



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

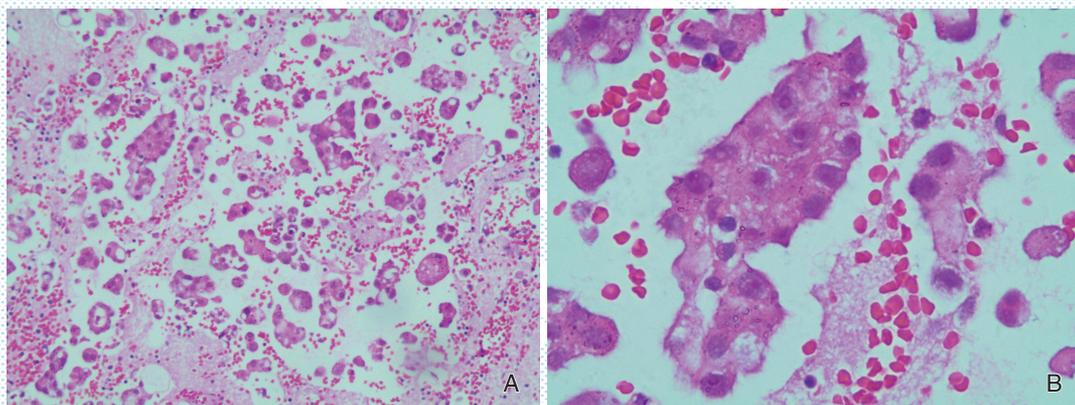
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2018年5月 第10卷 第3期 总第55期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 10 Number 3 May 2018



A: 沉渣包埋制片法见细胞处在同一平面上, 胞分布均匀, 易于观察(HE, ×100); B: 沉渣包埋制片法见细胞结构清晰, 核膜、核仁易见, 观察到腺癌细胞形成的典型的腺腔样结构(HE, ×500)。

图(P156) 沉渣包埋制片法示癌细胞

Figure(P156) A group of cancer cell in sedimentation method

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 692099

05>



分子诊断与治疗杂志

二〇一八年五月

第十卷 第三期

中山大学



耿 燕

耿燕,女,1967年9月出生。1990年7月毕业于原西安医科大学,2016年获病原微生物医学博士学位。一直从事医学检验的医教研工作,曾在香港中文大学交流学习,多次参与国家重大传染病科研项目的评审。

主任检验技师/检验医师,现任西安交通大学第二附属医院第二附属医院医学检验科主任,生物诊断治疗国家地方联合工程研究中心副主任。兼任中华科技奖励评审专家,教育部科技发展中心科研基金评审,中国微生物学会临床微生物分会感染性疾病诊断学组副主任委员,

中国医师协会检验医师分会第四届委员会委员,陕西省预防医学会病原微生物检验专业委员会副主任委员,中国检验检疫学会检验与检疫(陕西专委会)副主任委员,中华预防医学会医院感染控制分会病原抗菌学组委员,中国老年学会感染控制与质量控制学会委员,中国医疗保健国际交流促进会基层检验技术标准化分会委员,中国生物化学与分子生物学医学实验室质量管理学组常委,全国医学装备协会妇幼保健检验医学专业委员会委员,中国老年学会病原学检测与防控学会委员,中国老年学会感染诊治与合理用药专委会,陕西省预防医学会医院感染管理专业委员会常委,陕西省医学会检验学会委员,西安医学会检验医学分会委员,陕西省科技计划项目评审专家,陕西省性病防治专家,西安市医疗事故鉴定专家和陕西省医疗设备招标专家库成员。

主要研究方向为感染性疾病的实验室诊断、细菌耐药机制的研究、肠道菌群与代谢性疾病等。先后主持参与国家级、校级和省级科研课题10余项,多次参与国家级、省部级科技重大专项基金评审,以第一作者发表专业论文30余篇,其中SCI收录5篇,参编专著4部,分别获陕西省科技进步奖二等奖和三等奖各一项,获陕西高校科学技术二等奖一项,获医院新技术优秀奖5项。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2018年5月 第10卷 第3期 总第55期 Bimonthly Volume 10 Number 3 May 2018

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办 中山大学达安基因股份有限公司

顾问 来茂德 申子瑜
主编 李明
编辑部主任 郝芬
编辑部 《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑 李晓兰 叶萍萍 黄文珊
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 2018年5月18日
定价 RMB 15.00元

Responsible Institution Sun Yat-sen University
Sponsor China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.
Organizer DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University
Consultant LAI Maode SHEN Ziyu
Editor in Chief LI Ming
Managing Director HAO Fen
Editorial Office <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office
Editors LI Xiaolan YE Pingping HUANG Wenshan
Editing China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.

Add 10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290177 32290789-206
Fax (020) 32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2018.5.18
Price RMB 15.00

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2018年5月 第10卷 第3期

目次

专家讲座

血清表面抗原检测可能并非评价直接抗乙肝病毒药物临床效果的最好指标 鲁凤民(145)

论著

2016年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析
..... 陈静宜 廖飞 冯磊(148)

沉渣包埋法在卵巢肿瘤手术盆腔冲洗液细胞学诊断中的应用
..... 谭丽珊 陈玉英 余健华 等(153)

新型多重不对称PCR-电化学芯片法检测甲型流感病毒..... 蒋析文 黄桃生 黄志文 等(158)

G6PD活性、UGT1A1、SLCO1B1、ABCC2基因多态性和新生儿高胆红素血症的关系研究
..... 肖奇志 郭洪创 李恋湘 等(163)

两种无义突变 p.Gln263X 和 p.Tyr351X 导致的遗传性凝血因子XI 缺陷症家系分析
..... 翁妙珊 林芬 章金灿 等(169)

RNA 干扰沉默 SOX9 对肾细胞癌 786-O 细胞体外增殖、凋亡及裸鼠成瘤能力的影响
..... 楚广民 张建波 孙森森(174)

25-羟维生素 D3 与 IL-10 在系统性红斑狼疮中的临床应用研究
..... 张韶斌 陈斯亮 符青松 等(180)

微量元素对标准型 α 地中海贫血孕妇妊娠结局影响的研究
..... 刘建雷 曾赤佳 王文 等(184)

氯氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者 QT 离散度与冠脉病变程度的影响
..... 姚朝阳 金凤(189)

综述

登革热检测技术应用及发展 蒋力云 狄飏 杨智聪(196)

地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展..... 李继慧 覃运荣 梁毅(202)

CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展 张庆颜 董小玉 臧乃亮 等(206)

过氧化物还原酶6在中枢神经系统疾病中的研究现状 唐建巍 肖广庆 陈慧珍 等(212)

专家风采

耿燕 (封二)

实验室巡礼

西安交通大学第二附属医院医学检验科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 3 May 2018

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

Distribution and drug resistance of bacterial flora in children with lower respiratory tract infections

in a hospital at Yuxi, Yunnan in 2016

CHEN Jingyi, LIAO Fei, FENG Lei (148)

Application of sediment embedding method in cytological diagnosis of pelvic lavage fluid in ovarian tumors

TAN Lishan, CHEN Yuying, YU Jianhua, CHEN Zhihui, GUO Hui (153)

Detection of influenza A virus by multiplex asymmetric PCR–electrochemical chip

JIANG Xiwen, HUANG Taosheng, HUANG Zhiwen, ZHANG Xianpeng, YIN Sanhong (158)

The relationship between G6PD activity, *UGT1A1*, *SLCO1B1*, *ABCC2* gene polymorphisms and neonatal hyperbilirubinemia

XIAO Qizhi, GUO Hongchuang, Li Lianxiang, WANG Zhaoqing, LI Lei, KUANG Wenyong, ZHOU Yuqiu (163)

Analysis of hereditary coagulation factor XI deficiency pedigree induced by two kinds of nonsense mutations, p.Gln263X and p.Tyr351X

WENG Miaoshan, LIN Fen, ZHANG Jincan, WU Jiaoren, XING Shaoyi, YANG Liye (169)

Effect of silencing *SOX9* by RNA interference on proliferation and apoptosis of renal cancer 786–O cells *in vitro* and tumorigenicity in nude mice

CHU Guangmin, ZHANG Jianbo, SUN Miaomiao (174)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 3 May 2018

CONTENTS

The study of clinical application of 25-hydroxy vitamin D3 and IL-10 in systemic lupus erythematosus
ZHANG Shaobin, CHEN Siliang, FU Qingsong, LUO Guanchao, HUANG Wangxiang (180)

Effect of trace elements on pregnancy outcome of pregnant women with standard alpha thalassemia
LIU Jianlei, ZENG Chijia, WANG Wen, YU Junjian, XU Xiangjuan (184)

Effect of amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets on the QT dispersion and coronary artery disease degree of patients with coronary heart disease
YAO Zhaoyang, JIN Feng (189)

REVIEWS

Application and development of dengue fever detection
JIANG Liyun, DI biao, YANG Zhicong (196)

Advances of laboratory molecular diagnostic techniques for thalassemia
LI Jihui, QIN Yunrong, LIANG Yi (202)

Advances in research and application of CRISPR/Cas9 system in human diseases
ZHANG Qingyan, DONG Xiaoyu, ZANG Nailiang, XU Weiwen (206)

The research progress of peroxiredoxin 6 in central nervous system diseases
TANG Jianwei, XIAO Guangqing, CHEN Huizhen, LI Aimin (212)

血清表面抗原检测可能并非评价直接抗乙肝病毒药物临床效果的最好指标

鲁凤民*

【本文要点】 之前普遍认为乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)表面抗原(HBsAg)来自肝细胞核内的共价闭环状DNA(cccDNA)的转录,与病毒复制状态密切相关。相应地,血清HBsAg水平被广泛用作判定慢性乙肝抗病毒治疗应答的重要指标,以伴有或不伴有血清学转换的HBsAg消失为标准的功能性治愈(国内称之为“临床治愈”)更被认为是理想的临床抗病毒治疗终点。但是,越来越多的实验证据显示,感染肝细胞基因组存在广泛的病毒DNA整合。这些整合到宿主肝细胞基因组的HBV DNA片段也能够转录产生HBsAg,并分泌到肝细胞外。本文从HBV DNA整合片段表达HBsAg对血清HBsAg检测临床意义的可能影响出发,对目前的慢性乙肝治愈概念进行了检讨,也对未来如何通过实验室检测评价直接抗乙肝病毒药物的抗病毒疗效进行讨论。

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)病毒感染仍是全球及我国慢性肝病的重要病因^[1]。乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)DNA的存在形式主要有疏松开链环状DNA(rc-DNA)、共价闭环状DNA(cccDNA)。以不完全双链DNA形式存在的rc-DNA存在于具有感染性的Dane颗粒的核衣壳内,是成熟的乙肝病毒的主要存在形式。cccDNA存在于感染肝细胞的细胞核内,为病毒复制的模板。cccDNA的持续存在和活跃转录是HBV慢性感染的病毒学基础,由于现有抗乙肝病毒药物对cccDNA无直接破坏作用,如何彻底治愈CHB仍是一个巨大挑战。

HBV的基因组有S、C、P和X共4个部分重叠的基因编码区,分别编码表面抗原、e抗原和核心抗原、DNA聚合酶(p蛋白)及X蛋白等。其中S区又可划分为前S1(Pre-S1)、前S2(Pre-S2)和S基因,对应编码L、M和S3种HBV包膜蛋白,三者羧基端完全一致,统称HBsAg^[2]。HBsAg是病毒膜蛋白,既可存在于Dane颗粒表面,也是构成管形和小球形亚病毒颗粒的主要成分。HBsAg是最早被用于急/慢性HBV感染诊断的实验室指标,在

实现了血清HBsAg定量检测的同时,检测灵敏度也不断提高(检测下限已达0.05 IU/mL)。定量检测试剂的临床应用为我们打开了一扇新窗,可以观察抗病毒治疗下血清HBsAg的动态变化及其临床意义,大量的临床试验业已证实,与基线水平相比,血清HBsAg的快速下降往往预示着良好的病毒学应答^[3-4]。

临床上多将肝功能恢复正常、HBsAg消失和/或抗-HBs阳转、血清DNA低于检出限称为“功能性治愈(functional cure)”^[5]。我国学者将之称为临床治愈(clinical cure)。当患者出现HBsAg消失和/或抗-HBs阳转时,其肝组织内的cccDNA往往消失或失去转录活性。当发生血清HBsAg消失后,患者停药后发生HBV DNA反弹和疾病复发的风险大为降低。不仅如此,这些临床治愈患者的终末期肝病和肝癌的发生率明显减少^[6]。因此,表面抗原消失被认为是一个理想的治疗终点。遗憾的是,现有药物特别是核苷(酸)类(nucleos(t)ide analogues, NA)药物治疗的慢性乙肝患者HBsAg血清学阴转的发生率很低,仅为每年0.5%~1%^[7],大多数患者不得不终身用药^[8]。由于长期使用有

作者单位:北京大学基础医学院病原生物学系,北京 100191

*通讯作者:鲁凤民, E-mail: lu.fengmin@hsc.pku.edu.cn

副作用之虞,长效干扰素的临床方案多为48周的有限疗程,停药后总的表面抗原累计消失率(3%~7%)虽然略高于NA类药物^[9],但同样并不理想。

最近在Lok和Zoulim等4位教授^[10]所领导起草的针对目前慢性乙肝治愈的专家意见里,在提到既往的完全治愈(complete sterilizing cure,指血清中检测不到HBsAg,及肝组织内包括cccDNA和整合DNA的HBV DNA完全清除)难以实现的共识基础上,对功能性治愈(functional cure)也进行了讨论。多数专家对功能性治愈定义为:在限定疗程内,在消除残余肝损伤和降低肝细胞癌风险基础上的血清中HBsAg和HBV DNA的持续消失,可伴有或不伴有血清学转换(抗-HBs的阳转)。文中特别提到,部分专家认为功能性治愈还应有cccDNA转录的完全静止、cccDNA的清除(有别于整合DNA的清除)、彻底消除肝损伤和解除肝癌风险。不论是完全治愈或者功能性治愈,血清HBsAg的消失都是实验室判定的最重要指标。

一般而言,血清中的HBsAg主要来自肝细胞核内的cccDNA。但近年来的研究显示,整合的HBV DNA也会转录翻译产生HBsAg^[11]。HBV DNA的整合在慢性乙肝患者中广泛存在,如Mason实验室最近的报道表明,HBV DNA整合大量存在于CHB患者的肝细胞中,患者最多可有上亿的肝细胞带有整合病毒DNA片段^[12]。目前已知,双链线性HBV DNA(dsI-DNA)是病毒整合至宿主基因组的主要来源,其产生与作为正链合成起始引物的前基因组RNA(pgRNA)残端未发生正确的跳转,而在原位起始聚合酶链反应形成大小约3.2 kb的双链线性DNA有关^[13]。与其他逆转录病毒不同,整合的HBV DNA并不参与病毒的复制过程,而只是HBV感染过程中的随机事件。众多的研究结果显示,整合病毒DNA片段的断点大都位于病毒基因组的DR1和DR2区域,多保留了完整的编码HBsAg的S基因区^[11, 14]。由于HBeAg阴性CHB患者病程较HBeAg阳性患者长,发生整合的概率也更大、更加广泛^[15]。考虑到整合的HBV DNA同样能转录产生HBsAg,可以认为,在HBeAg阴性CHB患者中,其血清HBsAg水平对病毒复制水平的指示意义并不大。对于长期接受NA药物治疗的患者,尤其是HBeAg转阴后,血清中低水平的HBsAg可能来自于整合型HBV DNA的持续表达,与病毒载量无关,不能提示肝细胞核

内存在有转录活性的cccDNA^[16]。由此可见,以血清HBsAg的持续消失作为功能性治愈或临床治愈的判定标准,可能会使一些经过长时间NA类药物抗病毒治疗后,肝组织内cccDNA已经耗竭或转录已经完全静默的慢性乙肝患者不得不继续接受长期甚或终生的抗病毒治疗。而实际上,这些患者体内往往并无HBV病毒复制。可能是考虑到了这一现象或问题,也是基于HBsAg消失率过低影响新的抗病毒药物研发的考量,在Lok教授等的专家意见中,也有人提出了“部分治愈”(partial cure)的概念。即经过一定疗程的治疗,患者血清HBV DNA持续检测不到,但HBsAg阳性^[10]。很显然,现有的新一代核苷(酸)类药物通过抑制病毒P蛋白的逆转录活性和DNA聚合酶活性,可以很容易地使血清中的rc-DNA水平快速下降到检测不到的水平。但此时患者肝组织内的cccDNA仍在活跃复制,血清中存在大量的核衣壳内病毒核酸为pgRNA及其变异剪接体的病毒样颗粒,或者核衣壳为空心的颗粒。此时,肝脏因病毒仍在活跃复制而带来的免疫病理损伤可能并未有很好的缓解。来自我国的一项研究显示,在接受NA类药物治疗的慢性乙肝患者,其血清中HBV RNA的水平与患者肝组织的炎性损伤有密切关系^[17]。要实现真正意义上的“部分治愈”,除了病毒DNA检测不到、炎症损伤得到控制外,还需保证停药后病毒不反弹。在停药前能够准确预判哪位患者不会出现病毒学反弹,实现安全停药,现阶段仍是一个严峻的挑战。

由于整合的HBV基因组全长仅有3.2 kb,故3.5 kb长的pgRNA不可能来源于整合的HBV片段,只能由cccDNA直接转录产生。相比血清HBsAg水平,血清HBV RNA能够更好地反映肝组织cccDNA的活性。我们实验室近期通过一个小样本的回顾性临床研究显示,接受NA治疗的CHB患者停药点血清HBV RNA的检测结果显示确实与停药后病毒学反弹发生率密切相关,即停药点血清HBV RNA未检出的患者发生反弹的风险显著降低^[18]。据此,我们提出了“安全停药”建议,即对巩固治疗后达到现指南停药标准的患者,加测血清HBV RNA,如果持续阴性,停药后复发的风险会大为下降。当然,这一指标在进入临床并广泛应用之前,还需通过大样本的前瞻性研究。血清HBV RNA作为病毒活跃复制的指标,其意义可能

不仅局限于停药预测。考虑到血清 HBV RNA 能够较好地反映肝组织 cccDNA 的活性,我们把经过长期 NA 药物治疗后的 cccDNA 清除或者处于持续静默,且血清 HBsAg 低值阳性这一接近于临床治愈的状态称为“准临床治愈”(para-functional cure),以有别于 HBsAg 消失(伴有或不伴有抗-HBs 阳转)的“临床治愈”或“功能性治愈”^[19]。和部分学者提出的部分治愈不同,准临床治愈可以通过检测血清中的 HBV RNA 来进行判定,使之具有临床实践操作的可行性。建议在未来药物的临床疗效评价中,将之作为一个重要的实验室指标。

最后,需要强调的是,HBV DNA 的高频整合也与肝癌发生密切相关^[20]。HBV DNA 整合入宿主的基因组,通过插入突变破坏宿主基因组的功能或影响其调控^[21-22],是 HBV 感染重要的直接致癌机制之一。临床数据也显示,通过抗病毒治疗使患者实现血清 HBsAg 清除后,发生 HCC 的风险则可明显减少。因此,研发新药,实现慢性乙肝的临床治愈乃是我们不懈的追求。

参考文献

- [1] Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013[J]. *Lancet*, 2015, 386(10003): 1546-1555.
- [2] Howard CT, Anna SFL, Stephen AL, et al. *Viral hepatitis [M]*. 4th ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2014.
- [3] Hsu WF, Chen CF, Lai HC, et al. Trajectories of serum hepatitis B surface antigen kinetics in patients with chronic hepatitis B receiving long-term nucleoside analogue therapy[J]. *Liver Int*. 2017. [Epub ahead of print].
- [4] Hung CH, Wang JH, Lu SN, et al. Hepatitis B surface antigen loss and clinical outcomes between HBeAg-negative cirrhosis patients who discontinued or continued nucleoside analogue therapy[J]. *J Viral Hepat*, 2017, 24(7):599-607.
- [5] Levrero M, Testoni B, Zoulim F. HBV cure: why, how, when? [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 18: 135-143.
- [6] European Association for the Study of the Liver, Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398.
- [7] Loggi E, Vitale G, Conti F, et al. Chronic hepatitis B: Are we close to a cure? [J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 47(10): 836-841.
- [8] Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, et al. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: Finite treatment duration unlikely [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(4): 676-683.
- [9] Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(1): 16-26.
- [10] Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, et al. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4):847-861.
- [11] Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4):508-513.
- [12] Mason WS, Gill US, Litwin S, et al. HBV DNA integration and clonal hepatocyte expansion in chronic hepatitis B patients considered immune tolerant [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(5):986-98.e4.
- [13] Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(30): 11135-11140.
- [14] Tu T, Mason WS, Clouston AD, et al. Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(9): 737-753.
- [15] Manesis EK, Papatheodoridis GV, Tiniakos DG, et al. Hepatitis B surface antigen: relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1):61-68.
- [16] Thompson AJV, Nguyen T, Iser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: Disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers [J]. *Hepatology*, 2010, 51(6):1933-1944.
- [17] Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between serum HBV RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients [J]. *J Hepatol*, 2017. [Epub ahead of print].

(下转第 173 页)

2016年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析

陈静宜 廖飞* 冯磊

[摘要] **目的** 了解本地区儿童下呼吸道感染常见细菌分布特点及对抗生素的耐药情况。**方法** 回顾2016年5 857例呼吸道感染患儿痰标本行细菌培养鉴定及药敏试验,对细菌分布特点及细菌耐药情况进行统计学分析。**结果** 在待测痰标本中,病原菌分离率为26%,不同季节及年龄段细菌菌群分布存在差异。分离菌株中革兰阴性菌以大肠埃希菌(*E.coli*,21.5%)、流感嗜血杆菌(HIN,16.8%)和肺炎克雷伯菌(KPN,6.7%)为主;大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)菌株分别占49.7%和33.1%;流感嗜血杆菌对头孢菌素类、阿莫西林/克拉维酸及阿奇霉素敏感;革兰阳性菌以金黄色葡萄球菌(SAU,9.9%)、肺炎链球菌(SPN,9.5%)为主,未发现万古霉素耐药菌株。**结论** 本地区儿童下呼吸道感染存在年龄和季节分布差异,各细菌耐药性有其自身特点,建议临床依据药敏试验结果合理用药。

[关键词] 下呼吸道感染;菌群分布;耐药性分析

Distribution and drug resistance of bacterial flora in children with lower respiratory tract infections in a hospital at Yuxi, Yunnan in 2016

CHEN Jingyi, LIAO Fei*, FENG Lei

(Clinical Laboratory, the Sixth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, People's Hospital of Yuxi City of Yunnan Province, Yuxi, Yunnan, China, 653100)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the distribution of common bacteria and antibiotic resistance in children with lower respiratory tract infections at Yuxi area. **Methods** The sputum samples from 5 857 children with respiratory tract infection were collected for bacterial culture, identification and drug sensitivity test in 2016. The distribution of bacteria and drug resistance of bacteria were statistically analyzed. **Results**

The isolation rate of pathogenic bacteria was 26% in the tested sputum specimens. The distribution of bacterial flora was different in different seasons and ages. The Gram-negative bacteria among the isolated strains were mainly *Escherichia coli* (*E.coli*, 21.5%), *Haemophilus influenzae* (HIN, 16.8%) and *Klebsiella pneumoniae* (KPN, 6.7%). *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) strains accounted for 49.7% and 33.1% respectively. *Haemophilus influenzae* is sensitive to cephalosporins, amoxicillin-clavulanic acid and azithromycin. Gram-positive bacteria were mainly *Staphylococcus aureus* (SAU, 9.9%), *Streptococcus pneumoniae* (SPN, 9.5%), and vancomycin resistant strains were not isolated. **Conclusion** There are differences in age and season distribution in children with respiratory tract bacterial infection at Yuxi area. The drug resistance of each bacterium has its own characteristics, suggesting that the clinical use of drug sensitivity test is reasonable.

[KEY WORDS] Lower respiratory tract infection; Bacteria distribution; Drug resistance analysis

基金项目:2015年度云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金(2015FB084)

作者单位:云南省玉溪市人民医院暨昆明医科大学第六附属医院检验科,云南,玉溪 653100

*通讯作者:廖飞, E-mail:liaojingchen1979@163.com

由于儿童呼吸系统及免疫系统发育未成熟,下呼吸道感染成为儿童时期最常见且病死率较高的疾病。儿童下呼吸道感染病原体分布广泛,发达国家以病毒为主,发展中国家以细菌为主^[1]。为了给临床诊治提供依据,本次研究通过回顾分析2016年下呼吸道感染患儿分离的病原菌及药敏结果,以了解本地区近阶段儿童下呼吸道感染细菌病原学的流行特征及耐药情况。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取我院2016年1至12月收治入院的6岁以下下呼吸道感染患儿5 857例,男3 569例,女2 288例,男女比例为1.56:1。送检标本按年龄分组:≤1月909例,>1月~≤6月2 207例,>6月~≤1岁1 379例,>1~≤3岁680例,>3~≤6岁682例;按季节分组:春季2-4月,夏季5-7月,秋季8-10月,冬季11-1月。

1.2 标本采集

医护人员严格按照要求进行标本采集,患儿入院次日晨起用生理盐水漱口后留取第一口痰于无菌痰杯中送检,不能配合咳嗽者,用生理盐水清洁口腔后,采用一次性吸痰器吸痰。送检标本鳞状上皮细胞<10个/LP,白细胞>25个/LP判为合格痰标本。

1.3 细菌培养、鉴定及药敏试验

将合格痰标本分别接种于哥伦比亚血琼脂平皿、万古巧克力平皿及麦康凯平皿,对所分离可疑病原菌进行鉴定及药敏试验并报告最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),除流感嗜血杆菌的药敏试验采用法国梅里埃公司的ATB HAEMO药敏试剂盒外,其余细菌鉴定及药敏试验均采用该公司VITEK 2 compact细菌鉴定及药敏系统。上述药敏试验结果根据美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)2013年折点进行判读^[2],用头孢噻吩纸片法测定流感嗜血杆菌β-内酰胺酶。

1.4 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件对不同组间计数资料进行 χ^2 检验,剔除同一患儿重复检出的细菌, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用WHONET 5.6软件进行药敏试验结果的统计分析。

2 结果

2.1 不同年龄段细菌分离率

5 857份痰标本中共分离出1 534株细菌,细菌培养总阳性率为26%(1 534/5 857)。按不同年龄段划分,细菌分离率分别为:≤1月40%(366/909),>1月~≤6月30%(656/2 207),>6月~≤1岁26%(364/1 379),>1~≤3岁15%(100/680),>3~≤6岁7%(48/682),随年龄增长,儿童细菌感染率明显减低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 主要细菌在不同年龄段的检出情况

在分离的所有菌株中,分离菌株数较多的依次是大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, HIN)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SAU)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SPN)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KPN)。不同年龄段细菌分布存在差异:≤1月患儿分离菌株中以SAU、*E.coli*、SEP为主(占50%);>1月~≤6月主要是*E.coli*、HIN、SAU(占49%);>6月~≤1岁以*E.coli*、HIN、SPN较多(占63%);>1~≤3岁和>3~≤6岁主要是HIN、SPN(分别占73%和40%),见表1。

2.3 不同季节细菌分离率

从季节分布看,各季节分离率分别为:春季27%(381/1 398),夏季22%(265/1 196),秋季23%(294/1 270),冬季30%(594/1 993)。冬季细菌感染率较其他季节高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 主要革兰阴性杆菌对抗生素的耐药率

本次分离的*E.coli*和KPN产超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamase, ESBL)菌株分别占49.7%(164/330)和33.1%(34/103),头孢曲松耐药率接近50%,头孢他定耐药率接近30%,*E.coli*对阿莫西林/克拉维酸、头孢吡肟耐药率分别为2.3%和7.1%,KPN对这2类抗生素耐药率均高于*E.coli*但在25%以下,*E.coli*对碳青霉烯类的敏感率为100%,KPN对亚胺培南和美罗培南耐药率高于*E.coli*,接近10%;ECL对各类抗生素耐药率均较低,见表2。

2.5 主要革兰阳性球菌对抗生素的耐药率

葡萄球菌属耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)检出率19.6%(30/152),对红霉素和克林霉素耐药

表1 不同年龄段细菌检出情况(%)

Table 1 Distribution of the main bacterial pathogens in different age groups (%)

细菌种类	≤1月		>1月~≤6月		>6月~≤1岁		>1~≤3岁		>3~≤6岁		合计(%)		χ^2	P值
	菌株数	构成比(%)	菌株数	构成比(%)	菌株数	构成比(%)	菌株数	构成比(%)	菌株数	构成比(%)	菌株数	构成比(%)		
<i>E.coli</i>	65	17.8	171	26.1	84	23.1	7	7.0	3	6.3	330	21.5	284.8	<0.001
HIN	28	7.7	94	14.3	86	23.6	37	37.0	12	25.0	257	16.8	103.5	<0.001
SAU	70	19.1	62	9.5	12	3.3	5	5.0	3	6.3	152	9.9	141.5	<0.001
SPN	3	0.8	41	6.3	59	16.2	36	36.0	7	14.6	146	9.5	77.2	<0.001
KPN	22	6.0	54	8.2	22	6.0	3	3.0	2	4.2	103	6.7	85.9	<0.001
SEP	46	12.6	3	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	49	3.2	37.7	<0.001
ECL	0	0.0	36	5.5	11	3.0	3	3.0	2	4.2	52	3.4	58.0	<0.001
其他	132	36.1	195	29.7	90	24.7	9	9.0	19	39.6	445	29.0	-	-
阳性菌株	366	100.0	656	100.0	364	100.0	100	100.0	48	100.0	1 534	100.0	-	-

E.coli: 大肠埃希菌; HIN: 流感嗜血杆菌; SAU: 金黄色葡萄球菌; SPN: 肺炎链球菌; KPN: 肺炎克雷伯杆菌; SEP: 表皮葡萄球菌; ECL: 阴沟肠杆菌。

表2 主要革兰阴性杆菌对抗生素的耐药率(%)

Table 2 Drug resistance rates of the main gram-negative bacilli (%)

抗生素	<i>E.coli</i> (n=330)			KPN (n=103)			ECL (n=52)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
氨苄西林	18.3	0.5	81.2	-	-	-	-	-	-
哌拉西林	31.0	9.9	59.1	48.3	3.4	48.3	96.5	0.0	3.5
阿莫西林/克拉维酸	82.5	15.2	2.3	56.8	16.9	26.3	-	-	-
头孢唑啉	0.9	0.0	99.1	1.5	0.0	98.5	-	-	-
头孢他啶	92.6	2.3	27.1	66.1	2.5	31.4	88.8	2.4	8.8
头孢曲松	51.0	0.0	49.0	49.2	0.0	50.8	89.5	0.0	10.5
头孢吡肟	92.9	0.0	7.1	74.6	1.7	23.7	100.0	0.0	0.0
氨曲南	84.5	1.0	14.5	68.6	1.7	29.7	88.8	2.4	8.8
厄他培南	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
亚胺培南	100.0	0.0	0.0	90.2	1.7	8.1	98.2	0.0	1.8
美洛培南	100.0	0.0	0.0	90.6	1.8	7.6	100.0	0.0	0.0
阿米卡星	100.0	0.0	0.0	99.2	0.0	0.8	100.0	0.0	0.0
庆大霉素	75.9	0.0	24.1	83.9	0.0	16.1	100.0	0.0	0.0
环丙沙星	80.2	1.0	18.8	97.5	0.8	1.7	100.0	0.0	0.0
左旋氧氟沙星	81.0	0.8	18.2	98.3	0.0	1.7	100.0	0.0	0.0
复方新诺明	56.1	0.0	43.9	84.7	0.0	15.3	96.5	0.0	3.5
呋喃妥因	99.2	0.8	0.0	16.1	76.3	7.6	85.8	12.4	1.8
四环素	43.4	0.0	56.6	78.8	0.0	21.2	94.7	0.0	5.3

S: 敏感; I: 中介; R: 耐药; -: 天然耐药。

率较高(>50%), 表皮葡萄球菌对苯唑西林耐药率高达72%(35/49); 葡萄球菌对红霉素和克林霉素的耐药率均大于50%, 见表3。SPN中青霉素耐药

肺炎链球菌(penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*, PRSP)检出率较低占3.4%(5/146), 可作为临床首选用药, 但对克林霉素、红霉素、四环素、复

方新诺明的耐药率均高于90%,见表4。以上所分离的革兰阳性菌未发现万古霉素耐药菌株。

表3 葡萄球菌属对抗生素的耐药率(%)

Table 3 Drug resistance rates of Staphylococci (%)

抗生素	SAU (n=152)			SEP (n=49)		
	S	I	R	S	I	R
青霉素G	4.1	0.0	95.9	8.0	0.0	92.0
苯唑西林	80.4	0.0	19.6	28.0	0.0	72.0
庆大霉素	87.6	3.1	9.3	74.0	20.0	6.0
利福平	99.0	1.0	0.0	96.0	0.0	4.0
环丙沙星	85.6	7.2	7.2	90.0	0.0	10.0
左旋氧氟沙星	89.7	2.1	8.2	74.0	0.0	26.0
莫西沙星	91.8	1.0	7.2	94.0	0.0	6.0
复方新诺明	81.4	0.0	18.6	52.0	0.0	48.0
克林霉素	45.4	0.0	54.6	40.0	0.0	60.0
红霉素	40.2	0.0	59.8	26.0	0.0	74.0
呋喃妥因	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
利奈唑胺	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
万古霉素	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
奎奴普丁/达福普汀	100.0	0.0	0.0	97.6	0.0	2.4
四环素	64.9	2.1	33.0	62.0	6.0	32.0
替加环素	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0

S:敏感; I:中介; R:耐药。

表4 肺炎链球菌对抗生素的耐药率(%)

Table 4 Drug resistance rates of *Streptococcus pneumoniae* (%)

抗生素	肺炎链球菌(n=146)		
	S	I	R
青霉素G(非脑膜炎)	96.0	0.6	3.4
阿莫西林	65.4	12.3	22.3
头孢曲松(非脑膜炎)	79.8	2.8	17.4
头孢噻肟(非脑膜炎)	76.4	4.9	18.7
左旋氧氟沙星	98.6	0.9	0.6
莫西沙星	100.0	0.0	0.0
氧氟沙星	98.6	0.9	0.6
复方新诺明	7.6	0.0	92.4
克林霉素	1.7	0.0	98.3
红霉素	0.6	0.0	99.4
利奈唑胺	100.0	0.0	0.0
万古霉素	100.0	0.0	0.0
氯霉素	95.3	0.0	4.7
四环素	4.1	0.0	95.9

S:敏感; I:中介; R:耐药。

2.6 流感嗜血杆菌对抗生素的耐药率

流感嗜血杆菌β-内酰胺酶阳性菌株占32.4%,对氨苄西林、复方新诺明、耐药率较高(>40%),对头孢菌素类、阿奇霉素及阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦耐药率较低(<25%),见表5。

表5 流感嗜血杆菌对抗生素的耐药率(%)

Table 5 Drug resistance rates of *Haemophilus influenzae* (%)

抗生素	流感嗜血杆菌(n=157)		
	S	I	R
氨苄西林	57.2	0.0	42.8
阿莫西林/克拉维酸	80.1	0.4	19.5
氨苄西林/舒巴坦	75.9	0.0	24.1
头孢噻吩	74.6	0.5	24.9
头孢呋辛	70.5	5.6	23.9
头孢他啶	90.6	0.0	9.4
头孢曲松	90.7	0.0	9.3
头孢噻肟	89.8	0.0	10.2
头孢吡肟	98.3	0.0	1.7
头孢克洛	69.8	8.8	21.4
氨曲南	100.0	0.0	0.0
亚胺培南	100.0	0.0	0.0
美洛培南	100.0	0.0	0.0
利福平	99.5	0.5	0.0
左旋氧氟沙星	100.0	0.0	0.0
氧氟沙星	100.0	0.0	0.0
复方新诺明	43.0	0.0	57.0
阿奇霉素	88.3	0.0	11.7
氯霉素	90.7	0.0	9.3
四环素	90.7	0.0	9.3

S:敏感; I:中介; R:耐药。

3 讨论

下呼吸道感染是儿童时期的常见病,世界范围内每年5岁以下儿童发生肺炎约1.56亿,中国约0.21亿^[3],据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计,在5岁以下儿童死亡原因中,下呼吸道感染占第二位^[1]。本次研究细菌分离率占26%,与国内相关报道接近^[1, 4-5]。细菌总体分布革兰阴性杆菌检出率较高,以 *E.coli* 和 HIN 为主,革兰阳性球菌以 SPN 和 SAU 为主。从年龄分布看,随年龄增长,细菌感染率明显减低,考虑与婴幼儿阶段呼吸系统及细胞免疫功能发育不完善

相关^[6-7],因此加强婴幼儿时期感染防治至关重要。不同阶段感染细菌种类不同,1岁以内,*E.coli*感染的比例较大,≤1月患儿葡萄球菌属感染明显高于其他各年龄段,主要集中在新生儿,考虑新生儿吸入性肺炎;>6月以革兰阴性杆菌感染为主,HIN和SPN感染率有所上升;1岁以后以HIN、SPN为主,考虑与外界接触增多,感染细菌趋向于社区感染常见菌。从季节分布看,冬季较其他季节细菌检出率增加,这与国内其他地区的报道一致^[5];除肺炎链球菌冬、春季检出率高于其他季节外,其余细菌各季节分布基本一致,结果有异于袁翊等^[3]的研究报道,考虑与不同地区气候、地理环境差异相关,提示做好本地区流行病学调查有益于疾病的防治工作。

分离的肠杆菌科细菌,大肠埃希菌中产ESBL菌株占49.7%,肺炎克雷伯菌产ESBL菌株占33.1%,这与国内相关研究一致^[8-9]。儿童可用抗生素中,阿莫西林/克拉维酸、头孢吡肟耐药率较低,可作为首选用药,头孢他定耐药率接近30%,*E.coli*未发现碳青霉烯类耐药菌株,KPN中碳青霉烯类耐药菌株接近10%,总体来看KPN耐药率高于*E.coli*,这一发现我们将继续收集相关菌株做进一步研究;阴沟肠杆菌对各类抗生素耐药率均较低。

分离的革兰阳性菌株中均未发现万古霉素耐药菌株。金黄色葡萄球菌MRSA检出率19.6%,与四川地区相关报道一致^[1,10],与国内部分地区存在差异^[5,11-12],考虑地域环境因素及当地抗生素使用习惯相关;表皮葡萄球菌苯唑西林耐药率达72%,以上2种细菌对红霉素和克林霉素的耐药性高于50%,提示临床应依据药敏结果合理用药,减少耐药菌株的发生。SPN中PRSP检出率3.4%,与国内相关报道一致^[13]。青霉素和三、四代头孢菌素可作为治疗SPN感染的首选用药,红霉素和克林霉素耐药率较高(>95%),其耐药机制包括:耐药基因*erm(B)*编码的23S rRNA甲基化酶致靶位改变;*mef*编码的主动外排系统;23SrRNA、核糖体蛋白L4或L22突变,其菌株不含*erm(B)*或*mef*基因^[14]。HIN中β-内酰胺酶阳性菌株占32.4%,氨苄西林耐药率大于40%,这与国内相关报道一致^[15],阿莫西林/克拉维酸、头孢菌素类和阿奇霉素可作为其首选用药。

国内外相关研究发现部分患儿出现两种细菌交叉感染现象^[16-17],考虑属反复呼吸道感染,除婴

幼儿免疫系统发育不完善外,还与抗生素的不规范使用及大量多重耐药菌的产生有关,提示我们宜加强抗生素管理,合理用药,有效控制多重耐药菌的产生。

综上所述,本地区儿童细菌感染耐药形式严峻,儿童抗生素的使用有其局限性和特殊性,临床医生需适时参考本地区流行病学特点及细菌耐药情况,合理选用抗生素。

参考文献

- [1] World Health Organization (WHO). Indonesia: health profile [R]. WHO Media Centre, Geneva, Switzerland, 2014.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S23, CLSI, 2013.
- [3] 袁翊,陈文碧,刘靳波,等.儿童下呼吸道临床分离菌的分布及耐药性[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(5):552-557.
- [4] 崔黎红,郎丹丹.我院儿童呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J].儿科药学杂志,2015,21(6):44-46.
- [5] 王淑会,季伟,张新星,等.苏州地区14994例儿童呼吸道感染细菌病原学特点[J].中国当代儿科杂志,2016,18(1):44-50.
- [6] 董晓莉,荣霞,陈月洁,等.儿童急性下呼吸道感染的病原微生物分布特征[J].热带医学杂志,2017,17(05):654-657.
- [7] Aponte FE, Taboada B, Espinoza MA, et al. Rhinovirus is an important pathogen in upper and lower respiratory tract infections in Mexican children[J]. Virol J, 2015, 12:31.
- [8] 王冬梅,袁少伟.小儿社区获得性下呼吸道感染病原菌及耐药性分析[J].宁夏医学杂志,2013,35(12):1241-1243.
- [9] 江杨华,欧阳晓玲,熊劲芝,等.小儿下呼吸道感染病原菌的分布特征及耐药性分析[J].医学理论与实践,2015,28(4):429-431,446.
- [10] 袁飞,王晓青,秦进.2015年四川省儿童患者病原菌分布与耐药性监测[J].实用医院临床杂志,2017,14(02):44-48.
- [11] 郑兴厂,范文文,孙佰秀,等.儿童社区获得性下呼吸道感染病原菌分布及其耐药性[J].齐鲁医学杂志,2016,31(3):322-324,328.
- [12] 宁静,董权汉,任立歆.儿童下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(5):1260-1262.

(下转第173页)

· 论 著 ·

沉渣包埋法在卵巢肿瘤手术盆腔冲洗液细胞学诊断中的应用

谭丽珊^{1*} 陈玉英¹ 余健华² 陈智慧¹ 郭慧¹

[摘要] **目的** 探讨沉渣包埋法在卵巢肿瘤手术盆腔冲洗液细胞病理诊断中的应用价值。**方法** 以我院收治的66例卵巢恶性肿瘤患者作为研究对象,对卵巢肿瘤手术盆腔冲洗液同时行常规细胞涂片法与沉渣包埋法制片,HE染色,并进行对比分析。**结果** 沉渣包埋法联合常规涂片法的癌细胞阳性检出率高于单一的常规细胞涂片法和沉渣包埋法,差异有统计学意义(P 均 <0.01);沉渣包埋法对卵巢癌分类诊断的符合率高于常规涂片法,差异有统计学意义($\chi^2=4.569, P=0.033$)。**结论** 沉渣包埋法联合常规涂片法对卵巢恶性肿瘤的诊断阳性率较高,与常规细胞涂片法相比,盆腔冲洗液沉渣包埋法对卵巢癌分类诊断更佳。

[关键词] 卵巢肿瘤;沉渣包埋法;常规细胞涂片法

Application of sediment embedding method in cytological diagnosis of pelvic lavage fluid in ovarian tumors

TAN Lishan^{1*}, CHEN Yuying¹, YU Jianhua², CHEN Zhihui¹, GUO Hui¹

(1. Department of Pathology, The First People's Hospital of Shaoguan, Shaoguan, Guangdong, China, 512000; 2. Department of Pathology, Medical College of Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong, China, 512000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the application value of sediment embedding method in cytological diagnosis of pelvic lavage fluid in ovarian tumors. **Methods** 66 cases of ovarian malignant tumor treated in our hospital were recruited. The pelvic flushing fluids were collected during ovarian tumor operation. The conventional cell smear and sediment embedding methods were performed and the comparative analysis was also carried out. **Results** The positive cancer cell detective rate with the sediment embedding plus the conventional smear method was significant higher than that of the conventional cell smear method or the sediment embedding method alone. The difference was statistically significant ($P<0.01$). The sediment embedding method has a higher coincidence rate of the ovarian cancer classification compared to the conventional smear method ($\chi^2=4.569, P=0.033$). **Conclusion** The positive rate of the diagnosis of ovarian malignant tumor increases significantly by using the method of sediment embedding combined with the conventional smear method. Compared with the conventional smear method, the pelvic lavage fluid sediment embedding method is better for the diagnosis of ovarian cancer.

[KEY WORDS] Ovarian neoplasms; Sediment embedding method; Conventional cell smear method

卵巢恶性肿瘤的发病率近年来不断上升,发病仅次于宫颈癌和子宫体癌,严重威胁女性的生

命健康与安全^[1-2]。上皮性卵巢癌约占卵巢恶性肿瘤的85%^[3]。卵巢位于盆腔深部,其胚胎的发育过

作者单位:1. 韶关市第一人民医院病理科,广东,韶关 512000

2. 韶关学院医学院病理教研室,广东,韶关 512000

*通讯作者:谭丽珊, E-mail: 18927827666@189.cn

程及其相应的内分泌功能相对复杂,因此患者在卵巢癌早期常无明显的临床症状,70%患者确诊时已到中晚期^[4]。因此对卵巢恶性肿瘤的早期诊断和及时治疗是改善患者预后的重要前提^[5]。妇科卵巢肿瘤手术中常开腹进行盆腔冲洗,收集冲洗液并对冲洗液进行细胞学分析,以协助临床进行诊断及肿瘤分期。关于卵巢肿瘤盆腔冲洗液细胞学检查结果的可靠性,及对冲洗液细胞的诊断及鉴别诊断是病理细胞学诊断的难点。

在病理科的日常工作中,常进行胸腹水的脱落细胞检查,处理过程常采用常规涂片法。收集胸、腹水或体腔冲洗液离心后获得絮状凝块沉渣,经常规脱水石蜡包埋,称之为沉渣包埋法。沉渣包埋法制作石蜡细胞块这一技术的运用,使细胞学诊断上到了一个新台阶。所制作而成的石蜡细胞块,可以和肿瘤大体组织块一样,多次进行切片并长期保存,并在此基础上开展以下检测技术:苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色进行细胞的良恶性区分;免疫组化抗体联合运用,揭示转移性肿瘤的来源部位;运用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术对肿瘤治疗进行综合判断等,解决更多临床诊断和研究上的问题^[6]。为探索提高盆腔冲洗液肿瘤细胞阳性检出率的方法,获得更高的阳性率,本研究收集我院66例卵巢癌手术中盆腔冲洗液标本,均行常规细胞涂片法和沉渣包埋法检查,进行对比分析,为卵巢肿瘤盆腔冲洗液的脱落细胞学病理诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取韶关市第一人民医院2012年1月至2016年12月66例卵巢肿瘤病例资料,患者手术前未接受任何放化疗等其他辅助治疗。术后肿瘤大体组织学诊断均为上皮性卵巢癌,其中浆液性腺癌27例,透明细胞腺癌15例,子宫内膜样癌10例,黏液性腺癌9例,恶性Brenner瘤3例,未分化癌2例,术后组织学结果与术中盆腔冲洗液细胞学诊断结果相对照。患者年龄为34~63岁,中位年龄为48岁。

1.2 标本采集

术中开腹后取100 mL生理盐水注入盆腔中,于子宫直肠陷窝抽取盆腔冲洗液,放入干净容器。

1.3 检查方法

1.3.1 常规细胞涂片法制片方法

将手术盆腔冲洗液充分震荡混匀,取50 mL液体分别装入2支试管,以2 500 r/min的转速离心10 min,弃去上清液,吸取沉渣,涂片4张,经95%乙醚酒精固定1 h,HE染色后,光镜观察。

1.3.2 盆腔冲洗液沉渣包埋法制片方法

取患者手术盆腔冲洗液50 mL,离心方法同前,弃去上清液后,沿试管壁缓慢加入4%中性甲醛液固定,防止沉渣再度冲散,固定时间6 h以上。沉渣固定后,将试管再次离心,弃去上清液,将沉渣吸出,用棉纸包好,常规脱水后石蜡包埋,4 μ m厚度切片,HE染色,光镜观察。

1.4 常规细胞学涂片及沉渣包埋制片观察

1.4.1 阳性判断

光镜下观察到具有恶性特征的细胞评为阳性,恶性特征细胞具有细胞核大、深染,核形不规则,细胞大小不一,成团脱落、排列成腺样,异形性明显等形态特点,未见上述恶性特征细胞评为阴性。

1.4.2 卵巢癌分类细胞学形态观察特点

浆液性腺癌可见体积较小的肿瘤细胞,排列成腺管状或乳头状,胞浆丰富红染,核偏位,个别细胞呈“鞋钉样”形态,胞浆内未见明确黏液空泡;透明细胞腺癌的细胞胞浆丰富,富含糖原,呈空泡或透明状;子宫内膜样腺癌的肿瘤细胞亦呈乳头或腺管状排列,核仁较浆液性腺癌细胞及透明细胞腺癌细胞的清晰可见,胞浆粉染,染色质为粗颗粒;黏液性腺癌可见细胞胞浆充满大量透明黏液,细胞核被挤压至一旁,呈印戒细胞样形态;恶性Brenner瘤可见典型的椭圆形或圆形肿瘤细胞,呈“铺砖样”排列,未见明确腺管结构,细胞核居中;未分化癌细胞为单一圆形形态,核膜不规则,染色质成颗粒状密集分布且不均匀,核仁不明显或者较小,胞浆少。

1.5 统计学处理

应用SPSS 13.0软件对数据进行统计学分析处理,计量资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常规细胞学涂片法与沉渣包埋法对上皮性卵巢癌阳性检出率比较

沉渣包埋法联合常规涂片法癌细胞阳性检出

率高于单一的常规细胞涂片法或沉渣包埋法,差异有统计学意义(P 均 <0.01),常规细胞涂片法和沉渣包埋法癌细胞检出率对比无明显差异($P>0.05$)。提示两法联合对盆腔冲洗液癌细胞阳性检出率更高,见表1。

表1 2种方法对上皮性卵巢癌细胞阳性检出率的比较
Table 1 Comparison of positive detection rate of epithelial ovarian tumor cell between 2 methods

方法	阳性例数	阴性例数	阳性检出率(%)
常规涂片法	37	29	56
沉渣包埋法	46	20	70
沉渣包埋法+常规涂片法	61	5	92

常规涂片法结合沉渣包埋法与常规涂片法和沉渣包埋法癌细胞阳性检出率对比, P 均 <0.01 ;常规细胞涂片法和沉渣包埋法癌细胞阳性检出率对比无明显差异, $P>0.05$ 。

2.2 2种诊断方式对上皮性卵巢癌分类诊断统计结果

以术后肿瘤大体组织学肿瘤类型分类为标准,对比2种方法在细胞学上对卵巢癌初步分类的符合率。常规细胞涂片法肿瘤类型诊断符合率为51.50%(34/66);沉渣包埋法肿瘤类型分类诊断符合率为69.70%(46/66)。沉渣包埋法对卵巢癌分类诊断的符合率高于常规涂片法,差异有统计学意义($\chi^2=4.569, P=0.033$),见表2。

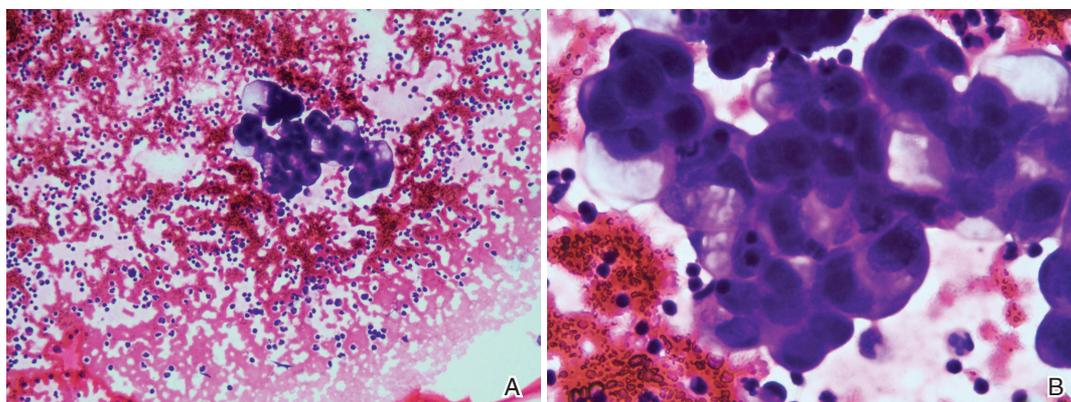
2.3 2种诊断方式镜下所见形态

常规细胞涂片法:涂片较厚,背景复杂,卵巢癌细胞成堆,重叠,分布不均,立体感强。癌细胞体积大小不等,个别细胞体积巨大,细胞异形明显,核大深染,核仁明显,染色质不均匀,成块状,胞质稀少。可见单个散在癌细胞,胞质部分有空泡,核仁明显增大(图1)。

表2 2种方式对卵巢癌分类诊断符合率比较(n)

Table 2 Comparison of coincidence rate of tumor classification between 2 methods (n)

方法	浆液性腺癌	透明细胞腺癌	子宫内膜样腺癌	黏液性腺癌	恶性Brenner瘤	未分化癌	符合例数	符合率(%)	χ^2	P
常规涂片法	17	9	3	4	1	0	34	51.50	4.569	0.033
沉渣包埋法	20	12	5	6	2	1	46	69.70		



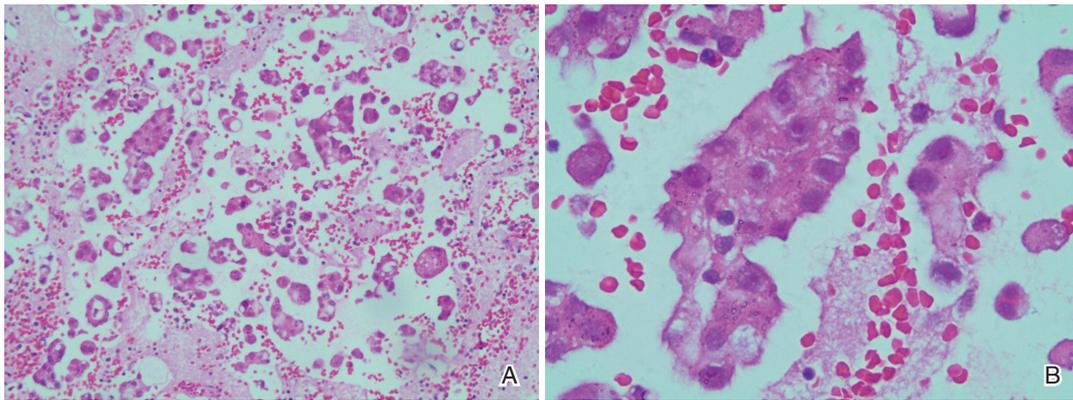
A: 常规涂片法见涂片厚薄不均,背景大量分布不均,深浅不一的红细胞,淋巴细胞(HE, $\times 100$); B: 常规涂片法涂片见腺癌细胞成团,立体感强,细胞结构模糊(HE, $\times 500$)。

图1 常规涂片法示癌细胞

Figure 1 A group of cancer cell in the smear

沉渣包埋与常规涂片相比,细胞在同一平面上,细胞相对较小,沉渣包埋切片中细胞染色清晰。可见形成典型的腺管样结构,癌细胞核大、

畸形、深染,染色质粗,部分胞质内可见空泡及粘液,把核挤向一侧呈印戒状,三维立体感不如涂片强烈,细胞轮廓较常规涂片法清晰(图2)。



A: 沉渣包埋制片法见细胞处在同一平面上,胞分布均匀,易于观察(HE,×100); B: 沉渣包埋制片法见细胞结构清晰,核膜、核仁易见,观察到腺癌细胞形成的典型的腺腔样结构(HE,×500)。

图2 沉渣包埋制片法示癌细胞

Figure 2 A group of cancer cell in sedimentation method

3 讨论

来源于卵巢表面上皮的卵巢癌是最常见的卵巢恶性肿瘤^[7],临床诊断卵巢癌常通过血清学肿瘤指标及影像学(B超、MRI、CT)等方法,不同的检查方法诊断结果差异较大^[8],妇科手术探查仍然是确定肿瘤良恶性及肿瘤分类的重要方法。近年来,将术中盆腔冲洗液脱落细胞学检查引入妇科卵巢术中行盆腔冲洗并收集冲洗液进行脱落细胞学检查,使卵巢肿瘤的诊断与鉴别诊断得以快速进行且准确性提高,因此提高盆腔冲洗液脱落细胞学肿瘤细胞的诊断技术日益迫切。

卵巢手术盆腔冲洗液中细胞成分较多,除肿瘤脱落细胞外,还可见腹腔间皮细胞、炎细胞、红细胞等。对盆腔冲洗液的处理,传统大多采用常规涂片法,离心常规涂片后镜下观察,对细胞进行定性和分类。近年来,出现了沉渣包埋法制作成细胞块的技术,促进了盆腔冲洗液细胞学诊断的发展。笔者总结,两者各有优缺点。常规涂片法优点:快速经济,简单方便^[9];缺点:细胞过于分散或重叠,存在过多的血液背景或黏液背景,不利于镜下观察;肿瘤细胞胞质肿胀,核质比失调,对阳性细胞的判定易出现误判^[10-11]。沉渣包埋法优点:细胞集中且分布均匀,细胞核结构清晰,背景清晰,易于观察;所制成的细胞块可用于下一步切片进行免疫组化检测或肿瘤分子检测。缺点:细胞块包埋脱水后,组织与切片方向的不同有时会引起可观察肿瘤细胞数量的减少。研究报道^[9],常规

涂片法细胞学诊断不确定率为10.3%,沉渣包埋法联合常规涂片法可将诊断不确定率降低。因此,笔者认为,沉渣包埋法联合常规涂片法,可以减少单一包埋法中的误差,增加肿瘤细胞的阳性检出率。唐丽艳^[12]、陈广峰等^[13]曾将沉渣包埋技术应用用于浆膜腔恶性积液的诊断当中,其实验结果表明,沉渣包埋法联合常规涂片法可以提高癌细胞的检出率和准确性。杨红等^[14]报道,肯定了沉渣包埋法联合常规涂片法是提高细胞学病理诊断的有效方法。笔者尝试将沉渣包埋法应用于卵巢癌盆腔冲洗液当中,实验统计常规涂片法及沉渣包埋法制片的阳性率分别为56%与70%,而联合2种方法检测的癌细胞阳性率达92%。提示与单一的常规细胞涂片法及沉渣包埋法相比,沉渣包埋法联合常规涂片法对癌细胞阳性检出率更高,漏诊率更低。这与文献^[12-14]上的相关研究结果一致。盆腔冲洗液中,常规涂片法可以观察到细胞的整体轮廓,沉渣包埋切片后,显示了卵巢癌团的内部结构,腺管样形态清晰可见,有形成组织结构的发展趋势。2种方法结合可以弥补沉渣包埋切片的误差,综合判断可以取得取长补短的作用。由此推断沉渣包埋法值得广泛应用于盆腔冲洗液当中,结合常规涂片法提高癌细胞阳性检出率,在工作当中联用两种方法检出率更高。

研究显示,沉渣包埋法由于能保持脱落细胞的形态与结构,与常规涂片(细胞分散,形态模糊)相比,对肿瘤分型准确性更大^[15]。本研究沉渣包埋法卵巢癌分类符合率为69.70%,高于常规涂片

法的符合率(51.50%)($P<0.05$)。沉渣包埋法制片的细胞轮廓清晰,易于观察到肿瘤细胞的排列结构,更加利于肿瘤分型,提示沉渣包埋法在细胞学基础上对卵巢癌初步分型的可行性。接下来我们可以用沉渣包埋法所得的细胞块进行切片,在此基础上选择有针对性的免疫组化抗体进行染色,对肿瘤分类进行细化或对其来源进行判断,有助于提高肿瘤细胞学的诊断水平;也可以进行肿瘤分子检测,为临床靶向药物的选择提供依据。

准确而有效的病理诊断是对肿瘤治疗取得满意疗效的先决条件^[16],卵巢手术盆腔冲洗液脱落细胞学由于操作简单,可以比术后大体肿瘤组织学更为高效而迅速。本次实验结果提示,虽然单一的沉渣包埋法使用未能使盆腔冲洗液检出率达到最高,但同时结合沉渣包埋法和常规涂片法这两种细胞制片法,明显提高阳性检出率。术中收集盆腔冲洗液并进行沉渣包埋法制片,有利于快速进行卵巢癌肿瘤分型。本实验操作简单易行,有利于卵巢癌患者得到及时,快速诊断,值得在病理日常工作中推广。

参考文献

- [1] 易琳,黄学梅,刘预,等. CA125、CA199、CEA联合检测在卵巢癌诊断中的应用[J]. 重庆医学, 2012, 41(32):3372-3374.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30.
- [3] Pellicciotta I, Yang CP, Venditti CA, et al. Response to microtubule-interacting agents in primary epithelial ovarian cancer cells [J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1):33.
- [4] 石华,罗蔚,李文胜,等. 血清人附睾上皮分泌蛋白4水平检测在卵巢癌的应用价值[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(4):267-270.
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-249.
- [6] 林静,周英琼. 脱落细胞学的细胞块制作及应用的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(15):2739-2740.
- [7] 张海燕,姜海娇,祝迪,等. 恶性腹腔积液中卵巢癌肿瘤细胞标志物的免疫细胞化学分析[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(2):159-162.
- [8] 任明达,刘树学,唐玉德,等. 卵巢肿瘤定性诊断及卵巢癌术前分期: MRI与病理对照研究[J]. 中国CT和MRI杂志, 2015, 13(4):87-90.
- [9] 朱琳,肖锋,钱铮,等. 细胞块石蜡切片联合免疫细胞化学技术在浆膜腔积液细胞学诊断中的应用[J]. 南通大学学报(医学版), 2016, 36(3):182-185.
- [10] 魏霖,程焰红,李颜,等. 胸腹水沉渣包埋结合免疫组化染色在细胞病理诊断中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2015, 22(12):825.
- [11] 丁春晓,张洋,张恒,等. 联合抗体免疫组织化学检测胸腹水细胞对恶性间皮瘤诊断的应用价值分析[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(2):163-168.
- [12] 唐丽艳. 细胞块技术在浆膜腔积液细胞学诊断中的应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(3):279-281.
- [13] 陈广锋,程志生,钟纬经,等. 浆膜腔积液细胞学联合诊断策略研究[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(4):622-624.
- [14] 杨红,王影,覃胜,等. 浆膜腔积液细胞块对提高细胞学诊断及开展基因检测的价值[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(21):9489-9493.
- [15] 黄其文,姜汉国. 胸腔积液细胞块切片免疫组化染色技术鉴别诊断肺腺癌的临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(2):227-229.
- [16] 黄啸,范建玄,蔡树模,等. CK7等单抗在鉴别原发与转移性卵巢癌腹水中的意义[J]. 中国癌症杂志, 2000, 10(6):510-513.

新型多重不对称PCR-电化学芯片法检测甲型流感病毒

蒋析文^{1*} 黄桃生¹ 黄志文¹ 张险朋² 殷三鸿²

[摘要] **目的** 建立一种基于多重不对称PCR-电化学芯片技术同时检测多种甲型流感病毒的新方法。**方法** 根据常见型甲型流感病毒的基质蛋白(matrix protein, MP)、血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase transferase, NA)基因的保守序列分别设计特异性引物和探针,建立优化多重PCR反应体系,再结合电化学芯片技术建立多重不对称PCR-电化学芯片法检测甲型流感病毒,对所建方法进行特异性和敏感性评价,同时检测200例流感样动物咽拭子样本。**结果** 本方法检测灵敏度可达 1×10^3 copies/mL, 200例动物样本中检出194例阳性,敏感率为97%。**结论** 本研究建立的多重不对称PCR-电化学芯片法可同时检测常见类型甲型流感病毒,具有较高的特异性和灵敏度,且操作较简单、检测周期短,便于临床筛查、诊断和治疗。

[关键词] 甲型流感病毒; 电化学芯片; 不对称PCR

Detection of influenza A virus by multiplex asymmetric PCR-electrochemical chip

JIANG Xiwen^{1*}, HUANG Taosheng¹, HUANG Zhiwen¹, ZHANG Xianpeng², YIN Sanhong²

(1. DAAN Gene Co., Ltd. Of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. Animal Centers for Disease Control and Prevention, Dongguan, Guangdong, China, 523000)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a new method for simultaneous detection of multiple influenza A viruses based on multiple asymmetric PCR-electrochemical chip technology. **Methods** A multiplex PCR reaction system was established and optimized by designing specific primers and probes according to the conserved sequences of matrix protein (MP), hemagglutinin (HA) and neuraminidase transferase (NA) gene encoded by influenza A viruses. The PCR system was hybridized with the chip, then, a new PCR-electrochemical chip for detecting influenza A viruses was developed. The specificity and sensitivity were evaluated. 200 samples from throat swab of animals were detected by this chip at the same time. **Results** The sensitivity is up to 1×10^3 copies/mL. 194 of 200 samples were detected as positive with the sensitivity of 97%. **Conclusion** The multiple asymmetric PCR-electrochemical chip established in this study can simultaneously detect the most common types of influenza A viruses with high specificity and sensitivity. The method of our study is simple and the detection cycle is short. It is suitable for clinical screening, diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Influenza A virus; Electrochemical chip; Asymmetric PCR

甲型流感是由甲型流感病毒(influenza A virus)引起的一种人畜共患的疾病综合症。目前许多甲型流感病毒如H1N1、H3N2、H5N1、H9N2、

H7N9等^[1-2]均由禽类传播到人类中,容易引起极高的死亡率,导致严重的公共卫生事件。监测是确定甲型流感流行株、发现变异株、预测和防控疫情

作者单位:1. 中山大学达安基因股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 东莞市动物疫病预防控制中心, 广东, 东莞 523000

*通讯作者: 蒋析文, E-mail: yuanyecat@vip.sina.com

的基础^[3-4]。甲型流感病毒的检测方法多种多样,主要包括病毒分离培养、血清学检测及核酸检测^[5]。作为流感病毒检测的传统方法,病毒培养和血清学检测灵敏度、特异性、准确性均较低,且操作繁琐,检测周期长。核酸分子检测凭其高特异性及高灵敏度,正逐步取代传统方法,广泛用于甲型流感病毒的检测中,其主要方法包括逆转录荧光定量PCR、芯片及高通量测序技术等。然而,目前所有针对甲型流感病毒的核酸检测均以3~4个型为主,完整的分型检测几乎空白。

本研究根据利用中山大学达安基因股份有限公司自主研发的电化学芯片核酸检测系统,针对甲型流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)常见型别H1、H3、H5、H7、H9、H10和N1、N2、N6、N8、N9的基因序列,建立一种基于多重不对称PCR-电化学芯片技术同时检测多种甲型流感病毒型的新分子诊断方法,并对200例流感样动物咽拭子样本进行检测及测序验证,对甲型流感病毒的临床诊断和治疗具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

c-MMLV 反转录酶、热启动 Taq 酶、Rnasin、dNTP 均购自美国 Promega 公司, ABI 9700 PCR

仪、ABI 7500 Real-time PCR 仪购自美国 ABI 公司, DA9100 电化学基因传感器检测系统(DA-01-004)和核酸提取或纯化试剂(磁珠法)(货号:Cat.#DA-512)及甲型流感相关荧光定量 PCR 检测试剂盒均来自于中山大学达安基因股份有限公司。

1.2 临床样本

H1N1、H3N2、H5N1、H5N6、H7N9、H9N2、H10N8 乙型流感病毒、丙型流感病毒、呼吸道合胞病毒标准病毒株、250 例动物咽拭子临床样本(200 例甲型流感阳性、50 例阴性)均由东莞动物疾病预防控制中心提供。

1.3 引物与探针

根据 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi> 流感数据库中提供的基质蛋白(matrix protein, MP)、H1、H3、H5、H7、H9、H10 和 N1、N2、N6、N8、N9 的基因序列,下载并比对分析后,利用生物软件 Oligo 7.0 分别在其保守区设计引物和探针,并通过 NCBI 数据库进行 Blast 同源性比对验证,其中 HA 和 NA 序列的下游引物采用通用引物进行扩增,MP 序列采用特异性引物进行扩增(MP-sense, MP-Anti-sense)。引物和探针均由上海生工生物股份有限公司合成,捕获探针(capture probe, CP)采用 C6 S-S 标记,信号探针(signal probe, SP)采用二茂铁(Fc)标记,具体序列特征和探针标记见表 1 和表 2。

表 1 甲型流感病毒分型引物的核酸序列

Table 1 Sequences of influenza A virus genotyping primers

序列来源	引物名称	序列(5'-3')	引物位置	Tm 值
HM142730.1	MP-sense	TCTTCTAACCGAGGTCGAAACG	31~52	62.7
	MP-Anti-sense	CGTCTACGCTGCAGTCCT	241~258	57.9
FN436023.1	H1-sense	TAATAGCACCATGGTATGCTTT	785~806	54.7
KY415635.1	H3-sense	TTCACCTGGACAGGAGTAAC	421~440	51.9
DQ095621.2	H5-sense	ATCATTGACAAAATGAACACTCAR	1201~1225	57.6
KP765952.1	H7-sense	TAAGCAGCGGCTACAAAG	1550~1567	56.3
KT699056.1	H9-sense	TCAACAACTCCACAGAAAC	79~98	49.6
KY402019.1	H10-sense	ATAGCACCGAGCCGAGTTAG	803~822	60.9
KF667692.1	N1-sense	AGTGCTCCTGTTATCCTGATG	773~793	51.7
KP767935.1	N2-sense	AAGGACAACCAATTAGGCTYTC	314~336	56.2
KM251485.1	N6-sense	TGCATAGGATGGTCAAGCA	526~544	49
KY402021.1	N8-sense	CAATGAAACAGTAAGGGTTGAGA	159~181	55
KP416240.1	N9-sense	ACAACCAACACAAGCCAAAC	148~167	57.3
FN436023.1	Universal primer 01	ATATCGTCTCGTATTAAGTAGAAACAAG	1716~1743	60.6
KF667692.1	Universal primer 02	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAG	1357~1386	61.6

表 1 的序列来源来自于 GenBank 数据库。

表2 甲型流感病毒分型探针的核酸序列

Table 2 Sequences of influenza A virus genotyping probes

序列来源	探针名称	序列(5'-3')	探针位置
HM142730.1	MP-CP	TTGTATTCACGCACACCGTGC-C6S-S	210~230
	MP-SP	Fc-CCCAGTGAGCGAGG	230~243
FN436023.1	H1-CP	TCATTGAAGGGGGATGGACAGGA-C6S-S	1049~1071
	H1-SP	Fc-ATGATAGATGGGTGGTATGG	1072~1091
KY415635.1	H3-CP	ATGCCAAACAATGACAATTTTGAC-C6S-S	550~573
	H3-SP	Fc-AAACTATACATCTGGGG	574~590
DQ095621.2	H5-CP	ATGGARGACGGATTCTAGATGTCTGG-C6S-S	1288~1314
	H5-SP	Fc-ACTTATAAYGCTGAACT	1315~1331
KP765952.1	H7-CP	TGGTTTAGCTTCGGGCATCAT-C6S-S	1579~1600
	H7-SP	Fc-GTTTTCTTCTTAGCC	1601~1617
KT699056.1	H9-CP	CTAACAGAAAACAATGTYCCT-C6S-S	109~129
	H9-SP	Fc-GTGACACATGCCAAAGAA	130~147
KY402019.1	H10-CP	CACCAATAGACAATAATTGTGAGTCCA-C6S-S	861~887
	H10-SP	Fc-AATGTTTTTGGAGAGGG	888~904
KF667692.1	N1-CP	TATATATGCAGTGGAGTTTTTCGGAGA-C6S-S	886~911
	N1-SP	Fc-CAATCCACGCCCAATG	912~928
KP767935.1	N2-CP	ACCAAAACAAGTGTGCATAGCAT-C6S-S	521~542
	N2-SP	Fc-GGTCTAGTTCAAGCTG	543~558
KM251485.1	N6-CP	AGGATGTCAATATGCATATCAGGA-C6S-S	568~591
	N6-SP	Fc-CCGAATAACAATGCATC	592~608
KY402021.1	N8-CP	ATTGTGTGATGCTAAGGGTTTTCG-C6S-S	264~286
	N8-SP	Fc-CACCCTTTTCCAAAGAC	287~303
KP416240.1	N9-CP	TTTCAATAACTTAACTAAAGGGCTC-C6S-S	237~261
	N9-SP	Fc-TGTACTATAAATTCATGGC	262~280

表2的序列来源来自于 GenBank 数据库。

1.4 病毒基因组核酸提取和 PCR 扩增

标准病毒株及咽拭子样本核酸的提取采用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(磁珠法),按试剂盒说明书进行操作。提取后的核酸置于-20℃冰箱中,并通过甲型流感相关荧光定量 PCR 检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)标定其浓度。甲型流感多重不对称 PCR 采用 50 μL 反应体系,其中主要包含 MgCl₂ (10 mmol/L), KCl (50 mmol/L), 12 条上游引物(每条用量 3 pmol), 3 条下游引物(每条 30 pmol)以及 20 μL 扩增模板。采用 ABI 9700 PCR 仪中进行扩增,反应条件:50℃ 30 min, 95℃ 15 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 45 个循环; 72℃ 7 min。PCR 扩增结束后,由于采用的不对称

PCR 方法上下游引物用量不对等,扩增完成后产生大量的单链 DNA(ssDNA),所以杂交检测前扩增产物(50 μL)无需经过高温变性即可直接与信号探针(100 μmol/L)、新生牛血清(10 μL)及高氯酸钠(20 μL)进行杂交,于 DA9100 电化学基因传感器检测系统中检测。

1.5 多重不对称 PCR-电化学芯片法

采用的电化学基因芯片表面有 72 个金电极,捕获探针分别固定在特制的印刷电路板金电极表面,制备成电化学芯片,用于捕获 PCR 多重扩增产物,信号探针与已被捕获的 PCR 产物特异结合。同时,在电极上施加交流电压,刺激信号探针上的二茂铁分子发生氧化还原反应,通过检测电流值来判定结果阴阳性。

1.5.1 特异性测定

利用确定的PCR-电化学芯片法体系分别对灭活的乙型流感病毒、丙型流感病毒、呼吸道合胞病毒及甲型流感H1N1、H3N2、H5N1、H5N6、H7N9、H9N2、H10N8病毒核酸进行检测,评价其特异性。

1.5.2 灵敏度测定

将已标定浓度的甲型流感H1N1、H5N1、H5N6、H7N9的核酸进行梯度稀释,检测其灵敏度。

1.5.3 临床样品检测

利用本研究所建立的多重不对称PCR-电化学芯片法,对通过中山大学达安基因股份有限公司生产的甲型流感通用型荧光定量PCR检测试剂盒检测阳性的200例甲型流感样本核酸及50例阴性样本核酸进行检测,并通过本公司生产的甲型流感荧光PCR检测试剂盒(H1N1、H5N1、H7N9、H9N2等)进行对照验证,对比方法的一致性。

1.6 统计学分析

通过kappa检验分析多重不对称PCR-电化学芯片法和荧光定量PCR法检测结果的一致性。

2 结果

2.1 PCR-电化学芯片法检测特异性

检测试剂可以准确检测出甲型流感各型别病毒核酸并且未出现错检、漏检等情况,而乙型流感病毒、丙型流感病毒以及呼吸道合胞病毒核酸等未出现假阳性结果。

2.2 PCR-电化学芯片法检测灵敏度

将H1N1、H5N1、H5N6、H7N9病毒株的核酸进行梯度稀释,直至电化学芯片法无法检出为止,结果显示当核酸浓度低于 1×10^3 copies/mL时,则H1N1和H5N6未见电化学信号产生,而H5N1和H7N9在100 copies/mL时出现漏检。因此,确定该方法灵敏度可达约 1×10^3 copies/mL。

2.3 临床样本检测结果及统计学分析

采用本研究所建立的多重不对称PCR-电化学芯片法对200例甲型流感阳性临床样本以及50例阴性样本进行检测,并采用中山大学达安基因股份有限公司生产的对应型别荧光定量PCR检测试剂盒进行对照验证,结果显示200例甲型流感阳性临床样本中,多重不对称PCR-电化学芯片法检出194例阳性,其中6例漏检,敏感率为97%,50例阴性样本检测均为阴性,特异度为100%,kappa分析

结果为0.928($P < 0.0001$)显示2种方法一致性高,差异具有统计学意义,见表3。

表3 PCR-电化学芯片和荧光PCR检测结果比较
Table 3 The detection outcomes of PCR-electrochemical chip and real-time PCR

	PCR-电化学芯片		总数(例)
	阳性	阴性	
荧光PCR	阳性	194	200
	阴性	0	50
	总数	194	250

一致率(P_o)= $(194+50)/250=0.976$; 机遇一致率(P_e)= $(194 \times 200 + 56 \times 50)/(250 \times 250)=0.666$; $K=(0.976-0.666)/(1-0.666)=0.928$

具体到不同型别,电化学方法与荧光定量法比较,结果显示H9N2 82例,H5N6 56例,H5N1 16例,H3N2 6例,H10N8 5例未出现漏检情况,H7N9 27例(电化学漏检4例),H1N1 8例(电化学漏检2例),通过分析荧光定量Ct值,发现这6例样本浓度均低于电化学方法确定的最低检出限,结果见图1。

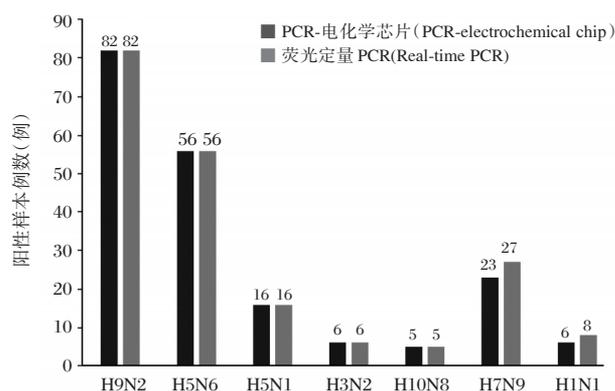


图1 各型别PCR-电化学芯片与荧光定量PCR样本检出比较

Figure 1 The detection outcomes of PCR-electrochemical chip and real-time PCR

3 讨论

目前已有大量研究^[6-8]通过逆转录荧光定量PCR检测甲型流感病毒通用型、H1N1、H3N2、H7N9等,其灵敏度和特异性均非常高但需根据Ct

值来判断结果,且由于荧光通道数目限制,单管体系最多能检测4~5种型别,同时对荧光PCR仪器要求较高,通道过少大大限制了其在分型检测中的应用,故至少需要3管体系才能完成所有常见型甲型流感病毒的检测。荧光定量PCR技术要广泛用于多重分型检测中,目前要解决的关键问题就是仪器本身对各通道的兼容性。相比荧光PCR,本文方法仅通过单管体系即可完成所有分型检测,优势明显。

微阵列芯片法^[9-10]和高通量测序技术(next-generation sequencing, NGS)^[11-12]也被广泛用于甲型流感病毒检测中。微阵列芯片技术先进,通量高,但其价格昂贵,劳动密集,耗时较长,且容易受到污染,检测灵敏度及特异性易受各种因素影响,重复性差,也容易出现假阴性。如若微阵列芯片技术能在操作性方面更加自动化,成本方面得到进一步控制,相信其一定会成为未来核酸检测领域的趋势之一。相比微阵列芯片法,电化学基因芯片仅需一步分子杂交,2 h内即可完成检测,且结果显示良好的重复性、准确性及高度特异性。而NGS技术是由几个特定制造平台的平台、不同的测序方法、试剂和生物信息学软件组成,构成复杂,成本高,其结果分析必须通过特定生物信息学软件完成,复杂繁琐,耗时较长,但在通量及挖掘病毒深层信息方面,NGS具有独特优势。作为国内外分子检测的最热点与最前沿技术,NGS备受关注,然而,本身复杂的生物信息学软件及居高不下的成本大大制约了其更加广泛的应用。相比NGS,本方法的优势在于检测结果以PDF形式呈现,简洁明了,且成本较低。

本研究根据 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi> 流感数据库中提供的几乎所有MP、H1、H3、H5、H7、H9、H10和N1、N2、N6、N8、N9的基因序列进行比对分析后,分别在其保守区设计特异性上游引物,并参照相关研究^[13]确定2条通用引物作为下游引物,而针对MP设计特异性引物通过优化最终建立可同时检测甲型流感病毒MP、H1、H3、H5、H7、H9、H10和N1、N2、N6、N8、N9的单管多重不对称PCR-电化学芯片法,经过对比实验,其检测灵敏度可达 1×10^3 copies/mL,且同时具有较高特异性和准确性。因此,我们完全有理由相信新构建的电化学基因芯片方法在甲型流感病毒分型筛查中一定可以发

挥很好的作用。

基因序列的重组、插入、缺失以及突变导致甲型流感病毒经常发生变异,如H7N9^[14]、H9N2^[15]等,这使得针对其进行分型检测变得异常困难。因此,我们将密切关注甲型流感病毒最新信息,及时更新试剂,为临床诊断和治疗奠定基础。

参考文献

- [1] Mgbere O, Ngo K, Khuwaja S, et al. Pandemic-related health behavior: repeat episodes of influenza-like illness related to the 2009 H1N1 influenza pandemic [J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145(12):2611-2617.
- [2] Pulit-Penalzo JA, Simpson N, Yang H, et al. Assessment of molecular, antigenic, and pathological features of canine influenza A (H3N2) viruses that emerged in the United States [J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(suppl_4):S499-S507.
- [3] Si YJ, Choi WS, Kim YI, et al. Genetic characteristics of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses isolated from migratory wild birds in South Korea during 2014-2015 [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(10):2749-2764.
- [4] Peeters B, Reemers S, Dortmans J, et al. Genetic versus antigenic differences among highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses: Consequences for vaccine strain selection [J]. *Virology*, 2017, 503(1): 83-93.
- [5] Vemula SV, Zhao J, Liu J, et al. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans [J]. *Viruses*, 2016, 8(4):96.
- [6] Mohammad AB, Mazyar Z, Abdolvahab A. A diagnostic one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction method for accurate detection of influenza virus type A [J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(6):1286-1292.
- [7] Cui D, Zhao D, Xie G, et al. Simultaneous detection of influenza A subtypes of H3N2 virus, pandemic (H1N1) 2009 virus and reassortant avian H7N9 virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):2054.
- [8] Zadeh VR, Jagadesh A, Krishnan A, et al. Detection of D151G/N mutations in the neuraminidase gene of influenza A (H3N2) viruses by real-time RT-PCR allelic discrimination assay [J]. *J Med Virol*, 2017, 89(7):1174-1178.

(下转第188页)

· 论 著 ·

G6PD 活性、*UGT1A1*、*SLCO1B1*、*ABCC2* 基因多态性和新生儿高胆红素血症的关系研究

肖奇志^{1*} 郭洪创² 李恋湘¹ 王昭晴¹ 李磊¹ 邝文英² 周玉球¹

[摘要] 目的 探讨体内胆红素转运与排泄相关基因(*UGT1A1*, *SLCO1B1* 和 *ABCC2*)的功能性单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)位点,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)活性与新生儿血清胆红素峰值浓度的关系。方法 457例新生儿同时采用经皮测和血清胆红素测定,采用G6PD/6PGD比值法和荧光斑点法测定G6PD活性,采用测序法分析所有标本的8个SNPs位点的基因型,统计学分析G6PD活性、各个SNPs位点与总胆红素峰值的关系。结果 G6PD缺乏组血清总胆红素浓度峰值为(276.55±94.92) μmol/L, G6PD正常组血清总胆红素浓度峰值为(220.12±89.39) μmol/L,两者之间差异有统计学意义($P < 0.001$);8个SNPs位点与血清总胆红素浓度相关性分析中,*UGT1A1* 211 G>A在显性遗传模型、隐性遗传模型和加性遗传模型下均显著影响新生儿外周血胆红素浓度($P < 0.01$),*SLCO1B1* -11187G>A在显性遗传模型下显著影响新生儿外周血胆红素浓度($P = 0.039$)。携带G6PD活性缺乏、*UGT1A1* 211 G>A和*SLCO1B1* -11187G>A这3个风险因素组发生新生儿高胆红素血症的风险是不携带上述3个风险因素组的8.78倍(95%置信区间:2.72~28.39)。结论 G6PD活性缺乏、*UGT1A1* 211 G>A和*SLCO1B1* -11187G>A为新生儿高胆红素血症发生的3个重要风险因素,三者之间具有累积效应,携带风险因素的数量越多,新生儿外周血胆红素峰值浓度就越高,发生新生儿高胆红素血症并发症的风险就越大。

[关键词] G6PD缺乏症;高胆红素血症;新生儿;单核苷酸多态性

The relationship between G6PD activity, *UGT1A1*, *SLCO1B1*, *ABCC2* gene polymorphisms and neonatal hyperbilirubinemia

XIAO Qizhi^{1*}, GUO Hongchuang², Li Lianxiang¹, WANG Zhaoqing¹, LI Lei¹, KUANG Wenyong², ZHOU Yuqiu¹

(1. Zhuhai Institute of Medical Genetics & Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhuhai, Guangdong, China, 519001; 2. Department of Neonatal Pediatric, Zhuhai Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhuhai, Guangdong, China, 519001)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between the candidate functional single nucleotide polymorphism (SNPs) of the genes (*UGT1A1*, *SLCO1B1* and *ABCC2*) involved with bilirubin transportation and excretion, G6PD activity and the serum bilirubin concentration in neonates. Methods The bilirubin concentrations of 457 neonates were measured by transcutaneous or serum. G6PD activity was measured by G6PD/6PGD activity ratio method and G6PD fluorescent spot test. The genotypes of all 8 SNPs loci in all specimens were analyzed by sequencing. The relationship of G6PD activity, each SNPs site and the peak of total bilirubin were statistically analyzed. Results The peak value of serum total bilirubin concentration in G6PD deficiency group was (276.55±94.92) μmol/L, and the peak of serum total bilirubin concentration in normal G6PD group was (220.12±89.39) μmol/L, and the difference was statistically

基金项目:广东省医学科研基金(2014680)

作者单位:1. 珠海市妇幼保健院检验科&珠海市医学遗传研究所,广东,珠海 519001

2. 珠海市妇幼保健院新生儿科,广东,珠海 519001

*通讯作者:肖奇志, E-mail: xiaoqizhi@126.com

significant ($P < 0.001$). In the analysis of the correlation between the 8 SNPs sites and the serum total bilirubin concentration, *UGT1A1* 211 G>A significantly affected the neonatal peripheral blood bilirubin concentration ($P < 0.01$) in the dominant genetic model, the recessive genetic model and the additive genetic model, and the *SLCO1B1*-11187G>A significantly affected the peripheral blood bilirubin concentration in the newborn under the dominant genetic model ($P = 0.039$). The risk of neonatal hyperbilirubinemia in the 3 risk factors group with G6PD activity deficiency, *UGT1A1* 211 G>A, and *SLCO1B1*-11187G>A was 8.78 times as high as that of the 3 risk factors group (95% confidence interval: 2.72-28.39). **Conclusions** The G6PD deficiency, *UGT1A1* 211 G>A and *SLCO1B1*-11187G>A are 3 crucial risk factors for neonatal hyperbilirubinemia. There is a cumulative effect among the three risk factors. The more the number of risk factors, the higher the peak concentration of the peripheral blood bilirubin in the newborn, the risk of complications of neonatal hyperbilirubinemia.

[KEY WORDS] G6PD deficiency; Hyperbilirubinemia; Neonatal; Single nucleotide polymorphism

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症是一种常见的遗传性疾病,该病是一种公认的导致新生儿高胆红素血症发生的风险因素^[1],约30%永久性神经系统损伤的黄疸新生儿为G6PD缺乏^[2-3]。*UGT1A1*基因编码的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A1(UDP-glucuronosyl transferase 1A1, *UGT1A1*),肝细胞溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员1B1(solute carrier organic anion transporter family member 1B1, *SLCO1B1*)基因编码的有机阴离子转运多肽C(organic anion transporter polypeptide C, OATP-C)和ATP结合盒子亚家族C成员2(ATP-binding cassette subfamily C member 2 gene, *ABCC2*)基因编码的多药耐受相关蛋白2(multidrug-resistance protein 2, MRP2)是胆红素排泄通路上的重要蛋白。未结合胆红素主要是由红细胞破碎产生,然后由肝细胞膜上的有机阴离子转运多肽C将未结合胆红素从血液系统转运至肝细胞内,在肝细胞内的滑面内质网上,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A1催化未结合胆红素与葡萄糖醛酸结合形成水溶性、不能透过半透膜的结合胆红素,结合胆红素通过多药耐受相关蛋白2转运到胆管,再经胆汁排至肠道内^[4]。未结合胆红素为脂溶性,可穿过新生儿不完整的血脑屏障和细胞膜,引起细胞和脑组织损伤,导致急性和慢性胆红素脑病,即核黄疸,严重者病死率高,存活者多留有后遗症,高达42.2%^[5]。G6PD缺乏症的患者频繁发生溶血,导致胆红素的生成过多,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A1、有机阴离子转运多肽C和多药耐受相关蛋白2负责胆红素的转运和排泄。因此,G6PD酶活性缺乏,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A1、有机阴离子转运多肽C和多药耐受相关蛋白

2功能的缺陷都会影响胆红素的产生和排泄,与新生儿胆红素水平升高密切相关。

已有报道表明,*UGT1A1*基因启动子区A(TA)_nTAA-A(TA)_nTAA(rs8175347)变异位点通过影响*UGT1A1*基因启动子区TATA盒,影响*UGT1A1*基因的表达,进而增加新生儿核黄疸的发生率^[6]。同样,*UGT1A1*基因1号外显子的211G>A错义突变(*UGT1A1**6,rs4148323)在一个大规模的全基因组关联研究分析中发现与血清胆红素浓度密切相关^[7]。因此,影响*UGT1A1*,*SLCO1B1*和*ABCC2*基因功能的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)位点均可能影响对应蛋白的功能进而影响新生儿外周血胆红素的转运与排泄。除了上述2个变异位点以外,*UGT1A1*基因-3279T>G(rs4124874),*SLCO1B1*的-11187G>A(rs4149015),388A>G(rs2306283),521T>C(rs4149056)和*ABCC2*基因的-24C>T(rs717620),1249G>A(rs2273697)也被报道影响对应蛋白的功能^[8-12],可能成为新生儿高胆红素血症的风险因素。

为此,本研究通过分析胆红素浓度峰值与候选基因功能性SNPs之间的相关性,探讨上述8个SNPs位点是否会影响中国人新生儿高胆红素水平以及是否与G6PD缺乏症对外周血胆红素水平具有积累和协同作用,是否会增加G6PD缺乏症新生儿高胆红素血症的发病风险,本研究结果将为新生儿高胆红素血症的防控奠定理论基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

珠海市妇幼保健院出生后15天以内的足月新生儿,共收集457例,其中男性329例,女性128

例。所有病例中高胆红素血症病例(高胆红素组)共计285例,胆红素正常病例(胆红素正常组)共计172例,高胆红素组体重范围为2 600~3 900 g,平均体重为3 254 g,男女比例为2.5:1;胆红素正常组体重范围为2 550~3 850 g,平均体重为3 140 g,男女比例为2.2:1;高胆红素组中G6PD活性缺乏共计203例,G6PD活性正常共计82例;胆红素正常组中G6PD活性缺乏共计76例,G6PD活性正常共计96例。两组病例中均排除其它因素影响血清总胆红素的个体,如早产儿、窒息、败血症、乙肝大三阳、胆管阻塞、ABO和Rh血型不合导致的溶血、携带其它血红蛋白病(如地中海贫血)、严重脱水、严重血管外溶血(如头颅血肿、皮下血肿、肺等部位大出血)、极低体重出生儿等,所有病例的脐带血标本被收集。

1.2 方法

1.2.1 G6PD缺乏症病例的诊断

①G6PD/6PGD比值法,G6PD/6PGD<1.5为G6PD活性缺乏,G6PD/6PGD>1.5为G6PD活性正常;②荧光斑点法,根据荧光斑点强弱判断为G6PD活性重度缺乏,中度缺乏和G6PD活性正常;③采用厦门致善生物科技有限公司的探针熔解曲线G6PD基因突变检测试剂盒检测到G6PD基因突变^[13]。

1.2.2 病理性黄疸的诊断

测量新生儿从出生后第1天到第7天的皮测胆红素值(JM-103, KONICA MINOLTA, 日本)和血清总胆红素值(钒酸盐氧化法,上海科华生物股份有限公司),以最高的那一次数值为峰值。血清总胆红素峰值大于221 $\mu\text{mol/L}$ 为病理性黄疸,血清总胆红素峰值小于221 $\mu\text{mol/L}$ 为胆红素数值正常个体^[14]。

1.2.3 基因组DNA提取

抽取新生儿脐带血1 mL,采用DNA提取试剂盒(厦门致善生物科技有限公司)提取基因组DNA,-20℃保存。

1.2.4 SNPs分型

待分析的SNPs位点有8个,分别为UGT1A1基因A(TA)_nTAA-A(TA)_nTAA(rs8175347)、-3279T>G(rs4124874)和211G>A(rs4148323);SLCO1B1基因的-11187G>A(rs4149015)、388A>G(rs2306283)和521T>C(rs4149056);ABCC2基因的-24C>T(rs717620)和1249G>A(rs2273697)。

本次设计引物采用软件Oligo 6.31(Molecular Biology Insights, Inc. CO, 美国)和Primer premier 5.0设计上下游引物,PCR扩增以后通过DNA测序获得该位点的SNPs分型结果。

1.3 统计学方法

G6PD缺乏组与G6PD正常组之间的计量资料均数比较采用两样本的 t 检验分析,样本性别和基因型的构成比较采用 χ^2 检验,各个SNPs位点与血清胆红素分析的不同遗传模型方式采用R软件的SNPassoc软件包进行分析^[15],新生儿携带不同风险因素发生高胆红素血症的优势比(ORs)和95%的置信区间用卡方检验分析。样本间的显著性采用双侧检验,显著性检验水准为 $P<0.05$ 。所有统计图表和数据均用R 3.4.1软件制作和分析。

2 结果

2.1 G6PD缺乏组和G6PD正常组基本资料对比

G6PD缺乏组和G6PD正常组基本资料对比结果见表1。其中G6PD缺乏组外周血清胆红素浓度峰值为(276.55±94.92) $\mu\text{mol/L}$,显著高于G6PD正常组外周血清胆红素浓度峰值(220.12±89.39) $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.001$)。除了UGT1A1基因启动子区A(TA)_nTAA-A(TA)_nTAA以外,G6PD缺乏组与G6PD正常组在男女比例,UGT1A1、SLCO1B1和ABCC2基因其余7个SNPs基因型之间的分布上差异无统计学意义。

2.2 8个SNPs对新生儿血清胆红素水平的影响

分别应用显性遗传模型、隐性遗传模型和加性遗传模型分析上述8个SNPs对新生儿血清胆红素峰值浓度的影响。结果发现UGT1A1 211G>A在3种遗传模式下均显著影响新生儿外周血胆红素水平($P<0.05$),SLCO1B1 -11187G>A在显性遗传模型下显著影响新生儿外周血胆红素水平($P=0.039$)。其余6个SNPs位点在3种遗传模型下均对新生儿血清胆红素水平没有显著性影响,见表2。

2.3 新生儿高胆红素血症风险因素的积累效应

在上面研究中发现G6PD活性、UGT1A1 211G>A和SLCO1B1 -11187G>A在显性遗传模型下均可以显著影响新生儿高胆红素峰值水平。由此根据携带3个风险因素的差异把样本分为8组,根据新生儿高胆红素血症峰值的阈值221 $\mu\text{mol/L}$ 把所有新生儿分为高胆红素血症组和非高胆红素血症组。其中不携带3个风险因素的第1组

表1 G6PD缺乏组与G6PD正常组的基本资料比较

Table 1 Comparison of clinical characteristics of G6PD deficient group and G6PD normal group

临床资料	G6PD 缺乏组 (n=279)	G6PD 正常组 (n=178)	测试值	P 值
性别(男:女)	192:87	137:41	$\chi^2=3.186$	0.074
血清胆红素峰值 ($\mu\text{mol/L}$)	276.55±94.92	220.12±89.39	$t=-6.667$	<0.001
<i>UGT1A1</i> -3279 T>G (TT: TG: GG)	103:145:31	82:81:15	$\chi^2=3.944$	0.139
<i>UGT1A1</i> promoter 6/7 (6/6:6/7:7/7)	219:60:0	143:30:5	$\chi^2=9.078$	0.011
<i>UGT1A1</i> 211 G>A (GG:GA:AA)	200:71:8	122:45:11	$\chi^2=3.022$	0.221
<i>SLCO1B1</i> -11187G>A (GG:GA:AA)	208:67:4	131:43:4	$\chi^2=0.425$	0.809
<i>SLCO1B1</i> 388 A>G (AA:AG:GG)	21:81:177	8:61:109	$\chi^2=2.619$	0.270
<i>SLCO1B1</i> 521 T>C (TT:TC:CC)	227:51:1	152:25:1	$\chi^2=1.487$	0.475
<i>ABCC2</i> -24 C>T (CC:CT:TT)	163:110:6	107:65:6	$\chi^2=0.909$	0.635
<i>ABCC2</i> 1249 G>A (GG:GA:AA)	245:34:0	156:22:0	$\chi^2=0.000$	1.000

表2 不同遗传模型下8个SNPs对新生儿血清胆红素浓度的影响

Table 2 The impact of 8 SNPs on neonatal serum bilirubin concentration using the different genetic models

变异位点	P 值		
	显性模型	隐性模型	加性模型
<i>UGT1A1</i> -3279T>G	0.864	0.351	0.570
<i>UGT1A1</i> promoter 6/7	0.499	0.267	0.375
<i>UGT1A1</i> 211G>A	0.003	0.017	0.001
<i>SLCO1B1</i> -11187G>A	0.039	0.475	0.095
<i>SLCO1B1</i> 388A>G	0.771	0.585	0.654
<i>SLCO1B1</i> 521T>C	0.861	0.330	0.996
<i>ABCC2</i> -24C>T	0.708	0.637	0.843
<i>ABCC2</i> 1249G>A	0.067	—	—

(G6PD 正常, 211GG, -11187GG) 发生新生儿高胆红素血症的风险值定义为1, 分别应用卡方检验比较其它各组与第1组的相对风险, 得出其它各组的相对风险值以及95%的置信区间。从表3中可以看到随着风险因素携带数量的增多, 新生儿发生高胆红素血症的风险逐渐增加, 携带3个风险因素的第8组发生新生儿高胆红素血症的可能性为第1组的8.78倍(95%的置信区间: 2.72~28.39)。从图1中也可以看出, 随着携带风险因素的增加, 箱体总体上移, 第7组与第8组75%的病例胆红素峰值均已超过221 $\mu\text{mol/L}$ (图1中红线)。

3 讨论

新生儿外周血胆红素浓度水平取决于红细胞在体内的破坏速度与机体对胆红素的处理两方面, 也就是血清总胆红素浓度由胆红素的产生、结合和排泄过程动态决定。新生儿G6PD活性缺乏可以导致红细胞溶血进而增加胆红素的产生, 本研究中G6PD缺乏组新生儿高胆红素血症峰值显著高于G6PD正常组($P < 0.001$), 这再次证明了G6PD活性缺乏是新生儿高胆红素血症的风险因素。而胆红素代谢通路上相关基因的SNPs位点可能影响胆红素的结合和排泄进而与新生儿高胆红素血症密切相关, 单个基因多态性的研究国内外均有报道^[4, 6, 9]。研究表明*UGT1A1*、*SLCO1B1*和*ABCC2*启动子区和编码区的遗传变异位点可能导致蛋白含量下降或者功能丧失, 进而增加新生儿高胆红素血症的风险, 特别是*UGT1A1*启动子区A(TA)_nTAA-A(TA)_nTAA、-3279T>G和编码区211G>A是新生儿高胆红素血症的风险因素^[6-8, 16]。在本研究中,*UGT1A1*基因211G>A在不同的遗传模型下均显著影响新生儿外周血胆红素峰值, 这与其他研究结果^[16]相似, 进一步证实了该位点为新生儿高胆红素血症的风险位点。然而, 本研究中*UGT1A1*启动子区A(TA)_nTAA-A(TA)_nTAA和-3279T>G在3种遗传模型下与新生儿外周血胆红素峰值浓度均无显著相关性, 这两

表3 3个风险因素的不同组合发生新生儿高胆红素血症的相对风险值以及95%置信区间

Table 3 The odds ratios and their 95% confidence intervals for each group carrying the different risk factors

分组	G6PD 活性	UGT1A1 211G>A	SLCO1B1 -11187G>A	n	优势比(95%置信区间)
1	G6PD 正常	211GG	-11187GG	92	1
2	G6PD 正常	211GG	-11187GA/AA	30	2.70 (1.16~6.28)
3	G6PD 正常	211GA/AA	-11187GG	39	2.97 (1.37~6.43)
4	G6PD 正常	211GA/AA	-11187GA/AA	17	4.96 (1.60~15.36)
5	G6PD 缺乏	211GG	-11187GG	149	5.27 (3.00~9.25)
6	G6PD 缺乏	211GA/AA	-11187GG	58	4.98 (2.44~10.18)
7	G6PD 缺乏	211GG	-11187GA/AA	51	6.04 (2.81~12.99)
8	G6PD 缺乏	211GA/AA	-11187GA/AA	21	8.78 (2.72~28.39)

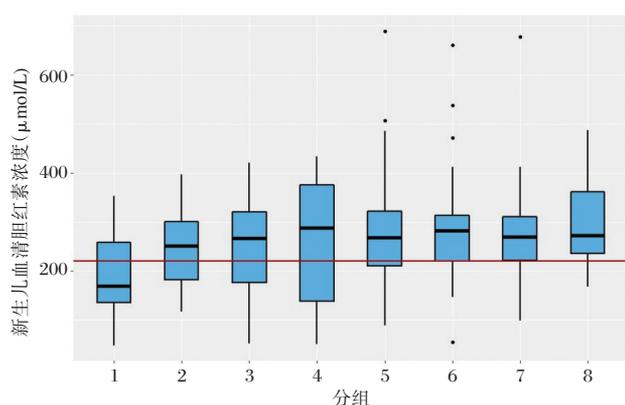


图1 携带不同风险因素组合的各组新生儿血清总胆红素浓度峰值的比较

Figure 1 Comparison of peak serum bilirubin concentrations for each group carrying the different risk factors

个位点是否为新生儿高胆红素血症的风险位点仍有待进一步证实。

Niemi 等^[17]报道 *SLCO1B1* 的 -11187G>A、388A>G 和 521T>C 影响 OATP-C 功能。在本研究中,只有 *SLCO1B1* 的-11187G>A 在显性模型下显著影响新生儿外周血胆红素峰值浓度($P=0.039$), Choi 等^[18]报道 *SLCO1B1* 基因-11187 G>A 可以影响辛伐他汀在体内的药物代谢动力学参数,这在一定程度上证实了 *SLCO1B1* 的-11187G>A 位点可能影响有机阴离子转运多肽 C 蛋白功能,而本研究发现的 *SLCO1B1* 基因 -11187G>A 与新生儿外周血胆红素峰值浓度相关目前未见报道。本研究中 *SLCO1B1* 基因 388A>G 和 521T>C 在 3 种遗传模型下均与新生儿外周血胆红素峰值浓度无显著相关。此外,尽管有报道显示 *ABCC2* 基因的-24C>T 和 1249 G>A 可能影响多药耐受相关蛋白 2 的功能^[12],但本研究中未能证实这 2 个位点与新生儿

高胆红素血症的相关性。因此, *SLCO1B1* 基因 388A>G、521T>C 和 *ABCC2* 基因的 -24C>T、1249G>A 是否会影响新生儿外周血胆红素峰值浓度仍有待进一步的研究。

在新生儿高胆红素血症的风险因素分析中,单个风险因素往往在胆红素代谢过程中的作用较小,而多个风险因素的积累则可能对结果产生较大的影响。因此,本研究通过单因素分析确认的新生儿高胆红素血症的风险因素:G6PD 活性缺乏、*UGT1A1* 211G>A 和 *SLCO1B1* -11187G>A 进行不同因素的组合,分析携带不同风险因素个体发生新生儿高胆红素血症的风险。从表 3 可以看出,G6PD 活性缺乏、*UGT1A1* 211G>A 和 *SLCO1B1* -11187G>A 三者中携带风险因素越多,发生新生儿高胆红素血症的风险越大,其中携带 3 个风险因素的病例血清高胆红素血症发生风险是不携带任何风险因素病例的 8.78 倍。可以看出,随着携带风险因素的数量增多,新生儿血清胆红素峰值浓度箱丝图整体上移,其中第 7 组与第 8 组 75% 以上的个体均发生了新生儿高胆红素血症。这些结果表明,G6PD 活性缺乏、*UGT1A1* 211G>A 和 *SLCO1B1* -11187G>A 对新生儿外周血胆红素峰值浓度存在积累效应,其积累效应产生的生物学基础为 G6PD 活性缺乏导致新生儿溶血增加,胆红素的生成增多,而 *UGT1A1* 211G>A 和 *SLCO1B1* -11187G>A 影响尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶 1A1 和有机阴离子转运多肽 C 的功能,导致胆红素的转运和代谢障碍,也增加了外周血胆红素峰值的浓度,若几个因素同时存在,则其作用将累积,导致新生儿外周血胆红素峰值浓度的进一步增高,发生高胆红素血症的风险也进一步加大。另外,不同 *G6PD* 基因突变类型是否与胆红素峰值升

高的程度有相关性,需要在后续的工作中扩大研究标本的数量进一步研究。

新生儿高胆红素血症在 G6PD 正常新生儿中发生概率约为 7.8%,在 G6PD 缺乏症的患儿中发生率约为 15.6%^[19],可见无论在 G6PD 正常的新生儿还是 G6PD 缺乏的新生儿中新生儿高胆红素血症均较为普遍。本研究仅分析了 9 个可能的风险因素与新生儿高胆红素血症的关系,发现 *SLCO1B1* 基因-11187 G>A 位点为新生儿高胆红素血症的风险因素。此外,发现 G6PD 缺乏、*UGT1A1* 211 G>A 和 *SLCO1B1* -11187G>A 3 种风险因素对新生儿外周血胆红素峰值浓度具有累积效应。然而,在临床上还是存在无上述 3 种风险因素的新生儿高胆红素血症发生,是否存在其它分子病理机制,目前机理不明。考虑到新生儿高胆红素血症发生的普遍性,检测新生儿 G6PD 活性和 *UGT1A1* 211 G>A、*SLCO1B1* -11187G>A 位点的基因型对临床上预防新生儿高胆红素血症的发生发展,降低新生儿核黄疸的发病率,提高我国人口素质具有重要意义。

参考文献

- [1] 中国新生儿胆红素脑病研究协作组. 中国新生儿胆红素脑病的多中心流行病学调查研究[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(5):331-335.
- [2] Mitra S, Rennie J. Neonatal jaundice: aetiology, diagnosis and treatment [J]. Br J Hosp Med, 2017, 78(12):699-704.
- [3] Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective[J]. Blood, 2008, 111(1):16-24.
- [4] Mu SC, Chen YL, Tsai LY, et al. Prolonged hyperbilirubinemia in a neonate with a novel mutation in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 Gene[J]. Neonatology, 2016, 109(3):235-238.
- [5] 赵丹丹, 黄迪, 高翔羽. 经皮胆红素测定在新生儿黄疸中的应用[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(1):74-77.
- [6] Pasha YZ, Kacho MA, Niaki HA, et al. The association between prolonged jaundice and TATA box dinucleotide repeats in gilbert's syndrome[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(9):GC05-GC07.
- [7] Kang TW, Kim HJ, Ju H, et al. Genome-wide association of serum bilirubin levels in Korean population [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(18):3672-3678.
- [8] Dai X, Wu C, He Y, et al. A genome-wide association study for serum bilirubin levels and gene-environment interaction in a Chinese population[J]. Genet Epidemiol, 2013, 37(3):293-300.
- [9] Büyükkale G, Turker G, Kasap M, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and organic anion transporting polypeptide-2 gene mutations [J]. Am J Perinatol, 2011, 28(8):619-626.
- [10] 刘玲, 蒋榆辉, 和灿琳, 等. 影响胆红素代谢的基因多态性研究[J]. 中国新生儿科杂志, 2016, 31(1):32-35.
- [11] Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, et al. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex [J]. Pharmacogenomics J, 2007, 7(1):56-65.
- [12] May K, Wegner D, Caliebe A, et al. Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol [J]. Pharmacogenet Genomics, 2008, 18(4):357-365.
- [13] 严提珍, 钟青燕, 唐宁, 等. 多色探针荧光 PCR 熔解曲线法在 G6PD 基因突变检测中的临床应用评价 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(2):156-162.
- [14] 刘义, 杜立中, 刘悠南, 等. 新生儿黄疸的历史回顾及问题[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(1):30-32.
- [15] González JR, Armengol L, Solé X, et al. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies[J]. Bioinformatics, 2007, 23(5):644-645.
- [16] Yang H, Wang Q, Zheng L, et al. Clinical significance of UGT1A1 genetic analysis in Chinese neonates with severe hyperbilirubinemia [J]. Pediatr Neonatol, 2016, 57(4):310-317.
- [17] Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, et al. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, *SLCO1B1*) [J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(7):429-440.
- [18] Choi HY, Bae KS, Cho SH, et al. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C19, CYP2A6, *SLCO1B1*, ABCB1, and ABCG2 gene polymorphisms on the pharmacokinetics of simvastatin and simvastatin acid [J]. Pharmacogenet Genomics, 2015, 25(12):595-608.
- [19] Huang MJ, Kua KE, Teng HC, et al. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates [J]. Pediatr Res, 2004, 56(5):682-689.

· 论 著 ·

两种无义突变 p.Gln263X 和 p.Tyr351X 导致的遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系分析

翁妙珊¹ 林芬² 章金灿¹ 吴教仁¹ 邢少宜² 杨立业^{2*}

[摘要] 目的 对1个遗传性凝血因子 XI (FXI) 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)、FXI 活性 (FXI:C) 等凝血指标; 对先证者 FXI 基因所有的外显子及其侧翼序列进行测序。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 APTT 为 86.0 s, FXI:C 为 1.7%, 基因测序发现其 FXI 基因为 8 号外显子 c.841C>T (p.Gln263X) 及 10 号外显子 c.1107C>A (p.Tyr351X) 复合杂合突变。家系分析表明先证者女儿为 c.841C>T 杂合突变, 母亲及儿子为 c.1107C>A 杂合突变。结论 FXI 基因 p.Gln263X 和 p.Tyr351X 复合杂合突变是导致先证者遗传性 FXI 缺陷症的分子发病机制, c.1107C>A (p.Tyr351X) 为国内首次报道。

[关键词] 凝血因子 XI; 家系分析; 基因突变

Analysis of hereditary coagulation factor XI deficiency pedigree induced by two kinds of nonsense mutations, p.Gln263X and p.Tyr351X

WENG Miaoshan¹, LIN Fen², ZHANG Jincan¹, WU Jiaoren¹, XING Shaoyi², 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)

[ABSTRACT] Objective To analyze the phenotypes and gene mutations in one pedigree with hereditary factor XI (FXI) deficiency, and investigate the molecular mechanisms of FXI deficiency. Methods Pro-thrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), FXI activity (FXI:C) were tested in the proband and family members. All the exons and exon-intron boundaries of FXI gene were analyzed in the proband by direct sequencing, thereafter, his family members were tested for the mutant site of proband. Results APTT (86 s) and the FXI:C was 1.7% in the proband. DNA sequencing showed that the proband had a combined mutation of c.841C>T (p.Gln263X) in exon 8 and c.1107C>A (p.Tyr351X) in exon 10. His daughter had a heterozygous mutation of c.841C>T, his mother and son had a heterozygous c.1107C>A. Conclusion The combined mutations of p.Gln263X and p.Tyr351X is the molecular pathogenesis of the proband with congenital coagulation factor XI deficiency, and c.1107C>A (p.Tyr351X) is the first report in China.

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

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

*通讯作者: 杨立业, E-mail: yangleeyee@sina.com

凝血因子 XI (FXI) 缺陷症曾被称为血友病 C、遗传性血浆凝血激酶前质缺乏症、Rosenthal 综合征等, 为常染色体不完全隐性遗传病。该病在人群中的发生率约为 1/10 万 ~ 1/100 万, 犹太人和法国巴斯克地区发生率较高^[1]。遗传性 FXI 缺陷症主要与 FXI 基因的突变有关, 患者较少出现自发性出血, 部分致病基因携带者有轻微的出血倾向。目前我国对于该病的报道较少, 国内的 FXI 基因突变类型以无义突变和错义突变最为常见^[2-5], 还有少见的剪接突变^[6]以及移码突变^[5,7]等。本文通过对 1 个遗传性 FXI 缺陷症家系进行凝血指标检测与基因突变分析, 进而探讨其分子发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

先证者, 男, 61 岁, 广东省潮州市枫溪区人, 因“混合痔”入住我院治疗。检查凝血常规时发现单纯性活化性凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 延长达 86.0 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 FXI:C 仅为 1.7%, 其他凝血指标均无明显异常, 考虑患者为 FXI 缺陷症。患者自诉并无自发出血病史和血栓病史, 仅因痔疮原因导致大便时有滴血症状。其父母非近亲婚配, 家系中其他成员均无出血病史和血栓病史。

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 5 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 PT、APTT、凝血因子 VIII 活性 (FVIII:C)、凝血因子 IX 活性 (FIX:C)、FXI:C 和凝血因子 XII 活性 (FXII: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试剂盒, 提取基因组 DNA, 对先证者 FXI 基因所有的外显子及其侧翼序列进行 PCR 扩增, 引物序列及扩增片段参照文献^[8]。PCR 产物纯化后用 ABI 3700 测序仪 (Applied Biosystems, 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。家系成员仅针对先证者基因突变区域进行检测。

2 结果

2.1 凝血指标检测结果

先证者 APTT 明显延长为 86.0 s, FXI:C 明显降低仅为 1.7%, 其儿子和女儿 APTT 略延长, 分别为 40.7 s 和 41.4 s; 其母亲、儿子和女儿 FXI:C 均轻度降低, 分别为 58.9%、51.2% 和 50.8%。先证者和家系成员的其他凝血指标均无明显异常, 凝血指标检测结果见表 1。

2.2 FXI 基因检测结果

基因测序发现先证者 8 号外显子存在 c.841C>T, 为无义突变 CAA→TAA (p.Gln263X), 同时在 10 号外显子还存在无义突变 c.1107C>A 即 TAC→TAA (p.Tyr351X)。家系成员中, 先证者的女儿为

表 1 FXI 缺陷症家系凝血指标检测结果

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

家系成员	PT(s)	APTT(s)	FVIII:C(%)	FIX:C(%)	FXI:C(%)	FXII:C(%)
II 1 先证者	11.1	86.0	98	101.1	1.7	63
I 2 母亲	11.5	36.0	148.4	98.7	58.9	72.8
II 2 妻子	10.5	35.5	106.4	70.2	85.8	58.7
III 1 儿子	11.4	40.7	90.3	71.6	51.2	60.1
III 2 女儿	10.9	41.4	86.7	72.6	50.8	54.3
参考值	9~12.8	24~40	75~150	70~120	65~150	50~150

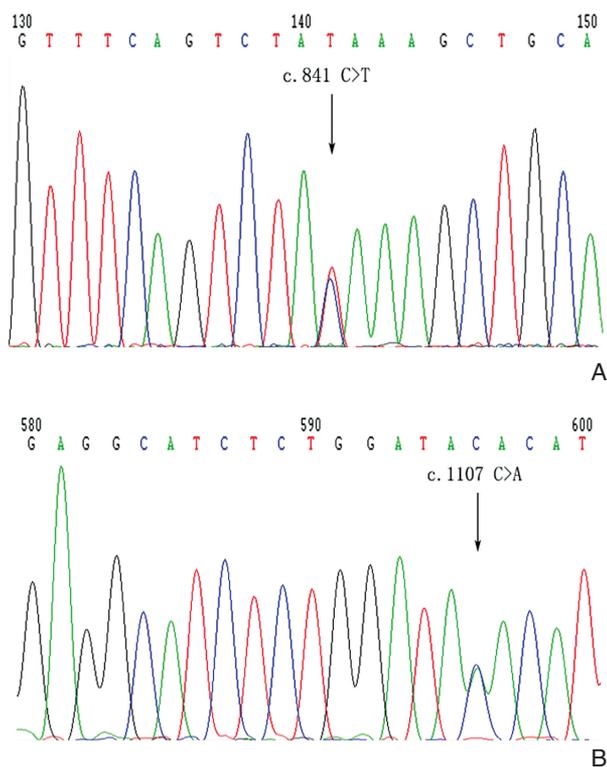
c.841C>T 杂合突变,母亲及儿子均为 c.1107C>A 杂合突变。基因检测结果见表 2 和图 1。经查询 F

XI 基因突变数据库 (<http://factorxi.org>), c.1107C>A (p.Tyr351X) 为国内首次报道。

表 2 FXI 缺陷症家系基因型检测结果

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

家系成员	突变碱基及氨基酸改变 c.841C>T(p.Gln263X)	突变碱基及氨基酸改变 c.1107C>A(p.Tyr351X)	基因型
II 1 先证者	+	+	复合杂合子
I 2 母亲	-	+	杂合子
II 2 妻子	-	-	野生型
III 1 儿子	-	+	杂合子
III 2 女儿	+	-	杂合子



A: 第 8 外显子 c.841C>T 突变, 箭头示突变位点; B: 第 10 外显子 c.1107C>A 突变, 箭头示突变位点。

图 1 FXI 基因突变测序结果

Figure 1 The sequencing results of factor XI gene mutation

2.3 家系图谱分析

家系分析表明,先证者的女儿携带 p.Gln263X, 其母亲及儿子则携带了 p.Tyr351X, 可见先证者的 p.Tyr351X 基因突变遗传自母亲, p.Gln263X 基因突变则推测遗传自己故的父亲, 而先证者儿子和

女儿各自携带的 FXI 杂合突变基因则遗传自先证者, 家系图谱见图 2。

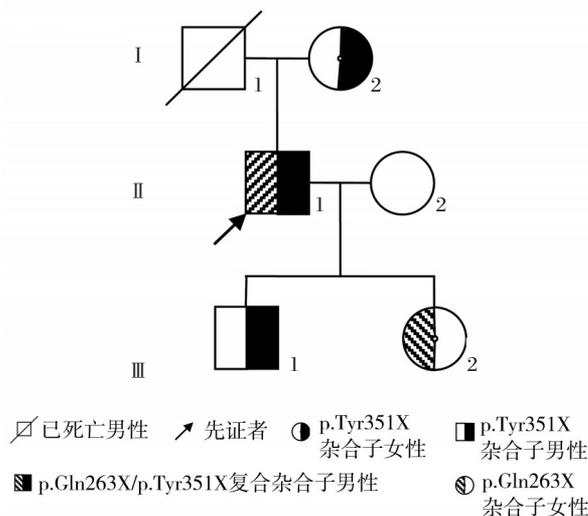


图 2 本例遗传性 FXI 缺陷症家系图

Figure 2 The family tree of hereditary coagulation factor XI deficiency

3 讨论

遗传性 FXI 缺陷症是由合成 FXI 蛋白的基因发生突变引起, 该基因位于第 4 号染色体长臂 (4q35), 含 15 个外显子和 14 个内含子。其中, 外显子 3~10 编码成熟蛋白质位于氨基端 4 个 AP 结构域, 由 369 个氨基酸残基组成重链区, 外显子 11~15 编码羧基端的催化结构域, 由 238 个氨基酸残基组成轻链区。成熟 FXI 蛋白以丝氨酸蛋白酶原形式存在于血液中, 为同源二聚体结构。

本文先证者 APTT 明显延长达 86.0 s, FXI:C 仅为 1.7%, 而其他凝血指标均未见异常, 故诊断为 FXI 缺陷症。经 FXI 基因测序发现, 先证者为 8 号外显子 c.841C>T (p.Gln263X) 及 10 号外显子 c.1107C>A (p.Tyr351X) 复合杂合突变。先证者 10 号外显子 c.1107C>A 突变可使编码 351 位酪氨酸密码子 TAC 变为终止密码子 TAA, Tyr351 位于重链区 AP4 区域, 该区域中第 321 位半胱氨酸(Cys) 是 2 个 FXI 单体间通过二硫键形成二聚体的部位, 同时还是 FXIa 结合区域。c.1107C>A 导致 Tyr351 无义突变, 使蛋白结构的完整性及区域功能性受到影响, 因缺失 AP4 部分区域和整个催化结构域, 产生的截短蛋白因高度不稳定可能是循环中 FXI:C 减低的原因。Au 等^[9]于 2003 年首次报道 FXI 基因 p.Tyr351X, 先证者为 1 名 56 岁女性, 因拔牙后出血时间延长而被发现, FXI:C 为 1%, 基因型为 p.Tyr351X / p.Gln263X 复合杂合子, 其二女儿和小女儿为 p.Tyr351X 杂合子, 大女儿及三女儿为 p.Gln263X 杂合子。巧合的是, 本文先证者基因型与首次报道的先证者基因型完全一样。经查询 FXI 基因突变数据库 (<http://factorxi.org>), c.1107C>A (p.Tyr351X) 为国内首次报道, 而本文先证者的基因型 p.Tyr351X/p.Gln263X 为新发现的 FXI 男性复合杂合子突变类型。

Gln263 位于 FXI 基因 8 号外显子, 即重链区 AP3 区域, 该区域有结合 FIX、肝素和血小板 GP I b 的作用。c.841C>T 杂合无义突变, 使编码 263 位的谷氨酰胺提前出现终止密码子 (CAA→TAA), 多肽链截短使 AP3 缺失部分序列, 整个 AP4 区域和轻链区也全部缺失, 结构功能域的不完整性和截短蛋白的不稳定性可能是导致 FXI:C 下降的原因。也有学者认为, 活化的血小板上约有 1 500 个 FXI 结合位点, 由其上面的血小板 GP I b 介导连接^[4]。而 Gln263 是 AP3 结构域中血小板的结合位点之一, 因此 p.Gln263X 可能会干扰 AP3 结构域的结构形成从而影响其相关的功能。本文先证者 FXI:C 仅为 1.7%, 考虑 p.Tyr351X 和 p.Gln263X 复合杂合突变是导致其血浆中 FXI 活性极度降低的原因。p.Gln263X 在 2000 年首次发现于日本家庭中^[10-11], 国内也有一些文献报道其研究的 FXI 缺陷症家系中存在 p.Gln263X^[4, 5, 12]。Asselta 等^[13]对全球 FXI 缺陷症的发病率及基因突变类型的发生频率做了调查研究, 发现东亚人群的 FXI 缺陷症发病

率约为 20.3/100 万, 其中 p.Gln263X 约占东亚人群基因突变类型的 28.2%, 可见该突变在东亚人群中具有较高的发生频率。

遗传性 FXI 缺陷症临床表现多样, 虽然 FXI:C 低于 15%~20% 被认为发生出血的危险概率最高, 但是 FXI:C 水平的高低并不是 FXI 缺陷症患者出血的发生率及出血程度的唯一决定因素^[14], 出血症状的轻微与否还与所累及的组织有关, 在纤溶组织活性高的部位出血症状较为严重。由于 FXI:C 的血浆水平与出血发生率及出血程度间无明显相关性, 使该疾病的诊断和治疗存在多变性^[15]。本研究中虽然先证者 FXI 重度缺乏, 但并无自发出血症状, 因 FXI 出血风险难以预测, 我院对其采取了保守治疗, 未施行手术。

基因分析不仅能检测出 FXI 缺陷症的突变基因, 也有助于更准确地对其家系成员进行筛查和诊断, 是目前家系患病风险估计与预测中最有效与最直接的检测手段之一, 不仅能节省测序成本, 也避免家系成员重复血液检查。我们在粤东潮州地区发现的 FXI 缺陷症 p.Tyr351X/p.Gln263X 为新的 FXI 男性复合杂合子突变类型, 本地区的突变类型是否与国内其他地区有所不同, 是否有突变热点, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] Souabni L, Meddeb N, Ajlani H, et al. Hemarthrosis revealing congenital factor XI deficiency [J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75 (3): 348-349.
- [2] 叶佳佳, 杨丽红, 郝秀萍, 等. 一例遗传性凝血因子 XI 缺陷症患者表型诊断及基因分析 [J]. *温州医科大学学报*, 2017, 47(5): 356-360.
- [3] 刁戈, 马莉, 林方昭, 等. 1 例凝血因子 XI 缺乏症的基因突变研究 [J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(2): 142-144.
- [4] 戴利亚, 张德亭, 谢海啸, 等. 一个遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系的基因分析 [J]. *温州医科大学学报*, 2015, 45(5): 376-380.
- [5] 董雷鸣, 丁秋兰, 武文漫, 等. 遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系的凝血因子 XI 基因突变分析 [J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(8): 915-919.
- [6] 谢爽, 王鸿利, 王学峰, 等. 凝血因子 XI 基因内含子区受位剪切位点突变导致的遗传性凝血因子 XI 缺陷症 [J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(3): 144-147.
- [7] 周娜, 欧阳建, 周荣富, 等. 两例遗传性凝血因子 XI 缺乏症患者的基因分析 [J]. *血栓与止血学*,

- 2016, 22(3):307-310.
- [8] 彭黎明, 邓承祺. 现代血栓与止血的实验室检测及其应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 561-563.
- [9] Au WY, Cheung JW, Lam CC, et al. Two factor XI mutations in a Chinese family with factor XI deficiency [J]. *Am J Hematol*, 2003, 74(2):136-138.
- [10] Sato E, Kawamata N, Kato A, et al. A novel mutation that leads to a congenital factor XI deficiency in a Japanese family [J]. *Am J Hematol*, 2000, 63(4): 165-169.
- [11] Kawaguchi T, Koga S, Hongo H, et al. A novel type of factor XI deficiency showing compound genetic abnormalities: a nonsense and an impaired transcription [J]. *Int J Hematol*, 2000, 71(1):84-89.
- [12] 王静, 傅启华, 李稻, 等. 遗传性凝血因子XI缺陷症1例家系基因缺陷研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(7):794-797.
- [13] Asselta R, Paraboschi EM, Rimoldi V, et al. Exploring the global landscape of genetic variation in coagulation factor XI deficiency [J]. *Blood*, 2017, 130(4): e1-e18.
- [14] Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, et al. The rare coagulation disorders-review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organisation [J]. *Haemophilia*, 2004, 10:593-628.
- [15] 董雷鸣, 王学峰, 王鸿利. 凝血因子XI缺陷症的研究进展[J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8(4):431-434.

(上接第147页)

- [18] Wang J, Shen T, Huang X, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(4):700-710.
- [19] Wang J, Du M, Huang H, et al. Reply to: "Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity": Consistent loss of serum HBV RNA might predict the "para-functional cure" of chronic hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(2):462-463.
- [20] Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, et al. HBV DNA integration: molecular mechanisms and clinical implications [J]. *Viruses*, 2017, 9(4):75.
- [21] Jiang S, Yang Z, Li W, et al. Re-evaluation of the carcinogenic significance of hepatitis B virus integration in hepatocarcinogenesis [J]. *Plos One*, 2012, 7(9):e40363.
- [22] Li X, Zhang J, Yang Z, et al. The function of targeted host genes determines the oncogenicity of HBV integration in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5):975-984.

(上接第152页)

- [13] 董力, 甄景慧, 王艳, 等. 住院患儿细菌培养标本分离肺炎链球菌特征分析 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2016, 31(3):201-205.
- [14] 徐丽慧, 王贤军, 方美玉, 等. 肺炎链球菌大环内酯类药物耐药性及耐药基因 *erm*、*mef* 的检测 [J]. *中华传染病杂志*, 2010, 28(3):174-177.
- [15] 孙燕, 孔菁, 张泓, 等. 2005-2014年 CHINET 流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(2):153-159.
- [16] 陈惠瑜, 成玲, 邱华红, 等. PICU 患儿医院感染病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(5):1175-1177.
- [17] Nikitina EV, Zeldi MI, Pugachev MV, et al. Antibacterial effects of quaternary bis-phosphonium and ammonium salts of pyridoxine on staphylococcus aureus cells: A single base hitting two distinct targets [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(1):5.

RNA 干扰沉默 *SOX9* 对肾细胞癌 786-O 细胞体外增殖、凋亡及裸鼠成瘤能力的影响

楚广民* 张建波 孙淼淼

[摘要] 目的 探讨 RNA 干扰沉默 *SOX9* (sex determining region Y-box 9) 对肾细胞癌 786-O 细胞体外增殖、凋亡及裸鼠成瘤能力的影响。方法 以 *SOX9* 特异性的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列为实验沉默组, 非特异性的 siRNA 序列为对照组分别转染 786-O 细胞。采用 CCK-8 实验与平板克隆形成实验检测 786-O 细胞的增殖, 采用 Hoechst 33342 细胞染色法检测 786-O 细胞凋亡。通过裸鼠成瘤实验检测 RNA 干扰沉默 *SOX9* 对动物体内成瘤能力的影响。采用免疫组织化学技术检测增殖抗原 Ki-67 蛋白的表达情况。结果 siRNA 转染细胞后, 与对照组比, *SOX9* 沉默组 OD 值明显降低, 细胞集落数较对照组明显减少, 差异具统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比, *SOX9* 沉默组细胞凋亡明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。动物成瘤实验结果表明, *SOX9* 沉默组瘤体体积及重量较对照组明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色表明, siRNA 沉默组 Ki-67 阳性细胞比例较对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 RNA 干扰沉默 *SOX9* 能显著抑制肾细胞癌 786-O 细胞的增殖, 促进其凋亡, 并且能够抑制肾癌细胞在裸鼠体内的增殖。

[关键词] 小干扰 RNA; *SOX9*; 786-O 细胞; 裸鼠成瘤

Effect of silencing *SOX9* by RNA interference on proliferation and apoptosis of renal cancer 786-O cells *in vitro* and tumorigenicity in nude mice

CHU Guangmin*, ZHANG Jianbo, SUN Miaomiao

(Department of Pathology, Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450008)

[ABSTRACT] Objective To explore the effects of small interfering RNA (siRNA) targeting *SOX9* gene on proliferation, apoptosis *in vitro* and tumorigenicity *in vivo* of renal cancer 786-O cells. Methods 786-O cells which transfected with *SOX9* siRNA or scramble RNA were collected for the following experiments. The effects of *SOX9* siRNA on cell proliferation were detected by CCK-8 assay and colony formation assay. Cell apoptosis was detected by Hoechst 33342 staining assay. The effects on cell proliferation *in vivo* were detected by establishing renal cancer (786-O) bearing nude mouse model. The effects on proliferation marker Ki-67 protein expression were evaluated by immunohistochemistry. Results Compared with control group, the OD values and the number of colonies in *SOX9* siRNA transfected group were decreased and the differences were statistically significant. However, the apoptosis rate in *SOX9* siRNA transfected group were increased when compared with control group. In renal cancer bearing nude mouse models, the average tumor volume and tumor weight in *SOX9* siRNA group were decreased and have significant difference as in comparison to control group. Meanwhile, the percentage of Ki-67 positive cells was decreased in siRNA transfected group when compared with control group and the differences were statistically significant. Conclusion *SOX9* inhibition by targeted siRNA can inhibit 786-O cell proliferation, enhance apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*.

[KEY WORDS] Small interfering RNA; *SOX9*; 786-O cell; Tumorigenicity in nude mice

作者单位: 郑州大学附属肿瘤医院病理科, 河南, 郑州 450008

*通讯作者: 楚广民, E-mail: ewfrr223@163.com

肾细胞癌是泌尿系统中仅次于膀胱肿瘤的最常见的恶性肿瘤之一,约占肾脏恶性肿瘤的85%^[1]。肾癌对于传统药物和放射治疗不敏感,预后相对较差,所以寻找新的治疗方法显得尤为重要。*SOX9*(sex determining region Y-box 9)属于*SRY*(sex determination region of Y chromosome)相关基因家族,目前为止共发现20多个*SOX*基因家族,其共同特点是各个基因都含有一个保守的HMG-box DNA结合域^[2]。有研究表明,*SOX9*基因的表达异常与结直肠癌、肺癌及胰腺癌等多种肿瘤进展相关^[3-5]。目前干扰*SOX9*基因表达对肾癌细胞增殖、凋亡及裸鼠成瘤的影响仍有待进一步研究。本研究采用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术沉默下调肾细胞癌786-O细胞中*SOX9*基因的表达,检测其对786-O细胞增殖、凋亡及裸鼠成瘤的影响,为肾细胞癌的临床治疗提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

肾细胞癌786-O细胞株购自ATCC(American Type Culture Collection)。细胞培养基为RPIM-1640(美国Hyclone公司),其中添加10%胎牛血清、青霉素100 IU/mL及链霉素100 IU/mL。所用实验动物均为BALB/c雌性裸鼠,4~6周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要仪器和试剂

Multiskan FC酶标仪购自美国Thermo公司,cx41荧光显微镜购自日本Olympus公司。Hoechst 33342细胞凋亡试剂盒购于北京联科生物科技有限公司,CCK-8试剂盒购于日本东仁化工公司,免疫组织化学抗体Ki-67购自美国Santa cruz公司。

1.3 实验与方法

1.3.1 siRNA细胞转染及qPCR

SOX9 siRNA有效序列为:上游:5'-AGCAAGTCCGCGAGCCAGTAC-3',下游:5'-GGTGTGCCTTCTGTGCTGCAC-3';对照组序列为:上游:5'-UCCACUGTCACUGGUCCGATT-3',下游:5'-CGUGACAGUGCCGAGAAT-3'。具体转染方法如下:细胞生长融合度为70%~80%时,按操作说明书,分别将INTERFERINGTM转染试剂(Polyplus Transfection公司,法国)和*SOX9* siRNA或阴

性对照序列(50 nmol/L的终浓度)加入786-O细胞培养液中,将细胞继续置于细胞孵化箱中转染。48 h后,收集细胞用于后续功能检测。取转染后的细胞,用Trizol法提取总RNA。按cDNA反转录酶试剂盒(北京达科为生物技术有限公司)说明书进行操作,将2 μg Total RNA反转录为cDNA,以此为模板进行扩增。*SOX9*序列:上游:5'-CAGAAGTACTGGGAAAGTCGT-3',下游:5'-CCGGTACTTGTAGTTGGGGTAGT-3'。内参*GAPDH*序列:上游:5'-AGCCTCAAGATCATCAGCAAT-3',下游:5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCACG-3'。反应体系总体积20 μL,其中模板cDNA为1.5 μL,上、下游引物分别为1 μL,SYBR混合物10 μL,无菌蒸馏水6.5 μL。反应条件:95℃预变性3 min,95℃变性10 s,60℃退火30 s,70℃延伸30 s,共30个循环。以*GAPDH*作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3.2 CCK-8法检测细胞活性

将各组786-O细胞制成细胞混悬液,以 3×10^4 个/孔的密度种于96孔板中,于细胞孵箱中分别孵育0、24、48、72 h。用100 μL的无血清细胞培养基与10 μL的CCK-8试剂混匀并加入各孔之中,于37℃细胞培养箱继续孵育1 h。最后将96孔板置于酶标仪下,于450 nm激发光下测定光密度(optical density, OD)值。每次实验重复3次,每组3个复孔。

1.3.3 Hoechst 33342细胞荧光染色

转染48 h后,将各组786-O细胞制备成 1×10^5 个/mL浓度细胞混悬液。取2 mL细胞混悬液加入6孔板(底部置入1张清洁载玻片)中,将6孔板置入细胞培养箱。48 h后将爬满细胞的玻片用PBS清洗3次,然后用4%多聚甲醛固定1 h。再次将玻片用PBS清洗3遍。然后将玻片浸泡在装有Hoechst33342染液的染色缸中10 min。荧光显微镜($\times 100$)下,随机选取5个视野计数。活细胞呈弥散均匀荧光,凋亡细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光,3个或3个以上的DNA荧光碎片被认为是凋亡细胞^[6]。

1.3.4 裸鼠成瘤实验

取经过siRNA转染后各组细胞 2×10^6 个重悬于100 μL PBS,分别皮下接种于裸鼠右前肢腋下。每隔5天,用游标卡尺测量肿瘤长(L)和宽

(W), 瘤体体积计算公式为 $LW^2/2$ (mm^3)。初始每组 11 只裸鼠, 第 7 天时, SOX9 沉默组有一只裸鼠因注射部位感染而死亡, 对照组有一只裸鼠从始至终未长出肿瘤。第 20 天时处死裸鼠, 仔细分离瘤体并称重。瘤体组织用于后续免疫组化实验。

1.3.5 免疫组织化学染色

新鲜的肿瘤组织从裸鼠体内分离后立即用 4% 多聚甲醛溶液行标本固定。然后经酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 用切片机切成厚约 $4 \mu\text{m}$ 的组织薄片。经二甲苯及梯度酒精处理予以脱蜡至水化。滴加 Ki-67 抗体孵育过夜, 二抗孵育 1 h。行二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 苏木精染色后中性树脂封片。在普通显微镜下, 随机取 5 个 40 倍高清视野计数总的细胞数目及 Ki-67 阳性细胞数目, 其中细胞核为棕褐色即视为 Ki-67 染色阳性。Ki-67 阳性细胞比例 = Ki-67 阳性细胞数目 / 总细胞数目 $\times 100\%$ 。

1.3.6 平板克隆形成实验

将转染了 siRNA 的 786-O 细胞制成单细胞混

悬液, 以 1 000 个/孔的密度接种于普通 6 孔板。将六孔板置于细胞孵箱中, 每两天更换一次新鲜培养基。14 天之后, 将细胞用 4% 多聚甲醛固定, 0.5% 结晶紫染色。普通显微镜 ($\times 100$) 下随机取 5 个视野, 并计数大于 100 个细胞的细胞集落数。实验重复 3 次, 每组 3 个复孔。

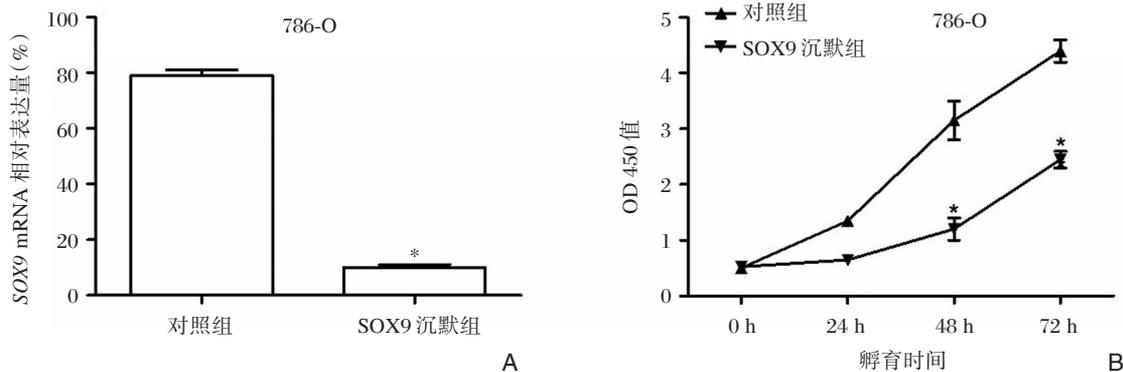
1.4 数据统计学处理

所有数据处理均采用 SPSS 13.0 软件。计量资料表达形式为均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 两组间的比较采用 student-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 SOX9 基因的表达影响 786-O 细胞的活性

转染 48 h 后, 相对于对照组而言, 沉默组中 SOX9 mRNA 的表达水平显著降低, 干扰效率为 83.8% (图 1A)。同时转染 48 h 及 72 h 后, SOX9 沉默组的细胞活性相对于对照组显著降低 ($P < 0.05$) (图 1B)。



A: SOX9 mRNA 在各组细胞中的相对表达量; B: 各组细胞在不同时间点的吸光度值。* $P < 0.05$ 表示与对照组相比差异具有统计学意义。

图 1 干扰沉默 SOX9 基因对 786-O 细胞活性的影响

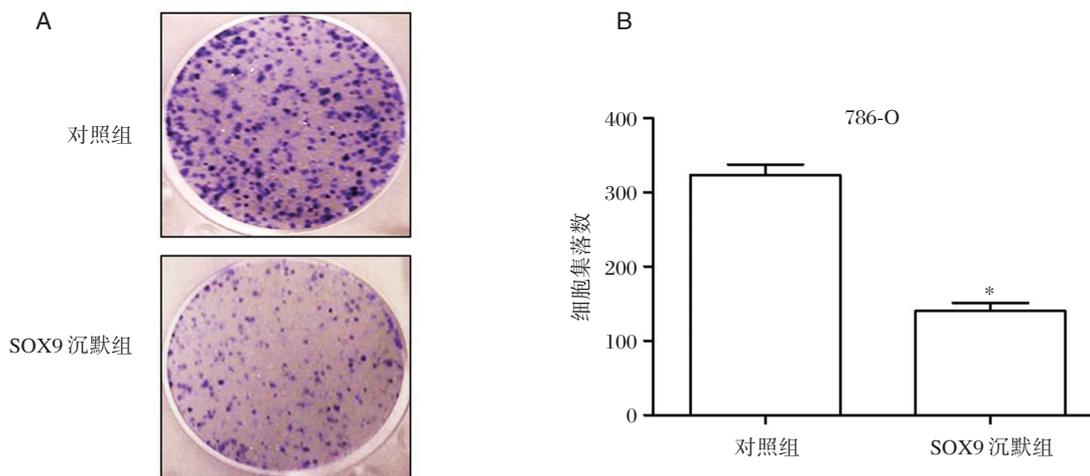
Figure 1 Effects of SOX9 siRNA on cell viability of 786-O cells

2.2 沉默 SOX9 基因的表达抑制 786-O 细胞的增殖, 促进细胞凋亡

平板克隆形成实验结果显示, 肾癌 786-O 细胞转染 SOX9 siRNA 后, SOX9 沉默组的细胞集落数为 (140.0 ± 11.52) 个, 显著低于对照组的细胞集落数 (323.3 ± 14.51) 个 ($P < 0.05$) (图 2A 和图 2B)。Hoechst 33342 细胞荧光染色结果显示, SOX9 沉默组细胞凋亡比例为 $(27.7 \pm 3.25)\%$, 显著高于对照组细胞凋亡比例 $(6.0 \pm 0.94)\%$ ($P < 0.05$) (图 3A 和图 3B)。

2.3 沉默 SOX9 基因的表达抑制 786-O 细胞裸鼠成瘤能力。

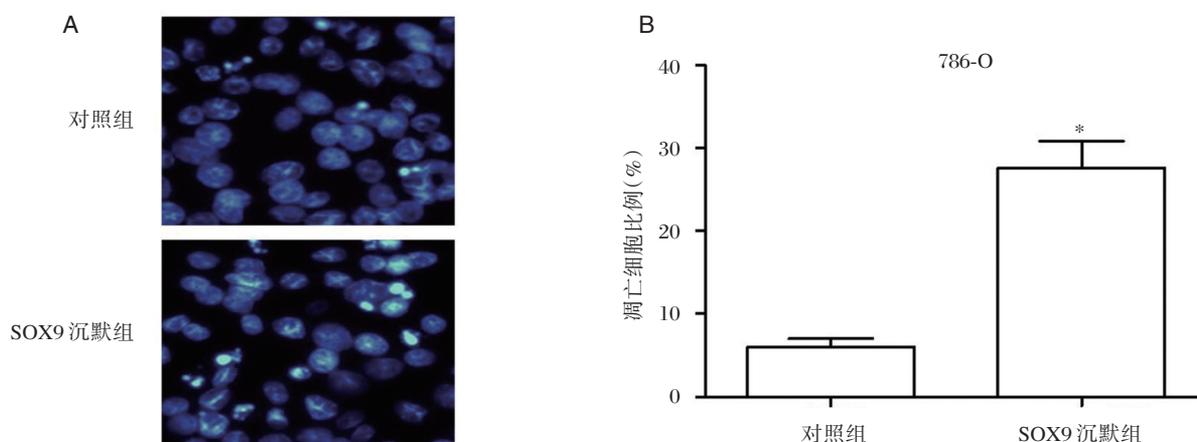
将 SOX9 siRNA 转染后的 786-O 细胞及其对照组细胞分别接种到 BALB/c 裸鼠体内, 观察其成瘤能力。在第 20 天实验结束时, SOX9 沉默组平均瘤体体积为 $(315.44 \pm 63.73) \text{mm}^3$, 明显小于对照组平均瘤体体积 $(595.2 \pm 50.52) \text{mm}^3$ (图 4A)。同时 SOX9 沉默组平均瘤体重量为 $(0.43 \pm 0.23) \text{g}$, 显著低于对照组的平均瘤体重量 $(0.89 \pm 0.16) \text{g}$ ($P <$



A: 各组细胞平板克隆形成实验图; B: 各组细胞平板克隆形成实验结果统计图。* $P < 0.05$ 表示与对照组相比差异具有统计学意义。

图2 干扰沉默SOX9基因对786-O细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of SOX9 siRNA on 786-O cells proliferation



A: 各组细胞Hoechst33342染色免疫荧光染色图($\times 100$); B: 各组细胞Hoechst33342染色免疫荧光染色结果统计图。* $P < 0.05$ 表示与对照组相比差异具有统计学意义。

图3 沉默SOX9基因对786-O细胞凋亡的影响

Figure 3 Effects of SOX9 siRNA on 786-O cells apoptosis

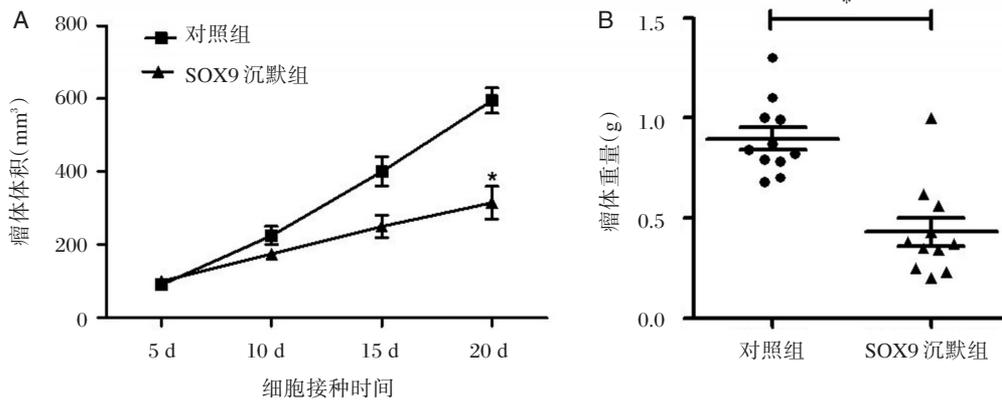
0.05)(图4B)。Ki-67免疫组织化学染色结果如图5所示,SOX沉默组Ki-67阳性的细胞比例为 $(13.3 \pm 2.66)\%$,显著低于对照组肿瘤组织中Ki-67阳性的细胞比例 $(56.3 \pm 3.21)\%$ ($P < 0.05$)。

3 讨论

肾细胞癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,手术切除结合分子靶向药物是其主要的治疗方法。但是肾细胞癌的发生发展是一个多因素、多基因参与的过程,部分肾癌患者对现有的分子靶向药物治疗并不敏感。所以寻找新的分子靶点,对于肾

癌的治疗具有重要的意义。

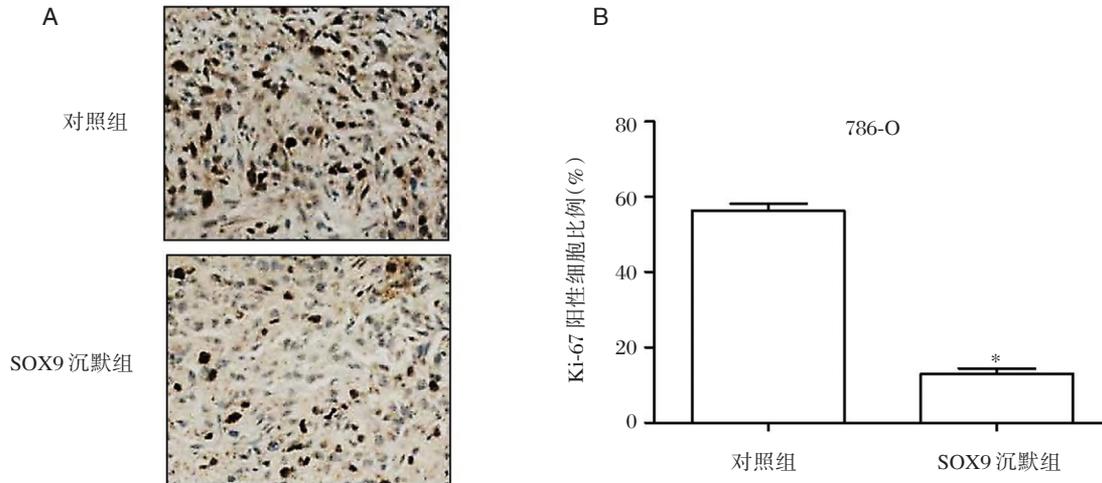
SOX基因超家族参与人体众多重要的生理过程,如决定性别、调节胚胎神经系统发育、参与软骨形成、晶状体的发育、血细胞生成等等^[7-8]。近年来相关研究表明,SOX基因家族与人类肿瘤关系密切,如SOX2基因通过调节PTEN的表达,抑制胃癌细胞的增殖和转移^[9]。SOX6基因在肝癌组织中表达明显降低,且低表达SOX6基因的患者预后较差^[10]。口腔鳞状细胞癌患者的SOX7低表达与其淋巴结转移、肿瘤高分级分期密切相关,抑制SOX7的表达能够降低口腔鳞状上皮癌细胞增殖



A: 各组动物瘤体在不同时间点的体积。B: 各组动物瘤体在不同时间点的重量。* $P < 0.05$ 表示与对照组相比差异具有统计学意义。

图4 干扰沉默 *SOX9* 基因对 786-O 细胞裸鼠成瘤能力的影响

Figure 4 Effects of *SOX9* siRNA on 786-O cells tumorigenesis in nude mice



A: 各组细胞 Ki-67 蛋白免疫组织化学染色图($\times 40$)；B: 各组细胞免疫组织化学染色 Ki-67 蛋白阳性比例结果统计图。* $P < 0.05$ 表示与对照组相比差异具有统计学意义。

图5 干扰沉默 *SOX9* 基因对 786-O 细胞 Ki-67 蛋白表达的影响

Figure 5 Effects of *SOX9* siRNA on Ki-67 protein expression in 786-O cells

及侵袭能力^[11]。*SOX9* 基因表达异常升高可导致结直肠癌的发生^[3]，且在肺癌和胰腺癌组织中表达丰富，参与调节其相应肿瘤细胞的转移^[4-5]，此外也与乳腺癌的预后密切相关^[12]。*SOX9* 表达增强能够促进脑胶质瘤细胞的转移^[13]，而沉默 *SOX9* 基因的表达能抑制宫颈癌细胞的增殖^[14]。此外，在前列腺癌中 *SOX9* 发挥抑癌基因的作用，低表达 *SOX9* 基因与 ERG 阳性的前列腺癌复发、转移密切相关^[15]。有报道称 *SOX9* 在相应的肾细胞癌组织中呈高表达，与其预后密切相关^[16]。但涉及 *SOX9* 基因的表达对肾细胞癌细胞功能的相关影响仍未

见报道。

为探究 *SOX9* 对肾细胞癌 786-O 细胞增殖的影响，本研究采用 CCK-8 检测 siRNA 干扰沉默 *SOX9* 基因表达对细胞活性的影响。实验结果表明，沉默 *SOX9* 表达后 786-O 细胞活性显著下降。同时，相应的平板克隆形成实验和 Hoechst 33342 细胞荧光染色结果进一步显示，干扰沉默 *SOX9* 能显著抑制 786-O 细胞的增殖，促进其凋亡增加。早期研究表明，在体外敲除 *SOX9* 基因能够显著抑制甲状腺癌、直肠癌及胃癌等细胞的增殖^[3, 17-18]，促进脊索神经瘤细胞凋亡^[19]；此外，敲除骨肉瘤细胞系

SOX9 基因的表达既能导致细胞增殖被抑制, 同时也能促进其细胞凋亡^[20]。本研究结果与上述文献报道结果基本吻合。

此外, 为进一步了解沉默 *SOX9* 基因对体内肾细胞增殖的影响, 本研究将细胞接种于裸鼠体内观察肿瘤体积及重量的变化。结果表明, *SOX9* 沉默组肿瘤体积与肿瘤重量均低于对照组。Ki-67 是一种与细胞周期相关的蛋白质, 其功能与有丝分裂密切相关, 在细胞增殖中不可缺少, 该蛋白高表达反应细胞增殖能力强, 是一个常用的细胞增殖抗原^[21]。数据显示, 沉默 *SOX9* 基因后, 增殖抗原 Ki-67 的表达显著被抑制。提示沉默 *SOX9* 基因同样能够抑制体内肾细胞癌 786-O 细胞的增殖, 与其体外实验结果一致。

综合上述研究结果, 干扰沉默 *SOX9* 的表达能够显著抑制肾细胞癌 786-O 细胞的增殖, 并促进该细胞凋亡。同时证明在体外及动物体内靶向抑制 *SOX9* 基因表达能够有效地杀伤肾细胞癌相关细胞系, 进一步为肾细胞癌的临床治疗提供参考。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30.
- [2] Zhao L, Koopman P. SRY protein function in sex determination: thinking outside the box [J]. *Chromosome Res*, 2012, 20(1):153-162.
- [3] Qian Y, Xia S, Feng Z. Sox9 mediated transcriptional activation of FOXK2 is critical for colorectal cancer cells proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1):475-481.
- [4] Capaccione KM, Hong X, Morgan KM, et al. Sox9 mediates Notch1 - induced mesenchymal features in lung adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(11):3636-3650.
- [5] Camaj P, Jäckel C, Krebs S, et al. Hypoxia-independent gene expression mediated by SOX9 promotes aggressive pancreatic tumor biology [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(3):421-432.
- [6] Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342 [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016(9): pdb.prot087205.
- [7] Fu L, Shi YB. The Sox transcriptional factors: Functions during intestinal development in vertebrates [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63:58-67.
- [8] Yin C. Molecular mechanisms of Sox transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63:68-78.
- [9] Wang S, Tie J, Wang R, et al. SOX2, a predictor of survival in gastric cancer, inhibits cell proliferation and metastasis by regulating PTEN [J]. *Cancer Lett*, 2015, 358(2):210-219.
- [10] Guo X, Yang M, Gu H, et al. Decreased expression of SOX6 confers a poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Epidemiol*, 2013, 37(5):732-736.
- [11] Oh KY, Hong KO, Huh YS, et al. Decreased expression of SOX7 induces cell proliferation and invasion and correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2017, 46(9):752-758.
- [12] Riemenschnitter C, Teleki I, Tischler V, et al. Stability and prognostic value of Slug, Sox9 and Sox10 expression in breast cancers treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. *Springerplus*, 2013, 2:695.
- [13] Liu H, Liu Z, Jiang B, et al. SOX9 overexpression promotes glioma metastasis via Wnt/ β -Catenin Signaling [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(1):205-212.
- [14] Wang HY, Lian P, Zheng PS. SOX9, a potential tumor suppressor in cervical cancer, transactivates p21WAF1/CIP1 and suppresses cervical tumor growth [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(24):20711-20722.
- [15] Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, et al. Loss of SOX9 expression is associated with PSA recurrence in ERG-positive and PTEN deleted prostate cancers [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0128525.
- [16] Wan YP, Xi M, He HC, et al. Expression and clinical significance of SOX9 in renal cell carcinoma, bladder cancer and penile cancer [J]. *Oncol Res Treat*, 2017, 40(1-2):15-20.
- [17] Huang J, Guo L. Knockdown of SOX9 inhibits the proliferation, invasion, and EMT in thyroid cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(2):167-176.
- [18] Santos JC, Carrasco-Garcia E, Garcia-Puga M, et al. SOX9 elevation acts with canonical WNT signaling to drive gastric cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(22):6735-6746.
- [19] Chen H, Garbutt CC, Spentzos D, et al. Expression and therapeutic potential of SOX9 in chordoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17):5176-51866.

(下转第 195 页)

25-羟维生素 D3 与 IL-10 在系统性红斑狼疮中的临床应用研究

张韶斌* 陈斯亮 符青松 罗莞超 黄望香

[摘要] 目的 探讨 25-羟维生素 D3 与 IL-10 在系统性红斑狼疮(SLE)中的临床应用。方法 选取 182 例 SLE 患者为实验组,150 例同期来本院体检的非 SLE 患者作为对照组,2 组患者的性别与年龄比较无统计学差异($P > 0.05$),其中 SLE 实验组根据疾病活动性指数(SLEDAI)评分标准分为活动组(100 例)和缓解组(82 例)。采用 ELISA 方法测定实验组和对照组的血清 25-羟维生素 D3 和 IL-10 水平,并比较各组的差异。结果 SLE 实验组 25-羟维生素 D3 为(17.51 ± 8.29) ng/mL,明显低于对照组的(38.31 ± 9.34) ng/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$);SLE 实验组 IL-10 为(53.73 ± 6.35) pg/mL,明显高于对照组的(25.45 ± 4.28) pg/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SLE 活动组 25-羟维生素 D3 为(14.42 ± 8.43) ng/mL,明显低于缓解组的(21.23 ± 8.52) ng/mL 和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);SLE 活动组 IL-10 水平为(58.21 ± 7.18) pg/mL,明显高于缓解组的(40.51 ± 6.89) pg/mL 和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SLE 患者血清 25-羟维生素 D3 水平与 SLEDAI 呈负相关($P < 0.05$);SLE 患者血清 IL-10 水平与 SLEDAI 呈正相关($P < 0.05$)。结论 25-羟维生素 D3 与 IL-10 在系统性红斑狼疮发病中起重要作用,并与疾病的活动度相关,具有重要临床应用价值。

[关键词] 25-羟维生素 D3; IL-10; 系统性红斑狼疮

The study of clinical application of 25-hydroxy vitamin D3 and IL-10 in systemic lupus erythematosus

ZHANG Shaobin*, CHEN Siliang, FU Qingsong, LUO Guanchao, HUANG Wangxiang

(Department of Clinical Laboratory, Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong, China, 518116)

[ABSTRACT] Objective To investigate the clinical application of 25-hydroxy vitamin D3(25-OH-D3) and IL-10 in systemic lupus erythematosus (SLE). Methods 182 cases of patients with SLE were recruited as the experimental group, and 150 cases of non-SLE patients who came to the hospital during the same period as the normal health control group. There were no significances in genders and age between the 2 groups ($P > 0.05$). The SLE group were further divided into the activity group (100 cases) and the remission group (82 cases) according to the disease activity index (SLEDAI) standard for evaluation. The levels of 25-hydroxy vitamin D3 and IL-10 in serum were measured by ELISA, and the results were analyzed among 3 groups. Results The level of 25-hydroxy vitamin D3 in the SLE experimental group was (17.51 ± 8.29) ng/mL, which was significantly lower than that in the control group (38.31 ± 9.34) ng/mL ($P < 0.05$). The level of IL-10 in SLE experimental group was (53.73 ± 6.35) pg/mL, which was significantly higher than that in the control group (25.45 ± 4.28) pg/mL, ($P < 0.05$). The level of 25-hydroxyl vitamin D3 in SLE activity group was (14.42 ± 8.43) ng/mL, significantly lower than the remission group (21.23 ± 8.52) ng/mL and control group,

基金项目:深圳市科技计划项目(JCYJ20150403091931186)

作者单位:深圳市龙岗中心医院检验科,广东,深圳 518116

*通讯作者:张韶斌, E-mail:13923856280@139.com

($P < 0.05$). The level of IL-10 in SLE activity group was (58.21 ± 7.18) pg/mL was significantly higher than that in the remission group (40.51 ± 6.89) pg/mL and control group, ($P < 0.05$). The level of 25-hydroxyl vitamin D3 in serum of SLE patients was negatively correlated with SLEDAI ($P < 0.05$). The level of serum IL-10 in SLE patients was positively correlated with SLEDAI ($P < 0.05$). Conclusion 25-hydroxy vitamin D3 and IL-10 play an important role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, and are related to the activity of the disease, suggesting a great potential in the clinical application.

[KEY WORDS] 25-hydroxy vitamin D3; IL-10; Systemic lupus erythematosus

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多脏器的自身免疫性炎症性结缔组织病,好发于青年女性,其发病与免疫异常、内分泌、遗传、感染和一些环境因素有关。虽然SLE发病机制尚未完全阐明,但普遍认为其是一种免疫性疾病,其病理损伤主要由抗体介导的免疫性炎症反应引起,以B淋巴细胞过度增殖活化、产生多种自身抗体为突出特点^[1]。维生素D是一种固醇类衍生物,目前认为是一种类固醇激素,其主要作用是参与钙磷调节,但是其免疫作用日趋受到研究者的重视。近年来有许多研究者对维生素D的免疫作用进行了深入的研究,发现其有明显的免疫调节作用^[2-3]。SLE患者维生素D的代谢状况在国外逐渐受到关注,世界不同地区陆续有SLE患者存在维生素D缺乏的报道^[4-5]。最近的研究证实维生素D在淋巴细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞的调节、分化以及影响抗炎细胞因子的表达等方面发挥免疫调节的作用^[6-7]。IL-10主要由Th2细胞产生,具有抑制细胞免疫作用,同时通过诱导B淋巴细胞增殖分化介导体液免疫,是SLE的易感因子之一^[8-9]。本研究通过检测SLE患者血清的25-羟维生素D3和IL-10水平,探讨其在SLE的临床应用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

病例选取2016年1月至2017年6月来本院就诊的SLE患者为实验组,共计182例,患者均符合系统性红斑狼疮国际临床协作组(Systemic Lupus International Collaborating Clinics, SLICC)在美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)2009年费城年会提出新的分类诊断标准^[10],其中男的18例,女的164例,年龄17~56岁,平均 (32 ± 12.3) 岁。按照SLE疾病活动性指数(SLE disease activity index, SLEDAI)评分标准将SLE实验

组分为SLE活动组和缓解组,SLE活动组SLEDAI评分大于或等于5分,共100例,SLE缓解组SLEDAI评分小于5分,共计82例。同时收集同期来本院体检的性别和年龄相匹配的非SLE患者作为对照组,共计150例,男的15例,女的135例,年龄15~60岁,平均 (33 ± 11.8) 岁。对照组的性别与年龄与SLE实验组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。排除近3个月服用钙剂及维生素D治疗、其他自身免疫性疾病者或近期合并感染者。

1.2 检测方法

患者入院后24 h内采集静脉非抗凝血各2 mL,离心分离血清。25-羟维生素D3和IL-10检测试剂盒购自英国IDS公司,采用ELISA方法进行检测,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法

运用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计分析,资料符合正态分布,故采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示进行统计描述,两组间的比较采用 t 检验,采用Pearson线性相关分析SLEDAI、血清25-羟维生素D3和IL-10水平指标间的相关性, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE实验组与对照组血清25-羟维生素D3、IL-10水平的测定结果

SLE实验组血清25-羟维生素D3水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SLE实验组血清IL-10水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 SLE活动组、缓解组和对照组血清25-羟维生素D3、IL-10水平比较

SLE活动组血清25-羟维生素D3水平明显低于缓解组和对照组,差异有统计学意义($P <$

表1 SLE 实验组与对照组血清 25-羟维生素 D3 和 IL-10 水平比较

Table 1 The comparison of serum 25-hydroxyl vitamin D3 and IL-10 levels between SLE group and control group

组别	25-羟维生素 D3 (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)
实验组	17.51±8.29*	53.73±6.35*
对照组	38.31±9.34	25.45±4.28

*表示与对照组比较, $P<0.05$ 。

0.05)。SLE 活动组血清 IL-10 水平明显高于缓解组和对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

表2 SLE 活动组、缓解组和对照组血清 25-羟维生素 D3 和 IL-10 水平比较

Table 2 Comparison of serum 25-hydroxylvitamin D3 and IL-10 levels among SLE activity group, SLE remission group and control group

组别	25-羟维生素 D3 (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)
活动组	14.42±8.43**	58.21±7.18**
缓解组	21.23±8.52*	40.51±6.89*
对照组	38.31±9.34	25.45±4.28

*表示与对照组比较, $P<0.05$; **表示与缓解组比较, $P<0.05$; *表示与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 SLE 活动组、缓解组和对照组 25-羟维生素 D3 不足及缺乏情况比较

参照 Hamza 等^[4]的标准, 25-羟维生素 D3 水平 30 ng/mL 以上定义为维生素 D 充足, 10~30 ng/mL 定义为维生素 D 不足, 低于 10 ng/mL 定义为维生素 D 缺乏, 对各组进行统计分析。SLE 活动组与缓解组血清 25-羟维生素 D3 水平充足率分别为 3.00% 和 10.98%, 明显低于对照组 76.67%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); SLE 活动组与缓解组血清 25-羟维生素 D3 水平不足率分别为 56.00% 和 74.39%, 明显高于对照组 21.33%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); SLE 活动组与缓解组血清 25-羟维生素 D3 水平缺乏率分别为 41.00% 和 14.63%, 明显高于对照组 2.00%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 3。

2.4 SLEDAI、25-羟维生素 D3 和 IL-10 水平相关性

采用 Pearson 线性相关分析 SLEDAI、血清 25-

表3 SLE 活动组、缓解组和对照组血清 25-羟维生素 D3 不足及缺乏情况 [n(%)]

Table 3 Deficiency and lack of serum 25-hydroxyl vitamin D3 among SLE activity group, SLE remission group and control group [n(%)]

组别	n	充足	不足	缺乏
活动组	100	3(3.00)*	56(56.00)*	41(41.00)*
缓解组	82	9(10.98)*	61(74.39)*	12(14.63)*
对照组	150	115(76.67)	32(21.33)	3(2.00)

*与对照组比较, $P<0.05$ 。

羟维生素 D3 和 IL-10 水平指标间的相关性。SLE 患者血清 25-羟维生素 D3 水平与 SLEDAI 呈负相关, $r=-0.478$, $P<0.05$; 血清 IL-10 水平与 SLEDAI 呈正相关 $r=0.638$, $P<0.05$; 血清 25-羟维生素 D3 水平与 IL-10 水平呈负相关, $r=-0.354$, $P<0.05$ 。

3 讨论

SLE 是一种累及多脏器的自身免疫性炎症性结缔组织病, 好发于青年女性, 其发病与免疫异常、内分泌、遗传、感染和一些环境因素有关。目前 SLE 发病机制尚未完全阐明, 普遍认为是一种免疫性疾病, 病情较复杂, 多呈慢性迁延且难以治愈, 病程中活动期与缓解期反复交替出现^[11-12]。临床表现多样化, 免疫炎症常导致各脏器损伤, 甚至危及生命。浆膜炎是 SLE 主要病理改变, 涉及皮肤、关节、肾脏等脏器。临床治疗多采用非固醇类抗炎药物缓解症状, 严重者使用免疫抑制剂或激素类药物, 但毒副作用较大。因此深入研究 SLE 的发病机制, 早期诊断早期干预, 对该病的防治具有重要意义。

维生素 D 是一种新发现的神经内分泌免疫调节激素, 通过与维生素 D 受体结合, 除参与钙磷代谢外, 还具有免疫调节作用。近年来维生素 D 免疫调节作用的研究日趋增多, 维生素 D 能影响细胞的增殖、分化, 通过调控多条免疫信号通路对机体的免疫系统和功能发挥干预效应^[13]。25-羟维生素 D3 是维生素 D 在血中主要循环形式, 目前临床多通过检测血清 25-羟维生素 D3 来反映机体维生素 D 的水平^[14]。研究发现自身免疫性疾病患者维生素 D 缺乏比例比正常人群要高^[15], SLE 患者维生素 D 的代谢状况近年在国外逐渐受到关注, 低

维生素D水平对SLE发生和疾病发展有影响作用^[16]。本研究发现SLE患者血清25-羟维生素D3水平与正常人相比明显下降,和周萍等报道一致^[17]。对SLE活动组、缓解组与对照组的25-羟维生素D3水平进行统计分析,发现SLE活动组、缓解组的25-羟维生素D3不足及缺乏的比例比正常人群要高。SLE患者血清25-羟维生素D3水平与SLEDAI呈负相关,和Terrier和Ben-Zvi报道一致^[18-19],提示25-羟维生素D3水平在SLE发病中起着重要作用,与SLE发病状态相关,可作为判断SLE疾病严重程度的临床指标。

IL-10是主要由Th2细胞分泌的一种多功能性细胞因子,起免疫抑制作用,主要表现为2个方面:①抑制T细胞的增殖,抑制细胞免疫;②诱导B淋巴细胞增殖分化,介导体液免疫,是SLE的易感因子之一^[8-9]。有研究报道SLE患者外周血IL-10增高,PBMC中IL-10表达水平增高,体外培养的PBMC上清液中IL-10含量亦明显增高,认为SLE患者的自身抗体的产生与IL-10的过度表达可能有关^[20-21]。本研究发现SLE实验组血清IL-10水平与正常人相比明显升高;无论SLE活动组还是缓解组的IL-10水平明显高于对照组,与国内外报道相一致^[20]。通过SLE患者血清IL-10水平与SLEDAI相关性分析,发现SLE患者血清IL-10水平与SLEDAI呈正相关,提示IL-10水平在SLE病中可能发挥重要作用,并与疾病的活动度相关。同时对SLE患者血清25-羟维生素D3水平与IL-10水平相关性分析,发现SLE患者血清25-羟维生素D3水平与IL-10水平呈负相关。

综上所述,本研究证实SLE患者普遍存在25-羟维生素D3水平不足或缺乏的问题,血清25-羟维生素D3水平在SLE发病中起着重要作用,与SLE发病状态相关。SLE患者血清IL-10水平与正常人相比明显升高,与SLE疾病活动度相关,在SLE发病中可能发挥重要作用。25-羟维生素D3水平和IL-10水平在SLE发病中起着重要作用,与SLE发病状态相关,可作为临床指标用于SLE的诊断、疾病严重程度的判断、疗效的观察等,具有重要临床应用价值。但是SLE患者血清25-羟维生素D3水平与IL-10水平呈负相关,血清25-羟维生素D3与IL-10在SLE患者中的相互作用机制有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, et al. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus[J]. *Genes Immun*, 2009, 10:373-379.
- [2] Birmingham DJ, Hebert LA, Song H, et al. Evidence that abnormally large seasonal declines in vitamin D status may trigger SLE flare in non-African Americans [J]. *Lupus*, 2012, 21(8):855-864.
- [3] Yeap SS, Othman AZ, Zain AA, et al. Vitamin D levels: its relationship to bone mineral density response and disease activity in premenopausal Malaysian systemic lupus erythematosus patients on corticosteroids [J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(1):17-24.
- [4] Hamza RT, Awwad KS, Ali MK, et al. Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus: relation to disease activity[J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(12):CR711-718.
- [5] Monticelo OA, Brenol JC, Chies JA, et al. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2012, 21(1):43-52.
- [6] Holick MF. Vitamin D deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(3):266-281.
- [7] van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(4):617-632.
- [8] 侯俊荣, 侯振江. 白细胞介素-10及其受体在系统性红斑狼疮中的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2015, 7(13):107-110.
- [9] Chong WP, Ip WK, Wong WH, et al. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus[J]. *Genes Immun*, 2004, 5(6):484-492.
- [10] 石连杰, 李春, 朱佳鑫, 等. 系统性红斑狼疮最新分类标准诞生[J]. *中华风湿病学杂志*, 2012, 16(10):713-714.
- [11] Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(9):1569-1574.
- [12] Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice[J]. *Auto-* (下转第195页)

微量元素对标准型 α -地中海贫血孕妇妊娠结局影响的研究

刘建雷^{1*} 曾赤佳¹ 王文² 余俊健¹ 徐向娟¹

【摘要】 目的 探讨微量元素对标准型 α -地中海贫血孕妇妊娠结局的影响。方法 采用GAP-PCR法确诊本院2015年1月至2017年6月分娩的标准型 α -地中海贫血孕妇,选择同期在本院分娩的100例正常孕妇,两组研究对象采用原子吸收光谱法检测全血微量元素钙、铜、铁、锌、镁,同时收集妊娠结局资料,分析微量元素对 α -地中海贫血孕妇妊娠结局影响。结果 两组间剖宫产、早产、胎儿窘迫等不良妊娠结局发生率及孕期差异均无统计学意义($P>0.05$);标准型 α -地中海贫血组新生儿出生体重低于正常对照组($3\ 103.74\pm 364.06$ vs $3\ 230.00\pm 355.55$, $P<0.01$),胎膜早破发生率高于正常对照组(27.52% vs 16.00%, $P<0.05$);标准型 α -地中海贫血组铁元素缺乏率高于正常对照组(62.39% vs 22.00%, $P<0.01$),锌元素缺乏率低于正常对照组(5.50% vs 20.00%, $P<0.01$)。讨论 铁缺乏与标准型 α -地贫孕妇胎膜早破发生率升高、新生儿体重降低密切相关。

【关键词】 标准型 α -地中海贫血;妊娠结局;微量元素

Effect of trace elements on pregnancy outcome of pregnant women with standard alpha thalassemia

LIU Jianlei^{1*}, ZENG Chijia¹, WANG Wen², YU Junjian¹, XU Xiangjuan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Chancheng Centre Hospital, the Affiliated of Guangdong Medical University, Foshan, Guangdong, China, 528031; 2. Department of Obstetrics, Chancheng Centre Hospital, the Affiliated of Guangdong Medical University, Foshan, Guangdong, China, 528031)

【ABSTRACT】 Objective To explore the effect of trace elements on pregnancy outcome of pregnant women with α -thalassemia minor. Methods Pregnant women who delivered from January 2015 to June 2017 were diagnosed as standard α -thalassemia minor by GAP-PCR, with 100 healthy pregnant women was randomly recruited as normal control group. The study subjects examined trace elements such as calcium, copper, iron, zinc and magnesium by atomic absorption spectrometry and collected the data of pregnancy outcomes, and analyzed the effect of trace elements on the pregnancy outcome of pregnant women with α -thalassemia minor. Results There was no significant difference in the ratio of cesarean section, preterm birth, fetal distress and gestational age between the two groups ($P>0.05$). The newborn birth weight of the thalassemia group was lower than that of the control group ($3\ 103.74\pm 364.06$ vs $3\ 230.00\pm 355.55$, $P<0.01$), and the incidence of premature rupture of membranes was higher than that of the control group (27.52% vs 16.00%, $P<0.05$). The deficiency rate of iron was higher than that of control group (62.39% vs 22.00%, $P<0.01$), and the lack of zinc was lower than the control group (5.50% vs 20.00%, $P<0.01$). Conclusion

基金项目:广东省佛山市医学类科技攻关项目(20151AB001441)

作者单位:1. 广东医科大学附属佛山禅城中心医院检验科,广东,佛山 528031

2. 广东医学院附属佛山禅城中心医院产科,广东,佛山 528031

*通讯作者:刘建雷, E-mail: Ljlei1980@126.com

The iron deficiency is closely related to the increase of premature rupture of the membranes and the decrease of the weight of the newborn of pregnant women with α -thalassemia minor.

[KEY WORDS] α -thalassemia minor; Pregnancy outcome; Trace elements

α -地中海贫血(简称 α -地贫)是因 α 珠蛋白基因缺失而导致的一种遗传性溶血性疾病。 α -地贫分为静止型、标准型、中间型及重型4种临床模式,其临床表现轻重程度不同^[1]。标准型 α -地贫无明显症状,终身可仅有轻度贫血或无,不影响患者的生活质量。近年来地贫与妊娠结局的关系引起广泛关注^[2-3],标准型 α -地贫亦对妊娠结局造成不良的影响^[4],另有研究发现标准型 α -地贫孕妇微量元素含量与非地贫孕妇存在差异^[5-6],这种差异是否增加不良妊娠结局的风险尚不明确。本文通过对标准型 α 地中海贫血孕妇微量元素的研究,探讨全血微量元素对标准型 α 地中海贫血孕妇妊娠结局的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2015年1月至2017年6月佛山市禅城区中心医院产前系统检查中患有标准型 α -地贫并符合研究标准的孕妇109例,作为标准型 α -地贫组,年龄范围15~37岁,平均年龄(26.42±3.78)岁。选择同期在本院分娩的100例健康孕妇作为正常对照组,年龄范围19~34岁,平均年龄(26.47±3.19)岁。两组之间年龄差异无统计学意义。

纳入标准:单胎妊娠分娩;标准型 α -地贫在孕前或孕早期基因检测确诊。

排除标准:2组孕妇均排除妊娠高血压、妊娠糖尿病、子痫前期、妊娠期肝内胆汁淤积症、妊娠28周之前自发流产的孕妇、与妊娠结局相关的感染(如B族链球菌感染、细菌性阴道炎及乙肝病毒感染等)、遗传性疾病(怀孕期间被诊断为胎儿结构或染色体异常、G6PD缺乏症、及其他类型地中海贫血)、配偶患有地中海贫血等影响妊娠结局的因素。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理

采集EDTA-K₂抗凝静脉外周血2 mL进行地中海贫血基因检测,采集肝素抗凝(微量元素专用)静脉外周血2 mL进行全血微量元素检测。

1.2.2 基因诊断

应用中山大学达安基因股份有限公司和亚能

生物技术(深圳)有限公司的试剂盒诊断,采用柱式法DNA提取试剂盒对研究对象外周静脉血提取DNA,使用GAP-PCR技术检测缺失型 α 地中海贫血,其中--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ 为标准型 α 地中海贫血,严格按照试剂盒说明书进行操作。质控专用标准品由厂家提供。

1.2.3 微量元素检测

应用北京博辉创新光电技术股份有限公司BH5100T型全血多元素分析仪,采用原子吸收光谱法对研究对象外周静脉血进行全血钙、铜、铁、锌、镁检测,严格按照试剂盒说明书进行操作。质控专用标准品由厂家提供。

微量元素参考范围^[7]:Ca:(1.55~2.10) mmol/L; Cu:(9.4~39.3) μ mol/L; Fe:(7.52~11.82) mmol/L; Zn:(76.5~170) μ mol/L; Mg:(1.12~2.06) mmol/L。检测结果低于下限为缺乏,高于上限为升高。

1.3 妊娠结局

1.3.1 观察指标

孕妇年龄、脐带缠绕/扭转、分娩方式、孕期、新生儿出生体重、胎膜早破、胎儿窘迫、1 min Apgar评分等。

1.3.2 不良妊娠结局判断标准^[8]

低体重儿:妊娠满37周,出生体重<2 500 g;巨大儿:出生体重 \geq 4 000 g;早产:妊娠满28周至不足37周分娩;新生儿窒息:1 min Apgar评分标准<7分。

1.4 统计学处理

数据使用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。计数资料用百分率(%)表示,采用卡方检验;计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析和 t 检验; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 孕妇 α 地中海贫血基因型频率

本研究中共诊断的 α 地中海贫血523例,其中--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ 、- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$ 、- $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$ 构成比分别为66.92%、20.84%、8.80%,见表1。

2.2 妊娠结局

标准型 α -地贫组与正常对照组2组间孕妇年

表1 孕妇 α 地中海贫血基因型和构成比
Table 1 The genotype and composition ratio of α -thalassemia minor in pregnant women

α 地贫基因型	<i>n</i>	构成比(%)
-- ^{SEA} / $\alpha\alpha$	350	66.92
- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$	109	20.84
- $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$	46	8.80
-- ^{SEA} / $\alpha^{3.7}$	8	1.53
- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha^{3.7}$	4	0.77
-- ^{SEA} / $\alpha^{4.2}$	3	0.57
- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha^{4.2}$	3	0.57
合计	523	100

龄、脐带缠绕/扭转发生率、分娩孕周差异无统计学意义;两组新生儿出生体重分别为(3 103.74±

364.06)g和(3 230.00±355.55)g,差异有统计学意义($P<0.01$),见表2。

标准型 α -地贫组与正常对照组2组间剖宫产、早产、胎儿窘迫等发生率差异无统计学意义;2组间胎膜早破发生率分别为27.52%和16.00%,差异有统计学意义($P<0.05$);低体重儿、巨大儿2组间发生率接近,但病例较少无法直接进行统计学分析;2组均无新生儿窒息发生,见表2。

2.3 微量元素检测

标准型 α -地贫组和正常对照组微量元素钙、铁、铜、锌、镁均有一定的缺乏率。两组间钙、铜、镁元素缺乏率相比,差异均无统计学意义($P>0.05$);标准型 α -地贫组铁元素缺乏率高于正常对照组,锌元素缺乏率低于正常对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$),见表3。

表2 标准型 α -地贫组与正常对照组妊娠结局比较

Table 2 The comparison of pregnancy outcome between thalassemia group and normal control group

项目	标准型 α -地贫组	正常对照组	χ^2	<i>P</i>
<i>n</i>	109	100	/	/
年龄(岁)	26.42±3.78	26.47±3.19	0.103	0.459
孕期(d)	274.43±8.05	276.02±12.54	1.080	0.141
新生儿出生体重(g)	3 103.74±364.06	3 230.00±355.55	2.533	0.006
脐带缠绕/扭转	46(42.20)	47(47.00)	0.486	0.486
剖宫产	25(22.94)	23(23.00)	0.122	0.727
早产	4(3.67)	1(1.00)	0.654	0.419
胎膜早破	30(27.52)	16(16.00)	4.034	0.045
胎儿窘迫	6(5.50)	2(2.00)	0.918	0.338
低体重儿	1(0.92)	1(1.00)	/	/
巨大儿	0(0.00)	2(2.00)	/	/
新生儿窒息	0(0.00)	0(0.00)	/	/

括号外数据为人数(例),括号内数据为百分率(%)。

表3 标准型 α -地贫组与正常对照组微量元素缺乏率比较[*n*(%)]

Table 3 Comparison of the lack rate of trace elements between the thalassemia group and normal control group[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	Ca	Cu	Fe	Zn	Mg	Fe/Zn
标准型 α -地贫组	109	3(2.75)	2(1.35)	68(62.39)	6(5.50)	1(0.92)	80(64.22)
正常对照组	100	7(7.00)	2(2.00)	22(22.00)	20(20.00)	0(0.00)	33(33.00)
χ^2	/	1.240	0.175	34.692	10.060	/	34.266
<i>P</i>	/	0.266	0.676	0.000	0.002	/	0.000

括号外数据为人数(例),括号内数据为百分率(%)。

3 讨论

佛山是地中海贫血的高发地区,佛山新婚育龄人群 α -地贫基因携带率为8.85%,其中--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ 频率为5.431%,占 α 地贫发生率的61.35%^[9],本研究中孕妇--^{SEA}/ $\alpha\alpha$ 占 α 地贫发生率的66.92%,两者结论基本一致。可见本地区 α -地贫中标准型 α -地中海贫血最常见,因此对本地区标准型 α -地贫(--^{SEA}/ $\alpha\alpha$)孕妇微量元素与妊娠结局的研究非常有意义。

本研究中在病例筛选时排除了自发流产、遗传性疾病及配偶患有地中海贫血的因素的影响,因此主要不良妊娠结局为胎膜早破、早产、低体重儿、巨大儿,胎膜早破、胎儿窘迫等。本文研究结果显示,标准型 α -地贫组和正常对照组剖宫产率、孕期、早产、胎儿窘迫等不良妊娠结局的比较差异无统计学意义;而标准型 α -地贫组新生儿出生体重低于正常对照组,胎膜早破发生率高于正常对照组,差异均有统计学意义。王玉廷等^[10]对1980年1月至2014年10月发表的关于地中海贫血与孕妇妊娠结局的队列研究,经文献筛选和数据提取后采用RevMan5.2软件进行Meta分析,结论是 α -地中海贫血不是孕妇剖宫产、早产、新生儿低体重发生的危险因素,与本研究结论一致。本研究中标准型 α -地贫组新生儿出生体重低于正常对照组的结论与庞婷等^[4]报道的差异无统计学意义的结论不一致,可能本研究中排除了与新生儿出生体重降低密切相关的因素如妊娠期高血压疾病、妊娠胎数、子痫前期、早产等^[11-12]相关。本研究标准型 α -地贫组胎膜早破发生率高于正常对照组,差异有统计学意义,与张晶莹等^[13]报道的差异无统计学意义的结论不一致,可能与两者研究方向不同相关,本研究中将与胎膜早破密切相关的妊娠高血压疾病、妊娠糖尿病、阴道炎、双胎及多胎妊娠等^[14-15]作为排除因素,且研究对象为标准型 α -地贫;而张晶莹等^[10]将妊娠高血压疾病、妊娠糖尿病、双胎及多胎妊娠作为研究因素,且其研究对象包括 α -地贫和 β -地贫。

本研究中标准型 α -地贫组微量元素铁元素缺乏率高于正常对照组,锌元素缺乏率低于正常对照组,差异均有统计学意义。铁元素是在人体内含量最高的微量元素,是构成血红蛋白的主要成分,铁素缺乏可引起血红蛋白合成降低、氧气运输障碍,导致地中海基因携带者处于慢性贫血状态,而妊娠期间慢性贫血与胎膜早破^[16]、新生儿低体

重^[17-18]相关,因此本研究中胎膜早破发生率升高和新生儿出生体重降低与标准型 α -地贫组铁元素缺乏相关。锌是人体内许多酶的组成成分,促进正常免疫调节的作用,是胎儿生长发育的重要营养物质,妊娠缺锌可影响胚胎细胞繁殖周期,另缺锌影响孕妇食欲,导致其他营养摄取不足,进一步影响胎儿生长发育不良,缺锌与胎膜早破^[19-20]、宫内生长受限^[21-22]、新生儿低体重^[23]密切相关,而本研究中标准型 α -地贫组锌元素缺乏率低于正常对照组,与胎膜早破发生率升高和新生儿出生体重降低结论相矛盾。原因分析为铁、锌元素均与胎膜早破、新生儿低体重相关,本研究数据显示标准型 α -地贫组铁、锌缺乏的总发生率为64.22%,高于对照组的33.00%,差异有统计学意义,因此锌元素不足以改变标准型 α -地贫组胎膜早破发生率升高、新生儿体重降低的临床现象。

综上所述,铁元素缺乏与标准型 α -地贫孕妇胎膜早破发生率升高、新生儿体重降低密切相关。

参考文献

- [1] Roth CK, Puttbrese A, Ottley C. Thalassemia syndromes in pregnancy [J]. Nurs Womens Health, 2016, 20(4):415-420.
- [2] Lan LX, Li MQ, Xie DN, et al. Analysis on the changes of hemoglobin and ferritin levels and pregnancy outcomes of pregnant women with α -thalassemia [J]. Chin J Mater Child Health Care, 2016, 31(16):3212-3214.
- [3] Petrakos G, Andriopoulos P, Tsironi M. Pregnancy in women with thalassemia: challenges and solutions [J]. Int J Womens Health, 2016, 8:441-451.
- [4] 庞婷, 郭雪峰, 周月红, 等. 广西壮族自治区平果县孕妇妊娠合并轻型 α -地中海贫血对妊娠结局的回顾性分析[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(12):1620-1623.
- [5] 刘建雷, 曾赤佳, 赵东, 等. 标准型地中海贫血孕妇全血微量元素的影响因素[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2016, 37(3):267-271, 276.
- [6] 兰菲菲, 梁凯玲, 杜丽, 等. 广东地区地中海贫血孕妇全血微量元素含量分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(6):397-400.
- [7] 周青雪, 董世雷, 施晓春, 等. 不同年龄段不同孕期孕妇体内微量元素含量的比较与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(21):3155-3157, 3160.
- [8] 乐杰. 妇产科学[M]. 6版, 北京:人民卫生出版

- 社, 2006.
- [9] 申莞子, 李哲刚, 潘干华, 等. 广东省佛山市新婚育龄人群地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(1):31-33.
- [10] 王玉廷, 徐雨晨, 刘媛, 等. 地中海贫血对孕妇妊娠结局影响的系统评价[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(4):569-574.
- [11] 王英翔, 王松柏, 李玉萍, 等. 江门地区低出生体重儿发生影响因素的病例对照研究[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(1):66-68.
- [12] 姜蕾, 陈斌, 赵光临, 等. 深圳市低出生体重影响因素的配对病例对照研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(11):1131-1134, 1157.
- [13] 张晶莹, 张燕燕, 贾瑾, 等. 地中海贫血妇女妊娠结局分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40(1):29-31.
- [14] 陈翠红. 足月胎膜早破产妇的影响因素及其对妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(19):3949-3951.
- [15] 刘会兰. 142例胎膜早破危险因素 Logistic 回归分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9(12):18-20, 24.
- [16] Toumba M, Kanaris C, Simamonian K, et al. Outcome and management of pregnancy in women with thalassaemia in Cyprus [J]. *Eastern Mediterr Health J*, 2008, 14(3):628-635.
- [17] Bakacak M, Avci F, Ercan O, et al. The effect of maternal hemoglobin concentration on fetal birth weight according to trimesters [J]. *Journal of maternal-fetal & neonatal med*, 2014, 28(17):2106-2110.
- [18] 阮琦, 区淑珍. 钙、镁、铁、锌、铜、磷等微量元素变化与不良妊娠结局的相关研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(9):13-15.
- [19] 吕品, 蒋玉霞. 妊娠中期不良结局与微量元素含量的相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(6):667-668.
- [20] 宋美兰, 贾艳艳. 微量元素与妊娠中期不良妊娠结局的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(32):4998-5000.
- [21] Wioleta J, Omeljaniuk K, Socha H, et al. Antioxidant status in women who have had a miscarriage [J]. *Adv Med Sci*, 2015, 60(2):329-334.
- [22] Loui A, Raab A, Maier RY, et al. Trace elements and antioxidant enzymes in extremely low birth weight infants [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2010, 24(2):111-118.
- [23] Wilson RL, Grieger JA, Bianco-Miotto T, et al. Association between maternal zinc status, dietary zinc intake and pregnancy complications: a systematic Review [J]. *Nutrients*, 2016, 8(10):1-28.

(上接第162页)

- [9] Zhang Y, Liu Q, Wang D, et al. Genotyping and detection of common avian and human origin-influenza viruses using a portable chemiluminescence imaging microarray [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):1871.
- [10] Fei Y, Sun YS, Li Y, et al. Characterization of receptor binding profiles of influenza A viruses using an ellipsometry-based label-free glycan microarray assay platform [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(3):1480-1498.
- [11] Li D, Li Z, Zhou Z, et al. Direct next-generation sequencing of virus-human mixed samples without pretreatment is favorable to recover virus genome [J]. *Biol Direct*, 2016, 11(1):3.
- [12] Seong MW, Cho SI, Park H, et al. Genotyping influenza virus by next-generation deep sequencing in clinical specimens [J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36(3):255-258.
- [13] Inoue E, Wang X, Osawa Y, et al. Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(3):129-134.
- [14] Dai M, McBride R, Dortmans JC, et al. Mutation of the second sialic acid-binding site, resulting in reduced neuraminidase activity, preceded the emergence of H7N9 influenza A virus [J]. *J Virol*, 2017, 91(9):e00049-17.
- [15] Liu YF, Lai HZ, Li L, et al. Endemic variation of H9N2 avian influenza virus in China [J]. *Avian Dis*, 2016, 60(4):817-825.

· 论 著 ·

氨氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者QT离散度与冠脉病变程度的影响

姚朝阳* 金凤

[摘要] **目的** 探讨氨氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者QT离散度与冠脉病变程度的影响。**方法** 选取2015年3月至2017年3月本院收治的冠心病患者100例,依据随机数字表法分为实验组和对照组,每组50例,对照组给予氨氯地平治疗,实验组给予氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗,比较2组血压、血脂、内皮功能、QT离散度、冠脉病变程度、不良反应。**结果** 在总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)方面,实验组治疗后均较治疗前改善,实验组治疗后明显优于对照组[(5.09±0.61) mmol/L、(3.38±0.31) mmol/L、(4.22±0.43) mmol/L、(1.48±0.31) mol/L vs (5.68±0.64) mmol/L、(3.95±0.51) mmol/L、(5.69±0.59) mmol/L、(1.05±0.35) mmol/L],差异有统计学意义($P<0.05$),对照组治疗前后基本相同,差异无统计学意义($P>0.05$);在收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、内皮素(ET)、QT间期、QTc、QT离散度方面,实验组和对照组治疗后明显低于治疗前,实验组治疗后明显低于对照组[(113.49±7.02) mmHg、(68.79±4.31) mmHg、(48.72±6.02) ng/L、(346.19±40.53) ms、(321.52±35.23) ms、(24.52±2.61) ms vs (127.57±7.82) mmHg、(74.13±4.66) mmHg、(60.48±7.12) ng/L、(381.34±40.31) ms、(361.85±40.27) ms、(29.47±3.12) ms],在一氧化氮(NO)、冠状动脉心肌梗死溶栓试验(TIMI)血流分级方面,实验组和对照组治疗后明显高于治疗前,实验组治疗后明显高于对照组[(68.18±7.34) μ mol/L vs (54.19±6.39) μ mol/L],差异有统计学意义($P<0.05$);实验组和对照组不良反应发生率基本相同(14.00% vs 10.00%),差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 氨氯地平阿托伐他汀钙片可有效改善冠心病患者血脂、血压及内皮功能,有利于降低QT离散度、冠脉病变程度,且具有良好的安全性,值得临床作进一步推广。

[关键词] 氨氯地平阿托伐他汀钙片;冠心病;QT离散度;冠脉病变程度

Effect of amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets on the QT dispersion and coronary artery disease degree of patients with coronary heart disease

YAO Zhaoyang*, JIN Feng

(Internal Medicine - Cardiovascular Department, The First People's Hospital of Xiangyang, Xiangyang, Hubei, China, 441000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets on the QT dispersion and the severity of coronary artery disease in patients with coronary heart disease. **Methods** 100 patients with coronary heart disease in the First People Hospital of Xiangyan from March 2015 to March 2017 were recruited and divided into experimental group and control group, with 50 cases in each group. The control group was treated with Amlodipine. The experimental group was treated with amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets, and the blood pressure, blood lipid, endothelial

作者单位:襄阳市第一人民医院心血管内科,湖北,襄阳 441000

*通讯作者:姚朝阳, E-mail: yaochaoyangcy@126.com

function, QT dispersion, QT dispersion and the degree of coronary lesions, adverse reaction of 2 groups were compared. **Results** In the experimental group, the levels of TC [post vs before: (5.09±0.61) mmol/L vs (5.68±0.64) mmol/L], TG [(3.38±0.31) mmol/L vs (3.95±0.51) mmol/L] and LDL-C [(4.22±0.43) mmol/L vs (5.69±0.59) mmol/L] decrease after the treatment with amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets ($P < 0.05$). The level of HDL-C [(1.48±0.31) mmol/L vs (1.05±0.35) mmol/L] after the treatment increases ($P < 0.05$). There are no significant difference of the level of TC, TG, LDL-C, HDL-C between the experimental and control groups before treatment or before and after treatment with amlodipine alone in control group ($P > 0.05$). The systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), endothelin (ET), QT, QTc, QT interval dispersion decrease both in the experimental and the control groups after treatment and were much lower in the experimental group than in the control group after treatment [(113.49±7.02) mmHg, (68.79±4.31) mmHg, (48.72±6.02) ng/L, (346.19±40.53) ms, (321.52±35.23) ms, (24.52±2.61) ms vs (127.57±7.82) mmHg, (74.13±4.66) mmHg, (60.48±7.12) ng/L, (381.34±40.31) ms, (361.85±40.27) ms, (29.47±3.12) ms]. The nitric oxide (NO) and coronary artery thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) flow grade significantly increase both in the experimental and control groups after treatment. The level of NO increases much higher in the experimental group compared to that in the control group after treatment [(68.18±7.34) $\mu\text{mol/L}$ vs (54.19±6.39) $\mu\text{mol/L}$] ($P < 0.05$). **Conclusions** Amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets can effectively improve the blood lipid, blood pressure and endothelial function in patients with coronary heart disease. It is beneficial to reduce the QT dispersion, the severity of coronary artery disease, and has a good safety which is worthy for further promotion in clinical practice.

[KEY WORDS] Amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets; Coronary heart disease; QT dispersion; Coronary artery disease degree

冠心病是由于冠状动脉管腔狭窄病变引起心肌的血供减少的一种心血管疾病,血脂、血压等异常是其常见的危险因素,可导致胸痛、寒冷、心动过速等症状,严重时可发生休克、甚至死亡^[1]。目前,除了对症治疗外,常需配合其他药物治疗,其中氨氯地平是冠心病常用药物,可有效改善患者的临床症状,但常可导致心律失常、正常心电图幅度最大波群的Q波起点至T波的终点(the starting point of the Q wave to the end of the T wave, QT)间期及离散度延长等,严重者可导致猝死的发生^[2]。而氨氯地平阿托伐他汀钙片是具有降脂作用的新型降压药,在冠心病治疗中具有良好的疗效,但关于其改善冠心病患者QT离散度与冠脉病变程度的研究鲜有报道^[3]。对此,本研究通过给予冠心病患者氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗,探讨其对患者QT离散度与冠脉病变程度的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年3月至2017年3月本院收治的冠心病患者100例,纳入标准:①经临床症状、实验

室、心电图、冠脉造影等检查为冠心病(经冠状动脉造影证实有单支或多支病变且狭窄程度>50%,合并缺血性胸痛的临床病史,心肌坏死的血清心肌标记物浓度的动态改变,血清肌酸激酶同工酶峰值>正常2倍)^[4];②年龄18~80岁,无精神病史;③无其他心脏病、急慢性感染性疾病、肿瘤等疾病;④患者签署知情同意书;⑤均接受心肌微循环、各项血清指标检查。排除标准:①妊娠或哺乳期妇女;②有氨氯地平、阿托伐他汀钙片等过敏史;③有脑、肝、肾等严重性疾病;④中途退出本次研究;⑤就诊前1个月有降脂药物治疗史。依据随机数字表法分为实验组和对照组,本次研究经我院伦理委员会审批且通过,每组50例,实验组:年龄42~74岁,体质指数(body mass index, BMI) 19.76~0.88 kg/m²,病程1~9年,对照组:年龄44~76岁, BMI 19.67~31.05 kg/m²,病程1~8年,两组在性别、年龄、BMI、糖尿病、高血压、病程等比较无显著差异($P > 0.05$),具有可比性,见表1。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

2组均给予饮食指导、作息指导、利尿、血管紧张素转化酶抑制剂、抗血小板、静脉溶栓、抗凝等

表1 2组一般资料比较

Table 1 Comparison of general data in 2 groups

组别	n	性别(男/女)	高血压[n(%)]	糖尿病[n(%)]	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	病程(年)	高脂血症
对照组	50	27/23	34(68.00)	18(36.00)	58.22±10.87	25.57±4.21	4.36±0.78	34(68.00)
实验组	50	29/21	36(72.00)	20(40.00)	57.57±10.27	25.68±4.26	4.39±0.80	36(72.00)
χ^2/t 值		0.162	0.203	0.227	0.307	0.130	0.357	0.217
P 值		0.912	0.887	0.876	0.805	0.922	0.781	0.896

基础治疗,对照组给予氨氯地平片(苏州东瑞制药有限公司,国药准字H20020390,5 mg×28片)口服治疗,1次/片,1次/d,连用3个月;实验组给予氨氯地平阿托伐他汀钙片(德国Pfizer Manufacturing Deutschland GMBH公司生产,海正辉瑞制药有限公司分包装,国药准字J20160017,氨氯地平5 mg/阿托伐他汀钙10 mg×7片)口服治疗,1次/片,1次/d,连用3个月。

1.2.2 观察指标和标准

比较2组治疗前、治疗3个月后的血压、血脂、内皮功能、QT离散度、冠脉病变程度和治疗期间的不良反应。①血压,通过血压计常规测量收缩压(systolic pressure, SBP)、舒张压(diastolic pressure, DBP),测3次,取平均值;②通过血常规常规检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C);③内皮功能,抽取上臂空腹静脉血6 mL,分离血清(3 000 r/min、10 min、离心半径8.5 cm)后,通过免疫比浊法检测内皮素(endothelin, ET)、一氧化氮(nitric oxide, NO);④QT离散度^[5],通过美国Marquette MAC心电图机记录静态2导联同步心电图,各导联连测3个QT间期,取平均值,

$QTc = QT/\sqrt{R-R}$,QT离散度为不同导联中最长的QTc减去最短的QTc;⑤冠脉病变程度,采用冠状动脉心肌梗死溶栓试验(thrombolytic test of coronary artery myocardial infarction, TIMI)血流分级^[6]进行分级,即冠状动脉造影显示,冠脉无灌注为0级,部分造影剂通过闭塞远端但未充分显影为1级,造影剂使冠脉闭塞远端完全充盈但其进出速度缓慢为2级,造影剂能迅速充盈冠脉闭塞远端且进出迅速顺畅为3级;⑥不良反应,包括恶心、头痛、出汗、头晕等。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件处理数据,对计数资料比较以(%)表示采用 χ^2 检验,对计量资料比较以均数±标准差表示,采用t检验,对等级资料采用秩和Z检验,在P<0.05时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组血脂比较

在TC、TG、LDL-C、HDL-C方面,实验组和对照组治疗前基本相同,差异无统计学意义(P>0.05),实验组治疗后均较治疗前改善,实验组治疗后明显优于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),对照组治疗前后基本相同,差异无统计学意义(P>0.05),见表2。

表2 2组血脂比较(mmol/L)

Table 2 Comparison of blood lipids between the 2 groups (mmol/L)

组别	n	TC		TG		LDL-D		HDL-C	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	50	5.72±0.77	5.68±0.64	3.95±0.51	3.91±0.35	5.71±0.64	5.69±0.59	1.03±0.26	1.05±0.35
实验组	50	5.67±0.73	5.09±0.61*	3.93±0.46	3.38±0.31*	5.76±0.67	4.22±0.43*	1.01±0.25	1.48±0.31*
t 值		0.333	4.719	0.206	8.016	0.382	14.238	0.392	6.503
P 值		0.801	<0.001	0.891	<0.001	0.762	<0.001	0.758	<0.001

与同组治疗前比较,*P<0.05。

2.2 2组血压比较

在SBP、DBP方面,实验组和对照组治疗前基本相同,差异无统计学意义($P>0.05$),实验组和对照组治疗后明显低于治疗前,实验组治疗后明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.3 2组内皮功能比较

实验组和对照组治疗前ET、NO基本相同,差异无统计学意义($P>0.05$),在ET方面,实验组和对照组治疗后明显低于治疗前,实验组治

疗后明显低于对照组,在NO方面,实验组和对照组治疗后明显高于治疗前,实验组治疗后明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表4。

2.4 2组QT间期、QTc、QT离散度比较

在QT间期、QTc、QT离散度方面,实验组和对照组治疗前基本相同,差异无统计学意义($P>0.05$),实验组和对照组治疗后明显低于治疗前,实验组治疗后明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表5。

表3 2组血压比较(mmHg)

Table 3 Comparison of blood pressure between the 2 groups (mmHg)

组别	n	SBP		DBP	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	50	144.79±8.23	127.57±7.82*	87.60±5.44	74.13±4.66*
实验组	50	145.28±8.18	113.49±7.02*	87.32±5.43	68.79±4.31*
t值		0.299	9.474	0.258	5.949
P值		0.906	<0.001	0.884	<0.001

与同组治疗前比较,* $P<0.05$, 1 mmHg=133.322 4 Pa。

表4 2组内皮功能比较

Table 4 Comparison of endothelial function between the 2 groups

组别	n	ET(ng/L)		NO(μmol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	50	74.68±8.49	60.48±7.12*	45.16±5.48	54.19±6.39*
实验组	50	75.43±8.69	48.72±6.02*	45.67±5.52	68.18±7.34*
t值		0.437	8.929	0.464	10.165
χ ² 值		0.701	<0.001	0.678	<0.001

与同组治疗前比较,* $P<0.05$ 。

表5 2组QT间期、QTc、QT离散度比较(ms)

Table 5 Comparison of QT interval, QTc, QT dispersion between the 2 groups (ms)

组别	n	QT间期		QTc		QT离散度	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	50	486.83±50.91	381.34±40.31*	432.38±45.36	361.85±40.27*	38.01±4.02	29.47±3.12*
实验组	50	487.22±51.87	346.19±40.53*	433.40±45.38	321.52±35.23*	38.15±4.04	24.52±2.61*
t值		0.038	4.348	0.112	5.330	0.174	8.605
P值		0.984	<0.001	0.962	<0.001	0.910	<0.001

与同组治疗前比较,* $P<0.05$ 。

2.5 2组TIMI血流分级比较

在TIMI血流分级方面,实验组和对照组治疗前基本相同,差异无统计学意义($P>0.05$),实验组

和对照组治疗后明显高于治疗前,实验组治疗后明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表6。

表6 2组TIMI血流分级比较 [n(%)]

Table 6 Comparison of TIMI blood flow classification between the 2 groups [n(%)]

组别	n	治疗前				治疗后			
		0级	1级	2级	3级	0级	1级	2级	3级
对照组	50	39(78.00)	7(14.00)	3(6.00)	1(2.00)	12(24.00)*	15(30.00)*	15(30.00)*	8(16.00)*
实验组	50	40(80.00)	7(14.00)	2(4.00)	1(2.00)	5(10.00)*	10(20.00)*	17(34.00)*	18(36.00)*
Z值			0.203				11.278		
P值			0.892				<0.001		

与同组治疗前比较,* $P<0.05$ 。

2.6 2组不良反应比较

实验组和对照组不良反应发生率基本相同,差异无统计学意义($P>0.05$),见表7。

表7 2组不良反应比较[n(%)]

Table 7 Comparison of adverse reaction between the 2 groups [n(%)]

组别	n	恶心	头痛	出汗	头晕	发生率
对照组	50	2(4.00)	1(2.00)	1(2.00)	1(2.00)	5(10.00)
实验组	50	3(6.00)	1(2.00)	2(4.00)	1(2.00)	7(14.00)
χ^2 值						0.217
P值						0.893

3 讨论

冠心病是临床常见的心血管系统疾病,近年来,随着人们饮食习惯和生活方式的改变,其发生呈逐年增加的趋势,易导致心肌缺血、心律失常、心力衰竭等严重并发症发生,危害患者的生命安全^[7-8]。

氨氯地平是非二氢吡啶类钙拮抗剂,可选择性防止血管平滑肌钙离子渗透而改善其痉挛状态,有利于改善心血管内皮功能和促进血液流动而降低外周血管阻力、心肌负荷,从而起到治疗的作用^[9]。而有研究显示,氨氯地平阿托伐他汀钙片是氨氯地平、阿托伐他汀钙的复合药物,除具有氨氯地平的作用外,阿托伐他汀钙作为人工合成的他汀类药物,可选择性竞争羟甲基戊二酰辅酶A

还原酶而使机体内源性胆固醇合成和分泌减少,降低机体的血脂水平,并可保护和改善血管内皮功能,有利于稳定和调节血压波动^[10]。本研究结果显示,在TC、TG、LDL-C、HDL-C方面,实验组治疗后均较治疗前改善,实验组治疗后明显优于对照组,对照组治疗前后基本相同,在SBP、DBP方面,实验组和对照组治疗后明显低于治疗前,实验组治疗后明显低于对照组,此结果与李玉敏、Maugeais等^[11-12]研究基本一致,表明氨氯地平阿托伐他汀钙片有效改善了冠心病患者血脂、血压。这可能是由于在本研究的氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗中,氨氯地平能够选择性防止血管平滑肌钙离子渗透而改善其痉挛状态,同时阿托伐他汀钙能够有效调节机体血脂水平状态,从而保护和改善机体的血管内皮功能,能够更有效降低患者的血压水平,起到更为良好的降压调脂的治疗作用。

而近年来,据相关文献报道显示,冠心病患者常合并高脂血症、高血压等心血管疾病危险因素,严重加剧了心脏结构与功能的损害,尤其是血压升高所引起的心脏压力负荷增高,可使心肌细胞肥大、间质纤维化、冠状动脉微循环改变,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统和交感神经系统,从而引起QT间期及离散度延长,甚至心律失常、猝死^[13]。也有研究显示,动脉粥样硬化是心血管疾病发生的重要病理基础,多见于高脂血症患者,脂代谢紊乱会刺激和损害血管内皮功能,尤其是在冠心病患者中,可加快冠脉粥样斑块的形成而加

剧冠脉动脉管腔狭窄病变,增加心脏压力负荷而增加心律失常等并发症发生的风险^[14-15]。而QT间期代表了心室肌跨膜动作电位的时间,QT离散度则反映了心肌细胞复极化的不同步,各个心肌细胞复极恢复早晚之差是导致QT离散度的细胞电生理基础,在心肌缺血时,QT离散度较正常时明显增大^[16]。NO是机体内一种信使分子,可作用于血管平滑肌细胞,具有降低血小板活性、凝集和向血管内皮粘附的作用,ET则是一种内源性长效血管收缩调节因子,具有调节心血管功能的作用,二者水平可有效反映心血管的内皮功能^[17]。本研究结果显示,在ET、QT间期、QTc、QT离散度方面,实验组和对照组治疗后明显低于治疗前,实验组治疗后明显低于对照组,在NO、TIMI血流分级方面,实验组和对照组治疗后明显高于治疗前,实验组治疗后明显高于对照组,此结果与Wang、陈章强等^[18-19]研究基本一致,表明氨氯地平阿托伐他汀钙片能够有效改善冠心病患者内皮功能,降低了QT离散度、冠脉病变程度。这可能是由于在本研究治疗中,氨氯地平能够有效降低外周血管阻力而降低了血压水平,阿托伐他汀钙片能够有效改善冠状动脉血管的收缩状态、炎症和粘附反应,有效保护和改善了血管内皮功能及抑制和稳定了冠脉内的粥样斑块,因而能够进一步改善了冠状动脉血流和减轻了心脏压力负荷,从而降低了QT离散度。

此外,本研究中,实验组和对照组不良反应发生率分别为14.00%、10.00%,2组基本相同,此与余盛龙等^[20]研究基本一致,提示氨氯地平阿托伐他汀钙片在治疗冠心病中,具有良好的安全性。

综上所述,氨氯地平阿托伐他汀钙片有效改善了冠心病患者血脂、血压及内皮功能,有利于降低QT离散度、冠脉病变程度,且具有良好的安全性,值得临床作进一步推广。

参考文献

- [1] Bakris G, Briasoulis A, Dahlof B, et al. Comparison of benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide in high-risk patients with hypertension and coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112(2):255-259.
- [2] 陈学军. 氨氯地平联合卡托普利治疗冠心病并高血压临床研究[J]. *河北医学*, 2013, 19(10):1545-1547.
- [3] 艾建华. 氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗高血压合并冠心病的临床效果[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(36):114-116.
- [4] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组, 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会等. 中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016)[J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(5):382-400.
- [5] Jeffers BW, Bhambri R, Robbins J. Incremental blood pressure-lowering effect of titrating amlodipine for the treatment of hypertension in patients including those aged ≥ 55 years[J]. *Am J Therap*, 2015, 22(4):278.
- [6] Bakris G, Briasoulis A, Dahlof B, et al. Comparison of benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide in high-risk patients with hypertension and coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112(2):255-259.
- [7] 明凯华, 雷秀霞, 邹愉, 等. 中国广东地区汉族人群P选择素糖蛋白配体-1Met62Ile基因多态性与冠心病的相关性探讨[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(4):237-241.
- [8] Benjo AM, El-Hayek GE, Messerli F, et al. High dose statin loading prior to percutaneous coronary intervention decreases cardiovascular events: a meta analysis of randomized controlled trials[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2013, 85(1):53-60.
- [9] 黄丽, 何宗义, 李国岩. 氨氯地平、瑞舒伐他汀联合非诺贝特治疗高血压合并冠心病的临床研究[J]. *海南医学*, 2017, 28(12):1920-1922.
- [10] Koyanagi R, Hagiwara N, Yamaguchi J, et al. Efficacy of the combination of amlodipine and candesartan in hypertensive patients with coronary artery disease: A subanalysis of the HIJ-CREATE study[J]. *J Cardiol*, 2013, 62(4):217-223.
- [11] 李玉敏. 血脂康胶囊联合氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗高血压并冠心病的临床疗效及其对血脂、血管内皮功能及炎症的影响[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2016, 24(7):90-93.
- [12] Maugeais C, Tietge U J, Broedl UC, et al. Dose-dependent acceleration of high density lipoprotein catabolism by endothelial lipase[J]. *Circulation*, 2013, 108(17):2121-2126.
- [13] 刘海龙, 曹俊达, 许圆圆, 等. QT离散度与冠脉病变范围及程度的相关性研究[J]. *基层医学论坛*, 2016, 20(31):4399-4400.
- [14] 郭宗生, 王乐丰, 王红石, 等. 不同药物治疗对于冠心病患者心室重构及QT离散度的影响[J]. *中西*

- 医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(10):1190-1192.
- [15] Alexandre J, Rouet R, Puddu PE, et al. Dronedarone versus amiodarone in preventing premature ventricular contractions in an in vitro model of border zone [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(1):49-57.
- [16] Walker EA, Dager WE. Bridging with Tirofiban during oral antiplatelet interruption: a single-center case series analysis including patients on hemodialysis [J]. *Pharmacotherapy*, 2017, 37(8):888-892.
- [17] Horwich TB, Maclellan WR, Fonarow GC. Statin therapy is associated with improved survival in ischemic and non-ischemic heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 43(4):642-648.
- [18] Wang W, Mc Kinnie SM, Patel VB, et al. Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(4):1-17.
- [19] 陈章强, 洪浪, 王洪, 等. 通心络对AMI延迟介入治疗术后血小板活化因子、血管内皮功能、TIMI血流分级的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(4):415-420.
- [20] 余盛龙, 郭惠庄, 张稳柱, 等. 氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗高血压、冠心病合并颈动脉粥样硬化患者的疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(4):823-825.

(上接第183页)

- immunity, 1992, 12(2):143-148.
- [13] Jones AP, D'Vaz N, Meldrum S, et al. 25-hydroxyvitamin D3 status is associated with developing adaptive and innate immune responses in the first 6 months of life [J]. *Clin Exp Allergy*, 2015, 45(1):220-231.
- [14] 张永锋, 郑毅. 初发系统性红斑狼疮患者血清25-羟-维生素D和维生素D抗体水平变化及意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2012, 16(10):661-664.
- [15] Zhang H, Shih DQ, Zhang X. Mechanisms underlying effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on the Th17 cells [J]. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2013, 3(4):237-240.
- [16] Krieger MA, Manson JE, Costenbader KH. Does vitamin D affect risk of developing autoimmune disease?: a systematic review [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2011, 40(6):512-531.
- [17] 周萍, 夏晶, 杨玉琮. 系统性红斑狼疮患者血清25-羟维生素D₃的临床价值[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(22):3166-3167.
- [18] Terrier B, Derian N, Schoindre Y, et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(5):R221.
- [19] Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *PLoS One*, 2010, 5:e9193.
- [20] 沈茹, 李艳君, 林丽佳. 系统性红斑狼疮患儿外周血IL-6、IL-10、IL-17水平变化及其在单个核细胞中的表达研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(6):371-375.
- [21] 陈登云, 陈小婷. 系统性红斑狼疮患者外周血IL-10和TGF- β 1的表达及与抗双链DNA抗体的相关性分析[J]. *当代医学*, 2015, 21(24):22-23.

(上接第179页)

- [20] Qi J, Yang Y, Hao P, et al. Transcription factor SOX9 promotes osteosarcoma cell growth by repressing claudin-8 expression [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 241(1):55-63.
- [21] Kim SH, Park WS, Park EY, et al. The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0179610.

登革热检测技术应用及发展

蒋力云 狄彪 杨智聪*

[摘要] 登革热是由登革病毒引起的传染性疾病,长期以来在世界范围特别是热带和亚热带地区广泛流行。早期实验室诊断是登革热疫情防控的关键手段之一。随着医学发展,登革热的诊治日趋成熟,不同的诊断方法存在着不同的优点和缺点。近年来,病毒分离、免疫学检测、分子生物学诊断方面的研究取得较大进展,本文就近年登革病毒早期快速检测技术进展及不同方法选用时机作一综述,并就将来可能的重点研究方向进行展望,以期作为登革热防控和研究的实用参考。

[关键词] 登革热; 抗体检测; 抗原检测; 核酸检测; 病毒分离

Application and development of dengue fever detection

JIANG Liyun, DI biao, YANG Zhicong*

(Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, China, 510440)

[ABSTRACT] Dengue fever is an infectious disease caused by dengue virus and has long been widespread in the world, especially in tropical and subtropical regions. Early laboratory diagnosis is one of the key means to prevent and control dengue fever. With the development of medicine, the diagnosis and detection of dengue fever are improved. However, different diagnostic methods have different advantages and disadvantages. In recent years, great progress has been made in the research of virus isolation, immunological detection and molecular biology diagnosis. In this review, the rapid detection technology of dengue virus and the application of different methods for dengue fever diagnosis will be discussed, in order to serve as a practical reference for the control and research of dengue fever.

[KEY WORDS] Dengue fever; Antibody detection; Antigen detection; Nucleic acid detection; Virus isolation

登革热(dengue fever, DF)是由登革病毒(dengue virus)引起的急性传染病,广泛流行于热带和亚热带地区,临床表现以高热、头痛、肌肉关节疼痛为主,有时伴有皮疹、淋巴腺肿大和白细胞减少等症状,重症患者会出现登革出血热(dengue hemorrhagic, DHF),甚至登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)。在我国,登革热自1978年在广东佛山暴发流行以来,主要流行于广东、广西、福建、浙江及海南等省^[1-2],已经成为我国面临的严峻的公共卫生问题。由于半数以上的登革热病例无症状或者仅出现普通的发热症状^[3-4],因此

仅从临床症状上来判断登革热比较困难,实验室的辅助诊断显得尤为重要。只有尽早快速准确地诊断疾病,才能对急性期患者进行早报告、早隔离、早就地治疗,并且及时开展蚊媒的灭杀工作,才有利于登革热疫情的控制。这也促使登革热检测技术不断进步和提高,检测方法更加简便、快速、准确。近年来在免疫学检测、病原检测、病毒分离培养技术等方面取得了一定进展,为临床检测不同发病阶段的登革热提供了更多的选择和有效的检测方法,有效地提高了登革热检测的灵敏度和准确度。

基金项目:广州市医学重点学科建设项目(2017-2019-07)

作者单位:广州市疾病预防控制中心,广东,广州 510440

*通讯作者:杨智聪, E-mail:yangzc@gzcdc.org.cn

1 登革病毒检测程序新进展

登革病毒感染后,患者除了出现白细胞降低、血小板减少、血液浓缩和低蛋白血症等非特异性的血象改变外^[5],还能从相关临床标本中检测到特异性抗体、病毒抗原、病毒核酸甚至分离到病毒。登革热检测所采集的临床病例标本可以包含血液、脑脊液、脑组织和肝^[6]。因为在标本采集过程中,血液的采集和处理最方便,对患者造成的创伤和损害最小,几乎在整个感染期间血液都能用于检测,因此登革热检测中采集的病例标本普遍以血液为主。脑组织和肝主要是在尸检或动物实验时采集,通常需要在研磨破碎后用于病毒分离或

者核酸检测,或者冰冻切片后进行免疫荧光检测。在国内外一些相关研究中,也有采集唾液和尿液进行检测,但是由于受到排毒量少和排毒时间短的限制,很少在日常检测中采用^[7]。在临床检测中,采用血清检测登革病毒及抗体的步骤如图1所示。根据血清采集时对应的发病时间,选择灵敏度较高的检测方法,有利于提高登革热检测效率。如在发病早期,通常是7天内,特别是出现发热症状的5天内^[8],使用NS1检测、核酸检测或者病毒分离的方法相较于通过抗体检测的方法检测更有优势。而在发病后期,我们更倾向于通过检测血清中抗体滴度的变化,特别是IgG的4倍增高来判断登革病毒的感染。

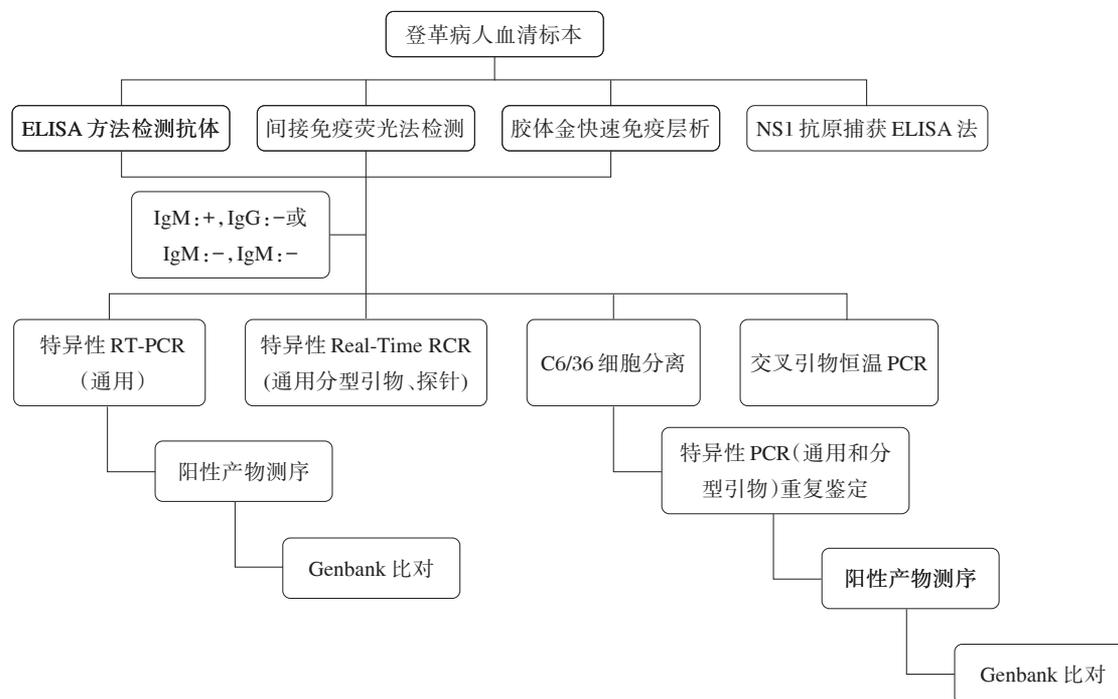


图1 血清中检测登革病毒及抗体流程图^[9]

Figure 1 Procedure of dengue virus and antibody detection in serum^[9]

2 登革病毒快速检测技术的运用

2.1 抗体检测

由于抗体检测技术操作简便,所需仪器设备简单,商品化试剂易于购买,是目前诊断登革热的重要手段。但是登革病毒抗体与其他黄病毒抗体存在交叉反应,加之我国将乙型脑炎预防接种作为计划免疫的一部分,因此在检测过程中需要注意非特异性反应,同时结合患者临床症状和流行

病学史对抗体阳性结果加以区分。

抗体检测样品以血液为主,主要是针对IgM和IgG进行检测。在首次感染时,出现发热后大概5天,IgM就能被检测到并且能在体内持续2~3个月;而IgG则出现在发热后的8~10天,并能在体内持续存在4个月。而在二次感染时,IgG在发热后快速升高,某些病例中甚至无法检出IgM,而IgG在10个月后仍然能检测到,甚至持续终身^[3, 8]。有报道通过IgM/IgG的比值来判定病例是首次感染

或是二次感染,但该比值无统一标准,并且受采样时间的影响较大,因此在判定时需谨慎,以免造成误判^[10-11]。也有文献研究通过检测血液、唾液和尿液中 IgM、IgG、IgE 和 IgA,以此来诊断登革病毒感染^[7]。但是总体来说,多数实验室仍然是以检测血清中 IgM 和 IgG 为主要方法。并且我国《登革热诊断标准》(WS216-2008)也包括以血清中特异性 IgM 或 IgG 阳性或双份血清特异性 IgG 的 4 倍增高为诊断依据。

抗体检测方法包括血凝抑制试验(hemagglutination-inhibition test, HI)、补体结合试验(complement fixation test, CFT)、中和试验(neutralization test, NT)、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金免疫层析快速试验(immunochromatographic colloidal gold test, ICT)、免疫斑点法(dot immunobinding assay, DIBA)和间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)等。

其中,HI 和 CFT 是较古老的血清学检测方法。前者是根据登革病毒能使鹅的红细胞发生凝集,但在特异性抗体存在的情况下凝集现象会被抑制的原理来检测样本中登革病毒抗体。用 HI 试验检测抗体时,登革病毒和其他黄病毒之间存在较高的交叉反应。用 CFT 检测抗体的时间,较用 HI 检测抗体的时间晚,且持续时间不长。在初次感染时,CFT 有较好的特异性,而二次感染时的特异性不好。CFT 参与反应的成分较多,影响因素比较复杂,较难操作,操作者需要经过严格培训和具备丰富的经验。因此,现在大多数实验室已经放弃将 HI 和 CFT 作为登革热的诊断试验。NT 能检测出样品中保护性抗体的水平,是抗体检测中的一种敏感方法。但是,标准病毒颗粒的完整性、宿主细胞的敏感性等各因素的变化都会影响其结果的准确性,判断实验结果所需时间也较长,故不适用于快速诊断。同时,NT 操作技术要求较高、操作繁琐、耗时长,因此多在研究性工作中使用,不适用于临床大规模检测。IFA 是先将病毒感染的细胞固定在玻片上,制备成抗原片,然后加入患者血清,再加上荧光素标记的二抗,作用一定时间在荧光显微镜下观察结果。该方法可区分感染病毒的血清型,但由于需要使用荧光显微镜,且在结果的判定上对检测人员的经验有一定依赖,因此难以在基层医疗机构建立。

ELISA、ICT 和 DIBA 是目前临床检测登革病毒抗体最常用的方法^[12],在检测过程中需要注意类风湿因子的影响和其他黄病毒的交叉反应。ICT 操作简单,人员只需简单培训即可使用,反应所需时间短,不需酶标仪等试验设备,因此特别适合现场快速检测^[13]。ICT 法检测登革病毒 IgM 抗体适合在登革热暴发流行期间用作疫区基层医疗单位的早期初筛试验。而 ICT 法检测登革病毒 IgG 抗体的灵敏度偏低,可以通过对有持续临床症状的患者再次采样来提高检出率。ELISA 由于操作简便,所需仪器设备简单,可同时检测大量标本,并且有多种品牌的商品化试剂提供,因而得到了广泛的推广和应用。ELISA 法检测登革病毒 IgM/IgG 抗体适合在普查及大批量标本检测时使用。在登革热散发期间,ELISA 法检测登革病毒抗体会与其他黄病毒抗体产生广泛的交叉反应,出现假阳性结果,需要结合临床症状或其他实验结果做出判断。DIBA 法操作费时,成本比较昂贵,检测 IgM 抗体不适宜作为初筛试验,但 DIBA 法检测 IgG 抗体敏感性和特异性好,与其他黄病毒交叉反应少,适合在登革热散发期间使用,可作为登革病毒感染的确证实验。

2.2 抗原检测

登革抗原检测方法有 HI、CFT、NT、免疫荧光(immunofluorescence, IF)、ELISA 和 ICT 等,主要是针对样品中病毒蛋白或病毒进行检测。登革病毒的基因组结构可以分为 5' 末端非编码区、结构蛋白编码区、非结构蛋白编码区和 3' 末端非编码区。

目前,对病毒蛋白的检测主要是针对非结构蛋白 NS1 检测。血清中的 NS1 在发病第一天出现,第 3 天达到峰值,4 天内的敏感性为 88%~95%,并可持续到第 9 天^[14]。NS1 产生于感染早期甚至早于 IgM 的出现,但是在抗 NS1-IgG 出现后就无法检测。因此,NS1 的检测主要是在登革病毒感染早期使用。在发病早期检测 NS1 和用 PCR 检测核酸的一致性高达 95%以上^[15-16],而 NS1 检测的成本和技术要求都低于 PCR 检测。因此,在无法开展 PCR 检测的基层单位开展 NS1 检测,有利于患者的早期发现和诊断。然而在二次感染时,由于 IgG 的存在,NS1 很快与抗体形成抗原-抗体免疫复合物,使得 NS1 难以检出。不过,通过 37℃ 孵育 1 h 的方法,使抗原-抗体复合物分离开来,可以提

高 NS1 的检出率^[17]。主要的商品化检测试剂有酶联免疫吸附试剂和胶体金快速试剂,都有较高的敏感性和特异性^[18-20]。在广州市,NS1 胶体金快速试剂已经在各大医院推广开展,针对发病早期的检测效果良好^[21]。同时我们也发现,进口试剂的准确率明显高于国产试剂^[22]。所以,在资金充足的情况下,优先推荐使用进口试剂。

FA 是目前实验室鉴定登革病毒的另一种常用方法。FA 是将待测样品与登革病毒型特异性单克隆抗体反应,随后加入荧光素标记的抗体,通过荧光显微镜观察结果。研究人员用免疫荧光检测外周血单核细胞登革抗原,发现在退热前阳性率较高^[23]。该技术最大优点为敏感性和特异性高,特别是单克隆抗体的问世大大提高了免疫荧光测定的效果,主要应用于快速诊断。

2.3 核酸检测

在登革热发病后 2~7 天时,登革病毒能在患者血液、血细胞甚至组织,特别是免疫系统组织中检测到,这个时期基本与患者的发热期相吻合。最适宜使用这段时期采集的标本进行登革病毒核酸检测、病毒分离。核酸检测主要是根据登革病毒的基因序列设计特异性引物,在适当的反应体系和条件下进行扩增,最后用仪器设备检测判断。由于不同血清型的登革病毒有不同的基因序列,因此通过核酸检测可以区分登革病毒的血清型。相较于病毒分离,核酸检测的反应时间短、特异性强、敏感性高。但是,由于对仪器设备和操作人员的要求较高,花费大,不适用于大批量的调查监测^[24]。特别是核酸检测敏感度较高,因此在操作中需要小心避免因污染造成假阳性。将实验室正确分区,注意阳性对照和阳性样品的妥善保存,以及谨慎地处理核酸扩增产物可以有效降低污染的可能性。又由于登革病毒是 RNA 病毒,需要避免实验中核酸降解造成假阴性。使用去除 RNA 降解酶和 DNA 降解酶的实验器材可以有效地避免 RNA 降解。这些要求都限制了核酸检测方法在基层工作中的开展和运用。

核酸检测常用的方法包括,核酸杂交检测(hybridization)、逆转录-聚合酶链反应检测(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应检测(real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)、基因芯片

(gene chip)和核酸等温扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)等。

核酸杂交检测的原理是双链的核酸分子在某些理化因素作用下解开,在条件恢复后又可依碱基配对规律形成双链结构。杂交通常在一支持膜上进行,因此又称为核酸印迹杂交。但由于该方法操作繁琐、费时费力,已基本不用于登革病毒的核酸检测。在目前临床检测中,最常用的是 RT-PCR 和 RT-qPCR。在 RT-PCR 检测中,通过对登革病毒不同位点设计特异性引物进行片段扩增,不仅可以检测样品中是否含有登革病毒核酸,还可以判断病毒的血清型,通过进一步的序列测定可以获得病毒的核苷酸序列,从分子生物学角度对病毒的流行和传播进行分析。而使用 RT-qPCR 检测则无法获得病毒的核苷酸序列。但是,RT-qPCR 相对 RT-PCR 可以实时地观察结果,检测时间短,有更高的灵敏度,并且可以定量测定,加之反应在一个密封的体系里进行,大大地减少了污染的可能性。因此,在对患者的急性期临床标本检测中应用更加广泛。

NASBA 是在恒温条件下对病毒核酸进行扩增,扩增产物通过电发光设备用探针杂交的方法检测出来。NASBA 可以扩增在人血中含量低至 1~10 PFU/mL 的登革病毒^[25]。相较于 RT-PCR, NASBA 在 41℃ 的恒温下进行,不需要温度循环装置;产物是单链 RNA,可以直接用于杂交检测,而且 RNA 较 DNA 容易降解,减少了阳性产物可能带来的污染问题。在 NASBA 反应体系中加入分子信标探针,可以实时观测反应结果。相较于 RT-PCR 和 RT-qPCR, NASBA 的简便和快捷更有利于在基层开展和运用。但是, NASBA 需要进一步提高其灵敏度。基因芯片的发展时间较短,但是它操作简便、成本低、体积小、高通量,具有广泛的应用前景,并有待进一步研究和推广^[26]。

在临床检测中,血清、全血或者血浆是登革病毒核酸检测的常见标本。有研究显示,组织、尿液或者唾液也可以作为临床检测标本。在发病 0~5 天时,用 RT-qPCR 检测尿液中登革病毒核酸的阳性率低于血清中的阳性率。但是,在发病 6~16 天, RT-qPCR 检测尿液中登革病毒核酸的阳性率大幅增加,并且高于血清检测的阳性率。甚至在血清中出现 IgM 和 IgG,在利用血清无法检测出病毒核

酸的情况下,尿液检测的阳性率依然保持较高水平^[27]。还有报道称,用RT-qPCR能从唾液中检测出登革病毒核酸^[28]。这些都为登革病毒核酸检测提供了更多可能的检测样本。

2.4 病毒分离

由于登革病毒分离的时间长,对样品的要求较高,加之核酸检测技术的发展,在临床检测中已经逐步被核酸检测所取代。但是,病毒分离作为判定登革病毒感染的金标准,能获得毒株进行进一步研究病毒的病原学、表型特征和抗原漂移等,仍然是登革病毒检测的一项重要技术。

登革病毒分离的方法包括乳鼠分离、蚊虫分离和细胞分离。乳鼠分离实验成本较高,对实验室设备要求也较高,并且敏感性不高,因此大多实验室不采用。可以用于蚊虫分离的蚊媒种类有:埃及伊蚊、白纹伊蚊、汉安巨蚊和华丽伊蚊等。登革病毒能在4~5天内,在蚊体内复制达到高滴度水平。虽然蚊虫分离是分离登革病毒最敏感的方法,但需要昆虫实验室培育大量的蚊虫用以分离,并且要注意防止感染蚊虫逃逸,因此也是最少使用的方法^[29]。

目前最常用的登革病毒分离的方法是细胞分离,常用细胞有:恒河猴肾细胞(Ganges River monkey kidney cells, LLC-MK2)、非洲绿猴肾细胞(African green kidney cells, Vero cells)、金黄地鼠肾细胞(Baby Hamster Syrian kidney cells, BHK21)、白纹伊蚊细胞(Aedes albopictus cells, C6/36)和伪盾伊蚊细胞(Aedes pseudoscutellaris cells, AP61)等。样品中的病毒载量是影响登革病毒分离率的关键因素;样品中抗体滴度越低,分离率越高;DHF患者样本比DF患者样本的病毒分离率更低;在发热期间采集样本分离病毒能获得更高的分离率;发病天数与病毒分离率也密切相关,采取发病5天前的样本能提高病毒分离率^[30]。因此,尽量采集发病早期的标本进行病毒分离,可以有效提高病毒分离率。由于某些毒株不能引起明显的细胞病变,因此可以结合IFA、RT-PCR等方法来鉴定病毒分离结果。随着细胞培养和病毒分离技术的发展,有研究通过在同一细胞瓶中培养不同细胞,可以同时分离鉴定不同病毒,或者使用基因改造的细胞来分离病毒^[31]。虽然这些方法尚未在病毒分离中推广运用,但为登革病毒分离提供了借鉴。

3 结语

登革热检测方法多种多样,商品化的检测试剂也琳琅满目。近年来,使用胶体金免疫层析快速试验检测登革病毒抗原和抗体,由于其具有操作简便、价格相对低廉、无需专用仪器、无需特殊培训、检测结果直观和现场使用方便等优点,在基层单位得到了广泛的应用和推广。同时,随着对病毒的研究更加深入和细致,检测方法和技术不断更新,检测样品更加多样化。在患者的不同时期,采用不同的检测方法,甚至是联合使用多种检测方法,既有助于排除假阳性的检测结果,避免交叉反应结果,又有利于提高检测结果的灵敏度。同时,从检测结果的灵敏度和特异性上对我国市场上存在的登革热检测商品化试剂进行比较,不同品牌的试剂存在差异。比如,在实际工作中发现,进口NS1检测试剂的特异性高于国产NS1检测试剂,但是国产试剂的灵敏度高于进口试剂^[32-33]。然而,国家缺乏相关的规范标准对试剂的选择进行指导,这就可能造成采用相同检测方法却使用不同试剂的医院对临床标本做出不同的判断。因此,希望国家能制定相关的工作标准,对检测工作中试剂的选用进行指导,用以规范检测诊断。

通过对各种方法进行比较,笔者认为根据不同时期和实验目的选择不同的实验方法,才能有效地检测和发现登革热。NS1检测、核酸检测和病毒分离在发病早期的敏感度较高,而在血液中抗体存在的时间较长,有利于进行大规模的流行病学调查。在患者的早期检测中,我们倾向于选用敏感性高、快速、简便、价廉以及能将登革热与其他具有相似临床症状的疾病区分开来的实验方法,如NS1和核酸检测。而在疫情暴发和流行中的监测,我们则倾向于选择特异性高、高通量,能在疫情的早期发现患者以及确定流行毒株血清型的方法。在2014年登革热流行中,广州市在基层医院使用胶体金快速试剂筛查登革病毒NS1和IgM/IgG,广州市疾病预防控制中心进一步对阳性标本进行酶联免疫吸附法检测、核酸检测和病毒分离,都取得较好结果,有力地支持了全市的疫情防控工作。相信随着科技的发展和研究的深入,复合运用多重手段,准确、快速地检测登革病毒,及早发现登革热患者,将会极大地提升登革热防

控的成效。

参考文献

- [1] 刘远, 蒋力云, 罗雷, 等. 广州市2001-2015年登革病毒2型E基因进化分析[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(1):90-95.
- [2] 牟笛, 何洪霓, 陈秋兰, 等. 我国2016年登革热输入和本地病例流行病学特征比较[J]. 疾病监测, 2017, 32(3): 184-189.
- [3] Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11 (4) : 642-650.
- [4] Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand [J]. Am J Epidemiol, 2002, 156(1):40-51.
- [5] 肖倩, 邱峰, 曾建明, 等. 登革热实验室检测的结果分析[J]. 热带医学杂志, 2016, 17(1):42-44.
- [6] 中华人民共和国卫生部. WS216-2008, 登革热诊断标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [7] Vazquez S, Cabezas S, Perez AB, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections [J]. Int J Infect Dis, 2007, 11(3):256-262.
- [8] Guzman MG, Harris E. Dengue [J]. Lancet, 2015, 385(9966):453-465.
- [9] 杨智聪, 吴新伟. 常见病原体快速检测技术与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016:82.
- [10] 王茜茜, 雷杨, 赵令斋, 等. 登革热血清抗体反应的动态变化特征及在初次/二次感染判定中的意义 [J]. 热带医学杂志. 2016, 17(5):576-578.
- [11] Tang Y, Kou Z, Zhang F, et al. Both viremia and cytokine levels associate with the lack of severe disease in secondary dengue 1 infection among adult Chinese patients [J]. Plos One, 2010, 5(12):e15631.
- [12] 文艳琼, 朱柏珍, 黄爱群, 等. 登革热疾病的流行特征及病毒检测 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13 (11):1459-1461.
- [13] 卢业成, 陈万山, 张复春, 等. 三种登革热抗体检测方法的临床对比研究 [J]. 热带医学杂志, 2005, 5(5):586-588.
- [14] 邱爽. 登革热患者尿液中病毒核酸检测及其临床意义 [D]. 广州: 广州医科大学, 2014.
- [15] 罗招凡, 张凤宜, 潘昆贻, 等. 2014年广州地区登革热患者病原学监测结果分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(20):4660-4663.
- [16] 钟志成, 马丹娟, 汪安石, 等. 455例季节性发热病人登革病毒感染情况分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(1): 14-17.
- [17] Koraka P, Burghoorn -Maas CP, Falconar A, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural -1 antigen in patients with acute dengue virus infections [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9):4154-4159.
- [18] Shan X, Wang X, Yuan Q, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of nonstructural protein 1 Ag-based tests for dengue virus in Asian population: a meta-analysis [J]. BMC infectious diseases, 2015, 15(1):360.
- [19] Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody [J]. Plos Negl Trop Dis, 2014, 8 (10):e3171.
- [20] 李玉枝, 平岷, 赵令斋, 等. 登革热的实验室早期诊断 [J]. 热带医学杂志, 2016, 16(1):10-13.
- [21] Luo L, Jiang L, Xiao X, et al. The dengue preface to endemic in mainland China: the historical largest outbreak by Aedes albopictus in Guangzhou, 2014 [J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1):148.
- [22] 石亚玲, 赵蓉, 黄颖怡. 登革热病毒快速检测 NS1 抗原和 IgG/IgM 抗体的临床应用评价 [J]. 检验医学, 2015, 30(4):363-366.
- [23] Chunhakan S, Butthep P, Yoksan S, et al. Early diagnosis of dengue virus infection by detection of dengue viral antigen in peripheral blood mononuclear cell [J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(12):1085-1088.
- [24] Hunsperger EA, Duarte Dos Santos CN, Vu HTQ, et al. Rapid and accurate interpretation of dengue diagnostics in the context of dengue vaccination implementation: Viewpoints and guidelines issued from an experts group consultation [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11 (9):e5719.
- [25] Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, et al. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8): 2794-2798.
- [26] 徐胜平, 刘琪琦, 张严峻, 等. 9种发热伴出疹病原体基因芯片检测方法的建立 [J]. 军事医学, 2017, 41(2):135-140.
- [27] Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method use-

(下转第211页)

地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展

李继慧* 覃运荣 梁毅

[摘要] 地中海贫血是最常见的血红蛋白病之一,具有遗传性,其主要类型为 α -及 β -型。目前实验室针对 α -、 β -型地中海贫血的分子学诊断方法主要是基于PCR法的多种检测技术,此外还有多重连接探针扩增技术、基因芯片技术、高通量测序技术等,各种技术均有其优缺点,合理选择检测方法有助于提高地贫的检出率,还能够引导患者及时进行产前诊断,为降低人口出生缺陷和提高人口素质提供有效的临床依据。本文就目前应用于地中海贫血的多种实验室分子诊断技术作一综述。

[关键词] 地中海贫血;分子诊断技术; α -地中海贫血; β -地中海贫血

Advances of laboratory molecular diagnostic techniques for thalassemia

LI Jihui*, QIN Yunrong, LIANG Yi

(Department of Clinical Laboratory, Guangxi Yulin Maternal and Child Health Hospital, Yulin, Guangxi, China, 537000)

[ABSTRACT] Thalassemia is one of the most common hemoglobinopathies, which is inherited. The main types of thalassemia are α -thalassemia and β -thalassemia. The laboratory molecular diagnosis methods for α - , β -thalassemia are mainly based on the PCR method. In addition, multiplex ligation dependent probe amplification, gene chip technology and high-throughput sequencing technology are also used to detect the thalassemia, which all have their own advantages and disadvantages. The rational selection of detection methods can help to improve the detection rate of thalassemia, and guide the patients for prenatal diagnosis in a timely manner, which would provide effective clinical basis for reducing birth defects and improving the quality of the population. In this review, a variety of laboratory molecular diagnostic techniques applied to thalassemia will be summarized and discussed.

[KEY WORDS] Thalassemia; Molecular diagnostic techniques; α -thalassemia; β -thalassemia

地中海贫血(简称地贫)是世界上最常见的血红蛋白病之一,主要是由于遗传性珠蛋白基因缺失或点突变导致血红蛋白中一种或一种以上珠蛋白链合成缺失和/或不足而引起的贫血,也称为珠蛋白生成障碍性贫血^[1]。按照存在缺陷的珠蛋白基因的种类,地中海贫血一般可以分为 α -、 β -、 $\delta\beta$ -和 $\epsilon\gamma\delta\beta$ -等类型,其中 α -和 β -地贫是最为常见的2种地贫类型^[1]。地中海贫血好发于地中海、中东、南亚次大陆和东南亚等地区,在我国四川、云南、广西、贵州、广东等南部地区也较为常见^[2]。地贫患者具有广泛的临床表现,可从几乎无症状到需

要终身输血并伴随多器官系统并发症的重度贫血,并会遗传给下一代,给家庭和社会带来沉重的负担^[3]。目前对于地贫的治疗一般是根据其类型采用相应的治疗方案,而 α -重型地贫(通常是指Hb-Bart's胎儿水肿综合征)及 β -重型地贫尚无有效、经济的治疗方法^[4-5]。因此使用经济、高效、准确的诊断及尽早对地贫进行筛查和判断其类型,不仅有利于临床对该病的治疗,还能够引导患者及时进行产前诊断,以避免重型地贫患儿的出生,对减缓家庭和社会压力以及实现优生优育具有重要的意义。本文将就目前地贫的实验室分子

作者单位:广西玉林市妇幼保健院检验科,广西,玉林 537000

*通讯作者:李继慧, E-mail:ljhhlc@126.com

诊断技术的研究进展进行综述。

1 地中海贫血的分子诊断技术

根据地中海贫血的分子学机制,越来越多的分子诊断技术相继被应用于临床。据报道,多数 α -地贫(约95%)及部分 β 地贫(约5%)是由于基因缺失引起的,这些缺失的传统检测方法是印记杂交技术(Southern blot),然而该技术操作繁琐,费时费力,已被基于基因扩增的方法所代替^[6]。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是检测缺失型地贫最常用的方法^[7]。此外,多种以PCR为基础的分子检测技术可用于已知珠蛋白基因突变的地中海贫血的基因诊断,以及多种其他方法可用于未知突变的地中海贫血基因诊断^[8]。

1.1 以PCR为基础的分子诊断技术

1.1.1 裂隙聚合酶链反应

近年来,裂隙聚合酶链反应(gap polymerase chain reaction, Gap-PCR)技术已成为普遍应用于已知的、常见的缺失型 α -地贫的检测手段^[9]。其原理是于缺失序列的两端设计一对引物,在正常序列中这对上下游引物间距过远,以至超出有效扩增范围而不能生成扩增产物。大片段缺失的存在会使断端连接,上下游引物靠近,可以生成特定长度的扩增产物^[10]。 α -地贫主要是由于不同长度的基因缺失导致的,可以优先选择Gap-PCR进行检测^[8]。唐笑等人^[11]采用Gap-PCR法对湖南地区的7 914例外周静脉血标本进行 α -地贫基因缺失检测,检出 α 地贫1 380例,检出率为17.44%。戴庆福等人^[12]对823例血常规指标异常的病人进行地贫基因检测7,采用Gap-PCR检测3种(--^{SEA}、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$)缺失型 α -地中海贫血,结果1 225例为缺失型 α -地中海贫血。Gilad等^[9]也选择Gap-PCR法检测常见的缺失型 α -地贫,并获得较高的检出率。上述研究团队的结果都显示了Gap-PCR法对于常见的缺失型 α -地贫的检测具有较高的临床应用价值,是实验室检测常见的缺失型 α -地贫的常用方法。

除了应用于缺失型 α -地中海贫血基因检测外,Gap-PCR法还能诊断一些大片段的 β -地贫基因缺失^[13]。然而,Gap-PCR的结果判读需进行琼脂糖电泳,不但会造成实验室核酸染料污染,而且电泳检测通量非常低并难以自动化,难以应用于大样本量检测^[14]。

1.1.2 反向斑点杂交技术

目前,已知的 β -地中海贫血突变有200种以上,其中以单碱基替换、插入或缺失为主。一些大片段的 β -基因缺失已经被人们发现,这些大片段的缺失多数可用Gap-PCR法进行诊断^[13]。而反向斑点杂交技术(reverse-dot-blotting, RBD),被广泛应用于突变型 β -地中海贫血的检测,其原理是将扩增的DNA与固定在尼龙扎带上的突变特异性探针杂交^[8]。PCR扩增产物和探针通过分子杂交反应及显色反应,观察检测膜条上各位点信号的有无,判断该探针是否与PCR产物杂交,从而确定待检样品的基因型^[12]。

1.1.3 其他PCR方法

除了Gap-PCR、反向斑点杂交技术外,多种以PCR技术为基础的方法也得到了临床应用。其中,高分辨溶解曲线分析系统是一种高通量的突变筛选方法,是一种全新 β -地中海贫血突变扫描和基因分析的遗传分析方法,其特点是高特异性和高灵敏度,在大样本、多突变位点筛查上比传统非均一性方法更方便、性价比更高,相比定量探针法突变分析和其他类型快速突变分析法,应用面更广,成本更低^[15]。扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)在一些实验室中也得到应用,它快速、经济、方便地同时检测多个突变^[8]。

目前,基于PCR法的Gap-PCR和反向斑点杂交技术在临床实验室应用成熟,准确度高,且检测成本相对较低,故已作为主流技术得到普及。但其也存在一些缺点,例如实验过程产生污染,操作繁琐,自动化程度低等,尤其是Gap-PCR和反向斑点杂交技术目前主要是针对已知的常见地贫类型的检测,对于罕见型地贫等地贫类型检出率低,对于未知类型地贫容易导致漏检。

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

MLPA是一种探针依赖扩增技术,仅需20~200 ng的DNA量,单管即可检测多达50个位点的拷贝数变异^[16]。基本原理是把目的基因复制到依赖探针上,再用一对通用引物扩增捕获到的目的片段,通过对扩增产物进行毛细管电泳分析得出目的片段异常的结果。MLPA可快速的定量分析所检测范围内的缺失或重复,且已被证明可以找到经标准诊断仪器检测尚不能找到的已知或者未知的缺失^[17]。

对于未知突变的 α -地贫,仍有部分实验室在使用印记杂交技术;然而MLPA逐渐取代了Southern印记杂交技术,原因是其高灵敏度、高可靠性,且无需使用放射性方法等优点^[18]。Yuregir等人^[19]对30名血液学参数提示为 α -地贫而传统的反向斑点杂交技术(RDB)检测结果为阴性的病人使用MLPA技术检测,结果发现,30名病人中有3人(10%)存在 α -珠蛋白基因缺失。Gilad等^[9]的研究也发现采用Gap-PCR法检测常见缺失型 α -地贫,联合使用MLPA技术检测罕见地贫可提高地贫检出率。由此可见,与常规的基于PCR的技术相比,MLPA对于罕见或未知类型的缺失型 α -地贫有着更高的检出率。虽然MLPA技术对于突变型地贫的应用有较大的局限性,但如果将常规检测方法与MLPA技术联合使用,就能在一定程度上弥补常规检测方法在罕见或未知缺失型 α -地贫类型上的空缺,提高检测的准确率,减少漏检的可能。

1.3 基因芯片技术

基因芯片技术的原理是将大量的寡核苷酸片段或DNA片段有序排列在固相载体上,称之为基因芯片或DNA阵列,同时提取待测样品DNA,与芯片杂交,然后扫描芯片的荧光强度,应用生物信息学分析结果,最后得到样品中基因序列和表达水平的相关信息。王沙燕等^[20]采用基因芯片技术对40例标本进行 β -地贫基因检测,结果29例检测出为 β -地贫的患者,7例为双重杂合子或纯合子。陈林兴等^[21]对经初筛为 β -地贫的32例患者进行基因芯片检测,并与斑点杂交法进行比较分析,结果基因芯片检出32例 β -地贫,斑点杂交法检出30例,他们认为基因芯片法具有快速、高效、自动化程度高且简便等优点,提倡推广应用。区小冰等^[22]应用基因芯片技术对62例初筛诊断为 α -地贫,93例初筛诊断为 β -地贫(轻型60例,重型33例)的患儿血样标本进行 α 及 β 珠蛋白的基因分析,结果成功检测出中国人中常见的3种缺失型 α -地贫,2种非缺失型 α -地贫(HbCS, HbQS)的杂合子、纯合子及双重杂合子。在60例轻型 β -地贫,33例重型 β 地贫的126条染色体中共检测到8种突变类型;在60例 β -地贫杂合子中检测到8例(13.3%)及33例重型 β -地贫中检测到2例(6%)同时复合有 α -地贫基因,可见,相对于常规的基于PCR的技术来说,基因芯片技术不仅可以同时检测 α -与 β -地贫,具有更高的效率,且自动化程度

高。然而,基因芯片技术虽然具有较大的优势,但其作为一种新兴技术应用在地中海贫血检测方面尚不够成熟,较高的检测成本目前也限制其在临床上的大规模推广应用。

1.4 高通量测序

继Sanger测序之后,二代测序(next-generation sequencing, NGS)将测序能力从几百个碱基对增加到数千个。NGS基于对克隆扩增的DNA分子大规模并行测序,再加上足够的计算能力和相应的软件进行有效的数据分析,将基因诊断以可承受的价格引入临床实践^[23]。它可以应用于整个基因组、全外显子组,以及全基因组的特殊目的范围^[23]。

宋春林等^[24]以1368例疑似地中海贫血患者为研究对象,采用二代高通量测序仪进行地中海贫血基因检测,同时以Gap-PCR和RDB-PCR方法检测常见地贫突变,以Sanger测序验证,结果共检出523例(38.2%)共25种地贫基因突变,使用常规基因检测方法阴性而NGS测序阳性的标本,经Sanger测序验证与NGS结果一致,他们认为高通量测序在地贫检测上值得推广。

然而也有报道称目前文献中未发现NGS技术有可用的珠蛋白基因测序数据^[8]。可见NGS技术用于地中海贫血的基因诊断还缺少大量的研究验证。

2 小结

地中海贫血是最常见的具有遗传性的血红蛋白病之一,危害着人类健康,也影响了新生人口的素质。随着医疗水平的不断提高,地中海贫血的检测技术在不断的提升。实验室对于常见的 α -地贫及 β -地贫基因检测技术主要是基于PCR法的Gap-PCR和反向斑点杂交技术,但这些常规技术也存在一定的局限性,影响着地贫的检出率。随着科技的发展,地中海贫血的致病分子机制不断被发现,各种新技术也随之发展起来,以提高地贫的检出率,如多重连接探针扩增技术、基因芯片技术、高通量测序等技术。而每种技术都有各自的优缺点,如MLPA主要是用来检测缺失型的地贫类型,检测效率较快,成本相对较低,但对于突变型地贫的应用则有较大的局限性;基因芯片及高通量测序的检测深度较高,但同时成本也较高,不适用于大规模的临床推广使用,且基因芯片及高通量测序技术在地贫基因检测上的应用尚不够成熟,在该方面的应用价值还有待更多考究。目前

国内多个地中海贫血高发地区享有政府的地贫基因检测补助,尤其是产前诊断,当使用常规的基于PCR法技术来检测时,病人自费比例可以降到很低,甚至免费;而若采用其他方法,特别是基因芯片或高通量测序技术,则产生费用过高而增加病人的负担,病人的依从性可能降低,从而降低了病人的检测积极性,不利于引导地贫患者的产前诊断遗传咨询。此外,是否有必要对病人进行常见的 α -地贫及 β -地贫基因以外的地贫基因检测也仍有待探讨。新兴的技术目前或许还不能取代常规的基于PCR法的检测技术,但可以作为常规技术的一种补充,弥补常规技术的不足。因此,充分了解每种技术的应用范围及局限性,结合各自实验室的具体情况,寻找到准确、高效、经济的诊断方案,对于各高发地区预防中重型地中海贫血患儿的出生及提高新生儿人口素质具有积极且深远的意义。

参考文献

- [1] Martin A, Thompson A A. Thalassemias [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2013, 60(6):1383-1391.
- [2] 杜萌,朱宝生,吕涛.地中海贫血致病机制及基因治疗进展[J]. *医学动物防制*, 2017, 33(1):58-61.
- [3] Weatherall DJ. Thalassemias [J]. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2013, 7(2):60-62.
- [4] Piel FB, Weatherall DJ. The alpha-thalassemias [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(20):1908-1916.
- [5] Joly P, Pondarre C, Badens C. Beta-thalassemias: molecular, epidemiological, diagnostic and clinical aspects [J]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2014, 72(6):639-668.
- [6] Greene DN, Vaughn CP, Crews BO, et al. Advances in detection of hemoglobinopathies [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 439(2015):50-57.
- [7] Kho SL, Chua KH, George E, et al. A novel gap-PCR with high resolution melting analysis for the detection of α -thalassaemia Southeast Asian and Filipino β^0 -thalassaemia deletion [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:13937.
- [8] Brancaleoni V, di Pierro E, Motta I, et al. Laboratory diagnosis of thalassemia [J]. *IntJnlLabHem*, 2016, 38(S1):32-40.
- [9] Gilad O, Shemer OS, Dgany O, et al. Molecular diagnosis of α -thalassemia in a multiethnic population [J]. *Eur J Haematol*, 2017, 98(6):553-562.
- [10] 秦丹卿,何天文,尹爱华.地中海贫血产前基因诊断技术的临床应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(4):223-227.
- [11] 唐笑,刘岱璿,周梅华.湖南地区地中海贫血基因检测结果及突变类型分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(4):32-33.
- [12] 戴庆福,李晓璐,王玉霞,等.中国福建省龙岩地区地中海贫血基因突变类型的分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(2):498-502.
- [13] Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassemia [J]. *Lancet*, 2012, 379(9813):373-383.
- [14] 骆明勇,胡听听,王继成,等.PCR-RDB的地中海贫血基因复合型检测方法的临床应用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(4):22-24.
- [15] 唐娟,张崇林,蒋群芳,等.地中海贫血基因诊断技术进展及无创产前诊断的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2015, 23(12):5-6.
- [16] Lescoat D, Jouan H, Loeuillet-Olivio L, et al. Fluorescent in situ hybridization (FISH) on paraffin-embedded placental tissues as an adjunct for understanding the etiology of early spontaneous abortion [J]. *Prenat. Diagn*, 2005, 25(4):314-317.
- [17] Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, et al. Nine unknown rearrangements in 16p 13.3 and 11p 15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation dependent probe amplification [J]. *J Med Genet*, 2006, 42(12):922-931.
- [18] Hartevelde CL. State of the art and new developments in molecular diagnostics for haemoglobinopathies in multiethnic societies [J]. *Int J Lab Hematol*, 2014, 36(1):1-12.
- [19] Yuregir OO, Ayaz A, Yalcintepe S, et al. Detection of α -thalassemia by using multiplex ligation dependent probe amplification as an additional method for rare mutations in Southern Turkey [J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2016, 32(4):454-459.
- [20] 王沙燕,蔡佩欣,张阮章,等.基因芯片用于检测 β 地中海贫血[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2015, 23(12):5-6.
- [21] 陈林兴,郑庆棠,陈泽钦. β 地中海贫血的基因芯片检测[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(7):409-410.
- [22] 区小冰,张力,余一平,等.基因芯片诊断地中海贫血的研究[J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43(1):33-34.
- [23] Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis [J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(4):699-707.
- [24] 宋春林,刘正平,陈淑芬,等.二代高通量测序仪在大规模地中海贫血基因检测的应用价值[J]. *中国医疗设备*, 2016, 31(S1):15.

CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展

张庆颜¹ 董小玉¹ 臧乃亮¹ 徐伟文^{2*}

[摘要] 规律成簇的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/(CRISPR associated 9, Cas9)基因编辑技术是由细菌中的获得性免疫系统发展而来的,作为目前最有效最受欢迎的基因编辑工具,Cas9蛋白可在向导RNA的引导下对DNA进行定点切割,与转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)和锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)相比效率更高且成本更低。CRISPR/Cas9编辑系统应用于人类疾病研究,有望解决生命科学领域多种复杂的分子生物学难题,例如癌症。本文主要从人类疾病的基因治疗出发,重点介绍了该技术在各系统中疾病模型的建立以及在遗传疾病的治疗、病毒感染性疾病治疗、癌症研究等方面的应用,并讨论了这种先进分子技术的未来前景和尚存在的不足。

[关键词] CRISPR/Cas9系统;基因编辑;人类疾病

Advances in research and application of CRISPR/Cas9 system in human diseases

ZHANG Qingyan¹, DONG Xiaoyu¹, ZANG Nailiang¹, XU Weiwen^{2*}

(1.The First Clinical Medical College, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated 9 (CRISPR/Cas9) is developed as an adaptive immunity mechanism in prokaryotes. As the most effective and popular gene-editing tool, Cas9 protein splice specific DNA sites by binding with short guide RNA molecules, which is better than transcription activator-like effect or nucleases (TALEN) and Zinc finger nuclease (ZFN). CRISPR/Cas9 system applies for human disease researches and to solve several complex molecular biology problems faced in the life science researches such as cancer. In this review, the recent advancements of CRISPR/Cas9 in the application of disease model establishment will be reviewed, as well as in the protection for hereditary disease, infectious disease, cancer. The future prospect of this advanced molecular technology and the shortcomings have also been discussed.

[KEY WORDS] CRISPR/Cas9 system; Genome editing; Human diseases

规律成簇的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/(CRISPR associated 9, Cas9)系统是在原核生物中发现的一种适应性免疫机制,现已广泛应用于分子生物学的相关领域,成为继锌指核酸酶(Zinc

finger nuclease, ZFN)和转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术后的第三代基因编辑工具。该系统靶向精确、价格低廉、构建简单并可同时操作多个基因,自2013年首次应用以来^[1],迅速发展并被广

基金项目:南方医科大学2015年校级大学生创新训练计划项目资助(201512121263)

作者单位:1.南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

2.南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:徐伟文, E-mail: Xu_sandy2006@126.com

泛应用于微生物研究、植物科学研究、动物科学研究和人类疾病治疗中,一跃成为当今生物科学领域最具影响力的生物技术之一。本文主要介绍了CRISPR/Cas9系统在疾病模型的建立及在遗传疾病治疗、病毒感染性疾病治疗、癌症研究等方面的进展。

1 CRISPR/Cas9基因编辑技术的原理

CRISPR由一段高度保守的正向重复序列和长度相似的间隔序列交替排列组成。Cas基因编码的Cas蛋白能与核酶、核酸酶、聚合酶、解旋酶等结合。CRISPR/Cas9系统根据Cas基因的不同分为I~III 3种类型,其中被广泛应用的是II型。II型CRISPR/Cas9在gRNA(guide RNA)的引导下实现对DNA的定点切割。其中Cas9功能的实现需要CRISPR转录而来的crRNA与CRISPR重复区互补的tracrRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)形成的复合物参与^[2]。crRNA和tracrRNA融合进一条单链引导RNA(single guide RNA, sgRNA)的设计发明简化了Cas9蛋白对特定DNA的体外定点切割,并将CRISPR/Cas9技术应用于编码细胞系和模式生物中。

由CRISPR/Cas9介导的基因编辑中,sgRNA通过互补配对识别基因组中的靶向序列(proto-spacer),Cas9酶在剪切基因组时于3'端的PAM(proto-spacer-adjacent motif)序列前产生一个双链的切口(图1)。由于细胞内存在非同源末端连接和同源重组2种修复方式,从而实现目标生物基因

组任意位点的序列编辑。

2 CRISPR/Cas9在人类疾病研究中的应用

CRISPR/Cas9最引人注目的应用是用于对人类疾病的基因治疗。其中利用CRISPR/Cas9系统对遗传性疾病^[3]、病毒感染性疾病^[4]及癌症^[5]等疾病的基因治疗已有报道。

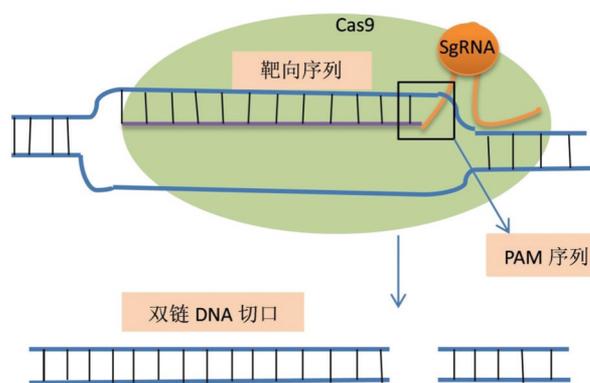


图1 CRISPR/Cas9的工作原理

Figure 1 Mechanism of the CRISPR/Cas9 system

2.1 在疾病模型中的应用

CRISPR/Cas9技术与干细胞结合可快速建立对目标基因修饰的各种生物模型^[6]。目前,CRISPR/Cas9技术已经广泛应用于细菌^[7]、细胞系^[8]、斑马鱼^[9]、小鼠^[10]和猪^[11]等模型的建立,成为研究基因功能和人类疾病的重要工具(表1)。

表1 CRISPR/Cas9在疾病模型中的应用

Table 1 The applications of the CRISPR/Cas9 in disease models

模式生物	靶基因	参考文献
细菌	结核杆菌 <i>YidC</i> 等	Choudhary E et al., 2015 ^[12]
细胞	<i>Rev-erbbeta</i> 敲除 HEK293	Chen et al., 2016 ^[13]
斑马鱼	多基因打靶	Varshney et al., 2015 ^[14]
蚊	抗疟原虫 <i>DsRed</i> , <i>kh2</i>	Gantz et al., 2015 ^[15]
小鼠	肿瘤 <i>KRAS</i> , <i>p53</i> , <i>LKB1</i>	Platt et al., 2014 ^[16]
猪	帕金森 <i>PARK2</i> , <i>PINK</i>	Zhou et al., 2015 ^[17]

斑马鱼和小鼠是生命科学研究中重要的模式生物。小鼠模型是研究遗传病血友病乙的重要工具,传统血友病乙小鼠模型构建的方法是用显微注射的方法将凝血因子IX(factor IX, FIX)大片段敲除的质粒注入小鼠的受精卵中,经过同源重组后筛选基因敲除小鼠,该方法存在过程繁琐、效率

低下和用时较长的弊端。CRISPR/Cas9技术提供了一种构建小鼠模型快捷高效的手段。汪启翰等^[18]将小鼠*FIX*基因第8外显子靶位点的sgRNA和特异的Cas9 mRNA显微注射到小鼠受精卵中,获得基因修饰的小鼠。通过精确基因分型和测序验证,小鼠突变率高达85%,突变小鼠的凝血活性

缺失。Platt 等^[16]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在小鼠体内同时实现了 *p53*、*Kras*、*Lkb1* 基因的突变,成功建立了小鼠肺腺癌动物模型,并由此证实 *p53*、*Kras*、*Lkb1* 是肺腺癌发生发展中的重要基因。这种基于 CRISPR/Cas9 技术快速构建多个基因突变的动物模型,对研究肿瘤相关基因的相互作用具有重大意义。斑马鱼模型系统已经处于使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术发展的最前沿,Varshney 等^[14]利用 CRISPR/Cas9 对斑马鱼进行多基因打靶,这种高效高通量打靶方法能快速建立多种疾病模型,可用于筛选致病基因,研究人类基因功能。

CRISPR/Cas9 编辑技术与动物克隆技术相结合可减少模式动物的饲养周期,所构建的大型动物模型有助于更好地用于农业和生物医学研究。Zhou 等^[17]将靶向特定基因的 Cas/sgRNAs 直接导入猪胚胎成纤维细胞,选取纯合突变细胞进行体细胞核移植,通过这种方法成功建立了 *PARK2* *-/-* *PINK1* *-/-* 双等位基因突变帕金森氏病猪模型。科学家们在动物模型中,通过 CRISPR/Cas9 技术编辑受精卵或早期胚胎中的基因组,或者对生殖干细胞进行基因编辑,从而构建能稳定遗传的基因修饰的新个体^[15]。也有科学家将 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术用于构建改良物种模型以防治人类疾病^[19]。疟疾是威胁人类健康的重大传染病,阻断蚊虫传播是控制疟疾的关键步骤。美国科学家利用 CRISPR/Cas9 系统将抗疟原虫基因插入斯氏按蚊胚胎细胞基因组的特定区域,结果表明 99.5% 的转基因斯氏按蚊后代有抗疟原虫基因的表达,与其他转基因技术相比有更高的效率,并能稳定遗传,这种抗疟原虫斯氏按蚊的成功构建,有助于疟疾传播机制的研究,并有望于改造出用于消灭疟疾的抗疟蚊^[19]。

2.2 在遗传病治疗中的应用研究

CRISPR/Cas9 技术已应用于基因治疗遗传病研究,修复突变的基因或使基因组中突变的基因失活,有望于从根本上治愈由基因突变引起的遗传病。

隐性营养不良性大疱性表皮松解症(recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB)是 *Col7a1* 基因发生突变及 VII 型胶原(collagen VII)蛋白功能异常导致的隐性皮肤遗传病。利用体外成熟的 Cas9/sgRNA 核糖蛋白复合物在病人特异性的

RDEB 小鼠表皮干细胞进行成体基因修复已经实现。Wu 等^[3]利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术从病人特异性的 RDEB 小鼠模型中筛选出能够特异、高效地介导第 80 位外显子切除的 sgRNAs,然后将 Cas9/sgRNA 核糖蛋白复合物电击导入皮内并介导体内 *Col7a1* 基因的编辑,从而恢复 Collagen VII 蛋白功能,并且修复 RDEB 表型,这为治愈此类遗传性皮肤病提供了全新思路。

CRISPR/Cas9 技术在镰状细胞性贫血^[20]、地中海贫血^[21-22]、囊性纤维化^[23]、杜氏肌营养不良^[24]、*Crygc* 基因突变引发的白内障^[25-26]、遗传酪氨酸血症 I 型、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症等遗传性疾病的应用研究均已报道。基于高通量测序的发展和精准医疗理念的提出,CRISPR/Cas9 技术与人类诱导多能干细胞技术相结合是临床应用的一大趋势^[24]。Song 等^[21]将地中海贫血患者的皮肤细胞诱导分化为多功能干细胞,再利用 CRISPR/Cas9 技术成功修复了其中的血红蛋白 β -球蛋白基因。该多能干细胞分化为造血细胞,生成各类造血祖细胞,最终表达功能正常的 β -球蛋白。

其他器官系统的成体干细胞或体细胞,同样可利用 CRISPR/Cas9 技术加以改造,从而实现部分或全部的功能修复。例如,*DMD* 基因突变使肌细胞中的抗肌萎缩蛋白(dystrophin)表达缺失从而导致杜氏肌营养不良综合征(duchenne muscular dystrophy, DMD)。目前 CRISPR/Cas9 技术应用于 DMD 的治疗研究已有多项研究报道。例如,Ousterout 等^[27]利用设计的 sgRNAs 靶向外显子 45-55 的突变热点以恢复肌营养不良蛋白的开放阅读框,并对外显子进行移动或删除操作,成功地纠正了成肌细胞中 *DMD* 基因的突变,正常的抗肌萎缩蛋白得以表达。CRISPR/Cas9 系统也可应用于某些终末分化的体细胞,Long 等^[28]利用腺病毒相关病毒在新生 DMD 小鼠模型的心肌或骨骼肌细胞中特异性表达 CRISPR/Cas9 系统组分,虽然只有部分抗肌萎缩蛋白表达,心肌和骨骼肌功能却明显改善,从而成功阻断了 DMD 的进展,这种方法可单独或联合其他疗法治疗 DMD,对 DMD 和其他单基因遗传病有潜在的应用价值。CRISPR/Cas9 系统应用于体细胞大大拓展了该技术的临床应用前景。

2.3 在病毒感染性疾病治疗中的应用研究

近年来,基因治疗技术逐渐应用于病毒感染

性疾病的治疗中^[4]。改造宿主细胞以免受病毒感染或改造病毒使其不能增殖和传播是基因治疗病毒感染性疾病的2种主要思路。艾滋病是人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的传染性疾病,高效抗逆转录病毒疗法是传统治疗艾滋病的方法,虽然这种治疗方法能显著改善患者的病发症状,但仍存在诸多弊端。

长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)是HIV病毒核酸的整合和RNA合成必不可少的元件,研究发现针对HIV-1感染的T细胞的LTRs利用CRISPR/Cas9系统进行打靶,能有效降低细胞内的前病毒水平^[29]。这种基因编辑方法也可以阻止随后的艾滋病毒感染。另外,改造后的CRISPR/Cas9能与潜伏于细胞中的HIV原病毒基因直接结合并使其活化,并同时联合抗病毒药物杀灭活化的HIV病毒。CRISPR/Cas9能够直接作用于细胞表面共受体CCR5[Chemokine(C-C motif)receptor 5],使细胞免受HIV侵袭,这或许也表明该技术可以在预防HIV病毒感染方面起到贡献。目前,CRISPR/Cas9基因编辑技术的安全性与稳定性还需进一步鉴定,sgRNAs的脱靶率及原因仍需深入分析,载体的选择也仍需优化,CRISPR/Cas9用于HIV-1的真正的临床治疗还有漫长的路要走。

此外,其他病毒感染性疾病的基因治疗研究也不断取得新进展。潜伏病毒感染是治愈病毒感染性疾病的一大障碍,目前大多数抗病毒药物的研究目标是抑制活跃病毒的复制,基因编辑技术有望在控制潜伏病毒感染中发挥作用。Epstein-Barr病毒(EB病毒)是疱疹病毒科嗜淋巴细胞病毒属的成员,这种病毒可导致传染性单核细胞增多症,且与我国南方发病率较高的鼻咽癌以及非洲儿童的淋巴瘤有密切关系,被认为可能是人类致癌病毒之一。一项利用CRISPR/Cas9技术对伯奇氏淋巴瘤细胞株中整合的EB病毒进行靶向基因组编辑的研究发现,伯奇氏淋巴瘤细胞出现增殖滞缓现象,且EB病毒载量大大降低了^[30]。这提示CRISPR/Cas9在根治病毒感染性疾病方面具有巨大潜力。

2.4 在癌症研究方面的应用研究

CAR-T(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)免疫疗法通过重新定向和编辑T淋巴细胞以介导肿瘤免疫排斥并特异性结合肿瘤细胞,是治疗肿瘤的一种有效方法。目前CAR-T

治疗并不完善,CAR基因传递到T细胞的过程,存在随机插入到受体细胞基因组的风险。Eyquem等^[5]利用CRISPR/Cas9技术将CAR基因精确地递送到特异的位置,并且增强了CAR-T细胞在小鼠中的肿瘤抑制作用,能够长期杀死癌细胞。CRISPR/Cas9编辑过的CAR-T细胞在急性淋巴细胞白血病的小鼠模型中的治疗效果要显著优于常规生成的CAR-T细胞。但是经CRISPR构建CAR-T细胞的安全性和有效性还有待探究。

CRISPR/Cas9技术已成功应用于miRNA在肿瘤中的功能研究。Huo等^[31]将靶向miRNA21以慢病毒为载体的CRISPR/Cas9导入卵巢癌细胞SKOV3和OVCAR3中,结果显示卵巢癌细胞的增殖、迁移及侵袭均受到抑制,并且编辑后的卵巢癌细胞对化疗药的敏感性显著增加。这表明miRNA21参与调控卵巢癌的发生发展。这种方法可用于研究miRNA与癌症之间的关系并指导癌症的靶向治疗。

此外,利用CRISPR/Cas9技术研究特定基因在癌症发生发展中的作用,可发现新的原癌基因或抑癌基因。Feng等^[32]利用CRISPR/Cas9系统有效地敲除了骨肉瘤细胞系的*CDK11*基因,发现敲除后的细胞活力、细胞增殖能力以及细胞迁移性和侵袭性均显著降低,*CDK11*基因可能成为骨肉瘤治疗的新靶点。Brandon等^[33]首次利用慢病毒载体使CRISPR/Cas9系统导入细胞内并进行高效的编辑,实现了对淋巴瘤癌基因*MCL-1*在体内外的敲除。*MCL-1*基因被敲除后,癌细胞出现了明显的死亡,小鼠体内实验显示肿瘤生长速度减慢并出现了明显的退化。利用CRISPR/Cas9系统对癌基因进行敲除或修复,从而实现肿瘤的基因治疗,这为肿瘤治疗提供了一种潜在方案。然而,CRISPR/Cas9应用于肿瘤治疗仍面临众多挑战,例如脱靶效应的存在,即sgRNA与靶点之外的DNA序列错配,引起非预期的基因突变。如何将CRISPR/Cas9系统导入靶细胞中也是肿瘤治疗的一大难题。

3 展望

CRISPR/Cas9是一种简洁、灵活和精确的基因编辑技术,CRISPR/Cas9介导的基因组编辑在短时间内崛起并取得众多突破,在生命科学研究领域尤其是在人类疾病基因治疗和作物品质改良方面

得到高度关注。

CRISPR/Cas9 系统为不同的生物体的基因组编辑提供了可能,但也存在不容忽视的需克服的困难。首先,CRISPR/Cas9 系统的分子结构较复杂,目前人们对该系统认识还不够全面,自然界中是否存在更高效率或更精确的变异的 Cas9 蛋白,有待进一步探究。其次,脱靶效应是 CRISPR/Cas9 应用于人类疾病治疗最主要的安全问题,虽然选取与人类基因同源性低的片段设计基因编辑病毒的靶标,可一定程度降低脱靶突变率,但脱靶效应依然严重制约了 CRISPR/Cas9 技术的广泛应用。再次,CRISPR/Cas9 能否用于人类生殖细胞的基因编辑,在伦理方面也存在较大争议。最后,CRISPR/Cas9 基因编辑技术对环境和生态平衡也有一定的负面影响,例如,为了控制发展中国家疟疾的传播,对蚊子基因组进行 CRISPR/Cas9 编辑可能导致短期内目标蚊种的灭绝。总之,CRISPR/Cas9 系统的分子生物学研究是一把双刃剑,科研工作者应在尽可能避免和控制其不良影响的前提下将其运用到多种研究中,为人类的健康造福。

参考文献

- [1] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823.
- [2] Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea [J]. *Molecular Cell*, 2010, 37(1):7-19.
- [3] Wu W, Lu Z, Li F, et al. Efficient in vivo gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(7):1660-1665.
- [4] 韩英伦,李庆伟. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在 HIV-1 感染治疗中的应用进展 [J]. *遗传*, 2016(1):9-16.
- [5] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J]. *Nature*, 2017, 543(7643):113-117.
- [6] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3):227-229.
- [7] Wiktor J, Lesterlin C, Sherratt DJ, et al. CRISPR-mediated control of the bacterial initiation of replication [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8):3801-3810.
- [8] 卢利莎,白杨,刘鑫,等.利用 CRISPR/Cas9 技术构建敲除 MEIS2 基因的 HEK293T 人胚肾细胞系 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015(4):535-541.
- [9] Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34):13904-13909.
- [10] Rauch I, Tenthorey JL, Nichols RD, et al. NAIP proteins are required for cytosolic detection of specific bacterial ligands in vivo [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(5):657-665.
- [11] Sheets TP, Park CH, Park KE, et al. Somatic cell nuclear transfer followed by CRISPR/Cas9 microinjection results in highly efficient genome editing in cloned pigs [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):E2031.
- [12] Choudhary E, Lunge A, Agarwal N. Strategies of genome editing in mycobacteria: Achievements and challenges [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 98:132-138.
- [13] Chen F, Zhang W, Zhao J, et al. Construction of Rev-erb β gene knockout HEK293 cell line with CRISPR/Cas9 system [J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2016, 32(11):1446-1452.
- [14] Varshney GK, Pei W, LaFave MC, et al. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9 [J]. *Genome Res*, 2015, 25(7):1030-1042.
- [15] Long C, McAnally JR, Shelton JM, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA [J]. *Science*, 2014, 345(6201):1184-1188.
- [16] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knock-in mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159(2):440-455.
- [17] Zhou X, Xin J, Fan N, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6):1175-1184.
- [18] 汪启翰,怀聪,孙瑞林,等.利用 CRISPR/Cas 系统快速高效构建血友病乙小鼠模型 [J]. *遗传*, 2015(11):1143-1148.
- [19] Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(49):E6736-E6743.
- [20] Huang X, Wang Y, Yan W, et al. Production of gene-

- corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(5):1470-1479.
- [21] Song B, Fan Y, He W, et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system [J]. *Stem Cells and Development*, 2015, 24(9):1053-1065.
- [22] Xie F, Ye L, Chang JC, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggy Bac [J]. *Genome Research*, 2014, 24(9):1526-1533.
- [23] Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6):653-658.
- [24] Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9 [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(1):143-154.
- [25] Wu Y, Zhou H, Fan X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1):67-79.
- [26] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6):659-662.
- [27] Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nature Communications*, 2015, 6:6244.
- [28] Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy [J]. *Science*, 2016, 351(6271):400-403.
- [29] Sarkar I, Hauber I, Hauber J, et al. HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase [J]. *Science*, 2007, 316(5833):1912-1915.
- [30] Wang J, Quake SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(36):13157-13162.
- [31] Huo W, Zhao G, Yin J, et al. Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells [J]. *Journal of Cancer*, 2017, 8(1):57-64.
- [32] Feng Y, Sassi S, Shen J K, et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system [J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(2):199-207.
- [33] Aubrey BJ, Kelly GL, Kueh AJ, et al. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo [J]. *Cell Reports*, 2015, 10(8):1422-1432.

(上接第201页)

- ful after disappearance of the genome in serum [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(6):2047-2052.
- [28] Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, et al. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2007, 101(7):738-739.
- [29] de Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis [J]. *Braz J Infect Dis*, 2004, 8(6):390-398.
- [30] Nisalak A, Gibbons RV, Thaisomboonsuk B, et al. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 84(2):218-223.
- [31] Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, et al. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis [J]. *Osong Public Health Res Perspect*, 2016, 7(2):77-82.
- [32] 李要星, 杨爽, 李娜, 等. 国产酶联免疫试剂检测登革热效能评价 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 30(5):434-436.
- [33] 郭鹏娟, 詹希美, 吴德, 等. 登革热病毒感染后 NS1 抗原检测的应用评价 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(5):697-699.

过氧化物还原酶6在中枢神经系统疾病中的研究现状

唐建巍¹ 肖广庆¹ 陈慧珍² 李爱民^{1*}

[摘要] 过氧化物还原酶6(peroxiredoxin 6, Prdx6)是过氧化物还原酶家族的第6个成员,具有不同于传统Prdxs家族成员的结构特点。Prdx6除了具有清除氧自由基、抗氧化应激的功能外,越来越多的研究表明该蛋白在中枢神经系统疾病中可以发挥多种作用。因此,本文就Prdx6的结构和活性特点,对该蛋白在中枢神经系统疾病中的研究现状进行总结和评述。

[关键词] 过氧化物还原酶6;神经退行性疾病;缺血再灌注损伤;颅脑损伤;脑肿瘤

The research progress of peroxiredoxin 6 in central nervous system diseases

TANG Jianwei¹, XIAO Guangqing¹, CHEN Huizhen², LI Aimin^{1*}

(1. Department of Neurosurgery, Xuzhou Medical Affiliated Hospital Of Lianyungang, Lianyungang, Jiangsu, China, 222000; 2. Neuroscience Institute, Xuzhou Medical Affiliated Hospital Of Lianyungang, Lianyungang, Jiangsu, China, 222000)

[ABSTRACT] Peroxiredoxin 6 (Prdx6) is the sixth member of peroxidases family with a unique structure from the other members. Besides the mechanisms of eliminating oxygen free radicals and anti-oxidative stress, more and more studies have revealed that Prdx6 plays a variety of roles in central nervous system diseases. Therefore, in this review, we will summarize and comment on the recent research progress of Prdx6 in central nervous system diseases based on its structure and activity characteristics.

[KEY WORDS] Peroxiredoxin 6; Neurodegenerative disease; Ischemia - reperfusion injury; Brain injury; Brain tumor

过氧化物还原酶(peroxiredoxins, Prdxs)家族是近年来发现的一个广泛存在于酵母、大多数真菌、动植物以及多种原核和真核生物细胞中的抗氧化蛋白家族^[1-2],因其在抗氧化、调节和介导细胞信号过程中所起的作用而受到广泛的关注^[3]。Prdxs家族的第6个成员是过氧化物酶6(peroxiredoxin6, Prdx6),起初被认为仅分布在肺组织中,但后续研究发现,Prdx6在哺乳动物体内多种器官均有表

达^[4]。Prdx6通过对抗氧化应激损伤,在中枢神经系统疾病如脑缺血缺氧疾病、颅脑损伤以及神经退行性疾病的发生、发展和转归的过程中扮演着重要角色。然而,Prdx6有着不同于传统Prdxs家族成员的结构以及多种活性,在不同的疾病和同一疾病的不同阶段中,也分别起到不同的作用^[5]。为了充分认识该分子的功能及临床价值,本文将对Prdx6在中枢神经系统疾病中的研究现状作一综述。

基金项目:江苏省科技厅基金资助项目(BE2015675)

作者单位:1.徐州医科大学附属连云港医院,神经外科,江苏,连云港 222000

2.徐州医科大学附属连云港医院,神经科学研究所,江苏,连云港 222000

*通讯作者:李爱民, E-mail:1127595015@qq.com

1 Prdx6的结构及特点

Prdx6是Prdxs家族第6个成员,在人位于染色体1q24,在大鼠位于染色体13q22,全长11 000 bp,相对分子量为25 000,等电点 p_i 约为5.1。Prdx6既具有经典的Prdxs家族螺旋管状硫氧还蛋白折叠结构,又以其独有的结构和功能特性区别于Prdx1-5。

结构上,Prdx中的半胱氨酸残基(-Cys)数量对其抗氧化功能起到重要作用。Prdxs1-5在结构中拥有2个半胱氨酸残基,因此被称为2-Cys型Prdx。Prdx6只有在保守的NH₂末端有一个半胱氨酸残基(-Cys),因此被称为1-Cys型Prdx。Prdx1-4以二聚体的形式存在于溶液中,并使用每一个单体的N端的-Cys结合氧自由基或者次磺酸(-SOH)后,再和另一个单体C端的-Cys之间形成二硫键;Prdx5被认为是非典型的2-Cys型Prdx,每个单体上过氧化的-Cys和游离的-Cys可以在自身内部形成一个二硫键。Prdx6结构中不含有游离态的-Cys,其抗过氧化物功能是通过单一保守的-Cys实现,其分解次磺酸化-Cys需要外部的还原物质。这种生理还原剂已经被发现,为谷胱甘肽(glutathione, GSH),Prdx6的-Cys在结合过氧化物之后需要在GSH的作用下才能与另一个Prdx6分子的-Cys形成二硫键(即,Prdx6的谷胱甘肽化)^[4-7]。而所有的Prdxs形成的二硫键,都是通过硫氧化还原蛋白降解,正因如此,Prdxs起初被称为硫氧还蛋白过氧化物酶家族(thioredoxin peroxidase, TPx),在Prdx6被发现并深入研究后才更名为Prdxs^[7]。

功能上,Prdx6已经被发现具有3种不同的酶活性:①Prdx6中单一保守的-Cys被氧化后,可以通过谷胱甘肽化减少氧自由基和氢过氧化物等物质,即非硒依赖谷胱甘肽过氧化物酶(non-selenium glutathione peroxidase, NSGPx)活性;②甘油磷脂和磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)等磷脂类物质是细胞膜磷脂双分子层的重要组成部分,参与细胞膜对蛋白质的识别和信号传导。Prdx6可以水解细胞膜磷脂类物质的SN-2位,从而减轻细胞的磷脂过氧化程度,即非钙离子依赖性磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)活性;③最近研究发现,Prdx6还可以利用游离脂肪酸(辅酶a衍生物)来酰化溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine,

LPC),即溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶(lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT)活性^[5]。LPCAT活性可以使LPC酰基化形成PC,也可以通过调节PC SN-2位点的酰基种类,对细胞膜的脂肪酸修饰和酰基交换产生影响。Prdx6是唯一在同一蛋白中同时表现PLA₂和LPCAT活性的分子,动力学研究表明Prdx6导致的磷脂水解(PLA₂活性)和再酰化(LPCAT活性)是一个连续的过程,二者联合作用会导致磷脂SN-2位PC的产生,在维持细胞正常生理功能,修复细胞膜氧化损伤中发挥重要作用^[4, 6, 8-9]。

2 Prdx6与中枢神经系统相关疾病的研究

2.1 Prdx6与神经退行性疾病

有研究表明,Prdx6对多发性硬化和脊髓灰质炎具有保护作用,可以作为一项新的神经保护药物^[10]。但是上调其PLA₂的活性可诱发并加重阿尔兹海默综合征(Alzheimer's disease, AD)^[11]。目前AD的发病机制众说纷纭,其中以A β 蛋白沉积的假说较为热门。A β 蛋白可以损害线粒体活性,同时增加活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的产生,进而诱导的氧化应激导致了神经元细胞凋亡^[12]。Yun等^[13]发现,上调Prdx6的PLA₂活性,可以增加核转录因子Nrf2的表达,诱发氧化应激的同时增加A β 淀粉样蛋白的沉积,加重AD的病程进展。这些结果表明,Prdx6可以在不同的神经退行性疾病中扮演不同的角色。其机制与Prdx6的PLA₂活性调节剂p67phox胞浆蛋白有关^[6, 14]。该蛋白与Prdx6共存于巨噬细胞、内皮细胞和多形白细胞的胞浆中,并和2型NAPDH氧化酶NOX₂复合体功能关系密切。p67phox对磷酸化的Prdx6亲和性非常高,易结合,并促进PLA₂活性的表达;但是对非磷酸化的Prdx6亲和性低,与之结合则会抑制PLA₂活性。当组织处于氧化应激状态,细胞膜上的K-ATP内向整流通道失活,细胞膜去极化并激活Prdx6磷酸化与p67phox蛋白结合,从而刺激NOX₂复合体产生O₂⁻。生理条件下,由NOX₂产生的O₂⁻同样在细胞运动和多种其他的细胞生物进程包括肥大、增殖和迁移、激活多种转录因子中扮演着重要的角色。而在炎症、损伤、应激等条件下这种平衡被打破,此时上调PLA₂活性可以刺激NOX₂,从而诱导氧化应激反应并造成损伤,加重疾病的产生^[14-15]。因此,Prdx6对不同神经

退行性疾病的作用不同,或许与这些疾病中神经细胞的氧化损伤水平有关。

2.2 Prdx6 与脑缺血再灌注损伤

缺血性脑卒中是由血栓形成、栓塞、或者其他血流动力学障碍导致脑组织局部缺血缺氧,从而对缺血脑组织造成不可逆损伤的过程。由于脑组织氧耗量高,对缺血缺氧尤为敏感,因此缺血性脑卒中往往会导致严重的后果。脑缺血再灌注损伤是导致卒中患者脑损伤的重要因素之一,其病理过程是卒中患者的脑血流没有在第一时间得到恢复,当间隔一段时间发生再灌注时,继发的内源性毒性物质会对缺血区脑组织造成严重的缺血再灌注损伤,缺血区的神经元则会发生不可逆转的坏死^[16-17]。目前,脑缺血再灌注损伤机制尚不明确,可能由超氧化物及氧自由基的大量生成、谷氨酸兴奋性毒性反应和炎症反应共同引起^[17]。

目前对于 Prdx6 在肺和心脏的缺血再灌注损伤研究较为集中,但是对脑缺血再灌注损伤中的研究较少。高杨等^[18]的研究发现,脑缺血再灌注损伤后 24 h 时 Prdx6 蛋白表达最高;随后通过电针预处理来上调 Prdx6 表达,发现处理后的大鼠脑缺血再灌注损伤程度较未处理大鼠模型减轻;姜蓓蓓等^[19]通过对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的侧脑室注射 Prdx6-siRNA 后,对比模型对照组,发现缺血坏死面积增加;超氧化物歧化酶 SOD 的活性进一步降低;TUNEL 染色阳性细胞率和 Caspase3 蛋白表达水平明显有增高。前文提到,氧化应激可以激活 Prdx6 磷酸化,上调 PLA₂ 活性,刺激 NOX2 复合体产生 O₂。而 O₂ 可以作为细胞信号介导产生血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF),促进新生血管形成,修复血管损伤。此外,也可以通过谷胱甘肽化 (NSGPx 活性),消耗并减少谷氨酸的细胞兴奋毒性作用。因此,我们可以得出结论,Prdx6 在脑缺血再灌注损伤中可以对抗氧化应激反应,促进血管再生,减轻损伤。

2.3 Prdx6 和中枢神经系统外伤

Prdx6 在中枢神经系统广泛表达,且与神经损伤修复、抗氧化应激有关。Zhang 等人^[20]的研究发现,大鼠脊髓损伤后,Prdx6 在脊髓前角运动神经元表达显著降低,抑制肿瘤坏死因子 TNF- α 可以提高 Prdx6 的表达,促进运动功能的恢复,提示二者共同参与了脊髓损伤修复的病理过程。Singh

等^[21]将 Prdx6 转导进神经细胞,发现转染后的细胞对氧化应激诱导剂如百草枯,过氧化氢,谷氨酸等具有了一定的耐受性,说明 Prdx6 可以抵抗氧化应激引起的神经细胞死亡。Shim 等^[22]发现地塞米松可以增加围产期大鼠脑中的 Prdx6 表达,从而发挥抗神经细胞凋亡的作用,这为激素的脑保护作用研究提供了新思路。Buonora 等^[23]通过击打大鼠头部制作颅脑损伤模型,发现损伤后 Prdx6 在模型大鼠脑血管周围间隙和神经胶质细胞中高表达;同时发现 Prdx6 在人类颅脑损伤患者的脑组织和血小板中高表达,并指出 Prdx6 可以作为轻、中度颅脑损伤患者预后的一项新的监测指标。

总结以上研究,Prdx6 在急性颅脑或脊髓损伤发生后表达增高,对抗氧化应激损伤从而起到神经保护作用。糖皮质激素可以促进 Prdx6 的合成转录^[22],因此补充外源性 Prdx6 或者糖皮质激素上调 Prdx6 表达,均可以作为损伤早期的治疗手段。此外,对颅脑损伤的预后评估也是神经外科领域的研究热点。内源性 Prdx6 在损伤后的表达明显升高,可以作为一项潜在的颅脑损伤预后评价指标。

2.4 Prdx6 和中枢神经系统肿瘤

目前,有关 Prdx6 与中枢神经系统肿瘤关系的研究较少。有研究发现,Prdxs 在视神经和视网膜都有表达,其分布和视神经周围的星型胶质细胞分布高度一致^[24];Valek 等人^[25]对大鼠坐骨神经损伤后的 Prdxs 表达和分布进行检测,发现 Prdx6 主要表达于和脑内星型胶质细胞同源的卫星胶质细胞,这和上文 Buonora 的研究结果相符。以上结果提示 Prdx6 可能与神经胶质细胞的支持、保护作用有着密切联系。周金桥等人^[26]选取 52 例经病理证实为星形胶质细胞瘤的脑肿瘤标本,检测 Prdx1 和 Prdx6 在肿瘤组织中的表达情况,发现 Prdx6 主要表达于肿瘤细胞胞浆中;与正常脑组织相比,星形胶质细胞瘤中的 Prdx6 的表达要明显高于正常对照组,且恶性程度越高,表达越明显。Park 等^[27]对 1 例少突胶质细胞瘤全切后迅速发生间变的肿瘤组织进行了质谱表达检测和验证,最终发现 Prdx6 的差异表达有意义,并提出 Prdx6 可能与少突胶质细胞瘤的恶变有关,可以作为一个潜在的标志物预测肿瘤预后。

在大部分的肿瘤组织中,Prdxs 家族成员均呈高表达,被认为是潜在的肿瘤标记物^[26-28]。其机制

可能是肿瘤组织内的高活性氧环境诱导 Prdxs 表达,通过对抗增加的 ROS 从而保护正常细胞,抑制肿瘤的发展^[14, 29]。也有研究发现,Prdx6 的高表达也可能是维持和促进肿瘤细胞生长的因素, Yun 等人^[30]通过动物实验和体外细胞培养,观察到 Prdx6 在肺癌组织中的 NSGPx 和 PLA₂ 活性增高均可以促进肺癌细胞的生长,并指出与 Prdx6 促进新生血管生成有关。但无论是哪种机制,Prdx6 与中枢神经胶质细胞瘤的发生发展均有着密切关系,应充分探讨其作为一项新型肿瘤标记物的可能。

3 总结与展望

Prdx6 作为 Prdxs 家族中唯一兼有 NSGPx 和 PLA₂ 两种活性的成员,既具有 Prdx1-5 抗氧化的共性,又具有其独特之处。一方面,Prdx6 具有抗氧化作用,其机制与清除活性氧、降低谷氨酸兴奋毒性以及减少细胞膜磷脂损伤有关,其 PLA₂ 位点激活 NOX₂ 和随后产生的 O₂/H₂O₂ 可以介导多种重要的生理功能稳态;另一方面,在机体处于异常状态下时,Prdx6 正常活性的平衡被打破,产生 O₂/H₂O₂ 可以作为炎症介质,在多种疾病中加重细胞损伤;第三,Prdx6 的 LPCAT 活性与磷酸化水平密切相关。其调节剂 p67phox 与磷酸化的 Prdx6 结合促进 PLA₂ 活性表达,与非磷酸化的 Prdx6 结合会抑制 PLA₂ 活性。这种多重活性平衡既是 Prdx6 的特点,又是研究 Prdx6 的难点。

在神经退行性疾病中,Prdx6 充分体现了上述“双刃剑”的特性,在不同的疾病中起不同的作用。虽然 Prdx6 在中枢神经肿瘤中的研究较少,但是有大量针对其他肿瘤的研究发现,Prdx6 在肿瘤组织中较正常组织有着明显的差异性表达,其表达程度与肿瘤的发生、发展、转归有着密切的相关性。而 Prdx6 促进 VEGF 生成,可以作为潜在的肿瘤标志物,也可以作为一个新的生物精准治疗靶点,具有较大的临床应用价值。

氧化应激损伤是机体多种生理、病理过程中均涉及的反应之一。由于人中枢神经系统特别是大脑对血氧含量变化极其敏感,因此,对急性病变如脑缺血缺氧疾病及颅脑损伤中涉及的氧化应激过程进行研究,具有重要意义。Prdx6 不仅可以减少缺血再灌注和颅脑损伤后的神经细胞损伤,对颅脑损伤的预后评估也具有参考价值。但是 Prdx6 是否可以作为一种新的神经保护剂尚未得

到临床试验证实。目前,仍需要对 Prdx6 自身特点,以及在中枢神经系统疾病中的作用机制进行深入研究。

参考文献

- [1] Park KJ, Kim YJ, Kim J, et al. Protective effects of peroxiredoxin on hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes [J]. Korean Circ J, 2012, 42(1):23-32.
- [2] Dietz KJ. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(4):1129-1159.
- [3] Flohe L. Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation [J]. Methods Enzymol, 2010, 473:1-39.
- [4] Manevich Y, Fisher AB. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38(11):1422-1432.
- [5] Fisher AB. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling [J]. Arch Biochem Biophys, 2017, 617:68-83.
- [6] Fisher AB, Vasquezmedina JP, Dodia C, et al. Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes [J]. Redox Biology, 2018, 14:41-46.
- [7] Kang SW, Baines IC, Rhee SG. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine [J]. J Biol Chem, 1998, 273(11):6303-6311.
- [8] Li H, Feinstein S, Zhou S, et al. Both peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 protect against oxidative stress by reduction of peroxidized cell membranes [J]. Faseb Journal, 2015.
- [9] Li H, Benipal B, Zhou S, et al. Critical role of peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes following oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 87:356-365.
- [10] Yun HM, Park KR, Kim EC, et al. PRDX6 controls multiple sclerosis by suppressing inflammation and blood brain barrier disruption [J]. Oncotarget, 2015, 6(25):20875-20884.
- [11] Mun H, Jin PJ, Han JY, et al. Acceleration of the development of Alzheimer's disease in amyloid beta-infused peroxiredoxin6 overexpression transgenic mice [J]. Mol Neurobiol, 2013, 48:941-951.
- [12] Schilling T, Eder C. Amyloid beta-induced reactive ox-

- xygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(12):3295-3302.
- [13] Yun HM, Jin P, Han JY, et al. Acceleration of the development of Alzheimer's disease in amyloid beta-infused peroxiredoxin 6 overexpression transgenic mice [J]. *Molecular Neurobiology*, 2013, 48(3):941-951.
- [14] Vázquez-Medina JP, Dodia C, Weng L, et al. The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 modulates NADPH oxidase 2 activation via lysophosphatidic acid receptor signaling in the pulmonary endothelium and alveolar macrophages [J]. *FASEB J*, 2016, 30(8):2885-2898.
- [15] Ambruso DR, Ellison MA, Thurman GW, et al. Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1823(2):306-315.
- [16] Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke [J]. *Nat Med*, 2008, 14(5):497-500.
- [17] 谭丽, 赵涌, 姜蓓蓓, 等. 敲低小胶质细胞中过氧化还原素6(PRDX6)降低氧糖剥夺再复氧神经元的存活 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(8):1014-1020.
- [18] 高杨, 孙思斯, 刘墨宇, 等. 电针预处理通过上调 Peroxiredox-in6 减轻大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *中华神经解剖学杂志*, 2014, 30(5):507-513.
- [19] 姜蓓蓓, 谭丽, 姚辉, 等. Peroxiredoxin 6 在脑缺血再灌注损伤中的抗氧化和抗凋亡作用 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016(8):781-786.
- [20] Zhang X, Shi LL, Gao X, et al. Lentivirus-mediated inhibition of tumour necrosis factor- α improves motor function associated with PRDX6 in spinal cord contusion rats [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:8486.
- [21] Singh SP, Chhunchha B, Fatma N, et al. Delivery of a protein transduction domain mediated Prdx6 protein ameliorates oxidative stress-induced injury in human and mouse neuronal cells [J]. *Ajp Cell Physiology*, 2015, 90(5):2560-2563.
- [22] Shim SY, Kim HS, Kim EK, et al. Expression of peroxiredoxin 1, 2, and 6 in the rat brain during perinatal development and in response to dexamethasone [J]. *Free Radical Research*, 2012, 46(3):231-239.
- [23] Buonora JE, Mousseau M, Jacobowitz DM, et al. Autoimmune profiling reveals peroxiredoxin 6 as a candidate traumatic brain injury biomarker [J]. *Journal of Neurotrauma*, 2015, 32(22):1805-1814.
- [24] Chidlow G, Wood JP, Knoops B, et al. Expression and distribution of peroxiredoxins in the retina and optic nerve [J]. *Brain Structure & Function*, 2015, 221(8):1-23.
- [25] Valek L, Kanngießer M, Häussler A, et al. Redoxins in peripheral neurons after sciatic nerve injury. [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2015, 89:581-592.
- [26] 周金桥, 刘秋红, 王景涛, 等. 过氧化物酶1,6和GFAP在人脑星形胶质细胞瘤中的表达及临床意义 [J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(9):1255-1259.
- [27] Park CK, Kim JH, Moon MJ, et al. Investigation of molecular factors associated with malignant transformation of oligodendroglioma by proteomic study of a single case of rapid tumor progression [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2008, 134(2):255-262.
- [28] 蔡鑫泽, 乔莹, 陈洋, 等. 应用二维电泳和质谱技术鉴定乳腺癌相关蛋白 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(1):23-27.
- [29] Kwon J, Wang A, Burke DJ, et al. Peroxiredoxin 6 (Prdx6) supports NADPH oxidase1 (Nox1)-based superoxide generation and cell migration [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2016, 96:99-115.
- [30] Yun HM, Park KR, Lee HP, et al. PRDX6 promotes lung tumor progression via its GPx and iPLA2 activities [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014, 69(4):367-376.

西安交通大学第二附属医院医学检验科

西安交通大学第二附属医院位于陕西省西安市新城区西五路157号,医院开放病床2200张,设有48个临床医技科室、专科病院和研究室,拥有数量众多的国家重点学科和国家临床重点专科,是原卫生部直属三甲医院。医学检验科是集医疗、教学、科研为一体的医技科室,为“临床实验诊断学”硕士学位授予点,具有卫生部认可的临床基因扩增实验室和疾病预防控制中心认可的HIV初筛实验室,是卫计委和省级细菌耐药监测网成员单位,是首批参加卫生部临床检验中心室间质量评价活动的单位之一。科室技术力量雄厚,现有职工75人,其中具有正高级职称5名,副高级职称7名,硕士生导师4名,博士学位7名,硕士以上学位25名。实验室功能齐全,设有临床检验组、临床免疫组、临床生化组、临床微生物组、分子基因诊断组、急诊组和标本组7个亚专业。实验室总面积约2000平方米,目前开展500余项检验项目,基本覆盖综合三级医院的检验科必须开展的检验项目,为临床提供准确及时的检验报告,积极参加卫生部和陕西省临检中心的室间质评检测项目,目前科室按照ISO15189医学实验室的质量控制体系在逐步完善各种实验室质量和安全管理制度、流程。拥有国际知名品牌的大型设备60多台,主要包括全自动生化免疫流水线、基质辅助激光解析电离时间飞行质谱系统、全自动五分类血细胞流水线、血细胞阅片系统、全自动特种蛋白分析仪、全自动化学发光免疫分析仪、高压液相糖化血红蛋白仪、全自动蛋白电泳仪、全自动微生物鉴定及药敏系统、全自动血培养仪、全自动微生物动态检测系统、荧光定量PCR扩增仪、全自动精液分析仪、全自动粪便常规分析仪、全自动酶免前处理、后处理系统及一体机、Beckman Coulter、BD流式细胞仪、Agilent 6460液质联用仪、Imstar全自动图像扫描仪和二代高通量测序仪MiSeq等大型仪器,仪器设备总值超亿元。

实验室紧密围绕严重威胁我国人民健康的重大疾病,如肿瘤、心血管疾病、代谢性疾病、重大传染病进行实验室诊断,以及相关医学诊断新技术、新方法的基础研发、转化及临床应用的研究。重点研究领域为细菌耐药机制的研究、免疫与感染性疾病实验室诊断、血栓性疾病实验室诊断、白血病免疫学和形态学诊断、肠道菌群与代谢性疾病相关性等。近5年来,以第一完成人承担国家自然科学基金课题2项、省级科研课题10余项,市级及校级科研课题10余项。荣获陕西省科学技术奖9人次,陕西省科技进步奖4人次,获医院新技术奖13项。以第一作者发表核心期刊论文近百篇,其中SCI收录15篇,主编及参编专著5部。

学科带头人耿燕获病原微生物医学博士学位,主任检验技师/检验医师,担任检验科主任,生物诊断治疗国家地方联合工程研究中心副主任。主要研究方向为感染性疾病的实验室诊断、细菌耐药机制的研究、肠道菌群与代谢性疾病等。



→ 公司简介

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



→ 公司优势

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

→ 多元化产品系列



→ 企业使命

达生命之源, 安健康之本

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



公司总部

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

营销中心

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