



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

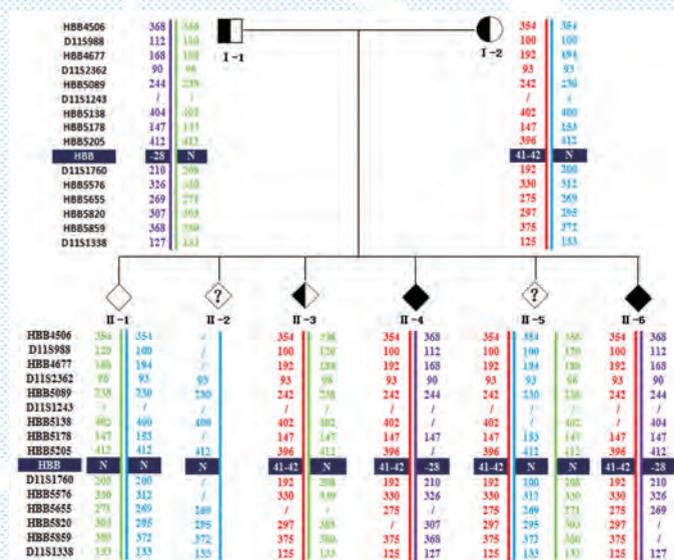
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年2月 第12卷 第2期 总第66期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 2 February 2020



图(P140) 部分家系STR单倍型分析结果

Figure(P140) STR haplotypes analysis in some families

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



9 771674 692204



温旺荣



1963年9月出生。
1987年毕业于福建医学院,医学学士学位(1985年至1987年在上海第二医科大学医学检验专业本科代培);1992年毕业于福建医学院,医学硕士

学位。2001年8月至2004年10月在日本北海道大学进行访问研究,2017年5月赴美国约翰霍普金斯大学进行访问学习。

主任技师,教授,博士生导师。现任暨南大学附属第一医院临床医学检验中心主任、临床检验诊断学教研室主任兼暨南大学司法鉴定中心主任。右江民族医学院的特聘教授、入选2018年《岭南名医录》等荣誉称号。担任中国医疗器械行业协会现场快速检测(POCT)分会常委、中国老年医学会检验医学分会委员、广东省医学教育协会检验医学专业委员会主任委员、粤港澳大湾区医学检验教育联盟主席、广东省医师协会检验医师分会副主任委员、广东省医院协会临床检验管理专业委员会副主任委员、广东省医学会检验分会常委、广东省精准医学应用学会精准检测分会副主任委员、广东省临床检验质量控制中心专家、PCR验收专家。《分子诊断与治疗杂志》和《右江医学》的编委,《暨南大学学报》杂志特邀审稿专家等学术职务。

温旺荣教授长期从事临床常见病原体及肿瘤相关病毒的分子生物学研究,在白念珠菌快速分离、鉴定、分型及病毒相关肿瘤的分子标志物方面形成了一定的特色和优势,尤其是microRNA在宫颈癌发生发展中的作用。主持或参与了日中医学协会基金、日本文部省基金、国家自然科学基金、国家卫计委基金和省级科技计划项目十余项。获得了福建省科技进步三等奖两项。发表相关论文40余篇,其中SCI收入5篇(Journal of Virology、Virus Research等)。主编《临床分子诊断学》、副主编《应急检验学》和《实验室生物安全》、参编《临床医学三基培训教材》。培养和招收博士后、博士及硕士研究生30名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年2月 第12卷 第2期 总第66期 Bimonthly Volume 12 Number 2 February 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
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	国内外公开发售
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2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</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>2020.2.18</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。

中国科学院信息研究所

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

月刊 2020年2月 第12卷 第2期

目次

述评

环状RNA在急性髓系白血病中的研究进展 张蕾 查显丰 温旺荣(123)

论著

基于纳米孔测序技术的呼吸道病原体快速确认 叶福强 李鹏 韩一芳 等(127)

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(133)

WGA、RDB结合STR单体型分析在 β -地中海贫血胚胎植入前遗传学诊断中的应用
..... 李伍高 严提珍 李哲涛 等(138)

甲基化荧光定量PCR快速检测自闭症男童中脆性X综合征的临床应用
..... 陈剑虹 黄淑君 马健 等(142)

海南地区571例男性感染HPV的基因型分布特点研究 吕家庆 胡俊杰 符生苗 等(146)

血管内皮生长因子基因936C/T位点多态性与急性心肌梗死的关系
..... 常亚伟 李赛 琚绍坦(151)

重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平变化意义
..... 尹宏 陈庆春 苏艳蓉 等(156)

婴幼儿特应性皮炎血清TlgE、sIgE与病情的相关性研究 阮富旺 杨万勇 张志斌 等(161)

血管瘤样纤维组织细胞瘤病理诊断2例并文献复习 王芳 相龙全 王海庆 等(166)

Taq DNA聚合酶5'~3'外切活性对荧光定量PCR的影响 蒋析文 刘霏珊 陈巍(170)

miR-374a-3p靶向Syk对ox-LDL诱导内皮细胞损伤及炎症反应的影响
..... 冯自波 祝友鹏 张静(175)

女性宫颈HPV感染与阴道局部Th17细胞免疫功能及血清因子的关系研究
..... 王小花 俞岩 王茹(181)

中晚期子宫颈鳞癌同步放化疗前后血清E-cadherin、VEGF、nm23-H1变化及预测价值
..... 李改玲 任芳 冯巍(185)

血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy联合检测对乳腺癌的临床诊断价值
..... 徐书星 霍庆赞 张明远 等(190)

GAP-43蛋白表达与大鼠心力衰竭发病相关性分析 王娜 陈玉善 刘蕾 等(195)

血清miR-200c表达与2型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的相关性研究
..... 庄芊 杨锦 郑蛟 等(199)

分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年2月 第12卷 第2期

目次

- 预后营养指数对胶质瘤患者预后的影响 徐日(203)
- 缺血性脑卒中患者单个核细胞 *TLR3*、*IRF-3*、*IFN- γ* mRNA 表达及临床意义
..... 李邦林 贾汉伟 李靖 等(207)
- 血清 hs-CRP、TGF- β 和 *TLR4* 水平对儿童急性细菌性肺炎的临床诊断价值
..... 杨德彬 冯日昇 王玲玲 等(212)
- TACE 联合射频消融对中期肝癌患者血清 GP73、AFP、AFP-L3 的影响
..... 孟令武 李月圆 李志彬 等(217)
- 合并 MS 冠心病患者细胞因子表达及临床意义 谢瑾 李红 罗浩(221)
- PCOS 患者 GDF-9、BMP-15、BAX 表达特点及其与卵巢储备功能的相关性
..... 程瑶瑶 李建辉 王淳 等(225)
- 血清 NT-proBNP、D-二聚体、ST2 水平与 COPD 合并呼吸衰竭患者预后的相关性分析
..... 孙彩玲 张华钊 孙淑红(229)
- 子宫内膜异位症患者血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平及与不孕的关系
..... 顾晓荔 吴新华 姬梦鸽 等(234)
- 抗苗勒管激素的单克隆抗体制备与鉴定 苏晓菱 李丽莹 李苗苗 等(239)
- 冠心病患者冠状动脉 CT 特征与血清脂蛋白(a)、脂联素、PTX3 的相关性研究
..... 周鹏 王烁 任艳玲(244)

综 述

- ATM 蛋白激酶促细胞增殖作用研究进展 唐石伏 吴婉君 阳建伶 等(249)
- 基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用 田彩平 廖世奇 孙敬阳 等(253)

专家风采

- 温旺荣 (封二)

实验室巡礼

- 暨南大学附属第一医院临床医学检验中心 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 2 February 2020

CONTENTS

COMMENTS

- Advances of circular RNAs in acute myeloid leukemia
ZHANG Lei, ZHA Xianfeng, WEN Wangrong (123)

ORIGINAL ARTICLES

- Rapid identification of respiratory pathogens by nanopore sequencing technology
YE Fuqiang, LI Peng, HAN Yifang, ZHANG Qi, LIN Yanfeng, WANG Kaiying, WANG Taiwu, SONG Hongbin, WANG Changjun, WANG Chunhui, ZHANG Jinhai (127)
- Complete genomic analysis of a erythromycin resistant *Bordetella pertussis* Isolate
YU Dan, LI Dongfang, YUAN Lin, FENG Xin, SHI Wei, YAO Kaihu (133)
- Application of WGA, RDB and STR haplotype analysis in preimplantation genetic diagnosis of β -thalassemia
LI Wugao, YAN Tizhen, LI Zhetao, TANG Yongmei, QIN Zuxing, LI Xinlin, CAI Ren (138)
- Clinical Application of Quantitative Methylation-sensitive PCR in Fast Screening of Fragile X Syndrome from Males with Autism
CHEN Jianhong, HUANG Shujun, MA Jian, ZHOU Weiping, ZHANG Liang (142)
- Study on the genotype distribution of 571 males infected with HPV in Hainan
LV Jiaqing, HU Junjie, FU Shengmiao, CHEN Xinping (146)
- Correlation between 936C/T site polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and acute myocardial infarction
CHANG Yawei, LI Sai, JU Shaotan (151)
- Influencing factors of severe hypertensive cerebral hemorrhage complicated with stress gastric ulcer and the significance of changes in GAS, MTL, SS, CCK-8 and VIP
YIN Hong, CHEN Qingchun, SU Yanrong, LV Jiayi (156)
- The correlations between the serum tige, sIgE and the condition of infants with atopic dermatitis
RUAN Fuwang, YANG Wanyong, ZHANG Zhibin, RUAN Jifeng, CHEN Xiaolong (161)
- The histological features of Angiomatoid fibrous histiocytoma in 2 cases and literature review
WANG Fang, XIANG Longquan, WANG Haiqing, CHEN Jun, ZHOU Fengjuan (166)
- Effects of Taq DNA Polymerase 5'~ 3' Exoactivity on Real-Time quantitative PCR
JIANG Xiwen, LIU Aishan, CHEN Wei (170)
- Effect of miR-374a-3p targeting Syk on ox-LDL-induced endothelial cell injury and inflammatory response
FENG Zibo, ZHU Youpeng, ZHANG Jing (175)
- Study on the relationship between cervical HPV infection and local Th17 cell immune function in women
WANG Xiaohua, YU Yan, WANG Ru (181)
- Changes of serum E-cadherin, VEGF and nm23-H1 before and after concurrent chemoradiotherapy for middle-late SCCC and the predictive value
LI Gailing, REN Fang, FENG Wei (185)
- Clinical value of combined serum CA153, CEA, SF, CT and Hcy in the diagnosis of breast cancer
XU Shuxing, HUO qingyun, ZHANG Mingyuan, WEI Yonghui, YANG Ying, JI Jinhao, ZHANG chunfen, ZHAO Bingying (190)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 2 February 2020

CONTENTS

- Analysis of the correlation between the GAP-43 protein expression and the pathogenesis of heart failure in rats
WANG Na, CHEN Yushan, LIU Lei, DU Linxiang, WANG Shufei, ZUO Yanfang, LI Zongying, LI Tingting (195)
- Correlation between serum miR-200c expression and the short-term progression of albuminuria in patients with type 2 diabetes
ZHUANG Ping, YANG Jin, ZHENG Jiao, ZHANG Min..... (199)
- Effect of prognostic nutrition index on the prognosis of glioma patients
XU Ri (203)
- Expression of *TLR3, IRF-3, IFN- γ* mRNA in mononuclear cells of patients with ischemic cerebral stroke and its clinical significance
LI Banglin, JIA Hanwei, LI Jing, LI Gang..... (207)
- Clinical diagnostic value of serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 levels in children with acute bacterial pneumonia
YANG Debin, FENG Risheng, WANG Lingling, GUO Yanjun (212)
- Effect of TACE combined with radiofrequency ablation on serum GP73, AFP and AFP-L3 in intermediate-stage hepatic carcinoma
MENG Lingwu, LI Yueyuan, LI Zhibin, LI Mingyu (217)
- Cytokine expression in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome and its clinical significance
XIE Jin, LI Hong, LUO Hao (221)
- Effect of GDF-9, BMP-15 and BAX expression levels on ovarian reserve function in patients with polycystic ovary syndrome
CHENG Yaoyao, LI Jianhui, WANG Chun, CHEN Juan (225)
- Correlation between serum NT-proBNP, D-dimer and ST2 levels and prognosis in patients with COPD and respiratory failure
SUN Cailing, ZHANG Huazhao, SUN Shuhong (229)
- Serum TIMP-1, MCP-1 and MMP-9 levels in patients with endometriosis and its relationship with infertility
GU Xiaoli, WU Xinhua, JI Mengge, FU Yuanyuan (234)
- Preparation and identification of monoclonal antibodies against Anti-Mullerian hormone
SU Xiaoling, LI Liying, LI Miaomiao, HE Jie, WANG Ruixue, WANG Yong, LUO Shuhong (239)
- Study on the correlation between CT features of coronary artery and serum lipoproteins (a), adiponectin, PTX3 in patients with coronary heart disease
ZHOU Peng, WANG Shuo, REN Yanling (244)

REVIEWS

- Advance of ataxia-telangiectasia mutated protein kinase promoting cell proliferation
TANG Shifu, WU Wanjun, YANG Jianling, MA Xingxuan, YANG Jianqing..... (249)
- Application of Cell-SELEX-based Nucleic Acid Aptamers in Cancer Diagnosis and Treatment
TIAN Caiping, LIAO Shiqi, SUN Jingyang, WANG Weijun, XU Jinling, YANG Suisheng (253)

环状RNA在急性髓系白血病中的研究进展

张蕾 查显丰 温旺荣*

[摘要] 环状RNA是一种内源性非编码RNA(ncRNAs),近年来随着高通量测序和转录组谱分析技术的发展使得人们能够鉴定出与许多生物过程以及疾病的发生和发展有关的环状RNA(circRNAs)。其结构稳定、序列保守、功能多样、具有组织细胞特异性。环状RNA已被证明不仅与胃癌、结肠癌、乳腺癌等实体肿瘤的发生与发展、转移、预后等显著相关,在血液系统肿瘤尤其是白血病发挥重要作用。目前研究发现,白血病中circRNAs可以作为诊断的新生物标记,并为白血病提供有希望的治疗方法和新颖的药物筛选策略。对白血病中circRNAs的全面了解是开展临床应用研究的前提。

[关键词] 环状RNA;急性髓系白血病;肿瘤标志物;治疗靶标

Advances of circular RNAs in acute myeloid leukemia

ZHANG Lei, ZHA Xianfeng, WEN Wangrong*

(Center of Clinical Laboratorial Medicine, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630)

[ABSTRACT] CircRNAs are endogenous non-coding RNAs (ncRNAs). Over the past decades, the development of high-throughput sequencing and transcriptome spectrum analysis have people to identify circular RNAs (circRNAs) involved in many biological processes, including the occurrence and development of diseases. They have stable structures, conserved sequences, diverse functions, and tissue cell specificity. CircRNAs have been shown to be significantly correlated with the occurrence, development, metastasis and prognosis of not only solid tumors such as gastric cancer, colon cancer and breast cancer, but also tumors of the circulatory system, especially leukemia. Current studies have found that circRNAs in leukemia can be used as new biomarkers for diagnosis, and lead to promising treatment methods and novel drug screening strategies for leukemia. A comprehensive understanding of circRNAs in leukemia is a prerequisite for the development of clinical application.

[KEY WORDS] Circular RNA; Acute myeloid leukemia; Tumor biomarkers; Therapeutic target

急性髓细胞性白血病(Acute Myeloid Leukemia AML)是造血干细胞的恶性疾病,其特征是髓系谱系异常分化的胚细胞的克隆扩增。未成熟骨髓细胞的异常增殖导致未成熟祖细胞(成纤维细胞)的积聚,损害了正常的造血功能,导致严重的感染,贫血和出血^[1]。随着年龄增长发病率越高,多发生在老年人群^[2]。目前国际上主要通过细胞形态学(Morphology)、免疫学(Immunology)、细胞遗传学

(Cytogenetics)和分子生物学(Molecular biology)分型,即MICM分型对AML进行诊断以及预后监测。随着分子生物学技术的发展,越来越多的与AML发病相关的生物分子被发现,有望成为AML诊断和预后监测的标志物。环状RNA(Circular RNA, CircRNA)作为近年研究热门的生物分子,具有丰度高、进化保守性、高特异性及高稳定性特点,可作为优良的疾病诊治的生物标志物^[3]。很多研究

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81400109)

作者单位:暨南大学附属第一医院临床检验中心,广东,广州 510630

*通信作者:温旺荣, E-mail: wenwangrong@yeah.net

已经表明,癌症的发生和进展与 circRNAs 表达失调有关,尤其是在实体肿瘤中已经有较多的研究,比如胃癌^[4]、结直肠癌^[5]、肺癌^[6]、乳腺癌^[7]等。近期在 AML 中也发现多种与肿瘤发生发展密切相关的 circRNAs,本文主要对这些 circRNAs 在 AML 中诊断和预后中的研究现状进行综述,旨在探讨 circRNAs 在 AML 中诊断和预后监测中的应用价值。

1 环状 RNA 简介

CircRNA 是具有共价闭环同种型的单链 ncRNA 家族,是由前体 mRNA (pre-mRNA) 生成的,由下游的 5' 剪接位点与上游的 3' 端连接在一起,因此既没有 5' 至 3' 端极性,也没有多聚腺苷酸尾。并且所得到的 circRNA 仍旧通过 3'-5' 磷酸二酯键连接^[8]。目前认为 circRNA 的形成主要有四种:内含子配对驱动环化套索驱动环化内含子自身驱动环化 RNA 结合蛋白 (Retinol-Binding Protein, RBP) 或反式因子驱动环化^[9]。CircRNA 具有种类丰富^[10,15]、进化保守及组织特异性^[17]、结构稳定^[3,11]等特点,能在细胞中稳定存在^[12]。CircRNA 的最突出功能是其作为 miRNA 海绵的作用,可通过抑制 miRNA 活性来调节靶基因的表达^[13],circRNA-miRNA 调控基因网络在癌症进展和治疗功效中起到至关重要的作用;除了能够与 miRNA 相互作用外,circRNA 还可作为蛋白质诱饵来影响细胞功能^[14,15];还可以作为转录和剪接的调节因子,Li 等^[9]就发现一类与人类细胞中的 RNA 聚合酶 II (Pol II) 相关的 EICiRNA 可能与 U1 小核糖体蛋白 (U1 snRNP) 形成 EICiRNA-U1 snRNP 复合物在亲本基因启动子处进一步与 Pol II 转录复合物相互作用,促进亲本基因的转录,起到顺势调节的作用;可能参与翻译蛋白质及加工核糖体,研究发现某些 circRNA 可能编码的几种肽可参与到癌细胞增殖过程,并能够与核糖体结合翻译蛋白^[16]。另外有研究发现环状反义非编码 RNA (circANRIL) 可以通过控制核糖体 RNA (rRNA) 成熟来赋予动脉粥样硬化保护作用 and 调节动脉粥样硬化的途径^[17]。

2 急性髓系白血病中的环状 RNA

2.1 f-circRNA

在白血病中,染色体易位常导致基因融合。

融合 circRNA (f-circRNA) 的发现及其功能研究为了解白血病的机理和为患者量身定制疗法创造了新的见解。Guarnerio J^[18]等猜测并验证了带有染色体易位的肿瘤也带有来自重排基因组的 circRNA: 异常融合 circRNA (f-circRNA), 并进一步研究了两种类型 AML 中的 PML-RAR α 和 MLL / AF9 融合基因产生的多个 f-circRNA。通过小鼠实验发现 f-circM9 不足以独自导致白血病发生而是可能与其他致癌刺激物 (例如 MLL-AF9 融合蛋白) 结合,促进体内白血病发生。另外进一步研究发现,沉默内源性 f-circRNA 会诱导癌细胞会发生凋亡,这说明 f-circRNA 有望成为抗肿瘤药物的重要靶标。f-circRNA 的发现及其功能研究为了解白血病的机理和为患者量身定制疗法创造了新的方向。

2.2 CircNPM1

核蛋白 (nucleophosmin/nucleoplasmin family, member1, NPM1) 是 AML 中最常见的突变基因之一,具有原癌基因和抑癌特性,可通过编码多功能伴侣蛋白来参与核糖体的生物发生以及细胞凋亡和细胞增殖。CircNPM1 位于 5 号染色体上。Hirsch^[19]等通过 RNA-Seq 的转录组分析探索了 NPM1 的 circRNA 变体,并定量检测了 NPM1 野生型和突变的 AML 中的 circRNA hsa_circ_0075001,发现 hsa_circ_0075001 表达与总 NPM1 表达呈正相关,但与 NPM1 突变状态无关。Hsa_circ_0075001 表达的高与低定义了以不同的基因表达模式为特征的患者亚组,例如在 hsa_circ_0075001 高表达情况下 Toll 样受体信号转导途径的成分表达较低。这些发现将有助于通过 circRNA 表达谱区分不同的 AML 亚组,并为探索白血病细胞的生物学特性提供新的见解。

2.3 CircVIM

波形蛋白 (VIM) 是 III 型中间丝 (IF) 蛋白的主要成分,由 VIM 基因编码,并在内皮细胞和其他间充质细胞中普遍表达。VIM 在重要的生理和病理过程中至关重要,例如黏附,迁移,细胞信号传导,炎症,神经突扩展和血管形成^[20],可能与肿瘤的生长,浸润和不良预后有关^[21]。circ-VIM 是 VIM 基因的 circRNA,位于 10 号染色体上。Yi^[22]等检测了 113 例 AML 患者和 42 例健康对照者骨髓标本中的 circVIM,发现与对照组相比,circVIM 在 AML 中显著上调,并且与白细胞 (WBC) 计数呈正相关。circVIM 表达的上调说明其可能作为有前途

的生物标志物,用于AML的诊断。生存分析进一步表明,在全队列AML,非急性早幼粒细胞白血病AML和细胞遗传学正常AML患者中,过表达的*CircVIM*与总体生存期(OS)和无白血病生存期(Leukemia-Free Survival, LFS)显著缩短有关。多变量分析还显示,*Circ-VIM*过表达是AML患者OS和LFS的独立不良预后因素,它可能有助于预测生存期较低,并且可能作为AML治疗结果的评估标准。

2.4 CircRNA-DLEU2

CircRNA - DLEU2 (hsa_circ_0000488) 位于13号染色体。Wu^[23]等研究发现,在AML组织和细胞中circRNA-DLEU2被上调,circRNA-DLEU2抑制miR-496表达并促进PRKACB(蛋白激酶依赖cAMP的催化 β ,是Ser/Thr蛋白激酶家族的成员,是cAMP/PKA诱导的信号转导的关键效应子,参与许多细胞过程包括细胞增殖,凋亡,基因转录,代谢和差异化。)表达。miR-496拮抗PRKACB对MOLM-13细胞增殖和凋亡的影响,进而判断circRNA-DLEU2通过抑制miR-496和促进PRKACB表达来促进人AML。另外还发现circRNA-DLEU2加速了体内AML相关肿瘤的形成。通过靶向miR-496/PRKACB通道,circRNA-DLEU2可以作为人类AML的新型生物标志物和治疗靶标。

2.5 CircPAN3

CircPAN3(源自*PAN3*基因转录本;基因符号mmu_circ: chr5: 147450653 - 147488258),是通过*Pan3* pre-mRNA的反向剪接产生的。Zhu^[24]等发现小鼠和人的Lgr5+肠道干细胞(Lgr5+ISCs)与免疫细胞相关的circPan3高表达,Lgr5-GFP+ISC中的circPan3通过隐窝ILC2介导的IL-13-IL-13R信号传导来促进ISC自我更新能力。另外,Shang^[25]等发现具有化学敏感性和化学抗性的AML细胞之间差异表达的circRNA-circPAN3可能通过circPAN3-miR-153-5p/miR-183-5p-X连锁的凋亡蛋白抑制剂(XIAP)轴而成为化学耐药性的关键介体,证明CircPAN3可以作为预测AML患者化疗临床疗效的重要指标,并且还可以作为逆转AML耐药性的潜在靶标。随后通过进一步的生物信息学分析和机制实验发现,circPAN3可能通过调节自噬和影响凋亡相关蛋白的表达来促进AML耐药,而AMPK/mTOR信号传导在circPAN3对自噬的调节中起关键作用。这些发现可

能为circRNA在介导AML耐药中的作用提供新的重要见解^[26]。

2.6 Hsa_circ_0004277

Hsa_circ_0004277位于10号染色体,位于相同染色体上的WDR37是Hsa_circ_0004277的线性同工型。它们与细胞凋亡,信号通路和细胞周期有关^[27]。Li^[28]等借助circRNA芯片,证明了circRNA在急性髓细胞性白血病患者中的表达谱,并鉴定了大量可能以白血病特异性方式表达的circRNA。并在115个人类样品的队列中对下调的circRNA hsa_circ_0004277进行了表征和功能评估,发现化学疗法可以显著恢复hsa_circ_0004277的表达,表明hsa_circ_0004277的水平升高与成功的治疗相关。除了分析AML患者和健康对照之间的circRNA,他们还进行了高风险和低风险AML亚组之间的比较,发现有5个circRNA失调,尤其是在低危亚组中,这可能有助于AML风险状况评估。因此根据AML的进展阶段,hsa_circ_0004277的动态表达,结合ROC曲线分析,hsa_circ_0004277很可能是AML中的诊断性生物标志物或治疗靶标。

2.7 其它circRNA

近年来越来越多的研究人员开始探索与AML相关的circRNA。范^[29]等发现hsa_circ_100290在AML临床样本中高表达,并通过靶向miR-203/Rab10轴确定了hsa_circ_100290在AML细胞增殖和凋亡中的关键调节作用。不同于其他研究者对比AML与健康人之间差异表达的circRNA,Ping L^[30]等通过circRNA测序鉴定AML患者和缺铁性贫血(对照)的骨髓样品中差异表达的circRNA,发现AML患者的circ_0009910明显上调,进行进一步的体内外实验表明,敲除circ_0009910通过使miR-20a-5p海绵化,抑制细胞增殖并诱导凋亡,因此可作为AML的新结局生物标志物,circ_0009910和miR-20a-5p也可能都是未来AML治疗的潜在治疗靶标。一种来自ANAPC7基因位点的circRNA(hsa_circRNA_101141),也称circ-ANAPC7,是有前途的AML生物标志物,它可能通过充当miR-181家族的海绵参与AML的发病机制^[31]。细胞遗传学和分子遗传学特征是AML患者的重要预后因素。由8号染色体上PVT1的外显子2产生的Circ-PVT1通常伴随着8q24扩增子。扩增后的AML患者(AML-amp)中circ-PVT1的表达水平显著高于正常核型的患者。在AML-amp病例中发

现与 8q24 扩增基因有关的转录后嵌合体和 circRNA,可能会拓宽我们对人类白血病潜在机制的探索^[32]。

3 小结与展望

随着高通量测序技术以及生物信息学的发展,人们对 circRNA 的认知和了解也越来越深入,积极探索了 circRNA 的形成潜在机制、生物信息学功能、在体内作用的机制。不同的 circRNA 的不表达谱与临床特征有关,尤其是在肿瘤的发生发展、转移和复发中表现出越来越重要的地位,使其成为疾病研究的主题之一。本文主要阐述与总结了 AML 中 circRNA 的相关研究,我们了解到 circRNA 在 AML 中可能起到早期诊断的生物标记物作用,并在疾病的发生发展以及与 AML 相关的体内肿瘤有关,对 AML 的治疗以及相关药物的耐药性研究也有重要的意义,同时可能是疾病疗效观察和预后的重要检测目标。但由于目前缺乏对 circRNA 缺乏全面的了解以及实验研究缺乏相应的标准规范,因此需要通过更深入的研究,以及通过总结归纳制定出相关的实验研究范本,并积极探索 circRNA 在疾病诊断中的更明确的作用,期望基于 circRNA 的相关药物早日应用到临床之中。

参考文献

- [1] Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia [J]. *The Lancet*, 2018, 392(10147):593-606.
- [2] Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel [J]. *Blood*, 2017, 129(4):424-447.
- [3] Veal A, Llorente-Cortes V, Gonzalo-Calvo D. Circular RNAs in Blood [M]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1087:119-130.
- [4] Chen S, Li T, Zhao Q, et al. Using circular RNA hsa_circ_0000190 as a new biomarker in the diagnosis of gastric cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 466:167-171.
- [5] Yuan Y, Liu W, Zhang Y, et al. CircRNA circ_0026344 as a prognostic biomarker suppresses colorectal cancer progression via microRNA-21 and microRNA-31 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2):870-875.
- [6] Han J, Zhao G, Ma X, et al. CircRNA circ-BANP-mediated miR-503/LARP1 signaling contributes to lung cancer progression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4):2429-2435.
- [7] Nair AA, Niu N, Tang X, et al. Circular RNAs and their associations with breast cancer subtypes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49):80967-80979.
- [8] Li X, Yang L, Chen LL. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3):428-442.
- [9] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs [J]. *Cell*, 2015, 160(6):1125-1134.
- [10] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):30733.
- [11] Kumar L, Shamsuzzama, Jadiya P, et al. Functional Characterization of Novel Circular RNA Molecule, circzip-2 and Its Synthesizing Gene zip-2 in C [J]. *elegans Model of Parkinson's Disease. Mol Neurobiol*, 2018, 55(8):6914-6926.
- [12] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6):9331-9342.
- [13] Panda AC. Circular RNAs Act as miRNA Sponges [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1087:67-79.
- [14] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6):2846-2858.
- [15] Du WW, Fang L, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ*, 2017, 24(2):357-370.
- [16] Zhang M, Zhao K, Xu X, et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4475.
- [17] Holdt LM, Stahringer A, Sass K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:12429.
- [18] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, et al. Oncogenic Role of Fusion-circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations [J]. *Cell*, 2016, 166(4):1055-1056.
- [19] Hirsch S, Blatte TJ, Grasedieck S, et al. Circular RNAs of the nucleophosmin (NPM1) gene in acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2017, 102(12):2039-2047.
- [20] Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(10):2050-2062.
- [21] Sutoh Yoneyama M, Hatakeyama S, Habuchi T, et al. Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2014, 93(4):157-169.
- [22] Yi YY, Yi J, Zhu X, et al. Circular RNA of vimentin expression as a valuable predictor for acute myeloid leukemia development and prognosis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4):3711-3719.

(下转第 165 页)

基于纳米孔测序技术的呼吸道病原体快速确认

叶福强¹ 李鹏² 韩一芳¹ 张琪¹ 林彦锋² 王凯英² 王太武¹ 宋宏彬²
王长军² 汪春晖¹ 张锦海^{1*}

[摘要] **目的** 验证纳米孔测序技术在呼吸道病原体应急检测中的可行性。**方法** 对某上呼吸道感染患者的咽拭子标本进行总核酸抽提并定量,接着进行cDNA的逆转录合成和测序文库构建,在便携式三代测序仪MinION上进行测序,然后对测序数据进行病原分类学分析,最后使用实时荧光定量PCR验证测序结果。**结果** MinION在15 h内共计产生188 063条有效序列。测序数据分析表明,在咽拭子样本中同时检测到人呼吸道腺病毒7型和甲型流感病毒H3N2亚型,分别有19和4条序列匹配到参考基因组。测序开始9 h内,MinION已分别产出78.95%的7型腺病毒序列和100%的H3N2序列。从取样到初步获得鉴定结果,流转时间为18.6 h。实时荧光定量PCR与测序结果一致。**结论** MinION用于呼吸道病原体的快速检测具有可行性,且具备同时检测多种病原体并对病原分型的能力,在暴发疫情和呼吸道病毒应急检测方面具有应用价值。

[关键词] 纳米孔测序; MinION; 病原体; 快速检测

Rapid identification of respiratory pathogens by nanopore sequencing technology

YE Fuqiang¹, LI Peng², HAN Yifang¹, ZHANG Qi¹, LIN Yanfeng², WANG Kaiying², WANG Taiwu¹, SONG Hongbin², WANG Changjun², WANG Chunhui¹, ZHANG Jinhai^{1*}

(1. Department of Disease Control and Prevention, Center for Disease Control and Prevention of Eastern Theater Command, Nanjing, Jiangsu, China, 210002; 2. Center of Communicable Disease Control, Center for Disease Control and Prevention of PLA, Beijing, China, 100071)

[ABSTRACT] **Objective** To validate the feasibility of nanopore sequencing technology in emergent detection of respiratory viral pathogens. **Methods** Total viral nucleic acid was extracted from the throat swab sample of a patient diagnosed with upper respiratory tract infection and then quantified. The cDNA was generated by reverse transcription and employed for downstream library construction. The sequencing was conducted on a portable third-generation nanopore sequencer MinION and taxonomic analyses were performed on the sequencing data. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to validate the sequencing results. **Results** MinION generated a total of 188063 useable reads within 15 hours. Human adenovirus 7 and H3N2 virus were simultaneously detected in the sample, with 19 and 4 reads respectively aligning to the corresponding reference genomes. Within 9 hours from the start of sequencing, 78.95% of adenovirus 7 reads and 100% of H3N2 reads have been produced by MinION. The turnaround time, from sampling to obtaining the preliminary identification results, was 18.6 hours. The PCR results were consistent with those of MinION. **Conclusion** MinION has the potential of rapid detection of respiratory pathogens and is able to simultaneously identify no less than one pathogen and distinguish the subtypes, proving the application value in epidemic outbreaks and emergent identification of respiratory viruses.

[KEY WORDS] Nanopore sequencing; MinION; Pathogen; Rapid detection

基金项目:国家自然科学基金(31701158);国家科技重大专项(2018ZX10713003);军队后勤重大项目(AWS16J020);军队后勤科研项目(CLB19J027)

作者单位:1. 东部战区疾病预防控制中心疾病预防控制中心,江苏,南京 210002

2. 中国人民解放军疾病预防控制中心传染病控制中心,北京 100071

*通信作者:张锦海, E-mail: ahoi@163.com

近年暴发的西非埃博拉出血热(2014年)、巴西寨卡病毒病(2015年)和尼日利亚拉萨热疫情(2018年)等新发传染病对疫区民众的生命健康造成巨大威胁^[1-6]。为了有效遏制传染病蔓延,亟需快速有效的病原体检测确认技术。常用的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术对未知病原或高突变率病原检测能力有限。现有的二代高通量测序平台虽然具备鉴别病原微生物的能力^[1,7-11],但对实验室环境要求苛刻,文库制备流程复杂,也限制其大规模的现场快速检测应用。

由 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 开发的三代测序平台 MinION, 通过捕捉 DNA/RNA 经过纳米孔时引起的电流变化来鉴别核苷酸^[12-13]。其在病原现场快速检测方面具有诸多优势:①便携。总质量仅为 87 g, 可应用于现场检测^[14-17]。②供电方式简单。USB 3.0 接口即可保证测序仪稳定运行。③测序数据实时产出即时分析。④读长长。现有报道的最长测序读长~2.3 Mb^[12]。当前该平台已用于人类血液、尿液和呼吸道样本里的病毒和细菌病原体检测^[7,18-19], 也为西非埃博拉病毒病以及巴西寨卡病毒暴发疫情的病原确认和流行病学调查提供了关键线索^[5,20-22]。为了验证纳米孔测序技术在呼吸道病毒病原体应急检测中的可行性, 笔者使用 MinION 对上呼吸道感染患者的咽拭子标本进行快速测序及病原学分析, 并采用 PCR 实验验证测序结果。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

咽拭子标本由东部战区疾病预防控制中心于 2019 年 3 月在流感网络实验室运行期间采集于某部 1 名士兵, 该患者因出现发热、咳嗽、流涕等症状就医, 初步诊断为上呼吸道感染, 病原不明。

病毒核酸抽提试剂盒 Qiagen QIAamp MinElute Virus Spin Kit 购自德国 Qiagen 公司, Qubit 3 及配套定量试剂耗材、磁力架购自美国 Invitrogen 公司, cDNA 合成试剂盒 NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module 和 NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module 购自美国 NEB 公司, AMPure XP 磁珠购自美国 Beckman 公司, 快速建库测序试剂盒 (SQK-RADSP4)、测序芯片制备试剂盒 (EXP-FLP001)、测序芯片 (FLO-MIN106, R9.4)、测序仪 MinION

Mk1B 购自英国 ONT 公司, 核酸抽提试剂盒 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 及实时荧光定量 PCR 检测试剂盒 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 购自日本 Takara 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒总核酸抽提及定量

对用于 MinION 测序的样本病毒总核酸 (DNA/RNA), 除不进行离心过滤、不加入核酸酶和溶菌酶外, 其余实验步骤均按说明书操作进行。收集核酸后, 取 2 μL 样本核酸按仪器说明书测定 dsDNA 和 RNA 浓度。

1.2.2 逆转录合成 cDNA 及定量

首先使用 NEBNext Ultra II RNA First Strand Synthesis Module 合成 cDNA 的第一链, 然后使用 NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module 合成 cDNA 的第二链。使用 Beckman AMPure XP 磁珠按说明书的方法对 cDNA 产物进行纯化收集。取 1 μL 产物, 使用 Qubit 3 对 dsDNA 浓度进行测量, 测量过程按仪器说明书进行。

1.2.3 MinION 文库构建及测序

测序在 MinION Mk1B 测序仪上进行。首先按说明书要求进行测序芯片质检, 质检通过后依照快速建库测序试剂盒及测序芯片引发试剂盒操作流程构建测序文库并加样至测序芯片中, 在加样过程中避免将气泡引入加样孔中。在测序仪控制软件 MinKNOW (v 3.1.19, ONT 官网 <https://nanoporetech.com/> 下载) 上对测序参数进行设置, 测序运行时间设为“48 h”。

1.2.4 MinION 测序数据生物信息学分析

使用 MinKNOW 实时读取测序仪产生的 fast5 文件, 使用 Albacore 软件 (v 2.3.4, ONT 官网下载) 将 fast5 文件转换成 fastq 文件, 碱基质量分数低于 7 的序列将被剔除。使用 Nanoplot 软件 (v 1.22.0)^[23] 查看测序数据质量及读长分布。使用 Centrifuge (v 1.0.4)^[24] 对测序数据进行初步比对分析: 将所有通过质控的序列与人 (Grch38.p12) 和病毒参考基因组 (NCBI Refseq 数据库 <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/refseq/>, 2019 年 3 月 21 日下载, 共计 8 588 个病毒全基因组序列) 进行快速比对, 参数设置为“--min-hitlen 15 -k 5”, 3 min 内即完成比对过程。

为进一步了解物种构成,采取“先比对后剔除”的策略,先使用 Minimap2 软件(v 2.16)^[25]将所有质控后序列与人参考基因组比对,参数设置为“-ax map-ont -k 15”,使用 samtools(v 1.9)^[26]对对比产生的 sam 文件进行处理,得到的未匹配序列用于下一步操作。然后将上步获得的序列与 NCBI 病毒参考数据库进行比对,参数为“-ax map-ont -k 7”,获得的未匹配序列用于下步比对。最后,将上步未匹配序列使用 BLASTN(v 2.8.1)与 NCBI 细菌和古细菌参考基因组比对(包括 12 668 个细菌和 283 个古细菌全基因组序列,2019 年 3 月 21 日下载),参数为“-perc_identity 90 -word_size 16 -evalue 0.000 001”,未匹配的序列定义为“未分类序列”。

为进一步了解比对详情,将匹配到 NCBI 病毒 Refseq 参考数据库的序列提取出来,进行在线 BLAST 比对,参数设置同上,并挑选出比对一致性较好的基因组,用于下游分析并统计比对情况,包括比对一致性、查询序列覆盖度等信息。使用 samtools 及 Qualimap(v 2.2.2)^[27]计算参考基因组覆盖度。使用自有 Perl(v 5.22.1)脚本查看序列的产出时间并进行统计排序。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

使用实时荧光定量 PCR 来验证 MinION 测序获取的病原阳性结果。Adv7 引物序列:HA_v7-F: 5'-GAGGAGCCAGATATTGATATGGAATT-3', HA_v7-R:5'-AATTGACATTTTCCGTGTAAAGCA-3', 探针序列为 FAM-AAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGA-BHQ1。H3N2 引物:H3F: ACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAA, H3R: TAAGGGAGGCATAATCCGGCACAT, 探针序列为 FAM-ACGCAGCAAAGCCTA CAGCAACTGT-BHQ1。使用无核酸酶的水作为阴性对照。使用的总核酸从咽拭子病毒保存液中抽提,使用试剂盒配制 PCR 反应体系。反应条件为 42℃ 5 min, 95℃ 10 s, 95℃ 5 s(40 个循环), 60℃ 34 s。Ct 值 <35 时,认为 PCR 检测阳性。

2 结果

2.1 测序概况

样本抽提后 RNA 浓度为 20.8 ng/μL, dsDNA 浓度为 52.0 ng/μL。逆转录合成 cDNA 后的定量结果为 77.2 ng/μL,以 cDNA 作为模板建立 MinION 文库并测序。MinION 运行 15 h,共产生 236 764 条

序列(图 1),其中 188 063 条序列(占比 79.43%)通过数据质控(高质量序列,碱基质量分数均不低于 7),其余序列未通过质控(低质量序列)。

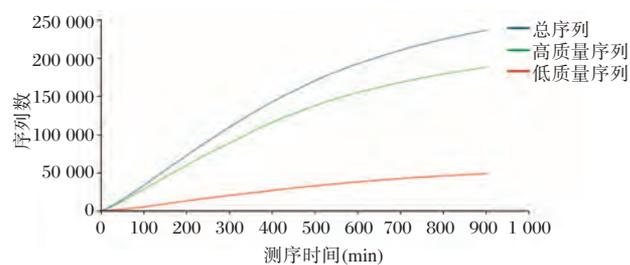


图 1 MinION 测序通量

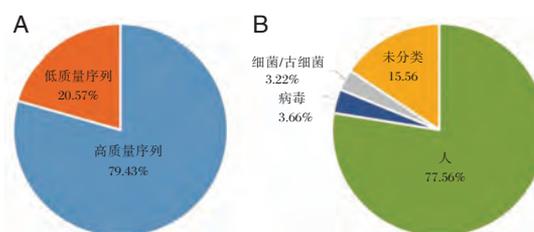
Figure 1 The sequencing throughput of MinION

通过质控的测序数据用于下游生物信息学分析。其中最长达 102 326 bp,最短读长为 23 bp,总碱基数为 246.7 M。平均读长为 1 311.8 bp,平均质量分数为 9.1,读长中位数为 3 281 bp。

2.2 测序数据病原学分析

快速比对分析结果表明样本中同时存在两种呼吸道病原体:人呼吸道腺病毒 7 型(DNA 病毒)和甲型流感病毒 H3N2 亚型(RNA 病毒)。仅 2 min 50 s 即完成比对过程,获得初步鉴定结果。

质控后的数据中共有 145 861 条序列(占比 77.56%)来自于人,病毒序列数为 6 876(占比 3.66%),细菌/古细菌比对数为 6 057(占比 3.22%,主要包括来自口动菌属、奈瑟氏菌属、链球菌属、普氏菌属、克雷伯菌属、梭菌属、嗜血杆菌属、韦荣球菌属等口咽部细菌),未分类序列数为 29 269(占比 15.56%),分类结果见图 2。



注:A 为测序仪数据通量占比; B 为质控后序列的分类学比重。

图 2 测序数据构成

Figure 2 The composition of sequencing data

进一步的生物信息学分析同样在样本中同时鉴别出两种呼吸道病原体:人呼吸道腺病毒 7 型和甲型流感病毒 H3N2 亚型,分别有 19 条和 4 条序列比对到参考基因组。进行在线 BLAST 比对后,

选取比对一致性较好的人呼吸道腺病毒7型(Adv7, Genbank 序列号:MG696128.1, 基因组大小为35 233 bp)和甲型流感病毒H3N2亚型(H3N2, Genbank 序列号:MK633737.1-MK633744.1, 共8个基因区段, 基因组大小分别为1 701 bp、982 bp、1 410 bp、1 497 bp、838 bp、2 151 bp、2 274 bp和2 280 bp)基因组进行下一步分析。

19条Adv7序列与参考基因组的比对一致性介于84.83%和96.55%之间, 查询序列覆盖度介于70.63%和99.58%之间(表1)。19条序列中, 读长排

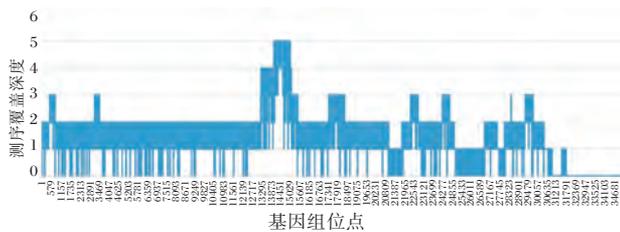
名前三的分别为14 910 bp, 14 720 bp和12 097 bp。对Adv7参考基因组覆盖度为87.65%, 覆盖深度介于1X和5X之间(图3)。4条H3N2序列比对到参考基因组的3个区段上, 分别是区段2(PB1和PB1-F2基因, MK633743.1), 区段3(PA和PA-X基因, MK633742.1)和区段6(NA基因, MK633739.1), 比对一致性介于91.43%和94.74%之间, 对3个区段的覆盖度分别为32.81%, 6.79%和7.02%。

至此, 鉴定出该患者为呼吸道腺病毒7型和甲型流感病毒H3N2亚型混合感染。

表1 Adv7和H3N2序列测序及比对信息统计

Table 1 The summary of sequencing and alignment statistics of Adv7 and H3N2 reads

序列	序列长度(bp)	参考序列	一致性(%)	序列覆盖度(%)	E value 期望值	产出耗时(s)
Adv7_1	12 097	MG696128.1	90.80	99.58	0	496
Adv7_2	1 196	MG696128.1	89.86	79.35	0	4 986
Adv7_3	880	MG696128.1	92.64	93.64	0	5 090
Adv7_4	2 476	MG696128.1	90.04	97.86	0	6 630
Adv7_5	464	MG696128.1	89.24	84.27	2.70×10 ⁻¹³³	6 639
Adv7_6	729	MG696128.1	91.80	92.46	0	7 196
Adv7_7	127	MG696128.1	90.53	74.02	1.83×10 ⁻²¹	7 673
Adv7_8	3 153	MG696128.1	87.77	97.21	0	9 004
Adv7_9	7 660	MG696128.1	91.13	98.80	0	9 651
Adv7_10	541	MG696128.1	96.55	84.84	0	9 919
Adv7_11	803	MG696128.1	87.71	94.52	0	11 088
Adv7_12	354	MG696128.1	91.32	82.20	3.76×10 ⁻¹⁰⁶	12 337
Adv7_13	14 720	MG696128.1	87.65	99.40	0	26 456
Adv7_14	326	MG696128.1	91.50	87.42	1.01×10 ⁻¹⁰⁰	28 617
Adv7_15	14 910	MG696128.1	84.83	99.42	0	31 058
Adv7_16	362	MG696128.1	93.19	75.14	2.37×10 ⁻¹⁰²	42 200
Adv7_17	3 458	MG696128.1	89.92	97.77	0	43 043
Adv7_18	933	MG696128.1	93.03	70.63	0	43 779
Adv7_19	551	MG696128.1	91.04	71.51	1.70×10 ⁻¹⁴⁸	50 536
H3N2_1	153	MK633743.1	92.52	67.97	1.02×10 ⁻³⁸	4 128
H3N2_2	221	MK633742.1	94.74	66.52	4.04×10 ⁻⁶⁴	10 045
H3N2_3	153	MK633739.1	91.43	66.01	1.70×10 ⁻³⁶	25 195
H3N2_4	811	MK633743.1	94.67	81.13	0	31 957



注:覆盖深度为0的位点表示无测序数据覆盖到此位点。

图3 Adv7参考基因组的测序覆盖度

Figure 3 The sequencing depth against the Adv7 reference genome

2.3 测序流转时间

MinION的文库制备具有简易快速的优点, 从获得样本到建立文库并上机测序, 仅用时约3.5 h (215 min) (图4)。纳米孔测序技术还具有实时产出数据的优势, 测序开始仅9 s后即有可用于下游分析的原始数据产生。测序1 h内, 共计产生18 151条序列, 占总产出数据的比重为7.67%, 其中通过质控的序列数为15 559, 占有所有可用数据的比重为8.27%。测序开始仅8 min后, MinION即产出第1条Adv7序列, 读长为12 097 bp, 与

MG696128.1 参考序列一致性为 90.80%，比对覆盖度高达 99.58% (表 1)。测序开始后的 9 h 内，78.95% 的 Adv7 序列均已产出，读长最长为 14 910 bp。14 h 以后，所有 Adv7 序列均已产出。对于 H3N2 数据而言，测序开始 69 min 后即产生第 1 条序列，9 h 内产出所有 H3N2 序列。测序进行 15 h 后终止，进行快速宏基因组比对分析，仅需 3 min

即获得微生物初步分类结果。综上，从拿到样本到获得初步鉴定结果，共耗时约 18.6 h，低于当前二代台式测序平台所需时长。值得注意的是，测序开始 9 h 内，匹配到 Adv7 和 H3N2 参考基因组的绝大部分序列已经产生。此时终止测序亦可获得类似鉴定结果，因此实际流转时间可控制在 13 h 以内。



图 4 MinION 测序流转时间

Figure 4 The sequencing turnaround time of MinION

2.4 PCR 实验结果

扩增曲线表明，Adv7 和 H3N2 均为 PCR 阳性 (图 5)。PCR 结果与测序结果吻合。同时，对该份送检标本，未检出流感网络实验室监测的其它呼吸道病原 (包括其它亚型甲型流感病毒、乙型流感病毒、支原体、衣原体、冠状病毒等，数据未显示)。

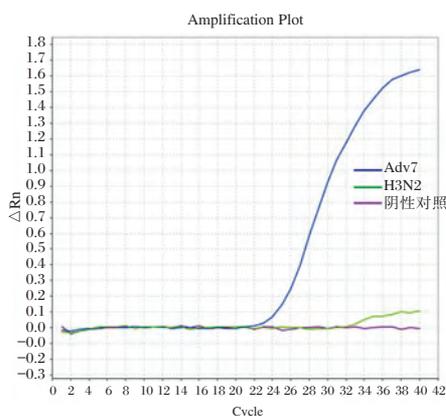


图 5 实时荧光定量 PCR 结果

Figure 5 The results of real-time fluorescence quantitative PCR

3 讨论

作为经典、常见的微生物快速检测方法，PCR 技术灵敏度和准确度高，在目标微生物参考序列已知的前提下，能在 4 个小时左右获得对单一病原的鉴定结果。但对于新发、未知病原体，由于缺乏病原序列先验知识，通常需要针对多种潜在病原设计多对引物，进行多轮 PCR 进行筛查，工作量大且仍有可能无法获得病原检测结果。当前主流二代测序平台文库制备流程一般较为繁琐，测序周期长，

同时数据分析必须在测序完成后进行，限制其在病原体快速检测方面的应用。基于纳米孔测序技术的 MinION 能有效解决以上不足，已应用于埃博拉病毒病、寨卡病毒病的病原现场快速检测中。

呼吸道病毒病原体包括 DNA 病毒和 RNA 病毒，为了全面捕获咽拭子保存液里的病毒序列，在病毒种类不明确时，必须采取病毒 DNA 和 RNA 同时测序的策略，所以，对于应急检测的样本而言，逆转录合成 cDNA 这一步必不可少，其耗时一般在 2~3 h。对于病原体快速测序而言，逆转录合成 cDNA 会是限速步骤之一，在今后的检测过程中，还需探索快速合成 cDNA 的实验方法。

从获得样本到建立文库并上机测序，仅用时约 3.5 h，远低于当前主流二代台式测序平台所需的至少 6 h 的建库时间^[28]。从取样到获得初步鉴定结果，MinION 测序流转时间约为 18.6 h，其中测序时长 15 h。对于培养样本或者具有病原先验知识的样本而言，可以针对性选择核酸富集 (核酸含量符合建库要求无需富集、PCR 扩增富集 DNA 样本、逆转录合成 cDNA) 或文库制备流程 (快速建库、连接建库、RNA 直接测序、cDNA 直接测序等)，测序仪运行时长也可针对性进行调整。当前单个 R9 测序芯片总数据产量可达到 10~15 Gb，单个细菌或病毒的培养样本一般测序数据产量达到 1Gb (细菌基因组的覆盖度此时一般可达 100X-200X) 时，即可考虑终止测序，测序耗时一般不超过 5 h，远低于本研究中的 15 h。而对于非培养样本而言，则需要动态监测产出数据，测序时长也会相应增加。本研究中，测序开始 9 h 内，匹配到 Adv7 和 H3N2 参考

基因组的绝大部分序列已经产生。测序开始 5 h 内,至少有 50%的 Adv7 和 H3N2 序列已产生。因此,应急检测的流转时间还有望进一步减少。

本文使用一步法 RT-PCR 对测序结果进行验证。可以发现 Ct 值与匹配序列数目和数据产出时间具有一定相关性。Ct 值越小,核酸含量相对越高,匹配到参考基因组的序列就越多,其数据产生的时间越早;反之,匹配到参考基因组的序列则越少,数据产出时间越晚。

本文的研究结果表明,MinION 用于呼吸道病原体的快速检测具有可行性,且具备同时检测多种病原体并对病原分型的能力,但仍有一些技术问题需要解决,如在快速检测背景下,人的临床样本,尤其是咽拭子、血液、尿液等样本,其宿主核酸含量占比一般较高,病原体核酸含量极低,这就导致测序数据中宿主相关序列占绝大部分。如何有效地富集病原体核酸将会是该技术应用于现场快速检测需要解决的重难点问题。笔者相信,随着纳米孔测序技术及相关试剂的升级完善,MinION 有潜力成为病原体快速检测和临床诊断的常规工具。

参考文献

- [1] Gardy JL, Loman NJ. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(1): 9-20.
- [2] Kafetzopoulou LE, Pullan ST, Lemey P, et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 74-77.
- [3] Evans DK, Popova A. West African Ebola crisis and orphans[J]. *Lancet*, 2015, 385(9972): 945-946.
- [4] The Neglected Dimension of Global Security: A Framework to Counter Infectious Disease Crises[M]. Washington, DC: The National Academies Press, 2016: 142.
- [5] Faria NR, Quick J, Claro IM, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas[J]. *Nature*, 2017, 546(7658): 406-410.
- [6] Faria NR, Azevedo R, Kraemer MUG, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings[J]. *Science*, 2016, 352(6283): 345-349.
- [7] Imai K, Tamura K, Tanigaki T, et al. Whole Genome Sequencing of Influenza A and B Viruses With the MinION Sequencer in the Clinical Setting: A Pilot Study[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2748.
- [8] Briand FX, Schmitz A, Ogor K, et al. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential[J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(9): 30473.
- [9] Harvala H, Frampton D, Grant P, et al. Emergence of a novel subclade of influenza A (H3N2) virus in London, December 2016 to January 2017[J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(8): 30466.
- [10] Houlihan CF, Frampton D, Ferns RB, et al. Use of Whole-Genome Sequencing in the Investigation of a Nosocomial Influenza Virus Outbreak[J]. *J Infect Dis*, 2018, 218(9): 1485-1489.
- [11] Macfadden DR, McGeer A, Athey T, et al. Use of Genome Sequencing to Define Institutional Influenza Outbreaks, Toronto, Ontario, Canada, 2014-15[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(3): 492-497.
- [12] Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, et al. The Third Revolution in Sequencing Technology[J]. *Trends Genet*, 2018, 34(9): 666-681.
- [13] Ameur A, Kloosterman WP, Hestand MS. Single-Molecule Sequencing: Towards Clinical Applications[J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(1): 72-85.
- [14] Johnson SS, Zaikova E, Goerlitz DS, et al. Real-Time DNA Sequencing in the Antarctic Dry Valleys Using the Oxford Nanopore Sequencer[J]. *J Biomol Tech*, 2017, 28(1): 2-7.
- [15] Mcintyre ABR, Rizzardi L, Yu AM, et al. Nanopore sequencing in microgravity[J]. *NPJ Microgravity*, 2016, 2: 16035.
- [16] Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, et al. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 18022.
- [17] Edwards A, Debonnaire AR, Nicholls SM, et al. In-field metagenome and 16S rRNA gene amplicon nanopore sequencing robustly characterize glacier microbiota[J]. *bioRxiv*, 2019: 073965.
- [18] Xu Y, Lewandowski K, Lumley S, et al. Detection of Viral Pathogens With Multiplex Nanopore MinION Sequencing: Be Careful With Cross-Talk[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2225.
- [19] Wang J, Ke YH, Zhang Y, et al. Rapid and Accurate Sequencing of Enterovirus Genomes Using MinION Nanopore Sequencer[J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(10): 718-726.
- [20] Quick J, Loman NJ, Duraffour S, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance[J]. *Nature*, 2016, 530(7589): 228-232.
- [21] Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(6): 1261-1276.
- [22] Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 894-899.
- [23] De Coster W, D'hert S, Schultz DT, et al. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(15): 2666-2669.
- [24] Kim D, Song L, Breitwieser FP, et al. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences[J]. *Genome Res*, 2016, 26(12): 1721-1729.

(下转第 150 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 3 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

Complete genomic analysis of a erythromycin resistant *Bordetella pertussis* Isolate

YU Dan¹, LI Dongfang², YUAN Lin¹, FENG Xin², 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, China, 100045; 2. Department of Microbial Research, WeHealthGene Institute, Shenzhen, Guangdong, China, 518000)

[ABSTRACT] **Objective** To determine the entire genome sequence of a domestic erythromycin resistant *Bordetella pertussis* P2013109 and understand its genetic characteristics. **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 of the 23s rRNA gene locus display the A2047G mutation. Comparing with P2013109, 3 long fragments are missing from the genomes of the 15 other strains. 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, lineage II included only P2013109, which was divergent from the others by 25 SNPs. 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 518000

于丹和栗东芳为共同第一作者

*通信作者:姚开虎, E-mail: yaokaihu@bch.com.cn

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 its 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;然后利用纠正后的三代测序数据进行组装,使用的软件为 Celera Assembler8.0。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 Barnap 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(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
Table 1 The genome characteristics of *B.pertussis* P2013109 and the others

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	<i>ptxA</i>	<i>ptxP</i>	<i>fim3</i>	<i>prn</i>
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 3 个比较大的缺失区域, R1 约 4kb, 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。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

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	
	细胞过程和信号传导	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	
细胞骨架		0	3	
转录		270	22	
信息储存和处理	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	

两个疫苗株作为 I 型, 分别于 1951 年和 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]。

3 讨论

本研究显示百日咳鲍特菌 P2013109 株基因组

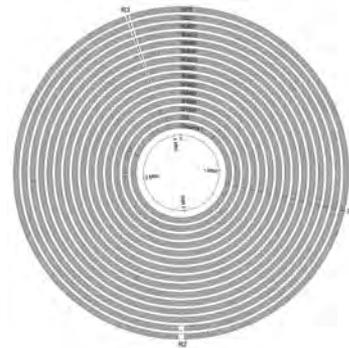


图1 P2013109 与其他 15 株菌的全基因组比较结果
Figure 1 The whole genome comparison analysis of *B. pertussis* P2013109 and the other 15 genomes

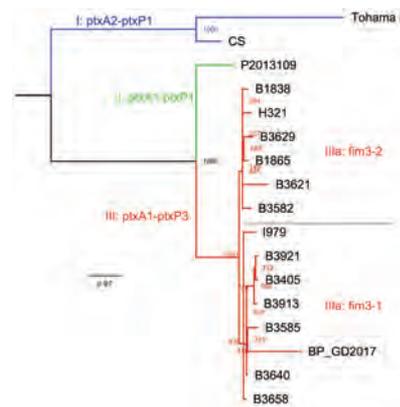


图2 百日咳杆菌 P2013109 与其他百日咳杆菌的全基因组进化树

Figure 2 Genome-wide phylogenetic tree of Genome-wide phylogenetic tree of *Bordetella pertussis* P2013109 and the other genomes (including the BP_GD2017 isolated from Gangdong)

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, 3 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 3 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。

致谢: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,(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 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,2018,04:301-305,311.
- [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.
- [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-Kielb 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*. 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.

WGA、RDB 结合 STR 单体型分析在 β -地中海贫血胚胎植入前遗传学诊断中的应用

李伍高¹ 严提珍² 李哲涛¹ 唐永梅¹ 秦祖兴¹ 李忻琳¹ 蔡稔^{2*}

[摘要] **目的** 分析全基因组扩增技术结合致病位点检测和短串联重复序列单体型分析进行 β -地中海贫血胚胎植入前遗传学诊断效果。**方法** 对2017年1月至2018年12月在本院进行 β -地中海贫血植入前遗传学诊断的囊胚检测结果进行分析,统计植入前遗传学诊断检测结果与产前诊断结果。**结果** 纳入统计分析的合计71个检测周期501枚囊胚,检测成功率94.4%(473/501)。其中69对夫妻进行了移植,移植周期92个,生化妊娠率63.04%,临床妊娠率53.26%,合计45对夫妇进行了产前诊断或流产物分析,符合率100%。**结论** 利用全基因组扩增技术结合致病位点检测和短串联重复序列单体型分析进行 β -地中海贫血胚胎植入前遗传学检测准确率高,能满足临床工作需求。

[关键词] *HBB* 基因; 植入前遗传学诊断; 全基因组扩增; 短串联重复序列单体型分析

Application of WGA, RDB and STR haplotype analysis in preimplantation genetic diagnosis of β -thalassemia

LI Wugao¹, YAN Tizhen², LI Zhetao¹, TANG Yongmei¹, QIN Zuxing¹, LI Xinlin¹, CAI Ren^{2*}

(1. Reproductive Centre of Liuzhou Municipal and Child Healthcare hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 2. Department of Medical Genetics, Liuzhou Municipal and Child Healthcare hospital, Liuzhou Key Laboratory of Birth Defect Prevention and Control, Liuzhou, Guangxi, China, 545001)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the preimplantation genetic diagnosis (PGD) effect of beta-thalassemia by whole genome amplification combined with pathogenic site detection and short tandem repeat sequence haplotype analysis. **Methods** The blastocyst test results of beta-thalassemia PGD in our hospital from January 2017 to December 2018 were analyzed retrospectively. The results of PGD test and prenatal diagnosis were analyzed. **Results** A total of 501 blastocysts in 71 detection cycles were included in the statistical analysis, of which the detection success rate was 94.4% (473/501). Among them, 69 couples were transplanted with 92 transplantation cycles, the biochemical pregnancy rate was 63.04%, and the clinical pregnancy rate was 53.26%. A total of 45 couples underwent prenatal diagnosis or abortion product analysis, the coincidence rate was 100%. **Conclusion** Preimplantation genetic detection of beta-thalassemia embryos by genome-wide amplification combined with pathogenic site detection and short tandem repeat sequence haplotype analysis has high accuracy and can meet the needs of clinical work.

[KEY WORDS] *HBB* gene; Preimplantation genetic diagnosis; Whole genome amplification; Short tandem repeat sequence haplotype analysis

基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20170527);柳州市科学研究与技术开发计划课题(2014G020404,2017BH20312和2018AF10501)

作者单位:1. 柳州市妇幼保健院生殖健康助孕中心,广西,柳州 545001

2. 柳州市妇幼保健院医学遗传科,柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室,广西,柳州 545001

*通信作者:蔡稔, E-mail: lzcairen@126.com

β -地中海贫血(β -thalassemia, 简称“ β -地贫”),是一组全球最常见、对人类健康影响最大的常染色体单基因隐性遗传病之一。在中国,多发于南部沿海地区,其中以广西、海南、广东常见,分子流行病学调查结果显示广西 β -地贫致病基因携带率为6.43%^[1]。 β -地贫分为点突变型和缺失型,以点突变型最为常见。

目前预防和控制地贫的诊断方法包括传统产前诊断和植入前遗传学诊断(Preimplantation Genetic diagnosis, PGD)。前者是在不同孕周进行绒毛膜取绒或羊膜腔穿刺抽取羊水或脐带血等方法对已孕胚胎进行基因诊断,而PGD是将常规产前诊断提早到胚胎于子宫着床之前进行活检和遗传学分析,选择无遗传性疾病的胚胎植入子宫腔内,从而获得正常胎儿的诊断方法。目前应用于 β -地贫PGD的方法包括:巢式PCR结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)分析技术^[2]、应用引物延伸预扩增方法^[3]、全基因组扩增技术(whole genome amplification, WGA)^[4]、单细胞巢式PCR技术^[5-7,16]、Taq-Man-MGB探针实时荧光PCR技术^[8]、突变扩增系统(amplification refractory mutation system, ARMS)技术^[9]、荧光共振能量转移杂交探针实时PCR技术^[10]、多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)结合巢式PCR技术^[11]、短串联重复(short tandem repeat, STR)序列单体型分析技术^[12-13]、荧光PCR技术^[14-15]。希腊^[2]、印度^[9]、台湾^[10]、新加坡^[12]、伊朗^[13-15]、意大利^[16]、中国^[3-8,11]都有 β -地贫PGD的成功案例。近几年国内学者利用胚胎培养基成功进行 β -地贫IVS-II 654突变的无创植入前胚胎遗传学检测^[17]。本研究分析2017年1月至2018年12月在本院进行 β -地贫PGD的周期资料,探讨WGA结合致病位点检测和STR序列单体型分析进行 β -地贫PGD的效果。

1 材料和方法

1.1 研究对象

分析本中心2017年1月至2018年12月进行 β -地中海贫血PGD的检测资料,纳入研究71个检测周期合计501个胚胎,该项目通过柳州市妇幼保健院生殖医学伦理委员会批准(20170221029),且每对夫妇均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 STR位点的鉴定和选择

利用UniSTS和UCSC数据库选择15个与 β -珠蛋白基因紧密关联的STR标记(HBB4506、D11S988、HBB4677、D11S2362、HBB5089、D11S1243、HBB5138、HBB5178、HBB5205、D11S1760、HBB5576、HBB5655、HBB5820、HBB5859、D11S1338)。为提高诊断的准确性和减少人工 stutter 峰的干扰,所有选择的STR位点均为三核苷酸或四核苷酸重复,用Oligo7.56软件设计STR序列引物,由生工生物(上海)股份有限公司合成。随后,对260例无血缘关系的健康个体进行基因分型,以评估每个STR位点的基因型频率。

1.2.2 囊胚滋养外胚层活检

采取常规排卵方案促排卵,行ICSI授精,授精后16~18小时观察受精情况,取卵后对第5天囊胚评分为3BB以上、第6天囊胚评分为4CB/4BC以上的胚胎采用激光法打孔,活检4~10个滋养层细胞。

1.2.3 全基因组扩增

全基因组扩增试剂盒采用德国QIAGEN公司的REPLI-g Single Cell Kit。将活检出的细胞移入PBS中洗涤3次,装入3.5 μ L PBS缓冲液200 μ L PCR管中,同时取最后一次洗涤的PBS 2 μ L转入阴性对照管中;加入3.5 μ L D2试剂65 $^{\circ}$ C裂解10 min,冰盒保存加入3.5 μ L终止液,瞬时离心;加入9 μ L超纯水,29 μ L REPLI-g反应缓冲液, Polymerase 2 μ L,上PCR仪30 $^{\circ}$ C 8 h,95 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C保存,取1.0 μ L产物稀释100倍使用。

1.2.4 STR位点检测

分为单管15重,引物100 pmol/ μ L等体积混合备用,10 \times PCR Buffer 5.0 μ L,2.5 mmol/ μ L dNTPs 2.5 μ L,DMSO 5.0 μ L,Hot star Taq(TAKARA,大连)0.5 μ L,混合引物4.0 μ L,模板2.0 μ L, ddH₂O 33 μ L。95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,54 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C后延伸30 min,12 $^{\circ}$ C保存。

1.2.5 毛细管电泳

利用美国ABI3500Dx遗传分析仪进行毛细管电泳,体系:Genescan 500LIZ Size standard (0.5+9.0) μ L HI-DI 甲酰胺+1.0 μ L PCR产物;95 $^{\circ}$ C变性5 min,迅速冰浴冷却5 min。

1.2.6 致病位点检测

常见位点使用 β -地中海贫血基因检测试剂

盒(深圳益生堂)进行反向点杂交(reverse dot blot, RDB)检测,按说明书操作,罕见位点利用 Sanger 测序检测,外送上海立菲生物技术有限公司。

1.2.7 胚胎移植均为单囊胚移植,专人负责随访。

2 结果

2.1 15个STR位点的杂合度情况

根据各STR位点观察到的等位基因数及等位基因频率,发现D11S1243杂合度最高,为0.90;最低为HBB5178,为0.62,15个STR位点杂合度高,适合应用于β-地中海贫血胚胎植入前遗传学检测的单体型构建。见表1。

表1 15个STR位点的杂合度

Table 1 Heterozygosity of 15 STR loci

STR 位点	杂合例数(n)	杂合度
D11S988	210	0.81
HBB5178	161	0.62
D11S1760	229	0.88
HBB5089	203	0.78
HBB5655	197	0.76
D11S1338	180	0.69
HBB4677	231	0.89
D11S1243	235	0.9
HBB5820	199	0.77
HBB4506	206	0.79
HBB5576	214	0.82
HBB5859	175	0.67
HBB5205	210	0.81
HBB5138	208	0.8
D11S2362	180	0.69

2.2 β-地贫 PGD 的结果

71个周期501枚囊胚基因检测结果及部分家系STR单倍型分析结果。中69对夫妻进行了移植,移植周期92个,生化妊娠率63.04%,临床妊娠率53.26%,合计45对夫妇进行了产前诊断或流产物分析,与胚胎检测结果一致性为100%。见表2,图1。

I-1(父亲)β⁻²⁸突变携带者,I-2(母亲)为β⁴¹⁻⁴²突变携带者,有6个囊胚,其中II-1(胚胎1)为未携带突变的正常胚胎,II-2(胚胎2)和II-5(胚胎5)的STR结果分别提示可能为单体和三体,II-3(胚胎3)为β⁴¹⁻⁴²突变携带者,II-4(胚胎4)和II-6(胚胎6)为β⁻²⁸/β⁴¹⁻⁴²复合杂合突变地贫胚胎。

表2 71个周期501枚囊胚基因检测结果

Table 2 The results of 501 blastocyst gene test in

71 cycles

分类	检测胚胎数(个)	百分比(%)
检测失败	28	5.59
正常	101	21.35
杂合	232	49.05
重型	113	23.89
单体	5	1.06
三体	9	1.90
重组	12	2.54
疑似UPD	1	0.21
合计	501	100

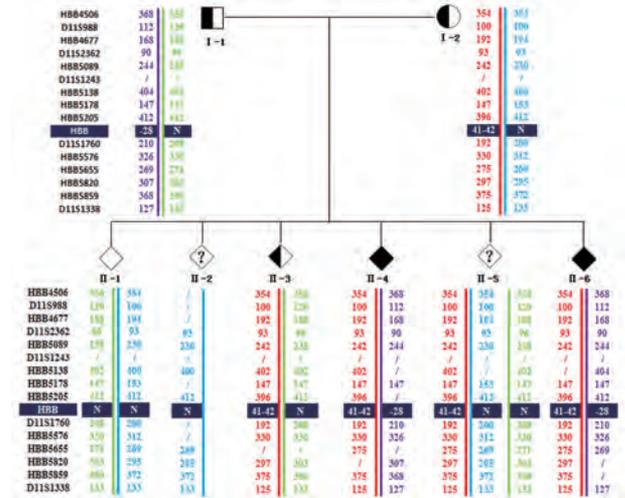


图1 部分家系STR单倍型分析结果

Figure 1 STR haplotypes analysis in some families

3 讨论

随着分子生物学技术飞速发展,越来越多的检测技术应用到胚胎植入前遗传学诊断。但是不可避免出现单细胞PCR产物少、扩增失败、等位基因脱扣(allele drop out, ADO)等问题,故欧洲人类生殖与胚胎学学会(European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE)推荐DNA扩增引物设计中除了致病基因之外,还应包括相邻的相关及不相关位点,通过高度多态性标志物的分析,可以判断外源性DNA污染及ADO,从而提高单基因病PGD准确率^[18]。WGA结合PCR及其衍生的PCR技术、STR位点单体型构建成本低廉,可给需要进行PGD治疗的患者降低经济负担,而且误诊率低、检测成功率高,能满足日常的临床检测需求,故应用广泛。

目前WGA技术主要有四种:简并寡核苷酸引物PCR扩增(Degenerate oligonucleotide primer-PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增(MDA)、置换预扩增和PCR扩增的组合(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)和转座子插入线性扩增(Linear Amplification with Transposon Insertion, LIANTI)^[19-20]。WGA技术通过非选择性地扩增活检的滋养外胚层细胞的整个基因组DNA,在真实反映基因组全貌的基础上最大限度地增加其DNA量,为后续分析提供足量的DNA模板^[19],在单体型构建方面,我们应用的是短串联重复序列,目前应用于 β -地贫胚胎植入前遗传学检测的STR位点较少^[13,15],而且由于杂合度问题,选择的STR位点不是每个点都能应用到单体型构建来分析胚胎检测结果。这就使得实际上每对进行PGD的夫妇所用得到的STR位点更加少,造成胚胎检测结果不明确风险增加,更多的时候需要增加STR位点来进行检测^[12],本研究选择的15个STR位点杂合度均超过0.5,能满足单体型构建。

β -地贫是常见的常染色体隐性遗传病,符合经典的孟德尔遗传规律,正常:携带:重型比例约为1:2:1。在本研究结果中,正常比例21.35%(101/473),携带者比例49.05%(232/473),重型 β -地贫比例23.89%(113/473),约为1:2:1,符合孟德尔遗传规律,可间接的证明该检测技术的安全性。

在进行胚胎移植过程中,笔者优先选择移植正常胚胎,携带者胚胎次之,如无胚胎可移植的情况下选择致病位点检测为正常或携带者而STR提示重组的胚胎;重型 β -地贫和STR提示11号染色体发生拷贝数变异的胚胎不考虑移植,均进行单囊胚移植。

通过检测结果较符合孟德尔遗传规律,而且产前诊断符合率高,虽然越来越多的技术应用到 β -地贫植入前遗传学诊断,但是利用全基因组扩增结合STR单体型分析和致病位点进行 β -地贫胚胎植入前遗传诊断仍不失为一种不错的选择。

参考文献

[1] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China [J]. Clin Genet, 2010, 78(2):139-148.

[2] Kanavakis E, Vrettou C, Palmer G, et al. Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting beta-thalassaemia major: clinical experience including the initia-

tion of six singleton pregnancies [J]. Prenat Diagn, 1999, 19(13):1217-1222.

[3] 焦泽旭,庄广伦,周灿权,等.应用引物延伸预扩增方法对地中海贫血进行植入前遗传学诊断的初步研究[J].中华血液学杂志,2003,24(10):546-548.

[4] 焦泽旭,庄广伦,周灿权,等.应用全基因组扩增技术对 β -地中海贫血进行胚胎植入前遗传学诊断[J].中华医学遗传学杂志,2003,20(5):447-448.

[5] 邓捷,庄广伦,彭文林,等.紧密连锁的多态性位点在 β 地中海贫血植入前遗传学诊断中的应用[J].中华医学遗传学杂志,2005,22(4):391-395.

[6] 邓捷,庄广伦,彭文林,等.多重巢式聚合酶链反应在 β 地中海贫血植入前遗传学诊断中的应用[J].中华医学杂志,2005,85(12):811-815.

[7] 蔡靖,吴彤华,宋成,等.单细胞巢式聚合酶链反应诊断 β 地中海贫血[J].临床检验杂志,2009,27(6):414-416.

[8] 尹爱华,张祥忠,何蕴韶,等. TaqMan-MGB 探针实时荧光PCR在 β 地中海贫血植入前诊断中的应用研究[J].热带医学杂志,2007,7(12):1155-1158,1181.

[9] Gada Saxena S, Saranath D. Single-cell polymerase chain reaction-based pre-implantation genetic diagnosis using fragment analysis for β -thalassemia in an Indian couple with β -globin gene mutations [J]. J Hum Reprod Sci, 2012, 5(3):289-292.

[10] Hung CC, Chen SU, Lin SY, et al. Preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassemia using real-time polymerase chain reaction with fluorescence resonance energy transfer hybridization probes [J]. Anal Biochem, 2010, 400(1):69-77.

[11] 王静,徐艳文,曾艳红,等.在 β 地中海贫血着床前遗传学诊断中应用多重置换扩增进行预处理的临床分析[J].生殖医学杂志,2014,23(8):653-657.

[12] Chen M, Tan AS, Cheah FS, et al. Identification of novel microsatellite markers <1 Mb from the HBB gene and development of a single-tube pentadecaplex PCR panel of highly polymorphic markers for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassemia [J]. Electrophoresis, 2015, 36(23):2914-2924.

[13] Sharifi Z, Rahiminejad F, Joudaki A, et al. Development and validation of a novel panel of 16 STR markers for simultaneous diagnosis of β -thalassemia, aneuploidy screening, maternal cell contamination detection and fetal sample authenticity in PND and PGD/PGS cases [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):7452.

[14] Khosravi S, Salehi M, Ramezanzadeh M, et al. Novel Multiplex Fluorescent PCR-Based Method for HLA Typing and Preimplantation Genetic Diagnosis of β -Thalassemia [J]. Arch Med Res, 2016, 47(4):293-298.

[15] Salehi R, Khosravi S, Salehi M, et al. Simple and Easy to Perform Preimplantation Genetic Diagnosis for β -thalassemia Major Using Combination of Conventional and Fluorescent Polymerase Chain Reaction [J]. Adv Biomed Res, 2017, 6:23.

(下转第155页)

甲基化荧光定量PCR快速检测自闭症男童中脆性X综合征的临床应用

陈剑虹¹ 黄淑君² 马健² 周伟平² 张亮^{2*}

[摘要] **目的** 建立一种经济、快速的检测男性脆性X综合征检测方法。**方法** 应用甲基化实时荧光定量PCR法(qMSP)检测已知脆性X综合征男性患者和正常男性的脆性X智力低下基因1(*FMRI*)启动子区甲基化状态,测试该方法的灵敏度和特异性。应用该方法对特殊学校54例自闭症男童进行病因学检查,并对阳性样本用侧翼PCR(F-PCR)进行复核。**结果** 在特殊学校的54例自闭症男童样本中发现1例*FMRI*甲基化阳性,F-PCR方法复核为CGG重复数为全突变,其母亲为前突变携带者。结合临床症状,该自闭症男童可以确诊为脆性X综合征,检出率为1.85%(1/54)。**结论** 本文所建立的qMSP方法可以对*FMRI*基因的CpG甲基化状态进行快速分析,可作为男性疑似脆性X综合征检测的可靠方法。

[关键词] 脆性X综合征; *FMRI* 基因; 甲基化荧光定量PCR

Clinical Application of Quantitative Methylation - sensitive PCR in Fast Screening of Fragile X Syndrome from Males with Autism

CHEN Jianhong¹, HUANG Shujun², MA Jian², ZHOU Weiping², ZHANG Liang^{2*}

(1. Prenatal Diagnosis Center, Huizhou Maternal and Child Health Care Family Planning Service Center, Huizhou, China, 516000; 2. Center of Translational Medicine, Guangdong Women and Children hospital, Guangzhou, China, 511400)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a low-cost, rapid assay to detect the methylation status of fragile X mental retardation gene 1(*FMRI*). **Methods** First, a quantitative methylation-sensitive PCR (qMSP) method was used to determine *FMRI* gene methylation status of males with full-mutation fragile X syndrome and normal males to test its sensitivity and specificity. Second, 54 boys with autism attending special education school were analyzed for etiology, followed by flanking polymerase chain reaction (F-PCR) to identifying CGG repeats for the methylation positive individual and his mother. **Results** Among the 54 boys with autism, one was detected to be *FMRI*-methylated. **Conclusion** The qMSP method established in this study can quickly analyze the CpG methylation status of the *FMRI* gene and can be used as a reliable method for the detection of suspected fragile X syndrome in males with mental retard or autism.

[KEY WORDS] Fragile X syndrome; *FMRI* gene; Quantitative methylation-sensitive PCR

脆性X综合征是造成智力低下和自闭症谱系障碍的主要单基因病因^[1-2],这种X连锁综合征主要是由于脆性X智力低下基因1(*fragile X mental retardation 1, FMRI*)基因5'非编码区的(CGG)_n异

常扩增导致的。

常用的分子遗传学检测方法有基于DNA水平的Southern blot法^[3]和PCR法。Southern blot作为诊断脆性X的金标准,但是该方法费时费力,需

作者单位:1. 惠州市妇幼保健计划生育服务中心产前诊断中心,广东,惠州 516000

2. 广东省妇幼保健院转化医学中心,广东,广州 511400

*通信作者:张亮, E-mail: zhangliang1999@tsinghua.org.cn

要DNA量大,不适合临床常规使用。基于DNA的PCR方法简单快速,包括检测*FMRI*基因5'非编码区CGG重复数和启动子区甲基化状态两种,临床应用最多的是检测CGG重复数的侧翼PCR(flanking PCR, F-PCR)^[4-5]。F-PCR法针对*FMRI*基因所在位置的CGG富集区进行PCR扩增,采用毛细管电泳的方法进行判读。F-PCR法由于大片段重复不易扩增,只能检测一定的CGG重复数,超出范围的病例易造成漏检。已有研究发现当CGG重复数达到全突变水平,会同时伴随*FMRI*启动子区CpG岛的异常甲基化^[6]。而有文献报道CGG重复达到全突变的男性当CpG岛不发生甲基化,并无明显临床症状的案例^[7-8]。说明甲基化是引起*FMRI*基因功能失活、造成脆性X智力低下蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)缺失引发脆性X综合征更重要的原因。已有一些研究针对检测*FMRI*启动子区CpG岛的甲基化情况^[9],但由于操作繁琐临床上尚未得到广泛应用。本研究建立了一种新的TaqMan探针甲基化实时荧光定量PCR法(quantitative methylation-specific PCR, qMSP),并在自闭症男童中检测外周血*FMRI*基因启动子区域甲基化状态,建立一种快速准确检测脆性X综合征的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取2017年1月至2018年4月在广东省妇幼保健院经过F-PCR确诊为脆性X综合征男童3例,年龄范围:3~6岁,中位数在4岁2个月,正常男童20例、女童3例,年龄范围:3~9岁,中位数在5岁3个月,外周血DNA保存于-20℃冰箱。测试组:2018年4月收集惠州市护苗培智学校中自闭症男童54名,年龄范围:3~8岁,中位数在4岁5个月外周血2mL,保存于EDTA抗凝管中。已知组和测试组2组人群年龄差异无统计学意义($P=0.56$),年龄不会对结果产生影响,因此进行下一步实验。

所有受试者均签署知情同意。入组的自闭症患儿均满足美国精神疾病协会2010年2月发布的《精神疾病诊断与统计手册》第五版对儿童自闭症谱系障碍诊断标准^[10]。本研究已经惠州市妇幼保健计划生育服务中心伦理委员会审核通过。

1.2 方 法

1.2.1 试剂/仪器

引物探针均合成于上海百力格生物技术有限公司,DNA亚硫酸盐处理试剂盒(磁珠法)购自上海敬善生物科技有限公司。亚硫酸盐转化后的DNA所使用的PCR扩增体系2×GoldStar TaqMan Mixture购自北京康为世纪生物科技有限公司。荧光定量PCR仪器为ABI 7500 Fast Real-Time PCR System。*FMRI*基因甲基化阳性样本和其母亲血样由苏州珀金埃尔默医学检验所用F-PCR其检测CGG重复数。

1.2.2 血液DNA提取

采用广州赛哲生物科技有限公司的磁珠试剂盒提取54例自闭症男童全血DNA,用紫外分光光度计测量DNA纯度和浓度,DNA样本置-20℃保存。

1.2.3 甲基化实时荧光定量PCR(quantitative methylation-specific PCR, qMSP)

在经过亚硫酸盐处理后,发生了甲基化的CpG岛保持CG序列,而没有发生甲基化的CpG岛则转化为UG序列。本研究设计的*FMRI*基因的引物、探针是针对亚硫酸盐处理后仍然保持CG序列的原理进行设计。上游引物*FMRI*-F:5'-TGATTTTTTACGTTATTGAGT-3',下游引物*FMRI*-R:5'-GAATCGAAAAACAAACGC-3',探针*FMRI*-P:5'-CACTACCTCGCGAAAACCAA-3'(5'-FAM,3'-MGB修饰)。内参*ACTB*基因引物探针设计:*ACTB*-F:5'-TGGTGATGGAGGAGGTT-TAGTAAGT-3'*ACTB*-R:5'-AACCAATA-AAACCTACTCCTCCCTTAA-3',*ACTB*-P:5'-ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA-3'(5'-HEX,3'-BHQ1修饰)。扩增条件93℃10min;然后56℃1min、65℃30s(收集荧光)、94℃30s,50个循环;40℃10s。

1.2.4 统计学方法

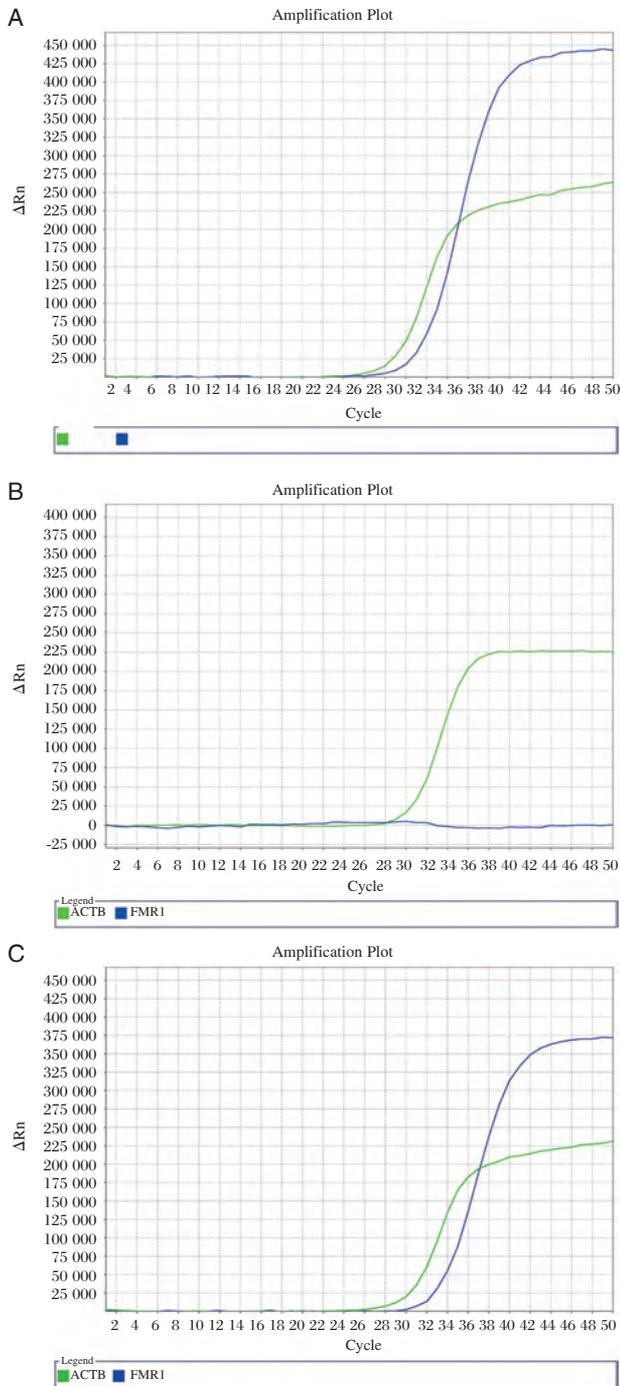
本研究采用*t*检验对纳入的两组数据进行对比检验,差异大小采用*P*值判断。 $P>0.05$ 表示两组数据之间差异无统计学意义, $P<0.05$ 表示两组数据之间差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 已知基因型样本的qMSP检测结果

在正常男性的DNA样本中,内参基因*ACTB*阳性(Ct值26.73~28.93),*FMRI*基因甲基化阴

性。脆性 X 综合征男性患者内参基因 *ACTB* 阳性 (Ct 值 26.95~27.98), *FMR1* 基因阳性 (Ct 值 27.11~29.57), 平均 $\Delta Ct=1.18$ 。正常女性内参基因 *ACTB* 阳性 (Ct 值 27.23~29.85), *FMR1* 基因阳性 (Ct 值 29.68~32.64), 平均 $\Delta Ct=2.64$ (见图 1)。



注: A. 脆性 X 综合征全突变男性患者 qMSP 结果; B. 正常男性 qMSP 结果; C. 正常女性 qMSP 结果。

图 1 已知脆性 X 患者 *FMR1* 甲基化类型的 qMSP 结果

Figure 1 qMSP results of samples with known methylation status

2.2 特殊学校男童 qMSP 检测结果

鉴于本研究建立起来的体系在测试已知样本时稳定可靠,对惠州市护苗培智学校 54 名 3~8 岁自闭症男童行本研究 qMSP 检测,有 1 例检测到 *FMR1* 阳性信号 (Ct 值 30.69) (见图 2), 检出率为 1.85%。

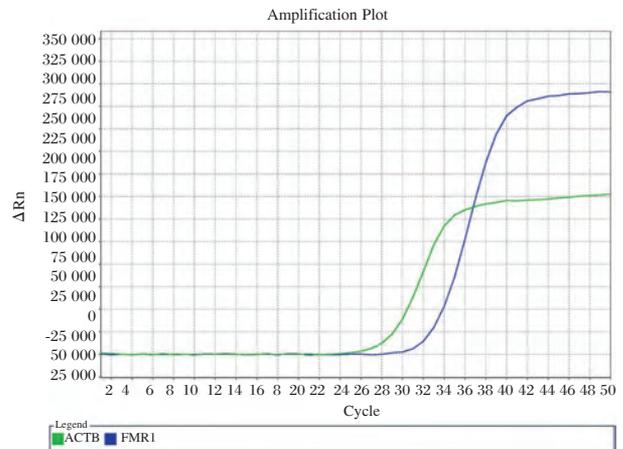


图 2 检出一例甲基化阳性男性患儿的 qMSP 结果

Figure 2 qMSP result from a boy detected positive *FMR1* methylation

2.3 qMSP 阳性结果 F-PCR 复核结果

为了确认 qMSP 检出 *FMR1* 基因甲基化阳性的男童的 CGG 具体重复次数, 以及其母亲是否为 CGG 的前突变, 经过苏州珀金埃尔默医学检验所 F-PCR 检测, 确认该男童的 CGG 重复数为 383, 为全突变。可确诊其自闭症的真实原因为脆性 X 综合征。其母亲无临床症状, F-PCR 检测 CGG 拷贝数为 30 和 81, 为前突变携带者。F-PCR 结果参见图 3 和图 4。

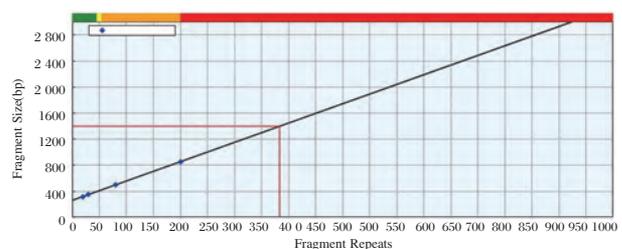


图 3 qMSP 阳性男童的 F-PCR 方法判读的 CGG 重复次数为 383 次

Figure 3 F-PCR result of the boy detected positive qMSP result with 383 CGG copies

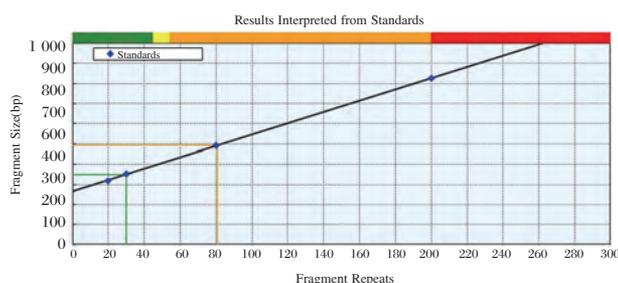


图4 qMSP阳性男童母亲的F-PCR方法判读的CGG重复次数图为30和81

Figure 4 F-PCR result of the positive boy's mother with 30 CGG copies and 81 copies

3 讨论

脆性X综合征是由于*FMRI*基因5'非编码区CGG重复数过度扩增,当大于200拷贝时,引起*FMRI*基因启动子区域高度甲基化导致基因沉默,其编码的蛋白FMRP表达减少,造成智力低下或性格孤僻等一系列临床症状^[11]。以此为基础,出现了多种检测方法,临床最常用的是检测CGG重复数的F-PCR法诊断脆性X综合征,但该方法有扩增CGG重复次数上限^[12]。我院也根据文献建立了F-PCR方法,发现CGG重复片段较多时,就难以扩增成功。故本研究把qMSP检测为阳性的男童及其母亲血液DNA样本外送苏州珀金埃尔默医学检验所进行复核确认。另外,由于有发现CGG重复次数为全突变却不发生甲基化,并且没有临床症状的案例的报道^[7-8],使得人们更加清晰地认识到甲基化导致的基因沉默才是导致脆性X综合征的根本原因,致使越来越多的关注投放到甲基化的检测上。

国内已报道的通过PCR检测*FMRI*基因甲基化状态的方法有:甲基化敏感性限制性内切酶定量PCR(methylation-sensitive restriction enzymes-based quantitative PCR, MSRE-qPCR)^[13]、甲基化特异性多重连接探针扩增(methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA)^[14]。限制性内切酶只能识别一种酶切位点,对于其它形式的甲基化CG不能切割,易造成偏差,且存在消化不良的问题,操作繁琐,不适合临床应用。而MS-MLPA需要设计多对探针后续还要进行毛细管电泳,操作烦琐价格昂贵,不适合大规模检测。2009年美国艾莫利大学采用与本研究相似的qMSP法筛查3万多名新生男婴的

*FMRI*甲基化情况^[15],操作简单、快速、准确,且费用低。国内迄今还未见qMSP应用于临床检测脆性X综合征的报道。qMSP的核心也是难点在于,亚硫酸盐处理后的DNA的GC含量严重下降,在这样的DNA模板上需要设计合适的引物探针来检测CpG序列的存在并保持qPCR反应的高效性和特异性。本研究克服了这一难题,建立一种qMSP方法,可以为临床检测脆性X综合征临床提供一种新的选择。

本方法首先在已知样本中确认*FMRI*启动子区CpG岛甲基化状态,结果显示正常男性*FMRI*是非甲基化的,正常女性和脆性X综合征男性患者*FMRI*是甲基化的,与实际一致,说明本方法稳定可靠。2015年,国内首都儿科研究所采用毛细管电泳检测CGG重复数的方式筛查540例智力低下男童检出5例脆性X阳性,检出率0.93%^[17],可能与仅采用F-PCR毛细管电泳检测CGG重复数诊断脆性X综合征造成的漏检有关。本研究的检出率高于2015年首都儿研所的研究,可能甲基化检测更为准确,但低于参考发病率,可能与本文入组的样本只为自闭症有关。

基于一般的三甲医院都已经有了荧光定量PCR仪,因此qMSP是一项快速筛查自闭症或者智力低下男童是否为脆性X综合征的较理想方案。但由于正常女性的一条染色体存在自然失活的状态,其上的*FMRI*基因也发生了甲基化,因此qMSP其不能用于在女性中检测*FMRI*的前突变和全突变。

参考文献

- [1] Zafarullah M, Tassone F. Molecular Biomarkers in Fragile X Syndrome[J]. Brain Sci, 2019, 9(5):1-23.
- [2] Telias M. Molecular mechanisms of synaptic dysregulation in fragile X syndrome and autism spectrum disorders[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12(51):1-12.
- [3] Cai X, Arif M, Wan H, et al. Clinical genetic testing for fragile X syndrome by polymerase chain reaction amplification and southern blot analyses[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1942(2):11-27.
- [4] Saldarriaga-Gil W, Hagerman R, Salcedo MJ, et al. Fragile X syndrome in a colombian family[J]. Iatreia, 2018, 31(1):76-85.
- [5] Rajan-Babu IS, Chong CS. Triplet-repeat primed PCR and capillary electrophoresis for characterizing the fragile X mental retardation 1 CGG repeat hyperexpansions[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1972(14):199-210. (下转第211页)

海南地区571例男性感染HPV的基因型分布特点研究

吕家庆¹ 胡俊杰² 符生苗² 陈鑫苹^{2*}

[摘要] 目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)在男性感染者中的基因型分布特点。方法 利用PCR-反向点杂交法对571例男性HPV感染者进行基因分型检测。结果 HPV低危型感染中,6、11和42型是主要感染亚型,高危型感染中,52、16和51是主要感染亚型;不同年龄段感染者中,21~40岁年龄的男性HPV感染率最高;不同类型感染中,单一感染率为56.39%,多重感染(二重及以上)感染率为43.61%,单一感染率高;多重感染中,共检测到7种不同的感染类型,其中二重感染和三重感染的感染率最高,且以高低危混合感染为主。结论 男性感染者的HPV基因型在不同年龄段和不同感染类型分布上有明显差异,21~40岁感染率最高且感染类型较为复杂。

[关键词] HPV; 男性感染; 基因分型

Study on the genotype distribution of 571 males infected with HPV in Hainan

LV Jiaqing¹, HU Junjie², FU Shengmiao², CHEN Xinping^{2*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nada Town Hospital, Danzhou city, Danzhou, Hainan, China, 571700; 2. Central Laboratory, Hainan General hospital, Hainan Hospital Affiliated to The Hainan Medical College, Haikou, Hainan Province 570311, China)

[ABSTRACT] Objective To investigate the genotype distribution of HPV infection in male persons. Methods Genotyping of 571 males infected with HPV infected by PCR - reverse dot blot hybridization. Results Among the low-risk HPV infections, genotype 6, 11 and 42 were the major subtypes of infection. Among the high - risk infections, genotype 52, 16 and 51 were the major subtypes of infection. Among different age groups infected, HPV in males aged 21-40 have the highest rate of HPV infection. Among different types of infection, the single infection rate was 56.39%, multiple (double and above) infection rate was 43.61%, and the single infection rate was high. In multiple infections, 7 different types of infections were detected, double and triple infection rates are the highest. High and low risk of mixed infection accounted for the majority. Conclusion The HPV genotypes of male infected persons are significantly different in different age groups and different infection types. The infection rate is the highest among 21-40 years old and the infection types are more complicated.

[KEY WORDS] HPV; Male infection; Genotyping

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)主要通过性接触传播,一般夫妻或性伴侣双方共同发病。女性感染部位主要分布在宫颈、外阴、阴道和肛门,可导致良性乳头状瘤或无乳头状瘤等

临床症状,男性除在肛周区域和外生殖器(包括包皮、阴囊、龟头和阴茎)外,尿道、输精管、附睾和睾丸等部位也会发生感染。与女性感染不同,男性感染高危型HPV通常无明显症状,并且男性感染

作者单位:1.儋州市那大镇卫生院检验科,海南,儋州 571700

2.海南省人民医院医学检验中心,海南省细胞与分子遗传转化医学重点实验室,海南,海口 570311

吕家庆和胡俊杰为并列第一作者

*通信作者:陈鑫苹, E-mail: chenxinping52@126.com

后不仅有癌变风险还可能会导致男性不育症的发生^[1]。临床研究表明女性因 HPV 感染导致患宫颈癌(cervical cancer)的风险明显受到男性性行为的显著影响,在实际调查中男性感染 HPV 的现象越来越普遍,导致女性高风险 HPV 相关癌症和癌前病变的发病率增加,因此研究男性 HPV 感染类型对女性宫颈癌的预防和康复治疗都至关重要^[2]。本研究对 571 例男性感染者的 HPV 基因型进行统计分析,以明确 HPV 基因型在男性感染者中的分布特征,减少男性感染者的传播途径,并降低 HPV 相关癌变风险。

1 材料和方法

1.1 研究对象

对 2014 年 8 月至 2018 年 2 月间于海南省人民医院中心实验室进行 HPV 基因分型检测并确诊的 571 例男性患者,年龄范围为 16~76 岁,平均年龄(35±9)岁结果进行统计分析,所有待检样本取自男性患者外生殖器的包皮、冠状沟、尿道口及肛周的组织脱落细胞或分泌物,使用一次性生殖道拭子(深圳亚能生物技术有限公司)采集后立即送检,低温保存运送,采集管内样本 4℃ 保存不超过 7 天,-20℃ 保存不超过 3 个月,避免反复冻融。

1.2 主要试剂和仪器

亚能生物技术(深圳)有限公司生产的人乳头瘤病毒基因分型(23 型)检测试剂盒(主要组成成份:反应液 I 和反应液 II、阴阳质控品、膜条、裂解液、链霉亲和素辣根过氧化物酶、3,3',5,5'-四甲基联苯胺)以及 YN-H16 型恒温杂交仪, T100 Thermal Cycler 型基因扩增仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 分离提取

取出保存有组织脱落细胞或分泌物的细胞保存液转移至 1.5 mL 离心管中,13 000 rpm 离心 10 min,弃上清液后,利用细胞裂解液(分离法)提取 DNA。

1.3.2 PCR 扩增

分别向装有反应液 I 和反应液 II 的 PCR 反应管(规格为 20 μL/管)中分别加入 5 μL 抽提好的 DNA,扩增总反应体系均为 25 μL/反应。设置反应条件:50℃ 15 min;95℃ 10 min,94℃ 30 s,42℃ 90 s,72℃ 30 s 共 40 个循环;72℃ 5 min。

1.3.3 HPV 基因分型

用人乳头状瘤病毒基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)检测 23 种 HPV 亚型:6、11、42、43 和 81(5 种低危亚型);16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82 和 83(18 种高危亚型)。主要原理是采用 PCR 体外扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 HPV 基因分型检测技术,利用 HPV 的基因特点设计特异性引物,扩增出 23 种 HPV 基因型的目的片段后,再将扩增产物与固定在膜条上的分型探针进行杂交,根据杂交信号的有无来判读结果。变性产物通过冰盒转移至离心管中并加入杂交液,先沸水浴 10 min,再放入杂交箱 51℃ 杂交 1.5 h,洗膜和显色后,按照试剂的判读标准判读结果,每组实验阴、阳性质控品均进行同步处理以作对照。

1.3.4 统计学分析

运用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,单一感染组和多重感染组中各基因亚型频率用%表示、不同年龄段感染 HPV 的危险类型以及不同危险类型的感染类型的组间使用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 各亚型频率分布

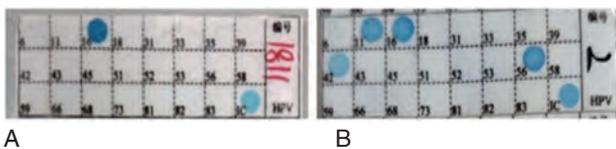
低危型感染较高的基因型有:6 型 202(35.38%)、11 型 109(19.09%)、42 型 58(10.16%);高危型感染率较高的基因型有:52 型 76(13.31%)、51 型 65(11.38%)、16 型 63(11.03%),见表 1。单一感染和多重感染(见图 1)中 HPV 各亚型对比分析显示,多重感染均高于单一感染差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.2 不同年龄段感染 HPV 的危险类型

571 例男性 HPV 感染者中,单纯低危型感染率为 38.18%,单纯高危型感染率为 34.15%,高低危混合型感染率为 27.67%,2 组间感染率差异无统计学意义($P > 0.05$),但 2 组的感染率均高于高低危混合型组($P < 0.05$)。不同年龄组之间 HPV 感染率总体比较,21~30 岁组和 31~40 岁组的 HPV 感染率最高($P < 0.05$),分别为 33.98%和 34.15%。不同感染类型的各年龄段之间 HPV 感染率比较,单纯低危型中 21~30 岁组和 31~40 岁组感染率最高($P < 0.05$),均为 13.84%,2 组间比较无明显差异($P > 0.05$);单纯高危型中 31~40 岁组的感染率为

表1 HPV各亚型分布情况 [n(%)]

型别	单纯感染	多重感染	总计
低危型			
6	96(16.81)	106(18.56)	202(35.38)
11	46(8.05)	63(11.03)	109(19.09)
42	17(2.98)	41(7.18)	58(10.16)
43	11(1.93)	40(7.01)	51(8.93)
81	8(1.40)	38(6.65)	46(8.06)
高危型			
16	20(3.50)	43(7.53)	63(11.03)
18	5(0.88)	19(3.33)	24(4.20)
31	1(0.18)	5(0.88)	6(1.05)
33	6(1.05)	11(1.93)	17(2.98)
35	3(0.53)	7(1.23)	10(1.75)
39	4(0.70)	16(2.80)	20(3.50)
45	0(0.00)	8(1.40)	8(1.40)
51	20(3.50)	45(7.88)	65(11.38)
52	27(4.73)	49(8.58)	76(13.31)
53	15(2.63)	32(5.60)	47(8.23)
56	5(0.88)	25(4.38)	30(5.25)
58	7(1.23)	37(6.48)	44(7.71)
59	9(1.58)	25(4.38)	34(5.95)
66	12(2.10)	22(3.85)	34(5.95)
68	9(1.58)	21(3.68)	30(5.25)
73	1(0.18)	4(0.70)	5(0.88)
82	0(0.00)	4(0.70)	4(0.70)
83	0(0.00)	9(1.58)	9(1.58)



注:A:单一感染;B:多重感染。

图1 不同感染类型的基因检测结果

Figure 1 Genetic test results for different infection types

12.61%,高于其它年龄组($P<0.05$);高低危混合型中21~30岁组的感染率为10.16%,高于其它年龄组($P<0.05$),见表2。

2.3 不同HPV感染类型分布

不同感染类型中单一感染有322人,占56.39%,多重感染有249人,占43.61%,单一感染的感染率高于多重感染($P<0.05$)。随着感染重数的增加,单纯低危型、单纯高危型和高低危混合型的感染率均呈下降趋势(见图3),其中单一感染中,单纯低危型占31.17%,单纯高危型占25.22%,单纯低

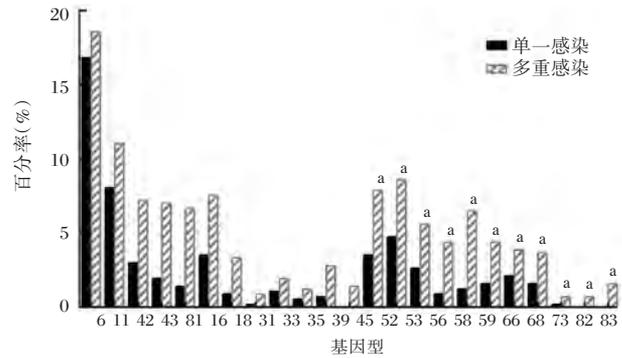


图2 单一感染和多重感染中HPV各亚型频率分布

Figure 2 Distribution of HPV subtypes in single infection and multiple infections

表2 不同年龄段感染HPV的危险类型 [n(%)]

年龄段	单纯低危型	单纯高危型	高低危混合型	总计
≤20	13(2.28) ^c	5(0.88) ^d	11(1.93) ^c	29(5.08) ^b
21-30	79(13.84)	57(9.98) ^d	58(10.16)	194(33.98)
31-40	79(13.84)	72(12.61)	44(7.71) ^c	195(34.15)
41-50	33(5.78) ^c	39(6.83) ^d	26(4.55) ^c	98(17.16) ^b
51-60	6(1.05) ^c	16(2.80) ^d	14(2.45) ^c	36(6.30) ^b
≥61	8(1.40) ^c	6(1.05) ^d	5(0.88) ^c	19(3.33) ^b
总计	218(38.18) ^a	195(34.15) ^a	158(27.67)	571(100)

注:^a与高低危混合型比较 $P<0.05$;^b与21~30岁组比较 $P<0.05$;^c与21~30岁组比较 $P<0.05$;^d与31~40岁年龄组比较 $P<0.05$;^e与21~30岁组比较 $P<0.05$ 。

危型感染率高于单纯高危型($P<0.05$);多重感染中,二重感染和三重感染的感染率最高,分别为25.22%和9.98%,且高低危混合型组感染率高于单纯低危型组或单纯高危型组($P<0.05$),见表3。

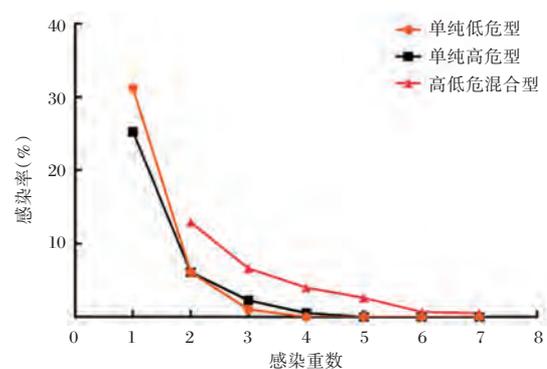


图3 不同感染类型的感染率分布情况

Figure 3 Distribution of infection rates for different infection types

表3 不同 HPV 感染类型分布 $n(\%)$ Table 3 Distribution of different HPV infection types $n(\%)$

感染类型	单纯低危型	单纯高危型	高低危混合型	总计
一重	178(31.17)	144(25.22)	—	322(56.39)
二重	35(6.13) ^b	35(6.13) ^b	74(12.96)	144(25.22) ^a
三重	6(1.05) ^b	13(2.28) ^b	38(6.65)	57(9.98) ^a
四重	0(0.00)	3(0.53) ^b	23(4.03)	26(4.55)
五重	0(0.00)	0(0.00)	15(2.63)	15(2.63)
六重	0(0.00)	0(0.00)	4(0.70)	4(0.70)
七重	0(0.00)	0(0.00)	3(0.53)	3(0.53)
总计	219(38.35)	195(34.15)	157(27.50)	571(100)

注:^a与四重感染比较 $P<0.05$; ^b与高低危混合型组比较 $P<0.05$ 。

3 讨论

HPV 是一类嗜上皮性的双链 DNA 病毒,已经确定的 HPV 基因型达 200 多种,根据其致癌性将粘膜型 HPV 分为高风险型(high risk, HR)和低风险(low risk, LR)型,而 HR-HPV 的持续感染是导致正常上皮转变为癌前病变和癌变的主要原因^[3]。据统计,宫颈癌和其他肛门生殖器癌症的发生率约占全球癌症总发生率的 5%,并且已经证实这类疾病与 HR-HPV 感染密切相关^[4]。此外研究资料还显示全世界约 70%的宫颈癌患者是由 HPV16 和 HPV18 感染引发,约 60%的口咽癌发生是与 HPV16 和宿主细胞染色体整合造成持续性感染有关^[5]。

近年来,随着高特异性 HPV 基因分型检测技术的推广,HPV 感染检出率逐渐上升,但由于地区、人口组成、采样周期和测试方法的差异,导致研究结果可能存在偏差。LR-HPV 感染分布中,本研究结果显示 HPV6 和 HPV11 感染频率分别为 35.38%和 19.09%,为男性群体中主要的 LR-HPV 感染类型,与黄泽棋等人^[6]在广东地区的研究显示 HPV6 和 HPV11 为主要感染基因型的研究结论相似。而与 LR-HPV 感染相关的许多良性皮肤疣、粘膜病变和低度宫颈上皮内病变都会产生相当大的健康负担^[7]。HR-HPV 感染分布中,田欣欣等人报道 HPV16、52、58 和 18 是国内多个地区男性群体中主要的 HR-HPV 类型,其中 HPV16 被发现与异常细胞学检测的关联度最高,其次是 HPV58、18、52,并且感染类型和感染率存在区域差异性^[8]。本研究结果中 HPV16、52、58 和 18 的感染率依次为 11.03%、13.31%、7.71%和 4.20%,其中 HPV16 和 HPV52 的感染率最高,且多重感染类型中 HPV 各

亚型频率均高于单一感染,与田欣欣的研究结果比较本研究中男性 HPV 多重感染中各亚型分布具有范围广、基因型复合程度和携带率较高等特点。不同年龄段的 HPV 感染结果显示,≤20 岁组中呈现初始的感染状态,21~40 岁组中感染率最高,40 岁以上组感染率呈下降趋势,此结果可能与 21~40 岁组男性处于性生活活跃期而导致 HPV 感染几率增加有关。据报道^[9]由 HPV 引起的宫颈癌是中低收入国家孕龄妇女(年龄为 20~40 岁)发病率和死亡率的主要原因,每年约有 50 万新病例和 266 000 人死亡,处于性活跃期的男性群体增加了 HPV 通过性传播途径传染给女性的可能。此外 21~60 岁组中 HPV 高危型(包括单纯高危型和高低危混合型)携带率高于单纯低危型,表明男性人群中 HR-HPV 感染较为常见,这不仅增加了自身癌变的潜在风险同时也增加了其性伴侣的感染和癌变机率。

虽然多重感染影响生存的具体原因还不完全清楚,但多种 HPV 基因型的存在可能增加持续性感染的长度和致癌风险。所以 HPV 多重感染的流行特征对宫颈癌的发生以及持续感染患者的预后具有重要意义,通过 HPV 基因分型检测可以对患者的生存质量进行预测^[10]。本研究男性感染者中二重感染和三重感染的人数最多,并且随着感染重数的增加,不同类型的感染率均呈下降趋势。此外高低危混合型组感染率高于单纯低危型组或单纯高危型组,表明男性 HPV 多重感染中以高低危混合型为主且感染谱较广,可能增加 CA 和高度癌前病变的发生风险以致对患者的治疗及预后产生影响。

用 HPV 疫苗进行大规模免疫接种能够降低 HPV 感染率,自 2007 年以来国外许多中低收入国家已经通过 HPV 疫苗接种试点,同时许多示范项

目和国家项目都获得了 HPV 疫苗接种经验^[11-12]。研究报道目前还没有较为成熟的男性 HPV 相关癌症的筛查方案,而男性感染者往往会增加前列腺癌、肛门癌和口腔癌的风险,尤其男男性接触者的发病率明显高于其他人^[13-15]。虽然各国正试图将 HPV 疫苗扩大到男性人群中使用,且有研究报道^[16] HPV 疫苗接种对男性具有保护作用,但监测 HPV 疫苗对男性癌症发病率的影响将需要相对较长时间观察。而 HPV 感染导致的非宫颈癌有关癌症往往其发病中位年龄较大,同时在样本规范收集和不同人群诊断和筛查等方面也面临较多困难,所以给男性 HPV 疫苗接种研究带来阻碍^[17]。例如 Tatar 等人^[18]进行的一项加拿大大学生(主要为男性群体)对接种 HPV 疫苗的认识调查中,结果显示研究对象中大多数人并不知道 HPV 疫苗能给予男性使用,也均未接种过男性 HPV 疫苗,该群体的调查结果尚且如此,其他男性群体的了解程度可能会更低。本研究结果为男性群体的 HPV 检测、治疗和疫苗接种提供了流行病学依据,对降低男性 HPV 感染率和癌变发生风险具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] Lyu Z, Feng X, Li N, et al. Human papillomavirus in semen and the risk for male infertility: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 714-723.
- [2] Lopez-Diez E, Perez S, Carballo M, et al. Lifestyle factors and oncogenic papillomavirus infection in a high-risk male population [J]. Plos One, 2017, 12(9): 1-12.
- [3] Bashaw AA, Leggett GR, Chandra J, et al. Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection [J]. Papillomavirus Res, 2017, 4: 58-65.
- [4] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [5] Li S, Shen H, Liu Z, et al. Integration of human papillomavirus 16 in esophageal carcinoma samples [J]. Infect Agent Cancer, 2017, 12: 53.
- [6] 黄泽棋, 谢伟贤, 陈启然, 等. 223 例男性尖锐湿疣组织 HPV 基因分型检测及分析 [J]. 广东医学, 2014, 35(7): 1087-1089.
- [7] Leto MD, Santos Júnior GF, Porro AM, et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations [J]. An Bras Dermatol, 2011, 86(2): 306-317.
- [8] 田欣欣, 王睿, 姜玲波, 等. 山东地区 1225 例男性尖锐湿疣患者 HPV 感染亚型分析 [J]. 中国男科学杂志, 2016, 30(7): 41-45.
- [9] Howard N, Gallagher KE, Mounier - Jack S, et al. What works for human papillomavirus vaccine introduction in low and middle - income countries? [J]. Papillomavirus Res, 2017, 4: 22-25.
- [10] Nogueira DGML, Martins TR, Mendoza LRV, et al. Multiple HPV genotype infection impact on invasive cervical cancer presentation and survival [J]. Plos One, 2017, 12(8): 1-10.
- [11] Gallagher KE, Howard N, Kabakama S, et al. Human papillomavirus (HPV) vaccine coverage achievements in low and middle-income countries 2007-2016 [J]. Papillomavirus Res, 2017, 4: 72-78.
- [12] Marcellusi A. Impact of HPV vaccination: health gains in the Italian female population [J]. Popul Health Metr, 2017, 15(1): 36-51.
- [13] Yin B, Liu W, Yu P, et al. Association between human papillomavirus and prostate cancer: a meta-analysis [J]. Oncol Lett, 2017, 14(2): 1855-1865.
- [14] Lin C, Franceschi S, Clifford GM. Human papillomavirus types from infection to cancer in the anus, according to sex and HIV status: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(2): 198-206.
- [15] Rollo F, Latini A, Pichi B, et al. Prevalence and determinants of oral infection by Human Papillomavirus in HIV-infected and uninfected men who have sex with men [J]. Plos One, 2017, 12(9): 1-15.
- [16] Lehtinen T, Söderlund-Strand A, Petäjä T. Human papillomavirus (HPV) prevalence in male adolescents 4 years after HPV -16/18 vaccination [J]. J Infect Dis, 2017, 216(8): 966-968.
- [17] Brotherton JML, Giuliano AR, Markowitz LE, et al. Monitoring the impact of HPV vaccine in males - Considerations and challenges [J]. Papillomavirus Res, 2016, 2: 106-111.
- [18] Tatar O, Perez S, Naz A, et al. Psychosocial correlates of HPV vaccine acceptability in college males: A cross-sectional exploratory study [J]. Papillomavirus Res, 2017, 4: 99-107.

(上接第 132 页)

- [25] Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences [J]. Bioinformatics, 2018, 34(18): 3094-3100.
- [26] Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2987-2993.
- [27] Okonechnikov K, Conesa A, Garcia-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data [J]. Bioinformatics, 2016, 32(2): 292-294.
- [28] Greninger AL, Naccache SN, Federman S, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis [J]. Genome Med, 2015, 7: 99.

· 论 著 ·

血管内皮生长因子基因 936C/T 位点多态性与急性心肌梗死的关系

常亚伟* 李赛 琚绍坦

[摘要] 目的 研究血管内皮生长因子(VEGF)936C/T多态性与急性心肌梗死(AMI)的关系。方法 纳入2016年7月至2018年12月在本院住院且首次诊断为AMI的120例患者作为AMI组及同期进行健康体检的150例志愿者作为对照组。提取外周血基因组DNA,通过PCR反应、酶切反应以及琼脂糖凝胶电泳检测VEGF基因936C/T位点多态性。结果 AMI组VEGF基因936C/T位点的基因型频率(CC:34.17%,CT+TT:65.83%)与对照组的基因型频率(CC:54.67%,CT+TT:45.33%)差异有统计学意义($P=0.001$);AMI组VEGF基因936C/T位点等位基因频率(C:59.58%;T:40.42%)与对照组等位基因频率(C:73.67%;T:26.33%)差异有统计学意义($P=0.001$);AMI组患者VEGF基因936C/T位点CT+TT基因型比例、等位基因T频率明显高于对照组($P<0.05$)。AMI组中VEGF基因936C/T位点CT+TT基因型患者的血清CK-MB峰值、cTnI峰值明显高于CC基因型患者,血清VEGF水平明显低于CC基因型患者($P<0.05$)。Logistic回归分析显示,年龄、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、VEGF基因CT+TT基因型是AMI发生的危险因素。结论 VEGF基因936C/T多态性与AMI的发生有关,其中等位基因T可能是AMI发生的易感等位基因。

[关键词] 急性心肌梗死;血管内皮生长因子;基因多态性;危险因素

Correlation between 936C/T site polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and acute myocardial infarction

CHANG Yawei*, LI Sai, JU Shaotan

(Department of cardiovascular medicine, Henan provincial third people's hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between vascular endothelial growth factor (VEGF) 936C/T polymorphism and acute myocardial infarction (AMI). **Methods** 120 cases of patients hospitalized and diagnosed with AMI for the first time in our hospital from July 2016 to December 2018 were enrolled as the AMI group and 150 volunteers who had physical examination in the same period were enrolled as the control group. Genomic DNA was extracted from peripheral blood, and the polymorphism of VEGF gene 936C/T site was detected by PCR, enzyme digestion and agarose gel electrophoresis. **Results** The genotype frequency of VEGF gene 936C/T site in the AMI group (CC: 34.17%, CT+TT: 65.83%) was significantly different from that of the control group (CC: 54.67%, CT+TT: 45.33%) ($P=0.001$). Allele frequency of VEGF gene 936C/T site in the AMI group (C: 59.58%; T: 40.42%) had statistical significance with control group allele frequency (C: 73.67%; T: 26.33%) ($P=0.001$). In the AMI group, the proportion of CT+TT genotype and the frequency of T allele at 936C/T of VEGF gene were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). The CK-MB peak, cTnI peak of the patients with CT+TT genotype at 936C/T site of VEGF gene in AMI group were significantly higher than those of the patients with CC genotype, and the level

作者单位:河南省直第三人民医院心血管内科,河南,郑州 450000

*通信作者:常亚伟, E-mail:27450553@qq.com

of VEGF were significantly lower than those of the patients with CC genotype ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that age, smoking, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, VEGF gene CT+TT genotype were risk factors for AMI. **Conclusion** The 936C/T polymorphism of VEGF gene is related to the development of AMI, and the allele T may be the susceptible allele of AMI.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; Vascular endothelial growth factor; Gene polymorphism; Risk factors

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是临床常见的心血管系统疾病, 病情较重, 具有较高的致残率和致死率。近年来, 我国 AMI 的发病率不断升高且发病人群呈年轻化趋势, 已经成为威胁国民健康的公共卫生问题。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 是具有强大促血管新生作用的细胞因子, 在 AMI、脑梗死等缺血性疾病的发病过程中, 能够促进新生血管形成、增加血管通透性, 有利于改善缺血组织的血流灌注^[1]; 多项动物实验也证实 VEGF 能够减轻 AMI 大鼠的心肌损伤^[2-4]。人的 VEGF 基因位于染色体 6q21, 位于 3' 非编码区的 rs3025039 位点 (936C/T) 是常见的基因多态性位点, 发生胞嘧啶 (C) 向胸腺嘧啶 (T) 的突变已经被证实与脑梗死的发生有关^[5], 但 VEGF 基因 936C/T 多态性在 AMI 中的作用尚未完全阐明。因此, 本研究旨在探讨 VEGF 基因 936C/T 多态性与 AMI 的关系, 以期从基因角度阐明 AMI 发病的易感因素、为筛查 AMI 高危人群提供新思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2016 年 7 月至 2018 年 12 月在本院且首次诊断为 AMI 的 120 例患者作为 AMI 组, 入组标准: ①符合中华医学会心血管病学分会指定的《急性心肌梗死诊断和治疗指南》^[6] 中的判断标准; ②临床资料及临床样本完整。排除标准: ①肝肾功能不全; ②合并恶性肿瘤、自身免疫性疾病、血液疾病; ③既往有心肌梗死、脑梗死病史。另取同期在本院进行健康体检的 150 例志愿者作为对照组。本研究的方案获伦理委员会审批同意, 所有入组对象均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂

全血基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 酶预混液购自美国赛默飞公司。VEGF 基因 936C/T 位点的

引物由上海生工公司合成, 序列如下: 上游 5'-CT-GAAATGAAGGAAGAGGAGAC-3'、下游 5'-TCCCCTCCCAACTCAAGTCCAC-3'; 美国 BIO-RAD 伯乐 T100 型梯度 PCR 仪为艾本德公司, 德国耶拿 UVP Gelstudio touch 凝胶成像仪为南京世研仪器公司。

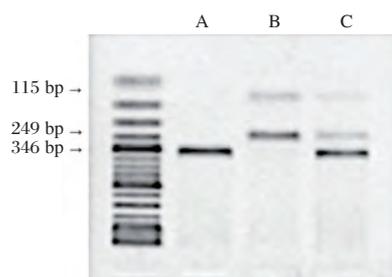
1.3 方法

1.3.1 VEGF(936C/T) 基因多态性的检测

取 AMI 组和对照组的肘静脉血 2 mL (EDTA 抗凝), 用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 采用 PCR 酶预混液、配置 PCR 反应体系, 具体如下: 基因组 DNA 2 μ L、PCR 酶预混液 10 μ L、10 pmol/L 的上下游引物各 0.4 μ L、去离子水 7.2 μ L, 按下列程序进行 PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 而后 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s、54 $^{\circ}$ C 退火 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 重复 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 50 s, 得到 PCR 产物。PCR 产物用限制性内切酶进行酶切反应, 酶切反应体系为 PCR 产物 1 μ L, 限制性内切酶 10 U, 去离子水补足至 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜, 次日酶切产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 100 V, 60 min, 琼脂糖凝胶在凝胶成像仪中显影得到酶切产物的图像, 根据图像判断 VEGF 基因 936C/T 位点的多态性: 364 bp 一个片段为 CC 基因型、249 bp、115 bp 两个片段为 TT 基因型、364 bp、249 bp、115 bp 3 个片段为 CT 基因型, 如图 1。

1.3.2 观察指标

两组受试者的性别、年龄、吸烟史、饮酒史、高血压史、糖尿病史、高脂血症史、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、同型半胱氨酸 (Homocysteine, Hcy)、磷酸肌酸激酶同工酶 (Creatine Kinase Isoenzyme-MB, CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin, cTnI)。



注:A为CC基因型;B为TT基因;C为CT基因型。

图1 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis

1.4 统计学处理

用SPSS 21.0软件进行统计学分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间均数的比较采用独立样本 t 检验或非参数秩和检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示。采用 χ^2 检验。采用二分类Logistic回归分析危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较

AMI组的年龄、吸烟率、高血压率、糖尿病率、高脂血症率、高Hcy血症率及血清TC、LDL-C、VEGF水平均明显高于对照组,血清HDL-C水平明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。性别、饮酒率、TG水平比较两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 两组基线资料比较 [$n(\%)$]

Table 1 comparison of basic clinical characteristics between 2 groups [$n(\%)$]

项目	AMI组 ($n=120$)	对照组 ($n=150$)	t/χ^2 值	P 值
男性	68(56.67)	71(47.33)	2.325	0.127
年龄(岁)	59.93±13.35	56.93±12.77	1.880	0.061
吸烟	53(41.67)	48(32.00)	4.215	0.040
饮酒	32(26.67)	44(29.33)	0.234	0.628
高血压	69(57.50)	36(24.00)	31.481	0.000
糖尿病	45(37.50)	29(19.33)	11.059	0.001
高脂血症	57(47.50)	45(30.00)	8.686	0.003
高Hcy血症	31(25.83)	19(12.67)	7.659	0.006
TG(mmol/L)	1.88±0.41	1.79±0.52	1.549	0.122
TC(mmol/L)	5.01±0.93	4.46±0.91	4.887	0.000
LDL-C(mmol/L)	3.03±0.73	2.26±0.52	10.107	0.000
HDL-C(mmol/L)	1.04±0.22	1.16±0.36	3.204	0.001
VEGF(ng/mL)	101.46±16.95	52.39±9.93	29.667	0.000

2.2 两组VEGF基因型及等位基因频率分布比较

两组间VEGF基因936C/T位点基因型及等位基因频率的分布,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组VEGF基因型及等位基因频率的比较 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of VEGF genotype and allele frequency between two groups [$n(\%)$]

VEGF基因	AMI组 ($n=120$)	对照组 ($n=150$)	χ^2 值	P 值
基因型			11.296	0.001
CC	41(34.17)	82(54.67)		
CT+TT	79(65.83)	68(45.33)		
等位基因			12.037	0.001
C	143(59.58)	221(73.67)		
T	97(40.42)	79(26.33)		

2.3 AMI组中不同VEGF基因型患者血清指标的比较

AMI组中VEGF基因936C/T位点CT+TT基因型患者的血清CK-MB峰值、cTnI峰值明显高于CC基因型患者,血清VEGF水平明显低于CC基因型患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。CC基因型与CT+TT基因型患者血清TG、TC、LDL-C、HDL-C、Hcy水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 AMI组中不同VEGF基因型患者血清指标的比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Comparison of serum indexes between patients with different VEGF genotype in AMI group [$n, (\bar{x} \pm s)$]

项目	CT+TT基因型 ($n=79$)	CC基因型 ($n=41$)	t 值	P 值
TG(mmol/L)	1.90±0.45	1.84±0.39	0.724	0.471
TC(mmol/L)	4.93±0.96	5.16±0.89	1.275	0.247
LDL-C(mmol/L)	3.08±0.77	2.93±0.70	1.043	0.299
HDL-C(mmol/L)	1.01±0.23	1.09±0.20	1.887	0.062
Hcy(mmol/L)	12.94±2.85	13.09±3.44	0.254	0.800
BG(mmol/L)	6.77±0.94	6.44±1.04	1.758	0.081
VEGF(ng/mL)	89.12±14.58	125.24±19.22	11.512	0.000
CK-MB峰值(U/L)	429.69±83.94	338.14±67.62	6.037	0.000
cTnI峰值(ng/mL)	4.67±1.33	4.11±1.19	2.265	0.025

2.4 AMI相关危险因素的Logistic回归分析

采用逐步回归方法筛选危险因素,分析结果显示:年龄、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、VEGF基因CT+TT基因型是AMI发生的独立危险

因素。其中,与 *VEGF* 基因 CC 基因型比较,CT+TT 基因型患者发生 AMI 的风险增加见表 4。

表 4 AMI 相关危险因素的 Logistic 回归分析
Table 4 Logistic regression analysis of related risk factor for AMI

变量	β 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄	0.093	1.174	1.023~1.351	0.021
吸烟	0.341	1.332	1.182~1.923	0.013
高血压	0.575	2.112	1.352~3.324	0.009
糖尿病	0.213	2.332	1.412~3.582	0.004
高脂血症	0.081	1.575	1.211~2.039	0.011
高 Hcy 血症	0.046	1.109	1.048~1.929	0.020
<i>VEGF</i> CT+TT 基因型	0.357	1.774	1.257~2.958	0.007

3 讨论

VEGF 是直接作用于血管内皮细胞的促有丝分裂因子,能够促进新生血管形成、增加血管通透性。在心肌梗死、脑梗死等缺血性疾病中,*VEGF* 通过其促血管新生及增加血管通透性的作用能够增加缺血病灶的侧枝循环及血流灌注,进而减轻局部组织的缺血缺氧损伤。多项临床研究报道,心肌梗死及脑梗死患者血清中 *VEGF* 的含量增多^[7-9];本研究对 AMI 患者血清 *VEGF* 的分析与已有的报道一致,即 AMI 组血清 *VEGF* 含量明显增多,分析认为 *VEGF* 的增多可能是机体在缺血缺氧状态下自我保护及自身代偿的机制。另有研究报道,AMI 预后不良患者的血清 *VEGF* 含量低于预后良好患者^[10],由此更加印证了 *VEGF* 增多是 AMI 发生后的一种自我保护及自身代偿,预后不良患者 *VEGF* 含量较低提示自我保护及自身代偿不足,*VEGF* 介导的促进新生血管形成、增加血管通透性作用较弱,因而远期预后较差。

VEGF 分泌的调控机制复杂,缺血缺氧、炎症及氧化应激等刺激会增加 *VEGF* 的表达和分泌^[11-13],编码 *VEGF* 的基因本身存在多态性也会影响 *VEGF* 的表达和分泌。目前已知 *VEGF* 基因多态性的位点超过 30 个,其中研究较为成熟的多态性位点是 3' 非翻译区上的 936C/T 位点,该位点 C 向 T 突变增多已经被证实与急性脑梗死的发生有关^[14-15]。本研究对 AMI 患者 *VEGF* 基因 936C/T 多态性的分析显示:AMI 组 *VEGF* 基因 936C/T 位点 CT+TT 基因型的比例及等位基因 T 的频率明显增加,说明 *VEGF* 基因 936C/T 位点 C 向 T 突变的增

多与 AMI 的发生有关。936C/T 位点位于 *VEGF* 基因的 3' 非翻译区,发生 C 向 T 的突变后会影响 miRNAs 与 3' 非翻译区的结合及对基因表达的调控,进而可能影响心肌梗死发生后 *VEGF* 表达增多对心肌缺血损伤的自身代偿,加重 AMI 的病情。在本研究中,不同基因多态性 AMI 患者血清心肌酶及 *VEGF* 的分析印证了这一猜想,CT+TT 基因型 AMI 患者的血清 *VEGF* 含量低于 CC 基因型 AMI 患者,CK-MB 及 cTnI 峰值高于 AMI 患者,说明 AMI 发生后虽然存在 *VEGF* 分泌增多的自身代偿机制,但当基因 936C/T 位点发生 C 向 T 的突变时,*VEGF* 的分泌相对较少、自身代偿也较弱,进而出现了更为严重的心肌缺血缺氧、反应心肌损伤的 CK-MB 及 cTnI 峰值也较高。

AMI 的发生与环境、饮食、遗传等多种因素有关,本研究对 AMI 患者除了 *VEGF* 外的其他多种指标也进行了分析,结果显示:AMI 组患者的年龄、吸烟率、高血压率、糖尿病率、高脂血症率、高 Hcy 血症率及血清 TC、LDL-C 水平均较高;经 Logistic 回归分析发现:年龄、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症、高 Hcy 血症是 AMI 的危险因素,这与既往多项关于 AMI 发病危险因素的研究^[16-18]吻合,年龄、吸烟、血压、血糖、血脂、血 Hcy 均会影响 AMI 的发生。但是在不同 *VEGF* 基因多态性的 AMI 患者中,血糖、血脂、血 Hcy 的水平无明显差异,说明 *VEGF* 基因多态性虽然会影响 *VEGF* 的分泌及心肌损伤的严重程度,但是对血糖、血脂、血 Hcy 的代谢并无影响。此外,本研究通过 Logistic 回归分析还发现:*VEGF* 基因 936C/T 位点 CT+TT 基因型是 AMI 的危险因素,CT+TT 基因型患者发生 AMI 的风险是 CC 基因型患者的 1.774 倍。但是,*VEGF* 基因发生上述突变后对 *VEGF* 表达及分泌的直接、可能通过靶向 *VEGF* 基因 936C/T 位点的 miRNAs 等均有待阐明。

综上所述,本研究发现 *VEGF* 基因 936C/T 位点多态性与 AMI 的发生有关,*VEGF* 基因 CT+TT 基因型是 AMI 的危险因素,等位基因 T 可能是 AMI 发生的易感等位基因。本研究的结果对筛查 AMI 的高危人群具有一定指导价值。但是,本研究未对 AMI 患者的长期预后进行随访,根据 *VEGF* 的代偿功能,*VEGF* 基因 CT+TT 基因型可影响 *VEGF* 的分泌及其代偿功能,进而可能在长期病情转归中产生影响,因此今后可进一步延长随

访时间、分析 *VEGF* 基因多态性对远期主要心血管事件的影响。

参考文献

- [1] Yang Z, Wan J, Pan W, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in cardiac repair: Signaling mechanisms mediating vascular protective effects [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 1(113): 179-185.
- [2] Zou J, Fei Q, Xiao H, et al. VEGF-A promotes angiogenesis after acute myocardial infarction through increasing ROS production and enhancing ER stress-mediated autophagy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17690-17703.
- [3] 冯艳, 李延民, 李静, 等. 血管内皮生长因子对急性心肌梗死大鼠保护作用的研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(14): 1982-1984.
- [4] 杨晓华, 杨欣悦, 王静蓉, 等. 血管内皮生长因子对急性心肌梗死大鼠心功能和心肌细胞凋亡的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(8): 792-796.
- [5] Wu T, Qiu S, Wang P, et al. The association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and stroke: a meta-analysis [J]. *Brain Behav*, 2016, 6(7): e00482.
- [6] 中华医学会心血管病学分会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南 [J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(12): 710-725.
- [7] Raman MR, Himali JJ, Conner SC, et al. Circulating Vascular Growth Factors and Magnetic Resonance Imaging Markers of Small Vessel Disease and Atrophy in Middle-Aged Adults [J]. *Stroke*, 2018, 49(9): 2227-2229.
- [8] 刘学芳, 霍豆, 赵茜, 等. 急性脑梗死患者血清 VEGF, SAA 和 Lp-PLA2 联合检测的临床研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(4): 76-80.
- [9] Niu J, Han X, Qi H, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor and long-term prognosis in patients with acute myocardial infarction [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 475-479.
- [10] 杨爱荣, 李志峰. 降钙素原和血管内皮生长因子-B 评估老年急性心肌梗死患者预后的价值 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(9): 2415-2417.
- [11] Sankar KS, Altamentova SM, Rocheleau JV. Hypoxia induction in cultured pancreatic islets enhances endothelial cell morphology and survival while maintaining beta-cell function [J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0222424.
- [12] Yang Y, Ju J, Deng M, et al. Hypoxia Inducible Factor 1 α Promotes Endogenous Adaptive Response in Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 3.
- [13] Zhao Q, Ji M, Wang X. IL-10 inhibits retinal pigment epithelium cell proliferation and migration through regulation of VEGF in rhegmatogenous retinal detachment [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 7301-7306.
- [14] Zhao J, Bai Y, Jin L, et al. A functional variant in the 3'-UTR of VEGF predicts the 90-day outcome of ischemic stroke in Chinese patients [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172709.
- [15] Liu B, Wei J, Li M, et al. Association of common genetic variants in VEGFA with biliary atresia susceptibility in Northwestern Han Chinese [J]. *Gene*, 2017, 628: 87-92.
- [16] Toluey M, Ghaffari S, Tajlil A, et al. The impact of cigarette smoking on infarct location and in-hospital outcome following acute ST-elevation myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Thorac Res*, 2019, 11(3): 209-215.
- [17] Kim CY, Lee JH, Jang SY, et al. Usefulness of Calculation of Cardiovascular Risk Factors to Predict Outcomes in Patients With Acute Myocardial Infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2019, 124(6): 857-863.
- [18] Martínez-Quintana E, Rodríguez-Hernández JL, Rodríguez-González F, et al. Cardiovascular risk factors and arterial thrombotic events in congenital heart disease patients [J]. *Int J Clin Pract*, 2019, 73(9): 1-8.

(上接第 141 页)

- [16] Monni G, Peddes C, Iuculano A, et al. From Prenatal to Pre-implantation Genetic Diagnosis of β -Thalassemia. Prevention Model in 8748 Cases: 40 Years of Single Center Experience [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(2).
- [17] Liu W, Liu J, Du H, et al. Non-invasive pre-implantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IV-SII654 mutation using spent embryo culture medium [J]. *Ann Med*, 2017, 49(4): 319-328.
- [18] Harton G L, De Rycke M, Fiorentino F, et al.ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(1): 33-40.
- [19] Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S, et al. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015, 16: 79-102.
- [20] Chen C, Xing D, Tan L, Li H, Zhou G, Huang L, Xie XS. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI) [J]. *Science*, 2017, 356(6334): 189-194.

重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及 GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 水平变化意义

尹宏* 陈庆春 苏艳蓉 吕加希

[摘要] **目的** 探究重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及胃泌素(GAS)、胃动素(MTL)、生长抑素(SS)、胆囊收缩素(CCK-8)、血管活性肠肽(VIP)水平变化意义。**方法** 选取226例重症高血压脑出血患者作为研究对象,统计应激性胃溃疡发生率,对比重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡与未并发应激性胃溃疡患者 GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 水平,并分析并发应激性胃溃疡影响因素及其预测价值。**结果** 226例重症高血压脑出血患者中52例发生应激性胃溃疡,发生率为23.01%(52/226);入院第3、7 d,并发胃溃疡组患者 GAS、MTL、CCK-8、VIP 水平均高于未并发胃溃疡患者,SS 水平低于未并发胃溃疡患者($P < 0.05$);Logistic 回归分析显示,脑干出血、脑出血量 ≥ 20 mL、颅内压增高、GCS 评分 < 8 分、GAS、MTL、CCK-8、VIP 均为重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡危险因素,SS 则为保护因素;ROC 曲线分析,入院第7 d GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 预测 AUC 大于入院第3 d。**结论** 脑干出血、脑出血量 ≥ 20 mL、颅内压增高、GCS 及 GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 均为重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡患者影响因素,脑出血发生后密切监测 GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 水平,可预测应激性胃溃疡的发生。

[关键词] 重症高血压脑出血;应激性胃溃疡;胃泌素;胃动素;生长抑素;胆囊收缩素;血管活性肠肽

Influencing factors of severe hypertensive cerebral hemorrhage complicated with stress gastric ulcer and the significance of changes in GAS, MTL, SS, CCK-8 and VIP

YIN Hong*, CHEN Qingchun, SU Yanrong, LV Jiayi

(Neurosurgery, Guilin Second People's Hospital, Guilin, Guangxi, China, 541001)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the influencing factors of stress-induced gastric ulcer in severe hypertensive cerebral hemorrhage, and the significance of changes in gastrin (GAS), motilin (MTL), somatostatin (SS), cholecystokinin (CCK-8) and vasoactive intestinal peptide (VIP) levels. **Methods** A total of 226 patients with severe hypertensive cerebral hemorrhage were enrolled as the study subjects. The incidence of stress gastric ulcer was statistically analyzed, the levels of GAS, MTL, SS, CCK-8, and VIP in patients with severe hypertensive cerebral hemorrhage with stress gastric ulcer and those without stress gastric ulcer were compared, the influencing factors of concurrent stress gastric ulcers and the predictive value of GAS, MTL, SS, CCK-8 and VIP levels were analyzed. **Results** Among 226 patients with severe hypertensive intracerebral hemorrhage, 52 cases had stress gastric ulcer, the incidence rate was 23.01% (52/226); On the third and seventh day of admission, the levels of GAS, MTL, CCK-8, and VIP in patients with gastric ulcer were higher than those without gastric ulcer, and SS levels were lower than those without gastric ulcer ($P < 0.05$); Logistic regression analysis showed that brain stem hemorrhage, cerebral hemorrhage

基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会科研课题(Z20190740)

作者单位:桂林市第二人民医院神经外科,广西,桂林 541001

*通信作者:尹宏, E-mail: yinhuasj13@163.com

volume ≥ 20 mL, increased intracranial pressure, GCS score < 8 points, GAS (on the third and seventh day of admission), MTL, CCK-8 and VIP are risk factors for severe hypertensive cerebral hemorrhage and stress gastric ulcer, SS is a protective factor; ROC curve analysis, on the seventh day of admission, GAS, MTL, SS, CCK-8, VIP predicted AUC was greater than the third day of admission. **Conclusion** Brain stem hemorrhage, cerebral hemorrhage ≥ 20 mL, increased intracranial pressure, GCS and GAS, MTL, SS, CCK-8, and VIP are all influential factors in patients with severe hypertensive cerebral hemorrhage and stress gastric ulcer, the levels of GAS, MTL, SS, CCK-8, and VIP after the occurrence of cerebral hemorrhage are closely monitored can predict the occurrence of stress gastric ulcers.

[KEY WORDS] Severe hypertensive cerebral hemorrhage; Stress gastric ulcer; Gastrin; Motilin; Somatostatin; Cholecystokinin; Vasoactive intestinal peptide

高血压脑出血为神经系统常见危急重症,发病率较高,约占所有脑卒中的1/10^[1-2]。脑出血后机体通常处于高度应激状态,易引起一系列严重并发症^[3]。应激性胃溃疡是指机体在各类危重疾病、严重创伤等应激状态下发生的急性消化道糜烂、溃疡等病变,可造成消化道出血、穿孔,是高血压脑出血患者常见严重并发症^[4-5]。相关研究表明,胃泌素(Gastric secrete element, GAS)、胃动素(Motilin, MTL)、生长抑素(Somatostatin, SS)、八肽胆囊收缩素(Cholecystokinin-8, CCK-8)、血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide, VIP)在消化道疾病发生、病情进展中均存在异常表达现象^[6-9],但关于其在重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡中的表达变化的研究较为鲜见。基于此,本研究初次分析重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平变化意义,旨在为临床早期诊断提供依据。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2017年5月至2019年9月本院226例重症高血压脑出血患者作为研究对象,男158例,女68例,年龄51~82岁,平均年龄(66.52 \pm 5.05)岁;高血压病程4~22年,平均病程(13.56 \pm 5.07)年;发病至入院时间2~15 h,平均时间(8.54 \pm 4.01)h;格拉斯哥昏迷指数(Glasgow Coma Scale, GCS)3~10分,平均GCS评分(6.52 \pm 1.34)分。所有患者及家属均已签署知情同意书,本研究经本院医学伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 影响因素分析

重症高血压脑出血患者发病两周内,从胃管内抽出咖啡样胃内容物或肉眼可见血、呕血、黑便并隐血试验强阳性(+++)即可诊断为应激性胃溃

疡^[10],统计重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡发生率,并记录年龄、性别、出血部位、脑出血量、颅内压、GCS评分。

1.2.2 指标检测

采集5 mL清晨空腹静脉血,离心速率为3 000 r/min,时间为15 min,置于-20℃环境下贮存,以发光免疫法测定GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平,试剂盒均购自解放军总医院东亚免疫技术研究所。操作严格遵循试剂盒说明书进行。

1.3 观察指标

统计重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡发生率,对比重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡与未并发应激性胃溃疡患者入院时、入院第3、7 d GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平,并分析重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素及GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平与各影响因素的相关性,以受试者工作特征(Receiver operator characteristic curve, ROC)曲线分析GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP预测重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡的价值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料符合正态分布采取($\bar{x} \pm s$)表示、*t*检验,非正态分布数据经自然对数转换成正态分布后施行分析,计数资料采用*n*(%)表示, χ^2 检验,采用Spearman进行相关性分析,ROC曲线分析GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP预测价值。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清、血浆指标水平

将226例重症高血压脑出血患者中52例(23.01%)并发应激性胃溃疡为应激胃溃疡组,174例未并发应激性胃溃疡患者作为未并发胃溃疡

组,入院第3、7 d,并发胃溃疡患者 GAS、MTL、CCK-8、VIP 水平均高于未并发胃溃疡患者,SS 水平低于未并发胃溃疡患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组血清、血浆指标水平对比 [$n, (\bar{x} \pm s)$]
Table 1 Comparison of serum and plasma levels of the 2 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

时间	组别	<i>n</i>	GAS (ng/L)	MTL (ng/L)	SS (ng/mL)	CCK-8 (pg/mL)	VIP (pg/mL)
入院时	并发胃溃疡	52	158.26±20.14	145.26±34.85	35.25±8.41	153.69±53.47	206.14±39.83
	未并发胃溃疡	174	157.62±21.32	146.32±33.74	35.69±8.92	154.02±54.26	207.15±35.41
	<i>t</i> 值		0.192	0.197	0.316	0.039	0.175
	<i>P</i> 值		0.848	0.844	0.752	0.969	0.861
入院第3 d	并发胃溃疡	52	179.41±27.83	209.61±68.32	26.47±7.41	178.69±32.85	237.42±41.39
	未并发胃溃疡	174	152.69±28.32	150.41±65.34	34.47±7.29	159.62±38.41	205.63±40.94
	<i>t</i> 值		5.993	5.673	6.918	3.242	4.901
	<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
入院第7 d	并发胃溃疡	52	155.62±20.87	196.45±60.12	25.41±7.24	152.74±55.61	177.64±40.12
	未并发胃溃疡	174	108.25±36.74	131.69±65.24	40.69±8.21	102.37±68.25	142.69±38.65
	<i>t</i> 值		8.871	6.392	12.086	4.859	5.672
	<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡单因素分析

重症高血压脑出血并发胃溃疡与未并发胃溃疡患者出血部位、脑出血量、颅内压及GCS评分相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡单因素分析
[$n(\%)$]

Table 2 Single factor analysis of severe hypertensive cerebral hemorrhage complicated with stress gastric ulcer
[$n(\%)$]

影响因素	并发胃溃疡 ($n=52$)	未并发胃溃疡 ($n=174$)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别			0.050	0.824
男	37(71.15)	121(69.54)		
女	15(28.85)	53(30.46)		
年龄			0.931	0.327
≥60岁	35(67.31)	104(59.77)		
<60岁	17(32.69)	70(40.23)		
出血部位			9.210	0.002
脑干	15(28.85)	20(11.49)		
其他部位	37(71.15)	154(88.51)		
脑出血量			8.118	0.004
≥20 mL	31(59.62)	65(37.36)		
<20 mL	21(40.38)	109(62.64)		
颅内压			15.749	0.000
正常	19(36.54)	117(67.24)		
增高	33(63.46)	57(32.76)		
GCS评分			15.155	0.000
≥8分	17(32.69)	110(63.22)		
<8分	35(67.31)	64(36.78)		

2.3 重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡多因素分析

Logistic 回归分析显示,脑干出血、脑出血量≥20 mL、颅内压增高、GCS 评分 < 8 分、GAS(入院第3、7 d)、MTL(入院第3、7 d)、CCK-8(入院第3、7 d)、VIP(入院第3、7 d)均为重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡危险因素,SS(入院第3、7 d)则为保护因素,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.4 血清、血浆指标水平与应激性胃溃疡影响因素相关性

GAS、MTL、CCK-8、VIP 水平与重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡影响因素呈正相关关系($P < 0.05$),SS 水平与其呈负相关关系,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

2.5 ROC 曲线分析

入院第7天 GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP 预测曲线下面积(Area under the cur, AUC)大于入院第3 d。见图1。

3 讨论

研究表明,重症高血压脑出血患者 GCS 评分较低时,脑功能损伤严重,迷走神经兴奋性增加,造成胃排空延缓,胃内容物滞留,胃酸分泌异常增加,并发消化道出血风险明显增加^[11-12]。入院第3、7 d,并发胃溃疡患者 GAS 水平高于未并发胃溃疡患者,可能是由于高血压脑出血后,应激反应可

表3 重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡多因素分析

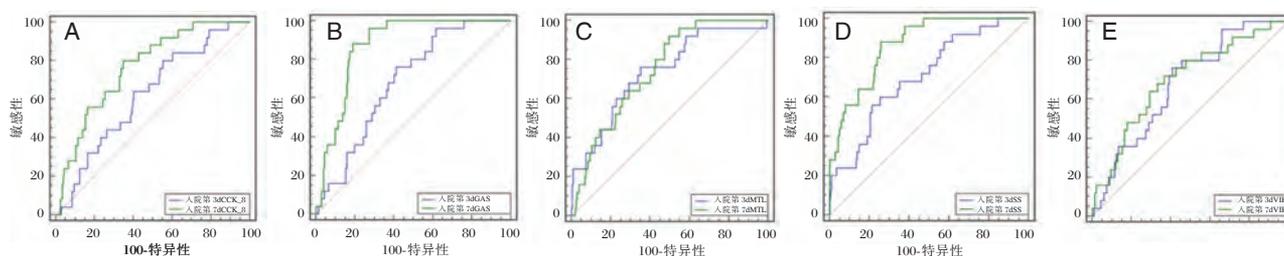
Table 3 Multivariate analysis of severe hypertensive cerebral hemorrhage complicated with stress gastric ulcer

因素	β 值	SE值	Wald/ χ^2 值	P值	OR值	95%CI
出血部位	1.098	0.416	6.976	0.000	3.000	1.330~6.765
脑出血量	0.818	0.341	5.758	0.006	2.267	1.162~4.421
颅内压	1.172	0.379	9.564	0.000	3.229	1.534~6.796
GCS评分	0.650	0.291	4.984	0.012	1.915	1.082~3.389
入院第3 d GAS	1.016	0.354	8.245	<0.001	2.763	1.476~5.174
入院第7 d GAS	1.094	0.361	2.955	0.025	2.985	1.512~5.892
入院第3 d MTL	0.955	0.349	7.488	<0.001	2.599	1.385~4.876
入院第7 d MTL	1.081	0.360	9.012	<0.001	2.947	1.694~5.126
入院第3 d SS	-0.670	0.205	10.677	<0.001	0.512	0.371~0.706
入院第7 d SS	-0.459	0.174	6.965	<0.001	0.632	0.485~0.823
入院第3 d CCK-8	0.962	0.350	7.547	<0.001	2.616	1.378~4.965
入院第7 d CCK-8	1.041	0.357	8.507	<0.001	2.833	1.521~5.276
入院第3 d VIP	1.047	0.358	8.556	<0.001	2.849	1.426~5.694
入院第7 d VIP	1.196	0.394	3.308	<0.001	9.221	1.847~5.926

表4 血清、血浆指标水平与应激性胃溃疡影响因素相关性

Table 4 Correlation between serum and plasma levels and factors affecting stress gastric ulcer

项目	出血部位		脑出血量		颅内压		GCS评分		
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	
GAS	入院第3 d	0.612	0.001	0.625	0.001	0.604	0.000	0.714	0.000
	入院第7 d	0.716	0.000	0.520	0.000	0.615	0.000	0.632	0.000
MTL	入院第3 d	0.421	0.001	0.711	0.000	0.609	0.000	0.598	0.000
	入院第7 d	0.745	0.000	0.452	0.000	0.498	0.000	0.625	0.000
SS	入院第3 d	-0.622	0.001	-0.614	0.010	-0.512	0.010	-0.723	0.010
	入院第7 d	-0.704	0.000	-0.730	0.000	-0.721	0.000	-0.605	0.000
CCK-8	入院第3 d	0.532	0.001	0.612	0.001	0.606	0.001	0.531	0.001
	入院第7 d	0.698	0.000	0.490	0.000	0.585	0.000	0.616	0.000
VIP	入院第3 d	0.625	0.001	0.606	0.001	0.631	0.001	0.523	0.001
	入院第7 d	0.521	0.000	0.745	0.000	0.755	0.000	0.635	0.000



注:A为CCK-8 ROC曲线; B为GAS ROC曲线; C为MTL ROC曲线; D为SS ROC曲线; E为VIP ROC曲线。

图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

引起交感神经兴奋,儿茶酚胺类水平增加,收缩胃肠黏膜血管,致使胃黏膜缺氧缺血,减少胃酸分泌,促进GAS反馈性增加;持续颅内压增高,可刺激副交感核及中枢,兴奋迷走神经纤维,引起GAS

分泌增加^[13]。本研究中入院第3、7 d,并发胃溃疡患者MTL水平高于未并发胃溃疡患者,原因在于重症高血压脑出血早期儿茶酚胺类物质大量增加,颅内压持续升高,刺激中枢、副交感神经,兴奋

迷走神经纤维,介导MTL胃肠收缩作用,进而刺激MTL分泌增加;从而反馈性增加血浆MIL水平,故MTL水平与重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡发病有关。

SS、CCK-8参与胃肠运动、激素分泌、血压调节等功能调节,本研究中入院第3、7d,并发胃溃疡患者SS水平低于未并发胃溃疡患者,CCK-8水平高于未并发胃溃疡患者,且二者与高血压脑出血并发应激性胃溃疡密切相关,考虑可能是SS可抑制人体胃蠕动、GAS及胃酸分泌、胃蛋白酶释放,可减少胃酸对胃黏膜的腐蚀作用,其分泌减少可致使胃酸分泌增加,削弱胃十二指肠黏膜的防御功能,从而增加胃黏膜发生风险^[14]。CCK-8作为一种神经递质调节胆囊收缩功能可刺激胆囊收缩,促进胆汁分泌及排除,促进胰腺消化酶、碳酸氢盐分泌,延缓胃排空,抑制胃酸分泌,加之胆盐相对增加,可溶解胃黏液,破坏胃黏膜屏障,促进溃疡发生^[15]。

VIP是一种存在于胃肠道神经元中的神经介质,入院第3、7d,并发胃溃疡患者VIP水平高于未并发胃溃疡患者,VIP作为一种胃肠运动抑制性递质,脑出血发生后,其分泌增加,胃运动受阻,胃排空减慢,胃内胃酸存储时间延长,进而增加胃酸对胃壁的消化作用,而相对削弱胃黏膜防御能力,致使胃酸消化作用与胃黏膜防御功能间失衡,从而增加应激性胃溃疡发生风险^[16],故VIP水平升高为应激性胃溃疡发病危险因素。

综上所述,脑干出血、脑出血量 ≥ 20 mL、颅内压增高、GCS及GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP均为重症高血压脑出血并发应激性胃溃疡患者影响因素,脑出血发生后密切监测GAS、MTL、SS、CCK-8、VIP水平,可预测应激性胃溃疡的发生。

参考文献

- [1] Liu X, Zhang P, Guo C, et al. Effect of rehabilitation therapy and nursing intervention on postoperative recovery of patients with hypertensive intracerebral hemorrhage [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(6): 4598-4604.
- [2] Gui C, Gao Y, Hu D, et al. Neuroendoscopic minimally invasive surgery and small bone window craniotomy hematoma clearance in the treatment of hypertensive cerebral hemorrhage [J]. *Pak J Med Sci*, 2019, 35(2): 377-382.
- [3] 马迪,王威,许晓英,等.基于免疫共沉淀技术探讨涤痰通瘀方对急性脑出血大鼠应激性肝损害的调控作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(2): 52-56.
- [4] 陈慧敏,黄昌宝,狄佳,等.急性脑卒中患者发生应激性溃疡并发症的危险因素分析[J]. *临床急诊杂志*, 2015, 16(3): 186-188.
- [5] 叶峰,王晶.兰索拉唑对高血压脑出血后应激性溃疡患者胃黏膜损伤及应激反应的影响[J]. *江苏医药*, 2018, 44(9): 34-37.
- [6] 黄鹤飞,张伟杰,杨庆,等.戊己丸对炎症后肠易激综合征大鼠脑肠肽的调控作用[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 265-271.
- [7] 齐娜,郑玉强,李素,等.大承气汤脐部湿热敷治疗AECOPD合并II型呼吸衰竭NIV并发腹胀患者胃肠动力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5): 87-92.
- [8] 王颂歌,余会丽,马明,等.抗菌药物对幽门螺杆菌感染胃溃疡患者血清炎症因子及胃泌素指标的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(11): 2470-2472.
- [9] 刘剑刚,张蕾,张庆翔,等.阿司匹林和氯吡格雷联合应用致急性心肌梗死后大鼠胃黏膜损伤和微血管变化的药理机制初探[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(10): 1002.
- [10] 李婧婷,关翰宇,马佳佳,等.艾灸对应激性胃溃疡大鼠血清及脑中促肾上腺皮质激素释放激素及促肾上腺皮质激素含量的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(5): 347-351.
- [11] 邓永嘉,刘建平,柳婷,等.高血压脑出血手术治疗后并发胃应激出血的因素分析[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2016, 21(3): 441-443.
- [12] 邝业兴,谢志强,吴嘉禧.高血压脑出血患者术后并发胃应激出血的相关因素分析[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2015, 23(1): 80-81.
- [13] 付晨露,马佳佳,关翰宇,等.艾灸对应激性溃疡模型大鼠血清和下丘脑中GAS、SS表达的影响[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(5): 107-110.
- [14] 陈新贵,许勋良,段礼兴,等.生长抑素及凝血酶在上消化道溃疡出血治疗中的应用及安全性分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(2): 307-310.
- [15] 胡斌杰.益气活血方在消化性溃疡愈合过程中对胃肠激素影响的研究[D]. *南京中医药大学*, 2016.
- [16] 王秋梅,赵庆,黄仕明,等.早期肠内营养与肠外营养在预防肝性脑病患者应激性溃疡出血和感染的疗效对比分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(22): 5138-5140.

婴幼儿特应性皮炎血清 TIgE、sIgE 与病情的相关性研究

阮富旺^{1*} 杨万勇¹ 张志斌² 阮继锋³ 陈小珑¹

[摘要] 目的 明确婴幼儿特应性皮炎血清总 IgE、过敏原特异性 IgE 与特应性皮炎病情的相关性。方法 按照特应性皮炎积分(SCORAD)评分方法评估 281 例婴幼儿特应性皮炎严重程度,检测特应性皮炎患儿和同期健康婴幼儿血清总 IgE 及过敏原特异性 IgE 水平。结果 特应性皮炎婴幼儿血清总 IgE 及过敏原特异性 IgE 水平显著高于健康婴幼儿,差异有统计学意义($P<0.05$);重度组显著高于中度与轻度组,中度组显著高于轻度组,差异均有统计学意义($P<0.05$);血清总 IgE、食物性混合过敏原特异性 IgE 和吸入性混合过敏原特异性 IgE 浓度水平与 SCORAD 评分均呈显著正相关($r=0.795, P<0.001$; $r=0.873, P<0.001$; $r=0.623, P<0.001$)。结论 血清总 IgE 和过敏原特异性 IgE 与婴幼儿特应性皮炎病情密切相关,其浓度水平随病情的加重呈上升趋势。

[关键词] 婴幼儿; 特应性皮炎; 过敏原; 特异性 IgE

The correlations between the serum tige, sIgE and the condition of infants with atopic dermatitis

RUAN Fuwang^{1*}, YANG Wanyong¹, ZHANG Zhibin², RUAN Jifeng³, CHEN Xiaolong¹

(1. Medical Inspection Center of Dongguan Guanghua Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000;

2. Department of Clinical Laboratory, Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000;

3. Department of Pediatrics, Guanghua Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000)

[ABSTRACT] Objective To clarify the correlations between serum total IgE, allergen specific IgE and the condition of atopic dermatitis in infants and young children. Methods The severity of atopic dermatitis in 281 infants was assessed according to SCORAD score. The serum total IgE and allergen specific IgE levels were measured in children with atopic dermatitis and healthy infants at the same time. Results The level of serum total IgE and allergen specific IgE in infants with atopic dermatitis was significantly higher than the healthy infants ($P<0.05$); and severe group was significantly higher than the moderate, and the moderate group was significantly higher than the mild group ($P<0.05$); There was a significant positive correlations between SCORAD score and serum total IgE, food specific IgE and inhalation specific IgE ($r=0.795, P<0.001$; $r=0.873, P<0.001$; $r=0.623, P<0.001$, respectively). Conclusion Serum total IgE and allergen specific IgE are significantly related to the condition of atopic dermatitis in infants and young children, and the concentration level increases with the aggravation of the disease.

[KEY WORDS] Infant; Atopic dermatitis; Allergen; Specific IgE

基金项目:东莞市社会科技发展(一般)项目(201950715060662)

作者单位:1. 东莞光华医院医学检验中心,广东,东莞 52300

2. 东莞市人民医院检验科,广东,东莞 523000

3. 东莞光华医院儿科,广东,东莞 523000

*通信作者:阮富旺, E-mail: ruanfw@qq.com

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种常初发于婴幼儿期的慢性、炎症性和复发性皮肤病,首次发病大多于出生后6个月内,主要表现为面部和头部皮肤湿疹样的损害,伴以剧烈瘙痒并且病情反复为特征,对患儿的生活造成严重影响^[1],部分患儿因病情反复迁延至成年,常伴发其他变态反应性疾病^[2]。血清总IgE(Total IgE, TIgE)、过敏原特异性IgE(specific IgE, sIgE)是AD临床诊疗过程中最常用的生物标志物;目前,血清TIgE、过敏原sIgE与AD相关性研究的对象主要集中于成人或较大年龄段的儿童,很少有研究证实婴幼儿血清TIgE与sIgE浓度水平与AD发展及病情严重程度相关性,本次研究通过检测分析1~24月龄AD患儿血清TIgE、sIgE浓度水平及其分布情况,并进一步探讨它们与AD病情的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取自2016年2月至2019年5月在本院诊断为AD的婴幼儿281例和同期儿童保健门诊体检健康的婴幼儿280例分别作为AD组和对照组。其中,AD组男142例,女139例,年龄1~24月龄,平均年龄(12.08±9.28)个月;对照组男140例,女140例,年龄1~24月龄,平均年龄(12.35±10.18)个月。AD组和对照组的性别和年龄之间的差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

AD组纳入标准:患儿家属或监护人同意并自

愿参加本次研究,符合《中国特应性皮炎诊疗指南(2014版)》推荐的AD Williams诊断标准^[3-4];婴幼儿月龄介于1~24月之间;AD初发;不伴有其他严重疾病(如肝、肾功能衰竭等)。对照组纳入标准:家属或监护人同意并自愿参加本次研究;婴幼儿月龄介于1~24月之间,身体健康,无既往AD病史;无皮疹。排除标准:患儿家属或监护人不同意参与本次研究;婴幼儿月龄小于1月或大于24月;存在AD既往史、皮疹;患儿研究资料不完整。

1.2 主要试剂与仪器

血清总IgE试剂及配套校准品采购自瑞士Roche公司;食物性混合过敏原sIgE(Fx5)、吸入性混合过敏原sIgE(Phadiatop)和单项过敏原sIgE试剂及配套校准品采购自瑞典Phadia公司。全自动电化学发光免疫分析仪采购自瑞士Roche公司(型号:Cobas E411);全自动荧光免疫分析仪采购自瑞典Phadia公司(型号:Phadia 250)。

1.3 方法

采集研究对象的静脉血3 mL,室温静置(20~25℃)30 min,3 500 r/min离心10 min,分离血清后检测TIgE、F5和Phadiatop;当AD组F5或Phadiatop筛查结果 >0.1 kUa/L时,进行单项的食物或吸入性过敏原sIgE项检测。F5、Phadiatop、食物或吸入性单项过敏原sIgE包含项目见表1。依据特应性皮炎积分(Scoring of Atopic Dermatitis, SCORAD)标准进行分级,其中 <25 分为轻度,25~50分为中度, >50 分为重度。

表1 Fx5、Phadiatop、食物或吸入性单项过敏原sIgE项目表
Table 1 List of items of Fx5, Phadiatop, food or inhaled single allergen sIgE

名称	sIgE
Fx5	小麦,花生,鸡蛋白,牛奶,鱼,黄豆
Phadiatop	屋尘螨,粉尘螨,猫皮屑,马皮屑,狗皮屑,梯牧草,分枝孢霉,疣皮桦,油橄榄,艾蒿,药用墙草
食物性单项过敏原sIgE	鸡蛋白、小麦、牛奶、花生、虾
吸入性单项过敏原sIgE	粉尘螨、屋尘螨、狗毛、猫毛

1.5 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用Pearson相关性分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清TIgE、F5和Phadiatop浓度水平比较

按照SCORAD评分将AD组分为轻度、中度和重度3组,血清TIgE、F5和Phadiatop比较结

果:重度>中度>轻度>观察组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 按病情分组各组血清 TIgE、Fx5 及 Phadiatop 水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of serum TIgE, Fx5 and Phadiatop levels in groups grouped by disease [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	TIgE (IU/mL)	Fx5 (kUa/L)	Phadiatop (kUa/L)
AD组				
轻度组	95	106.35±33.35 ^a	0.52±0.25 ^a	0.49±0.21 ^a
中度组	94	160.23±48.22 ^{ab}	3.26±1.02 ^{ab}	2.24±0.82 ^{ab}
重度组	92	325.67±65.17 ^{ab}	6.12±1.71 ^{ab}	4.81±1.62 ^{ab}
对照组	280	8.12±3.02	0.08±0.015	0.06±0.020
F 值		260.180	159.053	53.851
P 值		0.000	0.000	0.000

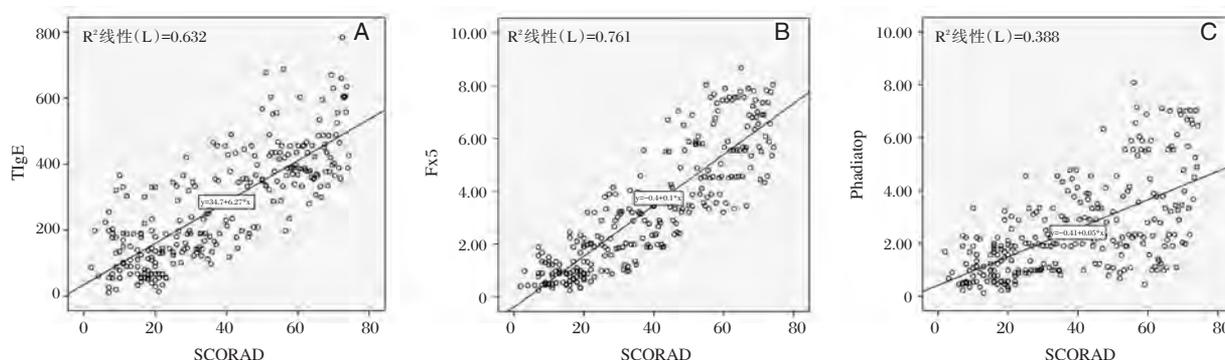
注:与对照组相比较,^a $P<0.05$;与轻度组相比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 血清 TIgE、Fx5 和 Phadiatop 浓度水平与 AD 病情严重程度相关性

Pearson 相关分析显示,血清 TIgE、Fx5 和 Phadiatop 浓度水平与 AD 病情严重程度 (SCORAD 评分) 呈显著正相关 ($r=0.795, P<0.001$; $r=0.873, P<0.001$; $r=0.623, P<0.001$)。见图 1。

2.3 不同月龄分组血清 TIgE、Fx5 和 Phadiatop 水平比较

根据月龄将 AD 组和对照组分别按照 1~6 月龄 (Months of age, M)、7~12M、13~18M、19~24M 分组,AD 组各分组血清 TIgE、Fx5 和 Phadiatop 浓度水平随着年龄增长呈上升趋势,并显著高于对应对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。



注:A. 血清 TIgE 浓度水平与 SCORAD 评分关系; B. Fx5 浓度水平与 SCORAD 评分关系; C. Phadiatop 浓度水平与 SCORAD 评分关系。

图1 TIgE、Fx5 和 Phadiatop 浓度水平与 SCORAD 评分相关性

Figure 1 Correlations between the levels of Tige, Fx5 and Phadiatop and SCORAD scores

表3 按月龄分组各组血清 TIgE、Fx5 以及 Phadiatop 水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Comparison of serum TIgE, Fx5 and Phadiatop levels among groups by month age [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	TIgE (IU/mL)	Fx5 (kUa/L)	Phadiatop (kUa/L)
AD组				
1~6 M	55	92.05±33.31	0.83±0.32	0.42±0.22
7~12 M	75	120.12±45.32	3.13±1.41	0.70±0.32
13~18 M	73	193.22±61.05	6.61±2.31	2.26±0.77
19~24 M	77	326.35±75.35	9.90±3.02	3.85±0.95
对照组				
1~6 M	53	5.31±2.25	0.04±0.014	0.03±0.011
7~12 M	76	8.20±3.30	0.05±0.012	0.06±0.013
13~18 M	72	12.55±5.29	0.06±0.011	0.06±0.012
19~24 M	79	33.15±9.44	0.05±0.016	0.08±0.017
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

2.4 AD组过敏原 sIgE 分布情况

当 AD 组 Fx5 或 Phadiatop 筛查结果 >0.1 kUa/L 时,进行食物或吸入性过敏原单项 sIgE 项检测,分布见表 4。

3 讨论

IgE 是一种分泌型免疫球蛋白,1996 年日本学者 Ishizaka 首次在豚草过敏患者的血清中发现,后续的研究证实 IgE 在 AD 的发生以及皮炎的形成中起了重要的作用^[5-6]。IgE 与 AD 病情的相关性仍存在一定的争论,有学者认为^[7],AD 患者血清 TIgE 及 sIgE 浓度水平升高程度与皮损严重程度呈正相关,病程越长其血清浓度水平就越高,并与 SCORAD 评分呈正相关;也有学者认为 AD 患者血清 TIgE 水平虽与病情有一定的相关性,但与病

表4 AD组过敏原sIgE浓度水平分布情况 [n(%)]

Table 4 distribution of allergen sIge in AD group		[n(%)]		
sIgE	n	>0.10 kUa/L	≥0.35 kUa/L	0.1~0.34 kUa/L
食物组	281			
Fx5	271(96.4)	220(78.3)	51(18.1)	
牛奶	121(43.1)	91(32.4)	30(10.7)	
鸡蛋白	106(37.7)	85(30.2)	21(7.5)	
小麦	40(14.2)	28(10.0)	12(4.3)	
花生	12(4.3)	10(3.6)	2(0.7)	
虾	32(11.4)	26(9.3)	6(2.1)	
吸入组				
Phadiatop	98(34.9)	66(23.5)	32(11.4)	
屋尘螨	58(20.6)	40(14.2)	18(6.4)	
粉尘螨	48(17.1)	33(11.7)	15(5.3)	
猫毛	9(3.2)	7(2.5)	2(0.7)	
狗毛	13(4.6)	9(3.2)	4(1.4)	

情的严重程度无关^[8];研究结论的不一致可能与研究对象、年龄、诊断标准和检测系统性能差异有关;此外,AD易感基因遗传多态性也是重要的潜在因素^[9]。

本次研究显示,随着AD病情的加重,婴幼儿血清TIgE和过敏原sIgE浓度水平逐渐升高,并可同时出现多项过敏原sIgE阳性,与部分文献报道一致^[10],AD其确切发病机制及病因尚不明确,可能与遗传和环境因素等相互作用有关^[11];Inside-out AD发病假说认为,在特异性免疫反应或固有的相关基因缺陷等遗传因素与过敏原进入、微生物定植等环境因素的共同作用下,导致皮肤角质层原始结构异常和皮肤屏障功能受损,致使致敏原易于侵入并诱导AD炎症反应发生;传统观点认为^[12],IL-4可以促进Th0细胞分化为Th2细胞并诱导IgE型转化,继而导致B细胞过度释放IgE,造成血液中IgE水平升高。

食物和吸入性的过敏原往往被认为是婴幼儿AD潜在的致病因素^[13],国外一项研究发现^[14],在6月龄的婴幼儿中,有11%的婴幼儿对七种常见食物和吸入性过敏原中的至少一种敏感(sIgE>0.35 kUa/L);本次研究AD组食物性过敏原sIgE阳性率分布依次为:牛奶>鸡蛋>小麦>虾>花生,吸入性过敏原阳性率分布依次为:屋尘螨>粉尘螨>狗毛>猫毛,研究结果与陈薇等^[15]报道相似。婴幼儿由于其肠道屏障不成熟^[16],对致敏性抗原屏障保护功能的不完善,容易使一些通透性高和大分子物质经过肠黏膜组织进入患儿体内导致过敏,随着

免疫功能和消化系统逐渐发育完善,对食物性过敏原逐渐耐受和户外活动增加,部分原来对食物过敏的婴幼儿,继而对吸入性过敏原过敏^[17]。

本次研究还显示,AD患儿血清TIgE、F_{x5}和Phadiatop浓度水平与患病年龄呈正相关,可能与婴幼儿免疫系统早期发育不成熟,过敏原诱导的细胞因子应答能力较差有关,随着年龄增长和免疫系统逐渐发育完善,机体致敏后产生的IgE抗体浓度水平随之增加^[18];目前,过敏原sIgE结果一直按照国际RAST 6级分级标准进行解读,即将0.35 kUa/L作为临界值(Cut off值),当sIgE>0.35 kUa/L时表示结果为阳性^[19];然而,婴幼儿由于其免疫系统发育原因,机体致敏后其产生的IgE抗体浓度水平与成人或较大年龄段儿童存在一定差异性,国外有研究^[20]认为婴幼儿sIgE>0.10 kUa/L时,即表示被致敏,本次研究AD组共有110例过敏原sIgE检测结果介于0.10~0.34 kUa/L之间,使用0.35 kUa/L作为Cut off值评估婴幼儿致敏状态时,可能会造成误判;国外对低致敏组婴幼儿(0.1~0.34 kUa/L)和非致敏组婴幼儿(sIgE<0.1 kUa/L)与将来发生过敏性疾病相关性的研究结果表明^[14,20],低致敏组婴幼儿未来发展为过敏性疾病的比例显著高于非致敏组。因此,在婴幼儿期检测到的过敏原sIgE即使水平较低(0.1~0.34 kUa/L),仍可能免疫系统致敏的信号,是未来发生过敏性疾病的重要预测信息,需定期跟踪随访,必要时尽早干预;目前国内尚未见到有关婴幼儿过敏原sIgE Cut off值方面的研究。

综上所述,TIgE、过敏原sIgE与婴幼儿AD的病情密切相关,虽然过敏原sIgE在AD的临床诊疗应用中存在一定的局限性,其阳性仅为致敏的标志,但其在婴幼儿特应性皮炎病情监测应用中意义重大。

参考文献

- [1] 韦祝,刘向宇,罗勇奇,等.血清特异性抗体测定在婴幼儿特应性皮炎致敏原检测中的意义[J].中国妇幼保健,2016,31(5):996-998.
- [2] PATERNOSTER L, SAVENIJE O E M, HERON J, et al. Identification of atopic dermatitis subgroups in children from 2 longitudinal birth cohorts [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(3):964-971.
- [3] 中华医学会皮肤性病学分会免疫学组,特应性皮炎协作研究中心.中国特应性皮炎诊疗指南(2014版)[J].全科医学临床与教育,2014,12(6):603-606.

- [4] 李欣泽. 1-12月龄婴儿特应性皮炎发病相关因素分析[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2016.
- [5] 张建中. 特应性皮炎的异质性与质谱特征[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2017, 24(05):303-306.
- [6] KIISKI V, KARLSSON O, REMITZ A, et al. High serum total IgE predicts poor long-term outcome in atopic dermatitis [J]. 2015, 95(8):943-947.
- [7] 刘茹, 黄鸣剑. 深度水解蛋白配方奶联合酪酸梭菌对改善婴儿湿疹的作用观察[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(02):198-199.
- [8] 张媛, 王慧丛, 颜敏. 儿童特应性皮炎严重程度与血清25-羟维生素D和总IgE水平的相关性[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(02):86-88.
- [9] KIM J, LEE S, KANG M, et al. Association of Genetic Polymorphisms with Atopic Dermatitis, Clinical Severity and Total IgE: A Replication and Extended Study [J]. Allergy, Asthma & Immunology Research, 2018, 10(4):397-405.
- [10] 刘方可. 儿童特应性皮炎外周血免疫球蛋白表达的研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2018.
- [11] JURAKIĆ T R, MARINOVIĆ B. The Role of Impaired Epidermal Barrier Function in Atopic Dermatitis [J]. Acta Dermatovenerologica Croatica Adc, 2016, 24(2): 95-109.
- [12] KANTOR R, SILVERBERG J I. Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis [J]. Expert Review of Clinical Immunology, 2017, 13(1): 15-26.
- [13] 张存雪, 陈艳, 杨配力, 等. IgE介导食物过敏和婴幼儿特应性皮炎的相关性研究[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(11):1346-1348.
- [14] NILSSON S F, LILJA G, JÄRNBERT-PETTERSSON H, et al. Relevance of low specific IgE levels to egg, milk and peanut in infancy [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2019, 49(3):308-316.
- [15] 陈薇, 欧书腾, 陈礼娟, 等. 郴州地区3803例儿童过敏性疾病常见过敏原检测分析[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(22):3422-3424.
- [16] 陈黎, 马展, 张泓, 等. 过敏原特异性IgE检测在新生儿湿疹中的价值[J]. 检验医学, 2019, 34(8):736-738.
- [17] 王晶华, 刘聪聪, 潘璐, 杨思睿. 儿童过敏诊治研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(11):954-962.
- [18] 柯海劲, 陈小燕, 郭勇, 等. 牛奶蛋白过敏婴幼儿常见过敏原sIgE阳性率分析[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(2):363-367.
- [19] 黄志锋, 罗文婷, 邹湘玮, 等. 32306项次可疑过敏性疾病患者猫狗毛过敏原特异性IgE结果分析[J]. 现代预防医学, 2019, 46(13):2431-2435.
- [20] HAMILTON R G. Clinical laboratories worldwide need to report IgE antibody results on clinical specimens as analytical results and not use differential positive thresholds [J]. 2015, 136(3):811-812.

(上接第126页)

- [23] Wu DM, Wen X, Han XR, et al. Role of Circular RNA DLEU2 in Human Acute Myeloid Leukemia [J]. Mol Cell Biol, 2018, 38(20):e00259-18.
- [24] Zhu P, Zhu X, Wu J, et al. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3 [J]. Nat Immunol, 2019, 20(2):183-194.
- [25] Shang J, Chen WM, Wang ZH, et al. CircPAN3 mediates drug resistance in acute myeloid leukemia through the miR-153-5p/miR-183-5p-XIAP axis [J]. Exp Hematol, 2019, 70:42-54.
- [26] Shang J, Chen WM, Liu S, et al. CircPAN3 contributes to drug resistance in acute myeloid leukemia through regulation of autophagy [J]. Leuk Res, 2019, 85:106198.
- [27] Okcanoglu TB, Gunduz C. Circular RNAs in leukemia [J]. Biomed Rep, 2019:1-5.
- [28] Li W, Zhong C, Jiao J, et al. Characterization of hsa_circ_0004277 as a New Biomarker for Acute Myeloid Leukemia via Circular RNA Profile and Bioinformatics Analysis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3):597.
- [29] Fan H, Li Y, Liu C, et al. Circular RNA-100290 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in acute myeloid leukemia cells via sponging miR-203 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 507(1-4):178-184.
- [30] Ping L, Jian-Jun C, Chu-Shu L, et al. Silencing of circ_0009910 inhibits acute myeloid leukemia cell growth through increasing miR-20a-5p [J]. Blood Cells Mol Dis, 2019, 75:41-47.
- [31] Chen H, Liu T, Liu J, et al. Circ-ANAPC7 is Upregulated in Acute Myeloid Leukemia and Appears to Target the MiR-181 Family [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(5):1998-2007.
- [32] A LA, Tolomeo D, Cifola I, et al. MYC-containing amplicons in acute myeloid leukemia: genomic structures, evolution, and transcriptional consequences [J]. Leukemia, 2018, 32(10):2152-2166.

血管瘤样纤维组织细胞瘤病理诊断2例并文献复习

王芳^{1*} 相龙全¹ 王海庆² 程军³ 周凤娟¹

【摘要】 **目的** 探讨血管瘤样纤维组织细胞瘤(AFH)的临床特征、病理特点、免疫组化表达以及鉴别诊断。**方法** 收集血管瘤样纤维组织细胞瘤2例,分析其临床症状,显微镜下观察其组织学形态及免疫组化特点,并复习文献进行鉴别诊断。**结果** 临床特点:2例均为男性患者,年龄分别为14岁、7岁,表现为真皮深层或皮下缓慢生长的无痛性肿块,两者均行麻醉下单纯切除肿物,术后未行其它方式辅助治疗,分别随访37个月和33个月,无复发、转移。病理检查:2例均为单发肿瘤,切面灰白、灰红,囊实性,质硬,与周围组织界尚清;其中1例左侧腹股沟淋巴结肿大,大小约2.8 cm×2.2 cm×1cm,切面灰红,质细腻。镜下特点:肿瘤细胞呈组织细胞样特点,由较厚的假包膜,周围见大量的淋巴细胞,浆细胞浸润。免疫组化:肿瘤细胞 Vimentin(+),Desmin 部分(+),CD68 部分(+),EMA(+),CD99(+),SMA 部分(+),MyoD1(-),CD34(-),CD31(-),S-100(-),CyclinD1(+),Ki-67 阳性率5%~8%。**结论** 血管瘤样纤维组织细胞瘤属于罕见的交界性病变,其病理诊断主要依靠组织形态及免疫组织化学标记明确诊断。表现为真皮深层或皮下缓慢生长的无痛性肿块,局部适当进行扩大切除;术后随访是主要处理原则。

【关键词】 血管瘤样纤维组织细胞瘤;病理诊断;免疫组织化学

The histological features of Angiomatoid fibrous histiocytoma in 2 cases and literature review

WANG Fang^{1*}, XIANG Longquan¹, WANG Haiqing², CHENG Jun³, ZHOU Fengjuan¹

(1. Department of Pathology, Jining NO.1 People's Hospital, Jining, Shandong, China, 272111; 2. Department of Vascular Surgery, Jining NO.1 People's Hospital, Jining, Shandong, China, 272111; 3. Department of radiology, Binzhou People's Hospital, Binzhou, Shandong, China, 256610)

【ABSTRACT】 **Objective** To study the clinical feature, pathological characteristics, immunophenotype and the differential diagnosis of angiomatoid fibrous histiocytoma (AFH). **Methods** The clinical feature of two cases of angiomatoid fibrous histiocytoma were analyzed. The pathological characteristics, immunohistochemical study was carried out and the literatures were reviewed. **Results** Both of the two cases were male, age of 14 years old and 7 years old, respectively. Both of the painless solitary masses and left inguinal lymph nodes were resected completely under anesthesia with no other adjuvant treatment after operation. During a period of follow 37 months and 33 month the patients had no recurrence or distant metastasis. Gross examination showed that they were well circumscribed and had a grey cut surface, with focal cystic and solid change. The size of left inguinal lymph nodes were 2.8×2.2×1 cm, with grayish red colour and exquisite cut surface. Histologically, the tumor was composed of histiocytoid cells which was with a fibrous pseudocapsule surrounded by lymphocytes and plasma cells. Immunohistochemical study showed that Vimentin (+), EMA (+), CD99(+), CyclinD1(+); part of Desmin, CD68, SMA were positive. MyoD1, CD34, CD31, S-100 were negative, the positive of Ki-67 was 5%~8%. **Conclusions** AFH is a rare borderline tumor, and the de-

作者单位: 1. 济宁市第一人民医院病理科, 山东 济宁, 272111

2. 济宁市第一人民医院血管外科, 山东 济宁, 272111

3. 滨州市人民医院放射科, 山东 滨州, 256610

*通信作者: 王芳, E-mail: 461940072@qq.com

finitive diagnosis requires thorough histomorphology and immunohistochemical study. The patients primarily presented with a painless mass that grows deep in the dermis or subcutaneously; and the principle of treatment is enlarged surgical resection of local lesions and postoperative follow-up.

[KEY WORDS] Angiomatoid fibrous histiocytoma; Histological features; Immunohistochemistry

血管瘤样纤维组织细胞瘤(angiomatoid fibrous histiocytoma, AFH)主要发生在儿童及青年人,是一种中间型肿瘤,罕见,常见于四肢真皮深层或皮下,临床主要表现为无痛缓慢生长的肿块,偶然发现,无不适症状。镜下特征:低倍镜下肿瘤境界清楚,有较厚的纤维性假包膜,包膜处有较多淋巴细胞、浆细胞浸润,形成“外周袖套”结构,部分区域淋巴组织增生形成淋巴滤泡。瘤组织呈实性片状或结节状分布,部分区域席纹状排列,间质内可见散在分布的淋巴细胞、浆细胞,可见薄壁血管和不规则的假性血管腔,高倍镜下瘤细胞大多形态温和,呈多边形、卵圆形或梭形,肿瘤细胞胞质淡染、嗜酸性,和圆形、卵圆形、核膜清晰,染色质稀疏,部分肿瘤细胞可见核仁,多位于中央^[1]。

1 材料和方法

2例血管瘤样纤维组织细胞瘤,标本以10%中

性福尔马林固定,石蜡包埋,常规切片,分别进行HE染色及免疫组织化学标记。免疫组织化学采用罗氏全自动免疫组织化学染色仪进行染色。所用一抗 Vimentin、Desmin、CD68、EMA、CD99、MyoD1、CD34、CD31、SMA、S-100、CyclinD1、CD20、CD3、CD10、Bcl-2和Ki-67均为迈新公司产品。随访2例患者分别37个月、33个月,患者身体均状况良好,无复发、转移。

2 结果

2.1 临床资料

2例男性患者,术中见2例位于皮下,肿物较硬,边界尚清,活动差,肿物内可见有暗黑色陈旧性积血;其中1例左腹股沟见肿大淋巴结,边界尚清,活动尚可,大小约(3×2×2)cm。(见表1)

2.2 病理检查

大体检查:单发肿块,肿瘤大小分别约为(3.5×

表1 2例血管瘤样纤维组织细胞瘤临床资料

Table 1 Clinical datas of AFH in 2 cases

序号	性别	年龄	病史	部位	大小(cm)	生长方式	随访	伴随症状
1	男	14岁	左背部肿物、左腹股沟及左颈部淋巴结肿大4个月	左背部皮下	3.5×2.8×2.2	边界尚清,位于真皮下	37个月	伴左腹股沟及左颈部淋巴结肿大
2	男	7岁	右腹股沟区肿物肿大3个月	右腹股沟皮下	2.6×1.8×0.8	边界尚清,位于皮下	33个月	无

2.8×2.2)cm,(2.6×1.8×0.8)cm,切面灰白、灰红,囊实性,质硬,与周围组织界清。

镜下特点:低倍镜下,肿瘤周围有较厚的纤维性的假包膜包被,被膜内外有较多的淋巴细胞及浆细胞浸润,瘤细胞呈不规则巢状、片状及结节状生长,镜下有血管腔样结构;高倍镜下瘤细胞呈多边形的组织细胞样细胞组成,部分呈梭形或肌样细胞分布,胞质丰富,核圆形、卵圆形或不规则形,染色质较细腻,核仁不明显,偶见核分裂。背景中有含铁血黄素沉积,未见坏死(图1)。

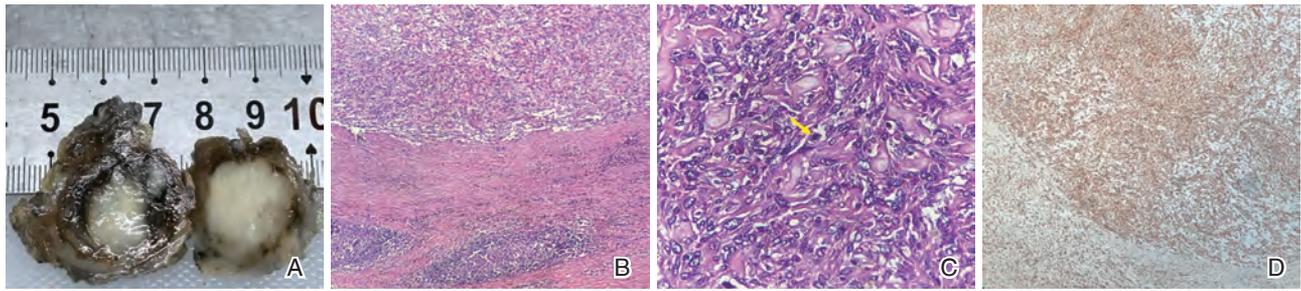
2.3 免疫组化

2例肿瘤瘤细胞 Vimentin(+),Desmin 部分

(+),CD68 部分(+),EMA(+),CD99(+),SMA 部分(+),MyoD1(-),CD34(-),CD31(-),S-100(-),Ki-67 阳性率5%~8%,其中1例 CyclinD1(+);另一例腹股沟区淋巴结 CD20 滤泡区(+),CD3 滤泡间区(+),CD10 生发中心(+),Bcl-2(-),Ki-67 生发中心阳性率约80%,滤泡间区阳性率约15%。(见表2)

2.4 随访

术后分别随访37个月和33个月,患者身体状况良好,无复发、转移。其中1例对患者进行了37个月随访,左背部无复发、转移,左侧腹股沟区未见淋巴结肿大,左颈部淋巴结比手术前减小。



注: A. AFH 大体观; B. AFH 肿瘤周围有较厚的纤维性的假包膜包被 HE, ×200; C. AFH 肿瘤细胞呈多边形的组织细胞样细胞组成偶见核分裂 HE, ×400; D. Vimentin 弥漫阳性 IHC, ×200。

图 1 AFH 大体观、组织学及免疫组化表达

Figure 1 The general view, histological and immunohistochemical expression of AFH

表 2 2 例血管瘤样纤维组织细胞瘤免疫组化结果

Table 2 The immunohistochemical results of AFH in 2 cases

序号	性别	年龄	部位	免疫组化结果阳性	免疫组化结果阴性
1	男	14岁	左背部皮下	Vimentin、Desmin 部分、CD68 部分、EMA、CD99、SMA 部分、CyclinD1、Ki-67 阳性率 5%~8%	MyoD1、CD34、CD31、S-100
2	男	7岁	右腹股沟皮下	Vimentin、Desmin 部分、CD68 部分、EMA、CD99、SMA 部分、Ki-67 阳性率 5%~8%; 腹股沟区淋巴结 CD20 滤泡、CD3 滤泡间、CD10 生发中心	MyoD1、CD34、CD31、S-100、Bcl-2

3 讨论

3.1 文献复习

AFH 是一种好发于儿童和青少年的肿瘤, 40 岁以后极少发生, 罕见, 主要好发于四肢, 位于真皮深层或皮下缓慢性生长的结节。由呈片状分布的组织细胞样细胞和囊状扩张的假性血管腔组成, 肿瘤周边常有慢性淋巴细胞, 浆细胞浸润, 外被致密的纤维性假包膜^[2]。AFH 最初由 Enzinger 于 1979 首先提出, 起初被命名为血管瘤样恶性纤维组织细胞瘤, 并作为 MFH 的一种亚型, 但随后报道显示, AFH 在生物学行为属于低度恶性或交界性病变, 1994 年版 WHO 软组织分类^[3]将其归入中间型纤维组织细胞瘤中。后因肿瘤细胞分化方向不明确, 2002 版 WHO 肿瘤病理学及遗传学分类软组织肿瘤^[4]将其划入分化未定的肿瘤之中^[5]。有些患者可伴有全身症状, 如贫血、发热、体重减轻等症状, 这是由于肿瘤产生的细胞因子导致, 切除肿瘤后, 患者症状完全消失^[6]。本文中, 2 例患者均与文献中好发年龄一致, 其中 7 岁患者左颈部及左腹股沟淋巴结同时肿大, 与左背部肿瘤同时出现, 腹股沟淋巴结呈反应性增生伴滤泡间区较多浆细胞浸润, 提示机体处于免疫应答活跃期, 肿

瘤切除后, 肿大淋巴结减小, 证明本例患者肿大淋巴结与肿瘤产生的细胞因子相关。

AFH 大体形态, 肿瘤直径约 0.7~12 cm, 大小不等, 平均 2cm, 切面灰白、灰红, 囊实性, 与周围组织界清。组织学特点: 低倍镜下, 肿瘤周围有较厚的纤维性的假包膜包被, 被膜内外有较多的淋巴细胞及浆细胞浸润, 偶尔见淋巴滤泡或生发中心形成, 炎症细胞常形成套样结构。瘤细胞呈不规则巢状、片状及结节状生长, 镜下有无内皮细胞衬覆的假血管腔样结构构成^[7]。高倍镜下, 瘤细胞呈多边形、梭形、卵圆形和圆形组织样细胞, 部分呈梭形细胞或肌样细胞, 细胞质丰富、细腻, 呈淡嗜伊红染色, 核仁不明显, 可见核分裂 (1~4/10HPF), 背景中有含铁血黄素沉积, 未见坏死。少数病例可出现瘤细胞异型性或黏液样变性^[8]。关于 AFH 的组织学起源仍然不能明确, 有不同的观点认为, 肿瘤起源于血管内皮、组织细胞及淋巴结内肌样细胞等, 主要根据电镜内 Weibel-Palade 小体和免疫组织化学表达肌源性或组织细胞标记推测, 目前瘤细胞的分化方向尚未明确^[8-9]。免疫组化瘤细胞表达 Vimentin, 50%~67% 表达 Desmin, 50% 表达 CD99, 40% 表达 EMA, 15%~50% 表达 CD68, 不表达 CD34、CD31、S-100 和 HMB45, 不表

达横纹肌源性免疫标记如 MyoD1、Myogenin^[10]。本文中2例肿瘤细胞 Vimentin(+)、Desmin 部分(+)、CD68 部分(+)、EMA(+)、CD99(+)、SMA 部分(+)、MyoD1(-)、CD34(-)、CD31(-)、S-100(-), Ki-67 阳性率 5%-8%。本病的组织来源未确定,但是免疫组化 Vimentin、Desmin、CD68 阳性,提示肿瘤细胞可能来源于纤维母细胞或组织细胞^[11]。

由于 AFH 罕见,相关病例报道较少,根据相关文献报道 AFH 属于生长缓慢、可复发、偶有转移,预后较好的交界性肿瘤。由于 AFH 属于交界性肿瘤,宜采取局部扩大切除的治疗手段并定期随访^[12]。本文2例病例随访 37 个月和 33 个月均无复发及转移。

3.2 鉴别诊断

AFH 应与以下肿瘤进行鉴别诊断:①动脉瘤性纤维组织细胞瘤;②血管瘤;③恶性纤维组织细胞瘤;④淋巴结内栅栏状肌纤维母细胞瘤;⑤富于细胞性神经鞘瘤。

动脉瘤性纤维组织细胞瘤常发生在四肢及真皮,瘤体小,生长缓慢,可出现灶性出血及增生的毛细血管,可见海绵状、出血性裂隙,由于肿瘤自发性的出血引起肿瘤迅速增大而得名,与 AFH 易于混淆。但其缺少 AFH 纤维性假包膜及淋巴细胞、浆细胞套,并且该肿瘤不表达 Desmin、EMA 等^[13]。

AFH 常形成假性血管腔,与血管瘤组织学形态存在相似性,但是免疫组化能够帮助诊断,AFH 囊壁为无血管内皮衬覆的假性血管腔,CD31、CD34 不表达,而血管瘤两者呈阳性表达^[14]。

恶性纤维组织细胞瘤(malignant fibrous histiocytoma, MFH)是一组以席纹状排列为特征并含有多形性细胞和多核巨细胞的软组织肿瘤^[5],MFH 与 AFH 相似,但是 MFH 瘤细胞异型性明显,细胞呈多形性,核分裂易见。肿瘤内可见杜顿细胞、黄色瘤细胞,肿瘤呈席纹状排列,易见出血、坏死,缺少 AFH 结节状结构、假血管腔以及纤维性假包膜的淋巴细胞、浆细胞套^[15]。

淋巴结内栅栏状肌纤维母细胞瘤(intracanalicular palisaded myofibroblastoma, IPM)是一种好发于成人腹股沟淋巴结内,由束状、栅栏状排列的梭形细胞伴石棉样纤维以及间质出血和红细胞外渗为特征的罕见良性间叶性肿瘤。梭形细胞表达 Vimentin 和 actins,不表达 Desmin 和 S-100,可过表达 Cy-

clinD1。而 AFH 好发于儿童和青少年,组织学缺乏典型的石棉样纤维结节,免疫组化能将两者区分开^[16]。

富于细胞性神经鞘瘤(cellular schwannoma)主要好发于躯干、四肢和头颈部,但也可发生于淋巴结内^[17]。主要由交织条束状排列的梭形细胞组成,缺乏典型的神经鞘瘤中束状区(Antoni A 区)和网状区(Antoni B 区),肿瘤具有完整包膜,包膜外或包膜下可见淋巴细胞聚集,形成袖套样结构,梭形肿瘤细胞间可见到泡沫样细胞聚集以及伴有玻璃样变性的厚壁血管,在瘤内血管周围可见少量淋巴细胞浸润,形成淋巴血管套。免疫组化 S-100 弥漫强阳性,GFAP、Leu-7 和 PGP9.5,对诊断具有帮助^[5]。

参考文献

- [1] 王正,范钦和,王坚,丁永玲.实性型血管瘤样纤维组织细胞瘤临床病理观察[J].中华病理学杂志,2013,42(11):744-747.
- [2] 朱皓峰,温剑峰,等.血管瘤样纤维组织细胞瘤1例[J].诊断病理学杂志,2019,26(6):390-391.
- [3] Weiss SW. Histological typing of soft tissue tumors. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
- [4] Christopher DM, Fletcher K, Unni K, et al. WHO 肿瘤病理学及遗传学分类软组织肿瘤(2002).杨绍敏,廖松林,译.北京:诊断病理学杂志社,2005:103-105.
- [5] 王坚,朱雄增.软组织肿瘤病理学[M].人民卫生出版社,2008 第一版:185-188.
- [6] Billings SD, Folpe AL. Cutaneous and subcutaneous fibrohistiocytic tumors of intermediate malignancy: an update. Am J Dermatopathol, 2004,26(2):141-155.
- [7] 陈金平,周新成,等.肺部实性型血管瘤样纤维组织细胞瘤2例并文献复习[J].临床与实验病理学杂志,2019,35(2):219-221.
- [8] Pratibha R, Ahmed S. Angiomatoid variant of fibrous histiocytoma: a case report and review of literature. Int J Paediatr Dent, 2006,16(5):363-369.
- [9] Sun CC, Toker C, Breitenacker R. An ultrastructural study of angiomatoid fibrous histiocytoma. Cancer, 1982,49(10):2103-2111.
- [10] 陈民,王文超,于鸿,等.血管瘤样纤维组织细胞瘤三例并文献复习[J].肿瘤研究与临床,2016,28(8):555-557.
- [11] Raddaoui E, Donner LR, Panagopoulos I. Fusion of the FUS and ATF1 genes in a large, deep-seated angiomatoid fibrous histiocytoma. Diagn Mol Pathol, 2002,11(3):157-162.
- [12] 张荣君,黄海建,等.血管瘤样纤维组织细胞瘤10例临床病理及分子病理学研究[J].诊断病理学杂志,2018,25(1):28-31.

(下转第 189 页)

Taq DNA 聚合酶5'~3'外切活性对荧光定量PCR的影响

蒋析文* 刘霏珊 陈巍

[摘要] 目的 为探讨Taq DNA聚合酶(后简称Taq酶)中5'~3'外切酶活性在Taqman探针法荧光定量PCR中的作用及影响,指导热启动Taq酶性能改造,本文研究了不同热启动Taq聚合酶的5'~3' DNA外切酶活性差异,以及该活性的高低对Taqman探针法荧光定量PCR的影响。方法 使用荧光探针为底物,分别测定不同热启动Taq酶的聚合酶活性及外切酶活性,对比在相同聚合酶活性下外切酶活性的差异,以及在荧光定量PCR扩增反应中的差异。结果 在聚合酶活性相等的条件下,不同的热启动Taq聚合酶具有不同的5'~3' DNA外切酶活性,经化学修饰的Taq酶的5'~3' DNA外切酶活性分别下降2.7倍和4.55倍,经抗体修饰的Taq酶5'~3' DNA外切酶活性没有变化。在乙型肝炎病毒(HBV)DNA荧光定量PCR检测体系中,加入同等聚合酶活性单位的不同修饰方法制备热启动Taq酶,外切酶活性高的酶比活性低的酶ct值更低。结论 在Taqman探针法荧光定量PCR反应中,Taq酶对探针的外切降解过程是反应的限速步骤,提高Taq酶5'~3' DNA外切酶活性有利于提高反应效率。

[关键词] 定量PCR; Taq DNA聚合酶; DNA外切酶

Effects of Taq DNA Polymerase 5' ~ 3' Exoactivity on Real-Time quantitative PCR

JIANG Xiwen*, LIU Aishan, CHEN Wei

(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** In order to explore the role and influence of 5'~3' exonuclease activity in Taq polymerase in Taqman probe fluorescence quantitative PCR, and to guide the performance of hot-start Taq enzymes. To investigate the differences in 5' ~ 3' DNA exonuclease activity for different hot-start Taq polymerases and the effect of the activity on the Taqman probe quantitative PCR. **Methods** Fluorescent probes were used as substrates to determine the polymerase activity and exonuclease activity of different hot-start Taq enzymes, and to compare the difference in exonuclease activity and Q-PCR amplification efficiency under the same polymerase activity condition. **Results** Under the same conditions of polymerase activity, different hot-start Taq polymerases have different 5'~3' exonuclease activities. The 5'~3' DNA exonuclease activity of the chemically modified Taq enzyme decreased by 2.7 times and 4.55 times, respectively. The antibody-modified Taq enzyme 5' ~ 3' DNA exonase activity did not change. In the Hepatitis B virus (HBV) DNA fluorescent quantitative PCR detection system, different modification methods with equivalent polymerase active units were added to prepare hot-start Taq enzymes. Enzymes with high exonuclease activity have lower ct values

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10732401,2018ZX10306414)

作者单位:卫生部医药生物工程研究中心,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: yuanyecat@vip.sina.com

than enzymes with lower activity. **Conclusion** The exo-degradation of the probe is the rate-limiting step of the Taqman Q-PCR reaction, and increasing the 5'~3' exonuclease activity of the Taq enzyme can improve the reaction efficiency.

[KEY WORDS] quantitative PCR; Taq DNA polymerase; exonuclease

Taqman 法荧光定量 PCR 是利用 Taq DNA 聚合酶(后简称 Taq 酶)的 5'~3' DNA 外切活性,在 PCR 过程中切割与模板链结合的荧光探针,释放出荧光基团而产生信号^[1]。在反应过程中, Taq DNA 聚合酶的聚合酶活性区与 5'~3' DNA 外切活性区均参与反应^[2-4]。目前 Taq 酶标定的浓度为聚合酶活性单位浓度^[5-6],缺乏对 5'~3' DNA 外切活性的定量。由于 Taqman 探针法荧光定量 PCR 信号的产生与 Taq 酶的 5'~3' DNA 外切活性直接相关,因此本文研究了不同热启动 Taq 聚合酶的 5'~3' DNA 外切酶活性差异,以及该活性对 Taqman 探针法荧光定量 PCR 的影响,以期进一步了解 Taq 酶两种不同活性区在反应中所起的作用,并指导 Taqman 法荧光定量 PCR 反应的优化。

1 方法

1.1 材料

Taq 酶、Hotstar Taq 酶、HotStar-II Taq 酶均为达安基因制备的原料产品,浓度均为 10 U/ μ L。5'~3' DNA 外切酶活性检测底物为:Sub1: ATGCTG-GTTAAGCTGCCGTAGTCATGCAGTACGTCCGTACGTCA, Probe1: FAM-CAGCTTAACCAGCAT-BQH1。外切活性反应 buffer(10X): 500 mM Tris、500 mM KCl、20 mM MgCl₂、2.5 mM dNTP、pH8.8。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒为达安基因产品。

1.2 方法

1.2.1 5'~3' DNA 外切酶活性的测定

酶样品用保存液进行梯度稀释:5、4、3、2、1、0 U/ μ L,反应体系见表 1。

表 1 5'~3' DNA 外切酶活性测定反应体系
Table 1 The Reaction of 5'~3' exonuclease activity assay

组分	用量(μ L)
酶稀释样品	1.00
反应 buffer(10 X)	2.50
Sub1(10 pmol/ μ L)	0.25
Probe1(10 pmol/ μ L)	0.50
灭菌水	补至 25

反应体系放置于 Q5 荧光定量 PCR 仪中,设置荧光检测通道为 FAM,设置反应程序:95 $^{\circ}$ C 10 min,(95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s 并读取荧光)X 40 个循环。反应后将原始荧光数据导出,以荧光强度(relative fluorescence units, RFU)为纵坐标,反应时间(min)为横坐标作图,得到在各浓度下的外切酶反应动力学曲线。计算反应前期的 RFU 值线性增长部分(线性 R²>0.9)的斜率,即为各聚合酶浓度梯度下外切酶活性测试的反应速率(RFU/min)。

1.2.2 不同酶的 5'~3' DNA 外切酶活性的对比

根据 1.2 测定的同一个聚合酶在不同聚合酶活性浓度下的外切酶活性反应速率,以反应速率为纵坐标,聚合酶活性浓度(U/ μ L)为横坐标作图,得线性关系方程,方程的斜率即为在单位聚合酶活性浓度下所具有的外切酶活性。对比不同酶所作线性关系方程的斜率,即可计算其外切酶活性的差异倍数。

1.2.3 不同酶在 HBV 病毒 DNA 荧光定量 PCR 反应体系中的性能测试

取达安 HBV 病毒 DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒,按照使用说明书的方法进行阳性参照品的提取制备。将酶样品稀释至 1 U/ μ L,然后按使用说明每反应加入 27 μ L 反应液 A 及 3 μ L 的 1 U/ μ L 酶样品,混合均匀后加入 20 μ L 阳性参照样品提取物。按 95 $^{\circ}$ C 10 min,(95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s 并读取荧光)X40 个循环,进行 PCR 反应。

2 结果

2.1 5'~3' DNA 外切酶活性的测定

5'~3' DNA 外切酶活性的测定原理如图 1。Taq 聚合酶的 5'~3' DNA 外切酶活性不依赖于上游的模板及引物,对交叉 DNA 或双链 DNA 的 5'游离末端具有特异性因此设计与单链 DNA(Sub1)互补的探针(Probe1),探针 5'端标记 FAM 荧光,3'端标记 BQH1 淬灭基团,当 Taq 聚合酶 5'~3' DNA 外切活性降解 Probe1 时,FAM 荧光基团从探针脱离,发出荧光信号,通过实时荧光定量 PCR 仪可检测出反应曲线(图 2)。从图 2 可见,随着聚合酶浓度的下

降,反应曲线的斜率随之下降,反应曲线前期荧光线性增长区的斜率即为各浓度梯度下反应速率。从图3可见,反应的初始速率与加入的聚合酶浓度成线性关系($r^2=0.982$),此直线的斜率可衡量单位浓度的Taq酶所具有的5'~3' DNA外切活性高低。

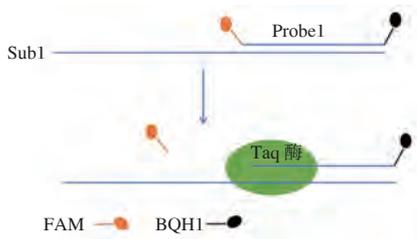


图1 5'~3' DNA外切酶活性测定原理

Figure 1 Schematic of 5'~3' exonuclease activity assay

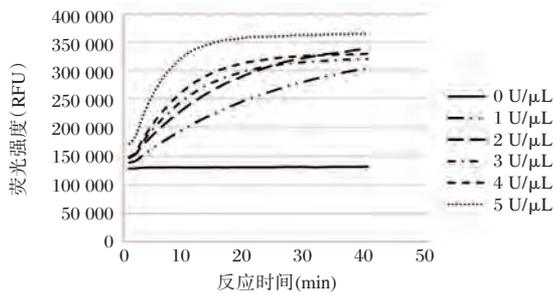


图2 不同浓度的Taq酶与底物反应后的荧光曲线
Figure 2 Fluorescence curve of substrate reaction with gradient of Taq

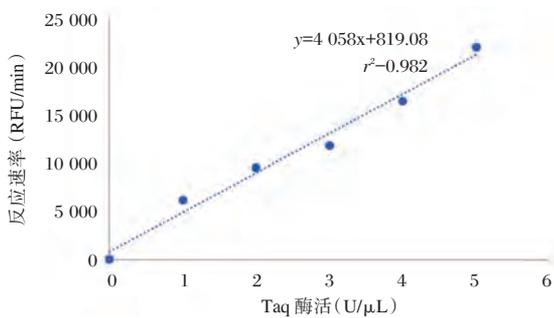


图3 Taq酶浓度与其5'~3' DNA外切活性的线性关系
Figure 3 Linear relationship between the concentration of Taq and its 5'~3' exonuclease

2.1 不同热启动Taq酶的5'~3' DNA外切活性的对比

两种热启动酶 Hotstar Taq 和 Hotstar-II Taq 来源于 Taq 酶,经不同化学修饰方法制备而成。测定3种酶在相同浓度下的5'~3' DNA外切活性,结果见图4。

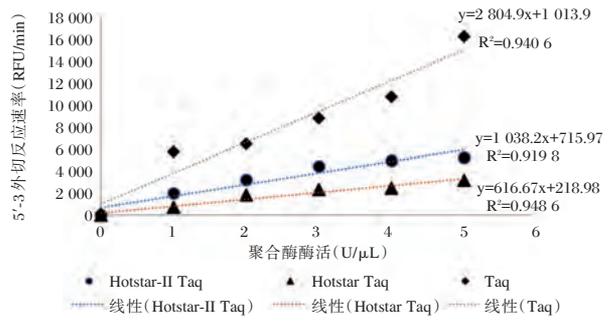


图4 Hotstar Taq、Hotstar-II Taq、Taq酶在相同聚合酶活性浓度下的5'~3'外切活性的对比

Figure 4 comparison of 5'~3' exonuclease activity of Hotstar Taq、Hotstar-II Taq、Taq with the same polymerase activity

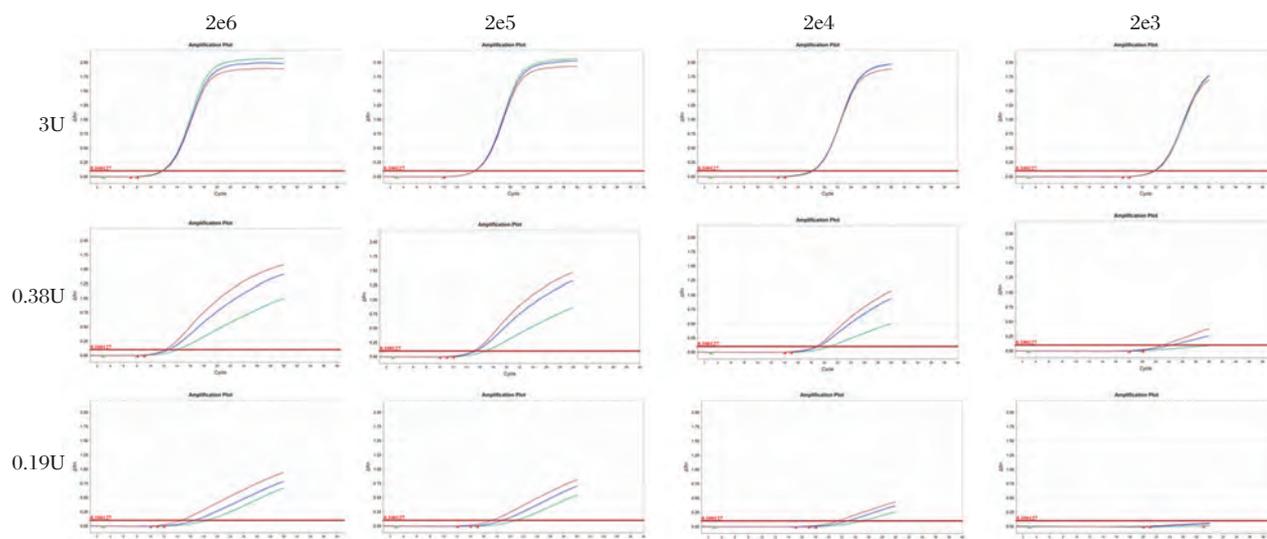
从图4可见,未经化学修饰的Taq酶同等聚合酶活性浓度下具有最高5'~3'外切活性,而经过化学修饰的制备而成的Hotstar Taq及Hotstar-II Taq的5'~3'外切活性均有所下降,其中Hotstar Taq 5'~3'外切活性最低。

2.3 热启动酶5'~3' DNA外切活性对Taqman探针法荧光定量PCR的影响

使用不同浓度的Hotstar Taq、Hotstar-II Taq及Taq酶,对4个梯度的HBV阳性参照物(2e6~2e3)进行荧光定量PCR扩增。结果见图5。

从图5可见,当每反应中加入3 U HotStar Taq、HotStar-II Taq、Taq酶时,各阳性参照物梯度扩增的情况基本一致,荧光曲线重合;每反应中加入0.38 U、0.19 U酶时,Taq酶对各阳性参照物梯度扩增每循环产生的荧光强于HotStar-II Taq,HotStar-II Taq强于HotStar Taq。证明酶对探针的外切反应为PCR反应的限速步骤。

根据图4中测定的各不同Taq酶单位浓度下的5'~3' DNA外切活性(标准曲线方程的斜率),Taq酶的外切活性为HotStar-II Taq的2.70倍,HotStar Taq的4.55倍,调整PCR反应中酶的用量至反应中加入的5'~3'外切酶活性单位一致(Taq:0.38 U/反应,HotStar Taq:1.73 U/反应,HotStar-II Taq 1.03 U/反应),测试对HBV阳性参照物样品的扩增效率,结果见图6。从图6可见,即使各酶加入量不同,但扩增曲线基本一致,证明当反应中5'~3'外切酶活性一致时,增加聚合酶活性并没能进一步提高PCR的扩增效率,因此进一步证明了酶对探针的外切反应为PCR反应的限速步骤。



注: HotStar Taq(绿色)、HotStar-II Taq(蓝色)、Taq 酶(红色)

图5 3种聚合酶活性不同活性梯度下对HBV阳性参照物的测试结果

Figure 5 Amplification of HBV positive sample by three polymerases with equal activity unit

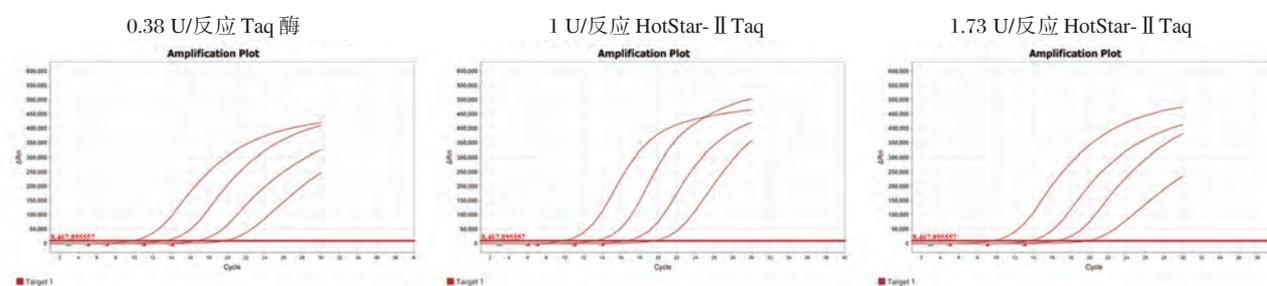


图6 3种聚合酶扩增不同梯度HBV阳性参照物的测试结果

Figure 6 Amplification of gradient HBV positive sample by three polymerases with different activity unit

3 讨论

Taqman 探针法实时荧光定量 PCR 是当今分子诊断的主流技术,以其快速、高通量^[7]、多通道^[8]、高灵敏度^[1,9]、高特异性^[2]等特点,被广泛应用于病原微生物的定性及定量检测^[10-12]、单核苷酸多态 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 检测^[13-14]、短串联重复序列 (Short Tandem Repeat, STR) 分型检测^[15]、基因表达水平差异检测^[16]、等位基因表达差异检测 (Allelic Expression Imbalance, AEI)^[17]、融合基因检测^[4]等方面,在科研、临床诊断、疾病防控、兽医、法医、检验检疫等领域有着广阔的应用前景。其检测原理是:具有 5'~3' DNA 外切活性的 DNA 聚合酶在 PCR 延伸过程中遇到结合在模板链上的荧光标记探针时,利用其 5'~3' DNA 外切活性将探针降解,释放荧光信号并由实时定量 PCR 仪检测^[5]。根据此原理, Taqman

探针法荧光定量 PCR 检测的信号与 PCR 产物的扩增及探针的切割直接相关。在 Taq DNA 聚合酶上,聚合酶活性区与 5'~3' DNA 外切活性区位于不同的结构域^[15],聚合活性区与外切活性区共同作用,驱动新生 DNA 链合成的同时切割荧光探针释放信号。在聚合与外切两种不同的反应中,反应效率低的一方直接决定 DNA 扩增的效率以及荧光信号释放的效率。根据报道, Taq 酶并非完全降解探针,其降解的区域从探针的 5' 端起约 5~12 bp,未完全降解的探针有可能参与后续的 PCR 循环,从而抑制荧光信号的释放,而探针的降解与 Taq 酶的外切活性的强弱密切相关^[3,18]。从本研究所得结果可见,当反应中酶过量时(3 U/反应),聚合酶活性及外切酶活性同时满足反应的需求,不同酶之间扩增效率没有明显差异。但在酶量不足的情况下(0.38、0.19 U/反应),反应中加入相同聚合酶活性的 Taq 酶,具有更高外切酶活性的酶其扩

增效率更高;而加入相同外切酶活性的 Taq 酶,即使聚合酶活性不同,但扩增效率基本一致。以上结果证明外切反应为限速步骤,其速率决定 DNA 扩增的效率。

提高 Taq 酶的 DNA 聚合活性及持续延伸能力是改进 PCR 效率的一贯策略,但由于 Taqman 探针法荧光定量 PCR 的信号产生依赖于探针的降解,而本研究揭示了 Taq 酶 5'~3' DNA 外切活性与 PCR 荧光信号的关系,为 Taq 酶的性能改造指出了新的方向。为提高 PCR 特异性,均需要对 Taq 酶的活性位点进行封闭修饰从而达到热启动的目的。化学修饰由于成本较低,能在较高温度下保持封闭,是对 Taq 酶进行热启动修饰的较常用方法。但化学修饰不可避免地对 Taq 酶的结构和活性有影响,在修饰过程中会出现蛋白变性、沉淀和失活,被修饰基团在酶上各结构域分布的情况也可能影响各结构域在修饰后性能改变的程度^[19]。本研究中两种不同化学修饰制备的 Taq 酶表现出不同的外切酶活性和 PCR 扩增性能也证明了这一弊端。抗体修饰 Taq 酶或配体修饰 Taq 酶由于通过与 Taq 酶结合而屏蔽活性位点达到热启动的目的^[20-21],因此能保留 Taq 酶完整的活性。在耐热 DNA 聚合酶的突变改造中,突变筛选方法通常专注于提高聚合酶性能而忽视对外切酶性能的考察^[6,22-23],而抑制或删除 5'~3'外切活性结构域已被证明是提高聚合酶性能的有效途径^[25],因此筛选出的突变体很可能因外切酶活性低而不适用于 Taqman 探针法定量 PCR。为解决这一问题,有必要在筛选前确认突变体具有完整的外切活性功能。

参考文献

- [1] Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR Methods for Quantitative Gene Expression in Tung Tree Tissues [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(50):12296-12303.
- [2] Xu Y, Derbyshire V, Ng K, et al. Biochemical and mutational studies of the 5'-3' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 268(2):284-302.
- [3] Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Comparison between, Taq, DNA Polymerase and Its Stoffel Fragment for Quantitative Real-Time PCR with Hybridization Probes [J]. *BioTechniques*, 2001, 30(5):1052-1062.
- [4] Zhang L, Pan Z, Geng S, et al. Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus [J]. *Research in Veterinary Science*, 2010, 89(2): 282-289.
- [5] Du F, Tang Z. Colorimetric Detection of PCR Product with DNAzymes Induced by 5'~3' Nuclease Activity of DNA Polymerases [J]. *Chembiochem A European Journal of Chemical Biology*, 2011, 12(1):43-46.
- [6] Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail and Novel Mutants of Taq [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12(2):152-161.
- [7] Longley MJ, Bennett SE, Mosbaugh DW. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 25; 18(24): 7317-7322.
- [8] Lewis A. A novel combination of TaqMan RT-PCR and a suspension microarray assay for the detection and species identification of pestiviruses [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142(1-2):81-86.
- [9] Ranjbar R, Naghoni A, Farshad S, et al. Use of TaqMan® real-time PCR for rapid detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2014, 61(2): 121-130.
- [10] Fink JM, Moore GE, Landau R, et al. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015, 27(2):159-166.
- [11] Pang Z, Li A, Li J, et al. Comprehensive Multiplex One-Step Real-Time TaqMan qRT-PCR Assays for Detection and Quantification of Hemorrhagic Fever Viruses [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(4):e95635
- [12] Tomas D, Cura CI, Ramirez JC, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, 7(1):e2000.
- [13] Bowens KL, Sullivan MJ, Curtis BR. Determination of neutrophil antigen HNA-3a and HNA-3b genotype frequencies in six racial groups by high-throughput 5' exonuclease assay [J]. *Transfusion*, 2012, 52(1):2368-2374.
- [14] Heissl A, Arbeithuber B, Tiemann-Boege I. High-Throughput Genotyping with TaqMan Allelic Discrimination and Allele-Specific Genotyping Assays [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 50(2): 29-57.
- [15] Kim Y, Eom SH, Wang J, et al. Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase [J]. *Nature (London)*, 1995, 37(6):612-616.
- [16] Shintani-Ishida K, Zhu BL, Maeda H. TaqMan® Fluorogenic Detection System to Analyze Gene Transcription in Autopsy Material [M]. *Methods in Molecular Biology*, 2005, 29(10): 415-421.

(下转第 243 页)

· 论 著 ·

miR-374a-3p 靶向 Syk 对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤及炎症反应的影响

冯自波* 祝友鹏 张静

[摘要] 目的 探讨 miR-374a-3p 对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤及炎症反应的影响及作用机制。方法 实验分为 ox-LDL 组、对照(Con)组、miR-NC 组、miR-374a-3p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-374a-3p 组、ox-LDL+miR-NC 组、ox-LDL+miR-374a-3p 组、ox-LDL+si-NC 组、ox-LDL+si-Syk 组、ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1 组、ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1-Syk 组。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-374a-3p 表达水平;蛋白质印迹(Western Blot)检测脾酪氨酸激酶(Syk)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)蛋白表达水平;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞活性;流式细胞术检测细胞凋亡;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)含量水平;荧光素酶报告实验检测 miR-374a-3p 和 Syk 的靶向关系。结果 ox-LDL 作用的 HUVEC 中 miR-374a-3p 低表达, Syk 高表达;细胞活性显著降低,细胞凋亡率显著升高, TNF- α 、IL-6 含量显著升高($P < 0.05$)。过表达 miR-374a-3p 和抑制 Syk 表达抑制 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡和炎症因子 TNF- α 、IL-6 的释放。miR-374a-3p 靶向调控 Syk, 过表达 Syk 逆转了 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症因子释放的抑制作用。结论 过表达 miR-374a-3p 可抑制 HUVEC 凋亡和炎症因子的释放, 保护 ox-LDL 引起的 HUVEC 损伤及炎症反应, 其机制可能与 Syk 有关。

[关键词] miR-374a-3p; Syk; 氧化低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡; 炎症反应

Effect of miR-374a-3p targeting Syk on ox-LDL-induced endothelial cell injury and inflammatory response

FENG Zibo*, ZHU Youpeng, ZHANG Jing

(Department of wound repair vascular surgery, Liyuan hospital affiliated to Tongji medical college, Huazhong university of science and technology, Wuhan, Hubei, China, 430077)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect and mechanism of miR-374a-3p on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced injury and inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Method The experiment was divided into ox-LDL group, control (Con) group, miR-NC group, miR-374a-3p group, anti-miR-NC group, anti-miR-374a-3p group, ox-LDL+miR-NC group, ox-LDL+miR-374a-3p group, ox-LDL+si-NC group, ox-LDL+si-Syk group, ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1 group, ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1-Syk group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-374a-3p. Western blot analysis was used to detect spleen tyrosine kinase (Syk), Bcl-2 related X protein (Bax), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) protein. Tetramethylazolum salt colorimetric assay (MTT) was used to detect cell viability. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels. Luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between miR-

基金项目:湖北省科技计划项目(2018CFB756)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属梨园医院创面修复血管外科,湖北,武汉 430077

*通信作者:冯自波, E-mail:390306820@qq.com

374a-3p and Syk. **Results** In HUVECs treated with ox-LDL, miR-374a-3p was down-regulated and Syk was highly expressed. Cell activity was significantly decreased, and apoptosis rate was significantly increased, TNF- α and IL-6 levels were significantly increased ($P < 0.05$). Overexpression of miR-374a-3p and inhibition of Syk expression inhibits ox-LDL-induced apoptosis and inflammatory factors TNF- α , IL-6 release. miR-374a-3p targets Syk, and overexpression of Syk reverses the inhibitory effect of miR-374a-3p on HUVEC injury and inflammatory factor release induced by ox-LDL. **Conclusions** Overexpression of miR-374a-3p can inhibit HUVEC apoptosis and release of inflammatory factors, protect HUVEC damage and inflammatory response caused by ox-LDL, and its mechanism may be related to Syk.

[KEY WORDS] miR-374a-3p; Syk; oxidized low density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cells; apoptosis; inflammatory response

血管内皮细胞是血管壁的屏障,血管内皮细胞损伤与心血管疾病的发生密切相关^[1]。研究发现 miRNA 参与调控血管内皮细胞功能^[2]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)处理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中 miR-374a 下调表达^[3]。miR-374a 可通过抑制氧化应激和抑制细胞凋亡来保护 PC12 细胞免受缺氧性损伤^[4]。miR-374a 可保护小鼠免于心肌缺血/再灌注损伤^[5]。脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)是一种非受体型酪氨酸激酶,与血管内皮功能及炎症反应有关^[6]。抑制 Syk 表达可降低小鼠炎症反应和动脉粥样硬化^[7]。然而 miR-374a-3p 和 Syk 对人脐静脉内皮细胞损伤及炎症反应的影响及机制尚不清楚,本实验通过用 ox-LDL 诱导 HUVEC 建立氧化损伤模型,研究 miR-374a-3p 和 Syk 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤及炎症反应的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)购自美国菌种保藏中心;胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶、ox-LDL 购自美国 Sigma 公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒、荧光定量试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;二辛可宁酸(BCA)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、四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)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;载体质粒购自上海基屹生物科技有限公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海联科生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 下培养 HUVEC, 2 d 换液一次,用终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ox-LDL 培养 HUVEC 细胞 48 h, 作为 ox-LDL 处理组,正常培养的细胞作为对照(Con)组。将 miR-NC、miR-374a-3p、anti-miR-NC、anti-miR-374a-3p 转染至 HUVEC 中,分别记为 miR-NC 组、miR-374a-3p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-374a-3p 组;将 miR-NC、miR-374a-3p、si-NC、si-Syk 转染至 HUVEC 后再用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ox-LDL 处理,记为 ox-LDL+miR-NC 组、ox-LDL+miR-374a-3p 组、ox-LDL+si-NC 组、ox-LDL+si-Syk 组;将 miR-374a-3p 与 pcDNA3.1、pcDNA3.1-Syk 分别共转染至 HUVEC 后再用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ox-LDL 处理,记为 ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1 组、ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1-Syk 组;转染均按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒进行操作。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-374a-3p 表达水平

细胞培养 48 h 后提取总 RNA,反转录成 cDNA,按照荧光定量试剂盒说明书进行 PCR 扩增,每个样品设 3 个复孔,循环条件为 95℃ 30 s, 60℃ 30 s; 72℃ 30 s, 共 40 个循环;72℃ 延长 5 min。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。miR-374a-3p 以 U6 为内参,miR-374a-3p 上游引物序列:5'-TACATCGGCCATTATAATA-3',下游引物序列:5'-TACACAGAATTACAATAC-3';U6 上游引物序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.3 蛋白质印迹(Western Blot)检测 Syk、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平

细胞培养 48 h 后提取总蛋白,BCA 试剂盒测

定蛋白浓度,蛋白经 10% SDS-PAGE 转至 PVDF 上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗,4℃孵育过夜,TBST洗膜;加入二抗室温孵育 90 min,TBST洗涤 3 次,用 ECL 化学发光液显像,用 Quantity One 凝胶软件测定各组蛋白条带灰度值,蛋白相对表达水平=目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。每个蛋白样品设 3 个重复。

1.2.4 MTT 试剂盒检测细胞活性

各组细胞培养至 24、48、72 h 时分别加入 20 μL 的 MTT 溶液,37℃孵育 4 h;每孔加入 150 μL DMSO 后振荡反应 15 min,酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔吸光度(OD)值。细胞活性(%)=实验组 OD 值/空白对照组 OD 值×100%。实验重复 3 次,每次设 3 个复孔。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

各组细胞培养 48 h 后用 PBS 漂洗 2 次,重悬细胞,按照试剂盒说明书,先后加入 Annexin V-FITC 和 PI 避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复 3 次,每次设 3 个复孔。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量水平

各组细胞培养至 48 h 后离心取上清,具体按照按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.2.7 荧光素酶报告实验检测 miR-374a-3p 对 Syk 的靶向调控

构建 Syk 野生型和突变型荧光素酶表达载体 WT-Syk 和 MUT-Syk,用 Lipofectamine™ 2000 将 WT-Syk 和 MUT-Syk 分别与 miR-NC 和 miR-374a-3p 转染至细胞中。按照说明书要求,进行双荧光素酶报告实验检测。实验重复 3 次。

1.2.8 统计学分析

采用 SPSS 20.00 进行分析。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-374a-3p、Syk 在 ox-LDL 作用的 HUVEC 中的表达

与对照组相比,ox-LDL 作用的 HUVEC 中 miR-374a-3p 表达水平显著降低,Syk 表达水平显著升高($P < 0.05$)(图 1,表 1)。

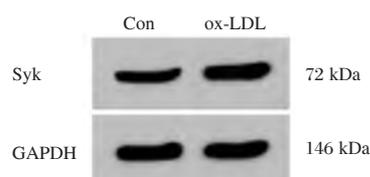


图 1 Syk 蛋白的表达

Figure 1 Expression of Syk protein

表 1 miR-374a-3p 在 ox-LDL 作用的 HUVEC 中的表达 $[n, (\bar{x} \pm s)]$

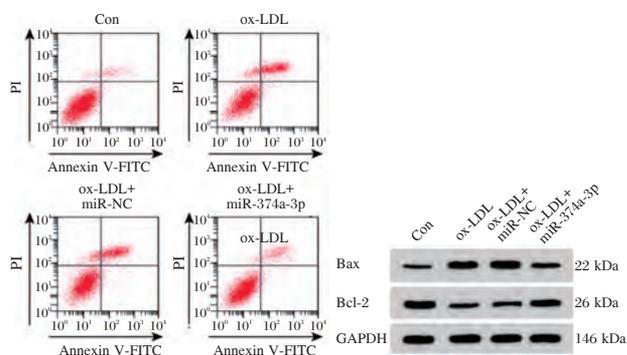
Table 1 Expression of miR-374a-3p in HUVECs treated with ox-LDL $[n, (\bar{x} \pm s)]$

分组	<i>n</i>	miR-374a-3p
Con	9	1.00±0.10
ox-LDL	9	0.26±0.03 ^a
<i>t</i> 值		21.264
<i>P</i> 值		0.000

注:与 Con 组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 过表达 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症反应的影响

与对照组相比,ox-LDL 作用的 HUVEC 中 miR-374a-3p 表达水平显著降低,Bax 表达水平显著升高,Bcl-2 表达水平显著降低,细胞活性显著降低,细胞凋亡率显著升高,TNF-α、IL-6 含量显著升高($P < 0.05$);与 ox-LDL+miR-NC 组相比,ox-LDL+miR-374a-3p 组 HUVEC 中 miR-374a-3p 表达水平显著升高,Bax 表达水平显著降低,Bcl-2 表达水平显著升高,细胞活性显著升高,细胞凋亡率显著降低,TNF-α、IL-6 含量显著降低($P < 0.05$)(图 2,表 2)。



注:A 为过表达 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡的影响;B 为过表达 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡蛋白表达的影响。

图 2 过表达 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡及凋亡蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of overexpression of miR-374a-3p on HUVEC apoptosis and expression of apoptotic protein by ox LDL

表2 过表达 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 活性、凋亡及炎症反应的影响 [n=9, (x̄±s)]

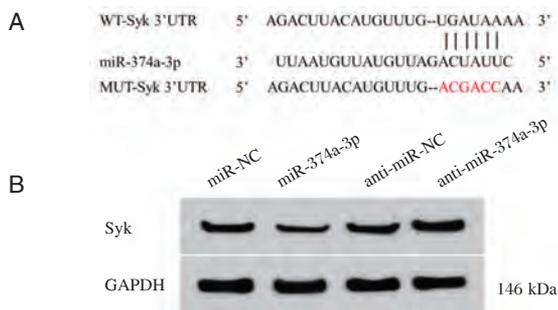
Table 2 Effect of overexpression of mir-374a-3p on HUVEC activity, apoptosis and inflammatory response induced by ox LDL [n=9, (x̄±s)]

分组	细胞活性(490 nm)			凋亡率	miR-374a-3p	TNF-α	IL-6
	24 h	48 h	72 h				
Con	0.61±0.06	0.98±0.10	1.46±0.15	7.52±0.83	1.02±0.10	443.54±59.28	75.51±11.58
ox-LDL	0.24±0.02 ^a	0.37±0.04 ^a	0.56±0.05 ^a	26.61±2.74 ^a	0.28±0.03 ^a	1762.27±156.61 ^a	415.69±38.89 ^a
ox-LDL+miR-NC	0.25±0.02	0.38±0.04	0.58±0.06	25.99±2.61	0.27±0.03	1705.68±161.28	407.68±39.15
ox-LDL+miR-374a-3p	0.48±0.05 ^b	0.73±0.07 ^b	1.16±0.12 ^b	12.26±1.30 ^b	0.81±0.08 ^b	686.53±75.82 ^b	112.16±14.26 ^b
F 值	171.304	173.503	165.433	201.728	317.934	280.440	360.902
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Con 组比较,^aP<0.05;与 ox-LDL+miR-NC 组比较,^bP<0.05。

2.3 miR-374a-3p 靶向、调控 Syk

通过 TargetScan 数据库预测到 Syk 与 miR-374a-3p 存在结合位点(图 3A)。荧光素酶报告实验结果(表 3)显示,相较于 miR-NC 组,miR-374a-3p 组 WT-Syk 的 HUVEC 荧光素酶活性显著降低,差异具有统计学意义(P<0.05);而 MUT-Syk 的 HUVEC 荧光素酶活性差异不显著,差异无统计学意义(P>0.05)。Western Blot 检测结果(图 3B)显示,相较于 miR-NC 组,miR-374a-3p 组 Syk 表达水平显著降低;而相较于 anti-miR-NC 组,anti-miR-374a-3p 组 Syk 表达水平显著升高,差异具有统计学意义(P<0.05)。可见,miR-374a-3p 靶向调控 Syk。



注:A 为 Syk 的 3'UTR 含有 miR-374a-3p 的互补序列; B 为 miR-374a-3p 调控 Syk 的表达

图3 miR-374a-3p 靶向、调控 Syk

Figure 3 mir-374a-3p targeting and regulating Syk

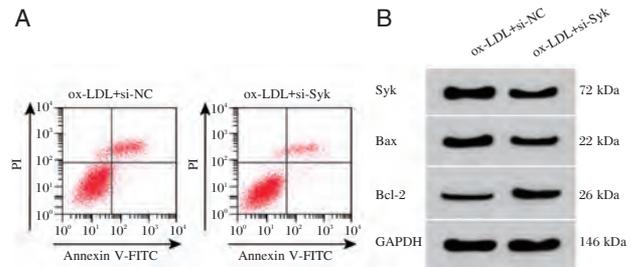
表3 双荧光素酶报告实验 [n, (x̄±s)]

Table 3 Dual luciferase reporter experiment [n, (x̄±s)]

分组	n	WT-Syk	MUT-Syk
miR-NC	9	1.04±0.10	1.10±0.11
miR-374a-3p	9	0.31±0.03 ^a	1.05±0.10
t 值		20.976	1.009
P 值		0.000	0.328

2.4 抑制 Syk 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症反应的影响

与 ox-LDL+si-N 组相比,ox-LDL+si-Syk 组 HUVEC 中 Syk、Bax 表达水平显著降低,Bcl-2 表达水平显著升高,细胞活性显著升高,细胞凋亡率显著降低,TNF-α、IL-6 含量显著降低(P<0.05)(图 4,表 4)。



注:A 为抑制 Syk 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡的影响; B 为抑制 Syk 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 中 Syk 及凋亡蛋白表达的影响

图4 抑制 Syk 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡及凋亡蛋白表达的影响

Figure 4 Inhibition of Syk on HUVEC apoptosis and expression of apoptotic protein by ox LDL

2.5 过表达 Syk 能逆转 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症反应的作用

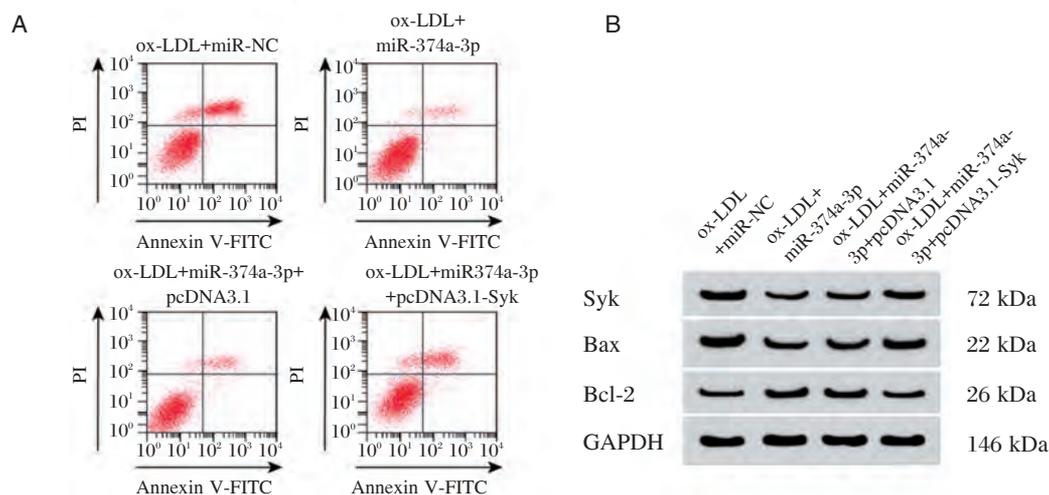
与 ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1 组相比,ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1-Syk 组 HUVEC 中 miR-374a-3p 表达水平显著降低,Syk、Bax 表达水平显著升高,Bcl-2 表达水平显著降低,细胞活性显著降低,细胞凋亡率显著升高,TNF-α、IL-6 含量显著升高(P<0.05)(图 5,表 5)。

表4 抑制 Syk 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症反应的影响 [n=9, (x̄±s)]

Table 4 Inhibition of Syk on HUVEC injury and inflammatory response induced by ox LDL [n=9, (x̄±s)]

分组	细胞活性(490 nm)			凋亡率	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)
	24 h	48 h	72 h			
ox-LDL+si-NC	0.26±0.02	0.41±0.04	0.63±0.06	26.39±2.66	1685.03±166.18	414.63±45.12
ox-LDL+si-Syk	0.42±0.04 ^a	0.65±0.06 ^a	1.04±0.10 ^a	16.21±1.71 ^a	826.43±85.11 ^a	143.36±15.08 ^a
t 值	10.733	9.985	10.547	9.658	13.796	17.106
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 ox-LDL+si-NC 组比较, ^aP<0.05。



注:A. 过表达 Syk 能逆转 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡的影响; B. 过表达 Syk 能逆转 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 中 Syk 及凋亡蛋白表达的影响

图5 过表达 Syk 能逆转 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 凋亡及相关蛋白表达的影响

Figure 5 Overexpression of Syk can reverse the effect of miR-374a-3p on apoptosis and related protein expression in HUVEC induced by ox-LDL

表5 过表达 Syk 能逆转 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症反应的影响 [n=9, (x̄±s)]

Table 5 Overexpression of Syk can reverse the effect of mir-374a-3p on HUVEC injury and inflammation induced by ox LDL [n=9, (x̄±s)]

分组	细胞活性(490 nm)			凋亡率	Sykm RNA	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
	24 h	48 h	72 h				
ox-LDL+miR-NC	0.28±0.02	0.37±0.04	0.61±0.06	26.19±2.62	1.01±0.05	1695.65±168.21	413.28±40.05
ox-LDL+miR-374a-3p	0.49±0.05 ^a	0.74±0.07 ^a	1.18±0.12 ^a	12.51±1.28 ^a	0.28±0.03	691.13±74.83 ^a	115.06±13.76 ^a
ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1	0.51±0.05	0.76±0.07	1.20±0.12	12.63±1.30	0.29±0.03	702.04±73.58	114.27±13.25
ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1-Syk	0.36±0.03 ^b	0.53±0.05 ^b	0.78±0.08 ^b	21.20±2.24 ^b	0.78±0.04	1431.23±151.00 ^b	336.61±34.59 ^b
F 值	68.191	88.921	80.312	107.471	810.712	151.442	267.969
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 ox-LDL+miR-NC 组比较, ^aP<0.05; 与 ox-LDL+miR-374a-3p+pcDNA3.1 组比较, ^bP<0.05。

3 讨论

内皮细胞损伤会导致炎性细胞浸润,引起炎症反应及一系列血管疾病,而炎症介质肿瘤坏死

因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)又可降低 HUVEC 的增殖活性,增加其凋亡率^[8-9],抑制内皮细胞损伤及炎症反应对相关疾病的防治具有重要意义。有研究发现苦参碱通过减少炎症因子表

达、抑制氧化应激保护脂多糖诱导的 HUVECs 损伤^[10]。miR-21 过表达可降低 HUVEC 内炎症因子 TNF- α 、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的分泌,减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤^[11]。本实验结果显示,ox-LDL 能诱导 HUVEC 凋亡和炎症因子的释放。而过表达 miR-374a-3p 后 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量降低,细胞凋亡率降低。还有研究报道 miR-374a 可通过负调控 MCP-1 的表达抑制糖尿病性肾病的炎症反应^[12]。miR-374a-5p 过表达可减少氧/葡萄糖剥夺处理的 PC12 细胞凋亡^[13]。而本实验研究结果与其相一致,说明过表达 miR-374a-3p 保护可保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤,减轻炎症反应。

研究报道干扰 Syk 表达,caspase-3 活性和细胞凋亡显著降,保护缺氧/缺糖损伤诱导的神经元凋亡^[14]。抑制 Syk 还可降低脂多糖诱导的 TNF- α 和 IL-6 的释放,抑制炎症反应的发生^[15]。本实验结果显示,ox-LDL 作用的 HUVEC 中 Syk 高表达,抑制 Syk 表达后 Bax 表达水平显著降低,Bcl-2 表达水平显著升高,细胞活性显著升高,细胞凋亡率显著降低,TNF- α 、IL-6 含量显著降低。说明抑制 Syk 表达可抑制 HUVEC 凋亡和炎症反应,保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。研究发现沉默 miR-27a 通过激活 Syk 依赖的 mTOR 信号传导途径促进黑素瘤细胞的自噬和凋亡^[16]。提示 Syk 可被 miRNA 调控进而影响细胞的凋亡。本实验结果显示,miR-374a-3p 可靶向调控 Syk,过表达 Syk 逆转了 miR-374a-3p 对 ox-LDL 作用的 HUVEC 损伤及炎症因子释放的抑制作用。表明,miR-374a-3p 可能通过调控 Syk 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤,减轻炎症反应。

综上所述,过表达 miR-374a-3p 可抑制 HUVEC 凋亡和炎症因子的释放,保护 ox-LDL 引起的 HUVEC 损伤及炎症反应,其机制可能与 Syk 有关。

参考文献

- [1] 阚科佳,齐昊喆,杨硕菲,等.舒洛地特对氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用及其机制研究[J].介入放射学杂志,2017,26(6):539-543.
- [2] 杨鹏,罗雪兰,莫国君,等.miR-24 对人脐静脉内皮细胞增殖、转移及自噬的影响[J].山东医药,2017,57(13):24-27.
- [3] 秦冰,曹宇泽,肖波,等.氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中 microRNA 表达谱分析[J].神经损伤与功能重建,2013,8(2):80-87.
- [4] Gong W, Qie S, Huang P, et al. Protective effect of miR-374a on chemical hypoxia-induced damage of PC12 cells in vitro via the GADD45 α /JNK signaling pathway [J]. Neurochem Res, 2018, 43(3):581-590.
- [5] Huang ZQ, Xu W, Wu JL, et al. MicroRNA-374a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by targeting the MAPK6 pathway [J]. Life Sci, 2019, 232(1):116619.
- [6] 孙丽,甘我挺,韩欣,等.脾酪氨酸激酶——动脉粥样硬化新靶点及其药物研究[J].中国药理学通报,2012,28(5):608-611.
- [7] Hilgendorf I, Eisele S, Zeschky K, et al. The oral spleen tyrosine kinase inhibitor fostamatinib attenuates inflammation and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(9):1991-1999.
- [8] 李超.丹皮酚通过升高单核细胞来源的外泌体 miR-223 抑制 STAT3 介导的内皮细胞炎症反应[D].安徽中医药大学,2018.
- [9] 段辉. TNF- α 、IL-1 β 和 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞增殖和凋亡的研究[J].中国现代医学杂志,2017,27(9):30-34.
- [10] 胡灿,唐其柱,张宁,等.苦参碱对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症反应及氧化应激的影响[J].中华生物医学工程杂志,2018,24(5):305-310.
- [11] 常方圆,冯泽瑞,许迎春,等.miR-21 在黄芪甲苷保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症损伤过程中的作用[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(4):276-282,309.
- [12] Yang Z, Guo Z, Dong J, et al. miR-374a regulates inflammatory response in diabetic nephropathy by targeting MCP-1 expression[J]. Front Pharmacol, 2018, 9(1):900.
- [13] Jiang F, Yang M, Wu C, et al. Potential roles of miR-374a-5p in mediating neuroprotective effects and related molecular mechanism[J]. J Mol Neurosci, 2019, 69(1):123-132.
- [14] 张志鑫,崔应麟,李彦杰,等.SYK 调控缺氧/缺糖损伤诱导的大脑皮质神经元凋亡及其机制[J].第三军医大学学报,2017,39(13):1381-1386.
- [15] 崔树娜, Bilitewski U. 脾酪氨酸激酶抑制剂对脂多糖诱导巨噬细胞炎症反应的影响及机制[J].细胞与分子免疫学杂志,2013,29(10):1024-1027.
- [16] Tang H, Xu X, Xiao W, et al. Silencing of microRNA-27a facilitates autophagy and apoptosis of melanoma cells through the activation of the SYK-dependent mTOR signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8):13262-13274.

· 论 著 ·

女性宫颈 HPV 感染与阴道局部 Th17 细胞免疫功能及血清因子的关系研究

王小花* 喻岩 王茹

[摘要] **目的** 探讨女性宫颈人乳头瘤病毒(HPV)感染与阴道局部辅助性 T 细胞 17(Th17)细胞免疫功能的关系。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2018 年 12 月在本院就诊的 HPV 感染阳性者 182 例,其中高危型 HPV 感染者 78 例,低危型 HPV 感染者 104 例;高危型 HPV 感染者中,持续感染者 26 例,非持续感染者 52 例;检测 Th17 细胞及白细胞介素-17(IL-17)、IL-10、IL-6、IL-4 和转化生长因子- β (TGF- β)。**结果** HPV 阳性者 Th17 细胞、IL-17、IL-6、IL-4 和 TGF- β 分别为(10.03 \pm 3.10)%、(159.82 \pm 31.33)ng/L、(46.60 \pm 10.61)ng/L、(150.03 \pm 31.15)ng/L 和(4.40 \pm 13.32)ng/L,明显高于 HPV 阴性者,差异有统计学意义($P<0.05$);高危型 HPV 感染者 IL-10 和 IL-4 分别为(21.12 \pm 3.72)ng/L 和(142.21 \pm 30.02)ng/L,明显低于低危型 HPV 感染者($P<0.05$);高危型 HPV 感染和低危型 HPV 感染者 Th17 细胞、IL-17、IL-6 和 TGF- β 水平比较差异无统计学意义($P<0.05$);高危型 HPV 持续感染和非持续感染者 Th17 细胞、IL-17、IL-10、IL-6、IL-4 和 TGF- β 水平比较差异无统计学意义($P<0.05$)。**结论** 女性宫颈 HPV 感染可明显影响阴道局部 Th17 细胞免疫功能,值得进一步研究。

[关键词] 人乳头瘤病毒;辅助性 T 细胞 17;细胞免疫功能

Study on the relationship between cervical HPV infection and local Th17 cell immune function in women

WANG Xiaohua*, YU Yan, WANG Ru

[Department of Gynecology, Hainan maternal and children's medical Center (Hainan maternal and child health hospital), Haikou, Hainan, China, 570000]

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between cervical human papillomavirus (HPV) infection in women and the immune function of local helper T cell 17 (Th17) in vagina. **Methods** From January 2017 to December 2018, 182 cases of HPV infection were selected, including 78 cases of high-risk HPV infection and 104 cases of low-risk HPV infection. Among the high-risk HPV infections, 26 were persistent and 52 were non-persistent. Th17 cells and interleukin-17 (IL-17), IL-10, IL-6, IL-4 and transforming growth factor- β (TGF- β) were measured. **Results** Th17 cells, IL-17, IL-6, IL-4 and TGF- β in HPV positive patients were (10.03 \pm 3.10)%, (159.82 \pm 31.33) ng/L, (46.60 \pm 10.61) ng/L, (150.03 \pm 31.15) ng/L and (4.40 \pm 13.32) ng/L, significantly higher than those in HPV negative patients ($P<0.05$); The levels of IL-10 and IL-4 in high-risk HPV patients were (21.12 \pm 3.72) ng/L and (142.21 \pm 30.02) ng/L, significantly lower than those in low-risk HPV patients ($P<0.05$). There was no significant difference in the levels of Th17 cells, IL-17, IL-6 and TGF- β between high-risk HPV infection and low-risk HPV infection ($P<0.05$). There were no

基金项目:海南省卫生厅重点科研课题项目(琼卫 2010 重点-32)

作者单位:海南省妇女儿童医学中心(海南省妇幼保健院)妇科,海口,海南 570000

*通信作者:王小花, E-mail: wuweigx@163.com

significant difference in the levels of Th17 cells, IL-17, IL-10, IL-6, IL-4 and TGF- β between persistent and non-persistent high-risk HPV infections ($P>0.05$). **Conclusion** HPV infection in the cervix of women can significantly affect the immune function of Th17 cells in local vagina. It is worth further investigation.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; Helper T cell 17; Cellular immune function

临床上女性宫颈 HPV 感染的发生,能够导致患者高级别宫颈上皮内瘤变或者宫颈癌的发生,增加不了临床结局的发生率^[1]。在研究女性宫颈 HPV 感染病情进展机理的过程中,发现细胞因子的改变,能够在促进 HPV 感染过程中发挥重要的作用^[2]。辅助性 T 细胞 17 (T helper cells 17, Th17)能够通过影响到局部 T 淋巴细胞的应答能力,影响到自然杀伤性 T 淋巴细胞的功能活性,进而影响到阴道对于 HPV 病毒的清除能力^[3];白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、IL-10、IL-6、IL-4 的表达,能够通过诱导炎症反应,加剧炎症免疫性损伤,进而促进宫颈上皮内病变的发生发展^[4];转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)作为转化生长因子家族成员,其对于下游补体和趋化因子的激活,能够干预到宫颈上皮细胞的损伤修复能力。为了揭示 Th17 细胞免疫功能与宫颈 HPV 感染的关系,从而为临床上相关宫颈 HPV 感染患者的诊疗提供理论参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月至 2018 年 12 月在本院就诊的 HPV 感染阳性者 182 例,其中高危型 HPV 感染者 78 例,低危型 HPV 感染者 104 例;高危型 HPV 感染者中,持续感染者 26 例(指同一高危型 HPV 感染持续时间超过 1 年),非持续感染者 52 例;纳入标准:①经液基薄层细胞检测、阴道镜检查及病理活检排除宫颈上皮内病变、阴道上皮内病变及外阴病变;②无免疫、内分泌及其他系统疾病;③感染者知情同意。排除标准:①近 3 月内接受过免疫治疗及抗病毒治疗;②妊娠或哺乳期女性。同时选取 HPV 阴性者 150 例作为对照(无生殖道感染、宫颈上皮内病变等),HPV 阳性者与阴性者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

1.2 检查方法

采用一次性采集器进行阴道分泌物采集,采集 5 mL 分泌物后自然放置,加入 5 mL 生理盐水后 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液体进行检测。

表 1 HPV 阳性者与阴性者一般资料比较 ($n, \bar{x} \pm s$)
Table 1 General data comparison of HPV-positive and HPV-negative patients ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	体重指数(kg/m ²)
HPV 阳性者	182	35.58±6.92	22.54±2.30
HPV 阴性者	150	34.40±6.15	22.41±3.15
<i>t</i> 值		1.625	0.434
<i>P</i> 值		0.105	0.665

加入 25 μ L IL-17Alexa Fluor/CD4 PE 抗体进行标记,孵育 30 min 后上机进行 Th17 细胞检测,Th17 检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。

采用 ELISA 法进行 IL-17、IL-10、IL-6、IL-4 和 TGF- β 的检测,采用交叉交叉的方法进行抗原浓度的测定,采用碳酸盐缓冲液进行抗原稀释,加入 96 孔的酶标板中,盖好酶标板盖后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 min,轻轻叩击酶标板甩干。每孔中加入 5% 的脱脂牛奶 200 μ L,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 min,加入稀释好的抗体(购自 abcum 公司批号:20083845 浓度 1:800),蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 min,每孔中加入 100 μ L 的底物,显色后在酶标仪上进行吸光度的检测。

1.3 统计学处理

统计分析采用 SPSS 19.0 软件,计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较使用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 阳性者和阴性者 Th17 细胞及相关因子比较

HPV 阳性者 Th17 细胞、IL-17、IL-6、IL-4 和 TGF- β 明显高于 HPV 阴性者 ($P<0.05$ 见表 2)。

2.2 高危型 HPV 和低危型 HPV 感染者 Th17 细胞及相关因子比较

高危型 HPV 感染者 IL-10 和 IL-4 明显低于低危型 HPV 感染者 ($P<0.05$);高危型 HPV 感染和低危型 HPV 感染者 Th17 细胞、IL-17、IL-6 和 TGF- β 水平比较差异无统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表2 HPV阳性者和阴性者Th17细胞及相关因子比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]Table 2 Comparison of Th17 cells and related factors between HPV-positive and HPV-negative patients [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	Th17细胞(%)	IL-17(ng/L)	IL-10(ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-4(ng/L)	TGF-β(ng/L)
HPV阳性者	182	10.03±3.10	159.82±31.33	23.39±4.50	46.60±10.61	150.03±31.15	34.40±13.32
HPV阴性者	150	3.82±2.73	134.40±34.40	22.67±5.14	36.50±9.88	50.03±14.42	22.18±8.71
<i>t</i> 值		19.162	7.038	1.360	8.903	36.240	9.661
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.175	0.000	0.000	0.000

表3 高危型HPV和低危型HPV感染者Th17细胞及相关因子比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]Table 3 Comparison of Th17 cells and related factors between high-risk HPV and low-risk HPV infections [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	Th17细胞(%)	IL-17(ng/L)	IL-10(ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-4(ng/L)	TGF-β(ng/L)
高危型HPV感染	78	10.13±2.78	160.00±30.42	21.12±3.72	46.71±9.92	142.21±30.02	34.81±9.78
低危型HPV感染	104	9.96±3.10	159.44±32.21	25.09±3.30	46.52±9.15	155.89±32.21	34.09±9.42
<i>t</i> 值		0.382	0.119	-7.603	0.134	-2.919	0.502
<i>P</i> 值		0.703	0.906	0.000	0.894	0.004	0.616

2.3 高危型HPV持续感染和非持续感染者Th17细胞及相关因子比较

高危型HPV持续感染和非持续感染者Th17

细胞、IL-17、IL-10、IL-6、IL-4和TGF-β水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表4。

表4 高危型HPV持续感染和非持续感染者Th17细胞及相关因子比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]Table 4 Comparison of Th17 cells and related factors between persistent and non-persistent high-risk HPV infection [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	Th17细胞(%)	IL-17(ng/L)	IL-10(ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-4(ng/L)	TGF-β(ng/L)
持续感染	26	10.22±2.90	161.12±30.70	21.24±3.62	46.62±9.81	143.31±33.21	35.03±8.92
非持续感染	52	10.09±3.02	159.44±33.82	21.06±3.43	46.76±9.06	141.66±34.03	34.70±9.15
<i>t</i> 值		0.182	0.213	0.215	-0.063	0.203	0.151
<i>P</i> 值		0.856	0.832	0.831	0.950	0.839	0.880

3 讨论

流行病学研究表明,女性宫颈HPV感染的发病率可超过2.5%左右^[5],在长期性生活紊乱或者多个性伴侣的群体中,女性宫颈HPV感染的发病率可进一步的上升^[6]。长期的临床随访观察研究发现,宫颈HPV感染导致远期宫颈上皮内瘤的发生风险可超过35%以上,同时宫颈恶性病变的发生率也明显上升^[7]。在研究宫颈HPV感染病情进展原理的过程中发现,虽然HPV病毒颗粒亚型或者病毒复制载量能够在促进宫颈HPV感染病情进展过程中发挥作用,但宫颈HPV感染的发生或者病情进展仍然受到其他病理因素的干扰。本次研究通过对于Th17细胞及相关因子的分析,不仅

能够解释宫颈HPV感染的免疫机理,同时还能够为临床上宫颈HPV感染的诊疗提供分子免疫学方面的参考。

Th17细胞是调节性T淋巴细胞家族成员,其能够通过诱导下游树突状细胞的激活,影响到树突状T淋巴细胞的功能活性,最终影响到宫颈局部免疫应答活性。Th17细胞还能够影响到CD4+T淋巴细胞的活性,导致其对于病毒颗粒吞噬能力的改变,最终促进宫颈局部免疫功能紊乱的发生;Th17相关因子是免疫功能的效应因子,其对于下游炎症性因子或者介质的激活,能够加剧宫颈上皮或者阴道微环境的破坏,提高了病毒颗粒整合进入宿主细胞的功能;TGF-β还能够通过募集趋化因子,提高不同细胞因子的扩散风险,进而

促进病毒颗粒感染风险的上升^[8-9]。部分研究者探讨了Th17细胞的表达与宫颈HPV感染的关系,认为在宫颈HPV感染患者中,Th17细胞水平明显的上升,并认为Th17细胞水平的上升与宫颈癌的早期发生密切相关^[10-11],但缺乏对于IL-17、IL-10、IL-6、IL-4和TGF- β 的具体分析。

本次研究提示了Th17细胞及相关细胞因子的改变,能够显著参与到宫颈HPV的感染过程。分析其具体的原因,可以从下列几个方面进行理解^[12-14]:①Th17细胞的上升,干预到了抗原提呈细胞的活性,能够影响到CD4+/CD8+T淋巴细胞的比例,导致抗原局部宫颈免疫微环境的恶化;②IL-17、IL-6、IL-4的上升,不仅能够影响到免疫功能的紊乱,同时还能够激活下游炎症性信号通路NF-KB,进而影响到宫颈炎症性损伤,为HPV感染提供条件;③TGF- β 作为转化生长因子,其能够提高下游金属基质蛋白酶的活性,促进宫颈上皮间质细胞的分解,从而提高了宫颈HPV病毒的入侵和扩散风险。张慧莉等^[15]研究者也认为,在宫颈HPV感染患者中,IL-17的表达浓度可平均上升30%以上,同时在合并有宫颈上皮内瘤变或者宫颈癌的患者中,IL-17的表达浓度的上升更为显著。但本次研究并未发现其他细胞因子与高危型HPV感染的关系,同时并未发现不同细胞因子与持续性宫颈HPV感染的关系,提示相关细胞因子并不能影响到宫颈HPV感染的病程。

综上所述,Th17细胞、IL-17、IL-6、IL-4和TGF- β 的表达可能在促进宫颈HPV感染过程中发挥一定的作用,其中IL-10和IL-4的表达与高危型HPV感染密切相关。本次研究的创新性在于探讨了IL-10和IL-4等于宫颈HPV持续感染的关系。

参考文献

- [1] Owadally W, Hurt C, Timmins H, et al. PATHOS: a phase II/III trial of risk-stratified, reduced intensity adjuvant treatment in patients undergoing transoral surgery for Human papillomavirus (HPV) positive oropharyngeal cancer[J]. BMC Cancer, 2015,15(1):90-93.
- [2] Bhatia A, Burtneess B. Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancer: Defining Risk Groups and Clinical Trials [J]. Journal of Clinical Oncology, 2015,33(29):3243-3250.
- [3] 樊金焱,刘玉玲,邵国香,等. 外周血中Th17/Treg细胞及炎症因子水平与宫颈病变程度、HPV危险分型的关系[J]. 山东医药, 2017,57(29):41-43.
- [4] 郭琪琼,史伟峰,许小鹏. 宫颈癌患者血清Th17细胞和妇女HPV感染的关系[J]. 中国临床研究, 2017,30(12):1685-1687.
- [5] Cordel N, Ragin C, Trival M, et al. High-risk human papillomavirus cervical infections among healthy women in Guadeloupe [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2015, 41(06):13-16.
- [6] 尹迎辉,王玫. 新产程管理下第二产程时长对慢性HBV感染孕妇母婴阻断及母儿结局的影响[J]. 传染病信息, 2017(4):42-45.
- [7] Harari A, Chen Z, Rodríguez AC, et al. Cross-protection of the Bivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Against Variants of Genetically Related High-Risk HPV Infections [J]. Journal of Infectious Diseases, 2016,213(6):939-947.
- [8] 杨晶,田威,戚昱. 宫颈病变患者HPV感染与淋巴细胞亚群相关细胞因子的关系[J]. 中国妇幼保健, 2017,32(19):4827-4830.
- [9] 余花艳,任统伟. 人乳头瘤病毒感染宫颈疾病患者外周血中MDSC、Treg、Th17细胞变化研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017,37(8):586-593.
- [10] 陈志芳,蔡冬慧,范玲玲,等. 维吾尔族宫颈癌患者手术前后HPV感染与Th17/Treg细胞的相关性[J]. 新疆医科大学学报, 2017,40(01):106-110.
- [11] 周爱枝,段迎春,张蕾,等. HPV16感染患者外周血中Treg/Th17细胞平衡偏移的表达意义[J]. 中国妇幼保健, 2018,33(17):4022-4025.
- [12] 李军,王一羽,原荣,等. 高危型HPV感染者外周血T细胞亚群和NK细胞检测及临床价值[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015,29(6):465-469.
- [13] 刘琳,沈攀,张力忆. 宫颈病变内高危型HPV感染与Th细胞分化、细胞异常增殖的相关性[J]. 海南医学院学报, 2018, 24(3):315-318.
- [14] 余晓凤,陈玲玲,王晶华,等. 宫颈高危型HPV感染者外周血T、B淋巴细胞及NK细胞变化分析[J]. 中国实验诊断学, 2018,22(3):449-453.
- [15] 张慧莉,鲍引娣,王书琴,等. Th17/Treg细胞与宫颈癌HPV感染类型的关系[J]. 中国妇幼保健, 2018,33(17):4018-4021.

· 论 著 ·

中晚期子宫颈鳞癌同步放化疗前后血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 变化及预测价值

李改玲 任芳* 冯巍

[摘要] **目的** 观察中晚期子宫颈鳞癌(SCCC)患者同步放化疗前后血清 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤转移抑制基因(nm23-H1)表达变化,并分析其对预后预测价值。**方法** 选取本院收治的92例中晚期SCCC患者,均予以同步放化疗,比较其治疗前后血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达水平,进行影响因素分析,观察 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 对预后预测价值,并与中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)比较。**结果** 与治疗前相比,血清 E-cadherin、nm23-H1 表达水平明显升高($P<0.05$),VEGF 水平明显降低($P<0.05$);患者3年总生存率在临床分期、淋巴转移情况、血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达等因素上比较差异有统计学意义($P<0.05$);COX 回归显示,临床分期 IIIa~IV、淋巴转移、VEGF 是患者预后独立危险因素($P<0.05$),E-cadherin 与 nm23-H1 为预后保护因素($P<0.05$);E-cadherin 预测患者预后敏感度 75.0%,特异度 94.7%,VEGF 敏感度 87.5%,特异度 90.8%,nm23-H1 敏感度 93.8%,特异度 77.6%;NLR 敏感度 82.3%,特异度 78.4%。**结论** 同步放化疗后,中晚期 SCCC 患者血清 E-cadherin、nm23-H1 呈升高趋势,VEGF 表达水平降低,对患者预后具有重要预测价值。

[关键词] 子宫颈鳞癌;同步放化疗;E-钙黏蛋白;血管内皮生长因子;肿瘤转移抑制基因

Changes of serum E - cadherin, VEGF and nm23 - H1 before and after concurrent chemoradiotherapy for middle-late SCCC and the predictive value

LI Gailing, REN Fang*, FENG Wei

(Department of Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the changes in the expression of serum E-cadherin, vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor metastasis suppressor gene (nm23-H1) in patients with middle-late squamous cell carcinoma of cervix (SCCC) before and after concurrent chemoradiotherapy, and analyze their predictive value for prognosis. **Methods** A total of 92 patients with middle-late SCCC in the hospital were selected. All of them were treated with concurrent chemoradiotherapy. The expression levels of serum E-cadherin, VEGF and nm23-H1 before and after treatment were compared, and the influencing factors were analyzed. The predictive value of E-cadherin, VEGF and nm23-H1 for prognosis was observed and then compared with neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR). **Results** The expression levels of serum E-cadherin and nm23-H1 significantly increased, while VEGF level significantly decreased after treatment ($P<0.05$). There were significant differences in 3-year overall survival rate in terms of clinical stage, lymphatic metastasis, expression of serum E-cadherin, VEGF and nm23-H1 ($P<0.05$). COX regression showed that clinical stage IIIa-IV, lymphatic metastasis and VEGF are independent risk factors of prognosis ($P<0.05$), while E-cadherin and

基金项目:河南省医学科技攻关项目(201702057)

作者单位:郑州大学第一附属医院妇科,河南,郑州 450052

*通信作者:任芳, E-mail: renfsunshine@sina.com

nm23-H1 are protective factors ($P<0.05$). The sensitivities and specificities of E-cadherin, VEGF and nm23-H1 for predicting prognosis are (75.0% and 94.7%), (87.5% and 90.8%) and (93.8% and 77.6%), respectively. The sensitivity and specificity of NLR are 82.3% and 78.4%, respectively. **Conclusion** After concurrent chemoradiotherapy, serum E-cadherin and nm23-H1 in middle and advanced SCCC patients showed an increasing trend, and the expression of VEGF decreased, which has important predictive value for patients' prognosis.

[KEY WORDS] Squamous cell carcinoma of cervix; Concurrent chemoradiotherapy; E-cadherin; Vascular endothelial growth factor; Tumor metastasis suppressor gene

大部分宫颈癌恶性肿瘤患者临床诊治时已发展至中晚期,且以宫颈鳞癌(squamous cell carcinoma of cervix, SCCC)最为常见,一般具有疗效不佳以及预后差等特征,有报道称其5年总生存率仅约55%~69%,故采取有效措施治疗中晚期 SCCC 十分重要^[1]。现阶段,同步放化疗为中晚期 SCCC 主要治疗手段。相关研究指出,与单纯放疗相比,同步放化疗可以更有效改善中晚期 SCCC 患者预后^[2]。E-钙黏蛋白(E-cadherin)属于抑癌基因表达产物,其与肿瘤转移抑制基因(nm23-H1)异常表达与人体某些实体瘤发展、去分化以及侵袭转移有关^[3]。有报道称,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达和宫颈癌发生发展存在紧密联系^[4]。以往多项研究表明,中性粒细胞/淋巴细胞比值(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)在卵巢癌、宫颈癌及结肠癌等肿瘤患者预后评估中起着重要作用^[5]。本文旨在探讨同步放化疗前后中晚期 SCCC 患者血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达变化,并与 NLR 比较,分析其对预后预测价值,以期为中晚期 SCCC 更有效诊治与预后评估提供一定依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 6 月至 2016 年 7 月本院 92 例中晚期 SCCC 患者,年龄 32~68 岁,平均(50.67±8.95)岁。纳入标准:①病理类型为 SCCC,并且肿瘤分期 II b~IV 期;②年龄<70 岁;③行为能力卡氏(Kar-nofsky, KPS)评分≥70 分^[6];④自愿行同步放化疗;⑤对本次研究知情。排除标准:①合并肝肾功能障碍;②伴随转移性肿瘤;③合并骨髓功能异常;④伴随精神障碍,不能配合治疗。

1.2 仪器/试剂

全自动酶标仪(美国 BIO-RAD680),全自动血

液分析仪(型号:XE-2100,日本 Sysmex 公司),顺铂(国药准字:H37021362,齐鲁制药有限公司),紫杉醇(国药准字:H20020705,上海三维制药有限公司),地塞米松(国药准字:H35021298,厦门星鲨制药有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 一般资料收集

收集患者一般资料,主要包括年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、肿瘤大小、临床分期、分化程度、淋巴转移情况等。

1.3.2 指标检测

分别在治疗前与治疗 3 个化疗周期后,检测患者血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达及 NLR。采集患者晨起空腹状态下静脉血 3 mL,进行离心获得上清液,通过酶联免疫吸附法进行 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 测定,采取全自动酶标仪,严格依据说明书完成操作过程;NLR 通过全自动血液分析仪获得。以正常体检者血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 为参考标准^[7-9]进行高表达判定:>20 ng/mL、>124.65 μg/L、>228.34 ng/mL。

1.3.3 同步放化疗方案

化疗:选择紫杉醇与铂类予以联合化疗,总共 1~3 个化疗周期。若为伴随胸、腹腔腹水者,需要引流干净后,在其胸、腹腔部位注射顺铂药物,注意每次 50~70 mg/m²,并且每 3 周注射 1 次;通过静脉注射方式予以紫杉醇,注意每次 75 mg/m²,并且 2 次/d。开始化疗前,可通过服用地塞米松(通常每 12 h 1 次,7.5 mg/次,并且连续用药 2~3 d)有效预防过敏反应。放疗:指导患者处于仰卧位,采用 CT 模拟机定位,进行全盆照射,控制 1.8~2 Gy/次,注意每周 5 次以及总剂量≤30 Gy。完成全盆照射后,进行盆腔四野照射,控制 1.8~2 Gy/次,注意每周 4 次以及总剂量 25 Gy。此外,盆腔照射同时予以腔内后装照射,注意后装照射当天不予以外照射,控制 A

点5~6 Gy,注意每周1次以及总剂量≤30 Gy。对所有患者进行3年随访,记录其生存情况。

1.4 观察指标

观察患者治疗前后血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达水平;进行影响因素分析;观察 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 对预后预测价值,并与 NLR 比较。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 19.0 软件分析数据,计数资料表示为(%),以 χ^2 检验;计量资料表示为($\bar{x} \pm s$),以 t 检验;使用 COX 回归分析法进行影响因素分析;采取以受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析各指标对预后预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达水平比较

与治疗前相比,血清 E-cadherin、nm23-H1 表达水平明显升高($P < 0.05$),VEGF 水平明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 治疗前后血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Expression levels of serum E-cadherin, VEGF and nm23-H1 before and after treatment [$n, (\bar{x} \pm s)$]

时间	n	E-cadherin (ng/mL)	VEGF ($\mu\text{g/L}$)	nm23-H1 (ng/mL)
治疗前	92	10.57±1.89	196.58±23.74	130.28±20.67
治疗后	92	18.63±2.78	163.84±21.69	148.53±15.78
t 值		22.997	9.766	6.731
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 预后单因素分析

92 例患者 3 年 16 例 (17.39%) 死亡,76 例 (86.96%) 生存, Kaplan -Meier 生存分析结果见图 1;患者 3 年总生存率在临床分期、淋巴转移情况、血清 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 表达等因素上比较有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 COX 回归分析

COX 回归显示,临床分期 IIIa~IV、淋巴转移、VEGF 高表达属于患者预后独立危险因素($P < 0.05$),E-cadherin 与 nm23-H1 低表达为预后保护因素($P < 0.05$)。见表 3。

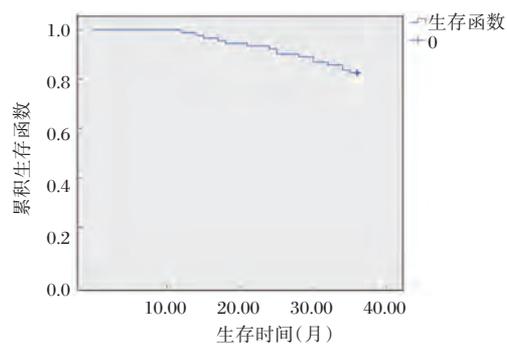


图 1 Kaplan-Meier 生存分析
Figure 1 Kaplan-Meier survival analysis

表 2 预后单因素分析 [$n(\%)$]

Table 2 Univariate analysis of the prognosis [$n(\%)$]

临床资料	n	3 年总生存率	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
<60	62	51(82.26)	0.016	0.899
≥60	30	25(83.33)		
BMI(kg/m^2)				
<18.5	15	10(66.67)	4.012	0.135
18.5~22.9	52	46(88.46)		
>22.9	25	20(80.00)		
肿瘤大小(cm)				
<5	32	26(81.25)	0.063	0.802
≥5	60	50(83.33)		
临床分期				
II b	35	34(97.14)	6.754	0.009
III a~IV	57	42(73.68)		
分化程度				
高中分化	64	52(81.25)	0.049	0.825
低分化	28	24(85.71)		
淋巴转移				
是	50	36(72.00)	7.039	0.008
否	42	40(95.24)		
E-cadherin				
高表达	30	30(100.00)	7.662	0.006
低表达	62	46(74.19)		
VEGF				
高表达	62	47(75.81)	4.758	0.029
低表达	30	29(96.67)		
nm23-H1				
高表达	24	24(100.00)	5.296	0.021
低表达	68	52(76.47)		

2.4 E-cadherin、VEGF、nm23-H1 与 NLR 对预后预测价值比较

各变量(E-cadherin、VEGF、nm23-H1)ROC曲线下面积,见表4。E-cadherin 预测患者预后敏感度 75.0%,特异度 94.7%;VEGF 预测患者预后敏

感度 87.5%,特异度 90.8%;nm23-H1 预测患者预后敏感度 93.8%,特异度 77.6%;NLR 敏感度 82.3%,特异度 78.4%(见图2)。E-cadherin、VEGF、nm23-H1 灵敏度、特异度与 NLR 相当甚至更高。

表3 COX 回归分析

Table 3 COX regression analysis

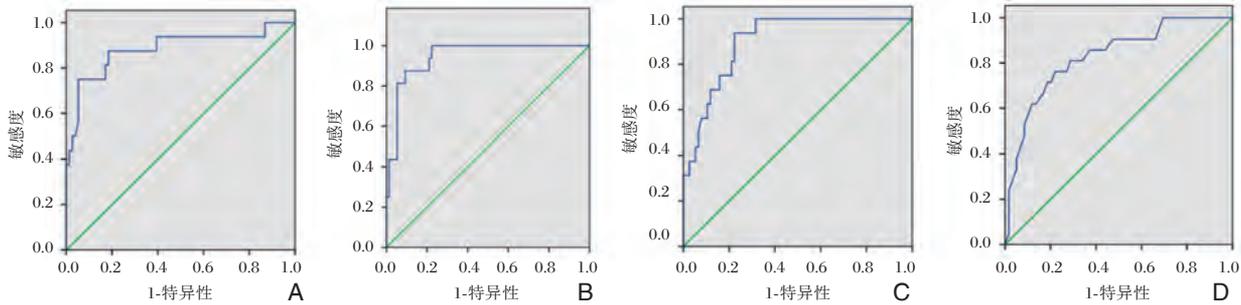
变量	β值	SE值	Wald值	P值	Exp(B)值	95.0%CI	
						下部	上部
临床分期	9.185	6.038	9.854	<0.001	4.186	2.369	6.847
淋巴转移	8.436	5.639	9.125	<0.001	3.827	1.946	6.725
E-cadherin	4.906	2.023	5.948	0.002	0.317	0.145	0.506
VEGF	7.208	2.354	8.026	<0.001	3.584	1.762	6.028
nm23-H1	4.571	1.968	5.842	0.005	0.283	0.128	0.359

表4 ROC 曲线下面积

Table 4 Area under the ROC curve

变量	面积	标准误 ^a	P值	渐进 95%置信区间	
				上限	下限
E-cadherin	0.884	0.057	0.000	0.772	0.995
VEGF	0.945	0.024	0.000	0.898	0.992
nm23-H1	0.902	0.033	0.000	0.837	0.967
NLR	0.918	0.042	0.000	0.846	0.980

注:^a表示为标准误。



注:图A为E-cadherin 预测患者预后的ROC曲线分析图;图B为VEGF 预测患者预后ROC曲线分析图;图C为nm23-H1 预测患者预后ROC曲线分析图;图D为NLR 预测患者预后ROC曲线分析图。

图2 ROC 曲线分析图

Figure 2 ROC curves

3 讨论

E-cadherin 属于钙黏附蛋白分子成员,亦为跨膜蛋白亚型,通常在人体与动物上皮细胞部位,并且大量表达于黏着连接,可以在保持上皮细胞形态以及结构完整性方面发挥重要作用。虽然不少研究证实^[10],E-cadherin 能够作为部分上皮源性肿瘤(包括肺癌与胃癌等)患者预后预测较为重要指标,其表达异常降低能促进肿瘤细胞浸润,加速病情进展,但是E-cadherin 在宫颈癌方面相关研究并不多。本研究中,同步放化疗后,患者血清E-cadherin 水平明显升高,与上述国内外研究观点相符,说明同步放化疗可有效改善中晚期SCCC E-cadherin 表达情况,E-cadherin 降低在肿瘤发展中起着重要作用。SCCC 发生与进展过程主要和血管、相应淋巴管生成存在紧密联系。VEGF 是一种糖蛋白,为当

前已知的一种促血管生成因子,主要作用机制为:经旁分泌机制高效并且特异地作用于相应血管内皮细胞,加快新生血管形成。对于新生血管,其既能促进肿瘤生长,同时又可为肿瘤细胞发生远处转移提供必要条件。以往报道称,血清VEGF 表达上调几乎出现在所有恶性肿瘤病人身上^[11]。大部分肿瘤细胞能够分泌VEGF,同时对肿瘤细胞产生作用,于原位肿瘤之中表达,加快内皮细胞增生,同时介导血管组织与淋巴微管形成^[12-13]。nm23 基因主要包括nm23H1 以及nm23H2 亚型。大部分恶性肿瘤患者中,可检测出nm23H1 低表达结果,其和恶性肿瘤发生及进一步发展有关^[14]。进一步COX 回归分析发现,临床分期、淋巴转移、VEGF 为预后主要独立危险因素,而E-cadherin 与nm23-H1 则属于预后保护因素,与杨杰等^[15]研究观点相符。分析其原因,关于VEGF,可能由于:①VEGF 能够加快

肿瘤血管组织与微淋巴血管组织生成,使得肿瘤组织血管大量增生,最终提高血管通透性;②VEGF表达上调能加快肿瘤血管生成,提高肿瘤细胞往淋巴系统与各种微循环系统转移几率,从而对预后产生影响;③因为血管之中物质渗出变多,肿瘤细胞从中吸收大量营养物质与所需氧分子,从而快速增殖。E-cadherin低表达代表着E-cadherin黏附功能降低,导致细胞黏附连接部位异常,瘤细胞逐渐脱离原发灶,产生转移潜能,可能为引起SCCC浸润转移主要步骤。nm23-H1表达异常能够减少三磷酸核苷产生量,从而对微管聚合造成影响,导致细胞减数分裂过程中,纺锤体形成异常,产生染色体畸形,并生成非整倍体细胞,促进肿瘤转移;同时可影响细胞骨架,导致细胞运动,最终在浸润、转移中发挥作用。炎症指标NLR和不少肿瘤预后存在紧密关联,以往报道称,NLR可用于宫颈癌患者预后评估,具有较高应用价值^[16]。本研究显示,ROC曲线下面积处于最大值时,提示血清E-cadherin、VEGF、nm23-H1在预测中晚期SCCC患者同步放化疗预后方面具有重要价值。

综上,中晚期SCCC患者接受同步放化疗后,血清E-cadherin、nm23-H1表达明显上调,VEGF表达明显降低,其检测可为预后生存预测提供有效指导。

参考文献

- [1] 李娇,李娜,赵静妮,等.人乳头状瘤病毒少见亚型在宫颈病变患者分布状况的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(6):367-371.
- [2] 郭婷,鲁天福,王娇.腹腔镜下保留神经平面广泛子宫切除术对宫颈癌患者直肠和膀胱功能恢复的影响[J].解放军医药杂志,2019,31(6):37-40.
- [3] 池雪静,边青,李蔚筠,等.华支睾吸虫分泌排泄蛋白对肝癌细胞系HepG2细胞增殖、迁移和上皮间质转化的影响[J].热带医学杂志,2019,19(4):393-397.
- [4] 蒋杰,毕玉晰,李志茹,等.人乳头瘤病毒E6/E7在宫颈癌中的研究进展[J].临床误诊误治,2018,31(11):107-111.
- [5] 王鑫,张虹.术前NLR和PLR对上皮性卵巢癌患者预后的评估价值[J].现代妇产科进展,2016,25(6):433-436.
- [6] 吴小花,陈书恩.HPV基因分型检测联合TCT在宫颈癌筛查中的价值[J].国际检验医学杂志,2015,36(21):3208-3209.
- [7] Potel CM, Fasci D, Heck AJR. Mix and match of the tumor metastasis suppressor Nm23 protein isoforms in vitro and in vivo[J]. FEBS J, 2018, 285(15):2856-2868.
- [8] 魏兰,郑轶,王艳,等.贝那普利联合雷公藤多苷治疗IgA肾病对细胞免疫功能及血清VEGF、ET-1水平的影响[J].临床误诊误治,2019,32(7):25-29.
- [9] 吕海燕,王刚,王若雨,等.E-cadherin以及转录因子ZEB1在乳腺癌中的表达及与ER、PR、HER-2及Ki-67表达的相关性[J].医学分子生物学杂志,2019,16(1):52-56.
- [10] 刘绪,朱杰,罗洪斌.RP11-366L20.3通过NF-κB通路调控E-cadherin表达[J].免疫学杂志,2018,34(7):562-567.
- [11] 王艳清,杨潇,鲜舒,等.SERPINB3、β-catenin和VEGF-C在宫颈癌中的表达[J].医学分子生物学杂志,2018,15(2):82-88.
- [12] 袁冬兰,钱华,王华,等.宫颈鳞状细胞癌组织中NDRG-1、COX-2、VEGF的表达及其临床意义[J].江苏大学学报(医学版),2014,24(3):250-254.
- [13] 邢海霞,赵明燕,郭勇.乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF和组织LOX水平与淋巴结转移的相关性分析[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(2):122-127.
- [14] Nauta IH, Rietbergen MM, van Bokhoven AAJD, et al. Evaluation of the 8th TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands, and the importance of additional HPV DNA-testing[J]. Ann Oncol, 2018, 29(5):1273-1279.
- [15] 杨杰,张泽高,阿依古丽·依不拉音木,等.血清VEGF水平对中晚期宫颈癌诊断价值及同期放化疗疗效影响研究[J].中华放射肿瘤学杂志,2013,22(2):99-101.
- [16] 李文婷,田男,古丽娜·库尔班.中性粒细胞与淋巴细胞比值对宫颈癌放疗及同步放化疗疗效及预后的影响[J].实用医学杂志,2015,31(22):71-74.
- [13] Thway K, Fisher C. Angiomatoid fibrous histiocytoma the current status of pathology and genetics[J]. Arch Pathol Lab Med, 2015, 139(5):674-682. DOI: 10.5858/arpa.2014-0234-RA.
- [14] 武景波,李小静.血管瘤样纤维组织细胞瘤临床病理观察[J].诊断病理学杂志,2011,18(5):361-364.
- [15] 于鸿,王朝夫,杨文涛,等.血管瘤样纤维组织细胞瘤病理诊断与鉴别诊断[J].中华病理学杂志,2010,39(4):245-248.
- [16] 王建容,张醇,陈春燕,等.淋巴结内栅栏状肌纤维母细胞瘤临床病理观察[J].诊断病理学杂志,2014,21(3):149-152.
- [17] Black JO, Zhai QJ, Varona OB, et al. Primary schwannoma in a cervical lymph node[J]. Head Neck, 2010, 32(7):964-969.

(上接第169页)

血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy联合检测对乳腺癌的临床诊断价值

徐书星^{1*} 霍庆赞¹ 张明远¹ 魏永辉¹ 杨颖¹ 纪金浩¹ 张春芬¹ 赵冰英²

[摘要] 目的 探讨血清糖类抗原153(CA153)、癌胚抗原(CEA)、铁蛋白(SF)、降钙素(CT)及同型半胱氨酸(Hcy)联合检测对乳腺癌的临床诊断价值。方法 选取2018年1月-2018年12月本院收治的150例乳腺癌患者(乳腺癌组),83例乳腺良性病变患者(乳腺良性病变组)为研究对象,同时选取同期60例健康体检女性为对照组,检测3组研究对象血清CA153、CEA、SF、CT、Hcy水平,比较3组间差异及乳腺癌不同病理参数患者的各指标水平。通过Logistic回归分析及ROC曲线分析各指标单独检测及联合检测对乳腺癌的诊断效能。结果 乳腺癌组血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy水平均明显高于乳腺良性病变组和对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),而乳腺良性病变组与对照组各指标(除SF外)差异均无统计学意义($P>0.05$)。乳腺癌患者血清CA153、CEA、SF、CT水平均随着乳腺癌临床分期的升高而逐渐升高,且有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。而血清Hcy水平与乳腺癌分期及淋巴结转移情况无显著相关性($P>0.05$)。Logistic回归分析显示血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy水平均与乳腺癌密切相关($P<0.05$)。SF、CT单独检测诊断乳腺癌的灵敏度较高(>0.7),CA153、SF单独检测诊断乳腺癌的特异度较高(>0.7),而5个指标联合检测诊断乳腺癌效果更佳,其AUC、约登指数、灵敏度、特异度、准确度分别为0.885、0.729、0.813、0.916、0.863。结论 血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy水平均可作为乳腺癌诊断的有效依据,而5项联合检测具有更高的诊断效能,诊断准确率高,更利于临床诊断。

[关键词] 糖类抗原153; 癌胚抗原; 铁蛋白; 降钙素; 同型半胱氨酸; 乳腺癌

Clinical value of combined serum CA153, CEA, SF, CT and Hcy in the diagnosis of breast cancer

XU Shuxing^{1*}, HUO Qingyun¹, ZHANG Mingyuan¹, WEI Yonghui¹, YANG Ying¹, JI Jinhao¹, ZHANG chunfen¹, ZHAO Bingying²

(1. Department of Laboratory, Cangzhou maternal and child health hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061001; 2. Department of Breast, Cangzhou maternal and child health hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061001)

[ABSTRACT] Objective To investigate the clinical value of serum carbohydrate antigen 153 (CA153), CEA, ferritin (SF), calcitonin (CT) and homocysteine (Hcy) in the diagnosis of breast cancer. Methods 150 cases of breast cancer (breast cancer group) and 83 cases of benign breast lesions (breast benign lesions group) admitted to our hospital from January 2018 to December 2018 were selected as the study objects, and 60 healthy women in the same period were selected as the control group. Serum levels of CA153, CEA, SF, CT and Hcy in the three groups were detected, and the differences among the three groups and the

基金项目:河北省卫生和计划生育委员会医学科科研项目(20191248)

作者单位:1.沧州市妇幼保健院检验科,河北,沧州 061001

2.沧州市妇幼保健院乳腺科,河北,沧州 061001

*通信作者:徐书星, E-mail:xsx17603171337@163.com

indexes of patients with different pathological parameters of breast cancer were compared. Logistic regression analysis and ROC curve were used to analyze the diagnostic efficacy of independent and combined detection for breast cancer. **Results** The serum levels of CA153, CEA, SF, CT and Hcy in the breast cancer group were significantly higher than those in the benign breast lesions group and the control group, with statistically significant differences ($P<0.05$), while the differences in all indicators (except SF) between the benign breast lesions group and the control group were not statistically significant ($P>0.05$). The serum CA153, CEA, SF and CT levels of breast cancer patients all increased gradually with the increase of the clinical stage of breast cancer, and those with lymph node metastasis were significantly higher than those without lymph node metastasis, with statistically significant differences ($P<0.05$). There was no significant correlation between serum Hcy level and stage of breast cancer and lymph node metastasis ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that serum CA153, CEA, SF, CT and Hcy levels were closely related to breast cancer ($P<0.05$). The sensitivity of SF and CT alone was higher (>0.7), while the specificity of CA153 and SF alone was higher (>0.7). The AUC, the Yoden index, the sensitivity, the specificity and the accuracy were 0.885, 0.729, 0.813, 0.916 and 0.863, respectively. **Conclusion** Serum CA153, CEA, SF, CT and Hcy levels can be used as an effective basis for the diagnosis of breast cancer. The five combined tests have higher diagnostic efficiency, higher diagnostic accuracy and are more conducive to clinical diagnosis.

[KEY WORDS] Carbohydrate antigen 153; Carcinoembryonic antigen; Ferritin; Calcitonin; Homocysteine; Breast cancer

乳腺癌作为目前临床中最为常见的女性恶性肿瘤,其发病率逐年升高,严重影响女性的健康及生活质量,尽早进行有效的诊断是提高乳腺癌治愈率、改善预后的关键^[1-2]。血清糖类抗原 153 (carbohydrate antigen 153, CA153) 和癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 是临床中最为常用的恶性肿瘤检测指标,广泛应用于各类恶性肿瘤的诊断中^[3],而 SF (ferritin, SF) 和降钙素 (calcitonin, CT) 也开始应用于乳腺癌、肺癌等检测,同时研究发现^[4-6]乳腺癌、卵巢癌等多种癌症中,血浆同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平也存在异常升高。但目前各指标单独检测对乳腺癌的诊断效能尚不够理想,且以上指标联合检测及相关定量研究较少。因此,本研究旨在通过对比分析乳腺癌患者、乳腺良性病变患者以及健康人群之间的差异,探究血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 联合检测对乳腺癌的临床诊断价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2018 年 12 月本院收治的 150 例乳腺癌患者 (乳腺癌组), 83 例乳腺良性病变患者 (乳腺良性病变组) 为研究对象。乳腺良性病变组年龄 34~58 岁, 平均 (44.68±10.13) 岁, 其中乳腺增生 45 例, 乳腺纤维瘤 28 例, 乳腺囊肿 10 例。

同时, 选取同期于本院进行体检的健康女性 60 例作为对照组, 年龄 30~60 岁, 平均 (45.16±10.42) 岁。3 组研究对象性别、年龄、既往病史等差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

纳入标准: ①均为女性, 且临床资料完整; ②均经详细查体、病史采集、影像学、穿刺活检或术后病理活检明确诊断^[7]; ③均为单侧; ④其中乳腺癌患者均为首次发现, 且未接受过放化疗或相关综合治疗; ⑤所以患者及家属均签署研究知情同意书, 并经本院伦理委员会批准。排除标准: ①合并患有心、脑、肝、肾等系统严重疾病及出血性疾病者; ②既往有肿瘤病史。乳腺癌组年龄 36~57 岁, 平均 (46.82±9.27) 岁, 其中, 根据 AJCC 第 7 版乳腺癌分期系统^[8]进行分期: 0 期 28 例, I 期 40 例, II 期 47 例, III 期 35 例; 有淋巴结转移者 63 例。

1.2 方法

抽取所有受试对象的晨起空腹静脉血 4 mL, 使用化学发光免疫法对血清 CA153、CEA、SF 进行检测, 血清 CA153、CEA、CT 均使用罗氏 cobas e601 全自动化学发光免疫分析仪及配套试剂进行检测, SF 使用美国雅培公司生产的 Architect i2000 化学发光免疫分析仪及其配套试剂进行检测。均严格按照试剂盒说明书进行操作。观察并记录受试对象血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平, 分析乳腺癌不同病理参数与各指标水平的关系。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行分析,计数资料用 n 表示,用 χ^2 进行检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用两独立样本 t 检验,应用 Logistic 回归分析各指标对乳腺癌的影响,并建立回归方程计算多指标预测概率的预测变量,以各指标及预测变量为检验变量,乳腺癌为状态变量绘制单项指标及多指标联合检测诊断乳腺癌的 ROC 曲线,同时通过 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验来评价预测模型的校准能力。

以 $P < 0.05$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组受试对象血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平比较

乳腺癌组血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平明显高于乳腺良性病变组和对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而乳腺良性病变组与对照组各指标(除 SF 外)差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3组受试对象血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of serum CA153, CEA, ferritin, calcitonin and Hcy levels between the 3 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	CA153(U/mL)	CEA(ng/mL)	SF(ng/mL)	CT(pg/mL)	Hcy(μ mol/L)
乳腺癌组	150	26.16 \pm 14.33	4.83 \pm 2.64	209.75 \pm 98.72	38.57 \pm 21.16	17.59 \pm 9.83
乳腺良性病变组	83	9.66 \pm 7.33 ^a	2.03 \pm 1.24 ^c	69.75 \pm 31.72 ^{ak}	18.48 \pm 9.66 ^e	12.34 \pm 5.8 ^{li}
对照组	60	8.87 \pm 4.39 ^b	1.81 \pm 0.83 ^d	48.51 \pm 29.36 ^f	17.29 \pm 9.13 ^h	10.41 \pm 5.92 ^j
F 值	/	83.299	73.884	149.904	86.848	21.245
P 值	/	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 乳腺癌不同病理参数与血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平的关系

乳腺癌患者血清 CA153、CEA、SF、CT 水平均随着乳腺癌临床分期的升高而逐渐升高,且有淋

巴结转移者明显高于无淋巴结转移者,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。而血清 Hcy 水平与乳腺癌分期及淋巴结转移情况无显著相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 乳腺癌不同病理参数与血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平的关系 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 The relationship between different pathological parameters of breast cancer and serum CA153, CEA, SF, CT and Hcy levels [$n, (\bar{x} \pm s)$]

病理参数	n	CA153(U/mL)	CEA(ng/mL)	SF(ng/mL)	CT(pg/mL)	Hcy(μ mol/L)
乳腺癌分期						
0 期	28	16.27 \pm 10.62	2.93 \pm 2.36	144.58 \pm 78.54	21.18 \pm 11.27	17.15 \pm 9.23
I 期	40	21.78 \pm 13.24	3.57 \pm 2.49	176.89 \pm 94.17	29.47 \pm 12.88	16.77 \pm 9.67
II 期	47	28.87 \pm 14.59	4.93 \pm 2.58	212.87 \pm 100.25	45.67 \pm 23.78	18.65 \pm 9.94
III 期	35	43.59 \pm 25.83	6.94 \pm 3.63	289.67 \pm 123.42	60.78 \pm 28.67	19.14 \pm 9.87
F 值		16.018	13.444	12.581	23.597	0.515
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.673
淋巴结转移						
无转移	87	15.79 \pm 11.27	2.88 \pm 2.41	141.58 \pm 79.61	22.63 \pm 12.11	16.57 \pm 9.79
有转移	63	40.48 \pm 23.14	7.52 \pm 3.23	303.89 \pm 109.47	60.58 \pm 31.24	19.00 \pm 9.83
t 值		8.644	10.078	10.517	10.321	1.498
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.136

2.3 各指标与乳腺癌关系的 Logistic 回归分析

血清 CA153、CEA、SF、CT 及 Hcy 水平均与乳腺癌密切相关 ($P < 0.05$)。通过计算 CA153、

CEA、SF、CT 及 Hcy 五个指标(分别计为 X1、X2、X3、X4、X5) Logistic 回归分析结果确定乳腺癌预测值回归方程为: $P = 1/[1 +$

$e^{-(7.075 + 0.046X1 + 0.179X2 + 0.032X3 + 0.061X4 + 0.054X5)}$], Logistic 回归分析结果的预测变量 PRE_1。

析结果见表3;同时确定五个指标联合检测预测概

表3 各指标与乳腺癌关系的 Logistic 回归分析

Table 3 Logistic regression analysis of the relationship between indicators and breast cancer

变量	B 值	S.E 值	Wald/ χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
CA153	0.046	0.020	5.270	0.022	1.048	1.007~1.090
CEA	0.179	0.086	4.367	0.037	1.196	1.011~1.415
SF	0.032	0.005	41.473	0.000	1.033	1.023~1.043
CT	0.061	0.023	7.096	0.008	1.063	1.016~1.112
Hcy	0.054	0.027	4.164	0.041	1.056	1.002~1.112
常量	-7.075	0.875	65.386	0.000	0.001	

2.4 各指标单项检测及联合检测对乳腺癌的诊断效能及 ROC 曲线

血清 CA153、CEA、SF、CT、Hcy 单独检测及联合检测预测变量 PRE_1 对乳腺癌诊断的的诊断效能及 ROC 曲线,见表4,图1。将每组 CA153、CEA、SF、CT、Hcy 数值代入方程 $P=1/[1 + e^{-(7.075 + 0.046X1 + 0.179X2 + 0.032X3 + 0.061X4 + 0.054X5)}$]得到预测概率值

P,若 P 值 \geq 预测变量 PRE_1 的临界值即诊断为乳腺癌。通过 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验来评价预测模型的校准能力。结果显示, Hosmer-Lemeshow $\chi^2=5.361, P=0.634 > 0.05$, 提示 PRE_1 模型预测值与实际观测值之间的差异无统计学意义,预测模型拟合度较好,有较好的校准能力。

表4 各指标单项检测及联合检测对乳腺癌的诊断效能

Table 4 The diagnostic efficacy of single and combined detection for breast cancer

指标	临界值	约登指数	敏感度	特异度	准确度	AUC(95%CI)
CA153(U/mL)	15.655	0.373	0.653	0.720	0.686	0.773(0.721~0.826)
CEA(ng/mL)	2.46	0.290	0.633	0.657	0.645	0.734(0.678~0.790)
SF(ng/mL)	95.810	0.566	0.853	0.713	0.785	0.893(0.856~0.930)
CT(pg/mL)	22.745	0.398	0.713	0.685	0.700	0.777(0.726~0.829)
Hcy(μ mol/L)	15.915	0.252	0.567	0.685	0.625	0.668(0.606~0.731)
预测变量 PRE_1	0.610	0.729	0.813	0.916	0.863	0.885(0.837~0.933)

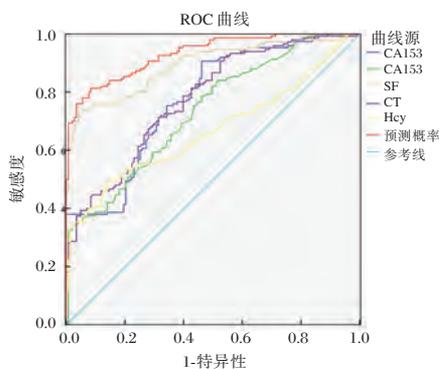


图1 血清 CA153、CEA、SF、CT、Hcy 单独检测及联合检测对乳腺癌诊断的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of serum CA153, CEA, SF, CT and Hcy in the diagnosis of breast cancer

3 讨论

目前临床中乳腺癌的诊断多采用多种肿瘤标志物联合检测的方法^[9]。CA153 是公认的对乳腺癌较高诊断特异性的肿瘤标志物,其在乳腺癌患者中的阳性率为 22.5%~49.2%^[10-11]。Gion 等^[12]的研究发现,CA153 水平与乳腺癌患者临床分期、淋巴结转移情况等密切相关。而 CA153 水平升高的乳腺癌患者在手术治疗结束后其水平均呈现显著降低趋势,直至趋近于正常参考范围,而术后复发患者其水平往往会再次升高^[13]。CEA 是特异性合成分泌的一种广谱肿瘤标记物,其在乳腺癌中的阳性率可达 14.8%~58.0%^[14-16],且其水平与乳腺癌

分期及肝脏、骨等转移情况密切相关^[17]。SF主要参与机体的铁代谢,恶性肿瘤能促进铁蛋白异构体的合成与分泌而导致血清铁蛋白水平的显著升高^[18]。CT与甲状旁腺素(PTH)有相互拮抗作用,一些恶性肿瘤可使血清降钙素水平明显增加,尤其在多种内分泌恶性肿瘤中及骨转移时的差异较为显著^[19-20]。本研究结果显示,乳腺癌组血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy水平均明显高于乳腺良性病变组和对照组,且随着乳腺癌临床分期的升高而逐渐升高,而有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移者,与以上研究结论基本一致。

本研究结果发现其对乳腺癌诊断的AUC、约登指数、灵敏度、特异度、准确度分别为0.885、0.729、0.813、0.916、0.863,诊断效能参数(除灵敏度外)均较单项检测得到了显著提高。而将各单项指标整合起来对乳腺癌进行综合分析,避免了经验判断的主观性,提高了乳腺癌诊断的科学性和客观性,对乳腺癌的筛查和诊断均具有重要价值。

综上所述,血清CA153、CEA、SF、CT及Hcy水平均可作为乳腺癌诊断的有效依据,而通过建立5项指标的回归模型对患者进行联合检测能有效提高乳腺癌的诊断效能,弥补单项检测中可能的不利因素影响,更利于临床诊断,值得推广应用。

参考文献

- [1] 杨文蔚,王志恒,岳朝艳. 乳腺癌患者血清CA153、CEA、铁蛋白和降钙素水平的变化及临床意义[J]. 检验医学, 2017, 32(4): 308-310.
- [2] 陈园,安丽颖,王鹏. CEA、CA-153、ICAM-1、E-selection单项及联合检测对乳腺癌的诊断价值[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(4): 547-549.
- [3] Schauenstein E, Lahousen M, Weblacher M, et al. Selective decrease in serum immunoglobulin G1. A tissue nonspecific tumor marker detecting early stages of gynecologic malignant disease with high efficiency[J]. Cancer, 2015, 73(3): 511-516.
- [4] 徐龙,张冠中,郑振东,等. 血清CEA及CA153连续且显著降低对晚期乳腺癌无影像学进展的判定价值[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(19): 865-868.
- [5] Bevilacqua V, Chan MK, Chen Y, et al. Pediatric population reference value distributions for cancer biomarkers and covariate-stratified reference intervals in the CALIPER cohort. [J]. Clinical Chemistry, 2014, 60(12): 1532-1542.
- [6] 门莎莎,李海涛,李艳伟. CEA、CA153和CRP对乳腺癌的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(12): 1193-1195.
- [7] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015版)[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(9): 692-754.
- [8] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC Cancer Staging Manual [M]. 7th ed. New York: Springer, 2010: 347-376.
- [9] 王海疆,蔡栋昊,栾艺,等. CEA、CA125、CA153、CYFRA 211在三阴性乳腺癌中的诊断价值评价[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(09): 1082-1085+1060.
- [10] 黄玉细,郑曦,黄双月,等. 乳腺癌P53、CA153的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(2): 221-224.
- [11] 王建国,王贯宇,吴煜龙,等. 乳腺癌肿瘤标志物CA15-3和CEA联合检测的临床意义[J]. 医学研究与教育, 2011, 28(1): 35-37.
- [12] Gion M, Mione R, Dittadi R, et al. Carcinoembryonic antigen, ferritin, and tissue polypeptide antigen in serum and tissue. Relationship with the receptor content in breast carcinoma [J]. Cancer, 2015, 57(5): 917-922.
- [13] 陈晓华,曹小龙,陈逢生,等. 血清肿瘤标志物CA15-3对Her-2阳性乳腺癌术后化疗疗效的评估价值[J]. 分子诊断与治疗, 2014, 6(3): 177-182.
- [14] 詹红泉. CEA CA153 CA125 CA199 CYFRA21-1联合检测乳腺癌的诊断价值[J]. 浙江临床医学, 2016, 18(3): 555-556.
- [15] 徐庆华,舒向芳,胡涛. 血清CA15-3、CEA和PRL联合检测在乳腺癌早期诊断中的意义[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(4): 647-648.
- [16] 易琳,刘兴明,林丁,等. 血清CA153、CA125、CEA联合检测在乳腺癌诊断中的价值[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(9): 802-805.
- [17] 吴祥德. 乳腺疾病诊治[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 170-176.
- [18] 曾磊,刘彤,于仁波. 乳腺癌患者血清铁蛋白测定的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2001, 14(1): 27-28.
- [19] 姜晓华,蔡洁,叶蕾,等. 甲状腺髓样癌的临床应对[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(5): 433-438.
- [20] 郝伟静,张寰,于洋,等. 血清降钙素检测对甲状腺髓样癌诊治的临床意义及成本效益分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(7): 506-509.

GAP-43 蛋白表达与大鼠心力衰竭发病相关性分析

王娜^{1*} 陈玉善² 刘蕾¹ 杜林翔¹ 王书飞¹ 左艳芳¹ 李宗赢¹ 李婷婷¹

【摘要】 目的 探讨生长相关蛋白43(GAP43)蛋白及与大鼠心力衰竭发病的关系。方法 选取清洁级 Wistar 大鼠 30 只,随机分为模型组和假手术组,每组各 15 只,模型组采用阿霉素 4 mg/kg 腹腔注射建立心力衰竭模型^[1],假手术组注射生理盐水,采用心脏超声评估大鼠左心室射血分数(LVEF),采用 qRT-PCR 检测心脏组织 GAP-43 mRNA 表达,Western blot 检测心脏组织 GAP-43 蛋白表达。结果 模型组心脏组织 GAP-43 mRNA 和蛋白相对表达量分别为(0.300±0.073)和(0.373±0.043),明显低于假手术组(0.902±0.089)和(1.210±0.133)($P<0.05$);模型组造模 4 周后 LVEF 为(20.44±2.01)%,明显低于假手术组(70.28±3.62)%,差异有统计学意义($P<0.05$);GAP-43 mRNA 相对表达量与 LVEF 呈负相关($r=-0.707, P<0.05$),GAP-43 蛋白相对表达量与 LVEF 呈负相关($r=-0.600, P<0.05$)。结论 心力衰竭大鼠心脏组织 GAP-43 mRNA 和蛋白相对表达量明显下调,GAP-43 蛋白的表达变化可能参与了心力衰竭的发病机制。

【关键词】 生长相关蛋白 43;心力衰竭;心功能

Analysis of the correlation between the GAP-43 protein expression and the pathogenesis of heart failure in rats

WANG Na^{1*}, CHEN Yushan², LIU Lei¹, DU Linxiang¹, WANG Shufei¹, ZUO Yanfang¹, LI Zongying¹, LI Tingting¹

(1. Department of Cardiology, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan, China, 466000; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the relationship between growth associated protein 43 (GAP-43) and the pathogenesis of heart failure in rats. Methods 30 SPF-grade Wistar rats were randomly divided into model group and sham-operated group, with 15 rats in each group. Heart failure model was established by intraperitoneal injection of adriamycin 4 mg/kg in model group, the sham operation group was injected with saline, the left ventricular ejection fraction (LVEF) was assessed by echocardiography, the expression of GAP-43 mRNA was detected by qRT-PCR, and the protein level of GAP-43 was detected by Western blot. Results The relative expression of GAP-43 gene and protein in heart tissue of model group were (0.300±0.073) and (0.373±0.043), significantly lower than those of sham operation group (0.902±0.089) and (1.210±0.133) ($P<0.05$). The LVEF of model group at 4 weeks after modeling was (20.44±2.01)%, which was significantly lower than that of sham operation group (70.28±3.62)% ($P<0.05$). The expression level of GAP-43 both gene and protein was negatively correlated with LVEF ($r=-0.707, P<0.05$) and ($r=-0.600, P<0.05$). Conclusion The expression of GAP-43 both mRNA and protein level in heart tissue of rats with heart failure are significantly down-regulated. It may be involved in the pathogenesis of heart failure.

【KEY WORDS】 Growth-related protein 43; Gene; Heart failure; Cardiac function

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2018JDZX107)

作者单位:1.周口市中心医院心内科,河南,周口 466000

2.河南省中医学第一附属医院心内科,河南,郑州 450000

*通信作者:王娜, E-mail: 18408433@qq.com

心力衰竭(heart failure, HF)是指各种原因导致的心脏组织重构、心功能降低临床表现为心室充盈、心室射血分数降低等的一种临床综合征,是常见的心血管系统疾病^[1]。其发病率呈逐年上升趋势。据流行病学资料估计,全国卒中患者不低于700万,心衰患者约450万左右,是常见的心血管患者死亡的主要原因^[3-4],慢性心衰患者住院30 d死亡率达5.4%^[5]。其发病机制,主要由于心输出量减少,心腔压力增加而激动神经体液调节机制,交感神经兴奋,肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,释放大量的去甲肾上腺素,心肌应激性增强而触发恶性室性心律失常,严重导致心源性猝死^[6]。神经生长相关蛋白-43(growth-associated protein 43, GAP43)是神经系统发育过程中高度表达的一种神经组织特异性磷酸蛋白质,参与轴突生长和突触形成,是神经再生表达过程中的典型特征,可作为神经生长状况的反映性标志物。GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA水平可反映神经重构水平,参与HF发生发展机制^[7]。为进一步确定GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA水平在HF诊断中的价值,本研究应用心脏超声评估大鼠左心室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF),应用qRT-PCR方法检测心脏组织GAP-43 mRNA表达,Western blot检测心脏组织GAP-43蛋白表达,试图探讨GAP-43蛋白的表达及其在心力衰竭发病机制中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取清洁级Wistar大鼠30只,3月龄,体重180~200 g,雌雄各半,购自广东省实验动物中心,使用许可证号:SYXK(粤)2013-0002,自由摄食和饮水,昼夜交替各12 h,随机分为模型组和假手术组,每组各15只,其中模型组造模过程中死亡4只。SPF级Wistar大鼠48只,雌雄不限,体质量(200±20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物合格证号:SCXK2010-0001。大鼠购入后,适应性饲养1周,动物室保持室温(20±2)℃,相对湿度45%,12 h昼夜节律,自由饮水,常规颗粒饲料喂养,隔天更换一次垫料。

1.2 实验方法

1.2.1 干预方法

手术组大鼠参见文献建立DHF模型^[1]。手术

严格无菌操作,每只大鼠术后给予30万U/(kg·d)青霉素肌肉注射3 d,预防感染,术后精心饲养。术后第8周开始,使用微升注射器,静脉注射右下肢急性心衰药物RLX,RLX小剂量组为30 μg/(kg·d),RLX大剂量组为98 μg/(kg·d),给药时间2周。而非手术组应用生理盐水以HF组相同的方法、体积和时间进行注射。

1.2.2 心脏超声检查

2%戊巴比妥钠以腹腔注射的方式(Sigma公司,批号T0894)进行静脉麻醉,固定每组大鼠的四肢,仰卧位。采用彩色超声诊断仪(SONOS5500, Hewlett-Packard公司)探头选用动物专用小探头(15 MHz,型号:Vevo 770)进行二维超声的心脏形态和功能检测,扫描范围:大鼠胸骨旁。测量指标包括左心室射血分数(LVEF)、左心室舒张末容积(Left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)。

1.2.3 qRT-PCR检查

总RNA提取:按照Trizol试剂盒(Invitrogen, 美国,批号:15596-026)说明书进行,向大鼠心脏组织中加入0.4 mL的Trizol试剂后匀浆,再加入1/5 Trizol试剂体积分量的氯仿,剧烈震荡混匀,室温下静置5 min,4℃,12 000 g离心15 min,取上清液至新离心管内,加入与上清液等体积分量的异丙醇,颠倒混匀,室温下静置10 min,4℃,12 000 g离心10 min,其上清液。向沉淀中加入1 mL 75%乙醇清洗沉淀,12 000 g,4℃离心5 min,其上清液保留沉淀并干燥。RNA OD值A260/A280在1.7~2.1为合格。PCR扩增:按照反转录试剂盒(广州瑞真生物有限公司,批号:RR047Q)说明书进行DNA反转录;以反转录cDNA产物为模板,按照实时荧光定量PCR试剂盒(广州瑞真生物有限公司,批号:RR430S)说明书进行荧光定量测定。PCR反应体系如下:预变性30 s,95℃;扩增、延伸15 s,95℃;退火30 s,60℃,循环40次,上游引物:ATTCAGGCTAGCTTCCGTGG,下游引物:GAAGGTGCATCTCCTGCCTT,产物片段为218 bp。

1.2.4 Western blot检查

取50 mg分离得到的左心室组织的蛋白质,BCA法(bicinchoninic acid)测量其蛋白浓度,将蛋白进行电泳、转膜、GAP-43一抗孵育(稀释比例

1:400, 武汉博士德生物试剂公司提供)、二抗孵育、杂交、显影、曝光, 所需的 Western、IP 细胞裂解液、PMSF、增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物技术研究。条带灰度值采用 Image J 图像分析软件分析处理。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较使用 *t* 检验, 相关性分析 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠体质量比较

模型组和假手术组大鼠体质量比较差异无统计学意义(P>0.05), 见表1。

表1 两组大鼠体质量比较 [n, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	体质量(g)	t 值	P 值
模型组	11	194.49±10.20	0.865	0.396
假手术组	15	191.18±9.22		

2.2 两组造模后4周心脏组织 GAP-43 mRNA 和蛋白表达

模型组心脏组织 GAP-43 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于假手术组, 差异比较有统计学意义(P<0.05), 见表2、图1。

表2 两组造模后4周心脏组织 GAP-43 mRNA 和蛋白表达 [n, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	GAP-43 mRNA 相对表达量	GAP-43 蛋白相对表达量
模型组	11	0.300±0.073	0.373±0.043
假手术组	15	0.902±0.089	1.210±0.133
t 值		18.335	20.023
P 值		0.000	0.000

注: A. 模型组; B. 假手术组

2.3 两组造模后4周后 LVEF 比较

模型组造模4周后 LVEF 明显低于假手术组, 差异比较有统计学意义(P<0.05), 见表3。

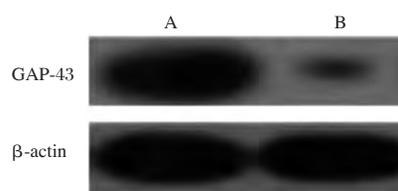


图1 模型组和假手术组大鼠心脏组织 gap-43 蛋白的 western blot 分析

Figure 1 Western blot analysis of GAP-43 protein taken from heart tissue of rats in model group and sham-operated group

表3 两组造模4周后 LVEF 比较 [n, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of LVEF in two groups after 4 weeks of modeling [n, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	LVEF(%)	t 值	P 值
模型组	11	20.44±2.01	41.110	0.000
假手术组	15	70.28±3.62		

2.4 相关性分析

将模型组 GAP-43 mRNA 和蛋白相对表达量与 LVEF 进行相关分析, 结果显示: GAP-43 mRNA 相对表达量与 LVEF 呈负相关 ($r=-0.707, P<0.05$), GAP-43 蛋白相对表达量与 LVEF 呈负相关 ($r=-0.600, P<0.05$)。见图2。

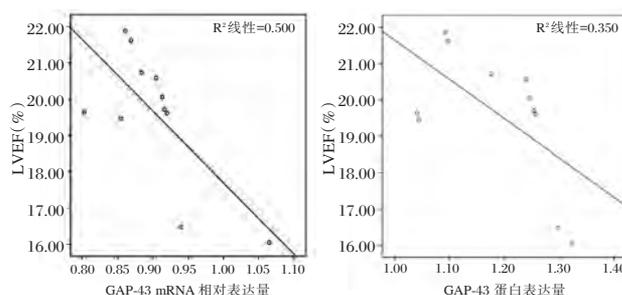


图2 心力衰竭大鼠 GAP-43 mRNA 和蛋白相对表达量与 LVEF 相关图

Figure 2 Analysis of correlation between relative expression of GAP-43 mRNA and protein and LVEF

3 讨论

多数学者认为, HF 致交感神经兴奋, 神经组织重构可引起以室性心律失常为代表的各种心律失常临床表现, 严重可引起患者心源性猝死。故神经重构在 HF 疾病进展过程中起着重要作用。目前关于神经重构致交感神经过度兴奋相关性猝死的发病机制并未完全阐明, 交感神经重构、心肌重构等相互作用一直被认为是心衰的主要发

病机制^[8]。有研究报道^[9]HF患者早期表现为交感神经兴奋,去甲肾上腺素分泌增多,出现功能性交感神经支配等现象,表现为反射性分泌去甲肾上腺素和酪氨酸羟化酶的水平下降,神经对去甲肾上腺素的重吸收能力降低,相应地,所需的去甲肾上腺素吸收载体-1密度降低,最终使患者交感神经功能下降甚至丧失,长时间的抑制作用,可加重心衰,严重导致死亡^[10]。临床上有研究报道^[11]血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)类药物可缓解患者的交感神经支配现象, β 受体阻断剂对临床各种心律失常、提高室颤阈值、膜稳定、减少猝死等方面具有重要作用。目前已得到临床的广泛应用,具体作用机制尚不明确,可能与减慢心率、降低异位起搏点兴奋性、延长房室结不应期、减慢传导等具有密切关系。但仍需进一步研究。

GAP-43是神经元上特异性的轴突膜蛋白质,又称neuromodulin,参与神经细胞生长、突触生成发育和神经细胞再生,在神经元的发育和再生过程中起着重要作用,同时,GAP-43作为细胞内信号分子,调节轴突延伸作用,间接影响信号传导途径,也可通过增强与G蛋白偶联受体的转运作用,直接促进细胞内的信号传导。近年来,大量文献报道,利用GAP-43水平反映心肌细胞功能,是判断交感神经重构常用的指标^[13],故在心衰相关性基础研究中具有一定作用。本研究结果显示,心力衰竭模型组大鼠血清GAP-43 mRNA、GAP-43蛋白水平较假手术组大鼠血清中上述指标显著降低,与既往研究报道一致^[14]。有文献报道^[15]通过给心力衰竭大鼠灌注益气活血中药后较治疗前发现血清GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA水平显著下降,对心功能指标检测发现LVEF提高,大鼠心衰症状得到明显改善。以往研究报道虽给出相同的结论,但并未进一步分析心脏功能与GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA水平的关系。本研究结果显示,GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA与LVEF间均呈负相关。提示,GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA越高,心功能越差。由此可作为心衰病情评估的指标,对临床诊断和个性化治疗方案的确定具有重要意义。

综上所述,心力衰竭大鼠心脏组织GAP-43 mRNA和蛋白相对表达量明显下调,与心功能有一定关系,在疾病发生发展中有重要作用。本研究创新处,不仅确定GAP-43蛋白、GAP-43 mRNA

水平在心衰诊断中的价值,还得出其与心功能的关系,对临床诊治具有重要的指导意义,可推进心衰治疗的临床发展。本研究不足之处,样本量有限,需扩大样本进一步深入实验。

参考文献

- [1] 尚莉莉,全爱君,王馨,等.祛痰通阳汤对慢性心力衰竭模型大鼠超声心动图及血清Ang II含量、心肌组织AT1 mRNA表达的影响[J].中医杂志,2018,59(1):56-60.
- [2] 李梦婷,彭成,谢晓芳.心力衰竭小型动物模型研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(5):213-219.
- [3] 王芳芳,陈章荣,吴新华,等.云南地区慢性心力衰竭患者正常甲状腺功能综合征的流行病学调查[J].中国现代医学杂志,2017,27(15):78-81.
- [4] 陈会花,章忱,吕嵘.舒张性心力衰竭实验动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2017,25(3):336-339.
- [5] Omar, Charnigo, Guglin. 收缩压与右心房压力的比值:一种新型标志物,可用于预测射血分数 $\leq 30\%$ 的急性失代偿性心力衰竭患者的发病率和死亡率[J].中华高血压杂志,2017,11(1):99-99.
- [6] 佚名.室旁核内脂肪酸酰胺水解酶上调介导慢性心衰大鼠交感神经兴奋亢进[J].中国病理生理杂志,2018,34(3):385-392.
- [7] 心脏神经节丛刺激对急性心肌梗死后心力衰竭犬心脏功能及自主神经重构的影响[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2018(1):73-77.
- [8] 张忠敏,王晓莉,毕鹏翔,等.姜黄素对阿尔茨海默病细胞模型的保护作用及GAP-43蛋白表达的影响[J].国际药学研究杂志,2017,44(3):257-261.
- [9] 陈龙菊,陈传奇,谭云霞.葛根素对臂丛撕脱后脊髓运动神经元GAP-43及NGF蛋白表达的影响[J].中华显微外科杂志,2018,41(1):62.
- [10] 黎罗明,邹达良,冯欣.NEPI-40联合VEGF对MCAO模型大鼠神经功能及GAP-43蛋白表达的影响[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(46):99-102.
- [11] 刘素江,韩惠芳,王世焕,等.先天性上斜肌麻痹性斜视患儿眼外肌NGF、GAP-43表达变化及意义[J].山东医药,2017,57(14):104-106.
- [12] 成对关联刺激对脑缺血再灌注大鼠感觉运动功能和MAP-2、GAP-43表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(10):733-738.
- [13] 张培,郝子淼,蒋素芳,等.cPKC γ /GAP-43信号通路在氯胺酮致发育期大鼠海马神经元凋亡中的作用:离体实验[J].中华麻醉学杂志,2017,37(3):296-298.
- [14] 有氧运动对大鼠脑衰老和学习记忆能力及额叶GAP-43表达的影响[D].成都体育学院,2017,11(8):66-73.
- [15] 李彩格,王瑞英,周红,等.糖尿病大鼠海马生长相关蛋白GAP-43表达的研究[J].神经解剖学杂志,2018,11(1):97-101.

血清 miR-200c 表达与 2 型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的相关性研究

庄苹¹ 杨锦¹ 郑蛟¹ 张敏^{2*}

[摘要] 目的 研究血清 miR-200c 表达与 2 型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的相关性。方法 选择 2015 年 3 月至 2019 年 10 月期重复收治入院的 108 例 2 型糖尿病患者,根据首次入院时尿白蛋白水平分为无白蛋白尿组 55 例、微量白蛋白尿组 35 例、大量白蛋白尿组 18 例,根据第二次入院时尿白蛋白变化分为白蛋白尿进展组和非进展组,检测首次入院时血清 miR-200c 表达量并分析白蛋白尿短期进展的相关因素。**结果** 与无白蛋白尿组、微量白蛋白尿组比较,大量白蛋白尿组患者的糖尿病病程明显延长,高血压率、FBG、HbA1c%、Scr、eGFR、miR-200c 均明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);与非进展组患者比较,进展组患者高血压率、Scr、eGFR、miR-200c 均明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);Logistics 回归分析显示,高血压及 miR-200c 增加是白蛋白尿短期进展的危险因素,差异具有统计学意义($P<0.05$);ROC 曲线分析显示,miR-200c 对白蛋白尿短期进展具有预测价值,最佳截点为 0.865。**结论** 血清 miR-200c 表达增加是 2 型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的危险因素且对白蛋白尿短期进展具有预测价值。

[关键词] 2 型糖尿病;白蛋白尿;miR-200c;短期进展;危险因素

Correlation between serum miR-200c expression and the short-term progression of albuminuria in patients with type 2 diabetes

ZHUANG Ping¹, YANG Jin¹, ZHENG Jiao¹, ZHANG Min^{2*}

(1. Department of Endocrinology, Sichuan Forestry Central Hospital, Chengdu, China, 610081; 2. Department of Geratology, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, China, 610072)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between serum miR-200c expression and the short-term progression of albuminuria in patients with type 2 diabetes. **Methods** 108 cases of patients with type 2 diabetes who were hospitalized repeatedly from March 2015 to October 2019 were selected, divided into non albuminuria group containing 55 cases, microalbuminuria group containing 35 cases and macroalbuminuria group containing 18 cases according to the level of urinary albumin at the first admission, progressive group and non-progressive group according to the change of urinary albumin at the second admission. The serum expression of miR-200c at the first admission was detected and the factors related to the short-term progress of albuminuria were analyzed. **Results** Compared with the non-albuminuria group, microalbuminuria group, the course of diabetes significantly prolonged, and the hypertension rate, FBG, HbA1c%, Scr, eGFR and mir-200c significantly increased in macroalbuminuria group ($P<0.05$); compared with the non-progressive group, the hypertension rate, Scr, eGFR and mir-200c significantly increased in progressive group ($P<0.05$). The logistics regression analysis showed that hypertension and the increase of miR-200c are the risk factors for

基金项目:成都市教育科技基金(HAF-20156021457)

作者单位:1. 四川省林业中心医院内分泌科,四川,成都 610081

2. 四川省医学科学院四川省人民医院老年内分泌科,四川,成都 610072

*通信作者:张敏, E-mail:caidiant5483@163.com

the short-term progress of albuminuria ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that miR-200c had predictive value for the short-term progress of albuminuria, and the best cutoff point was 0.865. Conclusion The increased expression of miR-200c in serum is a risk factor for the short-term progress of albuminuria in type 2 diabetic patients and has a predictive value for the short-term progress of albuminuria.

[KEY WORDS] Type 2 diabetes; Albuminuria; miR-200c; Short term progress; Risk factors

2型糖尿病是我国常见的内分泌代谢疾病且发病率呈逐年升高趋势,但2型糖尿病患者的治疗情况不容乐观,血糖达标率低、并发症发病率高。糖尿病肾病是2型糖尿病常见的慢性并发症,也是临床上终末期肾病最常见的病因之一^[1-2]。糖尿病肾病的发生与血糖控制不佳、糖基化终末产物蓄积、炎症反应及氧化应激反应激活均密切相关^[3-4]。近年来,越来越多的研究开始关注糖尿病肾病,多种风险因素也被证实与糖尿病肾病的发病有关,但目前国内关于糖尿病肾病的临床研究以横断面研究为主,未能对病情发展变化进行动态观察。

白蛋白尿是糖尿病肾病特征性的表现,本研究拟观察白蛋白尿短期进展情况来评价糖尿病肾病病情的动态变化并分析相关的危险因素。微小RNA (microRNAs, miRs) 是一类具有广泛生物学作用的非编码小分子RNA,血清中多种 miRs 表达异常被证实与糖尿病肾病的发生有关。刘新磊^[5]研究证实,糖尿病肾病大鼠肾脏中 miR-200c 的表达增加且抑制 miR-200c 表达对糖尿病肾病大鼠的肾脏具有保护作用。基于此,本研究将分析血清 miR-200c 表达与2型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的相关性,旨在为阐明糖尿病肾病病情发展变化的可能机制、探寻预测病情发展变化的标志物提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2015年3月至2019年10月期重复收治本院入院的108例2型糖尿病患者标本。入组标准:①符合2型糖尿病的诊断标准^[6];②连续两次住院的资料完整;③首次住院时留取血清并检测 miR-200c。④所有患者及家属均已签署知情同意书;排除标准:①其他类型糖尿病或合并糖尿病急性并发症,如糖尿病酮症酸中毒、高血糖高渗状态;②合并原发性肾脏疾病;③合并恶性肿瘤;④有使用肾毒性药物病史。以第一次入院时的资料作为基线资料、第二次入院时的资料作为随访

资料。根据第一次入院时的尿白蛋白水平分为无白蛋白尿组($< 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$)55例、微量白蛋白尿组($30 \sim 300 \text{ mg}/24 \text{ h}$)35例、大量白蛋白尿组($\geq 300 \text{ mg}/24 \text{ h}$)18例。本实验已通过医院伦理委员会批准同意。

1.2 试剂与仪器

miRNA 提取分离试剂盒、miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRNA 荧光定量检测试剂盒自北京天根公司,荧光定量PCR仪为Bio-rad公司。

1.3 方法

1.3.1 基线和随访数据的收集

收集患者第1次入院的病史资料,包括性别、年龄、糖尿病病程、体质量指数(Body mass index, BMI)、吸烟史、高血压史、用药情况、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL)、空腹血糖(Fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白(Hemoglobin A1c, HbA1c%)、血肌酐(Serum creatinine, Scr)、内生肌酐清除率(Glomerular filtration rate, eGFR)。

1.3.2 血清 miR-200c 表达的检测

取首次住院期间留取的血清标本,采用 miRNA 提取分离试剂盒分离血清中的 miRNA,采用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒将 miRNA 反转录为 cDNA,采用 miRNA 荧光定量检测试剂盒配置 PCR 反应体系并进行 PCR 扩增,分别扩增 miR-200c 及 U6,根据扩增曲线计算 miR-200c 的表达量。

1.3.3 白蛋白尿短期进展的评价

收集患者第2次入院的病史资料,与第1次入院时白蛋白尿的变化进行比较,同一患者由无白蛋白尿进展为微量白蛋白尿或大量白蛋白尿、由微量白蛋白尿进展至大量白蛋白尿、大量白蛋白尿患者 Scr 水平翻倍均判断为白蛋白尿短期进展。共28例患者发生白蛋白尿进展、作为白蛋白

尿进展组,其余80例未发生白蛋白尿进展、作为白蛋白尿非进展组。

1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行分析,计数资料用 n 表示,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间的比较采用方差分析、两组间的比较采用 t 检验,相关因素分析采用Logistic回归分析,预测价值采用ROC曲线分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 无白蛋白尿组、微量白蛋白尿组、大量白蛋白尿组患者一般资料的比较

3组间性别、年龄、BMI、吸烟率、用药情况等差异无统计学意义($P > 0.05$);与无白蛋白尿组、微量白蛋白尿组比较,大量白蛋白尿组患者的糖尿病病程明显延长($P < 0.05$),高血压率明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.2 无白蛋白尿组、微量白蛋白尿组、大量白蛋白尿组患者实验室指标的比较

表1 3组间一般资料的比较 [$n(\%)$]

Table 1 Comparison of general data among 3 groups [$n(\%)$]

资料	无白蛋白尿组 ($n=55$)	微量白蛋白尿组 ($n=35$)	大量白蛋白尿组 ($n=18$)	χ^2/F 值	P 值
男性	28(50.91)	15(42.86)	9(50.00)	0.585	0.746
年龄(岁)	59.48±9.94	58.77±10.71	61.34±10.88	0.370	0.692
BMI(kg/m^2)	23.48±6.92	23.28±7.12	24.29±8.52	0.120	0.887
糖尿病病程(年)	6.09±1.76	6.86±1.84	7.14±1.97	3.185	0.045
高血压	19(34.55)	19(54.29)	13(72.22)	8.761	0.013
吸烟	13(23.64)	7(20.00)	3(16.67)	0.445	0.801
ARB/ACEI	27(49.09)	18(51.43)	11(61.11)	0.789	0.674
他汀类	14(25.45)	10(28.57)	4(22.22)	0.262	0.877
二甲双胍	37(67.27)	28(80.00)	12(66.67)	1.919	0.383
胰岛素	16(29.09)	9(25.71)	5(27.78)	0.122	0.941

3组间TC、TG、LDL-C、HDL-C差异无统计学意义($P > 0.05$);与无白蛋白尿组、微量白蛋白尿组比较,大量白蛋白尿组患者的FBG、HbA1c%、Scr、eGFR、miR-200c均明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 3组间实验室指标的比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of laboratory indicators among 3 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

资料	无白蛋白尿组($n=55$)	微量白蛋白尿组($n=35$)	大量白蛋白尿组($n=18$)	F 值	P 值
TC(mmol/L)	1.77±0.32	1.64±0.35	1.83±0.39	2.329	0.102
TG(mmol/L)	4.77±0.78	4.49±0.81	4.84±0.92	1.635	0.200
LDL-C(mmol/L)	2.29±0.52	2.50±0.77	2.56±0.69	1.807	0.169
HDL-C(mmol/L)	1.28±0.29	1.19±0.31	1.22±0.34	0.981	0.378
FBG(mmol/L)	6.29±0.95	7.58±1.15	8.11±1.48	24.724	0.000
HbA1c%	6.83±0.97	7.34±1.25	8.65±1.94	14.073	0.000
Scr(mmol/L)	60.19±9.95	67.58±12.58	86.96±14.58	35.633	0.000
eGFR [$\text{mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ cm}^2)$]	114.49±26.96	100.19±31.48	85.68±14.85	8.544	0.000
miR-200c	0.69±0.26	0.86±0.28	1.08±0.29	14.855	0.000

2.3 白蛋白尿进展组与非进展组患者一般资料的比较

两组间性别、年龄、BMI、糖尿病病程、吸烟率、用药情况差异无统计学意义($P > 0.05$);与非进展组患者比较,进展组患者高血压率均明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.4 白蛋白尿进展组与非进展组患者实验室指标的比较

两组TC、TG、LDL-C、HDL-C、FBG、HbA1c%差异无统计学意义($P > 0.05$);与非进展组患者比较,进展组患者Scr、eGFR、miR-200c均明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表3 两组间一般资料的比较 [$n(\%)$]

Table 3 comparison of general data among 2 groups [$n(\%)$]

资料	白蛋白尿非进展组 ($n=80$)	白蛋白尿进展组 ($n=28$)	χ^2/t 值	P 值
男性	38(47.50)	14(50.00)	0.052	0.820
年龄	59.77±10.11	60.75±10.94	0.432	0.667
BMI(kg/m^2)	23.49±7.32	24.34±6.48	0.507	0.613
糖尿病病程(年)	6.72±1.68	7.09±2.29	0.909	0.366
高血压	39(48.75)	20(71.43)	0.289	0.591
吸烟	18(22.50)	5(17.86)	0.267	0.606
ARB/ACEI	40(50.00)	16(57.14)	0.424	0.515
他汀类	28(35.00)	10(35.71)	0.207	0.649
二甲双胍	54(67.50)	23(82.14)	2.173	0.140
胰岛素	22(27.50)	9(32.14)	0.218	0.640

表4 两组间实验室指标的比较 $[(\bar{x} \pm s), \text{mmol/L}]$ Table 4 Comparison of laboratory indicators between the two groups $[(\bar{x} \pm s), \text{mmol/L}]$

资料	白蛋白尿 非进展组 (n=80)	白蛋白尿 进展组 (n=28)	t 值	P 值
TC	1.73±0.30	1.85±0.41	1.649	0.102
TG	4.69±0.84	4.91±0.96	1.149	0.253
LDL-C	2.41±0.70	2.57±0.68	1.049	0.297
HDL-C	1.20±0.31	1.29±0.35	1.278	0.204
FBG	7.51±1.18	8.08±1.78	1.911	0.059
HbA1c	7.55±1.32	8.22±2.19	1.922	0.057
Scr	73.48±12.77	83.98±14.29	3.630	0.001
eGFR [mL/ (min·1.73 cm ²)]	110.48±28.48	87.12±16.48	7.704	0.000
miR-200c	0.73±0.15	1.05±0.33	5.346	0.000

2.5 白蛋白尿短期进展影响因素的logistics 回归分析

以白蛋白尿短期进展为应变量,以结果2.3及2.4中有统计学差异的高血压、Scr、eGFR、miR-200c为自变量进行Logistics回归分析,高血压及miR-200c增加是白蛋白尿短期进展的危险因素,差异具有统计学意义($P < 0.05$),Scr、eGFR与白蛋白尿短期进展无明显相关性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表5。

表5 白蛋白尿短期进展影响因素的Logistics 回归分析

Table 5 Logistic regression analysis of influence actors of short-term progress of albuminuria

因素	B 值	OR 值	95%CI	Wald/ χ^2 值	P 值
高血压	0.284	1.575	1.159~2.955	7.505	0.002
Scr	0.412	1.285	0.938~1.948	1.382	0.098
eGFR	-0.227	0.894	0.575~1.284	0.938	0.138
miR-200c	0.109	1.758	1.323~2.485	8.494	0.000

2.6 miR-200c 预测白蛋白尿短期进展的ROC 曲线分析

miR-200c 预测白蛋白尿短期进展的ROC 曲线下面积为0.7663(95%CI:0.6647~0.8679),根据约登指数最大值确定最佳截点为:0.865,该截点预测白蛋白尿短期进展的灵敏度为64.29%、特异性为71.25%。见图1。

3 讨论

糖尿病肾病是临床常见的糖尿病慢性并发症之一,严重影响患者的生活质量,也增加了终末期肾脏病的发病风险。白蛋白尿是糖尿病肾病的特

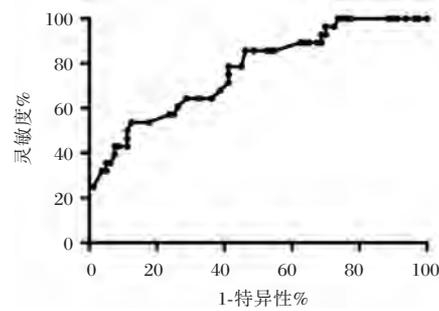


图1 miR-200c 预测白蛋白尿短期进展的ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of miR-200c in predicting short-term progress of albuminuria

征性表现之一,随着病情的发生、白蛋白漏出增多、白蛋白尿加重。多项研究证实,糖尿病患者尿白蛋白排泄增加不仅与糖尿病肾病的预后有关,还与糖尿病患者大血管病变、视网膜病变、骨代谢异常的发生密切相关^[7-9]。因此,通过危险因素筛查早期识别糖尿病患者中可能发生白蛋白尿加重的高危人群具有积极的临床意义。

在王婷婷^[10]的研究中,24.6%的2型糖尿病患者发生率白蛋白尿短期进展。本研究采用进行了2型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的随访证实是糖尿病患者白蛋白尿短期进展的危险因素之一。在糖尿病肾病的发生中,高血压也被证实是危险因素之一,血压升高能够通过引起肾小球硬化、影响肾小球灌注等途径来参与肾损害的发生^[11-12]。本研究的结果则进一步提示高血压不仅与糖尿病肾病的发生有关,还能促进糖尿病肾病的病情发展、与白蛋白尿短期进展相关。

近年来,多种血清标志物被用于糖尿病肾病病情的评价,其中miRs是一种非编码小分子RNA,在转录后水平调节基因表达,在糖尿病肾病的发生发展中起到保护作用或促进作用^[13-16]。刘新磊^[6]的动物实验证实,糖尿病肾病大鼠肾脏中miR-200c的表达增加;外源性使用miR-200c的抑制物后,糖尿病肾病大鼠肾损害减轻、活性氧生成减少、TGF- β 1表达下调,提示miR-200c可能在糖尿病肾病的发生发展中起到促进作用。在糖尿病肾病大鼠中,抑制miR-200c表达能够起到抗氧化、抗纤维化的作用。

综上所述,2型糖尿病患者血清miR-200c表达增加与白蛋白尿的产生、加重及短期进展均相关,血清miR-200c表达增加是2型糖尿病患者白蛋白尿短期进展的危险因素且对白蛋白尿短期进展具有预测价值。(下转第216页)

预后营养指数对胶质瘤患者预后的影响

徐日*

【摘要】 目的 系统评价预后营养指数(PNI)和胶质瘤患者的预后关系。方法 计算机检索PubMed、知网和万方数据库,收集有关PNI和胶质瘤预后关系的队列研究,检索时限均从建库至2019年7月31日。使用RevMan 5.3软件进行Meta分析。结果 共纳入7个队列研究,包括1 527位患者。Meta分析结果显示:单因素分析中低PNI患者的总生存期(OS)(HR=0.50,95%CI为0.38~0.64, $P<0.01$),多因素分析中低PNI患者的总生存期(OS)(HR=0.71,95%CI为0.56~0.90, $P<0.01$),与高PNI患者相比,均提示低PNI患者总生存期更短,预后较差。虽然Meta结果在单因素分析中提示异质性, $I^2=64%$,但敏感性分析显示Meta分析的总体结果是稳定的。结论 低PNI与胶质瘤患者的不良预后相关,有可能作为胶质瘤患者预后的潜在标志。

【关键词】 预后营养指数;胶质瘤;预后

Effect of prognostic nutrition index on the prognosis of glioma patients

XU Ri*

(Qilu hospital of Shandong University, Jinan, Shandong, China, 250000)

【ABSTRACT】 Objectives To systematically assess the prognostic value of prognostic nutritional index (PNI) in patients with gliomas. Methods We identified relevant studies by searching PubMed, CNKI and Wanfang databases to collect cohort studies from inception to July 31st, 2019. The meta-analysis was performed by using RevMan 5.3 software. Results A total of 7 cohort studies involving 1 527 patients were included. Low PNI was associated with the short overall survival of patients with gliomas in the univariate analysis (HR=0.50, 95% CI 0.38~0.64, $P<0.01$) and in multivariate analysis (HR=0.71, 95% CI 0.56~0.90, $P<0.01$). Although the results of the meta-analysis had statistically heterogeneous ($I^2=64%$), a sensitivity analysis showed that the results of the meta-analysis were stable. Conclusion Current evidence shows that low PNI is associated with poor prognosis in patients with gliomas and that the prognostic nutritional index may act as a useful prognostic biomarker in glioma patients.

【KEY WORDS】 Prognostic nutritional index; PNI; Glioma; Prognosis

胶质瘤(glioma)是最常见的原发性颅内肿瘤,占脑恶性肿瘤的81%^[1],其中胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)组织学类型最常见,约占所有胶质瘤的70%~75%,恶性程度最高,总生存期只有14~17个月^[1]。按照世界卫生组织分级方法胶质瘤可分为I~IV级, I级、II级为分化较好的低级别胶质瘤, III级、IV级为分化较差的高级别胶质瘤^[2]。

影响胶质瘤患者预后的因素很多,包括实验室分子学标记物IDH、TERT、ATRX、1p19q等以及一些临床特征如患者年龄、性别、Karnofsky功能状态评分等^[1, 3-4]。一些学者对预后营养指数(prognostic nutrition index, PNI)与胶质瘤患者预后的关系也进行了研究,但没有统一的结论。鉴于此,我们对评价PNI在胶质瘤患者中预后价值的文章进行

作者单位:山东大学齐鲁医院临床药学科,山东,济南 250000

*通信作者:徐日, E-mail: 1543674248@qq.com

Meta分析,以期获得一个总结性的结论为临床工作提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 纳入与排除标准

纳入标准:①研究对象为胶质瘤患者的前瞻性或回顾性队列研究;②研究报道了预后营养指数与胶质瘤患者预后(总生存期等)的关系;③研究提供了风险比(hazard ratio, HR)和95%可信区间(confidence interval, CI);④患者在手术前未接受过任何抗肿瘤治疗。排除标准:①未提供可用数据的研究;②综述、信函、评论、病例报告或会议摘要的文章;③动物研究。

1.2 检索策略

使用电子计算机进行全面的检索,搜集2019.7.31前发表在pubmed、知网、万方数据库中有关于PNI和胶质瘤患者预后关系的文章,并对纳入研究的参考文献进行扩展检索,以获得补充的资料。检索方式使用主题词和自由词相结合,中文数据库的检索式为:(胶质瘤)and(预后营养指数);英文数据库检索式为:(“glioma”or“glioblastoma”or“oligodendroglioma”or“astrocytoma”or“brain tumour”)and (“Prognostic nutritional index”or“PNI”)。

1.3 数据提取与质量评价

研究者筛选文献进行数据的提取,提取的内

容包括:第一作者、出版年份、国家、样本量、PNI截断值,低水平PNI比例,患者的年龄分布,胶质瘤类型,治疗类型,HR,95%CI,结局指标。

使用纽卡斯尔-渥太华量表(Newcastl-Ottawa scale, NOS)进行研究质量评价^[5]。质量评估值范围为0~9分,得分>5分为高质量研究。

1.4 统计方法

使用Revman5.3软件进行统计分析,总生存期(overall survival, OS)采用HR值及95%CI进行效应分析,若无法直接获得,则根据Kaplan-Meier生存曲线提取相关数据^[6]。通过Q统计量和I²值进行异质性检验,若I²≤50%或P≥0.05,各研究间同质性较好,采用固定效应模型进行分析;若I²>50%或P<0.05,各研究间存在异质性,采用随机效应模型分析。绘制漏斗图对纳入研究的发表偏倚进行评价。

2 结果

2.1 检索结果及纳入研究

初步检索后得到87篇相关文献,通过阅读全文和摘要排除15篇综述、3篇病例报告、62篇不相关研究,最终纳入7篇队列研究^[7-13],包括1527名患者。

2.2 纳入研究的基本特征和质量评价

纳入文献中6篇英文文献,1篇中文文献;6篇来自中国,1篇来自意大利;胶质母细胞瘤4篇,胶质瘤3篇。纳入研究的基本特征见表1。

表1 纳入研究的基本特征 [n, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 1 The characteristics of the included studies [n, ($\bar{x} \pm s$)]

纳入研究	国家	研究类型, 研究中心	肿瘤类型	样本量	平均年龄	PNI 截断值	低PNI 比例(%)	治疗方式	NOS score
Zhou等 (2016)	中国	回顾性 单中心	GBM	84	54(43~62)	44.4	16.7	手术+辅助放/化疗	8
He等 (2017)	中国	回顾性 单中心	Ⅲ、Ⅳ级 胶质瘤	188	45.0(5~78)	52.55	58.5	手术治疗 手术+辅助放/化疗	7
Xu等 (2017)	中国	回顾性 单中心	GBM	166	50.41±14.5	48	34.3	手术+辅助放/化疗	8
Ding等 (2018)	中国	回顾性 单中心	GBM	300	49.9±14.02	44	11	手术+STUPP治疗	6
Yang等 (2019)	中国	回顾性 单中心	胶质瘤	128	47.84±13.9	45	18.8	手术治疗	7
Andrea等 (2019)	意大利	回顾性 多中心	GBM	282	66.4(28~83)	45.9	41.1	手术治疗 手术+辅助放/化疗	6
Ji等 (2019)	中国	回顾性 单中心	Ⅱ、Ⅲ级 胶质瘤	379	未报道	47.8	20.3	手术治疗	6

2.3 预后营养指数和胶质瘤患者预后的关系

纳入的7篇研究均报道了PNI与胶质瘤患者OS的关系,其中5篇研究既包括多因素分析又包括单因素分析,2篇研究只有单因素分析。PNI的截断值在44~52.55之间。

对单因素分析的OS结果进行meta分析,结果显示各研究存在异质性, $I^2=64%$,使用随机效应模型,合并HR,低PNI患者的OS(HR=0.50,95%CI为0.38~0.64, $P<0.001$),与高PNI患者相比,提示预后较差(图1)。

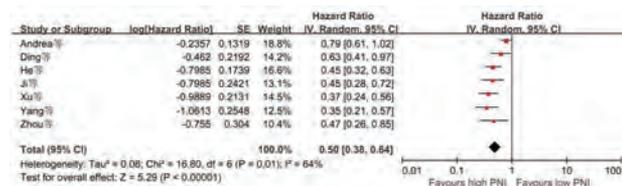


图1 PNI与胶质瘤患者总生存期OS的关系 (单因素分析)

Figure 1 Forest plot of the association between PNI and overall survival of gliomas (Univariate analysis)

对多因素分析的OS结果进行meta分析,结果显示各研究异质性较低, $I^2=44%$,故使用固定效应模型,合并HR,低PNI患者的OS(HR=0.71,95%CI为0.56~0.90, $P<0.01$),与高PNI患者相比,也提示预后较差,低PNI是胶质瘤患者不良预后的独立预测因子(图2)。

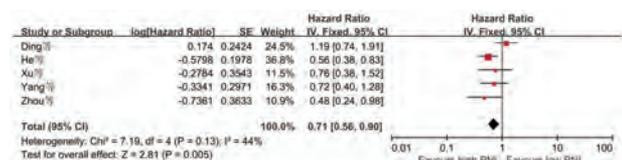


图2 PNI与胶质瘤患者总生存期OS的关系 (多因素分析)

Figure 2 Forest plot of the association between PNI and overall survival of gliomas (Multivariate analysis)

2.4 发表偏移

针对OS单因素分析这一结局指标绘制漏斗图进行发表偏倚检测,其结果显示:单因素分析中,有一个散点偏离,提示存在一定发表偏倚;而多因素分析中散点在漏斗两侧分布基本对称,提示无明显发表偏倚(图3~4)。

2.5 敏感性分析

由于OS单因素分析合并结果异质性较大,对纳入的7篇研究进行敏感性分析。采用逐个剔除

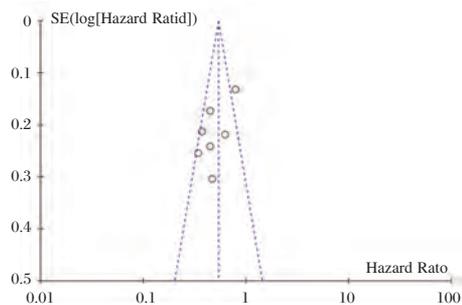


图3 单因素分析漏斗图

Figure 3 Funnel plot of the Univariate analysis

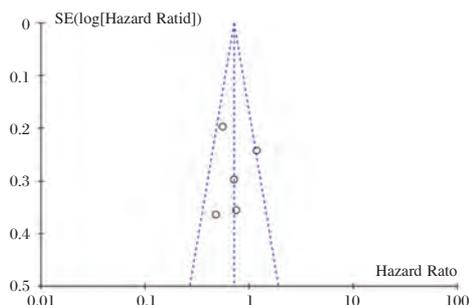


图4 多因素分析漏斗图

Figure 4 Funnel plot of the Multivariate analysis

单项研究的方法进行敏感性分析,发现异质性的来源主要是Andrea的研究,将这个研究剔除再行HR合并,合并结果没有异质性($P=0.52, I^2=0%$)。剔除其它任何研究,异质性没有明显的变化。剔除任一研究,对HR的合并结果未有影响,说明总体结果的稳定性和可靠性较好。

3 讨论

PNI定义为血清白蛋白(g/L)+5×外周血淋巴细胞总数($\times 10^9/L$)^[14],可反映患者的免疫和营养状况,最初用来评估手术患者的术前营养状况、手术风险以及术后并发症,现已运用到肿瘤领域,可预测妇科肿瘤、非小细胞肺癌、食管癌、胃癌等患者的临床预后^[15-18],与这些肿瘤患者的总生存期和无进展生存期有明显的相关性。胶质瘤侵袭性强,浸润广,手术难以完全切除,预后差,能否也使用PNI评估胶质瘤患者的预后尚存在争议,故本文对现有研究进行荟萃分析,最终纳入7篇文献,均为高质量研究。Meta分析结果显示,与高水平PNI的患者相比,术前低PNI的胶质瘤患者总生存期明显缩短,PNI水平与胶质瘤患者的临床预后显著相关,并且是预后的独立预测因素。异质性的来源主要是Andrea^[11]的研究,Andrea的研究是唯一

一篇来自欧洲的研究,其结论是PNI水平与GBM患者预后并无明显的相关性。即便他们观察到了高PNI患者总生存期更长的趋势,但他们的试验并没有证明这一结论。造成结果差异的原因可能是研究对象的人种不同,高龄及低Karnofsky功能评分的患者更多,使PNI的预后价值被其它因素所掩盖。虽然各研究结果间存在一定的异质性,敏感性分析的总体结果是稳定的。总的来说,Meta分析的结果显示,在大多数胶质瘤患者中低PNI是不良预后的一个危险因素。

胶质瘤的分子标记物如IDH、TERT、ATRX、1p19q等对胶质瘤的诊断有重要意义,也可独立或联合预测胶质瘤患者的临床预后^[3-4]。本Meta分析纳入的研究中,有2篇研究评估了PNI与这些分子标记物的关系。在Ding^[7]的研究中,IDH-1突变型与野生型患者的PNI水平无统计学差异。Ji^[13]的研究对不同分子分型的胶质瘤患者中PNI与预后的关系进行了评价,结果显示只有TERT突变患者,IDH、TERT和1p/19q三阴患者PNI的水平与临床预后存在相关性,而其它分子型的患者中PNI并不能提示预后。PNI在不同分子分型胶质瘤患者中的预后作用还有待进一步的研究。

本研究也存在一些局限性:①纳入的研究多来自中国,仅一项研究来自欧洲(意大利),而这项研究正是异质性的来源,在欧洲人群中是否有同样的结论需要进一步的研究;②PNI截断值没有统一的标准,纳入研究采用的判定方法存在差异,可能对本研究的结果造成影响,这是临床应用前需要解决的主要问题;③各研究的随访时间和治疗方式并不一致,可能对结果造成影响。

尽管本Meta分析有许多不足,仍提供了PNI水平与胶质瘤患者预后关系的证据,低PNI与胶质瘤患者的不良预后相关。针对PNI的最佳截断值以及在不同人种、不同分子分型患者中的预后价值仍需更多的研究进一步的判断。

参考文献

- [1] Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma[J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(7):405-417.
- [2] Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *NEUROPATH APPL NEURO*, 2018, 44: 139-150.
- [3] Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(6):1001-1016.
- [4] Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, et al. Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas[J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(1):66-77.
- [5] Andreas Stang. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses[J]. 2010, 25(9):603-605.
- [6] Tierney JF, Stewart LA, Ghersi D, et al. Practical methods for incorporating summary time-to-event data into meta-analysis[J]. 2007, 8(1):16.
- [7] Ding JD, Yao K, Wang PF, et al. Clinical significance of prognostic nutritional index in patients with glioblastomas[J]. *Medicine*, 2018, 97(48):e13218.
- [8] Yang T, Mao P, Chen X, et al. Inflammatory biomarkers in prognostic analysis for patients with glioma and the establishment of a nomogram[J]. *Oncol Lett*. 2019, 17(2): 2516-2522.
- [9] He ZQ, Ke C, Al-Nahari F, et al. Low preoperative prognostic nutritional index predicts poor survival in patients with newly diagnosed high-grade gliomas[J], 2017, 132(2): 239-247.
- [10] Xu WZ, Li F, Xu ZK, et al. Preoperative albumin-to-globulin ratio and prognostic nutrition index predict prognosis for glioblastoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10:725-733.
- [11] Rigamonti A, Imbesi F, Silvani A, et al. Prognostic nutritional index as a prognostic marker in glioblastoma: Data from a cohort of 282 Italian patients[J]. *J NEUROL SCI*, 2019, 400:175-179.
- [12] Zhou XW, Dong H, Yang Y, et al. Significance of the prognostic nutritional index in patients with glioblastoma: A retrospective study [J]. *CLIN NEUROL NEUROSUR*, 2016, 151:86-91.
- [13] 季玉陈, 湛允波, 刘献志, 等. 术前营养指数结合分子病理学对较低级别胶质瘤患者临床预后的影响[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(21):1641-1644.
- [14] Okugawa Y, Toiyama Y, et al. Feasibility of Assessing Prognostic Nutrition Index in Patients With Rectal Cancer Who Receive Preoperative Chemoradiotherapy [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2018, 42(6):998-1007.
- [15] Wang X, Wang Y. The prognostic nutritional index is prognostic factor of gynecological cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Surg*, 2019, 67: 79-86.
- [16] Hu Y, Shen J, Liu R, et al. Prognostic value of pretreatment prognostic nutritional index in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *The International journal of biological markers*, 2018, 33(4):372-378.
- [17] Xue Y, Zhou X, Xue L, et al. The role of pretreatment prognostic nutritional index in esophageal cancer: A meta-analysis [J]. *J CELL PHYSIOL*, 2019, 234(11):19655-19662.
- [18] Luo Z, Zhou L, Balde AI, et al. Prognostic impact of preoperative prognostic nutritional index in resected advanced gastric cancer: A multicenter propensity score analysis[J]. *European journal of surgical oncology*, 2019, 45(3):425-431.

缺血性脑卒中患者单个核细胞 *TLR3*、*IRF-3*、*IFN- γ* mRNA 表达及临床意义

李邦林* 贾汉伟 李靖 李刚

[摘要] **目的** 探讨缺血性脑卒中患者单个核细胞 Toll 样受体 3 (*TLR3*) 以及干扰素调节因子-3 (*IRF-3*)、干扰素- γ (*IFN- γ*) 表达及意义。**方法** 选取 2016 年 2 月至 2019 年 7 月治疗的缺血性脑卒中患者 108 例(观察组),其中轻度、中度和重度患者分别 30 例、42 例和 36 例;预后良好 66 例,不良 42 例;同时选取健康志愿者 80 例作为对照组,采用实时荧光定量 PCR 法检测单个核细胞 *TLR3*、*IRF-3*、*IFN- γ* mRNA 表达。**结果** 观察组 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN- γ* mRNA 相对表达量分别为 (7.211 ± 2.121) 、 (5.801 ± 1.821) 和 (6.270 ± 1.533) ,明显高于对照组 ($P < 0.05$);重度患者脑梗死体积、*TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN- γ* mRNA 相对表达量明显高于轻度和中度患者 ($P < 0.05$);预后不良患者脑梗死体积、*TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN- γ* mRNA 相对表达量明显高于预后良好患者 ($P < 0.05$);观察组治疗后 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN- γ* mRNA 相对表达量较治疗前降低 ($P < 0.05$);*TLR3* mRNA 表达与 *IRF-3* mRNA、*IFN- γ* mRNA、NIHSS 评分和脑梗死体积呈正相关 ($r = 0.561$ 、 0.508 、 0.400 和 0.311 , $P < 0.05$);*IRF-3* mRNA 与 *IFN- γ* mRNA 呈正相关 ($r = 0.302$, $P < 0.05$)。**结论** 缺血性脑卒中患者 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN- γ* mRNA 表达明显升高,其中 *TLR3* mRNA 与患者病情程度、脑梗死体积和预后有一定关系。

[关键词] Toll 样受体 3; 干扰素调节因子-3; 干扰素- γ ; 缺血性脑卒中

Expression of *TLR3*, *IRF-3*, *IFN- γ* mRNA in mononuclear cells of patients with ischemic cerebral stroke and its clinical significance

LI Banglin*, JIA Hanwei, LI Jing, LI Gang

(Department of Neurology, Huishan People's Hospital, Wuxi, Jiangsu, China, 214187)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and significance of mononuclear cell Toll like receptor 3 (*TLR3*), interferon regulatory factor-3 (*IRF-3*), interferon γ (*IFN- γ*) in patients with cerebral ischemic stroke. **Methods** A total of 108 patients with ischemic stroke (observation group) treated from February 2016 to July 2019 were selected, of which 30, 42 and 36 patients were mild, moderate and severe condition. 66 Patients had good prognosis, and 42 poor. 80 healthy volunteers were selected as the control group, and the expression mRNA of *TLR3*, *IRF-3*, *IFN- γ* mRNA in mononuclear cells was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** The levels of *TLR3*, *IRF-3* and *IFN- γ* mRNA in observation group were (7.211 ± 2.121) , (5.801 ± 1.821) and (6.270 ± 1.533) , which were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). The cerebral infarction volume, *TLR3*, *IRF-3* and *IFN- γ* mRNA levels in severe patients were higher than that in mild and moderate patients ($P < 0.05$), those in patients with the poor prognosis were significantly higher than that in patients with the good prognosis patients ($P < 0.05$). The levels of *TLR3*, *IRF-3* and *IFN- γ* mRNA in the observation group after treatment were lower than those before treatment ($P < 0.05$). The level of *TLR3* mRNA was positively related with *IRF-3* mRNA, *IFN- γ* mRNA, NIHSS score and cerebral infarction

基金项目:江苏无锡市科技发展计划(WX17HAN239)

作者单位:无锡市惠山区人民医院神经内科,江苏,无锡 214187

*通信作者:李邦林, E-mail: 2063713584@qq.com

volume ($r=0.561, 0.508, 0.400$ and $0.311, P<0.05$). The *IRF-3* mRNA level was positively correlated with the *IFN- γ* mRNA level ($r=0.302, P<0.05$). **Conclusion** The levels of TLR3, *IRF-3* and *IFN- γ* mRNA in cerebral ischemic stroke patients increased significantly. The TLR3 mRNA level is related to the patient's condition, the volume of cerebral infarction and the prognosis.

[KEY WORDS] Toll like receptor 3; interferon regulatory factor-3; interferon γ ; cerebral ischemic stroke

缺血性脑卒中是神经内科最为常见疾病,发病率高、致残率高、病死率高,并且随着我国步入老龄化社会后本病发病率呈现升高的趋势。目前有效治疗方法是发病后(3~4.5)h开展静脉溶栓,但受有限时间窗及医疗条件的限制,很少有卒中患者能得到这种措施的治疗。因此深入研究缺血性脑卒中的发病机制,有重要的临床意义^[1]。近年来研究发现,缺血后的炎症反应,如Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)、干扰素调节因子(Interferon regulatory factors, IRFs)等在脑缺血继发性脑损害中可能具有重要作用^[2]。TLR属于天然免疫受体家族,可以识别并结合病原体的特定分子结构^[3]。IRFs属于重要的转录调节因子,在TLR介导的髓样分化因子非依赖信号转导通路中发挥抵抗病原体入侵的作用^[4]。干扰素调节因子3(interferon regulatory factor -3, IRF-3)活化后形成同源二聚体转位入核,诱导 β 干扰素基因表达^[3]。上述3个因子在脑缺血发作中均会出现变化,但是对缺血性脑卒中患者的病情严重程度则临床报道较为少见,本文重点研究了缺血性脑卒中患者单个核细胞Toll样受体3(Toll like receptor 3, TLR3)以及IRF-3、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年2月至2019年7月在本院治疗的缺血性脑卒中患者108例(观察组),发病至入院时间6~70 h,平均(34.40 \pm 9.80)h;根据中国急性缺血性卒中诊治指南中的标准^[5],其中轻度、中度和重度患者分别30例、42例和36例;根据治疗90 d后mRS评分^[6]评估,预后良好66例,不良42例;纳入标准:①诊断符合中国急性缺血性卒中诊治指南中的标准;②发病至入院时间<72 h;③患者及家属知情同意。排除标准:①合并有颅内出血、急性心肌梗死、恶性肿瘤、肝肾功能不全、自身免疫性疾病等;②检

查前已行溶栓治疗;③发病前已有肢体残疾。同时选取健康志愿者80例作为对照组,两组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 两组一般资料比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

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

组别	<i>n</i>	男/女	年龄(岁)
观察组	108	66/42	51.12 \pm 8.22
对照组	80	50/30	50.12 \pm 9.11
<i>t</i> / χ^2 值		0.038	0.787
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05

1.2 实验方法

1.2.1 试剂/仪器

全自动生化分析仪为日本日立公司提供,型号7600;流式细胞仪美国Beckman Coulter公司型号EpicsXL;低温冰箱为德国Liebherr公司提供,型号321;酶标仪为瑞士Hamilton公司提供,型号FAME24/20。台盼蓝溶液为Sigma公司提供;Gimsa染色剂为Sigma公司提供;PBS为武汉博士德公司提供,Trizol试剂盒为Invitrogen公司提供,RT-PCR试剂盒为Promega公司提供,引物合成为南京金思瑞提供。

1.2.2 操作方法

患者空腹抽取静脉血10 mL,加入肝素抗凝,离心后分离血清待检,采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞。取已分离的外周血单个核细胞,加入RNAisoPlus裂解后,先后加入氯仿、异丙醇、体积分数75%的乙醇低温离心后获得总RNA。反转录-聚合酶链反应:在50 μ L的反转录反应体系中,以2.5 μ g mRNA为模板逆转录cDNA,取1 μ L的cDNA为模板,进行PCR扩增。反转录-聚合酶链反应产物鉴定:取TLR-3和GAPDH扩增产物3 μ L在2%琼脂糖凝胶中,120 V电泳30 min,经紫外线图像成像系统(DU640型)观察,并用凝胶成像仪进行拍摄;以验证引物的特

异性及获得引物的最适退火温度。采用 SYB-Green 试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司),使用 ABI7000 型荧光定量 PCR 仪检测,应用 Rotor gene 6 软件进行荧光信号的收集和结果分析。荧光定量 PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量。采用酶联免疫吸附法测定 IRF-3、IFN- γ 浓度变化。

1.3 脑梗死体积测量

脑梗死体积测量均由同一医师负责计算,患者在发病后1周进行头颅核磁共振检查,在 T2 加权像利用计算机后处理工作站对梗死组织边缘进行划分,使用感兴趣区技术算出像素综合,脑梗死体积为感兴趣区内所有的像素总和与层厚和层间隔的积^[5]。

1.4 美国国立卫生研究院卒中量表(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)和改良 Rankin 量表(Modified Rankin Scale, mRS)评分

一名医师根据缺血性脑卒中病情严重程度采用 NIHSS 评分评估,NIHSS<4 分为轻度神经功能障碍,4~15 分为中度神经功能障碍,NIHSS>15 分为重度神经功能障碍;治疗 90 d 后预后情况采用 mRS 评分评估,mRS \leq 2 分为预后良好,>2 分为预后不良^[6]。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,计数资料用 % 表示,组间比较使

用 χ^2 表示,多组间比较采用方差分析,相关性采用 Pearson 相关分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 表达比较

观察组 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 相对表达量明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 表达比较

$[n, (\bar{x} \pm s)]$

Table 2 Comparison of TLR3, IRF-3 and IFN- γ mRNA expression between 2 groups $[n, (\bar{x} \pm s)]$

组别	n	TLR3 mRNA	IRF-3 mRNA	IFN- γ mRNA
观察组	108	7.211 \pm 2.121	5.801 \pm 1.821	6.270 \pm 1.533
对照组	80	2.012 \pm 0.851	1.043 \pm 0.342	1.673 \pm 0.452
t 值		20.713	23.055	25.982
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

2.2 观察组不同病情患者 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 等指标比较

观察组中不同病情患者 TLR3、IRF-3、IFN- γ mRNA 等指标中的比较结果:重度>中度>轻度,见表 3。

表 3 观察组不同病情患者 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 等指标比较 $[n, (\bar{x} \pm s)]$

Table 3 Comparisons of TLR3, IRF-3 and IFN- γ mRNA in patients with different conditions in observation group $[n, (\bar{x} \pm s)]$

病情程度	例数	男/女	年龄(岁)	发病至入院时间(h)	脑梗死体积(cm^3)	TLR3 mRNA	IRF-3 mRNA	IFN- γ mRNA
轻度	30	20/10	51.82 \pm 8.40	33.72 \pm 8.04	10.02 \pm 2.12	5.012 \pm 1.665	3.102 \pm 1.022	3.102 \pm 1.302
中度	42	28/14	52.10 \pm 9.02	32.28 \pm 7.93	28.88 \pm 3.32 ^a	6.816 \pm 1.572 ^a	5.003 \pm 1.212 ^a	5.117 \pm 1.104 ^a
重度	36	18/18	51.51 \pm 8.2	33.11 \pm 8.67	39.56 \pm 3.43 ^{ab}	8.021 \pm 1.601 ^{ab}	6.821 \pm 1.145 ^{ab}	7.014 \pm 1.062 ^{ab}
F/ χ^2 值		2.805	2.231	1.903	45.312	21.021	18.254	20.212
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:^a与轻度比较 $P<0.05$; ^b与中度比较 $P<0.05$ 。

2.3 观察组不同预后患者 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 等指标比较

预后不良患者脑梗死体积、TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 相对表达量明显高于预后良好患者($P<0.05$),见表 4。

2.4 观察组治疗前后 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 比较

观察组治疗后 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 相

对表达量较治疗前降低($P<0.05$),见表 5。

2.5 相关性分析

将患者 TLR3、IRF-3 和 IFN- γ mRNA 表达、NIHSS 评分、脑梗死体积进行相关性分析,结果显示 TLR3 mRNA 表达与 IRF-3 mRNA、IFN- γ mRNA、NIHSS 评分和脑梗死体积呈正相关($r=0.561$ 、 0.508 、 0.400 和 0.311 , $P<0.05$); IRF-3 mRNA 与 IFN- γ mRNA 呈正相关($r=0.302$, $P<0.05$)。

表4 观察组不同预后患者 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN-γ* mRNA 等指标比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]Table 4 Comparisons of *TLR3*, *IRF-3* and *IFN-γ* mRNA in different prognosis patients in observation group [$n, (\bar{x} \pm s)$]

预后	<i>n</i>	男/女	年龄(岁)	发病至入院时间(h)	脑梗死体积(cm^3)	<i>TLR3</i> mRNA	<i>IRF-3</i> mRNA	<i>IFN-γ</i> mRNA
良好	66	40/26	51.11±10.02	33.11±7.51	23.90±4.11	6.881±1.732	5.101±1.131	5.901±1.225
不良	42	26/20	52.18±9.78	32.30±8.12	36.66±5.12	7.712±1.422	6.422±1.103	6.761±1.322
<i>t</i> / χ^2 值		0.187	-0.546	0.529	-14.278	-2.600	-5.974	-3.449
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表5 观察组治疗前后 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN-γ* mRNA 表达比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]Table 5 Comparison of *TLR3*, *IRF-3* and *IFN-γ* mRNA expression before and after treatment in observation group [$n, (\bar{x} \pm s)$]

时期	<i>n</i>	<i>TLR3</i> mRNA	<i>IRF-3</i> mRNA	<i>IFN-γ</i> mRNA
治疗前	108	7.211±2.121	5.801±1.821	6.270±1.533
治疗后	108	5.011±1.102	3.001±1.121	3.423±1.133
<i>t</i> 值		9.565	13.608	15.521
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

脑卒中发病后的神经功能损害与多种因素有关,其中继发的炎症反应导致的神经细胞的结构和功能的损害与脑卒中后的神经功能密切相关,因此控制患者发病后炎症反应也是脑卒中患者治疗的内容之一^[7]。脑缺血损伤机制复杂,神经细胞凋亡、氧化应激反应、炎症反应及免疫反应等均参与神经功能损害的过程^[8-9]。

TLR4 是跨膜糖蛋白,是天然免疫及模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)家族最为重要的模式识别受体之一。*TLRs* 主要识别细胞外的病原微生物及组织损伤时释放的内源性分子,即损伤相关的分子模式(DAMPs),启动 *TLRs* 信号通路进而诱导炎症反应发生^[10]。在脑缺血损伤过程中,*TLR4* 能够通过信号转导通路激活诱导下游的 *TLR3* 及 *INF* 的表达诱导炎症反应发生及细胞凋亡的启动^[10]。单个核细胞是以白细胞为主的一类细胞,是机体免疫及炎症反应的主要效应细胞,在脑缺血过程中,单个核细胞的激活与神经细胞的免疫损伤和炎性损伤密切相关^[11],目前在缺血性脑卒中患者,单个核细胞中 *TLR4* 信号转导通路的集火情况及其与脑缺血病情及预后的关系尚缺乏研究。

TLR3 被激活后可以募集调节蛋白、衔接蛋白诱导干扰素 β *TIR* 同连接子进行结合,通过此途径

诱导 *INF* 及 *NF-κB* 的表达,并且能够抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的多种信号通路,降低细胞因子 *TNF-α* 的水平,从而减轻 LPS 诱导的细胞和组织损伤^[12]。能够通过受体结合因子 3 (TNF receptor associated factor 3, TRAF3)与肿瘤坏死因子受体相关因子联合核因子- κ B 激酶(TANK)结合激酶 1(TBK1)相互作用,进而引发 *IRF3* 磷酸化,磷酸化后 *IRF3* 形成二聚体并发生核转位,引起 *IFN-β* 基因及其他可诱导基因的转录;干扰素是人体分泌糖蛋白,正常情况下具有抗病毒、调节人体免疫功能等多种生物学活性,研究发现 *IFN-γ* 受到 *TRIF* 途径的调节,患者体内的促炎因子水平表达减少,能够降低 *IFN-γ* 代表的表达水平。在缺血性脑卒中患者单个核细胞中 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN-γ* mRNA 水平的变化,提示其可能通过激活相关的信号转导通路,调节单个核细胞的生物学活性,直接及间接参与神经功能损害的过程^[13-15]。

再进一步的研究中发现,在缺血性脑卒中患者单个核细胞中,*TLR3* mRNA 的表达水平同 *NISS* 评分及脑梗死的体积具有相关关系,而且同其下游的 *IRF-3* 和 *IFN-γ* mRNA 水平也呈现正相关关系,也提示在缺血性脑卒中患者 *TLR3* 可能通过对 *IRF* 和 *IFN-γ* 的调节,参与神经功能损害的过程。

综上所述,缺血性脑卒中患者 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN-γ* mRNA 表达明显升高,其中 *TLR3* mRNA 与患者病情程度、脑梗死体积和预后有一定关系,提示检测 *TLR3*、*IRF-3* 和 *IFN-γ* mRNA 有助于患者病情的判断和预后的评估,并且可能能够为缺血性脑卒中患者神经功能的保护和康复提供新的思路。

参考文献

- [1] Jiang FM, Li XF, Cheng SQ, et al. Clinical significance of expression of *TLR3* and *TLR4* in liver tissue of patients with chronic hepatitis B [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2017, 25(32):2879-2887.

- [2] Frans Oktavianus Siregar, Hermin Pancasakti Kusumaningrum, Rejeki Siti Ferniah. Detection of non specific toll-like receptor 3 in the marine and freshwater fishes[J]. Journal of Physics Conference, 2018, 1025(1):012067.
- [3] D. Rauseo, M. Fernández-Mestre. X-linked Toll-like receptor 7 polymorphism associated with susceptibility to Chikungunya Fever [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2019, 12(3):137-141.
- [4] Rochanawan Sootichote, Peti Thuwajit, Ekapot Singsuksawat, et al. Compound A attenuates toll-like receptor 4-mediated paclitaxel resistance in breast cancer and melanoma through suppression of IL-8[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):231.
- [5] Takashi Ishii, Yuichi Niikura, Keigo Kurata, et al. Time-dependent distinct roles of Toll-like receptor 4 in a house-dust-mite-induced asthma mouse model[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2018, 87(3):e12641.
- [6] Palani CD, Ramanathapuram L, Lam-Ubol A, et al. Toll-like receptor 2 induces adenosine receptor A2a and promotes human squamous carcinoma cell growth via extracellular signal regulated kinases [J]. Oncotarget, 2018, 9(6):6814-6829.
- [7] 韩晓霞,左瑞菊. 缺血性脑卒中患者血浆脂蛋白相关磷脂酶A2水平测定与价值分析[J]. 中国医药导报, 2017, 14(20):82-85.
- [8] Vrgoc G, Vrbancic J, Eftedal RK, et al. Interleukin-17 and Toll-like Receptor 10 genetic polymorphisms and susceptibility to large joint osteoarthritis [J]. Journal of Orthopaedic Research Official Publication of the Orthopaedic Research Society, 2018, 36(6):1684.
- [9] Karin Pelka, Damien Bertheloot, Elisa Reimer, et al. The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport [J]. Immunity, 2018, 48(5):911-922.e7.
- [10] 韩晓霞,左瑞菊,韩婷婷,等. 缺血性脑卒中患者 Lp-PLA2水平及意义[J]. 中国医药导报, 2017, 14(17):50-53.
- [11] Thomas K Hoang, Baikun He, Ting Wang, et al. Protective effect of Lactobacillus reuteri DSM 17938 against experimental necrotizing enterocolitis is mediated by Toll-like receptor 2 [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018, 315(2):S822-S822.
- [12] Guinn Z, Brown DM, Petro TM. Activation of IRF3 contributes to IFN- γ and ISG54 expression during the immune responses to B16F10 tumor growth. [J]. International Immunopharmacology, 2017, 50(2):121.
- [13] 邓玲娜,潘经锐,彭晴霞,等. 脑梗死患者外周血单个核细胞 Toll 样受体及下游信号分子表达与临床预后的相关性研究[J]. 中华神经医学杂志, 2016, 15(12):1217-1223.
- [14] 谭晶,潘生英,徐树平. 影响缺血性脑梗急性发作至就诊时间间隔的相关因素[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(12):1652-1655.
- [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(02):100-103.

(上接第 145 页)

- [6] Hayward BE, Kumari D, Usdin K. Recent advances in assays for the fragile X-related disorders [J]. Hum Genet, 2017, 136(10):1313-1327.
- [7] Wohrle D, Salat U, Glaser D, et al. Unusual mutations in high functioning fragile X males: apparent instability of expanded unmethylated CGG repeats [J]. J Med Genet, 1998, 35(2):103-111.
- [8] Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, et al. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation [J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(11):2103-2108.
- [9] Gatta V, Gennaro E, Franchi S, et al. MS-MLPA analysis for FMR1 gene: evaluation in a routine diagnostic setting [J]. BMC Med Genet, 2013, 14(1):79.
- [10] 陈莲俊. 自闭症诊断与服务的发展趋向:美国《精神疾病诊断与统计手册》第五版草案评介与预测[J]. 中国特殊教育, 2011, (8):59-65.
- [11] D'Annessa I, Cicconardi F, Di Marino D. Handling FMRP and its molecular partners: Structural insights into Fragile X Syndrome [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2019, 141(1):3-14.
- [12] Hayward BE, Zhou Y, Kumari D, et al. A set of assays for the comprehensive analysis of FMR1 alleles in the fragile X-related disorders [J]. J Mol Diagn, 2016, 18(5):762-774.
- [13] 吴鼎文,竺智伟,赵正言,等. 脆性 X 综合征 FMR1 基因 CpG 岛的甲基化程度分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1):60-63.
- [14] 何文智,李少英,王晓蔓,等. 三核苷酸重复引物 PCR 和甲基化特异性多重连接探针扩增技术在脆性 X 综合征产前诊断中的应用 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(7):561-565.
- [15] Coffee B, Keith K, Albizua I, et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA [J]. The American Journal of Human Genetics, 2009, 85(4):503-514.
- [16] Chen X, Wang J, Xie H, et al. Fragile X syndrome screening in Chinese children with unknown intellectual developmental disorder [J]. BMC pediatrics, 2015, 15(1):77.

血清 hs-CRP、TGF- β 和 TLR4 水平对儿童急性细菌性肺炎的临床诊断价值

杨德彬 冯日昇 王玲玲 郭燕军*

[摘要] 目的 探讨血清 hs-CRP、TGF- β 和 TLR4 水平变化及对儿童急性细菌性肺炎的临床诊断价值。方法 选择自 2017 年 8 月至 2018 年 9 月在本院接受治疗的 113 例急性细菌性肺炎患儿,作为观察组,同时选择 100 例体检健康的儿童作为对照组,记录两组的基本临床资料,采用 ELISA 实验检测两组血清 hs-CRP、TGF- β 和 TLR4 水平。通过多因素 Logistic 回归分析研究儿童急性细菌性肺炎预后因素。采用绘制受试者工作特征(ROC)曲线,分析 hs-CRP 和 TGF- β 诊断儿童急性细菌性肺炎的临床价值。结果 观察组血清血小板、IL-6、WBC 水平均高于对照组($P<0.05$)。治疗前急性细菌性肺炎患儿血清 hs-CRP 为(12.6 \pm 3.4)mg/L,血清 TGF- β 为(7.8 \pm 1.6)ng/L,血清 TLR4 为(3.8 \pm 0.2)mg/L,与对照组相比均显著上升($P<0.05$)。治疗后急性细菌性肺炎患儿血清 hs-CRP 为(5.1 \pm 1.2)mg/L,血清 TGF- β 为(6.3 \pm 1.7)ng/L,血清 TLR4 为(2.3 \pm 0.1)mg/L,与治疗前相比均明显下降($P<0.05$)。经多因素 Logistic 回归分析,发现血清 hs-CRP、TGF- β 和 TLR4 水平是患儿影响预后的因素。ROC 曲线分析发现血清 hs-CRP、TGF- β 对儿童急性细菌性肺炎均有一定的诊断价值,其中 3 种指标联合检测的 AUC 为 0.832,灵敏度 78.3%,特异度 86.2%,联合检测效能显著高于单独指标检测($P<0.05$)。结论 hs-CRP、TGF- β 和 TLR4 水平可用于评估儿童急性细菌性肺炎的病情严重程度,有利于急性细菌性肺炎患儿的临床治疗及预后评估。

[关键词] 急性细菌性肺炎;超敏 C-反应蛋白;转化生长因子- β ;Toll 样受体 4

Clinical diagnostic value of serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 levels in children with acute bacterial pneumonia

YANG Debin, FENG Risheng, WANG Lingling, GUO Yanjun*

(General Internal Medicine Section 2, Affiliated Children's Hospital of Zhengzhou University/Henan Children's Hospital/Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450053)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the changes of serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 levels in children with acute bacterial pneumonia and assess the clinical diagnostic value. **Methods** 113 children with acute bacterial pneumonia treated in our hospital from August 2017 to September 2018 were selected as observation group. While 100 healthy children were selected as the control group, and the basic clinical data of the two groups were recorded. Serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 levels were detected by ELISA. Multivariate Logistic regression analysis was used to study the prognostic factors of children with acute bacterial pneumonia. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the clinical value of hs-CRP and TGF- β in the diagnosis of acute bacterial pneumonia in children. **Results** The levels of platelet, IL-6 and WBC in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Before treatment, the serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 levels in children with acute bacterial pneumonia were 12.6 \pm 3.4 mg/L, 7.8 \pm 1.6 ng/L and 3.8 \pm 0.2 mg/L respectively, which were significantly higher than those in the

基金项目:2018年度河南省科技攻关目录(182102311202)

作者单位:郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/郑州儿童医院普内科二病区,河南,郑州 450053

*通信作者:郭燕军, E-mail:2590139414@qq.com

control group ($P<0.05$). After treatment, serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 were 5.1 ± 1.2 mg/L, 6.3 ± 1.7 ng/L and 2.3 ± 0.1 mg/L, which were significantly lower than those before treatment ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that serum hs-CRP, TGF- β and TLR4 levels were the prognostic factors. ROC curve analysis showed that serum hs-CRP and TGF- β had certain diagnostic value in children with acute bacterial pneumonia. The AUC, the sensitivity and the specificity of joint detection of three indicators was 0.832, 78.3% and 86.2%, respectively. The combined detection efficiency was significantly higher than those of single index detection ($P<0.05$). Conclusion The levels of hs-CRP, TGF- β and TLR4 can be used to evaluate the severity of acute bacterial pneumonia in children, which is beneficial to the clinical treatment and prognosis evaluation of children with acute bacterial pneumonia.

[KEY WORDS] Acute bacterial pneumonia; Hypersensitive C-reactive protein; Transforming growth factor- β ; Toll-like receptor 4

急性细菌性肺炎是临床儿科常见的呼吸系统疾病,患儿因细菌感染导致体内炎性反应加剧,同时患儿的肺功能受到危害,主要表现为咳嗽、发热等症状,若不及时控制可导致惊厥、休克等严重并发症,由于儿童肺炎的临床症状不典型,容易被误诊为普通感冒,从而导致患儿临床疗效不佳^[1]。因此,有必要对儿童急性细菌性肺炎进行有效的诊断及评估。白介素-6(interleukin-6, IL-6)、降钙素原(procalcitonin, PCT)等指标可反映体内的炎性反应程度,但易受患者的年龄、饮食习惯等的影响,导致患者血清IL-6、PCT水平变化较大,从而促使急性细菌性肺炎的误诊率较高^[2]。超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, Hs-CRP)是一种主要由肝脏合成的急性期蛋白,在机体遭受病菌感染后可大量合成,可敏感地反映机体炎症状况^[3]。有研究发现急性细菌性肺炎患者的血清hs-CRP水平可在短期内达到峰值,当患者疾病程度减轻后血清hs-CRP水平下降^[4]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一类调节细胞生长和分化的蛋白活性因子,可刺激免疫细胞分泌IFN- γ 及TNF- α 等促炎因子,从而加剧机体的炎性反应^[5]。Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)是一类I型跨膜蛋白受体,通过识别各种抗原后介导体内的免疫分子发挥作用,激活体内免疫炎症反应,可能对机体造成免疫损伤^[6]。本研究旨在分析血清hs-CRP、TGF- β 及TLR4水平对儿童急性细菌性肺炎的诊断价值,为提高儿童急性细菌性肺炎的临床疗效提供参考。

1 资料及方法

1.1 一般资料

选择自2017年8月至2018年9月在本院接受治疗的113例细菌性急性细菌性肺炎患儿,作为观

察组,男67例,女46例,年龄5~14岁,平均年龄(8.35 ± 3.12)岁,平均体重(31.58 ± 3.42)kg。纳入标准:①符合中华医学会儿科学分会儿童急性细菌性肺炎的诊断标准^[7];②患儿性别、年龄、体重及患病时间临床基本资料完整;③患儿咳嗽、咳痰、肺部出现中细湿罗音及胸痛等临床症状;④采集患儿痰液或血液进行细菌培养后检出病菌。排除标准:①患有先天遗传性疾病;②有药敏反应的患者临床基本资料缺失;③心、肺等重要脏器功能衰竭;④伴发肺结核、肿瘤等疾病的急性细菌性肺炎患儿。同时选择100例体检健康的儿童作为对照组,男59例,女41例,年龄6~12岁,平均年龄(9.71 ± 3.43)岁,平均体重(32.26 ± 3.62)kg。儿童健康标准:①身体代谢、免疫功能正常;②无炎症、肿瘤及其他疾病;③心、肝、肺等重要脏器功能正常。两组的性别、年龄、体重差异无统计学意义($P>0.05$)。患儿家长均知情同意,本研究经郑州大学附属儿童医院伦理学委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器

hs-CRP酶联免疫试剂盒购自上海谷研实业有限公司;TGF- β 酶联免疫试剂盒购自上海恒远生化试剂有限公司;IL-6、TLR4酶联免疫试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;肝素购自上海恒远生化试剂有限公司;Xpand Plus全自动生化分析仪购自美国德灵公司;Statfax 4200酶标仪购自美国Awareness公司。

1.3 治疗方法

患儿均给予退热、祛痰、止咳及营养支持等常规治疗,同时头孢曲松钠和炎琥宁联合用药治疗,给药方法为:头孢曲松钠剂量为60 mg/(kg·d),炎琥宁剂量为10 mg/(kg·d),并与100 mL的10%葡萄糖溶液混匀后静脉滴注。患儿治疗时间为14

天,并严格执行治疗临床路径,同时观察并记录患儿的临床症状。

1.4 检测方法

研究对象均在治疗前、后空腹静脉取血 6 mL,加入肝素抗凝后以 1 500 rpm 离心 10 min,收集血浆并编号,置于 -80℃保存。通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)实验检测样本血清 IL-6、hs-CRP、TGF-β 及 TLR4 水平,按照 ELISA 试剂盒说明书将用抗体包被液处理 96 孔酶标板,设置空白孔、标准品孔及样本孔,将标准品及样本经梯度浓度稀释后加入孔中,孵育 15 min 后弃上清液,每孔加入 35 μL 的酶标试剂,置于 37℃孵育 25 min,每孔加入 20 μL 洗涤液。震荡 20 s 后弃上清液,每孔加入 30 μL 显色剂,避光孵育 15 min 后,每孔加入 10 μL 终止液,在 450 nm 处用酶标仪检测各孔光密度(optical density, OD)值。同时通过全自动生化分析仪检测样本中血小板、白细胞(leukocyte, white blood cell, WBC)水平。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件分析数据,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用 *F* 分析,计数资料采用 χ^2 检验,受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估 hs-CRP 和 TGF-β 诊断价值。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组儿童血液生化指标比较

观察组血清血小板、IL-6、WBC 水平高于对照组 (*P*<0.05)。见表 1。

表 1 急性细菌性肺炎儿童血液生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of blood biochemical indicators of children with acute bacterial pneumonia ($\bar{x} \pm s$)

指标	血小板 ($\times 10^9/L$)	IL-6 (ng/L)	WBC ($\times 10^9/L$)
对照组	216.67±37.43	11.7±0.1	9.3±1.8
观察组	362.47±43.71	23.2±0.2	14.8±2.1
<i>t</i> 值	5.234	14.8±2.1	5.347
<i>P</i> 值	0.032	6.268	0.021

2.2 治疗前后急性细菌性肺炎患儿血清 hs-CRP、TGF-β 和 TLR4 水平比较

治疗前急性细菌性肺炎患儿血清 hs-CRP、

TGF-β、TLR4 与对照组相比显著上升,差异有统计学意义 (*P*<0.05)。治疗后急性细菌性肺炎儿童血清 hs-CRP、TGF-β、TLR4 与治疗前相比明显下降,差异有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 2。

表 2 急性细菌性肺炎儿童血清 hs-CRP、TGF-β 和 TLR4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum hs-CRP, TGF-β and TLR4 levels in children with acute bacterial pneumonia ($\bar{x} \pm s$)

指标	hs-CRP (mg/L)	TGF-β (ng/L)	TLR4 (mg/L)
对照组	4.2±0.3	3.9±0.2	1.3±0.2
患儿治疗前	12.6±3.4*	7.8±1.6*	3.8±0.2*
患儿治疗后	5.1±1.2*	6.3±1.7*	2.3±0.1*
<i>F</i> 值	12.357	14.627	9.273
<i>P</i> 值	0.024	0.015	0.027

与对照组相比, **P*<0.05; 与治疗前相比, #*P*<0.05。

2.3 儿童急性细菌性肺炎预后不良的危险因素分析

以儿童急性细菌性肺炎预后为因变量,以急性细菌性肺炎儿童的性别、年龄、体重、血小板、WBC、IL-6、hs-CRP、TGF-β、TLR4 为自变量,通过 Logistic 回归分析发现 hs-CRP、TGF-β、TLR4 均是急性细菌性肺炎患儿预后不良的危险因素 (*P*<0.05)。见表 3。

表 3 Logistic 回归分析儿童急性细菌性肺炎预后危险因素

Table 3 Logistic regression analysis of prognostic risk factors for children with acute bacterial pneumonia

指标	β 值	SE 值	Wald 值	<i>P</i> 值	OR 值	95% CI
hs-CRP	1.251	0.132	7.259	0.031	4.627	2.316-9.269
TGF-β	1.328	0.204	6.628	0.027	5.137	3.126-7.692
TLR4	1.468	0.134	5.694	0.036	4.936	3.416-8.263

2.4 hs-CRP、TGF-β 和 TLR4 用于诊断急性细菌性肺炎的 ROC 分析

ROC 曲线分析发现血清 hs-CRP、TGF-β、TLR4 对儿童急性细菌性肺炎均有一定的诊断价值,其中联合检测的曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.832,灵敏度 78.3%,特异度 86.2%,检测效能显著高于其它单独指标检测 (*P*<0.05)。见表 4。

表4 ROC曲线评估hs-CRP、TGF- β 和TLR4检测急性细菌性肺炎的效能Table 4 ROC curve to evaluate the efficacy of hs-CRP、TGF- β and TLR4 in detecting acute bacterial pneumonia

指标	AUC	95%CI	灵敏度 (%)	特异度 (%)	P值
hs-CRP	0.724	0.493~0.816	75.8	81.7	0.024
TGF- β	0.767	0.561~0.826	73.9	83.2	0.016
TLR4	0.703	0.595~0.912	72.6	79.4	0.024
联合检测	0.832	0.613~0.937	78.3	86.2	0.021

3 讨论

急性细菌性肺炎是细菌感染诱发的常见儿科急症,可促使患儿氧合指数迅速下降,直至呼吸功能衰竭,对患儿的健康有较大危害。有研究发现儿童免疫系统发育尚未完善,对外界的铜绿假单胞菌、鲍氏不动杆菌等病菌抵抗力较弱,从而导致儿童的肺炎发病率高于成年人,对该病进行早期诊断并及时治疗有利于减轻患儿的临床症状^[8]。已有研究发现血清hs-CRP、TGF- β 和TLR4与自身免疫性疾病、病毒感染及局部感染等疾病的发生密切相关,对患者的预后及治疗有较高的临床价值^[9]。有研究发现急性肠炎患者的血清Hs-CRP、TGF- β 和TLR4水平显著上升,当患者临床症状缓解后,这几种临床指标均有一定程度下降^[10]。临床常规的检测手段(如血常规、胸片等)对急性细菌性肺炎有一定的诊断价值,但对患儿的误诊率较高。

Hs-CRP是机体在炎症感染、创伤等因素刺激下由肝脏分泌的急性反应蛋白,当患者恢复正常后血清Hs-CRP水平显著下降,可调节机体的免疫功能,促进体内补体系统的激活^[11]。TGF- β 是一种具有多种生理功能的细胞因子,体内可调控细胞增殖及分化,并能刺激免疫细胞分泌过多的促炎因子,损伤肺泡内血管内皮细胞,并促使毛细血管膜通透性增加,导致患儿的肺功能下降^[12]。TLR4可非特异性地识别并结合抗原,激活免疫细胞内NF- κ B信号通路,从而介导炎症因子的分泌^[13]。有研究发现急性肠炎患者的血清Hs-CRP、TGF- β 及TLR4表达水平可进一步激活体内巨噬细胞功能,可加剧体内炎症反应^[14]。有研究发现在炎症感染、创伤等因素刺激下急性细菌性肺炎

患者血清Hs-CRP水平迅速上升,促使患者机体的免疫反应加剧,并与血清TGF- β 、TLR4水平呈正相关^[15]。这可能是由于免疫细胞表面的TLR4识别细菌或细菌产生的抗原物质后,刺激炎症因子的分泌紊乱,抑炎因子分泌下降,并促进Hs-CRP、TGF- β 的分泌,提示血清Hs-CRP、TGF- β 及TLR4水平上升并不是单独孤立的,与机体的炎症反应密切相关,可作为衡量患者体内的炎症程度的指标,但需进一步实验以阐明这三种指标相互作用关系。因而评估患者的疾病程度及预后需要结合多种指标参考,否则可能影响患者疾病的治疗效果。本研究发现观察组hs-CRP、TGF- β 及TLR4诊断急性细菌性肺炎的灵敏度和特异度均优于单个指标的诊断价值。有研究发现普通感冒的患儿血清hs-CRP水平上升明显,可能是由于机体的炎症反应对hs-CRP水平影响较大,提示单独检测血清hs-CRP可能提高急性细菌性肺炎的误诊率^[16-17]。因此,同时检测血清hs-CRP、TGF- β 及TLR4水平对提高急性细菌性肺炎的临床诊断效果有重要价值。

综上所述,联合检测hs-CRP、TGF- β 和TLR4水平对平可提高儿童肺炎的诊断准确率,可作为患儿疾病危险分层的参考指标,有利于急性细菌性肺炎患儿的临床治疗及预后评估。

参考文献

- [1] 李攀,阳剑,曹辉彩.血清淀粉样蛋白A和C-反应蛋白对儿童支原体肺炎的诊断价值[J].中国医药导报,2017,14(25):134-137.
- [2] 付俊玲,刘洁,张秀云,等.儿童急性下呼吸道人博卡病毒感染血清特异性抗体检测的灵敏度与特异度分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(20):4714-4716.
- [3] 唐铭钰,李锦,赵瑞柯,等.6岁以下儿童急性喘息性疾病病原学与临床特点分析[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(04):365-371.
- [4] 倪金凤,黄光举,庞保东,等.小儿社区获得性肺炎病毒病原学及细胞免疫功能分析研究[J].临床肺科杂志,2017,22(6):1131-1133.
- [5] 马卫银,彭韶,张婷.反复肺炎患儿血清YKL-40与体液免疫功能的变化及意义[J].中国当代儿科杂志,2017,19(4):425-429.
- [6] Awasthi S, Yadav KK, Pandey M, et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RA) gene polymorphism and levels associated with adverse outcome in severe community-acquired pneumonia in children: A hospital-based study in India [J]. Pediatr Pulmonol, 2018, 53(9):1276-1283.

- [7] 陈娜芬, 陈碧芬, 苏艺娟. 热毒宁注射液联合机械辅助排痰治疗儿童支气管肺炎的疗效及对血液CRP、PCT、SLPI水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(19):4539-4542.
- [8] 王立斯, 王李润. 降钙素原与超敏C反应蛋白联合检测在小儿肺炎诊治中的意义[J]. 实用医技杂志, 2017, 24(9):985-987.
- [9] Ibrahim DD, Ousmane S, Moumouni K, et al. Measurement of pneumococcal IgG antibody, carriage and infection with *Streptococcus pneumoniae* in children under five years of age with acute respiratory infection in Niger [J]. *J Infect Public Health*, 2017, 10(5):657-660.
- [10] 阳甜, 李宏, 陈天君, 等. 陈明伟. 人巨细胞病毒DNA与IgM抗体检测在急性肺炎患者中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(12):1659-1660.
- [11] 钱婧, 袁艺. 血清25-(OH)D₃水平与儿童社区获得性肺炎严重程度及免疫功能相关性研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2018, 26(8):827-830.
- [12] Kawamata R, Yokoyama K, Sato M, et al. Utility of serum ferritin and lactate dehydrogenase as surrogate markers for steroid therapy for *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* [J]. *J Infect Chemother*, 2015, 21(11):783-789.
- [13] 林兵, 王斌. 微生物培养和血清检验在小儿肺炎支原体感染诊断中的价值探讨[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2018, 39(4):416-417.
- [14] Korkmaz EP, Töreyn ZN, Berk TH, et al. Evaluation of nephrotoxicity and prognosis in patients treated with colistin due to hospital - acquired pneumonia [J]. *Tuberk Toraks*, 2017, 65(4):271-281.
- [15] 刘冬梅, 王敬敏, 徐琳, 等. 血浆NT-ProBNP、H-FABP对小儿肺炎的评估价值及其与C反应蛋白的相关性研究[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(12):67-69.
- [16] 刘萌, 窦云鹏, 谷丽, 等. 鉴别诊断临床急性肺炎病原体感染的血清标志物研究[J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(5):636-640.
- [17] 白驹. 高龄重症肺炎患者血清过氧化物及过氧化水平及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(3):191-195.

(上接第202页)

参考文献

- [1] Hou JH, Zhu HX, Zhou ML, et al. Changes in the Spectrum of Kidney Diseases: An Analysis of 40, 759 Biopsy-Proven Cases from 2003 to 2014 in China [J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2018, 4(1):10-19.
- [2] Chu YW, Lin HM, Wang JJ, et al. Epidemiology and outcomes of hypoglycemia in patients with advanced diabetic kidney disease on dialysis: A national cohort study [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):1-13.
- [3] Han Q, Zhu H, Chen X, et al. Non-genetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. *Front Med*, 2017, 11(3):319-332.
- [4] Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, et al. AGE - RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 15(833):158-164.
- [5] 刘新磊, 宋卫敏, 高志强, 等. 抑制miR-200c表达对糖尿病肾病大鼠肾组织的保护作用及机制研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(6):668-672.
- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4):292-344.
- [7] 刘锐, 杨智鹏, 陈磊, 等. 社区2型糖尿病患者并发糖尿病肾病现状及危险因素[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(19):4679-4682.
- [8] 苏珂, 崔利娜, 楚晓婧, 等. 2型糖尿病患者尿白蛋白/肌酐比值与大血管病变的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(5):654-657.
- [9] 苗翠晓, 冯正平. 糖尿病肾脏病患者尿白蛋白排泄率与骨代谢生化指标相关性分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(12):1596-1599, 1638.
- [10] 王婷婷, 李明杰, 林宁, 等. 血清高尿酸水平与住院糖尿病患者白蛋白尿短期进展的关系研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(7):754-758.
- [11] 余颖, 陆泽元, 张华清, 等. 2型糖尿病患者尿白蛋白与肌酐的比值和下肢动脉病变的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(7):610-614.
- [12] Yu ZB, Wang JB, Li D, et al. Prognostic value of visit-to-visit systolic blood pressure variability related to diabetic kidney disease among patients with type 2 diabetes [J]. *J Hypertens*, 2019, 37(7):1411-1418.
- [13] Shao X, Kong WX, Li YT. MiR-133 inhibits kidney injury in rats with diabetic nephropathy via MAPK/ERK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24):10957-10963.
- [14] Shao H, Huang Y, Hu HL, et al. Effect of miR-29c on renal fibrosis in diabetic rats via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14):6250-6256.
- [15] García-Jacobo RE, Uresti-Rivera EE, Portales-Pérez DP, et al. Circulating miR-146a, miR-34a and miR-375 in type 2 diabetes patients, pre-diabetic and normal-glycaemic individuals in relation to β -cell function, insulin resistance and metabolic parameters [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(12):1092-1100.
- [16] 何爽, 黄萍, 范明娟. 血浆miR-192、miR-29c水平对2型糖尿病肾病诊断的临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6):522-526.

· 论 著 ·

TACE联合射频消融对中期肝癌患者血清GP73、AFP、AFP-L3的影响

孟令武^{1*} 李月圆² 李志彬³ 李明玉⁴

[摘要] 目的 观察经肝动脉化疗栓塞术(TACE)联合射频消融(RFA)治疗中期肝癌(HCC)近期疗效及对血清高尔基体糖蛋白-73(GP73)、甲胎蛋白(AFP)、甲胎蛋白异质体-3(AFP-L3)水平的影响。方法 以本院收治的300例中期HCC患者,非随机临床同期对照研究及患者自愿原则分为对照组(TACE治疗, $n=150$)、实验组(TACE联合RFA, $n=150$),评估两组近期疗效,观察治疗前、治疗后血清GP73、AFP、AFP-L3、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平,随访两组治疗后1年、2年复发率及总生存率,比较两组安全性。结果 实验组近期有效率明显高于对照组($P<0.05$);治疗后两组GP73、AFP、AFP-L3水平较治疗前明显降低,且实验组明显低于对照组($P<0.05$),治疗后两组SOD、MDA较治疗前明显升高($P<0.05$),但治疗后两组比较差异无统计学意义($P>0.05$);实验组治疗后2年复发率明显低于对照组($P<0.05$),两组不良反应总发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 与单一TACE治疗比较,TACE联合RFA可明显提高中期HCC患者近期疗效、降低复发率,可有效杀死肿瘤细胞从而使AFP、AFP-L3及GP73水平明显下降,此外联合治疗不会增加机体氧化应激反应,安全性好。

[关键词] 肝癌; 肝动脉化疗栓塞术; 射频消融; GP73; AFP; AFP-L3

Effect of TACE combined with radiofrequency ablation on serum GP73, AFP and AFP-L3 in intermediate-stage hepatic carcinoma

MENG Lingwu^{1*}, LI Yueyuan², LI Zhibin³, LI Mingyu⁴

(1. Department of Intervention, Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu, Henan, China, 476100; 2. Emergency Department, Shangqiu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shangqiu, Henan, China, 476000; 3. Department of Gastrointestinal Hepatobiliary Surgery, Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu, Henan, China, 476100; 4. Department of Intervention, Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu, Henan, China, 476100)

[ABSTRACT] Objective To observe the short-term curative effect of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) combined with radiofrequency ablation (RFA) on intermediate-stage hepatic carcinoma (HCC) and the effects on serum Golgi glycoprotein-73 (GP73), alpha fetoprotein (AFP) and alpha-fetoprotein heteroplasmon-3 (AFP-L3) levels. Methods 300 HCC patients at intermediate-stage were admitted to the hospital. According to non-randomized clinical homochronous controlled study and voluntary principle, patients were divided into control group (TACE, $n=150$) and experimental group (TACE combined with RFA, $n=150$). The short-term curative effect of both groups was evaluated. Serum GP73, AFP and AFP-

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B320011)

作者单位:1. 商丘市第一人民医院介入科,河南,商丘 476100

2. 商丘市中医院急诊科,河南,商丘 476000

3. 商丘市第一人民医院胃肠肝胆外科,河南,商丘 476100

4. 商丘市第一人民医院介入科,河南,商丘 476100

*通信作者:孟令武, E-mail:76581021@qq.com

L3, superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels were observed before and after the treatment. After 1 year and 2 years of treatment, the recurrence rates and overall survival rates in both groups were followed up. The safety was compared between the two groups. **Results** The short-term response rate of experimental group was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). After treatment, levels of GP73, AFP and AFP-L3 in both groups were significantly decreased. And the above indexes in experimental group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). SOD and MDA in both groups increased ($P<0.05$). After 2 year treatment, the recurrence rate in experimental group was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). The total incidence rates of adverse reactions in the two groups were no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** Compared with TACE treatment, TACE combined with RFA can significantly improve the short-term curative effect and reduce the recurrence rate of patients with intermediate-stage HCC. It can effectively kill tumor cells and reduce the serum levels of AFP, AFP-L3 and GP73. In addition, combined treatment will not increase the body's oxidative stress response, and has a good safety

[KEY WORDS] Hepatic carcinoma; Transcatheter arterial chemoembolization; Radiofrequency ablation; GP73; AFP; AFP-L3

经肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)为中晚期原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)首选治疗方案^[1]。TACE后受新生血管产生以及侧支循环建立等因素的影响,单纯TACE较难达到理想治疗效果,综合治疗已成为TACE技术发展的主要方向^[2]。射频消融(radiofrequency ablation, RFA)为局部微创治疗方法之一,研究发现TACE联合RFA治疗HCC患者可获得理想治疗效果^[3]。研究表明TACE后甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)的检测为HCC临床诊治工作指明了方向^[4],由此揭开了关于HCC患者治疗前后分子生物学标志物水平变化的研究热点。研究表明高尔基体糖蛋白-73(golgi glycoprotein-73, GP73)在HCC早期诊治中灵敏度高于AFP^[5]。甲胎蛋白异质体-3(alpha fetoprotein heterogeneity-3, AFP-L3)则是新近发现HCC诊断标志物^[6]。但目前国内有关TACE联合RFA治疗中晚期HCC近期疗效及对血清GP73、AFP、AFP-L3水平影响尚处于初步探索阶段,加之晚期HCC存活率较低临床随访研究受限,为此本文展开临床前瞻性研究,旨在为中期HCC患者早期诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2015年1月至2017年10月本院收治的中期HCC患者为研究对象。纳入标准:符合《原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版)》^[7]中期HCC诊断标准,入院后经增强电子计算机断层扫

描(computed Tomography, CT)或腹部超声检查确诊为HCC;未出现肝内血管侵犯或肝外转移;自愿参与本研究,签署书面知情同意书;未接受全身放疗。排除标准:严重肝肾功能不全;存在重度出血倾向;严重高血压;合并心脏病及糖尿病;严重腹水或肝静脉、动脉瘘;明显黄疸或腹腔积液。纳入300例中期HCC患者,根据非随机临床同期对照研究及患者自愿原则,分为对照组($n=150$)及实验组($n=150$),两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性,见表1。本研究征得本院医学伦理委员会批准同意。

表1 两组一般资料比较 [($n=150, (\bar{x} \pm s)$)]

Table 1 General data of the 2 groups [($n=150, (\bar{x} \pm s)$)]

分类	实验组	对照组	χ^2/t 值	P 值
性别(男/女)	86/64	88/62	0.055	0.815
年龄(岁)	57.24±5.01	58.03±5.10	1.353	0.177
肝功能 Child-Pugh 分级(A/B级)	92/58	90/60	0.056	0.813
病灶数(单发病灶/多发病灶)	107/43	109/41	0.367	0.544
肿瘤直径(cm)	4.21±0.65	4.30±0.68	0.605	0.547

1.2 试剂/仪器

主要试剂:5-氟尿嘧啶(上海经科化学科技有限公司)、奥沙利铂(武汉远启医药化工有限公司)、GP73、AFP、AFP-L3试剂盒均由上海瑞番生物科技有限公司提供,超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒由北京热景生物技术有限公司

提供。主要仪器:1.5T MR 数字减影血管造影和 LightSpeed VCT 64 层螺旋 CT(美国通用电气公司)、彩超(荷兰飞利浦,型号:iU22)等。

1.3 研究方法

①对照组:TACE 治疗,患者术前半小时肌注地西洋,常规消毒铺巾,局麻成功后,穿刺股动脉并注射对比剂,数字减影血管造影下对瘤灶行准确定位,对供血动脉行插管,将非离子型碘化油对比剂 5 mL、5-氟尿嘧啶 2 g、奥沙利铂 200 mg 注入插管中,在血管造影引导下明胶海绵以及聚乙烯醇颗粒注入靶血管,导管拔出后对穿刺部位行加压包扎,持续 5 天,1 次/月,3 个月为一个疗程,术后 12 h 确保患者下肢维持制动状态,密切关注穿刺部位是否渗血、水肿及皮纹等。②实验组:在 TACE 治疗基础上联合 RFA, TACE 操作步骤同对照组,在 TACE 完成后 15 d 开展 RFA 治疗,对患者电针预插部位皮肤行常规消毒,局麻成功后,彩超引导下射频电极插入肿瘤组织,穿刺成功后将射频发生装置进行连接,消融功率约 60 W(起始 20 W,6 min 后逐渐增加至 60 W),消融温度 80℃,时间为 12 min,≤3 个球灶单针消融,4~6 个球灶双刀联合消融,耐受性差者建议分次行消融,为确保瘤灶彻底杀灭,射频消融范围需延长到正常组织 1 cm。术后患者均行常规保肝、抗炎等治疗一周左右。

1.4 疗效评估

治疗结束后 6 个月,实体瘤疗效评价标准(evaluation criteria of solid tumor efficacy, RECIST)^[8]评估患者近期疗效,完全缓解(complete

remission, CR):瘤灶消失维持时间≥4 个月;部分缓解(partial remission, PR):瘤灶体积缩小≥30%且维持 4 周;疾病稳定(stabilization disease, SD):瘤灶体积缩小<30%或增大小于 20%;疾病进展(progression disease, PD):瘤灶体积增大>20%或出现新病灶。总有效率=(CR+PR)/总例数×100%。

1.5 观察指标

①血清指标检测:治疗前、治疗结束后采用酶联免疫吸附法检测血清 GP73、AFP 和 AFP-L3 水平;放射免疫沉淀法检测两组患者血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)。②预后随访:治疗后均定期随访 1、2 年,末次随访时间为 2019 年 10 月,比较两组复发率、总生存率,复发定义:随访时经 CT 或磁共振成像扫描检查发现新生瘤灶;总生存是从入院开始日期到随访截止日期仍存活的病例数。③不良反应发生情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件行分析,计数资料用%表示,组间比较行 χ^2 检验,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组实验近期疗效比较

两组实验在近期疗效结果显示,实验组近期有效率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组近期疗效比较 [n(%)]

组别	n	CR 值	PR 值	SD 值	PD 值	CR+PR
实验组	150	55(36.67)	66(44.00)	16(10.67)	13(8.67)	121(80.67)
对照组	150	46(30.67)	59(39.33)	26(17.33)	19(12.67)	105(70.00)
χ^2 值						4.592
P 值						0.032

2.2 血清 GP73、AFP、AFP-L3 水平比较

与同组治疗前比较,治疗后两组 GP73、AFP、AFP-L3 水平明显降低,且实验组明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.3 氧化应激指标比较

与同组治疗前比较,治疗后两组 SOD、MDA 水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),治疗

后两组比较差异无统计学意义, ($P > 0.05$),见表 4。

2.4 预后随访

治疗后 1 年复发率、治疗后 1、2 年总生存率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 5。

2.5 两组不良反应发生情况比较

两组不良反应总发生率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 6。

表3 治疗前后两组血清 GP73、AFP、AFP-L3 水平比较 [n, ($\bar{x} \pm s$)]Table 3 Serum GP73, AFP and AFP-L3 levels in the 2 groups before and after treatment [n, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	时间	实验组	对照组	t 值	P 值
GP73(ng/mL)	150	治疗前	246.18±12.89	245.98±12.95	0.134	0.893
		治疗后	107.26±8.91 ^a	162.57±9.96 ^a	50.690	<0.001
AFP(ng/mL)	150	治疗前	380.13±39.76	379.98±40.40	0.032	0.974
		治疗后	121.56±11.96 ^a	215.69±16.47 ^a	56.639	<0.001
AFP-L3(%)	150	治疗前	49.62±4.19	50.07±4.24	0.925	0.356
		治疗后	17.28±1.63 ^a	23.65±2.43 ^a	26.663	<0.001

注:与同组治疗前比较,均^aP<0.05。表4 治疗前后两组氧化应激指标比较 [n=150, ($\bar{x} \pm s$)]Table 4 Oxidative stress indexes in the 2 groups before and after treatment [n=150, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	时间	实验组	对照组	t 值	P 值
SOD(U/mL)	治疗前	22.43±2.34	21.92±2.29	1.908	0.057
	治疗后	42.25±4.31 ^b	41.98±4.28 ^b	0.544	0.587
MDA(μg/L)	治疗前	10.37±1.04	10.29±1.06	0.660	0.510
	治疗后	17.35±1.65 ^b	17.16±1.73 ^b	0.973	0.331

注:与同组治疗前比较,均^bP<0.05。

表5 两组预后随访情况比较 [n(%)]

Table 5 Prognosis of the 2 groups [n(%)]

组别	实验组 (n=150)	对照组 (n=150)	χ ² 值	P 值
复发			0.062	0.803
治疗后1年	8(5.33)	9(6.00)		
治疗后2年	12(8.00)	24(16.00)		
总生存			4.546	0.033
治疗后1年	140(93.33)	138(92.00)	0.196	0.659
治疗后2年	134(89.33)	122(81.33)	3.835	0.050

表6 两组不良反应发生情况比较 [n(%)]

Table 6 Adverse reactions in the two groups [n(%)]

分类	实验组 (n=150)	对照组 (n=150)	χ ² 值	P 值
恶心呕吐	21(14.00)	16(10.67)		
腹痛	8(5.33)	6(4.00)		
轻微发热	11(7.33)	7(4.67)		
皮疹	6(4.00)	5(3.33)		
合计	46(30.67)	34(22.67)	2.455	0.117

3 讨论

单纯 TACE 治疗中期 HCC 的疗效并不理想^[10]。近年来国内外学者主张对 HCC 患者采取综合疗法,尤其是 TACE 联合 RFA 在 HCC 患者中的应用日益被重视。匡远黎等^[11]文献报告指出 TACE 联合 RFA 治疗中晚期 HCC 患者是安全可行

的,国外学者也证实 TACE 联合 RFA 治疗可明显提高 HCC 患者临床疗效^[12]。TACE、RFA 治疗均属于有创操作,治疗中会引起机体氧化应激反应,SOD、MDA 则是评估机体氧化应激反应的有效指标,因而临床有必要密切关注 TACE 联合 RFA 治疗中期 HCC 患者血清 AFP、GP73、AFP-L3、SOD、MDA 水平变化。

Soichiro 等学者^[13]研究表明 HCC 患者 TACE 治疗前采用 RFA 治疗可有效缩小瘤灶体积,而本研究结果表明 TACE 联合 RFA 治疗中期 HCC 患者近期疗效优于 TACE 单独治疗,因此考虑联合治疗近期疗效更佳。本结果还提示 TACE 联合 RFA 治疗中期 HCC 患者可有效抑制 GP73、AFP、AFP-L3 水平表达并降低患者复发风险。尽管目前国内关于 TACE 联合 RFA 治疗前后 HCC 患者血清 GP73、AFP、AFP-L3 水平变化的研究不多,但相关研究指出血清 GP73、AFP、AFP-L3 水平与肝癌病灶内细胞增殖、血管新生以及术后肝外转移复发密切相关,因此本研究推测联合治疗可提高近期疗效并降低复发率,或与联合治疗可更有效杀灭肿瘤细胞继而降低血清 GP73、AFP、AFP-L3 水平有关。

本研究还提示 TACE 联合 RFA 治疗不会增加机体氧化应激反应,临床应用中有一定安全性。而本研究证实的 TACE 联合 RFA 治疗中期 HCC 患者可有效降低术后 2 年复发率,与张庆永等^[14]学者观点相符。不同的是本研究证实无论联合治疗还是单一 TACE 治疗对中期 HCC 患者近期复发率和生存率的影响相当,可能与张庆永等的研究样本量不多或对象来源较集中导致结果存在一定偏倚有关。

综上,TACE 联合 RFA 治疗中期 HCC 患者是安全可行的,不仅近期疗效佳,且可有效降低 GP73、AFP、AFP-L3 水平,有一定临床推广应用优势。
(下转第 238 页)

合并MS冠心病患者细胞因子表达及临床意义

谢瑾^{1*} 李红² 罗浩²

【摘要】目的 探讨合并代谢综合征(MS)冠心病患者脂联素(ADP)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)和炎症因子表达及与冠脉病变严重程度的相关性分析。**方法** 选取2016年12月至2018年12月本院收治的冠心病患者80人作为研究对象,根据是否合并代谢综合征分为对照组和观察组分别40人。运用酶联免疫吸附双抗夹心法对两组患者的ADP、PAI-1、TNF- α 、IL-6水平进行检测,使用生化分析仪对两组患者的hs-CRP水平进行检测,并对两组结果予以对比分析。**结果** 观察组患者的血糖、血压均明显高于对照组;观察组患者的ADP水平为(4.79 \pm 1.38),明显低于对照组ADP水平(6.60 \pm 1.57),而PAI-1水平(72.36 \pm 13.78)明显高于对照组(57.48 \pm 10.35),差异具有统计学意义($P<0.05$);在炎症水平上,观察组的TNF- α 、IL-6、hs-CRP的水平含量均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);两组患者左主干、双支病变例数及不同血管狭窄指数间对比,差异均无统计学意义($P>0.05$),但对对照组冠状动脉单支病变的患者明显高于观察组,观察组3支病变明显高于对照组,且观察组患者总狭窄指数显著大于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);经Pearson直线相关性分析得:ADP与脉狭窄指数呈负相关,而PAI-1、TNF- α 、IL-6及hs-CRP均与其呈正相关($P<0.05$)。**结论** 合并代谢综合征冠心病患者ADP表达较低,而PAI-1和炎症因子水平显著升高,其中ADP与冠脉病变程度呈负相关,而PAI-1和炎症因子与其呈正相关,故多种指标联合检测对冠心病合并代谢综合征患者冠脉病变程度具有一定的评估价值。

【关键词】 代谢综合征;冠心病;脂联素;纤溶酶原激活物抑制物;炎症因子;冠脉病变严重程度

Cytokine expression in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome and its clinical significance

XIE Jin^{1*}, LI Hong², LUO Hao²

(1. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610000; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China, 400016)

【ABSTRACT】Objective To investigate the expression of Adiponectin (ADP), Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inflammatory factors in patients with metabolic syndrome and coronary heart disease and their correlation with the severity of coronary artery disease. **Methods** A total of 80 patients with coronary heart disease treated in our hospital from December 2016 to December 2018 were selected as the research subjects. They were divided into the control group and the observation group of 40 people according to whether they had metabolic syndrome. The enzyme-linked immunosorbent sandwich assay (ELISA) was used to detect the serum levels of ADP, PAI-1, TNF- α , and IL-6 in the two groups. The biochemical analyzer was used to detect the levels of hs-CRP in the two groups. The results were analyzed. **Results** The blood glucose and blood pressure of the observation group were significantly higher than those of the control group. The ADP level of the observation group was (4.79 \pm 1.38), which was significantly lower than that of the control group

基金项目:四川省卫生厅科研项目(130115)

作者单位:1. 四川大学华西医院心内科,四川,成都 610000

2. 重庆医科大学第一附属医院心内科,重庆 400016

*通信作者:谢瑾, E-mail: z31xntl@sina.com

(6.60 ± 1.57). The PAI-1 level was (72.36 ± 13.78), which was significantly higher than that in the control group (57.48 ± 10.35 , $P < 0.05$). The levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6, hs-CRP in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The differences in the number of the left main coronary artery, double branch lesions and in vascular stenosis index between the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$), but the number of patients with single coronary artery lesions in the control group was significantly higher than that in the observation group. The number of patients with three coronary artery lesions in the observation group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the total stenosis index of the observation group was higher than that of the control group ($P < 0.05$). According to Pearson linear correlation analysis, ADP was negatively correlated with arterial stenosis index, PAI-1, TNF- α , IL-6 and hs-CRP were positively correlated with arterial stenosis index ($P < 0.05$). **Conclusion** In patients with coronary heart disease and MS, ADP level is low, and the levels of PAI-1 and TNF- α , IL-6 and hs-CRP are significantly increased. ADP is negatively correlated with the degree of coronary artery disease, while PAI-1 and TNF- α , IL-6 and hs-CRP are positively correlated. Therefore, the combined detection of these indicators has certain evaluation value for the degree of coronary artery disease in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome.

[KEY WORDS] Metabolic syndrome; Coronary heart disease; Adiponectin; Plasminogen activator inhibitor-1; Inflammatory factor; Severity of coronary artery disease

代谢异常包括高血压、血糖异常以及血脂异常,多种代谢异常在同一个机体上出现则称为代谢综合征,原称为X综合征和胰岛素抵抗综合征,是一种人体的脂肪、蛋白质、碳水化合物等物质发生代谢紊乱的病理状态,是一组复杂的代谢紊乱症候群^[1]。由于此病发病较为缓慢,常被人们所忽略,但代谢综合征患者的发病与久坐少动、饮食睡眠状态不健康、遗传因素等因素有密切联系,代谢综合征是冠心病、脑卒中的高危发病因素^[2]。近年来,由于人们的生活质量改进,生活方式的不断改善,冠心病患者合并有代谢综合征的趋势也逐渐上升,也因此受到重视^[3]。脂联素(adiponectin, ADP)是近年来新发现的一种具有调节脂类、糖类代谢的脂肪因子,在一定程度上可延缓动脉粥样硬化的发生^[4]。有相关研究显示,患者发生炎症反应是冠心病的发病机制,而患者病情的冠脉病变严重情况与纤溶酶元激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)的表达等具有一定关联^[5]。本研究通过观察合并代谢综合征冠心病患者ADP、PAI-1以及炎症因子的水平,探讨上述细胞因子和炎症因子与冠脉严重程度的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年12月至2018年12月本院收治的冠心病患者80人作为研究对象,根据是否合并代

谢综合征分为对照组和观察组分别40人,两组患者中性别,年龄,体质量指数(Body Mass Index, BMI)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但有可比性。见表1。

表1 两组组患者一般资料、生化检查情况比较
[$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison on general information and biochemical examination of patients in the two groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	男/女	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)
观察组	40	28/12	50.43 ± 3.78	25.39 ± 1.57
对照组	40	25/15	50.39 ± 3.61	25.89 ± 1.19
χ^2/t 值	-	0.503	0.048	1.605
P 值	-	0.478	0.962	0.113

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:①患者均进行冠状动脉造影、血液、生化检查等支持冠心病诊断^[6];②患者及家属均对研究知情并签字参加;③患者智力正常,交流无障碍,能与医务人员及家属较好的沟通交流。排除标准:①患有严重肝、肾功能不全等疾病;②在入院的两周前予以了溶栓治疗或有抗凝药物服用使或相关治疗史,女性患者有雌激素药物服用史;③有其他系统疾病患者或恶性肿瘤等疾病。

1.3 试剂/仪器

日本HITACHI公司生产的7060型全自动生化分析仪、PAI-1试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技

股份有限公司,货号:E-EL-H2104c)、ADP试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-H0004c)、TNF- α 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-H0109c)、IL-6试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-H0102c)、hs-CRP试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-H5134c)。

1.4 方法

测量患者血压抽取患者未进食、水时的静脉血1 mL,进行差速离心并分取放置上清液于-80℃恒温箱中等待检查。患者的PAI-1、血清ADP含量水平、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平通过使用酶联免疫吸附双抗夹心法进行检测;超敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)选用全自动生化分析仪进行检测。

1.5 观察指标

①患者PAI-1以及ADP水平含量情况;②炎症因子(IL-6、TNF- α 、hs-CRP)水平对比。③记录冠脉病变指数的数量。④两组患者冠脉狭窄情况;⑤分析合并代谢综合征冠心病患者ADP、PAI-1、TNF- α 、IL-6及hs-CRP与冠脉狭窄指数相关性。

冠脉病变情况根据冠状动脉造影分析判定^[7],观察结果发生病变和狭窄的部位和程度,观察病变是左主干、单支、双支还是三支。冠状动脉狭窄判定^[8]:①冠脉未发生狭窄为0分;②狭窄的范围处于25%至49%之间是1分;③若狭窄的范围处于50%至74%之间是2分;④狭窄的范围处于75%至89%之间是3分;⑤狭窄的范围处于90%至98%之间是4分;⑥狭窄的范围处于99%至100%之间是5分。分别对患者的冠状动脉的最大狭窄记录下来,总狭窄指数为各个狭窄的总和。

1.5 统计方法

应用SPSS 18.0软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验。相关性分析运用Spearman相关进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者ADP、PAI-1及炎症因子水平比较

观察组患者的ADP含量水平显著低于对照组,而观察组PAI-1、TNF- α 、IL-6、hs-CRP含量明显高于对照组,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组患者ADP、PAI-1及炎症因子水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison on levels of ADP, PAI-1 and inflammatory factors of patients in 2 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	ADP(mg/L)	PAI-1(μ g/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	hs-CRP(ng/L)
对照组	40	6.60 \pm 1.57	57.48 \pm 10.35	15.54 \pm 5.03	102.92 \pm 8.48	1.24 \pm 0.25
观察组	40	4.79 \pm 1.38	72.36 \pm 13.78	25.25 \pm 6.29	132.33 \pm 9.25	6.24 \pm 0.30
t 值	-	5.477	5.461	7.625	14.823	80.978
P 值	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 患者冠状动脉病变支数比较

两组患者左主干、双支病变例数及不同血管狭窄指数比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),但对照组冠状动脉单支病变的患者明显高于观察

组,观察组三支病变明显高于对照组,两组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),且观察组患者总狭窄指数显著大于对照组,两组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 冠心病患者冠状动脉病变支数比较及狭窄指数比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Comparison on the number of coronary lesions and stenosis index in patients with coronary heart disease [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	病变数目				病变狭窄指数				总狭窄指数
		左主干	单支	双支	三支	旋支	前降支	左主干	冠状动脉	
对照组	40	6	12	10	12	2.36 \pm 4.30	3.02 \pm 4.36	1.59 \pm 1.20	2.48 \pm 1.26	7.16 \pm 1.50
观察组	40	7	2	8	23	2.52 \pm 4.34	3.34 \pm 1.58	1.65 \pm 1.26	2.76 \pm 1.30	9.36 \pm 1.98
χ^2/t 值	-	0.092	8.658	0.287	6.146	0.166	0.440	0.218	0.978	5.601
P 值	-	0.762	0.003	0.592	0.013	0.869	0.661	0.828	0.331	<0.001

2.3 观察组患者 ADP、PAI-1、TNF- α 、IL-6 及 hs-CRP 与冠脉狭窄指数相关性分析

经 Pearson 直线相关性分析得:ADP($r=-4.364$)与脉狭窄指数为负相关性,而 PAI-1($r=4.308$)、TNF- α ($r=3.210$)、IL-6($r=3.240$)及 hs-CRP($r=3.504$)均与其为正相关,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

冠心病患者机体脂类代谢异常较为常见,其中 ADP 在脂类代谢中发挥着重要作用^[9]。ADP 是近年来才被发现的一种由脂肪组织分泌产生的脂肪因子,该因子被证实具有调节脂类和糖类的效果,同时也有一定的抗动脉粥样硬化和抗炎的作用^[10]。有学者发现,代谢综合征患者的体内 ADP 水平与正常人相比呈低水平状态^[11]。PAI-1 是一种具有调节机体纤溶酶原活性的平衡的功效的抑制剂,主要作用于组织性纤溶酶原激活物,其活性的强弱对机体纤溶的调节过程具有重要影响^[12]。有相关研究证实,PAI-1 表达增加将加速激活血小板,降低纤溶活性,加速血栓的形成^[13]。而在本组研究中的所显示合并代谢综合征冠心病患者体内 ADP 与 PAI-1 的水平变化,也进一步验证了上述研究,说明合并代谢综合征冠心病患者脂类代谢明显劣于单纯冠心病患者,机体纤溶活性更低,血栓形成更快。

炎症因子 IL-6 是一种预测冠心病严重程度的重要因子,与粥样硬化的风险发生的增加、慢性炎症负担的预测等具有相关性。hs-CRP、IL-6、TNF- α 是由脂肪组织分泌产生的,是发生炎症反应的高危因子,同时也是冠心病发病的高危因子,当冠脉病变处于相对稳定的时候,hs-CRP、IL-6、TNF- α 的表达才会相对稳定^[14]。而本研究炎症因子的变化不仅会加速冠心病患者的发病,还会加剧患者冠脉病变的严重程度,且合并有代谢性综合征冠心病患者其病变程度更严重。

本研究还说明合并代谢综合征冠心病患者的机体存在有增加炎症反应激活表达的炎症因子,对动脉粥样硬化斑块的生成起到了促进作用。对患者的 ADP、PAI-1 及炎症因子水平与冠脉狭窄指数相关性进行分析发现,PAI-1、TNF- α 、IL-6 及 hs-CRP 与脉狭窄指数呈正相关,而 ADP 与其为负相关,这与闫文珍^[15]、孙金栋等^[16]人研究结果一致。

综上所述,合并代谢性综合征冠心病患者的冠脉病变严重情况与 ADP、PAI-1 及炎症因子的表

达具有相关性,可根据其水平对患者冠脉情况进行评估,可作为临床诊断与治疗重要依据。

参考文献

- [1] 彭胡,唐克彬,颜彪,等.泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 CYP2C19 基因多态性分布的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(2):107-110.
- [2] 潘春燕,崔进国,崔豹,等.CTA 对冠状动脉钙化斑块管腔狭窄准确性评价的研究进展[J].解放军医药杂志,2016,28(3):23-24.
- [3] 白起君,黄捷,周晓亚,等.冠心病患者血清磷脂多不饱和脂肪酸谱与炎症关系[J].热带医学杂志,2019,19(2):35-39.
- [4] 李耀华,谢萍.代谢综合征与冠心病冠状动脉病变相关性分析[J].中国循证心血管医学杂志,2017,11(1):236-238.
- [5] 刘玲,陈各才,阮中宝.冠状动脉病变严重程度与血清脂蛋白磷脂酶及脂联素水平的相关性[J].中国老年学,2017,37(23):5819.
- [6] 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.非 ST 段抬高急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2012,40(5):353-367.
- [7] 张峻,乔树宾,杨国胜,等.冠心病合并代谢综合征患者脂联素水平与炎症因子及冠状动脉病变的关系[J].中国循环杂志,2008,23(2):102-105.
- [8] 周斌,蒋晓真,顾哲.吡格列酮对合并代谢综合征的 2 型糖尿病患者血清炎症因子及胰岛素抵抗的影响[J].实用医学杂志,2010,26(2):305-307.
- [9] 张小丹.Hcy、C-反应蛋白、SAA、APN 检测评估冠状动脉病变严重程度的价值[J].实验与检验医学,2018,35(1):91-94.
- [10] 张伟玲.冠心病患者冠脉病变程度与血清脂联素、C 反应蛋白的相关性研究[J].当代医学,2018,24(1):41-43.
- [11] 张峻,乔树宾,杨国胜,等.冠心病合并代谢综合征患者脂联素水平与炎症因子及冠状动脉病变的关系[J].中国循环杂志,2008,23(2):102-105.
- [12] Espiau M1, Yeste D, Noguera-Julian A, et al. Adiponectin, leptin and inflammatory markers in HIV-associated metabolic syndrome in children and adolescents [J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 2016, 36(2):e31-e37.
- [13] 刘英,孙贺,李霞.代谢综合征对冠心病患者颈动脉粥样硬化、血脂及血清脂联素水平的影响[J].中国医药导报,2015,12(6):71-74.
- [14] Held C, White HD, Stewart R, et al. Inflammatory biomarkers interleukin-6 and C-reactive protein and outcomes in stable coronary heart disease: experiences from the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) trial [J]. 2017, 6(10):898-899.
- [15] 闫文珍.PAI-1 和高敏 CRP 与代谢综合征合并冠心病的相关研究[D].山西医科大学,2010.
- [16] 孙金栋,袁红,於华敏,等.冠心病合并代谢综合征患者脂联素水平与炎症因子及冠状动脉病变的关系[J].中华全科医学,2016,14(6):918-920.

PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达特点及其与卵巢储备功能的相关性

程瑶瑶* 李建辉 王淳 陈娟

[摘要] 目的 观察多囊卵巢综合征(PCOS)患者生长分化因子-9(GDF-9)、骨形态发生蛋白15(BMP-15)、BAX表达水平和卵巢储备功能,并分析PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与卵巢储备功能的相关性。方法 选取2017年2月至2018年3月在本院接受治疗的PCOS患者为研究对象,同时选取在本院接受治疗的卵巢囊肿患者作为对照。观察2组研究对象GDF-9、BMP-15、BAX表达水平和卵巢功能的差异,分析PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与卵巢储备功能的相关性。结果 PCOS组患者的GDF-9、BMP-15和BAX表达水平均高于卵巢囊肿组($t=-30.567$ 、 -19.349 、 -11.412 , $P<0.001$);PCOS组患者的AMH水平高于卵巢囊肿组($t=-9.242$, $P<0.001$),AFC水平低于卵巢囊肿组($t=15.890$, $P<0.001$);PCOS组患者的FSH、LH、E2和T水平高于卵巢囊肿组($t=-8.251$ 、 -18.138 、 -17.925 、 -12.761 , $P<0.001$);PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与AMH、FSH、LH、E2和T水平正相关,与AFC水平负相关($P<0.05$)。结论 多囊卵巢综合征患者的GDF-9、BMP-15、BAX表达水平较高,且与AMH、AFC、FSH、LH、E2和T等卵巢储备功能指标水平密切相关。

[关键词] 多囊卵巢综合征;卵巢功能;生长分化因子-9;骨形态发生蛋白15

Effect of GDF - 9, BMP - 15 and BAX expression levels on ovarian reserve function in patients with polycystic ovary syndrome

CHENG Yaoyao*, LI Jianhui, WANG Chun, CHEN Juan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Panzhihua Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Panzhihua, Sichuan, China, 617000)

[ABSTRACT] Objective To observe the expression of GDF-9, BMP-15, BAX and ovarian reserve in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), and to analyze the correlation between the expression level of GDF-9, BMP-15, BAX and ovarian reserve in PCOS patients. Methods Patients with PCOS who were treated in our hospital from February 2017 to March 2018 were selected as the research subjects, and patients with ovarian cysts who were treated in our hospital were selected as controls. The differences in the expression levels of GDF-9, BMP-15, BAX and ovarian function in the two groups of subjects were observed, and the correlation between two groups was also analyzed. Results The levels of GDF-9, BMP-15 and BAX in the PCOS group were higher than those in the ovarian cyst group ($t=-30.567$, -19.349 , -11.412 , $P<0.001$). The level of AMH in group PCOS was higher than that in ovarian cyst group ($t=-9.242$, $P<0.001$), and AFC level was lower than that in ovarian cyst group ($t=15.890$, $P<0.001$). The levels of FSH, LH, E2 and T in group PCOS were higher than those in ovarian cyst group ($t=-8.251$, -18.138 , -17.925 , -12.761 , $P<0.001$). GDF-9, BMP-15 and BAX levels in PCOS patients were positively correlated with AMH, FSH, LH, E2 and T levels, and negatively correlated with AFC level ($P<0.05$). Conclusion The levels of GDF-9,

基金项目:四川省自然科学基金项目(2016098233)

作者单位:攀枝花市中西医结合医院妇产科,四川,攀枝花 617000

*通信作者:程瑶瑶, E-mail:657034347@qq.com

BMP-15 and BAX in patients with PCOS is high, and closely related to the ovarian reserve function, such as the levels of AMH, AFC, FSH, LH, E2 and T.

[KEY WORDS] Polycystic ovary syndrome; Ovarian function; Growth differentiation factor-9; Human bone morphogenetic protein 15

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)常伴有心血管系统疾病、糖尿病及生殖系统功能障碍,亦是导致育龄期妇女内分泌异常及无排卵性不孕的主要原因之一^[1]。但目前关于PCOS的发病机制和具体病因仍存在分歧,并有研究^[2]提示正确评估卵巢储备功能对正确诊断和治疗女性妇科内分泌疾病和不孕症具有重要意义。

生长分化因子-9(Growth differentiation factor-9, GDF-9)、骨形态发生蛋白15(human bone morphogenetic protein 15, BMP-15)、BAX蛋白可参与颗粒细胞和卵母细胞的代谢调节过程,可调控卵母细胞成熟及卵泡发育,研究^[3]证实当卵源性细胞代谢障碍是导致患者生育能力低下甚至不孕的主要原因。故而,本研究深入观察了PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平及其与卵巢储备功能的相关性,旨在为改善PCOS患者妊娠率和卵泡发育提供理论支持,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2017年2月至2018年3月治疗的PCOS患者为研究对象。纳入标准^[4]:①成年女性;②经超声检查确诊为多囊卵巢综合征;③无严重基础疾病者。排除标准:①合并其他生殖系统疾病;②不愿参与本项研究者。根据纳入排除标准共纳入病例数80例,年龄28~47岁,平均(36.15±2.38)岁;卵巢囊肿组纳入排除标准:成年女性,经超声等实验室检查确诊为卵巢囊肿者,无内分泌系统疾病者,根据纳入排除标准共纳入80例,年龄27~48岁,平均(36.19±3.12)岁。两组的一般资料比较无差别。本项研究经医院伦理委员会评审通过,所有患者及家属均已签知情同意书。

1.2 方法

2组患者均于月经周期第3d取空腹静脉血,同位素室化学标记免疫检测法检测基础性激素:卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)、雌二醇(Estradiol, E2)和睾酮(testosterone, T)水平;酶联免疫

法(ELISA)检测2组患者抗缪勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)和窦卵泡计数(antral follicle count, AFC)水平;留取2组患者剥除的卵母细胞周期(cerebellum granule cell, CGC)细胞,常规培养并制成 1×10^5 的细胞悬液,均匀涂至聚赖氨酸处理的载玻片上,甲醇:冷丙酮(1:1)10 min固定,标本 -20°C 保存备用。

免疫细胞化学染色检测两组患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平,标本常规PBS冲洗并胰酶消化后兔血清(10%)30 min封闭,分别计入羊抗人多克隆GDF-9、BMP-15及BAX抗体,4℃过夜;阴性对照过夜PBS代替一抗,20 h后取出标本30 min复温,分别加入兔抗羊FITC抗体,避光室温1 h孵育;加入辣根过氧化物标记链酶卵白素工作液20 min作用后PBS冲洗,DAB避光显色、封片^[5]。

1.3 评价指标

观察两组研究对象GDF-9、BMP-15、BAX表达水平和卵巢功能的差异,分析PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与卵巢储备功能的相关性。结果判定:阴性对照无黄色颗粒沉着,有棕黄色颗粒为阳性表达^[6]。

1.4 统计学处理

采用SPSS 11.5进行分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较行 t 检验,及Pearson相关分析法进行分析。以 $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平的比较

PCOS组患者的GDF-9、BMP-15和BAX表达水平均高于卵巢囊肿组差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 2组患者卵巢储备功能指标AMH和AFC水平的比较

PCOS组患者的AMH水平高于卵巢囊肿组,AFC水平低于卵巢囊肿组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表1 两组患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平的比较
[($\bar{x} \pm s$)(ng/L)]

Table 1 Comparison of expression levels of GDF-9, BMP-15 and BAX between the 2 groups [($\bar{x} \pm s$)(ng/L)]

组别	GDF-9	BMP-15	BAX
卵巢囊肿组	42.12±3.16	36.89±3.45	35.12±2.67
PCOS组	55.03±2.07	48.35±4.02	40.35±3.11
<i>t</i> 值	-30.567	-19.349	-11.412
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表2 2组患者卵巢储备功能指标AMH和AFC水平的比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of AMH and AFC levels in ovarian reserve function indicators between the 2 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	AMH(ng/mL)	AFC(个)
卵巢囊肿组	80	5.98±1.11	15.36±2.08
PCOS组	80	8.13±1.76	10.02±2.17
<i>t</i> 值		-9.242	15.890
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

2.3 2组患者卵巢相关激素水平的比较

PCOS组患者的FSH、LH、E2和T水平高于卵巢囊肿组差异统计学意义($P<0.05$),见表3。

表3 2组患者卵巢相关激素水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of ovarian related hormone levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	FSH (pmol/L)	LH (pmol/L)	E2 (pmol/L)	T (nmol/L)
卵巢囊肿组	4.08±1.04	5.21±1.08	50.27±6.04	65.83±6.93
PCOS组	5.49±1.12	8.56±1.25	69.15±7.23	80.42±7.52
<i>t</i> 值	-8.251	-18.138	-17.925	-12.761
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与卵巢储备功能的相关性

PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与AMH、FSH、LH、E2和T水平正相关,与AFC水平负相关($P<0.05$),见表4。

2.5 GDF-9、BMP-15、BAX表达的比较

PCOS患者的卵巢组织中GDF-9、BMP-15、BAX阳性表达率明显高于卵巢囊肿患者,见图1。

表4 PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达水平与卵巢储备功能的相关性

Table 4 Correlation between GDF-9, BMP-15, BAX expression levels and ovarian reserve function in patients with PCOS

GDF-9 vs	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	BMP-15 vs	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	BAX vs	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
AMH	0.467	0.001	AMH	0.516	0.015	AMH	0.435	0.022
AFC	-0.441	0.013	AFC	-0.521	0.009	AFC	-0.504	0.036
FSH	0.502	0.027	FSH	0.449	0.037	FSH	0.398	0.009
LH	0.576	0.035	LH	0.482	0.023	LH	0.422	0.017
E2	0.602	0.008	E2	0.503	0.015	E2	0.516	0.024
T	0.486	0.019	T	0.511	0.002	T	0.493	0.038

3 讨论

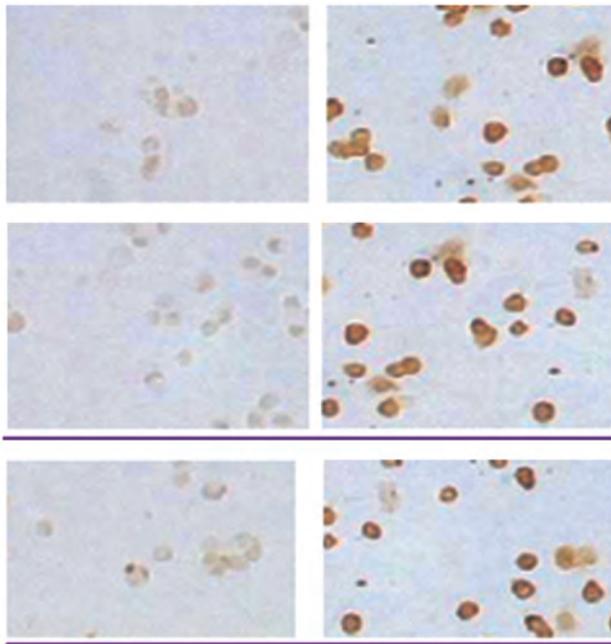
痤疮、多毛、月经稀发、肥胖、不孕均为PCOS常见临床表征,属于常见妇科内分泌疾病。研究提示PCOS患者出现代谢综合征、2型糖尿病、高血压、血脂异常、及子宫内膜癌等疾病风险较健康人显著升高^[7]。PCOS常伴有生殖功能障碍和代谢异常,可能与遗传、环境、心理因素等关系密切,但确切发病机制尚不明晰^[8]。

PCOS临床症状及病因复杂并具有高度异质性,其中PCOS患者多呈现出卵泡发育障碍的重要特征,因而卵泡相关因子的研究已成为PCOS机制研究的重要方向^[9]。GDF-9属于转化生长因子- β 超家族,是卵母细胞卵源的生长因子,主要以主、

旁分泌等形式参与卵泡的发育、生长、成熟及排卵。研究^[10]发现PCOS患者卵巢组织GDF-9多存在表达降低,提示GDF-9水平的降低可能在PCOS的发病过程发挥了重要的作用。

BMP-15亦属于TGF- β 超家族,具有调控卵巢局部细胞分化及增殖的功能并可调节卵母细胞的成熟。资料^[11]显示BMP-15可促进FSH分泌并刺激颗粒细胞分泌性激素,进而发挥抗凋亡作用。研究^[12]中羊或鼠的BMP-15被敲除后可出现不孕情况,这提示BMP-15与卵巢具有重要联系。

BAX是BCL-2基因家族中细胞凋亡促进基因,其与BCL-2水溶性蛋白具有同源性,BAX的过度表达达对Bcl-2产生阻抑作用并可拮抗BCL-2保护效应



注:左图为卵巢囊肿患者;右图为PCOS患者;由上到下分别为GDF-9、BMP-15、BAX,左为阴性,右为阳性。

图1 GDF-9、BMP-15、BAX 表达的比较

Figure 1 Comparison of the expressions of GDF-9, BMP-15 and BAX

而导致细胞死亡。研究^[13,14]发现 *Bax* 的表达广泛,血管平滑肌细胞、肝细胞、肾小管上皮细胞、呼吸系上皮细胞均可在其分布,此外 *Bax/Bcl-2* 蛋白大小对反映细胞凋亡抑制作用强弱具有重要提示作用,故而认为 *BAX* 可作为促细胞凋亡基因之一。

卵泡发育过程精细且复杂,*GDF-9* 可参与卵巢局部生长因子的调控,通过自分泌促进卵母细胞分裂并通过旁分泌调节卵泡膜细胞和颗粒细胞的增殖分化,进而影响卵巢蛋白酶、内固醇激素及相关因子的分泌。研究^[15]发现 *BMP-15* 可调控生育力,敲除小鼠 *BNP-15* 基因后,小鼠出现原始卵泡发育障碍,进而导致受精和排卵障碍,降低小鼠生育能力,故而机体 *BMP-15* 水平与卵巢功能具有密切联系;*Bax/Bcl-2* 两蛋白之间的比例关系是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素,因此认为,*BAX* 是极重要的促细胞凋亡基因之一,可反映卵母细胞功能活性。

AMH 主要由窦状卵泡和窦前卵泡颗粒细胞分泌,与卵巢反应性及获卵数呈正相关,可作为预测促排卵过程卵巢活性及卵巢储备功能的重要血清标记物。本研究发现 AFC 可对成熟卵泡总数进行预测,是评价机体卵巢储备功能的重要指标。相关性研究发现 PCOS 患者 *GDF-9*、*BMP-15*、*BAX*

表达水平与 AMH、FSH、LH、E2 和 T 水平正相关,与 AFC 水平负相关。上述结果提示多囊卵巢综合征患者的 *GDF-9*、*BMP-15*、*BAX* 表达水平较高,且与 AMH、AFC、FSH、LH、E2 和 T 等卵巢储备功能指标水平密切相关。但本研究对上述因子的具体机制进行研究,还需要深入研究进行探讨。

综上所述,多囊卵巢综合征患者的 *GDF-9*、*BMP-15*、*BAX* 表达水平较高,且与 AMH、AFC、FSH、LH、E2 和 T 等卵巢储备功能指标水平密切相关。

参考文献

- [1] 余爱丽,林元,孙艳,等. 控制性超促排卵周期多囊卵巢综合征患者生长分化因子-9 和骨形成蛋白-15 的初步研究[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(4):276-283.
- [2] 王蕾,林元,孙艳,等. 生长分化因子-9 和骨形成蛋白-15 对多囊卵巢综合征患者卵丘细胞凋亡的影响[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(10):786-792.
- [3] 温肖依,谭俊,伍琼芳. 多囊卵巢综合征患者卵泡发育不良与干细胞因子表达水平的相关性研究[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(11):882-886.
- [4] 张晓金,归绥琪,黄书慧,等. 从“痰瘀”论治多囊卵巢综合征不孕临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 19(2):415-419.
- [5] 胡勇,谭超. 多囊卵巢综合征患者妊娠母血及脐血中胰岛素样生长因子-1 水平对妊娠结局的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(1):73-75.
- [6] 向玉,杨惠林,马英兰,等. 调经助育汤治疗多囊卵巢综合征排卵障碍肾虚血瘀证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 11(22):170-174.
- [7] Chang HM, Qiao J, Leung PCK. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors[J]. Human Reproduction Update, 2017, 23(1):1-18.
- [8] 刘梅梅,丁慧,尹晓静,等. 多囊卵巢综合征患者血清血管内皮生长因子、内皮抑素水平及对卵巢间质血流的影响研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(4):448-453.
- [9] Desislava A, Elena K. Tribulus terrestris Alters the Expression of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Rabbit Ovaries of Mothers and F1 Female Offspring[J]. Plos One, 2016, 11(2):e0150400.
- [10] 周娴颖,周莉,孙祖越. 用于治疗多囊卵巢综合征的中药药理学作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20):3715-3720.
- [11] Castro FCD, Cruz MHC, Leal CLV. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility—A Review[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2016, 29(8):1065-1074.

(下转第 233 页)

血清 NT-proBNP、D-二聚体、ST2 水平与 COPD 合并呼吸衰竭患者预后的相关性分析

孙彩玲* 张华钊 孙淑红

[摘要] **目的** 分析血清氨基末端 B 型钠尿肽原(NT-proBNP)、D-二聚体(D-D)、人基质裂解素(human matrix lysin, ST2)水平与慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并呼吸衰竭(简称呼衰)患者预后的相关性。**方法** 选取 2018 年 3 月至 2019 年 7 月本院 112 例 COPD 合并 II 型呼衰患者为研究对象,根据其 30 d 内预后情况分为死亡组(预后不良组)及生存组(预后良好组),并纳入同期健康体检者 56 例作为健康对照组。比较 3 组性别、年龄、入院时动脉血氧分压(PaO₂)、动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)、COPD 评估测试(CAT)等基线资料及血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平差异,并使用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评估入院时血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平对 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后的预测价值。**结果** 112 例 COPD 合并 II 型呼衰患者入院后 30 d 死亡 31 例(27.68%),纳入预后不良组;生存 81 例(72.32%),纳入预后良好组。3 组性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$);预后不良组与预后良好组年龄、PaO₂ 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但年龄均高于健康对照组($P<0.05$),PaO₂ 均低于健康对照组($P<0.05$);3 组 PaCO₂ 及血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平比较,为预后不良组>预后良好组>健康对照组($P<0.05$);且预后不良组 CAT 评分高于预后良好组($P<0.05$)。经 ROC 曲线分析,发现血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平均对 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后具有较高预测价值(AUC=0.955、0.931、0.946, $P<0.05$),其 cut-off 值分别为 709.66 pg/L、532.47 ng/L、463.48 ng/L。**结论** 血清 NT-proBNP、D-D、ST2 对 COPD 合并 II 型呼衰预后预测价值较高,有助于临床诊疗。

[关键词] COPD;呼吸衰竭;NT-proBNP;D-二聚体;人基质裂解素

Correlation between serum NT - proBNP, D - dimer and ST2 levels and prognosis in patients with COPD and respiratory failure

SUN Cailing*, ZHANG Huazhao, SUN Shuhong

(Department of Oncology, Rongcheng People's Hospital of Shandong Province, Rongcheng, Shandong, China, 264300)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the correlation between serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), D-dimer (D-D) and human matrix lysin (ST2) levels and prognosis of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) complicated with respiratory failure. **Methods** From March 2018 to July 2019, 112 patients with COPD and type II respiratory failure in our hospital were selected as the research subjects. According to their prognosis within 30 days, they were divided into death group (poor prognosis group) and survival group (good prognosis group). Fifty-six healthy subjects were included as healthy controls. Compare the baseline data of gender, age, partial arterial oxygen pressure (PaO₂), partial arterial carbon dioxide pressure (PaCO₂), and COPD assessment test (CAT) and serum NT-proBNP, DD,

基金项目:泰安市科技发展计划基金项目(2018NS0216)

作者单位:山东省荣成市人民医院肿瘤科,山东,荣成 264300

*通信作者:孙彩玲, E-mail:HLB324@sina.com

and ST2 levels in the three groups. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to evaluate the predictive value of serum NT-proBNP, DD, and ST2 levels at the time of admission to the adverse prognosis of COPD patients with type II respiratory failure. **Results** Thirty-one patients (27.68%) who died of COPD combined with type II respiratory failure 30 days after admission were included in the poor prognosis group; 81 patients (72.32%) survived and were included in the good prognosis group. There was no significant difference in gender comparison between the three groups ($P>0.05$). There was no significant difference in age and PaO₂ between the poor prognosis group and the good prognosis group ($P>0.05$), but the age was higher than the healthy control group ($P<0.05$). PaO₂ was lower than the healthy control group ($P<0.05$). PaCO₂ and serum NT-proBNP, DD, ST2 levels of the three groups were poor prognosis group> good prognosis group> healthy control group ($P<0.05$). The CAT score of the poor prognosis group was higher than that of the good prognosis group ($P<0.05$). ROC curve analysis found that serum NT-proBNP, DD, and ST2 levels had a high predictive value for the poor prognosis of patients with COPD combined with type II respiratory failure (AUC=0.955, 0.931, 0.946, $P<0.05$), and their cut-off values are 709.66 pg/mL, 532.47 ng/mL, and 463.48 ng/L. **Conclusion** Serum NT-proBNP, D-D and ST2 have higher predictive value on prognosis of COPD with type II respiratory failure, which is helpful for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] COPD; Respiratory failure; NT-proBNP; D-dimer; Human matrix lysin

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)为常见呼吸系统慢性疾病,常发于老年人群,以不完全可逆气流受限为临床特点,病情呈进行性加重,可进展为肺心病,威胁患者生命健康^[1]。COPD急性加重期,肺功能严重受限,易出现低氧血症及二氧化碳潴留,导致II型呼吸衰竭(简称呼衰),II型呼衰也是COPD急性加重期常见且严重的并发症,能引起致残率、病死率增加,影响患者预后生存质量^[2]。因此,及时检测患者病情进展,判断预后,对COPD合并II型呼衰诊疗非常重要。氨基末端B型钠尿肽原(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)作为一种心力衰竭的常用生化标志物,近年发现,其水平与呼衰严重程度密切相关^[3]。D-二聚体(D-dimer, D-D)为反映机体血凝状态的重要指标,D-D的升高与机体纤溶系统激活及血栓形成相关,而缺氧可增加凝血与纤溶机能紊乱,故D-D水平也与COPD合并II型呼衰病情具有一定相关性^[4]。人基质裂解素(human matrix lysin, ST2)为白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)受体家族的新成员,在炎症及变态反应性疾病中具有重要作用,目前,有研究表明,血清ST2水平能随COPD等肺部疾病的严重程度升高而变化,且与患者预后状态相关^[5]。本研究评估入院时血清NT-proBNP、D-D、ST2水平对患者预后的预测价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年3月至2019年7月本院112例COPD合并II型呼衰患者为研究对象。纳入标准:符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)》^[6]中COPD诊断标准及II型呼衰诊断标准;年龄>18岁。排除标准:合并心、肾等重要脏器功能障碍;伴免疫系统、造血系统疾病;既往神经精神疾病史;合并意识障碍;合并肺栓塞、肺脓肿等肺部其他疾病。112例COPD合并II型呼衰患者男性67例,女性45例;年龄(68.45±9.25)岁。并纳入同期健康体检者56例作为健康对照组。所有患者及家属均已签署知情同意书。且经本院医学伦理委员会审批。

1.2 方法

所有COPD合并II型呼衰患者均在入院时采取股动脉血及外周静脉血,使用血气分析仪(丹麦雷度公司)检测动脉血PaO₂、PaCO₂;使用电化学发光法(试剂盒由德国罗氏公司生产)检测血清NT-proBNP;采用全自动血凝仪(日本希思美康公司)检测D-D水平;使用酶联免疫分析法(试剂盒由北京北方生物技术研究所以生产)检测ST2水平;采用COPD评估测试(COPD assessment test, CAT)^[7]评估临床症状,CAT总分0~40分,分数越高,临床症状越严重。并根据30d内预后情况分

为死亡组(预后不良组)及生存组(预后良好组)。56例健康对照组则采取空腹股动脉血及外周静脉血,检测方法同上述COPD合并II型呼衰患者。

1.3 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行数据分析;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,2组间比较采用独立样本 t 检验,3组间比较采用单因素方差分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;采用受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估血清NT-proBNP、D-D、ST2水平对COPD合并II型呼衰患者不良预后的预测价值,计算曲线下面积(AUC);以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组基线资料比较

112例COPD合并II型呼衰患者入院后30d死亡31例(27.68%),纳入预后不良组;生存81例(72.32%),纳入预后良好组;3组性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);预后不良组与预后良好组年龄、 PaO_2 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但年龄均高于健康对照组($P < 0.05$), PaO_2 均低于健康对照组($P < 0.05$);3组 PaCO_2 比较,为预后不良组 $>$ 预后良好组 $>$ 健康对照组($P < 0.05$);且预后不良组CAT评分高于预后良好组($P < 0.05$);见表1。

表1 3组基线资料比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of baseline data among the 3 groups [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	性别		年龄(岁)	PaO_2 (kPa)	PaCO_2 (kPa)	CAT评分(分)
		男	女				
预后不良组	31	21(67.74)	10(32.26)	70.09 \pm 8.32 ^a	6.95 \pm 0.78 ^a	9.65 \pm 0.94 ^{ab}	28.11 \pm 4.27 ^b
预后良好组	81	46(56.79)	35(43.21)	67.39 \pm 9.46 ^a	7.19 \pm 0.72 ^a	8.45 \pm 0.91 ^a	23.54 \pm 3.59
健康对照组	56	31(55.36)	25(44.64)	51.36 \pm 8.22	10.29 \pm 0.95	4.25 \pm 0.69	-
$\chi^2/F/t$ 值		1.413		15.362	18.361	22.327	5.713
P值		0.493		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与预后良好组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 3组血清NT-proBNP、D-D、ST2水平比较

3组血清NT-proBNP、D-D、ST2水平比较,均

为预后不良组 $>$ 预后良好组 $>$ 健康对照组($P < 0.05$),见表2。

表2 3组血清NT-proBNP、D-D、ST2水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of levels of serum NT-proBNP, D-D and ST2 among the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NT-proBNP(pg/mL)	D-D(ng/mL)	ST2(ng/L)
预后不良组	31	773.51 \pm 73.35 ^{ab}	617.09 \pm 71.08 ^{ab}	541.66 \pm 70.59 ^{ab}
预后良好组	81	602.82 \pm 69.90 ^a	458.21 \pm 76.98 ^a	380.77 \pm 71.38 ^a
健康对照组	56	216.54 \pm 41.09	156.41 \pm 23.36	105.49 \pm 20.36
F值		89.465	117.361	145.471
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与预后良好组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 血清NT-proBNP、D-D、ST2水平预测COPD合并II型呼衰患者不良预后的价值分析

经ROC曲线分析,发现血清NT-proBNP、D-D、ST2水平均对COPD合并II型呼衰患者不良预后具有较高预测价值(AUC=0.955、0.931、0.946, $P < 0.05$),其cut-off值分别为709.66 pg/mL、532.47 ng/mL、463.48 ng/L,见表3、图1。

3 讨论

COPD合并II型呼衰为临床危重症,患者常伴不同程度氧供失衡、炎症反应、内皮细胞受损、微循环障碍等病理状态,若未得到及时有效治疗,可诱发其他器官功能衰竭,也使该病具有较高致残率及致死率^[8]。因此,如何准确评估病情进展、尽

表3 血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平预测 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后的价值

Table 3 Value of serum NT-proBNP, D-D and ST2 in predicting the poor prognosis of patients with COPD and type II respiratory failure

指标	cut-off 值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC	95%CI
NT-proBNP(pg/mL)	709.66	83.87	92.90	0.765	0.955	0.920~0.990
D-D(ng/mL)	532.47	90.32	82.72	0.730	0.931	0.883~0.979
ST2(ng/L)	463.48	90.32	88.89	0.792	0.946	0.900~0.992

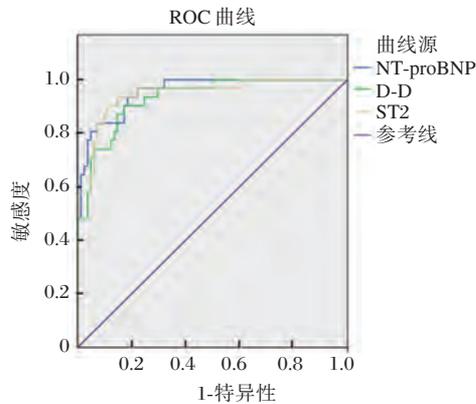


图1 血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平预测 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum NT-proBNP, D-D and ST2 in predicting the poor prognosis of patients with COPD and type II respiratory failure

早预测患者预后,成为学术界研究的热点及难点。近年来,血清学检测在诊断学领域飞速发展,血清学指标具有检测方便、快速等优点,临床接受度较高^[9]。对此,本研究就血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平对 COPD 合并 II 型呼衰患者预后的预测价值展开分析,为 COPD 合并 II 型呼衰的诊疗提供新靶点,取得一定成果。

本研究结果显示,112 例 COPD 合并 II 型呼衰患者入院后 30 d 死亡率为 27.68%,与 Hilty 等^[10]报道的 28% 一致。表明 COPD 合并 II 型呼衰患者近期死亡风险较高,临床应及时评估患者预后,尽早予以干预措施,改善患者预后状况。另外,预后不良组 PaCO₂、CAT 评分均高于预后良好组,这也提示,二氧化碳潴留及临床症状严重者,预后差,该结果与向薇等^[11]研究结果一致。向薇等^[11]还认为,随着二氧化碳潴留的加重,机体酸中毒也更严重,而增加呼吸抑制、心脏功能受损等症状体征,加速病情进展,使患者预后不佳。但 PaCO₂ 等血气分析指标仅能评估酸碱平衡状态,CAT 评分也仅

用于评估患者临床症状,故探寻其他更加准确、全面的评估指标,有其必要性。

谈定玉等^[12]提出,COPD 合并呼衰的严重缺氧状态下,可诱导心肌细胞受损,且使机体肺动脉收缩,增加心脏负荷,诱发心功能衰竭。而 NT-proBNP 作为反映心力衰竭情况的生化指标,对评估心功能受损程度有重要作用^[13]。

Xu 等^[14]也指出,纤溶系统、血凝状态也与 COPD 合并 II 型呼衰病情进展密切相关。COPD 患者长期处于缺氧状态,在合并 II 型呼衰时,内皮细胞损伤急剧增加,导致微循环瘀滞,机体可进入血栓前期,这一高凝状态由刺激纤溶系统改变,使血栓形成风险进一步升高^[15]。本研究中,预后不良组血清 D-D 水平高于预后良好组,且 D-D 对 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后具有较高预测价值。提示入院时伴高 D-D 水平者,可能处于血液高凝状态,出现心脑血管事件风险较高,预后较差^[16]。而 D-D 预测 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后的 cut-off 值为 532.465 ng/mL,提示临床应在入院时积极检测血清 D-D,在其水平高于 532.465 ng/mL 时,应注意患者血液高凝状态,予以针对性干预措施,减少心脑血管事件,降低患者死亡风险。

炎症反应及免疫系统紊乱也是影响 COPD 合并 II 型呼衰患者预后的重要因素,炎症反应增强、免疫系统失衡可增加气道水肿程度,加重呼吸困难症状及呼吸循环紊乱,引起不良预后^[17]。ST2 作为一种新型炎症因子,可选择性表达于 Th2 细胞,参与 Th2 细胞为主的炎症反应,且有学者发现,血清 ST2 水平与呼吸困难严重呈显著正相关^[18]。本研究结果显示,预后不良组血清 ST2 水平高于预后良好组,且 ST2 对 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后具有较高预测价值。究其原因可能与入院时血清 ST2 水平较高者,机体炎症反应及免疫功能紊乱状态更严重,使入院治疗期间病情加速进展,预后不良有关^[19]。本研究中,血清 ST2 预测

COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后的 cut-off 值为 463.48 ng/L,说明当患者入院血清 ST2>463.48 ng/L 时,机体炎症水平较高、病情较为严重,临床应予以重点监控,改善患者预后。

综上所述,血清 NT-proBNP、D-D、ST2 水平对预测 COPD 合并 II 型呼衰患者不良预后的价值较高,临床应积极进行入院血清 NT-proBNP、D-D、ST2 检测,尽早评估患者预后状况,为诊疗提供依据。

参考文献

- [1] Koblizek V, Milenkovic B, Barczyk A, et al. Phenotypes of COPD patients with a smoking history in Central and Eastern Europe: The POPE Study[J]. *European Respiratory Journal*, 2017, 49(5):1446-1455.
- [2] Cortegiani A, Longhini F, Carlucci A, et al. High-flow nasal therapy versus noninvasive ventilation in COPD patients with mild-to-moderate hypercapnic acute respiratory failure: study protocol for a noninferiority randomized clinical trial[J]. *Trials*, 2019, 20(1):450-457.
- [3] 谢希, 刘莉莉, 李书会. 尿毒症患者血液透析前后血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平变化及其临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(4):320-324.
- [4] Nybo M, Hvas AM. Age-adjusted D-dimer cut-off in the diagnostic strategy for deep vein thrombosis: a systematic review[J]. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 2017, 77(8):568-573.
- [5] 罗年桑, 张海峰, 刘品明, 等. 血清可溶性 ST2 联合白细胞介素-33 对射血分数保留的心力衰竭辅助诊断价值的初探[J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(3):198-203.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4):255-264.
- [7] Lim J, Choi SE, Bae E, et al. Mapping analysis to estimate EQ-5D utility values using the COPD assessment test in Korea[J]. *Health and Quality of Life Outcomes*, 2019, 17(1):97-103.
- [8] Echevarria C, Steer J, Bourke SC. Comparison of early warning scores in patients with COPD exacerbation: DECAF and NEWS score[J]. *Thorax*, 2019, 74(10):1136-1141.
- [9] Fan J, Ma J, Xia N, et al. Clinical value of combined detection of CK-MB, MYO, cTnI and plasma NT-proBNP in Diagnosis of acute myocardial infarction[J]. *Clinical Laboratory*, 2017, 63(3):427-433.
- [10] Hilty MP, Riva T, Cottini SR, et al. Low flow veno-venous extracorporeal CO2 removal for acute hypercapnic respiratory failure[J]. *Minerva anesthesiologica*, 2017, 83(8):812-823.
- [11] 向薇, 杨华, 赵涛, 等. BAL 与 NIPPV 对 COPD 合并 II 型呼吸衰竭患者肺功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(12):2901-2904.
- [12] 谈定玉, 凌冰玉, 孙家艳, 等. 经鼻高流量氧疗与无创正压通气比较治疗慢性阻塞性肺疾病合并中度呼吸衰竭的观察性队列研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(4):361-366.
- [13] Zhao Q, Zhang R, Hou J, et al. Relationship between fragmented QRS and NT-proBNP in patients with ST elevation myocardial infarction who underwent primary percutaneous coronary intervention[J]. *Acta Cardiologica Sinica*, 2018, 34(1):13-22.
- [14] Xu XP, Zhang XC, Hu SL, et al. Noninvasive ventilation in acute hypoxemic nonhypercapnic respiratory failure: a systematic review and meta-analysis[J]. *Critical Care Medicine*, 2017, 45(7):727-733.
- [15] Nobes J, Messow CM, Khan M, et al. Age-adjusted D-dimer excludes pulmonary embolism and reduces unnecessary radiation exposure in older adults: retrospective study[J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2017, 93(1101):420-424.
- [16] Leitao FFS, Alotaibi NM, Yamasaki K, et al. The role of beta-blockers in the management of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2017, 12(2):125-135.
- [17] Madhani SP, Frankowski BJ, Federspiel WJ. Fiber bundle design for an integrated wearable artificial lung[J]. *Asaio Journal*, 2017, 63(5):631-636.
- [18] Ruiz-Castilla M, Bosacoma P, Dos Santos B, et al. Soluble suppression of tumorigenicity-2 predicts hospital mortality in burn patients: an observational prospective cohort pilot study[J]. *Shock*, 2018, 51(2):194-199.
- [19] Turnbull AE, Sepulveda KA, Dinglas VD, et al. Core domains for clinical research in acute respiratory failure survivors: an international modified delphi consensus study[J]. *Critical Care Medicine*, 2017, 45(6):1001-1010.

(上接第 228 页)

- [12] 马俊花, 沈卫红, 朱红, 等. 血清颗粒蛋白前体、白细胞介素-6 与多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的相关性[J]. *上海医学*, 2016, 11(1):6-9.
- [13] Behrouzi A, Colazo MG, Ambrose DJ. Alterations in bone morphogenetic protein 15, growth differentiation factor 9, and gene expression in granulosa cells in preovulatory follicles of dairy cows given porcine LH[J]. *Theriogenology*, 2016, 85(7):1249-1257.
- [14] 马龙飞, 李娟, 冯赓. 胰岛素样生长因子 1 基因多态性与多囊卵巢综合征相关性研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(6):406-410.
- [15] 黄春, 陈自洪, 檀大焱, 朱小凤, 周莉, 王书佳. IVF/CISI-ET 对 PCOS 患者临床结局的影响[J]. *中国热带医学*, 2014, 14(1):93-95.

子宫内膜异位症患者血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平及与不孕的关系

顾晓荔¹ 吴新华¹ 姬梦鸽² 符元元^{1*}

[摘要] **目的** 观察子宫内膜异位症(EMs)患者血清基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)水平及与不孕的关系。**方法** 选取2016年5月至2018年12月于本院就诊的EMs患者102例,其中不孕患者54例作为观察组,非不孕患者48例作为对照组,采集两组患者治疗前后的血液样本,使用酶联免疫吸附法检测患者血清TIMP-1、MCP-1、MMP-9含量,比较两组患者血清中TIMP-1、MCP-1、MMP-9含量。**结果** 观察组TIMP-1显著低于对照组($P<0.05$),rAFS III期与IV期患者比例、MCP-1、MMP-9显著高于对照组($P<0.05$);随着rAFS分期的增高,TIMP-1呈下降趋势($P<0.05$),MCP-1、MMP-9呈上升趋势($P<0.05$);观察组治疗后TIMP-1显著增加($P<0.05$),MCP-1、MMP-9水平显著降低($P<0.05$);EMs患者血清TIMP-1与MMP-9水平呈强相关($P<0.05$);经logistics回归分析,EMs患者血清TIMP-1、MMP-9与不孕症的发生具有显著相关性($P<0.05$)。**结论** EMs不孕患者血清TIMP-1、MCP-1、MMP-9水平与非不孕患者存在显著差异,且随着rAFS分期的增加,EMs患者不孕率升高。血清TIMP-1、MMP-9与不孕症的发生具有相关性。

[关键词] 子宫内膜异位症;基质金属蛋白酶组织抑制因子-1;单核细胞趋化蛋白-1;基质金属蛋白酶-9;不孕症

Serum TIMP-1, MCP-1 and MMP-9 levels in patients with endometriosis and its relationship with infertility

GU Xiaoli¹, WU Xinhua¹, JI Mengge², FU Yuanyuan^{1*}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450014; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Luohe Central Hospital Henan, Luohe, Henan, China, 462000)

[ABSTRACT] **Objective** To detect serum matrix metalloproteinase tissue inhibitor factor-1(TIMP-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in patients with endometriosis (EMs) and to assess the relationship between TIMP-1/MMP-9/MCP1 and infertility. **Methods** A total of 102 patients with EMs who were treated in our hospital from May 2016 to December 2018 were selected. 54 infertile patients were recruited as the observation group and 48 non-infertile patients as the control group. Blood samples were collected before and after treatment in the two groups. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum TIMP-1, MCP-1, and MMP-9 levels in the two groups. **Results** The TIMP-1 in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The proportion of patients at rAFS stage III and IV, MCP-1, and MMP-9 were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). With the increase of rAFS stage, TIMP-1 showed a downward trend ($P<0.05$), MCP-1

基金项目:河南省科技攻关计划项目(172102310067)

作者单位:1. 郑州大学第二附属医院妇产科,河南,郑州 450014

2. 漯河市中心医院妇产科,河南,漯河 462000

*通信作者:符元元, E-mail:yuankai_212@sina.com

and MMP-9 showed an upward trend ($P<0.05$). TIMP-1 increased significantly after treatment in the observation group ($P<0.05$), MCP-1, MMP-9 Levels decreased significantly ($P<0.05$). Serum TIMP-1 and MMP-9 levels were strongly correlated in patients with EMs ($P<0.05$). Logistics regression analysis showed that serum TIMP-1 and MMP-9 in patients with EMs were obviously related to the occurrence of infertility ($P<0.05$).

Conclusion The serum levels of TIMP-1, MCP-1, MMP-9 in patients with EMs are significantly different from those in non-sterile patients, and the infertility rate of patients with EMs increases with the increase of rAFS stage. Serum TIMP-1 and MMP-9 are related to the occurrence of infertility.

[KEY WORDS] Endometriosis; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Monocyte chemoattractant protein-1; Matrix metalloproteinase-9; Infertility

子宫内膜异位(endometriosis, EMs)是子宫内膜组织在经期脱落后转移到宫腔以外的其他部位而引发的疾病,育龄妇女的发病比例约占10%左右^[1]。经血中的内膜碎片随血液循环转移至盆腔,可导致盆腔黏连、痛经和不孕症的发生^[2]。EMs的发病机制复杂,医学界尚未形成统一的认识,目前广泛得到认可的有是经血逆流-内膜种植学说。子宫内膜组织由宫腔转移到盆腔需突破腹水、腹腔细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)三道防线,才能完成异位部位的种植和生长^[3-4]。因而有研究人员推测,部分细胞因子和活性酶在组织的转移和侵袭过程中发挥了重要作用^[5]。相关研究证实,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)可降解ECM的胶原蛋白和纤维连接蛋白等成分,破坏ECM结构的完整性,而基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)是其天然抑制物,两者含量的变化对EMs疾病的发生和进展有密切联系^[6]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)是趋化因子家族中的一员,在EMs的炎症损伤和盆腔黏连中发挥重要作用^[7]。本研究旨在观察EMs患者血清细胞因子及活性酶水平,为EMs及相关不孕症的发生及诊断治疗提供数据支持,现汇报如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年5月至2018年12月于郑州大学第二附属医院妇产科就诊的EMs患者102例,根据美国生育协会(revised American Fertility Society, rAFS)分期标准^[8],其中I期27例,II期29例,III期25例,IV期21例。将102例EMs患者中的54例不孕患者作为观察组,48例非不孕患者作

为对照组。观察组年龄26~41岁,平均年龄(30.42±4.20)岁,病程(0.5~8)年,平均(3.86±1.64)年;对照组年龄25~42岁,平均(30.76±4.55)岁,病程1~7年,平均(3.72±1.60)年。两组患者年龄、病程等一般资料比较无统计学差异($P>0.05$)。纳入标准:①符合EMs诊断标准^[9];②所有患者知情且自愿参与实验研究。排除标准:①半年内曾使用激素治疗;②恶性肿瘤患者;③子宫腺肌症患者。

1.2 试剂/仪器

血清基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)试剂盒购自美国ThermoFisher公司。离心机为德国艾本德公司生产。检测仪器为芬兰Labsystem公司生产的MK3型全自动酶标仪。

1.3 实验室检测

1.3.1 样本采集

采集所有研究对象外周血4 mL,3 000 r/min低温离心10 min,取上层血清置于-80℃冰箱备用。

1.3.2 酶联免疫吸附法检测

将所有患者的备用血清及酶联免疫吸附试剂盒置于常温下复苏。按照说明书要求进行加样,封口后置于37℃恒温箱内孵育,反复冲洗3次,倒置将孔内残余液体吸干。加入相应抗体,封口后继续孵育,重复上述清洗步骤。加入酶标抗体100 μL,避光孵育30 min,重复清洗步骤。加入底物工作液,孵育15 min,终止反应,使用酶标仪读数。

1.4 治疗方法

两组患者均经腹腔镜病灶切除和粘连分离术治疗,统计两组患者术后血清TIMP-1、MCP-1、MMP-9水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 23.0 件进行数据分析, 计数资料用 % 表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验, 等级比较使用秩和检验; 血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平的相关性分析采用 Pearson 分析, 不孕症的多因素分析采用 Logistic 回归分析。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

表1 两组患者 rAFS 分期、血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平比较 [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

Table 1 RAFS stages, levels of serum TIMP-1, MCP-1 and MMP-9 in different groups [$n(\%)$, $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	I 期	II 期	III 期	IV 期	TIMP-1 (ng/mL)	MCP-1 (pg/mL)	MMP-9 (ng/mL)
观察组	54	0(0.00) ^a	1(1.85) ^a	18(33.33) ^a	35(64.81) ^a	205.19±41.31 ^a	45.67±5.36 ^a	413.56±61.79 ^a
对照组	48	18(37.50)	15(31.25)	10(20.83)	5(10.42)	308.56±52.19	26.18±4.27	278.19±54.37

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$ 。

2.2 不同分期患者血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平比较

EMs I 期患者血清 TIMP-1 水平高于 II 期、III 期、IV 期 ($P < 0.05$); 随着 rAFS 分期的增高, TIMP-1 水平呈下降趋势 ($P < 0.05$); EMs I 期患者血清 MCP-1、MMP-9 水平低于 II 期、III 期、IV 期 ($P < 0.05$); 随着 rAFS 分期的增高, MCP-1、MMP-9 水平呈上升趋势 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 两组治疗前后血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 比较

两组患者治疗后 TIMP-1 显著增加 ($P < 0.05$), MCP-1、MMP-9 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 EMs 血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平的相关性

EMs 患者血清 TIMP-1 与 MMP-9 水平呈强相

2 结果

2.1 两组患者 rAFS 分期、血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平比较

观察组 rAFS III 期与 IV 期患者比例明显高于对照组, 血清 TIMP-1 水平显著低于对照组; 观察组 MCP-1、MMP-9 水平显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表2 观察组不同分期患者血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平比较 [n , $(\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Levels of serum TIMP-1, MCP-1 and MMP-9 in patients at different stages in the observation group

组别	n	TIMP-1 (ng/mL)	MCP-1 (pg/mL)	MMP-9 (ng/mL)
I 期	27	376.18±56.12	24.65±3.96	220.64±42.38
II 期	29	312.68±54.19 ^a	31.74±4.23 ^a	243.17±47.62 ^a
III 期	25	261.24±46.78 ^{ab}	39.82±4.54 ^{ab}	321.35±50.62 ^{ab}
IV 期	21	213.78±40.57 ^{abc}	43.21±5.20 ^{abc}	375.12±58.47 ^{abc}

注:与 I 期相比,^a $P < 0.05$;与 II 期相比,^b $P < 0.05$;与 III 期相比,^c $P < 0.05$ 。

关 ($P < 0.05$); MCP-1 与 TIMP-1 水平呈弱相关 ($P < 0.05$); MCP-1 与 MMP-9 水平呈弱相关 ($P < 0.05$), 见表 4。

表3 两组治疗前后血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 比较 [n , $(\bar{x} \pm s)$]

Table 3 Serum TIMP-1, MCP-1 and MMP-9 in the two groups before and after treatment [n , $(\bar{x} \pm s)$]

组别	n	TIMP-1 (ng/mL)		MCP-1 (pg/mL)		MMP-9 (ng/mL)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	54	205.19±41.31	375.24±56.19 ^a	45.67±5.36	19.37±4.57 ^a	413.56±61.79	222.51±57.22 ^a
对照组	48	308.56±52.19	364.21±65.12 ^a	26.18±4.27 ^a	18.21±4.52 ^a	278.19±54.37	219.24±55.71 ^a

注:与治疗前相比,^a $P < 0.05$ 。

2.5 血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平与不孕症的 logistics 回归分析

以是否不孕为因变量, 以 EMs 患者血清 TIMP-1、MCP-1、MMP-9 水平为自变量进行 logistics 回归分析, 结果显示, 血清 TIMP-1、MMP-9 与不孕症的发

生具有相关性 ($P < 0.05$), 见表 5。

3 讨论

EMs 虽属于良性病变, 但也存在着向恶性转变的可能。脱落的子宫内膜上皮细胞若想发生侵

表4 观察组患者血清TIMP-1、MCP-1、MMP-9水平的相关性

Table 4 The correlations among serum TIMP-1, MCP-1 and MMP-9 levels in the observation group

相关因素	TIMP-1		MCP-1		MMP-9	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
TIMP-1	1	-	-0.372	<0.05	-0.725	<0.05
MCP-1	-0.372	<0.05	1	-	0.364	<0.05
MMP-9	-0.725	<0.05	0.364	<0.05	1	-

表5 血清TIMP-1、MCP-1、MMP-9水平与不孕症的logistics回归分析

Table 5 Logistics regression analysis of the correlation between serum TIMP-1, MCP-1, MMP-9 levels and infertility

因素	β 值	SE值	95%CI	P值
TIMP-1	-1.685	0.674	1.439~20.207	0.012
MCP-1	1.264	0.601	1.090~11.496	0.069
MMP-9	1.721	0.759	1.263~24.745	0.023

袭转移,EMC是必须突破的第一道屏障^[10]。相关文献证实,具有侵蚀EMC能力的宫腔内组织才能完成异位部位的定植和生长^[11]。MMPs是一类在金属离子辅助作用下发挥生物学活性的蛋白酶。有研究显示,MMPs可降解EMC中的胶原、纤维连接蛋白等成分,破坏机体的组织学屏障,在细胞的浸润转移中发挥重要作用^[12]。MMP-9经有机汞激活后,可降解EMC和重塑其动态平衡^[13]。Rai等人^[14]在研究中发现,MMP-9对EMs的发生不限于促进EMC的降解,还具有诱导血管生成的作用。TIMP-1作为MMP-9的抑制剂,可特异性的与羧基末端结合后抑制其活性。此外,TIMP-1还对细胞的增殖和凋亡具有调控作用^[15]。陈志华等^[16]的研究结果显示,EMs患者血清MMP-9水平与病情的进展程度密切相关。马艳鸽等^[17]在通过靶向沉默COX-2基因后发现,原代培养的子宫内异症细胞MMP-9表达水平显著降低,细胞凋亡率显著增加,因而猜测MMP-9的表达水平可能与内异症细胞的凋亡有关。本研究结果显示随着rAFS分期的增高,EMs患者TIMP-1呈下降的趋势,MMP-9呈上升的趋势,提示TIMP-1/MMP-9可能与EMs的发生和进展存在一定的关联。任威等^[18]采用腹腔镜手术联合米非司酮治疗EMs患者,观察组患者

临床症状明显减轻,血清TIMP-1、MMP-9水平较治疗前也显著下降,与本研究结果相符,证实了MMP-9水平与疾病的关联。EMs患者中合并不孕症的比例高达40%,EMs可造成孕龄妇女输卵管阻塞、盆腔炎症、黄体功能异常等疾病,给女性的生殖系统造成严重侵害^[19]。EMs患者免疫功能异常,可导致腹盆腔的炎症反应,各种炎性介质和趋化因子呈高表达,造成患者盆腔及腹腔环境的改变,营造有利于宫腔组织种植的环境,损害生殖系统的正常功能,进而导致不孕。本研究中EMs组血清MCP-1水平显著高于健康组,且随着疾病的进展,MCP-1水平逐渐升高,提示MCP-1在EMs的疾病演化中扮演重要角色。本研究还发现,EMs组中不孕症患者MCP-1水平显著高于非不孕组,但血清MCP-1水平与不孕症的发生并无相关。

综上所述,EMs不孕患者血清TIMP-1水平显著低于Ems非不孕患者,MCP-1、MMP-9高于Ems非不孕患者,且随着rAFS分期的增高,TIMP-1表现出下降趋势,MCP-1、MMP-9表现出升高趋势。血清TIMP-1、MMP-9与不孕症的发生具有相关性。

参考文献

- [1] Patel BG, Rudnicki M, Yu J, et al. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2017, 96(6):623-632.
- [2] Yoshino O, Yamada-Nomoto K, Kobayashi M, et al. Bradykinin system is involved in endometriosis-related pain through endothelin-1 production [J]. Eur J Pain, 2017, 22(3):501-510.
- [3] Chagovets VV, Wang Z, Kononikhin AS, et al. Endometriosis foci differentiation by rapid lipid profiling using tissue spray ionization and high resolution mass spectrometry [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):25-36.
- [4] 李雷,冷金花. 子宫内膜异位症相关生活质量的研究进展 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(45):3593-3596.
- [5] 陈颖,龙启芳. ER、HNF-1 β 及COX-2在子宫内膜异位相关性卵巢癌中的表达及临床意义 [J]. 重庆医学, 2017, 46(27):3801-3803.
- [6] 陈建玲,李莹. 异位子宫内膜治疗后对在位子宫内膜的生物学影响 [J]. 广东医学, 2016, 37(9):1349-1352.
- [7] Cakmak H, Basar M, Seval-Celik Y, et al. Statins inhibit monocyte chemotactic protein 1 expression in endometriosis [J]. Reprod Sci, 2012, 19(6):572-579.
- [8] 魏顺英,王烈宏,祁青玲,等. 子宫内膜异位症患者血清与腹腔液中CRP、IL-8、VEGF的表达及临床意义 [J]. 中国医药导报, 2019, 36(12):89-92.

- [9] 郎景和, 崔恒, 戴毅, 等. 2015年子宫内膜异位症的诊治指南专家解读[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(12):857-861.
- [10] 马堃, 陈燕霞, 李敏. 补肾活血法治疗子宫内膜异位症不孕的临床经验[J]. 中国中药杂志, 2019, 62(6):1094-1098.
- [11] 中国医师协会妇产科医师分会子宫内膜异位症专业委员会, 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症长期管理中国专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(12):836-841.
- [12] Wei SD, Cao D, Xu XS, et al. Investigation of the expressions of MMPs and TIMPs between isogenic and allogeneic rat aortic transplantation [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):6909-6913.
- [13] Li H, Qiu Z, Li F, et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5):5865-5870.
- [14] Ria R, Loverro G, Vacca A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32(3):199-206.
- [15] 陈再玲, 於丽华, 李爱金, 等. 复方丹参注射液对羊水过少孕妇 MMPs、TIMPs、炎症因子及宫腔环境的影响 [J]. *中成药*, 2017, 23(12):2635-2638.
- [16] 陈志华, 李爱军, 白晶, 等. 子宫内膜异位症患者血清 VEGF、HE4 及 MMP-9 的表达及意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(11):232-238.
- [17] 马艳鸽, 申爱荣, 李灿宇, 等. siRNA 靶向沉默 COX-2 基因对子宫内膜异位症在位、异位子宫内膜间质细胞 VEGF 和 MMP-9 表达、COX-2 活性及细胞凋亡的影响 [J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(10):770-776.
- [18] 任威, 郭小琴. 腹腔镜手术联合米非司酮治疗对子宫内膜异位症患者 MMP-9、TIMP-1 的影响 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(2):186-188.
- [19] Sofiane B, Horace R, Emmanuelle M, et al. Colorectal endometriosis - associated infertility: Should surgery precede ART? [J]. *Fertil Steril*, 2017, 108(3):525-531.

(上接第 220 页)

参考文献

- [1] 陈丽, 余日胜, 赖林强, 等. 髓源性抑制细胞监测在评估中晚期肝癌 TACE 预后中的临床价值 [J]. *介入放射学杂志*, 2019, 28(8):742-746.
- [2] 孙巍, 丁晓燕, 陈京龙, 等. CT 引导下经皮碘海醇混合无水乙醇注射联合射频消融治疗高危部位原发性肝癌 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(9):695-700.
- [3] Soichiro A, Shinichiro N, Kazuhiro N, et al. Transcatheter arterial chemoembolization to reduce size of hepatocellular carcinoma before radiofrequency ablation [J]. *Acta Med Okayama*, 2018, 72(1):47-52.
- [4] 蔚文祥, 孔延亮. 射频消融联合经肝动脉化疗治疗原发性肝癌对患者血清甲胎蛋白及生活质量的影响 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2019, 26(01):48-51.
- [5] 赵甜甜, 李洪春, 彭辉, 等. AFU, AFP, GP73 和 GPC3 联合检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(10):1941-1944.
- [6] 孙景武, 刘志春, 张雷, 等. 原发性肝癌细胞癌与胆管细胞癌中高尔基体蛋白 73 及甲胎蛋白表达的临床意义 [J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(5):737-742.
- [7] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版) [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2015, 21(3):865-872.
- [8] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors [J]. *JNCI*, 2000, 92(3):205-216.
- [9] 欧东, 陈奕霖, 付斯瑜, 等. 三氧化二砷联合 TACE 治疗中晚期原发性肝癌疗效的 meta 分析 [J]. *介入放射学杂志*, 2018, 16(6):523-529.
- [10] 匡远黎, 王郑, 杨志亮, 等. 经肝动脉化疗栓塞联合射频消融术对中晚期原发性肝癌的近期疗效分析 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2017, 29(5):363-367.
- [11] Seung HL, Young-Joo J, Jin-Woo L. Survival benefit of radiofrequency ablation for solitary (3-5cm) hepatocellular carcinoma: An analysis for nationwide cancer registry [J]. *Medicine*, 2017, 96(44):e8486.
- [12] Ting W, Kun H Z, Piao PH, et al. Combination of dual serum fluorescence, AFP and hepatic function tests is valuable to identify HCC in AFP-elevated liver diseases [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(58):97758-97768.
- [13] 朱楠, 鲁东, 肖景坤, 等. 肝动脉化疗栓塞联合射频消融术治疗中晚期肝癌的疗效 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2017, 14(4):195-199.
- [14] 张庆永, 张志安, 张文超, 等. 射频消融联合肝动脉化疗栓塞对原发性肝癌的疗效及对细胞因子的影响 [J]. *山西医药杂志*, 2018, 11(11):1244-1247.

抗苗勒管激素的单克隆抗体制备与鉴定

苏晓菱¹ 李丽莹¹ 李苗苗¹ 何洁¹ 王瑞雪¹ 王勇^{1,2*} 罗树红^{1*}

[摘要] **目的** 表达高纯度的抗苗勒管激素蛋白,以该蛋白作为抗原制备单克隆抗体,并鉴定抗体亚型,为进一步开发优质的抗苗勒管激素诊断试剂盒做技术储备。**方法** 在表达载体 pET-28a(+)质粒中接入经密码子优化的抗苗勒管激素基因(AMH)片段,转化于BL21细菌中,异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导重组蛋白大量表达,对上清中可溶性蛋白进行纯化。使用SDS-PAGE分析纯化蛋白的纯度。经纯化的抗原蛋白3次皮下免疫小鼠,挑选产生高效价的抗体的小鼠,取其脾细胞,制备悬液。经细胞杂交技术与骨髓瘤细胞进行融合,筛选能稳定持久分泌抗AMH抗体的杂交瘤细胞株,并制备腹水抗体。通过亲和层析技术、BCA蛋白检测方法等测定手段,纯化抗体、检测抗体浓度。**结果** 筛选到2株能持久分泌抗AMH蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别为克隆细胞株3F6和4E7,分泌抗体均为IgG1亚型。**结论** 筛选出稳定分泌高纯度的抗苗勒管激素抗体的2株杂交瘤细胞,并制备单克隆抗体。下一步将其应用于AMH检测试剂盒的开发。

[关键词] 抗苗勒管激素;单克隆抗体制备;蛋白纯化

Preparation and identification of monoclonal antibodies against Anti-Mullerian hormone

SU Xiaoling¹, LI Liying¹, LI Miaomiao¹, HE Jie¹, WANG Ruixue¹, WANG Yong^{1,2*}, LUO Shuhong^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, School of Stomatology and Medicine, Foshan University, Foshan, Guangdong, China, 528000; 2. Guangzhou Hongxiang Biological Medicine Technology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510663)

[ABSTRACT] **Objective** To express a high-purity anti-Mullerian hormone protein antigen, and use this antigen to prepare a monoclonal antibody, to identify antibody subtypes, and to provide antigen and antibody materials for the development of a high-quality anti-Mullerian hormone diagnostic kit. **Methods** Following E. coli expression system codon protocols, a codon-optimized anti-Mullerian hormone (AMH) gene fragment was subcloned into the expression vector pET-28a (+) and transformed into E. coli BL21. The AMH amino acid sequence was conserved. Before and after the optimization process, the prokaryotic expression vector and host bacteria were examined for protein expression. The recombinant AMH protein was induced, expressed and purified by His-tag purification. The purified recombinant protein activity was confirmed by western blot analysis. BALB/c mice were immunized subcutaneously three times with the purified protein and serum anti-AMH antibody titers were measured by ELISA. When the titer reached 1:80,000, the mouse spleen cells were collected to prepare a suspension and fused with BALB/c mouse myeloma cells. The hybridoma cell lines stably and persistently secreting anti-AMH antibodies were screened and identified. The anti-AMH monoclonal antibody was purified and validated. **Results** Two hybridoma cell lines, 3F6 and 4E7, were established and produced anti-AMH specific monoclonal antibodies. Both 3F6 and

基金项目:佛山科学技术学院大学生创新创业训练项目(201811847075);佛山大学高层次人才启动资金(20161110004);佛山大学高水平大学建设基金(20170131020)

作者单位:1. 佛山科学技术学院口腔医学院(医药工程学院),广东,佛山 528000

2. 广州洪祥生物医药科技股份有限公司,广东,广州 510663

*通信作者:罗树红, E-mail: sluo815@gmail.com; 王勇, E-mail: 57304210@qq.com

4E7 monoclonal antibodies were IgG1 subtypes. **Conclusion** Two anti - AMH specific monoclonal antibodies, 3F7 and 4E6, were identified and validated. The next step is to apply these monoclonal antibodies to develop AMH detection kits, promoting the development of domestic diagnostic reagents.

[KEY WORDS] Anti-Mullerian hormone; Monoclonal antibody; Hybridoma; Protein expression

抗苗勒管激素 (anti - Mullerian hormone, AMH) 作为女性卵巢储备功能的评价以及辅助生殖技术中卵巢反应性评估的激素, 是由睾丸支持细胞和卵巢颗粒细胞分泌。与其他临床常用卵巢功能的生物学指标相比 AMH 浓度相对稳定^[1]。随着国内“二胎”政策的开放, 评估高龄女性卵巢储备功能成为了辅助生殖技术中至关重要的一环^[2]。研究表明抗苗勒管激素是评价卵巢储备功能的稳定指标, 不受月经周期、口服避孕药、促性腺激素释放激素的影响, 是评价卵巢储备功能最直接、准确的指标。血清 AMH 的水平与年龄呈负相关。其水平低于相应年龄段正常参考范围, 则可认为卵巢早衰。高水平的 AMH 为多囊卵巢综合症的诊断提供依据^[3-5]。将纯化后的原核表达的 AMH 蛋白作为抗原免疫小鼠。将抗 AMH 蛋白单克隆抗体应用到评估卵巢储备能力的诊断中。现今已发展到全自动 AMH 检测技术^[6-7], 简化了繁琐的操作步骤。本抗体对有望替代进口 AMH 抗体, 降低 AMH 诊断试盒的成本。

1 材料与方法

1.1 实验材料

AMH 重组蛋白由本实验室制备; BALB/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心; SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞由本实验室保存并培养。

1.2 试剂

HAT/ HT 选择性培养基及添加剂、福氏佐剂、细胞融合剂 PEG1450 均购自美国 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自上海生工生物工程; 胎牛血清、DMEM 培养基均购自中国 GIBCO 公司; Protein G 亲和层析柱和 NI-NTA 亲和层析柱购自 GE 医疗中国; BCA (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量检测试剂盒购自中国碧云天生物技术公司 (Beyotime Biotechnology)。

1.3 AMH 蛋白的制备与纯化

选取合适的 AMH 基因, 优化使其适合于大肠杆菌中表达。构建质粒表达载体, 利用化学诱导法使大肠杆菌成为感受态细胞, 进行转化。将穿

刺菌至于含卡那霉素 (Kan) 的培养基中 37℃ 培养 12~16 h, 取菌液于含 Kan 的 LB (Luria-Bertani) 细菌培养基上划线, 37℃ 过夜培养。挑选出平板中淡黄色菌落, 内含重组质粒的大肠杆菌, 至于含抗性 LB 液体培养基中培养 4~6 h。完成后菌液分成两份, 分别用于制备菌种和 PCR 扩增和电泳分析。经 PRC 鉴定和测序正确的菌液加入甘油, 然后添加甘油并保存在 -80℃。

取甘油菌至 LB 液体培养基中培养过夜, 37℃, 220 rpm 振摇, 至 OD=0.6, 加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), 至终浓度梯度为 0.5 mM。取 500 μL 菌液作为负对照, IPTG 37℃ 下诱导表达 4 h。收取菌体, 经破碎、离心处理后十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测 AMH 重组蛋白的表达。优化表达条件后, 进行 AMH 蛋白大量表达, 并对可溶性蛋白通过 NI-NTA 亲和层析柱 (GE) 纯化, 纯化的物质通过 SDS-PAGE 电泳, 并用考马斯蓝染色以评估其分子量, BCA 蛋白检测试剂盒测定 AMH 蛋白的浓度。

1.4 动物免疫

以纯化后的 AMH 重组蛋白为免疫原, 首次 AMH 重组蛋白与等体积的福氏佐剂充分乳化, 分别 50 μg, 以 100 μg/只的量于 BALB/c 小鼠背部皮下多点注射免疫。二次、三次免疫同样使用 50 μg AMH 重组蛋白与等量不完全福氏佐剂。每次免疫的时间间隔为两周, 在三次免疫的一周后, 采血、分离血清进行间接 ELISA 以检测小鼠体内抗 AMH 蛋白抗体的效价。选免疫效价高的免疫小鼠取脾, 准备骨髓瘤-脾细胞融合实验。

1.5 细胞融合和杂交瘤细胞的筛选

细胞融合和杂交瘤细胞的筛选具体实验步骤请见参考文献^[8]。经过 3 次亚克隆后, 即得到能稳定分泌特异性抗 AMH 蛋白抗体的杂交瘤细胞株, 并扩大培养于液氮保存。

1.6 单克隆抗体的制备^[9]

单克隆抗体的制备实验具体步骤请见参考文

献^[9]。采用8~10周龄的BALB/c小鼠腹腔注射杂交瘤细胞,抽取腹水后离心,Protein G亲和纯化得到单克隆抗体。

1.7 单克隆抗体效价测定

使用ELISA间接法^[10]:①包被:将重组抗原以1 μg/mL,100 μL/孔包被酶标板,置于4℃孵育过夜;封闭:用PBST洗净ELISA板,加入200 μL/孔5%的脱脂奶粉,于37℃封闭2 h,以占据固相中未被重组抗原包被的位点,减少非特异性反应;③反应:洗板后,加入倍比稀释浓度的抗体(分别为500.0、250.0、125.0、62.5、31.2、15.6、7.8、0.0 ng/mL),100 uL/孔,置于37℃孵育1 h;④加入二抗:洗板后,加入适当稀释度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,置于37℃孵育1 h;⑤显色:加入TMB显色底物100 μL/孔,反应10 min;⑥终止:加入50 μL 2 mol/L硫酸终止液终止反应;⑦读数:酶标仪于450 nm处,读取各孔OD值。

1.8 单克隆抗体的亚型鉴定

应用小鼠单克隆抗体亚型检测试剂条对抗体的亚型进行检测,根据使用说明书操作,将70 μL细胞培养上清加到试剂条的加样区,10 min后,与参照卡比对,确定抗体亚型。

2 结果

2.1 AMH重组蛋白的小量表达与纯化

经过37℃诱导表达4 h和25℃诱导表达过液,菌体收集破碎,SDS-PAGE分析(图1)发现,AMH蛋白主要在包涵体中表达。37℃条件下,表达量更高且更省时,所以以37℃诱导表达4h,进行大量表达。经SDS-PAGE胶分析,NI-NTA亲和层析柱纯化后的AMH蛋白纯度达85%以上,蛋白分子量大约40 k左右。见图2。

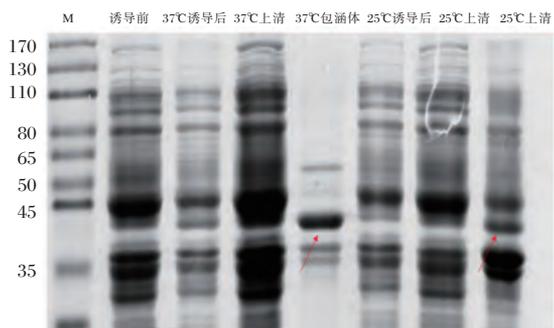
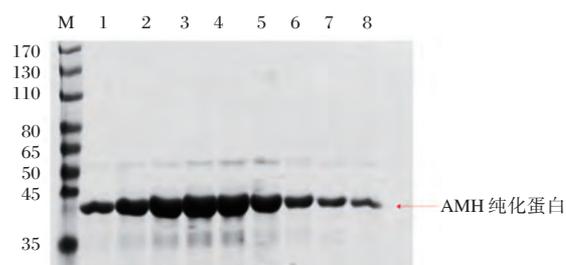


图1 AMH蛋白小量表达

Figure 1 Small amount of AMH protein expression



注:M为蛋白分子量标准 marker。1-8,含有6M尿素,500 mM咪唑洗脱液洗脱蛋白收集液

图2 SDS-PAGE分析AMH纯化蛋白

Figure 2 The purified AMH protein demonstrated with SDS-PAGE

2.2 小鼠免疫效价测定

纯化的AMH重组蛋白混合福氏佐剂用作免疫原,通过多次皮下注射使小鼠产生相应的抗体。免疫3次后,小鼠取血进行抗体效价评估。在1:128 000处的OD值超过阴性对照的OD值的2.1倍,而1:256 000时,OD值小于阴性对照OD值的2.1倍,为阴性结果。见图3。

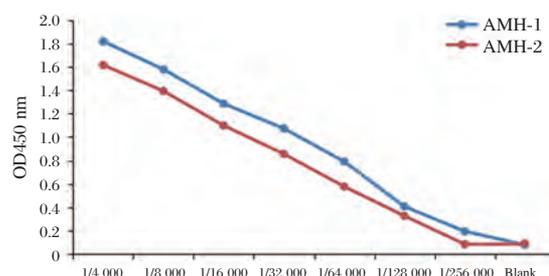


图3 小鼠血清免疫效价

Figure 3 Analysis of the immunopotency of mouse serum

2.3 杂交瘤细胞株的筛选

于96孔ELISA板中选取阳性孔,经有限稀释法对其进行克隆化,3次亚克隆后,即得到能稳定分泌特异性抗AMH蛋白抗体的杂交瘤细胞株,得到2株杂交瘤细胞,孔内上清抗体检测为阳性。将2株能稳定分泌特异性抗AMH蛋白抗体的杂交瘤细胞,分别命名为3F6、4E7。

2.4 单克隆抗体的纯化

经Protein G亲和层析法纯化后的单克隆抗体进行SDS-PAGE电泳,图4中可见55 kD、25 kD两条清晰的条带,其中位于55 kD的为抗AMH重组蛋白抗体的重链,25 kD为其轻链。

2.5 单克隆抗体效价测定、亚型鉴定

无菌抽取小鼠腹水,使用间接ELISA法于

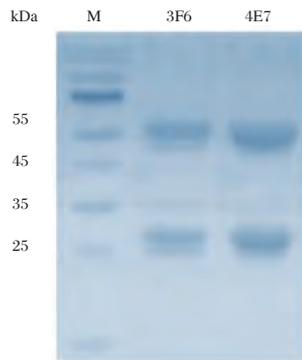


图4 单克隆抗体分析

Figure 4 The analysis of monoclonal antibody with SDS-PAGE

450 nm 处定量检测腹水中抗体效价为 6.25 ng/mL, 见图 5。使用亚型检测试纸条, 可直观得出 2 株单克隆抗体均为 IgG1 型, 见图 6。

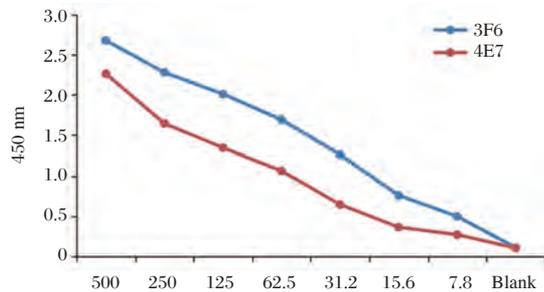


图5 单克隆抗体的效价

Figure 5 Concentration of 3F6 and 4E7 antibody

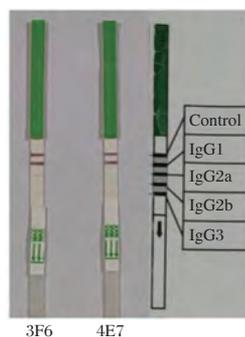


图6 抗体亚型鉴定

Figure 6 The subtype identification of antibody

3 讨论

利用大肠杆菌作为原核表达的表达式, 可构建出 AMH 基因的原核表达载体并诱导表达出 AMH 蛋白。大肠杆菌的最适生长温度为 37℃, 在

此温度下易生成包涵体蛋白。同时, 包涵体的形成是目的蛋白表达量很高的表现。本项目采取降低 IPTG 浓度并延长诱导时间的方法获得更多可溶蛋白。动物免疫制备单克隆抗体的过程中, 若 AMH 蛋白不纯会影响抗体的产生。采取多次多点注射以提高小鼠血清的免疫效价。经过 3 次免疫的小鼠产生的抗体效价达 1:128 000。可认为此时小鼠体内产生抗 AMH 重组蛋白的抗体的能力较为活跃, 制备脾细胞悬液。于小鼠腹腔注射杂交瘤细胞前, 注入降植烷可加速瘤细胞的生长。

本研究经对重组 AMH 蛋白杂交瘤细胞采用有限稀释法连续进行 3 次亚克隆, 成功制备出 2 株抗苗勒管激素单克隆抗体, 并进行效价的测定和亚型的鉴定。方法步骤较繁琐, 而且鼠源性的单克隆抗体有一定的应用局限性^[9]。可有新颖、可行的方法供纯化单克隆抗体的应用^[11]。血清中 AMH 作为卵巢储备功能的血清标志物, 具有预测卵巢储备、妊娠结局的功能^[12-14], 高水平 AMH 对卵巢颗粒细胞瘤的诊断有重要的意义^[15]。同时, AMH 水平的高低比年龄更能准确地预测妇女的更年期^[16]。制备出的抗苗勒管激素单克隆抗体可用于血清 AMH 的定量检测, 采用的检测原理为双抗体夹心法, 将其应用于全自动免疫分析仪的试剂中。AMH 测量的可靠性和可重复性引起了许多疑问, 自 2014 年以来, 已经开发出自动加样提高 AMH 测量的灵敏度和可重复性。自动化方法的准确度提高了四倍, 速度更快需要的血清量更少^[1]。但要注意用于检测的 AMH 免疫测定法并未使用相同的抗体对, 因此仍然有必要定义特定的参考值和临界点^[6], 对检测结果解释不能一概而论。依据现今科技发生的速度, 预测在不久的将来, 可将其应用于免疫层析试纸条的检测 AMH。在这医学技术日益发展的今天, 深入探究更多检测试剂核心原料的作用与来源, 可通过现今技术, 进行改良与优化, 有利于推动检验技术的发展, 惠及更多人群。

参考文献

- [1] Victoria M, Labrosse J, Krief F, et al. Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function [J]. Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction, 2018, 48(1): 19-24.
- [2] Rey RA, Picard JY, Clemente N, et al. Anti-Müllerian Hormone Deficiency and Resistance [J]. Encyclopedia of Endo-

- crine Diseases (Second Edition), 2019, 5: 506-517.
- [3] Gupta M, Yadav R, Mahey R, et al. Correlation of body mass index (BMI), anti-mullerian hormone (AMH), and insulin resistance among different polycystic ovary syndrome (PCOS) phenotypes - a cross-sectional study[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2019, 35(11): 970-973.
- [4] Asanidze E, Kristesashvili J, Pkhaladze L, et al. The value of anti-Mullerian hormone in the management of polycystic ovary syndrome in adolescents [J]. *Gynecological Endocrinology*, 2019, 35(11): 974-977.
- [5] 李世杰, 孙广范, 林霞, 等. 抗苗勒管激素对子宫内膜异位症患者妊娠的影响及其相关性分析[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2019, 11(1): 88-92.
- [6] Gruson D, Homsak E. Measurement of anti-Mullerian hormone: Performances of a new ultrasensitive immunoassay [J]. *Clinical Biochemistry*, 2015, 48(6): 453-455.
- [7] 张小刚, 刘霞, 刘飞, 等. AMH检测技术研究进展[J]. *食品与药品*, 2017, 19(5): 372-377.
- [8] Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2016, 917(2): 11-22.
- [9] 张力文. 单克隆抗体制备技术的类别与应用[J]. *科技风*, 2017, (3): 256.
- [10] Konstantinou G. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Food Allergens: Methods and Protocols*, 2017, 1592: 79-94.
- [11] Ishihara T, Miyahara M, Yamada T. Innovative next-generation monoclonal antibody purification using activated carbon: A challenge for flow-through and column-free processes [J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1121: 72-81.
- [12] Wang Y, Dzakah EE, Kang Y, et al. Development of anti-Mullerian hormone immunoassay based on biolayer interferometry technology [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(21): 5499-5507.
- [13] 苏比努尔·买买提. AMH及性激素对卵巢储备功能的预测价值和人工周期治疗对卵巢储备功能的疗效[D]. 新疆: 新疆医科大学, 2018.
- [14] Marca AL, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice [J]. *Human Reproduction Update*, 2014, 20(1): 124-140.
- [15] Wang MH, Chen CH, Wang CW, et al. A higher anti-Müllerian hormone level is associated with an increased chance of pregnancy in patients undergoing controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination [J]. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2014, 35(1): 64-68.
- [16] Dölleman M, Depmann M, Eijkemans JM, et al. Anti-Mullerian hormone is a more accurate predictor of individual time to menopause than mother's age at menopause [J]. *Human Reproduction*, 2014, 29(3): 584-591.

(上接第174页)

- [17] Gahan JM, Byrne MM, Hill M, et al. Detecting Allelic Expression Imbalance at Candidate Genes Using 5' Exonuclease Genotyping Technology [J]. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2015, 13(6): 93-103.
- [18] Ryazantsev DY, Tsybulsky DA, Prokhorenko IA, et al. Two-dye and one- or two-quencher DNA probes for real-time PCR assay: synthesis and comparison with a TaqMan probe [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 40(4): 59-68.
- [19] Sakamoto S, Hamachi I. Recent progress in chemical modification of proteins [J]. *Analytical Sciences*, 2018, 35(1): 5-27.
- [20] Hwang DE, Shin YK, Munashingha PR, et al. A repeat protein-based DNA polymerase inhibitor for an efficient and accurate gene amplification by PCR [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(12): 2544-2552.
- [21] Hee LJ, CHOI SO RA, KIM NAM IL, et al. COMPOSITION FOR HOT-START PCR COMPRISING BLOCKING OLIGONUCLEOTIDE (P), 08/30/2012.
- [22] Aye SL, Fujiwara K, Ueki A, et al. Engineering of DNA polymerase I from, *Thermus thermophilus*, using compartmentalized self-replication [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018; 5; 499(2): 170-176.
- [23] Yamagami T, Ishino S, Kawarabayasi Y, et al. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 35(5): 461-469.
- [25] Danilevich VN, Vasilenko EA, Pechnikova EV, et al. [New morphotypes of condensed DNA microparticles formed in PCR with KlenTaq- and Taq-polymerases and with plasmid DNAs as templates] [J]. *Mikrobiologiya*, 2012, 81(1): 126-137.

冠心病患者冠状动脉CT特征与血清脂蛋白(a)、脂联素、PTX3的相关性研究

周鹏^{1*} 王烁² 任艳玲³

[摘要] **目的** 探讨冠心病(CHD)患者冠状动脉CT特征与血清脂蛋白(a)[LP(a)]、脂联素(ADP)、五聚素3(PTX3)的相关性。**方法** 选取本院2018年6月至2019年10月102例CHD患者作为观察组,均采用128层螺旋CT行冠状动脉CT血管成像(CTA),并选取同期健康体检者104例作为正常对照组,检测对比两组血清LP(a)、ADP、PTX3水平。比较CT特征中不同冠状动脉狭窄程度、斑块性质(CT值)患者血清LP(a)、ADP、PTX3水平,分析血清LP(a)、ADP、PTX3与冠状动脉狭窄程度、斑块性质的相关性。**结果** 102例CHD患者的CT特征:轻度狭窄34例,中度狭窄42例,重度狭窄21例,闭塞5例;软斑块40例,钙化斑块34例,混合斑块28例。观察组血清LP(a)、PTX3水平高于正常对照组,ADP水平低于正常对照组($P<0.05$);观察组血清LP(a)、PTX3水平随冠状动脉狭窄程度增加呈升高趋势,ADP水平呈降低趋势($P<0.05$);血清LP(a)($r=0.681$)、PTX3($r=0.730$)与冠状动脉狭窄程度呈正相关,ADP($r=-0.646$)与冠状动脉狭窄程度呈负相关($P<0.05$);混合斑块患者血清LP(a)、PTX3水平高于钙化斑块、软斑块患者,ADP水平低于钙化斑块、软斑块患者($P<0.05$);血清LP(a)($r=0.790$)、PTX3($r=0.844$)与斑块性质呈正相关,ADP($r=-0.566$)与斑块性质呈负相关($P<0.05$)。**结论** 血清LP(a)、ADP、PTX3与CHD患者CT特征密切相关,可作为评估冠状动脉狭窄程度、斑块性质的重要生理病理改变因子,为临床诊治提供可靠参考依据。

[关键词] 冠心病;冠状动脉CT特征;LP(a);ADP;PTX3

Study on the correlation between CT features of coronary artery and serum lipoproteins (a), adiponectin, PTX3 in patients with coronary heart disease

ZHOU Peng^{1*}, WANG Shuo², REN Yanling³

(1. CT mri department, Fuxin mining general hospital, Liaoning health industry group, Fuxin, Liaoning, China, 123000; 2. Department of internal medicine, Fuxin mining general hospital, Liaoning health industry group, Fuxin, Liaoning, China, 123000; 3. Clinical laboratory, Fuxin mining general hospital, Liaoning health industry group, Fuxin, Liaoning, China, 123000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between CT features of coronary artery and serum lipoproteins (a) [LP(a)], adiponectin (ADP), pentalin 3 (PTX3) in patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** A total of 102 patients with CHD in our hospital from June 2018 to October 2019 were selected as the observation group, coronary CT angiography (CTA) was performed with 128-slice spiral CT, a total of 104 healthy subjects were selected as the normal control group, and serum LP(a), ADP, and PTX3 levels were detected and compared between the two groups. Compare serum LP(a), ADP, PTX3 levels in patients with different coronary stenosis and plaque properties (CT value) in CT features, correlation be-

作者单位:1. 辽宁省健康产业集团阜新矿总医院CT磁共振科,辽宁,阜新 123000

2. 辽宁省健康产业集团阜新矿总医院内科,辽宁,阜新 123000

3. 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:周鹏, E-mail:48303679@qq.com

tween serum LP(a), ADP, PTX3 and the degree of coronary artery stenosis and plaque properties was analyzed. **Results** The CT characteristics of 102 patients with CHD were: mild stenosis in thirty-four cases, moderate stenosis in forty-two cases, severe stenosis in twenty one cases, and occlusion in five cases; There were forty soft plaques, thirty-four calcified plaques, and twenty-eight mixed plaques. The levels of serum LP(a) and PTX3 in the observation group were higher than those in the normal control group, and the levels of ADP were lower than those in the normal control group ($P<0.05$); The levels of serum LP(a) and PTX3 in the observation group increased with the increase of the degree of coronary stenosis, and the ADP level decreased ($P<0.05$); Serum LP(a) ($r=0.681$) and PTX3 ($r=0.730$) were positively correlated with the degree of coronary stenosis, and ADP ($r=-0.646$) was negatively correlated with the degree of coronary stenosis ($P<0.05$); Patients with mixed plaque had higher serum LP(a) and PTX3 levels than those with calcified plaque and soft plaque, and ADP levels were lower than those with calcified plaque and soft plaque ($P<0.05$); Serum LP(a) ($r=0.790$) and PTX3 ($r=0.844$) had a positive correlation with plaque properties, and ADP ($r=-0.566$) had a negative correlation with plaque properties ($P<0.05$). **Conclusion** Serum LP(a), ADP, and PTX3 are closely related to CT characteristics of patients with CHD and can be used as important physiological and pathological factors to evaluate the degree of coronary artery stenosis and plaque properties, and provide a reliable reference for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Coronary heart disease; Coronary CT features; LP(a); ADP; PTX3

冠心病(Coronary heart disease, CHD)是临床常见冠状动脉疾病,据相关资料统计显示,冠状动脉疾病在中老年人群死亡病因中占据首位,需给予重视^[1-2]。目前,冠状动脉CT血管成像(CT angiography, CTA)是临床判断冠状动脉狭窄程度、斑块性质的重要手段之一^[3]。该方法仅可判断冠状动脉形态改变,无法评估生理病理变化情况。而临床实践证实,多种因子参与CHD生理病理改变过程^[4]。其中,五聚素3(Pentraxin 3, PTX3)属于促炎因子,可加速冠状动脉斑块破裂,促进血栓形成^[5]。脂联素(Adiponectin, ADP)在动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤过程中具有保护心肌作用^[6]。同时,研究显示,血清脂蛋白(a)[Lipoprotein(a), LP(a)]过多表达可增加CHD发生概率^[7]。为此,本研究尝试探究CHD患者冠状动脉CT特征与血清LP(a)、ADP、PTX3的相关性,旨在为临床诊治提供更多途径及参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年6月至2019年10月102例CHD患者作为观察组,男性69例,女性33例,年龄34~82岁,平均年龄(52.07±9.01)岁。选取同期健康体检者104作为正常对照组,男性70例,女性34例,年龄32~80岁,平均年龄(50.18±8.23)岁。两组年龄、性别等一般资料差异无统计学意义($P>$

0.05),有可比性。本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 临床标本

纳入标准:①观察组均首次确诊为CHD:均伴有心前区不适、气促、胸闷、胸痛等临床症状,经冠状动脉造影术检查证实至少1支冠状动脉主血管狭窄 $\geq 50\%$;②心率稳定在50~70次/min;均未接受治疗;③临床资料完整;④正常对照组体检各项指标正常,两组均知情;⑤自愿签订知情承诺书。排除标准:①伴有冠状动脉栓塞者;存在严重感染性、炎性疾病者;②因心肌炎、肥厚型心肌病、心脏瓣膜病而致心绞痛者;③结缔组织病继发冠状动脉血管炎者;④肝肾功能严重不全者;⑤心血管畸形者;⑥既往接受冠脉支架置入术或冠脉搭桥术者。

1.3 方法

1.3.1 CTA检查方法

CT扫描后所有数据传送至GE AW4.4后处理工作站,实施多平面重建、最大密度投影、容积再现,判断冠状动脉狭窄情况。评价标准:0%为无狭窄;1%~49%为轻度狭窄;50%~70%为中度狭窄;71%~99%为重度狭窄;100%为闭塞。根据CT值评估斑块性质,CT值15~35 HU为软斑块;36~130 HU为混合斑块;>130 HU为钙化斑块。

1.3.2 血清检测方法

采集空腹静脉血5 mL,离心处理,离心速率为

3 500 r/min,离心时间为15 min,取上清液,保存于-70℃条件下,待检。采用免疫比浊法检测血清LP(a)水平,酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清ADP、PTX3水平,试剂盒购自美国雅培公司,所有操作步骤严格遵循试剂盒说明书。

1.4 观察指标

①CT特征。②两组血清LP(a)、ADP、PTX3水平。③不同冠状动脉狭窄程度患者血清LP(a)、ADP、PTX3水平。④血清LP(a)、ADP、PTX3与冠状动脉狭窄程度相关性。⑤不同斑块性质患者血清LP(a)、ADP、PTX3水平。⑥血清LP(a)、ADP、PTX3与斑块性质相关性。

1.5 统计学分析

数据处理使用SPSS 22.0软件包,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD- t 检验,以Spearman相关性分析血清各指标水平与冠状动脉狭窄程度、斑块性质的关联性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CT特征

102例CHD患者,轻度狭窄34例,中度狭窄42例,重度狭窄21例,闭塞5例;软斑块40例,钙化斑块34例,混合斑块28例。典型病例:左前降支近段混合斑块,管腔狭窄75% CTA图像,见图1。



图1 CTA图像特征

Figure 1 CTA image features

2.2 两组血清LP(a)、ADP、PTX3水平比较

观察组血清LP(a)、PTX3水平高于正常对照组,ADP水平低于正常对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 两组血清LP(a)、ADP、PTX3水平比较
[$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 1 Comparison of serum Lp (a), ADP and PTX3 levels between the 2 groups [$n, (\bar{x} \pm s)$]

组别	n	LP(a)(mg/L)	ADP(μ g/L)	PTX3(μ g/L)
观察组	102	253.92 \pm 36.28	8.18 \pm 0.74	4.21 \pm 0.65
正常对照组	104	105.37 \pm 29.10	11.22 \pm 1.43	1.35 \pm 0.29
t 值		32.449	19.107	40.913
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同冠状动脉狭窄程度患者血清LP(a)、ADP、PTX3水平

血清LP(a)、PTX3水平随冠状动脉狭窄程度增加呈升高趋势,ADP水平呈降低趋势($P < 0.05$),见表2。

表2 不同冠状动脉狭窄程度患者血清LP(a)、ADP、PTX3水平比较 [$n, (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of serum Lp (a), ADP and PTX3 levels in patients with different degrees of coronary artery stenosis [$n, (\bar{x} \pm s)$]

冠状动脉狭窄程度	n	LP(a)(mg/L)	ADP(μ g/L)	PTX3(μ g/L)
轻度狭窄	34	210.85 \pm 37.45	9.04 \pm 1.01	3.27 \pm 0.72
中度狭窄	42	249.16 \pm 40.03	8.17 \pm 0.85	4.30 \pm 0.78
重度狭窄	21	307.41 \pm 46.10	7.22 \pm 0.77	5.11 \pm 0.82
闭塞	5	362.08 \pm 52.44	6.49 \pm 0.64	6.03 \pm 0.86
F 值		36.045	25.010	35.738
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 血清LP(a)、ADP、PTX3与冠状动脉狭窄程度相关性

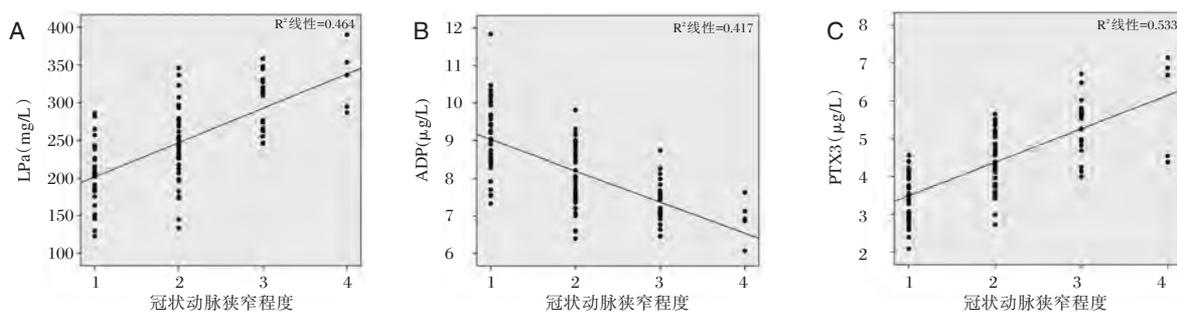
赋值“1=轻度狭窄”,“2=中度狭窄”,“3=重度狭窄”,“4=闭塞”,进行Spearman相关性分析发现,血清LP(a)($r=0.681$)、PTX($r=0.730$)与冠状动脉狭窄程度呈正相关,ADP($r=-0.646$)与冠状动脉狭窄程度呈负相关($P < 0.05$),图2。

2.5 不同斑块性质患者血清LP(a)、ADP、PTX3水平

混合斑块患者血清LP(a)、PTX3水平高于钙化斑块、软斑块患者,ADP水平低于钙化斑块、软斑块患者($P < 0.05$),见表3。

2.6 血清LP(a)、ADP、PTX3与斑块性质相关性

赋值“1=软斑块”,“2=钙化斑块”,“3=混合斑块”,进行Pearson相关性分析发现,血清LP(a)($r=0.790$)、PTX3($r=0.844$)与斑块性质呈正相关,ADP($r=-0.566$)与斑块性质呈负相关($P < 0.05$),见图3。



注: A 为血清 LP(a) 与冠状动脉狭窄程度的关系; B 为血清 ADP 与冠状动脉狭窄程度的关系; C 为血清 PTX3 与冠状动脉狭窄程度的关系

图2 血清 LP(a)、ADP、PTX3 与冠状动脉狭窄程度相关性

Figure 2 Correlation between serum LP (a), ADP, PTX3 and degree of coronary artery stenosis

表3 不同斑块性质患者血清 LP(a)、ADP、PTX3 水平比较 [n, (x̄±s)]

Table 3 Comparison of serum Lp (a), ADP and PTX3 levels in patients with different plaque properties [n, (x̄±s)]

斑块性质	n	LP(a)(mg/L)	ADP(μg/L)	PTX3(μg/L)
软斑块	40	162.33±30.41	9.96±1.36	2.51±0.69
钙化斑块	34	215.87±39.27	8.25±1.11	3.37±0.81
混合斑块	28	304.88±46.09	7.30±1.04	5.40±1.15
F 值		115.008	43.611	91.293
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

一项流行病学调查研究发现,与40岁以下人群相比,老年群体年龄每增加10岁,CHD发病风险分别升高15%(40~49岁)、48%、70%、82%、83%(>80岁),防治形势严峻^[8]。冠状动脉CTA可对冠状动脉狭窄程度进行有效评估,亦可定性分析冠状动脉粥样斑块,其局限性在于作为影像学检查方式无法从生理、病理方面反映病情程度^[9-10]。而

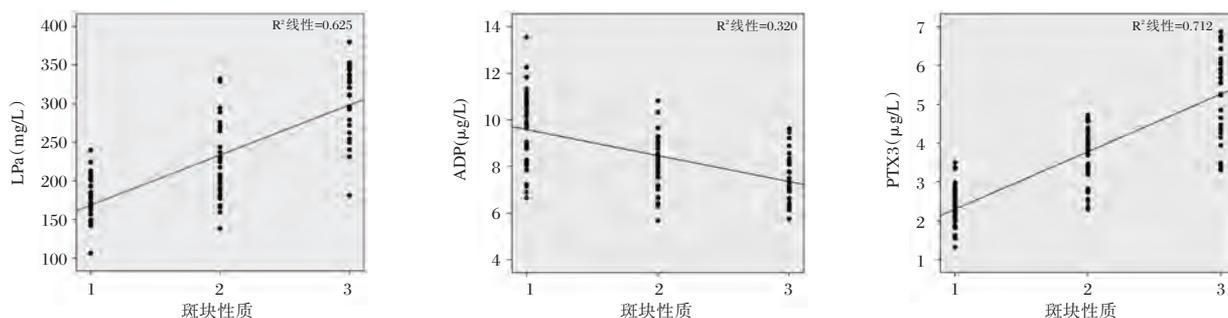


图3 血清 LP(a)、ADP、PTX3 与斑块性质的关系

Figure 3 Relationship between serum LP(a), ADP, PTX3 and plaque properties

相关指南推荐,应降低可控危险因素预防CHD,对已患CHD群体应寻求可间接反映病情的生物学指标,以做好二级预防^[11]。

Lp(a)本质上属于胆固醇,由载脂蛋白A与低密度脂蛋白经由二硫键联接而成,可加快冠状动脉粥样硬化及斑块形成^[12]。临床证实,血清Lp(a)与心肌梗死、心绞痛、脑溢血等心脑血管疾病呈正相关^[13]。同时,Schreml J等^[14]报道中认为,Lp(a)血清水平与CHD病情有关。本研究数据显示,血清LP(a)水平随冠状动脉狭窄程度增加、斑块稳定

性降低呈现逐渐升高趋势,提示LP(a)在冠状动脉狭窄及斑块形成、恶化、破裂过程中发挥重要作用。李小娟^[15]研究中经过分析CHD患者血清Lp(a)和冠状动脉斑块特点的关系,初步证实血清Lp(a)水平升高在预测急性冠状动脉事件发生及斑块不稳定性方面具有潜在价值。

研究表明,炎症反应发生时,炎症脂肪因子能作用于巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞、单核细胞等,在动脉粥样硬化形成、斑块破裂过程中发挥重要作用^[16]。PTX3属于炎症脂肪因子中促炎因

子之一,刘佟等^[17]研究表明,PTX3对CHD诊断AUC高达0.918,具有可靠诊断预测价值。本研究通过分析血清PTX3与CHD患者CT特征相关性发现,PTX3与冠状动脉狭窄程度、斑块性质具有正相关关系,其原因在于,冠状动脉粥样硬化病变及斑块部位巨噬细胞可分泌大量PTX3,使其参与冠状动脉狭窄进展过程,并增强斑块不稳定性、加速斑块破裂^[18]。临床实践发现,ADP可能通过不同途径发挥保护心肌、延缓动脉粥样硬化作用:①可抑制炎症因子所诱导的炎症反应、血管内皮凋亡;②能抑制致动脉粥样硬化因子产生;③可抑制血管平滑肌细胞增殖及泡沫细胞形成^[19-20]。这不仅为临床评估CHD冠状动脉狭窄程度、斑块性质提供依据,还为抗动脉粥样硬化提供新治疗靶点。

综上所述,血清LP(a)、ADP、PTX3与CHD患者CT特征密切相关,可作为评估冠状动脉狭窄程度、斑块性质的重要生理病理改变因子,为临床诊治提供可靠参考依据。但本研究未考虑LP(a)、ADP、PTX3治疗前后变化趋势与CHD患者CT特征的关系,仍需进一步分析与探究。

参考文献

- [1] Satija A, Bhupathiraju SN, Spiegelman D, et al. Healthful and Unhealthful Plant-Based Diets and the Risk of Coronary Heart Disease in U.S. Adults[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(4):411-422.
- [2] Zhu KF, Wang YM, Zhu JZ, et al. National prevalence of coronary heart disease and its relationship with human development index: A systematic review[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2016, 23(5): 530-543.
- [3] 王莹屏,徐新华,刘晶哲. 64层螺旋CT冠状动脉成像与冠状动脉造影诊断冠状动脉狭窄的对照研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(11): 1753-1755.
- [4] 邓涛,崔惠康,许承志,等. 冠心病患者外周血EMMPRN表达与冠脉造影下斑块性质、血清蛋白酶及细胞因子的相关性[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(12): 1274-1277.
- [5] 米琼瑶,杨坚,曹阳,等. 和肽素、正五聚蛋白3对稳定性冠心病患者冠脉狭窄程度的评估价值[J]. *中国细胞生物学报*, 2018, 40(7): 1202-1207.
- [6] Borges MC, Lawlor DA, de Oliveira C, et al. Role of Adiponectin in Coronary Heart Disease Risk: A Mendelian Randomization Study[J]. *Circ Res*, 2016, 119(3): 491-499.
- [7] 宋美,章蕊,王金辉. 同型半胱氨酸、脂蛋白a与不同程度冠心病的相关性研究[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(11): 1537-1538.
- [8] 宋宏宾,张伟民,陈大楸,等. 1872例冠心病增龄性临床研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(9): 109-113.
- [9] 姚易明,叶靖,高慧,等. 冠状动脉CT血管成像斑块主要成分定量分析对斑块类型的鉴别价值[J]. *放射学实践*, 2019, 34(07): 767-773.
- [10] 皇甫喜凤. 冠心病患者冠状动脉CT血管成像诊断斑块结果与外周血小板功能参数的相关性分析[J]. *实用医学影像杂志*, 2019, 20(01): 74-76.
- [11] 中国康复医学会心血管病专业委员会. 中国心脏康复与二级预防指南2018精要[J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(11): 802-810.
- [12] Zhao Y, Delaney JA, Quek RG, et al. Cardiovascular Disease, Mortality Risk, and Healthcare Costs by Lipoprotein (a) Levels According to Low-density Lipoprotein Cholesterol Levels in Older High-risk Adults[J]. *Clin Cardiol*, 2016, 39(7): 413-420.
- [13] 马煜盛,饶甲环,龙洁旎,等. 脂蛋白(a)与冠心病患者临床稳定性及冠状动脉狭窄程度的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(2): 235-240.
- [14] Schreml J, Gouni-Berthold I. Apolipoprotein (a) Antisense Oligonucleotides: A New Treatment Option for Lowering Elevated Lipoprotein (a)[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(10): 1562-1570.
- [15] 李小娟. 冠心病患者血清脂蛋白(a)和冠状动脉斑块特点的超声研究[J]. *安徽医药*, 2015, 19(3): 543-545.
- [16] 郝名媛,李旭,敬锐,等. 冠心病患者心外膜脂肪组织及其炎症因子对左心室舒张功能的影响[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(27): 2168-2171.
- [17] 刘佟,史菲,丁振江,等. 单核细胞/高密度脂蛋白比值与炎症脂肪因子水平及冠动脉疾病严重程度的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(11): 1159-1164.
- [18] Akgul O, Baycan OF, Bulut U, et al. Long-Term prognostic value of elevated pentraxin 3 in patients undergoing primary angioplasty for ST-elevation myocardial infarction[J]. *Coron Artery Dis*, 2015, 26(7): 592-597.
- [19] Katsiki N, Mantzoros C, Mikhailidis DP. Mikhailidis. Adiponectin, lipids and atherosclerosis[J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2017, 28(4):347-354.
- [20] 侯剑飞,罗雅月,董能斌,等. 脂联素、骨质疏松与冠心病及其病变严重程度的关系研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(4): 17-21.

ATM蛋白激酶促细胞增殖作用研究进展

唐石伏¹ 吴婉君¹ 阳建伶¹ 马兴璇¹ 杨建青^{2*}

[摘要] 一直以来,共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)编码的蛋白激酶相关研究主要集中在DNA双链断裂损伤修复领域。近年来越来越多研究表明,氧化激活的ATM激酶具有重要的促细胞增殖作用,其潜在的机制与其氧化还原稳态维持功能、糖代谢调控功能和细胞增殖信号通路活性调节功能等密切相关。本文综述ATM激酶相关研究进展,尤其是其增殖调控功能相关研究,将有利于深入了解ATM蛋白激酶促细胞增殖的机制及其临床应用。

[关键词] ATM基因; ATM蛋白激酶; 细胞增殖调控

Advance of ataxia - telangiectasia mutated protein kinase promoting cell proliferation

TANG Shifu¹, WU Wanjun¹, YANG Jianling¹, MA Xingxuan¹, YANG Jianqing^{2*}

(1. Department of Lab Medicine, the Third Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 2. Department of First Surgery, the Third Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Liuzhou, Guangxi, China, 545001)

[ABSTRACT] The research on Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase has been focusing on the field of DNA double-strand break repair. In recent years, many studies have shown that oxidation-activated ATM kinase has an important role in promoting cell proliferation, and its underlying mechanism is closely related to its redox homeostasis maintenance, glucose metabolism regulation and cell proliferation signaling pathway activity. This article reviews the progress of ATM kinase-related researches, especially related to its proliferation regulation, which will be helpful for a deeper understanding of the mechanism of ATM protein kinase to promote cell proliferation and clinical application.

[KEY WORDS] Ataxia-telangiectasia mutated gene; ATM kinase; Cell proliferation

ATM蛋白激酶由共济失调毛细血管扩张突变基因(Ataxia-telangiectasia mutated gene, ATM)编码。ATM基因是细胞管家基因,定位于染色体11q22~23,全长有150 Kb, cDNA为12 Kb,含有66个外显子,包含9 168个核苷酸的开放阅读框,编码一个3 056个氨基酸残基的ATM蛋白质激酶(相对分子质量350 kDa)^[1-2]。ATM蛋白激酶属于丝/苏氨酸蛋白激酶磷脂酰肌醇3激酶样激酶(phosphatidylinositol 3 kinase-like kinase family, PI3K)家族,通过磷酸化下游许多底物,以行使其

生物功能。ATM基因突变可致ATM蛋白激酶活性下降和功能缺陷,从而导致人类罹患共济失调-毛细血管扩张综合征(Ataxia-telangiectasia syndrome, ATS),并且ATM基因不同突变类型导致ATS表型不一致,差别很大^[3]。ATS是1岁~4岁发病的罕见常染色体隐性遗传病,以小脑退化、幼年进行性共济失调加重、毛细血管扩张、原发性免疫缺陷、基因组不稳定、电离辐射敏感、肿瘤易感、过早衰老、内分泌紊乱和生长停滞为主要症状^[4]。一直以来,ATS的电离辐射敏感、基因组不

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81560430);广西自然科学基金项目(2016JJA140484)

作者单位:1. 广西中医药大学第三附属医院检验科,广西,柳州 545001

2. 广西中医药大学第三附属医院外一科,广西,柳州 545001

*通信作者:杨建青, Email: yangjianqing2004@163.com

稳定和肿瘤易感是学界研究热点。现有研究已证实:ATM基因突变导致ATM蛋白激酶活性降低,使DNA双链断裂损伤修复能力受损,能合理解释AT患者电离辐射敏感、肿瘤易感和基因组不稳定等典型症状^[5-6]。近年来,ATS其它特异症状的研究日益增多,尤其是细胞增殖方面,取得了很多重要成果。本文主要综述ATM蛋白激酶促细胞增殖作用及其机制的研究进展。

1 ATM蛋白激酶的非DNA损伤修复功能

ATM蛋白激酶的结构域和空间构象已经明确。从氨基端到羧基端依次可分为HEATs(huntingtin, elongation factor 1A, protein phosphatase 2A A-subunit, TOR)重复、FAT(FRAP, ATM and TRRAP)、KD(The C-terminal PI3 kinase-like kinase domain)和FATC(FRAP, ATM and TRRAP C-terminal)等四个结构域^[5]。ATM同源二聚体呈现为翅膀张开的蝴蝶构象,激酶活性域位于蝴蝶头部,并显示出底物结合的位点,揭示了ATM激酶活性严谨调控的结构基础^[5]。ATM蛋白激酶在细胞DNA双链断裂(double-strand DNA breaks, DSB)损伤修复反应中起核心作用^[7]。活化的ATM蛋白激酶也能通过P53途径导致细胞凋亡或衰老^[7]。如前言所述,ATM功能缺失细胞对电离辐射和DSBs诱导剂极度敏感,基因组不稳定,对恶性转化易感ATM蛋白激酶DSBs修复功能缺陷合理解释ATS患者基因组不稳定、肿瘤易感、电离辐射敏感的表现。ATM基因测序已经广泛用于ATS的遗传咨询、优生优育、产前筛查和基因诊断^[2]。ATM激酶抑制剂也广泛用作肿瘤放疗增敏剂^[2]。ATM的DSBs修复功能难以解释ATS的生长停滞、衰老、胰岛素抵抗、共济失调等临床症状^[6]。在小脑神经元细胞中,ATM蛋白主要分布在细胞质,其功能完全缺失引起小脑神经元细胞死亡,导致A-T综合征^[8]。这些研究提示ATM在细胞质外有其它生物学功能。近年来,ATM激酶的非DNA双链断裂修复功能如细胞增殖调控越来越引起学界的重视,取得了较大进展。

2 ATM蛋白激酶调控细胞增殖功能及其氧化活化途径

2.1 ATM蛋白激酶调控细胞增殖

越来越多研究表明ATM蛋白激酶对细胞增

殖有重要促进作用。生长停滞是ATS患者常见的临床症状。ATM基因敲除小鼠来源的造血干细胞、神经干细胞和星形胶质细胞等各种类型细胞均有增殖缺陷。ATM功能缺失导致乳腺癌相关成纤维细胞(Cancer-associated fibroblasts, CAF)增殖缺陷^[9]。在乳腺癌CAF和神经细胞中,ATM蛋白激酶主要分布在细胞质中^[8-9],这提示在细胞质中ATM蛋白激酶有非DSB依赖的激活途径,可能参与调控细胞增殖。

2.2 ATM蛋白激酶氧化活化

现有研究已证实,ATM蛋白激酶是细胞的重要氧化还原感受器^[10]。氧化应激(oxidative stress, OS)能以非经典途径直接激活ATM蛋白激酶。在细胞质中,过氧化氢氧化ATM第2991位半胱氨酸残基上的硫醇基团成为次磺基团,该基团与另一ATM蛋白单体的第2991位半胱氨酸残基上的硫醇基团共价结合并形成分子间二硫键,使非活性的ATM二聚体转变成活性的ATM二聚体^[11]。ATM氧化活化是氧化应激特异的,不改变ATM的分布和稳定性^[11]。氧化型的ATM蛋白激酶调控乳腺癌CAF细胞增殖^[9],这提示氧化型ATM可能参与调控小鼠造血干细胞、神经干细胞和星形胶质细胞等各种类型细胞的增殖^[12-14]。作为蛋白激酶,氧化型ATM很可能通过磷酸化下游许多底物,调节相关信号通路活性,从而在细胞增殖中发挥关键作用。现有研究表明,氧化型ATM激酶至少通过维持细胞氧化还原稳态、调控细胞代谢和调节增殖相关信号通路活性等途径执行细胞增殖调控功能,具体依据见下文。

2.3 氧化型ATM激酶调控细胞增殖的机制

2.3.1 细胞氧化还原稳态维持功能

氧化型ATM蛋白激酶维持细胞氧化还原稳态以促进细胞增殖。ATM功能缺陷升高细胞内活性氧水平,降低细胞抗氧化能力,导致细胞氧化应激,激活相关信号通路从而抑制细胞增殖^[11]。抗氧化剂N-乙酰-L-半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine, NAC)能逆转ATM功能缺失所致乳腺癌CAF氧化应激和增殖缺陷^[9]。ATM激酶通过增强细胞抗氧化能力和降低细胞活性氧水平以维持细胞氧化还原稳态。ATM激酶主要通过激活P53和磷酸戊糖通路增强细胞抗氧化能力。在胰岛素刺激下,氧化型ATM激酶磷酸化P53第15位丝氨酸残基,被磷酸化的P53上调过氧化物还原酶等抗氧

化蛋白表达,增强细胞抗氧化能力,维持糖耐受和胰岛素敏感^[15-16]。在氧化应激条件下,氧化型 ATM 激酶通过增强磷酸戊糖通路关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性,促进 NADPH 抗氧化物产生、体内主要抗氧化物还原型谷胱甘肽再生和核酸合成^[17]。另一方面,氧化型 ATM 降低线粒体氧化磷酸化活性,减少活性氧簇产生。在营养过剩或生长因子刺激下,作为负反馈机制,被线粒体来源活性氧簇激活的 ATM 激酶通过 LKB1/AMPK/TSC2/mTORC1 信号轴抑制线粒体活性氧簇的产生^[18]。在低氧条件下,被线粒体来源的活性氧簇直接氧化激活的 ATM 激酶通过 HIF1/mTORC1 信号轴抑制线粒体活性,减少活性氧簇产生^[18]。在高水平氧化应激条件下,氧化型 ATM 磷酸化激活 P53,引起细胞凋亡。因此,在胰岛素刺激等各种生理条件下,氧化型 ATM 激酶精细化调节细胞氧化还原稳态的功能对细胞正常增殖有重要促进作用。

2.3.2 代谢调控功能

毛细血管扩张共济失调综合征(Ataxia-telangiectasia Syndrome, ATS)患者易罹患 2 型糖尿病和生长停滞,表现为胰岛素抵抗和高血糖^[6],这提示 ATM 功能缺失、糖代谢障碍和细胞增殖有密切关系。现有研究表明,氧化型 ATM 激酶在细胞代谢中有重要调节作用。在胰岛素作用下,被氧化活化的 ATM 激酶磷酸化 AKT 第 473 位丝氨酸残基,完全活化 PI3K/AKT 信号通路,促进葡萄糖转运子 4 膜转位,增加细胞葡萄糖摄取以利细胞增殖^[19-20]。另外,ATM 激酶能激活磷酸戊糖通路关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性,增加 NADPH 产生,有利于核酸合成和细胞增殖^[17]。ATM 激酶也与蛋白、脂代谢密切相关。在胰岛素刺激下,ATM 激酶活性增强,直接磷酸化 eIF-4E-binding protein 1(4E-BP1),启动蛋白合成^[21]。Klising-Sireul 等在 2006 年首次报道,在离子辐射下,ATM 激酶缺陷淋巴细胞的胆固醇代谢相关基因下调,导致细胞胆固醇含量下降,抑制细胞增殖^[22]。最近,氧化型 ATM 蛋白激酶在细胞能量代谢中的重要调控作用也不断被报道。氧化型 ATM 通过磷酸化葡萄糖转运子 1 第 490 位丝氨酸和增加丙酮酸激酶 M2 型表达水平促低氧癌相关成纤维细胞糖酵解能力^[23]。氧化型 ATM 蛋白激酶通过增强磷酸果糖激酶和柠檬酸合酶活性提高三阴性乳腺癌细胞内柠檬酸水平^[24]。以上研究表明,ATM 激酶的

细胞物质代谢调控功能在细胞增殖中有重要作用,其内在机制有待进一步阐明。

2.3.3 增殖信号通路活性调控功能

ATM 蛋白激酶精细调节正向和负向关键增殖信号通路控制细胞正常增殖。2001 年,Peretz 首先报道 ATM 激酶调控胰岛素样生长因子信号通路(insulin-like growth factor, GF)^[25]。在胰岛素刺激下,ATM 激酶磷酸化 AKT 第 473 位丝氨酸残基,以完全激活 PI3K/AKT 信号通路^[19-20]。最近研究发现,氧化型 ATM 激酶通过激活 PI3K-AKT、MEK-ERK 和 Wnt- β -catenin 等关键增殖信号通路活性在乳腺癌 CAFs 细胞增殖中起关键作用^[9]。以上研究表明 ATM 激酶调控正向关键增殖信号通路促进细胞增殖。另一方面,ATM 激酶调控负向关键增殖信号通路抑制细胞增殖,防止细胞过度增殖或适应不利增殖环境。现有研究表明,ATM 激酶主要通过抑制 mTOR 信号通路活性负向调控细胞增殖。在氧化应激条件下,ATM 激酶依赖的 LKB1 第 366 位苏氨酸残基磷酸化激活 AMPK (AMP-activated protein kinase)激酶,被激活的 AMPK 激酶磷酸化 TSC2 (tuberous sclerosis complex 2)抑制 mTORC1 信号通路^[26]。反过来,在胰岛素或生长因子刺激下,活化的 mTOR 通路上调线粒体活性,导致细胞氧化应激和 ATM 的氧化活化,以防止细胞过度增殖^[27]。在低氧条件下,氧化型 ATM 激酶磷酸化 HIF1(hypoxia-inducible factor 1) α 亚基第 696 位丝氨酸残基,以激活 HIF1/14-3-3/REDD1/TSC2 信号轴,下调 mTOR 信号通路活性,抑制细胞增殖,适应低氧环境^[28-29]。以上研究说明,ATM 激酶在细胞增殖调控信号通路网络中处于核心位置,在细胞增殖中发挥非常重要作用,其内在机制有待深入研究。

3 结束语

ATM 蛋白激酶的 DSB 修复功能难以解释 ATS 患者生长停滞等临床表现的困惑激发了学界探索其内在机制的强烈兴趣。越来越多研究证实,ATM 激酶在细胞增殖中起关键作用。现有研究表明,ATM 蛋白激酶磷酸化下游底物,调控相关信号通路,维持细胞氧化还原稳态、促进细胞代谢和协同调节增殖相关信号通路活性以精细调控细胞正常增殖。因为 ATM 激酶氧化激活的机制到 2010 年才被揭示和 ATM 两种激活机制很可能同时存在,今后 ATM 激酶相关研究要明确其激活机

制,以往 ATM 激酶相关研究要进一步厘清其功能归属,以利于 ATM 相关深入研究和临床应用。氧化活化的 ATM 蛋白激酶是细胞增殖调控网络中的关键节点,在各种增殖信号作用下,协调细胞各方面行为,精密调控细胞增殖,以适应增殖信号。作为蛋白激酶,氧化型 ATM 很有可能调控许多未知的底物和相关信号通路,以调控细胞增殖,但有待阐明。这不仅有利于揭示氧化型 ATM 激酶调控细胞增殖的内在机理,而且有助于寻找新的增殖性疾病如恶性肿瘤的干预策略和手段。

参考文献

- [1] Gatti RA, Berkel I, Boder E, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22 - 23. *Nature* [J]. 1988, 336(6199): 577-580.
- [2] 苏杭, 闫永彬, 马淑霞, 等. 基因检测诊断共济失调毛细血管扩张症 1 例[J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25(12): 1311-1312.
- [3] McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ, et al. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia [J]. *American journal of human genetics*, 1996, 59(2): 320-330.
- [4] Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 1995, 268(5218): 1749-1753.
- [5] Wang X, Chu H, Lv M, et al. Structure of the intact ATM/Tell kinase[J]. *Nature communications*, 2016, 7: 11655.
- [6] Ditch S and Paull TT. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response [J]. *Trends in biochemical sciences*, 2012, 37(1): 15-22.
- [7] Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints [J]. *Nature*, 2006, 444(7119): 633-637.
- [8] Boehrs JK, He J, Halaby MJ, et al. Constitutive expression and cytoplasmic compartmentalization of ATM protein in differentiated human neuron-like SH-SY5Y cells [J]. *Journal of neurochemistry*, 2007, 100(2): 337-345.
- [9] Tang S, Hou Y, Zhang H, et al. Oxidized ATM promotes abnormal proliferation of breast CAFs through maintaining intracellular redox homeostasis and activating the PI3K-AKT, MEK-ERK, and Wnt-beta-catenin signaling pathways [J]. *Cell cycle Georgetown, Tex*, 2015, 14(12): 1908-1924.
- [10] Wang Y, Yang J, and Yi J. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2012, 16(7): 649-657.
- [11] Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, et al. ATM activation by oxidative stress [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2010, 330(6003): 517-521.
- [12] Kim J and Wong PK. Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2009, 284(21): 14396-14404.
- [13] Kim J, Hwangbo J, and Wong PK. p38 MAPK-Mediated Bmi-1 down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation [J]. *PLoS one*, 2011, 6(1): e16615.
- [14] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 997-1002.
- [15] Armata HL, Golebiowski D, Jung DY, et al. Requirement of the ATM/p53 tumor suppressor pathway for glucose homeostasis [J]. *Molecular and cellular biology*, 2010, 30(24): 5787-5794.
- [16] Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor [J]. *Nature medicine*, 2005, 11(12): 1306-1313.
- [17] Cosentino C, Grieco D and Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair [J]. *The EMBO journal*, 2011, 30(3): 546-555.
- [18] Tang S, Yang L, Tang X, et al. The role of oxidized ATM in the regulation of oxidative stress-induced energy metabolism reprogramming of CAFs [J]. *Cancer letters*, 2014, 353(2): 133-144.
- [19] Viniestra JG, Martinez N, Modirassari P, et al. Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280(6): 4029-4036.
- [21] Halaby MJ, Hibma JC, He J, et al. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells [J]. *Cellular signaling*, 2008, 20(8): 1555-1563.
- [21] Yang DQ, and Kastan MB. Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1 [J]. *Nature cell biology*, 2000, 2(12): 893-898.
- [22] Klising-Sireul E, Rigaud O, Ory K, et al. Transcriptional response of wild-type and ataxia telangiectasia lymphoblasts following exposure to equitoxic doses of ionizing radiation [J]. *Journal of radiation research*, 2006, 47(3-4): 259-272.
- [23] Sun K, Tang S, Hou Y, et al. Oxidized ATM-mediated glycolysis enhancement in breast cancer-associated fibroblasts contributes to tumor invasion through lactate as metabolic coupling. *EbioMedicine*, 41(2019): 370-383.
- [24] Peng M, Yang D, Hou Y, et al. ATM activation (oxidized ATM) and suppression of oxidized ATM reduces intracellular citrate via decreasing the levels of phosphofructokinase (PFKP) and citrate synthase. *Cell death & disease*, 2019, 10(3): 228-243.
- [25] Peretz S, Jensen R, Baserga R, et al. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1676-1681.

(下转第 258 页)

基于 Cell-SELEX 的核酸适配体在肿瘤诊治中的应用

田彩平¹ 廖世奇¹ 孙敬阳³ 王维君⁴ 许金苓⁵ 杨碎胜^{2*}

[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

Application of Cell-SELEX-based Nucleic Acid Aptamers in Cancer Diagnosis and Treatment

TIAN Caiping¹, LIAO Shiqi¹, SUN Jingyang³, WANG Weijun⁴, XU Jinling⁵, YANG Suisheng^{2*}

(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. The types and expression levels of membrane proteins are closely related to the occurrence and development of malignant tumors. Cell-SELEX uses intact living cells as a screening target. Its biggest advantage is that it can simultaneously target a variety of membrane proteins with natural conformations as target molecules during the screening process. and It is not necessary to know the types of cell surface proteins and their expression levels in advance. Nucleic acid aptamer screening suitable for tumor cells has brought new ideas and methods for drug screening, clinical diagnosis, disease treatment and basic medical research, and has broad application prospects 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 study of Cell-SELEX, and to help the molecular diagnosis and individualized treatment of malignant tumors.

[KEY WORDS] Cell-SELEX; Nucleic acid aptamer; Cancer

基金项目:甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSKY-2019-35);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]。

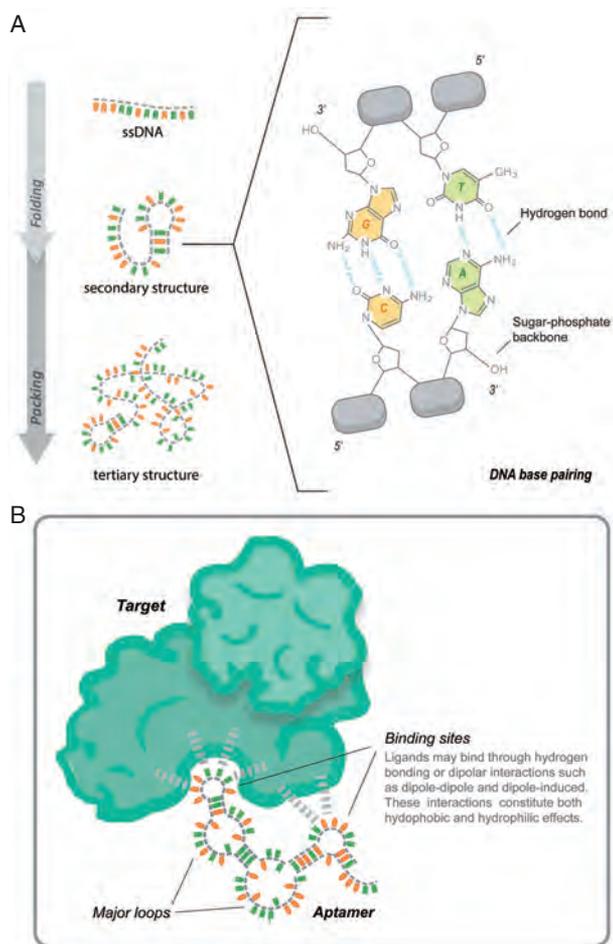
人工合成的单链随机寡核苷酸文库包括DNA文库、RNA文库、修饰化的RNA文库,该文库是两端约为20个碱基的固定序列(该区域带有限制性内

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 筛选的核酸适配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配体 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,由于核酸适配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 筛选出的核酸适配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配体,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 Eyetech 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, 还与靶标蛋白的离子强度、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-Selexaptamer 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-Selex 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-Selex [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-Selex[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34):55328-55342.
- [25] Shanguan 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-Selex 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] Shanguan 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]. 苏州大学硕士学位论文, 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 252 页)

- [26] Alexander A, Cai SL, Kim J, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(9):4153-4158.
- [27] Peterson K, Sabatini D and Sengupta S. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress [J]. *Molecular cell*, 2010, 40(2):310-322.
- [28] Cam H, Easton JB, High A, et al. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha [J]. *Molecular cell*, 2010, 40(4):509-520.
- [29] Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IM, et al. ATM activation and signaling under hypoxic conditions [J]. *Molecular and cellular biology*, 2009, 29(2):526-537.

实验室巡礼

暨南大学附属第一医院临床医学检验中心

暨南大学附属第一医院临床医学检验中心位于广东省广州市黄埔大道西613号,是集医、教、研为一体的综合性检验医学实验室,是首批国家卫计委检验医学科住院医师规范化培训基地,也是暨南大学第一临床医学院临床检验诊断学教研室,2007年成为临床检验诊断学硕士学位授予点,2010年成为博士学位授予点,2018年开始招收博士后。科室设有临床基因扩增检验实验室、临床微生物实验室、临床免疫学实验室、临床血液学实验室、临床生物化学实验室、临床检验实验室、门诊检验实验室和东圃院区检验室等8个实验室。科室拥有3000多万元的先进检测设备,尤其是贝克曼的全自动化生化免疫分析流水线、基因测序仪及微生物质谱仪,开展检测项目500多项,特别在临床分子诊断、微生物快速检测、细菌耐药药监测、骨髓形态学检查、司法物证鉴定等方面处于国内领先水平。

该中心有技术员47名,其中教授1名,主任技师2名,副主任技师6名;博士学位者5名;博士生导师1名,硕士生导师4名。科室建立了完善的质量管理体系,为患者提供准确、及时、规范的检测数据。科室不仅承担本科生的《实验诊断学》教学和检验医学科规培生的培养工作,而且负责三年制硕士和博士生的培养工作。

该中心形成了以青年博士和硕士为主的科研团队,研究方向是紧密围绕临床常见病原体的耐药机制、肿瘤和遗传性疾病的分子诊断新技术。2011年以来获得科研项目10项,总科研经费100多万元。其中承担国家自然科学基金项目1项、国家卫计委基金1项、广东省科技计划1项、广东省自然科学基金2项、广东省卫生厅青年基金3项和暨南大学创新基金2项。作为参与单位,申报的广州市病原微生物重点实验室和广东省病毒学重点实验室均获得市级、省级资助,同时获得广东省高水平大学基金资助。获得广东省科学技术三等奖2项和市级科技进步二等奖2项。发表科研论文100余篇,其中SCI收录文章20余篇。主编、副主编本科和研究生规划教材3部。共培养5名博士毕业生、20名硕士毕业生;在读全日制硕士研究生13名;招收博士研究生3名;博士后1名。

学科带头人温旺荣教授是该中心主任、暨南大学临床检验诊断学教研室主任兼暨南大学司法鉴定中心主任,并担任广东省医学教育协会检验医学专委会主委、粤港澳大湾区医学检验教育联盟主席、广东省医师协会检验医师分会副主委等学术职务,自1996年一直从事临床常见病原体的分子生物学研究,目前研究方向为宫颈癌的非编码RNA的分子诊断研究。



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。

