



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

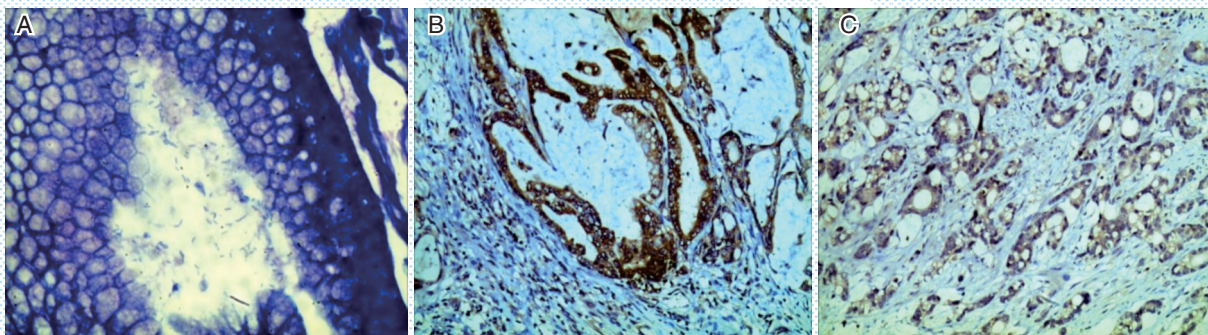
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2019年5月 第11卷 第3期 总第61期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 11 Number 3 May 2019



A: 800倍光镜下 Giemsa 染色情况, 可见 Hp 呈蓝紫色棒状微曲杆菌成群聚集。B、C: 光镜 300 倍, DAB 染色下, 免疫组化两步法检测胃癌组织中 sema5a 表达情况, 可见 sema5a 阳性区域呈棕色分布于胃癌细胞胞浆及胞膜。Hp 阳性组织 sema5a 表达明显高于阴性, 呈深棕褐色分布, 而 Hp 阴性组织呈浅棕黄色。

图(P191) Hp 阳性及阴性胃癌组织中 sema5a 表达及癌旁组织中 Hp 感染情况

Figure(P191) The expression of *sema5a* in cancer tissues and HP infection status in paracancerous tissues

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCi 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692198



徐学虎



出生于 1969 年 8 月, 1993 年毕业于中山医科大学临床医学专业, 获得临床医学学士学位。2004 年获得中国人民大学法学硕士学位。2016 年获得里斯本大学学院管理学博士学位。先后于美国芝加哥大学医学中心 (University of Chicago Medicine)、克利夫兰医疗中心 (Cleveland Clinic)、西雅图华盛顿大学医学院 (University of

Washington School of Medicine) 和纽约圣云仙医疗中心 (Saint Vincents Catholic Medical Center, NY) 进修学习。

教授, 主任医师, 博士生导师。现任广州医科大学附属第三医院副院长。中国肿瘤防治联盟广东结直肠癌专业主任委员、中国医院协会精准医疗分会常委、广东省医院协会常委理事、广东省医师协会快速康复外科分会副主任委员、广东省医师协会毕业后医学教育工作委员会副主委、广东省医学会外科分会常委、广州市医师协会常务理事、广州市医师协会普外科分会副主委, 美国基因与细胞治疗学会会员。广东省工程技术研究中心-省核酸分子诊断工程技术研究中心和广东省产业技术创新联盟-省精准分子病理产学研技术创新联盟主要成员。广东省重大科技专项“广东转化医学平台”的联合单位团队、主编《医院管理之道》、《全科医学-习题集精选》, 参编《医院管理学》、《外科学-住院医师规范化培训教材》。PLOS ONE 学术编辑、《现代医院》杂志编委。广州市科技项目课题评审专家, 广东省等级医院评审及省公立医院绩效评价评审员, 广州市卫生系列高级专业技术资格评委。

徐学虎教授善于以临床问题为导向, 协同开展创新临床转化研究, 聚焦于“结直肠癌早期预警机制及临床应用”和“CAR 免疫细胞治疗实体瘤基础与临床转化研究”, 与新加坡国立大学团队共同开展 CAR 免疫细胞治疗晚期结直肠癌基础与临床转化研究。主持省部级研究项目, 作为临床 PI 发起临床合作项目多项, 领导胃肠外科、消化内科、肿瘤科、中心实验室开展消化系统疾病临床协作研究, 研究团队聚焦结直肠癌早期分子预警、分子分型和诊断, 探索非编码 RNA 结直肠癌早期预警筛查机制及应用, 及基于免疫细胞培养平台开展实体瘤 CAR 细胞免疫治疗临床转化研究。研究成果发表在《Molecular Therapy》等国际权威杂志。获得国家发明专利一项《一种结直肠癌早期诊断标记物及相关试剂盒》, 建立 1 100 人份胃肠道肿瘤生物样本库, 开展疾病队列研究管理。承担《外科学》《临床医学导论》《医院经营管理学》课程, 主持国家级学分全省继续教育项目和广东省教育厅、广州市高校教育教改项目, 进行仿真模拟医学和住院医师培训评价研究, 发表教学改革论文 8 篇。曾主持全省医院管理 16 期培训班, 获广州市优秀教师及广州医科大学第十四届教学成果二等奖。2010 年至今, 培养博士后 1 名、博士生 1 名、硕士生 9 名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019 年 5 月 第 11 卷 第 3 期 总第 61 期 Bimonthly Volume 11 Number 3 May 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 申子瑜
主编 李明
编辑部主任 蒋析文
编辑部副主任 刘悦
编辑部 《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑 李晓兰 李彩珍 李卫鹭
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 国内外公开发行
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 3 月 18 日
定价 RMB 15.00 元

Responsible Institution Sun Yat-sen University
Sponsor China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.
Organizer DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University
Consultant SHEN Ziyu
Editor in Chief LI Ming
Managing Director JIANG Xiwen
Associate Editor LIU Yue
Editorial Office <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office
Editors LI Xiaolan LI Caizhen LI Weilu
Editing China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.

Add 10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290177 32290789-206
Fax (020) 32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2019.3.18
Price RMB 15.00

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5月 第11卷 第3期

目次

述评

- 循环外泌体 miRNAs 在结直肠癌中的标志作用和临床转化中的挑战
..... 刘学娟 甘海宁 张丽妹 等(157)

论著

- B群链球菌 CAMP 阴性株的表型及分子特征初步分析 邓颖颖 孔银波 姜长宏 等(164)
- 中国南方客家人群乙醛脱氢酶2基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究
..... 侯经远 谢运泉 赵平森 等(170)
- 利多卡因对发育期海马神经细胞生长的抑制作用及相关机制研究
..... 陈兰涛 孙鑫 尹辉 姚亚飞 等(176)
- 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药机制研究和同源性分析 谭坪海 陈利达 郭鹏豪 等(182)
- 胃幽门螺杆菌感染后 *Semaphorin 5A* 致胃癌可能机制的研究
..... 刘涛 李睿 龚琳 李庚 等(189)
- 结肠癌患者组织中 AKT2、Annexin A1 表达水平及其临床意义 孙清森 孙连生 徐建利 等(194)
- 长链非编码 RNA *LINC00393* 在子宫内膜癌临床预后判断中的意义
..... 麦碧 陈永秀 胡桂英 等(198)
- 防城港市 2 292 例女性宫颈 HPV 感染与基因分型分析 蓝家富(204)
- 循环肿瘤细胞(CTC)在乳腺癌预后与化疗评估中的应用 梁志洪 陈结贞 陈永雪 等(209)
- 丙型肝炎抗体阳性患者 HCV RNA 与肝功能指标联合检测的意义 朱少美 刘集鸿 周潇(214)
- LASP-1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及与其临床病理特征的相关性分析
..... 李君强 蒋茂芬 唐晶晶 等(219)
- 普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响
..... 韩莉莎 王琮 李丹 等(224)
- Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及利福平耐药性的应用价值研究
..... 翁绳凤 李宁 邢俊蓬 等(229)
- 全自动核酸提取检测仪选择和评价方案的建立和应用 戎国栋 赵鸿 吴蕾 等(233)
- 丙泊酚调控 miR-133a/SOX4 表达对结直肠癌 HCT116 细胞增殖凋亡的影响
..... 韩俊 赵静 张立群(238)

综述

- 树突状细胞及中性粒细胞在狼疮发病中的研究进展 卿平英 刘毅(245)

专家风采

- 徐学虎 (封二)

实验室巡礼

- 广东省产科重大疾病重点实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 3 May 2019

CONTENTS

COMMENTS

The role of circulating exosomal miRNAs in colorectal cancer and the challenges in clinical transformation

Liu Xuejuan, Gan Haining, Zhang Limei, Xu Xuehu (157)

ORIGINAL ARTICLES

Preliminary analysis of phenotypic and molecular characterization of CAMP-negative Group B *Streptococcus* clinical isolate

DENG Yingying, KONG Yinbo, JIANG Changhong, DENG Jiankai, JIANG Lingxiao (164)

Association between acetaldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and acute myocardial infarction in a southern Chinese Hakka population

HOU Jingyuan, XIE Yunquan, ZHAO Pingsen, ZHONG Zhixiong (170)

Inhibitory effect of lidocaine on the growth of hippocampal neurons in developing period and related mechanisms

CHEN Lantao, SUN Xin, YIN Hui, YAO Yafei, DUAN Baomin (176)

Detection of drug-resistance gene and homology analysis of *Acinetobacter baumannii*

TAN Pinghai, CHEN Lida, GUO Penghao, LIAO Kang, WU Zhongwen, YE Daning, HUANG Bin (182)

Study on the mechanism of gastric cancer induced by *Semaphorin 5A* after *Helicobacter pylori* infection

LIU Tao, LI Rui, GONG Lin, LI Geng, PAN Guoqing (189)

Expression levels and clinical significance of AKT2 and Annexin A1 in tissues of patients with colon cancer

SUN Qingsen, SUN Liansheng, XU Jianli, GU Bin, LI Chao (194)

Long non-coding RNA *LINC00393* in endometrial cancer and its prognostic implications

MAI Bi, CHEN Yongxiu, HU Guiying, LUO Xiping, LIU Tingyan (198)

Analysis of the HPV infection and genotyping distribution in 2 292 women in Fangchenggang city

LAN Jiafu (204)

Application of circulating tumor cells (CTC) in prognosis and chemotherapy evaluation of breast cancer

LIANG Zhihong, CHEN Jiezheng, CHEN Yongxue, GU Wenxin, WU Zehua (209)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 3 May 2019

CONTENTS

Significance of combined detection of HCV RNA and liver function indexes in HCV antibody positive patients

ZHU Shaomei, LIU Jihong, ZHOU Xiao..... (214)

Expression of LASP-1 Protein in Non-small Cell Lung Cancer and Its Correlation with Clinicopathological Features

LI Junqiang, JIANG Maofen, TANG Jingjing, WANG Min, LIU Chunjiao, XIAO Weihua, MA Haifen (219)

Effects of pravastatin combined with metoprolol on the cardiac function, glucolipid metabolism and other related indexes in patients with diabetes mellitus complicated with coronary heart disease

HAN Lisha, WANG Qiong, LI Dan, WANG Siqu (224)

Clinical value of Xpert MTB/RIF in detection of Mycobacterium tuberculosis (MTB) and Rifampicin (RIF) resistance

WENG Shengfeng, LI Ning, XING Junpeng, ZHANG Changhai, GUO Wei (229)

Establishment and application on the selection and evaluation of automated nucleic acid extraction systems

RONG Guodong, ZHAO Hong, WU Lei, HUANG Peijun, WANG Fang, ZHANG Yan, XU Ting..... (233)

Propofol inhibits the HCT116 cell proliferation and promotes apoptosis of HCT116 cells by regulating the expression of microRNA-133a/SOX4

HAN Jun, ZHAO Jing, ZHANG Liqun..... (238)

REVIEWS

Research progress of dendritic cells and neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

QING Pingying, LIU Yi (245)

• 述 评 •

循环外泌体 miRNAs 在结直肠癌中的标志作用和临床转化中的挑战

刘学娟 甘海宁 张丽妹 徐学虎*

〔摘要〕 循环 miRNAs 是“液体活检”的重要组成部分,包括游离和囊泡中 miRNAs,囊泡中 miRNAs 能够稳定存在,是循环 miRNAs 的主要来源。外泌体是 30~150 nm 的囊泡,外泌体来源的 miRNAs 是肿瘤细胞微环境中信号交流的重要媒介,几乎参与肿瘤发生发展的全部生物过程。本文从循环外泌体 miRNAs 相关生物学特性、在结直肠癌中的生物标志物作用、血液样本收集及预处理相关注意事项、临床转化的挑战和研究局限、未来展望等方面展开论述,以期能够为结直肠癌循环外泌体 miRNAs 研究领域的研究者们提供参考。

〔关键词〕 循环 miRNAs; 外泌体; 结直肠癌

The role of circulating exosomal miRNAs in colorectal cancer and the challenges in clinical transformation

LIU Xuejuan, GAN Haining, ZHANG Limei, XU Xuehu*

(Department of Gastrointestinal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510150)

〔ABSTRACT〕 Circulating miRNAs are important components of “liquid biopsy”, including miRNAs in free state and in vesicles. The miRNAs in vesicles are stable and the main source of circulating miRNAs. Exosomes are 30-150 nm vesicles. Exosomes-derived miRNAs are important mediators of signal exchange in the microenvironment of tumor cells and are involved in almost all biological processes of tumorigenesis and development. In this article, the biological characteristics of circulating exosomes miRNAs, the role of biomarkers in colorectal cancer, the considerations of blood sample collection and pretreatment, the challenges of clinical transformation, research limitations, and future prospects will be discussed. The findings will provide a reference for researchers in the field of colorectal cancer circulating exosomes miRNAs.

〔KEY WORDS〕 circulating miRNAs; exosomes; colorectal cancer

引言

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是指从细胞膜脱落或由细胞分泌的囊泡状小体,几乎可由所有细胞类型释放。EVs 至少可分为外泌体

(exosomes)和微囊泡(shed microvesicles, sMVs)2类,其中外泌体是胞内多泡小体与质膜融合释放的一大类 EVs,直径约 30~150 nm,而微囊泡是从质膜直接出芽形成的 EVs,直径约 50~1 300 nm。EVs 携带了供体细胞的癌蛋白/多肽、多种 RNA

基金项目:广东省科技厅产学研协同创新成果转化项目:血浆 miRNA 组合作为生物标志物用于结直肠癌早期诊断及试剂盒的研发(2016B090918130)

作者单位:广州医科大学附属第三医院胃肠外科,广东,广州 510150

*通信作者:徐学虎, E-mail:xxh@gzhmu.edu.cn

(如 microRNA、mRNA 和 lncRNA)、脂质和 DNA 片段等生物活性分子,主要介导细胞与细胞、细胞与微环境之间的信息交流^[1]。因外泌体的形成及其内容物的分选机制更具特异性,且能在循环中相对稳定存在等特点^[2-4],外泌体成为最被广泛关注的一类 EVs。

循环 miRNAs 是“液体活检”的重要组成部分,包括了游离和囊泡中 miRNAs,早期研究并未严格区分两者。之后的研究证实了游离 miRNAs 只占少部分且不稳定,血液中被囊泡(特别是外泌体)包裹的 miRNAs 才是循环 miRNAs 主要来源^[5]。外泌体 miRNAs 作为肿瘤基质-肿瘤细胞间信号交流的重要媒介,几乎参与了肿瘤发生、转移的全部生物过程^[1,6]。是一类有希望的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点。

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是三大恶性肿瘤之一,我国 CRC 综合发病率和死亡率分别排第三和第五位,总体仍呈现持续上升趋势^[7-8],缺乏敏感而特异的早期预警标志物是 CRC 发病率和死亡率持续上升的重要原因。循环外泌体 miRNAs 丰度较高、稳定性好,且更容易标准化,有望成为 CRC 早筛早诊、病情监测、疗效评估的新型生物标志物^[9-10]。本文从循环外泌体 miRNAs 相关生物学特性、在 CRC 中的生物标志物作用、血液样本收集及预处理相关注意事项、临床转化的挑战和研究局限、未来展望等几个方面进行论述。以期能够为本领域的研究者们提供参考。

1 循环外泌体 miRNAs 相关生物学特性

外泌体 miRNAs 在血液循环中之所以能稳定存在的原因有二:一是因为外泌体纳米级别的直径大小可以避免被吞噬,二是因为外泌体本身携带 CD47、CD55 和 CD59 等分子,可避免被循环单核-巨噬细胞清除而稳定存在^[11-12],miRNAs 有囊泡膜的保护,可免受体液中的酶类降解^[13]。

外泌体在肿瘤转移中被称为“探路者”,确定转移方向、传递转移信号、促进肿瘤细胞迁移、诱导上皮-间质间转化、营造转移前微环境和传播转移恶性行为^[14],而外泌体 miRNAs 以前体 miRNAs (precursor miRNAs, pre-miRNAs) 和(或)成熟

miRNAs 形式分选入多泡体中,并通过多种机制被受体细胞接纳,并在受体细胞中发挥其对靶基因的调控作用^[7]。目前在 ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) 网站上记录的外泌体 miRNAs 已经有 2838 条信息^[15]。

2 循环外泌体 miRNAs 在 CRC 中的生物标志物作用

2.1 早期诊断标志物

多项综述和荟萃分析阐述了循环 miRNAs 在 CRC 早期检测中的潜在作用^[16-18]。在肿瘤中研究最多的诊断标志物之一为 miR-21。Yu 等人^[19]的荟萃分析纳入了 9 项研究,共有 746 例 CRC 患者和 476 例健康者,汇总后发现 miR-21 对 CRC 的诊断敏感性和特异性分别是 72% 和 85%,提示其在 CRC 中具有良好的诊断标志物潜能。多个 miRNAs 作为组合或 miRNAs 联合其他生物标志物用于 CRC 早诊筛查,可以提高其检测效能。一项荟萃分析纳入了 24 项研究,包括 1 558 名 CRC 患者和 1 085 名健康者的循环 miRNAs 的检测结果,使用随机效应模型分析纳入的循环 miRNAs 对 CRC 诊断效能的总体水平,这些循环 miRNAs 对 CRC 的诊断敏感性和特异性分别为 81% 和 84%。而将单一 miRNA 和 miRNAs 组合研究纳入亚组分析,结果显示,与单一 miRNA (敏感性和特异性都为 78%) 相比,miRNAs 组合在 CRC 中具有更高的诊断敏感性(84%)和特异性(87%)^[20]。另一项研究也表示 miRNAs 组合具有更高的准确性,在早期 CRC 患者中敏感性可高达 90%,特异性高于 80%^[21-22]。然而,在探究 CRC 循环外泌体 miRNAs 表达谱时发现 miR-1246 和 miR-23a 的灵敏度可分别高达 95% 和 92%,提示血液中外泌体来源的 miRNAs 可能更具有成为 CRC 的诊断标志物的潜能^[23]。

2.2 预后预测标志物

循环 miRNAs 作为预后生物标志物在早期和晚期 CRC 患者中均有显著价值。有研究分析 I~IV 期 CRC 患者血清中 miR-21 的表达,发现其与 CRC 生存率显著相关^[24]。Fesler 等^[25]在评述中汇总了 miR-92a、miR-92c、miR-21、miR-141、miR-200c、miR-181b 等指标与 CRC 的淋巴转移或远处转移相关,可作为 CRC 的预后指标。Ferracin 等^[26]的分

析了已报道的20余个在CRC患者中显著差异表达的循环miRNAs,发现这些miRNAs在CRC循环中的表达水平随肿瘤的恶化进程而变化,恶性程度越高miRNAs表达差异倍数越大,可以作为CRC的风险监测和预后预警标志物。miR-29c有望成为CRC早期复发(局部复发或切除后1年内远处转移)的风险监测指标^[27]。循环miR-1290、miR-122和miR-203的水平可能对早期CRC患者有预后意义,miR-203还与转移性CRC的预后差密切相关^[28-30]。血清外泌体miR-19a过表达可以预测CRC复发^[31]。血浆外泌体miR-21可用作预测不同TNM分期CRC患者复发和不良预后的分子标志物^[32],相关研究较多,充分体现了循环外泌体miRNAs在CRC中具有不同层面的预后价值。

2.3 治疗反应/疗效评价标志物

奥沙利铂是转移性CRC的一线化疗药物,研究表明循环中miR-106a、miR-484、miR-130、miR-27b、miR-148a、miR-326等分子可能作为奥沙利铂化疗方案治疗CRC的疗效评价指标^[33]。有些外泌体miRNAs可能有KRAS依赖性,如miR-100在KRAS突变型患者的外泌体中上调,提示这类miRNAs可能参与CRC靶向治疗的耐药产生^[34]。检测CRC治疗前后循环miRNAs差异表达水平可能预示着CRC对治疗的反应/疗效情况^[35]。目前阐明循环外泌体miRNAs在预测CRC对化疗和靶向药物反应性和疗效中的作用研究相对较少,但探寻CRC的治疗反应/疗效评价标志物对临床医师制定决策具有重要的指导意义。

综上,循环外泌体miRNAs作为CRC的诊断、预后预测、风险监测、疗效评价等生物标志物是非常有希望的。但很多研究结论存在广泛的不一致,一个重要原因是存在样品选择偏倚、运输和处理不当、血细胞污染等问题^[36]。所以,血液样本收集和标准化很关键。

3 血液样本收集及预处理

根据液体活检在临床肿瘤诊疗应用的专家共识^[37]推荐,血液样本一般非空腹状态下采集肘部静脉血,建议不少于10 ml,排除凝血功能障碍、免疫缺陷疾病等患者,避免样本凝血、溶血等情况。若是采用EDTA-K2抗凝管:采血后轻柔颠倒8~10

次,即时冰浴送检。若需获得血浆标本,建议2 h内完成两步离心。第一步低温(4℃)条件下,先以1 900×g,离心10 min,去除细胞或细胞碎片吸取上清;第二步以16 000×g,离心10 min,进一步除去残留细胞碎片。血浆标本可保存于-80℃冰箱或直接抽提进行实验。若是 Streck 型采血管则可室温保存3~5天,7天内进行上述方法分离储存即可。若需获得血清样本,可待血液自然凝固后取上清,再参照上述两步离心法处理并储存。

标准化的样品处理至关重要,血液中血细胞,外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)和血小板等衍生的miRNAs都将显著影响循环miRNAs的水平,样本处理不当引起的溶血或血小板活化都将改变血液样品中的miRNAs。有研究也建议根据美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)早期检测研究网络(the Early Detection Research Network, EDNRN)的方案,将全血样品立即处理成血清或血浆^[25](<https://edrn.nci.nih.gov/>)。此外,血清中各种因子和其他污染物也可影响miRNAs的定量。应注意不同的miRNAs本身表现出不同的稳定性,在处理的过程中有不同降解程度,导致miRNAs之间的比例变化^[38-39]。控制这些因素对结果造成的偏倚是循环miRNAs临床转化中的一大挑战。

4 循环外泌体miRNAs临床转化的挑战和研究局限

尽管很多实验数据表示循环外泌体miRNAs在肿瘤中扮演重要角色,但其在临床实践中仍面临诸多挑战。除上述提到的样本收集和预处理的非标准,还缺乏数据标准化方案^[36],入组的患者数量往往有限,更普遍的原因是缺乏临床获益的明确证据^[40]。主要体现在循环外泌体miRNAs肿瘤特异性差;实验室间差异大,结果重复性差;循环外泌体纯化鉴定困难和外泌体形成及内容物分选机制不明确等方面。

4.1 循环外泌体miRNAs肿瘤特异性差

miRNAs肿瘤特异性问题是临床实践中的一大挑战。一项关于循环miR-21的研究发现CRC、乳腺癌、肺癌、食道癌和胃癌患者的血清miR-21均高表达^[41]。同样,外泌体miR-10b也参与乳腺癌、

胰腺癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤的进展^[42-44]。Leidner等^[45]发现13种miRNAs可作为乳腺癌的候选生物标志物,但其中10种被发现在其他肿瘤类型中显著差异表达。这些研究证明miR-21、miR-10b等分子不是任何一种癌症类型特异的,是广谱肿瘤标志物。甚至一些miRNAs的差异表达都不是肿瘤特异的,在应激反应、炎性增生等变化中也存在显著差异^[46]。

4.2 实验室间差异大,结果重复性差

循环miRNAs研究领域另一挑战是结果重复性低。He等人^[16]在搜集了25项相关研究进行荟萃分析,共纳入2 146例CRC患者和1 267例健康对照者,发现了78个差异表达的循环miRNAs。然而被大部分研究验证到的靶标也只有寥寥几个,只有miR-21、miR-29a、miR-15b等表达量高者。另一项研究在乳腺癌中发现158个差异表达的候选miRNAs,其中有16个在2个研究中重叠,但没有一个miRNA在3个研究中重叠^[45]。研究之间显著的差异性可由多种因素造成,如:单个miRNAs验证的样本数量相对较少、样本来源类型不同(血浆、血清与全血)、检测技术和使用的参比标准不同等^[40]。

外泌体的研究表示,使用WB、ELISA和粒径方法鉴定肿瘤患者和非肿瘤患者血浆样本来源的外泌体,二者存在显著差异^[47]。而另有研究表示,在多种肿瘤类型中,与非肿瘤的个体相比,血浆或血液中循环EVs或微粒水平均没有统计学差异^[48]。这种截然相反的结果可能部分原因是由样品采集或囊泡计数方法的差异导致^[1]。实际上,有人建议应使用粒子数与蛋白质浓度的比率来解决实验室间EVs测定的差异^[49]。当然,只有随着技术方法的标准化和规范化才能减少数据的不一致性。

4.3 循环外泌体纯化鉴定存在疑问

外泌体纯度不高可能是样品采集、预处理、储存和运输过程不规范或囊泡计数的实验方法差异导致。在临床血液样本中测定EVs(包括外泌体)水平的另一个关键影响因素是血小板产物的水平。血小板来源的EVs占据血液中EVs的最大比率,并且这些血小板EVs的水平随年龄、疾病负荷和感染等疾病状态而显著变化^[50]。此外,脂蛋白颗粒,蛋白质复合物和类似EVs大小的其他

微粒在血液中占比都可能高于EVs^[49, 51-52]。目前外泌体的纯化方法主要是以超速离心为代表的各式离心法和以试剂盒为代表的免疫亲和沉淀法,鉴定方法主要是针对外泌体的直径大小和其携带蛋白的特点做定性测定,有WB、ELISA、粒径、流式检测等。这些纯化和鉴定的方法依然存在很多的局限和疑问,不能很好的把外泌体从复杂的循环中纯化鉴定出来,更不能满足临床转化需求。

有些研究者也致力于生产临床级GMP外泌体。Kalluri博士等人^[53]生产出具有靶向致癌Kras能力的工程化外泌体(iExosomes)。并在体外体内研究中证实了这种iExosomes能够抑制kras,增加胰腺癌小鼠模型的存活率。该研究建立了一套临床级治疗性外泌体生产、质检等操作流程,为外泌体在其他类型疾病的治疗应用中奠定了基础。但目前这些工程化技术还只在少数实验室中进行探究。

4.4 外泌体形成及内容物分选机制不明确

目前EVs分离方法和亚群异质性区分还存在很大的挑战,虽然研究者们更关注外泌体,实际上外泌体为何更重要还未能从分子机制层面解释。目前的研究揭示了外泌体的生成、摄取和载物分选都涉及内涵体分选复合体(ESCRT complex)及相关蛋白^[54],而Dicer、Ago2和TRBP参与了外泌体miRNAs的加工分选^[55-56]。热休克蛋白HSP90也能刺激外泌体的释放,有助于含有潜在毒性蛋白的外泌体扩散到周围环境导致疾病传播^[57]。但是,这些关键分子具体是如何调控外泌体形成和miRNAs等内容物分选,还有哪些重要分子参与这一分子机制等问题都有待深入探究。

4.5 外泌体作为治疗载体的潜能和挑战

外泌体是人体的天然囊泡递送系统,因其理想的粒径大小及生物膜相容性,作为肿瘤的治疗载体或药剂具有很大的潜能。有研究通过将可注射水凝胶装载间充质干细胞来源的外泌体用于后肢缺血的治疗并取得了不错的效果^[58]。Kalluri博士等^[53]通过电转将靶向KRAS突变的siRNA导入成纤维细胞来源的外泌体中生成iExosome。iExosome经过体内运输到达癌细胞处,将含siRNA的内容物递送至癌细胞,激活相关通路,最终抑制肿瘤的增殖和转移。目前已有几种基于EVs的靶向药物递送系统在癌症、丙型肝炎、神经退行性病

变,炎症疾病等中展现了巨大的潜能^[59]。但外泌体载体在体内驻留时间和稳定性尚值得探讨,优化外泌体应用策略是提高外泌体利用率的有效方式。

5 小结和展望

循环外泌体 miRNAs 是循环 miRNAs 的主要来源,在样本收集和预处理、生物标志物作用、临床转化挑战、研究不足等方面存在很多共性。目前由于外泌体纯化鉴定等挑战的存在,循环外泌体 miRNAs 和循环 miRNAs 2 方面的研究是交融的,本文一并进行了阐述。循环 miRNAs 在 2008 年就已经发现,历经 10 年余的发展,它依然是研究热点却没有在临床中得到实践,这说明它具有强大的潜能,同时又存在很多的不足和挑战。循环外泌体 miRNAs 具备一定的肿瘤特异性和液体活检的简便性,在结直肠癌中具有作为早期/辅助诊断、预后预警、复发风险监测、疗效评价等生物标志物的潜能。但众多的研究存在血液样本收集和处理不规范、miRNAs 肿瘤特异性差、结果重复性差、循环外泌体纯化鉴定等方面的不足或挑战。目前有很多新的仪器设备和技术方法正在推进循环外泌体 miRNAs 的转化应用。

随着数字 PCR、微流控芯片等新兴技术对实验方案的不断优化,相信不久在循环 miRNAs 领域将会制定出更加规范统一的标准来解决 miRNAs 的定量不准、重复性差等问题。随着外泌体形成机制和 miRNAs 在循环中的调节机制的不断揭示,循环外泌体 miRNAs 的肿瘤特异性和标志物潜能将被进一步挖掘,相关临床转化也将顺利推进,也许未来的医者通过简单的血液测试就可以识别对治疗反应差的患者或发现需要治疗干预的目标人群,这对指导临床治疗选择意义重大。

此外,随着光学/电子显微镜以及微纳米技术取得的新突破,已经能够分离并分析单个(亚)囊泡的膜结构和功能异质性。相信未来对 EVs 异质性、亚群分型的研究将更加细致。此外,实验室的数据已经显示 iExosomes 可以经过体内运输到达癌细胞处,将含 siRNA 的内容物递送至癌细胞,影响肿瘤的增殖和转移,相信通过临床转化策略进一步完善,未来将有可能通过修饰外泌体携带更多有效的治疗靶点,靶向外泌体 miRNAs 的治疗手段也将得到有效验证。

参考文献

- [1] Xu R, Rai A, Chen M, et al. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018, 15(10): 617-638.
- [2] Eicheler C, Stückerath I, Müller V, et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA - 373 in receptor - negative breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(20): 9650-9663.
- [3] Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, et al. Exosomal tumor - suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(3): 376-382.
- [4] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes [J]. *PloS One*, 2012, 7(3): e30679.
- [5] Fan Q, Yang L, Zhang X, et al. The emerging role of exosome - derived non - coding RNAs in cancer biology [J]. *Cancer Letters*, 2018, 414(1): 107-115.
- [6] Li K, Chen Y, Li A, et al. Exosomes play roles in sequential processes of tumor metastasis [J]. *International Journal of Cancer*, 2019, 144(7): 1486-1495.
- [7] 赫捷, 孙可欣, 魏文强, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28.
- [8] Chen W, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2018, 30(1): 1-12.
- [9] Hosseini M, Khatamianfar S, Hassanian S M, et al. Exosome-Encapsulated microRNAs as Potential Circulating Biomarkers in Colon Cancer [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23(11): 1705-1709.
- [10] Camargo O A, Toden S, Goel A. Exosomal microRNA Biomarkers: Emerging Frontiers in Colorectal and Other Human Cancers [J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2016, 16(5): 553-567.
- [11] Clayton A, Harris C L, Court J, et al. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59 [J]. *European Journal of Immunology*, 2003, 33(2): 522-531.
- [12] Cho E, Nam G H, Hong Y, et al. Comparison of exosomes and ferritin protein nanocages for the delivery of membrane protein therapeutics [J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 279(1): 326-335.
- [13] Boukouris S, Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers [J].

- Proteomics Clinical Applications, 2015, 9(3): 358-367.
- [14] 张百红, 岳红云. 外泌体与肿瘤转移 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(15): 2467-2469.
- [15] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo [J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(4): 688-692.
- [16] He Y, Lin J, Kong D, et al. Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers [J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(9): 1138-1155.
- [17] Yörüker E E, Holdenrieder S, Gezer U. Blood-based biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer [J]. Clinica Chimica Acta, 2016, 455(1): 26-32.
- [18] Armand-Labité V, Pradines A. Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers [J]. Biomolecular Concepts, 2017, 8(2): 61-81.
- [19] Yu W, Wang Z, Shen L I, et al. Circulating microRNA -21 as a potential diagnostic marker for colorectal cancer: A meta-analysis [J]. Molecular and Clinical Oncology, 2016, 4(2): 237-244.
- [20] Zeng W, Tu Y, Zhu Y, et al. Predictive power of circulating miRNAs in detecting colorectal cancer [J]. Tumour Biology, 2015, 36(4): 2559-2567.
- [21] Zhang K, Chen L. A Highly Predictive Model for Diagnosis of Colorectal Neoplasms Using Plasma MicroRNA: Improving Specificity and Sensitivity [J]. Annals of Surgery, 2018, 264(4): 575-584.
- [22] Faltejskova P, Radova L, Sachlova M, et al. Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer [J]. Carcinogenesis, 2016, 37(10): 941-950.
- [23] Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer [J]. PloS One, 2014, 9(4): e92921.
- [24] Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, et al. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2013, 105(12): 849-859.
- [25] Fesler A, Jiang J, Zhai H, et al. Circulating microRNA testing for the early diagnosis and follow-up of colorectal cancer patients [J]. Molecular Diagnosis & Therapy, 2014, 18(3): 303-308.
- [26] Ferracin M, Lupini L, Mangolini A, et al. Circulating Non-coding RNA as Biomarkers in Colorectal Cancer [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016, 937(1): 171-181.
- [27] Yang I P, Tsai H L, Huang C W, et al. The functional significance of microRNA -29c in patients with colorectal cancer: a potential circulating biomarker for predicting early relapse [J]. PloS One, 2013, 8(6): e66842.
- [28] Imaoka H, Toiyama Y, Fujikawa H, et al. Circulating microRNA-1290 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in human colorectal cancer [J]. Annals of Oncology, 2016, 27(10): 1879-1886.
- [29] Hur K, Toiyama Y, Okugawa Y, et al. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer [J]. Gut, 2017, 66(4): 654-665.
- [30] Maiertaler M, Benner A, Hoffmeister M, et al. Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer [J]. International Journal of Cancer, 2017, 140(1): 176-187.
- [31] Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer [J]. British Journal of Cancer, 2015, 113(2): 275-281.
- [32] Tsukamoto M, Iinuma H, Yagi T, et al. Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer [J]. Oncology, 2017, 92(6): 360-370.
- [33] Kjersem J B, Ikeda T, Lingjaerde O C, et al. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment [J]. Molecular Oncology, 2014, 8(1): 59-67.
- [34] Cha D J, Franklin J L, Dou Y, et al. KRAS-dependent sorting of miRNAs to exosomes [J]. ELife, 2015, 4(1): e07197.
- [35] Xie T, Huang M, Wang Y, et al. MicroRNAs as Regulators, Biomarkers and Therapeutic Targets in the Drug Resistance of Colorectal Cancer [J]. Cellular Physiology And Biochemistry, 2016, 40(1): 62-76.
- [36] Clancy C, Joyce M R, Kerin M J. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer [J]. Cancer Biomark, 2015, 15(2): 103-113.
- [37] 中华医学会检验医学分会, 国家卫生健康委员会临床检验中心. 液体活检在临床肿瘤诊疗应用和医学检验实践中的专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(10): 724-733.

- [38] Kim D J, Linnstaedt S, Palma J, et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2012, 14(1): 71-80.
- [39] Köberle V, Pleli T, Schmithals C, et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers [J]. *PloS One*, 2013, 8(9): e75184.
- [40] Normanno N, Cervantes A, Ciardiello F, et al. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2018, 70(1): 1-8.
- [41] Wang B, Zhang Q. The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2012, 138(10): 1659-1666.
- [42] Singh R, Pochampally R, Watabe K, et al. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer [J]. *Molecular Cancer*, 2014, 13(1): 256-265.
- [43] Lai X, Wang M, McElyea S D, et al. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer [J]. *Cancer Letters*, 2017, 393(1): 86-93.
- [44] Jin X, Chen Y, Chen H, et al. Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing [J]. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(17): 5311-5319.
- [45] Leidner RS, Li L, Thompson C L. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer [J]. *PloS One*, 2013, 8(3): e57841.
- [46] Olejniczak M, Kotowska-Zimmer A, Krzyzosiak W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2017, 75(20): 177-191.
- [47] Cappello F, Logozzi M, Campanella C, et al. Exosome levels in human body fluids: A tumor marker by themselves? [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 96(1): 93-98.
- [48] Menck K, Bleckmann A, Wachter A, et al. Characterisation of tumour-derived microvesicles in cancer patients' blood and correlation with clinical outcome [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2017, 6(1): e1340745.
- [49] Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, 2(1): e19861.
- [50] Tao S C, Guo S C, Zhang C Q. Platelet-derived Extracellular Vesicles: An Emerging Therapeutic Approach [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2017, 13(7): 828-834.
- [51] Arroyo J D, Chevillet J R, Kroh E M, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(12): 5003-5008.
- [52] Vickers K C, Palmisano B T, Shoucri B M, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(4): 423-433.
- [53] Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(8): e99263.
- [54] Lee Y, Andaloussi S, Wood M J. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy [J]. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(1): R125-134.
- [55] Tran N. Cancer Exosomes as miRNAs Factories [J]. *Trends in cancer*, 2016, 2(7): 329-331.
- [56] Qu L, Ding J, Chen C, et al. Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(5): 653-668.
- [57] Lauwers E, Wang Y C, Gallardo R, et al. Hsp90 Mediates Membrane Deformation and Exosome Release [J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(5): 689-702.
- [58] Zhang K, Zhao X, Chen X, et al. Enhanced Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes with an Injectable Hydrogel for Hindlimb Ischemia Treatment [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(36): 30081-30091.
- [59] Surman M, Drożdż A, Stepień E, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems -methods of production and potential therapeutic applications [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2019. Epub ahead of print.

B群链球菌CAMP阴性株的表型及分子特征初步分析

邓颖颖¹ 孔银波² 姜长宏¹ 邓间开¹ 江凌晓^{1*}

【摘要】目的 初步分析B群链球菌(GBS)CAMP因子缺失株的生物学特征以及基因组序列特征。**方法** 首先通过CAMP实验筛选CAMP实验阴性的GBS临床分离株,然后测定并绘制CAMP实验阴性株和阳性株在不同温度、不同pH环境下的生长曲线,再通过与Hep-2、RAW 264.7共培养及流式细胞术,比较分析上述菌株在黏附、抗吞噬及吞噬细胞内存活能力、与人白细胞相互作用的差异,同时应用下一代测序技术检测CAMP实验阴性株和阳性株基因组序列,对15个已知的毒力相关基因进行初步比较分析。**结果** 从407株GBS中分离出1株CAMP阴性株,与4株CAMP阳性菌相比,5株菌在不同温度及不同PH环境中的生长无显著差异,CAMP阴性菌对Hep-2的黏附力最强,与RAW264.7作用后吞噬率最高且吞噬细胞内存活能力差。流式细胞分析显示,新鲜人全血中性粒细胞、单核细胞对CAMP阴性株的吞噬率均高于其他4株CAMP阳性菌株。下一代测序技术分析表明CAMP阴性株*cfb*基因缺失,其他已知毒力相关基因(*fbsA*、*fbsB*、*scpB*、*lmb*、*bca*、*hylB*、*cyl*、*gbcA*、*neuA*、*neuB*、*neuC*、*neuD*、*rib*、*sip*) 在5株菌中均有检出。**结论** CAMP因子在GBS的黏附、抗吞噬细胞吞噬及吞噬细胞内存活过程中起作用。

【关键词】 GBS; CAMP因子; 毒力基因

Preliminary analysis of phenotypic and molecular characterization of CAMP-negative Group B *Streptococcus* clinical isolate

DENG Yingying¹, KONG Yinbo², JIANG Changhong¹, DENG Jiankai¹, JIANG Lingxiao^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510282; 2. Department of Clinical Laboratory, Lincang People's Hospital, Lincang, Yunnan, China, 677000)

【ABSTRACT】Objective To preliminary analyze the phenotypic and molecular characterization of CAMP-negative Group B *Streptococcus* (GBS) clinical isolates. **Methods** Firstly, the CAMP test-negative GBS clinical isolates were screened by CAMP test, and then the growth curves of CAMP test negative and positive strains at different temperatures and different pH environments were determined and plotted. The co-culture with Hep-2 and RAW 264.7 and flow cytometry were used to compare and analyze the differences in the viability of the above strains in adhesion, anti-phagocytic and phagocytic cells, and the interaction with human leukocytes. At the same time, the next-generation sequencing technology was used to detect the sequence of CAMP test negative and positive strains, and 15 known virulence-related genes were compared and analyzed. **Results** One CAMP-negative strain was isolated from 407 strains of GBS. Compared with the 4 strains of CAMP-positive bacteria, there was no significant difference in the growth of the 5 strains at different temperatures and different pH environments. CAMP-negative bacteria have the strongest adhesion to Hep-2, and the phagocytosis rate is the highest and the survival ability in phagocytic cells is poor after RAW264.7. Flow cytometry analysis showed that the phagocytosis rate of CAMP-negative strains in fresh

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX10103011006)

作者单位:1. 南方医科大学珠江医院检验医学部,广东,广州 510282

2. 临沧市人民医院检验科,云南,临沧 677000

*通信作者:江凌晓, E-mail:jiang-lingxiao@163.com

human whole blood neutrophils and monocytes was higher than that of the other 4 CAMP-positive strains. Analysis of next-generation sequencing technology indicates that the CFB-negative strain *cfb* gene is deleted. Other known virulence-related genes (*fbsA*, *fbsB*, *scpB*, *lmb*, *bca*, *hylB*, *cyl*, *gbcA*, *neuA*, *neuB*, *neuC*, *neuD*, *rib*, *sip*) were detected in all 5 strains. **Conclusion** CAMP factor plays a role in adhesion of GBS, phagocytic phagocytosis and survival in phagocytic cells.

[KEY WORDS] Group B *Streptococcus*; CAMP factor; Virulence gene

B群链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)又名无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*),是一种革兰氏阳性链球菌。GBS不仅可正常定植于人体胃肠道及阴道,而且还是新生儿败血症、肺炎、脑膜炎的重要致病菌^[1]。CAMP(christie-atkinson-munch-peterson)实验是GBS鉴定的重要实验之一^[2]。CAMP因子与金黄色葡萄球菌产生协同溶血作用而出现 β -溶血增强的现象称为CAMP试验阳性^[3]。国内外未见CAMP实验阴性的人源性侵袭性感染GBS的报道。本实验室筛选出1株CAMP实验阴性的人源性侵袭性感染GBS,拟通过普通培养法、细胞培养技术、流式细胞技术,比较分析CAMP实验阴性株与阳性株在生长、黏附、抗吞噬、吞噬细胞内存活能力等特征的差异,并通过下一代测序技术分析实验菌株15个与侵袭/毒力相关基因的差异,以期了解CAMP因子人源性侵袭性感染过程中的可能作用,为进一步研究其功能和作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株/细胞株

金黄色葡萄球菌 ATCC25923、407株GBS、Hep-2人喉癌上皮细胞和RAW264.7小鼠巨噬细胞均由南方医科大学珠江医院检验医学部保存。人新鲜全血为南方医科大学珠江医院临床废弃标本。

1.1.2 仪器与试剂

CD45 Per-CP-Cy5.5抗体购于美国BD公司,CFDA SE细胞增殖与示踪检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司,细胞培养基购于美国Gibco公司,平板及肉汤培养基购于广州市迪景生物科技有限公司。Vitek2微生物自动化分析仪购自法国Biomerieux公司,流式细胞仪BD FACS Calibur Flow Cytometer购自美国BD公司,倒置显微镜TS100购自日本Nikon公司,倒置荧光显微镜AXIO Vert.A1购自德国Zeiss公司,CO₂培养箱(细

胞培养)HERA cell 150i购自美国Thermo公司,CO₂培养箱(细菌培养)SHELZB2306-2S购自美国HELLAB公司。

1.2 方法

1.2.1 CAMP试验

将本实验室冻存的407株GBS菌株分别接种于血琼脂平板上,35℃、5% CO₂培养箱培养18~24 h。按CAMP试验操作规程^[4]筛选CAMP阴性菌株。

1.2.2 不同环境生长曲线测定

取筛选出的CAMP阴性株为实验菌株,另以1:4的取样配比选同期分离自血液的GBS为对照实验菌株。取0.5 MCF实验菌株和对照菌株等量分别接种于营养肉汤中,于pH 7.0且温度分别为4℃、25℃、35℃培养,在培养4、5、6、7、8、9、10 h时各自取100 μ L菌液测定细菌浓度,绘制不同温度下各菌株的生长曲线。同样的方法,使5株菌在pH 4.0、pH 6.0、pH 7.0但温度同为35℃的条件下培养,间隔一定时间取100 μ L菌液测定细菌浓度,绘制不同pH下各菌株的生长曲线。

1.2.3 Hep-2细胞黏附试验

将0.5 MCF菌液稀释20倍后,加入Hep-2细胞浓度为 3.0×10^5 /孔的培养板中(底部放置多聚赖氨酸爬片)置于35℃、5% CO₂培养箱孵育2 h;弃上清,洗涤3次,取出细胞爬片,革兰氏染色,晾干后封片;用正置激光共聚焦显微镜对爬片进行镜检及计数,重复3次,计算黏附率。

1.2.4 RAW264.7小鼠巨噬细胞吞噬试验

将0.5 MCF菌液稀释20倍后,加入RAW264.7细胞浓度为 2.9×10^5 /孔的培养板中(底部放置多聚赖氨酸爬片)置于35℃、5% CO₂培养箱孵育16 h;弃上清,洗涤3次,取出细胞爬片,行革兰氏染色,晾干后封片;用正置激光共聚焦显微镜对爬片进行镜检及计数分析,重复3次,计算吞噬率。

1.2.5 RAW264.7小鼠巨噬细胞内存活试验

将0.5 MCF菌液稀释20倍后,加入RAW264.7细胞浓度为 2.9×10^5 /孔的培养板中,置于35℃、5%

CO₂培养箱孵育24 h;取出细胞板,弃上清,洗涤3次;裂解细胞,将裂解后的细胞溶液梯度稀释,涂布MH(mueller-hinton)平板进行菌落计数,重复3次,计算吞噬细胞内存活率。

1.2.6 人全血白细胞吞噬率试验

依据羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFDA SE)细胞增殖与示踪检测试剂盒说明书标记菌悬液,调浊度至0.5 MCF,取200 μL菌液与等量新鲜全血充分混匀后置于35℃、5% CO₂培养箱孵育2 h。取100 μL菌血混合物与10 μLCD45 Per-CP-Cy5.5抗体混合,避光标记15 min,随后加入450 μL溶血素,立即上机,以侧向散射光SS和CD45作图,检测有核细胞对不同菌株的吞噬率,重复3次,计算吞噬率。

1.2.7 人全血吞噬细胞内存活率试验

10 μL 0.5 MCF菌液与190 μL新鲜全血充分混匀后置于35℃、5% CO₂培养箱孵育2 h,加入青霉素80万单位继续孵育,20 h后取出菌血混合物50 μL,充分混匀后将菌血混合物裂解、梯度稀释后涂布MH平板,35℃、5% CO₂培养箱培养24 h后进行菌落计数。重复3次,计算吞噬细胞内存活率。

1.2.8 基因组序列测定

菌株送广州华银医学检验中心进行序列测定和分析。

1.3 统计学方法

运用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时采用LSD检验,方差不齐时采用Dunnett's T3检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAMP实验

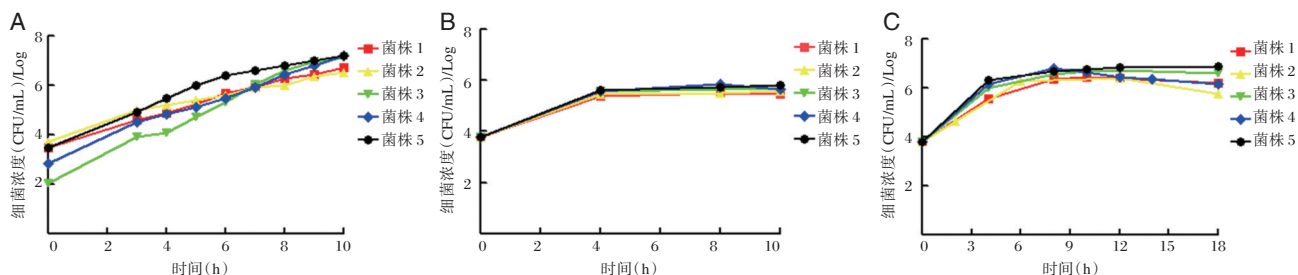
407株GBS仅1株CAMP实验阴性,该菌株分离自1名2月龄男婴血液标本。选取这一株为实验菌株,另选4株同期分离自血液的GBS为对照实验菌株,菌株信息见表1。

表1 5株GBS信息

Table 1 The information of five isolates of GBS			
菌株编号	CAMP实验	性别	年龄
1	+	男	39岁
2	+	女	54岁
3	+	男	12天
4	+	女	42岁
5	-	男	2月

2.2 生长曲线测定

5株GBS在4℃或pH<4.0环境中均不生长。在pH 7.0且温度分别为25℃和35℃培养环境中,温度为35℃且pH分别为pH 6.0、pH 7.0培养环境中,CAMP阴性和阳性菌株生长曲线见图1。



A: 35℃、pH7.0时生长曲线; B: 25℃、pH7.0时生长曲线; C: 35℃、pH6.0时生长曲线。

图1 GBS生长曲线

Figure1 GBS growth curve

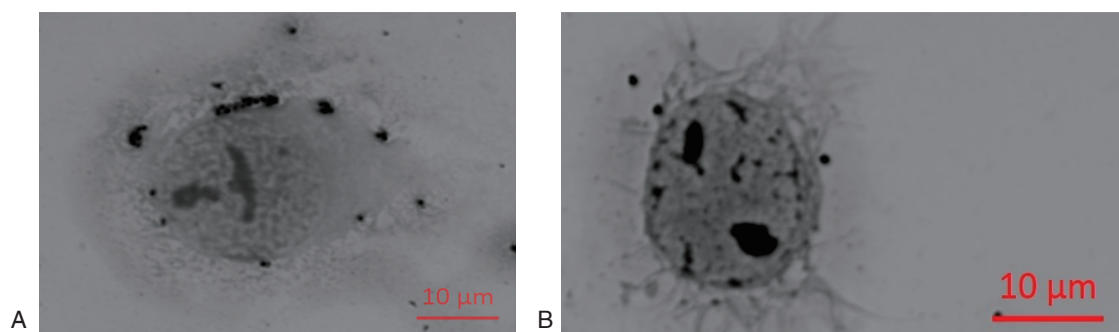
2.3 Hep-2细胞黏附试验

共聚焦显微镜观察显示Hep-2细胞周围存在GBS(图2)。5株菌的黏附率分别为11.6%±1.1%、4.3%±0.5%、9.8%±0.7%、7.9%±0.2%、17.0%±0.6%, CAMP实验阴性菌对Hep-2细胞的黏附能力最强,

差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.4 RAW264.7小鼠巨噬细胞吞噬试验

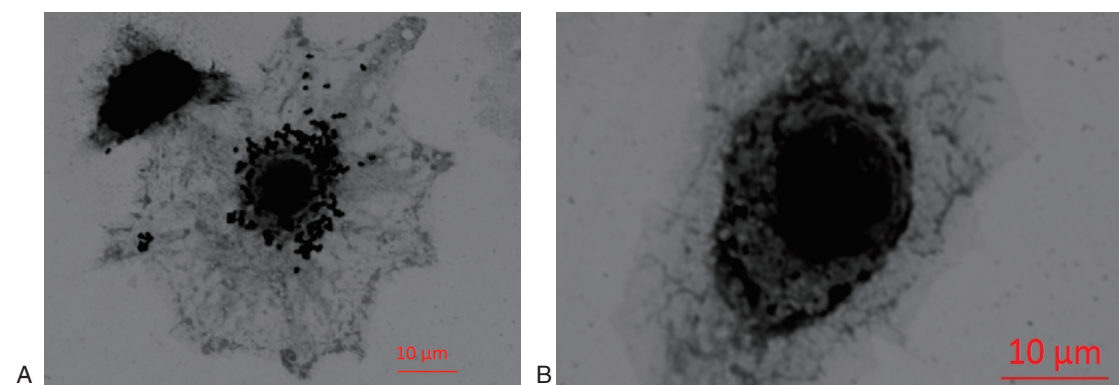
共聚焦显微镜观察显示RAW264.7细胞内存在GBS(图3),表明GBS可被RAW264.7细胞吞噬。5株菌的吞噬率分别为3.5%±0.2%、3.1%±0.6%、



A: CAMP 阴性株(菌株5)黏附 Hep-2 细胞; B: CAMP 阳性株(菌株1)黏附 Hep-2 细胞。

图2 GBS 黏附 Hep-2 细胞 (革兰氏染色, ×100)

Figure 2 Adhesion to Hep-2 cell of GBS (Gram, ×100)



A: CAMP 阴性株(菌株5)被 RAW264.7 细胞吞噬; B: CAMP 阳性株(菌株1)被 RAW264.7 细胞吞噬。

图3 GBS 被 RAW264.7 细胞吞噬 (革兰氏染色, ×100)

Figure 3 Phagocytosis to GBS of RAW264.7 cell (Gram, ×100)

3.7%±0.8%、3.5%±0.2%、13.4%±1.1%, RAW264.7 细胞对 CAMP 实验阴性株的吞噬率高于 CAMP 实验阳性株, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。

2.5 RAW264.7 小鼠巨噬细胞内活性试验

5 株菌在小鼠巨噬细胞内 24 h 存活率分别为 10.9%±0.1%、16.1%±0.2%、13.6%±0.7%、15.7%±0.2%、10.9%±1.1%。CAMP 实验阴性株与阳性株菌株 1 之间差异无统计学意义 ($P=0.92$), 但其小鼠巨噬细胞内 24 h 存活率低于其它 3 株 CAMP 实验阳性株, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

2.6 人全血白细胞吞噬率试验

流式细胞仪计数人全血中性粒细胞对 5 株菌的吞噬率分别为 10.7%±0.4%、14.1%±0.2%、21.1%±0.7%、9.5%±0.3%、26.2%±0.5%, 结果显示 CAMP 实验阴性菌最容易被中性粒细胞吞噬, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。流式细胞分析结果还显示: 单核细胞对 5 株菌的吞噬率分别为 60.1%±0.6%、61.3%±0.2%、52.3%±1.4%、64.7%±1.9%、

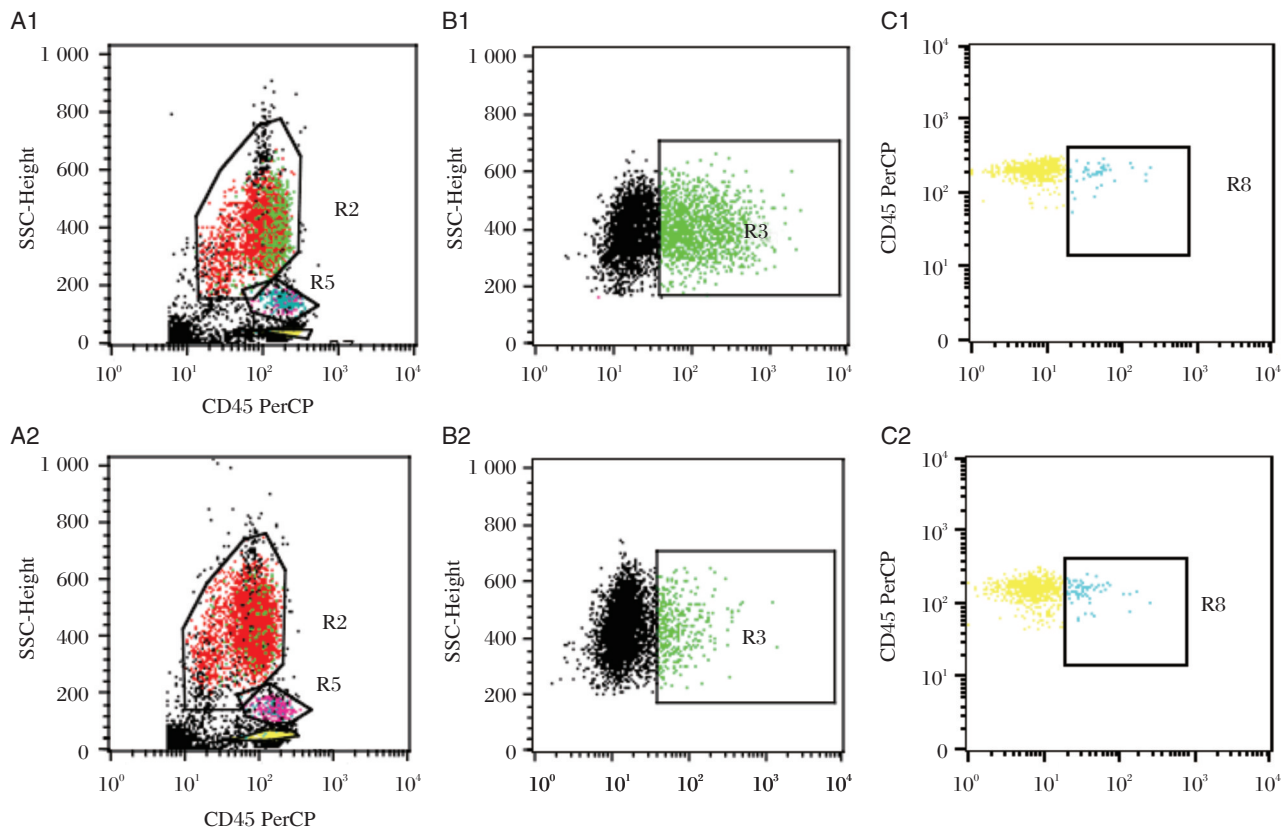
86.5%±0.2%。CAMP 实验阴性菌也最容易被单核细胞吞噬, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。图 4 所示为 CAMP 实验阴性株和阳性株菌株 1 的流式细胞仪检测结果。

2.7 人全血白细胞内存活率试验

5 株菌在人全血白细胞内 24h 存活率分别为 38.1%±3.3%、34.4%±4.8%、41.9%±11.0%、42.8%±0.3%、19.6%±0.8%, 将 4 株阳性菌与阴性菌分别进行两两比较, P 值分别为 $P=0.002$ 、 $P=0.008$ 、 $P=0.001$ 、 $P<0.001$, CAMP 实验阴性菌在白细胞内存活率最低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.8 基因组序列测定

5 株菌进行了基因组重测序, 并比较了 5 株 GBS 的 *fbsA*、*fbsB*、*scpB*、*lmb*、*bca*、*hylB*、*cfb*、*cyl*、*gb-cA*、*neuA*、*neuB*、*neuC*、*neuD*、*rib*、*sip* 基因序列, 发现 CAMP 实验阴性菌株缺失 *cfb* 基因。其他毒力基因在 5 株菌中均有检出。



A: SS 和 CD45 双参数设门对检测细胞准确分群; B: 中性粒细胞吞噬; C: 单核细胞吞噬。A1、B1、C1 为 CAMP 实验阴性株菌株 5; A2、B2、C2 为 CAMP 实验阳性株菌株 1。

图4 人全血白细胞吞噬 GBS 的流式细胞仪检测结果

Figure 4 Flow cytometry results of human whole blood leukocytes phagocytizing GBS

3 讨论

GBS 通常正常定植于人体胃肠道及阴道,是一种条件致病菌。成年人感染类型主要包括肺炎、败血症、尿路感染、皮肤软组织感染等。GBS 可通过孕妇产道上行感染引发早产、流产、胎膜早破,也可通过母婴的垂直传播,引发新生儿败血症和脑膜炎^[5],是一种围产期重点监测的病原菌。已有研究表明,GBS 致病主要涉及各种黏附因子(如纤维蛋白原结合蛋白、层黏蛋白结合蛋白、丝氨酸重复蛋白、免疫原性细菌黏附蛋白、 α C 蛋白等)以及各种毒力因子(如 CAMP 因子、细胞溶血素、荚膜多糖等)^[6]。其中 CAMP 因子是一个促溶血因子,能与金黄色葡萄球菌分泌的 β 溶血毒素(神经磷脂酶 C)共同作用,引发绵羊红细胞溶血程度增加^[7],在血平板上形成伞状的透明溶血区域。由于 CAMP 因子对 GBS 有很高的特异性,因此广泛的被临床实验室用作鉴定 GBS 的重要试验^[8],其

编码基因 *cfb* 常作为临床 GBS 检测的分子靶标^[9]。

虽然有研究表明 CAMP 因子在机体系统感染过程中能削弱宿主的免疫功能^[10],是一种重要的致病因子,也在活体动物试验中发现纯化的 CAMP 因子可导致兔子及小鼠死亡^[3, 11-12],但 Mary 等^[13]通过对 *cfb* 基因进行等位基因替换后的体外及体内试验研究认为 CAMP 因子在 GBS 的毒力系统中不是必须的。因此,有关 CAMP 因子在侵袭性感染过程中的作用和作用机制还存在争议。

牛源、鱼源性 GBS 分离株中有少量 CAMP 阴性菌株的报道,但人源性 CAMP 阴性 GBS 仅见个案报道^[14-15]。刘家玲等^[15]的初步研究显示 CAMP 阴性菌株的基因组中含有 *cfb* 基因,推测是由于 *cfb* 基因突变导致的 CAMP 阴性,或是由于调控元件 CovR/S 的突变导致的 CAMP 阴性。CovR/S 是 GBS 中重要的毒力因子相关基因的调控元件,可调控 CAMP 因子编码基因 *cfb* 及细胞溶血素的编码基因 *cylE* 等。在 CovR/S 突变的 GBS 菌株中可看到 GBS

的 β -溶血素增加及对各种上皮细胞的黏附增加,但CAMP因子的活性下降的现象^[16]。这与本实验中观察到的CAMP阴性菌株对Hep-2细胞的黏附能力最强现象相一致。由于CAMP阴性GBS的生物学意义未被充分认识,因此相关研究未见报道。

除了*cfb*基因,目前还有一些其他已知的毒力基因^[12, 17-18]:*fbsA*(编码纤维蛋白原结合蛋白A)、*fbsB*(编码纤维蛋白原结合蛋白B)、*lmb*(编码层黏蛋白结合蛋白)、*bca*(编码 α C蛋白)、*scpB*(与C5a肽酶有关)、*neuA-D*(编码荚膜多糖)、*cyl*(溶血素的分子基础)、*hylB*(编码透明质酸裂解酶)及*gbcA*、*rib*、*sip*(编码表面蛋白)等与GBS对宿主细胞的黏附、侵袭或免疫逃避有关。为分析上述毒力基因在5株GBS中的分布差异,本研究应用下一代测序技术对5株菌进行基因组重测序,测序结果表明,CAMP阴性株*cfb*基因完全缺失,但其他已知毒力相关基因(*fbsA*、*fbsB*、*scpB*、*lmb*、*bca*、*hylB*、*cyl*、*gbcA*、*neuA*、*neuB*、*neuC*、*neuD*、*rib*、*sip*) 在CAMP阴性菌和4株CAMP阳性菌中均有检出。

不同于其他研究者使用基因工程质粒研究CAMP因子生物学功能,本研究基于人源性侵袭性CAMP因子天然缺失株,避免了引入外源性质粒本身对实验菌生物学表征的影响。初步研究结果显示CAMP实验阴性株在黏附、抗吞噬以及吞噬细胞内存活能力等方面与阳性株之间存在显著差异,表明CAMP因子确实是一种重要致病因子。但该株菌仍能引发严重侵袭性感染,又提示在CAMP实验阴性GBS侵袭性感染过程中可能存在代偿机制或途径。本研究为深入探讨CAMP因子的生物学功能及作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Simoni S, Vincenzi C, Brenciani A, et al. Molecular characterization of Italian isolates of fluoroquinolone-resistant streptococcus agalactiae and relationships with chloramphenicol resistance [J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(3):225-231.
- [2] Jin T, Brefo-Mensah E, Fan W, et al. Crystal structure of the streptococcus agalactiae CAMP factor provides insights into its membrane-permeabilizing activity [J]. J Biol Chem, 2018, 293(30):11867-11877.
- [3] 刘家玲. 无乳链球菌的研究进展[J]. 贵州医药, 2018, 42(10):1180-1184.
- [4] 周庭银, 倪宇星. 临床微生物检验标准化操作[M]. 第2版. 上海:上海科学技术出版社, 2010:201-201.
- [5] 李小南. 无乳链球菌耐药性检测分析与临床微生物研究[J]. 临床检验杂志(电子版), 2019, 8(1):111.
- [6] 常瑞祥, 王旭荣, 杨志强, 等. 无乳链球菌黏附因子研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35(2):101-104.
- [7] Lang S, Palmer M. Characterization of streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin [J]. J Biol Chem, 2003, 278(40):38167-38173.
- [8] 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, 2015:654-655.
- [9] 江凌晓, 黎春, 姜长宏, 等. 应用实时荧光PCR技术快速检测B群链球菌[J]. 广东医学, 2011, 32(5):575-576.
- [10] Kurosawa M, Oda M, Domon H, et al. Streptococcus pyogenes CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells [J]. Microbes Infect, 2016, 18(2):118-127.
- [11] Skalka B, Smola J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor-a new finding about diffusible exo-substances of streptococcus agalactiae and Streptococcus uberis [J]. Zentralbl Bakteriell A, 1981, 249(2):190-194.
- [12] Rajagopal L. Understanding the regulation of group B Streptococcal virulence factors [J]. Future Microbiol, 2009, 4(2):201-221.
- [13] Hensler ME, Quach D, Hsieh CJ, et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of group B streptococcus [J]. Microb Pathog, 2008, 44(1):84-88.
- [14] Guo D, Xi Y, Wang S, et al. Is a positive Christie-atkinson-munch-peterson (CAMP) test sensitive enough for the identification of Streptococcus agalactiae? [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):7.
- [15] 刘家玲, 袁军, 胡方芳. 贵州地区孕晚期妇女生殖道无乳链球菌定植筛查及CAMP试验阴性的GBS菌株基因测序分析研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1):14-18.
- [16] Lamy MC, Zouine M, Fert J, et al. CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence [J]. Mol Microbiol, 2004, 54(5):1250-1268.
- [17] Wastfelt M, Stalhammar-Carlemalm M, Delisse AM, et al. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure [J]. J Biol Chem, 1996, 271(31):18892-18897.
- [18] Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, et al. Identification of group B streptococcal sip protein, which elicits cross-protective immunity [J]. Infect Immun, 2000, 68(10):5610-5618.

· 论 著 ·

中国南方客家人群乙醛脱氢酶2基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究

侯经远^{1*} 谢运泉¹ 赵平森¹ 钟志雄²

[摘要] 目的 探讨中国南方客家人群中乙醛脱氢酶2基因(*ALDH2*)Glu504Lys多态性与急性心肌梗死(AMI)之间的关系。方法 本研究共纳入2016年5月至2018年5月在梅州市人民医院就诊AMI患者252例及同期健康体检者264例,提取外周血基因组DNA,通过聚合酶链反应(PCR)和DNA微阵列芯片法检测*ALDH2* Glu504Lys基因多态性。结果 AMI组*ALDH2* GG、GA和AA基因型所占比例分别为45.63%、44.05%和10.32%,G和A等位基因频率分别为67.66%和32.34%。对照组*ALDH2* GG、GA和AA基因型所占比例分别为56.82%、35.98%和7.20%,G和A等位基因频率分别为74.81%和25.19%。*ALDH2*基因型和等位基因频率的分布在两组间差异有统计学意义,其中A突变等位基因携带者在AMI组的比例较高($P<0.05$)。Logistic回归分析显示,年龄、性别、饮酒、高血压病、糖尿病、高脂血症是AMI的危险因素。此外,*ALDH2* GA/AA基因型是中国南方客家人群AMI发生的独立危险因素($OR=1.906$,95%可信区间:1.278~2.844, $P=0.002$)。结论 *ALDH2*基因Glu504Lys位点多态性可能与中国南方客家人群AMI相关,其中A等位基因可能是AMI发生的易感等位基因。

[关键词] 乙醛脱氢酶2;基因多态性;急性心肌梗死;客家人群

Association between acetaldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and acute myocardial infarction in a southern Chinese Hakka population

HOU Jingyuan^{1*}, XIE Yunquan¹, ZHAO Pingsen¹, ZHONG Zhixiong²

(1. Meizhou People's Hospital (Huangtang Hospital), Meizhou Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Clinical Core Laboratory, Meizhou, Guangdong, China, 514031; 2. Meizhou People's Hospital (Huangtang Hospital), Meizhou Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Cardiovascular center, Meizhou, Guangdong, China, 514031)

[ABSTRACT] Objective To investigate the association between the polymorphisms of aldehyde dehydrogenase-2 (*ALDH2*) Glu504Lys and acute myocardial infarction (AMI) in the southern Chinese Hakka population. Methods Between May 2016 and May 2018, 252 patients with AMI and 264 subjects who underwent physical examination were enrolled from the Meizhou People's Hospital in this study. Genome DNA was extracted from their peripheral blood. *ALDH2* Glu504Lys polymorphisms were tested by polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA microarray method. Results The frequencies of the *ALDH2* GG genotype, GA genotype and AA genotype were 45.63%, 44.05% and 10.32% in the AMI patients, while those of the G and A allele were 67.66% and 32.34% respectively. In the control group, the frequencies of the *ALDH2* GG genotype, GA genotype and AA genotype were 56.82%, 35.98% and 7.20%, respectively,

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0500405);国家重点研发计划(2017YFD0501705);广东省自然科学基金(2016A030307031);广东省医学科学技术研究基金(A2017404)。

作者单位:1.梅州市人民医院(黄塘医院),中山大学附属梅州医院,中心实验室,广东,梅州 514031

2.梅州市人民医院(黄塘医院),中山大学附属梅州医院,心血管病中心,广东,梅州 514031

*通信作者:侯经远, E-mail:monkeyhjy@126.com

while those of G and A allele were 74.81% and 25.19% respectively. There were statistically significant differences in ALDH2 genotypes and allele frequencies between the two groups ($P<0.05$), the percentage of A allele mutation carriers was higher in AMI patients than in the control group. Logistic regression analysis showed that age, gender, alcohol consumption, hypertension, diabetes and hyperlipidemia were risk factors of AMI, while smoking was not. In addition, ALDH2 GA/AA genotype was an independent risk factor for AMI in the southern Chinese hakka population ($OR=1.906$, 95% CI : 1.278-2.844, $P=0.002$). **Conclusion** The polymorphisms of ALDH2 Glu504Lys may be associated with AMI in the southern Chinese Hakka population. The A allele of ALDH2 Glu504Lys may be a susceptibility factor for AMI.

[KEY WORDS] Acetaldehyde dehydrogenase 2; gene polymorphism; acute myocardial infarction; hakka population

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是心血管疾病中的严重类型, 具有高致病、高致死致残等特点, 已成为威胁全世界公共健康的重要问题^[1]。在我国, AMI 患病率及死亡率仍处于上升阶段并且呈年轻化的趋势, 严重危害人民健康^[2]。AMI 发病机理非常复杂, 主要由遗传、环境等因素共同导致^[3]。在传统危险因素基础上增加基因多态性等遗传易患因素预测 AMI 发病率的研究成为近几年热点。乙醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase-2, ALDH2) 基因位于人类染色体 12q24.2, 其在第 12 个外显子上发生点突变, 即鸟嘌呤 (G) 被腺嘌呤 (A) 替换, 使编码第 504 位氨基酸的密码子改变, 从而谷氨酸被赖氨酸替换 (Glu504Lys), 导致 ALDH2 酶活性的显著下降^[4]。人群中 ALDH2 基因可根据其突变情况分为 GG、GA 和 AA 3 种不同的基因型。目前 ALDH2 在体内的作用机制尚未完全阐明, 近年来研究发现 ALDH2 基因多态性与冠心病发病相关, 但研究结论尚不一致, 且 ALDH2 基因多态性在不同地区、民族间差别较大^[5-6]。本研究旨在探讨在中国南方客家人群中, ALDH2 基因 Glu504Lys 位点的多态性与 AMI 的关系, 以期从基因角度探寻 AMI 相关遗传易患因素, 为 AMI 的防治提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究选取 2016 年 5 月至 2018 年 5 月就诊于梅州市人民医院心血管内科住院且首次患 AMI 者共 252 例作为病例组, 其中男 187 例、女 65 例, 平均年龄 (69.6 ± 11.1) 岁, 年龄范围 38~95 岁。所有 AMI 患者诊断根据临床表现、心电图及冠状动脉造影证实, 且必须至少符合下列 3 条标准中的 2

条: ①缺血性胸痛的临床病史; ②心电图的特征性动态变化; ③心肌损伤坏死的血清标志物浓度的动态改变。另选取同期来我院门诊进行体检的健康者 264 例作为对照组, 其中男 165 例、女 99 例, 平均年龄 (62.8 ± 11.9) 岁, 年龄范围 40~94 岁。排除标准: 先天性心脏病、近期均无严重创伤或感染性疾病、严重肝肾功能不全、血液性疾病、恶性肿瘤或自身免疫性疾病。纳入的所有研究对象均为三代以内居住在广东省梅州境内的客家人且所有研究个体之间无血缘关系。本研究经患者及家属知情同意并签署知情同意书, 研究方案获本院伦理委员会审批同意。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂和仪器

主要试剂为天根生化科技 (北京) 有限公司血液基因组 DNA 提取试剂盒 DP318, 上海百傲科技股份有限公司 ALDH2 (Glu504Lys) 基因检测试剂盒 (DNA 微阵列芯片法), 北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司 ALDH2 基因检测试剂盒 (荧光 PCR-毛细管电泳测序法)。主要仪器为赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司 NanoDrop 2000 紫外-可见分光光度计, 美国伯乐 S1000 PCR 仪, 上海百傲科技股份有限公司 BR-526-24 全自动杂交仪, 上海百傲科技股份有限公司 BaiO®BE-2.0 生物芯片识读仪。美国贝克曼库尔特有限公司 AU5400 型全自动生化分析仪。

1.2.2 血液采集和 DNA 提取

患者入院即抽取肘静脉血 2~3 mL, 置于 EDTA 抗凝管中, 采用人血液基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型 DP318, 天根生化科技 (北京) 有限公司) 抽提全血基因组 DNA。用 NanoDrop 2000 紫外-可见分光光度计测定提取 DNA 浓度和 A_{260}/A_{280} 比值,

DNA 模板要求比值在 1.7~2.0 之间。DNA 的浓度和纯度均符合 PCR 扩增要求。提取的标本储存于 -80℃ 冰箱备用,避免反复冻融。

1.2.3 ALDH2 基因多态性检测

采用 DNA 微阵列芯片法检测 ALDH2 基因多态性,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书[上海百傲科技股份有限公司 ALDH2 (Glu504Lys) 基因检测试剂盒]进行。将提取和纯化好的 DNA 加入至聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 体系中,用 ALDH2 基因特异性引物 PCR 扩增。反应体系为 25 μL,其中 ALDH2 扩增液 22 μL、反应液 A 1 μL 和基因组 DNA 2 μL。PCR 扩增条件如下: 50℃ 5 min; 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 25 s, 60℃ 退火 25 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。扩增结束后,吸取 190 μL 杂交缓冲液,加入 10 μL PCR 扩增产物,在全自动杂交仪上将带有生物素标记的扩增产物特异性地与固定于玻片载体上的 ALDH2 基因检测探针进行杂交反应,然后酶促显色(上海百傲科技股份有限公司 BR-526-24)。反应结束后,取出生物芯片并放入芯片识读仪(上海百傲科技股份有限公司 BaiO®BE-2.0),用芯片图像分析软件进行扫描和分析,判断样品的 ALDH2 基因型。为保证 ALDH2 基因分型的准确性,随机抽取 10% 的 DNA 样本采用荧光 PCR-毛细管电泳测序法重新进行 DNA 测序验证(北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司 ALDH2 基因检测试剂盒)。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),计数资料以频数和百分比表示。两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验或 Mann-whitney 非参数检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。以 Hardy-Weinberg (HWE) 平衡检验样本是否具有群体代表性。ALDH2 基因型和等位基因频率分布采用 χ^2 检验比较。采用二元 Logistic 回归分析危险因素,计算比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 可信区间。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般临床资料比较

两组一般临床资料比较结果如表 1 所示。AMI 组的男性占比例、年龄、收缩压、饮酒史、高血

压、糖尿病、高脂血症患病率及血清总胆固醇、低密度脂蛋白的血清学水平与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),其中 AMI 组高密度脂蛋白酯水平的血清学水平明显低于健康对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外,舒张压、吸烟史和甘油三酯的血清学水平比较两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 两组一般临床资料比较

Table 1 Comparison of basic characteristics of the two group

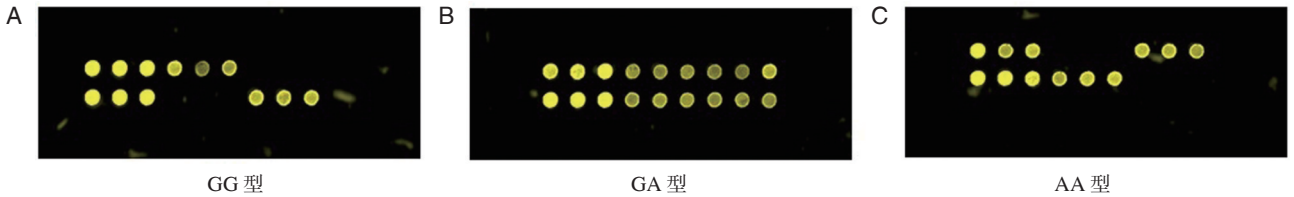
项目	AMI 组 (<i>n</i> =252)	对照组 (<i>n</i> =264)	<i>P</i> 值
男性 [<i>n</i> (%)]	187 (74.2)	165 (62.5)	0.004
年龄 (岁)	69.6 ± 11.1	62.8 ± 11.9	<0.001
收缩压 (mmHg)	131.5 ± 23.9	120.0 ± 16.1	<0.001
舒张压 (mmHg)	79.3 ± 16.2	77.9 ± 11.9	0.259
吸烟 [<i>n</i> (%)]	74 (29.4)	72 (27.3)	0.598
饮酒 [<i>n</i> (%)]	65 (25.8)	44 (16.7)	0.011
高血压 [<i>n</i> (%)]	148 (58.7)	90 (34.1)	<0.001
糖尿病 [<i>n</i> (%)]	83 (32.9)	47 (17.8)	<0.001
高脂血症 [<i>n</i> (%)]	59 (23.4)	38 (13.3)	0.009
总胆固醇 (mmol/L)	4.85 ± 1.24	4.43 ± 1.43	<0.001
甘油三酯 (mmol/L)	1.74 ± 1.42	1.52 ± 1.39	0.072
低密度脂蛋白酯 (mmol/L)	2.84 ± 0.94	2.77 ± 1.17	<0.001
高密度脂蛋白酯 (mmol/L)	1.19 ± 0.43	1.25 ± 0.36	0.002

1 mmHg=0.133 kPa

2.2 ALDH2 基因型和等位基因频率分布比较

ALDH2 基因 Glu504Lys 位点 DNA 微阵列芯片法基因分型结果如图 1 所示。经 DNA 微阵列芯片法基因分型检测,ALDH2 基因型和等位基因频率在 AMI 组及对照组中的分布情况结果如表 2 所示。ALDH2 基因型分布经遗传平衡 χ^2 检验,结果显示: AMI 组 ($\chi^2=0.011$, $P=0.918$); 对照组 ($\chi^2=0.540$, $P=0.463$)。两组 ALDH2 基因型和等位基因频率分布均符合 HWE 遗传平衡,表明所有入选的研究对象均具有人群代表性 ($P > 0.05$)。ALDH2 基因型和等位基因频率的分布在两组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中,AMI 组 ALDH2 GG、GA 和 AA 基因型所占比例分别为 45.63%、

44.05%和10.32%，G和A等位基因频率分别为67.66%和32.34%。对照组 *ALDH2* GG、GA和AA基因型所占比例分别为56.82%、35.98%和7.20%，G和A等位基因频率分别为74.81%和25.19%。



A:GG 型; B: GA 型; C:AA 型

图1 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点基因芯片分型图
Figure 1 Microarray genotyping of *ALDH2* gene Glu504Lys

表2 <i>ALDH2</i> 基因型和等位基因频率分布			
Table 2 The genotype and allele frequencies of <i>ALDH2</i> Glu504Lys in AMI patients and controls			
<i>ALDH2</i> 基因型	AMI 组(<i>n</i> =252)	对照组(<i>n</i> =264)	<i>P</i> 值
GG	115(45.63)	150(56.82)	0.036
GA	111(44.05)	95(35.98)	
AA	26(10.32)	19(7.20)	
等位基因			
G	341(67.66)	395(74.81)	0.011
A	163(32.34)	133(25.19)	
HWE	$\chi^2=0.011, P=0.918$	$\chi^2=0.540, P=0.463$	

2.3 AMI 相关危险因素的 Logistic 回归分析

将所有候选变量引入多因素 Logistic 回归模型,采用逐步回归方法筛选独立危险因素,以年龄、性别、吸烟、饮酒、高血压病、糖尿病、高脂血症及 *ALDH2* 基因型为自变量,以是否患有 AMI 为因变量。Logistic 回归分析结果显示,年龄、性别、饮酒、高血压病、糖尿病、高脂血症是 AMI 发生的危险因素。其中,与 GG 基因型相比,*ALDH2* GA/AA 基因突变型携带者患 AMI 的风险增高,提示 GA/AA 基因型是 AMI 发生的独立危险因素($OR=1.906$, 95% 可信区间: 1.278~2.844, $P=0.002$),见表 3。

表3 AMI 发生相关危险因素的 Logistic 回归分析					
Table 3 Logistic regression analysis of the potential risk predictors of AMI					
自变量	非标准回归系数 (β)	相对危险度 OR	95%可信区间		<i>P</i> 值
			下限	上限	
年龄	0.057	1.058	1.039	1.078	<0.001
性别	0.803	2.232	1.379	3.612	0.001
吸烟	-0.263	0.769	0.472	1.253	0.292
饮酒	0.594	1.812	1.071	3.067	0.027
高血压	0.864	2.374	1.582	3.561	<0.001
糖尿病	0.742	2.099	1.333	3.306	0.001
高脂血症	1.004	2.729	1.628	4.574	<0.001
<i>ALDH2</i> GA/AA 基因型	0.645	1.906	1.278	2.844	0.002

3 讨论

AMI 是世界范围内致病率和致死率居前的危重疾病,严重威胁人类健康,如何有效地实现 AMI 的早期预防和早期诊断成为心血管疾病研究领域的重要课题^[1]。现有证据表明,AMI 是由遗传因

素与各种环境因素共同作用导致的复杂性疾病,研究报道已发现多种与 AMI 发生相关的基因^[3]。人 *ALDH2* 基因定位于染色体 12q24.2 上,长 44 kb,由 13 个外显子组成^[3]。*ALDH2* 基因的遗传多态性存在两种表型,具有催化活性的 G 等位基因和丧失活性的 A 等位基因。早期研究显示,不同地域、民族

之间 *ALDH2* 基因多态性之间存在差异^[5]。*ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点在亚洲人群中的突变率显著高于高加索人、欧洲人和美国黑人(东亚人群中 *ALDH2* 的突变比例达 30%~50%),占世界人口的 8%,并且在中国、韩国和日本等东亚不同国家人群中存在一定地区差异^[5-6]。因此,研究亚洲人群 *ALDH2* 基因与疾病的关系已经成为近年来的关注热点^[7]。

目前,国内外研究表明 *ALDH2* 基因在冠心病的发生发展中起重要作用^[8-9]。一项基因组关联分析研究报道 *ALDH2* 基因多态性与冠心病遗传易感性相关^[10]。杨美艳等^[11]在老龄老年人中发现 *ALDH2* 基因突变型是动脉粥样硬化发生的危险因素。有研究则在研究大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型中证实 *ALDH2* 高活性能够显著降低心肌梗死面积,而抑制 *ALDH2* 活性则使心肌细胞凋亡显著增加^[12]。日本和韩国学者研究先后报道 *ALDH2* 基因突变型是心肌梗死(myocardial infarction, MI)发生的独立危险因素^[13-14]。中国学者 Pan 等^[15]报道 *ALDH2* 基因多态性与急性冠脉综合征不良预后相关。近年来,多项荟萃分析也表明 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 单核苷酸多态可能增加冠心病和心肌梗死易感性,但结论存在争议^[16-17]。

氧化应激是缺血再灌注损伤最主要的机制,体内外的各种研究证据表明 *ALDH2* 在减轻心肌细胞氧化损伤、抑制细胞凋亡等重要心脏保护性作用^[18]。有研究在诱导干细胞来源的心肌细胞模型中发现,*ALDH2* 基因的突变导致活性氧和毒性醛的水平上升,并且诱导细胞周期停滞、凋亡信号通路激活^[19]。另外一项研究则发现转染缺失型 *ALDH2* cDNA 后 PC12 细胞对醛类物质 4-羟壬烯(4-HNE)敏感性增加^[20]。此前有报道 *ALDH2* 参与缺血前适应相关信号转导通路,其活性与心肌梗死面积呈显著负相关^[12]。也有多项研究表明 *ALDH2* 酶失活或活性下降后,可致使体内拮抗氧化应激及炎症反应的能力减弱,进而导致动脉粥样硬化的进展和 AMI 的发生,但相关病理机制有待进一步阐明^[21-22]。

本研究纳入梅州地区客家人群共 252 例 AMI 患者和 264 例健康对照者,按 *ALDH2* 基因型分为 GG 型、GA 型和 AA 型 3 个型别,分析 *ALDH2* 不同基因型及等位基因频率的分布。结果显示,AMI 组 *ALDH2* GA (44.05%) 和 AA (10.32%) 基因型比例和 A 等位基因 (32.34%) 的突变频率远高于对照组 (35.98%、7.20% 和 25.19%),差异具有显

著性($P<0.05$),提示 A 等位基因可能与 AMI 易感性有一定相关性,与目前部分研究报道相一致^[13,23]。然而值得注意的是不同种族和人群 *ALDH2* 基因多态性存在差异从而导致研究结论尚不一致^[16],前期研究发现广东梅州地区客家人群 *ALDH2* 基因多态性频率与其它地区有所不同^[5]。因此,上述结论尚需扩大样本量以及在不同地域人群中进一步验证。环境和遗传易感因素在 AMI 的发生发展中起互相促进互相影响,是影响早期冠状动脉粥样硬化轻重程度的重要环节^[3,24]。客家人是居住在岭南地区有上千年历史、具有独特遗传背景的汉族民系分支,有着相对特殊的生活方式、饮食习惯、文化民俗等方面具有鲜明的不同于其他民族的特征^[25]。本研究中,Logistic 回归分析显示,年龄、性别、饮酒、高血压病、糖尿病、高脂血症史是中国南方客家人群 AMI 发病的危险因素。此外,本研究发现在校正上述传统危险因素后,*ALDH2* GA/AA 基因型携带者发生 AMI 风险仍然明显高于 GG 基因型携带者($OR=1.906$, 95%可信区间:1.278~2.844, $P=0.002$)。因此,推测 GG 基因型可能通过影响 *ALDH2* 酶活性从而在减轻心肌缺血及抗氧化应激等方面发挥着重要心肌保护作用^[18,21],但其确切机制还有待进一步深入研究。

综上所述,本研究发现 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点多态性与 AMI 相关,*ALDH2* GA/AA 基因型可能是 AMI 的独立危险因素。本研究结果表明 *ALDH2* 基因在中国南方客家人群 AMI 的发病中可能起到重要作用,为 AMI 的早期预警提供依据,具有一定的临床意义。然而,上述研究结果与部分既往研究的不同可能与病例选择、样本量大小、地理环境、种族以及饮食习惯等诸多因素有关,尚需在不同种族和地区人群中进行大样本的临床研究。随着人们对 *ALDH2* 基因在 AMI 发生发展过程中确切机制研究的不断深入,必将为 AMI 风险预测和个体化治疗提供新的思路和治疗靶点。

参考文献

- [1] Chang J, Liu X, Sun Y. Mortality due to acute myocardial infarction in China from 1987 to 2014: Secular trends and age-period-cohort effects[J]. Int J Cardiol, 2017, 227:229-238.

- [2] Crea F, Libby P. Acute Coronary Syndromes: The way forward from mechanisms to precision treatment [J]. *Circulation*, 2017, 136:1155-1166.
- [3] Pagidipati NJ, Peterson ED. Acute coronary syndromes in women and men [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(8): 138-143.
- [4] Mizuno Y, Harada E, Morita S, et al. East asian variant of aldehyde dehydrogenase 2 is associated with coronary spastic angina: possible roles of reactive aldehydes and implications of alcohol flushing syndrome [J]. *Circulation*, 2015, 131(19):1665-1673.
- [5] Zhong Z, Hou J, Li B, et al. Genetic Polymorphisms of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALDH2 gene in a large ethnic Hakka population in southern China [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:2038-2044.
- [6] Mizuno Y, Hokimoto S, Harada E, et al. Variant aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2*2) in east asians interactively exacerbates tobacco smoking risk for coronary spasm-possible role of reactive aldehydes [J]. *Circ J*, 2016, 81(1):96-102.
- [7] 姜树朋, 李艳. 乙醛脱氢酶-2 基因及其 rs671 多态性与相关疾病 [J]. *微循环学杂志*, 2016, 3:63-67.
- [8] Dai X, Wiernek S, Evans JP, et al. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction [J]. *World J Cardiol*, 2016, 8(1):1-23.
- [9] Mizuno Y, Harada E, Morita S, et al. East asian variant of aldehyde dehydrogenase 2 is associated with coronary spastic angina: possible roles of reactive aldehydes and implications of alcohol flushing syndrome [J]. *Circulation*, 2015, 131(19):1665-1673.
- [10] Yamada Y, Yasukochi Y, Kato K, et al. Identification of 26 novel loci that confer susceptibility to early-onset coronary artery disease in a Japanese population [J]. *Biomed Rep*, 2018, 9(5):383-404.
- [11] 杨美艳, 韩博, 徐勇, 等. 高龄老年人乙醛脱氢酶 2 基因型多态性与动脉粥样硬化的关系 [J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37(3):229-231.
- [12] Madungwe NB, Zilberstein NF, Feng Y, et al. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2016, 6(3):93-108.
- [13] Takagi S, Iwai N, Yamauchi R, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in Japanese men [J]. *Hypertens Res*, 2002, 25(5): 677-681.
- [14] Jo SA, Kim EK, Park MH, et al. A Glu487Lys polymorphism in the gene for mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 is associated with myocardial infarction in elderly Korean men [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 382(1-2):43-47.
- [15] Pan C, Zhao Y, Bian Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 Glu504Lys variant predicts a worse prognosis of acute coronary syndrome patients [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4):2518-2522.
- [16] Zhang LL, Wang YQ, Fu B, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) polymorphism gene and coronary artery disease risk: a meta-analysis [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4):18503-18514.
- [17] Li YY, Wang H, Wu JJ, et al. ALDH2 gene G487A polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis including 5644 participants [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3):1666-1674.
- [18] 江玲, 李玉茜, 刘朝中. 乙醛脱氢酶 2 基因多态性与冠心病的研究进展 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2017, 9(1):119-121.
- [19] Matsa E, Ahrens JH, Wu JC. Human induced pluripotent stem cells as a platform for personalized and precision cardiovascular medicine [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(3):1093-1126.
- [20] Zhao Y, Wang C. Glu504Lys single nucleotide polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2 gene and the risk of human diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2015; 174050.
- [21] Daiber A, Oelze M, Steven S, et al. Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system [J]. *Redox Biol*, 2017, 12:35-49.
- [22] Lai CL, Xing JP, Liu XH, et al. Relationships of inflammatory factors and risk factors with different target organ damage in essential hypertension patients [J]. *Chin Med J*, 2017, 130(11):1296-1302.
- [23] Morita K, Miyazaki H, Saruwatari J, et al. Combined effects of current-smoking and the aldehyde dehydrogenase 2*2 allele on the risk of myocardial infarction in Japanese patients [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 232(1): 221-225.
- [24] Huang L, Cai X, Lian F, et al. Interactions between ALDH2 rs671 polymorphism and lifestyle behaviors on coronary artery disease risk in a Chinese Han population with dyslipidemia: A guide to targeted heart health management [J]. *Environ Health Prev Med*, 2018, 23(1):29.
- [25] Zhao PS, Hou JY, Wu HM, et al. Analysis of genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase in a large ethnic Hakka population in southern China [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(50):e13332.

利多卡因对发育期海马神经细胞生长的抑制作用及相关机制研究

陈兰涛 孙鑫 尹辉 姚亚飞 段宝民*

[摘要] **目的** 研究利多卡因对发育期海马神经细胞生长的影响及相关分子机制。**方法** 通过做浓度依赖实验确定利多卡因实验浓度,依据不同浓度利多卡因分为3组,其中对照组给予0.9%生理盐水处理,不加利多卡因,A组加入1 μM 利多卡因,B组10 μM 利多卡因。采用四唑盐(MTT)法检测利多卡因对发育期海马神经细胞增殖能力的影响;采用PI单染法检测利多卡因对发育期海马神经细胞的细胞周期影响;采用Annexin V-FITC双染法检测利多卡因对发育期海马神经细胞凋亡水平的影响;采用RT-PCR实验检测 *mTOR*、*CyclinD1* 及 *Cleaved caspase3* 基因水平。采用Western blot法检测利多卡因对发育期海马神经细胞 *mTOR*、*CyclinD1*、*Cleaved caspase3* 蛋白表达的影响。**结果** 通过MTT实验发现利多卡因处理第2 d后A组及B组神经细胞增殖水平显著低于对照组($P<0.05$);第2 d后B组神经细胞增殖水平显著低于A组($P<0.05$)。PI单染实验发现A组及B组的G₀/G₁期细胞比例显著高于对照组($P<0.05$);A组及B组的S期细胞比例显著低于对照组($P<0.05$);A组及B组的G₂/M期细胞比例显著低于对照组($P<0.05$)。Annexin V-FITC双染实验发现A组及B组细胞凋亡率均显著高于对照组($P<0.05$);B组细胞凋亡率显著高于A组($P<0.05$)。RT-PCR实验发现A组及B组的 *mTOR*、*CyclinD1* 基因水平均低于对照组($P<0.05$);B组的 *mTOR*、*CyclinD1* 基因水平低于A组($P<0.05$);A组及B组的 *Cleaved caspase3* 基因水平显著高于对照组($P<0.05$);B组 *Cleaved caspase3* 基因水平显著高于A组($P<0.05$)。Western blot实验发现A组及B组 *mTOR*、*CyclinD1* 蛋白水平均低于对照组($P<0.05$);B组的 *mTOR*、*CyclinD1* 低于A组($P<0.05$);B组 *Cleaved caspase3* 蛋白水平显著高于A组($P<0.05$)。**结论** 利多卡因可抑制发育期海马神经细胞生长,并导致神经细胞发生凋亡,利多卡因的神经毒性可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

[关键词] 利多卡因;海马神经细胞;细胞周期

Inhibitory effect of lidocaine on the growth of hippocampal neurons in developing period and related mechanisms

CHEN Lantao, SUN Xin, YIN Hui, YAO Yafei, DUAN Baomin*

(Emergency Center of Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan, China, 475000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect and mechanism of lidocaine on the growth of hippocampal neurons in the developing period. **Methods** The experimental concentration of lidocaine was determined by concentration-dependent experiments. According to the different concentration of lidocaine, lidocaine was divided into 3 groups. The control group was treated with 0.9% saline without lidocaine. Group A was treated with 1 μM lidocaine and group B with 10 μM lidocaine. RT-PCR method was used to determine the gene level of *mTOR*, *CyclinD1*, *Cleaved caspase3*. MTT assay was used to detect the effect of lidocaine on the proliferation of developing hippocampal neurons; PI single staining was used to detect the effect of

基金项目:河南省教育厅科技攻关项目(18B310010)

作者单位:河南省开封市中心医院急救中心,河南,开封 475000

*通信作者:段宝民, E-mail: 489376698@qq.com

lidocaine on the cell cycle of developing hippocampal neurons; Annexin V-FITC double staining was used to detect the effect of lidocaine on the apoptosis of developing hippocampal neurons; Western blot was used to detect the effect of lidocaine on the expression of mTOR, CyclinD1 and Cleaved Caspase3 protein in hippocampal neurons during development. **Results** The MTT assay showed that the proliferation of nerve cells in group A and group B was significantly lower than that in the control group after the second day of lidocaine treatment ($P<0.05$). The proliferation of nerve cells in group B was significantly lower than that in group A after the second day ($P<0.05$). The proportion of G₀/G₁ phase cells in group A and group B was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). the proportion of S phase cells in group A and group B was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The proportion of G₂/M phase cells in group A and group B was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of group A and group B was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$); the apoptosis rate of group B was significantly higher than that of group A ($P<0.05$). RT-PCR showed that the levels of mTOR and CyclinD1 in group A and group B were lower than those in control group ($P<0.05$). The levels of mTOR and CyclinD1 in group B were lower than those in group A ($P<0.05$). The level of *Cleaved caspase3* gene in group A and B group was significantly higher than that in control group, but higher in group B than in group A ($P<0.05$). Western blot analysis showed that the levels of mTOR and CyclinD1 in group A and group B were lower than those in control group ($P<0.05$), both of mTOR and CyclinD1 much higher in group A compared to group B ($P<0.05$). The level of cleaved caspase3 protein in group B was significantly higher than that in group A ($P<0.05$). **Conclusion** Lidocaine inhibits the growth of hippocampal neurons in developmental stages and causes neuronal apoptosis. The neurotoxicity of lidocaine could be related to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[KEY WORDS] Lidocaine; Hippocampal neurons; Cell cycle

利多卡因是一类镇痛作用较好的酰胺类麻醉药物,临床实践发现利多卡因可导致患者出现头晕、低血压及肢体功能障碍,因而利多卡因对患者的副作用日益受到关注^[1]。海马主要由神经干细胞聚集形成,参与学习、记忆及情绪等重要功能的调控。李顺洪等^[2]通过动物实验研究发现利多卡因可抑制大鼠的学习及运动功能。游仁芳等^[3]发现利多卡因可导致部分老年患者术后发生认知功能障碍,可能由于利多卡因对患者中枢神经系统产生毒性。目前利多卡因对神经细胞的毒理机制尚不明确,本研究探讨利多卡因对发育期海马神经细胞生长的影响及相关作用机制,为进一步改善临床麻醉用药提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

大鼠发育期海马神经细胞购自上海斯信生物科技有限公司,采用含10%胎牛血清及150 U/L青霉素的达尔伯克改良伊格尔(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)培养液,通过做浓度依赖实验确定利多卡因实验浓度,依据不同浓度利多卡因分为3组,其中对照组给予0.9%生理盐水处

理,不加利多卡因,A组加入1 μ M利多卡因,B组10 μ M利多卡因。置于37℃,5% CO₂条件培养。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM培养基购自上海博升生物科技有限公司;Trizol试剂购自美国 invitrogen 公司;胰酶购自德国 Sigma 公司;逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;mTOR、CyclinD1、Cleaved caspase3、GAPDH一抗及HRP标记的二抗购自北京博奥森生物技术有限公司;MDF-394超低温冰箱购自日本三洋公司;DYCP-31DN电泳仪购自北京六一仪器厂;CyFlow Cube流式细胞仪购自德国 Partec 公司;SW-CJ-1B超净工作台购自上海苏净实业有限公司;HH-CP-01P CO₂培养箱购自上海皓庄仪器有限公司;Allegra 64R高速离心机购自美国贝克曼公司;Multiskan FC酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 MTT法检测海马神经细胞增殖能力

将海马神经细胞接种在96孔板,细胞数量为 1×10^4 /孔,每组设3个复孔。对照组加入生理盐水,A组加入1 μ M利多卡因,B组10 μ M利多卡因。置于37℃,5% CO₂条件分别培养0、1、2、3、4、5 d后弃上清

液,每孔加入 10 μ L MTT 溶液,孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 80 μ L 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),在 450 nm 波长采用酶标仪检测各孔 OD 值。

1.4 流式细胞术检测发育期海马神经细胞的细胞周期

对照组给予 0.9% 生理盐水处理,不加利多卡因, A 组加入 1 μ M 利多卡因, B 组 10 μ M 利多卡因。置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件培养 24 h 后,以 1 500 rpm 离心 10 min 后经预冷 PBS 清洗,并将细胞浓度调整为 1×10^5 /mL,取 0.5 mL 细胞悬液后加入预冷的 70% 乙醇固定 6 h,以 1 500 rpm 离心后弃上清液,经预冷 PBS 清洗后,加入 1 mL 的 PI 染色液,置于 4 $^{\circ}$ C 条件避光孵育 25 min,在 488 nm 处采用流式细胞仪检测细胞周期状况。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测发育期海马神经细胞的凋亡率

对照组给予 0.9% 生理盐水处理,不加利多卡因, A 组加入 1 μ M 利多卡因, B 组 10 μ M 利多卡因。置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件培养 24 h 后,经预冷 PBS 清洗,各组细胞加入 300 μ L Binding Buffer 悬浮细胞,然后加入 10 μ L Annexin V-EGFP,孵育 10 min 后加入 10 μ L PI,混匀后避光静置 10 min。采用流式细胞仪检测神经细胞凋亡情况。

1.6 RT-PCR 检测 *mTOR*、*CyclinD1* 及 *Cleaved caspase3* 基因水平

对照组给予 0.9% 生理盐水处理,不加利多卡因, A 组加入 1 μ M 利多卡因, B 组 10 μ M 利多卡因。置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件培养 24 h,收集细胞后采用 Trizol 法提取总 RNA,经 RNA 质检合格后,通过 RNA 反转录反应合成 cDNA。采用 Prime5.0 软件设计基因引物,以 *GAPDH* 基因为内参, *mTOR* 基因:正向引物 5'-CGACTGCATGCATGCAC-3', 5'-CGACTGCATGTGCAC-3'; *CyclinD1* 基因:正向引物 5'-GCACGTGCA-GTAGC-CAC-3', 5'-CGTGACTGCACTGATC-3'; *Cleaved caspase3* 基因:正向引物 5'-GTATGCAGTCACTGC-3', 5'-GCATGCAG TCGTCAGC-3'; *GAPDH* 基因:正向引物 5'-CTGACTGACGTCACGTC-3', 5'-GTACGTGCA-CT GCAGC-3';扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 25 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,反应 32 个循环后,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达水平。*mTOR* 基因扩增产物大小为 217 bp; *CyclinD1*

基因扩增产物大小为 342 bp; *Cleaved caspase3* 基因扩增产物大小为 249 bp; *GAPDH* 基因扩增产物大小为 273 bp。

1.7 Western blotting 检测 *mTOR*、*CyclinD1* 及 *Cleaved caspase3* 蛋白水平

对照组给予 0.9% 生理盐水处理,不加利多卡因, A 组加入 1 μ M 利多卡因, B 组 10 μ M 利多卡因。置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件培养 24 h,收集细胞后加入 RIPA 细胞裂解液,置于 4 $^{\circ}$ C 条件 20 min 后,以 12 000 rpm 离心 10 min,收集上清液并采用 BCA 法检测蛋白浓度,将蛋白样本液与上样缓冲液混匀后,沸水浴 5 min,待冷却后上样(每孔 15 μ g),采用 10% 的 SDS-PAGE 电泳,通过湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜,然后采用含 5% 脱脂奶粉的封闭液孵育 2 h,经 TBST 清洗 3 次后加入 *mTOR*、*CyclinD1*、*Cleaved caspase3* 和 *GAPDH* 的一抗,置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,经 TBST 液洗涤后,加入 HRP 标记的二抗,置于摇床晃动 2 h。采用 TBST 液洗涤 3 次后,加入增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂显色,曝光、拍照后采用 Image Lab 软件分析蛋白条带灰度值。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 21.0 分析数据,计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用独立 *t* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利多卡因对各组发育期海马神经细胞增殖能力的影响

通过 MTT 实验发现第 2 d 后 A 组及 B 组神经细胞增殖水平显著低于对照组($P < 0.05$);第 2 d 后 B 组神经细胞增殖水平显著低于 A 组($P < 0.05$)。利多卡因可促使发育期海马神经细胞数量下降、形态异常。见表 1、图 1 及图 2。

2.2 利多卡因对各组发育期海马神经细胞的细胞周期影响

本研究发现利多卡因处理 24 h 后, A 组及 B 组的 G0/G1 期细胞比例均显著高于对照组($P < 0.05$); B 组的 G0/G1 期细胞比例显著高于 A 组($P < 0.05$); A 组及 B 组的 S 期细胞比例显著低于对照组($P < 0.05$); B 组的 S 期细胞比例显著低于 A 组($P < 0.05$); A 组及 B 组的 G2/M 期细胞比例显著低于对照组($P < 0.05$); B 组的 S 期细胞比例显著低于 A 组($P < 0.05$)。见图 3。

表1 利多卡因对发育期神经细胞增殖水平的影响

Table 1 The effect of lidocaine on the proliferation of neurons during development

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照组	0.08 ± 0.03	0.17 ± 0.06	0.28 ± 0.07	0.46 ± 0.08	0.53 ± 0.11	0.69 ± 0.13
A 组	0.07 ± 0.04 [*]	0.16 ± 0.04 [*]	0.19 ± 0.06 [*]	0.24 ± 0.07 [*]	0.26 ± 0.06 [*]	0.34 ± 0.07 [*]
B 组	0.09 ± 0.03 [*]	0.14 ± 0.03 ^{*#}	0.16 ± 0.04 ^{*#}	0.17 ± 0.05 ^{*#}	0.19 ± 0.05 ^{*#}	0.21 ± 0.07 ^{*#}

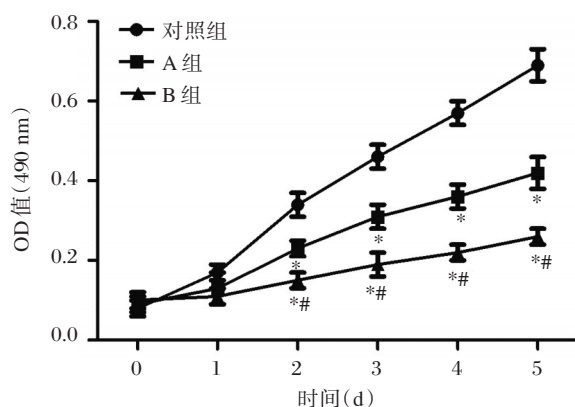
*与对照组相比, $P < 0.05$; #与A组相比, $P < 0.05$ 。*与对照组相比, $P < 0.05$; #与A组相比, $P < 0.05$ 。

图1 利多卡因对发育期神经细胞增殖能力的影响

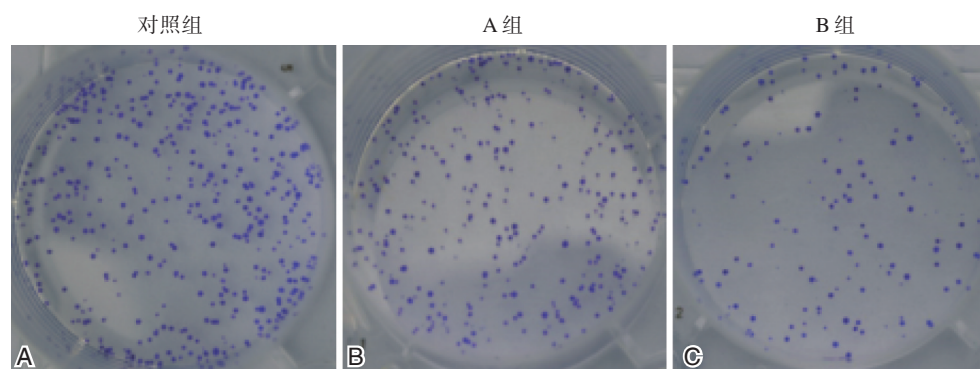
Figure 1 Effect of lidocaine on proliferation of developing nerve cells

2.3 利多卡因对各组发育期海马神经细胞的细胞凋亡影响

本研究发现利多卡因处理 24 h 后, A 组及 B 组细胞凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$); B 组细胞凋亡率显著高于 A 组 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 利多卡因对各组发育期海马神经细胞 *mTOR*、*CyclinD1* 及 *Cleaved caspase3* 基因水平的影响

利多卡因处理 24 h 后, A 组及 B 组的 *mTOR*、*CyclinD1* 基因水平均低于对照组 ($P < 0.05$); B 组的 *mTOR*、*CyclinD1* 基因水平低于 A 组 ($P < 0.05$); A 组及 B 组的 *Cleaved caspase3* 基因水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); B 组 *Cleaved caspase3* 基因水平显著高于 A 组 ($P < 0.05$)。见图 5。



A: 对照组发育期海马神经细胞克隆形成图; B: A 组发育期海马神经细胞克隆形成图; C: B 组发育期海马神经细胞克隆形成图。

图2 利多卡因对发育期神经细胞生长的影响

Figure 2 Effects of lidocaine on the growth of neurons during development

2.5 利多卡因对各组发育期海马神经细胞 *mTOR*、*CyclinD1* 及 *Cleaved caspase3* 蛋白水平的影响

利多卡因处理 24 h 后, A 组及 B 组的 *mTOR*、*CyclinD1* 水平均低于对照组 ($P < 0.05$); B 组的 *mTOR*、*CyclinD1* 低于 A 组 ($P < 0.05$); A 组及 B 组的 *Cleaved caspase3* 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); B 组 *Cleaved caspase3* 水平显著高于 A 组 ($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

利多卡因是临床应用较为广泛的麻醉药物,具有起效快、麻醉效果好等特点,但其对神经系统的副作用日益受到关注,利多卡因可能影响神经细胞的可塑性,并导致神经细胞功能受损^[4-6]。有临床研究发现大剂量使用利多卡因可能导致手术患者发生神经退行性病变,促使患者术后学习能

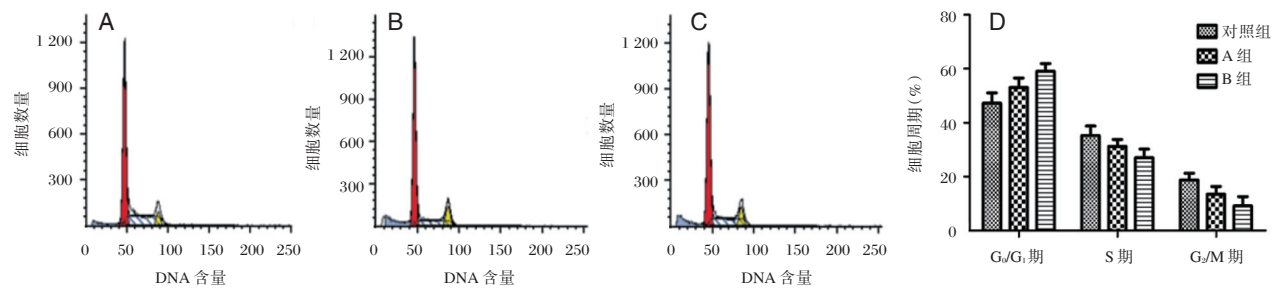


图3 利多卡因对发育期海马神经细胞的细胞周期的影响
Figure 3 Effect of lidocaine on cell cycle of cultured hippocampal neurons

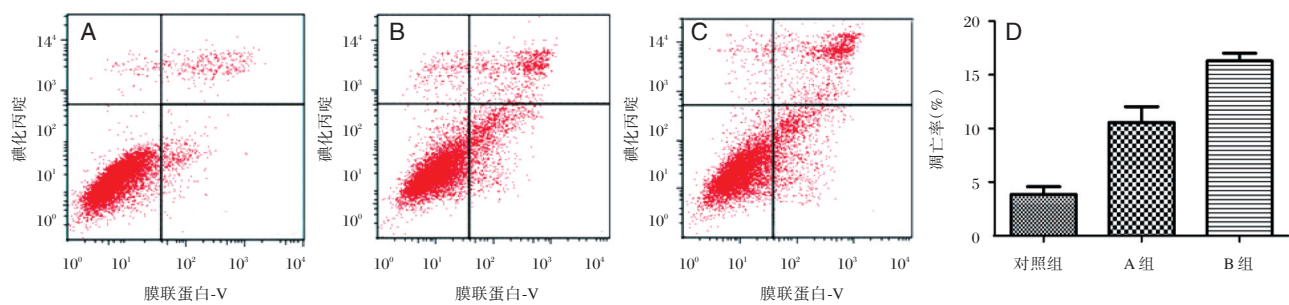
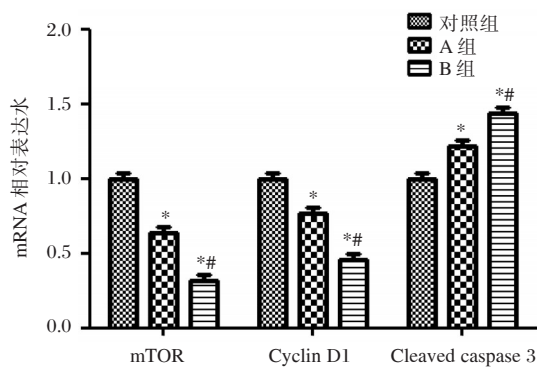


图4 利多卡因对发育期海马神经细胞的凋亡率影响
Figure 4 Effect of lidocaine on the apoptosis rate of hippocampal neurons during development



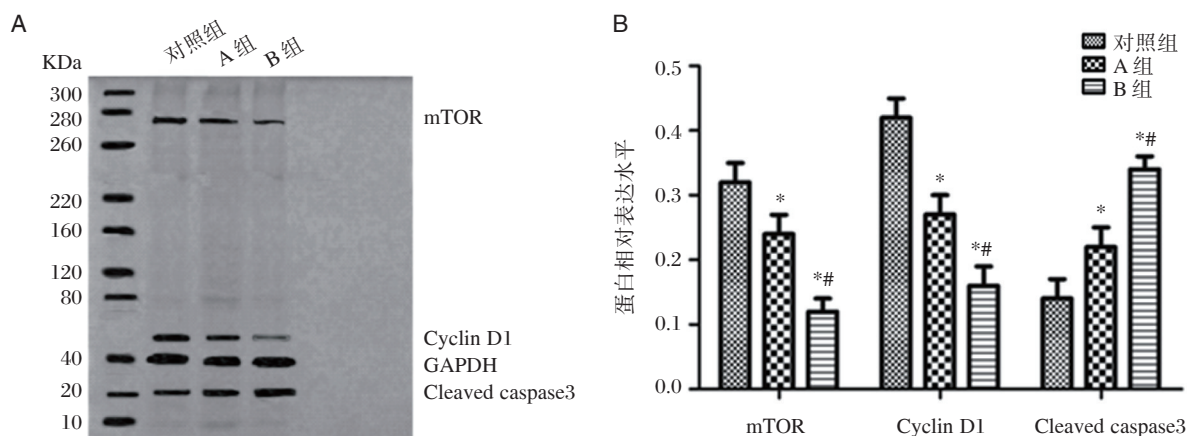
*与对照组相比, $P < 0.05$; **与A组相比, $P < 0.05$ 。

图5 利多卡因对发育期海马神经细胞相关基因水平的影响
Figure 5 Effect of lidocaine on the level of related gene in hippocampus of developing hippocampal neurons

力下降^[7]。Patterson等^[8]研究发现小鼠视神经细胞经8 μM 利多卡因作用12 h后,细胞内DNA发生降解并出现凋亡小体,提示利多卡因可促进神经细胞发生凋亡。郭艳辉等^[9]研究发现利多卡因麻醉可能导致患者发生马尾综合症,从而造成患者神经损伤。通常神经系统发育过程中衰老神经细胞将发生凋亡,有助于神经祖细胞分化、成熟,

从而保持神经元维持正常的生理功能,但利多卡因的使用可能促使发育期海马神经元凋亡率异常上升,对患者的记忆力及认知功能等造成损伤。目前利多卡因在临床应用较广,为降低利多卡因对患者的神经毒性,探讨利多卡因对神经细胞损伤的毒理机制有重要临床价值。

本研究通过MTT实验发现利多卡因可抑制发育期海马神经细胞的增殖能力,并且高浓度的利多卡因的抑制效果更强,导致G₀/G₁期神经细胞比例上升,从而抑制肿瘤细胞增殖。已有研究发现丙泊酚可干扰发育期海马神经元的细胞周期,促使细胞G₀/G₁期进入S期,并且导致细胞停滞于S期^[10-11]。这表明利多卡因抑制细胞增殖的机制与丙泊酚存在差异,G₀/G₁期转入S期的控制蛋白主要为cyclin D1、CDK4和CDK6等周期蛋白,利多卡因可能抑制这几类蛋白的活性,从而促使G₀/G₁期神经细胞比例上升。细胞由S期转入G₂/M期主要受CDK1激酶调控,丙泊酚对该类蛋白的活性产生干扰作用。本研究通过流式细胞术发现利多卡因可促进发育期的海马神经细胞发生凋亡,并且B



A:各组发育期海马神经细胞相关蛋白电泳图; B:各组发育期海马神经细胞相关蛋白相对表达水平; *与对照组相比, $P < 0.05$; #与A组相比, $P < 0.05$ 。

图6 利多卡因对发育期海马神经细胞相关蛋白水平的影响

Figure 6 Effect of lidocaine on the level of related protein in hippocampus of developing hippocampal neurons

组的海马神经细胞凋亡水平高于A组。Western blotting发现发育期海马神经细胞经利多卡因处理后 cyclin D1 及 mTOR 表达水平下降,提示利多卡因可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路干扰发育期海马神经细胞的正常生理功能。有研究发现利多卡因可抑制小鼠成纤维细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,促使细胞生长功能障碍,并导致细胞凋亡率上升^[12]。这表明利多卡因的细胞毒性与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路密切相关,为研究如何缓解利多卡因的毒性提供了作用靶点。有研究发现利多卡因可促进肺癌细胞内 p38MAPK 信号转导,调控细胞代谢相关基因的表达及翻译,导致凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 水平异常,并最终促进细胞发生凋亡^[13-15]。这与本研究结果不一致,提示利多卡因的细胞毒性机理可能涉及多种信号通路,需要综合分析利多卡因对细胞的生长、凋亡作用机制。有研究发现利多卡因可抑制 GAP-43 及 p-GAP-43 等蛋白水平促使神经细胞内细胞骨架形成障碍,从而诱导神经突起分支数量下降,并对促使神经细胞突触功能异常^[16-17]。这说明利多卡因对神经细胞的损伤机制较为复杂,不仅可干扰神经细胞的增殖、凋亡,同时可能对细胞的形态、结构产生一定的影响,为了充分阐明利多卡因对神经细胞的损伤,需进一步分析其细胞的形态、其它关键代谢基因的影响,以期寻找可能逆转神经细胞损伤的作用靶点。

综上所述,利多卡因可抑制发育期海马神经细胞生长,并诱导神经细胞发生凋亡,可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关,为治疗利多卡因的神经细胞毒性提供实验依据。

参考文献

- [1] 苗利萍,李珏,刘雅芳,等. 氯化锂对异氟醚诱导的发育期幼鼠海马毒性的影响[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(22):1923-1928.
- [2] 李顺洪,冯麟,岳济民,等. 利多卡因对异氟醚麻醉后大鼠海马组织炎症及认知功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(29):5633-5636.
- [3] 游仁芳,许福生,王少平. 阿米洛利对氯胺酮麻醉大鼠神经细胞凋亡及神经细胞活性物质的影响[J]. 利多卡因对老年肺癌根治术患者围术期脑氧代谢及术后早期认知功能影响[J]. 临床军医杂志, 2016, 44(1):64-67.
- [4] 耿倩,申乐. 围术期持续静脉输注利多卡因在多模式镇痛中的应用和机制探讨[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(2):80-83.
- [5] Zhou Y, Hong F, Tian Y, et al. Nanoparticulate titanium dioxide-inhibited dendritic development is involved in apoptosis and autophagy of hippocampal neurons in offspring mice [J]. Toxicol Res (Camb), 2017, 6(6): 889-901.
- [6] 王红运,高臻辉,梁斌,等. 利多卡因对老年脊柱手术患者术后炎症免疫反应及认知功能的影响[J]. 药物评价研究, 2017, 40(7):979-982.
- [7] Rao S, Kirschen GW, Szczurkowska J, et al. Repositioning of somatic golgi apparatus is essential for the dendritic establishment of adult-born hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 2018, 38(3):631-647.
- [8] Patterson KP, Barry JM, Curran MM, et al. Enduring memory impairments provoked by developmental febrile seizures are mediated by functional and structural effects of neuronal restrictive silencing factor[J]. J Neurosci, 2017, 37(14):3799-3812.

(下转第188页)

· 论 著 ·

耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药机制研究和同源性分析

谭坪海¹ 陈利达² 郭鹏豪³ 廖康³ 伍众文³ 叶大柠⁴ 黄彬^{3*}

【摘要】目的 研究鲍曼不动杆菌耐药性的变迁及耐亚胺培南鲍曼不动杆菌(IRAB)的耐药机制及同源性,为临床抗感染治疗及医院感染控制提供依据。**方法** 采用 Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定仪进行菌株鉴定和药敏实验。收集 2011 至 2014 年间 1 761 株鲍曼不动杆菌,其中 IRAB 1 360 株。随机选取对亚胺培南耐药和敏感的鲍曼不动杆菌,分为耐药组(66 株)及对照(敏感)组(14 株),用 PCR 方法进行 A~D 类 β -内酰胺酶、外膜孔通道蛋白和主动外排泵基因检测,采用脉冲场凝胶电泳对菌株进行分子分型,用 BioNumeric 软件进行聚类分析。**结果** 1 761 株鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药率逐年下降,由 84.0%降至 71.8%。同时,鲍曼不动杆菌对多种抗生素的耐药率也逐年下降。耐药组耐药基因 *TEM*、*AMPC*、*OXA-51* 的阳性率分别为 95.45%、98.48%、96.97%,对照组分别为 35.71%、64.29%、71.43%,耐药组均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。*OXA23*、*OXA58* 仅在耐药组中检出,阳性率分别为 95.45% 和 1.52%。其余耐药基因在 2 组中均未检出。80 株鲍曼不动杆菌分为 A~W 共 23 个型别,耐药组主要为 P1 型(16 株),R1 型(4 株)和 R2(12 株)型,对照组分布分散,其中 R4 型同时存在于耐药组和对照组。2012 年 2 次暴发流行,分别为 P1 型(9 月-11 月)(MICU、SICU),R2 型(9 月-11 月)(MICU);2013 年 2 次暴发流行,分别为 P1 型(4 月-6 月)(MICU、SICU、神经科),R1 型(2013 年 12 月-2014 年 2 月)(MICU、神经科);2014 年一次暴发流行,流行菌株为 R2 型(2 月-4 月)(MICU、SICU、神经科)。**结论** 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌对多种抗生素的耐药率较高。鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的主要机制为携带 *OXA23* 基因,产生 D 类 β -内酰胺酶水解亚胺培南。MICU、SICU 和神经科是暴发流行监控的重点科室。

【关键词】 鲍曼不动杆菌;院内感染;耐药性;同源性分析

Detection of drug - resistance gene and homology analysis of *Acinetobacter baumannii*

TAN Pinghai¹, CHEN Lida², GUO Penghao³, LIAO Kang³, WU Zhongwen³, YE Daning⁴, HUANG Bin^{3*}

(1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510280; 2. Department of Blood Transfusion, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, China, 100029; 3. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 4. Department of Medicine, Xinfeng People's Hospital, Shaoguan, Guangdong, China, 511100)

【ABSTRACT】Objective To investigate the drug resistance variation of *Acinetobacter baumannii* and the resistance mechanism and homology analysis of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (IRAB).

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313143)

作者单位:1. 南方医科大学珠江医院血液内科,广东,广州 510280

2. 中日友好医院输血科,北京 100029

3. 中山大学附属第一医院检验医学部,广东,广州 510080

4. 新丰县人民医院内科,广东,韶关 511100

*通信作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

Methods The identification and the drug susceptibility test were detected by Vitek 2 Compact automatic analyzer. 1 761 strains of *Acinetobacter baumannii* from 2011 to 2014 were isolated, 1 360 of which were IRAB. Imipenem - resistant and imipenem - sensitive *Acinetobacter baumannii* were randomly selected and divided into drug resistant group (66 strains) and control (sensitive) group (14 strains). Resistant genes were determined by PCR. The strains were classified by pulsed field gel electrophoresis and cluster was analyzed by BioNumeric software. **Results** The drug resistance rate of 1 761 strains of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics decreased year by year. The resistance rates of *Acinetobacter baumannii* to imipenem declined from 84.0% to 71.8%. The positive rates of *TEM*, *AMPC*, and *OXA-51* in the resistance group (95.45%, 98.48%, and 96.97%, respectively) were higher than that in the control group (35.71%, 64.29%, and 71.43%, respectively). *OXA23* and *OXA58* were detected only in the resistant group, and the positive rate were 95.45% and 1.52%, respectively. Other resistance genes were not detected in both groups. The 80 strains were divided into 23 genotypes by PFGE. The genotypes in the resistant group were mainly P1, R1 and R2, the genotype in the control group was scattered. R4 was present in both resistant and control group. There were 2 outbreaks in 2012, and the genotypes were P1 (MICU, SICU), R2 (MICU). There were 2 outbreaks in 2013, and the genotypes were P1 (MICU, SICU, Neurology), R1 (MICU, Neurology). There was 1 outbreak in 2014, and the genotype was R2 (MICU, SICU, Neurology). **Conclusions** The resistance of *Acinetobacter baumannii* to a variety of antibiotics is higher. The main mechanism of *Acinetobacter baumannii* resistance to imipenem is to carry the *OXA23* gene and produce D-type β -lactamase to hydrolyze imipenem. MICU, SICU, and Neurology are key departments for outbreak surveillance.

[KEY WORDS] *Acinetobacter baumannii*; nosocomial infection; resistance; homology Analysis

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)是非发酵革兰阴性杆菌^[1],近年已成为我国重症监护病房检出率最高的病原菌^[2]。Ab耐药株的出现,给临床抗感染治疗带来很大的困难^[3-4]。亚胺培南是碳青霉烯类抗生素的代表性药物,具有超广谱抗菌活性。随着亚胺培南在临床上的广泛应用,对亚胺培南耐药的临床分离菌株越来越多^[5]。因此,本研究将对临床分离的耐亚胺培南 Ab(imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, IRAB)及同期对亚胺培南敏感的 Ab 进行亚胺培南的耐药性变迁、耐药机制和暴发流行情况分析,从而为临床抗感染治疗及医院感染控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集中山大学附属第一医院 2011 年 1 月至 2014 年 12 月间临床分离的 Ab 1 761 株,其中 IRAB 1 360 株,所有菌株均为分离自患者的第一株,菌株冻存于 -80°C 备用。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 购自国家卫生健康委员会临床检验中心,沙门菌 H9812 为本室保存。

1.2 主要仪器和试剂

9700 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,DYY-6C

型电泳仪购自北京市六一仪器厂,FUSION Fx7 凝胶成像系统购自法国 VILBER 公司,Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统购自法国生物梅里埃公司,Eppendorf 5415 离心机购自德国 Eppendorf 公司,PCR 试剂、DNA marker DL 2000、限制性核酸内切酶 *Apa* I 和 *Xba* I 均购自大连 TaKaRa 公司。头孢哌酮/舒巴坦纸片购自英国 OXOID 公司。

1.3 细菌鉴定和药敏实验

采用 Vitek2 Compact 全自动微生物分析系统鉴定细菌,采用 K-B 法检测细菌对头孢哌酮/舒巴坦的敏感性,采用 MIC 法检测细菌对其他药物的敏感性,药敏结果参照美国临床实验室标准化协会 2017 版要求进行抗菌药物敏感性判断(CLSI M100-S27)^[6]。

1.4 耐药基因检测

采用热裂解法(95°C , 10 min)提取细菌 DNA,采用大连 TaKaRa 公司 PCR 试剂,反应体系为 TaKaRa Taq ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{PCR buffer (Mg}^{2+}\text{ Plus)}$ $5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP Mixture (各 2.5 mM) $4\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$,引物 1($20\text{ }\mu\text{M}$) $1\text{ }\mu\text{L}$,引物 2($20\text{ }\mu\text{M}$) $1\text{ }\mu\text{L}$,灭菌蒸馏水加至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。A-D 类 β -内酰胺酶基因、外膜孔通道蛋白基因和主动外排泵基因的引物序列及扩增产物大小见表 1。

表1 耐药基因的PCR引物序列及产物大小

Table 1 PCR primers and product sizes of drug-resistance genes

耐药基因类别	耐药基因	引物序列(5' to 3')		产物大小 (bp)
β-内酰胺酶基因				
A类	<i>TEM-1</i>	F:5'-AGGAAGAGTATGATTCAACA -3'	R:5'-CTCGTCGTTTGGTATGGC -3'	535
A类	<i>SHV-1</i>	F:5'-TGCGCAAGCTGCTGACCAGC -3'	R:5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG A-3'	305
A类	<i>GES-1</i>	F:5'- ATGCGCTTCATTCACGCAC - 3'	R:5'- CTATTTGTCCGTGCTCAGG - 3'	864
A类	<i>KPC-1</i>	F:5' - CTTGCTGCCGCTGTGCTG - 3'	R:5'-GCAGGTTCCGGTTTTGTCTC - 3'	489
A类	<i>PER-1</i>	F:5'-AGTCAGCGGCTTAGATA -3'	R:5'- CGTATGAAAAGGACAATC-3'	978
B类	<i>IMP-1</i>	F:5'-CGGCCGCAGGAGAGGCTTT-3'	R:5'- AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'	587
B类	<i>VIM-1</i>	F:5'-ATTCCGGTCGGAGAGGTCCG-3'	R:5'- GAGCAAGTCTAGACCGCCCG-3'	633
B类	<i>SIM-1</i>	F:5'- TACAAGGGATTTCGGCATCG -3'	R:5'- TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	571
B类	<i>SPM-1</i>	F:5'- CCTACAATCTAACGGCGACC -3'	R:5'- TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'	349
B类	<i>GIM-1</i>	F:5'-ATTACTTGTAGCGTTGCC-3'	R:5'- CTCTATAAGCCCATTTC-3'	418
B类	<i>AIM-1</i>	F:5'-CTCGGTTTCAGGCCGGAGGA-3'	R:5'-GGGTGACCAGGATGTCGCACT-3'	478
B类	<i>KHM-1</i>	F:5'-ACGGATTAGTCGTGCTTG-3'	R:5'-GCCTGCTCTTCGCCTTTA-3'	641
B类	<i>NDM-1</i>	F:5'-GGCGGAATGGCTCATCACGA-3'	R:5'-CGCAACACAGCCTGACTTTC-3'	287
C类	<i>AMPC</i>	F:5'-GCCTGGTAAGTATTGGAAAG-3'	R:5'-CCGAAACGGTTAGTTGAGCC-3'	696
C类	<i>DHA-1</i>	F:5'- GCTGCCACTGCTGATAGAA -3'	R: 5'- GTTGCCGTCTCCGTAAAG -3'	331
D类	<i>OXA-23</i>	F:5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3'	R:5'-TCACAACAATAAAAGCACTG-3'	1 067
D类	<i>OXA-24</i>	F:5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3'	R:5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT-3'	800
D类	<i>OXA-40</i>	F:5'-GATGAAGCTCAAACACAGGGTG-3'	R:5' -TTTCCATTAGCTTGCTCCACC- 3'	587
D类	<i>OXA-51</i>	F:5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	R:5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	353
D类	<i>OXA-58</i>	F:5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3'	R:5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'	599
外膜孔通道蛋白基因				
	<i>carO</i>	F:5'-TATGGATCCTACCAAGCTG AAGTTGGT GGTCG-3'	R:5'-TATGAATTCTTAGAAGCG GTATGCTGCACGAAC-3'	642
主动外排泵基因				
	<i>adeB</i>	F:5'-GGATTATGGCGACAGAAGGA-3'	R:5'-AATACTGCCGCCAATACCAG-3'	702

PCR循环参数为:93℃预变性2 min;93℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s,共35个循环。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察并记录结果,并送华大基因公司进行Sanger测序验证。用NCBI的Blast软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对耐药基因的测序结果进行序列比对。

1.5 Ab分子分型和同源性分析

采用脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)法,从琼脂平板上收集对数生长期Ab,调节麦氏浊度为4.0。取400 μL菌悬液37℃孵育5 min,分别加入蛋白酶K至终浓度0.5 mg/mL,再与等体积低熔点琼脂混合,倒入模具。

取出胶块加5 mL细胞裂解液和25 μL蛋白酶K,54℃水浴轻摇裂解2 h,用TE缓冲液50℃水浴15 min洗胶块6次。切2 mm胶块加入195 μL酶切缓冲液中,再加入5 μL *Apa* I,37℃酶切4 h,沙门菌H9812用*Xba* I酶切,其余实验条件与受试菌株相同。酶切好的胶块粘在梳子上制胶、电泳,电泳温度14℃,电压6 V,夹角120°,脉冲时间5~20 s,电泳18 h。EB染色20 min,纯水脱色30 min,凝胶成像仪上读取图像。应用聚类分析软件BioNumerics(Version 6.0)对PFGE条带进行分析。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计处理,计量资料

采用百分率表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏结果

临床分离的1 761株Ab,对氨苄西林/舒巴坦、

庆大霉素、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、头孢吡肟、复方新诺明、环丙沙星、头孢他啶的耐药率逐年下降,其中亚胺培南的耐药率从84%下降至71.8%,见表2。

除替加环素外,临床分离的1 360株IRAB对氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他

表2 2011至2014年间1 761株鲍曼不动杆菌对常用抗生素的药敏结果(%)

Table 2 Drug susceptibility results of 1 761 strains of *Acinetobacter baumannii* from 2011 to 2014 (%)

抗生素	2011(407株)			2012(447株)			2013(422株)			2014(485株)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
氨苄西林/舒巴坦	81.8	2.7	15.5	75.9	1.7	22.3	55.6	2.2	42.2	51.6	0.6	47.7
庆大霉素	84.0	0.5	15.5	78.3	1.1	20.6	70.9	3.6	25.6	69.3	2.9	27.8
左氧氟沙星	74.9	10.1	15.0	54.4	19.5	26.2	39.8	30.3	29.9	42.5	28.5	29.1
哌拉西林/他唑巴坦	79.9	5.7	14.5	77.6	2.2	20.1	73.7	2.6	23.7	69.7	3.5	26.8
亚胺培南	84.0	2.0	14.0	79.2	0.0	20.8	77.0	0.7	22.3	71.8	1.6	26.6
头孢吡肟	81.3	4.7	14.0	79.0	2.0	19.0	77.0	2.4	20.6	72.6	1.9	25.6
复方新诺明	86.0	0.0	14.0	65.8	0.0	34.2	60.2	0.0	39.8	60.8	0.0	39.2
环丙沙星	86.7	0.2	13.1	80.3	0.2	19.5	77.0	0.7	22.3	74.6	0.2	25.2
头孢他啶	85.4	1.7	12.8	77.9	1.4	20.6	58.5	4.4	37.0	51.0	1.9	47.1
氨苄西林	89.9	9.3	0.7	86.1	13.0	0.9	82.5	16.6	0.9	81.0	18.2	0.8
氨基糖苷	98.5	1.0	0.5	99.3	0.0	0.7	98.8	0.5	0.7	98.1	0.6	1.2
头孢曲松	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	99.8	0.0	0.2	99.8	0.0	0.2
阿莫西林/克拉维酸				88.8	1.0	10.2	85.7	1.7	12.5	83.4	3.0	13.6
替加环素							16.8	7.3	75.9	6.9	31.9	61.1

R,耐药;I,中介;S,敏感。

啶、头孢吡肟、环丙沙星、氨基糖苷和亚胺培南等常用抗生素的耐药率均较高,达到95.0%以上,对左氧氟沙星的耐药率为64.7%,IRAB表现为多重耐药,见表3。

2.2 耐药基因检测结果

耐药组中耐药基因TEM(A类)、AMPC(C类)、OXA51(D类)阳性率分别为95.45%、98.48%和96.97%,对照组分别为35.71%、64.29%和71.43%,耐药组均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。D类 β -内酰胺酶基因OXA23、OXA58仅在耐药组中检出,阳性率分别为95.45%和1.52%。在对照组与耐药组中均未检出其他A-D类 β -内酰胺酶耐药基因SHV、GES、KPC、PER、IMP、VIM、SPM、GIM、AIM、NDM、AMPC、DHA、OXA24、OXA40和外膜孔通道蛋白基因CARO、主动外排泵基因ADEB。

2.3 Ab分子分型和同源性分析

PFGE将66株IRAB和14株对亚胺培南敏感

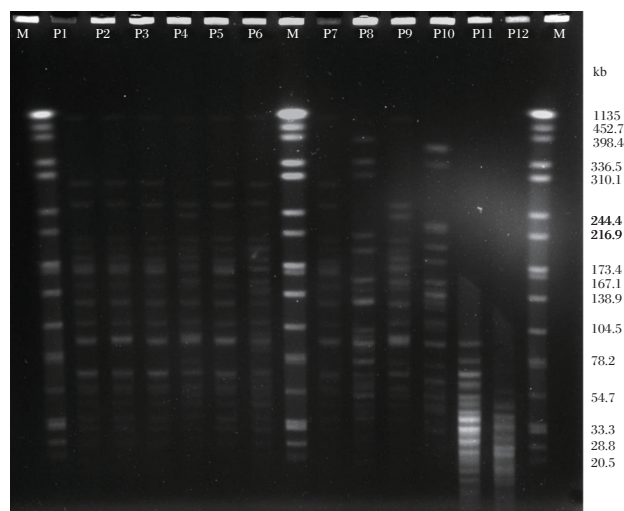
表3 2011至2014年间1 360株IRAB对常用抗生素的药敏结果(%)

Table 3 Drug susceptibility results of 1 360 strains of IRAB from 2011 to 2014 (%)

抗生素名称	R	I	S
替加环素	18.0	21.8	60.2
复方新诺明	81.9	0.0	18.1
左氧氟沙星	64.7	28.4	6.9
庆大霉素	94.2	2.6	3.2
氨苄西林/舒巴坦	96.0	2.4	1.6
环丙沙星	98.8	0.0	1.2
头孢他啶	98.7	0.3	1.1
头孢吡肟	97.1	2.1	0.8
哌拉西林/他唑巴坦	96.0	3.2	0.8
阿莫西林/克拉维酸	99.2	0.7	0.2
氨基糖苷	100.0	0.0	0.0
亚胺培南	100.0	0.0	0.0

R,耐药;I,中介;S,敏感。

的 Ab 分为 A~W 共 23 个型别,其中 P 型 26 株, Q 型 6 株, R 型 19 株,其余型别每个型少于 3 株。P 型有 P1-P7 7 个亚型, Q 型有 Q1-Q3 3 个亚型, R 型有 R1-R4 4 个亚型。耐药组主要为 P1 型(16 株)、R1 型(4 株)和 R2(12 株)型,对照组分布分散,其中 R4 型同时有耐药菌和敏感菌。PFGE 结果见图 1,聚类分析图见图 2。



M 为标准菌株沙门菌 H9812, P1~P12 为检测样本。

图 1 部分 Ab 脉冲场凝胶电泳图

Figure 1 Results of pulsed-field gel electrophoresis of *Acinetobacter baumannii*

2011 至 2014 年间 IRAB 引起院感暴发 5 次, 2012 年 2 次, 分别为 P1 型(9 月-11 月)(内科重症监护室, medical intensive care unit, MICU)、(外科重症监护室, surgery intensive care unit, SICU), R2 型(9 月-11 月)(MICU); 2013 年 2 次, 分别为 P1 型(4 月-6 月)(MICU、SICU、神经科), R1 型(2013 年 12 月-2014 年 2 月)(MICU、神经科); 2014 年 1 次, 为 R2 型(2 月-4 月)(MICU、SICU、神经科)。

3 讨论

Ab 是医院感染的重要病原菌,近年来出现严重的耐药性^[7]。以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗生素曾被誉为“最后一道防线”^[8],然而,IRAB 的分离率逐年上升^[9-10],患者感染死亡率增加^[11]。对本院 2011 至 2014 年间临床分离的 IRAB 进行了药敏、耐药机制和分子流行病学研究,以期临床合理用药和控制院感暴发提供依据。

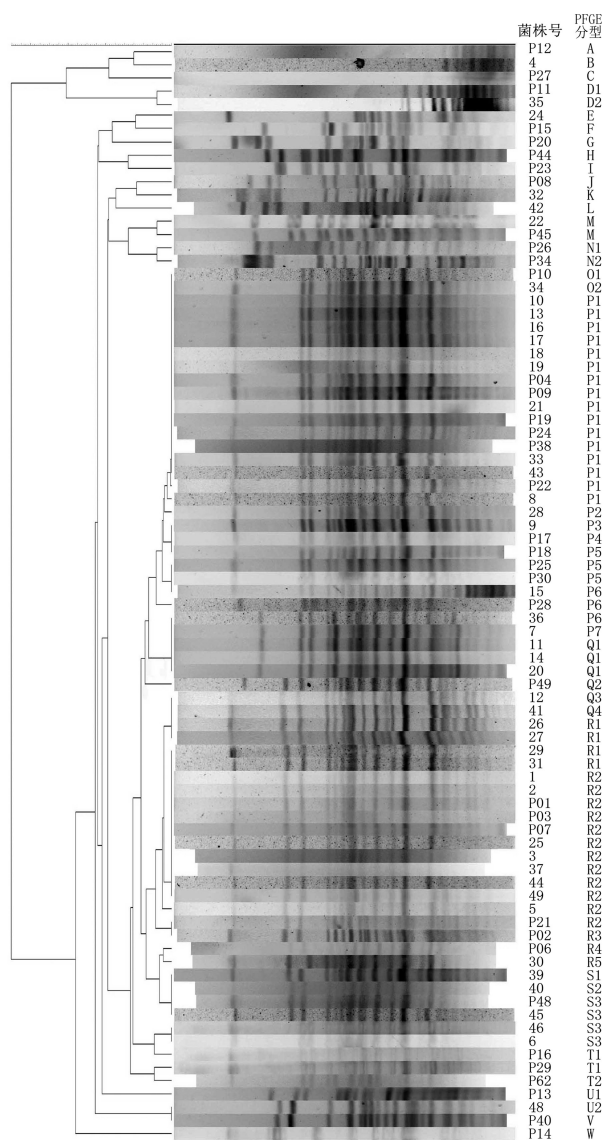


图 2 脉冲场凝胶电泳聚类分析图

Figure 2 Results of cluster analysis by BioNumeric (Version 6.0) of PFGE

2011 至 2014 年间,亚胺培南耐药率呈逐年下降趋势,与医院加强抗生素的管理密切相关。本课题组前期发现,2007 至 2010 年间 Ab 对亚胺培南的耐药率逐年上升(13.1%~59.5%)^[12]。此次 Ab 在 2011 至 2014 年间却出现了逐年下降的趋势(84%~71.8%),这与周秀岚等^[13]报道的 2009 至 2013 年逐年上升(25.30%~90.07%)相异。这是由于本院自 2011 年起,加强了细菌的耐药性监测和院感防控,及时控制住了 Ab 耐药性上升的势头。

Ab 一旦对亚胺培南耐药,对其他抗生素也几乎全部耐药,因此避免抗生素的滥用是关键。本

研究中,1 360株IRAB对其他抗生素几乎全部耐药,耐药率高达94.2%~100%,与辜裕光^[14]报道的IRAB对头孢唑林、呋喃妥因、氨曲南等耐药率均在95%以上相符。可能是由于亚胺培南是高耐药潜能药物,Ab在多种机制作用下才能对亚胺培南产生耐药作用^[15],而Ab对大多数抗生素只是通过其中一种或几种机制即可产生耐药,因此当Ab对亚胺培南耐药时,其耐药机制也往往同时对大多数抗生素产生了作用,导致广泛耐药。

替加环素对本院IRAB显现了良好的抗菌作用,2014年的耐药率仅为6.9%。Trebosc等^[16]认为,替加环素有拮抗细菌的外排泵和核糖体保护两种耐药机制,是新一类甘氨酸四环素类抗生素,具有超广谱的抗菌活性。Hornsey等^[17]发现,若AdeABC外排泵蛋白过表达,则会介导替加环素耐药。本院IRAB对替加环素敏感,可能是由于IRAB外排泵耐药基因adeB未检出,不存在外排泵蛋白过表达情况;同时替加环素本身对细菌外排泵也有拮抗作用,所以替加环素对本院IRAB的抗菌效果良好。因此,防止IRAB耐药的最有效措施是控制抗生素尤其是替加环素的滥用,避免出现更严重的超级耐药菌。

本院IRAB的耐药机制是碳青霉烯酶类多重亚型共同作用的结果,尤以OXA-23基因介导的耐药机制为主。IRAB的耐药机制复杂,主要有产生碳青霉烯酶、改变药物靶点、外膜孔通道蛋白缺失、主动外排泵将药物泵出体外等^[15]。本院编码碳青霉烯酶的A、C、D类基因阳性率在耐药组中显著高于敏感组。特别的是,D类OXA-23基因在敏感组中全阴性,而在耐药组中高达95.45%,比本课题组前期研究中^[12]2007至2010年间的20.7%明显增加。提示OXA-23基因编码碳青霉烯酶,已成为2011至2014年间本院Ab对亚胺培南耐药的最主要机制。这可能是由于OXA-23基因主要存在于质粒上^[18],在抗生素选择压力下,质粒在Ab中水平转移^[19],导致携带OXA-23的IRAB广泛传播。而其他耐药机制如外膜孔通道蛋白和主动外排泵类的耐药基因在本研究中未检出,提示这些机制在本院IRAB中并未发生作用或作用很小。

2011至2014年间存在5次IRAB引起的院感暴发,均分布于MICU、SICU和神经科,与Bogaty等^[20]报导的院感多暴发于ICU相符。可能与这3个科室患者自身疾病重、免疫功能低下、侵入性操

作多及广谱抗菌药物大量使用有关。因此,应加强院感防控工作:对ICU和神经科进行重点管理,对呼吸机、气管插管等定期灭菌,对病房空气等消毒处理,对医护人员卫生规范培训等,将有效地减少甚至消除IRAB的暴发流行。

综上所述,实验室应加强IRAB及其他细菌的耐药性监测,指导医生调整抗菌治疗方案,协助医院把握院感防控重点;临床医生应避免滥用抗生素,医护人员应及时对医院环境消毒灭菌,防止耐药菌株蔓延;院方应建立院感防控的奖惩机制。在多方合力下,将对抗生素的合理使用、降低细菌耐药性和院感暴发率产生重要意义。

参考文献

- [1] Nowak P, Paluchowska P. Acinetobacter baumannii: biology and drug resistance - role of carbapenemases [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2016, 54(2):61-74.
- [2] 张丽,杨文航,肖盟,等. 2010年度卫生部全国细菌耐药监测网报告:ICU来源细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(1):34-38.
- [3] Daitch V, Akayzen Y, Abu-Ghanem Y, et al. Secular trends in the appropriateness of empirical antibiotic treatment in patients with bacteremia: a comparison between three prospective cohorts [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(3):455-462.
- [4] Boyle DP, Zembower TR. Epidemiology and management of emerging drug-resistant gram-negative bacteria: extended-spectrum beta-lactamases and beyond [J]. Urol Clin North Am, 2015, 42(4):493-505.
- [5] Kuntaman K, Shigemura K, Osawa K, et al. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan [J]. Int J Urol, 2018, 25(11):966-972.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. M100-S27, CLSI, 2017.
- [7] Antunes LC, Visca P, Towner KJ. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen [J]. Pathog Dis, 2014, 71(3):292-301.
- [8] 聂署萍,陆学东. 碳青霉烯类抗生素耐药及治疗挑战[J]. 传染病信息, 2014, 27(3):134-138.
- [9] Niu T, Xiao T, Guo L, et al. Retrospective comparative analysis of risk factors and outcomes in patients with carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii bloodstream infections: cefoperazone-sulbactam asso-

- ciated with resistance and tigecycline increased the mortality [J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11: 2021-2030.
- [10] Choi SH, Cho EB, Chung JW, et al. Changes in the early mortality of adult patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia during 11 years at an academic medical center [J]. *J Infect Chemother*, 2019, 25(1):6-11.
- [11] 王带媚, 赵二义, 钟敬波, 等. 神经内科重症监护病房医院获得性肺炎多重耐药菌感染的病原学分布及耐药性分析[J]. *中南药学*, 2018, 16(12): 1785-1788.
- [12] 陈利达, 黄彬, 周晓玲, 等. 2007-2010 四年间鲍曼不动杆菌耐药性变迁及对亚胺培南耐药的机制研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(12): 1110-1114.
- [13] 周秀岚, 赵建平. 痰标本中耐亚胺培南鲍曼不动杆菌检出变化趋势及耐药性[J]. *中国感染控制杂志*, 2015, 14(11): 740-742.
- [14] 辜裕光. 医院鲍曼不动杆菌分布及耐药性监测分析[J]. *中国现代药物应用*, 2018, 12(24): 202-204.
- [15] Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities [J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11: 1249-1260.
- [16] Trebosc V, Gartenmann S, Royet K, et al. A novel genome-editing platform for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* reveals an adeR-unrelated tigecycline resistance mechanism [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(12): 7263-7271.
- [17] Hornsey M, Wareham DW. Effects of in vivo emergent tigecycline resistance on the pathogenic potential of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4234.
- [18] Paul D, Ingiti B, Bhattacharjee D, et al. An unusual occurrence of plasmid-mediated blaOXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Escherichia coli* from India [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(5): 642-645.
- [19] Wibberg D, Salto IP, Eikmeyer FG, et al. Complete genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* strain K50 discloses the large conjugative plasmid pK50a encoding carbapenemase OXA-23 and extended-spectrum beta-lactamase GES-11 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(5).
- [20] Bogaty C, Mataseje L, Gray A, et al. Investigation of a carbapenemase-producing *acinetobacter baumannii* outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018, 7: 140.

(上接第 181 页)

- [9] 郭艳辉, 赵崇法. 利多卡因对丙泊酚诱导患者意识消失半数有效量的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(2): 189-190.
- [10] 刘亚庆, 赵博, 罗亚东, 等. 转录因子 Foxp3 对人肺癌细胞 A549 增殖周期的影响及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(4): 490-494.
- [11] Chen X, Zhou X, Lu D, et al. Aberrantly expressed long noncoding RNAs are involved in sevoflurane-induced developing hippocampal neuronal apoptosis: a microarray related study [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(5): 1031-1040.
- [12] 刘苗, 唐荣, 夏利平, 等. 泮托拉唑通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路逆转 K562/A02 化疗多药耐药的作用[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018(6): 890-894.
- [13] McGinley LM, Sims E, Lunn JS, et al. Human cortical neural stem cells expressing insulin-like growth factor-I: a novel cellular therapy for Alzheimer's disease [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(3): 379-391.
- [14] 张军, 谷翔, 黄问银, 等. ROS 调节 mTOR 信号通路参与自噬的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(12): 1266-1270.
- [15] Christiansen GB, Andersen KH, Riis S, et al. The sorting receptor SorCS3 is a stronger regulator of glutamate receptor functions compared to GABAergic mechanisms in the hippocampus [J]. *Hippocampus*, 2017, 27(3): 235-248.
- [16] 张娟娟, 李李. 利多卡因干预对老年患者围术期术后认知功能障碍及镇痛效果的影响[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(19): 3026-3029.
- [17] Yu Y, Wu X, Pu J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1187-1194.

• 论 著 •

胃幽门螺杆菌感染后 *Semaphorin 5A* 致胃癌可能机制的研究

刘涛¹ 李睿² 龚琳² 李庚² 潘国庆^{2*}

[摘要] **目的** 研究在幽门螺杆菌(Hp)感染下 *Semaphorin 5A*(*sema5a*)致胃癌发生发展的可能机制。**方法** 使用免疫组织化学 Envision 法和 Giemsa 染色来检测胃癌组织中 *sema5a* 的表达及 Hp 感染情况。免疫印迹(WB)检测胃癌细胞中 *sema5a* 及基质金属蛋白酶9(MMP9)的表达水平。**结果** 感染 Hp 的胃癌细胞及胃癌组织中 *sema5a* 的表达显著高于未感染组,且 Hp 感染后 MMP9 表达上调,胃癌细胞侵袭力增加。**结论** 胃 Hp 感染与 *sema5a* 的表达相关,且能上调胃癌细胞中 *sema5a* 与 MMP9 的表达水平。

[关键词] *Semaphorin 5A*; 胃癌; Hp

Study on the mechanism of gastric cancer induced by *Semaphorin 5A* after *Helicobacter pylori* infection

LIU Tao¹, LI Rui², GONG Lin², LI Geng², PAN Guoqing^{2*}

(1. Department of Pathology, Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China, 650032; 2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China, 650032)

[ABSTRACT] **Objective** To study the possible mechanism of gastric cancer caused by *Helicobacter pylori* (Hp) and *Semaphorin 5A* (*sema5a*). **Methods** Immunohistochemical (Envision) and Giemsa staining were used to detect the expression of *sema5a* and Hp infection in cancer tissues, respectively. The expression levels of *sema5a* and MMP9 in gastric cancer cells were detected by Western blot. Invasion assay were performed to determine the invasive ability of gastric cancer cells. **Results** The expression of *sema5a* in gastric cancer cells and gastric cancer tissues infected with Hp was significantly higher than that in the uninfected group. Moreover, the expression of MMP9 is up-regulated after Hp infection, and the invasiveness of gastric cancer cells is increased. **Conclusion** Hp infection is associated with the expression of *sema5a* and enhances the invasive ability of gastric cancer cells by up-regulating the expression levels of *sema5a* and MMP9 in gastric cancer cells.

[KEY WORDS] *Semaphorin 5A*; Gastric cancer; *Helicobacter pylori*

胃癌是当今世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,全球每年约有70万人因胃癌死亡,5年生存率不良,其在全球恶性肿瘤中发病率位于男性第四位和女性第五位,死亡率居于男性第三位和女性

第五位,严重地危害着人类的健康^[1]。有研究发现神经导向分子5A(*semaphorin 5A*, *sema5a*)于胃癌中高表达且参与胃癌的形成和转移^[2-3],其在肠型胃癌中表达强阳性率为73.4%,而肠型胃癌与幽门

刘涛和李睿为并列第一作者

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81660413)

作者单位:1. 云南省中医医院病理科,云南,昆明 650032;

2. 昆明医科大学第一附属医院病理科,云南,昆明 650032

*通信作者:潘国庆, E-mail: guoqing_pan@163.com

螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)感染密切相关,提示 *sema5a* 基因的表达可能与 Hp 感染相关^[4-5]。Hp 感染被认为是胃癌发病最重要的高危因素^[1, 6],但其通过何种途径刺激相关基因表达而导致胃癌发生的机制至今不明确。本文通过检测 *sema5a* 在人胃癌组织及 Hp 感染后胃癌细胞株中的表达情况,以探讨 *sema5a* 与 Hp 感染间的关系及 Hp 感染后 *sema5a* 致胃癌的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂

SGC7901 胃癌细胞株购自上海柯雷生物科技有限公司,幽门螺杆菌 26695 菌株购自美国 ATCC 公司,RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,AnaeroPack 微需氧产气袋及培养罐购自日本三菱气体公司,抗 GADPH 抗体购自美国 Sigma Aldrich 公司,抗 MMP9 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,抗 *sema5a* 抗体购自美国 R&D system 公司,PVDF 膜、ECL 超敏发光液购自德国 Merck 公司,24 孔 transwell 购自美国 costar 公司,基质胶购自美国 BD 公司。电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,转膜仪购自北京六一生物科技有限公司,数码凝胶显像设备购自上海天能科技有限公司。

1.2 人胃癌组织样品

收集本院 2016 年 1 月至 2017 年 12 月术后病理诊断为胃腺癌的胃癌标本 50 例。所有患者术前未接受化疗或放疗。胃癌及癌旁组织均来源于术后 10% 甲醛固定 24 h 以内标本,取材后常规固定脱水,石蜡包埋保存待作免疫组织化学检测。

1.3 细胞及细菌共培养

人胃中高分化腺癌细胞株 SGC7901 使用添加 10% 无菌胎牛血清、1% 链霉素双抗的 RPMI1640 培养基置于培养瓶中于 37℃,5% 二氧化碳浓度培养箱内培养,培养 2~3 天后传代。Hp26695 菌株种植于含 5% 无菌脱纤维羊血的经过高压灭菌哥伦比亚琼脂培养基,于微需氧培养罐使用微需氧产气袋置于 37℃ 培养箱培养。培养基经高压灭菌后自然冷却至 50 度时添加脱纤维羊血及多粘菌素 B (250 U/L),万古霉素 (6 mg/L),两性霉素 (2 mg/L),TMP (5 mg/L),混匀后浇板。将长成菌落的 Hp 悬浮于含 3% 胎牛血清的 1640 培养基中,测定 OD₆₀₀,

1 OD₆₀₀=1×10⁸ 菌落形成单位(CFU)。按胃癌细胞于 Hp 菌落之比为 1:50 共培养 0 h、12 h、24 h,另按 1:0、1:50、1:100 共培养 12 h,PBS 清洗 5 次,收集细胞提取蛋白。

1.4 免疫组织化学法检测人胃癌组织中 *sema5a* 的表达情况

将组织块切成 3 μm 的切片,常规脱蜡至水。以 EDTA 为抗原修复剂高压抗原修复。用 3% 浓度的双氧水封闭 10 min,在磷酸盐中洗 3 次,每次 3 min。添加一抗前 PBS 清洗 3 遍,每遍 3 min。去除多余的 PBS,在室温下用抗 *sema5a* 单抗(R&D system)孵育 2 h。在 PBS 中洗 3 次每次 3 min 后,用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。继续在 PBS 中冲洗 3 次每次 3 min,加入 DAB 染液至显色后清水冲洗。常规脱水、透明。苏木精复染后中性树胶封片。Image J 测量平均光密度值。

1.5 免疫印迹检测 SGC7901 细胞株中 *sema5a* 及基质金属蛋白酶 9 表达情况

使用 RIPA 裂解液将待测蛋白调整至相同浓度待用。将等量蛋白加入到 10% 浓度 SDS-PAGE 胶上样孔中。电泳 2 h 后半干转移法恒流转移 1 h 后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。用含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 1.5 h 后按照分子量剪下膜与抗 *sema5a*,基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)及 GADPH 抗体进行孵育,4℃ 过夜。一抗孵育结束后 TBST 洗 3 次,每次 10 min。接着在室温下与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,孵育结束后 TBST 洗 3 次每次 10 min。去掉多余的 TBST 后在膜上滴加 ECL 发光液发光,于数码凝胶分析系统采集曝光数据,Image J 图形处理软件分析目标条带。

1.6 细胞侵袭实验

将共培养的 SGC7901 细胞用 PBS 洗 5 遍后待用。按 1:8 比例用无血清 Ham's RPMI1640 培养基稀释基质胶,混匀后吸取 100 μL 添加到 Transwell 小室中,37℃ 温箱成胶 1 h 后取出,于下室添加 500 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,上室加入无血清 RPMI1640 培养基重悬的 SGC7901 细胞,放入 37℃ 培养箱内。36 h 后取出。无菌棉签拭去小室上层的细胞,2% 多聚甲醛固定小室下层 5 min。PBS 清洗后苏木素染色 5 min,再次 PBS 清洗。高倍镜下随机选取 5 个视野拍照,Image J 软件计数后取平均值。

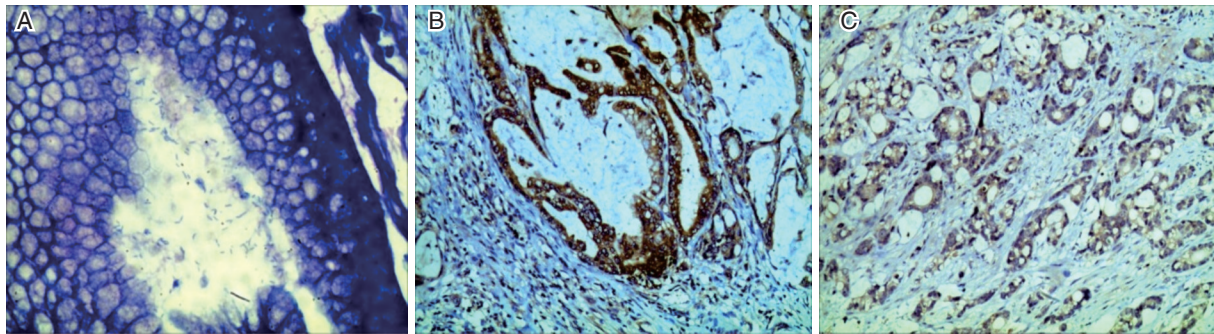
1.7 统计学分析

所有结果均以均值±标准差表示。用 SPSS 21.0 软件进行数据处理,使用两独立样本 *t* 检验评价 Hp 阴性及阳性标本间差异。免疫印迹(Western blotting, WB)及侵袭实验结果使用单因素 ANOVA 方差分析, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 Hp 的感染与 sema5a 表达有关

50 例胃癌组织蜡块的免疫组化及 Giemsa 染色结果显示, Hp 感染阳性率为 54.9%(28/50)。图 1B、C 所示,胃癌组织中 sema5a 于 Hp 感染阳性患者的癌细胞细胞质及细胞膜上呈阳性表达;而 Hp 感染阴性患者的胃癌组织中 sema5a 表达要明显低于感染阳性样本。如表 1 所示, Hp 感染阳性胃癌组织中 sema5a 的平均光密度为 (0.80 ± 0.11) ,明显高于 Hp 阴性胃癌组织中的 (0.43 ± 0.07) ,差异有统计学意义($P<0.001$)。



A: 800 倍光镜下 Giemsa 染色情况,可见 Hp 呈蓝紫色棒状微曲杆菌成群聚集。B、C:光镜 300 倍, DAB 染色下,免疫组化两步法检测胃癌组织中 sema5a 表达情况,可见 sema5a 阳性区域呈棕色分布于胃癌细胞胞浆及胞膜。Hp 阳性组织 sema5a 表达明显高于阴性,呈深棕褐色分布,而 Hp 阴性组织呈浅棕黄色。

图 1 Hp 阳性及阴性胃癌组织中 sema5a 表达及癌旁组织中 Hp 感染情况

Figure 1 The expression of *sema5a* in cancer tissues and HP infection status in paracancerous tissues

表 1 Hp 感染情况及 sema5a 表达平均光密度

Table 1 Hp infection and AO of *sema5a*

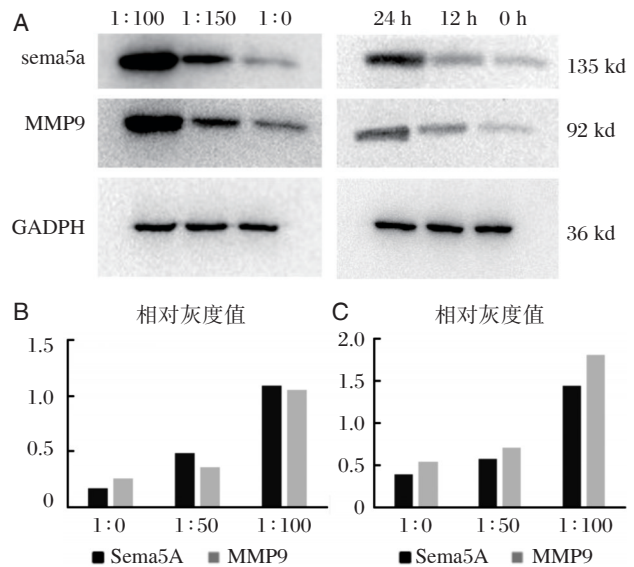
Hp 感染	Hp 感染阳性 样本数	光密度 ($\bar{x}\pm s$)	百分比
Hp+	28	0.80 ± 0.11	54.9%
Hp -	23	0.43 ± 0.07	45.1%

2.2 Hp 感染对胃癌细胞株 SGC7901 中 sema5a 及 MMP9 蛋白表达的影响

结果如图 2 所示,随着 Hp 感染时间的增加, sema5a 及 MMP9 的表达具有不同的上升幅度($P<0.001$)。与此同时,当 Hp 共培养浓度增加时, sema5a 及 MMP9 的表达同样也得到了促进。

2.3 Hp 感染对 SGC7901 侵袭能力的影响

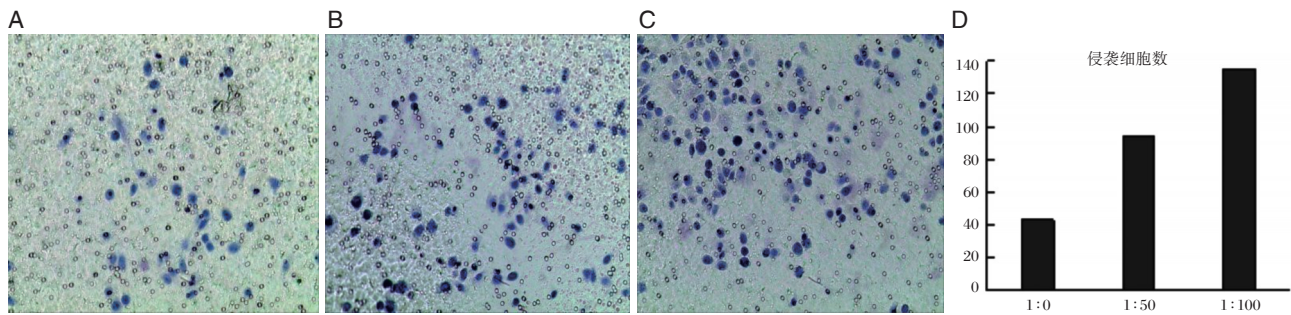
SGC7901 与 Hp 以不同比例共培养 12 h 后结果如图 3 所示。随着 Hp 浓度的增加,侵袭过小室的 SGC7901 细胞数量也得到了逐步提高;以 1:50 和 1:100 比例共培养的 SGC7901 侵袭性细胞数分别是 1:0 共培养 SGC7901 细胞的 2.18 倍和 3.13 倍,差异有统计学意义($P<0.001$)。



A:不同 Hp 培养浓度及时间情况下 sema5a 及 MMP9 的表达情况;
B:不同 Hp 浓度下 sema5a 和 MMP9 与 GADPH 的相对灰度值;
C:不同培养时间下 sema5a 和 MMP9 与 GADPH 的相对灰度值。

图 2 sema5a、MMP9 在胃癌细胞株 SGC7901 中的表达

Figure 2 Expression of *sema5a* and MMP9 in gastric cancer cell line SGC7901



A:SGC7901 以 1:0 与 Hp 共培养 12 h 的侵袭细胞; B:SGC7901 以 1:50 与 Hp 共培养 12 h 的侵袭细胞; C:SGC7901 以 1:100 与 Hp 共培养 12 h 的侵袭细胞; D:当 Hp 共培养浓度上升时 SGC7901 侵袭细胞数也随之上升,以 1:50 和 1:100 比例共培养的 SGC7901 侵袭性细胞数分别是 1:0 共培养 SGC7901 细胞的 2.18 倍和 3.13 倍。

图3 与Hp共培养后SGC7901侵袭能力(苏木素染色,500×)

Figure 3 Invasive ability of SGC7901 after incubate with Hp (hematoxylin staining, 500×)

3 讨论

根据全球癌症最新数据显示,胃癌仍是目前严重威胁人类健康的疾病之一,5年生存率低于30%^[7],但其发病机制尚不完全明确。已有研究表明Hp感染与胃癌发生、发展密切相关^[8],其感染阳性的胃癌组织中存在某些相关蛋白的表达上调,被认为与Hp共同促进胃癌的发生、发展,影响预后相关^[9-10]。本研究通过检测50例确诊为胃癌的阳性标本中sema5a的表达情况、sema5a和MMP9蛋白在Hp感染后的胃癌细胞株中表达情况及Hp感染对胃癌细胞株SGC7901侵袭能力的影响,旨在阐明sema5a与Hp感染间的关系及Hp感染后sema5a致胃癌的可能机制,为探索胃癌的发病机制提供新线索。

胃癌的发生、发展与多因素相关^[11]。sema5a属于Semaphorins家族,一种广泛表达的分泌和膜相关蛋白,最初的研究认为该蛋白参与中枢神经系统发生,被定义为轴突导向因子,参与神经系统的生长发育^[12]。近年来有研究表明Semaphorins分子参与细胞迁移和肿瘤生长,且在多种肿瘤组织中表达,参与肿瘤的发生与形成并调控其进程^[13]。本研究中sema5a在胃癌组织表达结果显示其在Hp感染阳性的胃癌组织中呈阳性表达明显高于Hp阴性的胃癌组织中,结果与同类研究结果一致^[14],表明sema5a蛋白的高表达可能与胃癌的发生、发展相关。同时,本研究对Hp感染的胃癌细胞株SGC7901中检测结果显示sema5a和MMP9蛋白随着Hp感染时间的增加,其表达均有

不同程度的上升与Pan等^[15]的研究结果一致,推测sema5a在胃癌组织中的高表达与胃癌的侵袭、转移呈正相关。此外,有研究表明sema5a可通过plexin-B3受体及PI3K/AKT通路激活MMP9的表达从而增强肿瘤细胞的转移及侵袭能力^[16]。MMP9可通过破坏基膜使肿瘤细胞能够更轻易的穿过组织而进一步达到促进肿瘤侵袭转移的作用^[17],在本研究结果中MMP9蛋白随着Hp感染时间的增加表达上调,或许与该蛋白的肿瘤侵袭转移作用相关。然而MMP9表达的上调是因Hp感染引起还是由上调的sema5a引起,进而激活相关信号通路,增强胃癌细胞的侵袭及迁移能力,目前尚未明确,需要进一步完善实验来证明。癌细胞的侵袭和转移是胃癌死亡率居高不下、难以根治的重要原因,因此,本研究还对Hp感染后的胃癌细胞SGC7901侵袭能力进行了观察,结果显示胃癌细胞侵袭能力随着Hp浓度的增加而增强,该结果与吕汪霞等^[18]的研究结论一致。而李一鑫等^[19]对118例胃癌样本研究结果显示局部癌组织中Hp的感染量和患者的中位生存时间以及预后呈负相关,这项研究结果恰恰支持了本研究关于Hp感染导致胃癌细胞侵袭度增加的结论。

胃癌的发生是多基因、多因素引起的复杂的病理过程,其发生伴随着许多相关基因和蛋白水平的改变,其中部分基因能够促进胃癌的形成和发展或者促进肿瘤细胞的增殖、生长和转移^[20],但至今对胃癌转移的具体作用机制尚未彻底阐明。因此,本研究通过对Hp感染与sema5a之间的关

系进行研究从而探索二者在胃癌发生发展过程中的可能联系和机制。目前,已陆续有研究证实 *sema5a* 与胃癌的相关性^[14-15],相信随着研究的不断深入,*sema5a* 可能成为 Hp 相关性胃癌的早期诊断标记物,为 Hp 相关性胃癌的治疗和诊断提供理论依据。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [2] Pan G, Zhang X, Ren J, et al. Semaphorin 5A, an axon guidance molecule, enhances the invasion and metastasis of human gastric cancer through activation of MMP9[J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19(1):11-18.
- [3] Pan G, Zhu Z, Huang J, et al. Semaphorin 5A promotes gastric cancer invasion/metastasis via urokinase-type plasminogen activator/phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(8):2197-2204.
- [4] 刘霞, 杨明, 张艳桥. 肠型胃癌的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(10):855-859.
- [5] 潘国庆. 神经轴导向分子 Semaphorin 5A 在人胃癌中表达、作用及其分子机制的研究[D]. 中南大学, 2010.
- [6] Wang F, Meng W, Wang B, et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2014, 345(2):196-202.
- [7] Mahawongkajit P, Tomtitchong P. A survey of early and advanced gastric cancer treatment by surgeons in Thailand[J]. Oncol Rev, 2018, 12(2):369.
- [8] Park JY, Forman D, Waskito LA, et al. Epidemiology of Helicobacter pylori and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(4).
- [9] 徐文敏, 张海燕, 何苗, 等. 幽门螺旋杆菌感染性胃癌组织中 Cyclin D1、MMP-9 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(2):213-215.
- [10] 陈佳栋, 罗天航, 孙颢, 等. CXCR4 及 VEGF-C 在胃癌组织中的表达及其意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2019, 34(2):146-150.
- [11] 李斌, 李玉民, 郭继武, 等. 幽门螺杆菌与胃癌相关机制的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(7):1083-1089.
- [12] Yazdani U, Terman JR. The semaphorins [J]. Genome Biol, 2006, 7(3):211.
- [13] Roth L, Koncina E, Satkauskas S, et al. The many faces of semaphorins: from development to pathology [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(4):649-666.
- [14] 许旭, 杨淑霞, 詹艳梅, 等. semaphorin5A 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(S1):66-67.
- [15] 许荣芬, 潘国庆, 张翔凌. Semaphorin 5A 基因在胃癌侵袭和转移中的作用[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(6):555-558.
- [16] Xiao JB, Li XL, Liu L, et al. The association of semaphorin 5A with lymph node metastasis and adverse prognosis in cervical cancer [J]. Cancer Cell Int, 2018, 18:87.
- [17] Okada R, Naito M, Hattori Y, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene polymorphisms are associated with a multiple family history of gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 2017, 20(2):246-253.
- [18] 吕汪霞, 方阳. 幽门螺杆菌感染对胃癌细胞株恶性转化的影响及机制研究[J]. 中华全科医学, 2018, 16(3):383-387.
- [19] 李一鑫, 李秀明, 张楠, 等. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生发展及预后的相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(2):91-94.
- [20] Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2009, 374 (9688):477-490.

结肠癌患者组织中 AKT2、Annexin A1 表达水平及其临床意义

孙清森* 孙连生 徐建利 谷斌 李超

[摘要] **目的** 探究结肠癌患者组织中丝/苏氨酸蛋白激酶 2(AKT2)、膜联蛋白 A1(Annexin A1) 表达水平并分析其临床意义。**方法** 选取本院 64 例行择期根治术治疗的结肠癌患者为研究对象,采用免疫组化法检测癌组织及癌旁组织中 AKT2、Annexin A1 蛋白表达情况,并分析其与临床病理特征的关系。**结果** 结肠癌患者癌组织 AKT2、Annexin A1 阳性率均高于癌旁组织($P<0.05$)。AKT2 及 Annexin A1 在不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、病理类型的结肠癌患者癌组织中表达情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$);但 AKT2 及 Annexin A1 均在伴淋巴结转移、浸润深度高、Dukes 分期高的结肠癌患者癌组织中表达阳性率高($P<0.05$)。**结论** AKT2 及 Annexin A1 在结肠癌的发生、发展和淋巴结转移中可能发挥重要作用,对评估结肠癌患者预后具有指导意义。

[关键词] 结肠癌; AKT2; Annexin A1; 免疫组化

Expression levels and clinical significance of AKT2 and Annexin A1 in tissues of patients with colon cancer

SUN Qingsen*, SUN Liansheng, XU Jianli, GU Bin, LI Chao

(Department of Gastrointestinal Hernia Surgery, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 352000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression levels of serine/threonine kinase protein 2 (AKT2) and Annexin A1 in tissues of patients with colon cancer and analyze their clinical significance. **Methods** 64 patients with colon cancer who underwent elective radical resection were selected for the study. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression levels of AKT2 and Annexin A1 in cancer tissues and adjacent tissues, and the relationship between expression levels and clinicopathological features was analyzed. **Results** The positive rates of AKT2 and Annexin A1 in cancer tissues of patients with colon cancer were higher than those in adjacent tissues ($P<0.05$). There were no significant differences in the expression levels of AKT2 and Annexin A1 in cancer tissues of colon cancer patients with different genders, ages, tumor diameters, tumor sites, differentiation and pathological types ($P>0.05$). However, the positive expression rates of AKT2 and Annexin A1 were higher in cancer tissues of colon cancer patients with lymph node metastasis, high infiltration depth and high Dukes stage ($P<0.05$). **Conclusions** AKT2 and Annexin A1 play important roles in the occurrence, development and lymph node metastasis of colon cancer and have a guiding significance for evaluating the prognosis of colon cancer patients.

[KEY WORDS] Colon cancer; AKT2; Annexin A1; Immunohistochemistry

基金项目:2015 年沧州市科技计划项目(151302115)

作者单位:河北省沧州市人民医院胃肠病外科,河北,沧州 352000

*通信作者:孙清森, E-mail: t14lbpx@sina.com

结肠癌为全球最常见恶性肿瘤之一,受人口老龄化、环境污染等因素影响,结肠癌发病率也呈逐年升高趋势^[1]。结肠癌的发生可涉及多基因、多步骤,包括癌基因的活化及抑癌基因的失活,寻找结肠癌发生过程中分子遗传学改变,以建立简便可行的评估指标,成为近年学术界研究的热点^[2]。丝/苏氨酸蛋白激酶2(serine/threonine kinase protein 2, AKT2)与蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)具有高度同源性,亦称为蛋白激酶B(protein kinase B, PKB),是病毒癌基因的表达产物在细胞内的同源类似物,能促进蛋白质合成和促进糖原转运,在结肠癌、胃癌等癌组织中均能过度表达或激活^[3]。膜联蛋白A1(annexin A1)是一类钙依赖的磷脂结合蛋白,可参与细胞多种重要生理功能过程,包括细胞信号传导、炎症反应、脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)修复及细胞凋亡等过程,在肝癌、结肠癌等癌组织中呈高表达^[4]。基于此,本研究选取64例行择期根治术治疗的结肠癌患者为研究对象,以分析结肠癌患者癌组织AKT2、Annexin A1表达情况与临床病理特征的关系,评估AKT2、Annexin A1的临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年3月至2018年5月本院64例行择期根治术治疗的结肠癌患者为研究对象。纳入标准:①经病理学检查确诊为结肠癌者;②年龄为40~75岁者;③沟通能力良好者;④签署知情同意书者;⑤经本院医学伦理委员会审批者。排除标准:①术前行放化疗者;②结肠手术史者;③围术期死亡者。64例结肠癌患者中男性42例,女性22例;年龄43~71岁,平均(58.87±10.22)岁。

1.2 方法

使用免疫组化法检测AKT2、Annexin A1在癌组织及癌旁组织(距肿瘤边缘≥3 cm且镜下无癌细胞)中的表达情况,具体步骤如下:将癌组织及癌旁组织石蜡标本4 μm连续切片后脱蜡水化,浓度为3%的甲醛过氧化氢孵育后,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗,微波法抗原热修复后滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育;分别滴加一抗工作液4℃孵育过夜,复温后PBS冲洗,滴加二抗工作液,37℃孵育30 min, PBS冲洗后

滴加适量底物显色液二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB);苏木素复染5 min,二甲苯透明,树脂封片,镜检。

1.3 试剂及仪器

AKT2鼠抗人单克隆抗体购自美国SANTA CRUZ公司,Annexin A1鼠抗人单克隆抗体购自美国Abcam公司,鼠抗人即用型免疫组化试剂盒购自福建迈新生物公司, PBS、DAB等试剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司;切片机、石蜡包埋机购自德国Leica公司,微波炉购自广东格兰仕集团有限公司,显微镜购自日本Olympus公司。

1.4 染色结果判定方法^[5]

由2名高年资病理医师独立评分;先根据细胞染色强度评分,细胞无变色计0分,浅黄色计1分,棕黄色计2分,黄褐色计3分;再随机选取10个视野,观察阳性细胞百分比,计算10个视野阳性细胞平均百分比,将阳性细胞百分比<10%计0分,10%~20%计1分,21%~50%计2分,>50%计3分;上述2项评分的乘积为每例标本的染色积分,积分<3分为阴性,≥3分为阳性。

1.5 统计学方法

应用SPSS 21.0软件进行统计学分析,计数资料以例或百分比 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌患者癌组织及癌旁组织AKT2、Annexin A1表达情况

结肠癌患者癌组织AKT2、Annexin A1阳性率均高于癌旁组织($\chi^2=42.792$ 、 24.500 , $P<0.05$)。见表1。

2.2 癌组织AKT2蛋白表达与结肠癌临床病理特征的关系

AKT2在不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、病理类型的结肠癌患者癌组织中表达情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$);但AKT2在伴淋巴结转移、浸润深度高、Dukes分期高的结肠癌患者癌组织中表达阳性率高($P<0.05$)。见表2。

2.3 癌组织Annexin A1蛋白表达与结肠癌临床病理特征的关系

Annexin A1在不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、病理类型的结肠癌患者癌组织

表1 结肠癌患者癌组织及癌旁组织 AKT2、Annexin A1 表达情况 [n(%)]

Table 1 Expression levels of AKT2 and Annexin A1 in cancer tissues and adjacent tissues of patients with colon cancer [n(%)]

组织类型	n	AKT2		Annexin A1	
		阳性	阴性	阳性	阴性
癌组织	64	50(78.13)	14(21.87)	46(71.88)	18(28.12)
癌旁组织	64	13(20.31)	51(79.69)	18(28.12)	46(71.88)
χ^2		42.792		24.500	
P		0.000		0.000	

表2 癌组织 AKT2 蛋白表达与结肠癌临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between AKT2 protein expression in cancer tissues and clinicopathological features of colon cancer

特征	阳性 (n=50)	阴性 (n=14)	χ^2	P
性别				
男	33	9	0.014	0.905
女	17	5		
年龄				
<60岁	28	8	0.006	0.939
≥60岁	22	6		
肿瘤直径				
<5 cm	19	8	1.643	0.200
≥5 cm	31	6		
肿瘤部位				
左半结肠	32	10	0.268	0.605
右半结肠	18	4		
分化程度				
高分化	6	2	0.141	0.932
中分化	39	11		
低分化	5	1		
病理类型				
腺癌	40	13	0.528	0.468
粘液癌	10	1		
淋巴结转移				
有	27	3	4.660	0.031
无	23	11		
Tis~T2	0	2	10.305	0.006
浸润深度				
T3	39	12		
T3	11	0		
A+B期	21	11	6.714	0.035
Dukes分期				
C期	18	3		
D期	11	0		

表3 癌组织 Annexin A1 蛋白表达与结肠癌临床病理特征的关系

Table 3 Relationship between Annexin A1 protein expression in cancer tissues and clinicopathological features of colon cancer

特征	阳性 (n=46)	阴性 (n=18)	χ^2	P
性别				
男	31	11	0.226	0.634
女	15	7		
年龄				
<60岁	25	11	0.241	0.624
≥60岁	21	7		
肿瘤直径				
<5 cm	17	10	1.835	0.176
≥5 cm	29	8		
肿瘤部位				
左半结肠	30	12	0.012	0.913
右半结肠	15	6		
分化程度				
高分化	4	4	2.395	0.302
中分化	38	12		
低分化	4	2		
病理类型				
腺癌	38	15	0.090	0.765
粘液癌	8	3		
淋巴结转移				
有	26	4	6.112	0.013
无	20	14		
Tis~T2	0	2	7.124	0.028
浸润深度				
T3	36	15		
T3	10	1		
A+B期	19	13	6.971	0.031
Dukes分期				
C期	16	5		
D期	11	0		

中表达情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$);但 Annexin A1 在伴淋巴结转移、浸润深度高、Dukes 分期高的结肠癌患者癌组织中表达阳性率高($P<0.05$);见表3。

3 讨论

近年来,分子生物学发展迅速,基因靶向治疗成为肿瘤治疗的新方向,抗血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF)等靶向药物随之出现,为改善恶性肿瘤患者生存质量创造条件^[6]。AKT2 是丝/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, AKT)的一个亚型,可介导细胞生存通路磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT,而促进细胞生长、增殖、运动、侵袭,抑制细胞凋亡,在血管新生中也具有积极调节作用^[7]。Annexin A1 在不同恶性肿瘤组织中表

达水平不同,在乳腺癌、结肠癌组织呈高表达,而在食管鳞癌、前列腺癌中表达下降,但 Annexin A1 不同表达水平可通过修饰后蛋白的磷酸化及去磷酸化 2 种形式,均引起细胞过度增生,使其具有促肿瘤形成作用^[8]。对此,本研究也就 AKT2 及 Annexin A1 在结肠癌组织中的表达情况展开分析,以评估 2 者与结肠癌临床病理特征的关系,为临床基因靶向治疗提供新思路。

AKT2、Annexin A1 在结肠癌组织中高表达,对结肠癌的发生发展中具有重要作用。另外,外国学者研究发现,AKT2 可通过多种途径促进肿瘤细胞增殖,其在肿瘤组织中的表达水平与其分化程度、肿瘤大小密切相关^[9]。而本研究中,AKT2 在不同肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、病理类型的结肠癌患者癌组织中表达情况比较,差异均无统计学意义,与上述学者研究结果不同。推测该结果由以下 2 个方面因素引起:①结肠癌肿瘤的生长与多种信号通路相关,仅观察 AKT2 一项内容未必能准确评估其分化程度及肿瘤体积^[10];②本研究纳入样本量较小,造成检验效能较低,需要扩大样本量,以验证该结果的准确性^[11]。且 AKT2 在不同性别、年龄结肠癌患者肿瘤组织中表达易无明显差异,与 Popp 等学者^[12]研究结果一致。说明结肠癌患者肿瘤组织中 AKT2 表达水平不受性别、年龄的影响。故 AKT2 表达水平在评估不同性别、年龄的结肠癌患者肿瘤进展中也有重要作用。此外,Annexin A1 在不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、病理类型的结肠癌患者癌组织中表达情况比较,差异无统计学意义。这也提示,Annexin A1 单项指标难以评估结肠癌肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、病理类型,仍需探索其他肿瘤标志性蛋白,以完善对直径、分化程度等肿瘤进展情况的评估。

除上述结论外,本研究还发现,AKT2 在伴淋巴结转移、浸润深度高、Dukes 分期高的结肠癌患者癌组织中表达阳性率高。提示 AKT2 能通过介导 PI3K/AKT 通路,促进结肠癌肿瘤细胞增殖,刺激其转移潜能,使其侵袭能力升高^[13]。此外,AKT2 也能通过调节 PI3K/AKT 通路促进血管新生,并刺激淋巴管增生扩张,促进肿瘤细胞进入淋巴管,引起淋巴结转移^[14]。Song 等学者^[15]也提出,PI3K/AKT 通路在结肠癌进展、浸润、转移及预后中具有重要作用。因此,AKT2 能利用 PI3K/AKT 通

路,与结肠癌恶性程度、淋巴结转移密切相关。不仅如此,Annexin A1 也在伴淋巴结转移、浸润深度高、Dukes 分期高的结肠癌患者癌组织中表达阳性率高,与魏礼清等学者^[16]研究结果一致。说明 Annexin A1 也与结肠癌侵袭能力及淋巴结转移情况密切相关。分析其原因可能与 Annexin A1 能介导肿瘤细胞内信号传导,而促进其侵袭能力增加^[17];且参与机体炎症反应过程,刺激淋巴管扩张,使结肠癌肿瘤细胞淋巴结转移风险升高有关^[18]。近年,Biaoxue 等学者^[19]也发现,Annexin A1 能通过参与酪氨酸激酶磷酸化过程,并抑制磷脂酶 A2 活性,促进肿瘤增殖。提示能通过多种路径参与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等过程。但 Annexin A1 作为一种新型肿瘤标志蛋白,作用途径仍在探索中,其对肿瘤细胞的调控路径仍需进一步探讨。

综上所述,AKT2 及 Annexin A1 与结肠癌淋巴结转移、浸润深度高、Dukes 分期均密切相关,在反映结肠癌发生、发展及生物学行为方面具有重要作用,检测 AKT2、Annexin A1 组织表达水平对评估结肠癌患者预后具有积极意义。

参考文献

- [1] 杨世斌,韩方海,肖隆斌,等.腹腔镜辅助右半结肠癌根治术与开放手术的临床应用比较[J].实用医学杂志,2016,32(11):1819-1822.
- [2] 邵晨,胡建鹏,严金川,等.苍术素对人结肠癌 LS174T 细胞增殖的影响[J].江苏大学学报(医学版),2016,26(6):480-483.
- [3] 常亮,王鑫,谭春雷,等. AKT1 和 AKT2 蛋白在胶质母细胞瘤中的表达及对患者预后的影响[J].临床误诊误治,2018,31(3):96-99.
- [4] Maurizio B, Andrea P, Augusto V, et al. Annexin A1 and autoimmunity: from basic science to clinical applications [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(5):1348-1354.
- [5] 顾笑梅,康晓芳,高淑凤,等.原癌基因 Wip1 在卵巢癌中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2017,38(24):3478-3480.
- [6] 成龙,李沁芸,张燕,等.抗 VEGF 与抗 EGFR 靶向药物联合化疗一线治疗转移结直肠癌 Meta 分析[J].中华肿瘤防治杂志,2017,24(14):1008-1016.
- [7] 张宝伟,王好,沈冬丽,等.丝氨酸蛋白酶抑制物 vaspin 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡的影响[J].江苏大学学报(医学版),2017,27(5):408-411.

(下转第 208 页)

· 论 著 ·

长链非编码 RNA *LINC00393* 在子宫内膜癌临床预后判断中的意义

麦碧 陈永秀 胡桂英 罗喜平* 刘婷艳

【摘要】目的 检测长链非编码 RNA *LINC00393* 在子宫内膜癌组织中的表达情况,并探讨其在子宫内膜癌临床预后判断中的意义。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 检测 150 例子宫内膜癌肿瘤组织及其对应的肿瘤旁正常组织中 *LINC00393* 的表达情况,按照表达水平高低,将患者分为高表达组(肿瘤组织中表达水平高于肿瘤旁正常组织)和低表达组(肿瘤组织中表达水平低于肿瘤旁正常组织),分析 2 组临床病理及预后特征的关系。利用生物信息学方法分析与 *LINC00393* 基因共表达的基因网络。**结果** *LINC00393* 在子宫内膜癌组织中的表达显著高于肿瘤旁正常组织(0.0031 ± 0.0013 vs 0.0016 ± 0.0010 , $P < 0.001$)。其中,*LINC00393* 高表达组 117 例(78.0%),低表达组 33 例(22.0%)。Logistics 回归分析结果显示,高表达组患者的淋巴结转移率明显升高(22.2% vs 6.1%, $P = 0.026$);而 2 组患者年龄、肿瘤类型、FIGO 分期和肿瘤分级的比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与低表达组患者相比,高表达组的生存时间明显缩短(23.3 月 vs 30.2 月, $P = 0.039$)。多因素 Cox 风险比例回归模型分析显示,肿瘤分期晚[相对危险度=3.728(95%CI: 1.854~5.983), $P = 0.027$]和 *LINC00393* 高表达[相对危险度=1.216(95%CI: 1.109~1.408), $P = 0.019$]是子宫内膜癌患者预后不良的独立危险因素。生物信息学分析显示,与 *LINC00393* 共表达的基因间存在复杂的相互作用网络。**结论** *LINC00393* 在子宫内膜癌患者肿瘤组织中呈现高表达状态,且与患者淋巴结转移存在明显关系。*LINC00393* 高表达患者的生存时间缩短,可作为不良预后的独立预测因素。

【关键词】 长链非编码 RNA; *LINC00393*; 子宫内膜癌; 生存分析

Long non-coding RNA *LINC00393* in endometrial cancer and its prognostic implications

MAI Bi, CHEN Yongxiu, HU Guiying, LUO Xiping*, LIU Tingyan

(Department of Gynaecology & Obstetrics, Guangdong Women's and Children's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

【ABSTRACT】Objective To detect the expression of long non-coding RNA *LINC00393* in endometrial cancer tissues and analyze its association with clinical and prognostic features of endometrial cancer. **Method** Real-time fluorescent quantitative PCR was performed to estimate the level of *LINC00393* in the tumor tissues and their adjacent normal tissues in 150 patients with endometrial cancer. Based on the expression level of *LINC00393*, patients were divided into 2 groups, the high expression groups (gene level in tumor tissue was higher than adjacent normal tissue) and the low expression group (gene level in tumor tissue was lower than adjacent normal tissue). The clinical and prognostic characteristics between the 2 groups were compared. Bioinformatics analysis was used to predict the interaction networks between genes co-expressed with *LINC00393*. **Results** The expression of *LINC00393* in endometrial tumor tissues was significantly higher than that in adja-

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(C2017010)

作者单位:广东省妇幼保健院妇科,广东,广州 511400

*通信作者:罗喜平, E-mail: 2488692399@qq.com

cent normal tissues (0.003 1 0.001 3 vs. 0.001 6 0.001 0, $P<0.001$). Out of 150 cases, 117 (78.0%) cases belongs to the high expression group and 33 (22.0%) belongs to the low expression group. Logistics regression analysis showed that the lymph node metastasis rate of patients in the high expression group was significantly increased (22.2% vs. 6.1%, $P=0.026$). There was no significant difference between the 2 groups in age, tumor type, FIGO stage and tumor grade (all $P>0.05$). Compared with the low expression group, the survival time of the high expression group was significantly shortened (23.3 months vs. 30.2 months, $P=0.039$). Multivariate Cox proportional risk regression model analysis showed that late tumor staging [$RR=3.728$ (95% CI : 1.854~5.983), $P=0.027$] and high expression of *LINC00393* gene [$RR=1.216$ (95% CI : 1.109~1.408), $P=0.019$] were independent risk factors for poor prognosis of endometrial cancer patients. Bioinformatics analysis showed that there exists a complex interaction network among the genes co-expressed with *LINC00393*. **Conclusion** *LINC00393* is highly expressed in the endometrial cancer tissues and associated with the increased lymph node metastasis rate. The survival time of patients with high expression of *LINC00393* was shortened, suggesting this gene can be used as an independent predictor of poor clinical prognosis.

[KEY WORDS] Long non-coding RNA; *LINC00393*; Endometrial cancer; Survival

子宫内膜癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤之一,近年来其发病率呈上升趋势^[1]。据估计,2015年我国子宫内膜癌新发病例约为6.3万,且发病呈现年轻化^[2]。尽管经过早期诊断和及时治疗,大多数子宫内膜癌患者可以获得良好的预后结局;但仍有部分在确诊时已处于临床晚期,导致手术和放化疗效果差,病死率高^[3-4]。因此,深入研究子宫内膜癌发病及转移的分子机制,并依此寻找新的诊断或预后分子标志物,将有助于进一步改善子宫内膜癌的诊治现状。

近年来,越来越多的证据表明,长链非编码RNA (long non-coding RNA, *LncRNA*) 的表达异常参与了人类复杂疾病,尤其是恶性肿瘤的调控过程^[5-7]。*LncRNA* 是一类长度超过200 nt的转录本,广泛分布于哺乳动物和植物等物种中^[8],通过与其它分子相互作用,在基因转录、转录后及翻译水平起着重要的调节作用,从而影响细胞增殖、分化、凋亡和新生血管形成等过程,参与肿瘤发生发展的调控^[9-10]。

癌症基因组图谱 (the Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据提示,与正常组织相比,位于13号染色体的 *LncRNA* (*LINC00393*) 在子宫内膜癌患者的组织样本中的表达明显升高^[11]。然而,*LINC00393* 与子宫内膜癌的发生发展是否存在相关性尚未见报道。本研究拟通过检测患者子宫内膜癌组织中 *LINC00393* 的表达情况,并分析其与子宫内膜癌临床病理及预后特征的关系,进而探讨 *LINC00393* 在子宫内膜癌临床诊断及预后判断中的应用价值,以期临床诊治提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象资料

采集2012年1月至2017年12月间在本院妇科行手术治疗并经病理学确诊的150例子宫内膜癌患者的肿瘤及肿瘤旁正常组织标本,并检测组织中 *LINC00393* 的表达情况。纳入患者年龄为25~82岁,平均(52.4±16.3)岁。根据2018新版国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期标准2018^[12],其中Ⅰ期和Ⅱ期患者共118例,Ⅲ期和Ⅳ期患者32例;子宫内膜样腺癌126例,非子宫内膜样腺癌24例;G1级44例,G2级79例,G3级27例;淋巴结阳性患者28例,阴性患者122例。所有患者术前均未接受放疗、化疗及激素治疗。本研究已获得医院伦理委员会批准,且获所有纳入患者知情同意。

1.2 随访方法

自病例确诊并收集后起,每半年随访一次。随访采用电话直接联系患者本人或其家属的方式,了解并记录患者的生存状况和疾病进展情况。随访截止日期为2018年12月31日。生存时间为自患者确诊之日起至随访截止日期或死亡的时间。随访期间失访的病例不纳入后续生存分析。

1.3 主要试剂和仪器

RNA的提取采用Trizol试剂(货号:15596026)购自美国Thermo Fisher公司。RNA逆转录为DNA的逆转录试剂盒(货号:RR047A)购自日本Takara公司。检测 *LINC00393* 基因的表达量的SYBR Green 实时荧光定量PCR预混液(货号:

04707516001)购自瑞士 Roche 公司。荧光实时定量 PCR 仪(货号:EN61326)购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.4 肿瘤组织和肿瘤旁正常组织 *LINC00393* 相对表达量的检测

采用 Trizol 法常规提取组织中的 RNA,并测量 RNA 的浓度和纯度。取 1 000 ng RNA 逆转录为 cDNA。所有操作均按照试剂说明书进行。根据 *LINC00393* 全长基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物序列如下:① *LINC00393* 基因上游引物为 TCTGCTTCCTGTTTGGAGGT,下游引物为 CATGTGAGACGCCAACAAC;②内参 β -actin 管家基因上游引物为 GGCGGCACCAC-CATGTACCCT,下游引物为 AGGGGCCGGACTC GTCATACT。实时荧光定量 PCR 的反应体系共 25 μ L,其中上下游引物各 0.5 μ L,cDNA 模板 2 μ L,ddH₂O 10 μ L,SYBR Green 预混液 12 μ L。反应条件:95℃预变性 5 min;扩增 40 个循环,每个循环包括 95℃变性 30 s,60℃延伸 30 s,72℃退火 1 min;72℃复性 5 min。*LINC00393* 的相对表达量 = $2^{-[(\text{肿瘤组织目的基因 Ct 值}-\text{肿瘤组织内参基因 Ct 值})-(\text{肿瘤旁正常组织目的基因 Ct 值}-\text{肿瘤旁正常组织内参基因 Ct 值})]}$ 。

1.5 *LINC00393* 表达量与子宫内膜癌患者临床病理及预后特征的关系

比较子宫内膜癌患者肿瘤与肿瘤旁正常组织中 *LINC00393* 的表达水平。根据 *LINC00393* 表达情况,将患者分为高表达组与低表达组,其中高表达组患者肿瘤组织中 *LINC00393* 相对表达量高于其肿瘤旁正常组织,反之则为低表达组。分析高表达组与低表达组患者的年龄、肿瘤病理类型、FIGO 分期、肿瘤分级、淋巴结转移情况及生存时间的关系。

1.6 *LINC00393* 基因潜在的调控机制分析

下载 TCGA 数据库中所有子宫内膜癌患者的转录组表达数据,利用 R 软件的 WGCNA 软件包构建 *LINC00393* 基因可能调控的共表达网络。

1.7 统计学方法

本研究所有数据的处理和分析均应用 3.2 版 R 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率或百分比表示。肿瘤与肿瘤旁正常组织中 *LINC00393* 表达量的比较采用配对 *t* 检验;*LINC00393* 表达量与临床病理特征的关系分析比较采用单因素 Logistic

回归分析,并计算比值比(odds ratio, OR)和 95% 置信区间(confidence interval, CI)。患者生存分析采用 Kaplan-Meier 法,并采用 Log-rank 检验比较组间生存时间的差异。采用多因素 Cox 风险比例回归模型分析 *LINC00393* 基因高表达是否为独立于患者年龄、肿瘤病理类型、FIGO 分期、肿瘤分级、和淋巴结转移情况外,影响预后结局的独立危险因素。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *LINC00393* 基因的表达情况

子宫内膜癌患者总体上肿瘤组织中 *LINC00393* 基因的相对表达水平明显高于肿瘤旁正常组织(0.0031 ± 0.0013 vs 0.0016 ± 0.0010 , $P < 0.001$)。在 150 例子宫内膜癌患者中,78% (117/150)肿瘤组织中 *LINC00393* 基因表达水平高于肿瘤旁正常组织(高表达组),其余 22% (33/150)患者肿瘤组织表达水平低于肿瘤旁正常组织(低表达组)。高表达组与低表达组患者 *LINC00393* 基因表达的分布情况见图 1。

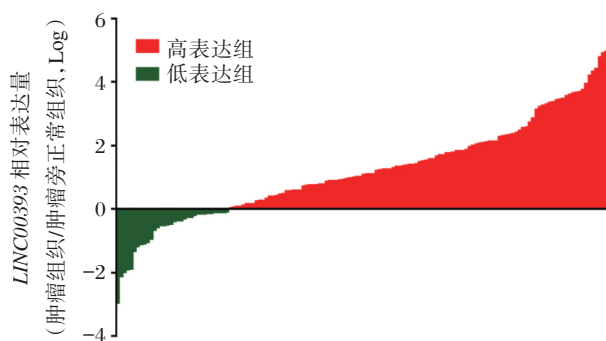


图1 *LINC00393* 在子宫内膜癌的表达

Figure 1 Expression of *LINC00393* in endometrial cancer

2.2 *LINC00393* 高表达与子宫内膜癌临床特征的关系

分析结果显示,高表达组患者的淋巴结转移率明显增加,而 2 组患者的年龄、肿瘤病理类型、FIGO 分期和肿瘤分级无明显差异。具体结果见表 1。

2.3 2 组患者子宫内膜癌预后的比较

对于随访数据,高表达组删失 27 例,低表达组删失 18 例。其中,高表达组获随访(11.5~83.3)月,

表1 2组患者子宫内膜癌临床病理特征关系的单因素 Logistic 回归分析

Table 1 Univariate Logistic regression analysis of clinical and pathological characteristics of endometrial cancer in the 2 groups

临床特征	高表达组 (117例)	低表达组 (33例)	OR (95% CI)	P 值
年龄[例(%)]				0.437
<50岁	36(30.8)	13(9.3)	1.00	
≥50岁	81(69.2)	20(90.7)	1.46(0.60-3.48)	
病理类型[例(%)]				0.644
子宫内膜样腺癌	100(85.5)	26(78.8)	1.00	
非子宫内膜样腺癌	17(14.5)	7(21.2)	0.63(0.22-2.00)	
FIGO分期[例(%)]				0.136
I+II	90(76.9)	28(84.8)	1.00	
III+IV	28(23.1)	5(15.2)	1.74(0.58-6.30)	
肿瘤分级[例(%)]				0.636
G1	33(28.2)	11(33.3)	1.00	
G2+G3	84(71.8)	22(66.7)	1.27(0.50-3.11)	
淋巴结转移[例(%)]				0.026
阴性	91(77.8)	31(93.9)	1.00	
阳性	26(22.2)	2(6.1)	4.43(1.01-40.4)	

中位随访时间为59.2月;低表达组获随访(13.6~79.2)月,中位随访时间为52.4月。生存分析结果显示,高表达组患者的中位生存期为23.3个月,较低表达组患者的中位生存期(30.2个月)明显缩短。2组患者的生存曲线见图2。多因素Cox风险比例回归模型分析结果显示,肿瘤分期晚和肿瘤LINC00393表达高是本研究纳入患者的独立危险因素。具体见表2。

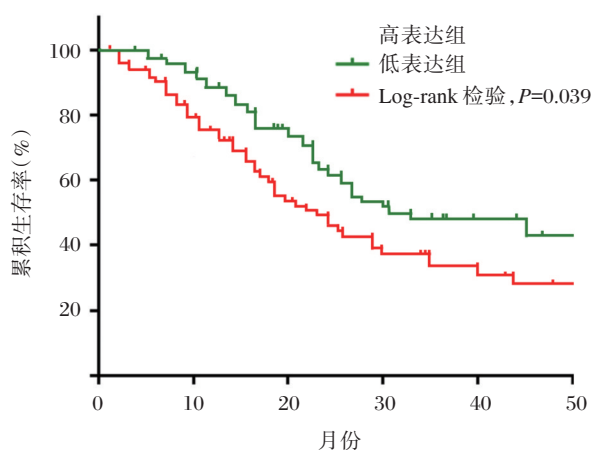


图2 LINC00393不同表达情况下子宫内膜癌患者的生存曲线

Figure 2 Survival curve of endometrial cancer patients with different expression levels of LINC00393

2.4 LINC00393 功能机制的生物信息学分析

生物信息学分析TCGA数据显示,LINC00393基因存在复杂的共表达基因关系网络。具体见图3。

3 讨论

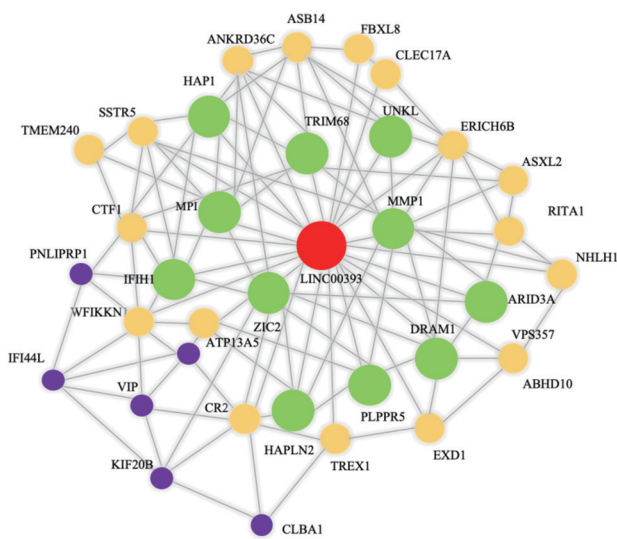
近年来,子宫内膜癌相关研究取得了较大进展,并对临床实践产生了非常重要的影响;然而,其发病率仍居高不下。在大多数病例中,子宫内膜癌通常是在上皮内有非恶性的内膜性新生物逐渐发展而来的^[13]。如果能够早期发现、早期治疗,降低转移风险,子宫内膜癌的总体预后相对较好。因此,精准寻找子宫内膜癌转移和预后相关的标志物意义重大。本研究从LncRNA入手,发现LINC00393与子宫内膜癌淋巴结转移和预后差存在明显关系,并可以作为子宫内膜癌预后判断的独立危险因素。

考虑到基因基础表达量的差异,为了更为直接地分析LINC00393与子宫内膜癌发生发展的关系,本研究根据肿瘤组织与肿瘤旁正常组织表达差异的不同,将患者分为高表达组和低表达组。这样做的优点是可以自身作对照,分析LINC00393基因表达高低对肿瘤的影响,从而更为直观的观察该基因在肿瘤发生发展中的作用。本研究发

表2 子宫内膜癌患者预后影响因素的Cox风险比例回归模型分析

Table 2 Multivariate Cox regression analysis of influence factors for survival of patients with endometrial cancer

影响因素	偏回归系数	标准误	Wald 值	相对危险度(95%置信区间)	P 值
年龄≥50岁	0.288	0.220	1.714	1.212(0.872-1.402)	0.622
非子宫内膜样腺癌	0.525	0.271	3.753	2.077(0.986-4.922)	0.064
FIGO III+IV期	0.201	0.089	5.100	3.728(1.854-5.983)	0.027
G2+G3级	0.781	0.516	2.291	1.833(0.783-2.018)	0.213
淋巴结阳性	0.094	0.19	0.245	2.109(0.559-5.310)	0.782
<i>LINC00393</i> 高表达	0.043	0.012	12.840	1.216(1.109-1.408)	0.019



连线代表存在共表达关系;点大小代表与 *LINC00393* 基因关联的强度,其中绿色>黄色>紫色。

图3 TCGA数据中 *LINC00393* 共表达基因的关系网络Figure3 Networks of co-expression genes related to *LINC00393* in TCGA database

现,子宫内膜肿瘤组织中 *LINC00393* 基因的表达量总体升高。虽然并未发现其表达增加与患者年龄、肿瘤类型、FIGO分期以及肿瘤分级存在明显关系,但值得注意的是,本研究发现该基因的表达与淋巴结阳性密切相关。*LINC00393* 高表达的肿瘤患者,淋巴结的阳性率高达22.2%,而低表达组仅有6.1%。众所周知,淋巴结转移是预后的不良因素^[14]。本研究通过生存分析,进一步发现 *LINC00393* 高表达患者的生存时间明显缩短,Cox回归分析再次提示 *LINC00393* 高表达是预后不良的独立危险因素。

越来越多的研究证据显示,非编码基因作为基因调控网络中的重要成员,为研究复杂疾病的病理生理过程、揭示其致病机理提供了新的重要

视角^[15-16]。由于 *LncRNAs* 参与了肿瘤的发生发展过程,因此,有望成为肿瘤诊断和治疗的新靶标^[17-19]。不例外的是, *LncRNA* 在子宫内膜癌的发生发展中亦起着非常重要的作用。本研究通过生物信息学分析发现,基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1, *MMP1*)和锌指蛋白2(zinc finger protein-2, *ZIN2*)等基因与 *LINC00393* 的表达量协同升高,且在共表达的诸多基因中与 *LINC00393* 最为关系。其中, *MMP* 家族是一组可以水解细胞外基质的蛋白酶,因此广泛参与细胞的侵袭、转移过程^[20]。本研究的这一发现同样得到其他研究支持。Wang等^[21]研究发现, *LncRNA BANCR* 在I型子宫内膜癌组织呈高表达状态, *BANCR* 表达与FIGO分期、病理分级、肌层浸润和淋巴结转移明显有关;进一步研究发现, *BANCR* 通过激活ERK/MAPK信号传导途径调节 *MMP1* 的表达,从而促进子宫内膜癌细胞增殖、迁移和侵袭。段玉真等^[22]也发现, *MMP9* 在子宫内膜癌患者肿瘤组织中呈现高表达状态,并与肿瘤转移关系密切。而对于 *ZIN2*, Bidus等^[23]发现,其在淋巴结阳性的子宫内膜癌患者中呈现过量表达状态。这样不仅与本研究发现一致,而且也很好地解释了 *LINC00393* 与淋巴结转移密切相关的原因。

理论上,非编码蛋白的基因数目多于编码基因。然而,虽然近来 *LncRNA* 在与子宫内膜癌相关研究领域的关注度逐渐增加,并取得了一定的进展,但研究深度仍远不如编码基因深入。本研究作为延伸和补充,发现了 *LncRNA* 家族中另一成员 *LINC00393* 同样与子宫内膜癌密切相关。虽然笔者没有对 *LINC00393* 参与子宫内膜癌发生发展的具体机制进行深入研究,但笔者通过对 *LINC00393* 共表达基因的分析,发现存在一个与其表达密切

相关的复制基因网络。针对网络中的基因,本研究初步的基因本体分析结果显示,这些基因广泛参与细胞增殖、粘附、侵袭与转移过程。未来,笔者将继续深入研究 *LINC00393* 基因与共表达网络中其他基因的相互作用情况,从而揭示其参与子宫内膜癌肿瘤发生发展的具体分子机制。

综上所述,*LINC00393* 在子宫内膜癌患者肿瘤组织中呈现高表达状态,且与患者淋巴结转移存在明显关系。*LINC00393* 高表达患者的生存时间缩短,可作为不良预后的独立预测因素,有望转化为用于子宫内膜癌患者临床预后判断的新的分子标志物。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in china, 2015 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Morice P, Leary A, Creutzberg C, et al. Endometrial cancer [J]. Lancet, 2016, 387(10023): 1094-1108.
- [4] Suri V, Arora A. Management of endometrial cancer: A review [J]. Rev Recent Clin Trials, 2015, 10(4): 309-316.
- [5] 潘洪丽, 何宝玉, 韦东, 等. 长链非编码 RNA CCAT1 对子宫内膜癌细胞迁移侵袭及上皮-间质转化的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(4): 598-602.
- [6] Kim J, Piao HL, Kim BJ, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis [J]. Nat Genet, 2018, 50(12): 1705-1715.
- [7] Yang L, Wu D, Chen J, et al. A functional cnvr_3425.1 damping lincrna fendrr increases lifetime risk of lung cancer and copd in chinese [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(3): 347-359.
- [8] Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Basic biology and therapeutic implications of *LncRNA* [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 15-24.
- [9] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(1): 47-62.
- [10] Du Z, Sun T, Hacisuleyman E, et al. Integrative analyses reveal a long noncoding RNA-mediated sponge regulatory network in prostate cancer [J]. Nat Commun, 2016, 15(7): 10982.
- [11] National Cancer Institute. Genomic Data Commons Data Portal [EB/OL]. <https://portal.gdc.cancer.gov/exploration>. 2018-12-18.
- [12] Amant F, Mirza MR, Koskas M, et al. FIGO cancer report 2018: cancer of the corpus uteri [J]. Int J Gynecol Obstet, 2018, 143: (Suppl.2): 37-50.
- [13] Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of untreated hyperplasia in 170 patients [J]. Cancer, 1985, 56(2): 403-412.
- [14] Morice P, Leary A, Creutzberg C, et al. Endometrial cancer [J]. Lancet, 2015, 387(10023): 1094-1108.
- [15] Lin C, Yang L. Long noncoding RNA in cancer: Wiring signaling circuitry [J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(4): 287-301.
- [16] Yang L, Froberg JE, Lee JT. Long noncoding RNAs: Fresh perspectives into the rna world [J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(1): 35-43.
- [17] Kim J, Piao HL, Kim BJ, et al. Long noncoding RNA malat1 suppresses breast cancer metastasis [J]. Nat Genet, 2018, 50(12): 1705-1715.
- [18] Hosono Y, Niknafs YS, Prensner JR, et al. Oncogenic role of THOR, a conserved cancer/testis long non-coding RNA [J]. Cell, 2017, 171(7): 1559-1572.
- [19] Wu D, Yang B, Chen J, et al. Upregulation of long non-coding RNA RAB1a-2 induces fgf1 expression worsening lung cancer prognosis [J]. Cancer Lett, 2018, 438: 116-125.
- [20] Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation [J]. J Leukoc Biol, 2007, 82(6): 1375-1381.
- [21] Wang D, Wang D, Wang N, et al. Long non-coding RNA BANCER promotes endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating MMP2 and MMP1 via ERK/MAPK signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(3-4): 644-656.
- [22] 段玉真, 周晓慧, 张玉娟, 等. HMGB1 及 MMP-9 在子宫内膜癌组织中表达的意义 [J]. 热带医学杂志, 2016, 16(11): 1371-1374.
- [23] Bidus MA, Risinger JI, Chandramouli, GVR, et al. Prediction of lymph node metastasis in patients with endometrioid endometrial cancer using expression microarray [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 83-88.

防城港市2 292例女性宫颈HPV感染与基因分型分析

蓝家富*

[摘要] **目的** 探讨防城港市女性宫颈人乳头瘤病毒(HPV)感染率和各基因亚型的分布情况,为该地区疫苗接种和宫颈癌的早期防治提供参考依据。 **方法** 收集2015年3月至2018年9月在本院就诊的2 292例女性患者的宫颈脱落细胞样本,采用PCR-膜杂交法对样本进行共21种HPV基因亚型分型检测。 **结果** 2 292例样本中有350例HPV-DNA阳性样本,感染率为15.27%,其中单一亚型感染率12.83%,多重亚型感染率2.44%。21种亚型均有检出,其中HPV52、HPV16、HPV58型感染率位居前三,依次为4.01%、1.96%、1.83%。18~20岁和≥60岁的2个年龄段HPV感染率较高,各年龄组间HPV感染率的差异具有统计学意义($P<0.05$)。 **结论** 该地区HPV感染以单一感染为主,感染率最高的亚型为HPV52、HPV16、HPV58型。HPV感染率在不同年龄组之间存在差异。

[关键词] 人乳头瘤病毒; HPV感染; HPV亚型; PCR-膜杂交法

Analysis of the HPV infection and genotyping distribution in 2 292 women in Fangchenggang city

LAN Jiafu*

(Department of Clinical Laboratory, Fangchenggang Maternal and Child Health Hospital, Fangchenggang City, Guangxi, China, 538001)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the epidemiology of women cervical infection with human papillomavirus (HPV) and distribution of gene subtypes in Fangchenggang city, and provide a basis for vaccination and early prevention and treatment of cervical cancer. **Methods** The cervical exfoliated cells of 2 292 female patients from March 2015 to September 2018 were collected, and a total of 21 HPV genotypes in cells were detected by PCR membrane hybridization. **Results** Among the 2 292 specimens, 350 were positive for HPV-DNA, with the infection rate of 15.27%. The infection rate of single subtype was 12.83%, and that of multiple subtypes was 2.44%. All 21 subtypes were detected, among which HPV52, HPV16 and HPV58 were the top three, and the infection rates were 4.01%, 1.96% and 1.83%, respectively. The infection rate of HPV was increased in the age group of 18-20 years old and over 60 years old. There was statistically significant difference in HPV infection rate among different age groups ($P<0.05$). **Conclusion** HPV infection in this area is dominated by single infection, and the most common subtypes is HPV52, HPV16, HPV58. The HPV infection rate varies between different age groups.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; HPV infection; HPV subtype; PCR membrane hybridization

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种致病性很强的DNA病毒,根据其致病能力大小可分为高危和低危2个亚型^[1]。研究证实HPV感染是引起宫颈癌以及癌前病变等问题的主要因

素,几乎在所有的宫颈癌患者中都能检测到HPV-DNA的存在^[2]。越来越多的研究发现,HPV的感染与基因分型在不同地理区域的感染率及型别分布均存在一定差异^[3-4]。在女性中检测HPV感染

作者单位:防城港市妇幼保健院检验科,广西,防城港市 538001

*通信作者:蓝家富, E-mail:lanjiafu2013@163.com

对宫颈癌的早期筛查和预防具有非常重要意义,同时也为该地区的HPV流行病学特征和模式以及疫苗的研发与接种提供重要的参考资料。本研究对防城港市妇幼保健院妇科就诊的2 292例女性患者宫颈脱落细胞进行HPV-DNA检测和分型分析,以了解该地区女性宫颈HPV感染与基因型分布情况,为该地区宫颈癌的早期防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本收集

收集2015年3月24日至2018年9月18日在本院妇科就诊的2 292例女性患者的HPV检测样本,患者年龄18~68岁,平均年龄(38.5 ± 8.1)岁。所有患者均为首次进行HPV检测,在检测前均未经阴道或宫颈治疗。宫颈脱落细胞样本由妇科医生使用专用样本采集器采集,随后将采集器置于加有专用细胞保存液的取样管中盖紧并作好标记,24 h内完成样本检测,样本未进行检测前保持样本管直立并置于2~8℃条件下保存。

1.2 仪器与试剂

人乳头瘤病毒(HPV)分型检测试剂盒(PCR-膜杂交法)(包含HPV-DNA提取试剂、PCR扩增试剂、杂交试剂)以及配套的样本采集器和医用核酸分子快速杂交仪HHM-2型均购自广东凯普生物科技股份有限公司。C100 Touch PCR仪购自美国BIO-RAD公司。小型台式高速离心机5424型购自于德国Eppendorf公司。

1.3 检测方法

HPV基因分型检测采用凯普HPV分型试剂盒和医用核酸分子快速杂交仪进行检测,采用BIO-RAD C100 TOUCH PCR仪进行PCR扩增。所有操作均严格按照仪器和试剂盒说明书规范进行。每批实验均设有阴、阳性质控对照,确保每批检测结果准确可靠。该HPV分型检测试剂盒可检测出世界卫生组织公布的与宫颈癌密切相关的15种高危亚型(HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68),还可检测出6种低危亚型(HPV6、HPV11、HPV42、HPV43、HPV44、HPV CP8304)。

1.4 统计分析

所有统计分析均使用SPSS19.0统计软件进行处理,计数资料比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 HPV感染率以及感染类型分布

每一批实验都设有对照组,HPV感染阴性的样本结果如图1所示;HPV-52感染的样本结果如图2所示;HPV-16感染样本结果如图3所示。本研究共对2 292例样本进行HPV基因检测,其中共发现350例HPV-DNA阳性样本,感染率为15.27%(350/2 292)。其中有294例患者样本属于HPV单一亚型感染,占全部阳性样本的84.00%(294/350),占所有样本的12.83%(294/2 292)。



图1 阴性样本

Figure 1 The negative samples

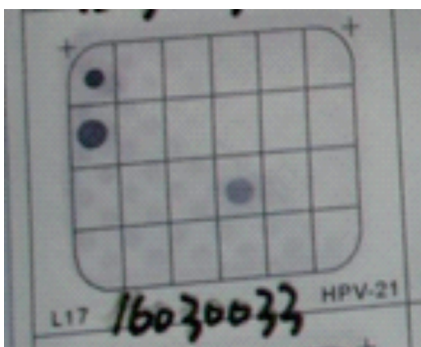


图2 HPV-52型

Figure 2 Type HPV-52



图3 HPV-16型

Figure 3 Type HPV-16

2.2 HPV多重感染

本研究发现350例HPV-DNA阳性样本,有56例患者样本属于HPV多重亚型感染,占全部阳性

样本的16.00%(56/350),占所有样本的2.44%(56/2 292)。其中双重感染例数最多,占全部阳性样本的12.00%(42/350)。感染型别最多为三重感染,

占全部阳性样本的 4.00% (14/350)。最常见的多重感染模式是 HPV52 和 HPV58, 为 8 例, 占全部阳性样本的 2.29% (12/350)。具体分布见表 1。

表 1 HPV 单一亚型感染及多重感染分布 (n=350)

Table 1 Distribution of single and multiple HPV infection subtypes (n=350)

感染模式	感染例数(n)	构成比(%)
单一感染	294	84.00
双重感染	42	12.00
三重感染	14	4.00
合计	350	100.00

2.3 HPV 感染患者中基因亚型分布

该 HPV 分型检测试剂盒能检测出的 21 种 HPV 基因亚型在本研究中均有检出, 其中 HPV52 感染在阳性感染患者中所占比列最高, 其感染率为 4.01% (92/2 292); 其次是 HPV16, 感染率为 1.96% (45/2 292); 随后是 HPV58, 感染率为 1.83% (42/2 292); HPV35 感染率最低, 为 0.09% (2/2 292)。具体及其他基因亚型分布见表 2。

2.4 不同年龄组 HPV 感染分布情况

本研究所收集病例样本中, 年龄最小为 18 岁, 最大 68 岁。各年龄组间 HPV 感染率差异存在统计学意义 ($\chi^2=65.855, P < 0.01$)。18~20 岁年龄组虽然受检者人数少, 只有 28 例, 但感染率最高, 达到 39.29%。其次是 60 岁以上受检者, 感染率为 22.50%, 再次是 20~29 岁受检者, 感染率为 16.09%。见表 3。

3 讨论

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率高, 每年全世界新发病例超过 50 万例, 该病近年来发病率仍在持续上升并呈年轻化趋势^[5]。HPV 基因分型检测是有效筛查宫颈癌的方法之一, 预防和降低宫颈癌的发生首先要了解各地区的感染状况以及其基因分型分布的特点。陈捷等^[6]对福建中医药大学附属人民医院妇科及体检中心收集的样本研究报道的 HPV 总感染率为 17.18%; 郭晓霞等^[7]对中国人民解放军北京军区总医院自愿进行宫颈癌筛查样本研究报道的 HPV 总感染率为 17.48%。曾选等^[8]对江西省妇幼保健医院门诊就诊和住院收集的样本研究报道的 HPV 总感染率为 29.98%。而李春龙等^[9]对深

表 2 HPV 感染患者 21 种基因亚型分布

Table 2 Distribution of 21 HPV subtypes in patients with HPV infection

感染类型	HPV 基因亚型	检出例数 (n)	占阳性患者比例 (n=350, %)	感染率 (n=2 292, %)
高危型	HPV16	45	12.857	1.96
	HPV18	27	7.714	1.18
	HPV31	16	4.571	0.70
	HPV33	11	3.143	0.48
	HPV35	2	0.571	0.09
	HPV39	23	6.571	1.00
	HPV45	6	1.714	0.26
	HPV51	25	7.143	1.09
	HPV52	92	26.286	4.01
	HPV53	27	7.714	1.18
	HPV56	6	1.714	0.26
	HPV58	42	12.000	1.83
	HPV59	3	0.857	0.13
	HPV66	8	2.286	0.35
	HPV68	17	4.857	0.74
低危型	HPV6	13	3.714	0.57
	HPV11	10	2.857	0.44
	HPV42	2	0.571	0.09
	HPV43	3	0.857	0.13
	HPV44	11	3.143	0.48
	CP8304	28	8.000	1.22

表 3 不同年龄组 HPV 感染分布 (n=2 292)

Table 3 Distribution of HPV infection among different age group (n=2 292)

年龄段(岁)	检测例数	感染例数	感染率(%)
18~20	28	11	39.29
20~29	665	107	16.09
30~39	1 023	152	14.86
40~49	443	57	12.87
50~59	93	14	15.05
≥60	40	9	22.50
总计	2 292	350	15.27

圳地区的 5 545 例女性进行 HPV 感染筛查, 结果共发现有 3 106 例阳性患者, 其感染率高达 56.01%。上述研究结果表明不同地区 HPV 感染率存在差异。笔者研究发现防城港市妇幼保健院妇科收集的 HPV 样本中, 其感染率为 15.27%, 与陈捷、郭晓霞等的研究结果相似, 但与曾选、李春龙等的研究结果相差较大。这可能与地域、人群分布、社会习惯、生活方式、样本数量以及检测

方法等因素有关。过早性行为以及同时拥有多个性伴侣,会显著增加 HPV 多重感染风险,本研究发现本地区 HPV 感染以单一亚型感染为主,最多为三重感染。通过对三重感染病例进行分析,发现三重感染的绝大部分为年龄较大者。有研究报道称目前世界范围内共同的最常见的基因型为 HPV16 亚型,其阳性率在宫颈癌中的可高达 51.00%~81.25%^[10]。HPV52 和 HPV58 是亚洲国家人群 HPV 感染的 2 个主要基因亚型,其检出率在中国、日本等亚洲国家中较高^[11-12]。本次研究结果显示,在本地区 15 种高危 HPV 亚型均有分布,其中最主要为 HPV52、HPV16、HPV58 型。在中国东南沿海地区比如浙江、上海、福建以及广东一些地区的人群中 HPV52 感染具有较高的检出率^[13-14]。李智敏等^[15]对广东潮州地区流行病学调查显示 HPV52、HPV16 亚型在该地区 HPV 感染率具有绝对优势,分别为 27.50%和 15.47%。李发涛等^[16]对广州地区 HPV 感染流行病学研究表明,该地区 HPV52、HPV16 感染检出频率最高,依次为 25.44%和 17.86%。赵丽辉等^[17]对中山市女性 HPV 基因分型检测分析结果显示感染率排前三分别为 HPV52、HPV16、HPV58 型,检出率分别为 9.38%、6.61%和 5.86%。研究结果与以上结果非常相似,表明在华南地区 HPV52、HPV16 亚型是 HPV 感染最常见亚型,HPV 感染亚型具有地域特异性。

初次性生活的年龄、2 个以上的性伴侣、吸烟、未使用避孕套、免疫缺陷与抑制等都是宫颈高危型 HPV 感染的相关因素,其中年龄是影响宫颈高危型 HPV 感染最重要的因素之一^[18]。研究资料表明不同年龄组人群 HPV 感染检出率存在明显差异,Smith 等^[19]认为女性年龄不大于 25 岁是 HPV 感染的高发期,随后年龄越大,感染越低。而王莉娜等^[20]研究发现女性年龄不大于 20 岁组患者感染率最高,随后年龄越大,感染越低,但当年龄大于 50 岁后 HPV 感染率增高。本研究发现有相似趋势,其中 18~20 岁年龄组 HPV 感染率最高,为 39.29%,但由于检测人数少只有 28 人,加之该年龄组病人只有在临床不适或症状较严重时才来医院进行检查。因此,该年龄组高感染率可能存在误差,造成感染率高的假象。其次,≥60 岁年龄组患者 HPV 感染率也较高,为 22.50%,这一方面可能与该时期女性卵巢功能和雌激素水平的生理性下降从而引起机体免疫力降低,对病毒清除能力减

弱,进而导致其 HPV 感染率升高有关。另一方面与本次研究纳入的样本数少有关,只有 40 例。所以,后续有必要加大这 2 个年龄组女性患者的 HPV 基因分型检测筛查范围。本研究也提示需进一步加强对 60 岁以上以及 20 岁以下女性人群进行 HPV 基因分型检测普查,宣传防控 HPV 感染知识,提高自我防护意识。

综上所述,本研究为防城港市女性后续 HPV 感染的诊断、HPV 疫苗的研制、接种以及为宫颈癌的防治提供重要的参考依据。同时也建议将 HPV 分型检测纳入到该地区妇女宫颈疾病普查项目,做到早筛查、早诊断、早干预、早治疗,从而降低本地区宫颈癌的发生率。

参考文献

- [1] Husain N, Neyaz A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts [J]. J Oral Biol Craniofac Res, 2017, 7(3):198-205.
- [2] Zhu Y, Wang Y, Hirschhorn J, et al. Human papillomavirus and its testing assays, cervical cancer screening, and vaccination [J]. Adv Clin Chem, 2017, 81: 135-192.
- [3] Cao D, Zhang S, Zhang Q, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women in Shaanxi province of China: a hospital-based investigation [J]. J Med Virol, 2017, 89(7):1281-1286.
- [4] Zhao P, Liu S, Zhong Z, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among women in northeastern Guangdong Province of China [J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1):204.
- [5] Zhang K, Liu Z, Li J, et al. Analysis of human papilloma virus type 52 integration status in exfoliated cervical cells [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6):5817-5824.
- [6] 陈捷, 张璇. 福州地区妇女宫颈人乳头瘤病毒感染流行病学调查分析 [J]. 福建医药杂志, 2017, 39(2):129-131.
- [7] 郭晓霞, 田玉旺, 张立英, 等. 41751 例女性宫颈细胞中 HPV 基因分型的回顾性分析 [J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(2):113-127.
- [8] 曾选, 宇翔, 陆瑶. 江西 10269 例女性 HPV 感染情况及分型检测分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(3):168-172.
- [9] 李春龙, 廖洪, 杨瑛, 等. HPV 分型及其高危亚型与宫颈病变的相关性分析 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(8):1109-1111.

- [10] Canales NA, Marina VM, Castro JS, et al. A1BG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 939-947.
- [11] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(1): 63-73.
- [12] Chan PK, Ho WC, Chan MC, et al. Meta-analysis on prevalence and attribution of human papillomavirus types 52 and 58 in cervical neoplasia worldwide [J]. *Plos One*, 2014, 9(9):e107573.
- [13] Ye J, Cheng X, Chen X, et al. Prevalence and risk profile of cervical Human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study [J]. *Virol J*, 2010, 7:66.
- [14] Liu SS, Chan KY, Leung RC, et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus (HPV) infection in southern Chinese women - a population-based study [J]. *Plos One*, 2011, 6(5):e19244.
- [15] 李智敏, 罗喜平, 毛玲芝, 等. 广东省潮州市 13750 例妇女宫颈人乳头瘤病毒感染状况及基因型分析 [J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2012, 8(4): 432-435.
- [16] 李发涛, 廖灿, 李焱, 等. 人乳头状瘤病毒感染妇女的年龄及其亚型分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(17):4345-4347.
- [17] 赵丽辉, 孙世珺, 孟凤娇. 中山市 4508 例女性宫颈细胞 HPV 基因分型分析 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45(22):4086-4088.
- [18] Baussano I, Diaz M, Tully S, et al. Effect of age-difference between heterosexual partners on risk of cervical cancer and human papillomavirus infection [J]. *Papillomavirus Res*, 2017, 3:98-104.
- [19] Smith JS, Melendy A, Rana RK, et al. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review [J]. *J Adolesc Health*, 2008, 43(4 Suppl):S5-25, S25.e1-41.
- [20] 王莉娜, 丁芹, 潘玉, 等. 徐州市 2696 例女性患者宫颈人乳头瘤病毒感染状况及基因分型 [J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2017, 11(5):460-463.

(上接第 197 页)

- [8] 孙雪玲, 房辉, 张禾伟, 等. 甲状腺乳头状癌中 EphA7 和 ANXA1 的表达及其意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(5):552-555.
- [9] Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network [J]. *Cell*, 2017, 169(3):381-405.
- [10] Liu Z, Gan L, Liu G, et al. Sirt1 decreased adipose inflammation by interacting with Akt2 and inhibiting mTOR/S6K1 pathway in mice [J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(8):1373-1381.
- [11] 郭旋, 李佳, 李远, 等. β 受体阻滞剂在严重脓毒症或脓毒症休克患者临床应用中的 meta 分析 [J]. *临床误诊误治*, 2017, 30(10):100-104.
- [12] Popp R, Li H, André LB. Immuno-Matrix-Assisted laser desorption/ionization assays for quantifying AKT1 and AKT2 in breast and colorectal cancer cell lines and tumors [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(19): 10592-10600.
- [13] Li G, Ying L, Wang H, et al. Rac1b enhances cell survival through activation of the JNK2/c-JUN/Cyclin-D1 and AKT2/MCL1 pathways [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14):17970-17985.
- [14] Zou S, Ren P, Zhang L, et al. AKT2 promotes bone marrow cell-mediated aortic protection in mice [J]. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2016, 101(6):2085-2096.
- [15] Song G, Xu S, Zhang H, et al. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35(1):148-171.
- [16] 魏礼清, 刘璐, 丁钟欢, 等. 沉默 Annexin-A1 对小胶质细胞 BV-2 生长和迁移能力的影响及其机制 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2016, 36(3):207-212.
- [17] Tu Y, Johnstone CN, Stewart AG. Annexin A1 influences in breast cancer: controversies on contributions to tumour, host and immunoediting processes [J]. *Pharmacological Research*, 2017, 119(14):278-288.
- [18] Álvarez T, Saúl M, Sofía T, et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck squamous cell carcinoma is mediated via transcriptional control with direct involvement of miR - 196a/b [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):6790.
- [19] Biaoxue R, Xiguang C, Hua L, et al. Increased level of annexin A1 in bronchoalveolar lavage fluid as a potential diagnostic indicator for lung cancer [J]. *The International Journal of Biological Markers*, 2016, 32(1):132-140.

• 论 著 •

循环肿瘤细胞(CTC)在乳腺癌预后与化疗评估中的应用

梁志洪 陈结贞 陈永雪 古文鑫* 吴泽华

【摘要】 目的 通过检测乳腺癌患者外周血循环肿瘤细胞(CTC)的数目变化,探讨CTC在评估患者病情及评估化疗效果中的应用。方法 选取于本院进行治疗的女性乳腺癌患者共135例,于化疗前后抽取患者健侧上肢静脉血5 mL,利用膜滤过法(ISET)检测外周血CTC。比较CTC检测结果与肿瘤分期、ER/PR、HER-2、Ki-67的相关性;比较CTC阳性率与乳腺癌患者生存分析及化疗前后变化。结果 CTC阳性率与肿瘤TNM分期显著相关($P<0.05$),TNM分期为I期的患者CTC阳性率为7.7%,而在TNM分期为IV期患者中CTC阳性率为73.8%($P<0.05$);HER-2与Ki-67表达亦与CTC阳性率明显相关,在HER-2阳性与Ki-67高表达的患者中CTC阳性率分别为71.2%和68.8%,远高于HER-2阴性与Ki-67低表达患者的34.8%和29.1%($P<0.05$)。而乳腺癌患者CTC阳性率与患者绝经状态、ER和PR表达无显著相关性($P>0.05$)。CTC阳性组总生存率为36.73%,CTC阴性组总生存率为59.37%,CTC阳性组总生存率低于CTC阴性组总生存率($P<0.05$)。化疗前乳腺癌患者CTC阳性率为52.5%(71/135),而化疗后乳腺癌患者的CTC阳性率显著降低至20.0%(27/135),差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 乳腺癌患者外周血CTC的阳性率与临床TNM分期、HER-2和Ki-67指数相关;CTC可以用于估计乳腺癌患者预后生存率。乳腺癌患者化疗前后CTC的变化情况与化疗疗效有一定关系。

【关键词】 循环肿瘤细胞;乳腺癌;肿瘤转移

Application of circulating tumor cells (CTC) in prognosis and chemotherapy evaluation of breast cancer

LIANG Zhihong, CHEN Jiezheng, CHEN Yongxue, GU Wenxin*, WU Zehua

(Guangzhou Panyu District City Bridge Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

【ABSTRACT】 Objective To evaluate the conditions of breast cancer patients and explore the effectiveness of chemotherapy by detecting the number changes of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer. Method A total of 135 women with breast cancer were enrolled in our hospital. 5 mL of venous blood of the healthy upper limbs was extracted before and after chemotherapy, and CTC in peripheral blood was detected by membrane filtration (ISET). The correlation between CTC test results and tumor stage, ER/PR, her-2 and ki-67 was compared. The correlation between CTC positive rate and survival analysis and chemotherapy evaluation was compared. Results The positive rate of circulating tumor cells was significantly correlated with tumor TNM stage ($P<0.05$). And the positive rate of CTC in patients with stage I TNM was 7.7%, while the positive rate of CTC in patients with stage IV TNM was 73.8% ($P<0.05$). The expression of HER-2 and Ki-67 were also significantly related to CTC positive rates. In HER-2 and Ki-67 expression positive patients, CTC positive rates were 71.2% and 68.8%, which were much higher than the HER-2 and Ki-67 expression negative patients (34.8% and 29.1%, $P<0.05$). There was no significant

作者单位:广州市番禺区市桥医院,广东,广州 511400

*通信作者:古文鑫, E-mail: 307414948@qq.com

correlation between the positive rate of CTC and the menstrual status, ER and PR ($P>0.05$). The positive rate of CTC in breast cancer patients before chemotherapy was 52.5% (71/135), while the positive rate of CTC in breast cancer patients after chemotherapy was significantly reduced to 20.0% (27/135) ($P<0.05$).

Conclusion The positive rate of peripheral blood CTC in breast cancer patients is related to clinical TNM stage, HER-2 and Ki-67 index. CTC can be used to estimate the prognosis survival rate of breast cancer patients. The changes of CTC in patients with breast cancer before and after chemotherapy have a certain relationship with the efficacy of chemotherapy.

[KEY WORDS] Circulating tumor cells; Breast cancer; Tumor metastasis

乳腺癌是女性肿瘤患者最常见的恶性肿瘤之一,好发于50~54岁,不论在发达国家还是发展中国家,乳腺癌已成为女性恶性肿瘤致死的首要原因^[1]。据统计约90%肿瘤导致的死亡是由于复发转移引起^[2]。而目前,对乳腺癌转移过程认识的主流观点仍是“种子-土壤”学说,即肿瘤细胞自原发灶脱落,直接或经淋巴系统间接进入血液循环系统形成循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC),进而在远处组织、器官增殖,最终形成转移灶^[3]。CTC是指从癌症原发部位脱落,通过血管或淋巴系统进入血液循环的细胞^[4]。在乳腺肿瘤发生的早期CTC侵入血液循环系统中,随着肿瘤的进展CTC在远处进一步形成转移灶,故CTC在乳腺癌转移过程中发挥着重要作用。现今以乳腺癌为代表的CTC研究已取得了快速发展,CTC可反映肿瘤的负荷状态及转移情况,及时评估患者的治疗效果^[5]。研究发现CTC在乳腺癌早期诊断、分期等方面已经展示出良好的应用前景^[6]。本研究将通过检测患者外周血CTC,探讨CTC在评估患者病情及化疗评估效果中的应用,为乳腺癌的病情评估、转移评估和化疗疗效评估寻求有效的检测方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2009年1月至2014年1月于本院乳腺甲状腺外科进行治疗的女性乳腺癌患者135例,患者年龄范围在31~74岁,平均年龄43.2岁,其中绝经前75例,绝经后60例。纳入标准^[7]:①经空芯针穿刺活组织检查确诊为乳腺癌;②所有患者为TNM分期系统(tumor node metastasis, TNM) I~IV期乳腺癌;③年龄20~80岁,无化疗禁忌证并签署知情同意书;④肿瘤为单侧、单发,就诊前均未接受任何辅助性治疗;⑤无其他部位恶性肿瘤病

史。排除标准:①炎性乳腺癌;②哺乳期乳腺癌;③患者入院前已行包块切除活组织检查。随访:纳入的患者,从第一诊疗后开始进行随访工作;随访内容包括患者的患者一般情况,肿瘤的彩超复查,CTC检测复查;随访时间:患者第一次诊疗后,每隔3个月进行随访,时间期限5年;终止随访:达到随访时间期限,或患者失联,或患者意外死亡;随访方式:电话随访。本实验研究方案获得本院伦理委员会批准(医研伦审2014年第46号)。

1.2 膜过滤法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET)检测CTC

取患者首次化疗前和化疗后健侧上肢浅静脉血5 mL(弃去最初抽取的2 mL血液,排除皮肤上皮组织污染),颠倒混匀后在2 h内按照标准ISET检测流程进行CTC检测^[8]。将5 mL全血应用含0.2%甲醛的缓冲液稀释至8 mL,将固定好的样本转移至自动化检测平台CTCBIOPSY®(武汉友芝友医疗科技股份有限公司)中(预先装有8 μm 的滤膜),上机检测,进行过滤、漂洗、样本染色、清洗等自动化操作。检测完成后取出滤器,取下滤膜,置于载玻片上,干燥后封片,于光学显微镜下观察结果。

1.3 CTC评判标准

根据ISET法^[8]检测CTC的判读标准进行阅片并统一判读:①细胞核大小不均匀;②细胞核直径 $>18\ \mu\text{m}$;③细胞核存在异型性;④染色质存在三维层次;⑤高核质比。将以上5种情况中至少存在4种的细胞定义为CTC。检测到1个CTC即为检测阳性。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件进行分析。患者临床病理特征如年龄、绝经状态等计数资料采用 χ^2 检验进行比较;生存分析比较采用Mantel-Cox检验;化疗前后CTC阳性率差异的比较采用McNe-

mar 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CTC 与乳腺癌临床因素相关性分析

2.1.1 CTC 与乳腺癌 TNM 分期相关性分析

如表 1 所示,乳腺癌患者中 CTC 阳性率与肿瘤 TNM 分期显著相关($P < 0.05$),TNM 分期为 I 期的患者 CTC 阳性率为 7.7%,而在 TNM 分期为 IV 期患者中 CTC 阳性率为 73.8%;TNM 分期 IV 期的 CTC 阳性率远高于 I 期的阳性率,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.1.2 CTC 与乳腺癌标志物相关性分析

如表 1 所示,人类表皮生长因子受体 2(human-erbB-2, HER-2)与增殖细胞核抗原 Ki-67(antigen Ki-67, Ki-67)表达亦与 CTC 阳性率明显相关,在 HER-2 阳性与 Ki-67 高表达的患者中 CTC 阳性率分别为 71.2%和 68.8%远高于 HER-2 阴性与 Ki-67 低表达患者的 34.8%和 29.1%,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.1.3 CTC 与雌/孕激素受体相关性分析

如表 1 所示,在雌激素受体(estrogen receptor, ER)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性的乳腺癌患者 CTC 阳性率 52.1%和 51.8%;而在 ER 和 PR 阴性的乳腺癌患者中 CTC 阳性率分别为 34.8%和 29.1%,可见 CTC 阳性率与 ER 及 PR 表达无显著相关性($P > 0.05$);此外 CTC 与患者绝经状态亦无明显相关,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 不同 CTC 组患者预后生存分析

根据化疗前 CTC 阳性情况,将乳腺癌患者分为 2 组:CTC 阳性组 71 例和 CTC 阴性组 64 例。其中 CTC 阳性组总生存率为 36.73%,CTC 阴性组总生存率为 59.37%,CTC 阳性组总生存率低于 CTC 阴性组总生存率,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.4 乳腺癌患者化疗前后 CTC 检出情况差异

化疗前乳腺癌患者 CTC 阳性率为 52.5%(71/135),而化疗后乳腺癌患者的 CTC 阳性率显著降低至 20.0%(27/135),差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

乳腺癌是好发于女性群体的常见恶性肿瘤,其发病率在女性恶性肿瘤中居首位^[9]。目前综合

表 1 CTC 阳性率与临床病理因素的相关性 [$n(\%)$]

Table 1 Correlation between positive rate of circulating tumor cells and clinicopathologic factors [$n(\%)$]

临床病理因素	<i>n</i>	CTC 检出情况	χ^2 值	<i>P</i> 值
绝经状态				
绝经前	75	41(54.7)	0.29	0.59
绝经后	60	30(50.0)		
TNM 分期(期)				
I	13	1(7.7)	19.89	<0.000 1
II	25	8(32.0)		
III	36	17(47.2)		
IV	61	45(73.8)		
ER 表达				
阳性	94	49(52.1)	0.03	0.87
阴性	41	22(53.7)		
PR 表达				
阳性	85	44(51.8)	0.06	0.80
阴性	50	27(54.0)		
HER-2 表达				
阳性	66	47(71.2)	17.96	<0.000 1
阴性	69	24(34.8)		
Ki-67 表达				
高	80	55(68.8)	20.56	<0.000 1
低	55	16(29.1)		

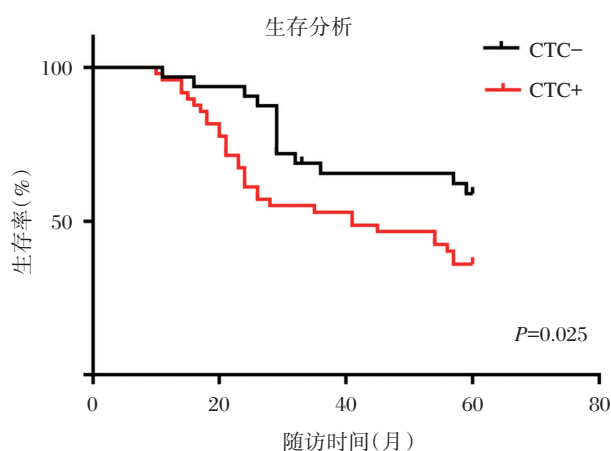


图 1 不同 CTC 组患者生存分析

Figure 1 Survival analysis of patients in different CTC groups

治疗模式使乳腺癌的复发率和死亡率均显著降低,但其仍然是导致女性死亡的主要原因之一,其中复发和转移是导致乳腺癌患者死亡的最主要的原因^[10]。现阶段临床应用肿瘤影像学特征来预测

表2 乳腺癌患者化疗前后 CTC 检出情况差异 (n)

Table 2 Differences in CTC detection before and after chemotherapy in breast cancer patients (n)

化疗前 CTC 状态	化疗后 CTC 状态		合计
	阳性	阴性	
阳性	25	46	71
阴性	2	62	64
合计	27	108	135

采用 McNemar 检验, $Kappa=0.31$, $P<0.001$ 。

患者的复发和死亡风险,如原发肿瘤大小、肿瘤局部转移及远处转移等情况。但肿瘤影像学特征对早期评估肿瘤转移的情况具有一定局限性,为进一步评估与提高乳腺癌治疗的疗效,需寻找更有效的疗效和预后检测指标。

CTC 是远处转移灶形成的重要前提和基础,故 CTC 的检测有助于早期评估肿瘤的转移情况^[11]。然而由于循环肿瘤细胞存在于外周血中而不易被检, ISET 法、逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、Cell Search 系统、流式细胞术等陆续被研发用于 CTC 检测^[12]。其中 ISET 法原理是利用 CTC 与正常细胞大小的差异,将外周血通过 8 μm 孔径的滤膜过滤后,再应用形态学方法鉴别肿瘤细胞,以确定 CTC 阳性情况。吴源娜等^[13]应用 ISET 技术分离 34 例胃癌晚期患者外周血循环肿瘤细胞 (CTC),并发现 ISET 法的 CTC 捕获技术具有较高的检出率,胃癌组 CTC 阳性率为 23.5% (8/34),对照组均未检出 CTC。然而基于 ISET 法 CTC 检测技术在乳腺癌中的应用较少,本研究中将采用 ISET 法检测乳腺癌 CTC 情况。

在本研究结果中,CTC 阳性 5 年总生存率为 36.73%,CTC 阴性组 5 年总生存率为 59.37%,CTC 阳性组总生存率低于 CTC 阴性组总生存率,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。此结果与此前 Cellsearch 检测 CTC 在转移性乳腺癌预后评估结果相一致^[14]。Bidard 等^[14]应用 Cell search 检测乳腺癌 CTC 情况,结果发现当患者 CTC>5 个/7.5 mL (CTC 阳性)其总生存期显著小于 CTC 阴性患者 (CTC<5 个/7.5 mL)。Jiang 等^[15]通过在 294 例中国乳腺癌患者中检测 CTC,其结果证实了 CTC 阳性状态均是总生存期和无进展生存期独立预测因素。本实验结果进一步验证了通过 CTC 阳性率可

以预估乳腺癌患者预期生存率,在 CTC 检测阳性的患者中肿瘤复发概率较高,生存期短,预后差。为进一步分析 CTC 检出情况与患者临床病理特征的关系,本研究发现 CTC 阳性率与 HER-2 及 Ki67 表达情况有关,但与患者 ER、PR 表达情况无关。在 HER-2 与 Ki-67 表达阳性的患者中 CTC 阳性率分别为 71.2% 和 68.8% 远高于 HER-2 与 Ki-67 表达阴性患者的 34.8% 和 29.1%,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。这可能与 HER-2 高表达的肿瘤侵袭力强,恶性程度高^[15-16],Ki-67 高表达患者癌细胞增殖更加活跃有关^[17-18]。尽管在 HER-2 阳性患者中 CTC 阳性率高,但是这并不代表 HER-2 阳性患者检出的 CTC 细胞依然呈现 HER-2 阳性。Ligthart 等^[19]报道,在 HER-2 阳性的乳腺癌患者中,其检出 CTC 细胞仍有 29% 呈现 HER-2 阴性。其结果说明原发病灶与 CTC 的 HER-2 表达情况存在不一致性,并进一步提示笔者深入探讨 CTC 细胞的分子分型与乳腺癌患者预后研究。而乳腺癌患者 CTC 阳性率与患者绝经状态、ER 和 PR 表达无显著相关性 ($P>0.05$)。此外,本研究亦发现化疗前乳腺癌患者 CTC 阳性率为 52.5% (71/135),而化疗后乳腺癌患者的 CTC 阳性率显著降低至 20.0% (27/135),差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。此结果与 Helissey 等^[20]应用 Cellsearch 检测结果相一致,CTC 阳性乳腺癌患者 (CTC>5 个/7.5 mL) 化疗后复查 CTC 转为阴性或计数值下降超过 70%,并进一步证实 CTC 检测可以用于乳腺癌患者在化疗期间的疗效检测,辅助判断化疗疗效及患者生存预后分析。

综上所述,本研究结果初步显示 CTC 数目的变化与患者肿瘤 TNM 分期及 HER-2、Ki-67 表达相关;CTC 可以用于估计乳腺癌患者预后生存率;且 CTC 的数目变化与化疗前后状态有一定的关系,化疗后 CTC 阳性率明显降低,CTC 能够在一定程度上反映化疗的疗效。然而本研究中存在部分 CTC 检出阴性的患者,这对结果存在一定影响。同时,本研究样本量较少,因此 CTC 在化疗的疗效评估中的作用价值仍需前瞻性、大样本、多中心的临床研究进一步验证。

参考文献

- [1] National Comprehensive Cancer Network. Breast cancer clinical practice guidelines in oncology [J]. Journal

- of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN, 2003, 1(2):148.
- [2] Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(12):1508-1511.
- [3] 马齐襄, 朱晓丹, 胡凯文, 等. 肿瘤转移的种子与土壤学说新认识[J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(10):1049-1053.
- [4] 李世超, 姜军. 乳腺癌循环肿瘤细胞生物学特性的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(16):1272-1275.
- [5] 李蕾, 江泽飞. 循环肿瘤细胞检测在不同阶段不同类型乳腺癌中的应用[J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(8):570-575.
- [6] 龚福生, 黄伟伟, 刘健, 等. 乳腺癌患者循环肿瘤细胞检测的临床意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(13):1009-1013.
- [7] 李燕, 陶敏, 马德亮, 等. 用膜滤过联合激光扫描细胞仪检测恶性肿瘤患者循环肿瘤细胞[J]. *苏州大学学报: 医学版*, 2010, 30(1):145-148.
- [8] Hofman V, Long E, Ilie M, et al. Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method [J]. *Cytopathology*, 2012, 23(1):30-38.
- [9] 何健荣, 高曦, 任泽舫. 全球女性乳腺癌和卵巢癌最新发病分布特征[J]. *中国肿瘤*, 2009, 18(3):169-172.
- [10] Scully OJ, Bay BH, Yip G, et al. Breast cancer metastasis [J]. *Cancer Genomics - Proteomics*, 2012, 9(5):311-320.
- [11] Williams SCP. Circulating tumor cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(13):4861-4861.
- [12] 王振丹, 赵文华, 李胜. 循环肿瘤细胞检测方法研究现状[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(17):1391-1394.
- [13] 吴源娜, 沈洁, 杨艳, 等. 基于 ISET 技术的晚期胃癌循环肿瘤细胞检测及其临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(10):1568-1571.
- [14] Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data [J]. *The Lancet Oncology*, 2014, 15(4):406-414.
- [15] Jiang ZF, Cristofanilli M, Shao ZM, et al. Circulating tumor cells predict progression-free and overall survival in Chinese patients with metastatic breast cancer, HER2-positive or triple-negative (CBCSG004): a multicenter, double-blind, prospective trial [J]. *Annals of oncology*, 2013, 24(11):2766-2772.
- [15] Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer the HER-2/neu gene and protein [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(4):379-398.
- [16] Zeillinger R, Kury F, Czerwenka K, et al. HER-2 amplification, steroid receptors and epidermal growth factor receptor in primary breast cancer [J]. *Oncogene*, 1989, 4(1):109-114.
- [17] Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer [J]. *Journal of clinical oncology*, 2005, 23(28):7212-7220.
- [18] Dowsett M, Nielsen TO, A'hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2011, 103(22):1656-1664.
- [19] Ligthart ST, Bidard FC, Decraene C, et al. Unbiased quantitative assessment of Her-2 expression of circulating tumor cells in patients with metastatic and non-metastatic breast cancer [J]. *Annals of oncology*, 2012, 24(5):1231-1238.
- [20] Helissey C, Berger F, Cottu P, et al. Circulating tumor cell thresholds and survival scores in advanced metastatic breast cancer: the observational step of the CirCe01 phase III trial [J]. *Cancer letters*, 2015, 360(2):213-218.

丙型肝炎抗体阳性患者 HCV RNA 与肝功能指标联合检测的意义

朱少美* 刘集鸿 周潇

【摘要】目的 探讨丙型肝炎抗体阳性患者 HCV RNA 水平与肝功能主要指标的关系。**方法** 选取 235 名丙型肝炎抗体阳性患者,使用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测 HCV RNA 水平,按 HCV RNA 检测结果 <500 IU/mL、 $500\sim 10^7$ IU/mL 和 $>10^7$ IU/mL 分别划分为阴性组、低中病毒水平组、高病毒水平组。同时检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)这 8 项肝功能指标。**结果** HCV RNA 阳性率为 71.06% (167/235),不同 HCV 病毒水平组之间的年龄和性别分布差异无统计学意义($P>0.05$)。8 项肝功能指标的异常率在 7.23%~48.51%,其中不同 HCV 病毒水平组间的 ALT、AST、GGT 指标的异常率差异有统计学意义($P<0.05$),且 ALT 和 AST 异常率随病毒水平逐渐升高,GGT 异常率在有病毒感染组明显高于阴性组。不同 HCV 病毒水平组间,ALT、AST、GGT、ALB 水平间差异有统计学意义($P<0.05$)。HCV RNA 水平与 ALT、AST、GGT 水平正相关($r=0.505, 0.407, 0.284, P<0.05$)。**结论** 丙型肝炎抗体阳性患者进行 HCV RNA 和肝功能的检测,有助于准确诊断丙型肝炎的感染、监测病毒活动以及评估肝脏的损害,对丙型肝炎的治疗具有十分重要的意义。

【关键词】 丙型肝炎; 抗体; 丙型肝炎病毒 RNA; 肝功能

Significance of combined detection of HCV RNA and liver function indexes in HCV antibody positive patients

ZHU Shaomei*, LIU Jihong, ZHOU Xiao

(Laboratory Medicine of Huizhou First People's Hospital, Huizhou, Guangdong, China, 516003)

【ABSTRACT】Objective To explore the relationship between HCV RNA levels and major liver function indexes in HCV antibody positive patients. **Methods** 235 HCV antibody positive patients was enrolled. The HCV RNA level was tested by real time PCR. According to HCV RNA test results, <500 IU/mL, $500\sim 10^7$ IU/mL and $>10^7$ IU/mL were divided into negative group, low virus level group and high virus level group respectively. 8 major liver function indexes including ALT, AST, GGT, ALP, TP, ALB, TBil and DBil were monitored by fully automatic biochemical analyzer. **Results** HCV RNA positive rate was 71.06% (167/235). No significant difference was found in age and gender between different HCV virus levels groups ($P>0.05$). The abnormal rate of eight hepatic functional indexes was 7.23%-48.51%, while the abnormal rates of ALT, AST and GGT in different HCV virus levels groups were statistically significant ($P<0.05$). The abnormal rate of ALT and AST increased with the virus level, and the abnormal rate of GGT in virus infected group was significantly higher than in the negative group ($P<0.05$). There were significant differences in ALT, AST, GGT and ALB levels among different HCV virus levels ($P<0.05$). HCV RNA levels were positively correlated with ALT, AST, and GGT levels ($r=0.505, 0.407, 0.284, P<0.05$). **Conclusion** The detection

基金项目:惠州市医疗卫生类科技计划项目(2017Y051)

作者单位:惠州市第一人民医院检验科,广东,惠州 516003

*通信作者:朱少美, E-mail: zsmay1224@163.com

of HCV RNA and liver function in patients with hepatitis C antibody-positive is helpful for the accurate diagnosis of hepatitis C infection, monitoring of viral activity and assessment of liver damage, and is of great significance for the treatment of hepatitis C.

[KEY WORDS] Hepatitis C; Antibody; HCV RNA; Liver function

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的血液性传播疾病。据统计,全球约有1.8亿人感染HCV,感染率高达3%,HCV的感染分布不均衡,主要集中在发展中国家,我国属于高感染区,感染率约为3.2%^[1]。HCV感染后,约55%~85%会进展为慢性感染,其中10%~20%会转变成肝硬化,有5%会发展为肝细胞癌^[2],严重危害人类健康。由于HCV感染起病隐匿,发展缓慢,大部分患者通常无典型症状,往往在肝功能受损后才进行HCV的检测。HCV的诊断主要依据丙型肝炎抗体、HCV RNA等实验室指标^[3],因此早期、精确的诊断对HCV的防治以及减缓患者肝脏损伤具有非常重要的意义。同时,进行主要肝功能指标的监测还可以反映患者的疾病进展,调整治疗方案。本研究通过检测丙型肝炎抗体阳性患者的HCV RNA水平与主要肝功能指标水平,探讨HCV RNA水平与肝功能损伤的关系,为HCV的诊断和治疗提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2014年1月至2017年12月来本院就诊的丙型肝炎抗体检测阳性患者,共235例,其中男性133例,女性102例,年龄20~89岁,平均年龄49岁。

1.2 血液标本采集

患者空腹采血,同时采集无抗凝血、EDTA抗凝血、肝素抗凝血各3 mL,2 000 r/min离心10 min,取血清或血浆分别用于丙型肝炎抗体、HCV RNA、主要肝功能指标的检测。

1.3 丙型肝炎抗体检测

根据酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法原理,采用北京万泰生物有限公司生产的丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒,操作方法严格按照试剂盒说明书进行,检测仪器为美国Biotek酶标仪ELX-800。

1.4 HCV RNA检测

根据实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)方法

原理,采用上海科华生物工程股份有限公司生产的丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法),操作方法严格按照试剂盒说明书进行,检测仪器为伯乐生命医学产品有限公司的实时荧光定量PCR仪CFX Conenect,可检测范围是500~10⁸ IU/mL。根据HCV RNA检测结果<500 IU/mL、500~10⁷ IU/mL和>10⁷ IU/mL分别划分为阴性组、低中病毒水平组、高病毒水平组^[4]。

1.5 主要肝功能指标检测

包括谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰基转移酶(γ -glutamyl transferase, GGT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、总胆红素(total bilirubin, TBil)、直接胆红素(direct bilirubin, DBil)8项主要肝功能指标。ALT、AST、GGT和ALP的检测采用速率法,TP采用双缩脲法,ALB采用溴甲酚紫法,TBil和DBil采用重氮法^[5]。仪器与试剂为罗氏电化学发光全自动免疫分析系统Cobas 6000及配套的原装试剂,所有的操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法

采用IBM SPSS Statistics 21对数据进行统计分析。方差齐时,多组间的比较采用One-Way ANOVA分析,2组间的比较采用独立样本 t 检测。方差不齐时,多组间的比较采用非参数检验Kruskal-wallisH(K)分析,2组间的比较采用Mann-Whitney U分析。多个率之间比较用卡方检验。HCV RNA与生化指标间的相关性采用Spearman相关分析。当 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙型肝炎抗体阳性患者HCV RNA水平分布情况

在235例丙型肝炎抗体阳性的患者中,HCV RNA阴性组、低中病毒水平组和高病毒水平组分别有68例、111例和56例,HCV RNA阳性率合计71.06%(167/235),其分布情况见表1。

表1 HCV病毒载量分布情况
Table 1 Distribution of HCV virus load

HCV病毒载量	<i>n</i>	病毒滴度中位数 (IU/mL)	25%百分位数 (IU/mL)	75%百分位数 (IU/mL)	极小值 (IU/mL)	极大值 (IU/mL)
阴性组	68	<500	<500	<500	<500	<500
低中病毒水平组	111	1.2×10 ⁶	2.90×10 ⁵	4.71×10 ⁶	707	1×10 ⁷
高病毒水平组	56	2.15×10 ⁷	1.37×10 ⁷	3.04×10 ⁷	1.08×10 ⁷	>1×10 ⁸
合计	235	9.67×10 ⁵	<500	9.71×10 ⁶	<500	>1×10 ⁸

2.2 不同HCV病毒水平组的年龄和性别分布

不同HCV病毒水平组之间的年龄和性别分布差异无统计学意义($P>0.05$),同时不同性别间HCV RNA水平差异无统计学意义($P>0.05$),具体情况见表2。

2.3 不同HCV病毒水平组主要肝功能指标情况

丙型肝炎抗体阳性患者8项肝功能指标的异常率约7.23%~48.51%,其中3组间的ALT、AST、GGT指标的异常率差异有统计学意义($P<0.05$),且ALT和AST异常率随HCV病毒水平增高而逐渐升高,GGT异常率在HCV阳性组明显高于阴性组,具体见表3。3组间的ALT、AST、GGT、ALB水平差异有统计学意义($P<0.05$);其中,每2组间ALT水平差异均有统计学意义,随着病毒水平增高逐渐升高;低中病毒水平组和高病毒水平组AST水平高于阴性组,差异有统计学意义($P<0.05$),但两病毒组间差异无统计学意义($P>0.05$);两病毒组的GGT水平高于阴性组,低中病毒组与

表2 不同HCV病毒水平组的年龄和性别分布

Table 2 Age and gender distribution in different HCV virus load level groups

组别	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	性别(<i>n</i>)	
		男	女
阴性组	47.85±16.01	39	29
低中病毒水平组	50.19±14.26	65	46
高病毒水平组	48.59±12.8	29	27
合计	49.13±14.44	133	102
统计值F	0.602	0.355	
<i>P</i>	0.549	0.701	

阴性组差异有统计学意义($P<0.05$);而低中病毒组的ALB水平低于阴性组和高病毒水平组,差异有统计学意义($P<0.05$);其余肝功能指标3组间差异无统计学意义($P>0.05$)具体见表4。HCV RNA水平与ALT、AST、GGT水平呈正相关($P<0.05$)具体见表5。

表3 不同HCV病毒水平组的肝功能异常率 [*n*(%)]

Table 3 Abnormal rate of liver function in different HCV virus load level groups [*n*(%)]

	<i>n</i>	ALT	AST	GGT	ALP	TP	ALB	TBil	DBil
阴性组	68	9(13.24)	6(10.34)	17(25)	4(5.88)	13(19.11)	14(20.58)	21(30.88)	22(32.35)
低中病毒水平组	111	62(56.36)	64(57.66)	66(59.46)	10(9.01)	38(34.23)	35(31.53)	39(35.14)	55(49.55)
高病毒水平组	56	43(76.79)	37(66.07)	31(55.36)	3(5.36)	13(23.21)	9(16.07)	21(37.5)	24(42.85)
合计	235	107(45.53)	107(45.53)	114(48.51)	17(7.23)	64(27.23)	58(24.68)	81(34.47)	101(42.98)
统计值 χ^2		54.198	53.054	21.426	1	8.953	5.648	4.275	5.089
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	0.606	0.062	0.059	0.37	0.079

3 讨论

由于HCV感染缺乏预防性疫苗,加强早期诊断和治疗是目前控制HCV感染策略中最为有效的手段^[6]。HCV抗体检测是HCV感染最重要的筛查方式,HCV RNA检测是诊断的金标准^[7-8],它们有着各自的优缺点:HCV抗体检测虽然简单方

便,但它不能区分现症感染和既往感染;HCV RNA检测的是病毒RNA含量,可以直接反映体内HCV的复制情况,因此探讨HCV抗体阳性和HCV RNA阳性的一致性具有重要意义。在本实验中,HCV抗体阳性患者中HCV RNA阳性率为71.06%,高于文献报道的67.0%^[4]和47.40%^[9],可能的原因一是检测的试剂厂家不同,包被的HCV

表4 不同病毒水平组的肝功能指标 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Liver function indexes in different HCV virus load level groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST	GGT	ALP	TP	ALB	TBI	DBI
阴性组(1)	24.57±16.54	26.26±17.24	45.44±95.43	78.75±48.33	72.99±6.89	41.12±6.52	14.85±9.94	6.69±7.73
低中病毒水平组(2)	74.77±89.00	89.04±237.63	82.98±90.77	92.91±47.19	74.57±9.04	37.05±6.63	18.36±16.97	7.89±7.67
高病毒水平组(3)	90.14±70.71	68.00±51.33	85.88±145.45	84.64±36.37	72.26±9.50	39.47±6.26	15.01±6.78	6.28±3.79
合计	63.91±75.15	65.88±167.21	72.81±108.45	86.84±45.43	73.56±8.61	38.80±6.72	16.55±13.32	7.16±6.98
3组间 (<i>P</i> ,统计值)	<0.001, 69.299	<0.001, 56.825	0.046, 3.115	0.118,2.155	0.225, 2.985	<0.001, 8.630	0.307, 2.364	0.302,1.202
1-2间 (<i>P</i> ,统计值)	<0.001, -6.622	<0.001, -6.638	0.009, -2.634	-	-	<0.001, -4.014	-	-
1-3间 (<i>P</i> ,统计值)	<0.001, -7.732	<0.001, -6.624	0.066, -1.858	-	-	0.155, 1.430	-	-
2-3间 (<i>P</i> ,统计值)	<0.015, -2.432	0.708, -375	0.875, -0.158	-	-	0.025, -2.269	-	-

ALT、AST、GGT和ALP单位是U/L,TP和ALB单位是g/L,TBI和DBI单位是 $\mu\text{mol/L}$ 。1、2和3分别为阴性组、低中病毒水平组和高病毒水平组。GGT、ALP、ALB、DBI数据方差齐($P>0.05$),多组间的比较采用One-Way ANOVA分析,2组间的比较采用独立样本*t*检测。ALT、AST、TP、TBI数据方差不齐($P<0.05$),多组间的比较采用非参数检验Kruskal-wallisH(K)分析,2组间的比较采用Mann-Whitney U分析。“-”表示多组间比较无统计学意义时,未进行两两比较。

表5 HCV RNA水平与肝功能指标的相关性

Table 5 Correlation between HCV RNA level and liver function index

	ALT	AST	GGT	ALP	TP	ALB	TBI	DBI
相关系数	0.505	0.407	0.284	0.117	0.048	0.083	0.035	0.061
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.074	0.467	0.202	0.599	0.353

抗原以及核酸检测下限不一样;二是虽然研究选取的都为医院就诊患者,但存在分布差异,本研究中患者大部分为门诊肝病专科患者,这可能是主要的原因。本研究中大约29% HCV抗体阳性患者核酸检测结果为阴性,一部分患者可能是既往感染,目前已经自发清除病毒,一部分患者可能是处于感染间隙期或者病毒复制水平过低,导致HCV RNA低于检测下限而无法检出^[10],建议HCV抗体阳性但HCV RNA阴性的患者应于3个月后复查,防止漏检^[11]。本研究发现不同HCV病毒水平组之间的年龄和性别分布差异无统计学意义($P>0.05$),不同性别间HCV RNA水平差异无统计学意义($P>0.05$),与邵林楠等人^[12]的研究相同。

HCV主要会引起患者肝脏发生慢性炎症坏死及纤维化,进一步可能进展为肝癌^[13]。肝功能生化指标检测是其疾病进程监测以及治疗方案调整的良好指标。在本研究中,3组间的ALT、AST、GGT指标的异常率差异有统计学意义($P<0.05$),且ALT和AST异常率随病毒水平增高而逐渐升

高,有病毒感染组的GGT异常率明显高于阴性组,钱明^[14]、张瑾^[15]、邵芳等人^[16]也发现ALT的异常率随HCV RNA水平的升高而增大。HCV RNA水平与ALT、AST、GGT水平呈正相关($P<0.05$),ALT、AST水平在有病毒水平组明显高于阴性组,且随病毒水平增高而逐渐升高,与文献报道一致^[17-19]。本研究中部分HCV感染患者的ALT、AST、GGT水平正常,可能是处于HCV感染早期或者病毒损伤较轻,HCV RNA携带时间的长短也是肝功能指标变化的原因之一。本研究发现低中水平病毒组的GGT水平明显高于阴性组,但高病毒水平组则与阴性组差异无统计学意义($P=0.066$),可能是高病毒水平组例数较少或者部分患者进行了药物治疗。低中病毒水平组的ALB水平低于阴性组和高病毒水平组,与文献报道一致^[20-21],也有研究者^[22]发现ALB水平随HCV RNA水平升高而升高。部分HCV RNA高水平病毒患者的ALB正常或轻微降低,可能是病毒损伤肝脏是一个持续的过程,由于肝细胞代偿能力强,在损

伤轻微时不影响肝脏合成功能。在本研究中ALP、TG、TBil和DBil水平变化不是很明显,孟宪春等^[23]研究表明随HCV RNA水平的升高,TBil、DBil水平升高,ALP水平有所升高但不及其它肝功能指标,可能与患者病毒呈携带状态有关,肝细胞代偿能力强,代谢功能并未受影响,但仍有待进一步随访观察和动态分析。综合这8项肝功能指标,ALT、AST、GGT在反应病毒复制水平上具有较好的提示价值,表明HCV感染、复制过程中以直接损伤肝细胞为主,导致肝实质损伤,而对肝细胞蛋白合成功能、排泄功能影响较小。

对抗HCV抗体初筛阳性患者进行HCV RNA检测可以准确有效判定地HCV的感染,但由于在窗口期或因灵敏度限制而导致漏检,无法直接反应病毒对机体的损伤程度。而肝功能指标的检测可以反应肝功能的损伤程度,对临床治疗有一定的指导意义,并且对于低病毒载量的患者的发现有一定提示作用,但是无法区别病因。HCV RNA检测和肝功能检测各有优缺点,不能相互替代,因此,在HCV抗体初筛阳性患者中,将两者联合应用,对HCV的早期诊断及疗效检测具有重要的临床价值^[24-26]。

综上所述,对丙型肝炎抗体检测阳性的患者联合HCV RNA检测和主要肝功能指标检测,尤其是ALT、AST、GGT项目,将有助于准确诊断其感染情况、监测病毒活动和评估肝脏损害程度,对丙型肝炎的诊断和治疗具有十分重要的临床意义。

参考文献

- [1] Taherkhani R, Farshadpour F. Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges [J]. World J Hepatol, 2017, 9(33): 1239-1252.
- [2] Moosavy SH, Davoodian P, Nazarneshad MA, et al. Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection [J]. Electronic Physician, 2017, 9(10): 5646-5656.
- [3] 王伟, 葛亮, 居朝霞. 抗-HCV-IgG抗体及血清HCV RNA在丙型肝炎诊断中的应用价值[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(6): 602-605.
- [4] 黄毛山, 黄毛山, 王秋英, 等. 379例HCV感染者丙型肝炎病毒载量与抗HCV及肝功能指标的相关性分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(4): 291-293.
- [5] 范和发, 郑辉才. 慢性乙型肝炎患者ALT、GGT、ALP、CHE、Alb/GLb、PA、TBIL、HBV标志物定量与组织病理学的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2015(20): 3294-3297.
- [6] Swann RE, Cowton VM, Robinson MW, et al. Broad anti-hepatitis C virus (HCV) antibody responses are associated with improved clinical disease parameters in chronic HCV infection [J]. Journal of Virology, 2016, 90(9): 4530-4543.
- [7] 陈峰, 唐晓宇, 吴尔翔, 等. ELISA法检测HCV cAg、抗-HCV及RT-PCR法检测HCV-RNA的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(8): 1097-1098.
- [8] 罗碧芬, 魏来. 慢性丙型肝炎治疗的机遇与挑战[J]. 中华肝病杂志, 2017, 25(3): 161-163.
- [9] 陈会枝. HCV-RNA联合肝功能主要指标对HCV抗体检测阳性者诊断意义的评价[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(27): 145-147.
- [10] 吴红, 徐咏, 朱锦宏, 等. HCV-IgG、HCV-cAg与HCV-RNA对丙型肝炎诊断的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(14): 1890-1891.
- [11] 王秋实, 郝文波, 罗树红. 丙型肝炎免疫诊断的前景与优势[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(1): 55-60.
- [12] 邵林楠, 张树婷, 段莹, 等. HCV RNA病毒载量和肝功能以及白蛋的相关性研究[J]. 临床血液学杂志, 2018, 31(8): 596-599.
- [13] 高荣, 徐力, 徐杰, 等. 丙型肝炎病毒诱发肝细胞肝癌的分子机制[J]. 微生物与感染, 2017, 12(5): 310-319.
- [14] 钱明, 袁君君, 傅剑钊, 等. HCV-RNA和抗-HCV和ALT联合检测在丙肝中的诊断应用[J]. 中国实用医药, 2011, 6(14): 5-6.
- [15] 张瑾, 张娟, 薛晓宁, 等. 血清HCV RNA载量、HCV抗体及ALT相关性研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2017, 40(2): 83-86.
- [16] 邵芳. HCV抗原、HCV抗体及HCV-RNA联合ALT的相关性及其临床意义[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(2): 80-82.
- [17] 张玉英, 郭雅琪, 师志云, 等. 回族地区慢性丙型肝炎患者HCV-RNA与ALT、AST、AST/ALT及抗-HCV的相关性研究[J]. 中国保健营养, 2016, 26(20): 13.
- [18] 薛丽, 黄芳, 张彦平, 等. 丙肝患者血清HCV-RNA含量与肝功能及血常规指标的相关性[J]. 现代检验医学杂志, 2017(5): 110-114.
- [19] 黄秀琼, 吴英. 110例丙肝患者HCV-RNA载量及抗-HCV与肝功能指标的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1809-1810.

(下转第223页)

· 论 著 ·

LASP-1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及与其临床病理特征的相关性分析

李君强* 蒋茂芬 唐晶晶 王敏 刘春姣 肖维华 马海芬

[摘要] 目的 探讨 LASP-1 蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及与其临床病理特征的相关性。方法 选取2014年1月至2018年5月在本院就诊的102例NSCLC患者作为研究对象,整理分析患者临床病例资料,采用免疫组化方法检测NSCLC患者癌组织和病灶边缘5 cm处正常组织中LASP-1蛋白表达,分析肿瘤患者癌组织中LASP-1蛋白表达与其病理特征的相关性。结果 NSCLC患者癌组织中LASP-1蛋白的阳性表达率(66.67%)显著高于癌旁正常组织(19.61%),差异具有统计学意义($P<0.05$);不同性别、年龄、肿瘤大小和病理类型的NSCLC患者其LASP-1蛋白阳性表达率无统计学意义($P>0.05$),但肿瘤低分化、TNM分期Ⅲ期+Ⅳ期,浸润深度T3+T4、以及出现淋巴结转移的NSCLC患者其LASP-1蛋白的阳性表达率显著升高($P<0.05$)。结论 LASP-1蛋白在NSCLC患者癌组织中表达水平较高,且与肿瘤分化程度、TNM分期、浸润深度和淋巴结的转移有着密切联系;LASP-1蛋白表达水平的增加可能参与NSCLC的侵袭和转移。

[关键词] LASP-1蛋白;非小细胞肺癌;临床分期;分化程度;淋巴结转移

Expression of LASP - 1 Protein in Non - small Cell Lung Cancer and Its Correlation with Clinicopathological Features

LI Junqiang*, JIANG Maofen, TANG Jingjing, WANG Min, LIU Chunjiao, XIAO Weihua, MA Haifen
(Department of Pathology, People's Hospital of Beilun District, Ningbo, Zhejiang, China, 315800)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression of LASP-1 protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinicopathological features. Method 102 patients with NSCLC who were admitted to our hospital from January 2014 to May 2018 were selected as subjects. The clinical data of all patients were analyzed and all the general conditions such as gender and age and diseases were recorded. The expression of LASP-1 protein in cancer tissues and normal tissues of NSCLC patients was detected by Immunohistochemistry, and differences in expression of LASP-1 protein were compared in different patients. Results The positive expression rate of LASP-1 protein in cancer tissues of NSCLC patients (66.67%) was significantly higher than that in adjacent normal tissues (19.61%) ($P<0.05$). There was no difference in the positive expression rate of LASP-1 protein in NSCLC patients with different gender, age, size of tumor and pathological type ($P>0.05$). However, the positive expression rate of LASP-1 protein was significantly increased in patients with poorly differentiated tumor, tumor node metastasis TNM stage Ⅲ + stage Ⅳ, invasive depth T3+T4, and lymph node metastasis ($P<0.05$). Conclusion The expression level of LASP-1 protein in NSCLC patients is high, and it is closely related to differentiation of tumor, TNM stage, depth of invasion and metastasis of lymph node. An increase in the expression level of LASP-1 protein may be involved in promoting invasion and metastasis of NSCLC.

[KEY WORDS] LASP-1 protein; Non-small cell lung cancer; Clinical stage; Differentiation; Lymph node metastasis

基金项目:浙江省医学会临床科研基金项目(2016ZYC-B5)

作者单位:浙江省宁波市北仑区人民医院病理科,浙江,宁波 315800

*通信作者:李君强, E-mail: uiim4iq6ok@sina.com

肺癌发病率在世界恶性肿瘤中排名第一,死亡率也位居首位,是一个严重影响居民健康和生活质量的公共卫生问题^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最为常见类型,所占比例约为80%~85%^[2-3]。手术治疗是早期NSCLC治疗的首选有效手段,而治疗失败原因主要因为晚期转移及恶性程度较高等。曾有国内外研究报道,肿瘤转移是多步骤、多因素参与的生物学过程,其中细胞迁移为肿瘤转移的首要步骤,而细胞肌动蛋白骨架重构是细胞运动的第一步,故认为肌动蛋白的表达与肿瘤细胞的转移有着一定的联系^[4-5]。LASP-1蛋白是近年来发现的一种新的肌动蛋白结合蛋白和斑粘结合蛋白支架蛋白,与肿瘤侵袭转移有着密不可分的关系^[6]。曾有研究报道,LASP-1cDNA最早由乳腺癌转移性淋巴结的cDNA文库中筛选克隆而得到^[7]。而在近年研究报道中证实,LASP-1cDNA在肝癌、食管鳞癌、肾透明细胞癌、胃癌及胆囊癌组织中表达异常较为多见,关于其在NSCLC中的表达及其作用机制尚未明确^[8]。本文旨在探讨LASP-1蛋白在NSCLC癌组织中的表达及与其临床病理特征的相关性,分析LASP-1蛋白在NSCLC发生和进展中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机选取2014年1月至2018年5月在本院就诊的102例NSCLC患者作为研究对象,其中男61例,女41例,年龄为48~80岁,平均年龄为(58.36±5.64)岁。纳入标准:①所有患者均符合临床上NSCLC明确诊断标准^[9];②所有患者完善准备后均行手术治疗且术中及术后均行病理学检查确诊;③所有患者知情同意本研究并签署知情同意书。排除标准:①存在手术禁忌症者;②除NSCLC外存在其他恶性肿瘤者;③存在原发性肝肾、功能障碍者;④临床病例资料不完整或缺乏准确性者。

1.2 研究方法

收取102例NSCLC患者中肺鳞状细胞癌与腺癌组织共102份(观察组),另收集肺癌旁组织形态学正常的肺组织(距离肿瘤5 cm以上)102份(对照组),2组组织标本均采用免疫组化EnVision法进行LASP1蛋白水平的检测。

1.2.1 检测所需试剂/仪器

免疫组化试剂盒(H.SABC, SAI082)购于武汉

博士德生物工程有限公司;自动切片机购自德国LECIA公司;显微摄像仪(BX60型)购自日本Olympus公司;Simply P总RNA提取试剂盒购自杭州博日科技有限公司;RT-PCR试剂盒(批号AK2801)购自于日本TaKaRa公司;荧光定量PCR仪(PRISM7700)购自美国应用生物系统(ABI)公司;LASP-1一抗体购自上海慧颖科技有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)由本医院提供,山羊抗兔/鼠二抗购自上海睿铂赛生物科技有限公司。

1.3 免疫组化检测方法

采用Envision法检测:所有标本组织石蜡切片厚度为4 μm,裱片后60℃烘烤2~4 h;二甲苯2次及酒精梯度脱蜡至水;置切片于1.5%甲醇过氧化氢液(室温10 min)阻断内源性过氧化物酶,将切片取出用自来水冲洗干净,置切片于pH值为9.0的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)修复液进行抗原修复(煮沸20 min,室温冷却20 min);将切片用自来水清洗干净,依次入蒸馏水1次、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)3次;将切片放于孵育盒上滴加正常非免疫山羊血清;将血清清除后,滴加1:600浓度的LASP-1一抗(来源于英国Abcam公司)4℃孵育过夜,对照组采用PBS代替一抗;次日取出切片置于自来水、蒸馏水1次、PBS 3次清洗切片;滴加山羊抗兔/鼠二抗(DAKO)室温孵育30 min;二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,苏木精复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,最后中性树脂封片。

1.4 资料收集与染色结果判读

记录所有患者性别、年龄、肿瘤大小、病理类型、分化程度、浸润深度、TNM分期系统(tumor node metastasis, TNM)分期以及淋巴结转移情况和不同组织标本中LASP-1蛋白的表达水平,并比较不同组织中LASP-1蛋白表达水平的差异。LASP-1蛋白结果评定方法^[10]:每个标本随机选取10个高倍视野(×100)的阳性细胞百分比计算,以其平均值作为评定依据。阳性染色为淡黄色、棕褐色或棕黄色,呈团块状或颗粒状。专业技术人员根据染色强度进行评分^[11]:3分为棕褐色,2分为棕黄色,1分为浅黄色;0分为无色;根据阳性细胞所占比例评分:全阴性为0分,阳性细胞>75%为4分,51%~75%为3分,11%~50%为2分,≤10%为1分。二者评分的乘积≥2分者则判断为LASP1蛋

白阳性,二者评分的乘积 <2 分者为阴性。将已知阳性切片作为阳性对照。

1.5 统计方法

均采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计数资料通过率或构成比表示,并采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组组织标本中LASP-1蛋白表达情况比较

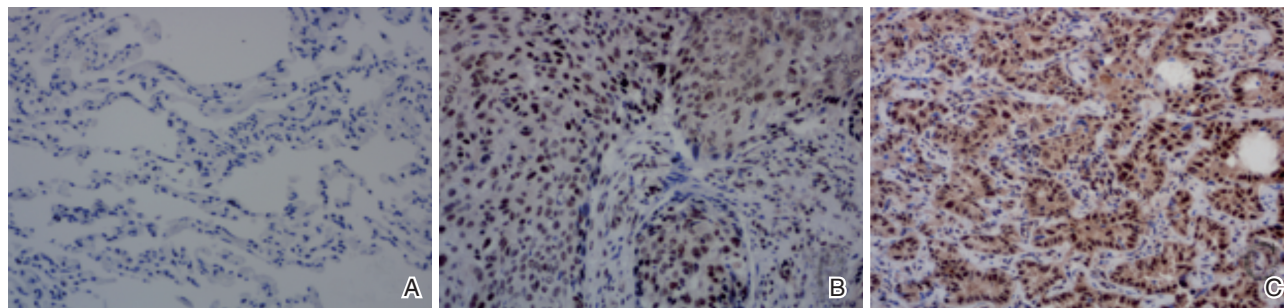
NSCLC 患者癌组织中 LASP-1 蛋白的阳性表达率显著高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表1;且 LASP-1 蛋白在 NSCLC 癌

表1 2组组织标本中LASP-1蛋白表达情况比较

Table 1 Comparison of LASP-1 protein expression in tissue samples from the 2 groups

分组	例数	阳性	阴性	阳性率(%)
对照组	102	20	82	19.61
观察组	102	68	34	66.67
χ^2 值	-	-	-	46.044
P值	-	-	-	<0.001

旁正常组织细胞浆中表现为无色,而在肺鳞状细胞癌和肺腺癌癌组织细胞器细胞浆中表现为棕褐色,见图1A~C。



A:在NSCLC癌旁正常组织中的表达($\times 100$); B:在肺腺癌组织中的表达($\times 100$); C:在肺鳞状细胞癌组织中的表达($\times 100$)。所有标本均采用DAB显色,苏木精复染进行染色,在 $\times 100$ 显微镜下进行观察。

图1 LASP-1蛋白在不同组织中的表达情况

Figure 1 Expression of LASP-1 protein in different tissues

2.2 不同临床病理特征的NSCLC患者其LASP-1蛋白表达情况比较

不同性别、年龄、肿瘤大小和病理类型的NSCLC患者其LASP-1蛋白阳性表达率无差异 ($P > 0.05$),但肿瘤低分化、TNM分期Ⅲ期+Ⅳ期,浸润深度T3+T4、以及出现淋巴结转移的NSCLC患者其LASP-1蛋白的阳性表达率显著较高 ($P < 0.05$),见表2。

3 讨论

目前临床上对于NSCLC的治疗主要以手术为主,但分析大量病例资料可知同样病理类型和分期的NSCLC患者予以相同标准化治疗后,其预后效果仍存在着一定的差异。有研究显示不同病理类型的预后差异可能与肿瘤病灶的侵袭与转移有关^[12]。根据既往文献的报道,细胞中的LASP-1蛋白主要定位在胞浆^[13]。但也有研究报道LASP-1可存在于胞核中^[14]。本研究结果中,LASP-1蛋白主要存在于细胞浆中,与既往研究结果一

致^[15]。曾有文献报道,肿瘤的TNM分期和淋巴结转移均为影响NSCLC患者远期预后生存的主要因素^[16]。而临床分期仍旧为目前临床上NSCLC诊治的主要依据^[17],故及时明确肿瘤病灶是否侵袭和转移是评估患者预后的重要手段。

本研究结果显示,NSCLC患者癌组织中LASP-1蛋白阳性率表达显著高于癌旁正常组织,可提示,LASP-1蛋白与NSCLC的发生可能有着一定的联系。另一方面,本组数据显示,不同性别、年龄、肿瘤大小和病理类型的NSCLC患者其LASP-1蛋白阳性率的表达无明显差异,但肿瘤低分化、TNM分期Ⅲ期+Ⅳ期,浸润深度T3+T4、以及出现淋巴结转移的NSCLC患者其LASP-1蛋白的阳性表达率均显著升高。进一步表明,LASP-1蛋白的表达水平与NSCLC的恶性程度、分期以及病灶的侵袭、转移等均有着密不可分的关系。结合以往生物学研究可知,LASP-1基因染色体定位于17q11-q21.3^[18]。LASP-1蛋白中的SH3和LIM结构域均在蛋白质-蛋白质相互作用中起着极为重要的作

表2 不同临床病理特征的NSCLC患者其LASP-1蛋白表达情况比较[(n, %)]

Table 2 Comparison of LASP-1 protein expression in NSCLC patients with different clinicopathological features [(n, %)]

临床病理特征	例数 (n=102)	LASP-1 蛋白 阳性(n=68)	χ^2 值	P 值
性别			0.020	0.886
男	61	41(67.21)		
女	41	27(65.85)		
年龄(岁)			0.850	0.357
≥ 60	72	46(63.39)		
< 60	30	22(73.33)		
肿瘤直径大小(cm)			0.088	0.766
≥ 3	34	22(64.71)		
< 3	68	46(67.65)		
病理类型			0.000	1.000
腺癌	62	40(64.52)		
鳞癌	40	28(70.00)		
肿瘤分化程度				
低分化	58	48(82.76)		
高、中分化	44	20(45.45)		
TNM 分期			15.668	< 0.001
I 期+ II 期	54	26(48.15)		
III 期+ IV 期	48	42(87.50)		
浸润深度			82.167	< 0.001
T1+T2	64	34(53.13)		
T3+T4	38	34(89.47)		
淋巴结转移			14.176	< 0.001
有	46	42(91.30)		
无	56	26(46.43)		

用,。其中 SH3 结构域可与 palladin 蛋白、脂肪瘤多见融合伴侣、前白介素-16 和血管扩张刺激磷酸蛋白和斑联蛋白等进行相互结合,从而起到一定的作用。曾有不少国内外研究报道,LASP-1 蛋白在机体组织中可通过 SH3 结构域对细胞伪足形成、延伸和侵袭起着一定的促进作用^[19]。故对于分化程度越低,浸润程度越深以及出现淋巴结转移的患者其 LASP-1 蛋白表达更高。而 Krp1 蛋白是一种涉及伪足延伸和细胞运动粘着斑蛋白。相关研究显示,中的 LIM 结构域可与 Krp1 蛋白相互作用,故在 NSCLC 癌组织中,LASP-1 蛋白表达的升高可促使 LIM 结构域与 LASP-1 结合共同定位于膜整合素 CD44 和衔接蛋白 Ezrin^[20]。CD44 与 Ezrin 蛋白均介导细胞与细胞外基质接触,参与细胞内信号转导,进而促进肿瘤细胞的增殖生长。近年来,随着病理学研究的不断深入,有研究报道显示,LASP-1 蛋白与口腔鳞癌细胞的增殖和迁移能力有关,参与了肿瘤的进展和侵袭过程^[21]。对肝癌、食管鳞癌、肾透明细胞癌、胃癌及

胆囊癌研究亦发现 LASP-1 蛋白高表达可促进肿瘤细胞的生长、迁移和浸润能力^[22]。而本组数据结果也表明,肿瘤分化越低、分期越高以及出现周围组织浸润转移的 NSCLC 患者其 LASP-1 蛋白表达水平更高。由此可见,LASP-1 蛋白与恶性肿瘤细胞的增殖生长有着一定的联系。

综上所述,LASP-1 蛋白在 NSCLC 患者癌组织中表达水平较高,且与肿瘤分化程度、TNM 分期、浸润深度和淋巴结的转移有着密切联系。因此,LASP-1 蛋白表达水平的增加可能参与促进 NSCLC 肿瘤病灶的侵袭和转移。

参考文献

- [1] 段纪俊,严亚琼,杨念念,等.中国恶性肿瘤发病与死亡的国际比较分析[J].中国医学前沿杂志,2016,8(7):17-23.
- [2] 黄汉琼,陈乾华,杨晓蕊.浮舰蛋白-1在非小细胞肺癌组织的表达及意义[J].实用医学杂志,2017,33(14):208-210.

- [3] 宋莉莉, 许凯, 何苗. Fascin 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 诊断病理学杂志, 2017, 23(11):34-36, 42.
- [4] 李米红, 廖子君, 张彦兵, 等. 非小细胞肺癌组织中 Ezrin、Snail 蛋白表达及意义[J]. 山东医药, 2017, 60(42):55-57.
- [5] 童莹, 张峤, 单莉. 神经突起生长因子蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 28(1):384-386.
- [6] 许浩然, 吕艳超, 韩双双, 等. 非小细胞肺癌组织中 p-mTOR、p70 s6 k 的表达变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2016, 56(11):11-13.
- [7] 马西森, 林刚, 林巍. 非小细胞肺癌组织中 Artemin 蛋白的表达研究[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(22):1696.
- [8] 史文博, 王雪, 陈智伟. MiR-106b 通过靶向 BTG3 调控非小细胞肺癌的增殖与细胞凋亡[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(4):10-15.
- [9] 张佩雯, 杨洋. 肺癌患者巨噬细胞抑制因子-1 表达情况及其与临床病理的关系分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(9):208-210.
- [10] Chüeh AC, Liew MS, Russell PA, et al. Promoter hypomethylation of NY-ESO-1, association with clinicopathological features and PD-L1 expression in non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(43):74036-74048.
- [11] 苏林. FSP-1/S100A4 和 E-cadherin 在胃癌及其癌前病变中的表达与临床病理意义[D]. 中国医科大学, 2013, 82(4):209-210.
- [12] 项保利, 钱海红, 李琛, 等. 非小细胞肺癌组织中转录因子 Oct4、Sox2 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2016, 56(13):81-82.
- [13] 祁军安, 梁容瑞, 李宗芳, 等. Lasp-1 蛋白在肝癌组织中表达及临床意义[J]. 西部医学, 2014, 35(8):198-199.
- [14] 高英铭, 辛华, 程龙, 等. ROCK 1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达[J]. 中国实验诊断学, 2017, 20(3):304-306.
- [15] Tomasetto C, Moog-Lutz C, Régnier CH, et al. Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains[J]. Febs Lett, 1995, 373(3):245-249.
- [15] Shi J, Guo J, Li X. Role of LASP-1, a novel SOX9 transcriptional target, in the progression of lung cancer [J]. International journal of oncology, 2018, 52(1):179.
- [16] Wei G, Jiakai H. Silencing of LIM and SH3 protein 1 (LASP-1) inhibits thyroid cancer cell proliferation and invasion [J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2017, 25(6):879-886.
- [17] 胡余敏, 朱君飞. 非小细胞肺癌组织中 FOXC2 和 MMP-9 的表达及临床意义[J]. 浙江医学, 2017, 38(18):284-286.
- [18] 许华, 吴晓芳, 伏利蓉. 2011-2015 年阆中市户籍居民恶性肿瘤死亡情况分析[J]. 预防医学情报杂志, 2018, 33(8):384-386.
- [19] Shi J, Guo J, Li X. Role of LASP-1, a novel SOX9 transcriptional target, in the progression of lung cancer [J]. International journal of oncology, 2018, 52(1):179.
- [20] 贾芳, 赖春花, 周震, 等. LASP-1 对不同来源成骨细胞的运动、成骨功能及细胞周期分布的影响[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(9):33-39.
- [21] 于丽娜, 张文轩, 于洋, 等. shRNA 沉默 LASP-1 对舌鳞状细胞癌 SCC9 细胞增殖和迁移的影响[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(6):336-340.
- [22] 倪洪早, 张芸, 崔晨晨, 等. 沉默 LASP-1 对人胶质瘤细胞的黏附、迁移和侵袭能力的影响及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(4):986-988.

(上接第 218 页)

- [20] 梁爱玲, 何瑞芬, 杜宗孝. 血清 HCV-RNA 含量与抗-HCV 及 ALT 的相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2016, 38(10):925-927.
- [21] 李钿, 侯婷婷, 索海燕, 等. 丙型肝炎抗体、ALB、ALT 和 HCV-RNA 联合检测对丙型肝炎的诊断意义[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(18):2762-2764.
- [22] 曾珠, 张卫云, 魏丽娟. 丙肝抗体、丙肝病毒 RNA、白蛋白及谷丙转氨酶在丙肝诊断中的应用[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(6):849-851.
- [23] 孟宪春, 王万海, 常谦, 等. 肝功能主要指标对 HCV 抗体检测阳性者诊断意义的评价[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(11):1904-1907.
- [24] 刘文俊, 杨霞芳, 钟秋连, 等. 丙型肝炎患者 RNA 载量和肝功能指标及血细胞参数的相关性分析[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(12):1168-1171.
- [25] 宋振兴. 86 例丙肝患者 HCV-RNA 载量及抗-HCV 与肝功能指标的相关性研究[J]. 中外医疗, 2017, 36(23):23-25.
- [26] 薛丽, 许楠, 周挺, 等. 血清丙型肝炎病毒-RNA 含量联合肝功能检测在丙型肝炎患者诊断中的应用价值研究[J]. 中国医师进修杂志, 2017, 40(10):916-919.

普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响

韩莉莎* 王琼 李丹 王思琪

[摘要] **目的** 研究普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响。**方法** 选取本院88例糖尿病合并冠心病患者,随机分为对照组(44例)和联合用药组(44例),对照组给予美托洛尔治疗,联合用药组给予普伐他汀+美托洛尔治疗,均治疗8周,比较2组治疗前后糖代谢、脂代谢、心功能、炎症因子等指标的变化。**结果** 治疗后,2组高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、左室射血分数(LVEF)、舒张早期峰值速度/舒张晚期峰值速度(E/A)均显著升高($P<0.05$),空腹血糖、空腹胰岛素、糖化血红蛋白、餐后2h血糖、胰岛素敏感指数、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、左室舒张末期内径(LVEDD)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、低密度脂蛋白受体(sLR11)、N末端B型利钠肽原(NT-proBNP)的水平均显著降低($P<0.05$),且联合用药组上述指标变化幅度均显著大于对照组($P<0.05$)。**结论** 普伐他汀联合美托洛尔可有效改善糖尿病合并冠心病患者心功能,改善糖代谢、脂代谢,降低炎症因子水平,从而降低患者发生心血管事件的风险,联合用药优于单一用药。

[关键词] 糖尿病;冠心病;普伐他汀;美托洛尔

Effects of pravastatin combined with metoprolol on the cardiac function, glucolipid metabolism and other related indexes in patients with diabetes mellitus complicated with coronary heart disease

HAN Lisha*, WANG Qiong, LI Dan, WANG Siqi

(Department of Cardiovascular Medicine, First People's Hospital of Ziyang, Ziyang, Sichuan, China, 641300)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of pravastatin combined with metoprolol on cardiac function, glucolipid metabolism and other related indexes in patients with diabetes mellitus complicated with coronary heart disease (CHD). **Methods** 88 patients with diabetes mellitus complicated with CHD in the hospital were selected and randomly divided into the control group ($n=44$) and the combined medication group ($n=44$). The control group was treated with metoprolol, and the combined medication group was treated with pravastatin combined with metoprolol for 8 weeks. The changes of glucose metabolism, lipid metabolism, cardiac function, inflammatory factors and other indexes were compared between the 2 groups before and after treatment. **Results** After treatment, the high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), left ventricular ejection fraction (LVEF), the early diastolic peak velocity/advanced diastolic peak velocity (E/A) were significantly increased in the 2 groups ($P<0.05$), while the levels of fasting blood glucose, fasting insulin,

基金项目:四川省卫计委科研项目(阿伐他汀联合益气复脉注射液治疗冠心病慢性心力衰竭患者的临床疗效观察及对sCD40、sCD146、PAPP-A的影响)(2016027)

作者单位:资阳市第一人民医院心血管内科,四川,资阳 641300

*通信作者:韩莉莎, E-mail:31760106@qq.com

glycosylated hemoglobin, 2 h postprandial blood glucose, insulin sensitivity index, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), late diastolic peak velocity (A peak), high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP), interleukin -6 (IL-6), interleukin -8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α), low density lipoprotein receptor (sLR11), N-terminal N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) were significantly decreased ($P<0.05$), and the changes of the above indexes in the combined medication group were significantly greater than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Pravastatin combined with metoprolol can effectively improve the cardiac function, regulate glucose metabolism and lipid metabolism, reduce the inflammatory factors levels, thus decreasing the risk of cardiovascular events in patients with diabetes mellitus complicated with CHD. The combined medication is better than single drug.

[KEY WORDS] Diabetes mellitus; Coronary heart disease; Pravastatin; Metoprolol

我国是糖尿病高发国家,2013年的糖尿病患者人数将近1亿,该病最主要的危害是慢性并发症较多,冠心病是其最危险的并发症之一^[1]。由于血糖长期处于高水平状态,导致冠状动脉粥样硬化,病史越长,心血管更狭窄,造成患者心肌缺血,从而引发冠心病^[2]。糖尿病合并冠心病患者多以静养为主,尽量避免大量剧烈运动,主要给予降糖、抗凝、扩张冠状动脉、抗心律失常、止痛等药物进行治疗^[3]。本研究对资阳市第一人民医院收治的糖尿病合并冠心病患者应用普伐他汀联合美托洛尔治疗,旨在探讨两药联用的临床疗效,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年1月至2016年1月本院收治的88例糖尿病合并冠心病患者。纳入标准:符合《中国2型糖尿病防治指南》(2013年版)^[4];所有患者均临床确诊为Ⅱ型糖尿病且合并有冠心病;稳定型心绞痛,心功能Ⅱ级;无甲功异常、心功能不全、肝肾功能异常、肿瘤、风湿或急慢性感染性疾病等;经本院伦理委员会审核同意,患者均同意参与治疗研究并签署知情同意书。排除标准:严重心衰竭患者;对本研究用药有禁忌症;妊娠期或哺乳期妇女。按随机数字表法,将患者随机分为联合用药组(44例)和对照组(44例)。对照组男23例,女21例,平均年龄(56.49 ± 6.28)岁,平均病程(8.39 ± 2.15)年;联合用药组男22例,女22例,平均年龄(56.83 ± 6.45)岁,平均病程(8.46 ± 2.28)年。2组一般资料比较,均无显著差异($P>0.05$)。

1.2 治疗方法

所有患者均控制饮食的同时服用抗血小板药物阿司匹林肠溶胶囊(华中药业股份有限公司,国

药准字H42022876,0.3g)口服0.3g/次,3次/d,降糖药格列本脲片(百正药业股份有限公司,国药准字H41022447,2.5mg)口服2.5mg/次,3次/d,扩冠药硝酸甘油控释口颊片(上海信谊天平药业有限公司,国药准字H10900079,1mg)1mg/次,1次/d舌下含服,调脂药烟酸缓释片(华润赛科药业有限责任公司,国药准字H20030714,0.5g)口服0.5g/次,3次/d,除这些基础治疗外,对照组给予美托洛尔(阿斯利康制药有限公司,国药准字H32025392,0.1g)口服治疗,首服剂量为6.25mg/次,2次/d,逐渐增加剂量,最大剂量为100mg/d;联合用药组口服美托洛尔的同时,加用普伐他汀钠片(第一三共制药(上海)有限公司,国药准字H20040101,20mg)每晚口服,20mg/次,1次/d。2组均治疗8周。

1.3 仪器/试剂

ZX7M-7180全自动生化仪购自日本株式会社日立制作所;Thermo Heraeus Multifuge X1离心机购自美国热电公司;IE33彩色多普勒超声诊断仪购自荷兰飞利浦公司;血糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法)购自北京利德曼生化技术有限公司;胰岛素放射免疫试剂盒购自上海瑞齐生物科技有限公司;高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)及甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒购自上海申索佑福医学诊断用品有限公司;超敏C反应蛋白(hypersensitive C reactive protein, hs-CRP)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;可溶性低密度脂蛋白受体11(soluble low density lipoprotein receptor 11,

sLR11)试剂盒购自武汉塞培生物科技有限公司、N末端B型利钠肽原(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)试剂盒购自苏州达麦迪生物医学科技有限公司。

1.4 观察指标

①血糖水平:分别采集患者治疗前后清晨空腹静脉血,静置离心,取上清液,存于 -80°C 冰箱待测;采用全自动生化仪检测空腹血糖、餐后2 h血糖、空腹胰岛素及糖化血红蛋白;②血脂水平:采用全自动生化仪检测血清HDL-C、LDL-C、TC及TG水平;③心功能指标:采用心脏超声检查患者治疗前后舒张早期峰值速度/舒张晚期峰值速度(peak velocity at early diastole/peak velocity of late diastole, E/A)、左室射血射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD);

④炎症因子水平:采用酶联免疫吸附法测定血清hs-CRP、IL-6、IL-8和TNF- α 水平;⑤预后指标:采用酶联免疫吸附法测定血清sLR11水平,采用化学发光免疫法测定血清NT-proBNP的水平。

1.5 数据分析

应用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,sLR11、NT-proBNP等计量数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验进行分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组治疗前后糖代谢比较

治疗后,2组患者空腹血糖、空腹胰岛素、糖化血红蛋白、餐后2 h血糖均显著降低($P<0.05$),联合用药组糖代谢指标变化幅度大于对照组($P<0.05$),差异有统计学意义。见表1。

表1 2组治疗前后糖代谢比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of glucose metabolism before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(mU/L)	糖化血红蛋白(%)	餐后2 h血糖(mmol/L)
联合用药组 (n=44)	治疗前	9.36 $\pm$ 2.29	14.98 $\pm$ 2.07	8.20 $\pm$ 1.38	13.64 $\pm$ 2.99
	治疗后	6.18 $\pm$ 2.02 ^{ab}	9.76 $\pm$ 1.54 ^{ab}	6.82 $\pm$ 0.69 ^{ab}	8.11 $\pm$ 2.26 ^{ab}
对照组 (n=44)	治疗前	9.53 $\pm$ 2.32	15.14 $\pm$ 2.25	8.15 $\pm$ 1.66	13.85 $\pm$ 3.17
	治疗后	7.62 $\pm$ 2.25 ^a	11.42 $\pm$ 2.37 ^a	7.43 $\pm$ 1.85 ^a	10.63 $\pm$ 3.31 ^a

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

2.2 2组治疗前后血脂水平比较

治疗后,2组患者HDL-C均显著升高($P<0.05$),TC、TG及LDL-C均显著降低($P<0.05$);联

合用药组变化幅度大于对照组($P<0.05$),差异有统计学意义。见表2。

表2 2组治疗前后血脂水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of blood lipids levels before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)
联合用药组 (n=44)	治疗前	5.44 $\pm$ 1.23	2.51 $\pm$ 0.62	4.28 $\pm$ 0.86	1.29 $\pm$ 0.23
	治疗后	4.29 $\pm$ 1.02 ^{ab}	1.73 $\pm$ 0.52 ^{ab}	3.16 $\pm$ 0.58 ^{ab}	1.78 $\pm$ 0.37 ^{ab}
对照组 (n=44)	治疗前	5.62 $\pm$ 1.25	2.43 $\pm$ 0.63	4.17 $\pm$ 0.98	1.30 $\pm$ 0.26
	治疗后	4.86 $\pm$ 1.07 ^a	2.12 $\pm$ 0.56 ^a	3.62 $\pm$ 0.61 ^a	1.51 $\pm$ 0.34 ^a

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

2.3 2组治疗前后心功能指标比较

治疗后,2组患者LVEF、E/A均显著升高($P<0.05$),LVEDD显著降低($P<0.05$),联合用药组各

心功能指标变化幅度显著大于对照组($P<0.05$),差异有统计学意义。见表3。

表3 2组治疗前后心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of cardiac function indexes before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	LVEF(%)	LVEDD(mm)	E/A
联合用药组 (n=44)	治疗前	43.54±6.25	55.51±7.28	0.83±0.17
	治疗后	52.60±6.64 ^{ab}	45.37±6.32 ^{ab}	1.07±0.26 ^{ab}
对照组 (n=44)	治疗前	43.20±6.18	56.14±7.06	0.82±0.15
	治疗后	47.18±6.53 ^a	49.54±6.15 ^a	0.93±0.23 ^a

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

2.4 2组治疗前后炎症因子水平比较

治疗后, 对照组和联合用药组血清 CRP、IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.05$), 且联合用药组血清炎症因子降低幅度显著大于对照组 ($P<0.05$), 差异有统计学意义。见表4。

2.5 2组治疗前后预后指标比较

治疗后, 2组血清 sLR11、NT-proBNP 水平均显著下降 ($P<0.05$), 联合用药组血清 sLR11、NT-proBNP 水平下降幅度大于对照组 ($P<0.05$), 差异有统计学意义。见表5。

表4 2组治疗前后炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of inflammatory factors levels before and after treatment between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	hs-CRP (mmol/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
联合用药组 (n=44)	治疗前	7.71±1.30	30.39±9.45	91.85.12±8.93	11.18±3.56
	治疗后	2.98±0.96 ^{ab}	15.83±5.27 ^{ab}	72.53±9.86 ^{ab}	4.68±1.52 ^{ab}
对照组 (n=44)	治疗前	7.65±1.35	31.68±9.56	92.77±10.15	11.35±2.92
	治疗后	4.72±1.23 ^a	24.35±8.11 ^a	80.26±9.94 ^a	8.63±2.76 ^a

与同组治疗前比较, ^a $P<0.05$; 与对照组治疗后比较, ^b $P<0.05$ 。表5 2组治疗前后预后指标比较 [$n(\%)$]Table 5 Comparison of prognosis indicators before and after treatment between the 2 groups [$n(\%)$]

组别	时间	sLR11 (ng/mL)	NT-proBNP
联合用药组 (n=44)	治疗前	34.79±9.56	2.06±0.65
	治疗后	22.45±7.48 ^{ab}	1.29±0.42 ^{ab}
对照组 (n=44)	治疗前	35.08±9.62	2.09±0.66
	治疗后	28.94±9.53 ^a	1.68±0.54 ^a

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

3 讨论

糖尿病是冠心病、高血脂症、心血管疾病的高危因素, 糖尿病合并有冠心病的临床症状较多且不典型, 患者需长期服用多种药物严格控制血糖、血压及血脂^[5]。糖尿病合并有冠心病患者需控制热量的摄入, 多吃碳水化合物, 作息规律, 保证睡眠充足, 避免熬夜^[6]。临床研究表明, β 受体阻断药可降低糖尿病合并冠心病患者的病死率, 其中以美托洛尔为代表^[7]。

普伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A, HMG-CoA)

还原酶的竞争性抑制剂, LDL-C 受体表达和胆固醇合成大多不在白天而是夜晚, 晚上服用普伐他汀后体内药物浓度较高, 能更好的发挥其药理作用且降低不良反应, 增加细胞表面 LDL-C 受体的数量, 还能抑制胆固醇的合成, 加速 LDL-C 的分解代谢, 减少 LDL-C 的生成, 从而降低血脂^[8]。美托洛尔是 β_1 受体阻断剂, 能选择性阻断 β_1 肾上腺素受体, 阻断交感-肾上腺素系统, 降低儿茶酚胺对心肌细胞的毒性, 改善心功能^[9-10]。本研究结果显示, 2组患者治疗后糖代谢指标均显著降低, 脂代谢和心功能指标均显著改善, 说明普伐他汀联合美托洛尔能有效改善患者糖代谢、脂代谢、心功能, 普伐他汀与美托洛尔两药的作用有差异, 这与 2 种药物作用的受体不同有关^[11]。普伐他汀与美托洛尔联合用药各自的药理作用不受影响, 联合用药组各指标变化幅度显著大于美托洛尔单药, 可能与普伐他汀与美托洛尔联合用药具有叠加作用有关。本研究与端木鲁健等^[12]、黄海燕等^[13]的研究结果一致。普萘洛尔和美托洛尔容易造成患者低血糖, 但症状不明显, 患者使用时应密切监控血糖水平, 以防因低血糖导致患者冠心病加重。

炎症因子异常表达是糖尿病合并冠心病患者息息相关的危险因素^[14],本研究发普伐他汀和美托洛尔均具有抑制炎症细胞和炎症因子表达的作用,普伐他汀联合美托洛尔炎症降低的幅度大于美托洛尔单药,提示联合用药改善患者糖代谢、脂代谢和心功能的作用机制可能与减轻患者炎症反应有关^[15]。hs-CRP异常增高可加速动脉粥样硬化进程,普伐他汀联合美托洛尔可抑制TNF- α 的活性,下调IL-6、IL-8和hs-CRP的转录,通过通路降低胰岛素敏感指数,降低胰岛素抵抗,改善血管内皮功能,抑制血管斑块炎性反应^[16]。Vongprommek等^[17]研究表明,动脉粥样硬化患者血清sLR11水平明显升高,猜测sLR11可能参与了冠心病的发生、发展,与患者预后密切相关。本文中,2组患者治疗后的血清sLR11水平均显著降低,另外,sLR11的表达与患者高血糖状态呈正相关,它还可间接反映患者体内血糖水平,与患者冠脉病变程度息息相关。NT-proBNP是心肌细胞受牵拉或血管透壁压力超负荷时,合成和分泌大量的proBNP在分泌过程或进入血液时转变成的具有生物活性的N端片段,是反映心脏功能的重要指标,同时也对冠心病患者的预后评估具有重要价值^[18]。本文中,2组患者心脏都存在不同程度的异常,治疗后,2组血清NT-proBNP水平均显著下降,联合用药组下降幅度大于对照组,进一步说明普伐他汀联合美托洛尔能有效改善糖尿病合并冠心病患者心功能。

综上所述,普伐他汀联合美托洛尔治疗糖尿病合并冠心病可以有效改善患者心功能,调节糖代谢、脂代谢水平,改善胰岛素抵抗,抑制炎症因子表达,降低其危险因素,且联合用药不存在明显严重不良反应,联合用药优于单一用药,值得临床推广。本研究应用多项指标对普伐他汀联合美托洛尔治疗糖尿病合并冠心病的疗效进行了全面评估,尤其sLR11、NT-proBNP的相关并不多,但本研究样本量有限,仍需大量的临床数据佐证。

参考文献

- [1] 吴刚. 冠心病及其合并2型糖尿病患者的冠脉CT影像特点分析[J]. 中国CT和MRI杂志, 2016, 14(9):44-46.
- [2] 张伯涛. 益气活血化痰法治疗2型糖尿病伴冠心病临床研究[J]. 四川中医, 2015, 33(6):68-69.
- [3] 杜文会. 阿托伐他汀对冠心病心力衰竭合并糖尿病的临床疗效观察[J]. 中国基层医药, 2014, 21(18):2846-2848.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(10):447-498.
- [5] 王庆忠, 范云, 沈祁烨. 人类微生物组学与健康及其临床检验的需求[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1):67-72.
- [6] 徐杰, 王艳. 2型糖尿病患者的血脂水平、血清胎球蛋白A与糖尿病肾病的相关性研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2016, 13(4):55-57.
- [7] 邹云增, 杨茗. II型糖尿病合并冠心病的机制[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(4):366-369.
- [8] 许文敏. 他汀类药物在糖尿病合并动脉粥样硬化性心血管疾病防治中的应用[J]. 岭南心血管病杂志, 2016, 22(6):638-640.
- [9] 朱培林, 曹文昕. 美托洛尔与通心络胶囊联合治疗冠心病心力衰竭疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2):501-503.
- [10] 袁斐, 罗心平. 通心络胶囊联合美托洛尔缓释片对冠心病血管内皮功能和心功能指标的影响[J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(4):300-302.
- [11] 刘英, 陈欣, 江霞. 利拉鲁肽对2型糖尿病合并冠心病患者心功能的影响[J]. 山东医药, 2015, 55(10):83-84.
- [12] 端木鲁健, 端木青霞. 美托洛尔联合硝酸甘油、辛伐他汀治疗冠心病合并左心功能衰竭的临床疗效研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015, 23(9):129-132.
- [13] 黄海燕, 鄢卫民. 4种他汀类药物治疗动脉粥样硬化的疗效和安全性比较[J]. 中国药房, 2016, 27(36):5100-5103.
- [14] 杨会萍, 任骞, 等. 美托洛尔联合曲美他嗪对冠心病心力衰竭患者炎症反应、T细胞亚群及心功能的影响研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24(8):20-23.
- [15] 黄敏, 黄俊, 段微, 等. 罗苏伐他汀对2型糖尿病合并冠心病患者炎症因子水平、调控因子活性和胰岛素抵抗的影响[J]. 河北医药, 2015, 37(2):191-193.
- [16] 姚朝阳, 金凤. 氨氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者QT离散度与冠脉病变程度的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3):51-57.
- [17] Vongprommek R, Bujo H, Hoekstra M, et al. LR11/SorLA links triglyceride-rich lipoproteins to risk of developing cardiovascular disease in FH patients[J]. Atherosclerosis, 2015, 243(2):429-437.
- [18] Mckie PM, Burnett JC. NT-proBNP[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2016, 68(22):2437-2439.

• 论 著 •

Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及利福平耐药性的应用价值研究

翁绳凤^{1*} 李宁¹ 邢俊蓬² 张长海³ 郭威¹

【摘要】目的 探讨结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF)在检测结核分枝杆菌(MTB)及利福平耐药性的临床应用价值。**方法** 选择2016年1月至2017年7月期间入住本院的受试者272例,其中临床诊断肺结核242例,非结核病患者30例。所有受试者痰标本分别采用Xpert MTB/RIF及传统罗氏固体培养(LJ)单独检测及联合检测MTB及利福平耐药性。分析比较2种方法检测的敏感度和特异度。**结果** 以临床诊断为金标准,Xpert MTB/RIF阳性率为54.96%,LJ阳性率为40.5%,联合应用阳性率60.33%。以培养结果为金标准,Xpert MTB/RIF检测MTB的敏感度为86.73%,特异度为64.60%。2种方法检测MTB符合率为73.55%,利福平耐药性符合率为98.82%。**结论** Xpert MTB/RIF检测技术操作简单快速,高诊断敏感度和特异度,对实验室生物安全要求低,建议在实验室条件不高的地区推广使用。

【关键词】 Xpert检测;结核分枝杆菌;利福平耐药;罗氏培养

Clinical value of Xpert MTB/RIF in detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and Rifampicin (RIF) resistance

WENG Shengfeng^{1*}, LI Ning¹, XING Junpeng², ZHANG Changhai³, GUO Wei¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Beijing Geriatric Hospital, Beijing, China, 100095; 2. Department of Infectious Disease, Beijing Geriatric Hospital, Beijing, China, 100095; 3. Department of Medical Oncology, Beijing Geriatric Hospital, Beijing, China, 100095)

【ABSTRACT】Objective To investigate the clinical value of Xpert MTB / RIF in detection of MTB and RIF resistance. **Methods** 272 patients who had admitted to hospital during January 2016 to July 2017 were selected, 242 cases were diagnosed as pulmonary tuberculosis, 30 cases were non-TB patients. Their sputum samples were underwent Xpert MTB / RIF and Lowenstein-Jensen (LJ) culture to detect MTB and conventional drug susceptibility to Rifampicin. Then the sensitivity and specificity were analyzed. **Results** Given the clinical diagnosis as gold standard, the positive rate of Xpert MTB/RIF and LJ in 242 cases of pulmonary tuberculosis were 54.96% and 40.5%, respectively, with the combined positive rate of 60.33%. Taking LJ culture as gold standard, the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF were 86.73% and 64.60%. The coincidence rate of the 2 methods in detection of MTB was 73.55%. The coincidence rate of the 2 methods for Rifampicin resistance was 98.82%. **Conclusion** Xpert MTB/RIF detection technology is simple and fast to operate, high diagnostic sensitivity and specificity, and low biosafety requirements for laboratories. It is recommended to promote it in areas with poor laboratory conditions.

【KEY WORDS】 Xpert test; *Mycobacterium tuberculosis*; Rifampicin resistance; LJ culture

基金项目:北京老年医院自主项目(2016bjlnyy-自1)

作者单位:1. 北京老年医院检验科,北京 100095

2. 北京老年医院感染疾病科,北京 100095

3. 北京老年医院肿瘤内科,北京 100095

*通信作者:翁绳凤, E-mail: franceswengnz@163.com

结核病目前仍然是严重危及全球的一个公共卫生问题。近十年来,由于艾滋病的流行,移动和流动人口的增加,耐多药结核杆菌的增多,以及不少国家和地区对结核病控制的忽视等因素,全球结核病形势急剧恶化^[1]。传统结核诊断技术不足是造成结核不能有效被控制的原因之一,世界许多地区结核病诊断仍然依赖不敏感、容易漏诊的涂片镜检法及耗时长的结核分枝杆菌培养法,从而导致延误诊疗^[2]。因此亟需新诊断技术来弥补这些方法的不足。近年来,由美国 Cepheid 公司研发生产的新型的分子检测方法-结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert mycobacterium tuberculosis/rifampin, Xpert MTB/RIF),逐步受到国内外的广泛关注。2010年12月世界卫生组织(World Health Organization, WHO)正式推荐使用 Xpert MTB/RIF 检测技术作为一种结核病快速诊断的新方法。该方法操作简单,快捷,全程检测只需 2 h,而传统罗氏培养(Lowenstein-Jensen, LJ)需要 4~8 周,时间长,无法满足临床需求。为了评估该技术结核病诊断效能,本研究通过对 242 例临床诊断为肺结核患者的痰标本分别采用传统 LJ 法和 Xpert MTB/RIF 法进行检测,通过比对检测的敏感度、特异度探讨 Xpert MTB/RIF 检测技术的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 病例来源

选取本院 2016 年 1 月至 2017 年 7 月期间住院且临床已诊断肺结核患者 242 例,其中男性 182 例,女性 60 例,年龄范围 18~94 岁,平均(58.45±20.77)岁。病例诊断依据中华人民共和国卫生行业标准 WS288-2017 肺结核诊断^[3]:临床诊断病例在排除其他肺部疾病基础上符合以下 6 种情况:①胸部影像学有活动性肺结核相符的病变,并具有相应的临床表现。②胸部影像学有活动性肺结核相符的病变,并获得任何 1 种免疫学检查结果支持。③胸部影像学有活动性肺结核相符的病变,肺外组织病理检查证实为结核病变。④胸部影像学有活动性肺结核相符的病变,和支气管镜检查都符合气管/支气管结核。⑤符合结核性胸膜炎影像学改变,胸水为渗出液,腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)高,并获得任何 1 种免疫学检查结果支持。⑥儿童具有肺结核临床表现,符合结

核病影像学改变,并获得结核菌素试验或 γ -干扰素释放试验结果支持。对照组选取排除结核病以外的其他呼吸道疾病患者 30 例,其中肺癌 8 例,细菌性肺炎 10 例,慢性阻塞性肺病 9 例,支气管扩张 3 例,疾病诊断标准参照《实用内科学》^[4]。

1.2 仪器与试剂

Gene Xpert MTB/RIF 检测仪及试剂盒购自美国 Cepheid 公司;改良罗氏培养基、药敏培养基及抗酸染液购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 分离培养和药敏试验

采用 4% 氢氧化钠处理法,用无菌操作方法将标本接种于改良罗氏培养基的斜面上,37℃,含 5%~10% CO₂ 温箱培养 8 周。分别在培养第 3 天和第 7 天各观察一次,此后每周观察一次生长情况并记录。阳性结果随时报告。培养 56 天后无生长判断为阴性结果。培养基上一旦出现菌落即进行抗酸染色确认是抗酸杆菌,然后进行菌种鉴定及药敏。所有操作参照《结核病实验室检验规程》^[5]进行。药敏试验采用罗氏比例法:培养阳性者做药敏试验,参照《结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化操作程序及质量保证手册》^[6],质控菌株为 H37RV,来自北京市结核病防治所。

1.3.2 Xpert MTB/RIF 检测

每份样本需收集至少 1 mL 痰液,在处理前采集好的痰标本需存放在 2℃~8℃。根据《结核病实验室检验规程》^[5]的操作方法进行痰样本处理。将前处理管在漩涡振荡器上震荡 20 s 直至无可见块状痰标本存在。取 2 mL 处理后样本由加样孔缓慢加入 Cartridge 反应盒内,将反应盒放入 Gene Xpert 检测系统进行检测,2 h 后系统自动显示 MTB 和 RIF 检测结果。MTB 阳性的诊断标准为 5 个探针中至少 2 个探针 Ct 值≤38,并可进一步按照 Ct 值对样本中 MTB 进行半定量分析,Ct 值<16 为高负荷量,16~22 为中等负荷量,22~28 为低负荷量,>28 为极低负荷量^[7]。检测利福平耐药的基础在于 MTB 特异性分子信标 Δ Ct 值,系统设置的结果判断标准为^[7]: Δ Ct>3.5 提示对利福平耐药, Δ Ct≤3.5 提示对利福平敏感。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计数资料以 % 表示,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Xpert MTB/RIF 对痰标本 MTB 的检测结果

242 例肺结核患者中, Xpert MTB/RIF 检测 MTB 敏感度为 54.96% (133/242), 特异度为 100% (30/30)。利福平耐药检出率为 24.06% (32/133)。见表 1。

表 1 Xpert MTB/RIF 对痰标本 MTB 检测分析[(n, %)]
Table 1 Sputum MTB analysis by Xpert MTB/RIF[(n, %)]

组别	例数	阳性数 (阳性率%)	RIF 耐药数 (耐药率%)
结核组	242	133 (54.96)	32 (24.06)
非结核组	30	0 (0)	/

2.2 Xpert MTB/RIF 检测技术与 LJ 培养法检测 MTB 结果比对

以临床诊断为金标准, Xpert MTB/RIF 法阳性

率 54.96% (133/242), LJ 培养法阳性率 40.5% (98/242)。以固体培养为金标准, Xpert MTB/RIF 检测 MTB 的敏感度为 86.73% (85/98), 特异度为 64.60% (93/144)。2 种方法阳性率差异有统计学意义($\chi^2=59.712$, $P=0.000$), 2 种方法结果符合率为 73.55% (178/242)。对 Xpert MTB/RIF 和固体培养进行 Kappa 检验, $K=0.751$, 两者具有好的一致性。2 种方法联合检测, 总阳性率 60.33% (146/242)。见表 2。

2.3 Xpert MTB/RIF 检测技术与 LJ 药敏法检测利福平耐药结果分析

表 3 结果中, Xpert MTB/RIF 检出利福平耐药 21 例, 耐药率 24.71% (21/85); LJ 法检出利福平耐药 20 例, 耐药率 23.53% (20/85)。2 种方法对利福平耐药性的检出率无统计学差异($\chi^2=0.033$, $P=0.869$)。2 种方法利福平耐药性检测符合率为 98.82% (84/85)。

表 2 Xpert MTB/RIF 与 LJ 培养检测 MTB 结果对比分析
Table 2 Comparison of Xpert MTB/RIF and LJ culture in detection of MTB

实验方法	样本总数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	总体符合率(%)	χ^2	P 值
LJ 培养法	242	98	144	40.5	—	—	—
Xpert MTB/RIF	242	133	109	54.96	—	59.712	0.000
Xpert MTB/RIF + LJ 培养	242	85	93	—	73.55	—	—

表 3 Xpert MTB/RIF 与 LJ 药敏法检测利福平耐药性结果对比分析
Table 3 Comparison of Xpert MTB/RIF and conventional drug susceptibility on Rifampicin

实验方法	样本总数	敏感例数	耐药例数	耐药率(%)	总体符合率(%)	χ^2	P 值
LJ 药敏检测	85	65	20	23.53	—	—	—
Xpert MTB/RIF	85	64	21	24.71	—	0.033	0.869
Xpert MTB/RIF + LJ 药敏	85	64	20	—	98.82	—	—

3 讨论

肺结核是通过肺部感染结核分枝杆菌而导致的疾病, 大多数结核菌存在于肺部病灶坏死组织, 然后通过痰液将结核菌排除体外。所以, 是否从痰液检出结核菌通常作为依据来诊断患者是否患有结核病。目前传统的固体培养法阳性率只有 30%~40%^[8-11], 特异度差, 各种分枝杆菌均可生长, 需要结合分枝杆菌菌种鉴定方可确定是否为结核分枝杆菌。抗酸染色涂片结核菌数目需>5 000 条/mL 才能得到阳性结果^[12]。而 Xpert MTB/RIF 检测技术在

痰标本中的检测极限为 131 CFU/mL, 灵敏度远高于涂片检测^[10]并且 Xpert 技术具有操作简便, 生物安全性高, 检测过程不易受干扰等特点^[13]。

国内报道的对 Xpert MTB/RIF 检测技术的评价, 其研究对象大多是成年人或儿童, 对老年人群该技术的应用评估报道不多^[14]。本实验在一家三级老年综合医院进行, 老年人群有其特殊性, 常存在合并多种基础疾病, 结核症状不典型, 咳痰困难等问题, 需要更为敏感的检测方法早期诊断。本次研究对象是临床诊断肺结核患者, 应用 Xpert MTB/RIF 检测痰液中的 MTB 及利福平

耐药性,并与传统罗氏培养方法进行比对来评价它在老年综合医院中肺结核诊断的敏感度和特异度。

近年来国内外对此项技术做了许多研究,针对不同的检测标本它的敏感性和特异性显示不同差异。一项多中心研究结果显示 Xpert MTB/RIF 诊断结核病的特异度达 99.2%,灵敏度为 92.2%,对利福平是否耐药检测的正确率约 98%^[15]。HU 等^[16]研究显示痰培养阳性患者中 Xpert 的灵敏度为 94.5%,特异度为 99.8%。赵冰等^[17]研究发现,以临床诊断为参考标准,痰 Xpert 灵敏度为 58.82%,特异度为 99.68%。本次研究也显示,在临床诊断肺结核病例中,它检测敏感度为 54.96%,高于黄建斌^[18]和赵冰等^[17]研究结果(48.05%和 45.45%)。说明 Xpert MTB/RIF 检测技术在检测不同标本时,敏感度存在差异,但都显示很高的特异度。但以罗氏培养结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 MTB 的敏感度和特异度明显低于王怡心等学者^[13]的研究,原因可能与痰的质量有关。试验中大多数是老年患者,不能正确咳痰,有的标本是口水,严重影响检测结果。所以,对于老年人,一次阴性结果不能排除结核病的可能,多次检测并引导正确留痰才能提高阳性率。

利福平作为重要抗结核药物,耐药现象严重,并且对利福平耐药的 90%菌株同时对异烟肼耐药,因此检测利福平耐药性可作为多重耐药结核杆菌(multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)的筛选标志^[19]。Boehme 等^[15]研究结果显示,与比例法药敏试验结果相比,Xpert MTB/RIF 能够正确判断 97.6%的利福平耐药菌株和 98.1%的利福平敏感菌株。本研究中 2 种方法检测利福平耐药性的符合率也达到 98.82%。30 例非结核患者 Xpert MTB 全部阴性,提示该方法的高特异度,与其他学者^[20-21]研究结果(97.5%和 98.8%)相似,说明对老年人群也具有高特异性。但本研究未建立与中青年的比对,不能充分说明该技术在老年人群中的检测特点。另外,2 种方法联合检测结核分枝杆菌提高了单一方法的灵敏度,对结核病早期诊断有更大的意义。

当然 Xpert MTB/RIF 也存在些自身的问题及局限性,比如,对痰质量的要求,也不能区分死菌或活菌,但它作为一种快速、直接可靠、高灵敏度和特异度地检测结核病患者以及是否对利福平耐药的新诊断技术,可更快的帮助临床从病原学上

检出结核病患者,提高确诊率。同时该检测设备仅需要 2 个独立区域,更多的基层实验室能达到这种低设施要求,有助于基层结核病患者较早的得到准确的诊断,充分的治疗和患者管理^[22]。因此,建议在实验室条件不高的地区推广使用。

参考文献

- [1] 金法祥,王华钧,许文芳,等. 4 种新方法快速检测结核分枝杆菌的临床研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(21):3638-3639.
- [2] Singh A, Kumar GA, Gopinath K, et al. Evaluation of 5 novel protein biomarkers for the rapid diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: preliminary results[J]. Sci Rep, 2017, 7(4):4-12.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准: WS288-2017[S/OL]. [2017-11-09]. <http://www.moh.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/12/201712154852389.pdf>.
- [4] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 14 版. 北京:人民卫生出版社, 2013, 5(14):276-588.
- [5] 中国防痨协会. 结核病实验室检验规程[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015, 5(2):13-16.
- [6] 王黎霞. 结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化操作程序及质量保证手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013, 6(3):1-40.
- [7] 付沛文,李世宝,李洪春,等. Xpert MTB/RIF 试验快速诊断结核病的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 8(16):779-783.
- [8] 阳士雄,阳咏芳,付汉东,等. 结核病诊断技术方法的选择及实验室诊断路径[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 10(38):2728-2730.
- [9] 张治国,欧喜超,孙倩,等. 利福平耐药实时荧光核酸扩增技术检测痰标本中结核分枝杆菌及其耐药性研究[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(1):13-16.
- [10] 胡军. 2024 份痰液标本行痰涂片检查结核杆菌结果分析[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(5):80-81.
- [11] 杜彦懿,王平,张文莉,等. 涂片镜检法与培养法检测结核分枝杆菌的结果比较[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(24):83-84.
- [12] 徐大叶. 某结核病定点医院痰涂片阳性率低的调查及应对措施[J]. 医学动物防制杂志, 2014, 10(30):1177-1178.
- [13] 王怡心,陈雄豪,林惠玲,等. Xpert MTB/RIF 技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 5(7):76-179.

(下转第 237 页)

· 论 著 ·

全自动核酸提取检测仪选择和评价方案的建立和应用

戎国栋 赵鸿 吴蕾 黄珮珺 王芳 张燕 徐婷*

[摘要] **目的** 对6个品牌全自动核酸提取仪进行性能验证,以期建立全自动核酸提取仪临床选择和评价的性能验证方案。 **方法** 采用阴性血清对乙型肝炎病毒核酸(HBV-DNA)血清标准物进行系列稀释,配制梯度浓度样品A-F。各仪器检测结果与罗氏系统比较,评价防污染能力、准确性、重复性、检测下限及线性相关性。用第三方扩增试剂盒对各仪器提取的核酸进行扩增检测,评价各系统开放性。 **结果** 通过防污染实验的5个品牌仪器进一步验证。配套系统中,品牌一、四与罗氏结果偏倚最小,准确性佳;品牌一、二对样品A(1×10^4 IU/mL)与C(1×10^3 IU/mL)的检测结果极差小,重复性佳;品牌一、五对样品F(1×10^1 IU/mL)的检出率为100%;品牌三线性相关系数为0.998,相关性最佳。开放性实验的准确性、重复性和检测下限低于配套系统,其中品牌一在各检测参数中均显示最佳性能。 **结论** 配套系统中各品牌优势各异,而品牌一在开放性评价中优势明显,基本建立全自动核酸提取仪临床选择和评价的性能验证方案。

[关键词] 荧光定量PCR; 磁珠; HBV-DNA; 性能验证

Establishment and application on the selection and evaluation of automated nucleic acid extraction systems

RONG Guodong, ZHAO Hong, WU Lei, HUANG Peijun, WANG Fang, ZHANG Yan, XU Ting*

(Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China, 210029)

[ABSTRACT] **Objective** To compare the performances of 6 brands of automated nucleic acid extraction platforms in order to establish a performance verification scheme for the selection and evaluation of automated nucleic acid extraction systems. **Methods** Serial dilutions of standard serum containing HBV-DNA were mixed with HBV negative serum, and the concentrations of sample A-F were prepared. Then, samples were detected by each platform and their results were compared with Roche's system to access the anti-interference feature, accuracy, reproducibility, limit of detection so as linear correlation. A third-party amplification kit was used to detect the extracted nucleic acids of each platform so as to evaluate the openness of detection systems. **Results** Subsequent tests continued when no cross-contamination was observed in 5 brands of platforms. In original systems, brand 1 and 4 had smaller biases and the accuracies were better. In reproducibility test, the ranges of brand 1 and 2 were the smallest. The detection rates of sample F (1×10^1 IU/mL) were 100% both in brand 1 and 5. Brand 3 showed the best linear correlation, and the correlation coefficient was 0.998. In openness test, brand 1 showed the best performance. However, the accuracy, reproducibility and lowest limit of detection by using the third-party amplification reagents were all worse than those of the original systems. **Conclusion** Various brands of instruments in the original system showed

基金项目:江苏省实验诊断学重点实验室(ZDXKB2016005);南京医科大学“十三五”教育研究课题(QN2017139)

作者单位:南京医科大学第一附属医院检验学部,江苏,南京 210029

*通信作者:徐婷, E-mail:tingxu@njmu.edu.cn

different advantages, while brand 1 performed the best in the open system. The performance verification scheme for the clinical selection and evaluation of the automated nucleic acid extraction instrument can be established.

[KEY WORDS] Fluorescence quantitative PCR; Magnetic beads; HBV - DNA; Performance verification

近年来,随着磁珠分离技术在病毒核酸检测领域的普及应用,很多公司推出了全自动核酸提取仪^[1]。此类仪器利用磁珠法进行核酸提取纯化,提高了核酸提取的效率,降低人工操作误差,实现了病毒核酸的高敏高通量检测,在临床分子检验中得到了广泛关注^[2-3],但其检测性能尚待进一步验证。由于乙型肝炎病毒核酸(hepatitis B virus DNA, HBV-DNA)检测为临床分子实验室最常见的检测项目,本文以 HBV-DNA 定量检测为例,通过对6套全自动核酸提取仪的准确性、重复性、线性相关性、检测下限、防污染能力和开放能力的临床验证,旨在建立适用于全自动核酸提取仪临床选择和评价的验证方案,为实验室实现 HBV-DNA 定量检测全自动化流程提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品准备

采用阴性血清将 10^6 IU/mL 浓度水平的乙型肝炎病毒核酸(HBV-DNA)血清标准物质(北京康彻思坦生物技术有限公司)稀释至 1×10^4 IU/mL、 1×10^3 IU/mL、 1×10^2 IU/mL、 5×10^1 IU/mL、 2×10^1 IU/mL 和 1×10^1 IU/mL,分别编号为 A、B、C、D、E 和 F,每个浓度梯度若干管,1 mL/管分装, -70°C 冻存。

1.1.2 仪器与试剂

6个国内外主流品牌全自动核酸提取仪,采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(ThermoFisher,美国)进行扩增,COBAS Ampliprep & Taqman 48 系统(Roche,瑞士)作为定量参考。检测试剂为各厂商配套的乙型肝炎病毒核酸提取和扩增试剂盒。系统开放性评价中采用上海复星长征医学科学有限公司的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)。

1.2 方法

1.2.1 防污染能力

HBV-DNA 定量结果为 10^7 IU/mL 浓度水平的临床血清样品若干份混合,分装;HBV-DNA 检测

阴性样本混合,分装。在全自动提取仪中以阴阳相间的方式排列,用6个品牌全自动核酸提取系统提取 HBV-DNA,荧光定量 PCR 检测,观察其防污染能力。

1.2.2 准确性试验

采用罗氏 COBAS Ampliprep & Taqman 48 系统及6个品牌全自动核酸提取系统对样品 A-F 进行 HBV-DNA 定量检测,每个浓度梯度重复检测2次,取均值。通过比较各品牌仪器在对应浓度检测结果的偏倚(待评价系统检测结果平均数的对数值-罗氏结果平均数的对数值)对准确性进行评价。

1.2.3 重复性试验

A(1×10^4 IU/mL)与 C(1×10^2 IU/mL)2个浓度梯度的样品平行提取5次后,进行荧光定量 PCR 检测,通过极差(5次结果中最高值的对数值-最低值的对数值)评价各仪器重复性。

1.2.4 检测下限

分析各品牌仪器所能检测出的最低检测浓度并计算检出率。

1.2.5 线性相关性

以罗氏测定值为 X,各品牌检测系统测定值为 Y,对样品 A-F 共6个浓度梯度检测结果计算线性范围及线性相关系数 R^2 。

1.2.6 开放性试验

采用第三方 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒,ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪,对各品牌仪器提取的样品 A-F 的模板进行扩增,评价检测结果的准确性、重复性、检测下限以及线性相关性,并与配套检测系统比较。

2 结果

2.1 防污染能力

检测结果显示,5种品牌仪器的高浓度阳性样本均检出,阴性标本均未检出,防污染性能高。仅有一个品牌仪器阴性标本均呈现低浓度检出,平均 Ct 值为 30.56,平均检测值为 6.04×10^1 IU/mL,防污染测试未通过,停止后续验证。

2.2 准确性试验

检测结果与罗氏结果的对数值差值位于 ± 0.4 之间时,准确性较高。配套系统中品牌一和品牌四准确性较高(表1),开放性系统中品牌一的准确性最高(表2)。

表1 5种品牌仪器配套系统的准确性结果(偏倚,log)

Table 1 Accuracy results of 5 instruments with matching systems (Bias, log)

	A	B	C	D	E
品牌一	0.31	-0.05	0.10	0.28	0.02
品牌二	0.44	0.19	0.38	0.35	0.42
品牌三	0.74	0.56	0.45	0.38	0.41
品牌四	0.22	0.08	0.10	0.35	0.14
品牌五	0.60	0.56	0.39	0.67	-1.66

表2 5种品牌仪器开放性系统的准确性结果(偏倚,log)

Table 2 Accuracy results of 5 instruments with open systems (Bias, log)

	A	B	C	D	E
品牌一	0.18	-0.01	0.20	0.33	0.32
品牌二	0.80	0.59	0.96	1.03	0.71
品牌三	0.72	0.51	0.36	0.78	0.44
品牌四	0.82	0.52	0.61	0.67	-0.09
品牌五	0.66	0.75	0.62	0.80	0.32

2.3 重复性试验

A(1×10^4 IU/mL)与C(1×10^2 IU/mL)2个浓度的样品分别用配套系统和开放性系统平行提取5次后,进行荧光定量PCR检测,其5次结果的极差如表3所示。配套系统测试中,品牌一、品牌二的重复性结果相当;但在开放性系统中,品牌一的重复性显著优于其他品牌。

表3 5种品牌仪器的重复性结果(极差,log)

Table 3 Repeatability results for 5 instruments (Range, log)

	配套系统		开放性系统	
	A	C	A	C
品牌一	0.16	0.20	0.20	0.26
品牌二	0.11	0.24	0.57	0.49
品牌三	0.17	0.30	0.13	0.95
品牌四	0.35	0.26	0.37	0.28
品牌五	0.13	0.44	0.34	0.89

2.4 检测下限

低值样品E(2×10^1 IU/mL)和F(1×10^1 IU/mL)的检出率如表4所示,样品A-D在各品牌仪器中的检出率均为100%。配套系统中,品牌一和品牌五对低值样品检出率较高,而开放性系统中品牌一低值样品检出率最佳。

表4 5种品牌仪器的检测下限

Table 4 Limit of detection for 5 instruments

	配套系统		开放性系统	
	浓度 (IU/mL)	检出率 (%)	浓度 (IU/mL)	检出率 (%)
品牌一	10	100	10	100
品牌二	10	50	20	50
品牌三	20	50	20	50
品牌四	10	50	20	50
品牌五	10	100	10	50

2.5 线性相关性

线性范围以罗氏值为X,实际测定值为Y,在 $10^1 \sim 10^4$ IU/mL范围内,自动核酸提取、实时荧光定量PCR扩增方法线性范围内均良好。配套系统中,品牌一至品牌五的线性相关性 R^2 分别为0.980、0.992、0.998、0.990、0.964,其中品牌三线性相关性系数最佳,见图1。开放性系统中,品牌一至品牌五的线性相关性 R^2 分别为0.991、0.977、0.976、0.920、0.974,其中品牌一线性相关性系数最佳,见图2。

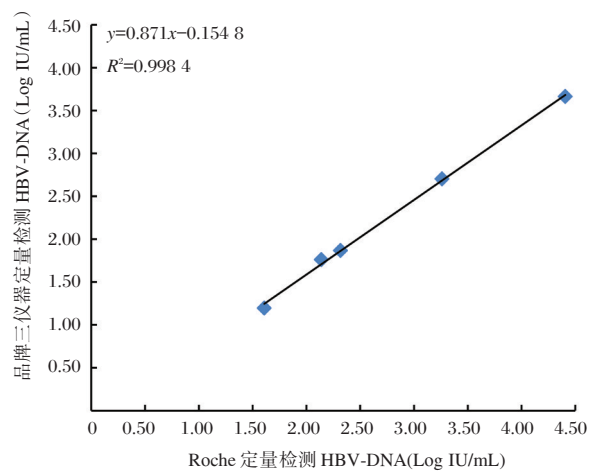


图1 配套系统,品牌三与罗氏检测结果线性相关性

Figure 1 Matching system, linear correlation between Brand 3 and Roche system

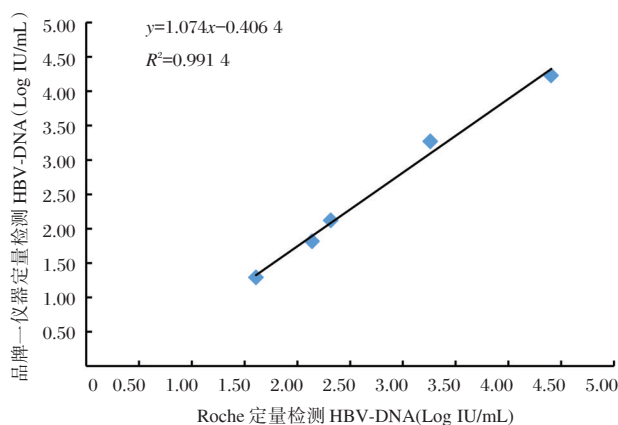


图2 开放性系统,品牌一与罗氏检测结果线性相关性

Figure 2 Open system, linear correlation between Brand 1 and Roche system

2.6 开放性试验

由上述结果可见,系统开放性评价中,采用第三方扩增试剂检测的准确性、重复性和检测下限普遍低于配套检测系统,其中品牌一在各检测参数中均表现出显著优势,开放性最佳。

3 讨论

近年来,核酸检测已成为临床分子实验中经常使用研究手段之一,其质量优劣直接影响后续实验的成败。因此,核酸提取成为分子生物学实验中的关键步骤。随着分子生物学技术的发展,核酸提取技术也从最初的手工提取发展到全自动核酸提取,同时解决了传统手工法操作复杂、重复性差、通量低等问题。目前,市场上的全自动核酸提取仪品牌繁多,性能参差不齐。根据CNAS-CL02:《医学实验室质量和能力认可准则》(ISO15189:2012)及CNAS-CL36:2012《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》^[4-5]要求,临床实验室在引入新的检测方法或检测系统时,需验证其在本实验室能否达到厂家声明的性能^[6]。因此,本研究从准确性、重复性、线性相关性、检测下限、防污染能力和开放能力6个方面对目前市场上常见的6款全自动核酸提取仪的性能进行了临床验证,制定了全自动核酸提取仪的性能验证方案,以期在众多的仪器品牌中挑选出更适用于临床分子检测领域的仪器及为实验室后续新检测仪器的引入提供参考方案。

我国作为乙肝大国,HBV-DNA检测已成为临床分子实验室中的常规检测项目,因此本研究选

择HBV-DNA为评价指标对6款全自动核酸提取仪进行性能验证。对于全自动核酸提取仪的性能验证,近年来陆续有文献报道,但一次性对多款仪器及多指标同步进行性能验证的类似研究尚未有先例。本研究中通过仪器试剂配套实验,结果表明品牌一、四与罗氏结果偏倚最小,准确性佳;罗氏定量检测系统具有灵敏度、精确度和可重复性高的优点,被国际公认为HBV-DNA定量检测的参比试剂。本研究结果与李莉华等^[7]在不同检测系统中应用国产核酸检测试剂研究结果相符,这可能与不同试剂盒厂家采购的原材料及生产水平差异相关。此外,本研究重复性实验结果显示品牌一、二对样品A(1×10^4 IU/mL)与C(1×10^2 IU/mL)的检测结果极差小,重复性佳;品牌一、五对样品F(1×10^1 IU/mL)的检出率为100%,高于其他品牌;品牌三线性相关系数为0.998,均大于其他品牌,表明其与罗氏检测结果相关性最佳;而在开放性实验中,其准确性、重复性和检测下限均低于配套系统,但品牌一在各检测参数中显示了最佳的检测性能。在已发表的文献中,有从灵敏度、精密度^[8]、检出率、精密度、重复性分别对核酸提取仪进行性能评价^[9]的研究,还有对其临床可行性进行验证的研究^[10],这些研究结果都提示核酸提取仪具有操作简单、快速、提取效率高的优点,值得临床检验推广,与本研究结果相符。但在已有的研究中并未有从横向对多品牌仪器之间差异的研究,在此基础上本文对6个品牌核酸提取仪进行了性能评价,其中仪器品牌涵盖了主流进口品牌与国产品牌,且本次研究中参与实验的研究人员跨省市开展实验、采集数据;实验结果显示开放性系统中品牌一为最优提取仪,配套系统中每个品牌各有优势,可以根据不同的实验目的选择不一样仪器进行实验,为临床分子实验室对核酸提取仪的选择和评价提供参考和指导。

本研究的创新点还在于,首次采用了第三方扩增试剂盒评价检测系统开放性,有利于扩增试剂的多项选择,对后续自建检测项目的开展及科研应用也具有一定意义。本研究已从横向多指标对多品牌核酸提取仪进行了评价,为了更全面、更完善地了解核酸提取系统的临床检测性能,后续研究可以增加对全自动核酸提取系统的抗干扰能力(如溶血、脂血、黄疸等)^[11]、对不同基因型HBV核酸检测能力^[12-13]等方面的研究进一步评估检测系统的应用性能。

综上所述,经过本次性能评价,品牌一全自动核酸提取仪在配套系统和开放性试验中均表现良好,显著优于其他品牌,与 Roche 定量检测系统在各指标上无明显差异,鉴于其明显的价格优势,有利于临床推广应用。本性能验证方案在全自动核酸提取仪的临床选择和评价中有效可行。

参考文献

- [1] 易勇,赵焕生,贾莉萍,等. 国产磁珠核酸自动提取系统对 HBV-DNA 检测前处理的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(08):1906-1908.
- [2] 李文静,徐红星,陈昭华,等. 基于 Pre-NAT 全自动核酸检测系统的 HBV-DNA 超敏检测试剂方法学性能验证[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(07):532-534.
- [3] 胡荣盛,薛静俊,朱振坤,等. 自动核酸提取实时荧光定量 PCR 检测全血及血浆中 EBV DNA 载量的性能评价[J]. 现代实用医学, 2013, 25(08):940-943.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A009: 2018《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》[J]. <https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkyzz/2018/03/889110.shtml>, 2018.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02: 2012《医学实验室质量和能力认可准则》[J]. <https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/jbzz/2013/12/750592.shtml>, 2015.
- [6] 王娇,钱军,石英,等. Mx3000p™ 实时荧光定量 PCR 仪 HBV-DNA 检测系统的性能验证[J]. 中国医药导报, 2018, 15(15):65-68.
- [7] 李莉华,韩卫,何路军,等. 国产核酸检测试剂在不同检测系统中的应用[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2015, 28(04):643-646.
- [8] 吕晓晓,唐少华,徐雪琴,等. 基于 ANAS1000 全自动核酸提取工作站的乙型肝炎病毒 DNA 检测性能评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(07):1000-1002.
- [9] 黄伟,冉飞,余杨红,等. 纳米磁珠核酸自动提取仪在手足口病病毒检测的临床应用价值研究[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(06):836-838.
- [10] 张睿,叶阿里,孔令君,等. 全自动核酸提取仪对三种性传播病原体检测的性能评价[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(06):142-144.
- [11] 姚懿雯,李冬. Autrax 全自动核酸提取工作站对高敏 HBV DNA 检测的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(23):3237-3239.
- [12] Chevaliez S, Dauvillier C, Dubernet. The new aptima HBV quant real-time TMA assay accurately quantifies hepatitis B virus DNA from genotypes A to F [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(4):1211-1219.
- [13] 沈戮,龙璐,邓中平,等. 新型国产乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂的质量评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(3):280-285.
- (上接第 232 页)
- [14] 林媛,谭守勇,彭德虎,等. 结核感染 T 细胞斑点试验、Xpert Mtb / RIF 检测技术在老年肺结核中的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(2):199-204.
- [15] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11):1005-1015.
- [16] Hu PL, Bai LQ, Liu FP, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in country-level laboratories in Hunan province, China [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(21):3744-3750.
- [17] 赵冰,欧喜超,夏辉,等. Xpert Mtb/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(6):462-466.
- [18] 黄建斌,杨玲,梁晓莉. Gene Xpert MTB/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用探讨[J]. 医学动物防制, 2017, 33(4):465-467.
- [19] 赵永,梁庆福,林淑芳,等. Xpert MTB/RIF 检测技术用于耐多药结核分枝杆菌利福平耐药检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(15):2621-2622.
- [20] 石海萍,高华. 痰 Xpert MTB/RIF 检查对涂阴肺结核的诊断价值[J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(1):19-20.
- [21] 刘佳庆,张丽霞,秦中华,等. Xpert MTB/RIF 和 T-SPOT TB 对涂阴肺结核诊断价值的评估[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(10):755-757.
- [22] 夏辉,赵雁林. Xpert MTB/RIF 在我国的应用前景[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(23):3799-3800.

丙泊酚调控 miR - 133a/SOX4 表达对结直肠癌 HCT116 细胞增殖凋亡的影响

韩俊* 赵静 张立群

[摘要] 目的 探讨丙泊酚对结直肠癌 HCT116 细胞增殖凋亡的影响及其机制。方法 以 1、5 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚处理 HCT116 细胞后,采用 MTT 法检测细胞增殖,流式细胞检测细胞凋亡,real-time PCR 检测细胞中 miR-133a 的表达,Western blot 检测细胞中 SOX4 蛋白的表达。采用双荧光素酶基因报告实验检测 miR-133a 与 SOX4 的靶向关系。将 HCT116 细胞分为对照组、丙泊酚组、丙泊酚+anti-NC 组和丙泊酚+anti-miR-133a 组,采用脂质体法将 miR-133a inhibitor 转染至 HCT116 细胞后,观察 miR-133a 低表达对 10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚作用下 HCT116 细胞增殖、凋亡和 SOX4 蛋白表达的影响。结果 丙泊酚呈浓度-时间依赖性抑制 HCT116 细胞增殖,丙泊酚显著促进 HCT116 细胞凋亡和 miR-133a 表达并抑制 SOX4 蛋白的表达,且表现为浓度依赖性。双荧光素酶基因报告实验证实 SOX4 是 miR-133a 的靶基因。与对照组相比,丙泊酚组、丙泊酚+anti-miR-NC 组和丙泊酚+anti-miR-133a 组细胞中 miR-133a 表达显著升高,而 SOX4 蛋白的表达水平显著降低,细胞增殖能力显著受到抑制,而细胞凋亡显著增强,差异均有统计学意义($P<0.05$);与丙泊酚组相比,丙泊酚+anti-miR-133a 组中 miR-133a 表达水平显著降低,而 SOX4 蛋白的表达水平显著升高,细胞的增殖能力显著增强,而细胞凋亡能力显著减弱,差异均有统计学意义($P<0.05$);而丙泊酚+anti-miR-NC 组细胞中 miR-133a 和 SOX4 蛋白的表达以及细胞的增殖和凋亡能力均无显著改变,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 丙泊酚可通过调控 miR-133a/SOX4 表达抑制 HCT116 细胞增殖并促进细胞凋亡。

[关键词] 结直肠癌;丙泊酚;细胞增殖;细胞凋亡;miR-133a;SOX4

Propofol inhibits the HCT116 cell proliferation and promotes apoptosis of HCT116 cells by regulating the expression of microRNA-133a/SOX4

HAN Jun*, ZHAO Jing, ZHANG Liqun

(Department of Anesthesiology, Pingmei What Medical Treatment Group General Hospital, Pingdingshan, Henan, China, 467000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of propofol on proliferation and apoptosis of colorectal cancer HCT116 cells. Method HCT116 cells were treated with 1, 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ propofol. The cell proliferation was detected by MTT assay. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expression of miR - 133a was detected by real - time PCR. The level of SOX4 was detected by Western blot. The dual luciferase gene reporter assay was performed to measure the targeting relationship between miR - 133a and SOX4. HCT116 cells were divided into control group, propofol group, propofol + anti-NC group and propofol + anti-miR - 133a group. The effects of low expression of miR - 133a on proliferation, apoptosis and SOX4 expression in HCT116 cells induced by 10 $\mu\text{g/mL}$ propofol were observed. Results Propofol inhibited the proliferation of HCT116 cells in a concentration and time dependent manner. Propofol significantly promoted

作者单位:平煤神马医疗集团总医院麻醉科,河南,平顶山市 467000

*通信作者:韩俊, E-mail: 1002673092@qq.com

HCT116 cell apoptosis and miR-133a expression and inhibited the expression of SOX4 in a concentration-dependent manner. The dual luciferase gene reporter experiment confirmed that *SOX4* is a target gene of miR-133a. Compared with the control group, the expression of miR-133a was significantly increased in the propofol group, propofol + anti-miR-NC group and propofol + anti-miR-133a group, while the expression level of SOX4 protein was significantly decreased. The cell proliferation ability was significantly inhibited, and the apoptosis was significantly enhanced ($P<0.05$). Compared with the propofol group, the expression level of miR-133a was significantly decreased in the propofol + anti-miR-133a group, while the expression level of SOX4 protein was significantly increased, the cell proliferation ability was significantly enhanced, and the apoptosis ability was remarkable weakened ($P<0.05$). There was no significant change in the expression of miR-133a and SOX4 protein and the proliferation and apoptosis of cells between propofol and propofol+anti-miR-NC group ($P>0.05$). **Conclusion** Propofol inhibits the proliferation and promotes apoptosis of HCT116 cells by regulating the expression of microRNA-133a/SOX4.

[KEY WORDS] Colorectal cancer; Propofol; Cell proliferation; Apoptosis; MiR-133a; SOX4

结直肠癌是一种发病率和死亡率均较高的消化道恶性肿瘤,手术根治性切除目前仍是其治疗的重要手段,而麻醉是手术过程中的重要部分,作为常用的静脉注射麻醉药——丙泊酚是否影响着肿瘤的发生发展逐渐引起人们的关注^[1]。随着研究的深入,除了对中枢神经系统起到催眠和镇静作用外,丙泊酚在食管癌、胃癌和胶质瘤等肿瘤治疗过程中还表现出较好的抑瘤作用^[2-4]。已有研究证实丙泊酚可通过抑制癌细胞增殖和促进凋亡的途径抑制结直肠癌的恶性进展,但具体的作用机制尚不完全清晰^[5-6]。miR-133a是一种与肿瘤发生发展关系密切的小分子RNA,被证实在结直肠癌中低表达,而上调其表达可抑制肿瘤细胞增殖和转移,并诱导细胞凋亡^[7-8]。有研究发现,丙泊酚可通过上调miR-133a的表达抑制胰腺癌细胞的增殖和转移,但其是否通过影响miR-133a表达参与调控结直肠癌增殖凋亡的分子机制并不清楚^[9]。因此,本研究以结直肠癌HCT116细胞为研究对象,观察丙泊酚对HCT116细胞增殖凋亡的影响,探讨其对miR-133a表达的调控,为进一步阐明丙泊酚改善结直肠癌恶性进展的分子机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

人结直肠癌HCT116细胞株购于美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC),RPMI-1640培养基和胰蛋白酶购于美国Hyclone公司,胎牛血清购于美国Gibco公司,脂质体2000和Trizol试剂购于美国Invitrogen公司。二甲基亚枫、丙泊酚和噻唑蓝(methylthiazolylidi-

phenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂美国Sigma-Aldrich公司,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购于美国GE Health care Life Science公司,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)检测试剂盒购于美国GE health care公司,miR-133a inhibitor(货号:miR3012)、miR-133a mimics(货号:miR1008)及其相应的阴性对照购于广州锐博生物科技有限公司。性别决定基因相关HMG盒基因4(SRY-related HMG-box4, SOX4)抗体(货号:A-ABV10137)购于艾美捷科技有限公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(货号:2218)购于美国Cell signaling公司。青霉素-链霉素-膜联蛋白V-FITC(annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium Iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于北京百奥莱博公司。恒温CO₂细胞培养箱购于日本三洋公司,7900HT real-time PCR仪购于美国应用生物系统公司,DYC-31D型电泳仪购于北京六一仪器厂,CEL-DOC2000型紫外凝胶成像3系统购于美国Bio-Rab公司。流式细胞仪购于美国BD Biosciences公司。

1.2 HCT116细胞培养

将液氮中装有HCT116细胞的冻存管置于温水浴中快速溶解后,转移至离心管中,加入RPMI-1640培养基吹打混匀。以1 000 rpm离心5 min,弃上清后以含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基重悬细胞。以25 cm²的培养瓶接种细胞,并放置于5% CO₂、饱和湿度的37℃恒温细胞培养箱内培养。待细胞铺满瓶底80%以上时,加入

0.25%胰蛋白酶消化,并按照1:3比例传代。实验所有HCT116细胞均处于对数生长期。

1.3 MTT法测定HCT116细胞增殖情况

每孔200 μL HCT116细胞悬液(含30 000个细胞)接种于96孔细胞板上。培养箱内培养过夜后,给予浓度为0、1、5和10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚,每孔设置4个复孔。培养箱内孵育24、48和72 h后,以MTT法检测细胞在 $\lambda=570\text{ nm}$ 处的吸光度OD值,具体方法参考文献^[2]。

1.4 流式细胞仪测定HCT116细胞凋亡情况

详细步骤参考文献^[6],实验重复测定3次。

1.5 real-time PCR测定HCT116细胞中miR-133a的表达情况

采用Trizol法提取HCT116细胞的总RNA,参照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA,以cDNA为模板按照94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共38个循环进行PCR扩增。其中,由上海吉凯生物公司合成的PCR引物如下:miR-133a F: 5'-CTG-CATTGGTCCCTTCAAC-3'和R: 5'-CAGTG-CAGGGTCCGAGGTAT-3'; U6 F: 5'-CTCGCTTC-GGCAGCACA-3'和R: 5'-AACGCTTCAC-GAATTTGCGT-3'。

1.6 Western blot测定HCT116细胞中SOX4蛋白的表达情况

详细步骤参考文献^[6],其中SOX4抗体和GAPDH抗体工作液以1:500稀释,而二抗工作液是按1:2 000稀释。实验重复测定3次。

1.7 HCT116细胞转染与分组

将HCT116细胞以每孔20 000个细胞接种至6孔细胞板上,放入细胞培养箱内培养过夜。待细胞融合度在70%以上时,参照脂质体2000说明书步骤将50 nM miR-133a inhibitor及其阴性对照转染至HCT116细胞中。转染6 h更换新鲜培养液进行培养24 h。miR-133a低表达影响HCT116细胞实验:随机分为对照组(未做任何处理)、丙泊酚组(给予浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚作用48 h)、丙泊酚+anti-miR-133a组(转染miR-133a inhibitor后给予10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚作用48 h)和丙泊酚+anti-miR-NC组(转染miR-133a inhibitor阴性对照后给予10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚作用48 h)。给药处理结束后,收集各组细胞,采用real-time PCR测定miR-133a的表达,Western blot测定SOX4蛋白的表达,MTT法和流式细胞仪分别检测各组细胞的增殖和凋亡情况。

1.8 双荧光素酶报告基因实验测定miR-133a与SOX4的靶向关系

构建野生型(SOX4-WT)和突变型(SOX4-MUT)的SOX4的3'-UTR荧光素酶报告载体。将HCT116细胞以每孔20 000个细胞接种至24孔细胞板上,细胞培养箱内贴壁培养过夜。将其分为miR-133a+SOX4-MUT组(共转染miR-133a mimics和SOX4-MUT质粒)、miR-133a+SOX4-WT组(共转染miR-133a mimics和SOX4-WT质粒)、NC+SOX4-MUT(共转染miR-133a mimics阴性对照和SOX4-MUT质粒)、NC+SOX4-WT组(共转染miR-133a mimics阴性对照和SOX4-WT质粒)。根据上述分组参照脂质体2000转染试剂说明书步骤将miR-133a mimics及其阴性对照分别与SOX4-MUT质粒、SOX4-WT质粒共转染至HCT116细胞中。转染48 h后,收集各组细胞参照试剂盒说明书步骤检测各组细胞的荧光素酶活性。实验重复检测3次。

1.9 统计学分析

采用SPSS 22.0进行统计学分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,3组组间数据采用单因素方差分析,方差齐性采用LSD检验,2组组间采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙泊酚抑制HCT116细胞增殖并促进凋亡

与对照(0 $\mu\text{g/mL}$)相比,1 $\mu\text{g/mL}$ 异丙酚对HCT116细胞增殖无显著影响($P > 0.05$),但5 $\mu\text{g/mL}$ 异丙酚从48 h开始抑制HCT116细胞增殖,10 $\mu\text{g/mL}$ 异丙酚从24 h开始抑制HCT116细胞增殖($P < 0.05$);丙泊酚对HCT116细胞增殖有显著的抑制作用,且呈浓度-时间依赖性,结果见图1A。同时,与0 $\mu\text{g/mL}$ 相比,5 $\mu\text{g/mL}$ 和10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚能够呈浓度依赖性诱导HCT116细胞凋亡($P < 0.05$),而1 $\mu\text{g/mL}$ 异丙酚对HCT116细胞凋亡无明显影响。见图1B和C。

2.2 丙泊酚促进HCT116细胞中miR-133a表达而抑制SOX4蛋白表达

与0 $\mu\text{g/mL}$ 相比,5 $\mu\text{g/mL}$ 和10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚显著促进HCT116细胞中miR-133a($P < 0.05$),且呈浓度依赖性;而1 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚对miR-133a表达无显著影响($P > 0.05$),结果见图2A。同时,5 $\mu\text{g/mL}$ 和10 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚处理后HCT116细胞中SOX4蛋白

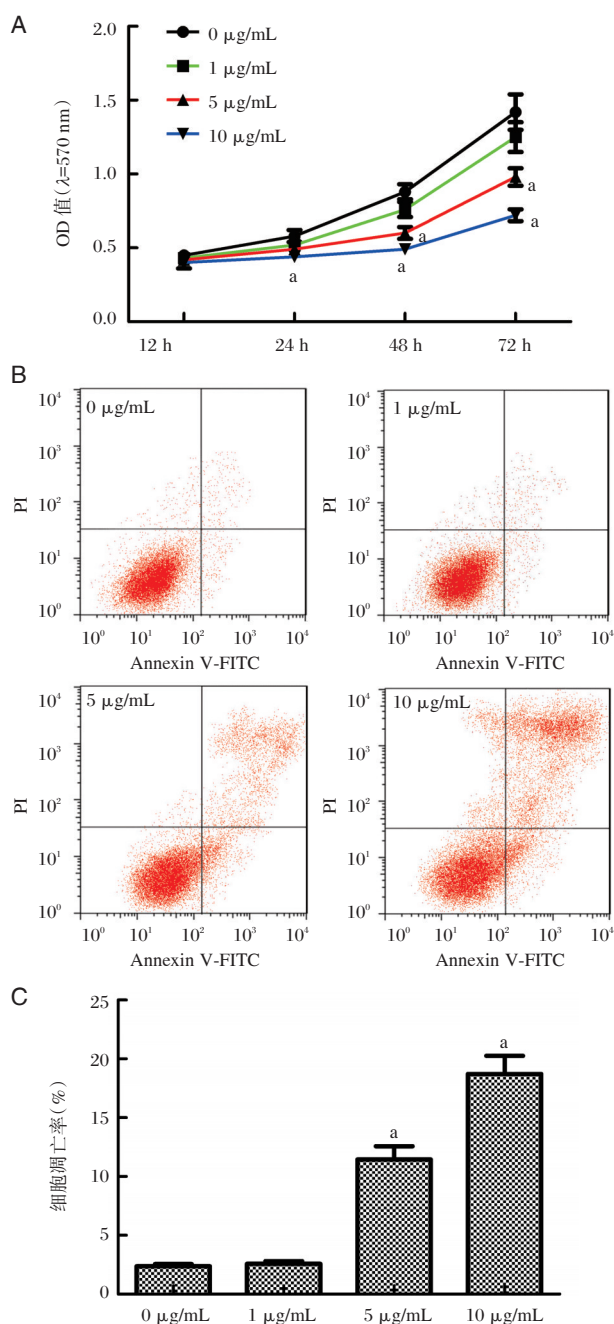


图1 丙泊酚对HCT116细胞增殖凋亡的影响
Figure 1 Effects of propofol on proliferation and apoptosis of HCT116 cells

的表达较0 µg/mL明显降低($P<0.05$),而以1 µg/mL丙泊酚处理后SOX4蛋白的表达与0 µg/mL处理组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2B和C。

2.3 SOX4是miR-133a的靶基因

采用TargetScan软件预测发现miR-133a与SOX4 3'UTR存在互补结合位点,结果见图3A;与

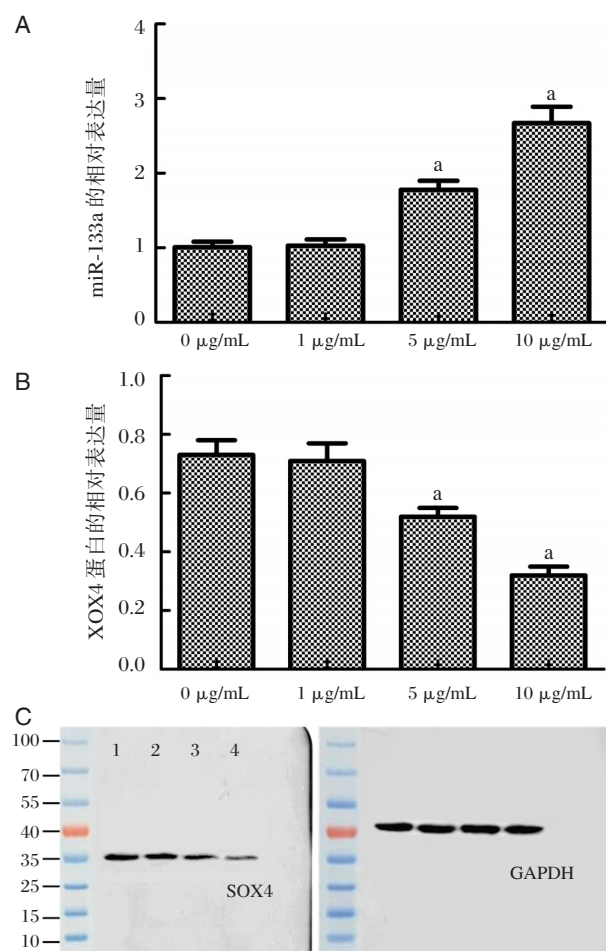
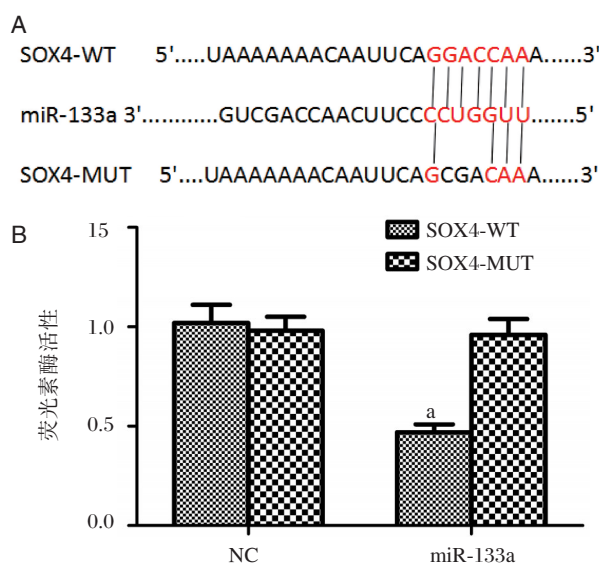


图2 丙泊酚对HCT116细胞中miR-133a和SOX4蛋白表达的影响
Figure 2 Effects of propofol on the expression of miR-133a and SOX4 protein in HCT116 cells

SOX4-WT共转染的miR-133a组细胞的荧光素酶活性较NC组明显降低($P<0.05$),而与SOX4-MUT共转染的miR-133a组和NC组之间荧光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$),结果见图3B。

2.4 miR-133a低表达逆转丙泊酚对HCT116细胞中SOX4蛋白表达的抑制作用

与对照组相比,丙泊酚组、丙泊酚+anti-miR-NC组和丙泊酚+anti-miR-133a组细胞中miR-133a表达显著升高($P<0.05$);与丙泊酚组相比,丙泊酚+anti-miR-133a组细胞中miR-133a表达水平显著降低($P<0.05$),而丙泊酚+anti-miR-NC组和丙泊酚组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图4A。同时,丙泊酚组、丙泊酚+anti-miR-NC组和丙



A: miR-133a 与 SOX4 3' UTR 的结合位点; B: 荧光素酶活性; 与 NC 组相比, $^*P<0.05$ 。

图3 miR-133a 与 SOX4 靶向关系的验证结果

Figure 3 Verification of the targeting relationship between miR-133a and SOX4

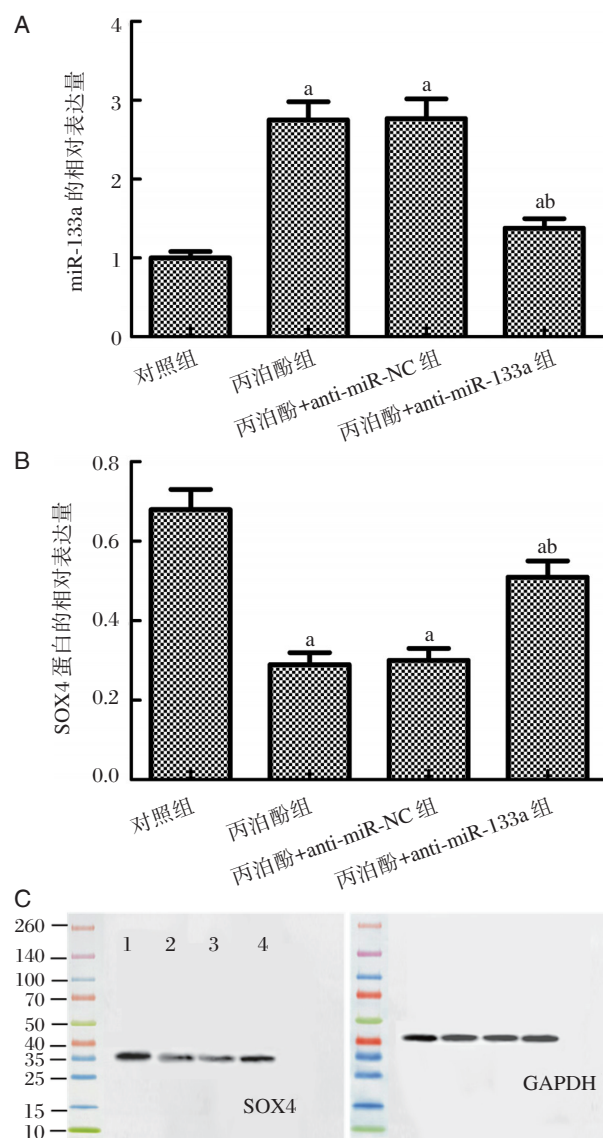
泊酚+anti-miR-133a 组细胞中 SOX4 蛋白的表达水平较对照组明显降低 ($P<0.05$), 且丙泊酚+anti-miR-133a 组高于丙泊酚组 ($P<0.05$)。结果见图 4B 和 C。

2.5 miR-133a 低表达逆转丙泊酚对结直肠癌细胞增殖和凋亡的调控作用

与对照组相比, 丙泊酚处理下 HCT116 细胞增殖能力显著受到抑制 ($P<0.05$); 与丙泊酚组相比, 丙泊酚+anti-miR-133a 组细胞的增殖能力显著增强 ($P<0.05$); 而丙泊酚+anti-miR-NC 组与丙泊酚组比较无显著差异 ($P>0.05$)。结果见图 5A。同时, 丙泊酚组细胞凋亡能力较对照组显著增强 ($P<0.05$), 但丙泊酚+anti-miR-133a 组细胞凋亡能力较丙泊酚组显著减弱 ($P<0.05$), 而丙泊酚+anti-miR-NC 组与丙泊酚组相比无显著变化 ($P>0.05$)。见图 5B 和 C。

3 讨论

丙泊酚是一种常用的静脉注射麻醉药, 在肿瘤手术过程中的作用不容忽视。随着研究的深入, 越来越多的证据显示, 丙泊酚在改善肿瘤患者预后和延长生存期方面具有积极作用^[10-12]。Yang 等^[13]和 Xing 等^[14]发现, 低浓度的丙泊酚能够降低脂多糖诱导的 HIF-1 α 、ROS 上调, 改善肿瘤微环境, 抑制上皮间充质转化和细胞侵袭、迁移; 另外, 还可通过 ERK1/2 途径上调 PUMA 表达抑制癌细

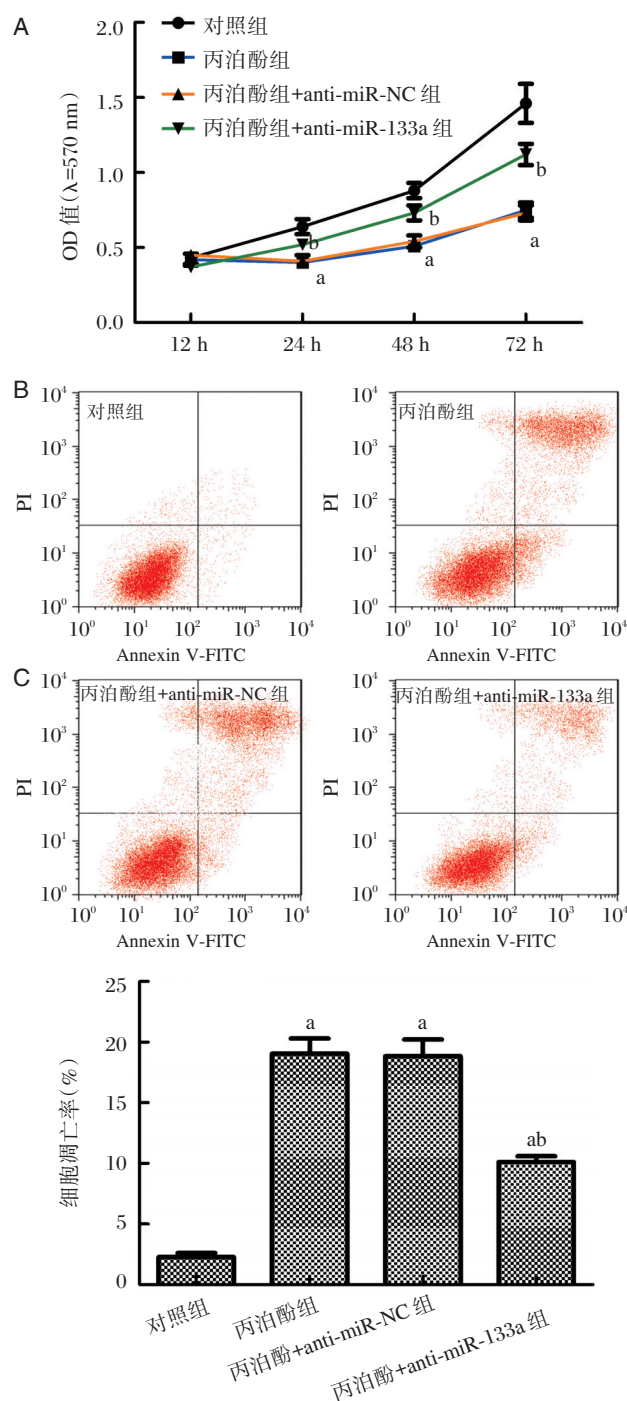


A: miR-133a 表达水平; B: SOX4 蛋白表达水平; 与对照组相比, $^*P<0.05$; 与丙泊酚组相比, $^bP<0.05$ 。C: Western blot 检测 SOX4 蛋白表达, 泳道 1-4 依次为对照组、丙泊酚组、丙泊酚+anti-miR-NC 组和丙泊酚+anti-miR-133a 组。

图4 miR-133a 低表达对丙泊酚作用下 HCT116 细胞中 SOX4 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of low expression of miR-133a on SOX4 expression in HCT116 cells induced by propofol

胞活性和诱导凋亡, 进而抑制非小细胞肺癌的恶性进展。Yu 等^[15]研究发现低浓度的丙泊酚可通过抑制 miR-24/p27 信号通路诱导乳腺癌 MDA-MB-435 细胞凋亡; Peng 等^[16]报道显示, 丙泊酚可通过上调 miR-451 影响 MMP-2 的表达抑制胃癌 SGC-7901 细胞的增殖和加速凋亡。可见, 低浓度的丙泊酚可通过复杂多样的分子机制在抑制肿瘤的发生发展过程中发挥着一定的积极作用。



A: MTT 检测细胞增殖; B: 流式细胞仪检测细胞凋亡; C: 细胞凋亡率; 与对照组相比, $^aP < 0.05$; 与丙泊酚组相比, $^bP < 0.05$ 。

图5 miR-133a低表达对丙泊酚作用下HCT116细胞增殖凋亡的影响

Figure 5 Effect of low expression of miR-133a on proliferation and apoptosis of HCT116 cells induced by propofol

目前,丙泊酚在结直肠癌中的研究已有报道。例如:余海燕等^[5]研究得到的丙泊酚能够抑制结直肠癌 LoVo 细胞和诱导细胞凋亡。本研究在结直肠

癌 HCT116 细胞中进一步验证了上述结果。根据上述资料显示,丙泊酚可通过调控 miRNAs 如 miR-451 和 miR-24 等参与其抑肿瘤机制。miRNAs 是一类短小的内源性非编码 RNA,可通过与靶 mRNAs 的 3' UTR 结合在转录后水平上抑制靶基因表达,参与细胞增殖、转移和凋亡等多种生物学过程。miR-133a 是一种与肿瘤发生发展密切相关的 miRNA,被证实可在胃癌、乳腺癌和非小细胞肺癌等多种肿瘤中异常低表达,而其过表达可通过调控相关靶基因如 *USP39* 和 *LASPI* 等发挥抑制癌细胞增殖和增强细胞凋亡的作用^[17-19];既往研究证实 miR-133a 在结直肠癌的发生发展过程中发挥着重要作用;miR-133a 在结直肠癌中低表达,且扮演着肿瘤抑制因子的角色^[7]。本研究发现,丙泊酚能够促进 HCT116 细胞中 miR-133a 的表达。该结果与 Wang 等^[6]在胰腺癌的研究中发现的丙泊酚可通过上调 miR-133a 表达的结果相吻合。结果提示,miR-133a 可能参与丙泊酚调控结直肠癌增殖和凋亡的分子机制。

SOX4 是 SOX 转录因子家族中的重要成员,在多种肿瘤组织或细胞中异常高表达,而干扰其表达可抑制肿瘤细胞的增殖并促进细胞凋亡^[20]。既往研究证实 SOX4 也在结直肠癌的发生发展过程中发挥着重要作用;靶向抑制异常高表达的 SOX4 可抑制结直肠癌细胞的增殖和体外侵袭^[21]。本研究还发现,丙泊酚能够抑制 HCT116 细胞中 SOX4 的表达。该结果与 Du 等^[22]在子宫内膜癌的研究中发现的丙泊酚可抑制 SOX4 的表达的结果相一致。这提示 SOX4 可能在丙泊酚调控结直肠癌增殖和凋亡过程中扮演着重要角色。

另外,本研究通过生物信息学软件预测发现 miR-133a 与 SOX4 3' UTR 存在互补结合位点,双荧光素酶报告基因实验证实 SOX4 是 miR-133a 的靶基因。这与 Li 等^[23]在食管癌的研究中证实 SOX4 是 miR-133a 的靶基因的结果相吻合。本研究通过转染 miR-133a inhibitor 成功下调 miR-133a 表达后进一步检测发现,miR-133a 低表达可逆转丙泊酚对 HCT116 细胞增殖和 SOX4 蛋白表达的抑制作用以及对 HCT116 细胞凋亡的促进作用。结果提示,丙泊酚可通过上调 miR-133a 进而抑制其靶基因 SOX4 的表达发挥抑制 HCT116 细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。

综上所述,丙泊酚可通过调控 miR-133a/SOX4 表达抑制结直肠癌 HCT116 细胞增殖和促进癌细胞凋亡。该结果为丙泊酚在结直肠癌手术过程中发挥着积极作用提供新的实验依据,也为有望成为结直肠癌手术中的理想麻醉药提供新的参考依据。

参考文献

- [1] 杨陈伟,王海云. COX-2 抑制剂与丙泊酚抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国医师杂志, 2017, 19(6):949.
- [2] 杨国庆,刘德军. 丙泊酚通过 MAPK/ERK 途径抑制食管癌细胞系 EC9706 中 VEGF 的表达[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(12):90-94.
- [3] Yang C, Gao J, Yan N, et al. Propofol inhibits the growth and survival of gastric cancer cells in vitro through the upregulation of ING3 [J]. *Oncology reports*, 2017, 37(1):587-593.
- [4] Xu W, Zheng J, Bie S, et al. Propofol inhibits Wnt signaling and exerts anticancer activity in glioma cells[J]. *Oncology letters*, 2018, 16(1):402-408.
- [5] Xu K, Tao W, Su Z. Propofol prevents IL-13-induced epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells [J]. *Cell Biology International*, 2018, 42(8):985-993.
- [6] 余海燕,刘德生,王云. 丙泊酚对结直肠癌细胞生物学行为的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(2): 245-250.
- [7] Li W, Chen A, Xiong L, et al. miR-133a acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting eIF4A1 [J]. *Tumor Biology*, 2017, 39(5): 101042831769838.
- [8] Dong Y, Zhao J, Wu CW, et al. Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer[J]. *Molecular Cancer Research*, 2013, 11(9):1051-1060.
- [9] Wang ZT, Gong HY, Zheng F, et al. Propofol suppresses proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by upregulating microRNA-133a expression[J]. *Genetics & Molecular Research Gmr*, 2015, 14(3): 7529.
- [10] Wang J, Cheng C, Lu Y, et al. Novel findings of anti-cancer property of propofol[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2018, 18(2): 156-165.
- [11] Tian HT, Duan XH, Yang YF, et al. Effects of propofol or sevoflurane anesthesia on the perioperative inflammatory response, pulmonary function and cognitive function in patients receiving lung cancer resection [J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2017, 21(23):5515-5522.
- [12] Heui LJ, Kang SH, Yunkwang K, et al. Effects of propofol-based total intravenous anesthesia on recurrence and overall survival in patients after modified radical mastectomy: a retrospective study [J]. *Korean Journal of Anesthesiology*, 2016, 69(2):126-132.
- [13] Yang N, Liang Y, Yang P, et al. Propofol suppresses LPS-induced nuclear accumulation of HIF-1 α and tumor aggressiveness in non-small cell lung cancer [J]. *Oncology reports*, 2017, 37(5):2611-2619.
- [14] Xing SG, Zhang KJ, Qu JH, et al. Propofol induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via ERK1/2-dependent upregulation of PUMA [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(13):4341-4349.
- [15] Yu B, Gao W, Zhou H, et al. Propofol induces apoptosis of breast cancer cells by downregulation of miR-24 signal pathway [J]. *Cancer Biomarkers*, 2017, 21(1-3):1-7.
- [16] Peng Z, Zhang Y. Propofol inhibits proliferation and accelerates apoptosis of human gastric cancer cells by regulation of microRNA-451 and MMP-2 expression [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2):1-9.
- [17] Xiang D, Su H, Feng J, et al. miR-133a, directly targeted USP39, suppresses cell proliferation and predicts prognosis of gastric cancer [J]. *Oncology Letters*, 2018, 15(6):8311-8318.
- [18] Sui Y, Zhang X, Yang H, et al. MicroRNA-133a acts as a tumour suppressor in breast cancer through targeting LASP1 [J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(2):473-482.
- [19] Wang Y, Li J, Chen H, et al. Down-regulation of miR-133a as a poor prognosticator in non-small cell lung cancer [J]. *Gene*, 2016, 591(2):333-337.
- [20] Zhou Y, Wang X, Huang Y, et al. Down-regulated SOX4 expression suppresses cell proliferation, metastasis and induces apoptosis in Xuanwei female lung cancer patients [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, 116(6):1007-1018.
- [21] Wang B, Li Y, Tan F, et al. Increased expression of SOX4 is associated with colorectal cancer progression [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(7):9131-9137.
- [22] Du Q, Liu J, Zhang X, et al. Propofol inhibits proliferation, migration, and invasion but promotes apoptosis by regulation of Sox4 in endometrial cancer cells [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2018, 51(4):e6803.
- [23] Li S, Qin X, Li Y, et al. MiR-133a suppresses the migration and invasion of esophageal cancer cells by targeting the EMT regulator SOX4 [J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(8):1390-1403.

• 综 述 •

树突状细胞及中性粒细胞在狼疮发病中的研究进展

卿平英 刘毅*

〔摘 要〕 系统性红斑狼疮(SLE)作为自身免疫性疾病,以产生多种自身抗体从而导致不同靶器官损害为显著特点,其发病机制及病因尚未明确。树突状细胞(DCs)具有诱导免疫应答和免疫耐受双向调控的重要作用,DCs 免疫耐受失衡可导致 T、B 细胞异常活化,进而出现多系统、多器官损伤。中性粒细胞(PMN)在免疫应答和免疫调控中扮演着重要的角色。本文通过探讨树突状细胞及中性粒细胞在 SLE 发病中作用的概述,旨在为 SLE 发病机制的探究奠定基础。

〔关键词〕 系统性红斑狼疮;树突状细胞;中性粒细胞;免疫耐受

Research progress of dendritic cells and neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

QING Pingying, LIU Yi*

(Department of Rheumatology and Immunology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

〔ABSTRACT〕 Systemic lupus erythematosus (SLE), as an autoimmune disease, produces a variety of autoantibodies that cause significant damage to different target organs. The pathogenesis and etiology are not well defined. Dendritic cells (DCs) play an important role in the induction of immune response and immune tolerance. The imbalance of DCs immune tolerance can lead to the abnormal activation of T and B cells, resulting in multiple system and multiple organ damage. Neutrophils (PMN) play an important role in immune response and immune regulation. This article aims to lay the foundation for the study of the pathogenesis of SLE by an overview of the role of PMN-mediated differentiation and regulation of DC in the pathogenesis of SLE.

〔KEY WORDS〕 Systemic lupus erythematosus; Dendritic cells; Neutrophils; Immune tolerance

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)作为典型的自身免疫性疾病,临床特点以产生大量的针对自身细胞核成分的抗体为主要特征,可出现多系统、多脏器的受累^[1-2]。免疫耐受是免疫系统对自身抗原的特异性免疫无反应状态,是维持免疫自稳的重要机制^[3]。大量研究证明,SLE的发病机制主要是由于自身抗原暴露诱导大量自身抗体产生、抗原抗体免疫复合物沉积于全身各组织器官,T淋巴细胞、B淋巴细胞组织

渗透,中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)、树突细胞(dendritic cells, DCs)、巨噬细胞促进组织炎症损伤,进而造成恶性循环^[4-6]。本文通过对 PMN 及 DCs 在 SLE 发病中作用的概述,旨在为 SLE 发病机制的探究奠定基础。

1 SLE 免疫机制研究进展

SLE 是一种自身免疫性疾病,发病患者主要以育龄期女性为主,在我国发病率呈现逐年递增的

基金项目:中华医学会风湿病学分会燎原计划(IYJH-337)

作者单位:四川大学华西医院风湿免疫科,四川,成都 610041

*通信作者:刘毅, E-mail: yi2006liu@163.com

趋势^[7]。已有研究证明,SLE发病与遗传因素、环境因素以及个体差异等诸多因素有关,且进一步诱导免疫失衡是发病的主要原因^[8]。

1.1 T淋巴细胞在SLE发病中的作用

T淋巴细胞是适应性免疫反应的重要组成部分,主要分为CD4和CD8细胞。其中CD8细胞具有细胞毒性,可直接特异性地清除、杀伤被病原体感染的细胞以及自身发生恶性转化的细胞(如癌细胞)等。而CD4细胞,其主要通过分泌各种细胞因子对免疫应答进行调控,主要分为Th1、Th2、Th17、Tfh和Treg等不同的细胞亚群。各种类型的辅助CD4细胞是维持机体正常免疫功能和免疫平衡的关键调节因素^[9-10]。研究发现Th1/Th2失衡是自身免疫性疾病(如类风湿关节炎,系统性红斑狼疮,硬皮病等)发病的重要原因^[11-12]。郝慧琴等^[13]研究结果提示Th17细胞及Treg细胞参与SLE的发生、发展,且Th17/Treg可以作为SLE疾病活动和病情评价的可靠指标。黄自坤等^[14]研究结果表明,SLE组CD4⁺T淋巴细胞TIGIT表达水平显著提高;SLE患者中抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体阳性组外周血CD4⁺T细胞TIGIT表达水平均高于对照组。SLE患者CD4⁺T细胞TIGIT表达水平与SLE疾病活动度指数、尿微量白蛋白、尿IgG、尿转铁蛋白呈正相关关系。

1.2 B细胞在SLE发病中的作用

B细胞通过产生大量的自身抗体,从而影响自身的免疫细胞参与SLE发病^[15]。陆一闻等^[16]在活动期SLE患者中加入抗IL-17抗体阻断后,该群细胞的正向促进功能减退,进而说明可能是通过B细胞异常增殖,向浆细胞的分化,分泌大量的自身抗体,而参与狼疮的发生与发展。

2 自身免疫耐受机制研究进展

由于胸腺的阴性选择不能完全清除自身免疫反应性T细胞,因此,在免疫系统中还存在外周耐受机制对自身免疫反应进行调控^[17]。严冰等^[18]研究结果表明,活动期和稳定期SLE患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞比例均明显提高,且SLE患者CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞表达水平与SLE疾病活动指数(SLE disease activity index, SLEDAI)呈正相关,活动期SLE患者CD4⁺CD25⁺T细胞中Foxp3在蛋白和基因转录水平上的表达均高于健康对照组,进而说明,SLE患者外周血中CD4⁺

CD25⁺Foxp3⁺T细胞比例变化,可能反应了SLE发病中T细胞外周免疫耐受失衡机制,即调节性T细胞的抑制效应被下调。

3 中性粒细胞在SLE发病机制中的研究进展

中性粒细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMN)来源于骨髓造血干细胞,是机体内数量最多的白细胞,其不仅具有固有免疫的多种功能,还涉及其他重要免疫功能效应,在适应性免疫中亦起到重要的刺激作用^[19]。

3.1 PMN比例在SLE患者治疗中的应用

余建林等^[20]研究结果表明,高疾病活动组与低疾病活动组间中性粒细胞与补体C3比值(neutrophils to complement C3 ratio, NC3R)、中性粒细胞与淋巴细胞比值(neutrophils to lymphocytes ratio, NLR)水平差异具有统计学意义,SLE活动度评分与NC3R、NLR具有相关性。覃凤娴等^[21]研究表明,与健康对照组相比,SLE组患者NLR,血小板/淋巴细胞比值(platelet/lymphocyte ratio, PLR)升高,平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)降低,差异具有统计学意义;经治疗后,活动组SLE患者NLR、PLR、SLEDAI评分下降,MPV上升,差异具有统计学意义。常俊等^[22]研究表明,SLE组中,狼疮肾炎患者外周血中性粒细胞数及其比例高于无狼疮肾炎患者。中性粒细胞比例与24-h尿蛋白呈正相关。狼疮重度活动患者中性粒细胞比例高于非重度活动患者,中性粒细胞比例与SLE疾病活动指数评分呈正相关。

3.2 中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)的作用

NETs是由中性粒细胞释放,由染色质及附着其上的颗粒蛋白,包括中性粒细胞弹性蛋白酶、髓过氧化物酶等组成的纤维网状结构。已有研究发现,NETs能够促进SLE患者内皮功能紊乱^[23]。同时,蒋秋梅等^[24]研究发现,NETs的形成过多及清除障碍也可能参与了SLE的发病机制,SLE患者的NETs水平与SLEDAI评分呈正相关。贾庆龄等^[25]研究表明,NETs能够显著促进单核细胞分泌IL-1 β 、IFN- α 、TNF- α 、MCP-1、IL-6。

4 DCs在SLE发病机制中的研究进展

树突状细胞(DCs)在系统性红斑狼疮的发病中扮演重要的作用,DCs是目前已知功能最强大

专职抗原呈递细胞 (antigen - presenting cells, APCs), 具有诱导免疫应答和免疫耐受双向调控的重要作用。DCs 免疫耐受失衡可导致 T、B 细胞的异常活化, 进而出现多系统、器官损伤^[26]。DCs 是目前自身免疫性疾病、肿瘤免疫、移植免疫等领域最常用的“载体”和“佐剂”, 使 DCs 维持在未成熟阶段, 诱导其发生耐受反应成为 SLE 治疗的新的靶点^[27]。林小军等^[28]研究表明, SLE 患者外周血单核细胞来源的未成熟树突细胞可能存在自发活化状态, 即使无活化信号存在, 亦能有效递呈抗原, 协同刺激 T 细胞, 致使患者外周免疫耐受状态被打破。陈洋等^[29]研究表明, SLE 患者髓样树突状细胞和浆细胞样树突状细胞 CD200R 表达均低于健康对照组, 说明 SLE 患者 DCs 表达 CD200R 下降, 可能与 SLE 的发生及炎症状态密切相关。赵小娟等^[30]研究表明, SLE 患者外周血浆细胞样树突状细胞与髓样树突状细胞比例显著降低, 且浆细胞样树突状细胞水平与 SLE 疾病活动及狼疮肾损害有关。

当机体受到刺激信号刺激后, 与其他抗原呈递细胞, 如 B 淋巴细胞和单核巨噬细胞相比, DCs 可以通过向初始 T 淋巴细胞传递信息, 活化初始 T 淋巴细胞, 诱导初始的免疫应答, 从而调控免疫反应和免疫耐受, 达到固有免疫和适应性免疫的桥梁作用。PMN 是固有免疫反应过程中的主要细胞, 在感染早期能够形成抵御外来病原菌的第一道防线, 同时其也可对参与适应性免疫应答的某些细胞因子起到一定的调节作用, 从而促进诱导 DCs 分化作用。

5 小结与展望

综上所述, 系统性红斑狼疮发病机制复杂, 涉及遗传和环境诸多方面因素的影响, PMN 和 DCs 在 SLE 的发病过程中发挥着重要, PMN 对 DCs 介导作用进一步揭示了固有免疫和适应性免疫的紧密联系。目前, 已有一些研究应用 DCs 治疗自身免疫性疾病, 但通过调节 DCs, 达到诱导免疫耐受的目的则还需大量的实验和临床研究作为佐证。因此, 随着医学研究技术的不断发展, 拓展研究 PMN 与 DCs 在 SLE 中的作用, 或者与其他免疫细胞间的相互作用, 以期 SLE 的临床治疗提供新的治疗靶点, 制定针对性的治疗方案, 探究 SLE 发病的免疫机制仍将成为今后研究的热点。

参考文献

- [1] Feasi M, Pontali E, Usiglio D, et al. Erysipelothrix rhusiopathiae septicaemia in systemic lupus erythematosus[J]. Infez Med, 2018, 26(4):356-358.
- [2] Katz-Talmor D, Kivity S, Blank M, et al. Cannabidiol treatment in a murine model of systemic lupus erythematosus accelerates proteinuria development[J]. Isr Med Assoc J, 2018, 20(12):741-745.
- [3] Zhao M, Duan XH, Wu ZZ, et al. Severe vitamin D deficiency affects the expression of autophagy related genes in PBMCs and T-cell subsets in active systemic lupus erythematosus [J]. Am J Clin Exp Immunol, 2017, 6(4):43-51.
- [4] Pan F, Tang W, Zhou Z, et al. Intestinal macrophages in mucosal immunity and their role in systemic lupus erythematosus disease [J]. Lupus, 2018, 27(12):1898-1902.
- [5] Llanos C, Carreño LJ, Gutierrez MA, et al. Genetic and pharmacological modulation of dendritic cell - T cell interactions as a therapeutic strategy for systemic lupus erythematosus [J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(6):544-553.
- [6] Yin ZJ, Ju BM, Zhu L, et al. Increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in Chinese systemic lupus erythematosus: correlate with disease activity and organ involvement[J]. Lupus, 2018, 27(13):2057-2068.
- [7] El-Maraghy N, Ghaly MS, Dessouki O, et al. CD4+CD25-Foxp3+ T cells as a marker of disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients[J]. Arch Med Sci, 2018, 14(5):1033-1040.
- [8] Hou H, Chen Z, Tian L, et al. Leptotrichia trevisanii bacteremia in a woman with systemic lupus erythematosus receiving high-dose chemotherapy [J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1):661.
- [9] Raeisi D, Zare ME, Nasir A, et al. Sex hormones and prolactin levels and their association with anti cardiolipin antibody in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2018, 17(4):336-345.
- [10] Crotty S. A brief history of T cell help to B cells [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(3):185-189.
- [11] Aas-Hanssen K, Thompson KM, Bogen B, et al. Systemic lupus erythematosus: molecular mimicry between anti-dsDNA CDR3 idiotype, microbial and self peptides-as antigens for Th cells [J]. Front Immunol, 2015, 6:382.

- [12] Jimeno R, Gomariz RP, Garín M, et al. The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(4):457-467.
- [13] 郝慧琴, 张少然, 李小峰, 等. 外周血 Th17 细胞及 Treg 细胞检测对系统性红斑狼疮病情的评估价值 [J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(3):242-244.
- [14] 黄自坤, 罗忠勤, 李雪, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血 CD4⁺T 细胞 TIGIT 的表达和意义 [J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(6):512-518.
- [15] Tipton CM, Hom JR, Fucile CF, et al. Understanding B-cell activation and autoantibody repertoire selection in systemic lupus erythematosus: AB-cell immunomics approach [J]. *Immunol Rev*, 2018, 284(1):120-131.
- [16] 陆一闻, 潘秀军, 郑英霞, 等. 系统性红斑狼疮患者的白细胞介素 17 阳性调节性 T 细胞对 B 细胞的存活及抗体分泌的调节 [J]. *诊断学理论与实践*, 2015, 14(6):528-532.
- [17] Yu X, Zhang N, Lin W, et al. Regulatory effects of four ginsenoside monomers in humoral immunity of systemic lupus erythematosus [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):2097-2103.
- [18] 严冰, 刘毅, 谢其冰, 等. 从 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞变化看系统性红斑狼疮外周免疫耐受失衡 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(8):695-698.
- [19] García-Carrasco M, Mendoza-Pinto C, Macías-Díaz S, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein activity on peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear neutrophils to methotrexate in systemic lupus erythematosus patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2017, 36(10):2267-2272.
- [20] 余建林, 吴洋, 曾婷婷, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值、中性细胞与补体 C3 比值在评估系统性红斑狼疮疾病活动度中的应用 [J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(7):490-492.
- [21] 覃凤娴, 韦维, 邹燕, 等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值、血小板/淋巴细胞比值及平均血小板体积与系统性红斑狼疮活动度的相关性研究 [J]. *重庆医学*, 2018, 47(18):2428-2431.
- [22] 常俊, 湛蓉. 中性粒细胞比例评估系统性红斑狼疮病情的应用价值 [J]. *江苏医药*, 2017, 43(23):1707-1710.
- [23] Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, et al. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(7):1417-1424.
- [24] 蒋秋梅, 晏波, 苟静, 等. 系统性红斑狼疮患者中性粒细胞胞外诱捕网水平分析 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(8):542-546.
- [25] 贾庆龄, 杨琨, 唐莎, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网对单核细胞分泌炎症介质的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 18(5):389-393.
- [26] Liu M, Wu X, Liu X, et al. Contribution of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) polymorphisms in susceptibility of systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome [J]. *Hum Immunol*, 2015, 76(11):808-811.
- [27] Dieker J, Tel J, Pieterse E, et al. Circulating apoptotic microparticles in systemic lupus erythematosus patients drive the activation of dendritic cell subsets and prime neutrophils for NETosis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(2):462-472.
- [28] 林小军, 蔡小燕, 叶静华, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血单核细胞来源的未成熟树突细胞活化状态检测及意义 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(4):344-347.
- [29] 陈洋, 李扬, 张焯. 系统性红斑狼疮患者树突细胞 CD200R 下调意义 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2016, 10(2):106-111.
- [30] 赵小娟, 汪国生, 俞大亮, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血树突状细胞的变化及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(8):948-952.

广东省产科重大疾病重点实验室

广州医科大学附属第三医院有多间重点实验室,其中妇产科实验室在2011年经广东省科技厅批准立项被评为国家临床重点专科、广东省母胎医学工程技术研究中心、广东省产科临床质量控制中心、广东省产科重大疾病防控协调创新中心、广东省卫生厅特色专科;妇产科学为广东省教育厅重点学科、广州市重点学科;临床医学(妇产科学方向)是广东省攀峰重点学科。并成立广州医科大学临床学系(妇产科学系)。实验室拥有广东省普通高校生殖与遗传重点实验室、广医三院-香港中文大学CMA联合实验室、广医三院-贺林院士新医学工作站。

实验室有科研人员35名,其中博士25名,副高级职称28名;博士生导师6名,硕士生导师21名;享有国务院特殊津贴专家2名,中组部“青年千人”1名,中科院百人计划人才2名。实验室功能齐全,设有临床诊断实验室、基础研究实验室、生物样本库,拥有基因诊断、芯片分析、高通量测序、分子生物学、细胞遗传、细胞培养、生化分析等各类专业实验室,总面积约3 000 m²,现有液相色谱串联质谱((liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)、高通量全自动样本制备工作站、分析型/分选型流式细胞仪、激光共聚焦显微镜、程序降温仪、生物能量代谢测定仪、多功能微孔板分析仪、9700 PCR仪、7500 荧光定量PCR仪、显微操作系统、基因芯片扫描仪、EZEISS-MetaSystem全自动染色体分析工作站等,各种先进仪器设备总值约8 000万元,价值超过5万元的设备近100台/套。

实验室已经形成以产科重症救治、胎儿疾病诊断、宫内治疗的临床培训和基础科学研究为特色的母胎医学研究体系。形成了胎盘起源性产科疾病的防治研究、遗传病防治研究与干细胞治疗、胚胎早期发育与生殖健康3个稳定而富有特色的研究方向,主要针对产科重大疾病的临床诊治与基础研究。 β -地中海贫血等地方遗传病干细胞资源库的建立及基因治疗研究;生殖医学基础研究及分子病的胚胎植入前诊断(preimplantation genome diagnosis, PGD)研究;环境与优生的关系、羊水异常、产后出血、子痫前期等妊娠相关重大疾病发病机制等深入研究。建立了临床级非基因整合的多型别地贫iPS细胞库,高效安全的基因编辑平台以及体外造血分化体系,并利用人源化 β -地贫小鼠完成了临床前试验。近5年来实验室获各种资助超4 000万元,其中承担国家自然科学基金委员会-广东省人民政府联合基金重点项目1项,国家自然科学基金重点项目2项,国家自然科学基金面上及青年项目35项,省级科研课题47项,市区级科研基金32项。获中华医学会科技奖三等奖1项,广东省科技进步二等奖1项,广东省科技进步奖三等奖1项、广州市科技进步二等奖1项。获得广州市医学会优秀论文一等奖3人次。主编出版专著2部,参与编写8部,获授权国家专利15项。近5年来发表SCI论文342篇,其中5分以上67篇,10分以上26篇。近3年共培养名83硕士研究生,独立招收博士研究生8名。



杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

