



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

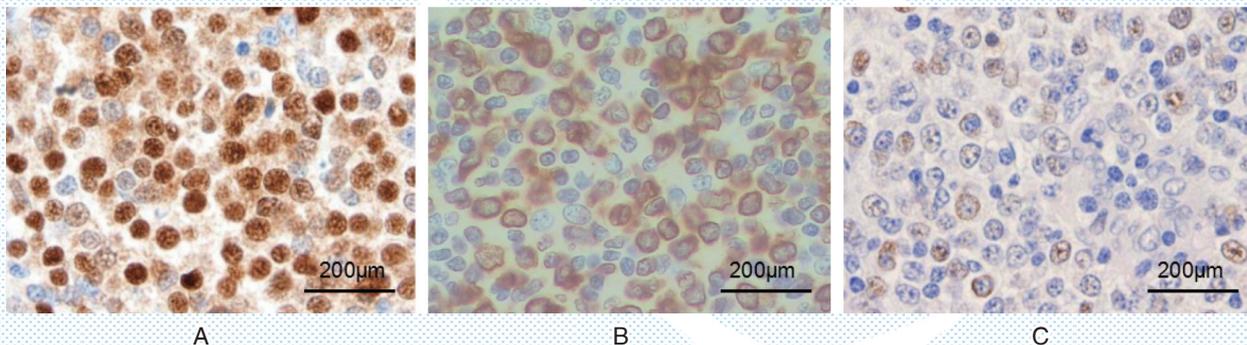
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2019年1月 第11卷 第1期 总第59期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 11 Number 1 January 2019



A: DLBCL 组织中 NF- κ B/p65 呈阳性表达; B: DLBCL 组织中 Bcl-2 呈阳性表达; C: DLBCL 组织中 Bax 呈阴性表达。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结 (streptavidin-biotinper-oxidsemethod, SP) 法染色, 放大倍数 200 倍。

图(P35) 各蛋白在 DLBCL 组织中表达情况

Figure(P35) Expression of each protein in DLBCL tissue

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 CMCJ 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 692198



王 青



1972年8月出生,1995年7月毕业于湖南医科大学90级临床医学系本科。2001年7月获全额奖学金赴新加坡国立大学医学院,取得医学博士学位。2005年10月至2006年10月于美国斯坦福大学医学院-神经研究所任博士后研究员,主要研究课题为Pyruvate对缺血性脑中风的影响及其免疫的

反应机制。2006年11月至2009年2月在澳洲卧龙岗大学医学院-神经生物研究中心,担任澳洲国家健康及医学科学研究院研究员工作。

主任医师,教授,研究员,博士生导师。现任南方医科大学珠江医院神经内科主任。为教育部与国家外国专家局“111”计划——中方合作者段燕文教授“中组部千人计划”获得者,2016年“广东特支百千万领军人才”,第7届新加坡科学年会“青年科学家奖”获得者。担任广东省老年保健协会神经调控专业委员会发起人、主任委员,美国神经科学会(Society for Neuroscience, SfN)委员,亚太神经化学学会(Asia Pacific Society for Neurochemistry, APSN)委员,中国老年保健医学研究会、老年认知心理疾病分会中青年委员会副主任委员,广东省神经药理学会常务委员,“PLoS One”杂志特邀审稿评委,“Frontiers in Bioscience”杂志特邀审稿评委,“Stroke”杂志特邀审稿评委,“Neuroscience”杂志特邀审稿评委,“Neurobiology of Disease”杂志特邀审稿评委,“Neuroscience Letters”杂志特邀审稿评委,“Neural Regeneration Research”杂志特邀审稿专家等学术职务。

王青教授长期从事帕金森病等神经退行性疾病及脑血管病等方面的研究,在帕金森病研究及治疗方面有一定特色及优势,承担及完成国家、省部级研究课题20余项,包括广东省自然科学基金重点项目、2016年广东省特支百千万领军人才、科技部973课题、教育部985基金、国家重大研发计划、广东省自然科学基金等。获得第8届亚太地区神经化学年会第三次特别会议旅行奖、第6届亚太地区神经化学年会旅行奖、2016年首届医师协会“十大中国杰出神经内科医师”(青年医师奖),论文“高糖对缺氧神经元的损害及西比灵的保护作用”获得全国神经科学会征文一等奖。2009年回国后共发表SCI论文33篇,其中纯临床相关文章共18篇(发表期刊包括“Molecular Neurobiology”“Scientific Reports”“Cell Death Dis”“Front Cell Neurosci”“CNS Neuroscience & Therapeutics”“Aging and Disease”和“Prog Neurobiol”等)。近年来参与3本英文书籍的章节编辑。

培养和招收博士后、博士及硕士研究生24名,其中1名博士获得2011年度中山大学优秀(博士)研究生奖学金;1名博士获得2012年度中山大学优秀(博士)研究生奖学金、2012年首届博士生国家奖学金、中山大学博士研究生创新人才;1名博士获得2015年博士生国家奖学金及2016年度博士生国家奖学金;1名博士获得2015年中山大学优秀(博士)研究生奖学金;3名硕士生分别获得2012年、2015年、2016年硕士生国家奖学金;1名博士获得2016年度中山大学优秀研究生奖学金及2016年度“卫生部国际交流与合作中心·日本第一三共医药学奖学金”。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019年1月 第11卷 第1期 总第59期 Bimonthly Volume 11 Number 1 January 2019

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	来茂德 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 叶萍萍 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10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
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
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2019年1月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>LAI Maode 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 YE Pingping LI Caizhen</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</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>2019.1.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

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。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年1月 第11卷 第1期

目次

述评

遗传代谢病诊疗新进展及面临的新挑战 郝虎 肖昕(1)

论著

广东佛山地区人群 *CYP2C19* 基因多态性及氯吡格雷药效反应的影响因素分析
..... 林静 杨洁飞 梁权辉 等(6)

乌鲁木齐地区维吾尔族 *ORMDL3* 基因单核苷酸多态位点与哮喘易感性的研究
..... 王玲 魏研荣 王丽霞 等(11)

miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究 田敬华 杨金玲 秦杰 等(17)

遗忘性轻度认知功能障碍与 *MTHFR* C677T 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平研究
..... 邢红宇 卢瑞丽 梁宁 等(22)

三亚市汉族和黎族女性 *MTHFR* 与 *MTRR* 基因多态性分布特征
..... 吴利 陈少金 李周扬 等(28)

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义
..... 王静 李馨筱 吴琳娜 等(33)

应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响
..... 王宝 孙媛 宋康 等(39)

血浆 NT-proBNP 水平对持续性房颤患者射频消融术后预后的预测价值
..... 孙小艳 徐立彦 李晨 等(44)

人免疫球蛋白对终末期肝病合并感染患者肝功能、免疫功能及凝血功能的干预作用
..... 段红光 周爱静 程崇勇 等(49)

厄贝沙坦与前列地尔联用治疗糖尿病肾病的可行性分析 张华贞 赵晓琴 吴琼皎(54)

血清癌胚抗原、甲状腺球蛋白及半乳凝集素-3 水平在甲状腺癌鉴别诊断中的价值
..... 温琥玲 谢建平 林师宇 等(58)

综述

miRNA 对自然杀伤细胞生长发育及功能的调控作用 黄秋萍 袁欢 王宜林 等(63)

α 地中海贫血筛查及诊断技术的进展 沈茹 陈云明 杨晓红 等(68)

专家风采

王青 (封二)

实验室巡礼

南方医科大学珠江医院神经内科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 1 January 2019

CONTENTS

COMMENTS

The recent advances and challenges in diagnosis and therapy of inherited metabolic disorders

HAO Hu, XIAO Xin (1)

ORIGINAL ARTICLES

Analysis of *CYP2C19* gene polymorphism and influence factors of clopidogrel effect in foshan population, Guangdong

LIN Jing, YANG Jiefei, LIANG Quanhui, LI Weixuan (6)

Study on single nucleotide polymorphism loci of *ORMDL3* gene and susceptibility to asthma in Urumqi Uygur Autonomous State

WANG Ling, WEI Yanrong, WANG Lixia, ZHANG Yanli, WANG Jing (11)

The role of miR-34 promoter methylation in the pathogenesis of gastric cancer

TIAN Jinghua, YANG Jinling, QIN Jie, ZHAO Linlin, LIU Min, HONG Yanying (17)

Relationship between amnesic mild cognitive impairment, *MTHFR* C677T gene polymorphism and plasma homocysteine level

XING Hongyu, LU Ruili, LIANG Ning, ZHOU Junxia (22)

Distribution characteristics of *MTHFR* and *MTRR* gene polymorphisms among Han and Li women in Sanya city

WU Li, CHEN Shaojin, LI Zhouyang, CHEN qian, LI Yuanli (28)

Expression and significance of nuclear factor κ B/p65, Bcl-2 and Bax in diffuse large B-cell lymphoma

WANG Jing, LI Xinxiao, WU Linna, LIU Fan (33)

Effects of stress hyperglycemia on inflammatory states, levels of peripheral blood lactate and MMP-9 and 28 d mortality rate in patients with craniocerebral injury

WANG Bao, SUN Yuan, SONG Kang, GU Changwei (39)

Predictive value of plasma NT-proBNP level in prognosis of patients with persistent atrial fibrillation after radiofrequency ablation

SUN Xiaoyan, XU Liyan, LI Cheng, WU Linna, WEI Lijuan (44)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 1 January 2019

CONTENTS

Intervention of human immunoglobulin on liver function, immune function and coagulation function in patients with end-stage liver disease complicated with infection

DUAN Hongguang, ZHOU Aijing, CHENG Chongyong, GAO Feng (49)

Feasibility analysis of irbesartan combined with alprostadil in the treatment of diabetic nephropathy

ZHANG Huazhen, ZHAO Xiaoqin, WU Qiongjiao (54)

The value of serum carcinoembryonic antigen, thyroglobulin and galectin-3 in differential diagnosis of thyroid cancer

WEN Huling, XIE Jianping, LIN Shiyu, WEN Dan (58)

REVIEWS

Regulation of miRNAs on the growth, development and function of natural killer cells

HUANG Qiuping, YUAN Huan, WANG Yilin, HUANG Qingsheng, LI Qi (63)

Progress in screening and diagnostic techniques for α -thalassemia

SHEN Ru, CHEN Yunming, YANG Xiaohong, WANG Xiaoyan (68)

遗传代谢病诊疗新进展及面临的新挑战

郝虎 肖昕*

[摘要] 遗传代谢病(inherited metabolic disorders, IMD)是一类由细胞核基因或线粒体 DNA 突变所引起的以细胞生化功能破坏为特征的先天性代谢紊乱。近年来,随着生化分析、酶学及基因技术的发展,使得更多的 IMD 明确病因,有助于开发新的药物及进行基因治疗,但与此同时也带来很多新的挑战。本文对目前 IMD 诊疗所面临的新进展及新挑战进行述评,以提高医务人员对遗传代谢病诊断、治疗和预防的认知。

[关键词] 遗传代谢病;串联质谱技术;气相色谱-质谱技术;基因治疗

The recent advances and challenges in diagnosis and therapy of inherited metabolic disorders

HAO Hu, XIAO Xin*

(Department of Pediatrics, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510000)

[ABSTRACT] Inherited metabolic disorder (IMD) is a class of genetic disorders characterized by disruption of cellular biochemical functions caused by mutation in genomic or mitochondrial DNA. Recently, the advances in technology of biochemistry and enzyme and gene have led to significant progress in detection and treatment such as new disorders and disease are described regularly and targeted drugs and gene therapy are explored. In this article, the recent advances and challenges about diagnosis and treatment to facilitate medical workers the better and more comprehensive understanding of IMD will be reviewed.

[KEY WORDS] Inherited metabolic disorders; Tandem mass spectrometry; Gas chromatography mass spectrometry; Gene therapy

遗传代谢病(inherited metabolic disorders, IMD)又称先天性代谢缺陷(inborn errors of metabolism, IEM),是因参与体内代谢的酶、运载蛋白、膜蛋白或受体等编码基因发生突变,使相关蛋白质结构或功能变化,导致机体生化代谢发生紊乱,造成生化反应的前体、中间、旁路代谢产物蓄积或终末代谢产物缺乏而引起一系列临床症状和体征的一类疾病^[1]。IMD 涉及体内广泛的代谢途径及各类生化代谢物异常,病因复杂且多数病种临床

症状缺乏特异性,常规实验室检查可为其诊断提供一些线索,但 IMD 的确诊不仅需要借助测定特异性靶标的生化检测技术或分子检测技术,如质谱技术、酶学及基因检测等,同时也依赖检验者和临床医师之间的有效沟通、包括各项技术的适用范围及方法的局限性、临床症状的准确描述等,以便合理的选择和应用。近年来随着生物化学和分子遗传学的不断发展和检测技术的不断完善、新生儿 IMD 筛查的推广以及临床医生对 IMD 认知

基金项目:天河区科技计划项目(201704KW004);中山大学高校基本科研项目(16ykjc24)

作者单位:中山大学附属第六医院儿科,广东,广州 510000

*通信作者:肖昕, E-mail: txiaoxin1049@163.com

的提高,使得越来越多的患儿得到早期诊断和及时治疗^[2-4],而遗传咨询和产前诊断在IMD中的广泛应用,也有效预防了IMD患儿的出生。总之,国内在IMD诊疗方面发展迅速,成绩瞩目,明显缩短了与发达国家的差距,但仍存在很多问题。本文将对国内遗传代谢病目前诊断和治疗所取得的新进展及面临的新挑战进行阐述,以提高医务人员对遗传代谢病诊断、治疗和预防的认知。

1 临床IMD病种扩展带来的认知挑战

遗传代谢病种类繁多,迄今已发现的病种已超过1 000种,全球常见的约有500~600种。对于IMD的单一病种来说,其发病率很低,约为万分之一至千万分之一,但这类疾病的总体发病率要比想象中高得多,群体患病率估计在1%甚至更高^[5-8]。目前国内常见的IMD病种为甲基丙二酸血症、戊二酸血症、3-甲基巴豆酰辅酶A羧化酶缺乏症、异戊酸血症、丙酸血症、高苯丙氨酸血症、酪氨酸血症、高甲硫氨酸血症、枫糖尿症、半乳糖血症、遗传性果糖不耐受、糖原贮积症、尿素循环障碍、Citrin缺陷症、肉碱缺乏症、多种羧化酶缺乏症、肉碱酰基肉碱移位酶缺乏症、多种酰基肉碱辅酶A脱氢酶缺乏症、肝豆状核变性、21-羟化酶缺乏症等^[9-11]。

随着临床医学的发展、IMD新生儿筛查的广泛开展以及检测技术的完善,新的IMD病种不断被发现,IMD疾病谱也逐渐扩大。如由于发现膜转运蛋白基因突变所致的脑肌酸缺乏症,扩大了物质转运障碍性疾病的范畴;先天性糖基化疾病的发现,使我们认识到一类全新的遗传性生物合成障碍性疾病。此外,对已认识的IMD及其变异型再认识也是一种新挑战,如以往认为 β -氨基己糖苷酶A缺陷所致的Tay-Sachs病主要在婴幼儿时期发病(早发型或经典型),表现为严重精神运动发育迟缓、难治性惊厥发作、视网膜病变,死亡率高;后来发现儿童、成年人中也存在Tay-Sachs病变,且临床表现明显有异于婴幼儿,即以脊髓小脑综合征样症状(共济失调)为主要临床表现而无智力障碍、惊厥发作和视力受损等,因而称之为晚发型或变异型^[12-13]。相似的例子还有甲基丙二酰辅酶A变位酶及其辅酶缺陷所致的甲基丙二酸血症,新生儿时期发病的甲基丙二酸血症病情危重,

死亡率极高,而儿童、成年时期起病的甲基丙二酸血症病情较轻,多在感染、发热或外科手术等应激状态下诱发^[14-15]。起初,人们无法解释相同疾病在发病年龄以及临床表现上的差异性,随着分子遗传学的发展和检测技术的提高,已确认基因突变导致相关酶活性不同改变是其根本原因。此外,一些原来认为不属于IMD的疾病,由于发现其发病与某些特异性酶、受体或转运蛋白密切相关而重新归类,例如由于发现Smith-Lemli-Opitz综合征患者的智力低下、器官受累等病变是因7-脱氢胆固醇还原酶缺陷导致胆固醇缺乏的结果,而将其归入IMD范畴。总之,IMD谱的不断扩大,临床表现的多样性和发病年龄的广泛性,对临床和检测医生提出了极大挑战,如何在错综复杂的条件下早期发现和诊断IMD,需要的不仅是准确无误的检测技术,更需要医务人员对IMD的全面认识。

2 临床IMD诊断的新进展及挑战

IMD的发病年龄可在新生儿期、婴幼儿期、儿童期甚至青少年期和成年期,其中近25%的IMD在新生儿期发病^[16]。多数IMD临床表现缺乏特异性,可累及全身各个器官尤其是神经系统及消化系统,常表现为抽搐、昏迷、呕吐、黄疸、肝脾肿大、心肌病、肌张力低下、白内障、皮疹、低血糖、酸中毒、电解质紊乱、高乳酸及高血氨等。此外,不同病种可表现出相似的临床症状,而同一病种有可能因不同个体而表现出差异较大的表型。因此,常规的实验室检查只能为IMD的诊断提供线索,而临床确诊常常需要借助测定特异性靶标的生化检测技术或分子检测技术如串联质谱检测技术(tandem mass spectrometry, MS-MS)、气相色谱质谱检测技术(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)、酶学测定及基因检测等。代谢病临床表现多种多样,且不同的技术在IMD诊断中有各自的优势和局限性,因此,检验者与临床医生之间及时有效的信息沟通也是IMD确诊的关键。

近年来,串联质谱技术(tandem mass spectrometry, MS-MS)及气相色谱-质谱技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)在临床中被广泛应用,这为IMD的筛查和诊断带来了革命性进展^[4,9,17-19];MS-MS和GC-MS技术通过微量的血

液和尿液可以进行上百种代谢产物的检测,实现了从“一次检测一种疾病”到“一次检测多种疾病”的转变,在IMD诊断中发挥着重要作用。然而,MS-MS和GC-MS技术在临床中的应用也面临着各种挑战。质谱技术对疾病的诊断依赖于检测时所采集的血液或尿液中特异性代谢产物的浓度,然而,很多遗传代谢病在发病期和缓解期,其特异性代谢产物的浓度变化差异显著,所以发病期采集血液或尿液进行检测的诊断价值更高。此外,因脏器如肝肾功能异常、药物治疗及其他非代谢性疾病的影响也会引起继发性或一过性的代谢紊乱,检测可能会出现假阳性或假阴性的结果,所以在进行代谢产物分析时需要结合患者的临床表现及其他生化检查综合判断,必要时需检测多次进行验证。目前,质谱技术可以诊断的遗传代谢病病种有限,MS-MS技术可以通过检测血液中50余种氨基酸和酰基肉碱进而诊断30多种遗传代谢病,GC-MS技术可以通过检测尿液中250余种代谢产物进而诊断100多种遗传代谢病,但这相对于现已知的遗传代谢病病种来说只是冰山一角,更多的病种需要在代谢产物中发现其特异性的物质,以待通过质谱技术快速得到诊断。

IMD多属于单基因遗传病,绝大多数为常染色体隐性遗传,少数为常染色体显性遗传、X连锁伴性遗传或线粒体遗传^[20-21]。遗传物质发生改变是遗传代谢病发生的分子机制,所以基因检测在临床遗传代谢病诊断中占有重要的地位,并且具有传统生化检测无法比拟的优势。近年来,随着快速而相对价廉的基因检测技术的成熟,以及更多的单基因病被发现,使得IMD的分子诊断成为可能^[22]。然而,必须认识到基因检测结果的复杂性,不是所有的基因序列突变都会导致疾病,而且基因存在多态性。对于诊断实验室和临床医生而言,特异性诊断线粒体电子传递障碍性疾病(如Leigh病)仍存在较大难度,因为线粒体病的临床表现、生化检测(体液中乳酸水平、神经影像学变化等)虽可强烈提示线粒体的可能,但不能确诊;留取患儿组织标本进行皮肤成纤维细胞培养和电镜观察比较麻烦,并且常常得不到明确结论;如果对已知线粒体突变基因分析无肯定结果,就只能进行推论性诊断。进行IMD产前诊断时,应该明确先证者基因突变类型和位点;产前诊断只能对

一些致病性明确的基因变异进行检测,在一些新变异或致病性不明确的变异面前则无能为力。随着高通量测序技术(next generation sequencing, NGS)的发展,测序与分析的价格越来越低,可以在出生时通过高通量测序和分析技术了解自身遗传缺陷,逐步替代候选基因的直接测序,并广泛应用于单基因疾病的分子基础研究。根据不同的情况,可采用基于高通量测序技术分析仅应用于特定选择的区域,如编码序列、全外显子测序(whole exon sequencing, WES)或全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)。WES能够在单次反应中检测约20 000个基因,诊断率达到22%~41%,但在技术层面也有些限制性,主要包括一些外显子的不完整测序覆盖率,即具有高百分比的胞嘧啶和鸟嘌呤的外显子可能难以测序,难以解释临床意义不明确的序列变异,以及不能检测DNA拷贝数变化。WGS能够覆盖WES所不能检测的基因组非编码区域(不是密码区域)变异,包括内含子,这极大地拓宽了寻找致病基因的范围。但值得一提的是,高通量测序会产生大量数据,如何解读测序结果是一个巨大的挑战,即使只分析外显子组,仍会产生大量数据。对于个别患者,约产生450 000个变异,其中大约几百个不是多态性的,对数据的正确解释需要分子生物学家、生物信息学专家和临床医生之间的紧密合作。此外,鉴定新基因变异也并不意味着明确致病位点,尤其是只在单个患者中存在此变异,不仅需要通过细胞培养或动物模型来进行功能验证,条件允许的话,还应该在具有特定临床表型的批量患者中继续分析及验证该基因。因此,对分子遗传学检测结果解释要慎之又慎,要从临床、生化检测、基因结果等多个方面进行综合评估。

新生儿遗传代谢病筛查是重要的出生缺陷预防手段,在IMD的早期诊疗方面发挥了巨大的作用。多数IMD患儿在孕期及出生时往往是正常的,一旦发病可能会出现一些非特异性的体征如喂养困难、昏迷、呕吐、酸中毒、电解质紊乱及低血糖等,这些体征在其他新生儿疾病中都很常见而不易被诊断,并且病情发展迅速,预后差。然而,新生儿筛查可在患儿发病前通过异常的生化指标提示疾病,让患儿在机体没有明显受损前进行及时的诊断和治疗,从而有效避免或减少严重并发症及神经系统损伤,甚至是挽救生命。近年来国

内越来越多的地区如上海、广州、浙江、广西等地区逐渐开展新生儿的遗传代谢病筛查,通过MS-MS技术可以筛查出约30多种遗传代谢病。研究表明,我国自开展新生儿遗传代谢病筛查以来,在预防疾病、挽救生命、改善预后等方面取得了显著的成绩^[9,11,17-19]。随着遗传代谢病诊断及治疗的不断发展、社会经济水平的提高,越来越多的遗传代谢性疾病被加入新生儿疾病筛查病谱。此外,值得一提的是,随着DNA测序技术的发展,对所有新生儿进行目标基因组DNA测序筛查已成为可能,这将是IMD筛查的重要发展方向和领域。通过基因筛查的结果预测疾病的发生及发病的严重程度,这会使更多的患者受益,但与此同时也是极大的挑战,因为每个人将携带近百甚至更多的致病变异,如何明确这些变异是否致病,如何判断疾病的发生,如何干预和治疗,如何进行遗传咨询和产前诊断等等,这些都是随之要解决的问题,这也将是一个长期积累和研究的过程。

3 临床IMD治疗的新进展及挑战

随着遗传代谢诊断技术的发展,治疗手段也在不断地提高。目前,虽然可治性的IMD仅有一小部分,多数疾病尚无有效的治疗方法,但通过相应的支持或对症治疗,许多IMD的病情可以得到有效控制^[23-25]。对于发病机理明确的IMD可采取饮食及药物治疗,如大多数小分子IMD(氨基酸、有机酸、脂肪酸、糖代谢异常)以饮食治疗为主,部分疾病可通过维生素、左卡尼汀和辅酶等进行治疗,临床效果显著^[26-27]。另外,一些新型治疗IMD的方法(如器官移植、酶替代治疗、干细胞治疗和基因治疗等)已有长足的进步并应用于临床,对IMD治疗和预后产生了根本性变化,颠覆了“IMD不可治愈”的传统观念,使之成为“可治之症”。

然而,在IMD实际临床治疗中仍有很多问题存在,一些疾病如苯丙酮尿症、酪氨酸血症等,需要通过饮食调控,即低苯丙氨酸和低酪氨酸饮食减少毒性代谢物的积累,该方法已常规应用于患者的治疗中,但特异性的治疗食品及药品尚未实现国产化,存在购买困难、价格昂贵的情况,给患者治疗带来很大不便。部分患者病情严重,需要进行肝肾移植或干细胞治疗,但是我国器官移植

和干细胞治疗的规模有限,且存在供体难寻、捐赠人数少和费用昂贵等,这也使得临床治疗明显受限。许多研究者和临床医生对酶替代疗法和基因治疗寄予厚望,但目前进展缓慢。以Gaucher病为例,酶替代疗法对其非神经性病变安全有效,但由于酶是大分子蛋白质,不能有效通过血脑屏障,对中枢神经系统退行性病变疗效不佳。因此,如何使这些大分子酶类通过血脑屏障或者研制能够通过血脑屏障的新的酶分子替代物,已成为需要解决的关键和紧迫问题。目前已有研究开展对酶分子肽段进行特异性修饰使其达到靶向治疗效果,在溶酶体疾病的情况下,特定的酶可以用载脂蛋白LDLR结合域修饰靶向中枢神经系统^[28]。

迄今为止,在基因治疗应用基础研究方面已投入了巨大的人力、物力和财力,携带治疗基因到体内的病毒载体,从腺病毒发展到慢病毒以及腺病毒相关病毒均有大量的研究基础,值得我们期待对IMD的彻底根治^[29-32]。但鸟氨酸甲酰转移酶缺陷症(ornithine transcarbamylase deficiency, OTCD)患儿在接受腺病毒为载体的基因治疗后,最终死于腺病毒引起的免疫反应,导致多器官衰竭^[33],由此引发的基因治疗担忧仍然是不容忽视的问题之一。2012年欧洲批准了首个基因治疗产品用于治疗脂蛋白脂酶缺乏症,为基因治疗带来了新的希望^[34]。当然,新的挑战也不断出现,治疗基因导入后的插入突变、受体免疫反应、精确的基因靶向以及治疗基因的生殖传递等均是基础和临床科学家所需要共同面对的最具挑战性的问题。

4 小结与展望

遗传代谢病属于罕见病,但其影响了全球范围的患者及家庭,带来了沉重的经济及精神负担。分子生物学技术的进步使得我们能够发现新的致病基因,确诊更多的遗传代谢病,也同时有助于开发新的靶向特定缺陷基因、功能蛋白及代谢通路的药物、实施细胞水平的基因治疗。精确的早期诊断能够帮助临床给予及时的对症治疗,有效防止副作用及降低死亡率。在未来几年随着分子技术进步,以及罕见疾病的分子病理学知识的增长,将会给遗传代谢病带来革新的发展。同时,新生儿筛查更大范围的普及也能够在全民范围内

快速筛查和诊断遗传代谢病, 以便立即采取适当的治疗。总之, 挑战与机遇是并存的, 我们相信随着技术进步、新生儿筛查的广泛普及, 能够为遗传代谢病患者提供明确诊断及治疗, 这不仅能提高患者及家庭生活质量, 同时也具有巨大的社会价值。

参考文献

- [1] El-Hattab AW. Inborn errors of metabolism [J]. Clin Perinatol, 2015, 42(2):413-439.
- [2] 林书祥, 舒剑波, 王朝, 等. 15851例遗传代谢病高危患儿的临床分析中国当代儿科杂志[J]. 2017, 19(12):1243-1247.
- [3] 郝虎, 李思涛, 欧阳学军, 等. 遗传性代谢病高危婴幼儿4710例尿素酶预处理-气相色谱-质谱技术筛查分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(21):1660-1662.
- [4] 吴宝铮, 薛鹏强. 新生儿遗传代谢病4785例筛查结果分析报告[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(11):1336-1337.
- [5] Lund AM, Christensen E, Skovby F. Diagnosis and acute treatment of inborn metabolic diseases in infants [J]. Ugeskr Laeger, 2002, 164(48):5613-5619.
- [6] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. Plos Med, 2006, 3(11):E442.
- [7] Moammar H, Cheriyan G, Mathew R, et al. Incidence and patterns of inborn errors of metabolism in the Eastern Province of Saudi Arabia, 1983-2008 [J]. Ann Saudi Med, 2010, 30(4):271-277.
- [8] Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction [J]. J Inherit Metab Dis, 2006, 29(2-3):261-274.
- [9] 刘明芳. 184063例应用串联质谱技术筛查遗传代谢病分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(1):8-12.
- [10] 杨楠, 韩连书, 叶军, 等. 新生儿期氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢病疾病谱分析[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(9):805-808.
- [11] 肖昕, 郝虎. 质谱技术在小儿遗传性代谢病筛查中的应用[J]. 中国新生儿科杂志, 2013, 28(1):4-7.
- [12] Lew RM, Burnett L, Proos AL, et al. Tay-Sachs disease: current perspectives from Australia [J]. Appl Clin Genet, 2015, 21(8):19-25.
- [13] Deik A, Saunders-Pullman R. Atypical presentation of late-onset Tay-Sachs disease [J]. Muscle Nerve, 2014, 49(5):768-771.
- [14] 黄倬, 韩连书, 叶军, 等. 甲基丙二酸血症患者143例资料分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(6):490-494.
- [15] 吴海兰, 董世霄, 刘红, 等. 新生儿甲基丙二酸血症的临床特点分析[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(1):48-52.
- [16] Leonard JV, Morris AA. Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth [J]. Acta Paediatr, 2006, 95(1):6-14.
- [17] 韩炳娟, 韩炳超, 邹卉. 串联质谱技术在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(29):4907-4909.
- [18] 张娟玲, 武雅俐, 刘郁明, 等. 串联质谱在遗传代谢性疾病筛查中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(4):12-14.
- [19] 曾伟宏, 欧阳海梅, 梁嘉颖, 等. 气相色谱-质谱联用技术在遗传代谢病诊断和治疗监测中的应用[J]. 广东医学, 2017, 38(19):2997-3000.
- [20] Hui J, Tang NL, Li CK, et al. Inherited metabolic diseases in the Southern Chinese population: spectrum of diseases and estimated incidence from recurrent mutations [J]. Pathology, 2014, 46(5):375-382.
- [21] Tebani A, Abily-Donval L, Afonso C, et al. Clinical metabolomics: the new metabolic window for inborn errors of metabolism investigations in the post-genomic era [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7):E1167.
- [22] Stranneheim H, Engvall M, Naess K, et al. Rapid pulsed whole genome sequencing for comprehensive acute diagnostics of inborn errors of metabolism [J]. BMC Genomics, 2014, 15:1090.
- [23] El-Hattab AW, Sutton VR. Approach to inborn errors of metabolism in pediatrics [J]. Pediatr Clin North Am, 2018, 65(2):19-20.
- [24] El-Hattab AW. Inborn errors of metabolism [J]. Clin Perinatol, 2015, 42(2):413-439.
- [25] Wertheim-Tysarowska K, Gos M, Sykut-Cegielska J, et al. Genetic analysis in inherited metabolic disorders--from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives [J]. Dev Period Med, 2015, 19(4):413-431.
- [26] Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction [J]. J Inherit Metab Dis, 2006, 29(2-3):261-274.

(下转第38页)

广东佛山地区人群 *CYP2C19* 基因多态性及氯吡格雷药效反应的影响因素分析

林静* 杨洁飞 梁权辉 李炜焯

[摘要] 目的 探讨佛山地区人群依赖细胞色素 P450 的加单氧酶系(*CYP2C19*)基因多态性及对该地区冠心病患者氯吡格雷药效反应的影响因素分析。方法 选取2016年8月至2018年2月在我院住院的冠心病患者375例,均连续服用氯吡格雷75 mg/d 5天以上者,进行*CYP2C19*基因型及血小板聚集功能检测,根据血小板聚集功能检测来判断氯吡格雷药效反应性,>50%为氯吡格雷抵抗。统计*CYP2C19*基因型及等位基因的分布规律,比较氯吡格雷抵抗及氯吡格雷反应组的基因分布和基本资料,并行Logistic多因素分析。结果 375名冠心病患者中突变纯合型占12.27%,突变杂合型占45.60%,野生型占42.13%;氯吡格雷抵抗组和氯吡格雷反应组在基因表型和等位基因频率分布上有明显差异($P < 0.05$),突变纯合型在氯吡格雷抵抗组显著高于氯吡格雷反应组;氯吡格雷抵抗组与氯吡格雷反应组的年龄、性别、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、血小板计数、纤维蛋白原水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),氯吡格雷抵抗组*CYP2C19*突变纯合和突变杂合型所占比例高于氯吡格雷反应组,差异有统计学意义($P < 0.05$);经Logistic分析,*CYP2C19*突变纯合型($OR=2.557$)和突变杂合型($OR=2.027$)为氯吡格雷抵抗的危险因素。结论 佛山地区人群*CYP2C19*基因型与广东其它地区人群分布相似,突变纯合型和突变杂合型为佛山地区人群发生氯吡格雷抵抗的危险因素,应采取有效措施进行干预。

[关键词] *CYP2C19* 基因多态性;影响因素;氯吡格雷药效反应

Analysis of *CYP2C19* gene polymorphism and influence factors of clopidogrel effect in Foshan population, Guangdong

LIN Jing*, YANG Jiefei, LIANG Quanhui, LI Weixuan

(Department of Clinical Laboratory, Foshan First People's Hospital, Foshan, Guangdong, China, 528000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the genetic polymorphisms of *CYP2C19* gene and its effect on the response to clopidogrel in patients with coronary heart disease in Foshan area. Methods A total of 375 patients with coronary heart disease who were admitted to the Foshan First People's Hospital from August 2016 to February 2018 were enrolled. All patients who received clopidogrel 75 mg/d for more than 5 days were tested for *CYP2C19* genotype and platelet aggregation test. The pharmacodynamic reactivity of clopidogrel was judged based on the results of platelet aggregation function test. If it is more than 50% determined as a clopidogrel resistance. The distribution patterns of *CYP2C19* genotypes and alleles were statistically analyzed. The gene distribution and basic data of clopidogrel resistance and clopidogrel responders were compared, and logistic multivariate analysis was performed. Results Among 375 patients with coronary heart disease, the slow metabolic genotype accounted for 12.27%, the intermediate metabolic genotype for 45.60%, and the fast metabolizing genotype for 42.13%. There was a significant difference in gene phenotype and allele frequency distribution between clopidogrel resistance group and clopidogrel reaction group ($P < 0.05$). Mutation

基金项目:佛山市卫生和计划生育委员会医学科研课题项目(20170043)

作者单位:佛山市第一人民医院检验科,广东,佛山 528000

*通信作者:林静, E-mail: 12linjing@163.com

homozygous type was significantly higher in clopidogrel resistance group than in reaction group. The levels of diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, PLT and fibrinogen levels were no significant difference between the 2 groups ($P>0.05$). The proportion of slow metabolism and intermediate metabolic genotypes of *CYP2C19* in clopidogrel resistant patients was higher than that in clopidogrel reaction patients, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Logistic analysis showed that *CYP2C19* slow metabolism ($OR=2.557$) and intermediate metabolism ($OR=2.027$) genotype were risk factors for clopidogrel resistance. Conclusion The *CYP2C19* genotype in Foshan population is similar to that in other parts of Guangdong. The slow metabolism and intermediate metabolic genotypes are risk factors for clopidogrel resistance in Foshan population. Effective measures should be taken to intervene.

[KEY WORDS] *CYP2C19* gene polymorphism; Influencing factors; Clopidogrel pharmacodynamic response

氯吡格雷是最常用的噻吩吡啶类抗血小板药物,但由于部分患者对抗血小板药物的反应存在差异性,经氯吡格雷抗血小板治疗后仍未能有效抑制血小板功能,造成血栓事件反复发生^[1]。目前尚未明确氯吡格雷抵抗的机制,但多认为基因多态性为其发生主要原因。*CYP2C19*是肝脏生物转化第一相反应最重要的酶,*CYP2C19*基因多态性将影响药物代谢,亦是药物遗传学研究的最早对象,在药物代谢过程中有着较为重要的作用^[2]。佛山地区处于亚热带沿海地区,本地人口组成相对单一,但由于近年来工业化进程加快,外来人口剧增,导致遗传群体遗传结构发生变化。基因多态性的情况在不同地区的表现并非一致,基因型频率的出现频率也不完全相同,因此,针对本地区人群*CYP2C19*基因多态性的调查显得尤为重要。基于此,本研究对佛山市第一人民医院375例冠心病患者展开研究,旨在探讨佛山地区人群*CYP2C19*基因多态性以及氯吡格雷药效反应的影响因素分析,具体信息如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

将2016年8月至2018年2月在佛山市第一人民医院治疗的冠心病患者375例纳入研究,均自愿参与本研究并签署知情同意书。375名患者中男255例,女120例;年龄31~83岁,平均年龄(65.89±6.73)岁。纳入标准:①经冠脉造影证实为冠心病患者;②无血缘关系的佛山常住人口;③连续服用氯吡格雷75 mg/d 5天以上者。排除标准:①患有肺源性心脏病、继发性心肌梗死等其他心脏器质性病变患者;②肝肾脾和造血功能异常者。③血

小板计数 $<125\times 10^9$ g/L或 $>350\times 10^9$ g/L者^[3]。

1.2 设备和仪器

ABI 9700 PCR扩增仪购自美国 Applied Biosystems公司; Baio e-Hyb全自动杂交仪购自上海百傲科技有限公司; FACSCalibur流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson公司。

1.3 方法

1.3.1 *CYP2C19* 基因检测

EDTA抗凝管采集受试者外周静脉血2 mL,操作流程:①提取外周血细胞基因组DNA。②*CYP2C19*基因特异引物对1和引物对2进行PCR扩增。③将带生物素标记的扩增产物与固定在醛基基片上的*CYP2C19*基因型检测探针进行特异性杂交,并通过酶促显色反应,使特异性杂交信号显现出颜色。④通过软件分析生物芯片识读仪读出的图像,判断待测样本基因型。*CYP2C19*基因检测芯片试剂盒由上海百傲科技有限公司提供,采用的方法是DNA微阵列芯片法。*2 G681A和*3 G636A为人基因组*CYP2C19*主要基因检测位点,等位基因主要是*1,*2,*3型。其中*1型无碱基突变,酶活性正常,*2,*3型发生碱基突变(681G>A,636G>A),无酶活性。3种等位基因形成6种基因型,分为突变纯合型(*2/*2,*2/*3,*3/*3)、突变杂合型(*1/*2,*1/*3)和野生型(*1/*1)。不同基因型人群间具有不同的氯吡格雷药物代谢动力学特征,其中突变纯合型为慢代谢型、突变杂合型为中间代谢型、野生型基因为快代谢型^[4]。

1.3.2 血小板聚集功能检测

采集连续服药7天以上者静脉血2 mL(枸橼酸钠抗凝管),操作流程:①取全血45 μ L与ADP 5 μ L混匀活化5 min。②标记IgG管和PAg管,分

别加入 6 μL CD42b 抗体。③待全血活化后,取全血 5 μL 到 IgG 管和 PAg 管中,混匀,室温避光静置 15~20 min;④分别加入 450 μL 含 1%多聚甲醛的 PBS,混匀,闭盖置于 4℃冰箱 10 min 后上机检测。使用抗体为美国 BD-Pharmingen 公司生产的单抗。血小板聚集 >50% 判断为氯吡格雷抵抗^[5]。

1.4 评价指标

①CYP2C19 基因多态性:统计冠心病患者中的 CYP2C19 基因型及基因表型的分布情况;②氯吡格雷反应组和氯吡格雷抵抗组基因分布差异。③基本资料:探讨氯吡格雷抵抗的危险因素,分析年龄、性别、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、纤维蛋白原、血小板计数, CYP2C19 基因表型等情况,并行 Logistic 多因素分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS21.0 统计学软件,计数资料以百分数和例数表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用 *t* 检验;采用 Logistic 行多因素分析;应用 Hardy-weinberg 遗传平衡定律检验研究对象是否具有群体代表性,均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP2C19 基因多态性

2.1.1 CYP2C19 基因型及基因表型分布情况

氯吡格雷抵抗组及氯吡格雷反应组分别进行

Hardy-weinberg 平衡检验, CYP2C19 等位基因分布符合遗传平衡法则,说明样本具有代表性 ($P > 0.05$)。375 名冠心病患者中基因型分布情况:野生型 CYP2C19*1/*1 所占比例(42.13%);突变杂合型占 45.60%,其中 CYP2C19*1/*2、CYP2C19*1/*3 分别占 40.27% 和 5.33%;突变纯合型占 12.79%,其中 CYP2C19*2/*2、CYP2C19*2/*3、CYP2C19*3/*3 分别为 7.47%、4.53% 和 0.27%,见表 1。

表 1 佛山地区人群 CYP2C19 基因型及基因表型分布
Table 1 Distribution of CYP2C19 genotype and gene phenotype in population of Foshan

基因型	人数	频率 (%)	基因表型	人数	频率 (%)
CYP2C19*1/*1	158	42.13	野生型	158	42.13
CYP2C19*1/*2	151	40.27	突变杂合型	171	45.60
CYP2C19*1/*3	20	5.33			
CYP2C19*2/*2	28	7.47	突变纯合型	46	12.27
CYP2C19*2/*3	17	4.53			
CYP2C19*3/*3	1	0.27			

2.1.2 广东珠三角地区人群 CYP2C19 基因分布频率的比较

在等位基因方面,佛山与广东其他地区 CYP2C19 等位基因分布统计学上无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 2。

表 2 佛山地区人群 CYP2C19 基因与广东其他地区人群的比较 (%)

Table 2 Comparison of CYP2C19 gene in Foshan population with other populations in Guangdong (%)

地区	等位基因频率 (%)			基因型频率 (%)					
	*1	*2	*3	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
佛山	64.93	29.87	5.20	42.13	40.27	5.33	7.47	4.53	0.27
广州 ^[6]	63.5	31.6	4.9	39.8	41.1	6.3	9.5	3.1	0.2
深圳 ^[7]	62.83	30.33	6.83	40.33	38.00	7.00	9.67	3.33	1.67
东莞 ^[8]	65.16	30.08	4.75	42.90	38.09	6.44	9.63	2.83	0.12

2.2 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷的抗血小板反应

2.2.1 氯吡格雷反应组与氯吡格雷抵抗组基因表型和等位基因差异

46 例突变纯合型中氯吡格雷抵抗 19 例,氯吡

格雷反应 27 例;171 例突变杂合型中氯吡格雷抵抗 53 例,氯吡格雷反应 118 例;158 例野生型中氯吡格雷抵抗 18 例,氯吡格雷反应 140 例。氯吡格雷抵抗组和氯吡格雷反应组在基因表型和等位基因频率分布上有明显差异 ($P < 0.05$),突变纯合型

在氯吡格雷抵抗组显著高于氯吡格雷抵反应组 (21.11%, 9.47%), 等位基因(*2, *3)的基因频率在 (50.56%, 30.18%)。见表3。

表3 氯吡格雷反应组与氯吡格雷抵抗组基因表型和等位基因差异

Table 3 Gene phenotype and allelic difference between clopidogrel reaction group and clopidogrel resistance group

分组	基因表型 例(%)			等位基因 例(%)	
	野生型	突变杂合型	突变纯合型	野生型(*1)	突变型(*2, *3)
氯吡格雷反应组	140(49.12%)	118(41.40%)	27(9.47%)	398(69.82%)	172(30.18%)
氯吡格雷抵抗组	18(20.00%)	53(58.89%)	19(21.11%)	89(49.44%)	91(50.56%)
χ^2 值		25.907		24.954	
P值		<0.001		<0.001	

2.2.2 基本资料及 Logistic 回归分析

氯吡格雷抵抗组年龄、性别、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、纤维蛋白原, 血小板计数水平比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$); 氯吡格雷抵抗组 *CYP2C19* 突变纯合型和突变杂合型所占比例高于

氯吡格雷反应组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表4。采用 Logistic 回归分析, 显示突变纯合型 ($OR=2.557, 95\% CI: 1.344\sim 4.864$) 和突变杂合型 ($OR=2.027, 95\% CI: 1.253\sim 3.281$) 与氯吡格雷抵抗发生显著相关, 是氯吡格雷抵抗发生的独立危险因素。

表4 氯吡格雷反应组与氯吡格雷抵抗组基本资料对比

Table 4 Comparison of basic data between the clopidogrel reaction group and clopidogrel resistance group

因素	氯吡格雷抵抗组(n=90)	氯吡格雷反应组(n=285)	χ^2/t	P
年龄	67.21±7.43	65.47±6.51	$\chi^2=0.178$	0.673
男(n)	61	194	$\chi^2=0.003$	0.959
女(n)	29	91		
糖尿病[n(%)]	19(21.11%)	56(19.72%)	$\chi^2=0.083$	0.774
高血压[n(%)]	72(80.00%)	234(82.39%)	$\chi^2=0.263$	0.608
高胆固醇血症[n(%)]	42(46.67%)	125(44.01%)	$\chi^2=0.195$	0.659
纤维蛋白原(g/L, $\bar{x}\pm s$)	3.19±0.98	3.02±0.75	$t=1.733$	0.084
血小板计数($\times 10^9, \bar{x}\pm s$)	189±25	195±31	$t=1.672$	0.095
突变纯合型[n(%)]	19(21.11%)	27(9.47%)	$\chi^2=8.531$	0.003
突变杂合型[n(%)]	53(58.89%)	118(41.40%)	$\chi^2=8.280$	0.004

3 讨论

细胞色素 P450 同工酶也称药酶, 是由一系列结构和功能相关的酶组成的超家族, 是体内药物代谢的主要酶系^[9]。其中, *CYP2C19* 已被多项研究证实与药物血药浓度及酶的抑制和诱导密切相关^[10-11], 成为近年来研究的热点。*CYP2C19* 基因由于遗传多态性, 个体间表现出不同基因型和基因

表型。佛山地处亚热带沿海地区, 随着外来人口剧增, 导致遗传群体遗传结构发生变化。因此本文针对佛山地区常住人口 375 名冠心病患者进行基因多态性检测, 得出 *CYP2C19* 基因表型分布情况, 以突变杂合型最高(45.60%), 其次为野生型(42.13%), 突变纯合型最低(12.27%); 基因型分布情况以 *CYP2C19**1/*1(42.13%) 所占比例最高, *CYP2C19**3/*3(0.27%) 所占比例最低; 等位基因分

布情况,*1、*2、*3分别为64.93%,29.87%,5.2%,其中野生型*1所占比例最高。该基因分布结果与广东其它地区如广州^[6],深圳^[7],东莞^[8]等地区的基因分布相近。广东省地处中国大陆最南部,虽然56个民族成分齐全,但汉族人口占全省总人口的97.46%,并且广州,深圳,东莞均是外来人口聚集地。佛山东接广州,已实现广佛同城,人口分布上也基本与广州同步化,因此由于佛山特殊的地域环境和人口特征,使得佛山地区人群 *CYP2C19* 基因多态性分布结果与广东其它地区人群基因分布相近。

一般情况下,临床需长时间服用的药物副作用较少,但对于药物代谢慢的人群,长期按照正常剂量服用药物就可能出现严重的毒副作用,导致肝肾损害,甚至可能引起死亡。而作为一种以血红素为辅基的细胞色素超家族蛋白酶,*CYP2C19*参与了氯吡格雷在内的大多数经肝代谢的药物的生物转化过程^[12]。氯吡格雷是临床的一线抗血小板药物,用于冠心病的I、II级预防,可显著降低不良心血管事件的发生率。有研究表明,细胞色素P450系统中的*CYP2C19*是氯吡格雷在体内代谢的主要代谢酶,其等位基因多态性与氯吡格雷的抗血小板反应多样性密切相关^[13]。因此,了解不同基因型人群的药物代谢特征显得尤为重要。本研究结果显示,氯吡格雷抵抗组和氯吡格雷反应组在基因表型和等位基因频率分布上有明显差异,突变纯合型发生氯吡格雷抵抗的概率远高于其它基因表型,这表明不同基因型人群间具有不同的氯吡格雷药物代谢动力学特征。突变纯合型中*CYP2C19**3基因为第4外显子在第636位的突变这导致终止码提前,产生*CYP2C19**3酶,具有较低的代谢功能;*CYP2C19**2基因型为*CYP2C19*基因的第5外显子在第681位的突变,引起5'端40bp碱基缺失,并对之后的mRNA阅读框架造成改变,产生无功能蛋白*CYP2C19**2^[14]。因此,*CYP2C19*突变纯合型(*2/*2,*2/*3,*3/*3)和突变杂合型(*1/*2,*1/*3)为影响氯吡格雷药性反应的危险因素,其中突变纯合型影响作用更为显著。上述基因突变将降低氯吡格雷的抗血小板效果,影响药效反应,发生血栓等严重后果,所以,应实现基因检测指导下的个性化抗血小板治疗,比如根据患者基因检测和血小板聚集功能检测适当增加药物剂量^[15];对高危患者可选用其它抗血小板药物或者联合用药;避免同时接受与氯吡格雷

有共同代谢途径或影响氯吡格雷吸收的药物,以减少药物间的相互作用等。

综上所述,佛山地区人群*CYP2C19*基因型与广东其它地区人群分布相似,突变纯合型和突变杂合型为佛山地区人群发生氯吡格雷抵抗的危险因素,故临床治疗中应根据患者基因检测结果制定个性化的治疗方案,选择合适的抗血小板治疗药物。

参考文献

- [1] 庄金龙,邓节喜,陈劲松,等. *CYP2C19* 基因多态性与PCI手术患者血小板抑制率的相关性研究[J]. 中国心血管病研究, 2017, 15(6):518-522.
- [2] 李桂梅,陈凤英,崔晓迎,等. 蒙古族PCI病人*CYP2C19*基因多态性与氯吡格雷抵抗相关性研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2017, 39(2):128-132.
- [3] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社, 2015:14.
- [4] Sridharan K, Kataria R, Tolani D, et al. Evaluation of *CYP2C19*, *P2Y12*, and *ABCB1* polymorphisms and phenotypic response to clopidogrel in healthy Indian adults[J]. *Indian J Pharmacol*, 2016, 48(4):350-354.
- [5] Ray S. Clopidogrel resistance: the way forward [J]. *Indian Heart J*, 2014, 66(5):530-534.
- [6] 方伟祯,蔡振华. 广州地区汉族人群*CYP2C19*基因多态性的分布[J]. 江苏医药, 2017, 43(21):1556-1558.
- [7] 刘秀卿,李卓成,李延武. *CYP2C19*基因多态性荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2):95-99.
- [8] 华仙丽,梁爱芬,雷亚利,等. 广东东莞地区心血管疾病患者*CYP2C19*基因多态性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(5):606-608.
- [9] Shumyantseva VV, Bulko T, Shich E, et al. Cytochrome p450 enzymes and electrochemistry: crosstalk with electrodes as redox partners and electron sources [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 851(1):229-246.
- [10] Jukić MM, Haslemo T, Molden E, et al. Impact of *CYP2C19* genotype on escitalopram exposure and therapeutic failure: a retrospective study based on 2 087 patients[J]. *Am J Psychiatry*, 2018, 175(5):463-470.
- [11] Garimella T, Tao X, Sims K, et al. Effects of a fixed-dose co-formulation of daclatasvir, asunaprevir, and beclabuvir on the pharmacokinetics of a cocktail of cytochrome P450 and drug transporter substrates in healthy subjects[J]. *Drug R D*, 2018, 18(1):55-65.

(下转第16页)

· 论 著 ·

乌鲁木齐地区维吾尔族 *ORMDL3* 基因单核苷酸多态位点与哮喘易感性的研究

王玲¹ 魏研荣¹ 王丽霞¹ 张艳丽¹ 王晶^{2*}

[摘要] 目的 通过对乌鲁木齐地区维吾尔族哮喘患者和正常人群中血清类黏蛋白1样蛋白3 (*ORMDL3*) 基因单核苷酸多态(SNP)位点 rs7216389、rs12603332 基因型的检测,探讨 rs7216389、rs12603332 位点与哮喘患者易感性的关系。方法 利用 SNaPshot 技术检测 100 例哮喘患者和 93 例对照组 *ORMDL3* 基因多态位点 rs7216389、rs12603332 基因分型及等位基因分布频率,并分析 2 组等位基因构成比。结果 rs7216389 位点和 rs12603332 位点 2 组基因型分布频率差异均有统计学意义($\chi^2 = 7.029, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.367, P < 0.05$)。rs7216389 位点 2 组 A、G 等位基因频率分别为 61.5%、38.5% 和 74.2%、25.8%; rs12603332 2 组 G、A 等位基因频率分别为 58.5%、41.5% 和 74.7%、25.3%, 差异也均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 *ORMDL3* 基因 rs12603332 位点和 rs7216389 位点多态性与新疆地区维吾尔族人群哮喘易感性相关, rs12603332 位点的 GG 型和 rs7216389 位点的 AA 型可能是哮喘病的易感基因型。

[关键词] *ORMDL3* 基因; 单核苷酸多态性; 哮喘; 维吾尔族

Study on single nucleotide polymorphism loci of *ORMDL3* gene and susceptibility to asthma in Urumqi Uygur Autonomous State

WANG Ling¹, WEI Yanrong¹, WANG Lixia¹, ZHANG Yanli¹, WANG Jing^{2*}

(1. Respiratory Department of TCM Hospital affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China, 830000; 2. Xinjiang Respiratory Disease Laboratory, affiliated Hospital of traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China, 830000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the association between a single nucleotide polymorphism of human *ORMDL3* and Uygur asthma susceptibility in Urumqi. Methods SNaPshot technique was used to detect the genotyping and allele distribution frequencies of 100 cases of asthma and 93 control *ORMDL3* gene polymorphism loci rs7216389, rs12603332, and analyze the composition ratio of alleles. Results rs7216389 and rs12603332 loci of 2 groups of genotype frequency differences were statistically significant ($\chi^2 = 7.029, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.367, P < 0.05$). The frequencies of A and G alleles in the 2 loci of rs7216389 locus were 61.5%, 38.5% and 74.2%, 25.8%, respectively. The frequencies of G and A alleles in rs12603332 2 group were 58.5%, 41.5% and 74.7%, 25.3%, respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion *ORMDL3* gene rs12603332 locus and rs7216389 locus polymorphism are associated with asthma susceptibility in Uighur population in Xinjiang. The GG type of rs12603332 locus and the AA type of rs7216389 locus may be susceptible genotypes types of asthma.

[KEY WORDS] *ORMDL3* gene; Single Nucleotide polymorphisms; Asthma; Uygur

基金项目:国家自然科学基金(81360584)

作者单位:1. 新疆医科大学附属中医医院呼吸科,新疆,乌鲁木齐 830000

2. 新疆医科大学附属中医医院新疆呼吸病研究实验室,新疆,乌鲁木齐 830000

*通信作者:王晶, E-mail:64431127@qq.com

支气管哮喘(简称哮喘)是一种气道慢性炎症性疾病,已成为严重危害人民健康的重要的慢性气道疾病之一^[1]。目前全球约有超过3亿哮喘患者,不同国家哮喘总体患病率为1%~8%^[2-3]。我国14岁以上人群哮喘患病率为1.24%^[4]。由于新疆特殊的地理环境,以及新疆维吾尔族饮食习惯、气候、居住条件等的特殊性,使得新疆成为我国哮喘的高发地区之一。研究表明,不同地域、不同民族哮喘的易感基因不同,但大多分布在17号染色体上^[5]。全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)表明血清类黏蛋白1样蛋白3(orosomucoid1-like protein3, *ORMDL3*)是迄今发现与儿童哮喘关联证据最充分的基因^[6]。*ORMDL3*基因s7216389位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是哮喘最显著的相关标记^[7],与香港、南方和内蒙古等地区人群哮喘易感性相关^[8-9]。目前,新疆维吾尔族人群哮喘与*ORMDL3*基因多态性的关系尚未见报道。本研究以乌鲁木齐地区维吾尔族人群为研究对象,探讨*ORMDL3*基因rs7216389、rs12603332位点多态性与维吾尔族哮喘易感性的关系,旨在从分子生物学角度探讨哮喘在乌鲁木齐地区维吾尔族人群中的遗传机制,为临床诊断及治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2015年1月至2016年12月新疆医科大学附属中医医院门诊及住院确诊的维吾尔族哮喘患者(祖籍三代无血缘关系、无异族通婚史)100例,设为哮喘组,男27例,女73例,年龄18~70岁,平均年龄(54.3±12.9)岁;收集同期体检的维吾尔族健康人93例为对照组,男30例,女63例,年龄18~70岁,平均年龄(45.6±17.0)岁。2组在年龄及性别上差异无统计学意义,且均来自新疆乌鲁木齐地区。纳入标准^[4]:(1)典型哮喘的临床症状和体征:①反复发作喘息、气急,伴或不伴胸闷或咳嗽,夜间及晨间多发,常与接触变应原、冷空气、物理、化学性刺激以及上呼吸道感染、运动等有关;②发作时双肺可闻及散在或弥漫性哮鸣音,呼气相延长;③上述症状和体征可经治疗缓解或自行缓解。(2)可变气流受限的客观检查:①支气管舒张试验阳性;②支气管激发试验阳性;③呼气流量峰值(peak expiratory flow, PEF)平

均每日昼夜变异率>10%或PEF周变异率>20%。符合上述症状和体征,同时具备气流受限客观检查中的任一条,并除外其他疾病所引起的喘息、气急、胸闷及咳嗽,可诊断为哮喘。排除标准:①合并气胸、肺癌、肺结核等其他严重肺部疾病者;②合并严重心脑血管、肝肾和造血系统等原发性疾病者;③精神病患者;④妊娠及哺乳期妇女;⑤3个月内使用全身糖皮质激素者;⑥吸烟患者。本研究经医院医学伦理学委员会批准,患者知情同意。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要仪器

多用电泳仪电源(BG-Power3500,北京百晶生物技术有限公司),凝胶成像仪(Tanon-3500R,上海天能科技有限公司),PCR仪(EDC-810,北京东胜创新生物科技有限公司),紫外分析装置(FR-110,上海复日科技有限公司),测序仪(ABI3730XL,美国ABI)等。

1.2.2 主要试剂

HotStar HiFidelity Polymerase Kit(202605, Qiagen 德国),DL2000 DNA Marker(DL2501,上海捷瑞生物工程有限公司),琼脂糖(AB0013-250g,上海捷瑞生物工程有限公司),溴化乙啶(EB0195-25g,上海捷瑞生物工程有限公司),FastAP酶(Fermentas,加拿大),外切酶I(EXO-I)(Fermentas,加拿大),Hi-Di™ Formamide(4311320,ABI,美国),SNaPshot® MultiplexKit(4323161,ABI,美国),GeneScan™-120 GeneScan(4324287,ABI,美国)等。

1.3 研究方法

1.3.1 DNA的提取

采集维吾尔族哮喘患者及健康人空腹静脉血5 mL,EDTA-Na₂抗凝,用DNA提取试剂盒提取基因组DNA,样本置-80℃保存。

1.3.2 基因多态性检测

使用SNaPshot技术,毛细管电泳检测,在美国ABI3730x1型全自动DNA测序仪上进行测序,*ORMDL3*基因rs7216389、rs12603332位点单核苷酸多态性的基因分型应用GeneMapper 4.1(Applied Biosystems Co.Ltd.,美国)分析。

1.3.2.1 SNP位点引物设计 使用Primer Premier 5设计SNP位点附近上下游引物,rs7216389上游引物序列:CCTGCCTCCAAAACCTAGCA,下游引物序列:GCAGTTCTGTCGCTGTTGTT;rs12603332上游引物序列:GCTGGGCCCG-

GATATTTGTA, 下游引物序列: AGAGAGA-AGAGGCTGGCAGA。

1.3.2.2 DNA 样本质检 DNA 样本取 1 μL , 1% 琼脂糖凝胶电泳对其样本进行质检, 用核酸蛋白定量仪测定 DNA 浓度以及 260/280; 然后根据测定的浓度将样本稀释到工作浓度 5~10 ng/ μL 。

1.3.2.3 多重 PCR 反应 ①多重 PCR 引物中各引物的终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$; ②PCR 反应体系如下: DNA 1 μL , 10 \times buffer 1.5 μL , MgCl_2 (25 mmol) 1.5 μL , dNTP (10 mmol) 0.3 μL , 引物 (10 μmol) 0.15/条, Taq 酶 (5 U/ μL) 0.3 μL , ddH₂O 补足到 15 μL ; ③多重 PCR 反应采用 Touch-down 的 PCR 反应程序如下: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; (94 $^\circ\text{C}$ 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 15 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s) -0.5 $^\circ\text{C}$ /循环, 11 个循环; 94 $^\circ\text{C}$ 15 s, 54 $^\circ\text{C}$ 15 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 24 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 3 min。

1.3.2.4 PCR 产物纯化 PCR 扩增后取 3 μL PCR 产物用 ExoI 和 FastAP 纯化, 主要是用 ExoI 去除反应产物中的剩余引物, 用 FastAP 去除反应中剩余的 dNTP。反应体系如下: PCR 产物 3 μL , ExoI (20 U/ μL) 0.2 μL , FastAP (1 U/ μL) 0.8 μL , ExoI buffer 0.7 μL , ddH₂O 补足到 7.0 μL 。37 $^\circ\text{C}$ 15 min, 80 $^\circ\text{C}$ 15 min, 纯化好后进行延伸反应, 预先混好延伸引物。

1.3.2.5 SNaPshot 多重单碱基延伸反应 使用 Primer Premier 5 设计 SNP 位点附近上下游引物进行 SNaPshot 多重单碱基延伸反应: ① rs7216389 延伸引物: TTTTTTGATCAAT-

CAGGGCCGAGTCCATGC, rs12603332 延伸引物: TTTTTTTTTACCCAGGGAGCCTTCTCTGACAG;

②延伸反应体系: PCR 产物 2 μL , SNaPshot Mix 1 μL , 延伸引物 (10 μmol) 0.2/条, ddH₂O 补足到 6.0 μL ; ③PCR 循环程序如下: 96 $^\circ\text{C}$ 预变性 1 min; (96 $^\circ\text{C}$ 10 s, 52 $^\circ\text{C}$ 5 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s), 30 个循环。

1.3.2.6 延伸产物测序 上 ABI3730XL 测序仪测序样本的制备, 体系如下: Hi-DiTM Formamide 9.0 μL , 纯化后的延伸产物 1 μL , 总体积 10.0 μL 。将各组混匀, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min 后上 ABI3730XL 测序仪。

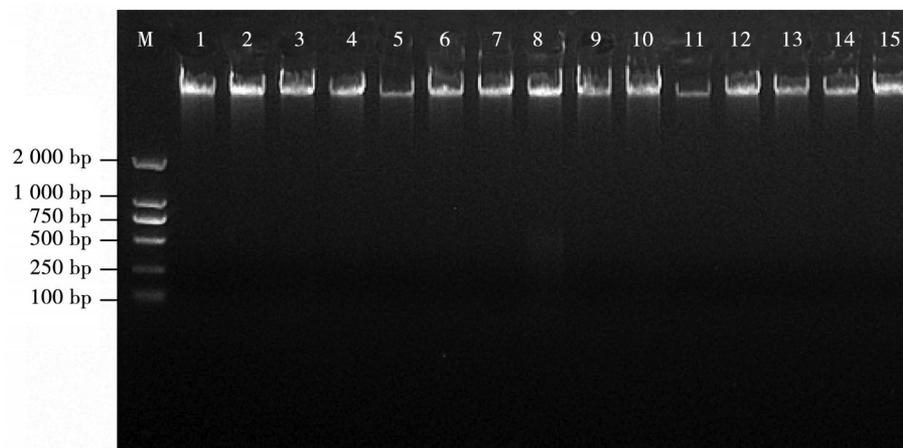
1.3.2.7 原始数据分析 ABI3730XL 测序仪上收集的原始数据用 GeneMapper4.1 分析。

1.3.3 统计学方法

利用 SPSS 17.0 软件进行分析。数值变量资料均进行正态性检验和独立样本 *t* 检验, 分类变量资料组间比较采用 χ^2 检验。各研究对象年龄以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 基因型频率及等位基因频率用百分数表示, 各基因型和等位基因频率的差异性用 χ^2 检验, 对照组与哮喘组基因型均进行 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

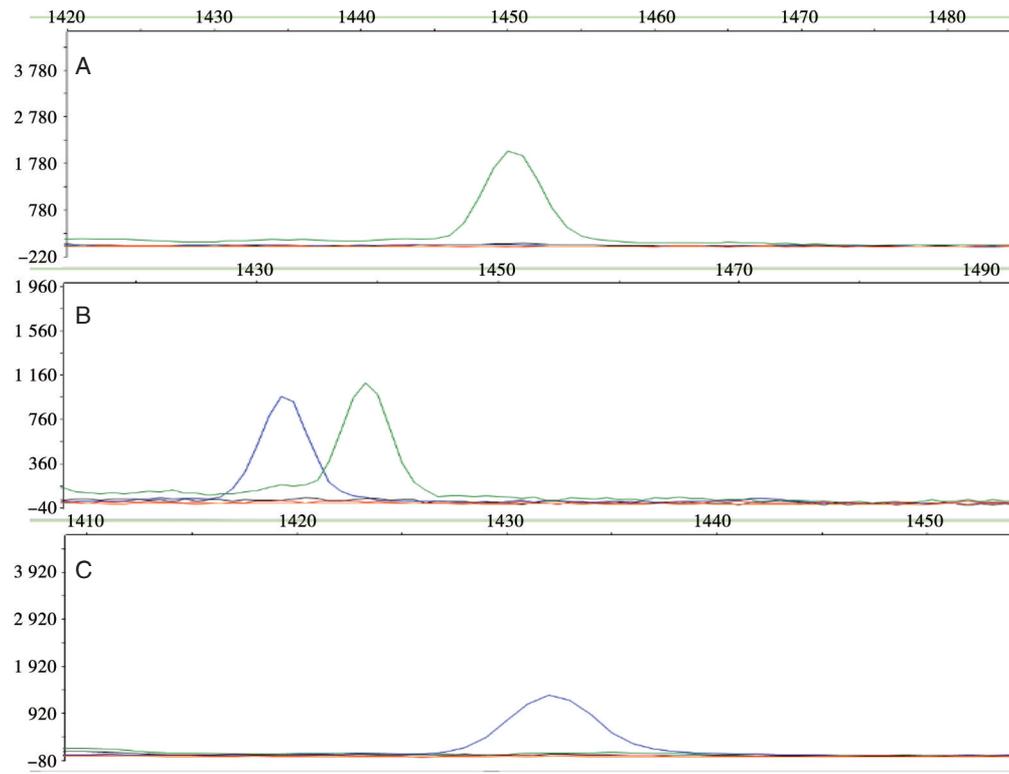
ORMDL3 基因 rs7216389、rs12603332 位点基因分型结果, 见图 1~图 3, 检测结果显示在哮喘组的实际情况中, 2 个 SNP 位点中 AA、AG 和 GG 基因型分别为 61 (32.8%)、63 (33.9%) 和 62 (33.3%) 例, A 和 G 等位基因在该人群中的分布频率分别



加样孔位于图片上方的看图模式下, Marker 从上至下依次为 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp。合格的基因组应该在 2 000 bp 以上有一条单一明亮的电泳条带, 无弥散拖尾现象、点样孔中无蛋白污染、无 RNA 污染。

图 1 基因组 DNA 质检电泳图

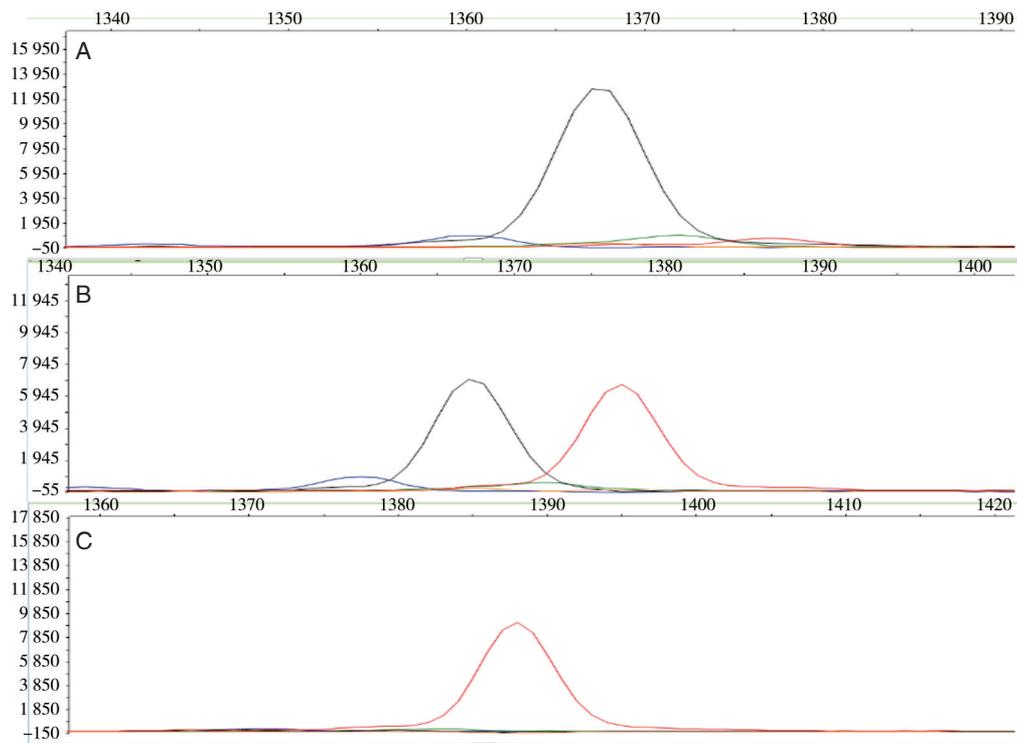
Figure 1 Genomic DNA quality control electrophoretogram



A: rs7216389 位点 AA 型; B: rs7216389 位点 AG 型; C: rs7216389 位点 AA 型。

图2 rs7216389 位点基因分型毛细管电泳峰

Figure 2 Allele peaks of rs7216389 genotyped by capillary electmphoresis



A: rs12603332 位点 CC 型; B:rs12603332 位点 CT 型; C: rs12603332 位点 CC 型。

图3 rs12603332 位点基因分型毛细管电泳峰

Figure 3 Allele peaks of rs12603332 genotyped by capillary electmphoresis

为 49.8% 和 50.2%。Hardy-weiberg 遗传平衡检验结果表明数据均符合 Hardy - weiberg 定律 ($P > 0.05$)。由表 1 可知,与对照组相比,哮喘组 *ORM-*

DL3 基因 rs7216389 和 rs12603332 位点的优势等位基因与劣势等位基因的差异存在统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 哮喘组与对照组 rs7216389 和 rs12603332 位点基因型和等位基因频率

Table 1 The frequencies of genotype and allele of rs7216389 and rs12603332 between the case and the control groups

组别	n	基因型			χ^2	P 值	等位基因		χ^2	P 值
		野生型	杂合突变型	纯合突变型			野生型	突变型		
rs7216389		AA	AG	GG	7.092	0.020*	A	G	7.805	0.008*
对照组	100	37(0.370)	49(0.490)	14(0.140)			122(0.615)	78(0.385)		
哮喘组	93	53(0.570)	32(0.344)	8(0.086)			138(0.742)	48(0.258)		
rs12603332		GG	GA	AA	11.367	0.005*	G	A	10.420	0.001*
对照组	100	36(0.360)	45(0.450)	19(0.190)			117(0.585)	83(0.415)		
哮喘组	93	54(0.581)	31(0.333)	8(0.086)			139(0.747)	47(0.253)		

*: $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

3 讨论

哮喘是一种复杂的疾病,其发病涉及到遗传和环境因素之间的相互影响,其中遗传因素占 48%~79% 不等^[10]。哮喘可有明显的家族聚集性,不同人种、民族、人群在疾病的易感性和抵抗性方面表现出一定的差异^[11]。对于哮喘遗传风险因素被证明因不同群体而不同^[12]。*ORMDL3* 基因 rs7216389 位点与儿童哮喘存在较强的关联^[13]。刘丽红等^[14]通过 Meta 分析发现,*ORMDL3* 基因 rs7216389 多态性与中国人儿童和成人哮喘发病均密切相关。本研究选择 *ORMDL3* 基因 rs7216389 位点进行多态性分析,结果发现哮喘组中 3 种基因型(AA/AG/GG)分别为 57.0%、34.4%、8.6%,对不同基因型观测值和期望值用 χ^2 检验检测,差异有统计学意义($\chi^2=7.092, P < 0.05$)。说明 *ORMDL3* 基因多态性是新疆乌鲁木齐地区维吾尔族成人哮喘发病的危险因素。*ORMDL3* 基因 rs12603332 位点也是研究与哮喘相关较多的一个位点。Sabar 等^[15]发现 rs12603332 在巴基斯坦及非裔美洲人群中同哮喘显著关联。本研究表明 *ORMDL3* 基因 rs12603332 位点与维吾尔族哮喘的发病水平最为相关。哮喘组中 3 种基因型(GG/GA/AA)分别为 58.1%、33.3%、8.6%,不同基因型 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=11.367, P < 0.01$)。我们的研究还发现 *ORMDL3* 基因 rs12603332 位点和 rs7216389 位点基因型在维吾尔族群体中均符合 Hardy-Wein-

berg 平衡定律,提示我们纳入研究的人群具有良好的群体代表性。

观察哮喘组和对照组 *ORMDL3* 基因 rs7216389 位点基因型发现,哮喘组 AA 型纯合子明显高于对照组,表明 AA 基因型与乌鲁木齐维吾尔族哮喘相关联,而哮喘组 GG 型例数低于对照组,等位基因 A 与 G 的频率分布在哮喘组频率分别为 74.2% 和 25.8%,而在对照组为 61.5% 和 38.5%,表明 rs7216389 位点 A 等位基因可能是哮喘的危险基因。同样,哮喘组的 *ORMDL3* 基因 rs12603332 位点 GG 型纯合子高于对照组,而 AA 型纯合子低于对照组,等位基因 G 与 A 的频率分布在哮喘组频率分别为 74.7% 和 25.3%,而在对照组为 58.5% 和 41.5%,表明 rs12603332 位点 G 等位基因可能是哮喘的危险基因,而 A 等位基因可能是哮喘的保护基因。Wu 等^[16]对患儿及家长全基因组关联分析,结果显示携带优势等位基因的儿童患哮喘风险明显增加,这与我们的研究结果一致。我们通过对新疆乌鲁木齐地区维吾尔族人群 *ORMDL3* 基因 rs12603332 和 rs7216389 位点的多态性研究发现,*ORMDL3* 基因单核苷酸位点多态性和新疆成人哮喘发病均密切相关。但一定条件下地理和环境因素差异将影响 *ORMDL3* 基因表达情况,故本研究还存在不足之处,将来需要扩大样本量,通过对新疆不同地区和民族的协同研究与分析,进一步阐明其在哮喘发病中的作用,为本地区哮喘的防治提供有效途径。

ORMDL3 基因的多态性存在于乌鲁木齐地区维吾尔族人群中,且分布频率有显著性。rs7216389 位点 AA 基因型和 rs12603332 位点的 GG 基因型可能是哮喘的危险基因型。本研究不仅增加了少数民族的遗传资源库资源,还为今后不同民族该位点与哮喘的致病机制研究提供了遗传学依据。

参考文献

- [1] Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA), 2017.
- [2] Alrifai M, Marsh LM, Dicke T, et al. Compartmental and temporal dynamics of chronic inflammation and airway remodelling in a chronic asthma mouse model [J]. Plos One, 2014, 9(1):e85839.
- [3] Brozek JL, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines - 2016 revision [J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2017, 140(4):950-958.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(9):675-679.
- [5] Holloway JW, Koppelman GH. 17q21 variants and asthma - questions and answers [J]. N Engl J Med, 2008, 359(19):2043-2045.
- [6] Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay S, et al. A polymorphism controlling *ORMDL3* expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(4):860-863.
- [7] Raby B. Novel Insights into the Contribution of *ORMDL3* in Asthma [J]. Biology of Reproduction, 2016, 61(3):705-714.
- [8] 杨婷, 崔丽英. *ORMDL3* 基因多态性与内蒙古地区蒙古族支气管哮喘的相关性研究 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44(8):38-39.
- [9] 池颖静, 庄建伟, 江柳. *ORMDL3* 基因多态性与南方成人哮喘发生的相关研究 [J]. 中国医学创新, 2012, 9(30):1-3.
- [10] Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma [J]. J Pediatr, 2008, 84(4 Suppl): S68-75.
- [11] 黄汉琼. *ORMDL3* 基因 rs7216389 位点多态性与哮喘相关性研究 [D]. 江西: 南昌大学, 2011.
- [12] Burchard EG, Ziv E, Coyle N, et al. The importance of race and ethnic background in biomedical research and clinical practice [J]. N Engl J Med, 2003, 348(12):1170-1175.
- [13] 李亚琴, 孔宪明, 卢燕鸣, 等. 5岁以下儿童 *ORMDL3* 基因表达与哮喘预测指数相关性分析 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(8):1462-1466.
- [14] 刘丽红, 郭文才, 周江, 等. *ORMDL3* 基因 rs7216389 多态性与中国人哮喘易感性的 Meta 分析 [J]. Chin J Evid-based Med, 2015, 15(2):170-175.
- [15] Sabar MF, Shahid M, Bano I, et al. rs12603332 is associated with male asthma patients specifically in urban areas of Lahore, Pakistan [J]. J Asthma, 2017, 54(9):887-892.
- [16] Wu H, Romieu I, Sienna-Monge J, et al. Genetic variation in *ORM1-like 3 (ORMDL3)* and *gasdermin-like (GSDML)* and childhood asthma [J]. Allergy, 2009, 64(4):629-635.

(上接第 10 页)

- [12] Tajima H, Izumi T, Miyachi S, et al. Association between *CYP2C19* genotype and the additional effect of cilostazol to clopidogrel resistance in neuroendovascular therapy [J]. Nagoya J Med Sci, 2018, 80(2):207-215.
- [13] Zhong Z, Hou J, Zhang Q, et al. Effect of cytochrome P450 2C19 polymorphism on adverse cardiovascular events after drug-eluting stent implantation in a large Hakka population with acute coronary syndrome receiving clopidogrel in southern China [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2018, 74(4):423-431.
- [14] Hassani IH, Hmimech W, Khorb NE, et al. A synergic effect between *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* loss-of-function and *CYP2C19*17* gain-of-function alleles is associated with clopidogrel resistance among moroccan acute coronary syndromes patients [J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1):46.
- [15] Winter MP, Koziński M, Kubica J, et al. Personalized antiplatelet therapy with *P2Y12* receptor inhibitors: benefits and pitfalls [J]. Postępy Kardiologii Interwencyjnej, 2015, 11(4):259-80.

miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究

田敬华* 杨金玲 秦杰 赵琳琳 刘敏 洪燕英

[摘要] **目的** 探讨胃癌组织中 miR-34 基因启动子甲基化状态对 miR-34 的表达影响及其与患者预后的相关性。 **方法** 采用实时荧光定量 PCR 法检测 50 例胃癌组织及癌旁组织中成熟 miR-34 的表达。采用甲基化特异性 PCR 法检测 miR-34 基因启动子的甲基化状态,运用统计学分析 miR-34 基因启动子甲基化状态与 miR-34 表达量之间的关系,并随访患者复发和转移情况。 **结果** 胃癌组织中成熟 miR-34 的表达水平比癌旁组织明显降低 ($P<0.05$)。miR-34 甲基化水平与淋巴结转移有相关性 ($P<0.05$)。miR-34 基因启动子非甲基化组的成熟 miR-34 表达水平明显高于甲基化阳性单一模式组和甲基化阳性混合模式组 ($P<0.05$)。与非甲基化组和甲基化阳性混合模式组相比,miR-34 基因甲基化阳性组的胃癌患者复发和转移率明显升高 ($P<0.05$)。 **结论** 在胃癌患者中,miR-34 基因启动子甲基化可导致 miR-34 表达下调。miR-34 基因启动子的甲基化状态与胃癌的复发与转移明显相关。

[关键词] 胃癌; miR-34; 甲基化

The role of miR-34 promoter methylation in the pathogenesis of gastric cancer

TIAN Jinghua*, YANG Jinling, QIN Jie, ZHAO Linlin, LIU Min, HONG Yanying

(Clinical Laboratory, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated to the Capital Medical University, Beijing, China, 100010)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of miR-34 gene promoter methylation status on the expression of miR-34 in gastric cancer and its correlation with prognosis. **Methods** The expression of mature miR-34 in 50 gastric cancer tissues and adjacent tissues was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The methylation status of the miR-34 gene promoter was detected by methylation-specific PCR. The relationship between miR-34 gene promoter methylation status and miR-34 expression was analyzed and the patients were followed up for recurrence and metastasis. **Results** The expression of mature miR-34 in gastric cancer tissues was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). miR-34 expression was correlated with lymph node metastasis ($P<0.05$). The expression level of mature miR-34 in non-methylated group was significantly higher than that in methylated positive single mode group and methylated positive mixed mode group (all $P<0.05$). Compared with non-methylated group and methylated positive mixed group, the recurrence and metastasis rate of gastric cancer patients with miR-34 methylation positive were significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** Methylation of miR-34 gene may lead to the down-regulation of miR-34 expression in some gastric cancer patients. The methylation status of miR-34 is associated with the recurrence and metastasis rate of gastric cancer.

[KEY WORDS] Gastric cancer; miR-34; Methylation

作者单位:首都医科大学附属北京中医医院检验科,北京 100010

*通信作者:田敬华, E-mail: jinghua1022@sina.com

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,中国胃癌患者人数和死亡率明显高于全球水平,是国内死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1]。越来越多的研究表明,微小RNA(microRNA, miRNA)参与肿瘤细胞的分化、生长、增殖、凋亡等诸多病理调控过程,在肿瘤发生和发展中发挥重要作用^[2]。miR-34是miRNA中的一类抑癌基因,包括3个同源基因:miR-34a、miR-34b和miR-34c。miR-34在多种肿瘤细胞中低表达,主要是由于其启动子区甲基化导致^[3-4]。也有研究显示miR-34在胃癌组织中低表达^[5],但目前尚未见关于胃癌中miR-34启动子甲基化状态,以及甲基化对miR-34表达的影响和对胃癌患者预后影响的研究报道。本研究拟通过实时荧光定量PCR法和甲基化特异性PCR法检测胃癌组织中成熟miR-34表达和miR-34基因启动子的甲基化状态,分析miR-34基因启动子甲基化状态与miR-34基因表达之间的关系,探讨miR-34基因启动子甲基化状态对患者预后的影响,以期为我国胃癌的发生提供分子生物学依据,并指导胃癌患者的预后。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集首都医科大学附属北京中医医院2015年12月至2017年6月消化内科收治的50例胃癌患

者的胃腺癌组织和对应的距肿瘤>5 cm的癌旁正常胃黏膜组织标本,其中男性26例,女性24例,年龄范围为31~75岁,平均年龄为(63.45±11.53)岁,患者术前未进行任何化放疗。标本取出后随即用液氮保存,用于后续核酸提取和检测。依照第8版《AJCC癌症分期手册》^[10]进行分期:TNM(topography, lymph node, metastasis) I期12例、II期9例、III期12例、IV期17例。入选标准:①所有患者均经纤维胃镜检查并经病理学确诊;②所有患者在手术前均未接受化疗及放射治疗;③同意本研究并签署知情同意者。排除标准:①未确诊为胃癌的消化系统疾病患者;②确诊为其它肿瘤患者;③不同意参加研究者。本研究经医院医学伦理委员会审批,并经得所有患者的知情同意后开展。

1.2 主要试剂和仪器

试剂:Trizol提取试剂(Invitrogen,美国),组织DNA抽提试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],Qiagen EpiTect Bisulfite Kit试剂盒(Qiagen,德国),Qiagen EpiTect MSP试剂盒(Qiagen,德国),Mir-X™ miRNA First Strand Synthesis Kit[宝日医生物技术(北京)有限公司],Mir-X™ miRNA qRT-PCR SYBR® Kit[宝日医生物技术(北京)有限公司],miR-34甲基化和非甲基化引物[生工生物工程(上海)股份有限公司],见表1。

表1 miR-34甲基化引物
Table 1 miR-34 methylation primers

引物名称	类别	序列(5'→3')	产物长度(bp)
miR-34a	甲基化	Sense GGTTTTGGGTAGCGCGTTTC	123
		Antisense TCCTCATCCCCTTACCGCCG	
miR-34a	非甲基化	Sense GGTTTTGGGTAGGTGTGTTTT	110
		Antisense AATCCTCATCCCCTTACCA	
miR-34b/c	甲基化	Sense TTTAGTTACGCGTGTGTGC	158
		Antisense ACTACAACCTCCGAACGATC	
miR-34b/c	非甲基化	Sense TGGTTTAGTTATGTGTGTGTGT	162
		Antisense CAACTACAACCTCCAAACAATCC	

仪器:Applied Biosystems 7500仪器(ABI,美国),Bio-Rad凝胶成像分析仪(伯乐,美国)。

1.3 方法

1.3.1 组织DNA和RNA提取

按组织和细胞DNA抽提试剂盒说明书抽提

组织DNA,并测定浓度和纯度,用Trizol试剂提取细胞总RNA。

1.3.2 miR-34表达检测

根据试剂盒说明书进行逆转录反应,逆转录程序:37℃ 1 h。以逆转录产物cDNA为模板进行

qPCR反应,PCR反应程序:95℃ 10 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,共40个循环;终延伸72℃ 5 min。20 μL反应体系:SYBR Advantage Premix (2×) 8 μL,RO× Dye (50×) 0.5 μL,miRNA-specific Primer (10 μmol/L) 0.5 μL,mRQ 3' Primer 0.5 μL,cDNA 2 μL,ddH₂O 补至 20 μL,得出各组 Ct 值,以 2^{-ΔΔCt}表示 mRNA 相对表达水平,所有反应均在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪上完成。

1.3.3 DNA 甲基化修饰及纯化

根据 Qiagen EpiTect Bisulfite Kit 试剂盒说明书进行 miR-34 亚硫酸氢钠处理及纯化,取 3 μL 溶液进行浓度及纯度的检测,纯化产物置于-20℃保存。

1.3.4 甲基化检测

根据 Primer Premier 5 软件设计 1 对非甲基化引物和 1 对甲基化引物,见表 1。甲基化特异性 PCR 体系共 25 μL,根据 EpiTect MSP 试剂盒说明进行反应,25 μL 体系:EpiTect Master Mix (2×) 12.5 μL、2 对引物各 0.5 μL、无核酸酶水 8.5 μL 和模板 DNA 3 μL。PCR 反应条件:95℃ 10 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环;终延伸 72℃ 10 min,去离子水作为阴性对照,并以 EpiTect PCR Control DNA Set 中甲基化和未甲基化 DNA 分别作为阳性和阴性对照。用 2% 琼脂糖凝胶对产物进行电泳,凝胶成像仪观察条带并拍照保存。出现甲基化条带(单一模式)或同时扩增出甲基化及非甲基化条带(混合模式)时则为甲基化阳性,只扩增出非甲基化条带时则为非甲基化。

1.3.5 随访

每 6 个月随访 1 次,以是否复发、转移或因胃癌死亡作为随访终点。复发是指肿瘤病灶再次出现在原有发病位置,转移是指肿瘤病灶脱离其原发部位,扩散到身体其他部位,统计所有患者复发或者转移情况。

1.4 统计分析

EpiData 3.1 软件录入随访资料以及实验数据,使用 SPSS 19.0 软件进行资料分析,miR-34 DNA 甲基化状态与 miR-34 表达、临床病理特征的关系应用相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者组织 miR-34 表达水平

荧光定量 PCR 结果显示,与癌旁组织相比,胃

癌组织中 miR-34 mRNA 表达水平明显降低,差异具有显著性意义($P<0.05$),见图 1。

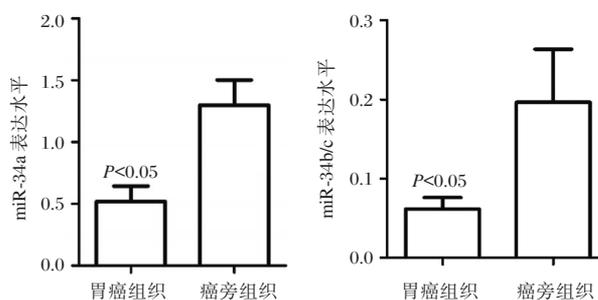
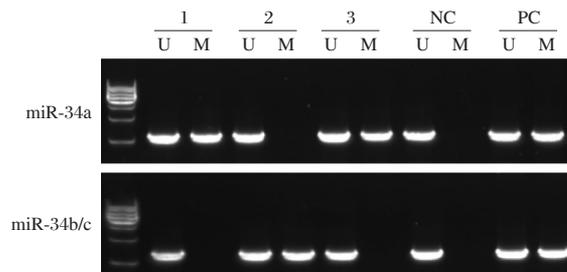


图 1 miR-34 表达水平

Figure 1 miR-34 expression level

2.2 胃癌患者组织 miR-34 甲基化水平

甲基化特异性 PCR 实验结果显示,胃癌组织 miR-34 基因单一模式阳性有 32 例,非甲基化 13 例,混合模式 5 例;癌旁组织中单一模式阳性仅为 12 例,非甲基化 34 例,混合模式 4 例。电泳结果显示,miR-34a 和 miR-34b/c 基因为单一条带,见图 2。



U 代表非甲基化,M 代表甲基化,U 和 M 均有条带代表甲基化混合模式,仅 M 有条带代表甲基化单一模式,仅 U 有条带代表非甲基化。

图 2 miR-34 甲基化电泳图

Figure 2 The electropherogram of miR-34 methylation

2.3 miR-34 甲基化水平与临床病理参数的相关性

将 miR-34 甲基化水平与胃癌患者各临床病理参数之间的关系进行统计分析,结果发现 miR-34 甲基化水平与年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤大小无明显相关性($P>0.05$),与淋巴结转移呈明显相关性($P<0.05$),见表 2。

2.4 miR-34 基因甲基化状态与成熟 miR-34 表达水平的关系

将 50 例胃癌患者标本按 miR-34 基因启动子

的甲基化状态分为非甲基化组、甲基化单一模式组和甲基化混合模式组,非甲基化组中成熟 miR-34a 的表达水平明显增高,与甲基化单一模式组及混合模式组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

表 2 miR-34 甲基化水平与临床病理特征的相关性
Table 2 Correlation of miR-34 methylation levels with clinicopathologic features

临床病理特征		<i>n</i>	甲基化例数(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别	男	26	19(73.08%)	0.024	0.877
	女	24	18(75.00%)		
年龄	≤65	23	17(73.91%)	0.000	0.990
	>65	27	20(74.07%)		
TNM分期	T1+T2	21	13(61.90%)	2.753	0.097
	T3+T4	29	24(82.76%)		
淋巴结转移	有	30	26(86.67%)	6.254	0.012
	无	20	11(55.00%)		
肿瘤直径	≥5 cm	31	25(80.65%)	1.872	0.171
	<5 cm	19	12(63.16%)		

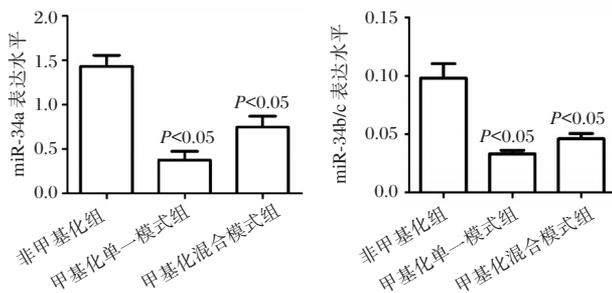


图 3 miR-34 基因甲基化状态与成熟 miR-34 表达水平的关系

Figure 3 Relationship between miR-34 gene methylation and mature miR-34 expression

2.5 miR-34 基因甲基化状态与胃癌患者生存的关系

50 例患者中有 44 例术后随访 2 年,发现 34 例出现复发或转移,其中癌组织 miR-34 甲基化阳性 30 例(88.24%),而未复发或转移的 10 例患者中,癌组织 miR-34 甲基化阳性 6 例(60.00%),复发或转移患者癌组织 miR-34 甲基化率明显高于未复发组,差异具有统计学意义($\chi^2=4.141$, $P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤是一类多基因突变导致的疾病。近年来,随着肿瘤的分子生物学机制研究逐渐深入,表观遗传学修饰在肿瘤发生和发展中的作用逐渐清晰。肿瘤细胞具有很高的异质性,这种异质性主要来源于表观遗传学修饰^[7]。miRNA 作为一类由约 22 个核苷酸组成的非编码小分子 RNA,其主要生理作用是通过与靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区结合,调控靶基因 mRNA 活性,从而实现靶基因的表达调控^[8]。

在诸多研究中发现 miR-34 具有抑制肿瘤细胞生长和诱导细胞凋亡等多种活性,与肿瘤抑制功能及致癌途径直接相关^[9]。miR-34 具有多个靶点,可同时在多个细胞信号通路上工作,从而产生协同作用。miR-34 可通过靶向 Wnt 通路(*Wingless* 与 *Int1* 结合,称为 *Wnt* 基因)和上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)通路相关基因,如 *WNT1*、*WNT3*、*LRP6*、*AXIN2*、 β -*catenin*、*LEF1* 的 UTRs,从而抑制 Wnt 通路和 EMT 通路^[10-11]。研究表明,miR-34 在多种肿瘤中,如肺癌、大肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌和肾癌中都会有不同程度的表达下降^[12]。本研究结果显示,与癌旁组织相比,胃癌组织中 miR-34 mRNA 表达水平明显降低,具有显著性差异,与其它癌种中的结果一致^[12]。可能是降低表达的 miR-34 引起靶基因发生不同程度的表达变化,抑制细胞的凋亡,引起肿瘤的发生。

miR-34 家族启动子均位于 CpG 岛,表达均由 DNA 甲基化调控。以前研究发现 miR-34a 启动子区在前列腺癌、膀胱癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤细胞中呈现高甲基化状态,从而下调成熟的 miR-34 的表达^[13-14]。我们发现在胃癌患者的胃癌组织中,miR-34 启动子甲基化的比率较癌旁组织明显增高,进一步分析表明 miR-34 基因启动子区域的甲基化水平与成熟 miR-34 表达水平成负相关,提示 miR-34 基因启动子区域甲基化可能导致 miR-34 表达下调,这可能是胃癌的发病因素之一,也可能是胃癌发生之后才引起该变化。有研究表明,在某些胃癌细胞中,由于 CpG 岛的高度甲基化,从而产生表观遗传学的影响,使 miR-34b 和 miR-34c 表达沉默^[15]。miR-34a 在 MKN74 和 AGS 胃癌细胞中则大量表达,在 KatoIII、NUGC-3 和 SNU-16

细胞中表达量较低。我们的研究显示在人胃癌组织中,miR-34a,b,c均呈现表达下调,并和启动子区域的甲基化水平相关。

进一步统计分析miR-34甲基化水平与胃癌患者各临床病理特征之间的关系,发现miR-34甲基化水平与淋巴结转移呈明显相关性($P<0.05$),这提示miR-34甲基化水平可能参与肿瘤的发生和发展。同时,miR-34基因的启动子甲基化水平与患者的预后密切相关。我们发现miR-34的启动子甲基化患者在手术后有很大比例的复发和转移,与其它肿瘤组织中miR-34基因高甲基化导致肿瘤患者预后差的结果类似^[16]。miR-34与p53抑癌通路相关,p53可能是miR-34表达和miR-34启动子甲基化的决定因素。有研究表明^[17],p53/miR-34轴可抑制*LICAM*的表达,而*LICAM*可减少卵巢和子宫内膜癌的预后和转移。因此,功能性p53的恢复可作为一种基因治疗方法,然而miR-34a由于分子量小,可能比p53更具优势成为肿瘤治疗的靶点,并可作为预后良好的有价值的预测指标。但本研究的样本量相对较小,结果可能具有一定的局限性,miR-34对胃癌患者的治疗和预后的相关性还需要多中心大样本研究加以补充和完善。

参考文献

- [1] Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention[J]. *Lancet*, 2014, 383(9916):549-557.
- [2] Moutinho C, Esteller M. MicroRNAs and epigenetics [J]. *Adv Cancer Res*, 2017, 135:189-220.
- [3] Kim YH, Lee WK, Lee EB, et al. Combined effect of metastasis-related microRNA, miR-34 and miR-124 family, methylation on prognosis of non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2017, 18(1):e13-e20.
- [4] Vogt M, Munding J, Grüner M, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas [J]. *Virchows Arch*, 2011, 458(3):313-322.
- [5] 邓晓晶, 邓敏, 宋育林, 等. miRNA-34a 对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(8):1090-1094.
- [6] Mahul BA, Stephen E, Frederick LG, et al. *AJCC cancer staging manual*[M]. 8th ed. New York: Springer, 2016.
- [7] Timp W, Feinberg AP. Cancer as adysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(7):497-510.
- [8] Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, et al. Epigenetics and microRNAs in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2):E459.
- [9] Slaby O, Laga R, Sedlacek O, et al. Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer [J]. *Biochem J*, 2017, 474(24):4219-4251.
- [10] Kim NH, Cha YH, Kang SE, et al. p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells [J]. *CellCycle*, 2013, 12(10):1578-1587.
- [11] Cha YH, Kim NH, Park C, et al. MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(7):1273-1281.
- [12] Vogt M, Munding J, Grüner M, et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas [J]. *Virchows Arch*, 2011, 458(3):313-322.
- [13] 邵佳, 何爱琴, 张玉泉, 等. miR-34 甲基化与卵巢癌临床病理特征及预后的关系[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2014, 24(6):513-516,419.
- [14] 殷帅, 徐仁芳, 何小舟, 等. 肾透明细胞癌组织中 miR-34a 和 miR-34b/c 基因 CpG 岛甲基化状态的变化及意义[J]. *实用临床医学*, 2013, 14(6):5-8.
- [15] Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(12):2066-2073.
- [16] Siemens H, Neumann J, Jackstadt R, et al. Detection of miR-34a promoter methylation in combination with elevated expression of c-Met and beta-catenin predicts distant metastasis of colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3):710-720.
- [17] Schmid G, Notaro S, Reimer D, et al. Expression and promotor hypermethylation of miR-34a in the various histological subtypes of ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16:102-130.

遗忘性轻度认知功能障碍与 *MTHFR* C677T 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平研究

邢红宇^{1*} 卢瑞丽² 梁宁³ 周君霞⁴

[摘要] 目的 探讨 *MTHFR* C677T 基因多态性及血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平与遗忘型 MCI(amnesic MCI, aMCI)的关系。方法 选入 50 例 aMCI 患者(aMCI 组)和 60 例健康老年人(对照组)为研究对象,记录并比较 2 组年龄、性别、高血压、糖尿病、吸烟、嗜酒。测定并比较 2 组胆固醇(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-C)、尿酸(uric acid, UA)、血浆 Hcy 浓度及 *MTHFR* C677T 基因多态性分布。采用蒙特利尔认知评估量表(montreal cognitive assessment, MoCA)评价 aMCI 患者认知功能与 *MTHFR* C677T 基因多态性和血浆 Hcy 水平的关系。采用 Logistic 回归分析 aMCI 发生的独立危险因素。结果 2 组研究对象在年龄、性别构成、受教育年限、高血压、糖尿病、高血脂、吸烟和饮酒等一般资料方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。2 组研究对象的 TG、HDL-C 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);2 组在 TC、LDL-C、UA、Hcy 水平及 *MTHFR* C677T 基因型分布和等位基因频率比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。aMCI 组 TC、Hcy 水平显著高于对照组($P<0.05$)。与对照组比较,aMCI 组 TT 基因型增高,CC 基因型降低,T 等位基因频率增高,C 等位基因降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同 *MTHFR* C677T 基因型 aMCI 组 Hcy 水平显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。2 组 TT 基因型血浆 Hcy 水平均显著高于 CC 基因型($P<0.05$)。CC、CT 和 TT 基因型 aMCI 患者对应的平均 MoCA 评分分别为(24.37±1.21)分、(23.26±1.02)分和(22.14±0.96)分,差异具有统计学意义($P<0.05$),两两比较差异也具有统计学意义($P<0.05$)。多元 Logistic 回归分析显示,UA 与 aMCI 存在负相关关系,TC、Hcy 和 *MTHFR* C677T 基因型与 aMCI 存在正相关关系。结论 *MTHFR* C677T 基因突变致血浆 Hcy 浓度升高可能是 aMCI 发病及不断进展的重要危险因素。

[关键词] 遗忘性轻度认知功能障碍;亚甲基四氢叶酸还原酶;基因多态性;同型半胱氨酸

Relationship between amnesic mild cognitive impairment, *MTHFR* C677T gene polymorphism and plasma homocysteine level

XING Hongyu^{1*}, LU Ruili², LIANG Ning³, ZHOU Junxia⁴

(1. Clinical Laboratory, Chinese Medicine Hospital of Hainan Province, Haikou, Hainan, China, 570203; 2. Acupuncture and Rehabilitation Department, Chinese Medicine Hospital of Hainan Province, Haikou, Hainan, China, 570203; 3. Haikou Emergency Medical Center, Haikou, Hainan, China, 570311; 4. Central Laboratory, Affiliated Haikou Hospital of Xiangya Medical College, Central South University, Haikou, Hainan, China, 570208)

作者单位:1. 海南省中医院检验科,海南,海口 570203

2. 海南省中医院针灸康复科,海南,海口 570203

3. 海口市 120 急救中心,海南,海口 570311

4. 中南大学湘雅医学院附属海口医院中心实验室,海南,海口 570208

*通信作者:邢红宇, E-mail: yaya-dejia@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between *MTHFR* C677T gene polymorphism and plasma homocysteine (Hcy) level in amnesia mild cognitive impairment (aMCI). **Methods** 50 patients with aMCI (aMCI group), and 60 healthy elderly (control group) were enrolled in this study. The age, gender, hypertension, diabetes, smoking and alcohol addiction were recorded and compared between the 2 groups. Cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), uric acid (UA), plasma Hcy concentration and *MTHFR* gene C677T polymorphism were measured and compared. The relationship between cognitive function and *MTHFR* C677T gene polymorphism or plasma Hcy level in aMCI patients was evaluated using the montreal cognitive assessment (MoCA). Logistic regression was used to analyze the independent risk factors for aMCI. **Results** There was no significant difference in age, gender composition, years of education, hypertension, diabetes, hyperlipidemia, smoking and drinking between the 2 groups ($P>0.05$) and in the levels of TG and HDL-C between the 2 groups ($P>0.05$). The TC, LDL-C, UA, Hcy levels and *MTHFR* C677T genotype distribution and allele frequencies were compared between the 2 groups. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of TC and Hcy in aMCI group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). Compared with the control group, TT genotype increased, CC genotype decreased, T allele frequency increased, and C allele decreased in aMCI group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The Hcy level of aMCI group with different *MTHFR* C677T genotype was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). The plasma Hcy level of TT genotype was significantly higher than that of CC genotype ($P<0.05$). The average MoCA scores of CC, CT and TT genotype of aMCI patients were (24.37 ± 1.21), (23.26 ± 1.02) and (22.14 ± 0.96), respectively. The difference was statistically significant between the 2 groups ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that UA was negatively correlated with aMCI, while TC, Hcy and *MTHFR* C677T genotypes were positively correlated with aMCI. **Conclusion** Increased plasma Hcy concentration caused by *MTHFR* C677T gene mutation may be an important risk factor for the onset and progression of aMCI.

[KEY WORDS] Amnesic mild cognitive impairment; Methylene tetrahydrofolate reductase; Gene polymorphism; Homocysteine

老年痴呆症是一种以记忆力衰退、认知功能障碍、人格改变等为主要症状的中枢神经系统退行性疾病,常见类型包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、血管性痴呆等^[1-2]。轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment, MCI)是介于正常老化和痴呆之间的过渡阶段,其向AD的转化率明显高于正常人群^[3],而以情景记忆受损为核心症状的遗忘型MCI(amnesic MCI, aMCI)又是向AD转化率最高的MCI类型^[4]。近年研究发现,血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高与aMCI的发生密切相关^[5],而Hcy代谢关键酶N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylene tetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)基因突变会对*MTHFR*活性和热稳定性产生不同程度的影响,进而影响体内Hcy浓度^[6]。在此背景下,本研究探讨了*MTHFR* C677T基因多态性及血浆Hcy水平的相关性以及二者与aMCI患者认知功能水平的关系,以期为该病的早期诊断和干预提供依据,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择2017年6月至2018年6月期间海南省中医院神经内科及门诊收治的50例aMCI患者作为研究对象,纳入标准:①符合aMCI诊断标准;②临床资料完整;③对本研究知情同意且签字或摁手印确认。排除标准:①排除由抑郁、癫痫、脑炎、头颅外伤、脑肿瘤等疾病导致的认知障碍;②存在明确精神疾病史;③严重视听力障碍、语言功能障碍或肢体残疾无法配合检查者。并选择60例同期在我院接受健康体检的健康者作为对照组。本研究通过本院伦理委员会的批准。

aMCI诊断标准:参照Petersen诊断标准^[7]及MCI国际工作组修订的诊断程序^[8],①存在主观记忆力减退症状,且病程持续3个月以上;②存在记忆力减退的客观检查证据(低于年龄和受教育程度相对应的对照的1.5个标准差以上);③一般认

知功能和日常生活能力正常;④临床痴呆评定量表测量显示无痴呆。

1.2 方法

1.2.1 一般资料搜集

记录2组研究对象年龄、性别、高血压、糖尿病、卒中、高脂血症病史、吸烟、嗜酒、受教育年限等一般资料。

1.2.2 实验室指标检测

1.2.2.1 生化指标检测

抽取患者晨起空腹外周静脉血5 mL,测定胆固醇(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-C)、尿酸(uric acid, UA)、血浆Hcy浓度。同型半胱氨酸测定试剂盒(循环酶法)和ZS-320型全自动生化分析仪购自中生北控生物科技股份有限公司;胆固醇检测试剂盒(酶比色法)、甘油三酯检测试剂盒(比色法)、低密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒(酶比色法)、高密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒(酶比色法)、尿酸检测试剂盒比色法(比色法)以及P800全自动生化分析仪均购置德国Roche公司。严格按照试剂盒说明书及仪器操作指南进行检测。以上测量均进行3次,以3次重复测定的平均值作为最后结果。

1.2.2.2 MTHFR C677T 基因多态性检测

抽取患者肘静脉血2 mL,置于EDTA抗凝采血管中,于-20℃保存。亚甲基四氢叶酸还原酶基因677C/T检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自深圳奥萨制药有限公司。检测研究对象MTHFR C677T基因型,检测设备为美国ABI公司7500型荧光定量PCR仪。严格按照试剂盒说明书及仪器操作指南进行检测。

1.2.3 认知功能水平测定

采用蒙特利尔认知评估量表(montreal cognitive assessment, MoCA)^[9]评价aMCI组患者认知功能水平,该量表包括8个认知领域:①视空间/执行能力(5分):包括交替连线(1分)、三维立方体图形复制(1分)、画钟测验(3分);②命名(3分);③记忆功能(不评分):对5个词语的2遍学习记忆和5 min后延迟记忆测验,词语流畅性测验(1分),延迟记忆(5分);④注意力(6分):包括数字广度测试(2分)、警觉性(1分)、连续减7(3分);⑤语言(3分):包括复述(2分)、语言流畅性(1分);⑥抽

象思维能力(2分);⑦延迟回忆(5分);⑧定向能力(6分):包括时间定向和地点定向。总分设为30分,若教育年限≤12年加1分,MoCA评分在27~30分为正常,<27分为认知功能障碍,MoCA评分≤13分(文盲)、≤19分(小学毕业)、≤24分(初中毕业及以上)为痴呆。以上评分均由经专业培训合格的护士进行。

1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0软件,其中多组计量资料的比较采用F检验,2组计量资料采用t检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验。采用Logistic回归分析aMCI发生的独立危险因素。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组一般资料比较

2组研究对象在年龄、性别构成、受教育年限、高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟和饮酒等一般资料方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 2组一般资料比较

Table 1 Comparison of general information of the 2 groups

一般资料	aMCI组 (n=50)	对照组 (n=60)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	65.46±5.89	65.37±6.98	0.072	0.943
性别			0.401	0.526
男	27	36		
女	23	24		
受教育年限(年)	10.18±1.61	10.03±1.94	0.436	0.664
高血压			0.185	0.667
有	32	36		
无	18	24		
糖尿病			2.054	0.152
有	14	10		
无	36	50		
高血脂			0.001	0.970
有	16	19		
无	34	41		
吸烟			2.522	0.112
是	25	39		
否	25	21		
饮酒			1.184	0.276
是	31	31		
否	19	29		

2.2 2组实验室检测指标比较

2组研究对象TG、HDL-C水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);2组在TC、LDL-C、UA、Hcy水平及MTHFR C677T基因型分布和等位基因频率比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

aMCI组TC、Hcy水平显著高于对照组($P<0.05$)。与对照组比较,aMCI组TT基因型比例增加,CC基因型比例降低,T等位基因频率增高,C等位基因降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 2组实验室检测指标比较
Table 2 Comparison of laboratory indexes of the 2 groups

实验室指标	aMCI组(n=50)	对照组(n=60)	t/χ^2 值	P值
TC(mmol/L)	5.26±1.37*	4.38±0.47	4.661	0.000
TG(mmol/L)	1.87±0.62	1.72±0.61	1.275	0.205
LDL-C(mmol/L)	2.56±0.45	2.51±0.39	0.624	0.534
HDL-C(mmol/L)	1.34±0.42	1.41±0.39	0.905	0.367
UA(μmol/L)	234.65±39.58*	314.25±42.75	10.055	0.000
Hcy(μmol/L)	17.43±2.39*	11.02±1.95	15.492	0.000
MTHFR C677T 基因型			9.144	0.010
CC	15	32		
CT	16	19		
TT	19	9		
MTHFR C677T 等位基因			12.070	0.000
C	46	83		
T	54	37		

与对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 2组MTHFR C677T基因型血浆Hcy水平的比较

aMCI组中不同MTHFR C677T基因型患者的Hcy水平均显著高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。组内两两比较后发现,2组TT基因型的血浆Hcy水平均显著高于CC基因型的血浆Hcy水平($P<0.05$),2组CT与TT基因型,CT与CC基因型的血浆Hcy水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表3。

2.4 不同MTHFR C677T基因型aMCI患者MoCA评分比较

CC、CT和TT基因型aMCI患者对应的平均MoCA评分分别为(24.37±1.21)分、(23.26±1.02)分和(22.14±0.96)分,差异具有统计学意义($F=18.681, P=0.000$),两两比较差异也具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 Logistic回归分析aMCI发生的危险因素

单变量Logistic回归分析显示TC、UA、Hcy

表3 2组MTHFR C677T基因型血浆Hcy水平的比较
($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

Table 3 Comparison of plasma Hcy levels in 2 groups of MTHFR C677T genotypes ($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	血浆Hcy水平		
	CC	TT	CT
aMCI组	15.40±2.26*	18.97±2.02**	17.51±4.28*
对照组	10.15±2.91	12.42±1.01#	11.81±3.04
t值	6.158	12.432	3.575
P值	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,* $P<0.05$;与同组CC型比较,# $P<0.05$ 。

水平和MTHFR C677T基因型与aMCI相关。进一步采用多元Logistic回归分析显示,UA与aMCI存在负相关关系,可能是aMCI的保护因素;TC、Hcy和MTHFR C677T基因型与aMCI存在正相关关系,可能是aMCI的危险因素,见表4。

表4 aMCI发生危险因素 Logistic 回归分析
Table 4 Logistic regression analysis of risk factors for aMCI

因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	P值	OR值	OR值 95%置信区间	
						下限	上限
TC	0.578	0.256	5.098	0.026	1.782	1.079	2.944
UA	-0.035	0.234	0.022	0.023	0.966	0.610	1.528
Hcy	1.369	0.341	16.118	0.032	3.931	2.015	7.670
<i>MTHFR</i> C677T 基因型	0.658	0.472	1.943	0.001	1.931	0.766	4.870

3 讨论

随着人口老龄化进程加速以及医疗卫生水平的提高,人类寿命明显延长,老年痴呆发病率逐年升高,业已成为全球性的公共卫生问题之一。其中AD是最常见的类型,具有病程长且不可逆、医疗护理负担重等特点,不仅严重危害患者的健康,同时也给家庭及社会造成巨大而沉重的负担。MCI是老年痴呆的过渡阶段,根据记忆功能是否受损,可进一步分为遗忘型MCI和非遗忘型MCI。aMCI以记忆损害为主,是MCI最常见的类型,也是AD型痴呆的高危人群。但aMCI的转归具有高度异质性,其中40%以上的患者可逆转为正常人,10%~15%可进展为AD,部分维持MCI状态或发展为其他疾病^[10]。因此,明确AD及aMCI患者的相关生物学指标,尽早准确诊断aMCI并予以积极干预,对疾病的转归及降低AD发生率具有重要意义。

本研究比较了aMCI患者和健康者一般资料、血清生化指标和*MTHFR* C677T基因型分布情况,结果显示2组研究对象的年龄、性别构成、受教育年限、高血压、糖尿病、高血脂、吸烟和饮酒等一般资料差异无统计学意义。流行病学调查结果显示高血压、糖尿病等是认知功能障碍发生的危险因素^[11],但本研究结果显示2组研究对象高血压、糖尿病发生率无显著差异,这可能与本研究纳入人群年龄较大有关,该人群中高血压和糖尿病发生率较高。血清生化指标检测结果则显示,2组在TC、LDL-C、UA、Hcy水平及*MTHFR* C677T基因型分布和等位基因频率比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),aMCI组UA水平显著低于对照组($P < 0.05$)。有报道显示,Hcy水平与认知功能呈负相关,Hcy水平越高,认知功能下降越严重^[12]。李扬娜等^[13]研究结果也显示aMCI血浆Hcy水平显著高

于健康对照组($P < 0.05$),另外aMCI患者*MTHFR* C677T基因T等位基因分布频率显著高于对照组,与本研究结果一致。Hcy是甲硫氨酸脱甲基后形成的一种含硫氨基酸,参与体内多种能量代谢过程和甲基化反应^[14],是目前公认的心脑血管性疾病的危险因素,与动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、中风、心肌梗死等的发生密切相关。近年研究发现,血浆Hcy水平升高也是认知功能损伤、痴呆的危险因素^[15]。高Hcy可产生神经毒性而致神经元损伤,同时产生大量氧自由基,介导氧化应激反应,造成血管内皮损伤,导致动脉粥样硬化,从而进一步降低认知功能,最终发生痴呆^[16]。

目前尚未见到有关*MTHFR* C677T基因型与aMCI患者认知功能水平关系的报道。本研究采用蒙特利尔认知评估量表评价aMCI患者认知功能水平,并分析了不同*MTHFR* C677T基因型与aMCI患者认知功能水平的关系,结果表明,*MTHFR* C677T基因CC、CT和TT3种基因型认知功能水平两两比较差异具有统计学意义,其中TT型患者认知功能水平最低,其次为CT型患者。这可能与TT型患者血浆Hcy水平最高,心脑血管损害最为严重有关。*MTHFR*是血浆Hcy代谢的限速酶,其活性降低则可引起Hcy水平的升高。编码*MTHFR*的基因具有多态性,其中以C677T多态性最为常见,是指编码该酶的基因在第677位的核苷酸碱基发生错义突变,由碱基T替换了碱基C,继而产生了Hinf I限制性酶切位点,导致*MTHFR*活性及稳定性下降^[17],已知突变TT纯合子的酶活性仅有正常的30%,CT杂合子的酶活性是正常的65%,从而使Hcy代谢通路受阻而导致其在血液中蓄积,诱发多种疾病^[18]。

本研究结果还显示aMCI发生与TC水平呈正相关关系,这可能与TC水平升高能够损害脑血管

内皮细胞,引起脑动脉粥样硬化,减少脑部血流有关。本研究采用 Logistic 回归分析 aMCI 发生的危险因素,结果表明 UA 可能是 aMCI 的保护因素,TC、Hcy 和 *MTHFR* C677T 基因型可能是 aMCI 的危险因素。以往有研究表明高水平 UA 能够减缓 MCI 患者认知功能下降速度^[19],降低痴呆发病风险^[20]。UA 对认知功能的保护作用主要原因是 UA 是体内天然的抗氧化剂,对超氧化物、羟自由基、活性氧具有良好的清除能力。病理状态下,中枢神经系统内活性氧和抗氧化系统之间的平衡被打破,活性氧对中枢神经系统造成损伤,影响认知功能,而 UA 通过清除活性氧,起到保护海马神经元的作用,进而保护人体认知功能^[21]。

由此可见,*MTHFR* C677T 基因突变致血浆 Hcy 浓度升高可能是 aMCI 发病及不断进展的重要危险因素,尽早采取有效措施降低 Hcy 水平可能是逆转 aMCI、减少 AD 发生的有效手段。

参考文献

- [1] 邓小岚,葛兆霞. 记忆诱导在老年痴呆病人中应用的对比性研究[J]. 护理研究, 2013, 27(6): 528-530.
- [2] Ginsberg SD, Alldred MJ, Che S. Gene expression levels assessed by CA1 pyramidal neuron and regional hippocampal dissections in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Disease*, 2012, 45(1): 99-107.
- [3] 云德波,夏学巍,杜贻庆. 功能性核磁共振在轻度认知功能障碍中的研究进展[J]. 重庆医学, 2013, 42(24): 2915-2917.
- [4] 吴娟,顾红梅. 遗忘型轻度认知障碍的脑功能网络研究进展[J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(9): 1374-1376.
- [5] 程艳华,张兰,申恂,等. 老年轻度认知功能障碍患者血浆同型半胱氨酸与甲状腺激素水平的关系研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(23): 2771-2775.
- [6] Ueland PM, Hustad S, Schneede J, et al. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2001, 22(4): 195-201.
- [7] Petersen RC, Negash S. Mild cognitive impairment: an overview [J]. *CNS Spectrums*, 2008, 13(1): 45-53.
- [8] Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, et al. Mild cognitive impairment-beyond controversies, towards a consensus: Report of the international working group on mild cognitive impairment [J]. *J Intern Med*, 2004, 256(3): 240-246.
- [9] Sacramento V, Endler M, Rubinsztein HK, et al. MoCA: A Middleware for developing collaborative applications for mobile users [J]. *IEEE Distributed Systems Online*, 2004, 5(10): 2.
- [10] 朱琳,廖文象,束昊,等. 载脂蛋白 E 基因多态性对遗忘型轻度认知功能障碍患者脑血流灌注的影响 [J]. 中华神经医学杂志, 2017, 16(9): 924-932.
- [11] 郭建敏,谭倩,李倩,等. 血管性认知功能障碍相关危险因素的临床研究 [J]. 神经损伤与功能重建, 2012, 7(5): 348-350.
- [12] 杨昊翔,尹立勇,崔志杰. 高同型半胱氨酸血症与老年人认知功能障碍相关性研究 [J]. 临床荟萃, 2011, 26(12): 1026-1028.
- [13] 李扬娜,曾红梅,周璐,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性、血浆同型半胱氨酸水平与遗忘型轻度认知功能障碍的关系 [J]. 实用临床医学, 2017, 18(3): 1-3.
- [14] 何晶伟,周瑞华,魏剑芬,等. 4 种 B 族维生素、同型半胱氨酸与心脑血管疾病 [J]. 山东医药, 2010, 50(36): 110-111.
- [15] 王慧琪,宋开义,杨平,等. 不同认知损害的痴呆患者血浆同型半胱氨酸水平及 VitB12 和叶酸的干预效果研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2015, 37(4): 393-396.
- [16] Piazza F, Galimberti G, Conti E, et al. Increased tissue factor pathway inhibitor and homocysteine in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2012, 33(2): 226-233.
- [17] Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity [J]. *Molecular Genetics & Metabolism*, 1998, 64(3): 169-172.
- [18] 籍玉红. 卒中后抑郁患者认知功能、同型半胱氨酸以及 *MTHFR* 基因多态性的相关研究 [J]. 中国临床医生杂志, 2015, 43(5): 47-51.
- [19] Irizarry MC, Raman R, Schwarzschild MA, et al. Plasma urate and progression of mild cognitive impairment [J]. *Neurodegenerative Diseases*, 2009, 6(1-2): 23-28.
- [20] Euser SM, Hofman A, Westendorp RGJ, et al. Serum uric acid and cognitive function and dementia [J]. *Brain*, 2009, 132(2): 377-382.
- [21] Du Y, Chen C, Tseng C, et al. Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity [J]. *Glia*, 2010, 55(5): 463-472.

三亚市汉族和黎族女性 *MTHFR* 与 *MTRR* 基因多态性分布特征

吴利 陈少金 李周扬 陈谦 黎元莉*

[摘要] **目的** 分析三亚市汉族和黎族女性 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) 与甲硫氨酸合成酶还原酶 (methionine synthase reductase, *MTRR*) 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 分布特征, 为个体化指导女性增补叶酸及预防出生缺陷提供依据。 **方法** 以三亚市 420 例黎族女性及 1 590 例汉族女性为研究对象, 采集其口腔黏膜上皮细胞, 提取基因组 DNA, 采用荧光定量 PCR 方法对 *MTHFR* C677T、A1298C 和 *MTRR* A66G 基因位点多态性进行检测分析, 并与其他已报道的民族进行比较。 **结果** 三亚市黎族女性 *MTHFR* C677T 位点基因多态性分布与思南苗族、延边朝鲜族、南宁壮族、乌苏哈萨克族、银川回族、新疆维吾尔族、张家界土家族相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。 *MTHFR* A1298C 位点基因多态性分布与三亚汉族、思南苗族、延边朝鲜族、银川回族、张家界土家族相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。 *MTRR* A66G 位点基因多态性分布与三亚汉族、思南苗族、延边朝鲜族、南宁壮族、银川回族、张家界土家族相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。 **结论** 三亚市黎族女性 *MTHFR* 和 *MTRR* 基因多态性分布不同于其他民族, 具有民族特异性。

[关键词] 三亚黎族; 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶; 甲硫氨酸合成酶还原酶; 单核苷酸多态性

Distribution characteristics of *MTHFR* and *MTRR* gene polymorphisms among Han and Li women in Sanya city

WU Li, CHEN Shaojin, LI Zhouyang, CHEN Qian, LI Yuanli*

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Sanya City, Sanya, Hainan, China, 572000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the distribution characteristics of single nucleotide polymorphism (SNP) of *MTHFR* and *MTRR* gene among Han and Li women in Sanya city. To provide individualized guidance for women to supplement folic acid and prevent birth defects. **Methods** A total of 420 Li women and 1 590 Han women were enrolled from Sanya city. Oral epithelial cells were collected to extract genome DNA, fluorogenic quantitative PCR technology was used to detect *MTHFR* and *MTRR* gene polymorphisms, and then compared with those of other nationalities in China. **Results** *MTHFR* C677T gene polymorphism distribution of Li women in Sanya was significant different from Miao women in Sinan, Korean women in Yanbian, Zhuang women in Nanning, Kazak women in Wusu, Hui women in Yinchuan, Uygur women in Xinjiang, Tujia women in Zhangjiajie ($P < 0.05$). *MTHFR* A1298C gene polymorphism distribution of Li women in Sanya was significant different from Han women in Sanya, Miao women in Sinan, Korean women in Yanbian, Hui women in Yinchuan, Tujia women in Zhangjiajie ($P < 0.05$). *MTHFR* A66G gene polymorphism distribution of Li women in Sanya was significant different from Han women in Sanya, Miao

基金项目: 三亚市科技创新项基金(YW1248; 2015YW38)

作者单位: 海南省三亚市人民医院检验科, 海南, 三亚 572000

*通信作者: 黎元莉, E-mail: li-yuanli@163.com

women in Sinan, Korean women in Yanbian, Zhuang women in Nanning, Hui women in Yinchuan, Tujia women in Zhangjiajie ($P<0.05$). Conclusion The *MTHFR*, *MTRR* polymorphism of Li women in Sanya city is ethnically specific.

[KEY WORDS] Li Nationality in Sanya; Methylenetetrahydrofolate reductase; Methionine synthase reductase; Single nucleotide polymorphisms

5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)和甲硫氨酸合成酶还原酶(methionine synthase reductase, *MTRR*)是叶酸代谢途径中的关键酶,*MTHFR* C677T、A1298C和*MTRR* A66G基因位点多态性可使其相应酶活性降低,在同型半胱氨酸转变为甲硫氨酸的过程中出现障碍,造成叶酸水平降低及血浆中同型半胱氨酸浓度升高^[1-2]。而同型半胱氨酸水平的升高可使新生儿神经管缺陷、唇腭裂、先心病及孕产妇妊娠高血压、贫血、自发性流产等疾病发生风险增加^[3-4]。*MTHFR*与*MTRR*基因多态性存在地区及民族的分布差异,目前尚未见三亚地区关于叶酸利用能力的大样本研究报告。本文对三亚市汉族和黎族女性*MTHFR*与*MTRR*基因多态性进行分析,并与国内其他民族进行对比,旨在阐明本地区人群的遗传特征,为出生病因学研究及基于遗传特征的个体化治疗提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

根据知情同意原则,选择2014年10月至2018年7月在三亚市人民医院进行孕前或孕期检查的汉族女性1 590例,年龄(27.55 ± 4.79)岁;黎族女性

420例,年龄(26.65 ± 4.67)岁。排除非本地区户籍以及DNA抽提不符合要求的人群,所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器及试剂

MTHFR C677T、A1298C位点和*MTRR* A66G位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)分型采用Taqman-MGB技术测定。仪器:低温离心机Beckman J-6BABI、ABI 7900型荧光定量PCR仪;试剂:Buffer A、Buffer B、饱和酚、氯化钠及异丙醇等。相关仪器、试剂均使用美国Applied Biosystems(AB)公司产品。

1.3 基因分型

采集口腔黏膜上皮细胞,采用硅胶吸附法提取基因组DNA。采用荧光定量PCR技术检测*MTHFR* C677T、A1298C和*MTRR* A66G基因位点SNP。PCR反应体系为10 μ L,包含1 μ L基因组DNA(20 ng/ μ L),5 μ L Taqman Universal Master Mix,0.5 μ L Taqman-MGB探针(表1),3.5 μ L去离子水。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;92 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C延伸1 min,20个循环;89 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C延伸90 s,30个循环。反应完成后,在ABI 7900型荧光定量PCR仪上读取样品孔中的终点荧光,利用分析软件确定各个样本的基因分型结果。

表1 Taqman-MGB探针所在位置
Table 1 Taqman-MGB probe location

基因多态位点	检测探针所在位置
<i>MTHFR</i> C677T	GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG[G/A]CTCCCGCAGACACCTTCTCCTTCAA
<i>MTHFR</i> A1298C	AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT[G/T]CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCCA
<i>MTRR</i> A66G	AGGCAAAGCCATCGCAGAAGAAAT[A/G]TGTGAGCAAGCTGTGGTACATGGAT

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0进行统计学分析,采用Haplo-View 4.2进行Hardy-Weinberg平衡、LD水平及单

倍型结构分析。计数资料采用百分率表示,对基因型及等位基因频率进行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡分析

对三亚市 1 590 例汉族和 420 例黎族女性 *MTHFR* C677T、A1298C 和 *MTRR* A66G 基因位点的检测数据进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。其中,汉族女性 *MTHFR* C677T 位点不符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($\chi^2=14.83, P<0.05$), 不具有本地区代表性, 后文不予分析; 黎族女性的 *MTHFR* C677T 位点及汉族和黎族女性的 *MTHFR* A1298C 与 *MTRR* A66G 位点检验结果符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 ($P>0.05$), 具三亚地区群体代表性。

2.2 三亚黎族女性与不同民族女性 *MTHFR*、*MTRR* 基因型和等位基因频率分布比较

三亚黎族女性 *MTHFR* C677T 位点基因型分布及等位基因频率与思南苗族^[5]、延边朝鲜

族^[6]、南宁壮族^[7]、乌苏哈萨克族^[8]、银川回族^[9]、新疆维吾尔族^[10]、张家界土家族^[11]相比均有显著性差异 ($P<0.05$)。三亚黎族女性 *MTHFR* A1298C 位点基因型分布及等位基因频率与南宁壮族^[7]、乌苏哈萨克族^[8]、新疆维吾尔族^[10]相比无显著性差异 ($P>0.05$), 与文中其他民族相比有显著性差异 ($P<0.05$)。三亚黎族女性 *MTRR* A66G 位点基因型分布及等位基因频率与乌苏哈萨克族^[8]和新疆维吾尔族^[10]相比无显著差异 ($P>0.05$), 与文中其他民族相比有显著性差异 ($P<0.05$) (表 2、3)。

2.3 *MTHFR* C677T 和 A1298C 两位点连锁情况及单倍型分析

三亚市黎族女性 *MTHFR* C677T 和 A1298C 两位点组合情况见表 4。单倍型结构分析结果显示存在 3 种组合 AC (56.1%)、CC (30.6%)、AT (13.3%)。两位点存在连锁不平衡现象 ($D'=1.00, r^2=0.07$)。

表 2 三亚黎族与不同民族女性 *MTHFR*、*MTRR* 基因型频数与频率 [$n(\%)$]

Table 2 Comparison of *MTHFR* and *MTRR* genotype distribution and frequencies between the Li women in Sanya and other different nations [$n(\%)$]

民族	<i>n</i>	<i>MTHFR</i> C677T			χ^2	<i>P</i>	<i>MTHFR</i> A1298C			χ^2	<i>P</i>	<i>MTRR</i> A66G			χ^2	<i>P</i>
		CC	CT	TT			AA	AC	CC			AA	AG	GG		
三亚黎族	420	315 (75.00)	98 (23.33)	7 (1.67)			210 (50.00)	163 (38.81)	47 (11.19)			157 (37.38)	201 (47.86)	62 (14.76)		
三亚汉族	1590	/	/	/			953 (59.94)	539 (33.90)	98 (6.16)	19.60	0.00	769 (48.36)	683 (42.96)	138 (8.68)	22.87	0.00
思南苗族 ^[5]	263	96 (36.50)	133 (50.57)	34 (12.93)	109.47	0.00	168 (63.88)	85 (32.32)	10 (3.80)	18.08	0.00	151 (57.41)	97 (36.88)	15 (5.70)	30.63	0.00
延边朝鲜族 ^[6]	261	81 (31.03)	131 (50.19)	49 (18.77)	145.33	0.00	173 (66.28)	81 (31.03)	7 (2.68)	25.00	0.00	140 (53.64)	97 (37.17)	24 (9.20)	17.91	0.00
南宁壮族 ^[7]	455	279 (61.32)	153 (33.63)	23 (5.06)	21.40	0.00	256 (56.26)	157 (34.51)	42 (9.23)	3.54	0.17	229 (50.33)	182 (40.00)	44 (9.67)	16.06	0.00
乌苏哈萨克族 ^[8]	120	69 (57.50)	45 (37.50)	6 (5.00)	15.40	0.00	59 (49.17)	49 (40.83)	12 (10.00)	0.23	0.89	42 (35.00)	55 (45.83)	23 (19.17)	1.38	0.50
银川回族 ^[9]	242	81 (33.47)	121 (50.00)	40 (16.53)	125.04	0.00	152 (62.81)	83 (34.30)	7 (2.89)	18.41	0.00	106 (43.80)	116 (47.93)	20 (8.26)	6.83	0.03
新疆维吾尔族 ^[10]	91	44 (48.35)	37 (40.66)	10 (10.99)	35.60	0.00	55 (60.44)	29 (31.87)	7 (7.69)	3.40	0.18	31 (34.07)	45 (49.45)	15 (16.48)	0.41	0.82
张家界土家族 ^[11]	1065	443 (41.60)	467 (43.85)	155 (14.55)	145.03	0.00	675 (63.38)	346 (32.49)	44 (4.13)	37.05	0.00	567 (53.24)	425 (39.91)	73 (6.85)	40.77	0.00

χ^2 和 *P* 值表示各民族与三亚黎族的统计差异值情况。“/”表示汉族女性 *MTHFR* C677T 位点不符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 不具有本地区代表性, 不予分析。

表3 三亚黎族与不同民族女性 *MTHFR*、*MTRR* 等位基因频数与频率 [n(%)]

Table 3 Comparison of *MTHFR* and *MTRR* allele frequencies between the Li women in Sanya and other different nations [n(%)]

民族	n	<i>MTHFR</i> C677T		χ^2	P	<i>MTHFR</i> A1298C		χ^2	P	<i>MTRR</i> A66G		χ^2	P
		C	T			A	C			A	G		
三亚黎族	420	728 (86.67)	112 (13.33)			583 (69.40)	257 (30.60)			515 (61.31)	325 (38.69)		
三亚汉族	1590	/	/			2445 (76.89)	735 (23.11)	20.01	0.00	2508 (69.84)	1156 (30.16)	15.79	0.00
思南苗族 ^[5]	263	32 (61.80)	201 (38.20)	113.35	0.00	421 (80.00)	105 (20.00)	18.78	0.00	399 (75.90)	127 (24.10)	30.91	0.00
延边朝鲜族 ^[6]	261	293 (56.13)	229 (43.87)	159.95	0.00	427 (81.80)	95 (18.20)	25.81	0.00	377 (72.22)	145 (27.78)	16.96	0.00
南宁壮族 ^[7]	455	711 (78.10)	199 (21.90)	21.77	0.00	669 (73.50)	241 (26.50)	3.63	0.06	640 (70.30)	270 (29.70)	15.84	0.00
乌苏哈萨克族 ^[8]	120	183 (76.20)	57 (23.80)	15.34	0.00	167 (69.60)	73 (30.40)	0.00	0.96	139 (57.90)	101 (42.10)	0.90	0.34
银川回族 ^[9]	242	283 (58.50)	201 (51.80)	135.23	0.00	387 (80.00)	97 (20.00)	17.46	0.00	328 (67.80)	156 (32.20)	5.54	0.02
新疆维吾尔族 ^[10]	91	125 (68.70)	57 (31.30)	35.06	0.00	139 (76.40)	43 (23.60)	3.50	0.06	107 (58.80)	75 (41.20)	0.40	0.53
张家界土家族 ^[11]	1065	1353 (63.50)	777 (36.50)	153.88	0.00	1696 (79.60)	434 (20.40)	35.24	0.00	1559 (73.20)	571 (26.80)	40.38	0.00

“/”表示汉族女性 *MTHFR* C677T 位点不符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,不具有本地区代表性,不予分析。

表4 *MTHFR* C677T 和 A1298C 连锁型分布 [n(%)]

Table 4 Distribution of linkage between *MTHFR* C677T and A1298C [n(%)]

位点		<i>MTHFR</i> C677T		
		CC	CT	TT
<i>MTHFR</i> A1298C	AA	135 (32.14)	68 (16.19)	7 (1.67)
	AC	133 (31.67)	30 (7.14)	0 (0.00)
	CC	47 (11.19)	0 (0.00)	0 (0.00)

3 讨论

叶酸是一种水溶性维生素,在生物体内以四氢叶酸的形式发挥作用,四氢叶酸是细胞生化反应中甲基的主要供应者,参与嘌呤及嘧啶的合成及同型半胱氨酸的代谢^[12]。叶酸缺乏可引起5-甲基四氢叶酸水平下降,从而使S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)水平下降,最终导致DNA低甲基化。此外,低叶酸水平还可使尿嘧啶错误掺入DNA,使DNA链断裂增加,并可导致DNA在复制过程中错误发生率增加,影响DNA的

生物合成。体内叶酸水平由叶酸摄入量和叶酸代谢水平决定,正常的叶酸水平对于正常胚胎生长和发育是必不可少的^[13]。现已有研究表明,叶酸代谢障碍与唇腭裂、先天愚型、心脏畸形、多发畸形、泌尿系统畸形、肢体畸形、妊娠期贫血、妊娠期高血压的发生具有相关性^[14]。叶酸缺乏在我国汉族女性中的发生率极高,远高于欧美国家。

叶酸代谢过程是一个涉及包括5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(*MTHFR*)、甲硫氨酸合成酶(*MTR*)、甲硫氨酸合成酶还原酶(*MTRR*)和胱硫醚-β-合酶(*CBS*)等多种酶参与的过程,其中*MTHFR*和*MTRR*是叶酸代谢过程中发挥重要作用且突变率较高的关键酶^[13]。在叶酸代谢过程中,*MTHFR*是叶酸活化的核心酶,也是同型半胱氨酸代谢和甲硫氨酸合成的关键酶,其不可逆地催化5, 10-亚甲基四氢叶酸转化为5-甲基四氢叶酸。而*MTRR*是参与同型半胱氨酸代谢的关键酶,其通过催化还原维生素B₁₂(甲基钴胺素)甲基化状态而维持*MTR*的活性,是平衡同型半胱氨酸水平的关键因素。相关研究已证实,*MTHFR*和*MTRR*基因位点多态性均可引起酶活性降低,从而影响叶酸代谢,造成同型半胱氨酸的堆积,增

加出生缺陷发生的风险^[15]。本研究针对三亚市黎族和汉族女性中 *MTHFR* 最常见的突变位点 *MTHFR* C677T 和 A1298C, 以及 *MTRR* 最常见的突变位点 *MTRR* A66G 这 3 个基因位点的多态性进行检测分析, 以阐明本地区不同民族人群的遗传特征, 了解其与国内其他民族基因多态性分布的差异, 为下一步有针对性的进行出生缺陷干预奠定基础。

本研究结果显示, 三亚黎族女性的 *MTHFR* C677T 位点基因型分布及等位基因频率与思南苗族^[5]、延边朝鲜族^[6]、南宁壮族^[7]、乌苏哈萨克族^[8]、银川回族^[9]、新疆维吾尔族^[10]、张家界土家族^[11]相比均有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明该位点的多态性分布存在民族差异。除去乌苏哈萨克族和新疆维吾尔族, 本文列举的其他少数民族符合从北到南 T 等位基因频率逐渐递减的趋势 (最高为银川 51.80%, 最低为三亚 13.33%), 与汉族的地域分布规律相似^[16], 该位点的多态性分布存在地域差异。三亚市黎族与汉族女性的 *MTHFR* A1298C 和 *MTRR* A66G 位点多态性存在显著性差异 ($P < 0.05$), 说明这 2 个位点在相同地区的不同民族间存在差异, 该差异与地域分布无关。三亚黎族女性 *MTHFR* A1298C 位点基因型分布及等位基因频率除与南宁壮族^[7]、乌苏哈萨克族^[8]、新疆维吾尔族^[10]相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 与文中列举的其他民族相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。除去乌苏哈萨克族和新疆维吾尔族, 本文列举的其他少数民族符合从北到南 C 等位基因频率逐渐递增的趋势 (最高为三亚 30.60%, 最低为延边 18.20%), 该位点的多态性分布存在一定的地域差异, 但差异性没有 *MTHFR* C677T 位点的强。三亚黎族女性 *MTRR* A66G 位点基因型分布及等位基因频率除与乌苏哈萨克族^[8]和新疆维吾尔族^[10]相比无显著差异 ($P > 0.05$), 与文中列举其他民族相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。表明 *MTHFR* A1298C 和 *MTRR* A66G 位点的多态性分布存在民族差异, 但其民族特异性可能没有 *MTHFR* C677T 位点强。*MTHFR* C677T 和 *MTHFR* A1298C 位点多态性的分布存在地域差异, *MTRR* A66G 位点的多态性分布未发现地域差异。

我国汉族人群 *MTHFR* C677T 位点的多态性具有地域性差异, T 等位基因频率呈现北高南低的趋势, *MTHFR* A1298C 和 *MTRR* A66G 位点多态性的地域差异相对来说比较不明显^[16]。而三亚市汉族人口来源驳杂, 祖籍本地的汉族居民所占比例

较少, 这可能是造成 *MTHFR* C677T 位点不符合 Hardy-Weinberg 平衡的原因。

本研究对三亚黎族女性的 *MTHFR* C677T 和 A1298C 两位点均进行了单倍型连锁不平衡研究。*MTHFR* C677T 位点位于第一号染色体 *MTHFR* 基因第 5 个外显子上, 物理位置为 11796321 bp。*MTHFR* A1298C 位点位于第一号染色体 *MTHFR* 基因第 8 个外显子上, 物理位置为 11794419 bp。理论上, 连锁不平衡性随着遗传距离的增加而下降, 通过分析, $D' = 1.00$, 表明两位点间存在连锁关系, $r^2 = 0.07$, 表明两位点间的连锁强度不高。三亚黎族女性的 *MTHFR* C677T 和 A1298C 两位点间存在连锁平衡, 但连锁强度不高, 可能发生了基因重组等情况。

目前孕期保健措施为育龄妇女从孕前 3 个月至妊娠满 3 个月每日补服叶酸, 根据不同的生育史、家族史等情况服用不同剂量^[17]。而叶酸代谢障碍的人群, 对叶酸的利用率较低。通过遗传筛查, 可针对存在叶酸代谢障碍的人群采取增加营养素补充, 加强监测等等干预措施, 达到出生缺陷一级预防的目的, 以达到预防出生缺陷儿出生和提高人口素质的目的。

参考文献

- [1] 贺先民, 张群, 杨琦, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18 (1): 13-18.
- [2] Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydro folate reductase (*MTHFR*) [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, 78(1): 523-526.
- [3] Chen P, Poddar R, Tipa E V, et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease [J]. *Advances in enzyme regulation*, 1999, 39 (1): 93-109.
- [4] Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71: 1295-1303.
- [5] 毛万成, 鲁衍强, 薛琰, 等. 贵州思南县汉族与苗族、土家族女性 *MTHFR*、*MTRR* 基因多态性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 23 (5): 310-313.
- [6] 于延辉, 鲁衍强, 李瑛, 等. 延边朝鲜族自治州汉族女性和朝鲜族女性 *MTHFR* 与 *MTRR* 基因多态性分布研究[J]. 实用医学杂志, 2014, 30 (5月增刊): 7-9.

(下转第 62 页)

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义

王静 李馨筱* 吴琳娜 刘凡

[摘要] 目的 探讨弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)组织核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)/p65、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达及其对临床 B 症状、国际预后指数(international prognostic index, IPI)得分、临床分期等病理特征和预后的影响。方法 组织标本来自于 2012 年 3 月至 2015 年 2 月我院接受手术治疗的 78 例 DLBCL 患者和 30 例反应增生性淋巴结患者,采用免疫组化方法比较 DLBCL 患者和反应增生性淋巴结患者淋巴组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况,分析它们与病理参数、生存期的关系。结果 DLBCL 组织中,NF- κ B/p65 和 Bcl-2 阳性率分别为 39.74%和 51.28%,显著高于反应增生性淋巴结组织($P<0.05$),Bax 阳性率为 32.05%,显著低于反应增生性淋巴结组织($P<0.05$);DLBCL 组织 NF- κ B/p65 阳性表达与 B 症状、IPI 得分、临床分期有关($P<0.05$),Bcl-2 阳性表达与 IPI 得分、临床分期有关($P<0.05$),Bax 阳性表达与临床分期有关($P<0.05$);NF- κ B/p65 与 Bcl-2 呈正相关($r=0.53, P<0.05$),NF- κ B/p65 与 Bax 呈负相关($r=-0.51, P<0.05$),Bcl-2 与 Bax 呈负相关($r=-0.62, P<0.05$);NF- κ B/p65、Bcl-2 阳性表达者生存期较短,Bax 阳性表达者生存期较长。结论 DLBCL 组织中 NF- κ B/p65、Bcl-2 高表达,Bax 低表达,有助于 DLBCL 预后评估。

[关键词] DLBCL; NF- κ B/p65; Bcl-2; Bax; 生存分析

Expression and significance of nuclear factor κ B/p65, Bcl-2 and Bax in diffuse large B-cell lymphoma

WANG Jing, LI Xinxiao*, WU Linna, LIU Fan

(Department of Health Management, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression of NF- κ B/p65, Bcl-2 and Bax in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and the effect on pathological characteristics such as clinical B symptoms, international prognostic index (IPI) scores, clinical stage and prognosis. Methods Tissue samples were obtained from 78 patients with DLBCL and 30 patients with reactive proliferative lymph nodes who underwent surgery from March 2012 to February 2015. Immunohistochemical methods were used to compare lymphoid tissue NF- κ B/p65, Bcl-2 and Bax protein expression in patients with DLBCL or reactive proliferative lymph nodes, their relationship with pathological parameters and survival time was analyzed. Results The positive rates of NF- κ B/p65 and Bcl-2 in DLBCL tissues were 39.74% and 51.28%, respectively, significantly higher than those in the proliferative lymph node tissues ($P<0.05$). The positive rate of Bax was 32.05%, significantly lower than that in the reaction hyperplasia lymph node tissue ($P<0.05$). NF- κ B/p65 positive expression in DLBCL was associated with B symptoms, IPI score and clinical stage ($P<0.05$), Bcl-2 positive

基金项目:四川省科技厅支撑计划项目(2010SZ0170)

作者单位:四川大学华西医院健康管理中心,四川,成都 610041

*通信作者:李馨筱, E-mail: wy123678@163.com

expression was associated with IPI score and clinical stage ($P<0.05$), the positive expression of Bax was associated with clinical stage ($P<0.05$). NF- κ B/p65 was positively correlated with Bcl-2 ($r=0.53$, $P<0.05$), NF- κ B/p65 was negatively correlated with Bax ($r=-0.51$, $P<0.05$), Bcl-2 was negatively correlated with Bax ($r=-0.62$, $P<0.05$). The patients with NF- κ B/p65, Bcl-2 positive expression had shorter survival time, and patients with Bax positive expression had longer survival time. **Conclusion** The high expression of NF- κ B/p65, Bcl-2 and low expression of Bax in DLBCL tissues contribute to the prognosis evaluation of DLBCL.

[KEY WORDS] DLBCL; NF- κ B/p65; Bcl-2; Bax; Survival analysis

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 作为一种常见的淋巴瘤, 具有侵袭力强、恶性程度高等特点^[1]。有统计数据表明, 经联合化疗治疗, 40% 左右的患者可达到完全缓解, 但仍有 50% 以上的患者对化疗不敏感^[2]。目前在癌症研究中发现, 癌细胞凋亡对于肿瘤形成与发展起到了重要作用, 许多药物均通过诱导癌细胞凋亡而发挥抗癌作用^[3]。凋亡过程的调节涉及多组基因, 这些调控基因表达改变会对细胞凋亡产生影响, 最终引起细胞异常增殖、凋亡受到抑制, 进而对化疗产生耐受性, 预后不佳^[4]。所以对 DLBCL 细胞凋亡相关基因表达进行检测可作为指导个体化治疗、预测治疗疗效的主要方法之一。NF- κ B 是一种多向性核转录调节因子, P50/P65 二聚体是其最常见形式, NF- κ B 激活入核后可调节炎症介质、细胞因子等表达。近年来, 有研究发现 NF- κ B 还可调节某些细胞增殖基因和抗凋亡基因的表达, 可能是肿瘤发病机制中的关键因子^[5]。Bcl-2 是抗凋亡蛋白, 在一些肿瘤细胞中高表达, 延长肿瘤细胞存活时间, 促进肿瘤发展^[6]。Bax 是促凋亡蛋白, 可抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用^[7]。本研究对 NF- κ B /p65、Bcl-2 和 Bax 等细胞凋亡相关蛋白表达进行检测, 探讨这些蛋白与 DLBCL 临床病理参数以及预后的关系, 为寻找 DLBCL 新治疗靶点提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样本收集

组织标本来自于 2012 年 3 月至 2015 年 2 月我院接受手术治疗的 78 例 DLBCL 患者和 30 例反应增生性淋巴结患者, 分别作为 DLBCL 组和反应增生性淋巴结组。DLBCL 组中, 男 46 例, 女 32 例, 年龄 26~77 岁, 中位年龄 54 岁, 根据 Ann Arbor 分期标准^[8], I、II 分期共 51 例, III、IV 分期共 27 例, 淋巴瘤国际预后指数 (international prognostic in-

dex, IPI) <2 分的 38 例, ≥ 2 分的 40 例。反应增生性淋巴结组中, 男 19 例, 女 11 例, 年龄 27~75 岁, 中位年龄 51 岁, 2 组性别、年龄差异无统计学意义 ($P>0.05$)。2 组患者均经手术、组织病理学证实, 术前未接受相关治疗, 患者对本研究均知情同意。组织标本的获取和使用均获得本院伦理委员会批准同意。

1.2 主要试剂

兔抗人 NF- κ B /p65 单克隆抗体 (ZA-0210)、鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体 (ZM-0010)、鼠抗人 Bax 单克隆抗体 (MAB-0254)、即用型免疫组化超敏 UltraSensitive™ SP 检测试剂盒 (KIT-9710) 均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组化方法

石蜡切片厚度 4 μ m, 3% H_2O_2 处理 10 min。0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 调 pH 值至 7.2~7.4, 冲洗干净后, 采用水浴锅加热 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液 (pH 6.0) 至 95 $^{\circ}$ C, 放入组织切片热修复 15 min。一抗低温封闭过夜, PBS 冲洗 3 次, 二抗室温孵育 30 min。PBS 冲洗 5 次, DAB 显色后采用苏木素复染。经脱水、透明、封片后镜检观察。结果判定: 随机选取 5 个视野, 根据阳性细胞所占比例及染色强度评分, 无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, $>75\%$ 为 3 分; 无着色为 0 分, 着色浅黄为 1 分, 着色黄色为 2 分, 着色棕黄为 3 分, 2 项评分乘积在 3 分以上者为阳性^[9]。由另 2 名高年资病理医师观察切片, 判定结果, 意见不一致时, 共同商讨得出最终结果。统计 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 阳性表达的 DLBCL 组织中患者的年龄、性别、B 症状、IPI 得分、结外病灶数、临床分期情况, 并进行统计学分析。

1.4 随访

对所有患者随访 5~53 个月, 随访以门诊或电

话方式进行,随访内容包括患者生活质量、一般情况、近期复查情况等。

1.5 统计学分析

数据均采用 SPSS 21.0 软件进行分析,DLBCL 组织中 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达与临床病理参数间的关系行 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DLBCL 组和反应增生性淋巴结组 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达情况比较

NF- κ B/p65 主要表达于细胞核,Bcl-2 主要表达于细胞浆和细胞膜(图 1)。2 组 NF- κ B/p65、Bcl-

2 和 Bax 阳性表达率比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 DLBCL 组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达与 B 症状、IPI 得分、临床分期等的关系

DLBCL 组织 NF- κ B/p65 阳性表达与 B 症状、IPI 得分、临床分期有关 ($P < 0.05$),Bcl-2 阳性表达与 IPI 得分、临床分期有关 ($P < 0.05$),Bax 阳性表达与临床分期有关 ($P < 0.05$),见表 2。

2.3 DLBCL 组织中 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达之间的相关性分析

免疫组化结果中,NF- κ B /p65 与 Bcl-2 表达呈正相关 ($r = 0.53, P < 0.05$),NF- κ B /p65 与 Bax 表达呈负相关 ($r = -0.51, P < 0.05$),Bcl-2 与 Bax 表达呈负相关 ($r = -0.62, P < 0.05$)。

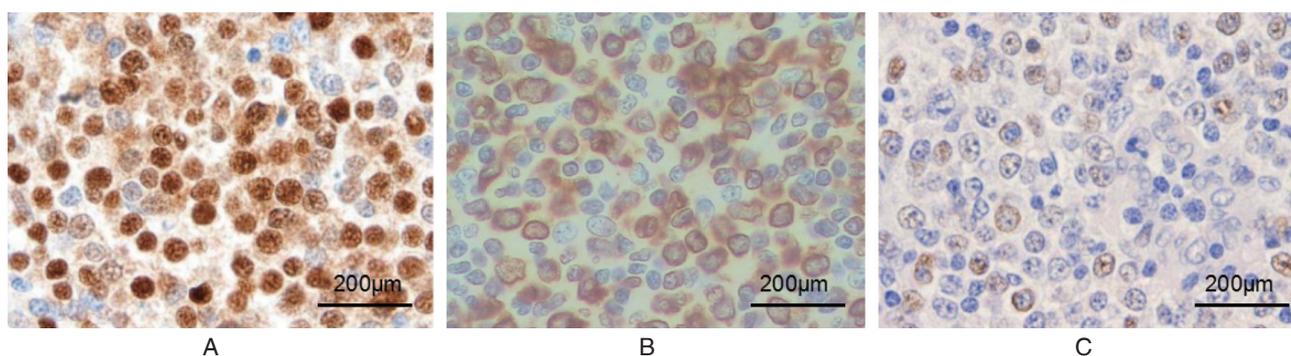


图 1 各蛋白在 DLBCL 组织中表达情况
A:DLBCL 组织中 NF- κ B/p65 呈阳性表达; B:DLBCL 组织中 Bcl-2 呈阳性表达; C:DLBCL 组织中 Bax 呈阴性表达。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(streptavidin-biotinper-oxidsemethod, SP)法染色,放大倍数 200 倍。

图 1 各蛋白在 DLBCL 组织中表达情况

Figure 1 Expression of each protein in DLBCL tissue

表 1 DLBCL 组和反应增生性淋巴结组 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达情况比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of NF- κ B/p65, Bcl-2 and Bax expression between DLBCL group and reactive proliferative lymph nodes group [n(%)]

组别	n	NF- κ B/p65 阳性表达	Bcl-2 阳性表达	Bax 阳性表达
DLBCL 组	78	31(39.74) ^a	40(51.28) ^a	25(32.05) ^a
反应增生性淋巴结组	30	5(16.67)	9(30.00)	16(53.33)

与反应增生性淋巴结组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.4 DLBCL 组织中 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达与生存期的关系

对本研究 78 例患者随访 5~53 个月,NF- κ B/p65 阳性表达中位生存期 18 个月,NF- κ B/p65 阴性表达中位生存期 34 个月,Bcl-2 阳性表达中位生存期 16

个月,Bcl-2 阴性表达中位生存期 31 个月,Bax 阳性表达中位生存期 30 个月,Bax 阴性表达中位生存期 15 个月。Kaplan-Meier 生存曲线分别见图 2 至图 4。NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 阳性表达与阴性表达的 Kaplan-Meier 生存曲线有明显差异 ($P < 0.05$)。

表2 DLBCL组织NF-κB/p65、Bcl-2和Bax表达与病理特征关系

Table 2 Relationship between expression of NF-κB/p65, Bcl-2, Bax in DLBCL tissue and pathological features

病理特征		n	NF-κB /p65 阳性 [n(%)]	P	Bcl-2 阳性 [n(%)]	P	Bax 阳性 [n(%)]	P
性别	男	46	20(43.48)	>0.05	27(58.70)	>0.05	15(32.61)	>0.05
	女	32	11(34.38)		13(40.63)		10(31.25)	
年龄(岁)	<60	30	10(33.33)	>0.05	16(53.33)	>0.05	11(36.67)	>0.05
	≥60	48	21(43.75)		24(50.00)		14(29.17)	
B症状	有	28	26(92.86)	<0.05	13(46.43)	>0.05	8(28.57)	>0.05
	无	50	5(10.00)		27(54.00)		17(34.00)	
IPI(分)	<2	38	10(26.32)	<0.05	12(31.58)	<0.05	16(42.11)	>0.05
	≥2	40	21(52.50)		28(70.00)		9(22.50)	
结外病灶数(个)	<2	49	18(36.73)	>0.05	22(44.90)	>0.05	17(34.69)	>0.05
	≥2	29	13(44.83)		18(62.07)		8(27.59)	
临床分期	I、II	51	15(29.41)	<0.05	16(31.37)	<0.05	21(41.18)	<0.05
	III、IV	27	16(59.26)		24(88.89)		4(14.81)	

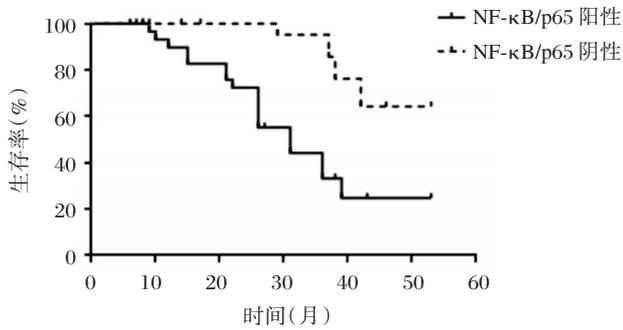


图2 NF-κB/p65阳性表达对DLBCL患者生存期的影响

Figure 2 The influence of positive expression of NF-κB/p65 on the survival of patients with DLBCL

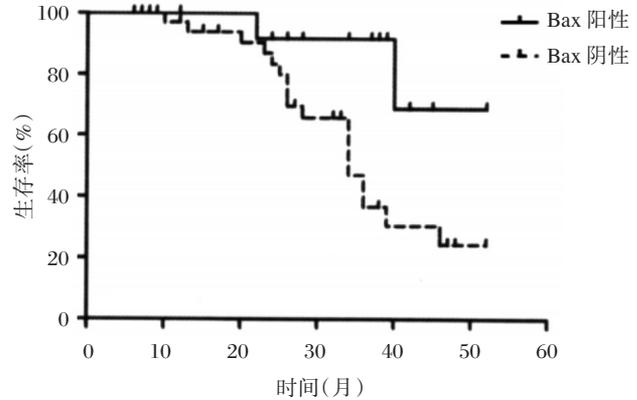


图4 Bax阳性表达对DLBCL患者生存期的影响

Figure 4 Influence of positive Bax expression on survival of DLBCL patients

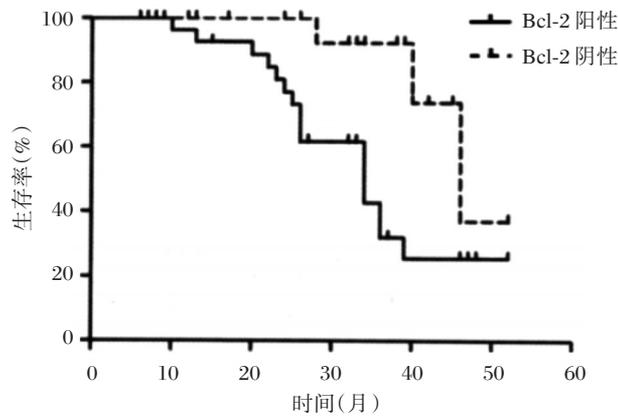


图3 Bcl-2阳性表达对DLBCL患者生存期的影响

Figure 3 Influence of positive expression of Bcl-2 on survival of patients with DLBCL

3 讨论

DLBCL的发生发展与多种遗传信息异常有关,是一个异质性、多步骤的过程,由各种信号通路的异常激活或阻滞引起的异常细胞生长、分化、凋亡均会引发DLBCL^[10-12]。现已明确药物化疗的主要机制是诱导癌细胞凋亡,调节凋亡的基因组包括NF-κB家族、BCL-2家族、胱冬蛋白酶(caspase)家族、TNF受体家族、MYC家族等^[13]。这些调控基因表达改变会对细胞凋亡产生影响,最终引起细胞异常增殖、凋亡受到抑制,进而对化疗产生耐受性,预后不佳。

p50/p56 二聚复合物是 *NF-κB* 家族蛋白成员中最常见的活性形式,通常情况下, *NF-κB* 与 *IκB* 结合处于未激活状态,当 *NF-κB* 受到外界刺激后, *IκB* 被磷酸化降解, *NF-κB* 由从细胞质转移至细胞核,结合靶基因,使转录增加^[14]。凋亡调节相关编码基因即为 *NF-κB* 靶基因之一,其可通过直接调控凋亡基因调节细胞凋亡,另外还可通过调节细胞周期和其他蛋白互相作用间接调节凋亡^[15]。 *Bcl-2* 和 *Bax* 均属于 *Bcl-2* 家族蛋白, *Bcl-2* 是抗凋亡蛋白, *Bax* 是促凋亡蛋白, *Bcl-2* 或 *Bax* 基因突变或表达异常均会影响 DLBCL 治疗疗效^[16]。朱斌等人^[17]发现 DLBCL 组织中 *NF-κB/p65* 阳性表达率为 62.8%,明显高于淋巴增生组织的 23.3%,与 IPI 评分以及临床分期相关。孟亚红等人^[18]研究发现,淋巴瘤组 *Bcl-2* 阳性表达率为 55.2%,显著高于对照组的 25.0%,且与临床分期相关。本研究结果发现, DLBCL 组织样本中, *NF-κB/p65*、 *Bcl-2* 阳性率分别为 39.74%、51.28%,显著高于反应增生性淋巴结组织样本中的阳性表达率,与上述研究结果基本一致。不同之处在于 *NF-κB/p65* 阳性表达除了与 IPI 得分、临床分期有关,还与 B 症状有关。国内关于 *Bax* 在 DLBCL 组织中的表达分析研究较少。本研究结果发现, *Bax* 阳性率为 32.05%,显著低于反应增生性淋巴结组织样本中的阳性表达率,且与临床分期相关,说明 *Bax* 也可能参与 DLBCL 的发生,促进 DLBCL 的发展。

进一步经相关性分析发现, *NF-κB/p65* 与 *Bcl-2* 呈正相关, *NF-κB/p65* 与 *Bax* 呈负相关, *Bcl-2* 与 *Bax* 呈负相关。 *NF-κB/p65* 与 *Bcl-2* 呈正相关原因可能在于 *Bcl-2* 是 *NF-κB/p65* 下游关键靶蛋白之一^[19]。 *Bcl-2* 与 *Bax* 呈负相关原因可能在于 *Bcl-2* 可阻止细胞色素 c 释放,而 *Bax* 可促进细胞色素 c 释放,细胞色素 c 一旦释放便与 caspase-9、细胞凋亡蛋白酶激活因子-1 (Apaf-1) 结合形成凋亡酶,激活 caspase-3 而启动凋亡^[20]。 *Bcl-2*、*Bax* 的平衡是以上效应是否发生的关键所在,随着 *Bcl-2* 蛋白表达增多, *Bax/Bax* 同源二聚体逐渐转化为 *Bax/Bcl-2* 异源二聚体,由诱导细胞凋亡转化为促进细胞凋亡, *Bcl-2*、*Bax* 两者对凋亡起到正负调控作用^[21]。延长患者生存期是 DLBCL 治疗的最终目的,朱斌等人^[17]发现 *NF-κB/p65* 阳性表达患者 2 年总生存率 25.0%,明显低于阴性表达者的 68.8%。糜公仆

等人^[12]研究发现 *Bcl-2* 阳性表达者 3 年总生存率 56.25%,低于 1 年总生存率 75%。以上结果提示 *NF-κB/p65* 和 *Bcl-2* 阳性表达会对患者生存率产生影响,但上述研究观察时间均较短。本研究则对所有患者进行为期 5~53 个月的随访,并进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析,结果显示 *NF-κB/p65* 或 *Bcl-2* 阳性表达可降低生存率,而 *Bax* 阳性表达可提高生存率。这是由于 *NF-κB/p65*、*Bcl-2* 阳性表达可抑制癌细胞凋亡,延长癌细胞寿命,预后不佳,而 *Bax* 阳性表达可促进癌细胞凋亡,阻止 DLBCL 进一步发展,进而延长患者生存期。

综上所述, *NF-κB/p65*、*Bcl-2* 和 *Bax* 表达可在一定程度上反映 DLBCL 生物学异质性及临床特征,对 DLBCL 预后产生一定影响,可作为 DLBCL 诊疗及预后评估的参考指标。

参考文献

- [1] 柴成国, 张建军, 李宁, 等. P53、C-MYC 和 BCL-6 基因异常在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1): 89-93.
- [2] 王清云, 岑溪南, 任汉云. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的治疗最新进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2017, 40(1): 51-55.
- [3] 王辉, 邓旭, 谢军, 等. CMYC、BCL2、BCL6 蛋白表达与弥漫性大 B 细胞淋巴瘤预后关系的研究[J]. 贵州医药, 2018, 42(5): 518-521.
- [4] Kawamoto K, Miyoshi H, Yoshida N, et al. MYC translocation and/or BCL 2 protein expression are associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Cancer Science, 2016, 107(6): 853-861.
- [5] 李亚卓, 赵坡. Id2 与 *NF-κB/p65* 在胃癌中的表达及临床病理意义[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(11): 846-850.
- [6] 张健, 昌军. 中和 IL-17 对博来霉素诱导的肺纤维化小鼠肺组织 *Bax/Bcl-2* 表达的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 13(4): 218-222.
- [7] 朱玉侠, 赵明星, 姜登鹤, 等. 抑癌基因 p53、凋亡抑制基因 *Bcl-2*、促凋亡基因 *Bax* 在胃癌及癌前病变中的表达[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2016, 25(9): 1040-1043.
- [8] Hoppe RT. The non-Hodgkin's lymphomas: pathology, staging, treatment[J]. Current Problems in Cancer, 1987, 11(6): 363-447.
- [9] 晋龙, 睦玉霞, 陈志忠, 等. 凋亡相关蛋白 Livin 与 Caspase-3 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(6):

- 1664-1669.
- [10] 李清平, 刘洁, 黎艳, 等. 弥漫大B细胞淋巴瘤组织中Bcl-2、NF- κ B、C-myc蛋白表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(10):1370-1372.
- [11] 柴成国, 张建军, 李宁, 等. P53、C-MYC和BCL-6基因异常在弥漫性大B细胞淋巴瘤中的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1):89-93.
- [12] 糜公仆, 王劲, 周旭, 等. 弥漫性大B细胞淋巴瘤中MYC、Bcl-2阳性表达患者的临床特征差异[J]. 中国医药导报, 2016, 13(17):25-28.
- [13] Kontos CK, Christodoulou MI, Scorilas A. Apoptosis-related BCL2-family members: key players in chemotherapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(3):353-374.
- [14] 潘兴飞, 张绍全, 黄小萍, 等. 白细胞介素32 γ 通过活化核转录因子 κ B通路诱导LX-2细胞表达基质金属蛋白酶9[J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 13(3):149-152.
- [15] Ok CY, Xumonette ZY, Li L, et al. Evaluation of NF- κ B subunit expression and signaling pathway activation demonstrates that p52 expression confers better outcome in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma in association with CD30 and BCL2 functions [J]. *Modern Pathology*, 2015, 28(9):1202-1213.
- [16] 王琳, 曹永成, 牛爱军, 等. 胃癌组织中bcl-2、Bax、p16和p53蛋白的表达和意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(6):397-399.
- [17] 朱斌, 潘韶英, 赵红, 等. 弥漫性大B细胞淋巴瘤组织中NF- κ Bp65、P-gp、CYP3A4表达变化及意义[J]. 山东医药, 2014, 54(28):68-70.
- [18] 孟亚红, 孙丽华. 弥漫性大B细胞淋巴瘤中Bcl-6、Bcl-2和NF- κ B的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(3):510-512.
- [19] Gottardo MF, Moreno AM, Ferraris J, et al. Humanin inhibits apoptosis in pituitary tumor cells through several signaling pathways including NF- κ B activation [J]. *J Cell Commun Signal*, 2017, 11(4):1-12.
- [20] Johnson M, Robinson M, Marsh C, et al. Expression of Bcl-2, Bax, and p53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation [J]. *Prostate*, 2015, 37(4):223-229.
- [21] 托娅, 张和平. 乳酸杆菌 *Lactobacillus casei*. Zhang的抗肿瘤作用及机制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(6):394-399.

(上接第5页)

- [27] 杨艳玲, 韩连书. 单纯型甲基丙二酸尿症饮食治疗与营养管理专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(7):481-486.
- [28] Ginocchio VM, Brunetti-Pierri N. Progress toward improved therapies for inborn errors of metabolism [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 6:418.
- [29] Baruteau J, Waddington SN, Alexander IE, et al. Gissen gene therapy for monogenic liver diseases: clinical successes, current challenges and future prospects [J]. *J Inher Metab Dis*, 2017, 40(4):497-517.
- [30] Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, et al. Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2013, 24(2):55-64.
- [31] Hofherr SE, Matern D. Systematic ranking of inborn errors of metabolism as targets for gene therapy [J]. *Mol Genet Metab*, 2010, 100(3):215-218.
- [32] Brunetti-Pierri N, Lee B. Gene therapy for inborn errors of liver metabolism [J]. *Mol Genet Metab*, 2005, 86(1-2):13-24.
- [33] Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer [J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 80(1-2):148-158.
- [34] Gaudet D, Méthot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(4):310-320.

· 论 著 ·

应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9水平以及28天死亡率的影响

王宝 孙媛 宋康 古长维*

【摘要】目的 探讨应激性高血糖(SHG)对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)水平以及28天死亡率的影响。方法 回顾性分析2015年1月至2018年6月间陕西西安大学第二附属医院收治的236例颅脑损伤患者的临床资料,根据入院后血糖水平分为SHG组($n=154$)和非SHG组($n=82$)。比较2组一般资料,采用pearson相关分析法分析血糖与患者炎症因子、血乳酸、MMP-9的相关性。比较2组患者院内感染发生率及28天死亡率,使用Cox风险比例模型分析SHG与患者死亡的相关性。结果 经pearson相关分析得,颅脑损伤患者血糖与TNF- α 、C反应蛋白(CRP)、乳酸水平、MMP-9水平均呈正相关关系($P<0.05$);2组颅内感染发生率对比,差异无统计学意义($P>0.05$);SHG组肺部感染、颅内感染及院内感染总发生率均高于非SHG组($P<0.05$);SHG组较非SHG组28天死亡率低($P<0.05$);Cox分析结果显示:高血压病史、格拉斯评分(GSC)评分及SHG对预测患者28天死亡率有统计学意义($P<0.05$)。结论 颅脑损伤合并SHG患者炎症因子、乳酸、MMP-9水平均更高,SHG可影响颅脑损伤患者病情进展及预后。

【关键词】 应激性高血糖;颅脑损伤;炎症因子;乳酸;基质金属蛋白酶-9

Effects of stress hyperglycemia on inflammatory states, levels of peripheral blood lactate and MMP-9 and 28 d mortality rate in patients with craniocerebral injury

WANG Bao, SUN Yuan, SONG Kang, GU Changwei*

(Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, 710004)

【ABSTRACT】 Objective To explore the effects of stress hyperglycemia (SHG) on inflammatory states, levels of peripheral blood lactate and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and 28 days mortality rate in patients with craniocerebral injury. Methods The clinical data of 236 patients with craniocerebral injury admitted to the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University from January 2015 to June 2018 were retrospectively analyzed. According to the blood glucose level after admission, they were divided into SHG group ($n=154$) and non-SHG group ($n=82$). The general data of the 2 groups were compared. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between blood glucose and inflammatory factors, blood lactate and MMP-9. The incidence rate of nosocomial infection and 28 days mortality rate were compared between the 2 groups. The Cox risk ratio model was used to analyze the correlation between SHG and mortality. Results Pearson correlation analysis showed that blood glucose was positively correlated with TNF- α , CRP, lactate and MMP-9 in patients with craniocerebral injury ($P<0.05$). There was no significant

基金项目:陕西省科技攻关项目(2014K11-03-02-06)

作者单位:陕西西安交通大学第二附属医院急诊科,陕西,西安 710004

*通信作者:古长维, E-mail:26151342@qq.com

difference in the incidence rate of intracranial infection between the 2 groups ($P>0.05$). The total incidence rates of pulmonary infection, intracranial infection and nosocomial infection in SHG group were higher than those in non-SHG group ($P<0.05$). Compared with non-SHG group, the 28 days mortality rate was lower in SHG group ($P<0.05$). Cox analysis showed that the hypertension history, Giasgow scale (GSC) score and SHG were statistically significant in predicting 28 days mortality rate ($P<0.05$). **Conclusions** The levels of inflammatory factors, lactate and MMP-9 are higher in patients with craniocerebral injury and SHG, and SHG could affect the progression and prognosis of patients with craniocerebral injury.

[KEY WORDS] Stress hyperglycemia; Craniocerebral injury; Inflammatory factors; Lactate; Matrix metalloproteinase-9

应激性高血糖(stress hyperglycemia, SHG)指非糖尿病患者经历大手术、外伤等应激情况,出现以血糖升高为主要表现的糖代谢紊乱^[1]。有研究指出,老年、重症颅脑损伤和重症胰腺炎患者易发生SHG^[2]。创伤等各种原因使患者内分泌系统激活,机体进入高分解状态,大量儿茶酚胺、糖皮质激素等升高血糖激素过度释放,并减少外周组织对葡萄糖的摄取;同时应激状态下白细胞介素、肿瘤坏死因子等细胞破坏因子大量出现可加强胰岛素抵抗现象,均可导致SHG^[3]。SHG可影响患者的病情发展与转归,不利于患者的预后。目前已有部分研究注意到SHG与脑血管疾病预后的关系,董彦等学者^[4]指出SHG与脑梗死患者神经缺损的严重程度呈正相关关系。但回顾既往文献,较少研究关注颅脑损伤患者的SHG状况,SHG影响颅脑损伤患者预后的机制等相关文献也较少。基于此,本研究回顾性分析236例颅脑损伤患者的临床资料,以探究应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)水平以

及28天死亡率的影响,深化临床对于SHG的认知,为临床制定治疗方案提供有效信息,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析2015年1月至2018年6月间陕西西安交通大学第二附属医院收治的236例颅脑损伤患者的临床资料。SHG诊断标准^[5]:随机测定2次以上空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)≥6.9 mmol/L或随机血糖≥11.1 mmol/L。纳入标准:经影像学检查、病史及临床症状确诊颅脑损伤者;年龄>18岁者;伤后12 h内入院者;伤后至入院前未使用过葡萄糖输液者;入院时已采集血标本测定血糖,且相关临床资料完整者;经我院伦理委员会审核通过。排除标准:合并其他部位严重损伤者;合并严重脏器功能不全者;有糖尿病史者;慢性感染者。根据入院后血糖水平分为SHG组($n=154$)和非SHG组($n=82$)。2组一般资料对比,见表1。2组患者年龄、性别对比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 2组一般资料对比 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

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

项目		SHG组($n=154$)	非SHG组($n=82$)	t/χ^2	P
性别	男	118(76.62)	59(71.95)	0.623	0.430
	女	36(23.38)	23(28.05)		
年龄(岁)	-	44.39±11.60	43.71±9.61	0.454	0.650
高血压病史	是	78(50.65)	38(46.34)	0.397	0.528
	否	76(49.35)	44(53.66)		
受伤至入院时间(h)	-	6.03±2.78	5.79±1.74	0.711	0.478
入院时格拉斯评分(GSC)	3~8分	73(47.40)	32(39.02)	1.521	0.467
	9~12分	55(35.71)	34(41.46)		
	13~15分	26(16.89)	16(19.51)		
随机血糖(mmol/L)	-	13.87±3.31	7.93±2.54	14.174	<0.001

1.2 试剂和仪器

GS300型快速血糖仪购自台湾瑞士瑞特公司,300G型血气分析仪购自美国雅培公司,C反应蛋白测定试剂盒(散射比浊法)购自德国西门子医疗诊断产品有限公司,人肿瘤坏死因子(hTNF- α)放免试剂盒和人基质金属蛋白酶9(MMP-9)酶联免疫吸附测定试剂盒购自上海瑞齐生物科技有限公司。

1.3 方法

于患者入院时采集其外周静脉血,使用GS300型快速血糖仪测定患者血糖水平,并使用300G型血气分析仪测定乳酸水平,检查时按照仪器操作说明操作;全血离心机3 000 r/min离心10 min,提取血清保存待测,使用免疫散射比浊法测定C反应蛋白(c-reactive protein,CRP)水平;使用放射免疫法测定肿瘤坏死因子- α (tumornecrosisfactor- α ,TNF- α);使用酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)测定MMP-9水平。

1.4 观察指标

比较2组一般资料,采用pearson相关分析法分析血糖与患者炎性因子、血乳酸、MMP-9的相关性。比较2组患者的院内感染发生率及28天死亡率,使用Cox风险比例模型分析SHG与患者死亡的相关性。

1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验,计数

数据以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,采用pearson相关分析法分析指标相关性,使用Kaplan-Meier法绘制患者28天生存曲线,经Cox风险比例模型分析SHG与患者死亡的相关性, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖与炎性因子、血乳酸、MMP-9的相关性

经pearson相关分析得,颅脑损伤患者血糖与TNF- α 、CRP、乳酸水平、MMP-9水平均呈正相关关系($P<0.05$),见表2。

表2 血糖与炎性因子、血乳酸、MMP-9的相关性

	TNF- α	CRP	乳酸	MMP-9
r 值	0.599	0.625	0.642	0.561
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 2组院内感染发生率及28天死亡率对比

2组颅内感染发生率对比,差异无统计学意义($P>0.05$);SHG组肺部感染、颅内感染及院内感染总发生率均高于非SHG组($P<0.05$);SHG组28天死亡率18.18%,显著高于非SHG组的7.32%($P<0.05$),见表3,2组死亡率ROC见图1。

表3 2组院内感染发生率及28天死亡率 [$n(\%)$]

Table 3 Comparison of incidence rate of nosocomial infection and 28 days survival rate between the 2 groups [$n(\%)$]

组别	n	院内感染				28天死亡率(%)
		肺部感染	泌尿系感染	颅内感染	总例数	
SHG组	154	49(31.82) ^a	18(11.69) ^a	8(5.19)	75(48.70) ^a	18.18(28/154) ^a
非SHG组	82	10(12.20)	3(3.66)	1(1.22)	14(17.07)	7.32(6/82)
χ^2	-	10.989	4.26	1.349	22.787	5.122
P	-	<0.001	0.039	0.245	<0.001	0.024

与非SHG组对比,^a $P<0.05$ 。

2.3 SHG与患者死亡的相关性

单变量分析中,年龄、高血压病史、受伤至入院时间、GSC评分及SHG发生依次单独进入Cox回归方程,结果显示:高血压病史、GSC评分及SHG对预测患者28天死亡率有统计学意义($P<0.05$)。多变量分析中,上述变量依次进入Cox方

程中,结果显示:高血压病史、GSC评分及SHG对预测患者28天死亡率有统计学意义($P<0.05$),见表4。

3 讨论

近年来随着经济和交通发展,急性颅脑损伤

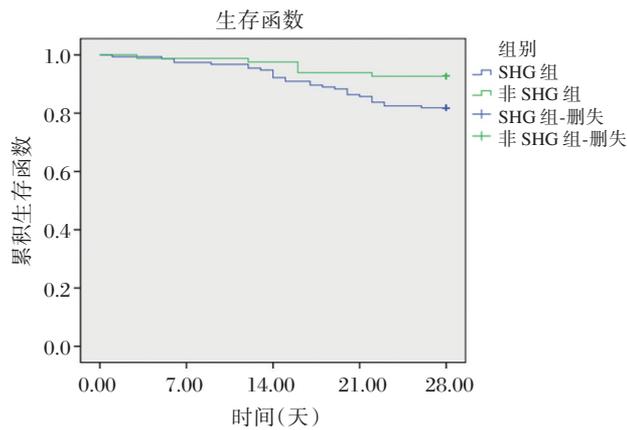


图1 2组28天死亡率ROC曲线图

Figure 1 ROC curve of 28 days survival rate in the 2 groups

发生率不断升高。颅脑损伤病死率和致残率均较高,如何降低患者颅脑损伤程度、改善患者预后是相关领域的研究重点。有研究发现,颅脑外伤患者血糖变化在一定程度上可以判断颅脑损伤程度,但不是所有急性颅脑损伤患者均会出现SHG,因此需要寻找更多相关指标联合判断^[6]。李慧等学者^[7]指出,颅脑外伤患者伴SHG可加重潜在的脑损伤,并通过诱导组织酸中毒、氧化应激和细胞免疫抑制来影响危重患者的发病率和死亡率,但其并未阐明血糖与乳酸或氧化应激指标的具体关系。炎症细胞因子作为人体重要的炎症介质,参与颅脑外伤后多种病理生理过程,包括脑水肿、血脑屏障通透性改变、神经元死亡等^[8]。故本研究分

表4 SHG与患者死亡的相关性

Table 4 Correlation between SHG and mortality

指标	单变量分析		P 值	多变量分析		P 值
	RR	95%CI		RR	95%CI	
年龄	0.997	0.967~1.027	0.834	0.999	0.968~1.031	0.945
高血压病史	1.014	1.010~1.126	0.003	1.061	1.006~1.092	0.040
受伤至入院时间	0.943	0.810~1.097	0.445	1.062	0.895~1.260	0.488
GSC 评分	1.106	1.101~1.058	0.000	1.051	1.034~1.154	0.034
SHG	0.004	0.001~0.132	0.002	12.529	6.278~24.987	0.001

析SHG对炎症状态、乳酸、MMP-9的影响,以进一步探讨颅脑损伤患者病情进展的几个主要机制与SHG的关系。

本研究pearson相关分析显示,颅脑损伤患者血糖与上述两炎性指标TNF- α 、CRP均呈正相关关系,这说明颅脑损伤合并SHG患者的炎症水平更高,SHG促使更多炎症介质释放,与吴清松等学者^[9]观点趋同。TNF- α 是一种由活化单核巨噬细胞产生的多肽类物质^[10],CRP是一种急性时相反应蛋白,在机体受到损伤或者感染时异常升高,对评估颅脑损伤患者炎性反应程度均有重要意义。石宝秋等学者^[11]在其论著中指出,TNF- α 、CRP均可判断颅脑损伤患者病情严重程度,因此SHG确实可通过促使机体炎性介质释放影响患者的病情。同时,柳学等学者^[12]研究指出,与有糖尿病史的患者比较,单纯SHG重症患者的TNF- α 等炎性因子显著升高,这提示SHG对重症患者的影响还高于糖尿病。同时,动物实验证明,急性高血糖在5h内就会降低动物的细胞免疫功能,对单核巨噬系

统造成直接损害^[13],因此SHG合并颅内损伤的患者的免疫功能较低下。本研究结果也显示,SHG组肺部感染、颅内感染及院内感染总发生率均高于非SHG组,严重影响患者的恢复进程和预后状况,因此SHG合并颅内损伤的患者在诊治过程中应注意预防院内感染。

当发生颅脑损伤时,细胞组织缺氧,脑细胞葡萄糖的有氧代谢减慢,使糖类的无氧酵解加快,导致乳酸酸中毒^[14]。本研究数据显示,SHG组乳酸水平高于非SHG组,且血糖与颅脑损伤患者的乳酸水平呈正相关关系。因此,当颅脑损伤患者发生SHG时,由于糖分解的增多导致乳酸/丙酮酸比值增高,其乳酸水平进一步增高,导致酸中毒,使患者出现继发颅脑损伤^[15]。

基质金属蛋白酶家族为体内锌离子依赖性的一类内肽酶,能特异性降解细胞外基质和毛细血管基膜中的V、VII、X型胶原、明胶和弹性纤维,破坏血-脑屏障,引起血-脑屏障通透性增加,诱发脑水肿,加重神经功能损害^[16]。MMP-9可以进一步

损伤血脑屏障,血清MMP-9蛋白含量越高,颅脑损伤越重,脑水肿越严重,预后越差^[17]。本研究数据中,SHG组MMP-9水平高于非SHG组,这表明SHG组也可通过影响血清MMP-9含量进而影响颅脑损伤患者的预后。故虽不是所有颅脑损伤患者均发生SHG,但合并SHG的患者会通过炎症反应,促使乳酸、MMP-9含量增高等途径来影响患者病情进展及预后,是预后不良的危险因素。本研究数据显示,SHG组较非SHG组28天死亡率高,SHG确能影响患者的临床疗效及预后。同时,经Cox风险比例模型分析显示,高血压病史、GSC评分及SHG均对预测患者28天死亡率有统计学意义。颅脑损伤28天死亡率在低GSC评分、合并高血压及发生SHG患者中更高。与相关文献进行横向对比,兰展等学者^[18]在其论著中指出,颅脑外伤患者胰岛素抵抗程度显著加剧,且与脑损伤程度、应激反应程度相关。该文献与本研究关联密切,且结论趋向一致。颅脑损伤会引起机体强烈应激反应,相关炎症因子高表达可增加胰岛素抵抗现象,而胰岛素抵抗程度高可导致机体血糖水平升高,血糖水平升高进一步影响乳酸及MMP-9高表达,加重颅脑损伤病情进展,本研究经相关性分析也证实了这一点。值得注意的是,有研究显示,将危重SHG患者血糖水平控制在较低水平可显著改善患者的机体功能及预后情况,但过度降低(4.4~6.1 mmol/L)并不能提高治疗效果,不仅增加药物使用量,还会导致患者的并发症风险相关增高,增加患者的低血糖风险^[19]。

综上所述,SHG影响颅脑损伤患者炎症状态、乳酸、MMP-9水平,颅脑损伤患者血糖水平与TNF- α 、CRP、乳酸、MMP-9水平均呈正相关关系;SHG合并颅脑损伤患者院内感染发生率更高、28天死亡率更高。

参考文献

- [1] 张然,许勤.外科非糖尿病患者应激性高血糖的研究进展[J].护理学报,2017,24(4):34-38.
- [2] 彭海菁,李杰,陈海琴,等.应激性高血糖的危险因素及护理干预措施[J].蚌埠医学院学报,2016,41(3):399-401.
- [3] 周涛,李树炎,覃碧云,等.院前干预创伤性应激性高血糖的探讨[J].中国中西医结合急救杂志,2017,24(2):207-209.
- [4] 董彦,赵路红.应激性高血糖与脑梗死的分型和神经功能预后的相关性[J].贵州医药,2017,41(6):615-616.
- [5] 赵晓营,任小红.脑卒中后应激性高血糖患者的血糖控制目标[J].解放军护理杂志,2016,33(11):26-28.
- [6] 张琳,李月成,夏春雷.Aalst胰岛素输注方案对非糖尿病患者颅脑外伤术中血糖及乳酸水平的影响[J].实用药物与临床,2016,19(2):176-179.
- [7] 李慧,蔡忠林,梁仲珍,等.颅脑外伤急性期血糖、肌酐的变化与疾病转归的研究[J].华南国防医学杂志,2017,31(5):297-299+304.
- [8] 蒋文庆,卞晓星,陈红春,等.脑外伤患者血清炎症细胞因子与颅内压关系的研究[J].重庆医学,2017,46(8):1060-1062.
- [9] 吴清松,饶平.强化胰岛素与常规胰岛素对颅脑创伤患者术后应激性高血糖的疗效比较[J].医学综述,2016,22(9):1787-1790.
- [10] 梁思敏,蔡则成,马赫,等.肿瘤坏死因子- α 在骨关节结核中的研究进展[J].宁夏医科大学学报,2018,40(1):115-121.
- [11] 石宝秋,梁有明.血清粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子 α 及C反应蛋白水平与颅脑损伤患者病情严重程度及预后的关系[J].实用心脑血管病杂志,2016,24(5):35-38.
- [12] 柳学,陈纯波,叶珩,等.应激性高血糖对重症脑血管病患者预后的影响[J].中华危重病急救医学,2016,28(4):359-363.
- [13] 黄怡玲,郑可鲁.应激性高血糖对脓毒血症儿童免疫功能及预后的影响[J].现代医学,2016,44(3):288-291.
- [14] 苏丽娜,王金环,谷守维,等.动态监测动脉血乳酸水平与急性重症颅脑损伤合并脑心综合征预后的关系[J].内科急危重症杂志,2017,23(1):35-36.
- [15] 何嫦娥,张玉梅,颜汉文,等.Leuven调节的改良方案对重型颅脑损伤患者术后血糖变异的影响[J].中华现代护理杂志,2016,22(27):3921-3924.
- [16] 余研,吴志峰,秦毅辉,等.银杏叶提取物对大鼠创伤性颅脑损伤后MMP-2和MMP-9的影响[J].中国微侵袭神经外科杂志,2017,22(3):132-135.
- [17] 李季林,盛罗平,陈仁辉,等.颅脑损伤后血清中MMP-9、S-100B蛋白的表达对颅脑损伤预后及脑水肿的影响[J].中国医师杂志,2016,18(8):1211-1213.
- [18] 兰展,仇洪,张传东,等.颅脑外伤患者胰岛素抵抗程度与脑损伤、应激反应的相关性研究[J].海南医学院学报,2017,23(7):943-945.
- [19] 李勃.危急重症患者应激性高血糖控制水平与患者预后情况的临床相关性研究[J].解放军药理学学报,2016,32(2):177-179.

血浆 NT-proBNP 水平对持续性房颤患者射频消融术后预后的预测价值

孙小艳¹ 徐立彦^{2*} 李晨³ 吴琳娜¹ 魏丽娟¹

[摘要] 目的 研究血浆后氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)水平对持续性房颤(简称房颤)患者射频消融术后预后的预测价值。方法 将四川大学华西医院2014年1月至2017年1月间收治的130例房颤患者纳为研究对象,同时纳入50例健康体检者为健康对照组,根据患者房颤类型将其分为持续性房颤组($n=77$)与阵发性房颤组($n=53$),比较3组血浆 NT-proBNP 水平;所有持续性房颤患者($n=77$)行射频消融治疗,根据其术后是否转复窦性心律将其分为转复窦律组($n=27$)与未转复窦律组($n=50$),随访1年,根据患者手术效果将其分为手术成功组($n=30$)与手术失败组($n=47$),分析术后转复窦律与手术效果的相关性;比较术后转复窦律组与未转复窦律组的血浆 NT-proBNP 水平;比较手术失败组与成功组的血浆 NT-proBNP 水平;分析血浆 NT-proBNP 水平与患者预后的关系。结果 健康对照组、阵发性房颤组、持续性房颤组患者的血浆 NT-proBNP 水平呈依次上升趋势,组间差异显著($P<0.05$);术后是否转复窦律与手术效果存在相关性($r=0.716, P<0.05$);术后转复窦律组的血浆 NT-proBNP 水平显著低于未转复窦律组($P<0.05$);手术成功组术前及术后24 h 血浆 NT-proBNP 浓度均显著低于失败组($P<0.05$);相关性分析提示,血浆 NT-proBNP 水平与持续性房颤患者射频消融术后复发呈正相关($r=0.367, P<0.05$)。结论 血浆 NT-proBNP 浓度在持续性房颤射频消融患者预后中具有良好的应用价值。

[关键词] 血浆 NT-proBNP; 持续性房颤; 射频消融; 预后价值

Predictive value of plasma NT - proBNP level in prognosis of patients with persistent atrial fibrillation after radiofrequency ablation

SUN Xiaoyan¹, XU Liyan^{2*}, LI Cheng³, WU Linna¹, WEI Lijuan¹

(1. Health Management Center, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041; 2. Department of Cardiology, People's Hospital of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Sichuan, China, 626000; 3. Department of Cardiovascular, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

[ABSTRACT] Objective To investigate the predictive value of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) level in patients with persistent atrial fibrillation (AF) after radiofrequency ablation. Methods 130 cases of patients with atrial fibrillation admitted to West China Hospital of Sichuan University from January 2014 to January 2017 were included in the study. At the same time, 50 healthy examiners were included in healthy control group. According to the types of atrial fibrillation, they were divided into persistent atrial fibrillation group ($n=77$) and paroxysmal atrial fibrillation group ($n=53$). The

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(120232)

作者单位:1. 四川大学华西医院健康管理中心,四川,成都 610041

2. 甘孜藏族自治州人民医院 心内科 四川,甘孜藏族自治州,626000

3. 四川大学华西医院心内科,四川,成都 610041

*通信作者:徐立彦, E-mail: jinli05926172@sina.com

plasma levels of NT-proBNP in the 3 groups were compared. All patients with persistent atrial fibrillation ($n=77$) were given radiofrequency ablation, and were divided into sinus rhythm cardioversion group ($n=27$) and sinus rhythm non-cardioversion group ($n=50$) according to whether there was sinus rhythm cardioversion after operation. After 1 year of follow-up, the patients were divided into surgery success group ($n=30$) and surgery failure group ($n=47$) according to the surgical results, and the correlation between the postoperative sinus rhythm cardioversion and surgical outcomes was analyzed. The plasma NT-proBNP levels were compared between sinus rhythm cardioversion group and sinus rhythm non-cardioversion group or failure group and surgery success group. The relationship between plasma NT-proBNP level and prognosis was analyzed. **Results** The levels of plasma NT-proBNP in control group, paroxysmal atrial fibrillation group and persistent atrial fibrillation group were increased in turn ($P<0.05$). There was a correlation between the presence or absence of sinus rhythm cardioversion and surgical outcomes ($r=0.716$, $P<0.05$). The level of plasma NT-proBNP in sinus rhythm cardioversion group was significantly lower than that in sinus rhythm non-cardioversion group ($P<0.05$). The plasma NT-proBNP concentrations before operation and at 24 h after operation in surgery successful group were significantly lower than those in surgery failure group ($P<0.05$). Correlation analysis showed that plasma NT-proBNP level was positively correlated with preoperative recurrence after radiofrequency ablation in patients with persistent atrial fibrillation ($r=0.367$, $P<0.05$). **Conclusion** Plasma NT-proBNP concentration has a good application value in the prognosis of patients with persistent atrial fibrillation after radiofrequency ablation.

[KEY WORDS] Plasma NT-proBNP; Persistent atrial fibrillation; Radiofrequency ablation; Prognosis value

房颤是临床上最常见的室上性心律失常之一,持续性房颤患者发病时间长,为患者生活带来了严重影响。射频消融治疗是目前治疗阵发性及持续性房颤的主要方式之一,有研究显示射频消融治疗后患者复发率高^[1],但是影响患者复发的因素尚不清楚。近年来,生化指标是预测持续性房颤患者射频消融术后复发的研究热点,其中包括氨基末端脑钠肽前体(N-terminal-pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP), NT-proBNP与脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)的生理作用相似,在利钠利尿、抑制交感神经系统、舒张血管平滑肌、抑制心肌纤维化与心肌重构中发挥功效。有研究表明,血浆NT-proBNP与房颤的发生之间存在密切的联系^[2]。目前,临床上对血浆NT-proBNP在持续性房颤患者射频消融术后复发中研究较少,基于以上背景,四川大学华西医院开展如下研究,以探究血浆NT-proBNP与持续性房颤患者射频消融治疗效果之间的关系,旨在准确评估患者预后,为提高手术治疗效果提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 病例资料

将四川大学华西医院2014年1月至2017年1

月间收治的130例房颤患者纳为研究对象,同时将50例同期于医院体检部行健康体检者纳为健康对照组,根据患者房颤类型,将其分为持续性房颤组($n=77$)与阵发性房颤组($n=53$),其中持续性房颤组中男42例,女35例,年龄30~65岁,平均(52.12 ± 13.44)岁,阵发性房颤组中男33例,女20例,年龄31~66岁,平均(53.45 ± 13.01)岁,健康对照组男31例,女19例,年龄32~65岁,平均(53.26 ± 12.01)岁,3组性别比例及年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.1.2 诊断标准^[3]

①持续性房颤:患者心房颤动持续发作超过7 d,或虽少于7 d,但需服药或电复律终止,或长期持续性心房颤动超过1年。②阵发性房颤:心房颤动时间 <7 d,一般能在48 h内自行终止。

1.1.3 纳入标准

①研究对象均满足相关诊断标准;②年龄 ≥ 18 岁;③所有持续性房颤者均为首次接受导管射频消融治疗,手术均由资历相当的主治医生完成;④知情且自愿参与本研究。

1.1.4 排除标准

①排除既往房颤消融史者;②左心房血栓者;③抗凝禁忌者;④近期心肌梗死者;⑤严重慢性器质性疾病者。

1.2 方法

1.2.1 手术方法

77例持续性房颤患者均行导管射频消融治疗,手术均由资历相当的主治医生完成,术后24h内行12导联心电图确定患者是否恢复窦性心律。

术后3~5d应用低分子肝素抗凝,在国际标准化比率(international normalized ratio, INR)到达2~3位点后停止使用低分子肝素。后持续华法林抗凝3个月,并应用常规胺碘酮治疗3个月。

1.2.2 血浆NT-proBNP检测方法

取患者空腹静息状态下的肘部静脉血2mL,放入含肝素抗凝的试管摇匀,室温静置30min,低温离心20min(3000r/min),将离心后的血样置于检测仪传输口,采用化学发光免疫分析法^[4]测定血浆NT-proBNP水平,检测仪器和试剂为罗氏公司Elecsys 2010全自动电化学发光免疫分析仪与NT-proBNP试剂盒。

1.2.3 研究方法

持续性房颤患者均行导管射频消融治疗,24h后经12导联心电图检查其是否恢复窦性心律,①根据检查结果将其分为转复窦律组($n=27$)与未转复窦律组($n=50$);②随访1年,依据术后复发情况,将77例行射频消融治疗的持续性房颤患者分为射频消融手术失败组(术后复发, $n=30$)与成功组(术后未复发, $n=47$)。术后复发定义^[5]:患者术后[排除术后3个月内(空白期)]出现症状性房颤,或心电图、24h动态心电图等捕捉到房颤、房扑、房速等房性心律失常,且持续时间超过30s。

1.3 观察指标

①于入组当天检测采集所有研究对象空腹静脉血,检测并比较健康对照组、阵发性房颤组以及持续性房颤组血浆的NT-proBNP水平。②分析射频消融手术效果与术后转复窦律的关系。③比较术后转复窦律与未转复窦律组血浆NT-proBNP水平。④比较射频消融失败组与成功组血浆NT-proBNP水平。⑤分析血浆NT-proBNP在预测持续性房颤射频消融患者预后中的价值。

1.4 统计学方法

数据分析用SPSS 19.0软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均行正态性和方差齐性检验,不符合正态分布变量则进行自然对数转化使其成正态或近似正态分布(或者不符合正态分布的数据采用非

参数检验),采用 t 检验;计数资料以例或百分比形式表示,采用 χ^2 检验;采用Spearman秩相关分析持续性房颤患者射频消融的血浆NT-proBNP水平与其预后的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康对照组、阵发性及持续性房颤患者血浆NT-proBNP水平比较

健康对照组、阵发性房颤组、持续性房颤组患者血浆NT-proBNP水平呈依次上升趋势,组间差异显著($P<0.05$),见表1。

表1 对照组、阵发性及持续性房颤患者血浆NT-proBNP水平比较

组别	n	NT-proBNP(pg/mL)
健康对照组	50	78.69±12.36
阵发性房颤组	53	152.37±25.44
持续性房颤组	77	459.77±45.89
F		2 539.49
P		<0.05

2.2 射频消融手术效果与术后转复窦律的关系分析

77例持续性房颤患者射频消融术后24h内,共有50例未转复窦性心律,其中27例(54.00%)1年内因疾病复发导致手术失败,经相关性分析提示,术后24h内是否恢复窦性心律与手术失败之间存在相关性($r=0.716, P<0.05$),见表2。

表2 手术效果与术后转复窦律的关系分析(n)

项目	失败组($n=30$)	成功组($n=47$)	χ^2	P
转复窦律($n=27$)	3	24	13.56	<0.05
未转复窦律($n=50$)	27	23		

2.3 转复窦律组与未转复窦律组血浆NT-proBNP水平比较

转复窦律组血浆NT-proBNP水平显著低于未转复窦律组($P<0.05$),见表3。

表3 转复窦律组与未转复窦律组血浆 NT-proBNP 水平比较

Table 3 Comparison of plasma NT-proBNP level between sinus rhythm cardioversion group and sinus rhythm non-cardioversion group

组别	n	血浆 NT-proBNP (pg/mL)
转复窦律组	27	403.24±62.37
未转复窦律组	50	491.65±64.18
t		5.82
P		<0.05

2.4 手术失败组及成功组的血浆 NT-proBNP 水平比较

成功组术前 24 h 及术后 24 h 血浆 NT-proBNP 浓度均显著低于失败组 ($P<0.05$); 较术前 24 h 比较, 2 组患者术后 24 h NT-proBNP 浓度均显著降低 ($P<0.05$), 且成功组下降幅度更大 ($P<0.05$), 见表 4。

表4 2组围术期血浆 NT-proBNP 水平比较 (pg/mL)

Table 4 Comparison of plasma NT-proBNP level in the 2 groups during perioperative period (pg/mL)

组别	n	术前 24 h	术后 24 h	t	P
成功组	47	425.58±45.89	211.27±27.81	39.87	<0.05
失败组	30	512.69±58.87	354.25±64.15	14.11	<0.05
t		7.27	13.46		
P		<0.05	<0.05		

2.5 分析持续性房颤射频消融患者的血浆 NT-proBNP 水平与其预后的关系

相关性分析提示, 血浆 NT-proBNP 水平与持续性房颤患者射频消融术后复发呈正相关 ($r=0.367, P<0.05$)。

3 讨论

BNP 主要由心脏分泌, 在舒张血管、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统中发挥功效, BNP 前体在人体心肌细胞内裂解形成 N 端含 1~76 位氨基酸的 N 端脑钠肽^[6]。近年来, 有研究发现 NT-proBNP 与房颤的发生及发展关系密切^[7]。本研究发现, 血浆高浓度 NT-proBNP 将加大持续性房颤患者射频消融手术失败风险, 在预测患者预后中具有良好的应用价值, 与谭今等^[8]研究证实

NT-proBNP 水平对体外循环心脏手术患者预后的影响作用最大, 能联合左心室射血分数有效评估患者预后风险的结论相似。

房颤患者心房容量与压力明显超出正常范围, 心房壁受到牵拉作用, 导致心房肌重构产生病理改变^[9-10]。生理解剖学提示, 持续性房颤患者心房肌细胞多呈现纤维化、肥大、空泡变性与肌溶解现象, 是心肌细胞兴奋传导障碍的病理基础^[11-12]。NT-proBNP 作为一种保护因子, 是机体神经体液调节对各种病理性损害因子的一种保护性代偿反应, 本文统计发现, 健康对照组、阵发性房颤组与持续性房颤组患者的血浆 NT-proBNP 浓度逐渐上升, 提示持续性房颤患者心脏局部神经内分泌系统活跃性更强, 病理改变更严重, 与张鸿雁等^[13]研究发现, 持续性房颤患者血浆 NT-proBNP 水平明显高于阵发性房颤者的结论一致。

射频消融手术已成为临床治疗阵发性及持续性房颤的主要治疗方式, 但由于目前医学界对房颤发病机制仍处于探究阶段, 射频消融治疗后房颤复发率高。有研究提出, 持续性房颤治疗难度更大, 已成为导致射频消融手术失败的独立危险因素之一^[14-15]。本文中 77 例接受射频消融治疗的持续性房颤患者, 1 年内有 30 例复发, 复发率高达 38.96%, 与王勇等^[16]研究结果一致。而射频消融术后患者是否直接转复窦性心律将对持续性房颤患者手术效果产生影响^[17]。本研究中有 50 例患者术后未转复窦性心律, 其中有 21 例在随访过程中疾病复发, 经相关性分析发现, 术后是否转复窦性心律与手术效果之间存在相关性, 这与吴毓优等^[18]研究结论相吻合。

本文比较转复窦律组与未转复窦律组患者的血浆 NT-proBNP 水平发现, 转复窦律组血浆 NT-proBNP 浓度显著低于未转复窦律组, 并对比手术失败组与成功组患者的血浆 NT-proBNP 水平发现, 成功组患者术前的血浆 NT-proBNP 浓度显著低于失败组, 且其术后 NT-proBNP 浓度出现大幅度下降现象。这提示血浆 NT-proBNP 浓度可能与术后转复窦性心律之间存在一定关系, 并在预测患者术后效果中发挥功效, 与孙晓臣等^[19]研究发现, 射频消融治疗后, 转复窦性心率的阵发性心房颤动患者的血浆 NT-proBNP 浓度更低, 且术后复发风险较小的结论相似。

血浆 NT-proBNP 浓度是机体病理性应激反应的一种保护因子,手术失败者术后血浆 NT-proBNP 浓度过高,提示其术后心肌细胞炎症、纤维化、坏死情况较为严重,肺静脉电传导恢复困难,康复负担较重,治疗效果不佳。而手术成功者术后血浆 NT-proBNP 浓度有大幅度下降趋势,提示患者经射频消融治疗后心肌炎症、受损情况得以好转,由此推论,术后血浆 NT-proBNP 浓度可有效反应手术效果,是预测患者预后的良好生化指标。术后血浆 NT-proBNP 浓度过高可能与患者自身机体条件、免疫功能及手术创伤相关,但其中的具体作用机制尚不清楚,需扩大样本进行深入探究。相关性分析提示,血浆 NT-proBNP 水平与持续性房颤射频消融患者术后复发风险呈正相关。

综上所述,血浆 NT-proBNP 浓度在持续性房颤射频消融患者预后中具有良好的应用价值,术前术后有效监测患者血浆 NT-proBNP 浓度能为评估患者预后、制定后续治疗方案提供可靠的参考价值。

参考文献

- [1] 丁峰,宋宏宁,陈金玲,等.左心房超声定量分析对心房颤动患者消融术后复发的预测价值[J].中华超声影像学杂志,2017,26(8):650-656.
- [2] 叶国杰,张力,张金盈.舒张功能不全的房颤患者超声心动图指标与 NT-proBNP 的相关性[J].临床心血管病杂志,2016,32(12):1198-1200.
- [3] 黄从新.对 2006 年 AHA/ACC/ESC 心房颤动治疗指南的评价[J].中国实用内科杂志,2007(22):1731-1734.
- [4] 刘诗琴,黄建芳,谈思怡,等.人 N 端脑钠肽前体(NT-ProBNP)单抗制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J].免疫学杂志,2016,32(5):441-445.
- [5] 卢振华,刘念,白融,等.2 型糖尿病合并持续性心房颤动导管消融术后复发因素研究[J].临床心血管病杂志,2017,33(4):356-360.
- [6] 何扬利,曾敏,吴智勇,等.老年非瓣膜性房颤伴急性脑梗死患者的血浆尿酸、脑钠肽水平变化及与 CHADS₂ 评分的关系[J].中国老年学杂志,2016,36(10):2365-2367.
- [7] 徐正云,任国珍.老年心力衰竭合并心房颤动病人血清 NT-proBNP 的临床意义[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(17):2157-2160.
- [8] 谭今,于涛,黄克力,等.NT-proBNP、血乳酸、肌钙蛋白 I 及血浆胱抑素 C 等对体外循环心脏手术患者预后的影响[J].实用医学杂志,2018,34(5):755-759.
- [9] 张维贞,向丽,黄山.分子诊断技术在心房颤动临床诊疗中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(4):283-288.
- [10] 段文涛,史东,王新夺,等.胺碘酮联合螺内酯在持续性心房颤动转复后维持窦性心律中的作用[J].中国老年学杂志,2017,37(8):1924-1925.
- [11] 肖淼淼,郑康超,肖辉雪,等.CSE/H₂S 在心血管系统的作用及机制[J].医学分子生物学杂志,2016,13(6):365-370.
- [12] 刘诗琴,黄建芳,谈思怡,等.人 N 端脑钠肽前体(NT-ProBNP)单抗制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J].免疫学杂志,2016,32(5):441-445.
- [13] 张鸿雁,李楠,林敏.孤立性房颤患者血浆 NT-proBNP、CRP 及 D-二聚体水平变化及意义[J].山东医药,2016,56(24):68-70.
- [14] 施伟丽,徐浩,丛伟红,等.从 Hsp90 对 eNOS 活性的影响探讨 Hsp90 在心血管疾病中的保护作用[J].医学分子生物学杂志,2016,13(6):350-354.
- [15] 刘力,王志权,朱启明,等.心房颤动射频消融术后复发相关危险因素的临床研究[J].心脑血管病防治,2016,16(3):187-189.
- [16] 王勇,李杰.心房颤动患者行肺静脉大环隔离消融术后复发的影响因素分析[J].山东医药,2017,57(30):64-66.
- [17] 丁云,孙建国,吴建荣,等.胺碘酮与伊布利特对老年转复消融术后持续性心房颤动的临床疗效评价[J].中国临床药理学杂志,2016,32(6):570-572.
- [18] 吴毓优,吕鹏飞,高炳玉,等.二尖瓣置换术同期行双极射频消融术治疗房颤及术前危险因素与术后转律的关系[J].海南医学,2016,27(17):2848-2850.
- [19] 孙晓臣.N 端脑钠肽前体与阵发性心房颤动复发的关系探讨[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(8):1088-1090.
- [20] 张鸿雁,李楠,林敏.孤立性房颤患者血浆 NT-proBNP、CRP 及 D-二聚体水平变化及意义[J].山东医药,2016,56(24):68-70.
- [21] 刘诗琴,黄建芳,谈思怡,等.人 N 端脑钠肽前体(NT-ProBNP)单抗制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J].免疫学杂志,2016,32(5):441-445.

· 论 著 ·

人免疫球蛋白对终末期肝病合并感染患者肝功能、免疫功能及凝血功能的干预作用

段红光* 周爱静 程崇勇 高峰

[摘要] 目的 分析人免疫球蛋白对终末期肝病合并感染患者的治疗效果及对患者肝功能、免疫功能及凝血功能的改善情况。方法 选择我院2016年3月至2018年3月收治的132例终末期肝病合并感染的患者为研究对象。随机选取66位患者为观察组,在常规治疗的基础上额外给予人免疫球蛋白,同期单纯给予常规治疗的66位患者为对照组。连续治疗7 d,观察2组的免疫功能、肝功能、凝血功能、治疗有效率、并发症及二重感染发生率。结果 治疗后2组的血浆总蛋白(TP)均明显高于治疗前($P<0.05$),且观察组明显高于对照组($P<0.05$)。治疗后2组的丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)及凝血酶原时间(PT)均明显低于治疗前($P<0.05$),且观察组明显低于对照组($P<0.05$)。治疗后2组的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 及 CD_4^+/CD_8^+ 均明显高于治疗前($P<0.05$),且观察组明显高于对照组($P<0.05$)。治疗后观察组与对照组Child-pugh评分 <10 分的患者的治疗有效率差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后观察组Child-pugh评分介于10~15分之间的患者的治疗有效率明显高于对照组Child-pugh评分介于10~15分之间的患者($P<0.05$)。治疗期间观察组的肝性脑病发生率、肝肾综合征发生率及二重感染发生率均明显低于对照组($P<0.05$)。结论 对Child-pugh评分介于10~15分之间的终末期肝病合并感染患者早期使用人免疫球蛋白的抗感染疗效更佳。人免疫球蛋白能显著地改善终末期肝病的感染状态及患者的肝功能、免疫功能、凝血功能,并且减少治疗期间肝性脑病、肝肾综合征及二重感染的发生率,延缓了终末期肝病的进展。

[关键词] 终末期肝病合并感染;人免疫球蛋白;Child-pugh评分;肝功能;免疫功能

Intervention of human immunoglobulin on liver function, immune function and coagulation function in patients with end-stage liver disease complicated with infection

DUAN Hongguang*, ZHOU Aijing, CHENG Chongyong, GAO Feng

(Department of Infectious Diseases, No.155 Central Hospital of the People's Liberation Army of China, Kaifeng, Henan, China, 475003)

[ABSTRACT] Objective To analyze the therapeutic effect of human immunoglobulin on patients with end-stage liver disease complicated infection and to improve the liver function, immune function and coagulation function of patients. Methods 132 patients with end-stage liver disease co-infection admitted to our hospital from March 2016 to March 2018 were selected as subjects. 66 patients were randomly selected as the observation group, and human immunoglobulin was additionally administered based on conventional treatment. 66 patients who received conventional treatment at the same time were used as the control group. After 7 days of continuous treatment, the immune function, liver function, coagulation function, treatment efficiency, complications and the incidence of double infection were observed. Results The total plasma

作者单位:中国人民解放军第一五五中心医院感染性疾病科,河南,开封475003

*通信作者:段红光, E-mail:13781109803@139.com

protein (TP) of the 2 groups after treatment was significantly higher than that before treatment ($P<0.05$), and the observation group was significantly higher than the control group ($P<0.05$). After treatment, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), serum total bilirubin (TBIL) and prothrombin time (PT) were significantly lower than those before treatment ($P<0.05$). The observation group was significantly lower than the control group ($P<0.05$). After treatment, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ were significantly higher in the 2 groups than before treatment ($P<0.05$), and the observation group was significantly higher than the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the treatment efficiency between the observation group and the control group with Child-pugh score <10 points after treatment ($P>0.05$). After treatment, the treatment efficiency of patients with a Child-pugh score between 10 and 15 was significantly higher than that of patients with a Child-pugh score between 10 and 15 ($P<0.05$). The incidence of hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome and double infection in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Early using of human immunoglobulin in patients with end-stage liver disease complicated with infection is better for patients with Child-pugh scores between 10 and 15 points. Human immunoglobulin can significantly improve the infection status of liver function, immune function and blood coagulation function, and reduce the incidence rate of hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome and double infections during treatment, delay the progress of end-stage liver disease.

[KEY WORDS] End-stage liver disease combined with infection; Human immunoglobulin; Child-pugh score; Liver function; Immune function

近年来肝病在我国的发病率一直处于居高不下的状态,肝癌、肝硬化及肝炎等绝大多数的肝脏疾病均可导致肝脏出现不可逆性损伤,形成终末期肝病^[1]。终末期肝病往往会导致患者免疫功能降低,产生并发症。感染现象在终末期肝病中的发生率较高,若救治不及时,可严重损伤患者的肝功能,甚至可导致死亡^[2]。人免疫球蛋白具有多种生物学功能,若与抗生素合并使用可提高对某些细菌和病毒感染的疗效^[3]。本研究以终末期肝病合并感染的患者作为研究对象,探究人免疫球蛋白对终末期肝病合并感染的治疗效果及对患者肝功能、免疫功能及凝血功能的影响,旨在为临床更好地治疗终末期肝病合并感染给予合理的参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择我院2016年3月至2018年3月收治的132例终末期肝病合并感染的患者为研究对象。本研究已得到医院伦理委员会的同意。随机选取66例患者为观察组,在常规治疗的基础上额外给予人免疫球蛋白,男性39例,女性27例,年龄45~69岁,平均(57.47±10.29)岁,其中腹腔感染患者41例、感染性休克3例、肺部感染7例、其它感染6例、2个部位以上的感染9例。观察组 Child-Pugh

评分 <10 分的患者为35例,Child-Pugh评分介于10~15分之间的患者为31例。同期单纯给予常规治疗的66例患者为对照组,男性38例,女性28例,年龄44~69岁,平均(56.96±10.17)岁,其中腹腔感染患者39例、感染性休克2例、肺部感染9例、其它感染7例、2个部位以上的感染9例。对照组 Child-Pugh评分 <10 分的患者为34例,Child-Pugh评分介于10~15分之间的患者为32例。2组患者的一般资料及 Child-Pugh评分均差异无统计学意义($P>0.05$)。

纳入标准:①选取对象均满足终末期肝病的诊断规范^[4];②入选对象均满足腹腔感染的诊断规范^[5];③患者知晓此次研究,并签署知情同意书。

排除标准:①患有心、肝、脑、肺疾病者;②对本研究所使用的药物发生过敏反应者;③患有精神性疾病者;④患有肿瘤者。

1.2 诊断标准

选取对象均经肝增强电子计算机断层扫描(contrast-enhanced computed tomography, CECT)等影像学检查、肝活检、内镜及实验室检查确诊,满足终末期肝病的诊断规范^[4],并按 Child-Pugh评分法^[5],依据患者的肝性脑病程度、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、血清白蛋白(serum albumin, ALB)、腹水、血清总胆红素(serum total bilirubin,

bin, TBIL)5个指标的得分情况,将所选患者分为Child-pugh评分<10分的患者、Child-pugh评分介于10~15分的患者。腹腔感染的诊断标准:腹胀、腹痛、发热畏寒、伴有少量腹水、中性粒细胞和白细胞数量增多;腹水、胸腔积液、尿、痰细菌培养结果呈阳性。

1.3 治疗方法

1.3.1 对照组

每日给予头孢噻肟钠(生产企业:山东海邦制药有限公司;批准文号:国药准字H20093075),1~2 g/次,3次/d,连续给药7 d。

1.3.2 观察组

在对照组治疗的基础上额外给予人免疫球蛋白(生产企业:广东双林生物制药有限公司;批准文号:国药准字S20003025),静脉滴注,于治疗的前3 d,每日使用量为200~300 mg/kg。3~7 d每日使用量为10 g。

1.4 观察指标和疗效评定

所有研究病例均在治疗前及治疗后清晨空腹采集静脉血1.8 mL。淋巴细胞亚群检测的样本为全血。将采集的血液样本放入离心机进行离心。最后分离出的血浆即为本研究检测PT的样本。将采集的血液样本于室温条件下放置半个小时,之后将样本放入离心机进行离心。最后分离出的血清即为本研究检测丙氨酸转氨酶

(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、TBIL、血浆总蛋白(plasma total protein, TP)的样本。采用Olympus AU-800型全自动分析仪测定ALT、AST、TBIL、TP。采用Sysmex CA-7000全自动血液凝固分析仪测定PT。采用BD公司FACScalibur流式细胞仪检测CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺淋巴细胞亚群并计算CD₄⁺/CD₈⁺。疗效评定^[6]:①有效:体征、症状均有所好转,中性粒细胞和外周血白细胞数量已达正常值,腹水显著减少甚至消失。②无效:体征、症状没有得到有效控制,甚至加重。腹水量增加,中性粒细胞和外周血白细胞数量没有出现降低趋势。

1.5 统计学处理

所有数据均应用SPSS 17.0进行分析;计数指标以百分率表示,采用 χ^2 检验;计量指标以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验; $P < 0.05$ 表明结果有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后2组患者的肝功能及凝血功能比较

2组患者治疗前ALT、AST、TBIL、PT、TP值差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后2组的TP均明显高于治疗前($P < 0.05$),且观察组明显高于对照组($P < 0.05$)。治疗后2组的ALT、AST、TBIL及PT均明显低于治疗前($P < 0.05$),且观察组明显低于对照组($P < 0.05$),见表1。

表1 治疗前后2组患者的肝功能及凝血功能情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of liver function and coagulation function between 2 group before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(U/L)	PT(s)	TP($\mu\text{mol/L}$)
观察组 (n=66)	治疗前	86.53±15.71	91.42±17.53	58.26±12.05	19.32±4.56	61.25±8.27
	治疗后	45.77±11.63	46.81±13.25	40.21±12.62	14.93±3.25	83.35±10.14
对照组 (n=66)	治疗前	86.23±15.28	91.76±20.32	57.94±13.26	19.54±6.42	60.96±8.12
	治疗后	58.63±13.26	60.51±16.42	50.24±13.16	10.17±2.48	71.18±9.31
t_1		0.147	0.306	0.068	0.072	0.296
P_1		0.874	0.539	0.523	0.517	0.643
t_2		4.672	3.815	3.637	2.936	2.373
P_2		0.026	0.030	0.033	0.039	0.042

t_1, P_1 表示治疗前“观察组 vs 对照组”; t_2, P_2 表示治疗后“观察组 vs 对照组”。

2.2 治疗前后2组患者的免疫功能比较

治疗前2组的CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺淋巴细胞亚群及CD₄⁺/CD₈⁺差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后

2组的CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺及CD₄⁺/CD₈⁺均明显高于治疗前($P < 0.05$),且观察组明显高于对照组($P < 0.05$),见表2。

表2 治疗前后2组患者的免疫功能比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of immune function between 2 group before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	CD ₃ ⁺ (%)	CD ₄ ⁺ (%)	CD ₈ ⁺ (%)	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
观察组 (n=66)	治疗前	72.83±10.63	32.45±5.92	18.84±5.37	1.36±0.99
	治疗后	96.61±13.24	53.46±7.25	27.06±3.58	1.88±0.76
对照组 (n=66)	治疗前	73.35±9.92	33.08±8.94	18.97±6.46	1.45±1.08
	治疗后	88.12±10.29	41.28±6.49	20.56±3.41	1.67±0.62
t_1		0.069	0.059	0.066	0.065
P_1		0.528	0.629	0.531	0.532
t_2		3.462	4.051	4.858	4.963
P_2		0.035	0.027	0.023	0.022

t_1, P_1 表示治疗前“观察组 vs 对照组”; t_2, P_2 表示治疗后“观察组 vs 对照组”。

2.3 治疗后2组患者的治疗有效率比较

治疗后观察组与对照组 Child-pugh 评分<10 分的患者治疗有效率差异无统计学意义($P>0.05$)。

治疗后观察组 Child-pugh 评分介于10~15分之间的患者的治疗有效率明显高于对照组 Child-pugh 评分介于10~15分之间的患者($P<0.05$),见表3。

表3 治疗后2组患者的治疗有效率比较

Table 3 Comparison of clinical efficiency between 2 group after treatment

组别	Child-Pugh 评分<10分				Child-Pugh 评分介于10~15分			
	n	有效	无效	有效率(%)	n	有效	无效	有效率(%)
观察组	35	32	3	91.43	31	25	6	80.65
对照组	34	31	3	91.18	32	17	15	53.13
χ^2				0.001				6.354
P				5.363				0.000

2.4 治疗后2组患者的并发症及二重感染情况比较

治疗期间观察组主要的并发症情况如下:上消化道出血共4例、肝性脑病共7例、肝肾综合征共5例、电解质紊乱共31例。对照组主要并发症情况如下:上消化道出血共7例、肝性脑病共18例、肝肾综合征共13例、电解质紊乱共37例。观察组肝性脑病及肝肾综合征的发生率分别为20%、14.29%,对照组肝性脑病及肝肾综合征的发生率分别为52.94%、38.24%,对照组明显高于观察组($\chi^2=6.936, P=0.000; \chi^2=7.24, P=0.000$),其余并发症差异无统计学意义($P>0.05$)。观察组共有3

人发生二重感染,发生率为8.57%。对照组共有9人发生二重感染,发生率为26.47%。观察组二重感染发生率明显低于对照组($\chi^2=8.216, P=0.000$)。

3 讨论

肝脏是人体内以代谢功能为主的一个器官,同时具有免疫及防御的功效,当肝脏受到损伤时会使体内的免疫功能发生异常,导致免疫力降低^[7-8]。肝纤维化时体内生成大量的自由基和炎性因子,进而导致肝功能及凝血功能的改变^[9-10],故对终末期肝病并发感染的患者来说测定肝功能、免疫功能及凝血功能对于临床治疗该病具有实质

性的指导意义。免疫球蛋白主要为IgG及其亚群分子,与此同时还含有人类淋巴细胞抗原(human lymphocyte antigen, HLA)、CD₄、CD₈分子^[11]。目前,免疫球蛋白已广泛应用于感染性及自身免疫性疾病的治疗,其具备抗炎及免疫调控的效果^[12]。其抗炎的机制为IgG中的Fc片段和淋巴细胞及吞噬细胞中的Fc受体相结合,生成抗炎因子。当肝脏受损后体内CD₈⁺水平会升高,同时生成大量代谢产物,使损伤加重,最终形成终末期肝病^[13]。人免疫球蛋白可以增加体内CD₃⁺水平,维持CD₄⁺与CD₈⁺的动态平衡,并且纠正CD₄⁺/CD₈⁺,调节机体免疫功能,进而增加生长因子的分泌加速肝脏修复,提高肝功能。免疫功能的提高也可阻滞CD₈⁺对肝脏的损伤,改善肝功能。治疗后观察组的肝功能优于治疗前及治疗后的对照组,即免疫球蛋白可以明显提高患者肝功能。

马春明等^[14]以105例终末期肝病合并感染患者为研究对象,探讨抗生素联合免疫球蛋白及单独使用抗生素对患者PT及TBIL的影响,即患者入院7d二种治疗方式均使TBIL及PT水平降低。凝血因子主要由肝脏合成,当肝功能受损时其不可正常的合成,故导致PT延长。本研究观察到经治疗后观察组PT及TBIL水平显著降低且趋于正常,即免疫球蛋白在进入机体后有效地改善由终末期肝病并发感染所带来的细胞调节紊乱症状,恢复凝血功能。

陈敏等^[6]探讨对中晚期肝病并发感染的不同Child-Pugh评分的患者实施人免疫球蛋白联合抗菌药物治疗的临床效果,得出对Child-pugh评分介于10~15分之间的终末期肝病合并感染患者,早期联合应用免疫球蛋白治疗能提高抗感染的疗效,其结果与本研究相类似。即免疫球蛋白对于治疗Child-pugh评分介于10~15分之间的患者效果优于Child-pugh评分<10分的患者,提示对于Child-pugh评分介于10~15分之间的患者早期联合免疫球蛋白治疗有潜在的有益效果。

钟国庆等^[15]对比分析抗生素联合免疫球蛋白与单纯抗生素治疗对终末期肝病合并感染患者二重感染发生率的影响,得出抗生素联合免疫球蛋白的二重感染发生率低于单纯应用抗生素治疗,但并无明显差异。此结论与本研究不一致,可能的原因为上述研究样本量较小^[15]。联合免疫球蛋白治疗相较于单一用药能明显的减少二重感染发

生率,其主要的原因为免疫球蛋白可以为机体提供相应的抗体,针对性的作用于入侵的病原体,减少重感染的发生。即人免疫球蛋白具有良好的抗炎效果,能够阻止二重感染,提升患者的预后质量。

肝脏为机体的主要免疫及防御器官,当肝损伤时会导致机体的免疫调节功能紊乱,如中性粒细胞功能低下、补体缺失等。终末期肝病合并感染患者机体中库普弗细胞遭到破坏,吞噬功能降低,故不能及时清除肠道细菌,导致来自门静脉中的内毒素无法经过有效的解毒而直接进入体循环,发生感染现象。内毒素可改变体内血液流变学及代谢,进而诱发多种并发症如肝性脑病及肝肾综合征等。免疫球蛋白可有效地调节终末期肝病合并感染患者的免疫功能。免疫功能的提高可增加库普弗细胞的吞噬功能,进而减少体内内毒素,最终减少肝性脑病及肝肾综合征等多种并发症的发生。

综上所述,对Child-pugh评分介于10~15分之间的终末期肝病合并感染患者早期使用人免疫球蛋白的抗感染疗效更佳。人免疫球蛋白能显著地改善终末期肝病的感染状态及患者的肝功能、免疫功能、凝血功能,并且减少治疗期间肝性脑病、肝肾综合征及二重感染的发生率,延缓了终末期肝病的进展。

参考文献

- [1] 吴玉卓,杨乐,翟玉峰,等. 干细胞移植对终末期肝病合并感染患者免疫、肝功能及相关指标的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(18):2492-2494.
- [2] 罗文强,张大志. 终末期肝病合并细菌感染的诊断与治疗[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 4(1):112-119.
- [3] 王垒,范林,彭贵主,等. 乙型肝炎免疫球蛋白在肝移植术后乙型肝炎复发防治中的应用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23(7):456-472.
- [4] 罗文强,张大志. 终末期肝病合并细菌感染的诊断与治疗[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 12(1):801-809.
- [5] 王婷. 肝硬化患者血小板、凝血功能的检测与肝硬化Child-Pugh分级的关系[J]. 中国实用医药, 2017, 12(7):35-37.
- [6] 陈敏,朱俊,袁玉林,等. 人免疫球蛋白联合抗菌药物治疗中晚期肝病合并感染患者的临床效果研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(21):4897-4899.

(下转第67页)

厄贝沙坦与前列地尔联用治疗糖尿病肾病的可行性分析

张华贞* 赵晓琴 吴琼皎

[摘要] **目的** 分析血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂厄贝沙坦与前列地尔联用对糖尿病肾病患者的治疗效果,旨在为临床更好地治疗糖尿病肾病提供合理的参考。**方法** 选取2014年3月至2016年3月河南省三门峡市中心医院收治的80例糖尿病肾病患者为研究对象。随机选取40例糖尿病肾病患者给予厄贝沙坦与前列地尔联合应用为观察组,40例糖尿病肾病患者仅给予厄贝沙坦为对照组。观察2组患者治疗前后的24 h尿微量白蛋白量(U-malb)、血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、舒张压(DBP)、收缩压(SBP)、高敏C反应蛋白(hs-CRP)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、不良反应情况及患者的治疗满意度。**结果** 治疗前2组患者DBP、SBP、BUN、Cr、hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb无明显差异($P>0.05$)。治疗后2组患者BUN、Cr、DBP、SBP、hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb明显低于治疗前($P<0.05$)。治疗后观察组BUN、Cr、DBP、SBP、hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb明显低于对照组($P<0.05$)。观察组临床有效率明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 厄贝沙坦与前列地尔二者联合治疗能够显著地降低糖尿病肾病患者的肾功能,改善糖尿病肾病预后,延缓糖尿病肾病的进展。

[关键词] 糖尿病肾病; 厄贝沙坦; 前列地尔; 肾功能

Feasibility analysis of irbesartan combined with alprostadil in the treatment of diabetic nephropathy

ZHANG Huazhen*, ZHAO Xiaoqin, WU Qiongjiao

(Department of Kidney Medicine, Sanmenxia Central Hospital, Sanmenxia, Henan, China, 472000)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonist irbesartan combined with alprostadil on patients with diabetic nephropathy, and to provide a reasonable reference for better treatment of diabetic nephropathy. **Methods** 80 patients with diabetic nephropathy admitted to Sanmenxia Central Hospital of Henan Province from March 2014 to March 2016 were enrolled. A total of 40 patients with diabetic nephropathy were randomly assigned to receive irbesartan and alprostadil as the observation group, and 40 patients with diabetic nephropathy were given only irbesartan as the control group. The 24-hour urine microalbumin (U-malb), serum creatinine (Cr), urea nitrogen (BUN), diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and β_2 -microglobulin (β_2 -MG) were measured before and after treatment. The adverse reactions before and after treatment and the satisfaction of patients were also observed. **Results** There were no significant differences in DBP, SBP, BUN, Cr, hs-CRP, β_2 -MG and U-malb between the 2 groups before treatment ($P>0.05$). BUN, Cr, DBP, SBP, hs-CRP, β_2 -MG and U-malb were significantly lower in the 2 groups after treatment than before treatment ($P<0.05$). The levels of BUN, Cr, DBP, SBP, hs-CRP, β_2 -MG and U-malb in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The clinical effective rate of the observation group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The

作者单位:三门峡市中心医院肾内科,河南,三门峡 472000

*通信作者:张华贞, E-mail: Zhangz1963@126.com

combination of irbesartan and alprostadil can significantly reduce renal function in patients with diabetic nephropathy, improve the prognosis of diabetic nephropathy, and delay the progression of diabetic nephropathy.

[KEY WORDS] Diabetic nephropathy; Irbesartan; Alprostadil; Renal function

糖尿病肾病为糖尿病的常见并发症之一,若不能及时地给予患者有效的治疗,可损伤肾功能^[1]。即便患者的血糖及血压得到了很好地控制,也仅能减缓微血管病变病程发展,无法完全抑制肾功能损伤^[2]。糖尿病肾病的主要发病原因为肾脏中血流动力学的改变^[3]。临床中厄贝沙坦及前列地尔均为保护肾脏的常见药物,二者均可有效地改善肾脏的血流动力学,对糖尿病肾病具有一定的治疗效果^[4]。本研究以80例糖尿病肾病患者作为研究对象,探究厄贝沙坦与前列地尔联用对患者的肾功能的改善作用,旨在为临床更好地治疗糖尿病肾病提供合理的参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年3月至2016年3月间河南省三门峡市中心医院收治的80例糖尿病肾病患者为研究对象。本研究已得到医院伦理委员会的同意及支持。随机选取40例糖尿病肾病患者给予厄贝沙坦与前列地尔治疗作为观察组,其中男性25例,女性15例,年龄在44~68岁之间,平均(56.74±10.26)岁,患病时长5.5~13.5年,平均(9.37±5.19)年。同时随机选取40例糖尿病肾病患者单用厄贝沙坦为对照组,其中男性23例,女性17例,年龄在42~67岁之间,平均(55.93±10.17)岁,患病时长5.5~14.5年,平均(8.84±4.96)年。2组尿白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)均为20~200 μg/min,且组间无明显差异($P>0.05$)。2组患者均在使用口服降糖药或使用胰岛素,使血糖维持在餐后<10.0 mmol/L,空腹<7.0 mmol/L,实验开始时2组间血糖无明显差异($P>0.05$)。2组患者的一般资料均无明显差异($P>0.05$),可以进行相互比较。

纳入标准:①糖尿病均符合2011年WHO标准^[5]。②UAER为20~200 μg/min,即2期糖尿病肾病(早期糖尿病肾病)。③3个月内未使用厄贝沙坦及前列地尔。④患者知晓此次研究,并签署知情同意书。

排除标准:①合并严重的肝脏及心血管原发性疾病等。②患者对本研究所使用的药物发生过敏现象。③精神性疾病者。④糖尿病以外的其它疾病所导致的肾脏损害。⑤酮症酸中毒。

1.2 方法

1.2.1 对照组

对照组患者每日给予厄贝沙坦片剂(生产企业:安徽环球药业股份有限公司;批准文号:国药准字H20000545),口服0.3 g/次,1次/天。连续治疗1个月,控制患者蛋白质摄入量,并给予控制血糖治疗。

1.2.2 观察组

观察组每日给予厄贝沙坦片(生产企业:安徽环球药业股份有限公司;批准文号:国药准字H20000545)与前列地尔注射液(生产企业:北京泰德制药股份有限公司;批准文号:国药准字H10980023;生产批号:201306017)联合治疗。厄贝沙坦口服0.3 g/次,1次/天。前列地尔注射液10 μg/次(溶于10 mL生理盐水中),1次/天。连续治疗1个月,控制患者蛋白质摄入量,并给予控制血糖治疗。

患者血压值测定:清晨于坐姿的方式测量舒张压(diastolic blood pressure, DBP)及收缩压(systolic blood pressure, SBP),采用电子血压计(型号:YE660A,江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)测定3次,取平均值。血液样本获取方法:清晨空腹静脉采血1.8 mL,室温条件放置30 min后将样本放入离心机离心分离出血清,即为本研究检测样本。尿液样本获取方法:于治疗前后留存24 h尿液,离心,取上清液待用。 β_2 -微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2 -MG)、尿微量白蛋白(urinary microalbumin, U-malb)采用放射免疫方法检测,血肌酐(serum creatinine, Cr)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)、高敏C反应蛋白(high sensitivity c-reactive protein, hs-CRP)采用AU5800自动生化分析仪检测。

1.3 观察指标和疗效评定

密切观察2组患者治疗前后的DBP、SBP、BUN、Cr、hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb。其正常值为

BUN<7.1 mmol/L, Cr<120 μ mol/L, hs-CRP<8 mg/L, β_2 -MG<2.2 mg/L, U-malb<20 mg/L^[6]。疗效评定标准:①显效:临床症状得到明显的改善甚至完全消失,UAER降至50%以下,Cr降至30%以下。②有效:临床症状有所缓解,肾功能有所改善,UAER及Cr降至20%~30%。③无效:临床症状没有得到改善甚至恶化,实验室指标无降低趋势,甚至升高^[7]。有效率=(显效+有效)/总人数 \times 100%。

1.4 统计学处理

所有数据均以SPSS 17.0进行分析;定性指标以百分率表示,采用 χ^2 检验;定量指标以($\bar{x} \pm s$)

表示,采用 t 检验; $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后2组患者的hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb改变情况

治疗前2组患者hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb无明显差异($P>0.05$)。治疗后2组hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb均明显低于治疗前($P<0.05$)。治疗后观察组hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb明显低于对照组($P<0.05$) (表1)。

表1 治疗前后2组患者的hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb改变情况($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The situation of hs-CRP, β_2 -MG, U-malb before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	hs-CRP (mg/L)	β_2 -MG (mg/L)	U-malb (mg/d)
观察组	40	治疗前	8.33 \pm 2.13	148.82 \pm 26.56	236.81 \pm 31.29
		治疗后	3.41 \pm 1.41	82.54 \pm 11.42	93.82 \pm 28.14
对照组	40	治疗前	8.38 \pm 2.18	147.93 \pm 29.14	229.92 \pm 32.26
		治疗后	6.34 \pm 2.09	113.18 \pm 21.29	139.82 \pm 21.36
t_1			0.147	0.306	0.284
P_1			0.874	0.539	0.657
t_2			4.633	2.732	3.637
P_2			0.026	0.044	0.033

t_1, P_1 表示治疗前观察组与对照组相比较, t_2, P_2 表示治疗后观察组与对照组相比较。

2.2 治疗前后2组患者的DBP、SBP、BUN、Cr改变情况

治疗后2组患者BUN、Cr、DBP、SBP均明显低于治疗前($P<0.05$)。治疗后观察组DBP、SBP

明显低于对照组($P<0.05$) (表2)。

2.3 2组患者临床有效率

观察组患者临床有效率显著高于对照组($\chi^2=7.846, P=0.019$) (表3)。

表2 治疗前后2组患者的DBP、SBP、BUN、Cr改变情况($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The situation of DBP, SBP, BUN, Cr before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	BUN (mmol/L)	Cr (μ mol/L)
观察组	40	治疗前	91.27 \pm 29.27	150.79 \pm 20.73	17.17 \pm 2.33	195.12 \pm 25.39
		治疗后	70.62 \pm 15.78	129.34 \pm 28.62	10.14 \pm 1.86	125.84 \pm 21.43
对照组	40	治疗前	90.98 \pm 26.69	151.25 \pm 21.21	17.29 \pm 2.38	194.23 \pm 21.83
		治疗后	79.83 \pm 16.94	137.42 \pm 24.17	13.21 \pm 2.12	160.82 \pm 24.05
t_1			0.064	0.012	0.067	0.072
P_1			0.525	0.941	0.524	0.518
t_2			4.621	5.743	4.719	4.862
P_2			0.026	0.021	0.025	0.024

1 mmHg = 0.133 324 kpa; t_1, P_1 表示治疗前观察组与对照组相比较; t_2, P_2 表示治疗后观察组与对照组相比较。

表3 2组患者临床有效率比较 [n(%)]

Table 3 The situation of clinical efficiency after treatment [n(%)]

组别	n	显效	有效	无效	有效率(%)	χ^2	P
观察组	40	16(40.00)	18(45.00)	6(15.00)	85.00	7.846	0.019
对照组	40	9(22.50)	19(47.50)	12(30.00)	70.00		

3 讨论

糖尿病肾病依照其肾小球滤过率将其分为5期,2期即早期糖尿病肾病为可逆转时期^[8]。蛋白尿为反映糖尿病肾病的重要指标,能够真实地体现肾间质、肾小管及肾小球的病变程度^[9]。故对糖尿病患者蛋白尿进行控制对其治疗及预后具有重要意义。

糖尿病肾病的作用机理还未完全揭示,国内大多数学者认为糖尿病肾病为肾血流动力学、肾血流非动力学相互作用所产生的结果^[10]。血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂因其疗效较优、降压效果好、持续时间长、保护心血管、降低尿蛋白、保护肾功能、改善肾血流动力学等作用,为治疗糖尿病肾病的常用药物^[12]。厄贝沙坦通过选择性地干预AT1受体及血管紧张素Ⅱ相互结合,与此同时舒张血管、减少醛固酮分泌,进而达到降压的效果^[13]。还可以通过降低肾小球的高滤过、高灌注及高压的状态改善肾脏血流动力学,通过降低肾脏细胞外基质的蓄积以及调控肾小球滤过膜选择通透性从而改善肾脏非血流动力学。前列地尔为药物封存于脂微球中,具有靶向性,对肾血管具有明显的扩张作用,可降低体内血栓素A₂水平与减少血小板的聚集,改善血液黏度。已有相关研究人员发现,前列地尔对早期糖尿病肾病患者肾功能的恢复及蛋白尿的控制具有很好的疗效^[14]。本研究结果显示,治疗后2组hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb均明显低于治疗前,且观察组更低。王卫民^[4]以96例糖尿病肾病患者为研究对象,探讨单独使用厄贝沙坦及厄贝沙坦与前列地尔联用治疗前后患者体内hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb水平情况,结果与本研究一致。即厄贝沙坦与前列地尔联用对hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb的改善作用更加明显。分析原因hs-CRP、 β_2 -MG、U-malb为肾脏损害的重要标志物之一,其值越高证明肾脏损伤越严重。故在厄贝沙坦的基础上加用前列地尔能够提高其治疗效果,减少患者的肾损伤情况。

金洁娜等^[14]对比分析在厄贝沙坦的基础上加用前列地尔与单独使用厄贝沙坦对患者治疗前后DBP及SBP的影响,其研究结果与本文类似,即前列地尔能够增强厄贝沙坦改善糖尿病肾病患者血压的效果。有研究证实前列地尔能够防止糖尿病肾病患者肾动脉扩张及高血压产生^[15],故在厄贝沙坦基础上加用前列地尔能够提高对患者血压的改善情况。刘婧承等^[16]对7篇文献进行Meta分析,发现厄贝沙坦联合前列地尔对糖尿病肾病的治疗在Cr及BUN方面优于对照组,与本研究结果一致。

综上所述,厄贝沙坦与前列地尔二者联合治疗能够显著地降低糖尿病肾病患者肾功能,改善糖尿病肾病预后,延缓糖尿病肾病的进展。

参考文献

- [1] 姚迪,张红,陆卫平. GLP-1受体激动剂与糖尿病肾病[J]. 重庆医学, 2015, 17(7):981-983.
- [2] 程梦凌,张倩,薛耀明. 糖尿病肾病药物治疗进展[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(22):3793-3795.
- [3] 万倩,张倩,薛耀明,等. 2型糖尿病肾病患者蛋白尿的危险因素分析[J]. 实用医学杂志, 2015, 6(8):1234-1237.
- [4] 王卫民. 前列地尔联合厄贝沙坦治疗早期糖尿病肾病的临床效果[J]. 中国综合临床, 2016, 32(5):434-437.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国血糖监测临床应用指南(2011年版)[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2011, 3(5):656-664.
- [6] 牟新,周迪夷,庄爱文,等. 2型糖尿病和糖尿病肾病人群的中医证候演变规律[J]. 中华中医药杂志, 2016, 7(9):3707-3710.
- [7] 强旭钊,林晋生,黄辉. 回顾分析依那普利联合银杏叶软胶囊治疗早期糖尿病肾病临床疗效及不良反应[J]. 糖尿病新世界, 2017, 12(20):219-115.
- [8] 张健美,李英. 糖尿病肾病早期肾损伤检测指标的研究进展[J]. 河北医药, 2015, 13(8):1232-1235.

(下转第62页)

血清癌胚抗原、甲状腺球蛋白及半乳凝集素-3水平在甲状腺癌鉴别诊断中的价值

温琥玲 谢建平* 林师宇 文丹

[摘要] **目的** 探讨血清中癌胚抗原(CEA)、甲状腺球蛋白(Tg)及半乳凝集素-3(gal-3)在甲状腺癌鉴别诊断中的价值。 **方法** 选取我院经病理学明确诊断的甲状腺癌患者127例(甲状腺癌组)、甲状腺良性结节患者(良性组)60例,收治时间2015年1月至2017年9月,检测并对比2组患者的血清CEA、Tg及gal-3水平,以病理学结果作为诊断金标准,计算诊断学指标。 **结果** 甲状腺癌患者的血清CEA、Tg及gal-3水平均显著高于良性组,差异具有统计学意义($P<0.05$);当血清CEA为5.00 ng/mL时,CEA诊断甲状腺癌的灵敏度为26.98%,特异度为87.40%,ROC曲线下面积AUC值为0.608;当血清Tg为65.40 ng/mL时,Tg诊断甲状腺癌的灵敏度为30.17%,特异度为89.21%,ROC曲线下面积AUC值为0.629;当血清gal-3为19.67 ng/mL时,gal-3诊断甲状腺癌的灵敏度为72.85%,特异度为85.64%、ROC曲线下面积AUC值为0.761;血清CEA、Tg及gal-3诊断甲状腺癌的灵敏度为87.92%,特异度为94.18%,ROC曲线下面积AUC值为0.916。 **结论** 血清CEA、Tg及gal-3联合诊断甲状腺癌较3项指标单独应用具有更高的临床价值。

[关键词] 癌胚抗原; 甲状腺球蛋白; 半乳凝集素-3; 甲状腺癌

The value of serum carcinoembryonic antigen, thyroglobulin and galectin-3 in differential diagnosis of thyroid cancer

WEN Huling, XIE Jianping*, LIN Shiyu, WEN Dan

(Nuclear Medicine Department, Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College, Nanchong, Sichuan, China, 637000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the clinical value of serum carcinoembryonic antigen (CEA), thyroglobulin (Tg) and galectin-3 (gal-3) in the differential diagnosis of thyroid cancer. **Methods** 127 patients with thyroid cancer diagnosed by pathology (thyroid cancer group) and 60 patients with benign thyroid nodules (benign group) were recruited. The patients were treated from January 2015 to September 2017. Serum levels of CEA, Tg, and gal-3 were calculated using pathological results as diagnostic gold standards. **Results** Serum levels of CEA, Tg and gal-3 in patients with thyroid cancer were significantly higher than those in benign group ($P<0.05$). When the serum CEA was 5.00 ng/mL, the sensitivity of CEA in diagnosing thyroid cancer was 26.98%, the specificity was 87.40%, and the area under the ROC curve was 0.608. When the serum Tg was 65.40 ng/mL, the sensitivity and specificity of Tg for diagnosing thyroid cancer were 30.17% and 89.21%, respectively. The AUC value under the ROC curve was 0.629. When serum gal-3 was 19.67 ng/mL, the sensitivity of diagnosis of thyroid cancer was 72.85%, the specificity was 85.64%, the area under the ROC curve was 0.761. The sensitivity and specificity of serum CEA, Tg, gal-3 in the diagnosis of thyroid cancer were 87.92% and 94.18%, respectively. The area under the ROC curve was 0.916. **Conclusion** The clinical value of the combination of CEA, TG and gal-3 was significantly higher than the single indicator.

[KEY WORDS] Carcinoembryonic antigen; Thyroglobulin; gal-3; Thyroid carcinoma

作者单位: 川北医学院附属医院核医学科, 四川, 南充 637000

*通信作者: 谢建平, E-mail: Xiejp@vip.sina.com

甲状腺癌是较为多见的内分泌系统来源恶性肿瘤,流行病学研究显示,甲状腺癌的发病率可达345/10万人左右^[1-2]。甲状腺癌的发生可以通过增加远处器官转移,导致患者病死率的上升。现阶段临床上甲状腺癌缺乏有效的早期诊断方式,超声等影像学检查虽然可以提高甲状腺癌的早期筛查水平,但其诊断的灵敏度或者特异度仍然具有一定的局限性。血清学指标的变化在评估恶性肿瘤的发生过程中具有一定的参考价值。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg)是甲状腺滤泡上皮病变过程中显著释放的糖链蛋白,其表达浓度的上升可以促进滤泡上皮的异常增殖和分化,增加甲状腺癌细胞的转移风险^[3-4];半乳凝集素-3(gal agglutinin-3, gal-3)可以通过结合糖链蛋白,促进细胞内的第二信使的活化,增加癌细胞调控异常的发生风险^[4]。为了进一步揭示血清CEA、Tg及gal-3水平在甲状腺癌患者血清中的异常表达,从而指导临床诊疗,本次研究选取川北医学院附属医院经病理学明确诊断的甲状腺癌患者127例,探讨了相关指标的异常表达及诊断学指标如灵敏度或者特异度的变化情况,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取川北医学院附属医院经病理学明确诊断的甲状腺癌患者127例(甲状腺癌组)、甲状腺良性结节患者(良性组)60例,收治时间2015年1月至2017年9月。

甲状腺癌组,男32例、女95例,年龄31~75岁,平均(54.5±16.0)岁;病理学结果:乳头状癌121例、滤泡状癌6例。良性组,男14例、女46例,年龄32~72岁,平均(53.0±16.8)岁,病理学结果:甲状腺腺瘤38例、结节性甲状腺肿22例。2组患者的

年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入排除标准

1.2.1 纳入标准

①甲状腺癌的诊断标准参考中华医学会制定的相关标准^[4];②所有甲状腺癌患者均经过病理学检查证实;③患者年龄范围18~75岁;④患者采集标本接受检查时未接受放化疗;⑤本研究获得患者的知情同意及川北医学院附属医院医学伦理委员会的批准。

1.2.2 排除标准

①术前具有放化疗病史;②合并其他部位恶性肿瘤;③长期应用免疫调节性药物;④伴有风湿性疾病、结缔组织疾病。

1.3 检测方法

采集患者入院后或者治疗6~8 h内的空腹静脉血5 mL,加入枸橼酸钠抗凝剂3 mL,1 000 r/min离心(离心半径12 cm)5 min,采用化学发光法检测CEA、Tg,检测仪器为MAGLUMI化学发光免疫分析仪及其配套试剂。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测gal-3,检测仪器为美国Bio-Bad全自动酶标仪,试剂盒购自南京建成生物工程研究所,严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 统计学方法

统计软件采用SPSS 16.0,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,组间比较采用 t 检验;绘制ROC曲线并选取最佳诊断临界值对应的诊断灵敏度、特异度、漏诊率、误诊率、曲线下面积AUC值及对应的临界值; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者的血清CEA、Tg及gal-3水平比较

甲状腺癌患者的血清CEA、Tg及gal-3水平均显著的高于良性组,差异具有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

表1 2组患者的血清CEA、Tg及gal-3水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum CEA, Tg and gal-3 levels were compared between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CEA (ng/mL)	Tg (ng/mL)	gal-3 (ng/mL)
甲状腺癌组	127	17.3±8.2	98.6±35.2	25.84±5.71
良性组	60	2.2±1.6	35.3±18.5	14.20±3.98
<i>t</i> 值		14.118	13.089	14.232
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 CEA、Tg 及 gal-3 鉴别诊断甲状腺癌与甲状腺良性疾病的诊断学分析

血清 CEA、Tg 及 gal-3 3 种指标单独应用及联合应用鉴别诊断甲状腺癌的诊断学价值指标见表 2, ROC 曲线图见图 1; gal-3 鉴别诊断甲

状腺癌的灵敏度、ROC 曲线下面积 AUC 值均高于 CEA、Tg; 血清 CEA、Tg 及 gal-3 3 种指标联合应用鉴别诊断甲状腺癌时, 能显著地提高诊断的灵敏度、特异度及 ROC 曲线下面积 AUC 值。

表 2 血清 CEA、Tg 及 gal-3 鉴别诊断甲状腺癌与甲状腺良性疾病的诊断学分析

Table 2 Diagnostic analysis of serum CEA, Tg and gal-3 for differential diagnosis of thyroid cancer and benign thyroid diseases

观察指标	临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	漏诊率(%)	误诊率(%)	AUC 值
CEA	5.00	26.98	87.4	73.02	12.6	0.608
Tg	65.4	30.17	89.21	69.83	10.79	0.629
gal-3	19.67	72.85	85.64	27.15	14.36	0.761
CEA+Tg+gal-3	-	87.92	94.18	12.08	5.82	0.916

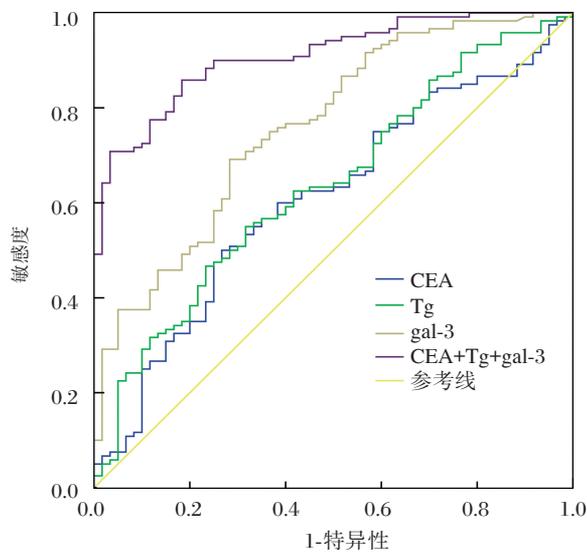


图 1 血清 CEA、Tg 及 gal-3 单独及联合应用鉴别诊断甲状腺癌与甲状腺良性疾病的 ROC 曲线图

Figure 1 ROC curve of serum CEA, Tg and gal-3 in the differential diagnosis between thyroid cancer and thyroid benign disease

3 讨论

射线因素、遗传等均可以促进甲状腺癌的发生,在我国部分地区甲状腺癌的发病率可持续性维持在较高的水平。甲状腺癌的五年生存率不足 45%,治疗后的远期生存指标如中位生存时间或者无瘤生存期等均无明显的改善^[5-6]。恶性肿瘤的早期诊断对于疾病的治疗具有重要的意义,其可以

为恶性肿瘤的根治性切除术提供契机,降低中晚期恶性肿瘤的检出率。但现阶段临床上主要通过超声检查评估甲状腺恶性病变的发生风险,超声检查虽然较为简便,但其对于早期甲状腺癌的检出水平仍然不能令人满意^[7]。

CEA 是临床上较为常见的广谱上皮细胞来源恶性肿瘤糖蛋白成分,在胚胎组织或者成人癌细胞中可显著异常高表达,CEA 的高表达主要考虑与甲状腺上皮细胞的异常增殖过程中过度释放的细胞内囊泡有关,过度的囊泡内糖蛋白结合成分的释放,促进了血清中信号通路蛋白的激活,促进了肿瘤下游信号转导因子的激活,增加了癌细胞的增殖或者分化障碍的风险^[8]。Tg 作为甲状腺球蛋白,其表达浓度的上升可以促进患者滤泡上皮细胞或者乳头状上皮细胞癌细胞 DNA 异常扩增的风险,导致癌细胞分化诱导凋亡抑制因子 a 的上调,促进癌细胞对于淋巴结内皮细胞的粘附能力,增加癌细胞的转移可能^[9-10]。gal-3 作为糖蛋白末端结合成分,其与癌细胞表面的巯基结合,能够增加细胞内三磷酸腺苷的浓度,促进癌细胞的凋亡抑制^[11]。

本次研究发现,在甲状腺癌患者血清中存在明显的相关指标的异常表达,其中甲状腺癌患者血清中 CEA、Tg 及 gal-3 水平均显著高于良性组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示 CEA、Tg 及 gal-3 等均可能参与到了恶性肿瘤的发生发展过程中。相关指标的高表达可以通过影响到下列几个

方面的因素,进而促进甲状腺滤泡或者乳头状细胞的异常病变^[12-14]:①CEA可以提高甲状腺滤泡上皮细胞癌变的风险,在癌细胞增殖过程中过度释放的CEA可以通过正反馈调控机制进一步增加癌细胞周期的紊乱风险;②gal-3对于甲状腺癌的发生的影响,主要考虑gal-3对于癌细胞表面糖蛋白的结合增加了癌细胞的NOTCH或者AKT等信号通路的激活程度。王宗平等^[15]研究者在探讨了52例不同类型的甲状腺癌的发病机制的过程中发现,CEA、Tg在甲状腺癌患者血清中的异常阳性表达率可在55%以上,同时其蛋白表达浓度可在发生了转移或者淋巴结浸润的患者中进一步上升。CEA单独诊断甲状腺癌的灵敏度较低,而特异度较高,可达80%左右,提示CEA对于甲状腺癌的特异性标志作用较为明显,诊断灵敏度较低则主要考虑与在早期癌细胞的凋亡或者分化过程中CEA的活性较弱、释放浓度不足有关。血清Tg诊断甲状腺癌的灵敏度或者特异度均有所上升,血清Tg在甲状腺结节或者甲状腺自身免疫性疾病中均可能显著上升,临床上对于可疑甲状腺癌血清Tg上升的患者,应综合评估其他参考指标,降低误诊的风险。综合考虑3种评估指标CEA、Tg及gal-3的诊断学灵敏度或者特异度,发现CEA、Tg的单独诊断的灵敏度较低,而gal-3单独诊断的灵敏度可显著上升,差异较为明显,存在相关显著的差异考虑可能与CEA、Tg作为肿瘤相关标志物,其对于甲状腺恶性肿瘤的特异性标志作用较低,同时甲状腺良性增生性病变或者甲状腺功能性病变等,均可能影响到Tg的表达,进而干扰到CEA、Tg的诊断灵敏度。gal-3诊断的灵敏度或者特异度均较为理想,但本次研究与部分国内外相关研究存在一定的不同之处,部分研究认为单独gal-3诊断甲状腺癌的灵敏度或者特异度均不足60%^[5],这与本研究存在较大的差异,考虑主要由于gal-3检测方法、检测时间节点或者相关临床研究未考虑到甲状腺癌的病理分型有关。单独检测诊断甲状腺癌的价值不足,而在联合了3种血清学指标进行诊断后,其诊断学价值较为理想,诊断的特异度可达90%以上,但临床上应综合影像学检查、临床症状、查体等,提高甲状腺癌的早期诊断水平。

相比于其他研究,本次研究的创新性在于分别探讨了CEA、Tg及gal-3的单独诊断或者联合诊断的相关灵敏度、特异度情况。综上所述,血清

CEA、Tg及gal-3水平在甲状腺癌患者中异常高表达,同时联合三者进行诊断的临床参考价值较高。

参考文献

- [1] Mian C, Perrino M, Colombo C, et al. Refining Calcium Test for the Diagnosis of Medullary Thyroid Cancer: Cutoffs, Procedures, and Safety [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 99(5):1656-1664.
- [2] Panebianco F, Mazzanti C, Tomei S, et al. The combination of four molecular markers improves thyroid cancer cytologic diagnosis and patient management [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1):90-92.
- [3] 王龙强, 彭功玲, 江明. 甲状腺过氧化物酶和半乳糖凝集素-3在甲状腺微小乳头状癌组织的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(1):205-207.
- [4] 张娜, 梁军, 林岩松. 甲状腺球蛋白抗体对甲状腺乳头状癌^{131I}清甲疗效的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(6):476-481.
- [5] Witt R L. Thyroid Cancer: Current Diagnosis, Management, and Prognostication [J]. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 2014, 47(4):34-35.
- [6] Liu M, Ruan M, Chen L. Update on the molecular diagnosis and targeted therapy of thyroid cancer [J]. *Medical Oncology*, 2014, 31(6):56-57.
- [7] 邵喜艳, 李金花, 郭斌, 等. 高频彩色多普勒超声和血清甲状腺球蛋白在分化型甲状腺癌^(131I)清除残余甲状腺后随访中的应用[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2015, 12(10):621-624.
- [8] 王喜青, 梁晓燕, 马晓伟, 等. 血清CEA、Tg联合检测在甲状腺良、恶性肿瘤中的临床价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(9):850-852.
- [9] 柴红, 陈泽泉, 余永利. 甲状腺球蛋白与抗甲状腺球蛋白抗体在甲状腺癌合并桥本病中对癌转移的诊断价值[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2014, 34(8):1189-1193.
- [10] 程歆琦, 金成, 韩松, 等. 甲状腺球蛋白自身抗体对2种化学发光免疫学方法检测甲状腺球蛋白的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(10):701-704.
- [11] 袁媛, 唐晓磊, 张林杰. 凝集素芯片法分析桥本氏甲状腺炎患者外周血DC细胞膜糖蛋白的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(2):213-217.
- [12] 郭玲, 张熊. CK19 Galectin-3和CD56mRNA在囊实性甲状腺病变中的临床应用[J]. *中国医师杂志*,

- 2015, 17(7):1074-1077.
- [13] 史良凤, 于振乾, 李玉妹, 等. 术前抗甲状腺过氧化物酶抗体和抗甲状腺球蛋白抗体阳性与甲状腺结节良恶性的关系[J]. 中国医科大学学报, 2014, 43(11):1044-1046.
- [14] 张勇, 刘小莉, 郭利锋, 等. 血清 Tg 检测联合 SPECT/CT 融合影像技术在甲状腺癌转移诊断中的临床价值[J]. 国际医药卫生导报, 2017, 23(6): 836-838.
- [15] 王宗平, 伍波, 康杰, 等. 血清甲状腺球蛋白水平对分化型甲状腺癌的诊断和监测价值[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2017, 24(3):391-395.

(上接第 57 页)

- [9] Shoukry A, Sel-A B, El-Sokkary R H. Urinary mono-cyete chemoattractant protein-1 and vitamin D-binding protein as biomarkers for early detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 408(1):25-32.
- [10] 余翠, 熊钱颖, 王李卓, 等. 糖尿病肾病的发病机制及治疗进展[J]. 医学综述, 2015, 11(21): 3944-3947.
- [11] 戴婧, 郭立新. 2013 国际糖尿病联盟老年 2 型糖尿病管理指南解读[J]. 中国医学前沿杂志电子版, 2014, 6(2):98-102.
- [12] Tian ML, Shen Y, Sun ZL, et al. Efficacy and safety of combining pentoxifylline with angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor blocker in diabetic nephropathy: a meta-analysis [J]. *International Urology and Nephrology*, 2015, 47(5): 815-822.
- [13] 张萍莉. 厄贝沙坦治疗糖尿病高血压的临床疗效观察[J]. 中国公共卫生, 2015, 18(4):277-277.
- [14] 金洁娜, 孙慧艳, 徐赵敏, 等. 前列地尔治疗早期糖尿病肾病疗效及安全性观察[J]. 重庆医学, 2016, 45(10):1337-1338.
- [15] 刘新胜. 前列地尔联合厄贝沙坦治疗对早期糖尿病肾病患者血流变学及肾功能的影响[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(9):883-886.
- [16] 刘婧承, 李竞. 厄贝沙坦联合前列地尔治疗糖尿病肾病的 Meta 分析[J]. 临床内科杂志, 2012, 29(9): 621-623.

(上接第 32 页)

- [7] 蒋武, 鲁衍强, 李瑛, 等. 南宁市壮族和汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因单核苷酸多态性比较[J]. 广西医学, 2014, 36(11): 1517-1519.
- [8] 孙玉萍, 鲁衍强, 付敏, 等. 乌苏市哈萨克族与回族女性 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶、甲硫氨酸合成酶还原酶单核苷酸多态性的分布特征调查[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(6): 1273-1276.
- [9] 杨玉清, 唐菊香, 鲁衍强, 等. 银川市回族和汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因单核苷酸多态性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(35): 6267-6269.
- [10] 郝友瑛, 赵红, 鲁衍强, 等. 新疆维吾尔族和汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因单核苷酸多态性比较[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(21): 3495-3497.
- [11] 符春翠, 鲁衍强, 李瑛, 等. 张家界市土家族与汉族女性 MTHFR、MTRR 基因型和等位基因频率分布研究及与其他地区比较[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(9): 1898-1901.
- [12] 朱海燕, 罗克嫫. 叶酸缺乏研究综述[J]. 中华临床医药, 2003, 4(7): 59-60.
- [13] 云小云, 欧凤荣. 叶酸缺乏与出生缺陷相关性研究进展[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(2): 244-248.
- [14] 尹保民, 杨小红, 曾淑兰. 叶酸代谢障碍与出生缺陷的关系探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 10: 75-77.
- [15] 杜景云, 杨新颖, 龚波, 等. 血浆同型半胱氨酸和叶酸及 MTHFR 基因多态性与早产的相关性[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34(6): 894-899.
- [16] 朱兆霞, 鲁衍强, 薛琰, 等. 山东省诸城市汉族女性 MTHFR、MTRR 基因多态性研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2016, 27(2): 12-16.
- [17] 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南工作组. 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南(2017)[J]. 中国生育健康杂志, 2017, 28(5): 401-410.

· 综述 ·

miRNA对自然杀伤细胞生长发育及功能的调控作用

黄秋萍¹ 袁欢¹ 王宜林¹ 黄庆生¹ 李琦^{1,2*}

[摘要] 微小RNA(microRNAs, miRNAs)是长度为19~24 nt的内源性非编码小RNA。miRNA与自然杀伤(naturalkiller, NK)细胞的分化和功能密切相关,并参与传染病,肿瘤和其他病理过程的免疫调节。本文对近年来发现的miRNAs在NK细胞发育、分化和功能调控中的作用进行综述。

[关键词] miRNA; NK细胞; 细胞发育; 细胞功能

Regulation of miRNAs on the growth, development and function of natural killer cells

HUANG Qiuping¹, YUAN Huan¹, WANG Yilin¹, HUANG Qingsheng¹, LI Qi^{1,2*}

(1. Laboratory of National Defense Key Subject of Space Biological Simulation Technology of Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi, China, 710072; 2. Experimental Center of the College of Life, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi, China, 710072)

[ABSTRACT] MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding small RNAs that are 19 to 24 nt in length. miRNAs are closely related to the differentiation and function of natural killer (NK) cells and are involved in the immune regulation of infectious diseases, tumors and other pathological processes. In this review, the role of miRNAs discovered in recent years in the development, differentiation and functional regulation of NK cells will be summarized.

[KEY WORDS] microRNAs; NK cells; Cell development; Cell function

微小RNA(microRNAs, miRNAs)是一种非编码的单链小RNA,通过与靶mRNA的3'非编码区(3'-untranslated region, 3'-UTR)特异性互补配对,降低靶基因mRNA的稳定性或抑制蛋白质翻译,调控细胞的功能和多种生理过程。自然杀伤(naturalkiller, NK)细胞是人体免疫防御的第一道防线,在抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节方面发挥重要作用^[1]。本文总结了近年来miRNA在NK细胞分化发育与功能调控中的作用,对miRNA在NK细胞免疫调控中作用的了解有利于从分子细胞水平上揭示某些疾病的发病机理并为其临床防治提供新理论与新依据。

1 NK细胞概述

人的NK细胞是CD56阳性且CD3阴性(CD56⁺CD3⁻)的大颗粒淋巴细胞。根据NK细胞表面CD56分子和Fc受体CD16(Fcγ R IIIA)的表达水平不同又可将NK细胞分为CD56^{dim}NK细胞和CD56^{bright}NK细胞2类亚群^[2]。CD56^{dim}NK细胞和CD56^{bright}NK细胞在分布与功能等方面存在较大差异。CD56^{dim}亚群在骨髓、外周血、脾脏中占主导地位,胞内含有大量穿孔素(perforin)和颗粒酶(granzyme, Grz);而CD56^{bright}亚群则在淋巴结、扁桃体和蜕膜中占主导地位,以释放细胞因子为主

基金项目:西北工业大学2018年度研究生创新创业种子基金(ZZ2018043)

作者单位:1. 西北工业大学空间生物模拟技术国防重点学科实验室,陕西,西安710072

2. 西北工业大学生命学院实验中心,陕西,西安710072

*通信作者:李琦, E-mail:liqi_1111@nwpu.edu.cn

要功能,并参与免疫调节^[3]。NK 细胞没有主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制,无需特异性抗原刺激,可直接被激活并杀死靶细胞。因此NK 细胞在人体固有免疫系统中发挥重要作用。

2 miRNA 的产生以及生物学功能

成熟的 miRNA 由基因转录后的初级转录本经过一系列核酸酶的切割而形成。初级转录本被称为 pri-miRNAs,其片段长度从几百到几千个碱基不等。pri-miRNA 通过由 RNA 聚合酶 III(Drosha)和双链 RNA 结合蛋白(DGCR8)组成的蛋白质复合物修剪。形成长度为 60~70 个核苷酸的

miRNA 前体,即 pre-miRNA^[4-5]。pre-miRNA 的结构为单一发夹,5'端带有磷酸基团,3'端有 2 个突出碱基,并带有 3'羟基。pre-miRNA 的 3'剪切位点被转运蛋白 exportin5 识别,依赖于 Ras(rat sarcoma)相关核蛋白和 GTP(guanosine triphosphate)途径,pre-miRNA 被 exportin5 带入胞质区域^[6];接下来,pre-miRNA 被另外一个 RNA 聚合酶 III(Dicer)与 TAR RNA 结合蛋白(TAR RNA binding protein, TRBP)复合物剪切,从而得到单链成熟 miRNA。成熟的 miRNA 与其他相关蛋白质组成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)^[7],引起靶 mRNA 的降解或翻译抑制(图 1)。

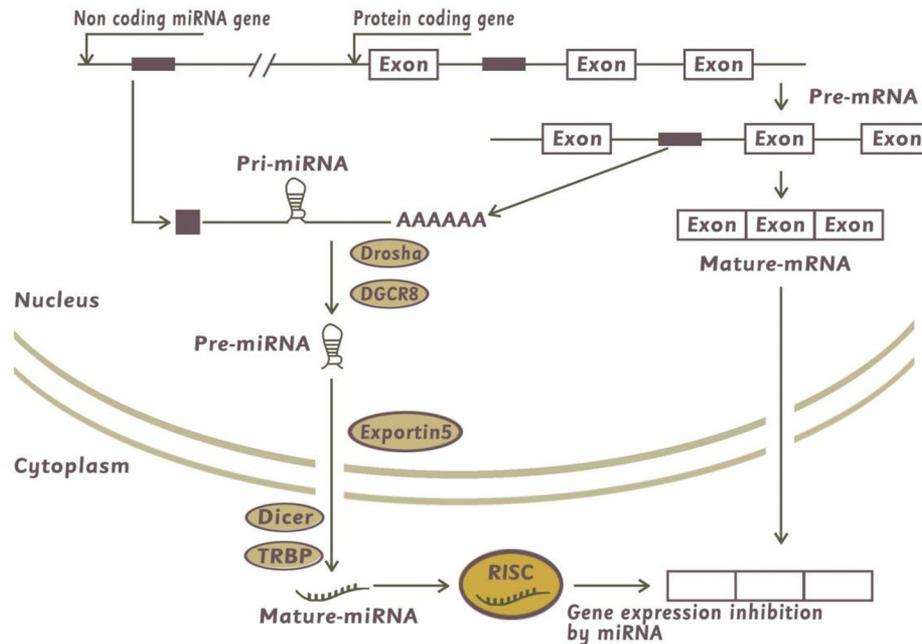


图 1 miRNA 形成与作用机制
Figure 1 The formation and action mechanism of miRNA

3 miRNA 调控 NK 细胞的生长发育及功能

miRNA 在生物体内广泛存在,虽不直接参与编码基因和蛋白质的翻译,但因其可以调控靶标基因的表达,在生理和病理过程中发挥着强大的调控作用。关于 miRNA 在调节 T、B 细胞的成熟和功能方面的作用已有了较多的研究,但针对 miRNA 调控 NK 细胞发育与功能方面的报道则较少。近几年,随着人们对 NK 细胞功能重要性认识的提高,miRNA 在 NK 细胞发育与功能的调控中

扮演的重要角色引起学界的广泛关注,并取得了许多研究进展。

3.1 miRNA 调控 NK 细胞发育

众所周知,Notch 信号影响细胞功能的多个过程,包括多能祖细胞的分化、细胞凋亡、细胞增殖及细胞边界的形成。而 *c-Myb* 是一种原癌基因,在细胞增殖、分化方面具有重要作用。Cichocki 等^[8]的研究发现,在 NK 细胞中,miR-181 可通过抑制 Notch 信号的抑制剂 Nemo 样激酶(Nemo-like kinase, NLK)的表达水平来促进 NK 细胞的发育和

成熟的过程。类似的,其它一些 miRNAs,如 miR-15/16^[9], miR-150^[10]也能够调控 NK 细胞的成熟过程,这些 miRNAs 都可通过靶向 *c-Myb* 来促进 NK 细胞走向成熟。

miR-155 也是一条能够调控 NK 细胞功能的重要 miRNA,可通过抑制肌醇磷酸酶-1 (SHIP-1) 的表达,增强胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 和蛋白激酶 B (protease kinase B) 的活性,从而增强 NK 细胞的细胞毒活性,调控 NK 细胞的发育和 NK 细胞在体内的动态平衡和活化过程^[11]。

3.2 miRNA 调控 NK 细胞的细胞毒功能

在人体先天免疫过程中, NK 细胞被激活后,通过释放诱导凋亡的 GrzB、perforin 和一系列细胞因子,如 IFN- γ 和 TNF- α 等发挥针对靶细胞的细胞毒作用。

Ni 等^[12]的研究团队在人外周血 NK (peripheral NK, pNK) 细胞中发现了高表达的 miR-362-5p, 该 miRNA 通过靶向肿瘤抑制因子头帕肿瘤综合征蛋白 (cylindromatosis, CYLD), 使 NK 细胞中 CD107a 表达量上调, 促进 perforin、GrzB 的分泌, 从而促进 NK 细胞的细胞毒性。

与 miR-362-5p 作用相反, miR-223 和 miR-27a* 负调控 NK 细胞的细胞毒功能。miR-223 可直接抑制 NK 细胞中 GrzB mRNA 的翻译; miR-27a* 则可同时抑制 NK 细胞中 GrzB 和 perforin mRNA 的翻译来抑制 NK 细胞的细胞毒性功能^[13]。

在调控 NK 细胞分泌 IFN- γ 方面, miR-155 起着重要的促进作用。SHIP-1 是调节 IFN- γ 表达的负性调控因子, 但 miR-155 可通过下调 *SHIP-1* 的表达促进 NK 细胞对 IFN- γ 的分泌^[11]。除了 *SHIP1*, miR-155 还可调控多种靶标基因, 例如 *Noxa* 和 *SOCS-1* (Suppressor of cytokine signaling-1) 等, 说明 miR-155 参与细胞内多条信号通路的调节, 对细胞的功能发挥重要的调控作用。而与 miR-155 作用相反, miR-29、miR-15/16 可直接作用于 IFN- γ mRNA 的 3' UTR 区域, 抑制 IFN- γ mRNA 的翻译, 从而抑制 NK 细胞中 IFN- γ 的合成^[14]。除此之外, 最新的研究表明, miR-146 a 通过 NF- κ B 负调节 NK 细胞中 IFN- γ 的产生, 并且这种 miRNA 可能对于防止 NK 细胞被超活化和过度产生 IFN- γ 至关重要^[15]。在调控 NK 细胞分泌 TNF- α

方面, miR-30 c-1* 作用于 NK 细胞 CD226 促进 TNF- α 的产生并增强 NK 细胞的杀伤作用^[16]。

3.3 miRNA 在抗感染免疫与抗肿瘤免疫中对 NK 细胞的调节作用

3.3.1 miRNA 与小鼠巨细胞病毒

在小鼠巨细胞病毒 (mouse cytomegalovirus, MCMV) 感染的 NK 细胞模型中, miR-155 在 NK 细胞中表达上调, 该 miRNA 通过作用于信号转导和转录激活因子 (signal transduction and activator of transcription, STAT)-4 以响应 NK 细胞刺激因子 IL-12 和 IL-18 的信号。尽管在正常生理状态下, miR-155 对于 NK 细胞的细胞毒功能和细胞因子的分泌是非必需的, 但受到 MCMV 感染后, miR-155 的缺乏会导致淋巴组织和非淋巴组织中 NK 细胞功能受损和记忆 NK 细胞数量的减少, 说明在 MCMV 病理条件下, miR-155 对 NK 细胞的功能发挥重要的调控作用^[17]。

3.3.2 miRNA 与肝脏疾病

Cheng 等^[18]的研究表明对于感染慢性丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 的患者, miR-155 是抑制 HCV 感染的信号蛋白的 miRNA, 在 HCV 感染的 NK 细胞中被下调; T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白域蛋白 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM)-3 是负性调节剂, 在感染慢性 HCV 的患者 NK 细胞中上调。其中调节机制是 miR-155 通过触发 STAT-5 磷酸化来阻断 TIM-3 信号, 增强 NK 细胞分泌 IFN- γ 的能力, 即 miR-155 通过下调 TIM-3 的表达来调节 NK 细胞的功能, 因此在患者体内低表达的 miR-155 增强了 TIM-3 信号, 从而减少了 IFN- γ 分泌, 导致 NK 细胞的细胞毒功能降低。

在慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 感染患者和肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者中, NK 细胞功能被显著抑制, 但导致这种功能抑制的机制仍不清楚。有关研究显示, 与来自正常供体的 NK 细胞相比, CHB 和 HCC 患者的 NK 细胞中, miR-146a 表达量上调并通过靶向 *STAT-1* 下调 IFN- γ 的分泌, 抑制 NK 细胞的细胞毒性^[19]。Ge 等^[20]的最新研究发现在 CHB 患者的 NK 细胞中, miR-155 表达下调并通过靶向 *SOCS-1* 而降低 IFN- γ 的产生, NK 细胞杀伤活性的下降可能导致 CHB 感染期间的免疫功能障碍。

相反的, 有一些 miRNA 可对 NK 细胞的功能产生积极的影响。例如, miR-34a 的过度表达可上

调 HCC 患者 NK 细胞中自然杀伤细胞 2 族成员 (natural killer group 2 member D, NKG2D) 和 perforin 的表达, 促进 NK 细胞的发育并增加 NK 细胞对靶细胞的杀伤活性^[21]。除此之外, miR-182 也可通过调节 NKG2D 的表达而增强 NK 细胞对 HCC 的细胞毒性^[22]。

3.3.3 miRNA 调控乳腺癌

Breunig 等^[23]研究发现, miR-519a-3p 的高表达可干扰乳腺癌细胞的凋亡信号, 使肿瘤细胞凋亡减少。同时, miR-519a-3p 可下调乳腺癌细胞中能被 NKG2D 识别的 UL16 结合蛋白 2 (UL16 binding protein 2, ULBP2) 和主要组织相容性复合体 I 类分子相关蛋白 A (major histocompatibility complex class I chain-related protein A, MICA) 的表达, 从而削弱乳腺癌细胞对 NK 细胞杀伤作用的敏感性, 提示高表达的 miR-519a-3p 水平可能与乳腺癌的不良生存率相关。

3.3.4 miRNA 调控登革热感染

针对于登革热病毒 (dengue virus, DENV) 感染目前尚无确切有效的病原治疗, 且 DENV 感染的免疫发病机制尚不完全清楚, 所以 DENV 仍然是一个主要的公共健康威胁。但相关研究推测 GrzB 可能在登革热病毒的感染过程中发挥关键作用。miR-378 是 NK 细胞细胞毒功能的负性调控因子^[24], Liu 等^[25]发现, 在 DENV 感染患者 NK 细胞中 miR-378 下调, 当对 DENV 感染小鼠加入 miR-378 agomir 使得 miR-378 过表达后发现 GrzB 表达被抑制并促进 DENV 复制。该结果提示 miR-378 在调节 GrzB 表达中的重要作用, 以及 GrzB 在体内控制 DENV 复制对人体的保护作用, 为寻找 DENV 感染的免疫发病机制提供了新的切入点。

4 展望

作为一种非编码小分子, miRNA 调节体内许多生理和病理过程, 并在调节 NK 细胞的发育、成熟、活化及细胞毒作用等多个环节中都扮演着重要角色。同时, 在病理条件下, miRNA 对 NK 细胞的功能也有一定的影响。对 miRNA 调控 NK 细胞功能的深入研究, 将有助于从分子细胞水平上理解某些感染、慢性炎症、肿瘤等疾病的病理机制。同时, 一些发挥重要调控作用的关键 miRNAs 有望成为疾病快速诊断、治疗和预后评估的重要生物标志物, 或基因治疗药物的靶标。在未来的研究

中, 通过开发能够调节 NK 细胞的发育或功能的关键 miRNA 抑制剂或模拟物而针对性地调控 NK 细胞的功能可为相关疾病的预防和治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Baginska J, Viry E, Berchem G, et al. Granzyme b degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(43):17450-17455.
- [2] Caligiuri MA. Human natural killer cells [J]. Blood, 2008, 112(3):461-469.
- [3] Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, et al. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function [J]. J Immunol, 1986, 137(9):2735-2739.
- [4] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431(7006):350-355.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.
- [6] Wang X, Xu X, Ma Z, et al. Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by exportin-5 [J]. RNA, 2011, 17(8):1511-1528.
- [7] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex [J]. Cell, 2003, 115(2):199-208.
- [8] Cichocki F, Felices M, McCullar V, et al. Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating notch signaling [J]. J Immunol, 2011, 187(12):6171-6175.
- [9] Sullivan RP, Leong JW, Schneider SE, et al. MicroRNA-15/16 antagonizes myb to control NK cell maturation [J]. J Immunol, 2015, 195(6):2806-2817.
- [10] Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, et al. Mir-150 regulates the development of NK and iNKT cells [J]. J Exp Med, 2011, 208(13):2717-2731.
- [11] Trotta R, Chen L, Costinean S, et al. Overexpression of mir-155 causes expansion, arrest in terminal differentiation and functional activation of mouse natural killer cells [J]. Blood, 2013, 121(16):3126-3134.
- [12] Ni F, Guo C, Sun R, et al. MicroRNA transcriptomes of distinct human NK cell populations identify mir-362-5p as an essential regulator of NK cell function [J]. Sci Rep, 2015, 5:9993.
- [13] Fehniger TA, Wylie T, Germino E, et al. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome [J]. Genome Res, 2010, 20(11):

- 1590-1604.
- [14] Sullivan RP, Leong JW, Schneider SE, et al. MicroRNA-deficient nk cells exhibit decreased survival but enhanced function[J]. *J Immunol*, 2012, 188(7):3019-3030.
- [15] Wang H, Zhang Y, Wu X, et al. Regulation of human natural killer cell ifn-gamma production by microRNA-146a via targeting the nf-kappab signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:293.
- [16] Gong J, Liu R, Zhuang R, et al. Mir-30c-1* promotes natural killer cell cytotoxicity against human hepatoma cells by targeting the transcription factor hmbox1[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4):645-652.
- [17] Zawislak CL, Beaulieu AM, Loeb GB, et al. Stage-specific regulation of natural killer cell homeostasis and response against viral infection by microRNA-155 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17):6967-6972.
- [18] Cheng YQ, Ren JP, Zhao J, et al. MicroRNA-155 regulates interferon-gamma production in natural killer cells via tim-3 signalling in chronic hepatitis c virus infection[J]. *Immunology*, 2015, 145(4):485-497.
- [19] Xu D, Han Q, Hou Z, et al. Mir-146a negatively regulates nk cell functions via stat1 signaling [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(8):712-720.
- [20] Ge J, Huang Z, Liu H, et al. Lower expression of microRNA-155 contributes to dysfunction of natural killer cells in patients with chronic hepatitis b [J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1173.
- [21] Abdelhamid AK, Yacoub RA, Fawzy IO, et al. MicroRNA-34a and natural killer cells: An immuno-epigenetic approach to halt hepatocellular carcinoma progression[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(1):S231-S231.
- [22] Abdelrahman MM, Fawzy IO, Bassiouni AA, et al. Enhancing nk cell cytotoxicity by mir-182 in hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(8):667-673.
- [23] Breunig C, Pahl J, Kublbeck M, et al. MicroRNA-519a-3p mediates apoptosis resistance in breast cancer cells and their escape from recognition by natural killer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8):e2973.
- [24] Wang P, Gu Y, Zhang Q, et al. Identification of resting and type i ifn-activated human nk cell mirnomes reveals microRNA-378 and microRNA-30e as negative regulators of nk cell cytotoxicity [J]. *Journal of Immunology*, 2012, 189(1):211-221.
- [25] Liu SY, Chen LM, Zeng Y, et al. Suppressed expression of mir-378 targeting gzmb in nk cells is required to control dengue virus infection[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2016, 13(5):700-708.

(上接第53页)

- [7] 赵世民, 郑林华, 韩英, 等. 经由肝动脉输注自体外周血干细胞移植治疗终末期肝病的临床疗效[J]. *河北医学*, 2016, 22(9):1411-1414.
- [8] 闫惠平, 刘燕敏, 张海萍, 等. 2015年肝脏自身免疫疾病国际会议简介[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(10):788-790.
- [9] Zeng X, Tang XJ, Sheng X, et al. Does low-dose rifaximin ameliorate endotoxemia in patients with liver cirrhosis: A prospective study [J]. *Journal of Digestive Diseases*, 2015, 16(11):665-674.
- [10] Kim BI, Kim HJ, Park JH, et al. Increased intestinal permeability as a predictor of bacterial infections in patients with decompensated liver cirrhosis and hemorrhage [J]. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2015, 26(3):550-557.
- [11] 徐佳莉, 王莹, 陈鹏. 人免疫球蛋白联合更昔洛韦治疗小儿腺病毒肺炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(6):1101-1104.
- [12] 陈丹. 血清中免疫球蛋白检验在乙型肝炎诊治中的意义[J]. *中国实用医药*, 2015, 19(9):50-51.
- [13] 张乃丹. 血清免疫球蛋白检验在肝衰竭诊断中的应用效果评价[J]. *医学信息*, 2017, 30(13):130-137.
- [14] 马春明, 李军. 人免疫球蛋白治疗终末期肝病合并感染临床观察[J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36(12):1362-1364.
- [15] 钟国庆, 杨庆平, 王伟玖, 等. 人免疫球蛋白联合抗生素治疗中晚期肝病并发感染的 Child-Pugh 评分效果观察[J]. *中国伤残医学*, 2015, 11(14):100-101.

α 地中海贫血筛查及诊断技术的进展

沈茹¹ 陈云明² 杨晓红¹ 王晓岩^{3*}

【摘要】 α 地中海贫血在我国东南沿海地区发病率高,预防和准确诊断该病尤为重要。先进的实验筛查及诊断技术,是预防及治疗 α 地中海贫血的基石。本文综述近年来 α 地中海贫血的相关实验诊断技术的进展,以期增加对不同的实验诊断及发展的了解,为各种技术方法的应用和改进拓宽视野和思路。

【关键词】 α 地中海贫血;分子机制;筛查方法;基因诊断

Progress in screening and diagnostic techniques for α -thalassemia

SHEN Ru¹, CHEN Yunming², YANG Xiaohong¹, WANG Xiaoyan^{3*}

(1. Laboratory Department of Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650028; 2. Laboratory Department of Shilin Yi nationality Autonomous County people's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 652200; 3. The 920 Hospital Cadre Ward of the Joint Service Support Unit of the Chinese people's Liberation Army, Kunming, Yunnan, China, 650032)

【ABSTRACT】 Alpha thalassemia has a high incidence in the southeastern coastal areas of China, and it is important to prevent and diagnose the disease. Advanced experimental screening and diagnostic techniques are the cornerstones for the prevention and treatment of alpha thalassemia. In this article, the progress of related experimental diagnostic techniques for alpha thalassemia in recent years will be reviews, with a view to increasing understanding of different experimental diagnostic techniques and developments, and broadening horizons and ideas for the application and improvement of various technical methods.

【KEY WORDS】 α -thalassemia; Molecular mechanism; Screening methods; Genetic diagnosis

α 地中海贫血(α -thalassemia)是因 α 珠蛋白基因变异,导致 α 珠蛋白缺乏或合成水平降低,以溶血、不同程度的小细胞低色素性贫血为表现的一种血红蛋白病(hemoglobinopathy)。 α 珠蛋白可构成胎儿期及成年期最重要的3种血红蛋白:血红蛋白F(hemoglobin F, HbF)、血红蛋白A(hemoglobin A, HbA)、血红蛋白A₂(hemoglobin A₂, HbA₂),正常人的2个 α 珠蛋白基因($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)分别从父、母两方继承。当前已发现超过100种与 α 地中海贫血相关基因型^[1-2],我国最为常见类型为东南亚缺失型 α 地中海贫血--^{SEA}、右侧缺失- α ^{3,7}、左侧缺失- α ^{4,2}、非缺失型

的血红蛋白 Constant-Spring (hemoglobin Constant-Spring, HbCS)和血红蛋白 Quong-Sze (hemoglobin Quong-Sze, HbQS)^[3]。 α 地中海贫血患者的临床表现根据基因型和变异数目不同而有所差异,从无症状携带到宫内即死亡均可见,主要症状为贫血、肝脾肿大、黄疸等。地中海贫血主要发病地区集中于热带和亚热带,特别是地中海沿岸,我国发病率较高省份为广西、广东、云南、海南等省^[4]。临床上,对 α 地中海贫血的治疗主要集中在对症治疗和对因治疗,主要是输血和干细胞移植两方面,治疗带来的花费大、并发症多。因此,对特定人群的筛查、检

基金项目:云南省重点研发计划项目国际科技合作专项(2018IA047)

作者单位:1. 昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650028

2. 昆明市石林彝族自治县人民医院检验科,云南,昆明 652200

3. 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院干部病房,云南,昆明 650032

*通信作者:王晓岩, E-mail: 764693110@qq.com

测,对于 α 地中海贫血的防控尤为重要,而实验室诊断技术的进步意义重大。本文分析和总结了近年来国内外在 α 地中海贫血筛查及诊断方面的研究进展,进行简要的综述,以期加深对不同的实验筛查、诊断技术及发展的了解,为各种技术的应用和改进拓宽视野和思路。

1 α 地中海贫血的分子生物学机制

正常成年人血红蛋白(HbA)的构成主要为2条 α 珠蛋白链和2条 β 珠蛋白链($\alpha_2\beta_2$),胎儿血红蛋白(HbF)由2条 α 珠蛋白链和2条 γ 珠蛋白链($\alpha_2\gamma_2$)构成,编码 α 链和 γ 链的基因2条来自父源、2条来自母源($\alpha\alpha/\alpha\alpha, \gamma\gamma/\gamma\gamma$),编码 β 链的基因则1条来自父源、1条来自母源(β/β)^[5]。在胎儿及成人中,若 α 链在血红蛋白中的含量降低,则 β 链或 γ 链的比例升高,而 β 链或 γ 链比例升高的血红蛋白氧气亲和力高于正常的血红蛋白,导致在外周毛细血管无法正常地将氧气解离,进而导致以缺氧为主要病理机制的一系列临床症状^[6]。

编码 α 珠蛋白的基因位于16号染色体短臂末端临近端粒13.3处,该区域包括2个 α 基因(α_1, α_2)、1个胚胎期基因 ζ_2 、3个假基因及1个功能未知的基因。根据 α 链基因缺陷程度,分子生物学上将 α 地中海贫血分为2类:一类为缺失型 α 地中海贫血,由较大片段基因缺失导致;另一类为非缺失型 α 地中海贫血,由少数核苷酸插入、缺失、单个替换而导致。而在个体层面上,又可以分为2类:① α^0 地中海贫血,因缺失2个 α 基因($-/\alpha\alpha$)导致 α 珠蛋白合成完全受阻所致,我国常见基因型为 $-^{SEA}$,而 $-^{THAI}$ 及 $-^{FH}$ 较为罕见;② α^+ 地中海贫血,由点突变导致的基因缺失或失活($-\alpha/\alpha\alpha$ 或 $\alpha\alpha^{NP}/\alpha\alpha$),从而使部分 α 珠蛋白合成受阻,我国最常见的 α^+ 地中海贫血基因型为 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 缺失型突变以及HbCS、HbQS、血红蛋白Westmead(hemoglobin Westmead, HbWS)点突变^[7]。临床上一般根据 α 基因变异数目分为:静止型(1个 α 基因异常)、标准型(2个 α 基因异常)、HbH病(3个 α 基因异常)、Hb Bart胎儿水肿综合征(4个 α 基因异常)^[8]。静止型为无症状携带者;标准型和HbH病可因突变位置、类型、严重程度不同,出现贫血、肝脾肿大等一系列症状;Hb Bart最为严重,大多在孕中晚期流产或出生后短时间死亡,少数可在宫内输血、出生后输血等方式下出生并生存至5岁左右,但生存质量和预后极差。

2 α 地中海贫血常用的诊断方法

2.1 筛查方法

临床上高度怀疑为 α 地中海贫血的患者,常规的筛查检测包括血常规检查、红细胞形态学检查、红细胞渗透脆性实验、不稳定血红蛋白测定、血红蛋白电泳等手段。在实际临床中,考虑到敏感性、特异性,常用的筛查方法为血常规检查和血红蛋白电泳2种^[9]。

2.1.1 血常规检查

在临床实践中,血常规通常是贫血类疾病首选及基础检验技术。 α 地中海贫血细胞学表现为小细胞低色素性贫血,所以,如果血常规显示 $MCV < 80$ fL, $MCH < 27$ pg^[8],即可诊断为小细胞低色素性贫血,而进一步确诊地中海贫血需与其他小细胞低色素性贫血如缺铁性贫血、儿童铅中毒、铁幼粒细胞贫血等疾病相鉴别。红细胞计数在地中海贫血患者及携带者中通常有一定程度的增高,网织红细胞通常偏低,可以此进行初步鉴别^[10]。考虑到血常规检查的经济性,利用其作为初筛手段,具有重要的实用意义。

2.1.2 血红蛋白电泳

对于 $MCV < 80$ fL, $MCH < 27$ pg的小细胞低色素性贫血,在进行鉴别后如高度怀疑地中海贫血,可进行血红蛋白电泳进行分析。在基因诊断广泛应用之前,血红蛋白电泳首次在19世纪70年代被用于产前诊断,并被作为地中海贫血的确诊实验长达30余年^[11]。常用的实验室技术有:血红蛋白醋酸纤维薄膜电泳、珠蛋白肽链聚丙烯酰胺凝胶电泳、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、全自动毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)、全自动琼脂糖电泳等。其中全自动琼脂糖电泳为曾经广泛应用的技术,其原理是根据各种不同类型的血红蛋白分子携带的电荷不同、在电场中运动速度不同,而分离不同类型的血红蛋白。在电泳后,经染色、脱色、固定,用扫描仪扫描电泳图像,对各条电泳带进行定量分析,可测定HbA、HbA₂、HbF、血红蛋白H(hemoglobin H, HbH)、血红蛋白Bart(hemoglobin Bart, Hb Bart)以及其他异常的血红蛋白的含量^[12]。血红蛋白电泳技术,可直接确诊Hb Bart型 α 地中海贫血,其余类型均因血红蛋白含量有限或不稳定,难以直接观察,无法直接诊断。但其对于 β 地中海贫血具有明

确诊意义,故可以作为排除性诊断的重要手段^[13]。随着分子生物学诊断方法进步与发展,血红蛋白电泳逐渐被基因诊断所替代,基因诊断现已成为最广泛使用的确诊实验方法。但在缺乏相应实验室条件,或在复杂、非典型突变类型的诊断中,依然具有重要地位^[14]。

2.2 分子生物学诊断方法

2.2.1 缺失型 α 地中海贫血的基因诊断

2.2.1.1 Southern 印记杂交 Southern 印记杂交原理为:首先用限制性内切酶消化提取出的目的DNA;再经琼脂糖凝胶电泳取得DNA片段后,分离不同DNA片段至硝酸纤维膜上;用放射性同位素标记的DNA或RNA探针与酶切、分离后的DNA片段杂交;最后用同位素显影技术,显示不同酶切后的DNA片段的位置及其大小。该检测技术可作为 α 珠蛋白基因片段缺失的诊断金标准,因而可用作其他检测手段的最终确诊试验^[15]。该方法缺点为操作繁琐,费时费力,不利于大范围开展,因此限制了其临床诊断中的应用。然而该检测结果稳定可靠,可作为PCR诊断结果的确诊实验。

2.2.1.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription quantitative, real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) RT-qPCR 其原理为采用荧光染色检测聚合酶链式扩增后产物总量^[16]。采用该方法检测时,可用不同颜色的荧光素对PCR扩增出的产物进行标记,从而同时显示不同片段的扩增产物,可分辨正常基因型、杂合子和纯合子^[17]。该方法为目前确定样品PCR产物总量最敏感、最特异的方法。Fallah等人^[18]应用RT-PCR技术,对29例经缺失基因测序后记过为阴性的疑似 α 地中海贫血患者的样本进行了检测,其结果显示29例样本中均存在 α 珠蛋白基因缺失。

2.2.1.3 跨越断裂点聚合酶链反应 (Gap-polymerase chain reaction, Gap-PCR) Gap-PCR最早由中国台湾学者Chong等^[19]建立,其原理为:设计2对或1对和1个单独的引物,1对引物与缺失区域外侧的基因序列互补,另1对或另1个单独的引物与缺失区域内的基因序列互补。若是正常基因型或杂合子,在缺失区域内的引物能够扩增出片段;若是纯合子,则缺失区域内的引物不能扩增出片段。而在缺失区域外侧的1对引物,因缺失的基因使两端DNA拉近,进而扩增成DNA片段^[20]。该方法可鉴别出纯合子患者、杂合子携带者和正常人。

目前通过该手段可鉴别诊断8种以上常见的 α 地中海贫血基因^[21],且该技术容易开展,检测过程简单,需时短,成本低,便于临床推广,可广泛应用于缺失型 α 地中海贫血的基因检测。但该手段的缺点为仅可检测出已知突变,如存在未知的突变则会出现假阴性结果,干扰临床诊断^[22]。

2.2.1.4 多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

MLPA技术是对样品中的目标序列定位和定量的检测技术,该技术联合基因杂交、连接酶催化反应、PCR扩增反应等技术,可以同时检测40多个不同核酸序列拷贝数的变化。在MLPA技术中,先设计2个寡核苷酸探针,与靶序列进行杂交,之后利用连接酶的特性将两部分探针连接。基于连接反应具备高度的特异性,即仅当2个探针均与靶序列完全互补杂交,连接酶才能将两段探针连接成一条完整的核苷酸链。如存在一个碱基的差别,都可以导致杂交不完全,连接反应因此无法进行。连接反应完成后,用适当引物扩增,之后使用毛细管电泳分离产物,进行软件分析,根据图像中扩增峰与标准扩增峰的对比,根据扩增峰改变情况判断是否有突变存在^[23]。Joly等^[24]运用MLPA,发现了一种长达285 kb的包含整个 α 珠蛋白基因家族的大片段缺失的缺失型 α 地中海贫血。Phylipsen等^[25]亦应用该技术,检测出了11种新的缺失型 α 地中海贫血基因。该方法存在成本较高,且需要毛细管电泳仪等缺点,不便于推广应用。由于可以检测出基因类型未知的 α 地中海贫血,MLPA可以作为常见方法检测阴性但高度怀疑地中海贫血时的确诊实验。

2.2.2 非缺失型 α 地中海贫血的基因诊断

2.2.2.1 反向点杂交聚合酶链反应 (polymerase chain reaction-reverse dot blot, PCR-RDB) PCR-RDB为临床上广泛应用的检测技术,其原理采取在尼龙膜上固定已知的寡核苷酸探针序列,与PCR产物进行杂交,后经分析杂交信号可检测出标本的突变情况^[26]。该方法优点为一份标本中如存在多种点突变可同时检测出,郭广洲等^[27]应用该检测技术针对中国人常见的3种非缺失型 α 地中海贫血(α^{QS} , α^{CS} , α^{WS})展开实验,明确检测出同一样品在3个位置发生的点突变,并区分了纯合子或杂合子突变,证实了该检测方法简单高效,符合临床检验需求。

2.2.2.2 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) PCR-RFLP 原理为经混合 DNA 限制性内切酶与 PCR 产物,利用内切酶高度识别切割特定 DNA 序列的特性,酶切得到不同 DNA 片段^[28]。点突变型 α 地中海贫血将导致 DNA 序列改变使酶切位点改变,从而影响酶切片段的长度。通过凝胶电泳可鉴别 DNA 片段的数量及大小,与正常序列酶切片段电泳对比,据此判断标本是否存在点突变^[29]。该法虽操作简便,用时短,但因其不能检测出具体点突变类型,限制了该技术在临床上的推广应用。

2.2.2.3 基因芯片 (gene chip) 基因芯片技术在 80 年代被提出,后于 90 年代该技术开始用于诊断地中海贫血。该技术原理是已知序列的靶核苷酸探针 (基因探针) 排列固定于硅片、玻片等支持物上,与经过荧光或同位素标记的样品进行杂交,以芯片上不同位置出现的杂交信号的有无及强弱为标准进行样品突变的定性及定量分析。Ye 等^[30]通过在实验中设计了常见的 α 、 β 地中海贫血基因的 38 个探针 (其中包括地中海贫血的常见 16 种突变, $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 、 $--^{SEA}$ 、 α^{QS} 、 α^{CS} 、 α) ,可在同一杂交反应,即于一块芯片中检测出这些突变的存在与否,极大地简化了实验步骤,使地中海贫血在基因芯片检测技术方面得到了极大的提升。该检测具有快速,高效,高敏感性及高效性等特性,为临床的 α 地中海贫血检测提供了一种新型、快速的检测手段。

2.2.2.4 DNA 序列测定 DNA 序列测定是基于一定手段测定标本基因核苷酸序列,从而检测出准确点突变的位置及类型,是目前检测基因突变的金标准^[31]。该方法是利用 DNA 自动测序仪对标本的 PCR 产物进行全自动化核苷酸序列测定,得出该标本核苷酸序列,进而分析取得点突变位置及类型。Galehdari 等^[32]采用 RDB-DNA 测序联合技术对伊朗的 1 241 例标本进行检测,发现 42 种基因突变,高于 PCR-RDB 能发现的 17 种突变。目前该检测技术优点在于不仅可以检测出已知突变,在一定程度上亦可检测出未知突变^[33]。DNA 序列测定具有快速高效,结果准确等特性,若今后出现可降低成本的技术改进,则该技术在临床检测方面的推广前景会进一步增加。

3 小结与展望

随着现代检验科学技术的不断发展, α 地中海贫血的实验室诊断技术也在不断改进及提高,各种先进的分子生物学科研究成果正不断转化为可行的实验室诊断技术。在众多技术手段中,如何精准选择合适的方法,需要检验工作者结合疾病本身的特点、实验室设备状况以及当地经济水平等条件,在综合分析后进行选择。在所有的地中海贫血分型中,血常规、血红蛋白电泳作为最基础的筛查手段,对于疾病的初步鉴别诊断具有重要意义,是不可或缺的诊断手段。而进一步的确证实验,则要根据相关指南,用 2 种不同原理的方法进行确诊。考虑到我国 α 地中海贫血以缺失突变为为主的情况,可优先选用 RT-qPCR 以及 Gap-PCR 技术。若为阴性结果,则考虑进行非缺失型突变相关的 PCR-RDB、基因芯片、DNA 测序等方法。对于实验室检测阴性但临床高度怀疑的病例,则需要考虑未知突变、非典型突变的可能,应当根据实验室条件不同,尝试进行 MLPA 和 DNA 测序、PCR-RFLP、Southern blot 等实验。考虑到 MLPA、PCR-RFLP、DNA 测序技术现阶段成本较高, Southern blot 在基层实验室开展困难等特点,临床实践中亦可将样本送至有条件的实验室协助诊断。同时,应当不断追踪国际国内最新的技术进展,以期将科研成果及时转化为实用的技术,提高诊断方法的敏感性和准确性,同时尽可能降低成本,为患者及临床医生提供更加可靠的实验室诊断方法。

参考文献

- [1] Frédéric BP, David JW. The alpha-thalassemias [J]. N Engl J Med, 2014, 371(20):1908-1916.
- [2] Giardine B, Borg J, Viennas E, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42:1063-1069.
- [3] 刘宜平,冯建军,尹维,等.地中海贫血诊断方法研究进展[J].川北医学院学报,2016,31(4):622-625.
- [4] Lai K, Huang G, Su L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):920.
- [5] Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: what clinicians need to know [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 39:3-15.

- [6] Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassemia[J]. *Lancet*, 2018, 391(10116):155-167.
- [7] 莫宗平, 喻长顺, 胡朝晖, 等. α 地中海贫血的基因诊断方法[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(3):682-684.
- [8] 葛均波, 徐永健. 内科学[M]. 人民卫生出版社, 2014, 543-566.
- [9] Ding ZY, Shen GS, Zhang S, et al. Epidemiology of hemoglobinopathies in the Huzhou region, Zhejiang province, Southeast China[J]. *Hemoglobin*, 2016, 40(5):304-309.
- [10] Gilad O, Shemer OS, Dgany O, et al. Molecular diagnosis of α -thalassemia in a multiethnic population[J]. *Eur J Haematol*, 2017, 98(6):553-562.
- [11] Clegg JB, Naughton MA, Weatherall DJ. An improved method for the characterization of human haemoglobin mutants: identification of alpha-2-beta-2-95GLU, haemoglobin N (Baltimore)[J]. *Nature*, 1965, 207(5000):945-947.
- [12] 陈永秀, 蒙开喜. 地中海贫血实验室诊断技术进展[J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(3):256-258, 293.
- [13] Sabath DE. Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: an ACLPS critical review[J]. *Am J Clin Pathol*, 2017, 148(1):6-15.
- [14] Brancaloni V, di Pierro E, Motta I, et al. Laboratory diagnosis of thalassemia[J]. *Int J Lab Hematol*, 2016, 1:32-40.
- [15] 周永娥, 朱卫健. 地中海贫血的产前诊断及治疗进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(21):3306-3308.
- [16] Suwannakhon N, Seeratanachot T, Mahingsa K, et al. Molecular diagnosis of α^0 -thalassemia through urine DNA: a novel DNA source to facilitate prevention programs in remote geographical areas[J]. *Hemoglobin*, 2015, 39(4):270-273.
- [17] Piyamongkol W, Vutyavanich T, Sanguanserm Sri T. Preimplantation genetic diagnosis of alpha-thalassemia-SEA using novel multiplex fluorescent PCR[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(1):95-102.
- [18] Fallah MS, Mahdian R, Aleyasin SA, et al. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of unknown alpha-globin gene deletions[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 45(1):58-64.
- [19] Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, et al. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletion determinants of α -thalassemia[J]. *Clin Chem*, 2000, 46:1692-1695.
- [20] 杜丽, 吴菁, 秦丹卿, 等. 异常血红蛋白合并东南亚型 α 地中海贫血一例的家系分析及产前诊断[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(2):226-228.
- [21] de Mare A, Groeneger AH, Schuurman S, et al. A rapid single-tube multiplex polymerase chain reaction assay for the seven most prevalent alpha-thalassemia deletions and alphaalphaalpha (anti3.7) alpha-globin gene triplication[J]. *Hemoglobin*, 2010, 34(2):184-190.
- [22] 郝颖, 徐晓昕, 徐志勇, 等. 多重连接依赖性探针扩增技术在 α 地中海贫血产前诊断中的应用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(5):683-686.
- [23] Ferrão J, Silva M, Gonçalves L, et al. Widening the spectrum of deletions and molecular mechanisms underlying alpha-thalassemia[J]. *Ann Hematol*, 2017, 96(11):1921-1929.
- [24] Joly P, Lacan P, Labalme A, et al. A novel telomeric (approximately 285 kb) alpha-thalassemia deletion leading to a phenotypically unusual HbH disease[J]. *Haematologica*, 2010, 95(5):850-851.
- [25] Phylipsen M, Prior JF, Lim E, et al. Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by multiplex ligation dependent probe amplification[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 44(3):146-151.
- [26] 韩媛媛, 戴薇, 刘兴梅, 等. 13738例孕妇的地中海贫血筛查及基因检测结果分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34(4):588-591.
- [27] 郭广洲, 陈延娥, 廖生赞, 等. 应用反向点杂交法检测 α -地中海贫血点突变[J]. *热带医学杂志*, 2008, 8(8):785-787.
- [28] Rujito L, Basalamah M, Siswandari W, et al. Modifying effect of XmnI, BCL11A, and HBS1L-MYB on clinical appearances: a study on β -thalassemia and hemoglobin E/ β -thalassemia patients in Indonesia[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2016, 9(2):55-63.
- [29] Yasmeen H, Toma S, Killeen N, et al. The molecular characterization of Beta globin gene in thalassemia patients reveals rare and a novel mutations in Pakistani population[J]. *Eur J Med Genet*, 2016, 59(8):355-62.
- [30] Ye BC, Zhang Z, Lei Z. Molecular analysis of alpha/beta-thalassemia in a southern Chinese population[J]. *Genet Test*, 2007, 11(1):75-83.
- [31] Rund D. Thalassemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(1):15-21.
- [32] Galehdari H, Salehi B, Azmoun S, et al. Comprehensive spectrum of the β -Thalassemia mutations in Khuzestan, southwest Iran[J]. *Hemoglobin*, 2010, 34(5):461-468.
- [33] Borgio JF. Impact of annotation error in α -globin genes on molecular diagnosis[J]. *Plos One*, 2017, 12(10):e0185270.

南方医科大学珠江医院神经内科

南方医科大学珠江医院神经内科始建于1982年,经全科同仁40年的不懈努力,目前已形成了以神经退行性疾病、脑血管病、神经急危重症、神经免疫性疾病、中枢神经系统感染、癫痫研究为一体的强大综合学科,是南方医科大学神经病学专业博士、硕士培养点,国家级脑卒中筛查与干预基地,中国卒中中心联盟第三批综合卒中中心,国家级住院医师规范化培训基地,广东省临床重点专科。学科现设有3个病区,开放床位150张,其中重症加护护理病房(intensive care unit, ICU)12张;每年收治住院病人5000余人次;开设专家门诊14单元,年门诊量6万人次。科室现有医技人员103人,其中高级职称8人,博士研究生导师2人,硕士研究生导师6人,主治医师19人,住院医师4人,主管护师6人,护师25人,护士40人,电生理技师3人。

学科(特色)及亚专科方向包括:帕金森和神经变性病研究,特色技术为神经调控、rTMS技术、微电极导向技术,目前该方向在研课题11项,累计经费达500万元,已发表相关方向SCI文章60多篇;脑血管病(干细胞和介入)研究,特色技术为溶栓绿色通道、机械取栓、脑血管支架植入术、干细胞治疗等,目前该方向在研课题6项,累计经费达108万元,已发表相关方向SCI文章10多篇。患者来源覆盖以珠三角为主,覆盖全国、东南亚、欧美等国家和地区。科室近5年共承担国家自然科学基金项目6项,973计划子课题、重大研发计划子课题共2项,教育部及广东省人才项目各1项,省市级项目20余项,发表临床SCI论文70篇,国内核心期刊论文200余篇。

学科带头人王青教授长期从事帕金森病等神经退行性疾病及脑血管病等方面的研究,原中山大学“百人计划”引进人才(2009年),现任南方医科大学珠江医院神经内科主任、主任医师、三级岗教授、博士生导师。新加坡国立大学(博士),新加坡神经内科注册医生,斯坦福大学(博士后,PI),澳大利亚NHMRC研究员(PI),美国神经科学学会会员、亚太神经化学学会委员、中华医学会帕金森及运动障碍委员,荣获首届中国医师协会“十大杰出神经内科青年医师奖”,2010年“教育部新世纪人才”获得者,2016年“广东特支计划”百千万工程领军人才,2018广东省医学杰青。承担了973重大研发计划子课题、国家自然科学基金等30余项,近5年文章被引1200余次,以通讯作者在“Progress in Neurobiology (IF: 14.37)”“Movement Disorders (IF: 8.35)”“Cell Death and Disease (IF: 5.9)”“Molecular Neurobiology (IF: 6.2)”“British Journal of Pharmacology (IF: 6.81)”“Neurobiology of Disease (IF: 5.3)”和“Aging and Disease (IF: 5.1)”等国际杂志发表SCI论文53篇。



→ 公司简介

中山大学达安基因股份有限公司依托中山大学雄厚的科研平台,以分子诊断技术为主导,集临床检验试剂和仪器的研发、生产、销售以及全国连锁医学独立实验室临床检验服务为一体的生物医药高科技集团公司,拥有7家研究机构、50多家全资或合资的下属企业。由公司自主研发的荧光定量PCR检测(FQ-PCR)系列产品在国内的市场覆盖率稳居行业第一。



→ 公司优势

- ★ 自主品牌的通道空间
- ★ 完善的售前和售后服务
- ★ 中山大学雄厚的科研平台
- ★ 自主知识产权的临床诊断试剂
- ★ 国内专业诊断产品供应商的首选之一

→ 多元化产品系列



→ 企业使命

达生命之源, 安健康之本

- ★ 不断完善创新机制,以全面的技术创新、管理创新、经营模式创新,探索生命的奥秘,以一流的产品和服务推动公司的不断成长。
- ★ 关爱社会、回馈社会,推动健康产业的发展。



公司总部

地址: 广州市高新技术开发区科学城香山路19号(510665)
电话: 020-32290789 传真: 020-32290158

营销中心

电话: 020-32068328 传真: 020-32068820
Http: //www.daangene.com