



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

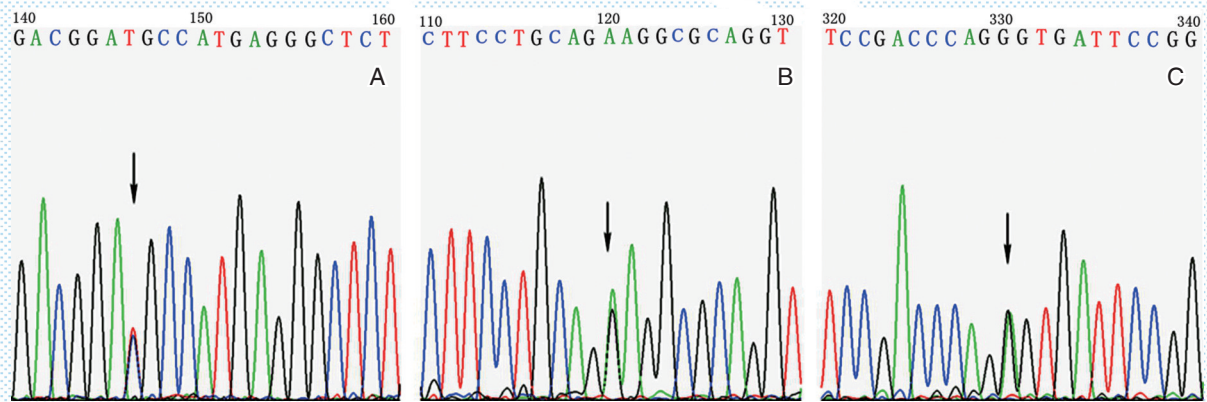
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2019年3月 第11卷 第2期 总第60期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 11 Number 2 March 2019



A: 第1外显子启动子区 c.46 C>T 杂合突变; B: 第13号外显子 c.156 G>A 杂合突变; C: 第14号外显子 c.168 G>A 杂合突变。

图(P88) FXII基因突变测序结果

Figure (P88) The sequencing results of factor XII gene mutation

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCJ 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692198

03>



分子诊断与治疗杂志

二〇一九年三月

第十一卷 第二期

中山大学

陈填烽



陈填烽, 1981年1月出生。2003年取得暨南大学化学系学士学位, 2005年取得暨南大学化学系硕士学位, 2008年获香港中文大学生物系博士学位。于2008年在香港中文大学进行博士后研究工作。

现任暨南大学教授、博导、化学与材料学院副院

长、广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心主任、暨南大学附属第一医院纳米诊疗研究所所长、香港大学荣誉教授。获得霍英东青年教师奖、万人计划青年拔尖人才、广东省特支计划青年拔尖人才广东省杰青等荣誉称号。担任《Chinese Chemical Letters》青年编委, 中国抗癌协会青年理事会理事, 中国抗癌协会纳米肿瘤学专业委员会青年委员, 中国生物物理学会生物微量元素分会委员, 广东省化学学会理事, 广东省化学会化学生物学专业委员会副主任, 农业部富硒产品开发与质量控制重点实验室学术委员会委员。

陈填烽教授一直致力于以临床问题为导向的纳米创新药物设计与诊疗应用研究, 组建多学科交叉的研究团队, 以技术创新、科研升级、成果转化为核心, 以技术整合为重点进行创新药物研发, 突破从实验室研究到产业化开发的技术瓶颈。获得万人计划青年拔尖人才项目、国家863计划、国家自然科学基金项目(3项)、国家科技支撑计划及广东省自然科学基金等项目的资助。先后入选了教育部新世纪优秀人才支持计划(2010)、国家863青年科学家(2013)、广东省杰出青年基金项目(2013)、霍英东青年教师奖(2014)及万人计划青年拔尖人才(2015)。以第一完成人获得2018年中华医学科技奖青年科技奖、2018广东省自然科学二等奖、2017广东省科技进步三等奖、2017中国产学研创新奖、2015广州市科技二等奖、2016首届中国创新大赛优秀奖、2014第三届金博奖及2012第七届国际发明展览会银奖, 推动了硒化学在生物医药领域的应用。

近5年以通讯作者在 Angew Chem Int Ed、Adv Funct Mater 及 ACS Nano 等本领域主流杂志发表论文超过200篇, 封面论文30篇, 个人H-index 42。申报中国专利45项, 授权美国专利1项, 实现技术成果转化8项。参与编写专著3部。培养和招收博士后、博士及硕士研究生约60名, 已毕业的研究生28人, 其中, 2人获广东省优秀硕士研究生学位论文; 1人被评为广东省优秀研究生, 毕业学生已评上高级职称6人。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019年3月 第11卷 第2期 总第60期 Bimonthly Volume 11 Number 2 March 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 叶萍萍 李彩珍
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2019年3月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2019.3.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

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

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年3月 第11卷 第2期

目次

述评

ctDNA检测在结直肠癌临床诊疗中的应用进展 谢英超 周春莲 徐伟文(73)

论著

利用NGS技术同时检测缺失和点突变型地中海贫血 黄杰 杨旭 孙楠等(79)
两种错义突变 p.Glu502Lys 和 p.Gly542Ser 所致遗传性XIII缺陷症家系的分析

..... 翁妙珊 林芬 章金灿等(86)

PPARGC1 启动子甲基化与II型糖尿病发病相关性分析 梁爽 王伟伟 孙力等(91)

ASAP1 和 GSTM3 基因多态性与肺结核易感性的相关性研究 张国栋 宋刚 李明辉(96)

耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究 李飞 李丽娟 梁德志等(101)

泸州地区冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布的研究 彭胡 唐克彬 颜彪等(107)

HBV DNA高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价 余学高 邓间开 何小洪等(111)

左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者Treg/Th17细胞、血清炎症因子和肾功能指标的影响
..... 鲁冰 任东升 栗明(117)

乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF和组织LOX水平与淋巴结转移的相关性分析
..... 邢海霞 赵明燕 郭勇(122)

2型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析
..... 韩晨鹏 徐清芳 张美华等(128)

血小板生长因子、白介素-17在肺纤维化诊断及预后的价值 徐林 罗义华 李霞(132)

代谢综合征对行根治术前列腺癌患者预后的影响 曾明坤 刘玲 张晓梅等(136)

云南玉溪地区高敏肌钙蛋白T在人群中的分布特点分析 叶丹 冯磊 吴英松(141)

综述

影像技术和分子检测技术在阿尔茨海默病诊断中的应用研究进展
..... 李卓然 魏新华 江新青(146)

下一代测序技术在遗传相关性智力障碍诊断中的应用 沈茹 任保艳 蒋鸿超等(152)

专家风采

陈填烽 (封二)

实验室巡礼

广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 2 March 2019

CONTENTS

COMMENTS

- Progress in the application of circulating tumor DNA detection in clinical diagnosis and treatment of colorectal cancer
XIE Yingchao, ZHOU Chunlian, XU Weiven (73)

ORIGINAL ARTICLES

- Simultaneous detection of deletion and point mutation thalassemia using NGS technology
HUANG Jie, YANG Xu, SUN Nan, SUN Binyu, QU Shoufang (79)
- A pedigree analysis of hereditary XIII deficiency caused by two missense mutations of p.Glu502Lys and p.Gly542Ser
WENG Miaoshan, LIN Fen, ZHANG Jincan, WU Jiaoren, LI Dengsong, XIE Yuqiang, YANG Liye..... (86)
- Correlation analysis between *PPARGC1* promoter methylation and type II diabetes
LIANG Shuang, WANG Weiwei, SUN Li, ZOU Guanghui, DONG Zhiwu (91)
- Correlation between *ASAP1* and *GSTM3* gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis
ZHANG Guodong, SONG Gang, LI Minghui..... (96)
- Investigation on antimicrobial resistance characteristics and mechanism of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*
LI Fei, LI Lijuan, LIANG Dezhi, WANG Fengping, ZHANG Bashan (101)
- Study of the distribution of *CYP2C19* gene polymorphism in patients with coronary heart disease treated with PCI in Luzhou area
PENG Hu, TANG Kebin, YAN Biao, QIU Houbin, ZHU Bin..... (107)
- Performance verification and clinical evaluation of HBV DNA high-sensitivity detection kit
YU Xuegao, DENG Jiankai, HE Xiaohong, CHEN Peisong, CUI Danli, HUANG Bin (111)
- Effects of L-carnitine combined with hemodialysis on Treg/Th17 cells, serum inflammatory factors and renal function indexes in uremia patients
LU Bing, REN Dongsheng, LI Ming (117)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 2 March 2019

CONTENTS

Correlation between serum sex hormones, *IGF-1*, *VEGF* and tissue *LOX* levels and lymph node metastasis in patients with breast cancer

XING Haixia, ZHAO Mingyan, GUO Yong (122)

The evaluation of combined detection of serum resistin, *VEGF* and glycated albumin in early diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes

HAN Chenpeng, XU Qingfang, ZHANG Meihua, CAO Liang (128)

The value of platelet growth factor and interleukin-17 in the diagnosis and prognosis of pulmonary fibrosis

XU Lin, LUO Yihua, LI Xia (132)

Effect of metabolic syndrome on prognosis of patients undergoing radical prostatectomy

ZENG Mingkun, LIU Ling, ZHANG Xiaomei, MA Tao (136)

Analysis of distribution characteristics of high-sensitivity troponin T in the population in Yuxi area, Yunnan

YE Dan, FENG Lei, WU Yingsong (141)

REVIEWS

Advances in the application of imaging and molecular detection technology in the diagnosis of Alzheimer's disease

LI Zhuoran, WEI Xinhua, JIANG Xinqing (146)

Application of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Genetic related Intellectual Disability

SHEN Ru, REN Baoyan, JIANG Hongchao, WANG Xiaoyan (152)

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019年3月 第11卷 第2期 总第60期 Bimonthly Volume 11 Number 2 March 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 叶萍萍 李彩珍
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
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	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2019.3.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

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

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年3月 第11卷 第2期

目次

述评

ctDNA检测在结直肠癌临床诊疗中的应用进展 谢英超 周春莲 徐伟文(73)

论著

利用NGS技术同时检测缺失和点突变型地中海贫血 黄杰 杨旭 孙楠等(79)
两种错义突变 p.Glu502Lys 和 p.Gly542Ser 所致遗传性XIII缺陷症家系的分析

..... 翁妙珊 林芬 章金灿等(86)

PPARGC1 启动子甲基化与II型糖尿病发病相关性分析 梁爽 王伟伟 孙力等(91)

ASAP1 和 GSTM3 基因多态性与肺结核易感性的相关性研究 张国栋 宋刚 李明辉(96)

耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究 李飞 李丽娟 梁德志等(101)

泸州地区冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布的研究 彭胡 唐克彬 颜彪等(107)

HBV DNA高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价 余学高 邓间开 何小洪等(111)

左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者Treg/Th17细胞、血清炎症因子和肾功能指标的影响

..... 鲁冰 任东升 栗明(117)

乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF和组织LOX水平与淋巴结转移的相关性分析

..... 邢海霞 赵明燕 郭勇(122)

2型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析

..... 韩晨鹏 徐清芳 张美华等(128)

血小板生长因子、白介素-17在肺纤维化诊断及预后的价值 徐林 罗义华 李霞(132)

代谢综合征对行根治术前列腺癌患者预后的影响 曾明坤 刘玲 张晓梅等(136)

云南玉溪地区高敏肌钙蛋白T在人群中的分布特点分析 叶丹 冯磊 吴英松(141)

综述

影像技术和分子检测技术在阿尔茨海默病诊断中的应用研究进展

..... 李卓然 魏新华 江新青(146)

下一代测序技术在遗传相关性智力障碍诊断中的应用 沈茹 任保艳 蒋鸿超等(152)

专家风采

陈填烽 (封二)

实验室巡礼

广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 2 March 2019

CONTENTS

COMMENTS

- Progress in the application of circulating tumor DNA detection in clinical diagnosis and treatment of colorectal cancer
XIE Yingchao, ZHOU Chunlian, XU Weiven (73)

ORIGINAL ARTICLES

- Simultaneous detection of deletion and point mutation thalassemia using NGS technology
HUANG Jie, YANG Xu, SUN Nan, SUN Binyu, QU Shoufang (79)
- A pedigree analysis of hereditary XIII deficiency caused by two missense mutations of p.Glu502Lys and p.Gly542Ser
WENG Miaoshan, LIN Fen, ZHANG Jincan, WU Jiaoren, LI Dengsong, XIE Yuqiang, YANG Liye..... (86)
- Correlation analysis between *PPARGC1* promoter methylation and type II diabetes
LIANG Shuang, WANG Weiwei, SUN Li, ZOU Guanghui, DONG Zhiwu (91)
- Correlation between *ASAP1* and *GSTM3* gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis
ZHANG Guodong, SONG Gang, LI Minghui..... (96)
- Investigation on antimicrobial resistance characteristics and mechanism of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*
LI Fei, LI Lijuan, LIANG Dezhi, WANG Fengping, ZHANG Bashan (101)
- Study of the distribution of *CYP2C19* gene polymorphism in patients with coronary heart disease treated with PCI in Luzhou area
PENG Hu, TANG Kebin, YAN Biao, QIU Houbin, ZHU Bin..... (107)
- Performance verification and clinical evaluation of HBV DNA high-sensitivity detection kit
YU Xuegao, DENG Jiankai, HE Xiaohong, CHEN Peisong, CUI Danli, HUANG Bin (111)
- Effects of L-carnitine combined with hemodialysis on Treg/Th17 cells, serum inflammatory factors and renal function indexes in uremia patients
LU Bing, REN Dongsheng, LI Ming (117)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 2 March 2019

CONTENTS

Correlation between serum sex hormones, *IGF-1*, *VEGF* and tissue *LOX* levels and lymph node metastasis in patients with breast cancer

XING Haixia, ZHAO Mingyan, GUO Yong (122)

The evaluation of combined detection of serum resistin, *VEGF* and glycated albumin in early diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes

HAN Chenpeng, XU Qingfang, ZHANG Meihua, CAO Liang (128)

The value of platelet growth factor and interleukin-17 in the diagnosis and prognosis of pulmonary fibrosis

XU Lin, LUO Yihua, LI Xia (132)

Effect of metabolic syndrome on prognosis of patients undergoing radical prostatectomy

ZENG Mingkun, LIU Ling, ZHANG Xiaomei, MA Tao (136)

Analysis of distribution characteristics of high-sensitivity troponin T in the population in Yuxi area, Yunnan

YE Dan, FENG Lei, WU Yingsong (141)

REVIEWS

Advances in the application of imaging and molecular detection technology in the diagnosis of Alzheimer's disease

LI Zhuoran, WEI Xinhua, JIANG Xinqing (146)

Application of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Genetic related Intellectual Disability

SHEN Ru, REN Baoyan, JIANG Hongchao, WANG Xiaoyan (152)

ctDNA检测在结直肠癌临床诊疗中的应用进展

谢英超 周春莲 徐伟文*

[摘要] 循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是肿瘤细胞在坏死、凋亡后释放的一种游离DNA(cell free DNA, cfDNA), ctDNA的遗传信息与肿瘤保持着高度一致性,能克服常规组织活检所无法突破的肿瘤异质性问题, ctDNA检测可以实时、多次地了解肿瘤的状态。近年来, ctDNA检测在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的早期诊断与筛查、疗效判断与预后评估、耐药监测与用药指导中得到广泛应用。本文就以上几个方面综述 ctDNA检测在CRC临床诊疗中的应用进展,以期对CRC患者的临床诊疗认知有所裨益。

[关键词] 结直肠癌; 液体活检; 肿瘤标志物; 循环肿瘤DNA; 临床应用

Progress in the application of circulating tumor DNA detection in clinical diagnosis and treatment of colorectal cancer

XIE Yingchao, ZHOU Chunlian, XU Weiwen*

(School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Circulating tumor DNA (ctDNA), a kind of cell-free DNA (cfDNA), is released from tumor cells after necrosis or apoptosis. The genetic information of ctDNA is highly consistent with that of tumor, so it can overcome the heterogeneity of tumor which cannot be solved by conventional biopsy of tumor tissue. ctDNA detection can reflect the state of tumor constantly and repeatedly. In recent years, ctDNA detection has been widely used in the early diagnosis and screening of colorectal cancer, the evaluation of curative effect and assessment of prognosis, the monitoring of drug resistance and the guidance of drug use. In this article, the application of ctDNA detection in the clinical diagnosis and treatment of CRC will be reviewed, in order to benefit the clinical diagnosis and treatment of CRC patients.

[KEY WORDS] Colorectal cancer; Liquid biopsy; Tumor marker; Circulating tumor DNA; Clinical application

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的消化道肿瘤之一,据2018年全国最新癌症报告显示, CRC发病率、病死率在恶性肿瘤中均位居前5位且保持上升趋势^[1]。CRC起病隐匿,早期病变位于黏膜层及黏膜下层,且病情发展缓慢,直至中晚期才会出现明显临床症状^[2]。其发生发展是一个多因素、多基因、多过程综合作用的结果,既有

多种基因突变、缺失和杂合子丢失,又涉及表观遗传学改变如基因的甲基化以及组蛋白的修饰。当前CRC临床诊疗难点主要在于以下几个方面:①CRC在早期很难被及时发现;②组织活检有创,具有肿瘤异质性且反复获取不实际;③常规肿瘤标志物存在灵敏度低、特异性差等缺点;④不能随时对诊疗效果进行监测评估;⑤肿瘤的异质性

基金项目:2017年度大学生创新创业训练计划省级项目(No. 201712121118)

作者单位:南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通信作者:徐伟文, E-mail: xu_sandy2006@126.com

使得对个体化用药的指导以及耐药性监测手段受限等。早诊断早治疗、实时监控、靶向用药以及个体化治疗是提高肿瘤远期生存率、降低死亡率的关键,而无法准确捕捉具有时空特异性的肿瘤是当前癌症临床诊疗面临的重大难题,循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 检测被公认为是目前解决此问题的最佳方案。ctDNA 作为液体活检的生物标志物之一,具有较高的特异性,相较于传统诊断手段,ctDNA 检测表现出诸多优势:①无创,实时,多次;②能够反映肿瘤基因组信息;③假阳性率低,灵敏度高,准确度高;④能够对肿瘤的演化和适应性改变进行监控;⑤能够对肿瘤病人的治疗效果进行实时监控(尤其在追踪肿瘤转归、转移、复发等方面),为个性化治疗提供指导(如个性化靶向用药、个性化治疗等)。本文对比了常见的 ctDNA 检测技术并就 ctDNA 检测在结直肠癌早期诊断与筛查、疗效判断与预后评估、耐药监测与用药指导等方面的应用进展进行了综述,阐释了该技术的临床应用科学性及其优势、发展前景以及面临的挑战,以期对 CRC 患者的临床诊疗认知有所裨益。

1 ctDNA 的生物学特性

1948年, Mandel 和 Metais^[3]首次发现人体血液巾存在着游离 DNA。1965年, Bendich 团队^[4]发现肿瘤与循环游离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 存在相关性。1977年, Leon 等^[5]通过对比正常人,发现肿瘤患者血巾游离 DNA 浓度更高且与肿瘤病程及疗效相关。cfDNA 是由正常细胞、肿瘤细胞、循环肿瘤细胞等凋亡、坏死后释放到血管巾的游离 DNA,通常与蛋白质结合形成核小体游离于循环巾^[6],大小集中在 166 bp 左右^[7],片段之间差异较大。来源于肿瘤的这部分 cfDNA,称之为 ctDNA。

ctDNA 占 cfDNA 的比例可以低至 0.01%,也可高达 90%甚至以上,半衰期较短,从 15 min 到几个小时不等,并被肾脏、肝脏和脾脏迅速清除^[8]。ctDNA 的遗传信息与肿瘤保持着高度一致性,故可以通过分析 ctDNA 的基因变异类型与数量来确定治疗手段或靶向药物。此外, ctDNA 含量在不同类型肿瘤巾、同类型肿瘤不同个体巾以及同类型肿瘤不同分期巾均存在差异。Bettegowda 等人^[9]通过评估 16 种不同组织类型的 187 种肿瘤的

ctDNA,证明了不同的肿瘤类型 ctDNA 检出率不同;基因拷贝数不同可能导致同类型肿瘤患者的 ctDNA 浓度不同;ctDNA 检出率的差异也与分期有关:47%的 I 期癌症患者有 ctDNA 可检出,而 II、III、IV 期癌的 ctDNA 检出率分别为 55%、69% 和 82%。Yang 等^[10]报道了结直肠癌 IV 期患者的 ctDNA 浓度显著高于 I 期患者且 ctDNA 浓度增加与肿瘤大小增加相关,高浓度 ctDNA 的存在往往预示着癌症晚期及不良预后。

2 ctDNA 检测技术

目前 ctDNA 检测技术并不完善,理论上来说,所有能检测基因组信息的手段都可以检测 ctDNA,由于癌症患者血液巾肿瘤 ctDNA 的水平极其低,因此需要寻求高灵敏度和高特异性的检测技术。以 Sanger 测序法为代表的二代测序技术敏感性很低,下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)则大大提高了 ctDNA 检测的技术水准,其通过反复测序同一区域的 DNA 片段以此提高灵敏度和准确度,其通量高、自动化程度高,可在短时间内完成上百亿碱基的测序。正在发展的“第三代”全基因组测序技术虽成本昂贵,但在癌症患者个性化管理巾有着极大的应用前景。目前,对于已知致癌突变位点的检测,一般采用数字聚合酶链式反应(digital PCR, dPCR)、磁珠乳液扩增技术(beads, emulsion, amplification, and magnetics, BEAMing)、基于 PCR 的突变扩增系统(amplification refractory mutation system PCR, ARMs-PCR)、双向焦磷酸解激活的聚合反应(bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization, Bi-PAP)、标记扩增深度测序(tagged-amplicon deep sequencing, TAM-Seq)以及基于深度测序的肿瘤个体化指纹图谱(cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq);而对于未知致癌突变位点的检测,则可采用全基因组测序、外显子测序、RNA 末端平行分析法以及全基因组甲基化测序。常见的 ctDNA 检测技术比较见表 1。

3 ctDNA 在结直肠癌诊疗巾的应用

3.1 早期诊断与筛查

CRC 早期很难发现,多数患者初诊时就已处于中晚期阶段,这极大增加了 CRC 治疗难度,严重影响了患者的治疗,而恶性肿瘤诊疗的关键就在

表1 常见的 ctDNA 检测技术比较^[11-14]Table 1 Comparison of common technology for ctDNA detection^[11-14]

检测技术	技术原理/方法	优势	局限性
BEAMing	结合数字 PCR 以及流式技术,通过磁珠克隆 DNA,利用流式细胞仪定量检测	灵敏度高,可达到 0.005%,使拷贝数量化,可检测特定组织或人群中罕见的基因突变	实验操作步骤复杂,成本昂贵,难以用于常规分析,针对预定序列
dPCR	将一个标准的聚合酶链式反应分配到大量微小的反应器中,扩增结束后再通过阳性反应器的数目数出目标序列的拷贝数	可绝对定量,灵敏度可达单个核酸分子,检测限低至 0.001%	只能检测已知突变位点,通量低
ARMs-PCR	Taq DNA 聚合酶缺少 3'-5' 端外切酶活性,故对于 3' 末端错配的引物延伸速度变慢	灵敏度高,不产生 PCR 产物的污染,操作简便快速	只能检测已知突变位点
Bi-PAP	基于 PCR 的双向焦磷酸解激活的聚合反应	特异性强,可精确检测单核苷酸的变化	灵敏度有限
NGS	在 DNA 进行 PCR 扩增时,借助化学标志物在碱基插入 DNA 链时发出的信号如光信号等来读取序列信息	可实现大规模平行测序,灵敏度高,特异性强,可进行相对定量	耗时较长,成本较高,序列特异性偏差
TAM-Seq	标记扩增深度测序,二步扩增(预扩增、标签扩增),双向重复测序	可检测未知突变位点,测序通量高,敏感性和特异度高于 97%,相对成本较低,利于临床应用	基于新一代测序技术,检测时间相对较长
CAPP-Seq	基于捕获的 NGS 技术,利用定制化的基因突变位点库作为筛选器,对样本进行靶向捕获后再进行超深度测序	灵敏度更高,特异性更强,与全外显子测序等相比经济可行	耗时较长

于早期发现、早期治疗。CRC 患者在早期(I 期、II 期)进行治疗,5 年存活率为 75%~90%;对于晚期(III 期、IV 期)患者,5 年存活率仅为 40%~55%和 10%^[15]。如何提高 CRC 的早期诊断率成为近年来 CRC 领域的研究热点,以往多项研究均阐释了 ctDNA 检测在 CRC 早期诊断和筛查方面具有重要的指导意义。Yang 等^[10]研究验证了 ctDNA 的检出率高于目前 5 种已知的常用肿瘤生物标志物(癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、糖类抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)、癌抗原 125(cancer antigen 125, CA 125)、癌抗原 72-4(cancer antigen 72-4, CA72-4)),对几乎所有癌症分期患者的检出率均高于最低检出限。Frattini 等^[16]研究发现 CRC 患者血浆 DNA 水平显著升高,而治愈后 DNA 水平下降,再复发时再次升高。Symonds 等^[17]在对 91 名 CRC 患者手术前后血液样本的分析中发现,47 例患者在诊断时具有 ctDNA 阳性,35 例(74.5%)

在肿瘤切除后变为阴性。血液中 ctDNA 的存在与 CRC 分期相关,并且在手术切除后显示快速逆转为阴性。以往多项研究也都报道了 CRC 患者 ctDNA 水平比健康人明显升高^[18-20]。液体活检中另一重要的生物标志物循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)和 ctDNA 有着许多同样的优势,如非侵入式、特异性高以及一定程度上克服肿瘤时间和空间异质性等,但 ctDNA 灵敏度更高, Bettgowda 等^[9]发现能够检出 CTC 的就一定会检出 ctDNA,但检出 ctDNA 的却未必能找到 CTC。由此可见,ctDNA 是一种相对较好的疾病指标。此外,有研究在检测中联合使用了 ctDNA 与 CEA,发现只使用 ctDNA 检测 CRC 的特异性为 70.7%,而 CEA 及 ctDNA 均为阳性使特异性可达 100%^[21]。这提示了我们在临床上可将 ctDNA 与 CEA 相结合,从而提高特异性。

3.2 疗效判断

肿瘤的疗效判断是非常重要的,可以避免无

效的治疗、减少毒副反应以及更换新的疗法。晚期CRC一般都是不能治愈的,若是能够寻找早期、特异的指标检测微小转移灶,有效地预测复发转移风险,这样就能通过治疗提早干预临床转移灶的出现,又能避免部分术后治愈的患者接受过度的辅助治疗。多项研究表明定性定量检测ctDNA水平变化可用于CRC患者的病情监测、治疗效果反馈、残留微小病灶判断及高危复发者识别等。Diehl等^[22]研究发现ctDNA在所有患者术前均能检测到,而连续血液取样显示ctDNA水平与手术切除程度有关。Cheng等^[23]报道了ctDNA既可以用来判断肿瘤是否切除干净,又可以判断药物治疗是否有效。在转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)患者治疗期间,治疗开始后,ctDNA水平立即急剧下降,手术后检测不到,复发时ctDNA水平再次升高。Hsu等^[24]使用12基因面板对32例mCRC患者的136个肿瘤组织和ctDNA样本进行了NGS,约70%的标本中检测到遗传变异,肿瘤组织与血浆ctDNA的一致性较高(85%),随访了18例患者发现ctDNA水平的变化与肿瘤缩小密切相关。Song等^[25]研究表明尿液中ctDNA水平升高与mCRC患者相关(敏感性:90.7%;特异性:82.0%),对于接受化疗或抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂治疗的患者,ctDNA量反映了早期治疗反应,连续监测ctDNA水平可以对治疗反应进行早期预测,并有效识别高危复发患者。Murray等^[26]在CRC患者手术后12个月内测定甲基化BCAT1和IKZF1的ctDNA状态,发现甲基化ctDNA阳性的CRC病例残留疾病和随后复发的风险大大增加。Diehl等^[22]发现mCRC患者手术切除后微小病灶的残留与ctDNA水平较高有关,监测术后血浆中肿瘤特异基因APC、TP53和KRAS的突变情况来判断肿瘤复发,灵敏度和特异性几乎均达到100%。Wang等^[27]研究发现ctDNA检测与术后复发有显著相关性($P<0.001$)。Scholer等^[28]报道了复发患者的术后ctDNA均可被检测到,未复发患者中检测不到。与CT成像相比,ctDNA检测到复发平均提前9.4个月,复发干预引起的ctDNA水平变化与肿瘤体积的变化具有良好的一致性,这也充分体现了ctDNA作为一种肿瘤特异性的生物标志物,在监测病情和早期复发上具有明显的优势。该研究还表明了术后ctDNA检测可以提供残

余病灶的证据,并能识别出复发风险非常高的患者。

3.3 预后评估

CRC患者经治疗后,在适当的条件下仍能进一步发展成新的肿瘤灶。肿瘤患者的预后评估需要结合临床观察、肿瘤分期、病理和生物分子特征等判断,目前主要依赖影像学和组织活检,当遇到无法进行组织活检或已保存的组织切片基因分析时,液体活检就显得愈加重要。多项研究均报道了ctDNA可以用来评估手术及化疗后的预后。Thomsen等^[29]在对138名接受标准一线治疗的mCRC患者的研究中发现,第一轮化疗后低水平的ctDNA与进展风险低有关,在治疗过程中任何时间ctDNA的显著增加都预示着持续治疗的高风险。Yao等^[30]报道了RAS/BRAF突变的ctDNA检测可预测mCRC一线化疗患者无进展生存期(progression-free survival, PFS)的恶化,为RAS/BRAF ctDNA突变检测在mCRC患者中的预后价值提供支持。Vandeputte等^[31]监测患者ctDNA水平时发现其与PFS和整体存活率(overall survival, OS)呈负相关。Tie等^[32]分析了来自159例患者的462份血浆样本,在治疗前、放射治疗后和术后血浆样本中,ctDNA分别为77%、8.3%和12%。术后ctDNA检测均可预测复发,若化放疗后或术后可检测到ctDNA,则无复发生存率明显更差。对于术后ctDNA阳性或阴性患者,估计3年无复发生存率分别为33%、87%。Zhou等^[33]报道了一例患者疾病复发时,ctDNA增加了13倍,而CEA和CA 19-9水平保持正常。Young等^[34]发现ctDNA监测CRC复发比CEA敏感2倍。这些都体现了ctDNA对预测CRC患者的预后具有高度敏感性和特异性。

3.4 耐药监测与用药指导

肿瘤耐药是当前CRC临床治疗面临的最主要的问题之一,其耐药机制十分复杂,利用ctDNA检测可以非侵入性地了解耐药突变的产生和寻找新的治疗靶点且方便可行,有望推动CRC靶向治疗的进程。EGFR抑制剂是当前CRC治疗的主要靶向药物之一,EGFR在60%~80% CRC中过度表达,以EGFR为靶点的单克隆抗体阻断EGFR的信号传导可以抑制肿瘤新生血管的形成、肿瘤生长、侵袭和迁移。CRC对EGFR抑制剂总是产生耐药性,RAS突变和HER 2/MET扩增是最常见的耐药机制^[35]。Bettegowda等^[9]对KRAS、NRAS、BRAF、

PIK3CA 和 *EGFR* 全外显子进行检测,发现 96% 的样本的 *KRAS* 或 *NRAS* 基因有至少一个突变。Diaz 等^[36]利用 ctDNA 检测技术对接受 *EGFR* 抑制剂类药物治疗的患者进行耐药性靶点检测,发现 *KRAS* 基因出现了 42 种与耐药相关的基因突变,从而可以追踪耐药突变的产生,达到定性并定量。Misale 等^[37]报道了野生型 *KRAS* 的 mCRC 患者在 *EGFR* 抑制剂治疗进展后血浆中能检测到 *KRAS* 突变,*KRAS* 水平呈进行性增加,中断 *EGFR* 抑制剂后 *KRAS* 突变呈进行性下降。Arena 等^[38]使用抗 *EGFR* 类抗体如西妥昔单抗和帕尼单抗治疗 *RAS* 野生型 CRC 时发现其疗效受到获得性耐药的限制。于是他们假设 *EGFR* 抗 ECD (*EGFR* 胞外区域) 变异体可能是寡克隆抗体 MM-151 (该抗体可与 ECD 多个位点结合后,抑制 *EGFR* 信号传导和细胞生长) 的靶点并使用 MM-151 治疗西妥昔单抗和帕尼单抗耐药的 CRC 患者,ctDNA 检测发现 *EGFR* ECD 突变率降低。Russo 等^[39]报道了 *MET* 扩增是 *EGFR* 抑制剂耐药的机制并首次描述了 p.G595R 和 p.G667C *TrkA* 突变促使了携带 *NTRK1* 重排的 CRC 患者获得性耐药。目前的靶向药物只能针对其中的一个或几个有作用,阻断了肿瘤转移的一个通路,肿瘤细胞就会向其他通路转移,所以肿瘤耐药问题是一个非常大的挑战。目前常联合使用新药物或者新疗法作为二线治疗,如使用逆转剂,天然药物治疗,免疫治疗,基因治疗,反义 RNA 技术,核酶技术以及 RNA 干扰技术等等。

4 小结与展望

大部分肿瘤患者无法进行组织活检和肿瘤异质性是临床个体化诊疗面临的主要难题,同一病灶内的不同细胞间存在差异、原发灶与转移灶之间存在差异、不同转移灶之间也可能存在差异,这些都给组织活检带来了挑战。ctDNA 的遗传信息与肿瘤保持着高度一致性,一定程度上可克服肿瘤时间和空间异质性,且 ctDNA 检测具有微创、非侵入式、半衰期短、特异性高、敏感性高、方便、经济以及无放射性污染等优点,尤其突出的是能够及时跟踪肿瘤分子的进化,在不同的时间点被多次和无损地进行研究。通过对 ctDNA 进行测序,可以分析其突变类型与数量,实现肿瘤早期诊断,确定对该突变类型敏感的靶向药和治疗手段,评估肿瘤治疗与预后,指导用药并监测耐药的发

生等,最终形成更具个性化和组合性的治疗方案。然而,不同的 ctDNA 检测方法有着不同的指标,无固定的标准,适用的人群和癌种也不一样。此外,与肿瘤组织比较,ctDNA 中特定基因改变检出的可靠性及稳定性仍需进一步验证。相信在不久的将来,随着更大规模、更长周期的临床研究,ctDNA 检测将逐步发展成熟并形成标准化,在临床领域展现其更高的应用价值。

参考文献

- [1] Wanqing C, Kexin S, Rongshou Z, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2018, 40(1): 5-13.
- [2] 江振作, 张春泽, 王跃飞, 等. 基于肠道微生物代谢产物的人结直肠癌诊断方法研究 [J]. 分析化学, 2016, 44(8): 1178-1184.
- [3] Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [J]. C R Seances Soc Biol Fil, 1948, 142(3-4): 241-243.
- [4] Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. CIRCULATING DNA AS A POSSIBLE FACTOR IN ONCOGENESIS [J]. Science, 1965, 148(3668): 374-376.
- [5] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650.
- [6] Roth C, Pantel K, Muller V, et al. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 4.
- [7] Mouliere F, Rosenfeld N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(11): 3178-3179.
- [8] Sumbal S, Javed A, Afroze B, et al. Circulating tumor DNA in blood: Future genomic biomarkers for cancer detection [J]. Exp Hematol, 2018, 65: 17-28.
- [9] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(224): 224-248.
- [10] Yang YC, Wang D, Jin L, et al. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients [J]. 2018, 38(4).
- [11] Moati E, Taly V, Didelot A, et al. Role of circulating tumor DNA in the management of patients with colorectal cancer [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol,

- 2018, 42(5):396-402.
- [12] Hench IB, Hench J, Tolnay M. Liquid biopsy in clinical management of breast, lung, and colorectal Cancer [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5:9.
- [13] Wan J, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4):223-238.
- [14] Nadal C, Winder T, Gerger A, et al. Future perspectives of circulating tumor DNA in colorectal cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5):705749.
- [15] Proskurina AS, Gvozdeva TS, Potter EA, et al. Five-year disease-free survival among stage II-IV breast cancer patients receiving FAC and AC chemotherapy in phase II clinical trials of Panagen [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16:651.
- [16] Frattini M, Balestra D, Verderio P, et al. Reproducibility of a semiquantitative measurement of circulating DNA in plasma from neoplastic patients [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(13):3163-3165.
- [17] Symonds EL, Pedersen SK, Murray DH, et al. Circulating tumour DNA for monitoring colorectal cancer—a prospective cohort study to assess relationship to tissue methylation, cancer characteristics and surgical resection [J]. *Clin Epigenetics*, 2018, 10:63.
- [18] Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(2):346-356.
- [19] Tie J, Kinde I, Wang Y, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(8):1715-1722.
- [20] Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, et al. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer [J]. *Plos One*, 2015, 10(4):e108247.
- [21] Flamini E, Mercatali L, Nanni O, et al. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(23):6985-6988.
- [22] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985-990.
- [23] Cheng C, Omura - Minamisawa M, Kang Y, et al. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(2):303-309.
- [24] Hsu HC, Lapke N, Wang CW, et al. Targeted sequencing of circulating tumor DNA to monitor genetic variants and therapeutic response in metastatic colorectal cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(10):2238-2247.
- [25] Song T, Mao F, Shi L, et al. Urinary measurement of circulating tumor DNA for treatment monitoring and prognosis of metastatic colorectal cancer patients [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018. [Epub ahead of print].
- [26] Murray DH, Symonds EL, Young GP, et al. Relationship between post-surgery detection of methylated circulating tumor DNA with risk of residual disease and recurrence-free survival [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(9):1741-1750.
- [27] Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, et al. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers [J]. *World J Surg*, 2004, 28(7):721-726.
- [28] Scholer LV, Reinert T, Orntoft MW, et al. Clinical implications of monitoring circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(18):5437-5445.
- [29] Thomsen CB, Hansen TF, Andersen RF, et al. Monitoring the effect of first line treatment in RAS/RAF mutated metastatic colorectal cancer by serial analysis of tumor specific DNA in plasma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):55.
- [30] Yao J, Zang W, Ge Y, et al. RAS/BRAF circulating tumor DNA mutations as a predictor of response to first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 2018:4248971.
- [31] Vandeputte C, Kehagias P, El HH, et al. Circulating tumor DNA in early response assessment and monitoring of advanced colorectal cancer treated with a multi-kinase inhibitor [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(25):17756-17769.
- [32] Tie J, Cohen JD, Wang Y, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study [J]. *Gut*, 2018. [Epub ahead of print].
- [33] Zhou J, Chang L, Guan Y, et al. Application of circulating tumor DNA as a non-invasive tool for monitoring the progression of colorectal cancer [J]. *Plos One*, 2016, 11(7):e0159708.

· 论 著 ·

利用 NGS 技术同时检测缺失和点突变型地中海贫血

黄杰¹ 杨旭² 孙楠¹ 孙彬裕¹ 曲守方^{1*}

【摘要】 目的 建立一种跨越断裂点 PCR(Gap-PCR)结合下一代测序技术的地中海贫血基因检测方法。方法 对地中海贫血核酸国家参考品进行 PCR 扩增,PCR 产物进行高通量测序。结果 32 例国家参考品涉及的 3 种 α 突变型别,16 种 β 突变型别,4 种 α 缺失型别,2 种 β 缺失型别全部检出,均与原型别一致。结论 本研究通过建立基于 Gap-PCR 结合下一代测序技术检测地贫的方法进一步完善了遗传病基因诊断方法,对遗传病的携带人群筛查,优生优育咨询,防止出生缺陷等方面具有重要意义。

【关键词】 Gap-PCR; 高通量测序; 地中海贫血; 缺失型别; 突变型别

Simultaneous detection of deletion and point mutation thalassemia using NGS technology

HUANG Jie¹, YANG Xu², SUN Nan¹, SUN Binyu¹, QU Shoufang^{1*}

(1. Division of In Vitro Diagnostic for Non-Infectious Diseases, Institute for In Vitro Diagnostics Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 102629; 2. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

【ABSTRACT】 Objective To establish a method for detecting thalassemia with combined Gap-PCR and next-generation sequencing technology. Methods 32 cases of national reference of thalassemia were amplified by Gap-PCR, and the PCR products were subjected to high-throughput sequencing. Results 3 mutation types of alpha-thalassemia, 16 mutation types of beta-thalassemia, 4 deletion types of alpha-thalassemia and 2 deletion types of beta-thalassemia were detected, which were consistent with the prototype. Conclusion The genetic diagnosis method of genetic diseases by establishing Gap-PCR combined with next-generation sequencing technology to detect thalassemia will further improved in this study. It is of great significance for screening of genetically transmitted populations, eugenics and counseling and prevention of birth defects.

【KEY WORDS】 Gap-PCR; Next generation sequencing; Thalassemia; Deletion types; Mutation types

α -地中海贫血和 β -地中海贫血是常见的常染色体隐性疾病。 α -地中海贫血主要是由于 α -珠蛋白基因缺失导致的。--^{SEA} 缺失型 α -地中海贫血是中国最常见的遗传性疾病之一,--^{SEA} 缺失型携带者无明显症状或显示轻度贫血,然而夫妻双方都是--^{SEA} 携带者怀有的胎儿就有 25% 机会患 Hb Bart's

胎儿水肿综合征^[1]。除此之外,-- $\alpha^{3.7}$ 和-- $\alpha^{4.2}$ 也是最常见的 α -地中海贫血。 α -地中海贫血除了主要由缺失导致外,也有少部分是由于 α -珠蛋白基因点突变引起,中国常见的有 3 种突变型分别是 α^{WS} 、 α^{CS} 、 α^{QS} 。世界上目前为止至少发现了 35 种缺失型^[2] 和 68 种突变型^[3]。 β -地中海贫血主要是由于 β -珠

基金项目:生殖健康及重大出生缺陷防控研究(2016YFC1000300)

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所非传染病诊断试剂室,北京 102629

2. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

*通信作者:曲守方, E-mail: qushoufang@126.com

蛋白基因突变引起的,包括单碱基突变,小的插入或缺失,世界上已发现200多种 β -珠蛋白基因突变型^[4],中国已报道了46种^[3]。除了基因突变之外,也有少部分 β -地中海贫血是由于 β -珠蛋白基因缺失导致的,目前至少发现12种缺失型^[3]。

本研究使用下一代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS)对来自中国食品药品检定研究院提供的地中海贫血核酸国家参考品进行检测,通过生物信息学,分析基因点突变(mutations)、小的插入缺失突变(indels)和缺失型(deletions)等信息,从而对地中海贫血基因变异作出准确的判断,为后期地中海贫血患者的变异检测提供基础,也为其他遗传性疾病的诊断和预防提供参考和研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

中国食品药品检定研究院提供的32例地中海贫血核酸国家参考品的DNA,具体突变型别见表1。

1.2 仪器与试剂

Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler 仪器和 Qubit™ 3 Fluorometer 仪器购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,DA8600 测序仪购自中山大学达安基因股份有限公司;Hi-Fi Hotstart Ready Mix 购自美国 KAPA BIOSYSTEMS 公司, Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit、Qubit dsDNA HS Assay Kit、Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit 和 Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 引物

引物:具体引物序列如表2,在生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 检测方法

1.4.1 引物 Mix 的配制

将1.3中15条引物分别稀释至100 $\mu\text{mol/L}$,各取1 μL 进行混合。

1.4.2 PCR 扩增

反应体系:10 μL Hi-Fi Hotstart Ready Mix, 4 μL 引物 Mix, 60 ng DNA 模板,双蒸水补齐到20 μL 。

反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性45 s, 62℃复性1 min 30 s, 72℃延伸2 min, 5个循环;

表1 样本信息

Table 1 Sample information

样本编号	疾病类型	突变&缺失型别
1	-	野生型
2	-	野生型
3	β 地贫	HbE 杂合
4	β 地贫	-28 (A>G) 杂合
5	α & β 地贫	IVS-II-654 (C>T) 杂合& $\alpha\alpha/--^{SEA}$
6	α 地贫	$\alpha\alpha/--^{SEA}$
7	α 地贫	$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$
8	α 地贫	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$
9	β 地贫	IVS-I-1 (G>T) 杂合
10	-	野生型
11	β 地贫	Codons 71/72 (+A) 杂合
12	β 地贫	Codon 17 (A>T) 杂合
13	α 地贫	HbQuang Sze (QS) 杂合
14	β 地贫	+43 to +40 (-AAAC) 杂合
15	β 地贫	Codon 43 (G>T) 杂合
16	β 地贫	Initiation codon ATG>AGG 杂合
17	β 地贫	Codon37 (TGG>TAG) 杂合
18	β 地贫	Codons 41/42 (-TTCT) 杂合
19	α 地贫	$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$
20	β 地贫	Codons 27/28 (+C) 杂合
21	α 地贫	Hb Constant Spring (Hb CS) 杂合
22	α 地贫	HbWestmead (Hb WS) 杂合
23	β 地贫	-50G>A 杂合
24	β 地贫	-29 (A->G) 杂合
25	β 地贫	$^G\gamma^+(\wedge\gamma\delta\beta)^0$ 杂合
26	β 地贫	Codons 41/42 (-TTCT) 纯合& $^G\gamma^+(\wedge\gamma\delta\beta)^0$ 杂合
27	β 地贫	Codons 14/15 (+G) 杂合
28	β 地贫	-90 (C>T) 杂合
29	α & β 地贫	IVS-II-654 杂合& $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$
30	α & β 地贫	IVS-II-654 纯合& $\alpha\alpha/--^{SEA}$
31	β 地贫	SEA-HPFH 杂合
32	α 地贫	$\alpha\alpha/--^{THAI}$

94℃变性30 s, 59℃复性1 min, 72℃延伸2 min, 30个循环;72℃最后延伸7 min。

1.4.3 文库构建和定量

使用 Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit 进行文库构建,按照说明书进行操作。使用 Qubit™ 3 Fluorometer 进行文库定量。将文库稀释至200

表2 引物序列

Table 2 The primer sequences

引物名称	引物序列
SF	GAGGGAAGGAGGGGAGAAGCTGAGT
SR	AGCCACGTTGTGTTTCATGGC
3F	CCCCACATCCCCTCACCTACATTC
3R	GCATCCTCAAAGCACTCTAGGGTCC
4F	TGCTTTTGTGAGTGCTGTGTTGACC
4R	GAAGTAGCTCCGACCAGCTTAGCAAT
α R	CGGGCAGGAGGAACGGCTAC
TF	GACCATTCTCAGCGTGGGTG
TR	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG
BF	CAGAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCT
BR	AAGGGCCTAGCTTGACTCAGAATAATCC
HF	CCAGCCTCATGGTAGCAGAATC
HR	TGGTATCTGCAGCAGTTGCC
GF	TCAACAATTATCAACATTACAC
GR	GGCATATATTGGCTCAGTCA

pmol/L, 32个不同特异性接头文库等量混合。

1.4.4 模板制备与富集

取 1.3.3 中的文库混合液 12 μ L, 使用 Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit 进行模板制备与富集。

1.4.5 上机测序

使用 Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit 对 1.3.4 的阳性模板进行测序, 按照说明书操作。

1.4.6 结果分析

突变型别分析: 使用测序仪配套服务器和软件进行序列比对和分析, 运行 Variant Caller 插件, 得出的 xsl 文件中“Allele Call”选项中筛选“Homozygous”和“Heterozygous”分别为杂合型和纯合型。

缺失型别分析: 针对 chr16: 198728-235908 和 chr11: 5190831-5275157 范围内的每个位点 depth 进行分析, 比对质量值为 Q10, 以染色体位置为横坐标, 相应 depth 为纵坐标分别作图。

2 结果

2.1 点突变型和小的插入缺失型检测结果

本研究对 32 例国家参考品检测情况分析结果显示, 22 例携带基因突变。携带 α 珠蛋白基因突变 3 例, 分别为 13 (QS 杂合), 21 (CS 杂合), 22 (WS 杂合), 其余 19 例携带 β 珠蛋白基因突变,

样本 26 的检测结果为 chr11: 5247993delAAAG 突变频率为 100%, 为 Codons 41/42 (-TTCT) 纯合突变, 30 检测结果为 chr11: 5247153G>A, 突变频率为 100%, 为 IVS-II-654 (C>T) 纯合突变。其他样本检测的突变频率为 37.2%~54.2%, 为杂合突变。具体结果见表 3。

2.2 缺失型检测结果

对 32 例样本进行分析, 对 chr16 和 chr11 的目标区域位置测序深度作图, 如图 1 至图 3。其中图 1 为野生型样本 chr16 和 chr11 的目标区域的测序深度分布图, 只在 chr16: 221913-221936 & chr16: 223631-223612 和 chr11: 5246996-5248448 内有峰, 其他位置无检测峰。图 2 显示的是 α 缺失型样本的 chr16 目标区域测序深度分布图。样本 19、29 在 chr16: 219303-219327 和 chr16: 225173-225148 范围内有峰为 $-\alpha^{4.2}$; 样本 7、8 在 chr16: 221913-221936 和 chr16: 227726-227702 范围内有峰为 $-\alpha^{3.7}$; 样本 5、6、7、30 在 chr16: 235908 - 235888 和 chr16: 215284-215308 范围内有峰为 $--^{SEA}$ 缺失型; 样本 32 在 chr16: 198728-199881 范围内有峰为 $--^{THAI}$ 。图 3 显示的是 β 缺失型样本的 chr11 目标区域测序深度分布图。样本 25、26 在 chr11: 5190831-5191339 范围内有峰为 $^{\gamma} \gamma^{+} (^{\gamma} \delta \beta)^0$ 型, 样本 31 在 chr11: 5222804-5223180 和 chr11: 5250214-5250590 范围内有峰为 SEA-HPFH 型。

本研究的 32 例国家参考品检测情况分析, 其中 11 例携带基因缺失。携带 α 珠蛋白基因缺失 8 例, 样本 5、6、30 为 $\alpha\alpha/--^{SEA}$, 7 为 $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$, 8 为 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$, 19 为 $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$, 29 为 $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$, 32 为 $\alpha\alpha/--^{THAI}$ 。3 例携带 β 珠蛋白基因缺失, 25、26 为 $^{\gamma} \gamma^{+} (^{\gamma} \delta \beta)^0$ 杂合, 31 为 SEA-HPFH 杂合, 见表 4。

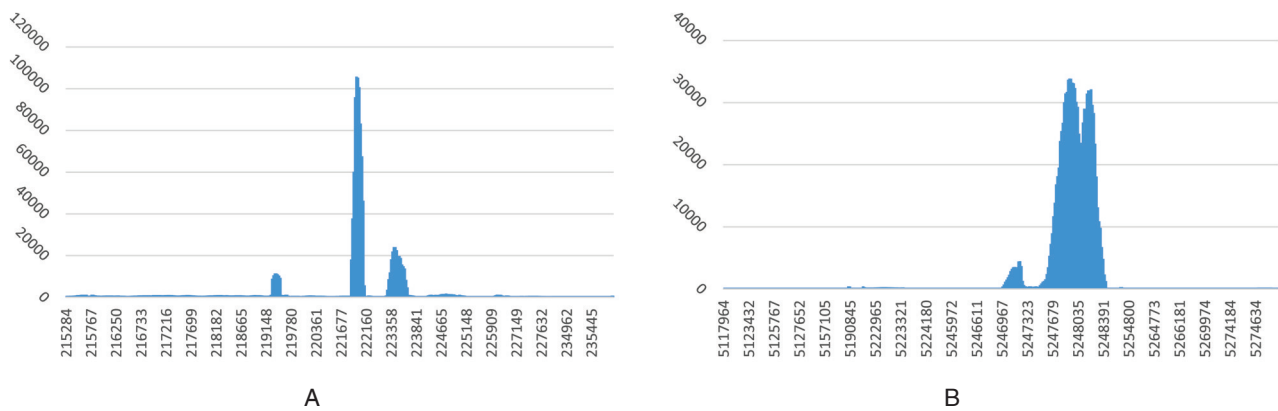
3 讨论

地中海贫血主要是由珠蛋白基因异常引起的。目前, 检测珠蛋白基因异常的方法包括特异性突变检测和整体基因组扫描。特异性突变检测利用常见的患者 α -珠蛋白和 β -珠蛋白突变信息 (缺失、点突变或基因重组) 形成的检测方法, 使用基于 PCR 方法来识别这些已知突变, 如跨越断裂点 PCR (Gap-PCR)^[5]、反向点杂交 (reverse dot blot, RDB)^[6] 等方法。针对整体基因组扫描, 大量报道关于应用 NGS 检测 α -珠蛋白基因 (*HBA1*、*HBA2*) 和 β -珠蛋白基因 (*HBB*), 能检测到常规方法不能

表3 样本点突变类型和小的插入缺失型检测结果

Table 3 Results of samples' mutation and indel types

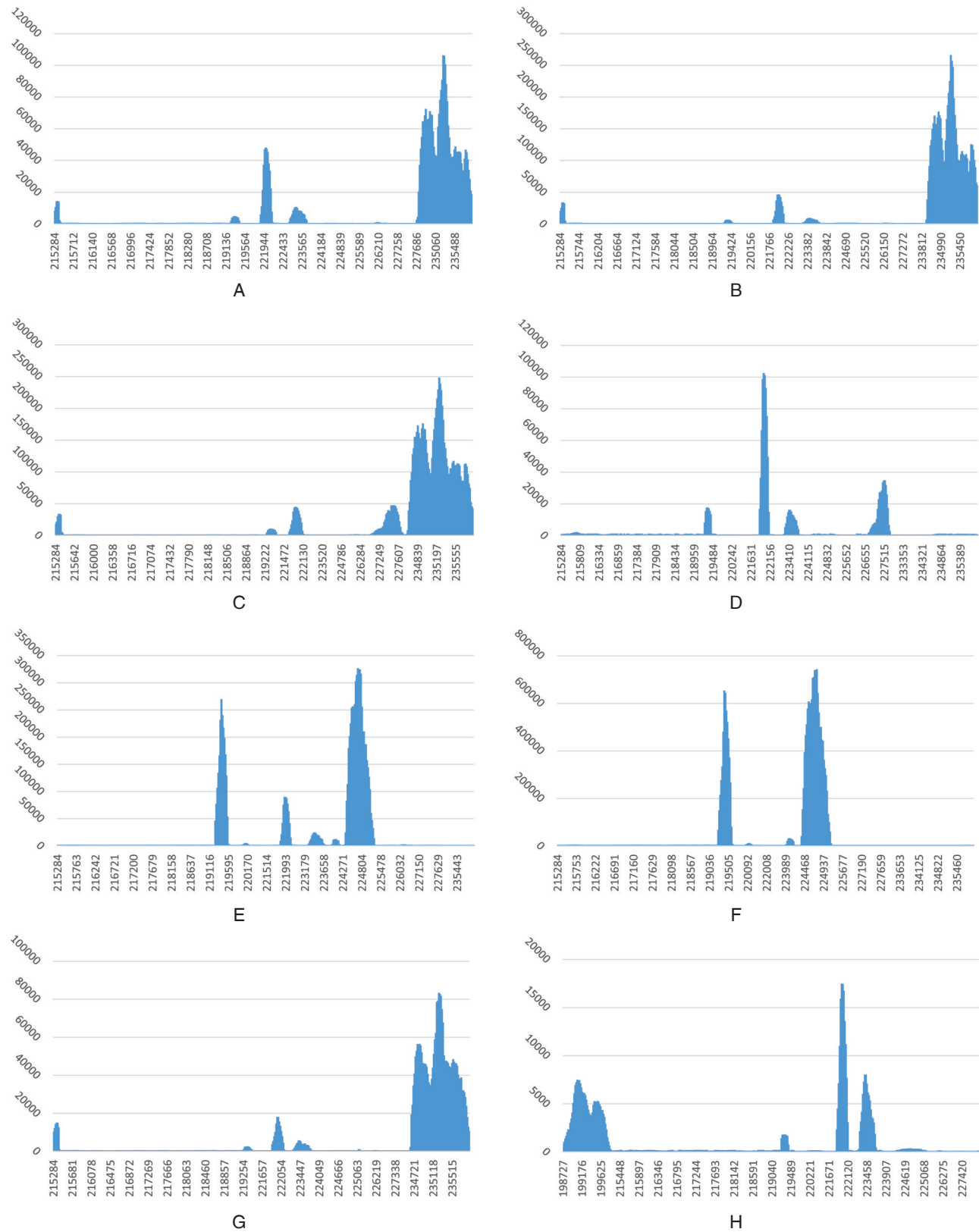
样本名称	染色体	位置	参考碱基	突变碱基	杂合性	突变频率	总覆盖度	突变碱基覆盖度	突变型别
3	chr11	5248173	C	T	杂合	45.8	400	183	HbE 杂合
4	chr11	5248329	T	C	杂合	48.6	399	194	-28 (A>G)杂合
5	chr11	5247153	G	A	杂合	49.4	397	196	IVS-II-654 (C>T)杂合
9	chr11	5248159	C	A	杂合	49.4	399	197	IVS-I-1 (G>T)杂合
11	chr11	5247906	-	T	杂合	37.2	392	146	Codons 71/72 (+A) 杂合
12	chr11	5248200	T	A	杂合	51.2	400	205	Codon 17 (A>T)杂合
13	chr16	223547	T	C	杂合	45	398	179	HbQuang Sze (QS)杂合
14	chr11	5248259	GTTT	-	杂合	37.6	391	147	+43 to +40 (-AAAC)杂合
15	chr11	5247992	C	A	杂合	48.6	393	191	Codon 43 (G>T)杂合
16	chr11	5248250	A	C	杂合	47.8	400	191	Initiation codon ATG>AGG 杂合
17	chr11	5248009	C	T	杂合	54.2	400	217	Codon 37 (TGG>TAG)杂合
18	chr11	5247993	AAAG	-	杂合	47.1	3 991	1 881	Codons 41/42 (-TTCT)杂合
20	chr11	5248168	-	G	杂合	49.4	393	194	Codons 27/28 (+C)杂合
21	chr16	223597	T	C	杂合	52	4 000	2 082	Hb Constant Spring (Hb CS)杂合
22	chr16	223539	C	G	杂合	51.6	397	205	HbWestmead (Hb WS)杂合
23	chr11	5248351	C	T	杂合	48.2	400	193	-50 (G>A)杂合
24	chr11	5248330	T	C	杂合	44.8	400	179	-29 (A->G)杂合
26	chr11	5247993	AAAG	-	杂合	100	392	392	Codons 41/42 (-TTCT)纯合
27	chr11	5248207	-	C	杂合	41.7	391	163	Codons 14/15 (+G)杂合
28	chr11	5248391	G	A	杂合	50.5	400	202	-90 (C>T)杂合
29	chr11	5247153	G	A	杂合	46.5	396	184	IVS-II-654 (C>T)杂合
30	chr11	5247153	G	A	纯合	100	3 998	3 998	IVS-II-654 (C>T)纯合



A: 样本2的chr16位置测序深度; B: 样本2的chr11位置测序深度。横坐标代表染色体位置,纵坐标代表覆盖度。

图1 野生型样本2目标区域的测序深度分布图

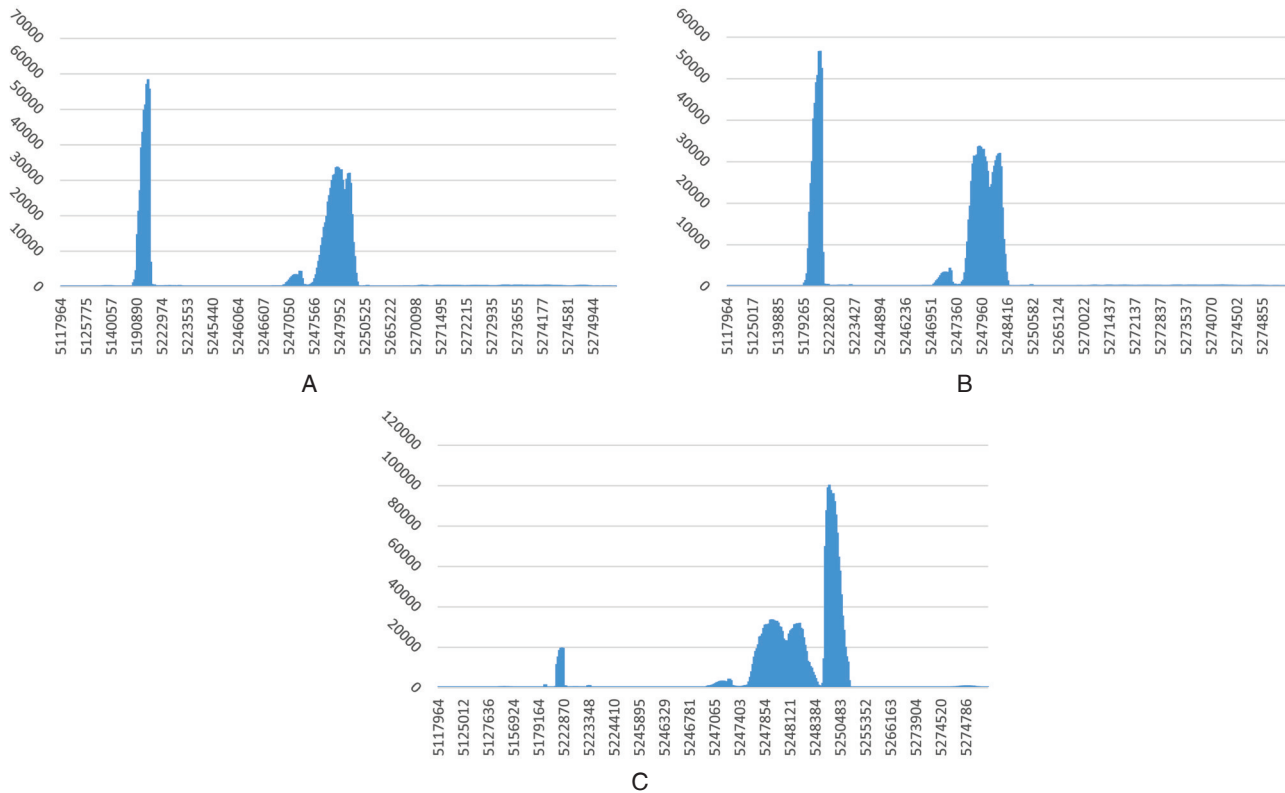
Figure 1 Sequence depth map of target regions of sample 2 with wild type



A: 样本5; B: 样本6; C: 样本7; D: 样本8; E: 样本19; F: 样本29; G: 样本30; H: 样本32。横坐标代表染色体位置,纵坐标代表覆盖度。

图2 α 缺失型样本的chr16目标区域测序深度分布图

Figure 2 Sequence depth map of chr16 target region sequence of samples with alpha deletions



A: 样本 25; B: 样本 26; C: 样本 31。横坐标代表染色体位置,纵坐标代表覆盖度。

图 3 β 缺失型样本的 chr11 目标区域测序深度分布图

Figure 3 Sequence depth map of chr11 target region sequence of samples with beta deletions

表 4 样本缺失类型检测结果

Table 4 Results of samples' deletion types

样本名称	疾病类型	缺失型别
5	α 地贫	$\alpha\alpha/--^{SEA}$
6	α 地贫	$\alpha\alpha/--^{SEA}$
7	α 地贫	$-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$
8	α 地贫	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$
19	α 地贫	$\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$
25	β 地贫	$\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 杂合
26	β 地贫	$\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 杂合
29	α 地贫	$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$
30	α 地贫	$\alpha\alpha/--^{SEA}$
31	β 地贫	SEA-HPFH 杂合
32	α 地贫	$\alpha\alpha/--^{THAI}$

检测到的罕见突变及新发突变,降低漏检风险^[7-8]。我们的研究旨在捕捉α-和β-珠蛋白基因簇关键区域,进行深度测序。考虑到地中海贫血跨种族的广泛突变谱和高患病率^[9-10],将本研究的

方法用于孕前的携带者筛查可以提供高危夫妇的检出率,用于疾病的辅助诊断可以提高疾病的检出率。

在大多数基因检测实验室,NGS 实验操作已经流程化,对于基因突变,Ion torrent 平台自带的插件能够进行分析,但对于缺失或者拷贝数变异(copy number variation, CNV)等,则需要重新建立生物信息学分析算法。本研究首先利用 Gap-PCR 原理对α地贫的 $--^{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 及 $--^{THAI}$ 型缺失和β地贫的 HPEH-SEA 和 $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 缺失的两端序列进行引物设计,同时分别设计一对用于扩增正常α珠蛋白和β珠蛋白基因的引物对照,对样本 DNA 进行一次性多重 PCR 扩增,扩增产物进行高通量测序和分析。这与谭梅等^[11]报道的使用 Gap-PCR 产物同时检测地中海贫血缺失型及突变型的思路比较相似,不同的是本研究建立了基于 CNV 分析的生物信息学分析算法,无需琼脂糖凝胶电泳来检测 Gap-PCR 产物的长度。由于α珠蛋白 2 个基因 *HBA2* 和 *HBA1* 有着高度同源性,本研究将比对质量值提高到 Q10,结果显示 7 号样本,8 号

样本,19号样本的结果均符合要求。

除此之外,与传统 Gap-PCR 相比,该技术在检测缺失型时增加了 α -地中海贫血的--^{THAI}型缺失型和 β -地中海贫血的 SEA-HPEH 和 $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 缺失型。Clark 等^[13]通过探针捕获目标序列结合 NGS 技术,建立的生物信息分析算法也发现新的地中海贫血缺失型。Shooter 等^[14]通过该分析方法发现了一个 59.0 kb 长度序列(覆盖了 *HBG2*、*HBG1*、*HBD*、*HBB* 和 *OR51V1* 基因)的倒位和一个 122.6 kb 长度序列的缺失(覆盖了 *HBG2* 和 *HBE* 基因)。在检测基因突变型方面,测序区域包含了 α 珠蛋白和 β 珠蛋白基因整个区域,因此可以判断该基因内发生的任一基因突变,如本研究涉及了 *HBB* 基因的新突变类型-50 (G>A)和-90 (C>T)(见表2)。

在准确性方面,由于是地中海贫血国家参考品 DNA 原有型别已知,本研究的方法检测结果均与原有型别一致。而 Shang 等^[12]利用 NGS 检测 β 地中海贫血突变,检测 10 111 对夫妇发现 4 180 人携带 4 840 个突变等位基因,通过一代测序验证,大部分一致。谭梅等^[11]也使用 NGS 方法检测 206 例新生儿足底血发现 6 种 α -地中海贫血和 14 种 β -地中海贫血突变型,经一代测序验证准确性和特异性均为 100%。说明 NGS 方法对于基因突变型检测具有较高的准确性。在灵敏度方面,本研究的方法仅需 60 ng DNA 进行 6 种缺失型和 α -珠蛋白基因和 β -珠蛋白基因检测,与其他对照方法检测这几种相比,样本量要求的更少。成本方面,由于地中海贫血的文库构建只需要普通的 PCR 扩增酶及连接酶等,测序数据量要求低,因此成本较低,适合大规模推广。

同时本研究也存在一定的局限性,即只能检测 4 种 α -地中海贫血和 2 种 β -地中海贫血缺失型别,对于新发现的缺失型别暂时还无法检出,还需要进一步的研究。对于基因突变方面,由于 *HBA1* 与 *HBA2* 基因具有较高的同源性,生物信息学分析需要首先去掉同源序列,导致部分基因信息丢失或者 2 个基因互相比对错误的情况。而对于 *HBB* 基因,可以达到全基因的 100%覆盖。

除了地中海贫血之外,利用 NGS 技术对其他几种常见单基因疾病如囊性纤维化^[15]、肝豆状核变性^[16]及上百种遗传病 panel^[17]等检测方法也已经建立。检测的方法也已经建立。由于 NGS 通量较大,因此可以结合笔者开发的地中海贫血

检测方法,将多种孟德尔遗传性疾病综合检测,应用在婚前孕前的携带者筛查,实现多种疾病的快速、高通量检测。综上所述,使用 NGS 技术能够有效检出地中海贫血已知的缺失型别及未知的突变型别,本研究的方法的建立丰富了地中海贫血基因检测方法,同时为其他类似发病机制的研究提供了理论基础和技术支持。

参考文献

- [1] Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia[J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5:13.
- [2] 谭梅, 卢森, 吴柳松, 等. 高通量测序技术在新生儿地中海贫血基因筛查中的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(5):1404-1409.
- [3] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社, 2011, 17-18, 22-24.
- [4] Brancaloni V, Pierro E, Motta I, et al. Laboratory diagnosis of thalassemia[J]. Int J Lab Hematol, 2016, 38(Suppl 1):32-40.
- [5] Tan AS, Quah TC, Low PS, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia[J]. Blood, 2001, 98(1):250-251.
- [6] Sutcharithchan P, Saiki R, Huisman TH, et al. Reverse dot-blot detection of the African-American beta-thalassemia mutations[J]. Blood, 1995, 86(4):1580-1585.
- [7] He J, Song W, Yang J, et al. Next-generation sequencing improves thalassemia carrier screening among premarital adults in a high prevalence population: the Dai nationality, China[J]. Genet Med, 2017, 19(9):1022-1031.
- [8] Pu J, Zhang L, Wei X, et al. Clinical genotyping by next generation sequencing reveals a novel, de novo β -globin gene mutation causing hemolytic anemia in a Chinese individual[J]. Hemoglobin, 2018, 2:1-5.
- [9] Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia[J]. Lancet, 2012, 379(9813):373-383.
- [10] Weatherall DJ. The importance of micromapping the gene frequencies for the common inherited disorders of haemoglobin[J]. Br J Haematol, 2010, 149(5):635-637.
- [11] 谭梅, 卢森, 吴柳松, 等. 高通量测序技术在新生儿地中海贫血基因筛查中的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(5):1404-1409.
- [12] Shang X, Peng Z, Ye Y, et al. Rapid targeted next-generation sequencing platform for molecular screen-

(下转第 95 页)

两种错义突变 p.Glu502Lys 和 p.Gly542Ser 所致遗传性XII缺陷症家系的分析

翁妙珊¹ 林芬² 章金灿¹ 吴教仁² 李邓松³ 谢裕强³ 杨立业^{2*}

【摘要】 目的 对1个近亲结婚的遗传性凝血因子XII(FXII)缺陷症家系进行凝血指标检测和基因突变分析,探讨其分子发病机制。 方法 检测先证者及其家系成员血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、FXII活性(FXII:C)等凝血指标;对先证者FXII基因所有的外显子及其侧翼序列进行PCR扩增和DNA直接测序。针对先证者的突变位点,对该家系成员进行相应的基因突变检测。 结果 先证者和其妹妹APTT、FXII:C明显异常,分别为174.8 s、0.8%和109.5 s、1.9%。基因测序发现先证者及其妹妹FXII基因存在13号外显子c.1561G>A(p.Glu502Lys)及14号外显子c.1681 G>A(p.Gly542Ser)2种杂合错义突变。家系分析表明先证者父亲和儿子携带c.1561G>A杂合突变,母亲携带c.1681 G>A杂合突变。先证者及家系成员FXII基因第1外显子启动子区46位多态性均为46C>T型。 结论 FXII基因p.Glu502Lys和p.Gly542Ser 2种杂合错义突变是导致先证者遗传性FXII缺陷症的分子发病机制。

【关键词】 凝血因子XII;家系分析;基因突变

A pedigree analysis of hereditary XII deficiency caused by two missense mutations of p.Glu502Lys and p.Gly542Ser

WENG Miaoshan¹, LIN Fen², ZHANG Jincan¹, WU Jiaoren², LI Dengsong³, XIE Yuqiang³, YANG Liye^{2*}

(1. Clinical laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000; 2. Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000; 3. General Surgery, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the gene mutations in one intermarriage pedigree with factor XII (FXII) deficiency, and to explore the molecular mechanisms of FXII deficiency. Methods Plasma prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and FXII activity (FXII:C) were tested in the proband and his family. All the exons and exon-intron boundaries of FXII gene of proband were analyzed by PCR amplification and direct sequencing. For the mutation site of the proband, the family members were tested for the corresponding gene mutation. Results The proband and its sister APTT, FXII:C were significantly abnormal, 174.8 s, 0.8% and 109.5 s, 1.9% respectively. Gene sequencing revealed that the proband and its sister FXII gene had 2 heterozygous missense mutations in exon 13 c.1561G>A (p.Glu502Lys) and exon 14 c.1681 G>A (p.Gly542Ser). Family analysis showed that the proband's father and son carried the c.1561G>A heterozygous mutation, and the mother carried the c.1681 G>A heterozygous mutation. The 46 polymorphisms

基金项目:潮州市卫计委科研项目(201825);潮州市科技计划项目(2018GY31)

作者单位:1.南方医科大学附属潮州中心医院检验科,广东,潮州 521000

2.南方医科大学附属潮州中心医院中心实验室,广东,潮州 521000

3.南方医科大学附属潮州中心医院普外一科,广东,潮州 521000

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

in the promoter region of the first exon of the F_{XII} gene of the proband and family members were 46C>T type.

Conclusion The F_{XII} gene p.Glu502Lys and p.Gly542Ser heterozygous missense mutations are the molecular pathogenesis of probands with hereditary F_{XII} deficiency.

[KEY WORDS] Coagulation factor XII; Pedigree analysis; Gene mutation

在传统的凝血瀑布理论中,凝血因子XII (coagulation factor XII, F_{XII})是内源性凝血途径的启动因子,属于凝血接触相蛋白,主要由肝脏合成。活化的F_{XII} (F_{XII}a)除启动内源性凝血途径外,也参与纤溶途径的激活、补体的活化和炎症反应^[1]。遗传性F_{XII}缺陷症(OMIM:234000)是由位于染色体5q33-qtter的F_{XII}基因突变所致的一种较罕见的常染色体隐性遗传病,部分家系可表现为显性遗传^[2]。该病在人群中的发病率并不明确,患者在临床上通常无出血倾向,常因术前凝血常规检查显示活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)延长而被发现。随着基因检测方法的飞速发展,近年来有关F_{XII}缺陷症基因突变研究的病例报道有所增加^[3-4]。本文通过对1个近亲结婚的遗传性F_{XII}缺陷症家系进行凝血指标检测和基因突变分析,并对突变位点的致病机制进行了初步探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

先证者,男,30岁,广东省潮州市凤塘镇人,2017年4月以“肛瘘”为主诉入住我院治疗。检查凝血常规时发现APTT明显延长达174.8 s,遂行APTT纠正试验,确定为凝血因子缺乏,进一步筛查凝血因子活性,发现凝血因子XII活性(F_{XII} activity, F_{XII}:C)仅为0.8%,肝肾功能及其他凝血指标均无明显异常,考虑患者为F_{XII}缺陷症。入院后行肛瘘瘘管切除术,术中和术后未见明显异常出血,术后给予抗感染、制酸、止血、消肿、高锰酸钾溶液坐浴、补液治疗,患者痊愈出院。患者自诉既往并无自发出血史和血栓史,父母为近亲结婚,其他家系成员均无出血史和血栓史。

1.2 方法

1.2.1 样本采集

经本院医学伦理委员会批准,在获得先证者与家系成员的知情同意下,采集先证者与家系成员(共6人)外周血标本各2管,0.109 mol/L枸橼酸钠抗凝,1管用于检测凝血指标,并于2 h内完成;

另1管-80℃冻存,准备用于抽提DNA,进一步做基因检测。

1.2.2 凝血指标检测

采用美国ACL TOP700全自动血凝仪对先证者及其家系成员进行血浆凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、APTT、凝血因子VIII活性(F_{VIII} activity, F_{VIII}:C)、凝血因子IX活性(FIX activity, FIX:C)、凝血因子XI活性(FXI activity, FXI:C)和F_{XII}:C的检测,配套试剂为美国IL公司产品。

1.2.3 基因分析方法

采用深圳亚能生物技术有限公司的试剂盒,提取基因组DNA,对先证者F_{XII}基因所有的外显子及其侧翼序列进行PCR扩增,引物序列参考文献^[2],引物由上海英潍捷基公司合成。PCR产物纯化后用ABI 3700测序仪(Applied Biosystems公司,美国)进行测序,测序的结果通过网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>进行序列比较,寻找基因突变。家系成员在明确先证者基因突变位点后,PCR扩增相应区域并测序分析。

2 结果

2.1 凝血指标检测结果

先证者及其妹妹APTT均明显延长,分别为174.8 s和109.5 s, F_{XII}:C均极度降低,分别为0.8%和1.9%;先证者儿子APTT在正常范围,但F_{XII}:C约为正常值的一半,为29.5%。先证者和家系成员其他各项凝血指标均无明显异常,凝血指标检测结果见表1。

2.2 F_{XII}基因检测结果

基因测序发现先证者及其妹妹F_{XII}基因均存在13号外显子c.1561G>A杂合突变,导致p.Glu502Lys错义突变,同时在14号外显子均存在c.1681 G>A杂合突变,导致p.Gly542Ser错义突变。家系分析表明先证者父亲及儿子为c.1561G>A杂合突变,母亲为c.1681 G>A杂合突变。先证者及家系成员F_{XII}基因第1外显子启动子区46C/T多态性位点基因型均为CT型。基因检测结果见表2和图1。

表1 FXII缺陷症家系凝血指标检测结果

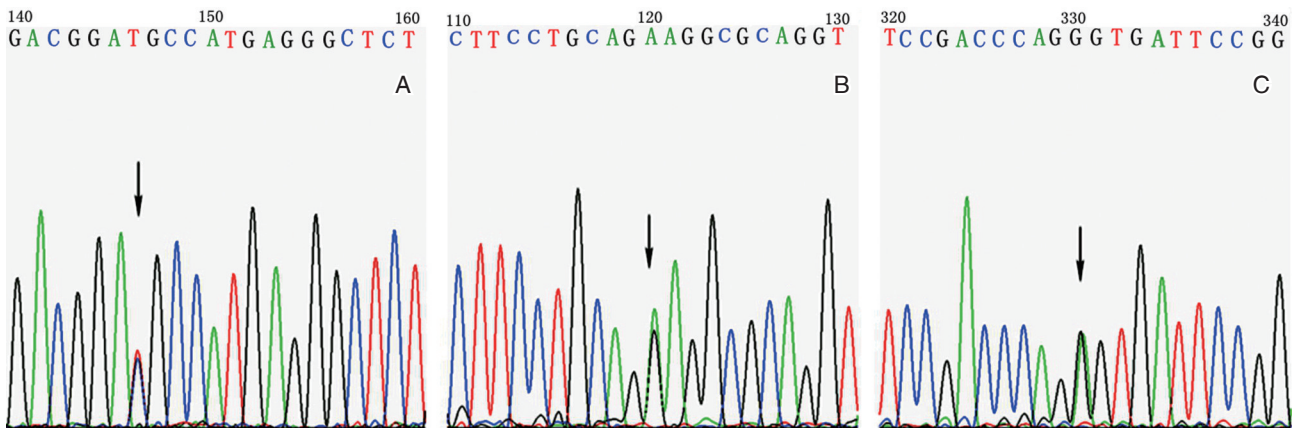
Table 1 The coagulation indices of the hereditary coagulation factor XII deficiency family

家系成员	PT(s)	APTT(s)	FVIII:C(%)	FIX:C(%)	FXI:C(%)	FXII:C(%)
II 1 先证者	9.9	174.8	120.7	117.8	141.6	0.8
I 1 父亲	10.6	38.8	126.8	71.2	90.0	74.6
I 2 母亲	10.0	35.8	127.9	112.7	144.1	71.8
II 2 妻子	10.3	28.9	118.2	86.0	85.0	142.5
II 3 妹妹	11.3	109.5	109.4	77.7	121.2	1.9
III 1 儿子	12.4	39.6	94.7	72.0	101.0	29.5
参考值	9.0~12.8	24~40	75~150	70~120	65~150	50~150

表2 FXII缺陷症家系基因型检测结果

Table 2 The genotype results of the hereditary coagulation factor XII deficiency family

家系成员	突变碱基及氨基酸改变 c.1561G>A(p.Glu502Lys)	突变碱基及氨基酸改变 c.1681G>A(p.Gly542Ser)	基因型	46C>T
II 1 先证者	+	+	复合杂合子	CT
I 1 父亲	+	-	杂合子	CT
I 2 母亲	-	+	杂合子	CT
II 2 妻子	-	-	野生型	CT
II 3 妹妹	+	+	复合杂合子	CT
III 1 儿子	+	-	杂合子	CT



A: 第1外显子启动子区 c.46 C>T 杂合突变; B: 第13号外显子 c.1561G>A 杂合突变; C: 第14号外显子 c.1681 G>A 杂合突变。

图1 FXII基因突变测序结果

Figure 1 The sequencing results of factor XII gene mutation

2.3 家系图谱分析

家系分析表明,先证者及其妹妹均携带 p.Glu502Lys 和 p.Gly542Ser 2种杂合错义突变,该突变遗传自近亲结婚的父母,其中 p.Glu502Lys 遗传自父亲, p.Gly542Ser 遗传自母亲,先证者儿子携带

的 p.Glu502Lys 则遗传自先证者。家系图谱见图2。

3 讨论

FXII基因定位于人类染色体5q33-qter区,由14

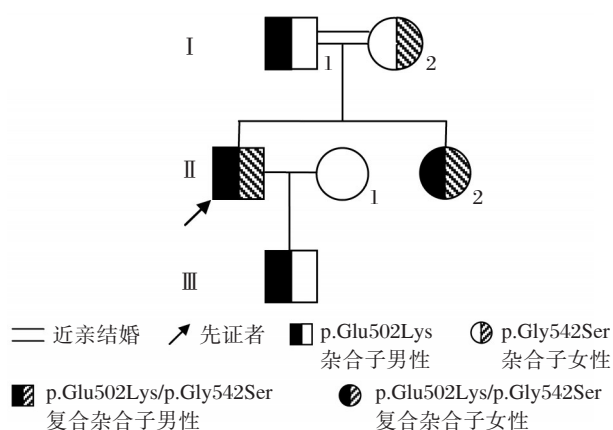


图2 本例遗传性FⅫ缺陷症家系图

Figure 2 The family tree of hereditary coagulation factor XII deficiency

个外显子和13个内含子组成^[5]。外显子1编码信号肽,外显子2编码一个目前还未见有同源结构的区域,外显子3和4编码与Ⅱ型纤维连接蛋白同源结构类似的区域,外显子5和7各自编码一个表皮生长因子样结构域(epidermal growth factor like domains, EGF),外显子6编码与纤维连接蛋白的指状结构同源区。FⅫ基因的催化结构域由外显子11~14编码^[6]。成熟FⅫ是由596个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,丝氨酸蛋白酶活性中心由His393、Asp442和Ser544组成^[2]。

本研究中我们通过对1个近亲婚配的遗传性FⅫ缺陷症家系进行基因分析,发现先证者及其妹妹均存在c.1561G>A (p.Glu502Lys)和c.1681 G>A (p.Gly542Ser) 2种杂合错义突变。家系成员中,先证者父亲及儿子携带p.Glu502Lys杂合突变,母亲携带p.Gly542Ser杂合突变。编码1561位于FⅫ基因13号外显子催化结构域,碱基G>A导致p.Glu502Lys错义突变,即502位谷氨酸突变为赖氨酸,推测该突变使负电的酸性谷氨酸变成正电的碱性赖氨酸,影响了多肽链的稳定性,造成突变的蛋白质提前降解及分泌障碍,从而引起血浆中FⅫ活性的下降。邢志芳等^[7]于2011年首次报道FⅫ基因p.Glu502Lys,文中2个先证者均存在p.Glu502Lys,其中1个为复合杂合子,另1个为纯合子,并通过体外表达的实验进一步证实了突变蛋白合成和分泌障碍导致FⅫ活性明显降低。此外,Jin等^[8]报道其研究的FⅫ缺陷症家系中也存在FⅫ基因p.Glu502Lys。编码1681位于FⅫ基因14

号外显子催化区,碱基G>A导致p.Gly542Ser错义突变,即542位甘氨酸突变为丝氨酸,因Gly542与FⅫ基因活性位点Ser544仅有2个氨基酸的距离,p.Gly542Ser错义突变很可能会影响544位活性位点的激活,并影响其正常的生物学功能。另外,甘氨酸为非极性疏水性氨基酸,同时具有酸性官能团,而丝氨酸为极性亲水性氨基酸,不带电荷,电荷的改变也可能影响催化结构域蛋白质的稳定性,使其更容易被降解,引起血浆中FⅫ活性减低。已有不少学者报道过FⅫ基因p.Gly542Ser^[1, 9-10],其中张扬等^[10]推测该错义突变的部位处于Cys540-Cys571之间,可能影响了二硫键的断裂,从而影响FⅫ的活性。由于目前FⅫ的结构仍未完全阐明,因此对于各结构域的功能只是个推测,发生在FⅫ蛋白催化功能区的突变,在不能被充分激活的情况下可能会影响其发挥应有的生物学功能^[3]。本研究中发现的2种杂合错义突变均发生在催化结构域,考虑复合杂合突变是导致先证者及其妹妹FⅫ活性极度降低的原因。

在FⅫ基因的第一外显子启动子区存在一个常见的多态性位点“46CT多态性”,具体包括46C/C、46C/T、46T/T 3种基因型。46T是会引起FⅫ翻译效率降低而导致血浆中FⅫ水平减低的多态性位点^[11]。巧合的是,本例家系的先证者及其家系成员46C/T多态性位点基因型均为同一基因型,都是C/T型。

遗传性FⅫ缺陷症患者不表现自发性出血或严重的损伤后出血等其他凝血因子缺乏所具有的临床症状^[12],即使是大型的开颅手术也无明显出血症状^[2],先证者及其妹妹APTT均明显延长,FⅫ:C均极度降低,但2人均无出血和血栓形成的临床表现,先证者术中、术后也未见明显异常出血。FⅫ缺陷症与血栓性疾病间的关系多来源于散发的病例报道,两者之间的关系尚存在争议^[13-14]。然而,最新的研究指出FⅫ只参与血栓形成而不参与止血过程,对于血栓形成是必需的^[15]。近些年的动物实验也表明,FⅫ缺乏有可能跟FⅪ缺乏一样,是预防血栓形成的保护性因素,并且不增加出血风险,甚至也可以作为治疗血栓安全有效的靶点^[16-17]。因此,从分子水平研究FⅫ缺陷症的发病机制可能将更有助于了解FⅫ与血栓形成间的相关性。

参考文献

- [1] 谢海啸, 吕美艳, 杨小丽, 等. 四个遗传性凝血因子 XII 缺陷症家系基因分析[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(3):200-204.
- [2] 杨丽红, 郝秀萍, 王莹宇, 等. 杂合突变导致遗传性 FXII 缺陷症一家系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(3):343-347.
- [3] 金佩佩, 姜文理, 沈立松, 等. 两个遗传性凝血因子 XII 缺陷症家系临床表型和基因型变化的分析[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(5):378-382.
- [4] 杨丽红, 金赛燕, 季伟丹, 等. 一个 Gly341Arg 纯合突变所致遗传性 FXII 缺陷症近亲婚配家系的分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35(1):69-73.
- [5] 李栋梁, 王友君, 李文静, 等. 遗传性凝血因子 XII 缺陷症 FXII 基因新突变一例[J]. 中华内科杂志, 2015, 54(6):533-534.
- [6] 王振义, 李家增, 阮长耿, 等. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004:375-377.
- [7] 邢志芳, 戴菁, 陆晔玲, 等. 2 例遗传性凝血因子 XII 缺陷症分子发病机制研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(5):367-371.
- [8] Jin PP, Jiang WL, Yan H, et al. Novel mutations in congenital factor XII deficiency[J]. *Frontiers in bioscience*, 2016, 21:419-429.
- [9] 王学峰, 戴菁, 王明山, 等. 两个遗传性凝血因子 XII 缺陷症家系 FXII 基因突变分析[J]. 诊断学实践与理论, 2005, 4(6):447-450.
- [10] 张扬, 谢海啸, 王明山, 等. 近亲结婚的遗传性凝血因子 XII 缺陷症家系分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(6):666-669.
- [11] Kanaji T, Okamura T, Osaki K, et al. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level[J]. *Blood*, 1998, 91(6):2010-2014.
- [12] Renné, T, Schmaier AH, Nickel KF, et al. In vivo roles of factor XII[J]. *Blood*, 2012, 120(22):4296-4303.
- [13] Kuhli G, Scharrer I, Koch F, et al. Factor XII deficiency: a thrombophilic risk factor for retinal occlusion[J]. *Am J Ophthalmol*, 2004, 137(3):459-464.
- [14] Girolami A, Morello M, Girolami B, et al. Myocardial infarction and arterial thrombosis in severe (homozygous) XII deficiency: no apparent causative relation[J]. *Clin Appl Thromb Haemost*, 2005, 11(1):59-63.
- [15] Matafonov A, Leung PY, Gailani AE, et al. Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model[J]. *Blood*, 2014, 123(11):1739-1746.
- [16] Revenko AS, Gao D, Croby JR, et al. Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding[J]. *Blood*, 2011, 118(19):5302-5311.
- [17] Wheeler AP, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation as a target for antithrombotic therapy[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2016, 30(5):1099-1114.

(上接第 78 页)

- [34] Young GP, Pedersen SK, Mansfield S, et al. A cross-sectional study comparing a blood test for methylated BCAT1 and IKZF1 tumor-derived DNA with CEA for detection of recurrent colorectal cancer[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(10):2763-2772.
- [35] Pietrantonio F, Vernieri C, Siravegna G, et al. Heterogeneity of acquired resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(10):2414-2422.
- [36] Diaz LJ, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):537-540.
- [37] Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):532-536.
- [38] Arena S, Siravegna G, Mussolin B, et al. MM-151 overcomes acquired resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancers harboring EGFR extracellular domain mutations[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(324):314-324.
- [39] Russo M, Misale S, Wei G, et al. Acquired resistance to the TRK inhibitor entrectinib in colorectal cancer[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(1):36-44.

· 论 著 ·

PPARGC1 启动子甲基化与Ⅱ型糖尿病发病相关性分析

梁爽¹ 王伟伟² 孙力¹ 邹广慧¹ 董志武^{1*}

[摘要] 目的 探讨过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅激活因子1 (peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1, *PPARGC1*) 基因启动子甲基化状况在Ⅱ型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发生中的作用。方法 选取2015年1月至2017年12月我院T2DM患者57例,对照组(健康人)152例,采集空腹静脉血检测血糖、胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白和脂蛋白a;测量身高、体重、腰围和血压并进行问卷调查。提取研究对象的全血基因组DNA并检测*PPARGC1*基因启动子甲基化程度,分析其与T2DM发生的相关性。结果 糖尿病组研究对象的腰围、体重和身体质量指数均大于对照组;糖尿病组具有糖尿病家族史的明显高于非糖尿病组;*PPARGC1*启动子甲基化程度与T2DM发病呈低度正相关,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 糖尿病发病受多种因素影响,阐明*PPARGC1*启动子甲基化与糖尿病发病的相关性,对预测糖尿病发病具有重要意义。

[关键词] T2DM; *PPARGC1*; PPAR γ ; 甲基化

Correlation analysis between *PPARGC1* promoter methylation and type II diabetes

LIANG Shuang¹, WANG Weiwei², SUN Li¹, ZOU Guanghui¹, DONG Zhiwu^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Jinshan Branch, Shanghai, China, 201599; 2. Department of Medical Prevention, Shanghai Sixth People's Hospital Jinshan Branch, Shanghai, China, 201599)

[ABSTRACT] Objective To investigate the promoter methylation status of peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1 (*PPARGC1*) gene in the development of type II diabetes (T2DM). Methods 57 patients with T2DM and 152 healthy controls from January 2015 to December 2017 were enrolled. Height, weight, waist circumference and blood pressure were measured and a questionnaire survey was conducted. Fasting venous blood was collected to detect blood sugar, cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein, low density lipoprotein and lipoprotein a. The whole blood genomic DNA was extracted and the degree of methylation of the *PPARGC1* gene promoter was detected, and its correlation with T2DM was analyzed. Results The waist circumference, body weight and body mass index of the diabetic group were higher than those of the control group. The family history of diabetes in the diabetic group was significantly higher than that in the non-diabetic group. The degree of methylation of the *PPARGC1* promoter was positively correlated with the incidence of T2DM ($P<0.05$). Conclusion The pathogenesis of diabetes is affected by many factors. It is important to elucidate the correlation between methylation of *PPARGC1* promoter and the pathogenesis of diabetes.

[KEY WORDS] Type II diabetes; *PPARGC-1*; PPAR γ ; Methylation

基金项目:上海市卫生与计划生育委员会课题(20134240);上海市第六人民医疗集团科学研究课题(2013-02)

作者单位:1.上海市第六人民医院金山分院检验科,上海 201599

2.上海市第六人民医院金山分院医防科,上海 201599

*通信作者:董志武, E-mail: dongzw312@163.com

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是临床上常见的代谢性疾病,其中 II 型糖尿病 (type 2 diabetes Mellitus, T2DM) 约占 DM 的 90%^[1]。而 T2DM 发病机制复杂,遗传与环境在 T2DM 过程中发挥着重要的作用^[2]。近年来,表观遗传学研究已成为研究糖尿病发病机制的热点。表观遗传学指在不影响 DNA 序列的情况下基因修饰的改变,主要包括 DNA 甲基化、染色质修饰、基因组印记等^[3],其中最常见表观遗传修饰方式为 DNA 甲基化。DNA 甲基化在胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (cytosine-phosphate-guanine, CpG) 丰富的序列,也称为“CpG 岛”,位于已知基因的启动子区域,其作用主要是导致基因表达的沉默^[4]。

PPARGC1 蛋白家族有 3 个成员: α , β 和 γ 相关协同激活因子,主要在富含线粒体的组织中表达,调节体内糖类与脂类代谢、脂肪酸 β 氧化、脂肪细胞分化等多种代谢过程^[5]。有研究发现在多种糖尿病研究模型及人种中 PPARGC1 的异常表达,并参与了线粒体的生物形成和脂肪酸的 β 氧化等过程,是线粒体基因转录的关键因子^[6]。另外研究显示 PPARGC1 参与 T2DM 的发病机制可能与患者胰腺 PPARGC1 启动子 DNA 甲基化水平升高,PPARGC1 基因 mRNA 表达减少,从而引起胰岛素分泌减少相关^[7]。因此,PPARGC1 基因是研究 T2DM 发病机制的关键候选基因。

本研究旨在探讨 T2DM 的危险因素及 PPARGC1 启动子甲基化与 T2DM 发病的相关性,尝试从表观遗传学解释 T2DM 的发病机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取于 2015 年 1 月至 2017 年 12 月在上海市第六人民医院金山分院体检或住院期间诊断为 T2DM 的患者 57 例,将其归为糖尿病组;其中男 22 例,女 35 例,年龄 51~66 岁,平均 (59.00±3.01) 岁;选取同期体检健康志愿者 152 例,确定为对照组;其中男 47 例,女 105 例,年龄 47~58 岁,平均 (51.00±3.23) 岁。排除标准:既往明确诊断有除糖尿病以外的其他代谢性疾病,心脑血管疾病或肿瘤等疾病者以及妊娠期、哺乳期者。两组患者性别、年龄等一般资料上差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。本研究由我院伦理管理委员

会批准 [伦研批第 (201401)], 所有受试者均知情同意且签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本处理

将体检当日或入院次日清晨空腹采集静脉血 3 mL 置于促凝剂分离胶管中,1 500 rpm 离心 10 min,检测血清中空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、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) 和脂蛋白 a (lipoprotein a, LPPA) 的水平,另采集静脉血 2 mL 置于 EDTA·K3 抗凝管,采用美国 Qiagen 公司的全血基因组 DNA 提取试剂盒进行全血基因组 DNA 提取。

1.2.2 重亚硫酸盐直接测序

从糖尿病组和对照组中各随机选取 26 名研究对象进行基因组 DNA 提取,取 1 μ g 提取的 DNA 样本进行重亚硫酸盐处理。以修饰后的 DNA 为模板,用 Pfu DNA Polymerase 高温聚合酶扩增 PPARGC-1 α 基因启动子基因片段。通过 Snapgene 软件设计扩增引物,上游引物 5'-CCGTGGGATTCCGTCAATCCCTCC-3',下游引物 5'-CTCTTTTACAGAGTATTTTACGTAGTAC-3'。PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪记录分析。将 PCR 纯化产物连接到 pUC18-T 载体上,待连接产物转化后进行蓝白斑实验筛选,筛选完利用 M13 +/- 引物测序 (ABI 3730XL 测序仪,美国)。检测启动子基因片段中 7 个 CpG 位点,这些位点在基因序列中的位置为 28, 53, 86, 217, 252, 348, 354。

1.2.3 各生化指标的检测

所有研究对象于清晨空腹采集静脉血,离心分离血清。采用西门子全自动生化分析仪 ADVIA2400 (西门子公司,美国)及其配套相关试剂检测 FPG、TG、TC、HDL-C、LDL-C 和 LPPA 水平。所有检测均严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 信息调查

参考以往研究,以调查问卷方式收集并确认患者资料。问卷项目包括个人一般情况及个人健康情况,如高血压、冠心病、脑血管疾病,是否有家族遗传病史等一般资料,T2DM 诊断参考临床诊断标准^[8]。

1.3 统计学分析

采用 Epidata3.1 建立数据库,数据实行双录入法。应用 SPSS 25.0 软件进行统计学处理。对数据进行 Komogorov-Smirnov (K-S) 正态性检验,计量资料采用 t 检验和秩和检验进行处理,并分别采用均数和标准差的形式表示。分类资料采用 χ^2 检验进行分析。Logistic 回归方法分析糖尿病发生的危险因素, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病组与对照组单因素统计分析

K-S 正态分析研究 2 组对象的临床特征, 身体质量指数 (body mass index, BMI)、腰围、收缩压、TC、HDL 和 LDL 符合正态分布; 而年龄、身高、体重、舒张压、FPG, TG 和 LPPA 不符合正态分布。分别采用 t 检验和秩和检验进行统计分析。结果显示, 与对照组相比, 糖尿病组病人的 BMI ($t=2.968$, $P < 0.05$)、腰围 ($t=4.858$, $P < 0.05$) 和体重 ($Z=2.858$, $P < 0.05$) 均明显增高, 且其平均年龄 ($Z=3.924$, $P < 0.05$) 均大于正常对照 (表 1); 对 2 组样本计数资料进行 χ^2 分析, 结果显示 2 组间糖尿病家族史差异有统计学意义 ($\chi^2=7.711$, $P < 0.05$), 其他指标均显示 $P > 0.05$, 差异无统计学意义。

2.2 糖尿病风险多因素回归分析

综合单因素统计分析结果, 将单因素分析结果 $P < 0.05$ 的变量进行多因素 Logistic 回归分析。以是否患糖尿病为因变量 (0=否, 1=是), 以糖尿病

表 1 糖尿病组和对照组各个指标的比较

Table 1 The comparison of each index between the type 2 diabetes mellitus group and the control group

变量	非糖尿病组 (n=152)	糖尿病组 (n=57)	t/Z	P
BMI	23.98±2.98	25.35±3.01	2.968	<0.05
腰围	82.40±11.71	90.93±10.10	4.858	<0.001
收缩压	125.07±15.26	126.63±10.29	0.850	>0.05
TC	4.85±0.86	4.92±0.91	0.533	>0.05
HDL-C	1.27±0.28	1.24±0.29	0.656	>0.05
LDL-C	2.75±0.75	2.83±0.86	0.599	>0.05
年龄	51.00±3.23	59.00±3.01	3.924	<0.001
身高	1.60±1.25	1.60±1.56	0.808	>0.05
体重	62.5±5.67	64.6±4.89	2.858	<0.05
舒张压	78.20±3.41	78.20±2.67	0.249	>0.05
FPG	5.40±1.29	5.52±1.48	0.091	>0.05
TG	1.10±0.23	1.25±0.31	0.975	>0.05
LPPA	132.00±11.98	124.20±9.87	0.095	>0.05

家族史 (X_1)、年龄 (X_2)、腰围 (X_3)、体重 (X_4) 及 BMI (X_5) 作为自变量进行 Logistic 回归分析。根据变量赋值方式的约定, 入选因素的参数估计值为正, 则该因素的量化值越大, 越促进糖尿病的发生; 否则即为保护因素。同时, 其对糖尿病患病的影响大小可由标准化参数估计值的大小来反映。由表 2 可知, 糖尿病家族史、年龄、腰围均为导致糖尿病发生的不利因素, 其 OR 值均 > 1 , 糖尿病家族史 OR 值较大, 意义更大。

表 2 糖尿病发生影响因素的 Logistic 回归

Table 2 The result of Logistic regression analysis of risk factors for type 2 diabetes mellitus

因素	B	SE	Wald χ^2	P	OR	OR95% CI
常量	-9.581	1.819	27.752	0.000	0.000	-
有无糖尿病家族史	1.542	0.491	9.885	0.002	4.676	1.788~12.230
年龄(岁)	0.053	0.020	6.737	0.009	1.054	1.013~1.097
腰围(cm)	0.062	0.018	12.063	0.001	1.064	1.028~1.102

2.3 PPARGC1 基因启动子甲基化与糖尿病关系回归分析

以是否患糖尿病作为因变量 (0=否, 1=是), 以年龄 (X_1)、身高 (X_2)、是否久坐 (X_3)、

PPARGC-1 α 甲基化 (X_4) 及最近测量血糖和血脂时间 (X_5) 作为自变量进行 Logistic 回归分析, 结果显示甲基化水平与糖尿病患病呈低度正相关 (表 3)。

表3 糖尿病发生影响因素的 Logistic 回归

Table 3 The result of Logistic regression analysis of risk factors for type 2 diabetes mellitus

因素	B	SE	Wald χ^2	P	OR 值	OR95% CI
常量 Y	-11.102	3.486	10.143	0.001	0.000	-
<i>PPARGC1</i> 甲基化	4.104	1.454	7.621	0.006	55.395	3.204~957.891
最近测量血糖血脂时间(min)	2.103	0.645	10.636	0.001	8.194	2.315~29.006

3 讨论

T2DM 患病率随着人口老龄化和人们生活方式的转变呈现逐渐递增的趋势。据国际糖尿病联盟数据显示,目前全球糖尿病患者约 4.15 亿并预计在 2040 年达到 6.42 亿^[9]。近年来的研究调查结果显示,T2DM 与遗传和环境因素关系密切^[2],这两者通过表观遗传修饰的改变,特别是 DNA 甲基化,在连接遗传和环境因素的发病机制和进展中发挥作用,最终导致 T2DM 的发生发展^[10]。有研究发现 *PPARGC1* 基因编码区突变与 T2DM 及相关代谢表型相关,其启动子变异也可能影响了 *PPARGC1* 的转录水平,从而参与 T2DM 疾病的发生^[11]。

DNA 甲基化水平受到环境、疾病、年龄和性别等因素的影响。已有研究证实,饮食、年龄及性别等环境因素与 DNA 甲基化修饰显著相关^[12]。本研究通过对糖尿病组与对照组样本临床特征分析发现,2 组样本中,患者的 BMI ($t=2.968, P<0.05$)、腰围 ($t=4.858, P<0.05$) 和体重 ($Z=2.858, P<0.05$)、年龄 ($Z=3.924, P<0.05$)、糖尿病家族史 ($\chi^2=7.711, P<0.05$) 为糖尿病患病危险因素;与前期研究结果相符^[13]。进一步统计分析结果糖尿病家族史 ($OR=4.676; 95\% CI: 1.788\sim 12.230; P<0.05$)、年龄 ($OR=1.054; 95\% CI: 1.013\sim 1.097; P<0.05$)、腰围 ($OR=1.064; 95\% CI: 1.028\sim 1.102; P<0.05$) 均为导致糖尿病发生的不利因素;该结论也与其他相关研究结论相近^[14-15],结果提示年龄、腰围,尤其糖尿病家族史对 T2DM 预防和控制有积极意义。

T2DM 的发生是一个复杂的过程。目前认为 T2DM 是由胰岛素抵抗与胰岛素分泌不足的双重缺陷共同作用所导致^[16]。有研究显示 T2DM 过程中存在糖代谢、脂肪代谢以及线粒体能量代谢等多系统和多通路代谢异常。Brons 等^[17]的研究表明高脂肪的摄入会诱导胰岛素抵抗及增加

PPARGC1 基因的 DNA 甲基化程度,提示 T2DM 过程中存在脂肪代谢异常。Jiang 等^[18]的研究则提示 T2DM 过程可能涉及糖代谢异常。因此,探索该过程中的效应分子,进一步揭示 T2DM 的发病机制,有利于在 T2DM 的预防和治疗领域为我们提供新的启发。*PPARGC1* 因其能够调节糖脂代谢和线粒体能量代谢,进而损伤胰岛 β 细胞,使葡萄糖刺激的胰岛素分泌减少而参与 T2DM 的发生过程,受到广泛关注。本研究采用重亚硫酸盐修饰测序技术检测 *PPARGC1* 基因甲基化水平。该技术既可以明确甲基化的确切位置,也可以检测甲基化的程度,是目前公认的 DNA 样品甲基化检测的推荐方法^[19]。*PPARGC1* 基因启动子甲基化在糖尿病发生中具有重要作用,甲基化水平与糖尿病患病呈低度正相关,之前有研究表明 *PPARGC1* 启动子 C 等位基因多态性与 T2DM 发病微弱关联^[20]。

PPARGC1 最早作为调控脂肪细胞分化的过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR γ) 的辅激活因子被发现,其后相继发现了其对下游靶转录因子调控的生物学功能。目前国内外普遍认为 *PPARGC1* 基因是 T2DM 中的关键候选基因,因其在人体能量代谢的调节中起核心作用,*PPARGC1* 启动子的甲基化会影响其分子的正常表达,进而导致 T2DM 症状。因此,阐明 *PPARGC1* 启动子甲基化与 T2DM 的关系,有望为胰岛素抵抗 T2DM 的治疗提供思路。

参考文献

- [1] 中国医师协会外科医师分会肥胖和糖尿病外科医师委员会. 中国肥胖和 2 型糖尿病外科治疗指南 (2014)[J]. 糖尿病临床, 2014, 8(11):499-504.
- [2] 莫惠芳, 张爱伦, 吴炯, 等. 同型半胱氨酸在糖尿病大血管病变中的意义及危险因素分析[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(7):526-531.

- [3] Scheen AJ, Junien C. Epigenetics, interface between environment and genes: role in complex diseases [J]. *Rev Med Liege*, 2012, 67(5-6):250-257.
- [4] Kar S, Deb M, Sengupta D, et al. An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(9):994-1007.
- [5] 聂燕钗, 俞丽娟, 管桦, 等. DNA 甲基化检测方法及其法医学应用研究进展 [J]. *法医学杂志*, 2017, 33(3):293-300.
- [6] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, 98(1):115-124.
- [7] Ling C, Del GS, Lupi R, et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(4):615-622.
- [8] 梁虹, 高海娥, 李飞, 等. 糖尿病肾病尿毒症患者尿路感染危险因素分析与预防 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(5):1056-1058.
- [9] IdF D AG. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015, 109(3):461-465.
- [10] Karachanak-Yankova S, Dimova R, Nikolova D, et al. Epigenetic alterations in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Balkan J Med Genet*, 2016, 18(2):15-24.
- [11] 孙亮, 王松岚, 屈彦纯, 等. 北京地区汉族人群 PPARGC1A 基因启动子变异筛查及与 2 型糖尿病的关联研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(3):352-356.
- [12] van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, et al. Epigenetics and human obesity [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(1):85-97.
- [13] 吴汉荣, 李丽, 王礼桂. 2 型糖尿病危险因素的 logistic 回归分析 [J]. *疾病控制杂志*, 2003, 7(6):484-486.
- [14] 林雄平, 马宇鹏, 曾欢. 2 型糖尿病危险因素的无条件 Logistic 回归分析 [J]. *中国医药科学*, 2018, 8(21):188-191.
- [15] 李钦鉴, 李群飞, 谢文波. 2 型糖尿病危险因素的 Logistic 分析 [J]. *中国实用医药*, 2018, 13(20):28-30.
- [16] 王卫庆, 陆洁莉. 中国人群 2 型糖尿病的分子机制 [J]. *中国科学:生命科学*, 2018, 48(8):840-846.
- [17] Brons C, Jacobsen S, Nilsson E, et al. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(6):3048-3056.
- [18] Jiang M, Zhang Y, Liu M, et al. Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4):1284-1289.
- [19] 李志刚, 林文弢. 白色脂肪棕色化调控途径的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2017, 37(2):176-186.
- [20] 孙亮, 王松岚, 屈彦纯, 等. 北京地区汉族人群 PPARGC1A 基因启动子变异筛查及与 2 型糖尿病的关联研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(3):352-356.

(上接第 85 页)

- ing and clinic genotyping in subjects with hemoglobinopathies [J]. *EBioMedicine*, 2017, 23:150-159.
- [13] Clark BE, Shooter C, Smith F, et al. Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters [J]. *Int J Lab Hematol*, 2017, 39(Suppl 1):111-120.
- [14] Shooter C, Rooks H, Thein SL, et al. Next generation sequencing identifies a novel rearrangement in the HBB cluster permitting to - the - base characterization [J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(1):142-50.
- [15] Baker MW, Atkins AE, Cordovado SK, et al. Improving newborn screening for cystic fibrosis using next-generation sequencing technology: a technical feasibility study [J]. *Genet Med*, 2016, 18(3):231-238.
- [16] Poon KS, Tan KM, Koay ES. Targeted next-generation sequencing of the ATP7B gene for molecular diagnosis of Wilson disease [J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(1-2):166-171.
- [17] Hallam S, Nelson H, Greger V, et al. Validation for clinical use of and initial clinical experience with, a novel approach to population-based carrier screening using high-throughput, next-generation DNA sequencing [J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(2):180-189.

ASAPI 和 GSTM3 基因多态性与肺结核易感性的相关性研究

张国栋^{1*} 宋刚² 李明辉²

[摘要] 目的 探讨 ASAPI 及 GSTM3 基因多态性与肺结核易感性的相关性。方法 选择自 2017 年 2 月至 2018 年 4 月在重庆市长寿区公共卫生服务中心接受治疗的 196 例肺结核患者为病例组,并以 160 例体检健康人群作为对照组,静脉取血后提取 DNA,采用限制性片段长度多态性方法 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms, PCR-RFLP) 法分析 ASAPI 及 GSTM3 基因多态性;采用多因素 Logistic 回归分析讨论肺结核易感性的危险因素。结果 病例组的总胆红素为 (1.36 ± 0.24) mg/dL, C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 为 (7.84 ± 1.34) mg/L, 白细胞为 $(9.26 \pm 1.38) \times 10^9/L$, 均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。病例组 ASAPI 基因 T2475G 位点基因型 TT、GT 及 GG 分别为 59 例、32 例及 105 例,与对照组基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。病例组 T2475G 位点 G 等位基因比例为 68.6%,显著高于对照 ($P < 0.05$)。病例组 GSTM3 基因 A3207C 位点基因型 AA、AC 及 CC 分别为 46 例、67 例及 83 例,与对照组基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。病例组 A3207C 位点 C 等位基因比例为 59.4%,显著高于对照 ($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析,发现 ASAPI、GSTM3 基因多态性是肺结核易感性的危险因素 ($P < 0.05$)。结论 ASAPI、GSTM3 基因多态性与肺结核易感性的相关性,为肺结核的高危人群筛选及临床治疗提供参考。

[关键词] 肺结核; 基因多态性; 肺结核易感性

Correlation between ASAPI and GSTM3 gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis

ZHANG Guodong^{1*}, SONG Gang², LI Minghui²

(1. Tuberculosis Department of Public Health Service Center, Changshou District, Chongqing, China, 401220; 2. Department of Respiratory Medicine, Chongqing People's Hospital, Chongqing, China, 400013)

[ABSTRACT] Objective To explore the association between ASAPI and GSTM3 gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis. Methods 196 patients with pulmonary tuberculosis who received treatment in Public Health Service Center, Changshou District, Chongqing from February 2017 to April 2018 were selected as case group, and 160 healthy people in the physical examination were used as the control group. The polymorphisms of ASAPI and GSTM3 were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). Multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of tuberculosis susceptibility. Results The total bilirubin in the case group was (1.36 ± 0.24) mg/dL, the C-reactive protein (CRP) was (7.84 ± 1.34) mg/L, and the white blood cells

基金项目:重庆市卫生局医学科研项目(面上项目)(2015-2-21);重庆市科技攻关计划项目(cstc2015gg-yyjsA10316)

作者单位:1. 重庆市长寿区公共卫生服务中心结核科,重庆 401220

2. 重庆市人民医院呼吸内科,重庆 400013

*通信作者:张国栋, E-mail: 148452927@qq.com

were $(9.26 \pm 1.38) \times 10^9/L$, which were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). In the case group, the T2475G locus genotypes of TT, GT and GG were 59 cases, 32 cases and 105 cases, respectively, and the genotype distribution of the control group was statistically significant ($P < 0.05$). The G allele ratio of the T2475G locus in the case group was 68.6%, which was significantly higher than that of the control ($P < 0.05$). The *GSTM3* gene A3207C locus genotypes AA, AC and CC were 46 cases, 67 cases and 83 cases, respectively, and the genotype distribution of the control group was statistically significant ($P < 0.05$). The proportion of C allele in the A3207C locus in the case group was 59.4%, which was significantly higher than that in the control ($P < 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that *ASAP1* and *GSTM3* gene polymorphisms were risk factors for tuberculosis susceptibility ($P < 0.05$). **Conclusion** The *ASAP1* and *GSTM3* gene polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis, and this provides a reference for screening and clinical treatment of high-risk TB patients.

[KEYWORDS] Tuberculosis; Genetic polymorphism; Susceptibility to pulmonary tuberculosis

肺结核是一种因结核分枝杆菌感染导致的肺部传染病,患者的主要症状表现为淋巴结肿大、咯血及乏力等症状,对患者的生命安全造成严重危害^[1]。肺结核的发生机制较为复杂,与患者的基因、病菌的毒性及生活环境等多种因素密切相关^[2]。有研究发现单核细胞趋化蛋白-1及巨噬细胞移动抑制因子等重要免疫蛋白的基因多态性异常与结核分枝杆菌的易感性明显相关,这表明宿主的遗传因素对肺结核的发展有重要影响^[3]。ADP核糖基化因子GTP酶活化蛋白1(Arf-GAP with SH3 domain ANK repeat and PH domain-containing protein, *ASAP1*)是一类分子量为20~40 kD的单体GTP结合蛋白,与GTP酶活化蛋白结合后发挥GTP酶活性,可增强巨噬细胞内肌动蛋白应激纤维的功能,从而有利于细胞提升细胞运动能力^[4]。谷胱甘肽硫转移酶M3(glutathione S-transferase M3, *GSTM3*)是一种含225个氨基酸的蛋白,具有催化谷胱甘肽等抗氧化因子与超氧化物反应的功能,从而可减轻细胞内的氧化应激反应^[5]。已有研究发现*ASAP1*及*GSTM3*基因多态性可对人体的免疫功能产生影响,从而降低机体对病菌的免疫能力^[6]。本研究对肺结核患者中*ASAP1*基因及*GSTM3*基因多态性进行检测,分析*ASAP1*基因及*GSTM3*基因多态性与肺结核易感的相关性,为肺结核的高危人群筛选及临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择自2017年2月至2018年4月在重庆市长寿区公共卫生服务中心接受治疗的196例肺结核

患者为病例组,其中男性109例,女性87例,年龄24~63岁,平均年龄 (32.58 ± 2.96) 岁。选择在重庆市长寿区公共卫生服务中心体检正常的160例健康人为对照组,其中男性84例,女性76例,年龄21~58岁,平均年龄 (34.65 ± 3.27) 岁。纳入标准:①患者均为汉族并无遗传病;②患者均经影像学检查、痰结核菌涂片等方法确诊为肺结核病。排除标准:①患者的基本临床资料缺失;②患者伴发肿瘤、高血压及重要器官衰竭;③伴发哮喘、气管炎等呼吸系统疾病。所有研究对象均知情同意,且本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 试剂及仪器设备

基因组DNA提取试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司,限制性内切酶购自美国NEB公司;PCR试剂盒购自金斯瑞生物科技有限公司。

1.3 基因多态性检测

采集受试者外周血5 mL, EDTA- Na_2 抗凝,按照全血基因组DNA提取试剂盒说明书提取DNA,基因组DNA经Nanodrop分光光度计检测合格后,置于4℃冰箱保存。采用限制性片段长度多态性方法(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms, PCR-RFLP)分析基因型多态性,按照Prime 6.0软件设计引物,*ASAP1*基因T2475G位点:上游引物5'-CTGACGTCCATC-CATCACTC-3',下游引物5'-CTGACGTCACTCACTCATGCAC-3'。*GSTM3*基因A3207C位点:上游引物5'-GTCATCATCATCCATGCATC-3',下游引物5'-CTGGACTGCATCTGCATC-3'。PCR反应条件:95℃ 3 min;95℃ 10 s, 58℃ 15 s, 72℃ 25 s,反应32个循环,反应结束后72℃ 5 min。然后采用*Kas I*限制性内切酶处理*ASAP1*基因扩增

产物,采用 *BsP63I* 限制性内切酶处理 *GSTM3* 基因扩增产物,将酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后,分析酶切产物的条带数目判断基因型,同时将 PCR 扩增产物送至上海桑尼生物科技有限公司测序验证。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 处理数据,计量数据以均数±标准差表示,采用 *t* 检验;计数数据以率表示,采用 χ^2 检验。肺结核易感性危险因素采用多因素 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 对照组及病例组的一般资料

2 组的年龄、性别、体重、身体质量指数 (body mass index, BMI)、饮酒史及吸烟史差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。病例组的总胆红素为 (1.36 ± 0.24) mg/dL, C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 为 (7.84 ± 1.34) mg/L, 白细胞数为 (9.26 ± 1.38) $\times 10^9/L$, 均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 2 组一般资料对比

Table 1 Comparison of the 2 groups of general data

组别	对照组 (n=160)	病例组 (n=196)	<i>t</i> 值	<i>P</i>
年龄(岁)	34.65±3.27	32.58 ±2.96	3.247	0.206
性别(男/女)	84/76	109/87	2.923	0.241
体重(kg)	57.35±6.42	56.76 ±5.83	2.534	0.264
BMI(kg/m ²)	21.67±3.69	22.42±3.76	3.735	0.178
饮酒史[n(%)]	68(42.5)	81(41.3)	2.627	0.239
吸烟史[n(%)]	46(28.7)	65(33.1)	3.162	0.218
总胆红素(mg/dL)	1.02±0.21	1.36±0.24	5.379	0.029
CRP(mg/L)	5.26±1.67	7.84±1.34	6.157	0.023
白细胞数($\times 10^9/L$)	6.25±1.14	9.26±1.38	5.734	0.026

2.2 *ASAPI* 基因多态性与肺结核易感性的分析

病例组 *ASAPI* 基因 T2475G 位点基因型 TT、GT 及 GG 分别为 59 例、32 例及 105 例,与对照组基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。病例组 T2475G 位点 G 等位基因比例为 68.6%, 显著高于对照 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 *GSTM3* 基因 A3207C 位点多态性与肺结核易感性的分析

病例组 *GSTM3* 基因 A3207C 位点多态性位点基因型 AA、AC 及 CC 分别为 46 例、67 例及 83 例,与对照组基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。病例组 C 等位基因比例为 59.4%, 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 肺结核易感性的危险因素分析

以肺结核感染为因变量,将本研究受试者的年龄、性别、体重、BMI、饮酒史、吸烟史、总胆红素、CRP、白细胞数值进行多因素 Logistic 回归分

表 2 *ASAPI* 多态性与肺结核易感性的相关性 [n(%)]

Table 2 Association between *ASAPI* polymorphism and susceptibility of pulmonary tuberculosis [n(%)]

T2475G	对照组 (n=160)	病例组 (n=196)	χ^2	<i>P</i>
基因型频率			5.421	0.023
TT	67(41.8)	59(30.1)		
GT	42(26.3)	32(16.3)		
GG	51(31.9)	105(53.6)		
等位基因频率			4.762	0.029
T	176(84.1)	123(31.4)		
G	144(46.2)	269(68.6)		

析,发现 T2435G 及 A3207C 位点多态性是肺结核感染的危险因素 ($P < 0.05$), 见表 4。

3 讨论

人体对结核分枝杆菌免疫机制较为复杂,巨

表3 *GSTM3* 多态性与肺结核易感性的相关性Table 3 Association between *GSTM3* polymorphism and susceptibility of pulmonary tuberculosis

A3207C	对照组(n=160)		病例组(n=196)		χ^2	P
基因型					4.159	0.021
AA	73	45.6%	46	23.5%		
AC	49	30.6%	67	34.2%		
CC	38	23.8%	83	42.3%		
等位基因					5.324	0.017
A	195	60.9%	159	40.6%		
C	125	39.1%	233	59.4%		

噬细胞可吞噬侵入的致病菌,并将免疫信号传递至T淋巴细胞等其它免疫细胞,进一步增强人体对结核分枝杆菌的免疫能力^[7]。有流行病学研究统计发现结核分枝杆菌的感染者中约有10%的感染者可转化为活动性肺结核,并且不同族群及人种的肺结核发病率有一定的差异,这表明宿主的遗传特征与肺结核的易感性有密切关系^[8-9]。麦志丹等^[10]研究发现 *TNF- α -308* 基因多态性与肺结核的易感性密切相关。有研究发现75.3%的肺结核患者 *ATG4A* 及 *ATG16L1* 基因多态性与健康者有显著差异^[11]。这表明某些基因的多态性可能会对肺结核的易感性产生影响。有研究发现

表4 肺结核易感性的多因素 Logistic 回归分析

Table 4 Multiple factor Logistic regression analysis of susceptibility of pulmonary tuberculosis

变量	β	SE	Wald 值	OR	95%CI	P
T2475G 位点	0.423	0.021	4.359	1.572	1.062~2.346	0.031
A3207C 位点	0.319	0.018	4.156	1.348	0.642~1.951	0.021

ASAP1 及 *GSTM3* 基因多态性可能对免疫细胞的功能产生影响,从而降低机体对外界病菌的抵抗力^[12]。因此,研究 *ASAP1* 及 *GSTM3* 基因与肺结核易感性的相关性有助于结核病的预防及治疗。

ASAP1 蛋白主要位于细胞的高尔基体上,参与细胞囊泡物质运输,且是构成细胞伪足、黏着斑的重要组成部分,可增强某些细胞(如巨噬细胞)的黏附及运动功能^[13]。已有研究发现当小鼠成纤维细胞内 *ASAP1* 基因转录或翻译发生障碍后,可导致细胞的伪足运动功能下降^[14]。有研究发现结核分枝杆菌分泌的某些有毒物质可能干扰巨噬细胞 *ASAP1* 基因的表达,进一步削弱巨噬细胞对结核分枝杆菌的免疫功能^[15]。本研究发现病例组 *ASAP1* 基因 T2475G 位点基因型 TT 的比例明显高于 GT 及 GG 型的比例,提示 *ASAP1* 基因 T2475G 位点与肺结核易感性相关。有研究通过 RNA 干扰技术下调巨噬细胞中 *ASAP1* 基因表达水平后,巨噬细胞识别、捕获结核分枝杆菌的能力明显下降,并干扰巨噬细胞向其它免疫细胞传递免疫信号^[16]。Faghfoori 等^[17]研究发现 *ASAP1* 基因的多态性可影响肺结核患者的免疫功能,从而提高了结核杆菌对机体的侵染力。这表明 *ASAP1* 基因的多态性促使 *ASAP1* 蛋白活性降低或表达水平降低,

导致巨噬细胞的识别及运动功能障碍,可能是导致肺结核易感性上升的诱因。*GSTM3* 可以催化谷胱甘肽与细胞内的氧自由基等活性氧反应,因而可抑制活性氧对巨噬细胞、T淋巴细胞等免疫细胞的攻击,提高机体的免疫功能。有研究发现肺结核患者血浆中的 *GSTM3* 蛋白水平显著低于正常人,提示 *GSTM3* 与肺结核的发生密切相关^[18]。本研究发现病例组 *GSTM3* 基因 A3207C 位点基因型 CC 比例明显高于 AA 及 AC 型的比例,提示 *GSTM3* 基因多态性对肺结核的发生产生影响。有研究发现肺结核患者 *GSTM3* 基因的 A3207C 位点为 CC 型的比例为 51.4%,与肺结核易感性明显相关^[18],与本研究一致。这可能是由于 *GSTM3* 基因 A3207C 位点 CC 基因型促使 *GSTM3* 蛋白结构异常或转录水平下降,导致免疫细胞受到氧自由基或过氧化物攻击,从而降低患者的免疫系统功能。有研究通过 TaqMan 基因技术分析肺结核患者体内 *GSTM3* 基因中 A3207G 和 C1305G 位点多态性特征,发现这 2 个位点的基因多态性与肺结核易感性无显著相关性^[19]。这表明 *GSTM3* 基因 SNP 位点多态性与肺结核易感性的关系较为复杂,*GSTM3* 基因中的多个 SNP 多态位点可能产生交互作用,进而对 *GSTM3* 基因的表达产生不同的影响。多因素 Logistic 回归

分析发现 T2475G 位点及 A3207C 位点的多态性是肺结核发生的危险因素。ASAP1 基因及 GSTM3 基因多态性作为宿主的遗传特征,并不受外界干扰因素的影响,检测 ASAP1 基因及 GSTM3 基因多态性对筛查肺结核易感性人群有较高临床价值。

综上所述,ASAP1 基因及 GSTM3 基因多态性与肺结核易感性密切相关,通过检测 ASAP1 基因及 GSTM3 基因多态性可评估受试者肺结核易感性。但由于影响肺结核的发病的基因较多,需进一步检测其它可能的易感基因进行综合分析,以期提高对肺结核的防治水平。

参考文献

- [1] 孙红梅,冯建纯,李刚,等. 河北地区汉族人 TLR2 基因多态性与结核易感性的相关性研究[J]. 河北医科大学学报, 2017, 38(12):1443-1447.
- [2] Kayomo MK, Hasker E, Aloni M, et al. Outbreak of tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis, mbutji mayi central prison, democratic republic of the congo[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(11):2029-2035.
- [3] 何杰,李万成,李小燕,等. MBL2 基因 P54 位点多态性与结核易感性相关性的 Meta 分析[J]. 中国预防医学杂志, 2018, 19(5):326-332.
- [4] 李鹏,崔佳,王丽清,等. ASAP1 调节巨噬细胞对结核分枝杆菌吞噬作用的研究[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(3):481-488.
- [5] 高丽,李世明,史哲,等. GSTA1/GSTM3 基因多态性与抗结核药物性肝损伤的相关性分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(7):585-589.
- [6] Kapadiya DJ, Dave PV, Vadera B, et al. Assessment of tuberculosis prevalence in newly diagnosed human immunodeficiency virus-infected adults attending care and treatment center in Gujarat, India [J]. Indian J Community Med, 2018, 43(3):185-189.
- [7] 王骑凤,肖海,杨洪毅,等. FAM46A、EBF1 基因多态性与河南汉族肺结核相关性分析[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(1):56-59.
- [8] 杨春娥,冯喜英,久太. 结核病易感基因的研究现状[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2016, 9(2):207-209.
- [9] Sharma SK, Jha BK, Sharma A, et al. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 & susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatotoxicity [J]. Indian J Med Res, 2016, 144(6):924-928.
- [10] 麦志丹,李小萍,梁梅,等. TNF- α -308 基因多态性与尘肺以及尘肺合并结核易感性的研究[J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(7):509-511.
- [11] 黄秦,赵凤容,李霞,等. ATG4A 及 ATG16L1 基因多态性与肺结核易感性的关系[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(4):599-603.
- [12] Ghamari E, Farnia P, Saif S, et al. Comparison of single nucleotide polymorphisms [SNP] at TNF- α promoter region with TNF receptor 2 (TNFR2) in susceptibility to pulmonary tuberculosis; using PCR-RFLP technique [J]. Am J Clin Exp Immunol, 2016, 5(4):55-61.
- [13] Dowdy DW, Theron G, Tornheim JA, et al. Of testing and treatment: implications of implementing new regimens for multidrug-resistant tuberculosis [J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(7):1206-1211.
- [14] Li J, Wu L, Guo W, et al. Clinical relevance of LINC00152 and its variants in western Chinese tuberculosis patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(70):115456-115468.
- [15] 廖春信,杨嘉慧,王金丽,等. HLA-A、HLA-DRB1 等位基因多态性与中国南方活动性肺结核患者遗传易感性的相关性[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(1):95-100.
- [16] 邢志伟,高艳军,张建武,等. CXCL10 与 CXCL12 基因多态性与肺结核易感性的关系[J]. 天津医药, 2018, 46(3):280-283.
- [17] Faghfoori Z, Pourghassem GB, Saber A, et al. The investigation of the diversity of lactobacilli spp. and assessment their some probiotic properties in traditional dairy products in East Azerbaijan province in Iran [J]. Iran J Pharm Res, 2017, 16(4):1538-1545.
- [18] Wang Y, Yang ZY, Chen YH, et al. A novel functional polymorphism of GSTM3 reduces clear cell renal cell carcinoma risk through enhancing its expression by interfering miR-556 binding [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(6):3005-3015.
- [19] Yuengling KA, Padayatchi N, Wolf A, et al. Effect of antiretroviral therapy on treatment outcomes in a prospective study of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) HIV coinfection treatment in KwaZulu-Natal, South Africa [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2018, 79(4):474-480.

耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究

李飞 李丽娟 梁德志 王凤平 张拔山*

[摘要] **目的** 探讨耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制。**方法** 收集2016年1月至2017年12月东莞地区2家医院110株耐亚胺培南铜绿假单胞菌,采用VITEK2系统分析临床菌株耐药性,脉冲场凝胶电泳(PFGE)行同源性分析,PCR法检测金属 β -内酰胺酶相关基因以及 $oprD$ 基因,并对阳性株进行测序;对 $oprD$ 基因无中断突变株,利用qRT-PCR检测其mRNA表达情况。**结果** 110株耐亚胺培南铜绿假单胞菌PFGE分析结果显示高度克隆多样性。PCR法检测出18株金属 β -内酰胺酶基因阳性的菌株,主要类型是:IMP-25, VIM-2, SIM-2。PCR法检测出107株阳性菌株,测序结果表明有意突变率高达93.46%(100/107),类型包括点突变,缺失突变,插入突变以及提早终止突变。7株 $oprD$ mRNA表达量均降低。**结论** 本实验进一步证实了 $oprD$ 基因缺失,发生广泛有意突变,mRNA表达减少以及金属 β -内酰胺酶基因产生是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制。

[关键词] 铜绿假单胞菌; MBLs基因; $oprD$ 基因; PFGE; 亚胺培南耐药

Investigation on antimicrobial resistance characteristics and mechanism of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

LI Fei, LI Lijuan, LIANG Dezhi, WANG Fengping, ZHANG Bashan*

(The Clinical Laboratory of Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523059)

[ABSTRACT] **Objective** To study the characteristics of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanisms of drug resistance. **Methods** 110 imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates were collected from 2 hospitals of Dongguan from January 2016 to December 2017, and antibiotic resistance was analyzed by using VITEK2 system. The homology between these strains was evaluated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The metal β -lactamase-related gene and the $oprD$ gene were detected by PCR, and the positive strain was sequenced; The mRNA expression of the $oprD$ gene without disrupted mutation strains was detected by qRT-PCR. **Results** The results of PFGE analysis of 110 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* showed high-level clonal diversity. 18 strains of metal β -lactamase gene-positive strains were detected by PCR. The main types were IMP-25, VIM-2 and SIM-2. 107 positive strains were detected by PCR. The sequencing results showed that the intentional mutation rate was as high as 93.46% (100/107) including point mutation, deletion mutation, insertion mutation and early termination mutation. The expression levels of $oprD$ mRNA in 7 strains were all decreased. **Conclusion** This experiment further confirmed that $oprD$ gene deletion, extensive intentional mutation, decreased mRNA expression and metal β -lactamase gene production are the main mechanisms of *P.aeruginosa* resistance to imipenem.

[KEY WORDS] *Pseudomonas aeruginosa*; MBLs gene; $oprD$ gene; PFGE; Imipenem resistance

基金项目:东莞市社会科技发展资助项目(No.2016108101042)

作者单位:东莞市人民医院检验科,广东,东莞 523059

*通信作者:张拔山, E-mail: zbsdgry@163.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是临床最常见的机会致病菌之一,在非发酵革兰阴性菌中其分离量占第一位(45.4%)^[1]。曾经认为亚胺培南是用于治疗铜绿假单胞菌感染最有效的临床药物,随着抗生素选择压力增加,铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药情况日趋严重,常呈多重耐药,给临床抗感染治疗带来了新的挑战,使得临床抗感染治疗的难度大大增加^[2-5]。耐亚胺培南铜绿假单胞菌(imipenem resistance *Pseudomonas aeruginosa*, IMPRPAE)的耐药机制国内外进行了大量研究,发现碳青霉烯类耐药机制主要包括以下几个方面:碳青霉烯酶的产生、AmpC酶、ESBLs、外膜孔蛋白缺失和外排泵超表达等。本研究选取2016年1月至2017年12月东莞地区2家医院临床送检标本110株 IMPRPAE,从 *MBLs* 基因检测, *oprD* 基因检测以及 *oprD* mRNA 表达水平检测三方面着手,分析其耐药特征以及耐药机制。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

选取2016年1月至2017年12月东莞市人民医院及东莞市东华医院临床送检标本分离的110株耐亚胺培南铜绿假单胞菌,送检标本类型包括痰液、尿液、血液、分泌物等。所有标本保存于脱脂牛奶, -70℃保存。同一患者分离得到的菌株不重复计入。实验时把菌株从脱脂牛奶复苏到血平板,再从血平板中挑取纯菌株的单个菌落备用。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器设备与试剂

VITEK-2全自动细菌鉴定/药敏系统购自法国生物梅里埃公司; bioMérieux DENSIMAT比浊仪购自法国生物梅里埃公司; CHEF-DRIII电泳仪购自美国生物伯乐公司。RNA提取试剂盒购自LIFE公司; Bestar™qPCR RT Kit试剂盒购自上海星汉生物科技有限公司; 细菌鉴定卡(GN)以及药敏卡(AST-GN10)购自广州市番禺华鑫科技有限公司; 40U SpeI购自大连生物工程公司, DNA提取试剂购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2.2 药敏方法

所有菌株均以VITEK-2全自动细菌鉴定分析仪鉴定到种。根据2016年美国临床和实验室标准

化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)规定的常规药敏试验标准^[6],选择AST-GN10药敏卡上的氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑啉、头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、亚胺培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因、复方新诺明16种抗生素进行药敏试验。使用纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B法)进行美罗培南药敏试验。其中美罗培南的判断折点主要依据CLSI判断标准^[7]: 抑菌圈直径 ≥ 19 mm为敏感, 抑菌圈直径 = 16~18 mm为中介, 抑菌圈直径 ≤ 15 mm为耐药。

1.2.3 脉冲凝胶电泳(plused field gel electrophoresis, PFGE)

挑取单菌落接种营养平板, 37度孵育过夜。用bioMérieux DENSIMAT比浊仪调整细菌悬液浓度, 使浊度为3.8~4.2。加入1% Seakem Gold胶, 混匀制备胶块。使用含蛋白酶K的细胞裂解液(cell lysis buffer, CLB)消化2 h。纯水清洗胶块2次; TE(10 mmol/L Tris: 1 mmol/L EDTA, pH值8.0)清洗胶块4次。使用40 U SpeI内切酶进行酶切, 在37℃孵育4 h。在CHEF-DRIII电泳仪中进行脉冲场电泳。电泳参数为5 s~15 s, 9 h; 15 s~50 s, 9 h。电泳结束后, 使用GelRed核酸染料染色。在读胶仪中成像, 并转换成TIFF图像格式保存。PFGE图像录入BioNumerics软件包进行处理, 识别图像条带, 经统一的分子质量标准, 进行聚类, 构建聚类树。分子量标准用沙门菌H9812经过XbaI酶切后的片段。

1.2.4 PCR扩增

MBLs 基因以及 *oprD* 基因应用Oligo 7软件(Molecular Biology Insights, Inc.Co, 美国)设计引物, 委托上海赛默飞世尔科技公司合成, 相关基因的引物序列见表1, 引物设计参考国内外现有的文献报道^[8-10]。PCR扩增体系为: 2.5 μ L 10 \times Taq Buffer(20 mM Mg²⁺), 0.5 μ L dNTPs(2.5 mmol/L), 上下游引物各1 μ L(10 μ mol/L), DMSO 2.5 μ L, Taq DNA Polymerase 0.5 μ L(1.5 U/ μ L), DNA模板50~100 ng, ddH₂O补足至25 μ L。*MBLs*的热循环参数为: 94℃预变性5 min后, 30个循环: 94℃变性30 s, 52℃退火40 s, 72℃延伸50 s, 最后72℃延伸5 min后扩增完毕。产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 以100 bp DNA Marker为标准确定位点分子质量,

空白水为阴性对照,出现与目的产物分子相当的条带为阳性。*oprD*的热循环参数为:95℃预变性10 min,30个循环:95℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸30 s,最后72℃延伸10 min后扩增完毕。用1.5%琼脂糖凝胶电泳,以100 bp DNA Marker为标准确定位点分子质量,以标准菌株ATCC27853作为阳性对照。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primers used for gene amplification

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
IMP	F-CTCACATTTCCATAGCGACA	429
	R-TTGAATCCTTTTACCGTCTGC	
VIM	F-ATGTTTCAMRYTTTTGAGTAAAGTT	801
	R-CTACTCAACGACTGAGCGATT	
SPM	F-TGCTTTTCTGCCCCGTGTTC	270
	R-GAGCATGGGGTCTCCTCGT	
SIM	F-TACAAGGGATTTCGGCATCG	570
	R-TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
GIM	F-TCGACACACCTTGGTCTGAA	477
	R-AACTTCCAACCTTTGCCATGC	
NDM	F-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	R-CGGAATGGCTCATCACGATC	
<i>oprD</i>	F-CGCTTCGGAACCTCAACTATCGC	1 412
	R-TCACCGGTACCTACGCCCTT	

1.2.5 Sanger 测序基因测序和分析

纯化PCR扩增产物,产物送上海Invitrogen公司进行测序。*oprD*测序产物分别在假单胞菌基因组网站(www.pseudomonas.com)和NCBI网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对分析获得的序列,分析其突变情况。*MBLs*测序产物与NCBI网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对分析获得序列。

1.2.6 荧光定量PCR(real time quantitative-PCR, qRT-PCR)检测 *oprD* 因 mRNA 的表达

按照RNA提取试剂盒说明书提取PA的总RNA。RNA定量后,取等量RNA反转录成cDNA。使用Bestar™ qPCR RT Kit试剂盒进行目的基因*oprD*基因mRNA的检测,管家基因*rpsL*作为内参。*oprD*基因mRNA的相对表达量通过与标

准PAO1菌株做比较。*oprD*基因mRNA表达量减少与标准PAO1菌株相关,即标准PAO1菌株*oprD*基因mRNA表达量被赋值为1.0,若其他菌株*oprD*基因转录水平小于其70%时,被认为其表达量减少^[11]。并且选取10株亚胺培南敏感的铜绿假单胞菌均同时检测其*oprD*基因mRNA表达量。所有实验重复3次。PCR引物的核苷酸序列见表2。

表2 PCR引物序列

Table 2 Primers used for gene amplification

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
内参基因 <i>rpsL</i>	F-CTCGGCACTGCGTAAGGTAT	138
	R-CCCGGAAGGTCCTTTACACG	
目的基因 <i>oprD</i>	F-ATGTTTCAMRYTTTTGAGTAAAGTT	112
	R-CTACTCAACGACTGAGCGATT	

2 结果

2.1 IMPRPAE 耐药特点

IMPRPAE对阿米卡星的耐药率为10.00%,对妥布霉素、庆大霉素、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦的耐药率在17.27%~21.82%,对头孢他啶、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率26.36%~31.82%,对其余β-内酰胺类、氟喹诺酮类、四环素、磺胺类抗菌药物耐药严重,结果见表3。

2.2 IMPRPAE 的流行病学分析(PFGE)

本研究调查了110株PA,所有分离菌株对亚胺培南耐药。而对美罗培南敏感或中介的菌株共32株(29.09%),其中敏感株14个,中介株18个,判断标准依据美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)规范化操作。

110株PA PFGE聚类图见图1。110株菌分为84个不同的带型,其中70个带型只包含1株菌,即有70株菌具有独特的PFGE带型。总的来说,PFGE显示其具有高度克隆多样性(如图1),尽管有一个包含菌株最多的带型包含5株。

2.3 PCR法分析 *MBL* 基因和 *oprD* 基因以及其测序结果

经PCR扩增后发现110株IMPRPAE中产*MBLs*阳性菌株共有18株,阳性菌株进行基因测

表3 IMPRPAE对常用抗菌药物的药敏率(%)(n=110)

Table 3 Sensitivity of imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa to frequently-used antimicrobial drugs (%) (n=110)

抗菌药物	敏感		耐药	
	株数	敏感率	株数	耐药率
亚胺培南	0	0.00	110	100.00
氨苄西林	0	0.00	110	100.0
呋喃妥因	2	1.82	108	98.18
复方新诺明	3	2.73	107	97.27
头孢唑啉	0	0.00	106	96.36
头孢替坦	2	1.81	104	94.55
氨苄西林/舒巴坦	7	6.36	103	93.64
头孢曲松	6	5.45	100	90.91
美罗培南	14	12.73	82	74.54
头孢他啶	54	49.09	35	31.82
环丙沙	64	58.19	30	27.27
左氧氟沙	69	62.73	29	26.36
哌拉西林/他唑巴坦	47	42.73	24	21.82
头孢吡肟	75	68.18	24	21.82
庆大霉素	78	70.91	21	19.09
妥布霉素	83	75.45	19	17.27
阿米卡星	96	87.27	11	10.00

序,测序结果直接在 GenBank 中进行序列对比分析,发现有9株检出是 *IMP-25*,8株检出是 *VIM-2*,4株检出是 *SIM-2*,有3株同时检出即有 *VIM-2* 又有 *SIM-2*。分别与 *IMP-25* GenBank 注册号 EU352796, *VIM-2* GenBank 注册号 AF191564 以及 *SIM-2* GenBank 注册号 KT013203 相同。

110株 PA 菌中 107株 *oprD* 基因扩增阳性,3株阴性,缺失率为 2.73%。阳性菌株基因测序表明其中7株无中断突变,84株伴有移码突变,16株伴有一个碱基单点突变而致终止密码子提前出现(表4)。移码移位所致突变其中共有8株伴有 IS 序列插入,主要发现了 IS_{Ppu29}、IS_{Ppu21}、IS₁₃₉₄ 以及 IS_{Pst2} 4种插入序列类型。

2.4 qRT-PCR 检测 *oprD* 基因 mRNA 的表达结果

检测7株(编号为:5,11,18,23,43,81和107)无中断突变株其 *oprD* 的 mRNA 表达水平。与 PAO1 相比,所有菌株 *oprD* 表达量降低(从 0.06 到 0.65)(表5)。对10株亚胺培南敏感的 PA 其 *oprD* 的表达也进行了检测,发现没有任何一个菌株其 *oprD* 表达量降低,其范围从 1.23 到 12.94。

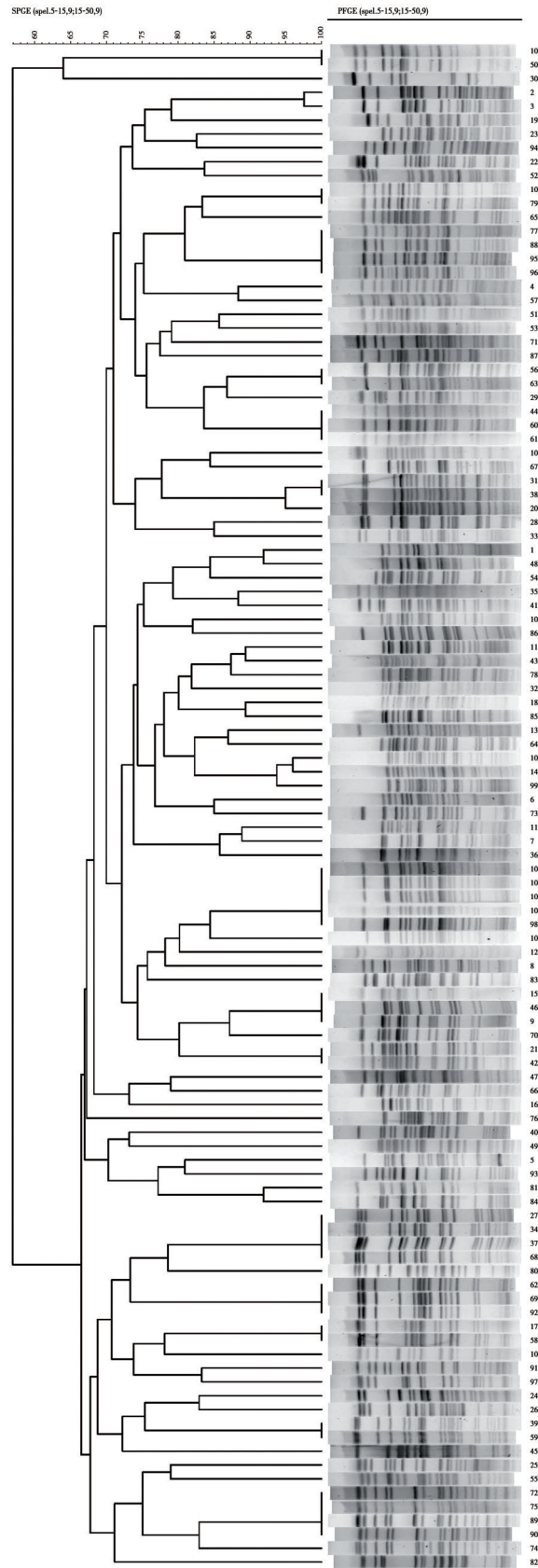


图1 110株 PA PFGE 聚类图
Figure 1 Dendrogram based on PFGE profiles of imipenem-resistant PA isolates

表4 IMPRPAE *oprD* 基因突变类型

突变类型	菌株数	比例(%)	
框码移位	插入单个碱基	7	6.36
	插入多个碱基	5	4.55
	缺失单个碱基	8	7.27
	缺失多个碱基	56	50.91
	插入 IS 序列	8	7.27
提早终止	单个碱基突变	16	14.55
PCR 阴性		3	2.73
无中断突变	氨基酸改变	7	6.36
总数		110	100

3 讨论

目前,临床已广泛使用亚胺培南用于治疗感染铜绿假单胞菌,使得越来越多的耐亚胺培南铜绿假单胞菌产生了耐药性^[12]。2015年一项荟萃分析研究显示^[13],铜绿假单胞菌碳青霉烯耐药率在8.7%至50.4%之间。中国细菌耐药监测网报告2016年铜绿假单胞菌对各种抗菌药物的耐药性仍处于较高水平^[4]。本组研究发现110株耐亚胺培南铜绿假单胞菌除对阿米卡星敏感率较高达87.27%,而对其他药物耐药率都很高,甚至有7种药物耐药率在90%以上,由此可知铜绿假单胞菌的耐药情况已十分严峻,对于在临床诊疗过程中

表5 无中断突变株其 *oprD* 基因的 mRNA 表达水平Table 5 The mRNA expression of the *oprD* gene without disrupted mutation

菌株号	<i>oprD</i> 类型	mRNA 表达 ^a	氨基酸改变
PAO1	野生型	1	
5	氨基酸改变	0.65	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A
11	野生型	0.15	
18	野生型	0.06	
23	野生型	0.08	
43	氨基酸改变	0.16	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G425A
81	野生型	0.12	
107	野生型	0.15	

^a *oprD* 基因 mRNA 的表达量通过与标准 PAO1 菌株比较,即标准 PAO1 菌株 *oprD* 基因 mRNA 表达量被赋值为 1.0,若其他菌株 *oprD* 基因转录水平小于其 70% 时,被认为其表达量减少。

应重视和加强对细菌耐药性的监测,并合理地应用和优先选用低耐药可能性的抗菌药物,减少耐药菌株在院内的扩散。

铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物的耐药机制较为复杂,其中最主要的耐药机制包括以下几个方面:①产碳青霉烯酶:铜绿假单胞菌中常见的碳青霉烯酶为金属 β -内酰胺酶。目前发现的获得性金属 β -内酰胺酶包括:IMP、VIM、SPM、GIM、SIM、AIM、KHM、DIM、NDM 9 种,其中以 IMP 和 VIM 常见^[14-15]。本研究 110 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中发现 18 株(16.36%)耐药菌株携带金属 β -内酰胺酶,主要包括 IMP-25, VIM-2, SIM-2,这也说明了金属 β -内酰胺酶在铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药中发挥重要作用。多项研究结果发现金属 β -内酰胺酶基因检测阳性率均低于 20%^[17-18]。而方小龙

等研究发现 2013 年至 2015 年深圳地区金属 β -内酰胺酶基因检测阳性率 32.8% 结果较不一致^[15]。本组研究发现金属 β -内酰胺酶基因的存在以及产生金属酶是本地区铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的机制之一,可能还存在其他主要耐药机制。②外排泵高表达:铜绿假单胞菌染色体上存在多种外排泵基因,外排泵可将多种有毒物质、药物等排出细菌体内;正常情况下外排泵表达较低,对碳青霉烯耐药性无影响,但外排泵高表达时,可引起对亚胺培南及美罗培南的外排增加,从而增加其耐药性^[2]。③外膜通透性降低:铜绿假单胞菌外膜通透性低,碳青霉烯无法直接通过其外膜,需借助外膜上的孔道蛋白 oprD 进入细菌发挥作用,因此外膜蛋白 oprD 缺失或表达降低都会导致铜绿假单胞菌对碳青霉烯的耐药性增加^[18-19]。本研究

110株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中发现 *oprD* 缺失的有3株(2.73%),与这与颜英俊等^[20]报道结果一致。相关文献报道 *oprD* 缺失是PAE对IMP耐药的主要机制,例如闫玉兰等人^[6]发现 *oprD* 缺失率高达86.8%。而也有相关报道发现 *oprD* 缺失率较低,例如广东中山地区王娟等人^[21]发现 *oprD* 缺失率为16.3%,哈尔滨地区多丽波等人^[22]发现 *oprD* 缺失率为26.19%,北京地区杨春等人^[23]发现 *oprD* 缺失率为56.1%,这说明菌株耐药具有地域性。不同地域耐药菌株 *oprD* 缺失率不一样,本研究 *oprD* 缺失率为2.73%,与广东中山地区^[21] *oprD* 缺失率低较一致。*oprD* 缺失率低不排除因 *oprD* 基因突变或基因表达下调导致PA对IMP耐药,于是我们进一步对107株阳性菌株进行了 *oprD* 基因测序检测和mRNA表达量检测。而国内其他大部分研究者^[21-23]仅检测了 *oprD* 基因,并未对其进行测序,无法判断 *oprD* 突变情况,本研究进一步完善了此部分实验内容。本组结果提示其中有100株(90.91%)发生了有意突变,对7株(6.36%)无中断突变株进行mRNA表达量检测,发现其mRNA表达量均减少,与国内颜英俊^[21]报道结果一致,同时本研究组在国内发现铜绿假单胞菌外膜蛋白 *oprD* 基因中插入IS序列,包括IS1394、ISPpu29以及ISPst2。本研究进一步证实 *oprD* 缺失,发生广泛有意突变以及mRNA表达减少是导致导致本组PA对IMP耐药的主要机制。

综上所述,IMPRPAE对常用抗菌药物耐药情况非常严峻,PA对亚胺培南耐药机制复杂,产酶、膜孔蛋白 *oprD* 基因缺失以及外排泵出机制三者有着密不可分的关联,即可单独存在,又可同时存在。临床上应该重视和加强对细菌耐药性的监测,合理地应用低耐药的抗菌药物,在一定程度上控制和避免耐亚胺培南铜绿假单胞菌的大量出现和流行爆发。

参考文献

- [1] 刘德华. 铜绿假单胞菌耐药性及其变迁研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 19(23):4852-4854.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗志, 2017, 17(5):481-491.
- [3] 杨春, 历建芝, 朱效茹, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(2):173-176.
- [4] 何宇婷, 黄彬, 等. 耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(3):206-210.
- [5] 王淋荆, 曾建明, 鲁洋, 等. 中药对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵的作用机制研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(6):401-407.
- [6] 闫玉兰, 郭世辉, 李萌, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(15):3650-3652.
- [7] 吴迪, 胡静仪, 张弢, 等. 2002-2011年医院病原菌分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(9):2096-2098.
- [8] Matthew JE, James K, David ML, et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(1):321-322.
- [9] Laurent P, Gunturu R, Sandrine B, et al. Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(2):934-936.
- [10] Rosemary S, Matthew JE, Martin DC, et al. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 42(6):352-356.
- [11] Xavier DE, Picao RC, Girardello R, et al. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil [J]. BMC Microbiol, 2010, 10(7):217-218.
- [12] Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. Risk factors for imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients [J]. J Hospital Infect, 2014, 6(2):26-27.
- [13] Liu Q, Li X, Li W, et al. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: A meta-analysis [J]. Sci Rep, 2015, 5(4):11715.
- [14] Alba B, Jessica B, Beatriz RB, et al. Characterisation of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from lower tract respiratory infections in a Spanish hospital [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 18(1):3318-3328.

(下转第140页)

泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布的研究

彭胡* 唐克彬 颜彪 邱厚兵 朱彬

[摘要] 目的 探讨泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布情况。方法 选取泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 120 例作为试验组,选取本地区健康汉族人群 108 例作为对照组,抽取 2 组对象的外周血 5 mL,提取基因组 DNA,并采用实时荧光定量 PCR 方法检测 *CYP2C19* 的基因型,分析 2 组对象的 *CYP2C19* 基因多态性分布。结果 试验组患者检测出 *CYP2C19* 的 6 种基因型,*1/*1 型(CC,CC),*1/*2 型(CC,TC),*1/*3 型(TC,CC),*2/*2 型(CC,TT),*3/*3 型(TT,CC),*2/*3 型(TC,TC)明显高于对照组($P<0.05$);检测出 *CYP2C19* 的 3 种代谢型,快代谢型,中间代谢型,慢代谢型明显高于对照组($P<0.05$)。结论 对泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布情况进行检测可以分析冠心病的发病情况,并为补充本地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布提供一定参考。

[关键词] 泸州地区;冠心病;PCI 治疗;*CYP2C19* 基因

Study of the distribution of *CYP2C19* gene polymorphism in patients with coronary heart disease treated with PCI in Luzhou area

PENG Hu*, TANG Kebin, YAN Biao, QIU Houbin, ZHU Bin

(Clinical Laboratory of Luzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Luzhou, Sichuan, China, 646000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the distribution of *CYP2C19* gene polymorphism in patients with coronary heart disease treated with PCI in Luzhou area. Methods A total of 120 patients treated with PCI in Luzhou area were enrolled as the experimental group. 108 healthy Han populations in the same area were selected as the control group. 5 mL of peripheral blood from 2 groups of subjects were collected. The genomic DNA was extracted and the genotype of *CYP2C19* was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The polymorphism of *CYP2C19* gene was analyzed in the 2 groups. Results The test group patients detected 6 genotypes of *CYP2C19*, *1/*1 (CC, CC), *1/*2 (CC, TC), *1/*3 (TC, CC), *2/*2 type (CC, TT), *3/*3 type (TT, CC), *2/*3 type (TC, TC) were significantly higher than the control group ($P<0.05$); *CYP2C19* was detected 3 Metabolic, fast metabolizing, intermediate metabolite, and slow metabolizing type were significantly higher than the control group ($P<0.05$). Conclusion The polymorphism distribution of *CYP2C19* gene in patients with coronary heart disease undergoing PCI in Luzhou area can be used to analyze the incidence of CHD and provide some reference for the polymorphism distribution of *CYP2C19* gene in patients with coronary heart disease.

[KEY WORDS] Luzhou area; coronary heart disease; PCI therapy; *CYP2C19* gene

基金项目:四川省泸州市科技计划项目[2017-S-46(1/2)];泸州市中医医院重点项目(2017-YJ001)

作者单位:四川省泸州市中医医院检验科,四川,泸州 646000

*通信作者:彭胡, E-mail:1330911697@qq.com

冠心病是常见的心血管疾病,当发生冠状动脉粥样硬化后就会使管腔出现狭窄、痉挛或阻塞,进而导致心肌缺血、缺氧或坏死,而出现心脏疾病^[1]。经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是治疗冠心病常见方法,具有一定的改善心肌的血流灌注效果。冠心病进行PCI治疗后患者的基因分布也是当前研究比较多的内容。通过CYP2C19代谢的药物主要有冠心病介入治疗药物中的氯吡格雷有关。氯吡格雷需要经过CYP2C19酶的代谢才会发挥作用,氯吡格雷抵抗主要与CYP2C19基因突变有关^[2]。在我国汉族人群中,CYP2C19基因多态性的主要的突变位点为CYP2C19*2(T-C)和CYP2C19*3(T-C),而携带CYP2C19*2/CYP2C19*3基因的患者与氯吡格雷抵抗的发生呈正相关^[3]。而且不同地区的冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布存在一定差异,关于泸州地区冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布未见详细报道,是否与我国汉族人群的CYP2C19基因分布一致需要对此进行分析,因此本研究对此进行研究,旨在说明泸州地区冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2018年11月泸州地区冠心病PCI治疗120例患者的CYP2C19基因多态性分布进行研究,作为试验组,纳入标准:①确诊为冠心病且接受PCI手术治疗;②年龄45~80岁;③CYP2C19基因资料齐全;④均为汉族无血缘关系。经过本医院伦理学并签订患者知情同意书。排除标准:①对阿司匹林和氯吡格雷有禁忌症的患者;②合并严重肝、肾等器官功能损害的患者;③凝血功能异常的患者;④既往有出血性病史的患者。选取本地区汉族健康人群108例,作为阴性对照组,2组研究对象在一般资料方面无统计学意义($P>0.05$)。具体见表1。

1.2 试剂与仪器

全血基因组DNA提取试剂及CYP2C19基因检测试剂盒均由苏州旷远生物技术有限公司提供,DNA提取试剂包括缓冲液L1(提取核酸)、L2(提取核酸)、WA(提取核酸)、WB(纯化核酸)、TE(纯化核酸)、纯化柱(纯化核酸)、收集管(收集废液)。CYP2C19基因检测试剂盒包括质控品

表1 2组对象的一般资料比较

Table 1 comparison of general data for groups of objects

分组	性别 (男/女)	年龄 (岁)	胃肠病史 (有/无)
试验组(n=120)	68/52	63.2±22.5	55/65
对照组(n=108)	60/48	63.9±19.8	40/68
t/χ^2 值	0.029	0.158	1.810
P值	0.866	0.845	0.179

2G、2A、3G、3A、反应酶、特异性引物和探针、内参引物和探针。核酸扩增仪包括ABI7500和ABI stepone Plus。高速冷冻离心机(eppendorf 5424R)。金属浴,漩涡振荡器。

1.3 样本类型

采集受试者静脉全血2 mL,EDTA-K2抗凝。

1.4 方法

1.4.1 DNA提取

用移液器加300 μ L缓冲液L1到1.5 mL离心管中然后加入混匀后的全血样本400 μ L盖上管盖漩涡震荡30 s,加入L2缓冲液300 μ L剧烈颠倒混匀5次再漩涡震荡30 s,13 000 rpm离心2 min,将全部上清液吸入至核酸纯化柱中,盖上管盖12 000 rpm离心30 s(2 mL离心管收集滤液),弃废液后在核酸纯化柱中加入500 μ L缓冲液WA盖上管盖12 000 rpm离心30 s(2 mL离心管收集滤液),弃废液后在核酸纯化柱中加入600 μ L缓冲液WB盖上管盖12 000 rpm离心30 s(2 mL离心管收集滤液),弃废液后13 000 rpm离心2 min,弃2 mL离心管,将核酸纯化柱置于洁净的1.5 mL离心管中,悬空向纯化柱膜中央加入60 μ L 56℃预热的缓冲液TE,盖上管盖室温静置1 min。12 000 rpm离心30 s,将提取到的DNA -20℃保存6个月内备用。

1.4.2 CYP2C19基因多态性位点基因型检测

基于NCBI数据库,针对CYP2C19基因得到相关基因位点外显子序列,并设计相关外显子的引物^[4-5];各位点PCR引物序列如下:636T>C的上游引物为5'-AGGTAACCAGTTCTCA-3',下游引物为5'-GAATTGGATGGGCA-3',636 pb;681 C>A的上游引物为5'-TAGGGTTAGTCCCA-3',下游引物为5'-TTCCGGTTAACCGA-3',681 pb。然后用设计的引物序列对DNA进行PCR扩增。

1.4.3 PCR扩增

将试剂取出解冻后混匀并低速离心,在0.2

mL 扩增管中分别加入 23 μ L 2G、2A、3G、3A 4 种反应液,然后每管加入 1 μ L 酶,1 μ L 提取的 DNA 模板,配成 25 μ L 反应体系,瞬时离心后放入扩增仪扩增。扩增循环条件及荧光采集设置^[6]: 37 $^{\circ}$ C 2 min 去污染;95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 45 s, 10 个扩增循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s*, 65 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个扩增循环,在本轮循环中 56 $^{\circ}$ C 30 s*处设置 FAM 和 ROX 双通道采集荧光信号; 25 $^{\circ}$ C 1 min,扩增结束。每次试验时,4 种反应体系均做其对应质控品及空白对照检测快代谢型、中间代谢型和慢代谢型是根据细胞色素 P450 酶的代谢的程度而分型^[7]。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行分析, *CYP2C19* 基因分布频率采用例数+百分比(n%)表示,并进行卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组对象的 *CYP2C19* 基因分布情况

具体结果见表 2,由表 2 可知试验组患者检测出 *CYP2C19* 的 6 种基因型,*1/*1 型(CC, CC), *1/*2 型(CC, TC), *1/*3 型(TC, CC), *2/*2 型(CC, TT), *3/*3 型(TT, CC), *2/*3 型(TC, TC)明显高于对照组($P < 0.05$)。

表 2 2 组研究对象的 *CYP2C19* 基因分布情况 [n(%)]

Table 2 Distribution of *CYP2C19* gene in the 2 group [n (%)]

分组	*1/*1 型	*1/*2 型	*1/*3 型	*2/*2 型	*3/*3 型	*2/*3 型
试验组(n=120)	45(37.5)	48(40.0)	8(6.7)	13(10.8)	2(1.7)	3(2.5)
对照组(n=108)	30(27.8)	38(35.2)	5(4.6)	7(6.5)	1(0.9)	1(0.9)
χ^2 值	6.598					
P 值	0.016					

2.2 2 组对象的 *CYP2C19* 基因代谢型分布情况

具体结果见表 3,由表 3 可知检测出 *CYP2C19* 的 3 种代谢型,快代谢型,中间代谢型,慢代谢型明显高于对照组($P < 0.05$)。

表 3 2 组研究对象的 *CYP2C19* 基因代谢型分布情况 [n(%)]

Table 3 Distribution of metabolic patterns of *CYP2C19* gene in the 2 group [n(%)]

分组	快代谢型	中间代谢型	慢代谢型与
试验组(n=120)	45(37.5)	54(45.0)	21(17.5)
对照组(n=108)	30(27.8)	38(35.2)	5(4.6)
Mann-Whitney U 检验值	6.874		
P 值	0.015		

3 讨论

细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)是人体内主要的药物代谢酶系,主要存在于肝脏微粒体中,其中 *CYP2C19* 是一种重要的药物代谢酶,参与多种药物的体内代谢^[8]。目前已发现的在人群中 *CYP2C19* 基因多态性涉及到 25 个位点,其中可以导致氯吡格雷疗效减弱的*2 和*3 等位基因,

这在亚洲人中最为常见,而且在我国的汉族比较常见。但是维族冠心病患者 *CYP2C19* 基因型及等位基因分布与汉族存在明显不同^[9]。泸州地区大部分冠心病患者为汉族,因此本研究主要涉及的患者均为汉族,不对其他少数民族进行分析。

泸州地区属于四川省,该地区冠心病患者进行 PCI 治疗的患者比较多,而 PCI 治疗后容易发生不良心血管疾病,但是关于冠心病 PCI 治疗后发生不良事件的原因分析没进行基因方面的研究。有研究^[10]显示冠心病 PCI 治疗后患者存在 *CYP2C19* 基因多态性,而且检测出的 6 个 *CYP2C19* 基因型与冠心病 PCI 治疗中的药物有关。其中研究比较多的药物是氯吡格雷,已经被广泛的应用于冠心病 PCI 治疗中,而药效发挥需要 *CYP2C19* 酶的作用下有效^[10],因此需要对此研究。对泸州地区的冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布的研究未见详细报道,因此本研究的结果对泸州地区冠心病的研究具有一定意义。

赵连爽^[11]等人对沈阳地区冠心病患者氯吡格雷药物代谢相关 *CYP2C19* 基因多态性分布进行研究,研究结果显示沈阳地区冠心病拟行 PCI 治疗患者中约 60%携带 *CYP2C19**2、*3 功能缺失基因,而且与患者的性别和年龄无关。本研究的结果与此

研究结果基本一致。孙亚勤等人^[12]对北京地区汉族冠心病患者 *CYP2C19* 基因多态性进行研究, 研究结果显示北京地区汉族冠心病患者携带 *CYP2C19* 基因中间代谢型最多, 氯吡格雷抵抗的患者携带慢代谢型基因型未存在氯吡格雷抵抗的患者高, 氯吡格雷抵抗的患者发生支架内血栓事件率显著高于未存在氯吡格雷抵抗的患者。本研究结果与此研究结果不同, 可能的原因是在分组方面存在一定的不同, 进而导致结果不同。李琳等人对武汉地区汉族冠心病患者 *CYP2C19* 基因多态性进行研究, 研究结果显示武汉地区冠心病患者中, *CYP2C19* 基因存在多态性, 而 *CYP2C19* 基因类型分布及代谢型分布与国内其他地区(北京、河南)的结果一致^[13]。本研究的结果说明了泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布与我国汉族冠心病 PCI 治疗患者基本一致。这说明了汉族患者无论在哪个地区, *CYP2C19* 基因多态性分布基本一致。本研究的结果与南京及周边地区^[14]、云南汉族地区^[15]等关于冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布情况基本一致。这也说明了我国汉族均存在冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性, 而且分布情况基本一致。但是均比健康人群存在一定差异, 这为进一步研究冠心病的治疗提供一定参考。

本次研究对泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布进行分析, 结果表明了汉族各省的冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布情况基本一致, 这也说明了我国汉族冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布情况基本相同。

综上所述, 对泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布情况进行检测可以分析冠心病的发病情况, 并对补充本地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布提供一定参考。

参考文献

- [1] 范超, 张燕, 何建维, 等. 重庆地区冠心病介入治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布[J]. 重庆医学, 2016, 45(11): 1549-1551.
- [2] 吴干斌, 周建华, 刘科兰. 河南汉族冠心病患者 *CYP2C19* 基因多态性分布[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(4): 568-571.
- [3] 张琳, 马旭, 王燕, 等. *CYP2C19* 基因多态性及代谢表型在 604 例老年冠心病患者中的分布[J]. 心肺血管病杂志, 2015, 34(12): 887-889.
- [4] 胡暉臣, 于学会, 李艳华, 等. *CYP2C19** 2 基因多态性、血瘀证与氯吡格雷抵抗、PCI 术预后的相关性研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(15): 2173-2175.
- [5] YANG Y, LEWIS JP, HULOT JS, et al. The pharmacogenetic control of antiplatelet response: candidate genes and *CYP2C19* [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2015, 11(10): 1599-1617.
- [6] Lundstrom A, Laska AC, Von Arbin M, et al. Glucose intolerance and insulin resistance as predictors of low platelet response to clopidogrel in patients with minor ischemic stroke or TIA [J]. Platelets, 2014, 25(2): 102-110.
- [7] Hokimoto S, Tabata N, Akasaka T, et al. Gender differences in impact of *CYP2C19* polymorphism on development of coronary artery disease [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2015, 65(2): 148-152.
- [8] Akasaka T, Hokimoto S, Sueta D, et al. Sex differences in the impact of *CYP2C19* polymorphisms and low-grade inflammation on coronary microvascular disorder [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(11): H1494-1500.
- [9] 热依汗·依明, 帕丽达·阿布来提, 古丽扎尔·买买提明. 维吾尔族、汉族冠心病人群 *CYP2C19* 基因多态性分析[J]. 心血管康复医学杂志, 2014, 23(2): 127-130.
- [10] WANG XQ, SHEN CL, WANG BN, et al. Genetic polymorphisms of *CYP2C19* 2 and *ABCB1* C3435T affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel in 401 patients with acute coronary syndrome [J]. Gene, 2015, 558(2): 200-207.
- [11] 赵连爽, 杨紫伟, 代娣, 等. 沈阳地区冠心病患者氯吡格雷药物代谢相关 *CYP2C19* 基因多态性分布分析[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(6): 754-756.
- [12] 孙亚勤, 杨胜利, 王亮. 北京地区汉族冠心病患者 *CYP2C19* 基因多态性的研究分析[J]. 心血管康复医学杂志, 2016, 25(3): 250-254.
- [13] 李琳, 李居怡, 王德昭, 等. 武汉地区 123 例冠心病患者 *CYP2C19* 基因多态性分布[J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(6): 60-63.
- [14] 吕园, 俞杨, 张秀梅, 等. 南京及周边地区冠心病患者 *CYP2C19* 基因多态性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(10): 1139-1143.
- [15] 张立国, 喻卓. *CYP2C19* 基因多态性与云南汉族人群冠心病的相关性研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(14): 1597-1600.

HBV DNA 高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价

余学高¹ 邓间开¹ 何小洪¹ 陈培松¹ 崔丹荔² 黄彬^{1*}

[摘要] 目的 对基于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) DNA 高敏检测试剂盒(以下简称高敏试剂)进行性能验证和临床应用评价。方法 根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制定的试剂盒性能评价标准,采用高敏试剂分别对 HBV 标准品、临床 HBV DNA 高、中、低值样本及阴性样本进行定量检测,评价高敏试剂的精密度、正确度、分析测量范围、临床可报告范围和最低检测限等指标。同时采用高敏试剂和 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48 高敏病毒载量系统检测 44 份乙型肝炎患者血清,进行方法学比较并分析高敏试剂与 COBAS 高敏检测系统的相关性。结果 高敏试剂检测高、中、低值标本的批内不精密度 s_r 分别为 0.069、0.085、0.059,室内不精密度 s_i 分别为 0.083、30.138、0.117。偏倚标准差为 0.25,小于厂家声明的偏倚标准差 0.45。分析测量范围广,在 25~(1.0×10^9) IU/mL 范围内成线性。样本的最大稀释度为 1:80,功能灵敏度为 10 IU/mL,临床可报告范围为 10~(8.0×10^{10}) IU/mL。最低检测限为 10 IU/mL,低于厂家声明的检测下限 20 IU/mL。高敏试剂与 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48 病毒载量系统的相关性好($y=0.9876x+0.1894$, $r=0.9754$, $P<0.05$)。结论 所评价的高敏试剂的精密度和正确度高,分析测量范围和临床可报告范围宽,最低检测限低,与 COBAS 高敏检测系统的相关性好,具有良好的临床应用价值。

[关键词] HBV-DNA; Pre-NAT 系统; 全自动核酸检测系统; 性能验证

Performance verification and clinical evaluation of HBV DNA high-sensitivity detection kit

YU Xuegao¹, DENG Jiankai¹, HE Xiaohong¹, CHEN Peisong¹, CUI Danli², HUANG Bin^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Medical Laboratory, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] Objective To verify performance and evaluate clinical application of HBV DNA high-sensitivity detection kit based on Pre-NAT automatic nucleic acid extraction system. Methods According to the kit performance evaluation standard developed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), high-sensitivity reagents were used to quantitatively detect HBV standards, clinical HBV DNA high, medium and low samples and negative samples. The precision, accuracy, analytical measurement range, clinical reportable range and minimum detection limit of high-sensitivity reagents were evaluated. At the same time, 44 serum samples of hepatitis B patients were detected by high-sensitivity reagent and COBAS AmpliPrep/

作者单位:1. 中山大学附属第一医院检验医学部,广东,广州 510080

2. 中山大学中山医学院医学检验系,广东,广州 510080

*通信作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

COBAS TaqMan 48 high-sensitivity viral load system, and the correlation between high-sensitivity reagent and COBAS high-sensitivity detection system were analyzed. **Results** The intra-assay imprecision sr of high-, medium-, and low-value specimens was 0.069, 0.085, and 0.059, respectively, and the indoor imprecision sl were 0.083, 30.138, and 0.117, respectively by HBV DNA high-sensitivity quantitative detection kit based on Pre-NAT system. The standard deviation of bias is 0.25, which is less than the manufacturer's stated standard deviation of 0.45. The analytical measurement range is wide and linear in the range of 25~(1.0×10^9) IU/mL. The maximum dilution of the sample is 1:80, the functional sensitivity is 10 IU/mL, and the clinical reportable range is 10~(8.0×10^{10}) IU/mL. The minimum detection limit is 10 IU/mL, which is below the manufacturer's stated lower limit of 20 IU/mL. The high-sensitivity reagent correlated well with the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48 viral load system ($y=0.9876x+0.1894$, $r=0.9754$, $P<0.05$). **Conclusion** The HBV DNA high-sensitivity detection kit based on Pre-NAT automatic nucleic acid extraction system has high precision and correctness. The analytical measurement range and clinical reportable range are wide, and the minimum detection limit is low. This system has a good correlation with COBAS high-sensitivity detection system and has good clinical application value.

[KEY WORDS] HBV-DNA; Pre-NAT system; automatic nucleic acid detection system; performance verification

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是严重的公共卫生问题。全球约有20亿人曾感染过HBV,其中超过10%为慢性HBV感染者^[1]。每年约有80万人死于HBV感染所致的相关疾病^[2]。HBV DNA定量检测在早期诊断HBV感染、判断疾病活动性、制定抗病毒治疗方案、治疗监测以及判断治疗终点中均起到重要作用^[3]。

近年来亚太肝病研究学会、欧洲肝病研究学会和我国发布的慢性乙型肝炎防治指南均推荐用高敏检测方法检测HBV DNA载量,前两者发布的指南明确要求检测方法的灵敏度应达到10~15 IU/mL^[4-5]。而目前国内各单位常用的HBV DNA定量检测方法的灵敏度在100~1000 IU/mL之间,不能很好地满足临床对慢性乙肝患者管理的要求。因此,应采用高灵敏度的HBV DNA试剂对患者血清/血浆中的HBV DNA进行检测,以满足临床对慢性乙肝治疗监测和判断治疗终点等的需要。Pre-NAT全自动核酸检测系统采用磁珠法进行HBV核酸提取、纯化,采用转移磁珠、防倒吸、尿嘧啶N糖基化酶-脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(uracil N glycosylase - deoxyuridine nucleoside triphosphate, UNG-dUTP)等有效防污染措施,结合HBV DNA高敏定量检测试剂对血清/血浆中的HBV DNA进行定量检测。本研究对基于Pre-NAT系统的HBV DNA高敏定量检测试剂盒进行方法学性能验证与临床检测性能评价。

1 材料与方法

1.1 标准品

定值高浓度HBV假病毒颗粒(7.5×10^{10} IU/mL)由美国Perkin Elmer医学诊断事业部上海浩源公司提供。

1.2 临床样本

收集2018年5月至7月间在中山大学附属第一医院检测的HBV DNA高值样本和阴性样本,用于制备高/中/低值混合血清。收集慢性乙型肝炎患者血清64份,涵盖不同的病毒载量范围。

1.3 仪器与试剂

Pre-NAT全自动核酸提取仪由美国Perkin Elmer公司提供,COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48病毒载量系统购自瑞士罗氏公司,ABI ViiA7型荧光定量PCR仪购自美国Life Technologies公司,低温高速离心机购自德国Eppendorf公司;HBV DNA高敏检测试剂盒由美国Perkin Elmer医学诊断事业部上海浩源公司提供,其说明书声明的灵敏度为20 IU/mL,线性范围为20~(1.0×10^9) IU/mL;COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV核酸检测试剂盒购自瑞士罗氏公司,其说明书声明的灵敏度为20 IU/mL,线性范围为20~(1.7×10^8) IU/mL。

1.4 方法

1.4.1 精密度评价

参考EP15-A2^[6]文件。每天重复检测高(10^8

IU/mL)、中(10^5 IU/mL)、低(10^3 IU/mL)3个水平的混合血清各5次、连续测5天,由公式①计算批内不精密度(within-run imprecision, s_r),由公式②计算室内不精密度(within-laboratory imprecision, s_1),并分别与由公式③、公式④计算得出的厂家声明的批内标准偏差(performance claim repeatability standard deviation, σ_r)和厂家声明的室内标准偏差(manufacturer's claim of laboratory required standard deviation, σ_1)进行比较,若小于厂家提供的标准偏差,结果可以接受。若大于厂家提供的标准偏差,则进行统计学分析。

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}} \quad (1)$$

$$s_1 = \sqrt{\frac{n-1}{n} \times s_r^2 + s_b^2} \quad S_b = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D-1}} \quad (2)$$

$$\sigma_r = CV_r \bar{\bar{x}} \quad (3)$$

$$\sigma_1 = CV_1 \bar{\bar{x}} \quad (4)$$

s_r :批内不精密度; s_1 :室内不精密度; D :实验天数; n :实验次数; S_b :批间不精密度; $\bar{\bar{x}}$:总均值; σ_r :厂家声明的批内标准偏差; σ_1 :厂家声明的室内标准偏差; CV_r :厂家声明的批内变异系数; CV_1 :厂家声明的室内变异系数。

1.4.2 正确度评价

参考EP15-A2^[6]文件。收集乙型肝炎患者血清20份,每天分别用高敏检测试剂和COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan系统检测,每天检测5个样本,连续测4天,由公式⑤计算偏倚标准差(standard deviation of bias, $S_{\bar{b}}$),并与厂家声明的偏倚进行比较。

$$S_{\bar{b}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (b_i - \bar{b})^2}{n-1}} \quad (5)$$

$S_{\bar{b}}$:偏倚标准差; b_i :试验方法结果; i -比较方法结果; \bar{b} :平均偏倚; n :实验次数。

1.4.3 分析测量范围(analytical measurement range, AMR)评价

参考EP6-A^[7]。将定值高浓度标准品(7.5×10^{10} IU/mL)用HBV阴性血清作系列稀释,稀释后HBV DNA浓度分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、50、25、20、10、5、2.5 IU/mL,与阴性质控品一同重复检测3次。采用平均斜率法进行线性

评价。

1.4.4 临床可报告范围(clinical reportable range, CRR)评价

参考EP6-A^[7]。选择浓度在厂家说明书声明的分析测量范围内的高值标本5份,用阴性血清分别进行1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640稀释并检测,根据预期值和实测值计算稀释回收率,回收率在90%~110%为合格,确定最大稀释度。将定值高浓度标准品(7.5×10^{10} IU/mL)系列稀释为100、50、25、20、10、5 IU/mL并进行检测,连续检测6天,每天检测1次,计算重复检测变异系数(coefficient of variation, CV),得出功能灵敏度(即日间重复测量时变异系数为20%的检测限)。结合功能灵敏度、分析测量范围及最大稀释度确定临床可报告范围。

1.4.5 最低检测限评价

参考EP17-A^[8]。将定值高浓度标准品(7.5×10^{10} IU/mL)用HBV阴性血清系列稀释为100、50、25、20、10、5、2.5 IU/mL并进行检测,重复检测6次,计算HBV DNA检出率及与理论值的偏倚。

1.4.6 仪器间比对及相关性评价

参考EP9-A2^[9]。选取临床慢性乙肝患者血清样本44份,样本浓度尽量覆盖试剂盒的线性检测范围,分别用高敏试剂和COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan系统检测,分析2种方法的相关性。

1.5 统计学分析

采用Microsoft Excel 2010和MedCalc等软件进行统计学分析。计算计量资料的均数、方差、标准差和CV,线性范围采用平均斜率法,2种定量检测结果比对采用Deming回归分析相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

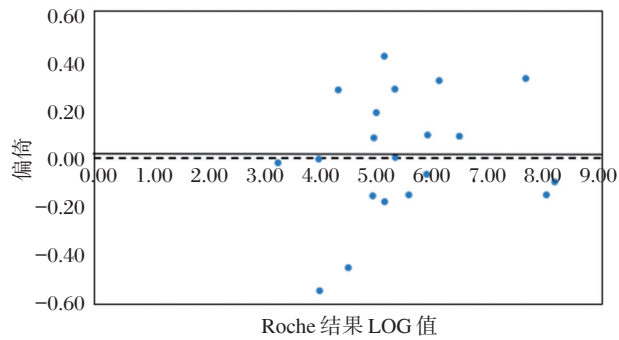
2.1 精密度评价

批内精密度:高、中、低值标本的批内不精密度 s_r 分别为0.069、0.085、0.059,均分别小于厂家声明的标准差 σ (0.799、0.592、0.398)。室内精密度:高、中、低值标本的室内不精密度 s_1 分别为0.083、0.138、0.117,均分别小于厂家声明的标准差 σ (0.799、0.592、0.398)。

2.2 正确度评价

采用高敏试剂和COBAS AmpliPrep/COBAS

TaqMan 检测系统同时检测 20 例患者标本, 所得结果作偏倚图(见图 1), 可知 2 种检测方法的结果一致, 偏倚标准差 (standard deviation of bias, S_b) 为 0.25 lg 值, 小于厂家声明的偏倚 0.45 lg 值。



实线为实际平均偏倚(0.011 g), 虚线为理想平均偏倚(0)。

图 1 高敏试剂和 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 检测系统检测结果的偏倚图

Figure 1 Bias diagram of the results of high sensitivity test kit and COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan Detection system

2.3 分析测量范围评价

对各梯度浓度测量结果做平均斜率法以验证分析测量范围。计算各组测量结果的变异系数 CV, 与厂家声明的精密度(10%)比较。以预期浓度 lg 值为 X, 测量浓度均值 lg 值为 Y, 做散点图(图 2), 为直线关系, 然后作直线回归。回归方程为 $y=1.0277x-0.082$, 斜率 $b_1=1.0277$, 在 0.97~1.03 之间, 截距 $b_0=0.082$, $r^2=0.9996$ 。该方法在实验所涉及的浓度范围内 25~(1.0×10^9) IU/mL 成线性。

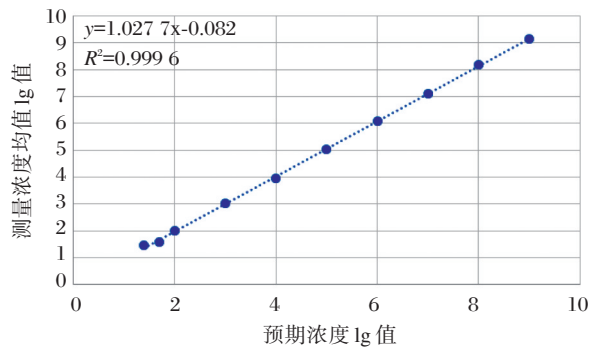


图 2 HBV DNA 定量预期值和测量均值散点图

Figure 2 HBV DNA quantitative expected value and measured mean scattered plot

2.4 临床可报告范围评价

2.4.1 回收率及最大稀释度

对 3 个标本的原血清和各稀释度血清进行检测后, 计算稀释回收率: 稀释回收率=(实测值/预期值) $\times 100\%$, 回收率在 90%~110% 为合格, 得出最大稀释度为 1:80。

2.4.2 功能灵敏度

对各浓度的样本重复检测 6 次, 计算 CV, 10 IU/mL 浓度组的 CV 为 18.10%, 小于 20%, 符合厂家声明的功能灵敏度(20 IU/mL)。

2.4.3 临床可报告范围

临床可报告范围上限为分析测量范围上限乘以最大稀释度, 结合上述实验得到的功能灵敏度 10 IU/mL, 高敏试剂的临床可报告范围为 10~(8.0×10^{10}) IU/mL。

2.5 最低检测限评价

高敏试剂对 100、50、25、20、10、5 IU/mL 6 个浓度水平样本的检出率均为 100%, 2.5 IU/mL 浓度水平检出率为 66.67%, 最低检测限为 5 IU/mL, 符合厂家声明的检测下限(20 IU/mL)。

2.6 仪器间比对及相关性评价

将 44 份慢性乙肝患者血清样本同时用高敏试剂和 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 系统检测, 对测定结果做 Deming 回归分析, 回归方程为 $y=0.9876x+0.1894$, 相关系数 $r=0.9754$ ($P<0.05$), 可知高敏试剂和 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 检测系统的相关性好, 结果见图 3。

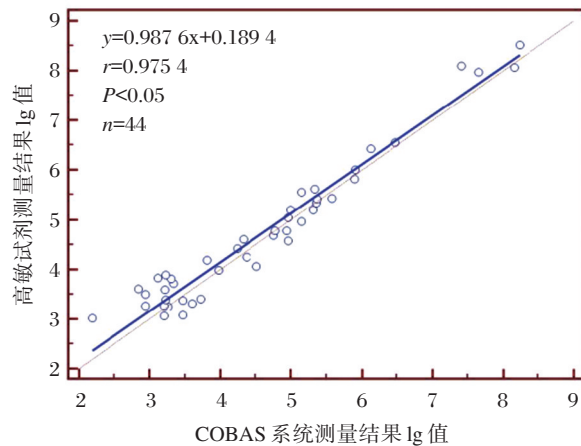


图 3 Deming 线性回归图

Figure 3 Deming linear regression diagram

3 讨论

HBV感染的病原学诊断方法目前主要有免疫学方法检测HBV的血清学标志物和分子生物学方法检测HBV核酸^[10-11]。免疫学方法检测病毒抗原或抗体仅提供HBV感染的间接证据,其出现晚于HBV DNA的出现,且在病毒感染的窗口期不能检测到抗体,这在很大程度上限制了免疫学方法的应用^[12]。采用分子生物学方法检测HBV DNA,可为早期诊断HBV感染、判断病毒复制程度、进行HBV基因分型及耐药性检测等提供更多的信息^[13-16]。荧光定量PCR法定量检测HBV DNA,能准确地反映HBV DNA的复制水平,在治疗监测、判断治疗终点等中有重要的应用价值^[17-18]。最新国际和国内的乙型肝炎防治指南推荐使用高敏检测方法检测HBV DNA,以帮助判断治疗终点。如亚太肝病研究学会建议,对于应用核苷酸类药物治疗的HBeAg阳性者,当HBeAg发生血清学转换,且HBV DNA至少12个月低于检测水平(10~15 IU/mL)时,可考虑停药^[4-5]。我国药物监督管理局在2013年《乙型肝炎病毒DNA定量检测试剂注册申报资料技术指导原则》中将HBV DNA的最低检测限定为不大于30 IU/mL^[19]。高敏HBV DNA定量检测在临床中的作用越来越重要,未来将逐步取代传统低敏试剂检测^[20]。

区别于传统的手工提取核酸方法,Pre-NAT全自动核酸提取系统可自动进行核酸提取、扩增前PCR反应体系构建等全过程,所需的人工操作仅为样本与试剂的准备和摆放。Pre-NAT系统分为4大模块,包括样本加载、试剂分装、核酸提取和PCR体系构建等模块。其采用独家专利的聚乙烯醇磁珠,在低盐环境下展现出对DNA的独特吸附能力,对蛋白的结合非常弱,并且转移磁珠的方法减少了液体或气溶胶暴露而产生的污染,保证了核酸提取的得率、纯度、安全性和稳定性。另外,Pre-NAT系统还具有样本通量大(96)、满通量处理时间较短(140 min)、样本用量少和紫外灯防污染等特点,能够很好地提高实验效率和质量,节约劳动力,减少手工操作带来的污染和误差。

本研究主要参考CLSI的EP6-A、EP9-A2、EP15-A2和EP17-A等文件^[6-9],对基于Pre-NAT全自动核酸提取系统的HBV DNA高敏定量检测试

剂盒进行性能验证。本研究得到的数据显示:高、中、低值标本的批内不精密度 s_r 和室内不精密度 s_i 均分别小于厂家声明的标准差 σ ,表明精密度通过验证,可以在临床应用。实验室对正确度的评价过程实际上就是偏倚计算的过程,根据检测数据计算得出的偏倚小于厂家声明的偏倚,表明该实验方法得到的偏倚满足要求,正确度通过验证。本研究采用平均斜率法回归分析进行分析测量范围(AMR)的评价,根据统计结果得知预期值与测量值之间相关性较好,且在25~1.0×10⁹ IU/mL内成线性,与厂家声明的线性范围20~(1.0×10⁹) IU/mL相较,AMR下限不符合厂家声明,考虑可能是由高值标准品稀释到相应低浓度水平引起的误差,需要后续补充试验进一步验证。高敏试剂盒检测下限为25 IU/mL,与罗氏COBAS系统检测灵敏度(20 IU/mL)几乎相当,比目前国内常用HBV定量试剂盒更灵敏,达到2013年国家食品药品监督管理总局技术评审中心提出的HBV DNA最低检测限应小于30 IU/mL的要求^[19]。本研究主要设计了两方面实验以验证Pre-NAT系统的临床可报告范围(CRR),包括最大稀释度的确定和功能灵敏度的验证。最大稀释度的确定主要通过计算回收率,依据结果可知1:160稀释度组的回收率已超过合格范围,因此选择1:80作为最大稀释度,其乘以AMR上限即为CRR上限。因此本实验得到的功能灵敏度为10 IU/mL,低于厂家声明的功能灵敏度20 IU/mL。由最低检测限实验结果可见,5 IU/mL浓度水平及以上的检出率均为100%,符合厂家声明的检测下限(20 IU/mL)。方法学比对中选择COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48病毒载量系统作为比较方法,选用Deming线性回归分析法,使用统计软件得出回归方程为 $y=0.987 6x+0.189 4$, $r=0.975 4$, $(P<0.05)$,可知两者相关性较好,说明2种方法的结果具有可比性。另外,本研究未涉及Pre-NAT系统及该试剂盒抗干扰能力的评价,期待后续实验补充完善。

综上所述,对基于Pre-NAT全自动核酸提取系统的HBV DNA高敏定量检测试剂盒的精密度、正确度、分析测量范围、临床可报告范围、最低检测限及方法学比对等性能进行验证,均表现良好,与厂家声明基本一致,达到了应用于临床的要求,也为分子生物学检验实现自动化作出了贡献。

参考文献

- [1] 应盛,董飞波,孙毅,等. COBAS TaqMan 系统检测血清 HBV-DNA 的临床价值探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(2):305-308.
- [2] 王创俊,王庆,曹治家,等. NGS 检测乙型肝炎病毒耐药基因突变情况及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(1):28-32.
- [3] 张春娇,仲崇明. 核酸免提取 HBV-DNA 检测方法性能评价[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(4):513-515.
- [4] Liaw YF, Kao JH, Piratvisuth T, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update [J]. *Hepatol Int*, 2012, 6(3):531-561.
- [5] EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(1):167-185.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: approved guideline-second edition [S]. EP15-A2, CLSI, 2005.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. approved guideline [S]. CLSI documents EP6-A. Wayne, PA: CLSI, 2003.
- [8] Moretti M, Sisti D, Rocchi MB, et al. CLSI EP17-A protocol: a useful tool for better understanding the low end performance of total prostate-specific antigen assays [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(11-12):1143-1145.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline - second edition [S]. CLSI documents EP9-A2. Wayne, PA: CLSI, 2002.
- [10] 吕允凤. 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂性能评价要点[J]. 中国药事, 2013, 27(10):1072-1074.
- [11] 高春芳,吴孟超. 乙型肝炎病毒感染标志物的检测现状和思考[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(3):145-147.
- [12] 张辉,吴冬生,方敏,等. 荧光定量 PCR 法与酶联免疫吸附法在乙型肝炎病毒检测中的应用[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(11):1459-1461.
- [13] 齐林,刘永芳. 乙型肝炎病毒 DNA 与血清标志物的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(1):130-131.
- [14] 张宇,李冬,戴燕,等. 罗氏 LightCycler Nano 荧光定量 PCR 仪性能评价[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(2):145-146.
- [15] 秦绪珍,孙江燕,韩建华,等. COBAS Taqman HBV DNA 的方法学验证[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1):29-31.
- [16] 庞志宇,谢在春,刘玥,等. HBV-DNA 定量检测试剂盒性能验证[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(17):2530-2532.
- [17] 林健聪,王红翠,吴英松,等. 乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1):47-55.
- [18] 柳直英,哈斯朝鲁. 一种乙型肝炎病毒-DNA 实时荧光定量聚合酶链反应试剂的质量评价[J]. 实用医技杂志, 2018, 25(8):826-829.
- [19] 药监总局通告[2013]3号. 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0087/811119.html>, 2013-05-17.
- [20] Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. COBAS AmpliPrep - COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) test: a novel automated real-time PCR assay for quantification of HBV DNA in plasma [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3):828-834.

左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者 Treg/Th17 细胞、血清炎症因子和肾功能指标的影响

鲁冰^{1*} 任东升¹ 梁明²

[摘要] 目的 探究左卡尼汀联合尿毒症血液透析对尿毒症患者调节性T细胞(Treg)/辅助性T细胞17(Th17)细胞、血清炎症因子及肾功能指标的影响。方法 将2016年6月至2018年7月河南省南阳市中心医院收治的80例尿毒症患者随机分为观察组和对照组,各40例。对照组给予普通血液透析治疗,观察组给予左卡尼汀联合血液透析治疗,比较2组治疗前后Treg/Th17细胞水平、营养指标、炎症因子[白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-17(IL-17)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超敏C-反应蛋白(hs-CRP)]、肾功能指标[肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、24 h尿蛋白定量]变化,并统计并发症发生情况。结果 治疗后观察组Treg细胞、Th17细胞、Treg/Th17细胞水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后观察组营养指标改善情况显著优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后观察组IL-6、IL-17、TNF- α 、hs-CRP、SCr、BUN、24 h尿蛋白定量水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);且观察组并发症发生率12.50%(5/40)显著低于对照组32.50%(13/40),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 外源性补充左卡尼汀可帮助血液透析尿毒症患者维持较好的营养状态,改善机体微环境、免疫功能及炎症反应,减轻肾功能损伤,且安全性良好。

[关键词] 左卡尼汀;血液透析;Treg/Th17;营养状态;炎症因子;肾功能

Effects of L-carnitine combined with hemodialysis on Treg/Th17 cells, serum inflammatory factors and renal function indexes in uremia patients

LU Bing^{1*}, REN Dongsheng¹, LI Ming²

(1. Department of Nephrology, Rheumatology and Immunology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of Nephrology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effects of L-carnitine combined with hemodialysis on regulatory T cell/ helper T cell 17 (Th17) cells, serum inflammatory factors and renal function indicators in uremia patients. Methods 80 uremia patients admitted to Nanyang Central Hospital, Henan, Province from June 2016 to July 2018 were randomly divided into observation group and control group, 40 cases each. The control group was given normal hemodialysis treatment, while the observation group was treated with hemodialysis and L - carnitine. The Treg/Th17 cell levels, nutritional indicators, inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6), Interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α), hypersensitive C-reactive

基金项目:河南省自然科学基金资助项目(0611044800)

作者单位:1.河南省南阳市中心医院肾病风湿免疫科,河南,南阳 473000

2.上海交通大学医学院附属新华医院肾脏风湿免疫科,上海 200092

*通信作者:鲁冰, E-mail: 12027779@qq.com

protein (hs-CPR)], and renal function indicators [serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), 24 h urine protein quantitation] changes in the 2 groups before and after treatment were compared, and the incidence of complications was statistically analyzed. **Results** After treatment, the levels of Treg cells, Th17 cells and Treg/Th17 cells in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The improvement of nutritional indicators in the observation group was significantly better than that in the control group ($P<0.05$). The levels of IL-6, IL-7, TNF- α , hs-CPR, SCr, BUN and 24 h urine protein in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The incidence of complications in the observation group was 12.50% (5/40), which was significantly lower than that in the control group [32.50% (13/40)] ($P<0.05$). **Conclusion** Exogenous supplementation of L-carnitine can help uremia patients undergoing hemodialysis maintain good nutritional status, improve the microenvironment, immune function and inflammatory response, reduce renal damage, and have good safety.

[KEY WORDS] L-carnitine; Hemodialysis; Treg/Th17; Nutritional status; Inflammatory factors; Renal function

尿毒症在肾内科常见,是肾脏疾病发展至晚期的终末阶段,发病率、致死率高。目前医疗水平尚无法经药物治愈尿毒症,多采用血液透析或肾脏移植,以减轻患者肾脏代谢负担,维持患者生命^[1-2]。但血液透析为侵入性操作,且多数患者由于摄食不足,内源性左卡尼汀合成较少,导致血液透析过程中易出现营养不良、心功能受损等并发症,进而影响患者免疫功能,加剧机体炎症反应及肾功能损伤,增加疾病死亡率^[3]。补充外源性左卡尼汀可辅助改善尿毒症血液透析患者代谢异常及炎症状态^[4]。本研究旨在探究左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者调节性T细胞(Regulatory T cell, Treg)/辅助性T细胞17(T helper T cell 17, Th17)、血清炎症因子及肾功能指标的影响,以期对尿毒症患者的临床治疗提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

筛选2016年6月至2018年7月河南省南阳市中心医院收治的80例尿毒症患者。纳入标准:①确诊为尿毒症;②病情稳定,行血液透析治疗时间 ≥ 3 个月;③患者及其家属知情同意。排除标准:①心脑血管疾病;②药物引起的肾脏损害;③合并感染、恶性肿瘤及精神障碍;④重度营养不良。根据随机数表法分为观察组和对照组,各40例。观察组男27例,女13例;年龄27~68岁,平均(48.73 \pm 6.21)岁;原发病:肾小球肾炎19例,糖尿病肾病9例,高血压肾病5例,多囊肾病4例,其他3例。对照组男30例,女10例;年龄29~

70岁,平均(50.04 \pm 8.02)岁;原发病:慢性肾小球肾炎18例,糖尿病肾病11例,高血压肾病4例,多囊肾病5例,其他2例。2组性别、年龄及原发病比较无显著差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法

1.2.1 血液透析

对照组给予普通血液透析治疗,采用德国费森4008S型血液透析机,一次性聚砜膜透析器(德朗B-16P),标准碳酸氢盐透析液,血流量200~300 mL/min,透析液流量500 mL/min,常规肝素抗凝,透析时间4 h/次,3次/周,治疗期间常规给予静脉补充铁剂、口服叶酸、维生素等。

1.2.2 左卡尼汀治疗

观察组除给予普通血液透析治疗外,于每次透析结束前联合左卡尼汀治疗,将2 g左卡尼汀注射液(常州兰陵制药有限公司,国药准字H20000543)加入到20 mL 0.9%氯化钠溶液中稀释,静脉缓慢注射2~3 min。治疗疗程3个月。

1.3 观察指标

1.3.1 主要仪器与试剂

EPICS XL2流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特有限公司,7600-020全自动生化分析仪购自日本株式会社日立制作所,VIDAS荧光免疫分析仪购自法国生物梅里埃股份有限公司,BC-5390全自动血细胞分析仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3.2 Treg/Th17细胞水平检测

于治疗前和治疗3个月后各采集2组晨间空

腹肝素抗凝外周静脉血 3 mL, 采用 Ficoll 淋巴细胞分离液梯度离心分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 以 1640 培养液混悬制调整至浓度为 3×10^6 个/mL, 采用流式细胞仪检测 Treg 和 Th17 细胞比例。将 PBMCs 细胞混悬液滴加至 24 孔板, 每孔加 50 mg/mL PMA、1 μ mol/L 离子霉素和 500 ng/mL 模能霉素, 37°C CO₂ 培养箱培养 4 h, 离心(1 500 r/min, 10 min), PBS 冲洗, 室温避光孵育 20 min, 采用 PerCP 标记抗 CD4 抗体, FITC 标记抗 CD25 抗体, 对细胞表面染色, 固定透化后加入 PE 标记抗 Foxp3 抗体与 FITC 标记抗 IL-17 抗体, 4°C 避光孵育 30 min, 上机检测, 分析结果。

1.3.3 实验室指标检测

于治疗前和治疗 3 个月后各采集 2 组晨间空腹肝素抗凝外周静脉血 3 mL, 检测以下指标。

①营养指标: 使用全自动血细胞分析仪检测血红蛋白(hemoglobin, Hb)、血浆总蛋白(total plasma protein, TP)、白蛋白(albumin, Alb)、前白蛋白(pre-albumin, PA)水平。②炎症因子: 使用酶联免疫吸附法检测血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、

白细胞介素-17(Interleukin-17, IL-17)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及超敏 C-反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)水平。③肾功能指标: 检测血清肌酐(serum creatinine, SCr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)。同时收集 24 h 尿液, 检测 24 h 尿蛋白定量。

1.3.4 并发症统计

统计 2 组并发症发生情况, 包括低血压、心脏病变、肌肉痉挛及乏力。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件处理数据, 计数资料以 n (%)表示, 行 χ^2 检验; Treg/Th17 细胞水平、营养指标、炎症因子及肾功能指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Treg/Th17 细胞水平比较

治疗前 2 组 Treg/Th17 细胞水平比较无显著差异($P > 0.05$); 治疗后观察组 Treg 细胞、Th17 细胞、Treg/Th17 细胞水平均显著低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 2 组治疗前后 Treg/Th17 细胞水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of Treg/Th17 cell levels between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	Treg 细胞(%)	Th17 细胞(%)	Treg/Th17 细胞
观察组 ($n=40$)	治疗前	7.25 \pm 1.84	36.22 \pm 8.46	0.20 \pm 0.08
	治疗后	2.18 \pm 1.50*	13.38 \pm 6.44*	0.16 \pm 0.04*
对照组 ($n=40$)	治疗前	7.33 \pm 2.05	36.10 \pm 8.20	0.21 \pm 0.07
	治疗后	4.26 \pm 2.78 $^{\Delta}$	23.15 \pm 7.05 $^{\Delta}$	0.18 \pm 0.05 $^{\Delta}$

与治疗前比较, * $P < 0.05$; 与观察组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

2.2 营养指标比较

治疗前 2 组营养指标比较无显著差异($P > 0.05$); 治疗后观察组 PA、Hb、TP、Alb 营养指标改

善情况均显著优于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 2 组治疗前后营养指标比较($\bar{x} \pm s$, g/L)

Table 2 Comparison of nutritional indicators between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	时间	PA	Hb	TP	Alb
观察组 ($n=40$)	治疗前	0.24 \pm 0.08	58.27 \pm 3.94	61.82 \pm 4.71	27.38 \pm 2.24
	治疗后	0.33 \pm 0.12*	75.61 \pm 5.07*	71.22 \pm 4.28*	38.98 \pm 3.26*
对照组 ($n=40$)	治疗前	0.23 \pm 0.05	57.73 \pm 2.59	61.22 \pm 5.12	27.66 \pm 2.35
	治疗后	0.27 \pm 0.07 $^{\Delta}$	69.33 \pm 3.74 $^{\Delta}$	66.89 \pm 5.49 $^{\Delta}$	32.10 \pm 3.41 $^{\Delta}$

与治疗前比较, * $P < 0.05$; 与观察组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

2.3 血清炎症因子比较

治疗前2组炎症因子比较无显著差异($P>0.05$);治疗后观察组IL-6、IL-17、TNF- α 、hs-CPR

水平均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表3 2组治疗前后血清炎症因子比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of serum inflammatory factors between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	IL-6 (ng/L)	IL-17 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	hs-CPR (mg/L)
观察组 (n=40)	治疗前	25.82 \pm 3.72	37.87 \pm 4.56	40.85 \pm 8.94	7.21 \pm 2.84
	治疗后	19.94 \pm 3.12*	20.98 \pm 3.24*	30.69 \pm 9.17*	4.52 \pm 1.67*
对照组 (n=40)	治疗前	26.23 \pm 3.48	38.27 \pm 4.49	41.10 \pm 8.20	7.52 \pm 2.62
	治疗后	23.45 \pm 3.71 [△]	25.36 \pm 3.62 [△]	36.87 \pm 9.37 [△]	5.73 \pm 2.10 [△]

与治疗前比较,* $P<0.05$;与观察组比较,[△] $P<0.05$ 。

2.4 肾功能指标比较

治疗前2组肾功能指标比较无显著差异($P>0.05$);治疗后观察组SCr、BUN、24 h尿蛋白定量

水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表4。

表4 2组治疗前后肾功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of renal function indicators between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	SCr (mmol/L)	BUN (mmol/L)	24 h尿蛋白定量 (g/24 h)
观察组 (n=40)	治疗前	428.90 \pm 35.34	24.65 \pm 2.66	3.46 \pm 0.82
	治疗后	316.29 \pm 20.05*	14.93 \pm 2.16*	0.87 \pm 0.33*
对照组 (n=40)	治疗前	431.97 \pm 34.43	25.25 \pm 3.18	3.59 \pm 0.79
	治疗后	367.58 \pm 22.10 [△]	18.14 \pm 2.40 [△]	1.68 \pm 0.48 [△]

与治疗前比较,* $P<0.05$;与观察组比较,[△] $P<0.05$ 。

2.5 并发症比较

2组并发症主要表现为低血压、心脏病变、肌肉痉挛及乏力等,观察组并发症发生率为12.50%显著

低于对照组的32.50%,差异有统计学意义($P<0.05$),见表5。

表5 2组并发症比较[n(%)]

Table 5 Comparison of complications between the 2 groups [n(%)]

组别	n	低血压	心脏病变	肌肉痉挛	乏力	并发症
观察组	40	1(2.50)	0(0.00)	2(5.00)	2(5.00)	5(12.50)
对照组	40	2(5.00)	3(7.50)	5(12.50)	3(7.50)	13(32.50)
χ^2	-	0.346	3.117	1.409	0.213	4.588
P	-	0.556	0.078	0.235	0.644	0.032

3 讨论

肾脏是人体的主要排泄器官,通过清除体内

代谢废物及毒素,排出身体内的废物和多余水分。而尿毒症患者肾结构损害和纤维化,肾功能进行性下降导致其肾脏功能几乎完全丧失,毒素

在身体内大量蓄积,严重危害身体健康^[5]。血液透析是治疗尿毒症的常用方法,可滤除体循环内的大、中分子毒性物质,起到一定程度的肾脏替代作用,延长患者生存时间^[6]。临床应用中发现尿毒症患者肾功能损伤呈慢性、进行性、不可逆性加重,可导致多器官、多系统病理损伤,而长期血液透析治疗患者免疫功能低下,可诱发并加重炎症反应^[7-8]。王明波等^[9]学者认为该病理过程可能与获得性免疫及自主免疫调节机制减弱相关,但其具体发病机制目前尚未完全明确。

单核细胞是重要的免疫性活性细胞,其分离出的 Treg 和 Th17 细胞与机体免疫功能密切相关^[10]。Th17 细胞可通过促进中性粒细胞募集、活化,促进 IL-6、IL-17、TNF- α 细胞因子大量释放,介导促进炎症反应。研究发现,IL-6、IL-17、TNF- α 细胞因子在自主免疫性疾病及炎症反应中高表达^[11]。Berthelot^[12]研究发现血液透析尿毒症患者外周血 IL-6、IL-17、TNF- α 细胞因子水平表达亦明显高于健康正常人。Treg 细胞是重要的免疫调节细胞,可抑制效应性 CD4⁺T 细胞增生、活化,诱导免疫耐受。Treg/Th17 维持平衡状态有利于维持机体免疫稳态,起到维持体内内环境稳定的作用^[13]。若 Treg/Th17 失衡可诱导疾病发生甚至恶化。

左卡尼汀主要存在于原核及真核细胞中,源于食物摄入、肾小管重吸收、肉碱合成、组织内外转运等因素合成,可通过运载长链脂肪酸进入线粒体,为 β 氧化代谢提供能量,同时还可清除线粒体中毒性产物,具有多种生理功能^[14]。左卡尼汀缺乏可导致体内脂肪酸堆积、产能缺乏,进而导致营养不良相关并发症^[15]。血液透析尿毒症患者由于进食差,导致摄入量减少,左卡尼汀合成不足;再加上肾功能严重损伤,导致肾小球对滤过肉碱重吸收作用减弱,排泄增加;另外,左卡尼汀相对分子质量较小(162),水溶性好,导致其透析过程丢失较多。以上多因素作用导致血液透析尿毒症患者体内左卡尼汀严重缺乏。因此,有学者认为在常规血液透析治疗基础上,通过补充外源性左卡尼汀或可起到改善患者肾功能,提高其免疫功能的作用^[16]。本研究结果中观察组治疗后 PA、Hb、TP、Alb 营养指标改善情况显著优于对照组, Treg、Th17、Treg/Th17 细胞、IL-6、IL-17、TNF- α 、hs-CPR 及 SCr、BUN、24 h 尿蛋白定量水平均显著低

于对照组,提示外源性补充左卡尼汀可显著改善血液透析尿毒症患者机体微环境及免疫功能,维持较好的营养状态,减轻炎症反应及肾功能损伤,与路静芬等^[17]、Higuchi 等^[18]国内外相关研究基本一致。同时本研究还发现,观察组并发症发生率显著低于对照组,提示外源性补充左卡尼汀具较高安全性,笔者认为其原因或与患者营养状况及免疫功能得到有效改善相关。

综上所述,左卡尼汀联合血液透析可显著改善尿毒症患者 Treg/Th17 细胞功能,降低血清炎症因子水平,减轻肾功能损伤,其作用机理可能与纠正患者营养不良及细胞免疫紊乱有关。但本研究样本量较少,未展开长时间随访分析,可能导致研究结果偏差,仍需大量科学、严谨的临床实验进一步补充、论证及完善,为尿毒症患者的血液透析治疗提供更多依据,更好地改善患者生存质量,延长患者生存时间。

参考文献

- [1] Su HH, Kao CM, Lin YC, et al. Relationship between serum total bilirubin levels and mortality in uremia patients undergoing long-term hemodialysis: A nationwide cohort study[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 265: 155-161.
- [2] Aliasgharpour M, Zabolypour S, Asadinoghabi A, et al. The effect of increasing blood flow rate on severity of uremic pruritus in hemodialysis patients: a single clinical trial[J]. *Journal of the National Medical Association*, 2018, 110(3):270-275.
- [3] Tashiro K, Kaida Y, Yamagishi SI, et al. L-carnitine supplementation improves self-rating depression scale scores in uremic male patients undergoing hemodialysis[J]. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2017, 14(6): 737-742.
- [4] 罗进辉. 左卡尼汀对尿毒症行维持性血液透析患者营养状况和心功能的影响[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2017, 37(4):1239-1241.
- [5] Etinger A, Kumar, Ackley W, et al. The effect of isohydric hemodialysis on the binding and removal of uremic retention solutes[J]. *Plos One*, 2018, 13(7): e0192770.
- [6] 马婉乐, 孙雪, 喻婉莹, 等. 慢性肾疾病和尿毒症毒素对非肾清除影响的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(9):861-864.

(下转第 127 页)

乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF和组织LOX水平与淋巴结转移的相关性分析

邢海霞* 赵明燕 郭勇

[摘要] 目的 分析乳腺癌患者血清性激素、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、血管内皮生长因子(VEGF)和组织赖氨酰化酶(LOX)水平与淋巴结转移的相关性。方法 回顾性分析2015年2月至2017年12月我院86例行手术治疗的乳腺癌患者临床资料,其中伴淋巴结转移者44例(转移组),无淋巴结转移者42例(无转移组),并将同期入院的40例乳腺良性肿瘤患者纳入良性组。记录3组患者术前血清雌二醇(E2)、睾酮(T)、孕酮(P)、IGF-1、VEGF水平及组织(乳腺癌患者取乳腺癌组织、良性组取良性病变组织)LOX相对表达量差异,并分析乳腺癌患者血清E2、T、P水平、组织LOX相对表达量及IGF-1、VEGF水平与淋巴结转移的相关性。结果 3组术前血清T水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而血清E2、P、IGF-1、VEGF水平及组织LOX相对表达量比较,均为转移组高于无转移组及良性组($P<0.05$),且无转移组高于良性组($P<0.05$)。术前,无转移组血清IGF-1、VEGF水平低于转移组($P<0.05$);术后4周时,2组血清IGF-1、VEGF水平均较术前降低($P<0.05$),且无转移组仍低于转移组($P<0.05$)。经Spearman相关性分析发现,乳腺癌患者血清T及P水平与其淋巴结转移无相关性($r=-0.049, 0.162, P>0.05$),而血清E2、IGF-1、VEGF水平、乳腺癌组织LOX相对表达量与其淋巴结转移呈显著正相关($r=0.825, 0.865, 0.791, 0.750, P<0.05$)。结论 乳腺癌患者术前血清E2、IGF-1、VEGF水平及组织LOX相对表达量与淋巴结转移状态呈正相关,临床可将血清E2、IGF-1、VEGF水平结合乳腺癌组织LOX表达情况作为预测乳腺癌患者预后的指标。

[关键词] 乳腺癌;淋巴结转移;性激素;IGF-1;VEGF

Correlation between serum sex hormones, IGF-1, VEGF and tissue LOX levels and lymph node metastasis in patients with breast cancer

XING Haixia*, ZHAO Mingyan, GUO Yong

(Second Department of Oncology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the correlation between serum sex hormones levels, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), tissue lysyloxidase (LOX) levels and lymph node metastasis in patients with breast cancer. Methods The clinical data of 86 patients with breast cancer who underwent surgery in our hospital from February 2015 to December 2017 were retrospectively analyzed, including 44 patients with lymph node metastasis (metastasis group) and 42 patients without lymph node metastasis (non-metastasis group). And another 40 patients with benign breast tumors admitted to the hospital in the same period were included in benign group. The levels of serum estradiol (E2), testosterone (T),

基金项目:河南省医学科技攻关计划重点资助项目(201202015)

作者单位:驻马店市中心医院肿瘤二科,河南,驻马店463000

*通信作者:邢海霞, E-mail: suzhi17655294@sina.com

progesterone (P), IGF-1 and VEGF and relative expression level of tissue (breast cancer tissues from patients with breast cancer, benign lesions tissues from benign group) LOX before operation were recorded in the 3 groups. The correlation between serum E2, T and P levels, relative expression level of tissue LOX, IGF-1 and VEGF levels and lymph node metastasis was analyzed. **Results** There was no significant difference in serum T level among the 3 groups ($P>0.05$). The levels of serum E2, P, IGF-1 and VEGF and the relative expression level of tissue LOX in metastasis group were higher than those in non-metastasis group and benign group ($P<0.05$), and the indexes in non-metastasis group were higher than those in benign group ($P<0.05$). Before operation, the levels of serum IGF-1 and VEGF in non-metastasis group were lower than those in metastasis group ($P<0.05$). At 4 weeks after operation, the levels of serum IGF-1 and VEGF in the 2 groups were lower than those before operation ($P<0.05$), and the levels in non-metastasis group were still lower than those in metastasis group ($P<0.05$). Spearman correlation analysis found that serum T and P levels were not correlated with lymph node metastasis in patients with breast cancer ($r=-0.049, 0.162, P>0.05$) while serum E2, IGF-1 and VEGF levels and relative expression level of breast cancer tissue LOX were positively correlated with lymph node metastasis ($r=0.825, 0.865, 0.791, 0.750, P<0.05$). **Conclusions** The preoperative levels of serum E2, IGF-1 and VEGF and relative expression level of tissue LOX in patients with breast cancer are positively correlated with lymph node metastasis. The serum levels of E2, IGF-1 and VEGF combined with expression level of breast cancer tissue LOX can be used as an index to predict the prognosis of patients with breast cancer.

[KEY WORDS] Breast cancer; Lymph node metastasis; Sex hormones; IGF-1; VEGF

乳腺癌为我国常见恶性肿瘤,随着大众饮食结构及生活习惯的改变,乳腺癌呈现发病年轻化趋势^[1]。淋巴系统转移为乳腺癌转移的主要途径之一,转移状态是影响患者预后的重要因素^[2]。故探析乳腺癌淋巴结转移发生的影响因素,有其必要性。近期有学者研究发现,乳腺癌患者可发生不同程度性激素代谢紊乱,性激素水平与患者淋巴结转移等临床特征具有一定相关性^[3]。赖氨酰化酶(lysyl oxidase, LOX)是细胞外基质的主要成分,可氧化胶原蛋白及弹性蛋白上的特殊氨基酸残基,对细胞外基质发育、成熟及维持其稳定性具有重要作用。LOX与恶性肿瘤发生发展、侵袭转移关系密切^[4]。另外,近年来,胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与恶性肿瘤的关系受到学术界广泛关注,IGF-1可刺激乳腺癌细胞分裂,而增加其恶性程度及转移潜力;VEGF则为刺激血管和淋巴微管形成的信号蛋白,可促进恶性肿瘤细胞增殖^[5]。基于此,本研究回顾性分析驻马店市中心医院86例行手术治疗的乳腺癌患者临床资料,以评估组织LOX表达情况、血清性激素及IGF-1、VEGF水平与乳腺癌淋巴结转移的相关性,为临床尽早诊治乳腺癌提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析2015年2月至2017年12月我院86例行手术治疗的乳腺癌患者临床资料,其中伴淋巴结转移者44例(转移组),无淋巴结转移者42例(无转移组),并将同期入院的40例乳腺良性肿瘤患者纳入良性组。纳入标准:经手术病理学检查确诊为乳腺癌或乳腺良性肿瘤者;年龄为18~65岁者;临床资料完整者。排除标准:伴严重感染、糖尿病等手术禁忌证者;既往放化疗或激素治疗者;合并其他恶性肿瘤者;妊娠或哺乳期妇女。3组患者均为女性。转移组年龄40~63岁,平均(51.15±9.65)岁;体质指数(body mass index, BMI)18~24 kg/m²,平均(21.68±2.05)kg/m²。无转移组年龄41~63岁,平均(50.84±9.17)岁;BMI 19~24 kg/m²,平均(21.92±1.94)kg/m²。良性组年龄40~62岁,平均(50.22±9.36)岁;BMI 18~24 kg/m²,平均(22.04±2.11)kg/m²。3组年龄、BMI等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 研究方法

转移组及无转移组乳腺癌患者均行改良乳腺癌根治术,良性组患者均予以弧形切口切除手术

治疗。于术前,使用化学发光免疫法检测3组血清雌二醇(estradiol, E2)、睾酮(testosterone, T)、孕酮(progesterone, P)水平;使用酶联免疫分析法检测3组血清IGF-1、VEGF水平;通过灌胶、电泳、转膜、封闭后加抗体检测LOX在乳腺癌患者乳腺癌组织及良性组良性病变组织中表达情况,并利用发光法以目的条带面积灰度值做半定量检测LOX相对表达量。

1.3 试剂及仪器

化学发光免疫法试剂购自德国罗氏公司;酶联免疫分析法试剂购自美国R&D公司;LOX抗体试剂购自北京博奥森生物技术有限公司;化学发光仪购自德国罗氏公司;酶标仪购自澳大利亚博赛生物公司。

1.4 观察指标

3组患者术前血清E2、T、P、IGF-1、VEGF水平及组织(乳腺癌患者取乳腺癌组织、良性组取良性病变组织)LOX相对表达量和术后4周时血清

IGF-1、VEGF水平差异,同时分析乳腺癌患者术前血清E2、T、P、IGF-1、VEGF水平、组织LOX相对表达量与淋巴结转移的相关性。

1.5 统计学方法

数据处理用SPSS 19.0软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用多因素方差分析,2组间采用独立样本 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;相关性分析使用Spearman相关性分析法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组术前血清血清E2、T、P、IGF-1、VEGF水平及组织LOX相对表达量比较

3组术前血清T水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而血清E2、P、IGF-1、VEGF水平及组织LOX相对表达量比较,均为转移组高于无转移组及良性组($P < 0.05$),且无转移组高于良性组($P < 0.05$),见表1。

表1 3组术前血清E2、T、P、IGF-1、VEGF水平及组织LOX相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of preoperative serum levels of E2, T, P, IGF-1, VEGF and relative expression level of tissue LOX in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	E2(pg/mL)	T(ng/dL)	P(ng/mL)	IGF-1(ng/mL)	VEGF(pg/mL)	LOX相对表达量
转移组	44	210.41±15.49	50.78±9.45	0.39±0.05	232.54±19.47	229.45±18.72	0.65±0.12
无转移组	42	175.22±12.36 ^a	52.47±9.12	0.32±0.06 ^a	153.78±15.46 ^a	189.74±17.46 ^a	0.41±0.10 ^a
良性组	40	93.45±10.17 ^{ab}	52.98±9.09	0.28±0.04 ^{ab}	114.26±10.69 ^{ab}	134.26±14.33 ^{ab}	0.15±0.04 ^{ab}
<i>F</i>		17.452	1.743	9.476	22.652	19.869	26.874
<i>P</i>		0.000	0.214	0.000	0.000	0.000	0.000

与转移组比较,^a $P < 0.001$;与无转移组比较,^b $P < 0.001$ 。

2.2 转移组及无转移组手术前后血清IGF-1、VEGF水平比较

术前,无转移组血清IGF-1、VEGF水平低于

转移组($P < 0.05$);术后4周时,2组血清IGF-1、VEGF水平均较术前降低($P < 0.05$),且无转移组仍低于转移组($P < 0.05$),见表2。

表2 2组手术前后血清IGF-1、VEGF水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum IGF-1 and VEGF levels before and after operation in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IGF-1(ng/mL)		<i>t</i>	<i>P</i>	VEGF(pg/mL)		<i>t</i>	<i>P</i>
		术前	术后			术前	术后		
转移组	44	232.54±19.47	160.23±15.69	27.284	0.000	229.45±18.72	195.41±16.32	12.888	0.000
无转移组	42	153.78±15.46	101.26±10.15	26.581	0.000	189.74±17.46	152.36±15.23	14.821	0.000
<i>t</i>		20.712	20.587			10.161	12.633		
<i>P</i>		0.000	0.000			0.000	0.000		

2.3 乳腺癌患者术前血清 E2、T、P、IGF-1、VEGF 水平及组织 LOX 与淋巴结转移的相关性分析

将乳腺癌转移定义为 1, 无转移定义为 0, 经 Spearman 相关性分析, 发现乳腺癌患者血清 T 及

P 水平与其淋巴结转移无相关性 ($P > 0.05$), 而血清 E2、IGF-1、VEGF 水平、乳腺癌组织 LOX 相对表达量与其淋巴结转移呈显著正相关 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 乳腺癌淋巴结转移的相关性分析 ($n=86$)

Table 3 Correlation analysis of lymph node metastasis in breast cancer ($n=86$)

项目	淋巴结转移	E2	T	P	IGF1	VEGF	LOX	
淋巴结转移	相关系数	1.000	0.825**	-0.049	0.162	0.791**	0.750**	0.865**
	Sig.(双侧)	-	0.000	0.653	0.137	0.000	0.000	0.000
E2	相关系数	0.825**	1.000	-0.088	0.084	0.657**	0.596**	0.696**
	Sig.(双侧)	0.000	-	0.421	0.443	0.000	0.000	0.000
T	相关系数	-0.049	-0.088	1.000	0.097	-0.168	0.013	-0.036
	Sig.(双侧)	0.653	0.421	-	0.374	0.122	0.906	0.741
P	相关系数	0.162	0.084	0.097	1.000	0.043	0.195	0.134
	Sig.(双侧)	0.137	0.443	0.374	-	0.696	0.071	0.218
IGF1	相关系数	0.791**	0.657**	-0.168	0.043	1.000	0.599**	0.710**
	Sig.(双侧)	0.000	0.000	0.122	0.696	-	0.000	0.000
VEGF	相关系数	0.750**	0.596**	0.013	0.195	0.599**	1.000	0.669**
	Sig.(双侧)	0.000	0.000	0.906	0.071	0.000	-	0.000
LOX	相关系数	0.865**	0.696**	-0.036	0.134	0.710**	0.669**	1.000
	Sig.(双侧)	0.000	0.000	0.741	0.218	0.000	0.000	-

**为在置信度(双侧)为 0.01 时, 相关性是显著的; -为相同指标分析, 无意义。

3 讨论

淋巴结转移在乳腺癌中发生率较高, 淋巴结转移不仅影响手术疗效, 亦是导致患者预后不良的重要因素^[6]。目前, 临床诊断乳腺癌患者是否发生淋巴结转移, 多通过电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)、钼靶等影像学检查, 均可出现一定漏诊及误诊^[7]。影像学检查常造成不同程度辐射损伤, 使其使用受到一定限制。故利用血清学指标筛选出淋巴结转移风险较高者, 对其予以重点监测, 受到学术界广泛关注。

乳腺癌病因与遗传基因缺损、内源性性激素-免疫激素-细胞基因受体等生理病理变化有关, 其中内源性性激素可促进乳腺局部 E2 合成增多, E2 具有刺激乳腺导管上皮细胞增生等作用, 可提高乳腺癌细胞增殖能力及转移潜力^[8]。故乳腺癌患者血清 E2 水平与其淋巴结转移可能存在相关

性。T、P 等性激素能刺激乳腺细胞增殖, 并促进乳腺上皮组织内生长因子合成, 与乳腺癌恶性程度具有一定联系^[9]。外国学者^[10]研究发现, 血清 T 水平与乳腺癌淋巴结转移状态呈正相关。而本研究结果显示, 转移组血清 E2、P 水平均高于无转移组及良性组, 但 3 组 T 水平比较, 差异无统计学意义。提示 E2、P 能通过性激素代谢等生理病理反应, 使乳腺癌细胞增殖, 并增加淋巴结转移发生率。血清 T 水平则对乳腺癌增殖及淋巴结转移等情况影响较小, 与上述外国学者研究结果不同。考虑造成该结果的原因有人种差异、内分泌代谢不同或检验方法不一致。

据文献报道, LOX 可参与胃癌、乳腺癌等恶性肿瘤的发生发展, 并推测其原因可能为 LOX 异常表达使细胞外基质结构及功能异常, 进而破坏肿瘤转移的生理屏障, 达到促进肿瘤转移的作用^[11]。而本研究也发现, 转移组乳腺癌组织 LOX

相对表达量显著高于无转移组,且转移组及无转移组的组织 LOX 相对表达量均高于良性组的良性病变组织,与上述报道结果一致。然而,组织 LOX 表达情况需要通过病理活检检出,在术前评估中受到一定限制。但也有学者指出,仍可利用术后病理组织检查 LOX 表达情况等方式,分析恶性肿瘤情况发展状态,对手术效果及患者预后情况作出预测^[12]。

另外,日本学者 Mahdavi 等^[13]指出,IGF-1 不仅能作用于乳腺细胞基质,还能刺激乳腺癌患者雌激素活性,同时促进卵巢功能兴奋,使机体雌激素水平升高,并与雌激素产生协同作用,以促进乳腺癌细胞增殖,提高其转移潜能。本研究结果也显示,转移组术前血清 IGF-1 水平高于无转移组和良性组,与上述学者研究结果一致。说明血清 IGF-1 在恶性肿瘤增殖中具有重要作用,能通过促进乳腺癌细胞增殖等方式,刺激癌细胞淋巴结转移,进而影响患者预后。不仅如此,大量实验数据显示,VEGF 不仅能导致乳腺组织血管增生,还能刺激癌周围间质淋巴管增生扩张,而促进癌细胞进入淋巴管,引起淋巴结转移^[14]。本研究中,转移组术前血清 VEGF 水平高于无转移组及良性组,且无转移组血清 VEGF 水平高于良性组,与学术界研究结果一致^[15]。这也初步证实,VEGF 在乳腺癌转移中具有重要作用。提示血清 VEGF 水平较高的乳腺癌患者淋巴结转移风险较高,术后存在一定肿瘤复发、转移等风险,可造成患者预后不良。术后 2 组 IGF-1、VEGF 水平较术前降低,但无转移组仍低于转移组。分析其原因可能与手术虽然能降低 IGF-1、VEGF 表达,但伴淋巴结转移者术后存在较大的肿瘤复发风险,使 IGF-1 和 VEGF 仍然高表达有关。

除上述结论外,本研究还发现,血清 E2、IGF-1、VEGF 水平、乳腺癌组织 LOX 相对表达量与乳腺癌淋巴结转移呈显著正相关。该结果机制可能为:血清 E2、IGF-1 能通过协同刺激乳腺癌细胞增殖,提高其恶性程度及转移潜力^[16];血清 VEGF 增加能同时刺激乳腺癌细胞增生、间质淋巴管扩张,使乳腺癌患者出现淋巴结转移^[17];乳腺癌组织 LOX 的高表达可影响细胞外基质功能,促进乳腺癌细胞迁移,而刺激病情进展,增加淋巴结转移风险^[18]。因此,临床在乳腺癌患者治疗前,可通过检

测其血清 E2、IGF-1、VEGF 水平,观察其淋巴结转移情况,并联合手术组织病理检测乳腺癌组织 LOX 表达水平,综合评估患者病情,预测患者预后。

综上所述,乳腺癌患者血清 E2、IGF-1、VEGF 水平、乳腺癌组织 LOX 表达与淋巴结转移呈正相关,临床可根据血清 E2、IGF-1、VEGF 水平及乳腺癌组织 LOX 表达水平评估患者淋巴结转移及病情进展情况,预测患者术后恢复状况。

参考文献

- [1] 侯丽娟,张喜平. SUVmax 与 MTV 预测乳腺癌新辅助化疗效果的对比观察[J]. 临床误诊误治, 2016, 29(12): 94-97.
- [2] 常振宇,白玲,唐英,等. 早期乳腺癌无创腋窝淋巴结分期的临床初步观察[J]. 军事医学, 2016, 40(9): 759-763.
- [3] 陈金辉,焦喜林,吴劲松,等. 雌、孕激素受体表达状态与局部晚期乳腺癌经内乳动脉置管新辅助化疗疗效的关系[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(2): 74-77.
- [4] Cox TR, Gartland A, Erler JT. Lysyl Oxidase, a targetable secreted molecule involved in cancer metastasis [J]. Cancer Research, 2016, 76(2): 188-192.
- [5] Sławomir Ł, Zajkowska M, Edyta KG, et al. Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in the diagnostics of breast cancer patients [J]. Biomarkers, 2017, 22(2): 157-164.
- [6] 孔祥崇,程文,郭存丽,等. 乳腺癌腋窝淋巴结声像图联合免疫组织化学与淋巴结转移的相关性研究[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(2): 155-160.
- [7] 吴佩琪,刘春玲,刘再毅,等. 钼靶、CT 与 DCE-MRI 评价乳腺癌淋巴结转移的价值[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(4): 493-499.
- [8] 于庆龙,张莹,王宏健,等. 17 β -雌二醇对乳腺癌细胞迁移的影响及 CANP-FN 通路的介导作用[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10): 1371-1376.
- [9] 朱嵩瑜,许宇媚,许晶,等. 雄激素受体对雌激素受体阳性乳腺癌细胞增殖的抑制作用[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(4): 354-358.
- [10] Secreto G, Muti P, Sant M, et al. Medical ovariectomy in menopausal breast cancer patients with high testosterone levels [J]. Endocrine-related cancer, 2017, 24(11): 21-29.

- [11] 刘静, 季晨, 史琳, 等. 抑制赖氨酰氧化酶可抑制胃癌细胞体外迁移和异质黏附[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(4):390-393.
- [12] Wang TH, Hsia SM, Shieh TM. Lysyl oxidase and the tumor microenvironment [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(1):62.
- [13] Mahdavi M, Moreau V, Kheirollahi M. Identification of B and T cell epitope based peptide vaccine from IGF-1 receptor in breast cancer [J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2017, 75(8):316-321.
- [14] Matà R, Palladino C, Nicolosi ML, et al. IGF-I induces upregulation of DDR1 collagen receptor in breast cancer cells by suppressing MIR - 199a - 5p through the PI3K/AKT pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(7):7683-7700.
- [15] 凌锐, 周玲, 周月鹏, 等. Wnt1 诱导分泌蛋白-1 通过 NF- κ B 通路促进食管鳞癌细胞的增殖和侵袭转移 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(2):129-134.
- [16] Mitrofanova I, Zavyalova M, Telegina N, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy [J]. Immunobiology, 2017, 222(1):101-109.
- [17] Shinozaki M, Hoon D, Giuliano A, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis [J]. Clinical Cancer Research, 2016, 11(6):2156-2162.
- [18] 张敏敏, 韦薇, 刘剑仑, 等. 乳腺癌组织 LOX 蛋白表达与腋窝淋巴结转移相关性分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(4):236-241.

(上接第 121 页)

- [7] Li WH, Yin YM, Chen H, et al. Curative effect of neutral macroporous resin hemoperfusion on treating hemodialysis patients with refractory uremic pruritus [J]. Medicine, 2017, 96(12):e6160.
- [8] Zhang ZH, Mao JR, Chen H, et al. Removal of uremic retention products by hemodialysis is coupled with indiscriminate loss of vital metabolites [J]. Clinical Biochemistry, 2017, 50(18):1078-1086.
- [9] 王明波, 谭永顺, 王自良, 等. 血液透析对尿毒症患者 Treg 与 Th17 水平失衡的影响分析 [J]. 重庆医学, 2018, 47(15):2045-2047.
- [10] 丁瑜, 王健, 梁新, 等. 尿毒症毒素对甲酚对单核细胞体外释放炎症因子的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(1):35-39.
- [11] 胡波, 商义, 李蓓睿. 尿毒症血液透析患者外周血单核细胞 Nrf2、NQO1 及血清 TNF- α 、IL-6 的表达变化及意义 [J]. 中国血液净化, 2018, 32(5):299-303.
- [12] Berthelot L. Immune and inflammatory mechanisms [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2016, 30(10 Suppl):S3-8.
- [13] 尤亚红. 调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞 17 失衡在自身免疫性疾病中的研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2015, 38(6):541-545.
- [14] 吴风雷. 左卡尼汀联合血液透析治疗尿毒症性周围神经病变 38 例疗效分析 [J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(12):1661-1663.
- [15] 贾明华, 冯敏. 左卡尼汀对尿毒症行维持性血液透析患者营养状况和心功能的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(12):1239-1241.
- [16] 陈正芳. 高通量血液透析联合左卡尼汀改善尿毒症患者免疫功能的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(7):669-672.
- [17] 路静芬, 王晓慧, 姚颖, 等. 高通量血液透析联合左卡尼汀治疗对维持性血液透析患者营养状况和生存质量的影响 [J]. 内科急危重症杂志, 2016, 22(4):262-266.
- [18] Higuchi T, Abe M, Yamazaki T, et al. Levocarnitine improves cardiac function in hemodialysis patients with left ventricular hypertrophy: a randomized controlled trial [J]. American Journal of Kidney Diseases, 2016, 67(2):260-270.

2型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析

韩晨鹏^{1*} 徐清芳¹ 张美华¹ 曹亮²

[摘要] 目的 探讨血清抵抗素、血管内皮细胞因子(VEGF)、糖化白蛋白(GA)联合诊断早期糖尿病肾病(DN)的应用价值。方法 选取2014年1月至2017年1月就诊的T2DM患者152例作为研究对象,参照尿蛋白/尿肌酐比值(UACR)分为正常白蛋白尿组(NA组)68例、微量白蛋白尿组(MA组)45例、大量白蛋白尿组(LA组)39例,比较3组患者血清抵抗素、VEGF、GA变化及与UACR的关系,ROC曲线分析抵抗素、VEGF、GA及三者联合诊断早期DN的效能。结果 NA组抵抗素、VEGF、GA及UACR值低于MA组、LA组,MA组上述指标低于LA组,三者比较差异均有统计学意义($F=12.907$ 、 24.082 、 10.905 、 136.311 , $P<0.05$);血清抵抗素、VEGF、GA与UACR均呈正相关分析($r=0.646$ 、 0.678 、 0.583 , $P<0.01$);ROC分析显示血清抵抗素、VEGF、GA诊断早期DN的最佳节点值分别为50.53 ng/mL、95.12 pg/mL、20.08%,三者联合曲线下面积为0.874高于血清抵抗素(0.775)、VEGF(0.788)、GA(0.733)单独检测($Z=2.189$ 、 3.031 、 2.441 , $P=0.029$ 、 0.002 、 0.015)。结论 血清抵抗素、VEGF、GA与UACR呈正相关关系,三者联合检测可提高早期诊断效能。

[关键词] 糖尿病肾病;血清抵抗素;血管内皮细胞生长因子;糖化白蛋白

The evaluation of combined detection of serum resistin, VEGF and glycated albumin in early diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes

HAN Chenpeng^{1*}, XU Qingfang¹, ZHANG Meihua¹, CAO Liang²

(1. Department of Laboratory, First People's Hospital of Zhumadian, Zhumadian, Henan, China, 463000;
2. Department of Laboratory, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China, 400016)

[ABSTRACT] Objective To investigate the value of serum resistin, vascular endothelial cell factor (VEGF) and glycated albumin (GA) in the diagnosis of early diabetic nephropathy (DN). Methods A total of 152 patients with T2DM who were admitted from January 2014 to January 2017 were enrolled. According to urinary albumin creatinine ratio (UACR), there were 68 cases of normal protein proteinuria group (NA group), 45 cases of microalbuminuria group (MA group) and 39 cases of large albuminuria group (LA group). The changes of serum resistin, VEGF and GA and their relationships with UACR in the patients were compared among the 3 groups. ROC curve was performed to analyze the diagnostic efficiency of resistin, VEGF, GA and the combination of the three in the early diagnosis of DN. Results The resistin, VEGF, GA and UACR value in NA group were lower than those in MA group and LA group and the MA group was lower than the LA group ($F=12.907$, 24.082 , 10.905 , 136.311 , $P<0.05$). Serum resistin, VEGF and GA were positively correlated with UACR ($r=0.646$, 0.678 , 0.583 , $P<0.01$). ROC analysis showed that the best node values of serum resistin, VEGF and GA for early diagnosis of DN were 50.53 ng/mL, 95.12 pg/mL and 20.08%. The area under

基金项目:河南省科技攻关计划基金资助项目(1421023110011)

作者单位:1.驻马店市第一人民医院检验科,河南,驻马店 463000

2.重庆医科大学第一附属医院检验科,重庆 400016

*通信作者:韩晨鹏, E-mail:g24i6cc@sina.com

curve of the three was 0.874, higher than that of serum resistin (0.775), VEGF (0.788) and GA (0.733) alone ($Z=2.189, 3.031, 2.441, P=0.029, 0.002, 0.015$). Conclusion Serum resistin, VEGF and GA are positively correlated with UACR. The combined detection of three can improve early diagnostic.

[KEY WORDS] Diabetic nephropathy; Serum resistin; Vascular endothelial growth factor; Glycated albumin

糖尿病是临床常见的慢性疾病,预计2040年中国糖尿病人将增至1.5亿人^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是常见的糖尿病微血管并发症之一,随着病情进展,可引起终末期肾功能衰竭,甚至死亡^[2]。据调查, DN是导致慢性肾衰竭及维持性血液透析的主要原因。目前DN的发生机制尚未完全阐明,尚缺乏统一的指标。肾穿刺活检是临床诊断早期DN的金标准,然而其为有创检查,临床应用受限。尿微量白蛋白排泄率是临床诊断DN常用的实验室指标,但临床发现肾小球基底膜结构改变早于微量白蛋白尿发生,无法反映早期肾脏损害。因此,筛选早期、准确DN生物学标志物对疾病诊断、疗效评估等具有重要意义。近年来,有研究报道抵抗素、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、糖化白蛋白(glycated albumin, GA)在DN发生、进展中起重要参与作用,如:抵抗素是由脂肪细胞特异性分泌的多肽,具有降低脂肪细胞、胰岛 β 细胞的胰岛素敏感度,诱导胰岛素抵抗发生,通过其诱导的体液介质可导致全身性血管功能紊乱,激活肾素血管紧张素系统,引起肾功能损害^[3]。糖尿病状态下,肾小球内高压、蛋白激酶C活化等因素造成血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),可增加肾小球毛细血管下分裂增加血管通透性、增加肾小球内单核巨噬细胞活性等途径参与DN发生、进展^[4]。糖化白蛋白(glycated albumin, GA)可通过减少肾小球系膜细胞形成和增加系膜基质扩张等途径参与糖尿病患者肾小球硬化发生^[5]。杨浩等^[6]研究发现,GA是影响DN发生的独立危险因素。然而单一实验室诊断指标诊断敏感性或特异度较低。故本研究通过分析DN患者血清脂联素、VEGF、GA水平,探讨3项联合检测在DN早期诊断中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2014年1月至2017年1月驻马店市第一

人民医院就诊的2型糖尿病(Type 2 diabetes, T2DM)患者152例作为研究对象,纳入标准:中国2型糖尿病防治指南(2013年版)^[7];无合并肝、肾功能不全及其他慢性肾脏疾病;无严重慢性并发症;近期末使用肾脏有害药物。排除标准:1型糖尿病或合并其他内分泌疾病;原发肾病者;入组前30 d出现糖尿病酮症酸中毒、高渗性昏迷等急性并发症;既往有心脑血管病史;恶性肿瘤;接受血液透析、肾移植患者;入组前6个月有肿大手术史。DN诊断标准^[8]参照尿清蛋白/尿肌酐比值(urinary albumin creatinine ratio, UACR)分为正常白蛋白尿组(NA组, UACR<30 mg/g)68例、微量白蛋白尿组(MA组, UACR 30~<300 mg/g)45例、大量白蛋白尿组(LA组, UACR \geq 300 mg/g)39例。NA组,男性41例,女性27例,年龄34~68岁,平均(52.19 \pm 3.94)岁,糖尿病病程7个月~21年,平均(11.57 \pm 3.26)年;MA组,男性27例,女性18例,年龄31~69岁,平均(53.09 \pm 4.11)岁,糖尿病病程9个月~18年,平均(11.27 \pm 4.05)年;LA组,男性24例,女性15例,年龄33~70岁,平均(53.09 \pm 4.11)岁,糖尿病病程9个月~18年,平均(11.39 \pm 3.51)年。3组患者性别、年龄、病程比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 试剂

血清抵抗素试剂盒购自美国Phoenix Pharmaceutical公司;VEGF试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司;GA试剂盒购自日本旭化成公司;微量清白蛋白试剂盒购自上海基恩科技有限公司,尿肌酐试剂盒购自上海哈灵生物科技有限公司。

1.2.2 实验室指标检测

所有患者检查前1 d均清淡饮食,晚餐后禁食8~10 h,检查日行空腹静脉采血3~4 mL, 3 500 r/min离心15 min,分离血清后分装保存于-70 $^{\circ}$ C低温下保存。采用酶联免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清抵抗素水平,采用双抗体夹心ELISA法检测VEGF水平,采用液态酶法检测GA水平。留取晨尿,标本收集后

分装,离心后取上清液,采用免疫比浊法检测尿微量清蛋白,酶比色法检测尿肌酐水平,并按照尿微量清蛋白 $\times 100 / (\text{尿肌酐} \times 0.113)$ 计算UACR水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS18.0统计学软件进行数据分析,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,组间比较SNK-q检验,计量资料的相关性采用Pearson相关分析,诊断效能分析采用受试者工作特征曲线

(receiver operating characteristic, ROC),并计算曲线下面积(area under curve, AUC)。 $P < 0.05$ 提示有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者抵抗素、VEGF、GA及UACR值比较
NA组抵抗素、VEGF、GA及UACR值低于MA组、LA组,MA组上述指标低于LA组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 3组患者抵抗素、VEGF、GA及UACR值比较

Table 1 Comparison of serum resistin, VEGF, GA and UACR values in the 3 groups

组别	n	抵抗素(ng/mL)	VEGF(pg/mL)	GA(%)	24 h UACR(mg/g)
NA组	68	46.27 \pm 5.64	85.06 \pm 9.67	17.52 \pm 1.84	16.24 \pm 2.05
MA组	48	57.05 \pm 6.22*	109.84 \pm 9.64*	19.84 \pm 1.89*	79.69 \pm 4.17*
LA组	39	68.71 \pm 6.97**	152.18 \pm 10.26**	23.35 \pm 1.95**	320.05 \pm 15.01**
F		12.907	24.082	10.905	136.311
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与NA组比较,* $P < 0.05$;与NA组比较,** $P < 0.05$ 。

2.2 血清抵抗素、VEGF、GA与UACR相关性分析

血清抵抗素、VEGF、GA与UACR均呈正相关分析($r = 0.646, 0.678, 0.583, P < 0.01$)。

2.3 血清抵抗素、VEGF、GA及三者联合对早期DN的诊断价值分析

将NA组、MA组患者作为研究对象,UACR ≥ 30 mg/g诊断DN的切点,ROC分析显示血清抵抗素、VEGF、GA诊断早期DN的最佳节点值分别为50.53 ng/mL、95.12 pg/mL、20.08%,三者联合曲线下面积为0.874高于血清抵抗素(0.775)、VEGF(0.788)、GA(0.733)单独检测,差异有统计学意义($Z = 2.189, 3.031, 2.441, P = 0.029, 0.002, 0.015$)。

三者联合诊断为序列诊断实验,即任一为阳性则为三者联合诊断阳性。

3 讨论

抵抗素是一种新的脂肪内分泌激素,可通过降低肝细胞、骨骼肌细胞等对胰岛素敏感性诱导胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗可促使肾小球动脉收缩,损伤肾功能;此外,抵抗素还可增加内皮素、炎症介质、其他内皮活性物质等表达,引起全身血管系统紊乱,进而激活肾素血管紧张素系统,导致肾损伤^[9]。本研究发现NA组血清抵抗素水平MA组、LA组,且MA组高于LA组($P < 0.05$),且与

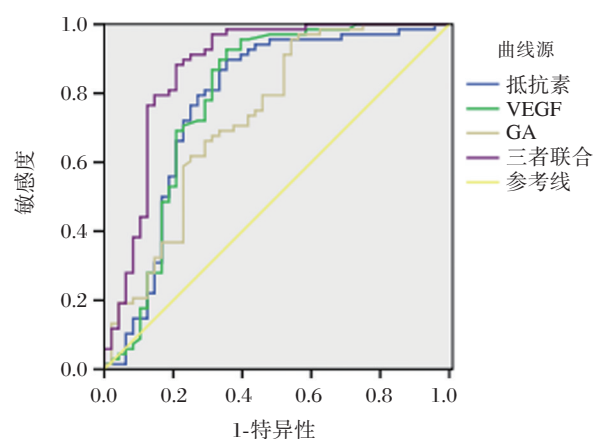


图1 血清抵抗素、VEGF、GA及三者联合诊断早期DN的ROC曲线分析

Figure 1 ROC curve analysis of serum resistin, VEGF, GA and the combined diagnosis with the three for early DN

UACR呈正相关关系,说明随着肾功能损害加重,血清抵抗素水平明显上升。有研究指出,DN患者体内产生过多的抵抗素可引起胰岛素抵抗,其是导致微量白蛋白尿发生的重要原因^[10]。钟春等^[11]指出,DN患者血清抵抗素水平异常升高,本研究结果与其一致。

多数学者认为,异常血管增生是DN的重要病理特征之一^[12]。EGF及其受体在调控血管生成、调节血管通透性、维持肾小球毛细血管完整性方

表2 血清抵抗素、VEGF、GA对早期DN的诊断价值分析

Table 2 Diagnostic value analysis of serum resistin, VEGF and GA for early DN

指标	最佳截点值	AUC	敏感度	特异度	95%CI
抵抗素	50.53	0.775	79.4	72.9	0.678~0.873
VEGF	95.12	0.788	92.6	65.6	0.692~0.884
GA	20.08	0.733	91.2	47.9	0.636~0.829
三者联合		0.874	80.5	88.2	0.799~0.948

三者联合诊断为序列诊断试验,即任一为阳性则为三者联合诊断阳性

面起重要最终。长期高糖刺激下,糖基化终末产物、肾小球内高压、蛋白激酶C活化等作用下造成肾脏 VEGF 表达水平上调,而 VEGF 水平上调可刺激内皮细胞增殖、分化,增加内皮细胞通透性,且同时其可释放多种血管活性物质破坏滤过膜的电荷屏障,增加肾小球通透性,损伤肾功能;另外,VEGF 还可通过引起内皮细胞形态改变、增加肾小球内单核巨细胞活性等途径参与 DN 发生和进展^[13]。本研究发现, DN 患者血清 VEGF 与 UACR 呈正相关关系,说明随着 UACR 增加,血清 VEGF 也会随之增高,原因可能为糖尿病患者缺氧、高糖、炎性因子等作用下,促使 VEGF 基因转录及蛋白表达,而 VEGF 表达增加,会通过增加内皮细胞通透性、破坏滤过膜屏障等损伤肾功能。汪菲等^[14]研究报道 DN 患者 VEGF 水平显著上升,在 DN 发生、发展过程中起重要参与作用。

GA 是一种可沉积于肾小球基底膜的糖基化终末产物,可反映 2~3 周的血糖水平,是评价 T2DM 患者短期控糖情况、评价降糖药物效果的重要指标。GA 不仅是晚期糖基化终产物的前提形式,还可通过引起致纤维化因子、炎性因子释放等参与肾小球硬化发生^[15]。本研究中, NA 组血清 GA 水平 MA 组、LA 组,且 MA 组高于 LA 组 ($P < 0.05$),相关性分析显示,血清 GA 水平与 UACR 呈正相关关系,原因可能为 GA 升高提示血糖控制不佳,还会促进人体纤维化因子、炎性因子等增加,共同参与 DN 发生。费杨等^[16]研究报道,非 DN 患者 GA 水平明显低于 DN 患者,且与肾功能有一定关系;本研究结果与上述研究结果一致。

ROC 曲线分析抵抗素、VEGF、GA 及三者联合的诊断早期 DN 的价值,发现抵抗素、VEGF、GA 单独诊断的诊断效能较低,如除血糖外,高血压、

炎症、甲亢等均会影响血清抵抗素水平^[17]; VEGF 受多种因素的调控,如血糖控制水平、慢性炎症、肿瘤等^[18];此外,肿瘤、甲状腺功能亢进可造成血清 GA 水平降低,而肝硬化、甲状腺功能亢进造成 GA 水平升高^[19]。目前,临床关于三者联合诊断早期 DN 的报道尚少。本研究结果显示,三者联合诊断早期 DN 的 AUC 高于三者单独检测 ($P < 0.05$),说明三者联合诊断可提高 DN 的诊断效能。

综上所述, DN 患者伴随血清抵抗素、VEGF、GA 水平升高,且三者联合检测早期 DN 可提高诊断效能,对 DN 早期筛查、防治具有重要意义。

参考文献

- [1] 白碧玉,于琦,苏闫兵,等.中国糖尿病研究论文合作分析[J].中国药物与临床,2017,17(11):64-66.
- [2] Nordquist L, Friederichpersson M, Fasching A, et al. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(2): 328-338.
- [3] 曲韶玲.糖尿病肾病病人血清 TNF- α 、抵抗素和微量清蛋白检测[J].齐鲁医学杂志,2014,29(2): 135-136.
- [4] 孙立,闫冬,原泉,等.血管内皮细胞生长因子可溶性受体 1 在慢性肾衰竭患者血液和尿液中的表达及意义[J].广东医学,2016,37(10):1471-1473.
- [5] 刘翔哈,李国生,李欣宇,等.应用动态血糖监测系统评估糖尿病合并不同阶段的慢性肾脏疾病患者糖化血红蛋白及糖化白蛋白准确性的研究[J].中国糖尿病杂志,2016,24(2):118-122.
- [6] 杨浩,孔德宝,付靖瑜,等.糖化白蛋白、糖化血红蛋白与 2 型糖尿病早期肾损伤的关系[J].广东医学,2018,39(13):1989-1992.
- [7] 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].中国糖尿病杂志,2014,30(8): 893-942.
- [8] 童国玉,朱大龙.糖尿病肾病国内外临床指南和专家共识解读[J].中国实用内科杂志,2017,37(3):32-37.
- [9] 修良昌,任寒,杨杰,等.抵抗素基因多态性与 2 型糖尿病关联性分析[J].中国公共卫生,2015,31(3):369-372.
- [10] 任毅,左之才,万涛梅.抵抗素在胰岛素抵抗中的作用机制及其受体信号通路研究进展[J].生理学报,2016,68(1):65-74.
- [11] 钟春.不同血液净化方式对糖尿病肾病患者脂肪因子、炎症因子的影响[J].海南医学院学报,2016,22(4):340-342.

(下转第 151 页)

血小板生长因子、白介素-17在肺纤维化诊断及预后的价值

徐林* 罗义华 李霞

[摘要] 目的 分析血小板生长因子(PDGF)、白介素-17(IL-17)在肺纤维化诊断及预后的价值。方法 2017年6月至2018年1月,医院呼吸内科收治的肺纤维化患者94例纳入病例组,分别在入院时、4周后,采血进行PDGF、IL-17检测。另选择健康成人50例纳入健康组,检测PDGF、IL-17,计算肺部CT评分。将病例组中的对象根据4周后的疗效进行分组,对比亚组显效组、对照组治疗前后的指标水平。进行PDGF、IL-17、肺部CT评分的相关性分析。结果 病例组入院时、4周后PDGF、IL-17均高于健康组,差异有统计学意义($P<0.05$)。显效组治疗前、4周后的PDGF、IL-17均低于对照组,指标下降幅度高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗前、4周后,PDGF、IL-17与肺部CT评分存在正相关性($P<0.05$),PDGF、IL-17下降幅度与肺部CT评分下降幅度存在正相关性($P<0.05$)。结论 PDGF、IL-17可作为肺纤维化辅助诊断指标,还可预测疗效,评估治疗效果。

[关键词] 肺纤维化;肺部CT评分;血小板生长因子;白介素-17

The value of platelet growth factor and interleukin - 17 in the diagnosis and prognosis of pulmonary fibrosis

XU Lin*, LUO Yihua, LI Xia

(Health Management Center, Dazhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Dazhou, Sichuan, China, 635000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the value of platelet growth factor and interleukin-17 (IL-17) in the diagnosis and prognosis of pulmonary fibrosis. Methods from June 2017 to January 2018, 94 patients with pulmonary fibrosis admitted to the Department of Respiratory Medicine in our hospital were enrolled in the study. The blood samples were collected for the detection of IL-17 and PDGF from 4 weeks after admission. In addition, 50 healthy adults were included in the healthy group, and the lung CT scores were calculated. The patients in the case group were divided into 2 groups according to the curative effect after 4 weeks, and the index levels before and after treatment were compared between the subgroup and the control group. The correlation between PDGF or IL-17 and lung CT score was analyzed. Results PDGF and IL-17 were higher in the case group than in the healthy group at 4 weeks after admission, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The PDGF and IL-17 levels in the treatment group were lower than those in the control group after 4 weeks ($P<0.05$). There was a positive correlation between PDGF or IL-17 and lung CT scores before and after treatment ($P<0.05$). There was a positive correlation between the decrease of PDGF and IL-17 and the decrease of lung CT score ($P<0.05$). Conclusion PDGF and IL-17 can be used as an auxiliary diagnostic indicators for pulmonary fibrosis, and can predict and evaluate the therapeutic effect.

[KEY WORDS] Pulmonary fibrosis; Lung CT score; Platelet growth factor; Interleukin -17

作者单位:达州市中西医结合医院健康管理中心,四川,达州 635000

*通信作者:徐林, E-mail:2079799548qq@com

肺纤维化是一种多种病因引起的肺部弥漫性炎性疾病,患者以呼吸困难、肺功能异常为主要临床表现。肺间质纤维化发生机制十分复杂,可以肯定其与复杂的细胞因子协同作用、炎症级联作用、免疫损伤协同作用有关^[1]。血小板生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)是一种重要的血管损伤标志物,白介素-17(interleukin-17, IL-17)是重要的炎症反应标志物,有关于肺纤维化与这2种因子的相关研究并不多,但从现有的研究来看,肺纤维化普遍伴有微炎症、慢性炎症以及血管损伤,从而导致PDGF、IL-17水平变化^[2]。本次研究以2017年6月至2018年1月,达州市中西医结合医院呼吸内科收治的肺纤维化患者94例、健康成人50例分别入组,分析其在肺纤维化诊断、预后预测中的价值,为临床提供相关参考依据。

1 资料及方法

1.1 一般资料

2017年6月至2018年1月,达州市中西医结合医院呼吸内科收治的肺纤维化患者94例,纳入病例组,其中男45例、女49例,年龄(51.4±11.4)岁。纳入标准:①参照2015年《特发性肺纤维化诊治循证指南》、《内科学》制定的标准确诊^[1,3];②无其他可能系统重大原发疾病,如慢性心力衰竭;③尚未服用拮抗血小板的药物;④近1个月无重大疾病病史、创伤史;⑤知情同意。排除标准:①临终期、危重症;②预计生存时间不超过4周,无法完成研究;③需要转院治疗。退出标准:①误漏诊;②转院;④出现严重的合并症发作或创伤疾病,如急性阑尾炎、跌倒引起的骨折。另选择同期健康志愿者50名,纳入健康组,其中男25例、女25例,年龄(52.0±12.4)岁。纳入标准:①体检健康;②知情同意。排除标准:①有重大疾病病史;②正在用药。退出标准:①误漏诊;②晕针等原因未能完成采样。本研究经院伦理委员会批准。

1.2 方法

健康组、病例组均在入院时,采集肘部静脉血5 mL,1 h内送检,采用酶联免疫吸附法检测PDGF、IL-17水平。IL-17检测应用上海丰寿生物科技有限公司提供的试剂盒(规格96T/48T,货号952017031456),PDGF(规格96T/48T,货号YYB1056)由美国R&D公司生产,均严格按照说明书操作。

病例组常规化痰止咳等对症治疗,吸氧、营养

支持等支持治疗,早期肺康复,靶向治疗,同时中西医结合治疗,4周后,根据疗效分组,将显效患者纳入显效组、其余对象纳入对照组,对比治疗前、4周后2组对象的PDGF、IL-17以及变化值。病例组同时在治疗前、4周后,进行检查评分,将PDGF、IL-17与CT值进行相关性分析。

1.3 疗效评价^[3]

①显效:症状明显改善,活动能力增强,咳、痰、喘症状基本消失,且高分辨CT上肺间质病变减轻,下降≥20%;②稳定:症状改善,活动能力有所提高,咳、痰、喘症状明显缓解,不影响生活,高分辨CT肺间质病变积分无明显改变,变动幅度-9%~9%;③无效:症状明显加重,特异性呼吸困难、咳嗽加重,HRCT病变积分上升10%,或出现蜂窝肺、肺动脉高压征象。

1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计学处理,血清PDGF、IL-17指标水平以及肺部CT评分服从正态分布,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,病例组与健康组组间对比、显效组与对照组组间比较均采用 t 检验,显效组治疗前后组内对比、对照组治疗前后组内对比、病例组治疗前后组内对比采用配对 t 检验,相关性分析采用Spearman相关性分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 指标水平

病例组入院时、4周后PDGF、IL-17均高于健康组,差异有统计学意义($t=25.64$ 、 17.35 、 18.40 、 11.18 , $P=0.000$ 、 0.000 、 0.000 ,均 <0.05),见表1。

表1 病例组与对照组的PDGF、IL-17水平对比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PDGF, IL-17 levels between observation group and control group($\bar{x} \pm s$)

分组	PDGF(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	
病例组($n=94$)	治疗前	913.42±185.2	48.45±11.32
	4周后	543.4±132.5	35.23±12.41
健康组($n=50$)		215.6±115.9	20.35±3.44

2.2 疗效分组的指标水平

4周后,显效组45例、对照组49例。显效组治疗前、4周后的PDGF、IL-17均低于对照组,指标下降幅度高于对照组,差异有统计学意义($t=7.42$ 、

23.51、4.66、5.20、10.05、6.81, $P=0.000$ 、 0.000 、 0.001 、 0.000 、 0.000 、 0.000 , 均 <0.05), 见表2。

2.3 相关性分析

治疗前、4周后, PDGF、IL-17与肺部CT评分

存在正相关性($P<0.05$), PDGF、IL-17下降幅度与肺部CT评分下降幅度存在正相关性($P<0.05$), 见表3。

表2 显效组与对照组治疗前、4周的指标变化对比($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of the changes of indexes between the effective group and the control group in 4 weeks before treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	指标	治疗前	4周后	下降幅度(%)
显效组	45	PDGF	845.92±78.16	435.46±102.5	48.52±13.51
		IL-17	45.98±4.03	31.17±5.62	32.21±12.56
对照组	49	PDGF	975.41±94.52	642.53±147.31	34.13±14.18
		IL-17	50.72±7.86	38.96±10.43	23.19±14.59

表3 PDGF、IL-17与肺部CT评分相关性分析

Table 3 PDGF, IL-17 and pulmonary CT score correlation analysis

系数	PDGF			IL-17		
	治疗前	4周后	下降幅度	治疗前	4周后	下降幅度
r	0.382	0.431	0.398	0.476	0.575	0.496
P	0.012	0.364	0.011	0.012	0.020	0.025

3 讨论

PDGF、IL-17均与组织损伤、上皮损害、间质细胞损伤、炎症损伤关系密切,病情越重、病程越长,PDGF、IL-17指标水平越高^[4]。本次研究显示,无论是入院时,还是出院时病例组肺间质纤维化的患者PDGF、IL-17明显高于健康组($P<0.05$),与其他文献报道的结果相似,即肺纤维化患者PDGF、IL-17水平更高。不同文献报道肺间质纤维化患者的PDGF、IL-17水平也存在差异,PDGF在300~1 500 pg/mL不等,IL-17在25~80 pg/mL^[5-6],与本次研究结果相近。需要注意,白细胞介素是一类细胞因子,往往半衰期较短,如IL-16的半衰期仅为2 h,本组对象1 h内送检,可减少偏差,PDGF半衰期极短,送检延迟会导致PDGF下降。本研究中检测的血液中的PDGF、IL-17,符合前文提出的血液中PDGF、IL-17变化特征,再次证实血液中PDGF、IL-17可作为肺间质纤维化诊断依据。在今后,有必要开展肺泡灌洗液中的PDGF、IL-17指标分析,以进一步分析疾病严重程度、肺纤维化发展阶段、急性发作与肺泡PDGF、IL-17

水平的关系。

前文提到,不同研究中肺纤维化PDGF、IL-17水平存在显著的差异,这实际上反映了患者严重程度、肺纤维化发展阶段、急性发作特征。因此,理论上PDGF、IL-17可作为疾病阶段的判断依据,分析急性发作是否得到控制,从而评价疗效。类似的研究较多,有文献报道肺纤维化显效率可达60%以上,治疗后PDGF、IL-17较急性期显著下降,降幅可在20%~60%^[6-7]。目前并无关于不同疗效治疗前后PDGF、IL-17基础水平对比研究。但PDGF、IL-17与疾病严重程度有关,指标越低,提示患者的病情可能越轻,严重并发症发生风险较低,转归相对容易。反之,若治疗前PDGF、IL-17越高,则提示病情可能越重,肺纤维化越严重,病程更长,转归越困难。

本次研究显示,本组肺纤维化对象4周后显效组45例,不足50%,略低于其他文献报道的60%以上,这可能与本次研究的对象纳入时间较短、并非严格的治疗循证研究、治疗方法较为常规有关。从PDGF、IL-17指标变化来看,显效对象治疗前后PDGF、IL-17均低于对照组($P<0.05$),提示治疗前

指标越低、治疗期间降幅越高,则获得显效的可能性更高。也证实 PDGF、IL-17 可以作为疗效预测的指标,实际上反映了 PDGF、IL-17 与疾病严重程度、急性发作之间的相关性,与其它文献分析结果相似^[8]。

目前尚无有关于 PDGF、IL-17 与肺部 CT 评分相关性分析,现有的研究主要探讨 PDGF、IL-17 与 CRP 等其他指标的相关性,且一般为中高强度的相关性($r>0.5$)^[8]。本次研究显示,治疗前、4 周后,PDGF、IL-17 以及肺部 CT 评分以及降幅存在正相关性($P<0.05$),再次验证了肺部 CT 评分指标与疾病严重程度、疗效之间的关系,提示该指标可反映患者的疾病严重程度,同时该指标变化可反映肺纤维化的控制情况。从相关系数来看,IL-17 与肺部 CT 评分存在相关性似乎相对更高($r=0.476、0.575、0.496$),相关性相对更弱,低于这 2 项指标与其他血液标志物之间的相关性。

可能原因为:①在肺纤维化相关的细胞因子网络中,PDGF、IL-17 与某一项细胞因子网络往往存在密切的链条关系。如 IL-17 是炎症的启动因素,与肺间质损伤引起的细胞损伤、微炎症关系密切,作用的途径更少,与 CRP 关系更为密切^[9]。近年来,动物研究也证实,通过阻断 IL-17 作用可减轻肺纤维化^[10-11]。而 CT 一定程度上反映了肺纤维化长期作用所致肺损伤的情况,不容易受到急性发作影响,而 PDGF、IL-17 容易受到急性细胞损伤影响,相关性被明显削弱。②PDGF 与血小板破坏、巨噬细胞激活、炎症细胞浸润、受损内皮细胞等均存在相关性,关联的生理病理机制更为复杂,不仅与肺内间质损伤有关,还与合并原发病、缺氧引起的损伤以及微循环障碍所致的血小板功能变化等因素有关^[12-13]。与此同时,PDGF 可促胶原的产生与沉积,但这种作用是可逆转的,临床上许多药物均可通过调节 PDGF 发挥抗纤维化作用,这一点也会影响 PDGF 与肺纤维化的相关性,从而导致相关性下降^[14-15]。

因此,不推荐 PDGF、IL-17 作为肺纤维化所致的永久性损伤的一线分析指标,若需评估肺损伤,应在积极治疗患者并进入稳定期后,此时 PDGF、IL-17 可能更能反映患者肺纤维化所致的肺损伤情况。

综上所述,PDGF、IL-17 可作为肺纤维化辅助诊断指标,还可预测疗效,评估治疗效果。

参考文献

- [1] 赢珠,钟南山.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:87.
- [2] 陈永春,王天轶.特发性肺纤维化发病机制及治疗研究现状[J].临床误诊误治,2017,30(8):105-109.
- [3] 范碧君,蒋捍东.2015版特发性肺纤维化治疗指南解读[J].世界临床药物,2016,37(7):453-456.
- [4] 朱玉凤.肺纤维化细胞因子机制研究进展[J].当代医药论丛,2015,13(5):157-158.
- [5] Schiza S, Mermigkis C, Margaritopoulos GA, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and sleep disorders: no longer strangers in the night [J]. Eur Respir Rev, 2015, 24(136):327-339.
- [6] Nathan SD, du Bois RM, Albera C, et al. Validation of test performance characteristics and minimal clinically important difference of the 6 minute walk test in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Med, 2015, 109(7):914-922.
- [7] Ley B, Collard HR. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Clinical Epidemiology, 2013, 25(5): 483-492.
- [8] Huang CL, Li YY, Fan XM, et al. IL-17A promotes pulmonary inflammation in rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(4):366-370.
- [9] Qian H, Liu LJ. Protective effect and mechanism of IL-17 monoclonal antibody on mice with viral myocarditis [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(5):509-512.
- [10] 刘理静,钱红,尹辉明,等.IL-17单克隆抗体对肺纤维化大鼠的保护作用及部分机制研究[J].中国药理学通报,2015,31(11):1586-1592.
- [11] 黄成亮,李艳艳,范贤明,等.IL-17A促进博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺组织的炎症形成[J].细胞与分子免疫学杂志,2014,30(4):366-370.
- [12] 张效云,宋桂芹,鞏晓峰,等.阻断IL-17对博来霉素诱导小鼠肺纤维化及肺组织Fas/FasL表达的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(5):584-587,624.
- [13] 李永琦,卢绍蓉.白细胞介素与肺纤维化的研究进展[J].中国社区医师,2014,30(31):5-6.
- [14] 郝小惠,郭志义,李娟,等.姜黄素对矽肺纤维化大鼠肺组织血小板源性生长因子及胶原表达影响[J].中国职业医学,2013,40(5):411-415.
- [15] 刘宇娟,王昌明.血小板及其衍生长因子在肺纤维化中作用研究进展[J].国际呼吸杂志,2015,35(22):1744-1747.

代谢综合征对行根治术前列腺癌患者预后的影响

曾明坤¹ 刘玲^{2*} 张晓梅¹ 马涛¹

[摘要] **目的** 探究代谢综合征(MS)对行根治术前列腺癌患者预后的影响。**方法** 选择2013年1月至2016年12月西昌市人民医院收治的92例行根治性切除术的前列腺癌患者纳入研究,按照是否合并MS将患者分为前列腺癌合并MS组及单纯前列腺癌组。收集患者临床资料,随访并记录生化复发情况。**结果** 前列腺癌合并MS组及单纯前列腺癌患者体质量指数(BMI)、空腹血糖、高密度脂蛋白(HDL-C)、前列腺特异性抗原(PSA)、Gleason评分、病理分期、切缘阳性率等方面差异显著($P<0.05$); Logistic回归分析显示合并MS的患者肿瘤前列腺外浸润的风险为非MS患者的2.314倍, Gleason评分 ≥ 8 分的风险是非MS患者的1.849倍;前列腺癌合并MS组无生化复发生存时间显著短于单纯前列腺组($P<0.05$);合并MS、Gleason评分 ≥ 8 分、病理分期高及切缘阳性为前列腺癌患者生化复发的相关因素($P<0.05$)。**结论** 合并MS是影响根治性切除前列腺癌患者预后的危险因素。

[关键词] 代谢综合征; 前列腺癌; 生化复发

Effect of metabolic syndrome on prognosis of patients undergoing radical prostatectomy

ZENG Mingkun¹, LIU Ling^{2*}, ZHANG Xiaomei¹, MA Tao¹

(1. Department of Urology, Xichang People's Hospital, Xichang, Sichuan, China, 615000; 2. Department of Urology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of metabolic syndrome (MS) on the prognosis of patients undergoing radical prostatectomy. **Methods** A total of 92 patients with radical prostatectomy underwent radical resection admitted to Xichang People's Hospital from January 2013 to December 2016 were enrolled. Patients were divided into prostate cancer with MS group and prostate cancer group according to whether MS was combined. Patient clinical data were collected, followed up and biochemical recurrence was recorded. **Results** There were significant differences in preoperative body mass index (BMI), fasting blood sugar, high density lipoprotein (HDL-L), PSA, Gleason score, pathological stage and positive rate of incisional margin between prostate cancer with MS group and simple prostate cancer group ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that the risk of outside infiltration of tumor prostate in patients with MS was 2.314 times than that of non-MS patients. The risk with Gleason scores more than 8 was 1.849 times than that of non-MS patients. The survival time without biochemical recurrence in prostate cancer with MS group was significantly shorter than that in simple prostate cancer group ($P<0.05$). Combining MS, Gleason score more than 8, pathological stage and positive incisional margin were the related factors for biochemical recurrence of prostate cancer patients ($P<0.05$). **Conclusion** Prostate cancer combined with MS is a risk factor for the prognosis of patients with radical prostatectomy.

[KEY WORDS] Metabolic syndrome; Prostate cancer; Biochemical recurrence

基金项目:四川省卫计委科研项目(120206)

作者单位:1. 西昌市人民医院泌尿外科,四川,西昌 615000

2. 四川大学华西医院泌尿外科,四川,成都 610041

*通信作者:刘玲, E-mail: yide54950@sina.com

前列腺癌是威胁男性健康的主要生殖系统恶性肿瘤,在全球范围内发病率为9.7%,而发达国家可达15.3%,我国前列腺癌发病率虽低于欧洲国家,但近年来随着人口老龄化及生活方式的改变也呈逐年上升的趋势^[1]。既往研究表明,前列腺癌发生及发展除与年龄、种族及家族遗传史等固定因素相关外,肥胖、久坐、糖尿病、高血压及高营养摄入等诸多不确定因素也被证实与其相关^[2-3]。超重、糖尿病、高血压等均为代谢综合征的重要组成部分,既往关于代谢综合征与前列腺癌发生的相关性研究较多,但其在癌症侵袭性及预后方面的影响还有待大样本的验证^[4-5]。本研究以根治性前列腺切除术患者作为研究对象,分析代谢综合征与肿瘤侵袭性及术后复发之间的关系,旨在为前列腺癌治疗及预后评估提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2013年1月至2016年12月于凉山彝族自治州西昌市人民医院行根治性前列腺切除术的92例前列腺癌患者纳入研究,纳入标准:参考中华医学会泌尿外科学会前列腺癌诊断指南^[6],经病理检查确诊;临床资料完整;对本研究知情且签署同意书。排除标准:合并其他恶性肿瘤;因抗雄或去势治疗等情况导致肿瘤病理情况无法评估者;合并急、慢性肝肾功能障碍患者;有前列腺癌家族史者。

1.2 方法

临床资料收集:收集所有患者的体质量指数(body mass index, BMI)、空腹血糖、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL-L)等一般生化指标及前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)等实验室指标。按照患者是否合并代谢综合征将患者分为前列腺癌合并代谢综合征(metabolic syndrome, MS)组(60例)及单纯前列腺癌组(32例)。代谢综合征诊断标准参考《中国成人血脂异常防治指南》^[7]修订的组分量化标准:腹型肥胖腰围 ≥ 90 cm;空腹血糖 ≥ 6.1 mmol/L或餐后2 h血糖 ≥ 7.8 mmol/L;血压 $\geq 130/85$ mmHg;TG ≥ 1.7 mmol/L;HDL-L ≤ 1.04 mmol/L,符合以上项目中3项或以上者可确诊为代谢综合征。其中前列

腺癌合并MS组患者年龄范围49~78岁,平均年龄(58.62 \pm 8.94)岁;单纯前列腺癌患者年龄范围48~80岁,平均年龄(57.64 \pm 10.22)岁,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

根据手术情况及病理诊断报告进行患者病理T分期(pathological staging, pT),根据肿瘤是否存在前列腺外浸润分为肿瘤前列腺外浸润期组(pT₃~pT₄期)及局限组(pT₁~T₂期);根据Gleason评分^[8]分为低危组(Gleason评分 <8 分)及高危组(Gleason评分 ≥ 8 分)。

随访调查:对患者进行随访,随访以门诊随访及电话随访为主,第一年每3个月随访一次,之后每半年随访一次,连续随访3次未能取得联系则为失访,随访日期截止至2018年3月,随访内容为血清PSA水平,连续2次PSA水平 ≥ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 为生化复发^[9],生化复发时间为接受根治术日期至随访发现生化复发的时间间隔。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0进行数据的整理与统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 t 检验,MS对前列腺癌临床病理因素的影响采用Logistic多因素回归分析,患者术后生化复发采用Kaplan-Meier法及多因素Cox比例风险模型分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者临床资料比较

2组患者空腹血糖、BMI、HDL-C、PSA、Gleason评分、病理分期及切缘阳性比例等方面差异显著($P<0.05$),详见表1。

2.2 MS对前列腺癌患者前列腺外浸润及Gleason评分 ≥ 8 分的Logistic回归分析

经多因素Logistic回归分析校正年龄、术前PSA水平、病理分期等因素后,合并MS的患者肿瘤前列腺外浸润的风险为非MS患者的2.314倍;合并MS的患者Gleason评分 ≥ 8 分的风险是非MS患者的1.849倍,详见表2。

2.3 生存曲线分析

本研究最短随访时间为16个月,最长随访时间为61个月。采用Kaplan-Meier法构建生存曲线,经检验,前列腺癌合并MS组无生化复发生存时间显著短于单纯前列腺癌组($P<0.05$),见图1。

表1 2组患者临床资料比较

Table 1 Comparison of clinical data between 2 groups of patients

资料	前列腺癌合并MS组(n=60)	单纯前列腺癌组(n=32)	χ^2	P
空腹血糖(mmol/L)	6.95±1.02	5.63±1.21	5.537	0.000
BMI(kg/m ²)	29.56±3.26	22.13±2.96	10.741	0.000
TG(mmol/L)	4.56±0.89	4.22±0.74	1.846	0.068
TC(mmol/L)	1.66±0.58	1.52±0.34	1.253	0.213
HDL-C(mmol/L)	0.82±0.29	1.26±0.41	5.978	0.000
LDL-C(mmol/L)	3.02±0.65	2.82±0.51	1.509	0.135
术前PSA水平(ng/mL)				
<20	25(41.66)	22(68.75)	6.126	0.013
≥20	35(58.33)	10(31.25)		
病理 Gleason 评分				
<8分	18(30.00)	23(72.88)	14.813	0.000
≥8分	42(70.00)	9(28.12)		
病理分期				
pT ₁	12(20.00)	13(40.63)	10.033	0.002
PT ₂	18(30.00)	14(43.75)		
pT ₃	30(50.00)	5(15.63)		
切缘状态				
阴性	32(53.33)	26(43.33)	6.981	0.008
阳性	28(46.67)	6(18.75)		

表2 MS与前列腺癌患者前列腺外浸润及 Gleason 评分≥8分的 Logistic 回归分析

Table 2 Logistic regression analysis of extra-prostatic extracorporeal infiltration and Gleason score≥8 in patients with MS and prostate cancer

影响因素	前列腺外浸润			Gleason 评分≥8分		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
年龄	1.586	0.826~3.046	0.167	1.397	0.727~2.682	0.316
术前PSA水平	1.624	1.331~3.927	0.000	2.330	1.889~6.324	0.000
病理分期	3.220	1.564~5.623	0.000	2.614	1.564~4.267	0.000
合并MS	1.986	1.332~3.115	0.004	1.623	1.005~3.274	0.002

2.4 影响患者生化复发的Cox生存多因素分析

将各因素纳入Cox风险比例模型多因素分析显示,有无合并MS、Gleason评分、病理分期及切缘阳性为前列腺癌患者根治术后生化复发的影响因素($P<0.05$);合并MS的患者根治术后生化复发风险为非MS患者的1.23倍,见表3。

3 讨论

MS是以中心性肥胖、糖尿病或糖调节功能损伤、胰岛素抵抗、血脂异常及高血压等为共同病理生理基础,多种代谢疾病合并出现的临床症候群^[10]。部分学者认为MS为前列腺癌的新病因,但关于其与前列腺侵袭性及预后的相关研究仍存在

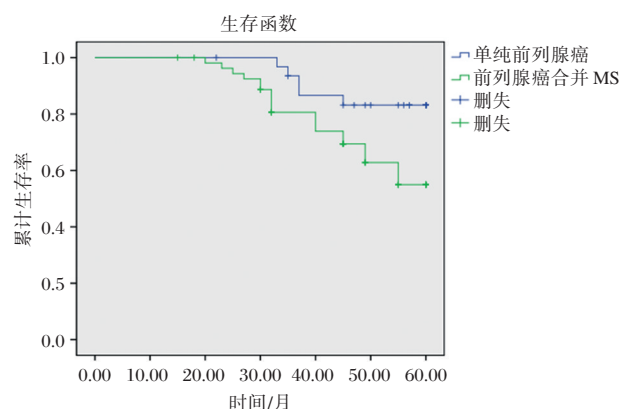


图1 采用Kaplan-Meier法分析2组患者生化复发情况
Figure 1 Kaplan-Meier analysis of biochemical recurrence in the 2 groups of patients

表3 影响患者生化复发的Cox多因素分析
Table 3 Coxmultivariate analysis of patients with biochemical recurrence

影响因素	生化复发多因素分析		
	OR	95%CI	P
术前PSA水平 ≥ 20	1.278	1.045~2.334	0.128
病理Gleason评分 ≥ 8 分	2.334	1.278~3.462	0.017
病理分期pT ₃	3.024	2.145~5.623	0.001
切缘状态阳性	3.147	2.614~5.946	0.000
合并MS	1.227	0.416~2.647	0.038

一定争议^[11-12]。

本研究结果显示,合并及不合并MS的患者在术前PSA水平、病理Gleason评分、病理分期及切缘阳性率等方面具有明显差异。分析MS与诸多前列腺癌临床资料的关系,其中PSA为临床筛查前列腺癌的主要指标,其水平在一定程度上反映患者的病情进展程度,合并MS的患者PSA <20 ng/mL的比例多于不合并MS的患者,提示MS可能与血清PSA水平相关,也证实MS与前列腺癌进展程度的相关性;Gleason评分、病理分期及切缘阳性率也可一定程度反映肿瘤侵袭的程度,合并MS的患者具有更高的Gleason评分、病理分期及切缘阳性率,提示合并MS的患者肿瘤恶性程度更高,推测MS的发生可能可加速前列腺肿瘤的进展,使得合并MS的患者具有更高的恶性程度。既往关于前列腺癌侵袭性与MS的相关性研究结果不尽相同,de Nunzio等人^[13]对195例前列腺癌患者进行研究发现,合并MS患者较非MS患者Gleason评分明显升高;郭耀川等

人^[14]证实代谢综合征与肿瘤前列腺外浸润及Gleason评分 >8 显著相关;但一项来自韩国的210例前列腺癌横断面调查中,MS与前列腺癌的病理分期及Gleason分级均无明显相关^[15]。本研究与前者结果类似,另外,本研究中多因素Logistic回归也进一步证实MS对前列腺癌侵袭性的影响,进一步证实MS是前列腺癌进展的危险因素,结合前人关于MS与前列腺癌分子机制研究,推测可能与MS中多种交叉关联的代谢激素通路的相互作用有关,如糖尿病患者胰岛素样生长因子升高、肥胖患者瘦素、白细胞介素、脂联素水平异常等。

根治性前列腺癌术后生化复发受诸多因素的影响,目前临床证实影响因素主要有血清PSA水平、临床分期、Gleason评分、切缘状态、手术方法等,这些因素相互影响,共同作用决定患者的预后^[16-17]。MS作为一种与前列腺癌发生发展相关的合并征,可能也与患者预后存在一定相关性。本研究生存分析结果提示合并MS的前列腺癌患者具有更短的生化复发时间,提示MS可能可在一定程度上提高根治术后生化复发率,降低患者预后。结合前人研究,分析MS与前列腺癌生化复发的关系,一方面,合并MS的前列腺癌患者肿瘤恶性程度更高,侵犯周围组织更多,术后肿瘤细胞极易再次复发;另一方面,合并MS的患者在根治术后机体也处于激素分泌失衡、炎性浸润状态中,长期的机体改变也可在一定程度上刺激肿瘤的生化复发。翟明慧等人^[18]研究证实T分期 $\geq T2$ 、Gleason评分 ≥ 7 分、治疗前PSA ≥ 10 ng/mL及肥胖的前列腺癌患者生化复发风险较高。本研究与其研究结果类似,但本研究对MS不同组分对患者预后的研究仍存在一定限制,后期可进一步针对单一组分进行分析、总结。

综上,MS与前列腺癌发展相关,是影响根治性前列腺癌患者术后生化复发的危险因素。

参考文献

[1] 中国抗癌协会泌尿男生殖系肿瘤专业委员会微创学组. 中国前列腺癌外科治疗专家共识[J]. 中华外科杂志, 2017, 55(10):217-220.
[2] Jian S, Li J, Wei W, et al. Curcumin induces G0/G1 arrest and apoptosis in hormone independent prostate cancer DU-145 cells by down regulating Notch signaling [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 8(4):177-184.

- [3] 韦高猛, 宾晓芸, 黄勇平. CYP17基因多态性和环境暴露因素交互作用与前列腺癌易感性的关系[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(5):26-27.
- [4] 马志方, 曾胜, 卜威振, 等. 代谢综合征与前列腺癌患者发生去势抵抗及骨转移的相关性[J]. 肿瘤研究与临床, 2018, 5(1):12-14.
- [5] Munkley J, Mills IG, Elliott DJ. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer[J]. *Nature Reviews Urology*, 2016, 13(6):324.
- [6] 中华医学会泌尿外科学分会前列腺癌联盟. 中国前列腺癌早期诊断专家共识[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(8):561-564.
- [7] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志, 2016, 16(10):15-35.
- [8] Zakian KL, Sircar K, Hricak H, et al. Correlation of proton MR spectroscopic imaging with gleason score based on step-section pathologic analysis after radical prostatectomy[J]. *Radiology*, 2015, 234(3):804-814.
- [9] 方志伟, 胡浩, 梁晨, 等. 前列腺癌根治术切缘阳性对患者术后生化复发的影响[J]. 临床泌尿外科杂志, 2017, 7(9):678-681.
- [10] 何宇纳, 赵文华, 赵丽云, 等. 中国2010-2012年成年人代谢综合征流行特征[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(2):212-215.
- [11] Marquis K, Maltais F, Duguay V, et al. The metabolic syndrome in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Egyptian Journal of Chest Diseases & Tuberculosis*, 2016, 65(3):593-596.
- [12] Salgadamontilla J, Salgado MS, Trautmann BS, et al. Association of serum lipid levels and prostate cancer severity among Hispanic Puerto Rican men[J]. *Lipids in Health & Disease*, 2015, 14(1):1-7.
- [13] de Nunzio, Cosimo, Trucchi, et al. 1849 The presence of widespread hgpin on prostatic biopsy predicts the risk of prostate cancer on a subsequent biopsy[J]. *Journal of Urology*, 2010, 183(4):e718-e718.
- [14] 郭耀川, 陈鹏, 曹德宏, 等. 代谢综合征与前列腺癌根治术后病理特征的相关性研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2018, 5(1):19-22.
- [15] Trump DL. Commentary on "Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy." [J]. *Urologic Oncology Seminars & Original Investigations*, 2013, 31(8):1846-1846.
- [16] 范艳平, 卢经君, 唐静怡, 等. 老年中晚期前列腺癌患者预后影响因素的Logistic回归分析[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2016, 5(5):547-549.
- [17] 王跃, 杜少静, 张晋夏, 等. 年轻前列腺癌患者28例临床病理特征及预后分析[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(6):22-24.
- [18] 翟明慧, 胡尔西旦·尼牙孜, 刘攀, 等. 早期前列腺癌不同治疗模式的疗效及生化复发的危险因素分析[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(6):601-605.

(上接第106页)

- [15] 方小龙, 王莉平, 林立鹏, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶基因及耐消毒剂基因研究[J]. 中国热带医学, 2018, 18(2):107-115.
- [16] 万强, 薄志坚, 陈杨, 等. 大连地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶检测及耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(4):405-408.
- [17] 何立志, 黄露萍, 李志芳, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶的检测及耐药性分析[J]. 检验医学, 2013, 28(5):353-356.
- [18] Fang ZL, Zhang LY, Huang X, et al. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 21:124-128.
- [19] Chi HK, Hee YK, Bo RK, et al. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals[J]. 2016, 54(1):44-49.
- [20] 颜英俊, 喻华, 周忠华, 等. 亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌oprD基因突变的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(4):451-454.
- [21] 王娟, 王前, 张秀明, 等. 广东中山地区铜绿假单胞菌外膜蛋白OprD2缺失研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(1):71-73.
- [22] 多丽波, 张联博, 栾英, 等. 哈尔滨地区铜绿假单胞菌外膜蛋白D2与亚胺培南耐药关系研究[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(2):147-148.
- [23] 杨春, 历建芝, 朱效茹, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(2):173-176.

玉溪地区高敏肌钙蛋白 T 在人群中的分布特点分析

叶丹^{1,2} 冯磊² 吴英松^{1*}

【摘要】 目的 了解玉溪地区高敏肌钙蛋白 T (high sensitive cardiac troponin-T, hs-cTnT) 在普通人群中的分布特点。 方法 以玉溪市人民医院 2017 年 7 月至 10 月的 1 594 例 18~89 岁健康体检者为研究样本, 对 hs-cTnT 在普通健康人群检出率、分布特点及与常规生化指标的相关性进行统计分析。 结果 ①hs-cTnT 在普通健康人群检出率为 57.31%, 其中男性的检出率是 74.52%, 女性的检出率是 23.75%; ②普通健康人群中男性的 hs-cTnT 平均水平为 (5.59±5.08) ng/L, 女性为 (3.46±1.45) ng/L, 男性与女性 hs-cTnT 水平有统计学差异 ($P<0.05$), 各年龄段 hs-cTnT 水平比较男性均高于女性; ③hs-cTnT 水平随年龄增长而增大, 男性和女性 66 岁以上人群与其它各年龄组人群的 hs-cTnT 水平比较均有统计学差异 ($P<0.05$); ④hs-cTnT 与年龄和肾功能指标尿素 (urea nitrogen, Urea)、肌酐 (creatinine, Crea) 尿酸 (uric acid, UA) 呈明显正相关。 结论 hs-cTnT 存在性别和年龄的分布差异, 应建立不同性别、不同年龄的参考区间; 56 岁以下女性 hs-cTnT 检出率较低, 将其作为心脑血管疾病早期筛查和监测的指标意义有限。

【关键词】 高敏肌钙蛋白 T; 分布特点; 早期筛查

Analysis of distribution characteristics of high-sensitivity troponin T in the population in Yunnan Yuxi area

YE Dan^{1,2}, FENG Lei², WU Yingsong^{1*}

(1. Institute of Antibody Engineering, School of Laboratory and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Laboratory Department of the Sixth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yuxi, Yunnan, China, 653100)

【ABSTRACT】 Objective To understand the distribution characteristics of highly sensitive cardiac troponin-T (hs-cTnT) in the general population in Yuxi area. Methods A total of 1 594 healthy people aged 18-89 years old from July to October 2017 in Yuxi People's Hospital were selected as samples to study the detection rate and distribution characteristics of hs-cTnT in the general healthy population. The detection rate, distribution characteristics and correlation with routine biochemical indicators of hs-cTnT were analyzed. Results ① The detection rate of hs-cTnT was 57.31% in the general healthy population, 74.52% in males and 23.75% in females. ② The average level of hs-cTnT was (5.59±5.08) ng/L in males and (3.46±1.45) ng/L in females. There was significant difference between males and females ($P < 0.05$). The level of hs-cTnT in males was higher than that in females in all age groups. ③ The level of hs-cTnT increased with age. There were significant differences in the levels of hs-cTnT between aged over 66 in both males and females and other groups ($P<0.05$). ④ hs-cTnT was positively correlated with age and renal function indicators such as urea nitrogen (Urea), creatinine (Crea) and uric acid (UA). Conclusion There is a

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460326)

作者单位: 1. 南方医科大学检验与生物技术学院抗体工程研究所, 广东, 广州 510515

2. 昆明医科大学第六附属医院检验科, 云南, 玉溪 653100

*通信作者: 吴英松, E-mail: yingsongwu@hotmail.com

difference in gender and age distribution between hs-cTnT, and reference intervals of different genders and ages should be established. Since the detection rate of hs-cTnT is lower in women under 56 years old, It has limited significance as an indicator for early screening and monitoring of cardiovascular and cerebrovascular diseases.

[KEY WORDS] High sensitive cardiac troponin-T; Distribution characteristics; Early screening

据2017年中国心血管病报告显示,心血管疾病已经超过恶性肿瘤和其他疾病,成为中国城乡居民总死亡原因的首位^[1]。心血管疾病的患病率和死亡率还呈逐年上升趋势^[2],如何提高心血管疾病的早期识别、预防能力是亟待解决的问题。高敏肌钙蛋白T(high sensitive cardiac troponin-T, hs-cTnT)由于其高敏感性和高特异性,被欧洲心脏病协会和我国专家一致认为是早期诊断急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)以及对心脏疾病进行危险分层的最好依据^[3-4],低浓度高敏肌钙蛋白的动态监测对AMI的诊断也是意义重大^[5]。但最新研究表明^[6-8],高敏肌钙蛋白在国外部分种族的女性人群中检出率较低,且不同种族的参考区间存在差异。玉溪是少数民族较多的高原地区,本地区高敏肌钙蛋白的检出率及分布情况是否同国外及其他地区人群有差异?本地区现行的高敏肌钙蛋白的参考区间是采纳试剂说明书建议,没有性别和年龄差异,又是否适用本地区人群?带着疑惑笔者对玉溪市1 594例健康体检人群hs-cTnT检出率和分布特点以及与常规生化检测指标相关性进行分析,旨在为高原地区心血管疾病的防治提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2017年7月至10月在玉溪市人民医院进行健康体检者1 594例,均为在玉溪本地生活5年以上人群,年龄18~89岁,平均年龄47岁,其中男性1 099例,女性495例。将研究对象按年龄分为<26岁(男性18例,女性26例)、26~35岁(男性184例,女性142例)、36~45岁(男性222例,女性103例)、46~55岁(男性413例,女性169例)、56~65岁(男性134例,女性33例)、≥66岁(男性128例,女性22例)共6组。本次研究目的是探讨普通人群的hs-cTnT分布特点,故所选对象均为健康体检的普通人群,仅排除急性疾病和肝肾病史,且实验室相关检查(血常规、肝功能、肾功能、血糖、血

脂)有明显异常者。

1.2 检测设备及方法

1.2.1 试剂和仪器

Roche hs-cTnT试剂盒、总胆红素(total bilirubin, TBIL)试剂盒、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)试剂盒、间接胆红素(indirect bilirubin, IBIL)试剂盒、总蛋白(total protein, TP)试剂盒、白蛋白(albumin, Alb)试剂盒、球蛋白(globulin, Glo)试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、谷氨酰转肽酶(gamma glutamyl transferase, GGT)试剂盒、UREA试剂盒、CREA试剂盒、UA试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒、载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒、载脂蛋白A1(apolipoprotein A1, ApoA1)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒、脂蛋白a[lipoprotein(a), LP(a)]试剂盒, Roche cobas e 601全自动电化学发光分析仪, Roche cobas 701全自动生化分析仪,上述试剂和仪器均为瑞士罗氏公司生产。

1.2.2 检测方法

研究人群空腹12 h以上,于次日上午7:30至9:00采静脉血5 mL,并在2 h内分离血清,按照试剂盒说明及仪器操作程序,于4 h内完成检测。hs-cTnT试剂检测范围是3~10 000 ng/L,检出率为实测≥3 ng/L的人群占研究人群的比例。

1.3 质量控制

按照实验室室内质量控制操作程序,hs-cTnT和常规生化项目采用罗氏配套校准品和质控品,均在控后开始样本检测,本实验室hs-cTnT批间不精密度变异系数(coefficient of variation, CV)为3.48%,此次研究项目均参加卫生部临床检验中心室间质量评价且近3年成绩格。

1.4 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单向方差分析;相关性分析采用Spearman秩相关;计数资料采用四格表方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hs-cTnT在男性和女性的检出率情况

从表1可见,男性hs-cTnT的检出率是74.52%,各年龄段的检出率均大于50%;女性的检出率是23.75%,仅56岁以上人群的检出率高于50%。男性和女性的检出率在26岁后均随年龄的增长而增大,男性66岁前检出率均高于女性,有显著差异($P<0.05$)。

2.2 hs-cTnT在人群分布的情况

从表2可见,普通健康人群每个年龄组男性与女性hs-cTnT水平比较均有统计学差异($P<0.05$),男性均高于女性。另外,将男性和女性各年龄组进行卡方检验,分别比较同性别各年龄组间hs-cTnT水平,结果显示男性各年龄组总体有统计学差异($P<0.05$),其中66岁以上组人群与其它各年龄组人群的hs-cTnT水平比较均有统计学差异($P<$

表1 hs-cTnT检出率比较

Table 1 Comparison of detection rate of hs-cTnT

年龄(岁)	男性		女性		χ^2	P
	n	检出率(%)	n	检出率(%)		
<26	18	88.89	26	19.23	20.687	0.000
26~35	184	59.78	142	7.75	92.981	0.000
36~45	222	62.61	103	10.68	76.354	0.000
46~55	413	75.30	169	17.16	166.901	0.000
56~65	134	88.06	33	57.58	16.697	0.000
≥66	128	97.66	22	90.91	0.972	0.324*
合计	1 099	74.52	495	23.75	427.133	0.000

*表示该值采用的是校正结果。

0.05),56~65岁组人群与26~35、36~45岁2组人群hs-cTnT水平比较有统计学差异($P<0.05$),56岁以下4组人群之间比较无统计学差异($P>0.05$);女性各年龄组总体也有统计学差异($P<0.05$),其中66岁以上组人群与其它各年龄组人群的hs-cTnT水平比较均有统计学差异($P<0.05$),56~65岁组人群与26~35岁、36~45岁、46~55岁3组人群hs-cTnT水平比较有统计学差异($P<0.05$),56岁以下4组人群之间比较无统计学差异($P>0.05$)。

表2 hs-cTnT在人群中的分布比较

Table 2 Comparison of population distribution of hs-cTnT

年龄(岁)	男性		女性		t 值	P 值
	n	hs-cTnT(ng/L)	n	hs-cTnT(ng/L)		
<26	18	5.93±2.75	26	3.55±1.24	3.899	0.000
26~35	184	4.36±2.47	142	3.14±0.87	5.613	0.000
36~45	222	4.38±1.98	103	3.09±0.35	6.524	0.000
46~55	413	5.16±3.50	169	3.33±1.33	6.566	0.000
56~65	134	6.78±9.00	33	4.15±1.72	3.167	0.002
≥66	128	9.61±7.66	22	7.12±2.60	2.838	0.006
合计	1 099	5.59±5.08	495	3.46±1.45	9.170	0.000
F 值	-	25.321	-	48.345	-	-
P 值	-	0.000	-	0.000	-	-

又从图1可见,男性和女性hs-cTnT水平变化趋势相似,均表现为35岁前呈下降趋势,45岁后随年龄增长逐渐升高的趋势。其中,女性hs-cTnT水平在55岁后呈现快速上升趋势。

2.3 hs-cTnT与年龄及常规生化检测指标的相关性分析

从表4可见,男性hs-cTnT与年龄、Glo、Urea、

Crea、UA呈正相关($R>0, P<0.05$),与Alb、A/G、ALT呈负相关($R<0, P<0.05$),女性hs-cTnT与年龄、TBIL、DBIL、IBIL、ALT、AST、ALP、Urea、UA、TC、TG呈正相关($R>0, P<0.05$),总体研究人群hs-cTnT与年龄、TB、DB、IB、A/G、ALT、AST、ALP、GGT、Urea、Crea、UA、TC、TG、ApoB呈正相关($R>0, P<0.05$),与HDL-C、ApoA1呈负相关($R<0, P<$

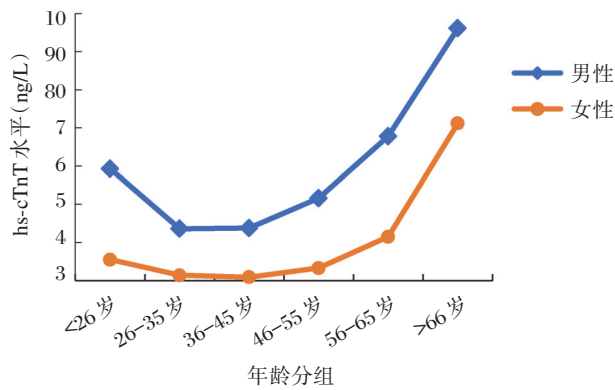


图1 男性和女性 hs-cTnT 水平年龄分布图

Figure 1 Distribution of hs-cTnT levels in males and females

表4 hs-cTnT 与年龄及常规生化检测指标的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of hs-cTnT with age and routine biochemical indicators

项目	男性		女性		合计	
	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值
年龄	0.384	0.000	0.343	0.000	0.411	0.000
TBIL	0.025	0.407	0.120	0.008	0.145	0.000
DBIL	0.048	0.110	0.102	0.023	0.142	0.000
IBIL	0.008	0.798	0.121	0.007	0.134	0.000
TP	0.019	0.521	0.069	0.125	0.019	0.440
Alb	-0.107	0.000	0.023	0.611	0.046	0.068
Glo	0.089	0.003	0.058	0.201	-0.032	0.195
A/G	-0.115	0.000	-0.021	0.635	0.052	0.038
ALT	-0.08	0.008	0.115	0.011	0.123	0.000
AST	0.002	0.942	0.161	0.000	0.154	0.000
ALP	0.046	0.128	0.132	0.003	0.160	0.000
GGT	-0.058	0.053	0.015	0.742	0.198	0.000
Urea	0.141	0.000	0.167	0.000	0.211	0.000
Crea	0.168	0.000	0.076	0.091	0.405	0.000
UA	0.092	0.002	0.180	0.000	0.351	0.000
TC	0.013	0.661	0.104	0.021	0.082	0.001
TG	-0.010	0.736	0.104	0.020	0.182	0.000
HDL-C	-0.036	0.238	0.045	0.314	-0.176	0.000
LDL-C	0.010	0.743	0.032	0.484	0.030	0.224
ApoA1	-0.062	0.041	0.032	0.477	-0.147	0.000
ApoB	0.021	0.482	0.068	0.131	0.146	0.000
LP(a)	0.034	0.258	-0.009	0.844	-0.25	0.317

0.05), 总体人群 hs-cTnT 与年龄和肾功能指标相关性较强。

3 讨论

高敏肌钙蛋白作为急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)诊断、危险分层和预后判断的首选心肌损伤标志物,其价值已得到国内外的认可^[3-4]。当心肌缺血不严重或心电图改变不明显时,能检出低浓度高敏肌钙蛋白,或能动态监测高敏肌钙蛋白的变化,则可及时发现高危人群,进行医学干预或治疗。由于检测方法学、试剂厂商及检测灵敏度不同等原因,国内外对高敏肌钙蛋白在普通人群的早期 ACS 筛查以及风险评估一直没有明确共识,仅定义了能在部分或全部表观健康人群中检出肌钙蛋白,且同时第 99 百分位值 CV≤10%才能称为高敏肌钙蛋白^[4]。2018 年国际临床化学和检验医学联合会发布了最新肌钙蛋白检测特异性质量标准^[9],提出高敏肌钙蛋白需满足在男性和女性表观健康人群中检出比例均应高于 50%,本次研究结果显示 hs-cTnT 在玉溪地区 56 岁以下女性人群检出率均低于 50%,未达到上述标准要求。新的研究还表明高敏肌钙蛋白在不同种族参考区间存在差异^[6-7]。玉溪地区少数民族种类较多,因此有必要了解 hs-cTnT 在普通人群的分布和检出特点,从而指导本地区心血管疾病的防治。

与 Gunsolus 等人的研究^[7]相比,本次研究男性和女性检出率均有所偏高,分析原因:①56 岁以下女性 hs-cTnT 均值 < 4 ng/L,接近试剂最低检出限,而本研究所用高敏肌钙蛋白试剂盒灵敏度已高于传统试剂^[10],但仍不能灵敏监测 56 岁以下女性人群的变化,表明 hs-cTnT 作为 56 岁以下女性心血管疾病风险监测的意义值得商榷,同时也提出,厂家应在试剂灵敏度方面继续努力。②可能与研究人群选择及年龄构成有关,Gunsolus 等人^[5]的研究对象均为国外人群且年龄构成不明,而本次研究对象为高原地区人群,年龄构成以 36~55 岁为主。③本次研究对象为普通人群,未完全按 Apple 等人^[11]的表观健康人群标准筛选对象,故研究结果高于国外人群。

本次研究男性和女性 hs-cTnT 水平均高于四川地区^[12]人群,而玉溪地处云贵高原,平均海拔 1 600 多米,hs-cTnT 水平是否与高海拔有关,也需进一步研究。此次研究还发现,男性各年龄段 hs-cTnT 水平均高于女性,而男性心血管发病危险被证实普遍高于女性^[13],考虑可能与心血管疾病的多种危险因素有关,如:糖尿病、慢性肾病、冠脉微

循环损伤等。此外,男性和女性 hs-cTnT 水平均随年龄增长而增大,同性别 66 岁以上人群与其他年龄段人群 hs-cTnT 水平也有明显差异。因此,试剂盒说明书参考区间未进行性别和年龄区分已不适用。

此外,男性和女性 hs-cTnT 水平在 26 岁后均呈下降趋势,达最低点后又随年龄开始增长,符合 hs-cTnT 生理变化^[14]。新生儿时期 hs-cTnT 最高,儿童期下降,45 岁后随心肌凋亡细胞的增多,肌钙蛋白释放增加,但随年龄增大肾脏功能下降,肌钙蛋白及其代谢产物从肾脏的清除率下降,从而导致血清水平逐渐升高。本次研究分析了 hs-cTnT 与年龄及常规生化指标相关性,发现 hs-cTnT 与年龄和肾功能指标相关性较强,与北京地区卢丹等人^[15]的研究结果相似,均表明 hs-cTnT 与肾脏代谢有关。但是否年龄越大 hs-cTnT 就越高,还需增大样本量进一步研究。另外,女性 hs-cTnT 检出率及 hs-cTnT 水平在 36~45 岁开始随年龄增长缓慢上升,56~65 岁时出现一个明显转折点后开始急剧上升,考虑与女性绝经期激素变化有关,绝经后女性睾酮与雌二醇比值增高会增大心血管疾病发病风险^[16]。

总之,基于本研究我们建议玉溪地区应建立不同性别、不同年龄段的 hs-cTnT 参考区间,而 56 岁以下女性 hs-cTnT 检出率较低,在现有检测条件下,将其作为 56 岁以下女性心脑血管疾病早期筛查和监测的指标意义有限。但本次研究样本例数偏少,尤其 56 岁以上女性人群占比较低,研究结果可能存在一定偏倚,后续还需增大样本量,多中心联合共同研究探讨。

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1):1-8.
- [2] 马丽媛,吴亚哲,王文,等.《中国心血管病报告 2017》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2018, 23(1):3-6.
- [3] Chenevier-Gobeaux C, Bonnefoy-Cudraz, É, Charpentier S, et al. High-sensitivity cardiac troponin assays: Answers to frequently asked questions[J]. Archives of Cardiovascular Diseases, 2015, 108(2):132-149.
- [4] 中华心血管病杂志编辑委员会,中华医学会心血管病学分会.高敏心肌肌钙蛋白在急性冠状动脉综合征中的应用中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(10):809-812.
- [5] 黎卓华,吴学诗,吴丽川,等.高敏肌钙蛋白低水平升高的临床研究[J]. 检验医学与临床, 2014(z1): 100-102, 103.
- [6] Pretorius CJ, Tate JR, Wilgen U, et al. A critical evaluation of the Beckman Coulter, Access hs TnI: Analytical performance, reference interval and concordance [J]. Clinical Biochemistry, 2018, 55:49-55.
- [7] Gunsolus IL, Jaffe AS, Sexter A, et al. Sex-specific 99th percentiles derived from the AACC Universal Sample Bank for the Roche Gen 5 cTnT assay: Comorbidities and statistical methods influence derivation of reference limits [J]. Clinical Biochemistry, 2017, 50(18):1073-1077.
- [8] Koerbin G, Abhayaratna WP, Potter JM, et al. Effect of population selection on 99th percentile values for a high sensitivity cardiac troponin I and T assays [J]. Clinical Biochemistry, 2013, 46(16-17):1636-1643.
- [9] Wu AHB, Christenson RH, Greene DN, et al. Clinical laboratory practice recommendations for the use of cardiac troponin in acute coronary syndrome: expert opinion from the Academy of the American Association for Clinical Chemistry and the Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [J]. Clinical Chemistry, 2018, 64(4):645-655.
- [10] 宋凌燕,吴炯,宋斌斌,等.高敏感方法检测心肌肌钙蛋白 T 的分析性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9):814-818.
- [11] Apple FS, Ler R, Murakami MM. Determination of 19 Cardiac Troponin I and T Assay 99th Percentile Values from a Common Presumably Healthy Population [J]. Clinical Chemistry, 2012, 58(11):1574-1581.
- [12] 郭英,都向阳,黄华兰,等.四川地区高敏肌钙蛋白 T 参考值的建立及其在胸痛患者中诊断急性心肌梗死的价值[J]. 四川大学学报(医学版), 2017, 48(6):905-910.
- [13] 张干深,罗丽莎,崔芳芳,等.1990 年与 2015 年中国心血管病危险因素疾病负担分析[J]. 中国卫生统计, 2018, 35(3):375-379.
- [14] 胡孝彬,逯心敏,于晓,等.健康人群心肌标志物参考区间调查[J]. 检验医学, 2013, 28(7):573-576.
- [15] 卢丹,吴小慧,桂媛,等.北京地区表观健康成年人人群中高敏肌钙蛋白 I 参考范围的初步建立[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(9):674.
- [16] Zhao D, Guallar E, Ouyang P, et al. Endogenous Sex Hormones and Incident Cardiovascular Disease in Post-Menopausal Women [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2018, 71(22):2555-2566.

影像技术和分子检测技术在阿尔茨海默病诊断中的应用研究进展

李卓然 魏新华* 江新青*

[摘要] 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是以进行性发展的神经系统退行性变为特征的病变,它给患者、家庭和社会造成了很大的负担,因此亟待寻找早期诊治AD的方法。目前,神经影像新技术和分子检测技术发展迅速,如对海马、灰质等的测量与基因检测等,都对AD的早期诊断有非常重要的价值。本文将结合国内外关于影像技术和分子检测技术在AD早期诊断中的应用进展作一综述,为AD的预防管理提供新思路。

[关键词] 阿尔茨海默病;影像技术;人工智能;分子诊断

Advances in the application of imaging and molecular detection technology in the diagnosis of Alzheimer's disease

LI Zhuoran, WEI Xinhua*, JIANG Xinqing*

(Department of Radiology, the Affiliated Guangzhou First Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510180)

[ABSTRACT] Alzheimer's disease (AD) is a disease characterized by progressive neurodegeneration of the nervous system, which imposes a great burden on patients, families and society. Therefore, it is urgent to find a way to diagnose AD early. At present, the rapid development of new neuroimaging technology and molecular detection technology, such as the measurement of hippocampal, gray matter and gene detection, are of great importance to the early diagnosis of AD. In this paper, the application of imaging technology and molecular detection technology in the early diagnosis of AD at home and abroad will be reviewed, to provide new ideas for the prevention and management of AD.

[KEY WORDS] Alzheimer's disease; Imaging technology; Artificial intelligence; Molecular techniques

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种起病隐匿、进行性发展的神经系统退行性疾病。AD在临床上多以记忆障碍为最初特征,并可发展为认知能力丧失、视空间技能损害以及人格和日

常行为性格改变等症状,患者日常生活能力会逐渐下降甚至生活完全不能自理,严重者会呈现全面性痴呆^[1],给患者、家庭和社会造成了沉重的负担。AD病因迄今未明,65岁以前发病者,称早老

基金项目:国家自然科学基金项目(81571665);广州市科技计划项目(201804010032)

作者单位:广州医科大学附属市一人民医院放射科,广东,广州 510180

*通信作者:魏新华, E-mail:weixinhua.hy@qq.com; 江新青, E-mail:jiangxqw@163.com

性痴呆;65岁以后发病者称老年性痴呆,女性较男性多(女:男比例为3:1)。数据显示,我国目前阿尔茨海默病患者人数已居世界第一,约占世界总病例数的1/4^[2]。随着我国老年化进程的进一步加快,AD的早期预防、早期诊疗显得尤为重要。近年来,有关遗传性AD基因突变而引起 β 淀粉样蛋白(amyloid β , A β)长度改变的分子生物学机制研究^[3]及基因突变与神经影像学生物标志物的时空变化等研究^[4]受到广泛关注。本文将结合国内外关于影像技术和分子检测技术在AD早期诊断中的应用进展作一综述,为AD的预防管理提供新思路。

1 影像技术在AD早期诊断中的应用研究

1.1 海马及颅脑结构的测量对AD的应用

Dolek等^[5]用磁共振成像方法测量痴呆患者,并通过对实验对象的认知功能进行了一些心理状态检查,结果显示不同类型的痴呆患者均有海马体积缩小情况,并且痴呆症的严重程度随着海马体积的减少而增加,该研究认为海马体积萎缩与认知障碍程度之间存在着正相关关系。因此,笔者推测对高度怀疑可能患有AD的患者,可通过磁共振成像技术定期随访患者海马体积的变化来判断患者病情进展情况,也许可以在更早期发现AD患者,更早地给予AD患者药物干预,延缓AD的发展进程。

Stout等^[6]报道,阿尔茨海默病痴呆患者言语学习记忆的局部脑体积会发生丢失,证明AD的语言缺陷不仅与颞叶边缘皮质萎缩有关,同时也与脑丘体的损伤有关,并认为脑丘体的损伤是AD患者中最早和最严重的病理部位。Whitwell等^[7]选择了33例遗忘型轻度认知障碍(amnesic mild cognitive impairment, aMCI)患者作为研究对象,并进行了3次连续的核磁共振扫描(AD确诊的3年前、1年前和确诊时等3个不同时间点)进行随访研究,研究结果表明灰质流失的模式主要集中在内侧颞叶,包括杏仁核、海马和内侧嗅区皮质,与对照组相比,有更多的梭状回参与,核磁共振扫描显示AD最早的变化发生在前内侧颞叶和梭状回。

梁洪等学者^[8]基于磁共振图像(magnetic resonance imaging, MRI)的AD和轻度认知障碍(mild cognitive impairment, MCI)海马子域的关联研究

结果显示海马子域的体积在AD和MCI患者中较健康人有明显的萎缩,认为海马及其子域体积萎缩可作为AD早期诊断的标记。Varon等^[9]研究认为在AD中,神经退行性萎缩是从内侧嗅区皮质到海马(hippocampus, HP),还涉及边缘系统和新大脑皮层,并认为内侧嗅区皮质的轻微萎缩导致的损害比海马轻微萎缩导致的损害更大,因此通过测量内侧嗅区皮质厚度及新皮质相关区域对早期AD患者的诊断具有较高的准确率(90%以上)。而Cavedo等^[10]学者的研究结论则认为杏仁核内侧结构差异与AD最为相关。

综上所述,AD的发生与颅脑病变密切相关,其中海马、内侧嗅区皮质、新大脑皮层等的萎缩程度与AD的严重程度关系较大,通过常规颅脑部MRI检测,并对上述区域改变状况进行详细描述、对颅脑结构进行详细分析是非常有意义的。但由于海马等部位测量时对图像质量要求较高,同时判读者的主观因素对测量影响较大,因此,要得到一个准确性高的结果,既要进一步提高图像的质量,同时也要进一步制定规范化的测量标准,还要提高阅片人员的判读能力。

1.2 人工智能与静息态功能磁共振(functional MRI, fMRI)的应用

随着人工智能时代的发展,计算机通过自动深度学习和训练可快速自动地分析不同脑区灰质体积大小以及其内部结构的改变情况,从而对阿尔茨海默病进行预测与分类^[11]。Jiménez-Huete等^[12]认为,可用前后缘(anteroposterior limbic, APL)与初级后缘(primary-toposterior limbic, PPL)的前、后边缘比值大小不同作为阿尔茨海默病的MRI容积的标记物,从而有效地对早期AD病患者行鉴别性诊断,为早期AD的药物干预提供了实验依据。王吉喆等^[13]提出了一种利用三维格子玻尔兹曼模型,他们结合形变模型曲面演化思想,对阿尔茨海默症患者脑部磁共振图像进行了分割海马实验。这个实验证实格子玻尔兹曼方法可快速准确地获得海马体积变化。另外,还有学者^[14]用相似软件发现具有轻度认知衰退的老年人海马及杏仁核会发生物质丢失,其上外侧面萎缩较为明显,并且左侧海马体积和结构的变化可以用来预测病情的短期发展。还有文献报道^[15]以阿尔茨海默病患者的脑皮层厚度作为数据集,可利用最大相关最小冗余(Maximum correlation minimum

redundancy, mRMR)方法对支持向量机递归特征消除(Support vector machine recursive feature elimination, SVM-RFE)方法进行改进,以提高MCI人群和正常人群分类的准确率。

一项涉及95例早产儿和83例成年人的脑部结构和功能磁共振成像技术的比对结果分析显示,在皮质和皮层网络中发现了内在功能连接的差异^[16]。脑部结构上的差异位于皮层下、颞叶和扣带区域,早产儿内在功能连接网络的差异是重叠的,并且与异常的区域灰质体积有关,特别是在皮层和颞区。Papma等^[17]探讨了海马功能、体积及连接对早期AD(轻度认知障碍)患者情景记忆fMRI的后扣带回皮质(posterior cingulate cortex, PCC)功能的影响,结果显示在MCI的情景记忆中,PCC与海马的激活之间存在着某种联系。上述研究认为PCC功能与MCI的海马功能有关,PCC的作用与MCI的海马结构无关,而功能网络的改变是MCI中PCC功能的重要预测因子。

目前,有关皮质和皮层网络连接方面的研究已成为对大脑功能研究的一个新的研究热点。而利用模型结合先进软件技术研究AD患者的大脑结构和功能变化,既可以提高轻度认知障碍人群和正常人群分类的准确率,也可以节省医疗资源。但临床工作中每个患者的具体情况是千变万化的,没有一个是完全相同的案例,因此,如何才能有效地训练计算机,教会计算机通过深度学习各种千差万别的案例,做到准确而灵活地掌握判读各种病例的能力,还要待以时日。

1.3 图论功能连接对AD的研究

目前,基于图论(graph theory)的复杂网络定量分析的最新发展已被迅速转化为对大脑网络组织的研究。大脑的结构和功能系统具有复杂网络的特征——比如小世界拓扑、高度互联的中枢和模块性——既包括人类神经成像的全脑规模,也包括非人类动物的细胞层面。大脑连通性网络建模的研究出现了爆炸式的增长^[18-19],近年来,非侵入性神经成像和神经生理学技术[如结构MRI、扩散MRI、功能性核磁共振成像和脑电信号(electroencephalogram, EEG)/脑磁信号(Magnetoencephalography, MEG)]和基于图形理论的网络分析为人类大脑的结构和功能连接模式上提供了一个新的视角。最近一项对AD患者的研究^[20]结果显示,在神经网络的全球和区域属性中,AD患者都表现

出异常的拓扑组织,表明AD不仅影响特定的大脑区域,而且还改变了不同大脑区域之间的结构和功能联系。杨晶晶等^[21]应用扩散张量成像(diffuse tensor imaging, DTI)中的平均扩散率(mean diffusivity, MD)评估aMCI和AD患者灰质微观结构完整性的损伤特征拟判断疾病的转化规律,研究结果提示,与正常对照组相比,aMCI和AD组的灰质水分子平均扩散率网络显示出异常的“小世界”特性,表现为聚集程度较高和路径长度较长,从而反映了灰质微结构的损伤,而且AD和aMCI患者网络的平均连接度均低于正常对照组。研究结论显示,aMCI脑灰质的水分子扩散特征有助于发现AD前期患者,并可反映神经退行性疾病脑微观结构的破坏。

综上所述,通过图论网络分析理论构建大脑功能连接网络,可研究AD患者脑功能连接网络的改变及与临床症状的潜在关系,大脑复杂功能网络的连接模式差异已越来越多地被研究者应用于AD患者认知功能丧失的原因研究。

2 分子检测技术在AD早期诊断中的应用研究

2.1 ApoE与TREM2基因突变对AD的影响

阿尔茨海默病是最常见的痴呆类型。而相关研究^[25-26]结果显示,载脂蛋白E(apolipoprotein E, Apo E)基因多态性与AD的发生发展密切相关,其中Apo E4等位基因是目前唯一被确证的晚发性AD发病风险基因。Apo E被发现是一种与脂蛋白代谢有关的血浆蛋白,在动脉粥样硬化发生、发展过程中起着重要的作用。ApoE基因的多态性还会影响对头部创伤的反应,降低对衰老和其他一些疾病的认知能力,不同基因型ApoE通过特定方式调控大脑内部的淀粉样蛋白P的聚积和清除而影响AD的发展进程。Garcia等^[27]研究认为,ApoE与脑淀粉样蛋白有关,它是脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA)的一个组成部分,ApoE4容易与具有神经毒性的 β 样淀粉蛋白(A β)结合并稳定地沉积在脑血管壁,使 β 样淀粉蛋白不易被清除,从而导致血管完整性受损,引起脑组织损伤和功能障碍,这既是AD的病理特征,也是导致脑内出血的常见原因。王治国等^[28]研究结果显示,AD患者血浆tau蛋白、脑脊液tau蛋白水平显著高于正常对照组,血浆A β 42、脑

脊液 A β 42 水平显著低于正常对照组(由于 A β 42 在脑内沉积,使得血浆和脑脊液中 A β 42 含量减少)。因此笔者认为研究血浆和脑脊液生物标志物 β 淀粉样蛋白(A β)42 和 tau 蛋白对阿尔茨海默病早期诊断有较高的临床应用价值。新近的研究^[29]发现,编码髓细胞触发受体 2(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)对淀粉样蛋白病变有保护性作用,脑内 TREM2 主要在小胶质细胞上表达,而当 TREM2 基因发生变异时可能会增加发展为 AD 的风险,其原因是 TREM2 变异体阻断了小胶质细胞信号传递并且 TREM2 变异体本身具有毒性作用,从而诱发并加重了神经炎症的发生,并在 tau 蛋白病变环境中引起神经退行性变。TREM2 与 AD 的关联为阐明先天免疫系统在 AD 起病和进展中的作用增加了越来越多的证据。基因多态性与疾病相关性研究已成为目前研究的热点,一系列的研究成果为临床诊治疾病提供了新思路。但众所周知,遗传性疾病(如 AD)的发生发展有其复杂性,受身体内外环境影响较大,不是单一因素改变引起的。因此假如我们在研究过程中发现一些位点突变或特定基因型可能与 AD 相关,那么我们应该对突变位点与性状相关的基因、通路、连锁区域的关系作进一步研究,以验证该基因功能是否能准确地预测疾病性状,这将是今后我们要重点关注的问题。

2.2 ApoE4 与影像学相结合对 AD 的检测

程妍等^[30]制作了一种研究靶向脑内 β -淀粉样斑块(A β 斑块)的正电子发射断层显像(positron-emission tomography, PET)显像剂 [¹⁸F]FB-2,研究其在小鼠体内的分布情况与 PET 成像效果的方法, PET 成像结果显示显像剂在小鼠脑内的放射性聚集显著高于老龄小鼠;成像脑放射自显影图中的黑点与硫黄素 S 染色的 A β 斑块位置一致,研究结果认为 [¹⁸F]FB-2 有望成为用于临床阿尔茨海默病早期诊断的新型 PET 显像剂。Seo 等^[31]使用 18 氟-氟代脱氧葡萄糖-正电子发射断层扫描研究了在认知正常老年人的全脑功能网络中 ApoE4 等位基因对大脑葡萄糖代谢的影响,发现在临床症状出现之前 AD 的遗传易感性可能会改变整个大脑的功能网络。Wang 等^[32]采用 18 氟-氟代脱氧葡萄糖-正电子发射断层显像系统地研究了 ApoE4 携带者和非携带者全脑功能网络的拓扑结构,发现携带者脑功能网络均有明显的“小世界”

特征,结果显示 ApoE4 携带者脑功能网络拥有较低的聚类系数和较小的特征路径长度, ApoE4 等位基因显著扰乱了全脑拓扑组织。由此得知,不管在认知正常人群或者 AD 患者中, ApoE4 等位基因均表现出对全脑网络拓扑组织结构的调控作用,而网络拓扑结构的变化与患者的认知表现有显著的相关性。

上述的研究发现为超早期阶段识别 AD 的生物学标记及病理机制提供了重要的启示。当前相关的生物标志物在 AD 超早期诊断中越来越受到学者们的重视,例如 ApoE4 等位基因、tau 蛋白、A β 42 等,假如这些生物标志物出现异常提示时,我们能及时给予患者进一步的脑部影像学相关检测,及早监控相关影像学部位的结构和功能改变,例如对携带 ApoE4 等位基因患者早期监控全脑网络拓扑组织结构是否发生改变等,将有助于 AD 预测及早期干预。

2.3 外泌体早期诊断 AD 的应用

Fiandaca 等^[33]进行了一项时间持续 10 年的有关 AD 早期诊断的研究,发现 AD 患者在神经衍生的血浆外泌体中 181 位点磷酸化的 tau 蛋白、396 位点磷酸化的 tau 蛋白及长 A β 肽 1-42 含量较高,早期定量检测上述外泌体可在临床症状出现前提前 10 年诊断 AD。研究者因此认为预测外泌体中不同种类 RNA 含量的改变将可成为 AD 早期诊断的新型标志物。另外, Lugli 等^[34]将 AD 患者与健康个体血浆外泌体中 miRNA 进行对比,发现 miR193b 在 AD 的发展中起作用,同时在 AD 患者的脑脊液中也观察到外泌体 miR193b 表达的变化,该研究认为 miR193b 具有成为 AD 诊断的一种新颖的、非侵入性的、以血液为基础的生物标记物的潜力。马珺等^[35]应用实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)和 Western blot 检测 RNA 结合蛋白 MOV10 在阿尔茨海默患者脑组织中的表达变化,发现 MOV10 在 A β 处理的人脑微血管内皮细胞和神经元中呈高表达,该研究认为, RNA 结合蛋白 MOV10 可能参与调控阿尔茨海默病的病理过程。

目前,外泌体检测还是个全新的领域,外泌体中携带着细胞的 DNA、RNA 和蛋白质等信息,外泌体作为细胞间通信载体的作用现在已被普遍接受,通过分析外泌体 DNA、RNA 和蛋白质成分的改变,可以直接获得细胞的基本信息,与病理组织

相比,是个很有发展前景的无创标志物。但考虑到这个领域尚未成熟,关于外泌体生物学特性仍有很多悬而未决的基本问题,以及外泌体检测技术操作存在繁琐、分离困难、纯化难度大等缺点,要使外泌体检测成为一种特异而成熟的标志物还需待以时日。

3 小结与展望

综上所述,AD病理改变的核心是A β 对神经细胞的毒性作用,该毒性作用导致AD患者影像学表现为大脑渐进性萎缩,最终导致患者丧失认知、丧失身体机能甚至丧失自理能力。目前国内对外AD的研究已经逐步深入,涉及到脑部影像学血流信息改变的研究、常规海马白质和灰质体积测量及功能连接的研究、灰质网络及不同大脑区域之间结构和图论功能连接的研究。另外,阿尔茨海默病遗传易感基因、 β 样淀粉蛋白和外泌体等标志物的研究及上述标志物对AD患者全脑功能网络拓扑结构影响的研究也得到学者们的广泛关注。与此同时,人工智能(artificial intelligence, AI)正逐步发展,也实现了对颅内肿瘤和颅内血肿的CT/MRI影像智能判读,但人工智能对AD的影像智能判别研究报道较少。如何根据AD患者遗传信息和生物标志物结合颅脑部早期结构改变情况,对人工智能进行海量训练,实现AD超早期诊断,并对不同AD易感基因型患者制定个性化的健康管理方案,从而实现早期防范阿尔茨海默病发生将成为今后AD研究的热点。

参考文献

- [1] 陈庆华,张凤强,李立新,等.阿尔茨海默病发病机制和诊断技术研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2018,20(1):108-110.
- [2] 郁金泰. AME特邀来稿|美国多家顶级新闻媒体同期报道我国研究成果:改变生活、远离痴呆[J].临床与病理杂志,2015,35(9):1610-1611.
- [3] Szaruga M, Munteanu B, Lismont S, et al. Alzheimer's-causing mutations shift A β length by destabilizing γ -secretase-A β n interactions.[J]. Cell, 2017, 170(3):443-456.
- [4] Masoodi TA, Al Shammari SA, Al-Muammar MN, et al. Exploration of deleterious single nucleotide polymorphisms in late-onset Alzheimer disease susceptibility genes [J]. Gene, 2013, 512(2):429-437.
- [5] Dolek N, Saylisoy S, Ozbabalik D, et al. Comparison of hippocampal volume measured using magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease, vascular dementia, mild cognitive impairment and pseudodementia[J]. 2012, 40(2):717-725.
- [6] Stout JC, Bondi MW, Jernigan TL, et al. Regional cerebral volume loss associated with verbal learning and memory in dementia of the Alzheimer type[J]. Neuropsychology, 1999, 13(2):188-197.
- [7] Whitwell JL, Przybelski SA, Weigand SD, et al. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease[J]. Brain A Journal of Neurology, 2007, 130(7):1777-1786.
- [8] 梁洪,肖玉芬,兰海青,等.基于MR图像的AD和MCI与海马体子域的关联研究[J].生命科学仪器,2017,15(6):37-41.
- [9] Varon D, Loewenstein D A, Potter E, et al. Minimal atrophy of the entorhinal cortex and hippocampus: progression of cognitive impairment[J]. Dementia & Geriatric Cognitive Disorders, 2011, 31(4):276-283.
- [10] Cavado E, Boccardi M, Ganzola R, et al. Local amygdala structural differences with 3T MRI in patients with Alzheimer disease[J]. Neurology, 2011, 76(8):727-733.
- [11] Long X, Chen L, Jiang C, et al. Prediction and classification of Alzheimer disease based on quantification of MRI deformation[J]. Plos One, 2017, 12(3):e173372.
- [12] Jiménez-Huete A, Estévez-Santé S, ADNI group. The antero-posterior and primary-to-posterior limbic ratios as MRI-derived volumetric markers of Alzheimer's disease[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2017, 378:110-119.
- [13] 王吉喆,严壮志,温军玲.海马体磁共振图像分割:基于先验信息的三维格子玻尔兹曼方法及其并行加速[J].中国医疗器械杂志,2018,42(1):1-6,13.
- [14] Zanchi D, Giannakopoulos P, Borgwardt S, et al. Hippocampal and amygdala gray matter loss in elderly controls with subtle cognitive decline [J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2017, 9:50
- [15] 乔迎芳,胡斌,谢元伟,等.面向阿尔茨海默症的脑皮层厚度的特征选择方法研究[J].小型微型计算机系统,2017,38(12):2641-2644.
- [16] Bäuml JG, Daamen M, Meng C, et al. Correspondence between aberrant intrinsic network connectivity and gray-matter volume in the ventral brain of preterm born adults [J]. Cerebral Cortex, 2015, 25(11):4135-4145.
- [17] Papma JM, Smits M, Groot MD, et al. The effect of hippocampal function, volume and connectivity on posterior cingulate cortex functioning during episodic memory fMRI in mild cognitive impairment[J]. European Radiology, 2017, 27(9):3716-3724.
- [18] Bullmore E, Sporns O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2009, 10(3):186-198.

- [19] He Y, Evans A. Graph theoretical modeling of brain connectivity[J]. *Current Opinion in Neurology*, 2010, 23(4):341-350.
- [20] Xie T, He Y. Mapping the Alzheimer's Brain with Connectomics[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2012, 2:77.
- [21] 杨晶晶, 顾康康, 夏顺明, 等. 遗忘型轻度认知障碍脑灰质扩散张量成像特征研究[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(11):1199-1203.
- [22] Tóth E, Szabó N, Csete G, et al. Gray matter atrophy is primarily related to demyelination of lesions in multiple sclerosis: adiffusion tensor imaging MRI study [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2017, 11(1):23.
- [23] Kumar M, Duda JT, Yoon SY, et al. Diffusion tensor imaging for assessing brain gray and white matter abnormalities in a feline model of α -mannosidosis.[J]. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2015, 75(1):1-9.
- [24] Zhang B, Gu GJ, Jiang H, et al. The value of whole-brain CT perfusion imaging and CT angiography using a 320-slice CT scanner in the diagnosis of MCI and AD patients [J]. *Eur Radiol*, 2017, 27(11):4756-4766.
- [25] Smith J D. Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases[J]. *Annals of Medicine*, 2009, 32(2):118-127.
- [26] Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis [J]. *Biological Psychiatry*, 2015, 77(1):43-51.
- [27] Garcia C, Pinho EMT, Rocha L, et al. Cerebral hemorrhage and apoE[J]. *Journal of Neurology*, 1999, 246(9):830-834.
- [28] 王治国, 战莹, 武晓丹, 等. 血浆和脑脊液 A β 42、tau 水平对阿尔茨海默病患者的早期诊断价值[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(3):314-316.
- [29] 肖书. TREM2 基因缺陷在 tau 蛋白病变小鼠模型中可减弱神经炎症并防止神经退行性变[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2):320.
- [30] 程妍, 蔡华伟, 张志荣. β -淀粉样斑块显像剂 [18 F]FB-2 的小鼠 PET 成像[J]. *中国科技论文*, 2017, 12(24):2799-2802.
- [31] Seo EH, Lee DY, Lee JM, et al. Influence of APOE genotype on whole-brain functional networks in cognitively normal elderly[J]. *Plos One*, 2013, 8(12):e83205.
- [32] Wang J, Wang X, He Y, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 modulates functional brain connectome in Alzheimer's disease [J]. *Human Brain Mapping*, 2015, 36(5):1828.
- [33] Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study[J]. *Alzheimers & Dementia*, 2014, 11(6):600-607.
- [34] Liu CG, Song J, Zhang YQ, et al. MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(5):2395.
- [35] 马珺, 薛一雪, 巩威, 等. RNA 结合蛋白 MOV10 在阿尔茨海默病人脑组织及细胞中的表达及意义[J]. *解剖科学进展*, 2017, 23(6):558-560.

(上接第 131 页)

- [12] Sebastian O, Yan Q, Ferguson JK, et al. Vascular endothelial growth factor - A165b is protective and restores endothelial glycocalyx in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(8):1889-1904.
- [13] Amle D, Mir R, Khaneja A, et al. Association of 18 bp insertion/deletion polymorphism, at -2549 position of VEGF gene, with diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients of North Indian population [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2015, 14(1):19.
- [13] 董闪闪, 张洁, 刘璠, 等. 2 型糖尿病肾病患者尿足细胞标志蛋白和血管内皮生长因子水平与氧化应激的相关性[J]. *重庆医学*, 2016, 45(10):1334-1336.
- [14] 汪菲, 高向阳, 张蓉. 糖尿病肾病患者血清炎症因子、vWf、VEGF 及黏附分子水平变化及意义[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(16):2207-2210.
- [15] 陈冬莲, 郑身宏, 刘首明, 等. Cys-C、HbA1c、GA 和 U-mAlb/Cr 检测对 2 型糖尿病早期肾损伤的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(6):677-679.
- [16] 费杨, 程东生, 范瑛, 等. 糖化白蛋白对慢性肾脏病患者的血糖评估价值及其影响因素[J]. *上海医学*, 2016, 39(5):272-276.
- [17] 杨伟, 李耘, 马丽娜. 抵抗素与老年 2 型糖尿病肾病的相关性研究[J]. *疑难病杂志*, 2012, 11(12):949-950.
- [18] 齐鹏鹏, 于士洋, 吴梓齐, 等. 血管内皮生长因子的研究进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2016, 26(6):381-384.
- [19] 杨浩, 孔德宝, 付靖瑜, 等. 糖化白蛋白、糖化血红蛋白与 2 型糖尿病早期肾损伤的关系[J]. *广东医学*, 2018, 39(13):1989-1992.

下一代测序技术在遗传相关性智力障碍诊断中的应用

沈茹¹ 任保艳² 蒋鸿超³ 王晓岩^{4*}

[摘要] 智力障碍(intellectual disability, ID),是一种严重危害儿童身心健康的综合症,不但影响患者自身的生活质量,也给她家庭和社会带来沉重负担。ID病因十分复杂,既有外在的环境因素又有内在的遗传因素。近年来,下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)从一种新兴技术变成了主流检测技术被逐渐应用于临床诊断,其通量高、快速、高效等优势为遗传性疾病的诊断研究带来重大变革。本文将从智力障碍概述、病因分析、遗传性检测技术以及NGS在遗传性智力障碍诊断中的应用4个方面进行综述,以期对相关智力障碍病人的临床诊断方法的选择提供帮助。

[关键词] 发育迟缓;智力障碍;遗传诊断;二代测序

Application of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Genetic related Intellectual Disability

SHEN Ru¹, REN Baoyan², JIANG Hongchao³, WANG Xiaoyan^{4*}

(1. Laboratory Department of Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650028; 2. Laboratory Department of Magan County people's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 663700; 3. Department of Science and Education of Kunming Children's Hospital, Kunming Yunnan, China, 650028; 4. The 920 Hospital Cadre Ward of the Joint Service Support Unit of the Chinese people's Liberation Army, Kunming, Yunnan, China, 650032)

[ABSTRACT] Intellectual disability (ID) is a syndrome that seriously jeopardizes children's physical and mental health. It not only affects the quality of life of patients themselves, but also imposes a heavy burden on their families and society. The etiology of ID is very complex, both external and internal genetic factors. In recent years, next-generation sequencing (NGS) has been developed from a newborn technology to a mainstream technology, and gradually applied to clinical diagnosis with a high-throughput, fast and high-resolution feature. NGS brings major changes to the diagnosis of genetic diseases. In this article the 4 aspects of intellectual disability overview, etiology analysis, hereditary detection technology and the application of NGS in the diagnosis of intellectual disability will be summarize. We hope to help with the selection of clinical diagnostic methods for patients with relevant mental retardation.

[KEY WORDS] Developmental retardation; Intellectual Disability; Genetic diagnosis; Next-generation sequencing

基金项目:云南省重点研发计划项目国际科技合作专项(2018IA047)

作者单位:1. 昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650028

2. 马关县人民医院检验科,云南,文山 663700

3. 昆明市儿童医院科教科,云南,昆明 650028

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

*通信作者:王晓岩, E-mail: 764693110@qq.com

智力障碍(intellectual disability, ID),又称为智力低下、精神发育迟滞(mental retardation, MR)、脑发育迟缓(developmental delay, DD),其主要表现为智力功能、适应性行为和相关系统的损害^[1]。ID在全世界发病率约为1%~3%,已经成为一个世界范围内的社会问题^[2-3]。ID病因复杂,主要影响因素有环境因素和遗传因素。其中,环境因素约占20%,有研究显示约三分之二的ID是由遗传因素所致^[4]。随着社会文明的进步,卫生保健事业的发展,做好智力障碍的诊断与筛查工作,明确ID病因成为各界关注要点。常用遗传诊断方法G带核型分析、荧光原位杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)、多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)、染色体微芯片(chromosomal microarray, CMA)技术以及下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)^[5],前2种方法以低分辨率检查一个人的整个基因组,后2种虽然分辨率提高了但仅限于检测到一个人整个基因组的一小部分。而下一代测序因其高通量、诊断精确可提供广泛和高分辨率遗传变异鉴定,不但能明确诊断还能发现新的病变基因,因此具有巨大的应用前景。

1 智力障碍概述

ID,是指各种原因导致的18岁前出现认知及社会适应能力明显障碍。按照美国智力与发育障碍协会(The American Association on Intellectual and Developmental Disability, AAIDD)建议应从智力、适应性行为和给予个体的支持系统(systems of ID supports afforded the individual)等3个方面来定义ID^[6]。智力是指一般的智力功能,如学习、推理、解决问题等。适应性行为是人们在日常生活中学习和执行的概念(语言和识字)、社会技能(人际交往技能、社会责任)和实践技能(日常生活和个人护理活动、职业技能、医疗保健)的集合。ID在临床上表型多样,智力异常或者伴随其他症状,如先天畸形、癫痫、语言发育迟缓、学习障碍等行为、运动异常。ID是世界范围内主要致残原因之一^[7]。ID患病率受各种因素影响,包括性别、年龄、种族、经济、文化、科学发展水平、所处环境等^[8]。因此,做好ID的预防及诊断工作,防止或减少ID患儿的出生;明确ID的病因,提高ID的诊断

水平及遗传学筛查率,以达到降低和消除高危人群再生育风险及预防ID患儿出生的目的。

2 智力障碍病因分析

ID的病因按照来源可分为环境因素与遗传因素,环境因素包括外源性感染、中毒、外伤、缺氧、药物性损伤、营养不良、心理疾病等;遗传因素包括各类染色体异常、单基因突变或多基因异常、先天性代谢缺陷疾病等。随着医疗技术水平和生活质量的提高,遗传因素逐渐成为ID的主导因素,占25%~50%^[9]。而染色体异常在已经探明原因的ID中约占11%^[4]。染色体数目异常中唐氏综合征(发病率1:800)、爱德华兹综合征(发病率1:7 000)及帕陶氏综合征(发病率1:6 000~1:29 000)在ID中最为常见,常伴有重度智力障碍、先天畸形等^[10]。单基因突变也常常导致ID的发生,包括常染色体的单基因突变与性染色体的单基因突变。据报道目前已知的ID致病基因达528个,候选致病基因达628个^[11]。同时研究显示单基因突变所致的ID发病率存在男女差异,比例为1.3~1.4:1,临床上最为常见的性别相关ID综合征为脆性X综合征(发病率1:5 000)^[5]。多基因异常及遗传性代谢缺陷疾病在ID中也占了一定比例,常见的如脑积水、胼胝体发育不全和Dandy-Walker畸形等^[12]。随着研究深入及检测技术的发展,有研究数据证实染色体亚端粒拷贝数变异也是ID的重要病因之一,占遗传性ID的5%~10%^[13]。这可能与亚端粒区含有大量功能基因容易发生重组相关,但具体机制未明^[14]。

3 NGS在遗传性智力障碍诊断中的应用

随着大数据、高通量时代的来临,加速了分子生物学诊断方法的不断革新。近年来,NGS技术用在智力障碍病人的诊断越来越多,不但对不明原因诊断的病例提供诊断依据,而且还能发现新的致病基因,为后续智力障碍的研究以及药物研发提供理论基础。

3.1 在染色体数目或结构异常所致ID中的应用

染色体异常是导致ID的重要原因,文献报道约30%重度ID、10%中度ID是由染色体异常所致,轻度智力障碍较少见^[15]。ID中常见的染色体数目异常有21三体(T21)、18三体(T18)和13三体(T13)。目前临床上应用NGS技术进行无创产

前诊断(noninvasive prenatal Testing, NIPT)已经非常成熟,国内外已发表了多篇大规模临床应用数据^[16, 17-20],且早在2014年已有meta分析数据证实T21、T18、T13在单胎妊娠中的检出率分别为99.2%、96.3%、91.0%,假阳性率分别为0.09%、0.13%、0.13%^[21]。这些数据均表明基于NGS的NIPT较传统的染色体非整倍体筛查方法更灵敏,结果更可靠准确,假阳性率更低,完善了染色体异常的检测体系。随着技术的应用与发展,也有研究发现NGS用于NIPT的检测还受到一些因素的影响,如嵌合体、胎儿DNA浓度、孕妇本身携带微缺失微重复或患有妇科肿瘤、双胎消失综合征等^[22],因此,在进行ID病因探索时应全面分析问题,根据不同患者的信息进行多种方法的联合检测,为ID的准确诊断提供更全面的信息。

染色体拷贝数变异(copy number variations, CNVs)为常见的染色体结构异常,因染色体微小片段缺失或重复而引起染色体疾病,统称为染色体微缺失/微重复综合征。常见临床表现为发育迟缓、智力障碍、精神行为异常等。目前有约300种微缺失/微重复综合征被报道,发病率在1/200 000~1/4 000,合并发病率近1/600^[23],因此尽早明确病因尤为重要。NGS应用于CNV的检测日渐成熟,Liang等^[24]的研究证实基于NGS的CNV测序(copy number variation sequencing, CNV-seq)可取得与SNP array完全一致的检测结果,甚至在有些方面优于SNP array;Dong等^[25]则表明CNV-seq可应用于产前或产后的染色体微重复或微缺失的遗传学诊断。目前在许多发展中国家,ID乃至其他遗传病的诊断仍主要依赖于传统的检测方式进行。CMA(chromosome micro analysis)技术由于普及性差、价格高昂,仅限于小部分人作为辅助手段进行检测。随着NGS技术成本的迅速下降,加之工作流程简单,NGS有望更加广泛的应用于遗传相关性的ID的诊断,以便更全面地检测遗传性ID。

3.2 在单基因缺陷病所致ID中的应用

搜索OMIM及NCBI上的数据,已明确与ID相关的致病基因共有818个^[26]。荷兰内梅亨大学医学中心Joris Veltman和研究团队对50例重度智力障碍患者,以及他们没有智力障碍的父母进行了全基因组测序,发现这些在其他测试中的结果都为阴性的病人在和这次分析中出现了84个全新的单核苷酸变异(single nucleotide variations, SN-

Vs)和8个全新的CNVs,这些全新的变异与重度ID相关^[14]。该研究数据突出了NGS技术作为诊断ID工具的价值。朱丽娜等^[27]则创新性地采用了基于NGS的靶向捕获技术对40例ID患者进行了384个ID相关基因进行全序列分析及对ID相关的CNVs进行探索,发现了23个国内外首发的新发突变。英属哥伦比亚大学BC儿童医院的科学家们^[28]通过基于NGS的全基因组测序技术精确诊断了一些传统方法无法确诊ID背后的遗传疾病,碳酸酐酶VA缺乏症和谷草转氨酶2缺乏症,研究人员指出特定的药物可以改善患儿症状。ID是一个比较复杂的问题。有些儿童>ID是因为某种罕见遗传病干扰了机体的代谢功能,这种代谢障碍会使大脑和机体出现能量缺陷和有毒物质累积,最终导致发育迟缓、认知缺陷、癫痫和器官功能不全等。在细胞水平针对靶标代谢紊乱进行治疗对ID是很有帮助的,比如调整膳食、补充维生素、服用药物和骨髓移植。因此,尽早确诊ID病因,早期干预能为这些患儿提供很大的帮助,显著改善他们和家人的生活质量。

3.3 在尚未明确致病基因导致智力障碍病人中的应用

有些智力障碍的致病基因尚未明确,对于这样的病人不可能进行单个基因的逐一排查,目前可以使用基因Panel,全外显子测序或者全基因组测序来进行诊断。下面是一个具体病例:9岁男童因严重智障于6岁开始随访,所有迹象显示有频发癫痫发作和智力倒退。到了8岁时,他无法按住头或咽下去,开始吃鼻饲。他不认识他的母亲,癫痫持续发作。显着性神经检查表现为痉挛性挛缩,无器质性肿大。MRI表现为脑萎缩和脑室周围白质改变。经广泛评价,甲状腺形态、氨、乳酸、MS-MS、尿GCMS均正常,但后者表现为乳酸升高。神经传导、VEP、脑干诱发反应测听(BERA)、眼底检查均正常。对变性表型进行了大量的酶类分析,如对变异型白质营养不良、Krabbe、神经元类脂褐质增多症、Tay Sachs等酶进行了检测,但均为正常,核型正常。在鉴别诊断的基础上进行特异性疾病相关单基因检测,其中包括Leigh病的突变、Angelman综合征的甲基化以及SURF1和PANK2基因的测序。然而,所有结果均正常。全外测序结果显示,GLB1基因有一个复合杂合子突变,即c.1310delA和c.1769G>A。这证实了GM1

型神经节苷脂病的诊断。这个结果体现了 NGS 技术在结束家庭无效诊断方面的力量。对 ID 患者的大量单个基因进行 Sanger 测序实际上是不可能的。外显子测序只捕获编码基因,而全基因组测序,其中 30 亿个核苷酸被测序,以确定基因与疾病一致。自 2010 年以来,新的 ID 基因被快速识别出来,大大提高了 ID 基因检测的诊断率。

在不太可能获得的明确表型的背景下,外显子测序用于病因学诊断的能力得到了很好的证实,附加诊断率为 25%~32.5%^[29,30]。在一个家族中特定的常染色体或 X 连锁遗传模式的临床背景下,对特定靶向基因的 Panel 测序是一种实用的方法^[30,31]。Gilissen 等人^[32]在一组 ID 患者中使用全基因组测序,在 60% 的患者中确定了致病变异。

3.4 NGS 用于目前临床及市场应用的情况

目前,主要有 3 种基于 NGS 的 ID 检测方法^[33]: panel 测序、外显组测序(whole exome sequencing, WES)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)。由于 WGS 数据量庞大,价格昂贵,在临床分子诊断中应用较多的是 panel 测序和 WES。Panel 测序可根据研究者需求自主设计探针针对目的基因进行捕获,且价格适中,分析简单;但该方法只能针对已知致病基因进行检测,对探针以外的新发突变无能为力。WES 能捕获所有的外显子区域,突破了 Panel 测序不能检测新发突变的局限;尤其是针对遗传性智障这类疾患,进行家系 WES 可以减少后续验证,提高诊断效率。

自 2014 年 7 月国家食品药品监督管理局批准了第一批测序仪器和部分测序产品以及 2015 年 3 月开始进行测序技术临床应用试点申报工作,标志着 NGS 迅速进入市场。目前尚未有经国家食品药品监督管理局批准的基于 NGS 的 ID 测序产品,但提供 Panel 测序及 WES 基因测序服务规模比较大的公司有华大基因、达安基因、贝瑞和康、博奥生物、诺禾致源等,这些企业在该测序服务领域都已经涉足,但由于涉及的基因个数不同,市场价格也从几百元到上千元不等。

4 小结与展望

ID 病因复杂,目前仍有半数以上的 ID 患者病因不明^[34],了解 ID 病因及其临床检测手段有助于 ID 的诊断。NGS 是近年来新兴的检测技术,其简单、快速、高分辨率、高通量的特点使得其在临床

上得到越来越多的尝试。然而,NGS 产生的大数据目前并没有得到充分的利用,仍然有许多未知的数据等待挖掘。目前已有的 ID 数据库有包括收集相关 ID 基因及其表型、疾病之间的关联展示的 DBDB 数据库;对已知 ID 基因及其对应的蛋白相互作用信息和相关通路信息进行了整合的 ID 基因库;提供相关基因的查询和检索,展示基因的名称位点、功能和对应疾病的信息的 GeneQuest 工具;收集 ID 相关基因和相关疾病的信息,并提供了基因描述、基因信息(包括 EntrezID, Ensembl ID, HUGO gene 名称, OMIM ID 信息等)的 SysID 数据库等。这些数据库为 ID 的研究提供了证据与工具,但这些数据库均只提供 ID 基因的简单检索和查询及基因基本信息的展示。建立完善的数据库,为 ID 的研究提供更全面准确的信息十分必要。目前,全外显子测序逐渐成为全面深入了解遗传相关性 ID 的常规方法,而这种基于 NGS 的 panel 检测将产生更大量 DNA 序列信息,这些数据的分析依赖于数据库的建立与健全以及生物信息分析方法的不断优化,这将不断地促进研究人员提出更有效的针对遗传相关性 ID 的分子诊断方案,为以数据挖掘和基础科研为导向的联合性新发致病性遗传突变分析提供助益。

参考文献

- [1] Moeschler J B. Medical genetics diagnostic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability [J]. *Curr Opin Neurol*, 2008, 21 (2): 117-122.
- [2] Srivastava A K, Schwartz C E. Intellectual disability and autism spectrum disorders: causal genes and molecular mechanisms [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 46 Pt 2: 161-174.
- [3] Perou R, Bitsko R H, Blumberg S J, et al. Mental health surveillance among children - United States, 2005-2011 [J]. *MMWR Suppl*, 2013, 62(2): 1-35.
- [4] 杨尧,王芳,何玺玉. 智力障碍的遗传因素研究进展 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2013(1): 54-56.
- [5] 杨璞,桂宝恒,邬玲仟. 智力障碍的病因及诊断方法 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2015(6): 543-548.
- [6] Battle D E. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) [J]. *Codas*, 2013, 25 (2): 191-192.
- [7] Department Of Information E A R W. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates

- 2000-2015[J]. WHO/HIS/IER, 2017,1(2017):1.
- [8] Makrythanasis P, Kato M, Zaki M S, et al. Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(4):615-626.
- [9] 高会萍. 48例不明原因智力障碍患儿致病基因的研究[D]. 山西医科大学, 2016.
- [10] Iourov I Y, Vorsanova S G, Yurov Y B. Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases[J]. *Curr Genomics*, 2008, 9(7):452-465.
- [11] Gilissen C, Hehir-Kwa J Y, Thung D T, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability[J]. *Nature*, 2014, 511(7509):344-347.
- [12] Stevenson R E, Procopio-Allen A M, Schroer R J, et al. Genetic syndromes among individuals with mental retardation[J]. *Am J Med Genet A*, 2003, 123A(1):29-32.
- [13] 朱丽娜, 王艳, 彭薇, 等. 智力障碍儿童的亚端粒拷贝数变异检测[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015(12):1273-1276.
- [14] Medina A, Pineros L, Arteaga C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to subtelomeric rearrangements in idiopathic intellectual disability in Colombia[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 50(3):250-254.
- [15] 宋银森, 范天黎, 马金元. 3155例智力低下患儿的细胞遗传学分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017(4):65-76.
- [16] Zhou X, Sui L, Xu Y, et al. Contribution of maternal copy number variations to false-positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(4):318-322.
- [17] Pescia G, Guex N, Iseli C, et al. Cell-free DNA testing of an extended range of chromosomal anomalies: clinical experience with 6,388 consecutive cases[J]. *Genet Med*, 2017, 19(2):169-175.
- [18] Snyder H L, Curnow K J, Bhatt S, et al. Follow-up of multiple aneuploidies and single monosomies detected by noninvasive prenatal testing: implications for management and counseling[J]. *Prenat Diagn*, 2016, 36(3):203-209.
- [19] 王元丽, 唐明珠, 杨学习. 11339例孕妇无创产前检测结果对比分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(6):363-366, 406.
- [20] Zhang H, Gao Y, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(5):530-538.
- [21] 魏贤达, 吕卫刚, 邬玲仟. 下一代测序技术应用于无创产前检测的现状与未来[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(7):489-491.
- [22] 杨学习. 下一代测序技术在遗传病临床检测中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(6):357-362.
- [23] Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, et al. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review[J]. *Genet Mol Biol*, 2014, 37(1 Suppl):210-219.
- [24] Liang D, Peng Y, Lv W, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes[J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(5):519-526.
- [25] Dong Z, Zhang J, Hu P, et al. Low-pass whole-genome sequencing in clinical cytogenetics: a validated approach[J]. *Genet Med*, 2016, 18(9):940-948.
- [26] Vissers L E, Gilissen C, Veltman J A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1):9-18.
- [27] 朱丽娜. 基于二代测序技术对智力障碍的发病机制及诊断策略研究[D]. 第二军医大学, 2015.
- [28] Piton A, Redin C, Mandel J L. XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(2):368-383.
- [29] Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*, 2013, 369:1502-1511.
- [30] Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A, et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical wholeexome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin Genet*, 2016, 89:700-707.
- [31] Redin C, Gérard B, Lauer J, et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted highthroughput sequencing. *J Med Genet*, 2014, 51:724-736.
- [32] Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, 2014, 511:344-347.
- [33] 孙昱, 傅启华, 余永国. 高通量测序技术在智力障碍/发育迟缓中的临床应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 1(42):489-491.
- [34] de Ligt J, Willemsen M H, van Bon B W, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(20):1921-1929.

广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心

广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心位于广东省广州市天河区黄埔大道西601号暨南大学化学楼,成立于2015年,在广东省高水平大学建设的支持下,建立了一支技术过硬的科研团队,配备一流的专业研究硬件条件,在纳米化学创新药物研究领域取得过多项成果,在靶向药物设计领域取得了重要的突破,支撑学科为临床医学、影像科学、肿瘤学、药学、化学及材料科学等,其中临床医学、药学和化学是硕士、博士学位授权学科,化学学科是省级重点特色学科。本中心现有科研人员64名,其中具有正高级职称者5名,副高级职称者5名;博士学位者20名;博士生导师5名,硕士生导师10名。该中心目前有实验室面积约400平方米,大型仪器设备高分辨质谱、液质联用分析仪、电镜等设备近3000万,承担了国家万人计划、国家863计划、国家自然科学基金项目、国家科技支撑计划及广东省自然科学基金等40个国家省部级项目,近5年发表SCI论文超过200篇,申请专利50项,实现产业化技术8项。

本工程中心着重利用化学与材料的优势,设计、构建不同纳米材料体系,并进行靶向修饰及药物负载,再按照抗肿瘤药物临床前研究开发的原则,系统、深入地研究靶向性纳米药物对抑制肿瘤增殖的作用,并阐述其抗肿瘤作用机制,寻找药物的作用靶点。同时对该类药物进行生产工艺的优化、药代动力学分析和初步毒理学研究,为该类药物进入临床前研究提供理论和实验依据,为进一步开发新型靶向性纳米药物提供理论和实验依据。推动学科交叉融合、协同创新,促进产业化应用及靶向药物开发。2015年以来获得国家级省部级科研项目近30项,总科研经费1217万元(未含学校配套经费)。其中承担国家中组部青年拔尖人才一项,国家863计划一项,国家自然科学基金项目20项和省部级科研项目10项。以第一单位获得了2018中华医学会中华医学科技奖青年科技奖、2018年广东省自然科学二等奖、2017年广东省科学技术三等奖、2017年中国产学研合作创新成果奖优秀奖、2017年梅州市科学技术一等奖、2015年广州市科技奖二等奖等奖项。主办学术会议5次,被邀请参与国内外前沿科技会议20余次。近3年共培养30名硕士毕业生,在读全日制硕士研究,60名;招收、培养博士研究生近20名。

学术带头人陈填烽教授是暨南大学化学与材料学院副院长、暨南大学附属第一医院纳米诊疗研究所所长,并担任香港大学荣誉教授、广东省化学学会化学生物学专业委员会副主任、中国抗癌协会青年理事会理事、《Chinese Chemical Letters》青年编委、中国抗癌协会纳米肿瘤学专业委员会青年委员、中国生物物理学会生物微量元素分会委员。



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。

