一种多态性形式。常见的 CNV 检测方法只能对 *CYP2D6* 基因的单一区域进行检测,以确定拷贝数,而人类 *CYP2D6* 基因常为与 *CYP2D7* 假基因的杂交型基因,因此这些常规方法的单一区域检测很可能得到不准确的拷贝数或药物代谢信息。使用 MALDI-TOF MS 通过对 *CYP2D6* 基因中不同区域设计多个检测位点同时进行检测,深度覆盖杂交型 *CYP2D6* 基因,能够获得更为精准的拷贝数变异信息,通过设计 CNV, SNP 以及 In/del 的检测组合,可以实现对一系列药物基因组基因位点的同时检测,提供一套快速,经济,准确的检测方案。实验数据表明 MALDI-TOF 质谱能够准确进行 *CYP2D6* 基因多态性分型,是一种经济有效的药物基因组检测方案^[22]。同时 MassARRAY 核酸质谱技术也常常作为其他分子检测技术的验证标准,Liu 等研究者设计了一套基于荧光定量 PCR 技术的含 32 个 SNP 的 *CYP450* 家族基因分型和拷贝数变异 panel,并使用 MassARRAY 核酸质谱以及数字 PCR (Droplet Digital PCR, ddPCR) 技术对该 panel 检测结果进行验证,结果证明核酸质谱技术具备与 ddPCR 一致的灵敏度和准确性^[23]。美国 Assurex 公司针对精神类疾病用药制定了一套基于 MassARRAY 核酸质谱平台的检测方案,和参考方法的平行比较结果具有 100% 的一致性^[24],基于此 Assurex 使用该平台开发的 Genesight PGx 检测 panel 覆盖 55 种常见药物,检测量每年超过 50 万人次。国内的第三方检测机构和医院也逐渐基于此平台开展高血压、精神分裂、抑郁症等疾病用药基因检测。

3 展望

现有的可用于药物基因组学相关研究的技术和平台,如荧光定量 PCR、微滴式数字 PCR,生物芯片技术,Sanger 测序技术和二代测序技术等,这些技术在实验操作难度、检测时间的长短、检测成本的控制、数据分析难度等方面各有利弊。相比之下,已有大量研究证明 MALDI-TOF MS 利用多重 PCR 技术,在同一个反应中同时检测高达 40 个变异位点,不但能够对药物基因组学中相关 SNP 进行检测,还能够同一 panel 中同时检测 CNV 和 Indel,极大的提高了检测效率,节约了样本用量,同

时其基于分子量的质谱检测方式提供了不依赖于荧光信号的检测准确度,以极高的性价比满足了药物基因组分子检测的需求。美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 已于 2018 年批准美国 Agena Bioscience 公司的 MassARRAY[®] MALDI-TOF MS 可用于临床核酸检测^[25]。在中国,达瑞生物的 DR MassARRAY 飞行时间质谱系统通过了国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 审核,成为国内第一台获批 IVD 核酸质谱检测系统,批准其 SNP 方面的应用,如耳聋基因检测等。

随着全基因组关联分析 (Genome-wide association analysis, GWAS) 生物统计/信息平台的建立和发展,越来越多的基因多态性信息被发现与药物在体内的代谢、转运、和作用靶点密切关联。自 2007 年 FDA 批准了第一种遗传分子检测,根据 *CYP2C9* 和 *VKORC1* 基因多态性预测抗凝药华法林的敏感性^[26-28],标志着药物基因组学已经开始由实验室研究走向实际应用。到目前为止已有 140 余种药物经 FDA 批准,在说明书中附上其药物基因组信息,用于指示不同基因型的临床患者在应用该药物时对疗效和毒性的预测作用^[28],其中涵盖了高血压、内分泌、哮喘、高血脂、精神类、肿瘤等疾病的药物治疗。在我国,为进一步推进合理用药、安全用药,中华人民共和国国家卫生健康委员会于 2015 年 7 月颁布了《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术试行指南》(国卫医便函[2015]240号)^[29]。在指南中明确指出药物代谢酶和药物作用靶点相关的药物种类及其对应基因,进一步提高了药物基因组学检测的重要性并作出规范化的要求。

基于 MALDI-TOF MS 的核酸检测平台具备了独特的多重 PCR 技术,稳定且准确的检测结果,经济的检测成本和快速的周转时间,能够满足临床上越来越多的对中高通量 SNP、CNV 及 Indel 变异的定性和定量检测需求,这些优势也使得核酸质谱技术在基因检测领域显示出强大的竞争力。伴随全球对药物基因组研究日益增长的关注度和更多遗传标记的发现,以及对核酸质谱技术的了解与应用不断深入,该检测平台将成为分子检测实验室不可或缺的标准装备。

参考文献

- [1] 许力,王升启,药物基因组学的发展及其在个体化用药中的应用[J]. 国外医学药学分册, 2006, 33(6):441-444.
- [2] Menezes -Rodrigues FS, Errante PR, Tavares JGP, et al. Pharmacological modulation of b-adrenoceptors as a new cardioprotective strategy for therapy of myocardial dysfunction induced by ischemia and reperfusion [J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2019, 34(5):e201900505.
- [3] Meltzer HY. New Trends in the Treatment of Schizophrenia [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2017, 16(8):900-906.
- [4] De Luca P, de Girolamo L, Perucca Orfei C, et al. Vitamin D's Effect on the Proliferation and Inflammation of Human Intervertebral Disc Cells in Relation to the Functional Vitamin D Receptor Gene FokI Polymorphism [J]. International journal of Molecular Sciences, 2018, 19(7):2002.
- [5] de Oliveira FF, Chen ES, Smith MC et al. Pharmacogenetics of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Patients with Alzheimer's Disease Dementia [J]. Current Alzheimer Research, 2018, 15(4):386-398.
- [6] Ward KM, Kraal AZ, Flowers SA, et al. Cardiovascular Pharmacogenomics and Cognitive Function in Patients with Schizophrenia [J]. Pharmacotherapy, 2017, 37(9):1122-1130.
- [7] Sychev D, Shikh N, Morozova T, et al. Effects of ABCB1 rs1045642 polymorphisms on the efficacy and safety of amlodipine therapy in Caucasian patients with stage I-II hypertension [J]. Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 2018, 11:157-165.
- [8] Johnson JA, Caudle KE, Gong L, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics - Guided Warfarin Dosing: 2017 Update [J]. Clinical Pharmacology Therapeutics, 2017, 102(3):397-404.
- [9] Langaee T, EI Roubay N, Stauffer L, et al. Development and Cross-Validation of High-Resolution Melting Analysis-Based Cardiovascular Pharmacogenetics Genotyping Panel [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2019, 23(3):209-214.
- [10] Mousavi S, Kohan L, Yavarianet M, et al. Pharmacogenetic variation of SLC47A1 gene and metformin response in type2 diabetes patients[J]. Mol Biol Res Commun, 2017, 6(2):91-94.
- [11] Del Re M, Rofi E, Cappelli C, et al. The increase in activating EGFR mutation in plasma is an early biomarker to monitor response to osimertinib: a case report [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):410.
- [12] Jmel H, Romdhane L, Ben Halima Y, et al. Pharmacogenetic landscape of Metabolic Syndrome components drug response in Tunisia and comparison with worldwide populations [J]. PLoS One, 2018, 13(4):e0194842.
- [13] Zhou JC, He FZ, Sun B, et al. Polytropic Influence of TRIB3 rs2295490 Genetic Polymorphism on Response to Antihypertensive Agents in Patients With Essential Hypertension [J]. Front Pharmacol, 2019, 10:236.
- [14] Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Prediction of drug response and adverse drug reactions: From twin studies to Next Generation Sequencing [J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 130:65-77.
- [15] Bonk T, Humeny A. MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA [J]. Neuroscientist, 2001, 7(1):6-12.
- [16] Chang WC, Huang LC, Wang YS, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 582(1):1-9.
- [17] 中国核酸质谱应用专家共识协作组,中国核酸质谱应用专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(12):895-900.
- [18] Ye AL, Zhang HY, Dou YL, et al. Establishment of MALDI TOF-MS Technique Platform for Detecting Cytochrome P450 Gene Polymorphism [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5):30-33.
- [19] Jurinke C, Oeth P, van den Boom D. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis [J]. Molecular Biotechnology, 2004, 26(2):147-164.
- [20] Liu J, Xu Z, Li Y, et al. Comparison between MassARRAY and Pyrosequencing for CYP2C19 and ABCB1 Gene Variants of Clopidogrel Efficiency Genotyping [J]. Molecular Membrane Biology, 2019, 35(1):1-8.
- [21] Zhou W, Xu Y, Lv QY, et al. Genetic association of olanzapine I treatment response in Han Chinese schizophrenia patients [J]. Front. Pharmacol, 2019, 10:177.
- [22] Schroth W, Hamann U, Fasching PA, et al. CYP2D6 polymorphisms as predictors of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: Expanded polymorphism coverage improves risk stratification [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17):4468-4477.
- [23] Goh LL, Lim CW, Sim WC, et al. Analysis of Genetic Variation in CYP450 Genes for Clinical Implementation [J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0169233.
- [24] Jablonski MR, King N, Wang Y, et al. Analytical validation of a psychiatric pharmacogenomic test [J]. Personalized Medicine, 2018, 15(3):189-197.
- [25] Establishment Registration and Device Listing [S]. American Maryland: U.S. Food and Drug Administration, 2019.
- [26] Cooper GM, Johnson JA, Langaee TY, et al. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose [J]. Blood, 2008, 112(4):1022-1027.
- [27] Ndegwa S. Pharmacogenomics and warfarin therapy [J]. Issues Emerg Health Technol, 2007, (104):1-8.
- [28] Gage BF, Lesko LJ. Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues [J]. J Thromb Thrombolysis, 2008, 25(1):45-51.
- [29] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术试行指南 [Z]. 2015-07-31.

基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用

田彩平¹ 杨碎胜² 袁红霞¹ 孙敬阳³ 王维君⁴ 许金苓⁵ 廖世奇^{1*}

[摘要] 细胞上的表面膜蛋白能够维持细胞结构的完整性以及调控细胞生理活动,膜蛋白种类及表达水平均与恶性肿瘤的发生发展密切相关。Cell-SELEX 是将完整活细胞作为筛选靶标,其最大的优点是在筛选过程中能够同时以多种呈天然构象的膜蛋白为靶标分子,不需要预先了解细胞表面蛋白种类及其表达水平,特别适用于肿瘤细胞的核酸适配体筛选,为药物筛选、临床诊断、疾病治疗和基础医学研究等带来了新的思路和方法,在肿瘤诊治领域具有广泛的应用前景。本文对基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用做一综述,以期对 Cell-SELEX 的研究提供参考依据,对恶性肿瘤的分子诊断、个体化治疗研究提供帮助。

[关键词] Cell-SELEX; 核酸适配体; 肿瘤

The application of nucleic acid aptamers based on Cell - SELEX in tumor diagnosis and treatment

TIAN Caiping¹, YANG Suisheng², YUAN Hongxia¹, SUN Jingyang³, WANG Weijun⁴, XU Jinling⁵, LIAO Shiqi^{1*}

(1. Medical Molecular Biology Research Center of Gansu Province Medical Science Institute, Lanzhou, Gansu, China, 730050; 2. Galactophore Department I of Gansu Province Tumor Hospital, Lanzhou, Gansu, China, 730050; 3. Clinical Medicine College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu, China, 730030; 4. Surgical Department II of Gansu Province Tumor Hospital, Lanzhou, Gansu, China, 730050; 5. College of Life Sciences of Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu, China, 730070)

[ABSTRACT] Surface membrane proteins on cells can maintain the integrity of cell structure and regulate cell physiological activities. Their types and expression levels are closely related to the occurrence and development of cancer. Cell-SELEX is a selex technology which screening targets are complete living cells. The biggest advantage of Cell - SELEX is that it can target multiple membrane proteins with natural conformation at the same time in the selex process, and it does not need to know the types of cell surface proteins and their expression levels in advance. This technique is especially suitable for nucleic acid aptamer screening in tumor cells. It brings new ideas and methods for drug screening, clinical diagnosis, disease treatment and basic medical research, and it has a broad application prospect in the field of tumor diagnosis and treatment. This article reviews the application of Cell-SELEX-based nucleic acid aptamers in the diagnosis and treatment of tumors, with a view to providing reference for the research of Cell-SELEX, and to help the molecular diagnosis and individualized treatment of malignant tumors.

[KEY WORDS] Cell-SELEX; Nucleic acid aptamers; Cancer

基金项目:国家自然科学基金项目(81560346);甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSKY2017-06);甘肃省科技计划项目(18JR3RA061);兰州市科技计划项目(2018-3-40)

作者单位:1. 甘肃省医学科学院医学分子生物学研究中心,甘肃,兰州 730050

2. 甘肃省肿瘤医院乳腺一科,甘肃,兰州 730050

3. 甘肃中医药大学临床医学院,甘肃,兰州 730030

4. 甘肃省肿瘤医院腹外二科,甘肃,兰州 730050

5. 西北师范大学生命科学学院,甘肃,兰州 730070

*通信作者:廖世奇, E-mail: lshiqi@126.com

恶性肿瘤已经成为世界性的健康问题之一,据世界卫生组织报道,到2025年恶性肿瘤病例将从2012年的1 400万增加到2 000多万^[1]。恶性肿瘤的发生、侵袭和转移有很多的诱导因素,比如病毒感染、环境因素和基因异常等等,这些因素导致恶性肿瘤的复杂性^[2]。恶性肿瘤与基因组之间有着密切的联系,特异性表型与个体基因型的相关性是肿瘤(肿瘤分为良性肿瘤和恶性肿瘤)研究的关键,恶性肿瘤发生的过程主要是由原癌基因的损伤或突变引起的,这些基因编码了与细胞增殖、分化有关的蛋白质,以及与生长和凋亡有关的信号^[3]。蛋白质是关于细胞内发生变化的更准确的信息来源,是疾病本身发展的一个关键指标,它可以在体液或组织中被检测到,所以蛋白质可以成为疾病检测的生物标记。恶性肿瘤细胞和正常细胞表面有不同的受体蛋白,利用这些受体可以判断疾病进展以及预后。Tuerk等^[4]构建了指数量富集的配基系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术,在此基础上,Tan等^[5]构建了Cell-SELEX技术,它是以整个细胞作为靶标筛选特异性核酸适配体的技术,并且不需要预先了解细胞表面蛋白种类及其表达水平,特别适用于肿瘤细胞的核酸适配体筛选,为药物筛选、临床诊断、疾病治疗和基础医学研究等带来了新的思路和方法,在肿瘤诊治领域具有广泛的应用前景。本文对基于Cell-SELEX的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用做一综述,以期为Cell-SELEX的研究提供参考依据,对恶性肿瘤的分子诊断、个体化治疗研究提供帮助。

1 SELEX 技术

SELEX技术是一种新的组合化学技术,该技术应用体外化学合成的大容量随机寡核苷酸文库(ss-DNA文库和RNA文库)与靶物质结合,洗掉未与靶物质结合的DNA,分离与靶物质结合的DNA,以此DNA为模板进行聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增,进行下一轮的筛选过程。通过重复的筛选与扩增,一些与靶物质不结合或与靶物质有低亲和力、中亲和力的DNA或RNA分子被洗去,而与靶物质有高亲和力的DNA或RNA从随机文库中分离出来,即核酸适配体^[6]。

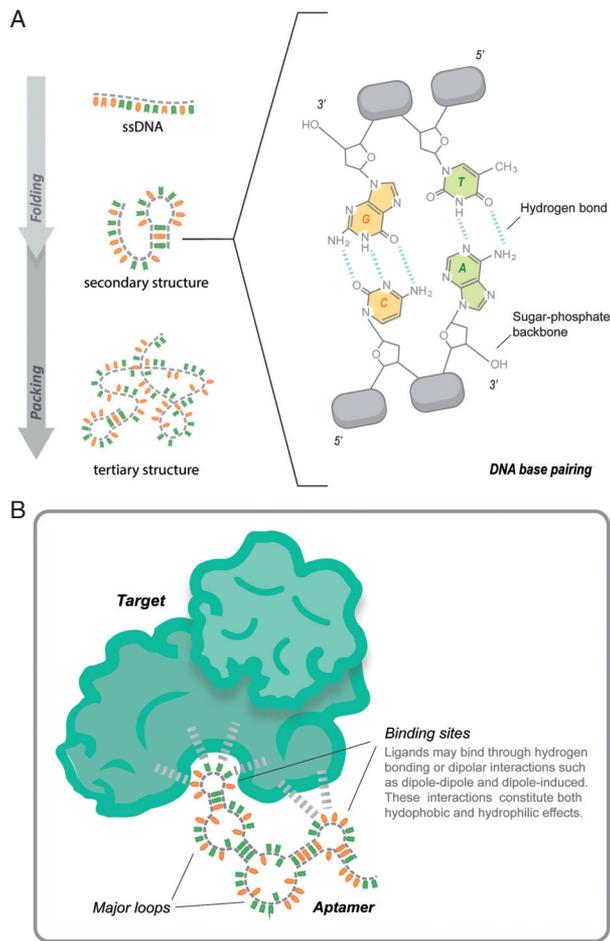
人工合成的单链随机寡核苷酸文库包括DNA文库、RNA文库、修饰化的RNA文库,该文库是两端约为20个碱基的固定序列(该区域带有限制性内

切酶位点,是多聚酶链反应及其他酶学反应相关引物的结合位点),中间为约20~40个碱基的随机序列,库容量可达 10^{15} ,理论上,库容量达到 10^{14} 以上的随机寡核苷酸文库几乎涵盖了所有可能的立体构象,可为自然界存在的所有分子“配型”,识别特异性的核酸适配体^[7]。单链寡核苷酸因序列不同,可形成构象不同且热力学上稳定的二级和三级结构,如发卡、口袋、假结、G四聚体等,由于随机序列的存在,文库中的单链寡核苷酸因序列各异而形成多样而独特的空间构象,适配体能够通过碱基配对、范德华力,氢键和静电等相互作用和靶标结合,主要是特异性茎环识别靶标^[8](见图1A至C),然后结合PCR体外扩增技术,以指数富集与靶分子特异结合的寡核苷酸,经过反复的体外筛选、扩增,最终获得高亲和力、高特异性的核酸适配体^[9]。

应用SELEX技术筛选的靶物质范围广泛,包括DNA聚合酶、人免疫缺陷病毒反转录酶(human immunodeficiency virus reverse transcriptase 1, HIV-1)、细胞生长因子、激素、小肽、抗体以及三磷酸腺苷(adenosinetriphosphate, ATP)、氨基酸等小分子有机物,甚至金属离子、糖、有机染料,以及完整的细胞、病毒、孢子等^[10]。该技术和抗体相比具有操作简便,筛选周期短等优点,更为重要的是它与靶细胞或靶分子的高特异性和高亲和力^[11](见表1)。经过多年的研究,SELEX技术筛选的适配体在疾病诊断、治疗、药物递送、生物成像、分析试剂、法医鉴定、危险性检测、食品应用、搜索工具等多个方面得到应用^[12]。

2 Cell-SELEX 技术

尽管应用传统SELEX技术已经筛选到许多高特异性的适配体,但生物体内在生理条件下可能发生翻译后修饰或三维构象的改变,使得筛选到的适配体无法识别该靶标在细胞膜表面的天然构象。细胞作为与外界环境交换物质和能量的结构,细胞表面膜上存在大量的蛋白质类功能分子,占细胞蛋白总量的30%,这些蛋白质类功能分子能够维持细胞结构的完整性,并且对细胞生理功能起着关键作用^[13]。如离子通道与胞膜的物质转运功能有关,受体与细胞辨认和接受环境中特异的化学性刺激有关,白细胞分化抗原(Cluster of Differentiation, CD)分子与细胞的免疫功能有关^[14]。因此,为了筛选出能够识别膜蛋白天然构象的适配体,Tan等^[5]率先提出了Cell-SELEX技术,与传统SELEX技术



注: A. 单链 DNA 经过一系列条件的影响能够折叠形成二级结构, 二级结构进一步扭曲盘绕形成三级结构, 分子线性部分的单链 DNA 碱基对通过氢键相互作用。B. 在茎环中, 碱基可以自由地通过氢键或偶极与靶标相互作用。

图1 适配体的结构和与它特异性结合的靶标示意图
Figure 1 Depiction of the aptamer structure and its interaction with the target

不同的是, Cell-SELEX 的靶标是完整的活细胞, 筛选出细胞表面分子的适配体, 该技术最大的优点是在筛选过程中能够同时以多种呈天然构象的膜蛋白为靶标分子, 并且不需要预先了解细胞表面蛋白种类及其表达水平。恶性肿瘤的发生是由于基因的突变, 这些突变的基因会引起细胞内部分子的改变, 最终引起细胞形态和生理的改变。研究表明膜蛋白的种类及其表达水平均与恶性肿瘤的发生发展密切相关, 因而 Cell-SELEX 技术对恶性肿瘤发生发展分子机制的研究、恶性肿瘤新标志物的发现以及恶性肿瘤精准诊疗新方法的提出具有一定的促进作用, 在恶性肿瘤的检测诊疗及生物标志物的研究方面具有良好的前景。

表1 核酸适配体和蛋白质抗体特性对比

Table 1 The characteristics comparison of nucleic acid aptamers and protein antibody

特征	抗体	适配体
材质	多肽	核酸
特异性	高	高
亲和力	高	高
免疫原性	高	没有体液反应
制备场所	体内	体外
花费	高	低
稳定性	不稳定	稳定
潜在靶标	限于免疫原性分子	范围广泛
制备时间	约6个月	约3-7周
修饰	有限	方便

Cell-SELEX 筛选过程主要包括孵育、洗脱和扩增3个过程。为了提高所筛选的核酸适配体的特异性, 文库先与形态上、生物学上以及生物化学上相似的反筛靶细胞(一般以正常细胞作为反筛靶细胞)结合, 然后再与正筛靶细胞(一般以肿瘤细胞作为正筛靶细胞)结合, 然后洗脱掉没有与靶蛋白结合的核酸分子, 具有强结合力的核酸适配体通过 PCR 技术扩增分离得到, 然后被用作下一轮筛选的次级文库, 这个过程重复几个循环, 直到筛选到高亲和力和高特异性的适配体为止, 最后, 通过克隆测序, 测定筛选得到的适配体分子的详细序列信息。

3 筛选的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用

应用 Cell-SELEX 技术筛选到了许多针对细菌细胞、大肠杆菌、被狂犬病病毒感染的幼鼠细胞系(BHK-21)的核酸适配体, 更重要的是筛选到很多针对不同恶性肿瘤细胞类型的核酸适配体, 比如针对肺癌、恶性胶质瘤、胰腺、结肠直肠癌、肝癌、淋巴瘤、白血病以及其它恶性肿瘤的核酸适配体。这些适配体的成功筛选对恶性肿瘤生物靶标的发现、诊断、治疗、分子成像、药物递送都已有应用^[15-16]。如从恶性胶质瘤 K308 细胞筛选的 WQY-9-B 适配体用于诊断分子探针, 从卵巢癌 Caov-3 细胞筛选的 RLA01、RLA02 和 RLA03 适配体用于诊断和药物递送, 从乳腺癌 MCF-7 细胞筛选的 MS03 适配体用于诊断和治疗, 从胰腺导管腺癌 PL45 细胞系筛选的 XQ-2d 适配体用于体内成像和临床组织识别(见表2)。

表2 应用 Cell-SELEX 筛选出的核酸适配体

Table 2 The nucleic acid aptamers screened by cell-SELEX

适配体	肿瘤类型	靶标	功能
GBI-10	恶性胶质瘤	U251 细胞系	识别靶标 ^[17]
GBM128 GBM131	恶性胶质瘤	U118-MG 细胞系	识别分子靶标 ^[18]
U2, U8, U19, U31	恶性胶质瘤	U87 过表达 EGFRvIII	分子成像探针 ^[19]
WQY-9-B	恶性胶质瘤	K308	诊断分子探针 ^[15]
KMF2-1a	乳腺癌	MCF-10AT1	特定细胞内药物递送 ^[20]
MS03	乳腺癌	MCF-7 细胞	诊断和治疗 ^[21]
KW16-13	乳腺导管癌	MCF10CA1h	新型的抗肿瘤疗法 ^[22]
TD05	B 细胞淋巴瘤	Ramos 细胞	体内荧光成像 ^[23]
S3, S5, S12, S27	鼻咽癌	NPC 5-8F 细胞系	早期诊断和靶向治疗的生物靶标 ^[24]
TLS1, TLS3, TLS4, TLS6, TLS7, TLS9, TLS11	肝癌	BNL 1ME A.7R.1 细胞系	分子探针 ^[25]
LY-1, 13, 46, 32, 27/45, 7/43	肝癌	HCCLM9 细胞系	新的诊断靶标 ^[26]
LY-1	肝癌	HCCLM9	转移性肝癌的分子探针和化疗的开发 ^[27]
PL1-8	胰腺导管腺癌	PL45 细胞系	生物标记和药物递送 ^[28]
XQ-2d	胰腺导管腺癌	PL45 细胞系	体内成像和临床组织识别 ^[29]
Aptamers 1 and 146	胰腺癌	HPAC 细胞系	CSCs 靶标药物递送, 循环肿瘤细胞检测 ^[30]
RLA01, RLA02, RLA03	卵巢癌	Caov-3 细胞	诊断和药物递送 ^[31]
XL-33-1	结肠癌	SW620 细胞	转移性恶性肿瘤的诊断和治疗 ^[32]

3.1 在肿瘤标志物发现方面的应用

通过 Cell-SELEX 筛选的核酸适体可以特异性识别肿瘤细胞,其识别的基础是肿瘤细胞与正常细胞之间存在的未知膜蛋白的分子差异。因此,分离鉴定能够与肿瘤细胞特异性识别的核酸适配体结合的靶蛋白就可以发现肿瘤标志物。Shang-guan 等^[33]利用 Cell-SELEX 技术成功的发现了对于 T 细胞急性淋巴白血病的潜在肿瘤标志物酪氨酸蛋白激酶受体分子 (protein tyrosine kinase 7, PTK7)。Jia 等^[24]利用该技术发现 CD109 有可能成为对鼻咽癌进行早期诊断和治疗的一个新的肿瘤标志物。Kaur 等^[34]用该技术筛选出的能够抑制肿瘤细胞侵袭的核酸适体 TOV6,通过 siRNA (小干扰 RNA)沉默等技术,确定出了卵巢癌的潜在肿瘤标志物磷酸化应激诱导蛋白 (stress-induced phosphoprotein 1, STIP1) 等。

3.2 在肿瘤靶向治疗方面的应用

药物对肿瘤治疗效果不理想的原因大多数是药物对肿瘤细胞的选择性差、毒性大以及易产生耐药性等,由于核酸适体对靶细胞有高亲和性和特异性,所以在肿瘤的靶向治疗中具有重要意义。Meng 等^[35]将抗癌药物 DOX 与人肝肿瘤细胞株 LH86 的核酸适配体 TLS11a-GC 偶连形成药物-适配体共轭探针,实验结果表明 DOX-TLS11a-GC

对靶细胞具有靶向性与特异性,因此该核酸适配体可以用于抗癌药物的靶向递送。Liu 等^[36]将抗癌药物 DOX 包裹于纳米颗粒中,再与适配体结合组装成三维纳米结构,结果证明 DOX 能有效稳定地插入到适配体中,这样改装的 DOX 对人乳腺癌细胞的耐药性具有抑制作用。Zhu 等^[37]研究发现用核酸适配体作为火车头识别靶细胞,由 DNA 组装的车厢用来载药,以此达到靶向治疗的目的。此外,适配体结合其他材料应用于肿瘤靶向治疗的研究还有很多,相信其可以作为药物载体在肿瘤诊治中发挥重要作用。

3.3 在循环肿瘤细胞检测方面的应用

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 能够实时反应肿瘤动态,对肿瘤的侵袭转移监测以及预后评估都有重要价值,但由于其在癌症患者外周血液中含量少,很难被检测到。由于 Cell-SELEX 筛选出的核酸适体具有优越的细胞特异性和亲和性,结合微流控技术,为 CTCs 的检测提供了新的方法。方晓红等^[38]利用 Cell-SELEX 筛选到了与非小细胞肺癌 (Non-small Cell Lung Cancer, NSCLC) 特异性结合的核酸适体,然后对其进行修饰使之与硅纳米微流芯片结合,检测到晚期肺小细胞肺癌患者外周血中的 CTCs。Xu 等^[39]设计了一种能够高效、高选择性并简便的捕获 CTCs 的微流体

系统。当细胞混合物通过该微流体系统时,能够捕获不同类型的白血病细胞。方帅^[40]采用上转换发光材料UCNP和sgc8结合来检测CTCs中人急性淋巴白血病细胞(human acute lymphatic leukemia cells, CCRF-CEM),并将检测得到的CTCs细胞利用超顺磁性纳米材料进行有效的分离,此外,他们还模拟了临床样本,即使靶细胞数量极少时,其检测模型也能够进行高效率的捕获、富集和分离。

3.4 作为药物方面的应用

核酸适配体可以直接作为药物来治疗肿瘤,其原理是作为药物分子结合肿瘤细胞中的相关代谢分子来影响细胞调节途径,例如阻遏信号传导、血管生成以及免疫功能等,从而进行细胞杀伤或调控凋亡,阻止肿瘤细胞侵袭转移。由Eyetechnology与辉瑞公司联合生产的核酸适配体药物Macugen^[41]作为一种抗血管内皮生长因子的RNA适配体,能有效治疗年龄相关性黄斑病变,也在2004年被美国食品和药物管理局批准上市,Macugen的上市为适配体药物研究带来了曙光。Lee等^[42]研究发现骨膜蛋白的适配体PNDA-3能破坏骨膜蛋白与其细胞表面受体的相互作用,从而抑制骨膜蛋白诱导的乳腺癌细胞的黏附与转移,可用于抑制乳腺癌的扩增与转移的潜在药物。目前有数百种的核酸适配体药物进行临床验证,相信随着技术的发展,核酸适配体药物将会展现出广阔的应用前景。

4 展望

由于核酸适配体具有分子量小、设计灵活、易于修饰等优点,在临床诊断和疾病治疗中表现出良好的发展前景,Cell-SELEX与靶细胞膜蛋白高特异性、高亲和性的结合,能较好地区分不同细胞之间的膜蛋白差异,是用于恶性肿瘤检测的理想工具。应用Cell-SELEX技术筛选的适配体在恶性胶质瘤、乳腺癌、鼻咽癌、肝癌等恶性肿瘤的诊断治疗中已有应用,但是核酸适配体广泛应用于临床还需克服一定的困难。首先,Cell-SELEX适配体筛选结果与核苷酸适配体的类型、长度、碱基组成和修饰有关系,还与靶蛋白的离子强度、缓冲试剂成分、温度、pH值等也有关系,此外还与洗脱时间、洗脱次数、文库纯度、文库浓度与靶蛋白的比率等都有关系,因此限制了在和临床与药物开发等方面的应用。尽管存在制约因素,但是相信随着研究的不断深入,这些难题将会被攻克,Cell-

SELEX技术筛选的核酸适配体在肿瘤的临床诊治中将有可能得到广泛应用。

参考文献

- [1] Sauer AG, Siegel RL, Jemal A, et al. Updated review of prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States [J]. *Cancer Epidemiol Bio-markers Prev*, 2017, 26(8):1192-1208.
- [2] Liao TT, Yang MH. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7):792-804.
- [3] Basil CF, Zhao Y, Zavaglia K, et al. Common cancer biomarkers [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6):2953-2961.
- [4] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA ligands to bacteriophage t4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968):505-510.
- [5] Shanguan D, Li Y, Tan W, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(32):11838-11843.
- [6] Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(23):13581-13584.
- [7] Kulbachinskiy AV. Methods for selection of aptamers to protein targets [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(13):1505-1518.
- [8] Pereira RL, Nascimento IC, Santos AP, et al. Aptamers: novelty tools for cancer biology [J]. *Oncotarget*, 2018, 42(9):26934-26953.
- [9] Zamay TN, Zamay GS, Kolovskaya OS, et al. Current and prospective protein biomarkers of lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(11):1-22.
- [10] Civit L, Taghdisi SM, Jonczyk A, et al. Systematic evaluation of Cell-SELEX enriched aptamers binding to breast cancer cells [J]. *Biochimie*, 2018, 145:53-62.
- [11] Zhuo Z, Yu Y, Wang M, et al. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):1-19.
- [12] Rimmel M. Nucleic acid aptamers as tools and drugs: Recent developments [J]. *Chembiochem*, 2003, 4(10):963-971.
- [13] Sefah K, Shanguan D, Xiong X, et al. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(6):1169-1185.
- [14] Wu CC, Yates JR. The application of mass spectrometry to membrane proteomics [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3):262-267.
- [15] Wu Q, Wu L, Wang Y, et al. Evolution of DNA aptamers for malignant brain tumor gliosarcoma cell recognition and clinical tissue imaging [J]. *Biosensors & bioelectronics*, 2016, 80:1-8.
- [16] Kim Y, Wu Q, Hamerlik P, et al. Aptamer identification of brain tumor-initiating cells [J]. *Cancer Research*, 2013, 73(15):4923-4936.
- [17] Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, et al. A tenascin-c aptamer identified by tumor Cell Selex: systematic evolution of ligands

- by exponential enrichment [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(26):15416-15421.
- [18] Kang D, Wang J, Zhang W, et al. Selection of DNA aptamers against glioblastoma cells with high affinity and specificity [J]. Plos One, 2012, 7(10):e42731.
- [19] Wu X, Liang H, Tang Y, et al. Cell-Selextamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo [J]. Plos One, 2014, 9(6):e90752.
- [20] Zhang K, Sefah K, Tang L, et al. Novel aptamer developed for breast cancer cell internalization [J]. Chem Med Chem, 2012, 7(1):79-84.
- [21] Lu M, Zhou L, Zheng X, et al. A novel molecular marker of breast cancer stem cells identified by Cell-Selext method [J]. Cancer biomarkers: section A of Disease markers, 2015, 15(2):163-170.
- [22] Chandrasekaran R, Lee AS, Yap LW, et al. Tumor cell-specific photothermal killing by selex-derived DNA aptamer-targeted gold nanorods [J]. Nanoscale, 2016, 8(1):187-196.
- [23] Shi H, Tang Z, Kim Y, et al. in vivo fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by Cell-Selext [J]. Chemistry-an Asian Journal, 2010, 5(10):2209-2213.
- [24] Jia W, Ren C, Wang L, et al. CD109 is identified as a potential nasopharyngeal carcinoma biomarker using aptamer selected by Cell-Selext [J]. Oncotarget, 2016, 7(34):55328-55342.
- [25] Shangguan D, Meng L, Cao ZC, et al. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(3):721-728.
- [26] Wang FB, Rong Y, Fang M, et al. Recognition and capture of metastatic hepatocellular carcinoma cells using aptamer-conjugated quantum dots and magnetic particles [J]. Biomaterials, 2013, 34(15):3816-3827.
- [27] Rong Y, Chen H, Zhou XF, et al. Identification of an aptamer through whole Cell-Selext for targeting high metastatic liver cancers [J]. Oncotarget, 2016, 7(7):8282-8294.
- [28] Champanhac C, Teng IT, Cansiz S, et al. Development of a panel of DNA aptamers with high affinity for pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Scientific Reports, 2015, 5:16788.
- [29] Wu X, Zhao Z, Bai H, et al. DNA aptamer selected against pancreatic ductal adenocarcinoma for in vivo imaging and clinical tissue recognition [J]. Theranostics, 2015, 5(9):985-994.
- [30] Kim YJ, Lee HS, Jung DE, et al. The DNA aptamer binds stemness-enriched cancer cells in pancreatic cancer [J]. Journal of Molecular Recognition, 2017, 30(4):1-9.
- [31] Benedetto G, Hamp TJ, Wesselman PJ, et al. Identification of epithelial ovarian tumor-specific aptamers [J]. Nucleic acid therapeutics, 2015, 25(3):162-172.
- [32] Li X, An Y, Jin J, et al. Evolution of DNA aptamers through in vitro metastatic-cell-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for metastatic cancer recognition and imaging [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(9):4941-4148.
- [33] Shangguan D, Cao Z, Meng L, et al. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells [J]. J Proteome Res, 2008, 7(5):2133-2139.
- [34] Kaur J, Tikoo K. Ets1 identified as a novel molecular target of RNA aptamer selected against metastatic cells for targeted delivery of nano-formulation [J]. Oncogene, 2015, 34(41):5216-5228.
- [35] Meng L, Yang L, Zhao X, et al. Targeted delivery of chemotherapy agents using a liver cancer-specific aptamer [J]. Plos One, 2012, 7(4):e33434.
- [36] Liu J, Wei T, Zhao J, et al. Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance [J]. Biomaterials, 2016, 91:44-56.
- [37] Zhu G, Zheng J, Song E, et al. Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(20):7998-8003.
- [38] 赵立波, 徐丽, 方晓红. 核酸适配体修饰的微流芯片用于非小细胞肺癌循环肿瘤细胞的检测 [C]. 中国化学会第十八届全国有机分析及生物分析学术研讨会, 2015:138-139.
- [39] Xu Y, Phillips JA, Yan J, et al. Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells [J]. Anal Chem, 2009, 81(17):7436-7442.
- [40] 方帅. 上转换纳米探针在循环肿瘤细胞的富集与检测中的应用 [D]. 苏州大学硕士论文, 2014:1-71.
- [41] Ng EW, Shima DT, Calias P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(2):123-132.
- [42] Lee YJ, Kim IS, Park SA, et al. Periostin-binding DNA aptamer inhibits breast cancer growth and metastasis [J]. Mol Ther, 2013, 21(5):1004-1013.

(上接第112页)

- [16] Shibayama Y, Kondo T, Ohya H, et al. Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in AML patients [J]. Oncol Rep, 2015, 33(5):2176-2182.
- [17] Li Z, Chen P, Su R, et al. Over expression and knockout of miR-126 both promote leukemogenesis [J]. Blood, 2015, 126(17):2005-2015.
- [18] 张赛圣, 程丽霞. 骨髓间充质干细胞 miR-126 高表达在游离皮瓣移植后皮瓣血管新生中的促进作用及机制研究 [J]. 现代医学, 2018, 46(2):126-130.
- [19] 任梦宇, 迟路湘, 欧书林, 等. microRNA-126 对 VEGF 介导血管生成的调控作用 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(20):2259-2263.

原发性胆汁性胆管炎易感基因多态性的研究现状

高琪¹ 张华^{1,2*}

[摘要] 原发性胆汁性胆管炎(PBC)是一种慢性进行性肝内胆汁淤积的自身免疫性疾病,临床特点以大量抗线粒体抗体(AMA)的产生和胆管上皮细胞的损伤为特征。PBC的病因和发病机制尚未完全明确,可能与遗传和环境等相互作用所导致的异常自身免疫反应有关。PBC的家族聚集性、女性患病率明显高于男性以及同卵双胞胎患病的高度一致性,均提示了遗传易感性在PBC的发生和发展中起着重要的作用。全基因组关联分析(GWAS)以及病例对照研究已经鉴定出与PBC相关的各种人类白细胞抗原(HLA)和非HLA等位基因,并证实了PBC的种族差异性。本文综述了可能与PBC相关的易感基因多态性的研究现状。

[关键词] 原发性胆汁性胆管炎;遗传易感性;全基因组关联分析;单核苷酸多态性;HLA和非HLA等位基因

Polymorphisms of Susceptibility Genes in Primary Biliary Cholangitis

GAO Qi¹, ZHANG Hua^{1,2*}

(1. Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, China, 563000; 2. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou, China, 550000)

[ABSTRACT] Primary biliary cholangitis (PBC) is an autoimmune disease with chronic progressive intrahepatic cholestasis. The clinical features are characterized by the production of large amounts of antimitochondrial antibodies (AMA) and the damage of bile duct epithelial cells. The etiology and pathogenesis of PBC have not been fully clarified, and may be related to the abnormal autoimmune response caused by genetic and environmental interactions. The family aggregation of PBC, the prevalence of women are significantly. The family aggregation and female prevalence of PBC were significantly higher than that of males and identical twins, suggesting that genetic susceptibility plays an important role in the occurrence and development of PBC. Genome-wide association analysis (GWAS) and case-control studies had identified various human leukocyte antigen (HLA) and non-HLA alleles associated with PBC and confirmed their ethnic differences. This article reviews the progress of polymorphisms of susceptibility gene in primary biliary cholangitis.

[KEY WORDS] Primary biliary cholangitis; Genetic susceptibility; Genome-wide association analysis; Single nucleotide polymorphism; Human leukocyte antigen and non-human leukocyte antigen alleles

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC),既往称为原发性胆汁性肝硬化^[1],是一种以肝脏损害为主的器官特异性自身免疫性疾

病,临床特点以慢性进行性肝内胆汁淤积为主,典型病理表现为进行性、非化脓性、破坏性肝内小胆管炎,伴门管区淋巴细胞浸润和肝纤维化,疾病进

基金项目:贵州省人民医院国家自然科学基金培育基金项目(黔科合LH字[2017]5724号)

作者单位:1. 遵义医科大学,贵州,遵义 563000

2. 贵州省人民医院检验科,贵州,贵阳 550000

*通信作者:张华, E-mail: 780837482@qq.com

展最终可导致肝硬化甚至肝功能衰竭,其特征主要是血清高特异性抗线粒体抗体(Anti-mitochondrial antibody, AMA)的产生和胆管上皮细胞的特异性损伤^[2-3]。目前PBC的发病机制尚未完全阐明,但越来越多的研究表明,可能是遗传和环境多方因素共同作用诱发体内免疫功能失衡,导致免疫耐受丧失,从而致使针对自身肝内胆管上皮细胞的免疫反应发生^[4]。近年来,随着对PBC认识的不断加深以及AMA检测的逐渐普及,文献报道的病例数呈快速增多的趋势。PBC起病隐匿,临床症状不典型,且病程漫长,从疾病早期出现AMA发展至最终肝硬化阶段,约需14~18年,患者常错过早期诊断和治疗的最佳时期。因此,进一步阐明PBC的发病机制,找到疾病的治疗靶点,对于获得更好的治疗效果尤其重要。大量研究表明,遗传易感性在PBC的发病过程中起着重要的作用,全基因组关联分析(genome-wide association studies, GWAS)和基因芯片已经鉴定出PBC相关易感基因主要有人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)和非HLA两大类^[5]。现就PBC的遗传易感性及易感基因多态性的研究现状作一综述。

1 PBC的遗传易感性

PBC发病的家族聚集性、女性患病率明显高于男性以及同卵双胞胎患病的高度一致性,均提示了PBC的遗传易感性^[6-7]。单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)是人类基因组中最常见的一种基因多态性,主要是指不同个体DNA序列上单个碱基的差异,是人群个体差异产生最主要的遗传因素,也是造成人们患病的主要原因之一。GWAS是一种对人类全基因组范围内序列变异及SNP分析的方法,其最显著的特点之一是能够在整个人类基因组范围内识别并筛选出与疾病相关的遗传基因。目前,GWAS研究已鉴定出了数千种与人类复杂疾病易感性相关的基因位点,同时也筛选出了PBC人群的易感基因位点,并证实了PBC的种族差异性。HLA等位基因与PBC发病具有强相关性,尤其是HLA-DRB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1等^[5]。欧洲PBC人群最显著相关的基因主要是*IL12RB2*和*IL12A*^[8]。日本GWAS研究表明,*TNFSF15*、*POU2AF1*、*PRKCB*、*NFKB1*、*MANBA*、*IL21R*、*IL7R*和染色体17q12-21基因座是日本PBC人群的易感区域,其中的

*TNFSF15*和*POU2AF1*是日本PBC人群的主要易感基因,但这两者均未在欧洲PBC人群中有描述^[9]。Dong等^[8]选取日本和欧洲人群显著相关的14个SNP位点在中国汉族人群中进行了大样本研究表明,最显著相关的SNP位点是CD80(rs2293370)和*TNFSF15*(rs4979462)。另外,*IL12RB2*(rs11209050)、*STAT4*(rs7574865)、*17q12-21*(rs9303277)、*PDGFB*(rs715505)和*NF-κB1*(rs7665090)等也与汉族PBC人群相关。

2 PBC相关易感基因多态性

2.1 HLA易感基因多态性

HLA基因复合体位于人类染色体6p21,占人类整个基因组的1/3 000,包含了人类基因组中最具多态性的基因位点,在多种自身免疫性疾病中已有报道。根据HLA的结构及其特点,HLA复合体可分为I、II、III类基因区。全球多项GWAS研究表明HLA-II类基因区与PBC的发病显著相关,主要是*HLA-DQA1*、*HLA-DRB1*和*HLA-DQB1*基因,其等位基因的多态性通过编码不同的氨基酸残基,可能通过影响对抗原的结合亲和力,进而影响PBC的遗传易感性。其中,*DRB1*0801*、*DRB1*0803*、*DRB1*14*和*DPB1*0301*是PBC的易感等位基因,而*DRB1*11*和*DRB1*13*是其保护性等位基因^[5-6]。Darlay等^[10]的研究表明,单体型*HLA-DQB1*0402-DRB1*0801*、*DQB1*0602-DQB1*0301*、*DRB1*0404-DQB1*0302*与英国PBC人群紧密关联,早前研究已表明*HLA-DRB1*0801*是英国及意大利PBC人群共同的风险等位基因,而*HLA-DRB1*13*是其共同的保护基因,*DRB1*11*仅在意大利人群中发现。中国PBC人群中,单体型*HLA-DRB1*0803-DQB1*0601*与PBC人群高度相关,单体型*DRB1*0701-DQB1*0202*也有关联,而单体型*DRB1*1202-DQB1*0301*相对于健康对照组明显降低^[11]。单体型*DRB1*0803-DQB1*0601*和*DRB1*0405-DQB1*0401*可显著增加日本PBC患者的遗传易感性,*DRB1*1302-DQB1*0604*和*DRB1*1101-DQB1*0301*是其保护性关联单体型。Im等^[12]在日本PBC人群的全基因组单倍型关联分析中发现,PBC相关基因座(*TNFSF15*, *HLA-DRA*)的风险单倍型可能潜在地模拟调节基因表达的顺式相互作用。*HLA-DRB1*与PBC易感性显著相关,但撒丁学者的研究发现,与PBC

高度相关的 HLA-DRB1*08 等位基因却在撒丁人群中出现的频率较低,单体型 DRB1*0301-DQB1*0201 的高发病率是撒丁人群特有的遗传学特征^[13]。

2.2 非 HLA 易感基因多态性

尽管 HLA 基因多态性与 PBC 的发病紧密关

联,但仍有大部分患者并未携带这种常见的 HLA 基因多态性,提示非 HLA 易感基因中可能存在与 PBC 发病相关的遗传变异。GWAS 研究和基因芯片研究^[8, 11, 14]表明,超过 20 种非 HLA 基因多态性位点与中国汉族 PBC 患者的发病相关(表 1)。

表 1 与中国汉族 PBC 显著相关的非 HLA 位点 ($P < 1 \times 10^{-5}$)

Table 1 Non-HLA sites significantly associated with Chinese PBC ($P < 1 \times 10^{-5}$)

基因位置	候选基因	SNP 位点	等位基因	组合 P 值	比值比 (95%可信区间)
1p13.1	<i>CD58</i>	rs2300747	A/G	1.84×10^{-12}	1.29(1.20~1.39)
2q33.2	<i>CD28, CTLA4, ICOS</i>	rs4675369	A/G	1.38×10^{-13}	1.31(1.22~1.41)
2q33.2	<i>CD28, CTLA4, ICOS</i>	rs7599230	T/C	3.30×10^{-10}	1.26(1.18~1.36)
2q32.2	<i>STAT4</i>	rs10168266	C/T	5.82×10^{-8}	1.31(1.19~1.44)
3q13.33	<i>CD80</i>	rs2293370	G/A	2.67×10^{-8}	1.44(1.27~1.63)
3q13.33	<i>TIMMDC1/TMEM39A</i>	rs3732421	A/G	3.00×10^{-13}	1.35 ¹⁾
3q25.33	<i>IL12A</i>	rs582537	A/C, G	6.55×10^{-8}	0.77(0.68~0.88)
4q27	<i>IL-21</i>	rs925550	C/A	3.87×10^{-13}	1.31(1.21~1.40)
4q24	<i>NFKB1</i>	rs1598856	A/G	1.83×10^{-7}	1.28(1.17~1.41)
9p32	<i>TNFSF15</i>	rs4979462	C/T	3.86×10^{-8}	1.42(1.26~1.62)
9p32	<i>TNFSF15</i>	rs4979467	C/T	8.28×10^{-12}	1.40(1.27~1.54)
11q23.3	<i>DDX6, CXCR5</i>	rs77871618	C/T	9.12×10^{-14}	1.55(1.38~1.74)
12p13.31	<i>TNFRSF1A</i>	rs4149576	C/T	4.00×10^{-9}	1.35(1.18~1.55)
15q25.1	<i>IL-16</i>	rs11556218	T/G	8.99×10^{-9}	1.29(1.18~1.41)
16p12.1	<i>IL-21R</i>	rs2189521	C/G, T	4.00×10^{-16}	0.71(0.66~0.78)
16p12.1	<i>IL-21R, ILAR</i>	rs10852316	T/G	8.83×10^{-8}	0.77(0.70~0.85)
16q21	<i>CSNK2N2/CCDC113</i>	rs2550374	G/T	2.00×10^{-8}	1.23 ¹⁾
17q12	<i>17q12</i>	rs9303277	C/T	5.58×10^{-7}	1.42(1.22~1.56)
17q21.1	<i>ZBP2/GSDMB/IKZF3</i>	rs9635726	C/T	2.00×10^{-16}	1.37 ¹⁾
19p13.3	<i>ARID3A</i>	rs10415976	A/G	3.61×10^{-12}	0.77(0.72~0.84)
22q13.1	<i>RPL3, SYNGR1</i>	rs137603	A/C	2.06×10^{-7}	0.68(0.59~0.79)
22q13.1	<i>PDGFB</i>	rs715505	G/C	4.50×10^{-5}	1.36(1.17~1.58)

注:1)95%可信区间无法获取。

2.2.1 肿瘤坏死因子超家族 15

肿瘤坏死因子超家族 15 (tumor necrosis factor superfamily 15, *TNFSF15*) 是一类在诱导细胞增殖和凋亡中起重要作用的细胞因子^[15]。GWAS 研究表明, *TNFSF15* 基因多态性与日本和汉族 PBC 人群显著相关。Hitomi 等^[16]的研究结果提示 *TNFSF15* (rs4979462、rs55682128、rs1857335、rs117567605、rs76015065、rs3810936、rs76998125) 与日本 PBC 显著相关,其中最显著相关的 SNP 位点是 rs4979462,该位点可能是通过与转录因子结合位点核因子-1 (nuclear factor-1, NF-1) 紧密结合影响其表达进而导致 PBC 的发病。Fang 等^[11]研究发现,中国 PBC 人群中最强关联的 SNP 位点是 *TNFSF15* (rs4979467),这与日本 Hitomi 和

中国 Dong 等人报道的研究结果有所差异,但 rs4979467 位点具有强连锁性,它与 rs6478108 ($r^2 = 1$) 和 rs4979462 ($r^2 = 0.68$) 有很强连锁,后两者已报道与多种自身免疫性疾病有关。

2.2.2 白细胞介素家族

白细胞介素 (Interleukin, IL), 是一类在免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节等一系列过程中发挥重要作用的细胞因子。研究报道, PBC 患者中卵泡 T 辅助细胞产生的 *IL-21* 明显增多,它可进一步介导 B 淋巴细胞的成熟和自身抗体的分泌,进而参与 PBC 的发病^[17]。GWAS 研究表明, *IL21* (rs925550、rs17005934) 以及 *IL21R* (rs2189521) 与汉族 PBC 人群最显著相关^[18]。欧洲 PBC 人群显著相关的 SNP 位点是 *IL12RB2* (rs11209050) 和

IL12A (rs485499, rs2366408)^[8]。LiP等^[18]对*IL12A*基因座周围的22个SNP位点研究发现,有3个SNP位点与汉族PBC人群相关,其中最显著相关的是rs4679868和rs6441286,连锁分析发现这两个SNP位点彼此紧密关联($r^2=0.981$),并且均与欧洲PBC人群显著相关。*IL12RB2*(*IL12R-β2*)主要编码IL-12受体β2,*IL12RB2* rs3790567位点的等位基因A和rs6679356位点的等位基因C可显著增加患者肝硬化的风险^[19]。以上结果均提示了IL家族在PBC发病中的重要作用,但由于IL家族的复杂性和它们涉及信号通路功能研究的不充分,IL家族相关信号通路在PBC发病中的具体机制尚不明确。

2.2.3 细胞信号转导通路及转录激活因子4

信号转导和转录激活因子4(signal transducer and activator of transcription 4, *STAT4*),在辅助T淋巴细胞的分化调控及各种炎症性疾病中可发挥重要的作用,其编码的转录因子可参与多种重要细胞因子的信号转导过程。*STAT4*基因多态性已报道与系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征等多种自身免疫性疾病相关。研究发现,江苏地区汉族人群*STAT4*的rs7574865位点的等位基因T与PBC显著相关^[20]。*STAT4*基因多态性与PBC的荟萃分析^[21]表明,rs7574865、rs3024921、rs6752770、rs7601754和rs10168266位点与PBC在统计学上存在显著相关性。

2.2.4 细胞毒性T淋巴细胞抗原4

细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, *CTLA4*),主要表达于活化的调节性T细胞,通过与*CD28*竞争性结合表达于抗原提呈细胞表面的*CD86/CD80*来抑制细胞免疫。*CD28-CTLA4-ICOS*基因座紧密相连并有多个SNP位点,它们一直被认为是PBC的风险基因位点,共同参与T细胞共刺激信号通路的激活^[14]。中国PBC人群的队列研究显示*CTLA4*(rs231775)与汉族PBC紧密关联。日本的荟萃分析^[22]表明,*CTLA4*基因的rs231775、rs3087243和rs231725位点都与日本PBC患者的发病高度相关,其中rs231725位点与疾病的晚期进展阶段密切相关,这与中国PBC的研究结果一致。

2.2.5 蛋白质O-葡萄糖基转移酶1与*CD80*

Dong等^[6]报道了*CD80*(rs2293370)是与中国PBC人群显著相关的易感基因位点。蛋白质O-葡萄糖基转移酶1(Protein O-Glucosyltransferase 1,

POGLUT1)与*CD80*都是人类染色体3q13.33上的易感基因位点,最新的一项研究^[23]表明,*POGLUT1* rs2293370位点与日本PBC患者显著相关,这提示了*POGLUT1*基因在PBC的发生和发展中可能扮演着重要的角色,人类染色体3q13.33上的基因位点的改变可能在PBC的发病机制中起着一定的作用。

2.2.6 *NFκB1/MANBA*基因区域

*NFκB1/MANBA*基因区域位于人类染色体4q24,已被确定为几种消化系统疾病的易感基因区域,如溃疡性结肠炎(rs3774937,rs3774959)^[24]和克罗恩病(rs13126515)^[25]以及PBC^[26]。研究表明,*NFκB1/MANBA*基因区域的SNP位点rs17032850和rs227361是与PBC最显著相关的易感基因位点;Hitomi等^[26]从分子机制层面,通过体外功能验证实验发现它们可通过与转录因子LEF-1和RXRα的紧密结合,进一步调控基因的表达,从而促进PBC的发生和发展。

3 小结与展望

综上所述,PBC的发病机制复杂,涉及遗传、环境和免疫等多种因素,也是涉及多种基因变异的复杂性疾病。遗传易感性在PBC的发病中起着重要作用,但目前发现的基因多态性位点只是一小部分,仍有大量未知基因及对应的生物学信号通路需进一步研究。随着对PBC遗传易感性的深入研究,结合其他病因机制,挖掘SNP及其对应的信号通路,将有助于个体化风险评估和筛查PBC高危人群,评估其发病风险,风险等位基因位点的靶向治疗或可成为PBC的潜在有效治疗途径。

参考文献

- [1] Tanaka A, Takikawa H, Mochida S, et al. Changing nomenclature for PBC from "Primary Biliary Cirrhosis" to "Primary Biliary Cholangitis" [J]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 2016, 113(7):1165-1167.
- [2] Joshita S, Umemura T, Tanaka E, et al. Genetic contribution to the pathogenesis of primary biliary cholangitis [J]. *J Immunol Res*, 2017(5):3073504.
- [3] 中华医学会肝病学会,中华医学会消化病分会,中华医学会感染病学会.原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015) [J]. *中华传染病杂志*, 2016, 34(7):385-394.
- [4] Ma WT, Chen DK. Immunological abnormalities in patients with primary biliary cholangitis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(6):741-760.

- [5] Tanaka A, Leung PSC, Gershwin ME. The genetics of primary biliary cholangitis [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2019, 35(2):93-98.
- [6] Joshita S, Umemura T, Tanaka E. Genetics and epigenetics in the pathogenesis of primary biliary cholangitis [J]. *Clin J Gastroenterology*, 2018, 11(1):11-18.
- [7] Gerussi A, Cristoferi L, Carbone M, et al. The immunobiology of female redominance in primary biliary cholangitis [J]. *J Autoimmun*, 2018, 95:124-132.
- [8] Dong M, Li J, Tang R, et al. Multiple Genetic Variants Associated with Primary Biliary Cirrhosis in a Han Chinese Population [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2015, 48(2/3):316-321.
- [9] Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, et al. Genome-wide association study identified PRKCB as a genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in a Japanese population [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(3):650-659.
- [10] Darlay R, Ayers KL, Mells GF, et al. Amino acid residues in five separate HLA genes can explain most of the known associations between the MHC and primary biliary cholangitis [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(12):e1007833.
- [11] Qiu F, Tang R, Zuo X, et al. A genome-wide association study identifies six novel risk loci for primary biliary cholangitis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14828.
- [12] Im C, Sapkota Y, Moon W, et al. Genome-wide haplotype association analysis of primary biliary cholangitis risk in Japanese [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):7806.
- [13] Clemente MG, Frau F, Bernasconi M, et al. Distinctive HLA-II association with primary biliary cholangitis on the Island of Sardinia [J]. *United European Gastroenterol J*, 2017, 5(4):527-531.
- [14] Cordell HJ, Han Y, Mells GF, et al. International genome-wide meta-analysis identifies new primary biliary cirrhosis risk loci and targetable pathogenic pathways [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8019.
- [15] Yuan ZC, Wang JM, Su LC, et al. Gene polymorphisms and serum levels of TL1A in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):11760-11767.
- [16] Hitomi Y, Kawashima M, Aiba Y, et al. Human primary biliary cirrhosis - susceptible allele of rs4979462 enhances TNFSF15 expression by binding NF-1 [J]. *Hum Genet*, 2015, 134(7):737-747.
- [17] Adam L, Zoldan K, Hofmann M, et al. Follicular T Helper Cell Signatures in Primary Biliary Cholangitis and Primary Sclerosing Cholangitis [J]. *Hepatol Commun*, 2018, 2(9):1051-1063.
- [18] Li P, Lu G, Cui Y, et al. Association of IL12A Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) With Primary Biliary Cirrhosis in a Chinese Han Population [J]. *Medicine*, 2016, 95(19):e3665.
- [19] Wasik U, Wunsch E, Norman GL, et al. Polymorphisms of IL12RB2 May Affect the Natural History of Primary Biliary Cholangitis A Single Centre Study [J]. *J Immunol Res* 2017, 2017:2185083.
- [20] 郑立明,周红. STAT4 rs7574865 位点单核苷酸多态性与江苏部分地区汉族人群原发性胆汁性肝硬化相关 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(4):521-525.
- [21] Zhang L, Gao C, Liu C, et al. Association between STAT4 polymorphisms and risk of primary biliary cholangitis: a meta-analysis [J]. *Genes Genomics*, 2018, 40(10):1101-1109.
- [22] Yang XC, Fujino M, Cai SJ, et al. Genetic Polymorphisms of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 in Primary Biliary Cholangitis: A Meta-Analysis [J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017:5295164.
- [23] Hitomi Y, Ueno K, Kawai Y, et al. POGlut1, the putative effector gene driven by rs2293370 in primary biliary cholangitis susceptibility locus chromosome 3q13.33 [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):102.
- [24] Pickrell JK, Berisa T, Liu JZ, et al. Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(7):709-717.
- [25] de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(2):256-261.
- [26] Hitomi Y, Nakatani K, Kojima K, et al. NFKB1 and MANBA Confer Disease Susceptibility to Primary Biliary Cholangitis via Independent Putative Primary Functional Variants [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(3):515-532.

(上接第 117 页)

- [12] Nicholas H. Carbonetti. Bordetella pertussis: new concepts in pathogenesis and treatment [J]. *Current Opinion in infectious disease*, 2016, 29(3):287-294.
- [13] Robbins JB, Schneerson R, Kubler-Kiel J et al. Toward a new vaccine for pertussis [J]. *PNAS*, 2014, 111(9):3213-3216.
- [14] Weigand MR, Pawloski LC, Peng Y, et al. Screening and genomic characterization of filamentous hemagglutinin-deficient Bordetella pertussis [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(4): e00869-17.
- [15] Xu Z, Wang Z, Luan Y, et al. Genomic epidemiology of erythromycin-resistant Bordetella pertussis in China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1):461-470.

山东大学肝病研究所实验室巡礼

山东大学肝病研究所实验室位于山东省济南市文化西路107号山东大学齐鲁医院内。实验室有科研人员32名,其中具有正高级职称者4名,副高级职称者4名,博士学位者10名,博士生导师1名,硕士生导师3名。实验室功能齐全,拥有磁珠分选仪、流式细胞仪、核酸电泳和蛋白质印迹系统、实时荧光定量PCR仪、酶标分析仪、显微成像系统等设备,以及多台生物安全柜、高速低温离心机、细胞培养箱等设备,具有完备的细胞实验、动物实验、分子生物学等实验体系。

学术带头人王凯,主任医师,二级教授,博士生导师。山东大学肝病研究所所长,国家卫生计生委合理用药专家委员会抗菌药物专业组专家,中华医学会医学病毒学分会委员,中国医师协会感染科医师分会常务委员,中国微生物学会干扰素与细胞因子专业委员会副主任委员,中国生命关怀协会无创大健康大数据专业委员会副主任委员,国家肿瘤微创治疗产业技术创新战略联盟副主任委员,中国研究型医院学会感染病学专业委员会常务委员,山东省医学会医学病毒学分会主任委员,山东省医学会感染病学分会名誉主任委员,山东省医师协会感染科医师分会名誉主任委员,第十届吴阶平医学研究奖-保罗·杨森药理学研究奖获得者,国内外多家杂志审稿专家或编委。主要研究方向为肝脏疾病的发病机制与治疗。

在王凯教授的领导下,山东大学肝病研究所全面系统地开展了肝病的基础与临床研究,近几年,在肝病的流行病学、发病机制及临床个体化治疗等方面取得了许多进展,学术地位居全国领先水平。山东大学肝病研究所转化医学为核心,着眼于表观遗传学与肝脏疾病、肝脏疾病的分子诊断、肝脏疾病的免疫学机制等研究,确定多种新的分子诊断靶点和建立新的诊断方法,属于具有前瞻性的产学研领域。主要研究方向包括:(1)肝病表观遗传分子分型和个体化诊断:建立了DNA甲基化分子标志物为基础的肝衰竭诊断标准和评估体系;(2)肝病免疫细胞调控的基础和临床研究:系统开展慢性乙型肝炎的免疫研究,以Th17细胞、Th22细胞以及CTL细胞为重点,着眼于建立乙型肝炎表面抗原转阴的临床预警分子标志物,研究成果达到国际领先水平;(3)氧化损伤在肝病中的基础和临床研究:通过临床流行病学方法和生物化学方法相结合,发现慢性乙型肝炎患者存在氧化损伤平衡状态紊乱,提出抗氧化损伤可能有助于慢性乙型肝炎患者高胆红素血症的治疗,应用于临床治疗,取得较好的临床效果;(4)HBsAg转阴研究等。既往承担国家科技重大专项、国家自然科学基金、973项目子课题、山东省自然科学基金等多项课题。获授权国家发明专利10项,获山东省科技进步奖二等奖2项。在国内外学术核心期刊发表学术论文135篇,其中SCI收录71篇。共培养博士21名、硕士研究生41名。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于2009年5月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家80余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于2016年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

