



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

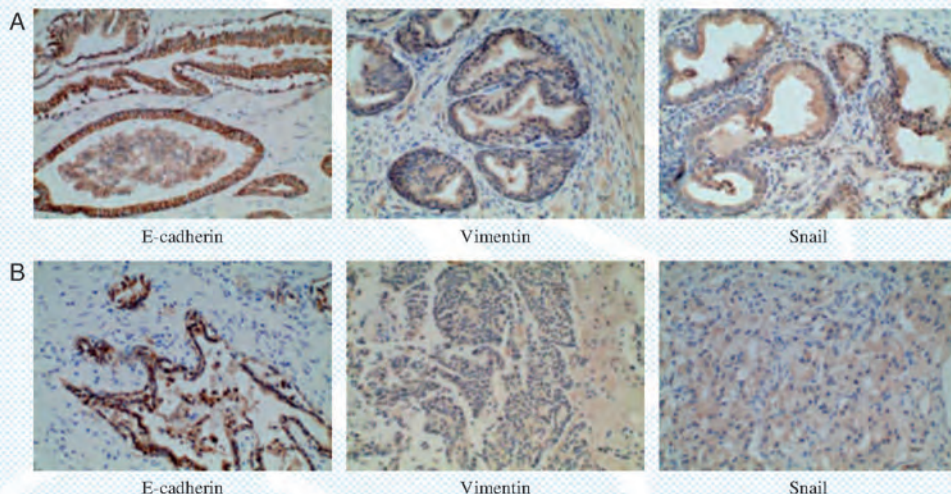
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2019年11月 第11卷 第6期 总第64期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 11 Number 6 November 2019



A: 前列腺良性增生组(对照组); B: 前列腺癌组(实验组)

图(P454) 前列腺良性增生和前列腺癌组织免疫组化结果

Figure(P454) Immunohistochemical results of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库CMCC收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库CMCI收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692198

1 1 >



王谦



王谦,《分子诊断与治疗杂志》第五届编委。1996年毕业于山东医科大学(现山东大学)医疗系,获医学学士学位,先后获得内科学硕士、血液病学博士。现为山东大学齐鲁医院(青岛)检验医学中心副主任,主持科室日常工作,主任技师,山东大学教授,博士研究生导师,济宁医学院兼职教授,潍坊医学院兼职教授。

兼任中华医学会检验专业委员会血液体液学委员,中国医师协会检验医师分会老年病检验医学专业委员会委员,中国中西医结合学会血液病检验诊断学术委员会副主任委员,中国免疫学会标记免疫学专业委员会常务委员,中国医学装备协会临床检验装备技术专业委员会委员,山东省抗癌协会临床细胞肿瘤学专业委员会副主任委员,山东省检验专业委员会委员,青岛市医学会检验专业委员会副主任委员,青岛市抗癌协会临床肿瘤学专业委员会副主任委员等。被聘为教育部学位与研究生教育发展中心学位论文通讯评议专家,《中华检验医学杂志》、《医学参考报》、《山东大学学报医学版》等多家杂志的编委、常务编委或审稿专家。

长期从事细胞形态学和分子肿瘤免疫学的临床诊断及科研工作,擅长各种贫血、感染、白血病实验室鉴别诊断及体液细胞形态学检验。承担山东大学医学院、公卫学院、药学院、口腔学院《诊断学》以及公卫学院《临床检验基础》、《血液学及血液学检验》等理论授课,在《Haematologica》、《Int J Biol Sci》、《J Clin Immunol》、《Exp Hematol》、《中华内科杂志》、《中华血液学杂志》等国内外核心期刊发表本专业学术论文60余篇,SCI收录15篇。主编著作5部,其中《检验与临床诊断》被列入国家新闻出版总署“十一五”国家重点图书,《临床医师检验速查》获华东六省一市优秀科技图书二等奖,主审全国高校医学检验专业统编教材《免疫学检验技术》,参加编写国家医学数字教材,国家卫计委“十二五”规划教材全国高等学校本科临床医学专业《诊断学》。获实用型专利4项,其中2项已技术转让并获得一定的社会效益和经济效益。完成并主持省部级以上课题研究11项,获山东省科技进步二等奖2项、三等奖5项,教育部科技进步二等奖1项,山东省医学科技创新二等奖1项。现第一位主持中加(Université Laval)国际合作课题,国家科技部重大科技计划联合课题,吴阶平医学基金资助课题及山东省科技攻关课题各1项。近年来培养硕博研究生8名,与加拿大Laval大学建立了联合培养博士研究生机制。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019年11月 第11卷 第6期 总第64期 Bimonthly Volume 11 Number 6 November 2019

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 刘清群
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) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2019年11月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan LI Caizhen LIU Qingqun</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2019.11.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>



扫码订阅《分子诊断与治疗杂志》

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



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

分子诊断与治疗杂志

经过多项学术指标综合评定及同行专家
评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期
刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学院信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路15号 100038 www.istic.ac.cn

2018年11月

证书编号：2017-G556-0388
有效期至：2019年12月



分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年11月 第11卷 第6期

目次

述评

丙型肝炎病毒生活周期中脂蛋白代谢的研究进展 杨银荣 王谦(441)

论著

下一代测序法检测乙型肝炎病毒YMDD突变的方法学建立及性能评价
..... 余学高 邓间开 陈耀铭 等(446)

Snail 基因甲基化与TGF β 1 诱导前列腺癌细胞发生EMT的相关性研究
..... 杜彦丹 牛艺卿 郑海军 等(451)

血清HMGB1、TGF β 1 及GP73检测对脓毒症并发肝损伤预后的评估价值
..... 宋莹 李世朋 焦伟伟(457)

miR-137 靶向下调SETD7 表达对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激的影响研究
..... 王彦利 李纪明 罗进光(462)

基于分子标签二代测序技术的非小细胞肺癌驱动基因变异分析 刘小云 吴小延 邵琼 等(468)

PSCA 基因单核苷酸多态性位点与胃溃疡易感性的研究 莫大超 李君久 彭亮 等(474)

FBN1 基因 c.2418A>G 突变对转录影响的研究 张岳 李金洁 刁艳君 等(479)

慢病毒介导 *HMGN5* 基因沉默对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制研究
..... 孙娟 信艳萍 张国梅 等(485)

术后早期PTX-3 及PCT检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染的预测价值 杨秉融 王瑾(491)

不同HBV 基因型慢性乙型肝炎患者的血清HBV DNA、PreS1、HBeAg 检测结果分析
..... 吴湃 吴坤河 刘海燕 等(495)

南京地区1 776 例外周血淋巴细胞染色体核型分析 余梦瑶 顾敏 赵鸿(499)

血清Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平检测对妊娠期糖尿病的诊断价值及与患者胰岛素
抵抗的关联性 李茂香 李玉 吕媛媛 等(503)

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年11月 第11卷 第6期

目次

- CEA、NSE、SCCA 联合 miR-21 检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性研究
..... 汤乔雅 宫郡茗 马艳凌(508)
- 卵巢癌患者血清 miR-21 及糖类抗原 125 水平变化及意义 尤娟(513)
- 水蓼花对过氧化氢诱导神经细胞凋亡的影响 于广周 谭文刚 张昊(517)
- 血浆 miR-192、miR-29c 水平对 2 型糖尿病肾病诊断的临床意义 何爽 黄萍 范明娟(522)
- 脓毒症患者血清中白细胞介素-6 和降钙素原表达及其临床意义 刘蕾蕾 华玮 居培红 等(527)
- D-乳酸和降钙素原对细菌性脑膜炎的诊断价值 范文兵 周银锁(531)
- GATA3、CK20 在膀胱尿路上皮癌中的表达和意义 曾玉梅 杜娟 陈应智 等(535)

综 述

- 循环肿瘤 DNA 的临床应用研究进展 程筱雯(539)

专家风采

- 王谦 (封二)

实验室巡礼

- 山东大学齐鲁医院(青岛)检验科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 6 November 2019

CONTENTS

COMMENTS

- Research progress on lipoprotein metabolism in the hepatitis C virus life cycle
YANG Yinrong, WANG Qian (441)

ORIGINAL ARTICLES

- Establishment and evaluation of next-generation sequencing for the detection of hepatitis B virus YMDD-motif mutations
YU Xuegao, DENG Jiankai, CHEN Yaoming, CHEN Peisong, HE Xiaohong, ZHONG Liangying, HUANG Bin (446)
- Correlation between methylation of snail gene and EMT induced by TGF β 1 in prostate cancer cells
DU Yandan, NIU Yiqing, ZHENG Haijun, WANG Xiaoyan, JIANG Yuhai, CHEN Haiqiu, LI Yinyan, SUN Gang, LI Chunyu, LU Desheng, SUN Hui (451)
- Evaluation of serum HMGB1, TGF- β 1 and GP73 in the prognosis of sepsis complicated with liver injury
SONG Ying, LI Shipeng, JIAO Weiwei (457)
- Effect of miR-137 targeting down-regulation of SETD7 expression on oxidative stress induced by hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes
WANGYanli, LI Jiming, LUO Jinguang (462)
- Analysis of driving gene mutations in non-small cell lung cancer using UMI-based next-generation sequencing
LIU Xiaoyun, WU Xiaoyan, SHAO Qiong, LONG Yakang, WANG Haiyun, DENG Ling (468)
- Study on the single nucleotide polymorphisms of *PSCA* gene and susceptibility to gastric ulcer
MO Dachao, LI Junjiu, PENG Liang, LIU Zhiyuan, WANG Jieyun, YUAN Jiru (474)
- Study on the effect of *FBN1* gene c.2418A>G mutation on transcription
ZHANG Yue, LI Jinjie, DIAO Yanjun, YANG Liu, HAO Xiaoke (479)
- Effect of lentivirus mediated *HMG5* gene silencing on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells and its mechanism
SUN Juan, XIN Yanping, ZHANG Guomei, TIAN Xiaona, LIU Huimin (485)
- Predictive value of early detection of PTX-3 and PCT for pulmonary infection after gynecological laparoscopic surgery under general anesthesia
YANG Bingrong, WANG Jin (491)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 6 November 2019

CONTENTS

- Serum HBV-DNA, preS1, HBeAg in patients with various HBV genotype of chronic virus hepatitis B
WU Pai, WU Kunhe, LIU Haiyan, ZHANG Douxing, HU Anqun (495)
- Chromosome karyotype analysis of 1 776 peripheral blood lymphocytes in Nanjing Area
YU Mengyao, GU Min, ZHAO Hong (499)
- The diagnostic value of serum chemerin, 25(OH)D3, visfatin levels in gestational diabetes mellitus and their association with insulin resistance
LI Maoxiang, LI Yu, LYU Yuanyuan, CAO Yongxian (503)
- Correlation between CEA, NSE, SCCA combined with miR-21 and clinicopathological features, efficacy and prognosis in patients with lung cancer
TANG Qiaoya, GONG Junming, MA Yanling (508)
- Changes and significance of serum miR-21 and carbohydrate antigen 125 in patients with ovarian cancer
YOU Juan (513)
- Effect of cleistocalyx operculatus flower buds on hydrogen peroxide induced apoptosis of nerve cells
YU Guangzhou, TAN Wengang, ZHANG Hao (517)
- The clinical significance of plasma mir-192 and mir-29c levels in diagnosis of type 2 diabetic nephropathy
HE Shuang, HUANG Ping, FAN Mingjuan (522)
- Expression of interleukin -6 and procalcitonin in serum of patients with sepsis and its clinical significance
LIU Leilei, HUA Wei, JU Peihong, ZHANG Wenyan, HUANG Kan, LI Zheng (527)
- Diagnostic value of D-lactic acid and procalcitonin in bacterial meningitis
FAN Wenbing, ZHOU Yinsuo (531)
- Expression and significance of GATA3 and CK20 in bladder urothelial carcinoma
ZENG Yumei, DU Juan, CHEN Yingzhi, CHU Bing (535)

REVIEWS

- Progress in clinical application of circulating tumor DNA
CHENG Xiaowen (539)

丙型肝炎病毒生活周期中脂蛋白代谢的研究进展

杨银荣¹ 王谦^{1,2*}

[摘要] 丙型肝炎病毒(HCV)是包括肝细胞癌在内的慢性肝病的重要病因。由于HCV缺乏进行自身脂质合成的途径,因此进化出了利用宿主脂质代谢来完成胞内病毒复制的过程。脂蛋白是运输脂质的载体,甘油三酯、游离胆固醇、胆固醇酯和磷脂是脂质转运的主要成分。越来越多的研究证明,HCV生活周期中的入胞、复制、装配和排出的各个阶段均与脂蛋白的代谢密切相关,而介导这一相互作用的关键分子是载脂蛋白。了解HCV生活周期和脂蛋白代谢有利于发现抗HCV治疗的潜在靶点和指导疫苗的设计工作。本文就HCV生活周期与脂蛋白代谢之间的关联作一综述。

[关键词] 丙型肝炎病毒;脂蛋白;载脂蛋白;脂蛋白代谢

Research progress on lipoprotein metabolism in the hepatitis C virus life cycle

YANG Yinrong¹, WANG Qian^{1,2*}

(1. Clinical Laboratory of Qilu Hospital of Shandong University (Qingdao), Qingdao, Shandong, China, 266000; 2. Clinical Laboratory of Qilu Hospital of Shandong University, Qingdao, Shandong, China, 250012)

[ABSTRACT] Hepatitis C virus (HCV) is an important cause of chronic liver disease, including HCC. Due to the lack of self-lipid synthesis pathway, HCV has evolved the process of using host lipid metabolism to complete the replication of intracellular virus. Lipoproteins are the carriers of lipid transport. Triglycerides, free cholesterol, cholesterol esters and phospholipids are the main components of lipid transport. More and more studies have shown that all stages of the entry, replication, assembly and excretion of HCV life cycle are closely related to the metabolism of lipoproteins, and the key molecule mediating this interaction is apolipoproteins. Therefore, understanding the life cycle and lipoprotein metabolism of HCV is helpful to find potential targets of anti HCV therapy and guide the design of vaccine. In this review, we summarized the studies on the relationship between HCV life cycle and lipoprotein metabolism.

[KEY WORDS] hepatitis C virus; lipoprotein; apolipoprotein; lipoprotein metabolism

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链RNA病毒,属于黄病毒科丙肝病毒属,是丙型肝炎的致病因子。流行病学调查,全球约2%~3%的人感染HCV,80%以上的感染者不能自发清除HCV,进而引起持续性感染,持续性感染者可演变成慢性肝炎、肝硬化和原发性肝细胞癌^[1]。尽管目前已研制出了针对HCV有效的抗病毒药物,这类药物多是以病毒蛋白酶为靶点,疗

效强但长期用药后容易产生耐药性。因此,开发HCV疫苗以及其他新型HCV抗病毒药物仍然具有重要前景。

近年来与HCV生活周期各环节有关的宿主细胞因子得到广泛研究,越来越多的研究证明,HCV的生活周期与宿主脂质代谢密切相关^[2]。HCV的组装和分泌途径与脂蛋白的产生和分泌密不可分,其颗粒的感染性在很大程度上取决于脂蛋白的相

基金项目:973子课题(2015CB755402),吴阶平医学基金资助课题(320.6750.17181);山东省科技攻关课题(2013GSF11824)

作者单位:1. 山东大学齐鲁医院(青岛)检验科,山东,青岛 266000

2. 山东大学齐鲁医院检验科,山东,济南 250012

*通信作者:王谦, E-mail:sd.wangqian@163.com

互作用。此外, HCV 进入肝细胞后受脂蛋白的强烈影响, 介导这些相互作用的关键脂蛋白分子是载脂蛋白。了解 HCV 的生命周期与脂蛋白代谢之间的关系可为抗病毒药物的研发提供新的研究靶点。并且这类药物的作用机制不直接作用于病毒本身, 因此就有可能降低耐药的几率, 还可能具有更加广谱的抗病毒优势。

1 脂蛋白代谢

脂蛋白是一类球状微粒, 由富含固醇脂、甘油三酯的疏水性内核和蛋白质、磷脂、胆固醇等组成的外壳构成。脂蛋白是血液中不溶性脂类的载体, 根据其密度大小分为: 乳糜微粒(chylomicrons, CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)、中间密度脂蛋白(intermediate density lipoproteins, IDL)、低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoproteins, HDL)。CM 和 VLDL 是富含甘油三酯的脂蛋白, 而 LDL 和 HDL 含有丰富的胆固醇。CM 颗粒最大, 密度最低, 而 HDL 颗粒最小, 密度最高。

载脂蛋白(Apo)是脂蛋白颗粒表面的两亲性蛋白质, 在肝脏(部分在小肠)合成, 是极其活跃的一组血浆蛋白质, 在血浆脂蛋白代谢中具有促进脂类运输, 调节酶活性, 引导血浆脂蛋白同细胞表面受体结合等功能。载脂蛋白主要分为 Apo A、Apo B、Apo C、Apo D、Apo E 五类。根据生物学和结构特征, 载脂蛋白也可分为可交换和不可交换的载脂蛋白。Apo B100 是一种与 LDL 和 VLDL 颗粒结合的不可交换性蛋白质, 而其他载脂蛋白则是可交换蛋白。Apo A I 和 Apo A II 是 HDL 的主要载脂蛋白, Apo C II 是介导 CM 和 VLDL 颗粒水解不可缺少的脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)的激活剂, 而 Apo C III 则具有抑制 LPL 的功能。这些可交换载脂蛋白主要存在于 CM、VLDL 和 HDL 颗粒的表面。脂蛋白代谢途径包括外源性途径和内源性途径。脂蛋白代谢的主要途径见图 1^[3]。

2 脂蛋白代谢对 HCV 生命周期的影响

HCV 建立了一个复杂的与宿主细胞相互作用的网络, 以维持其复制循环的所有步骤。与其他单股正链 RNA 病毒类似, HCV 首先吸附于细胞膜表面的病毒受体或辅助受体, 然后由 HCV 包膜蛋白

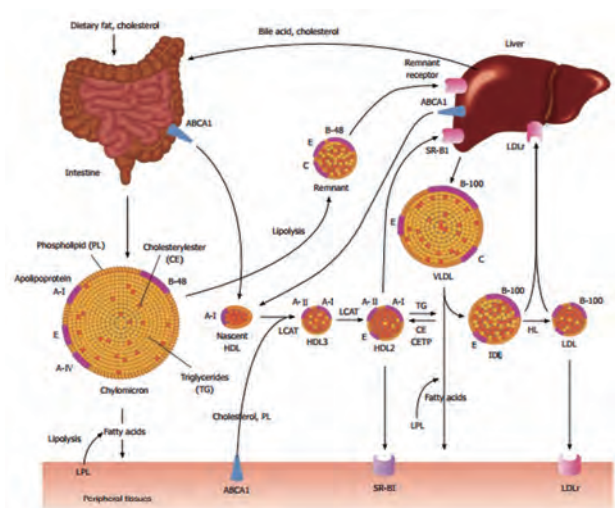


图 1 脂蛋白代谢的主要途径

Figure 1 The main pathway of lipoprotein metabolism

E1 和 E2 介导病毒进入细胞。HCV 使用的是一种包括脂质和脂蛋白受体在内的入胞因子组合, 已知与 HCV 吸附及入胞有关的细胞表面蛋白包括: claudin-1、B 类清道夫受体 I 型(scavenger receptor class B type 1, SRB1)、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, VLDLR)、CD81 和闭塞素等^[4], 因此, 干扰这某些入胞蛋白能否发现临床抗病毒药物的潜在靶点值得探究。

HCV 基因组编码十种蛋白质, 包括核心蛋白 C、包膜糖蛋白 E1 和 E2, 以及 p7 病毒肽 4 种结构蛋白和 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 6 种非结构蛋白。所有的病毒蛋白在 HCV 感染中都有特定的功能, 以协助完成 HCV 的复制过程, 是病毒形态发生的必要条件^[5], HCV 的复制始于修饰的内质网膜即由 NS4B 与 NS5A 诱导形成的囊泡结构上^[6]。HCV RNA 和非结构蛋白 NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 以及某些细胞蛋白共同在内质网膜上组装成 HCV 复制复合体, 复制复合体形成是 HCV 复制的标志。其中非结构蛋白参与内质网膜的形成和修饰, 而体内的一些宿主蛋白则被募集到网状复合物中, 参与调控膜复合物的脂质组成, 为病毒复制提供稳定场所^[6]。

肝细胞内富含鞘磷脂和胆固醇的动态细胞器脂滴(Lipid droplet, LDs)在 HCV 复制和病毒颗粒的装配中发挥了重要作用^[7]。装配的开始阶段发生在与 LDs 相互作用的内质网的胞质侧, HCV 核心蛋白转运与 LDs 密切相关^[8], 核心蛋白通过与 NS2 和 NS3-4A 的相互作用被招募到 HCV 装配位点^[9]。在

后期的组装步骤中,包膜糖蛋白E1和E2结合到病毒颗粒上^[10],跨膜蛋白NS2通过介导未成熟病毒颗粒与膜糖蛋白E1/E2的相互作用在病毒的组装中发挥了非常关键的作用^[11]。新生病毒颗粒在成熟过程中与前VLDLs结合^[12]。通过这种方式,LDs管腔中的Apo B100、Apo E和APO C I参与生成脂类病毒颗粒(Lipid Virus Particles, LVPs),形成真正的HCV和VLDL杂合颗粒。Apo B100不是HCV-LVPs形态发生的必要条件,相反,Apo C I和Apo E是HCV-LVPs细胞内形态产生不可或缺的因素^[13]。以这样的方式,HCV病毒颗粒的成熟和分泌过程与VLDL的组装和分泌链接在了一起。微粒体甘油三酯转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)是产生VLDL的关键分子,通过下调MTP抑制了丙型肝炎病毒的复制^[14]。在感染细胞中,四胱氨酸标记的核心蛋白与GFP标记的Apo E一起运输也证明了这一观点^[15]。新合成的HCV-LVPs最终以VLDL依赖的方式从感染的细胞中释放。多项研究证明了Apo E和VLDL通路在病毒释放中的重要作用^[16]。

3 HCV颗粒的特征、感染与脂蛋白代谢的关系

HCV病毒颗粒的一个显著特性是其低密度,并且密度范围大,颗粒的大小和形状呈现较大的不均一性,感染性HCV颗粒的密度为(1.03~1.10)g/mL。这一密度与血清脂蛋白类似^[17]。各类脂蛋白VLDL、LDL、IDL和HDL之间是交换脂质和载脂蛋白的动态群体,除了Apo B外,其他载脂蛋白可逆地结合在脂蛋白表面,脂蛋白类别在血液循环中可以相互切换。同样地,与其他黄病毒科病毒不同的是HCV的密度范围不仅很宽,而且是动态的,受体内饮食中甘油三酯和宿主细胞的影响^[18],这表明脂蛋白和LVPs之间的脂质在血循环中可以相互转移的^[18],宿主细胞脂蛋白代谢状态与颗粒特性关系密切。通常,培养细胞的HCV可感染黑猩猩和人肝嵌合体小鼠等动物,但从这些动物分离出的HCV比培养细胞中HCV显示出更低的颗粒密度和更高的传染性^[19]。同样地,HCV感染患者血清中分离出的HCV也显示了更低的密度和更高的特异感染性,如果将分离出的病毒颗粒在细胞系中培养,这种特性就会消失^[20],提示低密度HCV颗粒可能含有与感染性相关的蛋白成分。高传染性HCV颗粒的密度小

于1.07 g/mL,与LDL或VLDL的密度相对应,其平均粒径为73 nm,与VLDL的粒径相对应^[17]。因此,感染性HCV颗粒的物理性质与VLDL颗粒非常相似。感染性HCV颗粒具有Apo E和Apo C I-Apo C-III在表面上,正如VLDL颗粒^[21]。随着电镜技术的发展,使用针对HCV糖蛋白天然表位或工程标记的有效抗体或针对载脂蛋白的有效抗体^[22],证实了:丙肝病毒病毒颗粒大小不一,在40~140 nm的范围内;丙肝病毒不具有明显的对称性,无论是其包膜还是其衣壳。

在病毒形态发生过程中结合宿主细胞蛋白是一种比较常见的现象^[23]。HCV除了3种结构蛋白外,还有一系列载脂蛋白被结合在病毒包膜内,并实际参与病毒颗粒进入细胞和保护病毒免受抗体介导的中和作用^[24]。通过免疫纯化的病毒质谱检测也证实了载脂蛋白是HCV颗粒一部分的结论^[25]。在HCV颗粒中结合的多种载脂蛋白已被证实的有Apo B、Apo A I、Apo C I、Apo C II、Apo C III和Apo E^[24]。近年来,基因敲除技术的发展使得载脂蛋白在HCV产生中的作用有了新的认识:Apo E是HCV形态发生的关键脂蛋白因素,实际上所有与Apo E相关的可交换载脂蛋白以及Apo B都能够修复HCV的产生^[26]。这表明真正影响HCV生活周期的不是特定的氨基酸序列,而是蛋白的结构即Apo E的双亲螺旋结构,这个结构也存Apo B中,而Apo B是HCV装配的关键决定因素^[26]。许多研究已经解决了Apo E在HCV生成过程中所起的作用,在肝癌细胞系中证实Apo E表达受抑制或被阻断^[27],病毒在没有Apo E的情况下进行包膜复制,在细胞内和细胞外均不产生传染性病毒,这表明Apo E对于病毒组装的包膜后步骤是必不可少的^[28]。虽然在293t细胞株Apo E补足时,核心定位没有明显差异^[28],然而,已有研究证实核心蛋白积聚在Apo B/Apo E双基因敲除的huh-7细胞的LDs表面^[26]。总之,Apo E参与了HCV的成熟,并赋予其感染性。

4 HCV与宿主脂蛋白代谢和载脂蛋白的相互作用

随着HCV体外培养系统的建立以及研究的不断深入,人们发现一方面脂质通过提供细胞内膜表面、脂质、能量和蛋白质等重要组分来参与HCV生活周期,在病毒复制过程中发挥重要作用。另一方面HCV也能够调节细胞内脂质代谢,营造富含脂质

的内环境以利于病毒复制,并对宿主细胞的脂质代谢产生影响。

HCV 复制对脂蛋白代谢的影响主要表现为慢性 HCV 感染者血清脂蛋白水平降低,以及肝实质细胞中脂类堆积造成肝脂肪变性等。低 LDL 水平是慢性 HCV 感染的显著特点^[29-30]。脂质代谢改变的程度取决于宿主干扰素 $\lambda 3$ (Interferon $\lambda 3$, IFN $\lambda 3$) 基因多态性和 HCV 基因型:rs12979860 多态性 CC 型 (IFN $\lambda 3$ 主要的基因型)合并 HCV 基因型 1(G1)患者表现为较高的 LDL 水平,但 HCV 基因型 3(G3)、基因型 4(G4)或未感染对照组的 LDL 水平则无相关性^[31]。日本的一项研究显示 HCV 本身直接导致了低血脂的发生,HCV 根除后,紊乱的脂质得到纠正^[32]。

慢性 HCV 感染所伴随的炎症和脂肪变性可能受脂蛋白代谢紊乱的影响。HCV 核心蛋白转基因小鼠肝脏细胞发生脂肪变性的研究表明了 HCV 感染与脂肪变性的发生密切相关^[33]。此外,HCV 感染的肝细胞经过长期的培养后,由于持续的脂质代谢紊乱,HCV 核心蛋白具备了致癌潜力^[34]。与慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)相比,脂肪变性慢性丙型肝炎(Chronic hepatitis C, CHC)炎症的关系更为密切^[35]。CHC 的脂肪变性可能导致后续的炎症和肝纤维化的进展。

Apo A I 已被证实参与 HCV RNA 复制和病毒颗粒的产生^[36],而 Apo A II 直接与 HCV 核心蛋白的 C-末端结构域结合^[37]。研究证明 Apo A II 与 HCV 患者 HOMA-IR (抗胰岛素性稳态模式评估法)和瘦素显著相关^[38],因此,Apo A II 可能参与 HCV 感染细胞肝脂肪变性的进展。然而,也有研究支持在 HCV-G1b 患者中,Apo A II 水平似乎升高,而体重指数并没有随之增加^[39]。因此血清 Apo A II 在慢性 HCV 感染中的意义有待进一步研究。血清中 Apo B 100 被证实与 HCV 感染的持续性和干扰素疗效有关^[40]。与其他脂蛋白相比,Apo C III 水平与慢性病毒感染清除的相关性最强,随着肝纤维化程度的加重而下降^[41],提示 Apo C III 可能是与 HCV 相关的肝纤维化进展相关的潜在生物标记。

Apo E 是 HCV 组装和进入肝细胞的关键分子之一。Apo E 有 3 个等位基因(E2、E3 和 E4),其中 E3 是最常见的。E2 与细胞表面受体结合不良,使得 HCV 慢性感染风险降低 3~5 倍^[42]。E4 可能对 HCV 引起的严重肝损伤有保护作用^[43]。此外,在 Apo

E3/E3 纯合子中,转氨酶持续正常的慢性丙型肝炎患者的纤维化进程可能加快^[44]。因此 Apo E 亚型可能是慢性 HCV 感染发病率差异的原因之一。

展望

HCV 是一种独特的病毒,它巧妙地利用宿主脂蛋白代谢途径建立起了适宜自身增殖的环境。HCV 和脂蛋白代谢在 HCV 生命周期的多个阶段密切相关。HCV 感染可能对脂蛋白代谢产生影响,而脂蛋白也可以调节 HCV 的复制。脂蛋白代谢紊乱与炎症活动、肝纤维化进展和肝癌发展密切相关。最近发现脂蛋白无关蛋白可以替代载脂蛋白在丙肝病毒的组装、释放和进入中的作用^[16],这无疑为肝外丙型肝炎病毒库的建立和疫苗的研制开辟了新的研究途径。

未来的研究还有待于进一步阐明不同脂类、脂肪酸及脂蛋白在 HCV 感染周期中的具体功能及其分子机制,以及临床上 CHC 的发生发展及抗病毒治疗效果与患者血清中的脂类和脂蛋白水平的紧密联系。我们相信深入研究 HCV 与其宿主脂蛋白代谢之间的这种独特相互作用,可进一步揭示宿主对 HCV 感染易感性的新的遗传决定因素和激发新的疫苗概念平台,以及针对 HCV-LVPs 颗粒特性衍生抗 HCV 治疗的潜在靶点,以更加有效的应对 HCV 的耐药问题。

参考文献

- [1] Schauer C, van Rijnssoever M, Gane E. Surveillance factors change outcomes in patients with hepatocellular carcinoma due to chronic hepatitis C virus infection in New Zealand [J]. J Viral Hepat, 2019 [Epub ahead of print]
- [2] Branche E, Conzelmann S, Parisot C, et al. Hepatitis C Virus Increases Occludin Expression via the Upregulation of Adipose Differentiation-Related Protein [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146000.
- [3] Yoshio Aizawa, Nobuyoshi Seki, Tomohisa Nagano, et al. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. World J Gastroenterol, 2015, 21(36): 10299-10313.
- [4] Ploss A, Evans MJ. Hepatitis c virus host cell entry [J]. Curr Opin Virol, 2012, 2: 14-19.
- [5] 徐楚,张平安. 慢性丙型肝炎病毒感染与模式识别受体的研究进展 [J]. 职业与健康, 2018, 34(7): 1000-1004.

- [6] Paul D, Hoppe S, Saher G, et al. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment [J]. *J Virol*, 2013, 87(19): 10612-10627.
- [7] Falcón V, Acosta-Rivero N, González S, et al. Ultrastructural and biochemical basis for hepatitis C virus morphogenesis [J]. *Virus Genes*, 2017, 53(2): 151-164.
- [8] Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, et al. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets [J]. *Virology*, 2014, 462-463:166-174.
- [9] Boyer A, Dreneau J, Dumans A, et al. Endoplasmic Reticulum Detergent-Resistant Membranes Accommodate Hepatitis C Virus Proteins for Viral Assembly [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 487.
- [10] Vieyres G, Dubuisson J, Pietschmann T. Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion [J]. *Viruses*, 2014, 6(3): 1149-1187.
- [11] Shanmugam S, Saravanabalaji D, Yi M. Detergent-resistant membrane association of NS2 and E2 during hepatitis C virus replication [J]. *Virology*, 2015, 89(8): 4562-4574.
- [12] Takacs CN, Andreo U, Dao Thi VL, et al. Differential Regulation of Lipoprotein and Hepatitis C Virus Secretion by Rab1b [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(2): 431-441.
- [13] Syed GH, Khan M, Yang S, et al. Hepatitis C Virus Lipovirions Assemble in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Bud off from the ER to the Golgi Compartment in COPII Vesicles [J]. *Virology*, 2017, 91(15).
- [14] Mirandola S, Bowman D, Hussain MM, et al. Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP) [J]. *Nutr Metab (Lond)* 2010, 7(1): 13.
- [15] Coller KE, Heaton NS, Berger KL, et al. Molecular determinants and dynamics of hepatitis c virus secretion [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(1): e1002466.
- [16] Lee JY, Acosta EG, Stoeck IK, et al. Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins [J]. *J Virol*, 2014, 88(21):12422-12437.
- [17] Gabrielle Vieyres, Thomas Pietschmann. HCV Pit Stop at the Lipid Droplet: Refuel Lipids and Put on a Lipoprotein Coat before Exit [J]. *Cells*, 2019, 8(3), 233.
- [18] Felmlee DJ, Sheridan DA, Bridge SH, et al. Intravascular transfer contributes to postprandial increase in numbers of very-low-density hepatitis c virus particles [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(5): 1774-1783.
- [19] Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, et al. Cell culture-grown hepatitis c virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3805-3809.
- [20] Podevin P, Carpentier A, Pene V, et al. Production of infectious hepatitis c virus in primary cultures of human adult hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(4): 1355-1364.
- [21] Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, et al. Amphipathic α -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(12): e1004534.
- [22] Piver E, Boyer A, Gaillard J, et al. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture [J]. *Gut*, 2017, 66(8): 1487-1495.
- [23] Knodel MM, Targett-Adams P, Grillo A, et al. Advanced Hepatitis C Virus Replication PDE Models within a Realistic Intracellular Geometric Environment [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(3): 513.
- [24] Wrensch F, Crouchet E, Ligat G, et al. Hepatitis c virus (hcv)-apolipoprotein interactions and immune evasion and their impact on hcv vaccine design [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1436.
- [25] Lussignol M, Kopp M, Molloy K, et al. Proteomics of hcv virions reveals an essential role for the nucleoprotein nup98 in virus morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(9): 2484-2489.
- [26] Weller R, Hueging K, Brown RJP, et al. Hepatitis C Virus Strain - Dependent Usage of Apolipoprotein E Modulates Assembly Efficiency and Specific Infectivity of Secreted Virions [J]. *J Virol*, 2017, 91(18): e00422-00517.
- [27] Ganesh S, Koser ML, Cyr WA, et al. Direct Pharmacological Inhibition of β -Catenin by RNA Interference in Tumors of Diverse Origin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(9): 2143-2154.
- [28] Hueging K, Doepke M, Vieyres G, et al. Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis c virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly [J]. *Virology*, 2014, 88(3): 1433-1446.
- [29] Steba GS, Koekkoek SM, Tanck MWT, et al. SNP rs688 within the low - density lipoprotein receptor (LDL - R) gene associates with HCV susceptibility [J]. *Liver Int*, 2019, 39(3): 463-469.

下一代测序法检测乙型肝炎病毒 YMDD 突变的方法学建立及性能评价

余学高 邓间开 陈耀铭 陈培松 何小洪 钟良英 黄彬*

[摘要] 目的 建立乙型肝炎病毒 YMDD 突变的下一代测序法,并对此方法进行性能评价。方法 采用离心柱法提取血清标本中的 DNA,设计引物对乙型肝炎病毒 P 基因区扩增并靶向捕获,通过下一代测序技术对捕获的 DNA 进行检测,利用生物信息学分析软件系统对检测结果进行分析,得到基因突变结果,建立下一代测序用于乙型肝炎病毒 YMDD 突变的检测方法。收集慢性乙型肝炎患者血清样本共 229 例,采用下一代测序法和 Sanger 测序法同时检测 YMDD 基因突变,评价下一代测序法的检测性能。选取 5 例基因突变阳性的样本(包含不同基因突变型别)、2 例基因突变阴性样本,采用下一代测序法对所选样本进行重复检测,评价该方法的重复性。结果 建立了乙型肝炎病毒 YMDD 突变的下一代测序检测方法。对 229 份临床样本的检测中,2 种测序方法均检测到 74 例(74/229, 32.31%) YMDD 突变,其中下一代测序法检测到 44 例(44/229, 19.21%)rtM204V 突变,25 例(25/229, 10.92%)rtM204I 突变,5 例(5/229, 2.18%) rtM204V/I 混合突变。Sanger 测序法检测到 47 例(47/229, 20.52%)rtM204V 突变、25 例(25/229, 10.92%) rtM204I 突变和 2 例(2/229, 0.87%)rtM204V/I 混合突变。下一代测序法检测到 3 例 Sanger 测序法漏检的 rtM204V/I 混合突变。与 Sanger 测序法相比,下一代测序法的灵敏度、特异度和准确度均为 100%,突变类别完全符合率为 95.95% (71/74),部分符合率为 4.05% (3/74)。2 种方法的一致性(κ)为 0.97 ($P < 0.01$)。经重复性试验检测,下一代测序法的检测结果均一致,重复性符合率为 100%。结论 本研究建立的乙型肝炎病毒 YMDD 突变的下一代测序法灵敏度高,特异性好,重复性好,准确性高,比 Sanger 测序法更灵敏,能检测到更多的混合突变,为乙型肝炎病毒耐药基因检测提供了新的手段。

[关键词] 下一代测序法; Sanger 测序法; YMDD; HBV 耐药基因

Establishment and evaluation of next-generation sequencing for the detection of hepatitis B virus YMDD-motif mutations

YU Xuegao, DENG Jiankai, CHEN Yaoming, CHEN Peisong, HE Xiaohong, ZHONG Liangying, HUANG Bin*

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] Objective A next-generation sequencing (NGS) was established for the detection of hepatitis B virus (HBV) YMDD mutations and its performance was also evaluated. Methods DNA was extracted from serum samples by centrifugation column, and primers were designed to amplify the P gene region of HBV and the PCR products were captured by the target followed by NGS. The detection results were analyzed by using the bioinformatics software system to establish the NGS for the detection of HBV YMDD mutations. A total of 229 serum samples from patients with chronic HBV were collected. The NGS and Sanger sequencing were used to detect the YMDD gene mutations simultaneously, and the detection performance for

基金项目:广东省科学基金(2014A030313143)

作者单位:中山大学附属第一医院检验医学部,广东,广州 510080

*通信作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

NGS was evaluated. Five positive samples (including different types of gene mutations) and two negative samples were selected to detect repeatedly by NGS and the results were evaluated. **Results** Among 229 clinical samples, 74 (74/229, 32.31%) YMDD mutations were detected by two sequencing methods. Of which 44 (44/229, 19.21%) were detected by NGS, 25 (25/229, 10.92%) were detected by rtm204i mutations, and 5 (5/229, 2.18%) rtm204v / I mixed mutations. 47 (47/229, 20.52%) rtm204v mutations, 25 (25/229, 10.92%) rtm204i mutations and 2 (2/229, 0.87%) rtm204v / I mixed mutations were detected by Sanger sequencing. Three cases of rtm204v/I mixed mutation missed by Sanger sequencing were detected by NGS. Compared with Sanger sequencing, the sensitivity, specificity and accuracy of NGS are 100%. The complete coincidence rate was 95.95% (71/74), and the partial coincidence rate was 4.05% (3/74). The consistency of the two methods was 0.97 ($P < 0.01$). The repeatability coincidence rate between two methods is 100%. **Conclusion** The NGS for the detection of HBV YMDD mutations has been established. This method is more sensitive than Sanger sequencing and can detect more mixed mutations providing a new method for the detection of drug-resistant genes of HBV.

[KEY WORDS] Next generation sequencing; Sanger sequencing; YMDD; HBV resistance genes

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起。全球约有3.6亿HBV感染者,每年约有100万人死于与HBV相关的肝脏疾病^[1]。我国属于HBV感染的高发区,现有的慢性HBV感染者约9300万例^[1]。拉米夫定(lamivudine, LAM)是一种有效的抗病毒药物,用于治疗慢性乙型肝炎和晚期肝病^[2-3]。然而,长期的拉米夫定单药治疗导致了抗拉米夫定乙型肝炎病毒的出现,治疗1年后,16%~55%的患者出现了病毒突破^[4-5]。LAM抗性主要与HBV聚合酶基因的酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(tyrosine-methionine-aspartate-aspartate, YMDD)基序204位突变有关。常见突变是甲硫氨酸变为缬氨酸(reverse transcriptase methionine 204 valine, rtm204v)或异亮氨酸(reverse transcriptase methionine 204 isoleucine, rtm204i)^[6-7]。病毒学突破与丙氨酸转氨酶升高分别发生在YMDD突变出现后的2~28周和12~31周^[8-10]。因此,早期检测耐LAM突变及进行治疗监测,将有助于医生为慢乙肝患者制订个性化治疗方案。本研究中,我们建立了乙型肝炎病毒YMDD突变的下一代测序检测方法,并对该方法进行性能评价,以期为临床检测乙型肝炎病毒耐药基因提供新手段。

1 材料与方法

1.1 样本

选取2017年1月至12月间在中山大学附属第一医院接受LAM单药治疗至少3个月的乙型肝炎病毒感染患者,用无菌分离胶管采集患者外周

血5 mL, 3 500 rpm离心5 min,分离的血清样本用于临床常规HBV DNA荧光定量PCR检测,HBV DNA大于100 IU/mL的患者入组,共229例,其中男性182例,女性47例。年龄17~77岁,平均年龄(46.1±13.63)岁。将入组患者血清转移到无菌低吸附Eppendorf管内,冻存于-80℃冰箱备用。

1.2 仪器与试剂

ABI 9700 PCR仪(LOT N8050200)、磁力架(LOT 4314)、One Touch2仪器(LOT 2457881-5247)、ES仪器(LOT 74200)、DA8600下一代测序仪(LOT sn247560288)、ABI 3500 DX基因分析仪(LOT 4406019)、Qubit 3.0荧光定量仪(LOT 2321609904)等仪器均购自美国Life Technology公司,核酸提取试剂盒(LOT #DA-Z14648)购自中山大学达安基因股份有限公司, SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒(LOT B518141-0100)购自上海生物工程技术有限公司, Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0(LOT 4480441)、Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit(LOT A26434)、Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 kit(LOT 4488315)、Qubit® dsDNA HS Assay kit(LOT 1788710)试剂均购自美国Life Technology公司。

1.3 方法

1.3.1 下一代测序法检测YMDD突变

1.3.1.1 样本核酸提取 采用核酸提取试剂盒(离心柱法)提取血清标本中的DNA,按照试剂盒说明书进行操作,使用Qubit 3.0荧光定量仪进行核酸定量。提取后的DNA保存于-20℃。

1.3.1.2 病毒DNA扩增及纯化 采用定性PCR方法对HBV P基因区进行扩增并靶向捕获。根据HBV P基因区设计引物(引物序列见表1),PCR扩增条件如下:95℃预变性15 min;然后94℃变性30 s,55℃复性30 s,72℃延伸45 s,共40个循环;最后72℃延伸7 min。采用上海生物工程有限公司的SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒纯化PCR扩增产物,用Qubit 3.0荧光定量仪对纯化后的核酸定量。纯化后的DNA置于-20℃保存。

表1 PCR扩增的目的区域引物序列

Table 1 Primer sequence of target region for PCR amplification

引物	序列	目的区域
正向引物1	5'-ACAACCAGCACGGGACC-3'	乙型肝炎病毒
反向引物1	5'-GCGGGATAGGACAACAGAG-3'	P基因区

1.3.1.3 文库构建 严格按照文库构建试剂盒说明书对纯化后的PCR产物进行文库构建:①末端补平:按要求配制末端补平反应液进行反应;②产物纯化:对末端补平后的产物进行磁珠纯化;③连接接头:按要求分别加相应接头;④产物纯化:对连接接头产物进行磁珠纯化;⑤扩增文库:按要求配制反应体系进行文库扩增;⑥产物纯化:对扩增文库产物进行磁珠纯化;⑦文库定量:采用Qubit 3.0荧光定量仪对文库核酸定量。构建好的文库置于-20℃保存。

1.3.1.4 模板制备和模板富集 构建好的DNA文库经过稀释后使用Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit(Life Technologies公司,美国)试剂盒,在One Touch2仪器及ES仪器(Life Technologies公司,美国)上严格按照说明书操作,进行模板的制备和富集。

1.3.1.5 DA8600测序仪测序 使用Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 kit(Life Technologies公司,美国)试剂盒,严格按照说明书操作,对上一步实验收集到的混合文库样本进行下一代测序。

1.3.1.6 结果分析 运用生物信息学分析系统,运行variantCaller插件,在“Allele Call”项目下,显示为“Absent”或“No Call”,则对应的突变点无突变即为YMDD型。在“Allele Call”项目下,显示为“Heterozygous”或“Homozygous”,则对应的突变位点有突变,判定为对应突变类别(YVDD或YIDD),详见表2。

表2 YMDD突变类别

Table 2 Mutation category of YMDD

基因名称	突变类别	碱基变化
HBV	YVDD	739A>G
HBV	YIDD	741G>T

1.3.2 Sanger测序

使用中山大学达安基因股份有限公司生产的乙型肝炎病毒耐药基因突变检测试剂盒(PCR-测序法)(国食药监械(准)字2014第3401444号),严格按照试剂盒说明书检测并分析结果。具体操作流程:①核酸提取:使用核酸提取试剂盒(离心柱法);②PCR试剂准备:按要求准备PCR扩增体系试剂;③加样;④PCR扩增:按下列条件扩增:50℃ 2 min,95℃ 15 min预变性,然后94℃变性30 s,55℃复性30 s,72℃延伸45 s,共40个循环;最后72℃延伸7 min;⑤产物纯化:按要求进行产物纯化;⑥测序PCR:按要求配制测序PCR体系,按下列条件扩增:96℃ 1 min预变性,然后96℃变性10 s,50℃复性5 s,60℃延伸4 min,共25个循环;最后4℃保温;⑦测序产物纯化:按要求参照BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit用户手册进行纯化;⑧ABI 3500 DX基因分析仪测序:按要求上机测序;⑨结果分析:运行SeqScanner程序,分析结果。

1.4 统计学分析

采用SPSS软件进行方法学比较的数据分析,Kappa(κ)系数检验进行方法学比较的一致性分析。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立下一代测序法检测YMDD突变的方法

在229份慢乙肝样本中,下一代测序法检测到44例rtM204V突变,25例rtM204I突变,5例rtM204V/I混合突变。

2.2 下一代测序法检测YMDD突变的方法学评价

下一代测序法和Sanger测序法均在229份慢乙肝样本中检测到74例YMDD突变。其中Sanger测序法检测到47例rtM204V突变、25例rtM204I突变和2例rtM204V/I混合突变。下一代测序法的灵敏度100%,特异度100%,准确度100%。2种测序方法检测到的突变类型完全符合率为95.95%(71/

74),部分符合率为4.05% (3/74),未发现完全不一致(0/74,0%)(图1)。下一代测序法检测到3例Sanger测序法漏检的rtM204V/I混合突变。

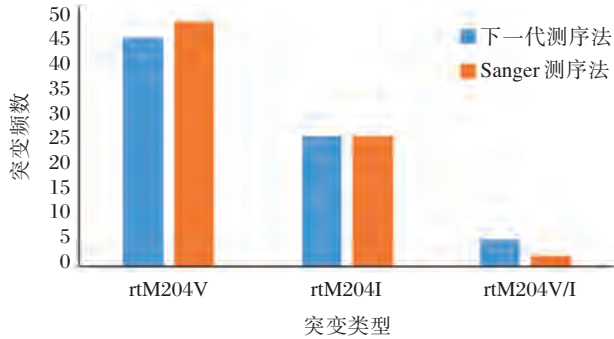


图1 下一代测序法与Sanger测序法检测YMDD突变的结果比较

Figure 1 The comparison of next generation sequencing method and Sanger sequencing method

2.3 下一代测序法的重复性

根据Sanger测序法的结果,选取5例基因突变阳性的样本(包含YIDD突变2例,YVDD突变3例)、2例基因突变阴性样本,采用下一代测序法对所选样本进行重复检测,每天上机检测一次,连续重复检测10天。经重复性试验检测,下一代

测序法的检测结果均一致,重复性符合率为100%。

2.4 下一代测序法与Sanger测序法的方法学比较

下一代测序法与Sanger测序法的方法学比较结果见表3,2种方法检测YMDD突变的一致性良好(Kappa=0.97, P<0.01)。

表3 下一代测序法与Sanger测序法检测YMDD突变的比较

Table 3 The comparison of the next generation sequencing and Sanger sequencing for detection of YMDD mutations

	下一代测序法		κ值	P值
	阳性	阴性		
Sanger 测序法	阳性	71	0.97	0.000
	阴性	3		

2.5 3例检测结果不一致的分析

下一代测序法与Sanger测序法有3例样本的检测结果不一致,Sanger测序法均只检出YVDD突变,而下一代测序法检出YVDD/YIDD混合突变。这3例患者均为高龄,男性,2例肝硬化,1例肝癌,均为长期用药患者,HBV DNA载量在 $10^3 \sim 10^5$ IU/mL(见表4)。

表4 下一代测序法与Sanger测序法3例检测结果不一致的分析

Table 4 Analysis of inconsistent results between next generation sequencing and Sanger sequencing

样本编号	年龄	性别	下一代测序法	Sanger 测序法	临床诊断	HBV-DNA(IU/mL)
HBV-53	51	男	YVDD&YIDD	YVDD	肝硬化	1.16×10^4
HBV-71	66	男	YVDD&YIDD	YVDD	肝硬化	1.53×10^5
HBV-120	65	男	YVDD&YIDD	YVDD	肝癌	2.14×10^3

3 讨论

HBV感染主要的治疗方法是抗病毒治疗,国内外普遍使用的药物有干扰素和核苷(酸)类似物。由于干扰素需要反复注射,且副作用较多,近年来,核苷(酸)类似物(nucleoside acid analogues, NA)已成为抗HBV感染的主要方法之一。NA因其抑制病毒复制能力强、使用方便、耐受性好且疗效确切,适用于不同阶段的乙肝患者,是长期治疗的合理选择^[11-13]。乙肝患者在长期治疗中常常对药物出现耐受的情况,是因为HBV是高变异的病毒,在患者接受抗病毒药物治疗时,病毒自身受生存压

力而导致变异^[1]。拉米夫定是第一个被批准用于治疗慢性乙型肝炎的核苷类似物,能显著降低HBV DNA水平,并可使患者肝功能恢复正常和肝脏组织学改善。HBV YMDD变异对拉米夫定用药产生影响,基因组变异为rt180、rt204和rt207^[14-16]。目前比较明确与耐药相关的变异主要是HBV聚合酶RT区YMDD基因序列的变异(rt204),发生YVDD或者YIDD变异,导致HBV野生株中蛋氨酸被缬氨酸或异亮氨酸替代。当HBV出现耐药株后,大量复制,严重影响治疗的效果^[17]。因此需要监测乙型肝炎病毒耐药基因型,有助于临床判断治疗效果和制定个性化抗病毒治疗方案。

目前常用的检测 HBV 耐药基因的方法主要有 PCR 产物直接测序法(即 Sanger 测序法)、克隆测序法、基因芯片法、PCR-荧光探针法和斑点杂交等方法,不同检测技术的特异性及灵敏度有一定的差异,Sanger 测序法被认为是检测 DNA 变异的金标准,但由于灵敏度较低限制了其应用。该方法只在特定突变达 20% 以上时才能检测出。克隆测序法可大致确定不同毒株序列之间的相对比例,有助于发现混合株,但是操作繁琐且灵敏度有限。此外,基因芯片法、PCR-荧光探针法和斑点杂交法在临床上均有使用,针对每一个位点分别设计探针或引物,灵敏度各不相同,都只能检测已知的耐药突变位点,效率低下^[18-19]。

下一代测序技术是能在单次反应中同时检测来自数千或数百万 DNA 模板上碱基序列的 DNA 测序技术。该技术具有高数据通量、短序列读长等特征。目前下一代测序平台主要有基于荧光检测的 illumina 测序平台和基于质子检测的 Life 半导体测序平台。随着测序成本的下降,下一代测序技术越来越多地用于疾病研究和诊断治疗中^[20-21]。

本研究建立了下一代测序法检测乙型肝炎病毒 YMDD 突变的方法,并对所建方法进行了评价。下一代测序法对 229 例临床样本的检测结果显示,YMDD 基因突变阳性率为 32.31% (74/229),比宋世会等^[22]和张笠等^[23]报道的高,可能是本研究着重选取长期拉米夫定单药治疗患者和地域差异导致。Sanger 测序法检测到 47 例 rtM204V 突变、25 例 rtM204I 突变和 2 例 rtM204V/I 混合突变。下一代测序方法检出 44 例 rtM204V 突变,25 例 rtM204I 突变和 5 例 rtM204V/I 混合突变。下一代测序法的灵敏度为 100%,特异度 100%,准确度 100%,完全符合率为 95.95% (71/74),部分符合率为 4.05% (3/74),未发现完全不一致(0/74 0%)。通过重复性实验下一代测序法的重复性符合率 100%。2 种方法的一致性(κ)为 0.97 ($P < 0.01$)。其中有 3 例样本在 Sanger 测序法只检出 rtM204V 突变,在下一代测序法中检出 rtM204V/I 混合突变。结果提示下一代测序法的检测灵敏度高于 Sanger 测序法,能检测到 Sanger 测序法漏检的混合突变。Sanger 测序法只能在突变比例大于 20% 时检出性能好,结果仅代表优势序列的信息,无法早期发现耐药突变。本研究不足之处在于由于实验条件限制并没有做克隆测序进一步验证 3 例不

一致样本。

本研究成功建立了乙型肝炎病毒 YMDD 突变的下一代测序法。该方法灵敏度高,特异性好,重复性好,准确性高,比 Sanger 测序法更灵敏,能检测到更多的混合突变,为乙型肝炎病毒耐药基因检测提供了新的手段,同时为其他病原体耐药基因的检测提供了新思路。随着下一代测序技术发展,操作自动化程度越来越高,测序成本越来越低,能更好地应用于临床检测。

参考文献

- [1] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(15):1521-1531.
- [2] Ong A, Wong VW, Wong GL, et al. Management options for lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients with suboptimal virological suppression by adefovir[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(8):972-981.
- [3] Sheng YJ, Liu JY, Tong SW, et al. Lamivudine plus adefovir combination therapy versus entecavir monotherapy for lamivudine-resistant chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis[J]. *Virology*, 2011, 8(8):393.
- [4] Choi YM, Lee SY, Kim BJ. Naturally occurring hepatitis B virus reverse transcriptase mutations related to potential antiviral drug resistance and liver disease progression[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(16):1708-1724.
- [5] Lee HJ, Kim SJ, Kweon YO, et al. Evaluating the efficacy of switching from lamivudine plus adefovir to tenofovir disoproxil fumarate monotherapy in lamivudine-resistant stable hepatitis B patients[J]. *Plos One*, 2018, 13(1):e190581.
- [6] Masaadeh HA, Hayajneh WA, Alqudah EA. Hepatitis B virus genotypes and lamivudine resistance mutations in Jordan[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(47):7231-7234.
- [7] 尚丽红,武小桐,李娟,等.乙型肝炎病毒 YMDD 突变检测方法学比较[J]. *中国药物与临床*, 2013, 13(12):1568-1570.
- [8] Pas SD, de Man RA, Fries E, et al. The dynamics of mutations in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene during and after lamivudine treatment as determined by reverse hybridisation[J]. *J Clin Virol*, 2002, 25(1):63-71.
- [9] Sun J, Wang Z, Ma S, et al. Clinical and virological characteristics of lamivudine resistance in chronic hepatitis B patients: a single center experience[J]. *J Med Virol*, 2005, 75(3):391-398. (下转第 484 页)

Snail 基因甲基化与 TGFβ1 诱导前列腺癌细胞发生 EMT 的相关性研究

杜彦丹¹ 牛艺卿² 郑海军¹ 王晓艳¹ 姜玉海³ 陈海秋⁴ 李寅雁¹ 孙刚¹
李春雨¹ 陆德生¹ 孙辉^{1*}

[摘要] 目的 探讨 Snail 基因甲基化与转化生长因子 β1(TGFβ1)诱导前列腺癌细胞上皮间质转化(EMT)过程的相关性。方法 TGFβ1 诱导前列腺癌 PC3、DU145 细胞,通过细胞形态、划痕及侵袭实验筛选 EMT 明显的细胞系;利用 Western blot、RT-PCR 技术检测该细胞系 EMT 时相关 Marker 表达的变化,确定 EMT 过程中的决定性转录因子;沉默组蛋白去甲基化酶 KDM4A 的表达,观察前列腺癌细胞形态学及转录因子 Snail 表达的变化;收集前列腺良性增生组织(对照组)及 Gleason 分级四级以上的前列腺癌组织(实验组)各 60 例,检测 Snail、E-cadherin 和 Vimentin 的表达。结果 细胞形态学变化、划痕及侵袭实验证明 TGFβ1 诱导后前列腺癌细胞 PC3 具有明显的迁移及侵袭能力;Western blot、RT-PCR 实验表明 PC3 细胞 EMT 时 E-cadherin 表达下调,Snail 和 Vimentin 表达上调,其中 Snail 变化最为明显。免疫组化结果显示对照组 E-cadherin 细胞膜表达强阳性,Vimentin、Snail 细胞质表达弱阳性;实验组 E-cadherin 细胞膜表达弱阳性,Vimentin、Snail 细胞质表达强阳性。沉默 KDM4A 表达,PC3 细胞由间质转变为上皮形态,Snail 表达上调。结论 Snail 甲基化富集程度改变与 TGFβ1 诱导前列腺癌细胞上皮间质转化相关。

[关键词] 前列腺癌; TGFβ1; 上皮间质转化; Snail; KDM4A

Correlation between methylation of snail gene and EMT induced by TGFβ1 in prostate cancer cells

DU Yandan¹, NIU Yiqing², ZHENG Haijun¹, WANG Xiaoyan¹, JIANG Yuhai³, CHEN Haiqiu⁴,
LI Yinyan¹, SUN Gang¹, LI Chunyu¹, LU Desheng¹, SUN Hui^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Inner Mongolia Forestry General Hospital(The Second Clinical Medical School of Inner Mongolia University for Nationalities) Yakeshi, Inner Mongolia, China, 022150; 2. Department of Nuclear medicine department Laboratory, Inner Mongolia Forestry General Hospital(The Second Clinical Medical School of Inner Mongolia University for Nationalities) Yakeshi, Inner Mongolia, China, 022150; 3. Department of Department of Anesthesiologist Laboratory, Inner Mongolia Forestry General Hospital(The Second Clinical Medical School of Inner Mongolia University for Nationalities) Yakeshi, Inner Mongolia, China, 022150; 4. Department of Department of endocrinology Laboratory, Inner Mongolia Forestry General Hospital(The Second Clinical Medical School of Inner Mongolia University for Nationalities) Yakeshi, Inner Mongolia, China, 022150)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between the methylation of Snail gene and the induction of epithelial-mesenchymal-transition (EMT) by TGFβ1 in prostate cancer cells. Methods PC3 and DU145 cells were induced by TGFβ1. The induced EMT phenotype was screened by cell

基金项目:内蒙古自然科学基金资助项目(2017MS0338)

作者单位:1. 内蒙古林业总医院(内蒙古民族大学第二临床医学院)检验科,内蒙古,牙克石市 022150
2. 内蒙古林业总医院(内蒙古民族大学第二临床医学院)核医学科,内蒙古,牙克石市 022150
3. 内蒙古林业总医院(内蒙古民族大学第二临床医学院)麻醉科,内蒙古,牙克石市 022150
4. 内蒙古林业总医院(内蒙古民族大学第二临床医学院)内分泌科,内蒙古,牙克石市 022150

*通信作者:孙辉, E-mail:sunhui7360771@163.com

morphology, scratch and invasion experiments. Western blot and RT-PCR were used to detect the expression of related markers in EMT cells, and the decisive transcription factors in EMT were determined. The expression of histone demethylase *kdm4a* was silenced, and the changes of cell morphology and transcription factor *Snail* were observed. The expression of *snail*, E-cadherin and vimentin were detected in 60 cases of benign prostatic hyperplasia (control group) and 60 cases of prostate cancer (experimental group) with Gleason grade 4 or above by immunohistochemistry. **Results** Cell morphology, cell scratch and Transwell experiments demonstrated that the prostate cancer cell line PC3 had a significant migration and invasion ability after TGF β 1 induction. Western blot and RT-PCR results showed that E-cadherin expression was down-regulated, *Snail* and Vimentin expression were up-regulated in the process of EMT occurrence, especially *Snail*. The control group showed *Snail* and Vimentin of cytoplasm were weakly positive, E-cadherin of membrane was strongly positive. Prostate cancer tissue showed that *Snail* and Vimentin were strongly positive, E-cadherin was weakly positive. Silenced histone demethylase *KDM4A* expression, PC3 cells changed from mesenchymal to epithelial morphology, *Snail* expression was down-regulated. **Conclusion** The change of *Snail* methylated concentration is related to the TGF β 1-induced epithelial stromal transformation of prostate cancer cells.

[KEY WORDS] Prostate cancer; TGF β 1; Epithelial-mesenchymal transition; *Snail*; *KDM4A*

前列腺癌(Prostate cancer, PCa)是中老年男性常见的一种恶性肿瘤,中国PCa发病率明显低于欧洲国家,随着人口老龄化及生活水平的提高,正呈现逐年升高的趋势。PCa中腺泡腺癌占95%以上,通称为PCa^[1],其不是一种独立疾病,能够侵袭转移至膀胱、血管神经束、精囊,从而引起全身系统的病理生理改变。大量研究显示,前列腺癌的发生、转移与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal-transition, EMT)密不可分^[2-3],它与表观遗传修饰在肿瘤侵袭-转移级联过程中发挥着重要作用。微环境中的转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF β 1)由基质细胞分泌,其信号通路下游SMAD磷酸化,可进一步激活转录因子启动EMT过程^[4]。有研究表明具有锌指结构的转录因子*Snail*参与EMT的发生,多种转移及复发的上皮细胞肿瘤中均有*Snail*的高表达^[5-6],这可能与*Snail*转录因子启动子区组蛋白甲基化修饰有关。赖氨酸及精氨酸甲基化多发生在组蛋白H3各位点^[7],其中H3K9甲基化是特殊染色质形成和基因转录沉默的表观遗传标志,可以抑制基因转录,其去甲基化酶KDM4A参与催化去除H3K9甲基化过程。本课题旨在通过沉默KDM4A表达,改变*Snail*甲基化富集程度,观察PC3细胞形态学变化及*Snail*的表达变化,阐明前列腺癌发生EMT的重要机理。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

人前列腺癌PC3、DU145细胞株购自ATCC公司。胎牛血清、1640培养液、胰酶购自Gibco公司;

DMSO购自美国Sigma公司;Trizol为荷兰Invitrogen公司产品;DNA Marker为TakaRa公司产品;所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成;BCA蛋白定量试剂购自美国Thermo公司,所有抗体均为美国Cell Signaling公司生产;免疫组化试剂来源于上海McLean公司。

1.2 细胞实验

1.2.1 形态学观察

当细胞生长至90%汇合时,无血清饥饿细胞24 h,0.5% FBS的1640培养基中添加10和20 ng/mL TGF β 1处理细胞24、48 h,使用荧光显微镜对细胞形态的改变进行观察和记录。

1.2.2 细胞划痕(迁移)实验

培养皿下画线、铺板并培养细胞至贴壁。给药后,无血清饥饿培养。待细胞生长至80%,垂直于六孔板的底部直线划线,按照不同时间段及给药浓度留取图片并分析结果。

1.2.3 细胞侵袭(Transwell)实验

Transwell小室内平铺100 μ L基质胶,小室下加入500 μ L 1640培养基,放入小室时避免产生气泡。小室内吸入100 μ L无血清细胞悬液,孵育24、48 h,固定、结晶紫染色后分析结果。

1.3 RT-PCR检测人前列腺癌细胞株中EMT相关marker的变化

处理方法如1.2.1, Trizol法提取细胞总RNA,取A260/A280比值落于1.8~2.0之间的RNA进行实验,取1 μ g逆转录合成cDNA。以cDNA序列为模板,选用的内参基因为GAPDH,扩增后按以下计算方法分析数据:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{[(Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因}) \text{ 待测样本} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因}) \text{ 对照样本}]}$$

1.4 Western Blot 检测人前列腺癌细胞株中 EMT 相关 maker 的变化

取对数生长期的前列腺癌细胞, PBS 洗涤后加入细胞变性裂解液, 煮沸、离心、取上清液, 加入蛋白 loading buffer, 检测蛋白浓度。取上样量 40 g 的蛋白, 以 β -actin 作为参照, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 随后进行转膜、封闭、抗原抗体反应及发光显影, 使用与 β -actin 的比值表示各组蛋白表达水平。

1.5 免疫组化实验

收集内蒙古林业总医院病理科前列腺良性增生组织(对照组)及 Gleason 分级 4 级以上的前列腺癌组织(实验组)各 60 例。将标本依次进行固定、包埋及切片; 置于新鲜二甲苯中浸泡, 沥干后按顺序放入无水乙醇、90%乙醇及 75%乙醇中; 蒸馏水冲洗 1 min, 放入 PBS 缓冲液中; 组化染色后观察组织片, 分析结果。

1.6 统计学分析

以上实验均有效重复三次以上, 数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 使用 SPSS 22.0 软件中方差分析来处理实验结果。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 TGF β 1 诱导后前列腺癌细胞系形态学及 EMT 相关 Marker 变化

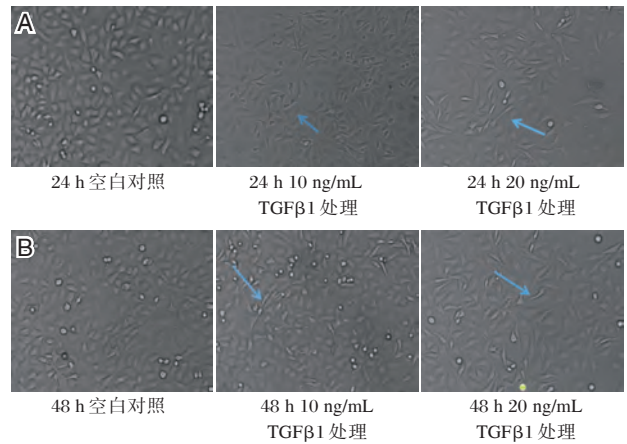
培养人前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞, 观察 TGF β 1 诱导后细胞形态变化、细胞迁移和侵袭试验结果。利用 Western blot 和 RT-PCR 技术检测细胞发生 EMT 时相关 Marker 的表达变化。

2.1.1 前列腺癌 PC3 细胞形态学变化

按照 1.2.1 处理细胞后, 在光学显微镜下观察细胞形态学改变, 结果显示: PC3 和 DU145 细胞均由椭圆形变为长梭型(图 1 A、B), 其中 PC3 细胞形态变化较明显, 课题组筛选出 PC3 细胞进行后续实验(图 2A、B)。划痕和 Transwell 侵袭实验结果表明: TGF β 1 诱导 PC3 细胞后, 细胞的迁移和侵袭能力增强(图 3、4)。

2.1.2 RT-PCR 和 Western blot 检测 PC3 细胞 EMT 相关 Marker 表达的变化

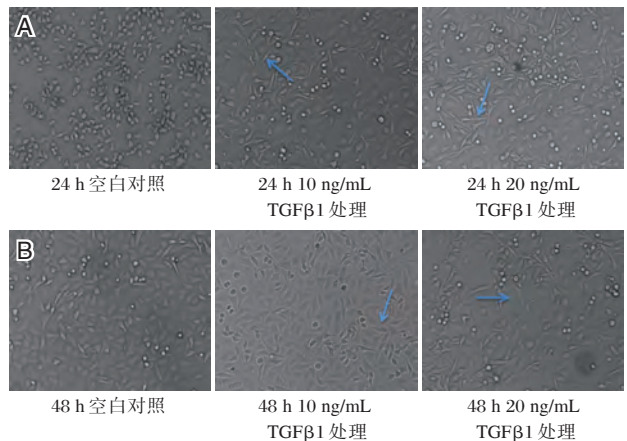
TGF β 1 诱导 PC3 细胞, EMT 相关 Marker 表达发生改变, E-cadherin 表达下调, Snail1 和 Vimentin 表达上调, 其中 Snail1 表达变化最显著(图 5); Western blot 结果也显示 Snail1 的表达量显著增高。(图 6、7)。



A: DU145 细胞经 10、20 ng/mL TGF β 1 诱导 24 h 后光学显微镜下形态学的变化; B: 48 h 后形态学的变化($\times 40$)。

图 1 DU145 细胞经 TGF β 1 诱导 24、48 h 后光学显微镜下形态学的变化

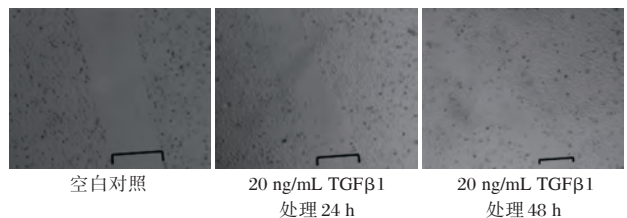
Figure 1 Morphological changes of DU145 cells induced by TGF β 1 for 24 and 48 hours under optical microscope



A: PC3 细胞细胞经 10、20 ng/mL TGF β 1 诱导 24 h 后光学显微镜下形态学的变化; B: 48 h 后形态学的变化($\times 40$)。

图 2 PC3 细胞经 TGF β 1 诱导 24、48 h 后光学显微镜下形态学的变化

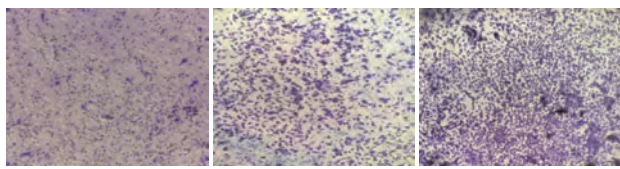
Figure 2 Morphological changes of PC3 cells induced by TGF β 1 for 24 and 48 hours under optical microscope



PC3 细胞加入 20 ng/mL TGF β 1 处理后细胞划痕变窄, 迁移能力增强($\times 10$)。

图 3 PC3 细胞经 20 ng/mL TGF β 1 处理 24、48 h 后, 细胞划痕实验结果

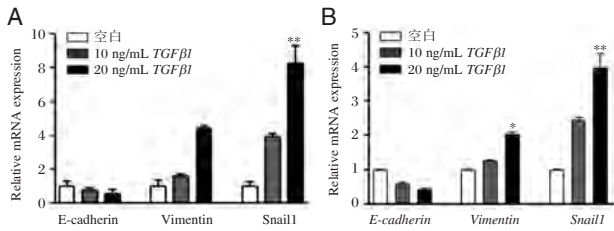
Figure 3 Scratch test results of PC3 cells treated with 20 ng/mL TGF β 1 for 24 and 48 hours



PC3 细胞加入 TGFβ1 后细胞数量显著增多,侵袭能力增强(×10)。

图 4 PC3 细胞 Transwell 实验结果

Figure 4 Transwell experiment results of PC3 cells



A: 培养 24 h EMT 相关 Marker mRNA 水平的变化; B: 培养 48 h EMT 相关 Marker mRNA 水平的变化。

图 5 TGFβ1 诱导 PC3 细胞, EMT 相关 Marker mRNA 水平的变化

Figure 5 mRNA changes of EMT-related Marker in PC3 cells induced by TGFβ1

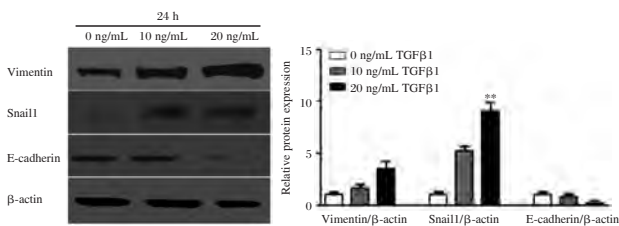


图 6 TGFβ1 诱导 PC3 细胞 24 h 后相关蛋白的表达

Figure 6 Expression of related proteins in PC3 cells induced by TGFβ1 for 24 hours

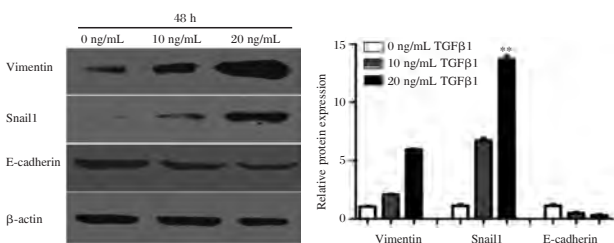


图 7 TGFβ1 诱导 PC3 细胞 48 h 后相关蛋白的表达

Figure 7 Expression of related proteins in PC3 cells induced by TGFβ1 for 48 hours

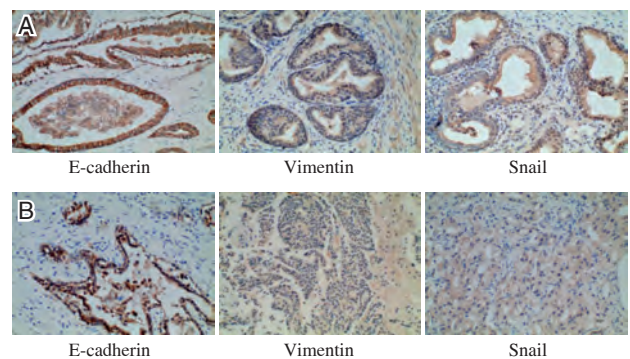
2.2 前列腺良性增生组织及前列腺癌组织中 EMT 相关 Marker 的表达结果

对照组及实验组组织标本免疫组化结果显示: 对照组中 E-cadherin 细胞膜表达呈强阳性, Vimentin、Snail 细胞质表达呈弱阳性, 见图 8A; 实验组中

E-cadherin 细胞膜表达弱阳性, Vimentin、Snail 细胞质表达强阳性, 见图 8B。可见组织病理学层面 Snail 在前列腺癌的发生发展过程中也起了决定性作用。

2.3 沉默 KDM4A, PC3 细胞形态学及转录因子 Snail1 表达的变化

培养前列腺癌 PC3 细胞, 进行 TGFβ1 及 TGFβ1+siKDM4A 处理。20 ng/mL TGFβ1 诱导的同时, 沉默组蛋白去甲基化酶 KDM4A 的表达, Snail1 甲基化程度发生改变, 抑制了 EMT 的进程, 前列腺癌 PC3 细胞由间质形转变为上皮形态(图 9), 间质 marker Snail1 表达下调(图 10)。



A: 前列腺良性增生组(对照组); B: 前列腺癌组(实验组)

图 8 前列腺良性增生和前列腺癌组织免疫组化结果
Figure 8 Immunohistochemical results of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

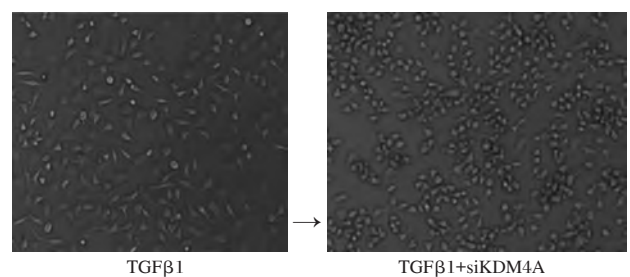


图 9 沉默 KDM4A 后 PC3 细胞形态学变化(40×)

Figure 9 Morphological changes of PC3 cells after silencing KDM4A

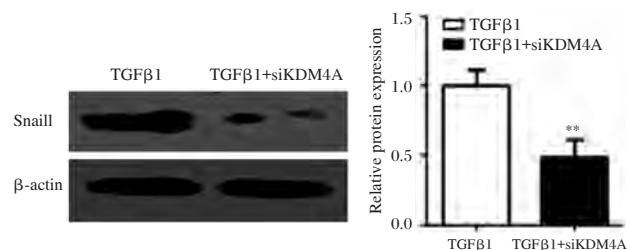


图 10 沉默 KDM4A 后 Snail1 表达变化

Figure 10 Changes of Snail1 expression after silencing KDM4A

3 讨论

肿瘤转移与表观遗传修饰密切相关,重要修饰包括组蛋白甲基化、泛素化、乙酰化和染色质重塑^[8]。EMT发生期间,上皮标志物 *E-cadherin* 启动子区域高甲基化是一例常见的表观遗传修饰事件^[9],可引发 E-钙粘蛋白沉默。一些报道也称 EMT 其它相关转录因子 *Snail*, *Slug* 等启动子区域甲基化与其表达相关^[10],可能主要因 EMT 相关转录因子 *Snail*、*ZEB1* 和 *ZEB2* 能够募集 HDAC 复合物,发生 EMT 时使 *E-cadherin* 表达沉默^[11]。

目前,组蛋白修饰是表观遗传学研究的重要领域^[12],其中以组蛋白 H3 各位点的乙酰化,甲基化及泛素化等最为常见和多变^[13]。相关报道指出组蛋白 H3 各位点乙酰化修饰一般均和染色质的开放程度有关,H3 乙酰化可以诱导染色质结构松散,促进基因转录,而甲基化修饰的结果则取决于基因组的不同功能^[14-15]。组蛋白 H3 甲基化中 H3K4 和 H3K36 甲基化修饰可激活基因转录,H3K9 甲基化可导致特殊染色质的形成,抑制基因转录。有研究证实 H3K9ME3 基因上游和基因组富集与染色质开放和基因转录水平呈负相关^[16-17],本课题的研究结论与其一致。

赖氨酸甲基化是调节染色质结构的一种常见组蛋白修饰。癌症发展进程中,组蛋白赖氨酸甲基化显著改变,被认为是由不受控制的组蛋白赖氨酸甲基转移酶或组蛋白去甲基化酶作用的结果^[18-19]。KDM4 是一种组蛋白去甲基酶^[20],主要针对赖氨酸 9 / 36 位置上的组蛋白 H3 和赖氨酸 26 位置上的组蛋白 H1.4^[21]。有研究证明 KDM4A、KDM4B 和(或)KDM4C 在乳腺、结直肠、口腔^[22]、甲状腺^[23]、肺及前列腺等肿瘤中均呈现过表达,它们是肿瘤细胞迅速生长所必需的去甲基化酶,这可能是由于其具备调节转录因子表达的作用,如雄激素和雌激素受体。本课题通过沉默 KDM4A,探索转录因子 *Snail1* 表达的改变,证实了通过干扰组蛋白修饰的变化可以阻滞 EMT 的发展进程。不仅为临床提供了新的前列腺癌诊断依据,也为该疾病的靶向治疗开辟了新局面。

参考文献

[1] 陈本川. 治疗前列腺癌新药—阿帕鲁胺(apalutamide) [J]. 医药导报, 2018,37(10):1295-1301.

[2] Wang Y, Shang Y. Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis [J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319(2):160-169.

[3] Carmona F J, Davalos V, Vidal E, et al. A comprehensive DNA methylation profile of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(19): 5608-5619.

[4] Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming [J]. *Nature*, 2013, 502 (7472):462-471.

[5] Vincent T, Neve EP, Johnson JR, et al. A Snail1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(8):943-950.

[6] 唐华容. 造血干细胞髓系分化中相关基因组蛋白修饰特征的研究[D]. 中南大学, 2009.

[7] Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis[J]. *Genes & development*, 2013, 27(20):2192-2206.

[8] 刘莉,王丽玲,于晓光,等. 上皮-间质转化在前列腺癌中的研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2013, 19(4): 360-364.

[9] Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, et al. Slug and Sox9 Cooperatively Determine the Mammary Stem Cell State[J]. *Cell*, 2012, 148(5):1015-1028.

[10] 韩永付. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 LBH589 对舌鳞癌 Tca8113 细胞的抑制作用及其机制的研究[D]. 郑州大学, 2015.

[11] Jing Y, Han Z, Zhang S, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment [J]. *Cell & Bioscience*, 2011, 1(1):29.

[12] Chen Y, Wang K, Qian CN, et al. DNA methylation is associated with transcription of Snail and Slug genes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 430(3):1083-1090.

[13] 金鑫荣,陈佳媛,张婷. 组蛋白去甲基化酶与肿瘤发生[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(8): 801-809.

[14] 高陈林,徐勇. 组蛋白泛素化及其与甲基化的关系 [J]. *医学综述*, 2011, 17(23):3527-3529.

[15] 汤明,李治明,陆小鹏,等. 甲基化和乙酰化修饰在肿瘤发生发展中的作用[J]. *生命科学*, 2017, 29(10): 1078-1082.

[16] Liu F, Zhou Y, Zhou D, et al. Whole DNA methylome profiling in lung cancer cells before and after epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Diagnostic Pathology*, 2014, 9(1):66.

- [17] Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem - cell development [J]. NATURE REVIEWS CANCER, 2007, 7 (11):823-833.
- [18] 孙辉,孙文静,杨正凯,等. Snail1 基因启动子区组蛋白修饰在前列腺癌细胞 EMT 发生中的作用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50(5):397-402.
- [19] Mcdonald OG, Wu H, Timp W, et al. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, 18(8):867-874.
- [20] Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism [J]. Nature, 2013, 502 (7472):489-498.
- [21] Mohan M, Herz HM, Shilatifard A. Snapshot: Chromatin Lysine Methylase Complexes: Transcriptional Regulation and Epigenetics [J]. Cell, 2012, 149 (2) : 498.
- [22] 王红红,潘云,李艳. 非组蛋白甲基化与肿瘤研究进展[J]. 广东医学, 2018, 39(17):2675-2678.
- [23] 金鑫. KDM4A 表观调控 AP-1 与口腔黏膜癌变预后关系的多中心队列研究[A]. 中华口腔医学会口腔医学科研管理分会. 中华口腔医学会口腔医学科研管理分会第二次学术年会论文集[C]. 中华口腔医学会口腔医学科研管理分会:中华口腔医学会, 2017:1.

(上接第 445 页)

- [30] Andrade VG, Yamashiro FDS, Oliveira CV, et al. Increase of lipids during HCV treatment: virus action or medication? [J]. Arq Gastroenterol. 2018, 55(2) : 184-187.
- [31] Rojas Á, del Campo JA, Maraver M, et al. Hepatitis C virus infection alters lipid metabolism depending on IL28B polymorphism and viral genotype and modulates gene expression in vivo and in vitro [J]. Viral Hepat, 2014, 21 (1) :19-24.
- [32] Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, et al. Hepatitis C virus infection causes hypolipidemia regardless of hepatic damage or nutritional state: An epidemiological survey of a large Japanese cohort [J]. Hepatol Res, 2011, 41(6): 530-541.
- [33] Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice [J]. Gen Virol, 1997, 78 (Pt7): 1527-1531.
- [34] Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, et al. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis [J]. Cancer, 2008, 122(11) : 124-131.
- [35] Moroşan E, Mihailovici MS, Giuşcă SE, et al. Hepatic steatosis background in chronic hepatitis B and C-significance of similarities and differences [J]. Morphol Embryol, 2014, 55(3 suppl) : 1041-1047.
- [36] Mancone C, Steindler C, Santangelo L, et al. Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins [J]. Gut, 2011, 60(3):378-386.
- [37] Sabile A, Perlemuter G, Bono F, et al. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates [J]. Hepatology, 1999, 30(4):1064-1076.
- [38] Petit JM, Jooste V, Duvillard L, et al. Apolipoprotein-AII concentrations are associated with liver steatosis in patients with chronic hepatitis C [J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(12): 3431-3434.
- [39] Seki N, Sugita T, Aida Y, et al. Assessment of the features of serum apolipoprotein profiles in chronic HCV infection: difference between HCV genotypes 1b and 2 [J]. Hepatol Int, 2014, 8(4): 550-559.
- [40] Yoshizawa K, Abe H, Aida Y, et al. Serum apolipoprotein B-100 concentration predicts the virological response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 1b [J]. Med Virol, 2013, 85 (7) : 1180-1190.
- [41] Rowell J, Thompson AJ, Guyton JR, et al. Serum apolipoprotein C-III is independently associated with chronic hepatitis C infection and advanced fibrosis [J]. Hepatol Int, 2012, 6(2): 475-481.
- [42] Silva GF, Andrade VG, Moreira A, et al. Waiting daas list mortality impact in HCV cirrhotic patients [J]. Arq Gastroenterol, 2018, 55(4) : 343-345.
- [43] Gomaa HE, Mahmoud M, Saad NE, et al. Impact of Apo E gene polymorphism on HCV therapy related outcome in a cohort of HCV Egyptian patients [J]. J Genet Eng Biotechnol, 2018, 16(1) :47-51.
- [44] Fabris C, Vandelli C, Toniutto P, et al. Apolipoprotein E genotypes modulate fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and persistently normal transaminases [J]. Gastroenterol Hepatol, 2011, 26 (2) : 328-333.

血清 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 检测对脓毒症并发肝损伤预后的评估价值

宋莹^{1*} 李世朋² 焦伟伟¹

[摘要] 目的 探讨血清高迁移率族蛋白1(HMGB1)、转化生长因子 β 1(TGF β 1)及高尔基体糖蛋白73(GP73)检测对脓毒症并发肝损伤预后的评估价值。方法 选取86例脓毒症并发肝损伤患者为观察组,80例单纯脓毒症患者为对照组,对比两组患者血清HMGB1、TGF β 1及GP73水平差异,分析影响脓毒症并发肝损伤患者预后的危险因素,探讨血清HMGB1、TGF β 1及GP73检测对预后的评估效能。结果 观察组患者血清HMGB1、TGF β 1及GP73水平均显著高于对照组($P<0.05$);随着肝损伤程度的加重,患者血清HMGB1、TGF β 1及GP73水平也呈显著上升趋势($P<0.05$)。APACHE II评分高、肝损伤严重、血清HMGB1、TGF β 1及GP73水平升高是导致脓毒症合并肝损伤患者不良预后的危险因素($P<0.05$)。血清HMGB1、TGF β 1及GP73检测对预后评估的ROC曲线下面积分别为0.805、0.827、0.855,最佳临界值为HMGB1 $>33.44 \mu\text{g/L}$ 、TGF β 1 $>40.63 \mu\text{g/L}$ 及GP73 $>79.84 \mu\text{g/L}$ 。HMGB1、TGF β 1及GP73联合检测的AUC为0.917,联合检测的评估灵敏度为72.7%,与单独检测差异无统计学意义($P>0.05$),而联合检测的特异度为95.3%,显著高于各指标单独检测($P<0.05$)。结论 血清HMGB1、TGF β 1及GP73水平与脓毒症患者肝损伤情况密切相关,三者可作为评估脓毒症并发肝损伤患者预后的参考指标。

[关键词] 脓毒症;肝损伤;高迁移率族蛋白1;转化生长因子 β 1;高尔基体糖蛋白73

Evaluation of serum HMGB1, TGF β 1 and GP73 in the prognosis of sepsis complicated with liver injury

SONG Ying^{1*}, LI Shipeng², JIAO Weiwei¹

(1. The 1st Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471000; 2. Department of General Surgery, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo, Henan, China, 454000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the prognostic value of serum high mobility group box 1 (HMGB1), transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and golgi glycoprotein 73 (GP73) in patients with sepsis complicated with liver injury. Methods 86 patients with sepsis complicated with liver injury were selected as the observation group and 80 patients with sepsis alone as the control group. The differences of serum HMGB1, TGF β 1 and GP73 levels between the two groups were compared, the risk factors affecting the prognosis of patients with sepsis complicated with liver injury were analyzed. The evaluation effect of serum HMGB1, TGF β 1 and GP73 on the prognosis was discussed. Results The levels of HMGB1, TGF β 1 and GP73 in observation group were significantly higher than control group ($P<0.05$). With the aggravation of liver injury, the levels of HMGB1, TGF β 1 and GP73 also showed significant increase ($P<0.05$). High APACHE II score, severe liver damage, elevated of serum HMGB1, TGF β 1 and GP73 levels were risk factors for poor prognosis of sepsis patients combined liver damage ($P<0.05$). The area under ROC curve for prognostic evaluation of

基金项目:国家自然科学基金(81700556)

作者单位:1. 河南科技大学第一附属医院,河南,洛阳 471000

2. 焦作市人民医院,河南,焦作 454000

*通信作者:宋莹, E-mail: 541097303@qq.com

serum HMGB1, TGFβ1 and GP73 was 0.805, 0.827, 0.855. The optimal critical values were HMGB1>33.44 μg/L, TGFβ1>40.63 μg/L, GP73>79.84 μg/L, respectively. The AUC of HMGB1, TGFβ1 and GP73 combined detection was 0.917. The sensitivity of combined detection was 72.7%, which was not significantly different from that of single detection ($P>0.05$), while the specificity of combined detection was 95.3%, which was significantly higher than that of single detection ($P<0.05$). **Conclusion** The serum levels of HMGB1, TGF - β 1 and GP73 are closely related to the liver injury of sepsis patients, indicating that they can be used as reference indexes to evaluate the prognosis of sepsis patients with liver injury.

[KEY WORDS] Sepsis; Liver injury; High mobility group box 1; Transforming growth factor β1; Golgi glycoprotein 73

脓毒症为病原菌感染所导致的全身性炎症反应综合征,可引发多器官功能衰竭,是重症病房患者死亡的重要原因^[1]。肝脏由于解剖结构及生理功能特殊,致使其成为脓毒症发生过程中最容易受损器官之一^[2]。有报道^[3]表明,脓症患者肝损伤发病率高达30%左右,病死率约为60%。脓毒症并发肝损伤是导致患者死亡的高危因素,但目前对于肝损伤的发病机制尚未明确^[4]。研究^[5-6]发现,高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1)、转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGFβ1)及高尔基体糖蛋白73(golgi glycoprotein 73, GP73)等多项血液细胞因子在机体炎症过程和调控肝脏组织损伤方面均起重要作用,但关于脓毒症并发肝损伤患者预后评估方面的研究较少。本研究通过观察脓毒症并发肝损伤患者血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平变化,分析其与脓症患者肝损伤程度及预后的相关性,为评估患者预后提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年1月本院重症医学科收治的86例脓毒症并发肝损伤患者为观察组,男性43例,女性43例;年龄36~78岁,平均(57.50±11.32)岁;感染部位:腹腔66例、肺部感染20例;肝损伤程度:轻度25例、中度42例、重度19例;预后状况:生存64例,死亡22例。选取同期80例单纯脓症患者为对照组,其中男46例,女34例;年龄38~75岁,平均(56.32±10.57)岁;感染部位:腹腔57例,肺部感染23例。两组患者性别构成、年龄等基础资料方面,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。本研究经医学委员会审批通过,所有受试者家属均知情同意。

表1 两组基础资料比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of basic data in 2 groups [n(%)]

组别	n	性别 (男/女)	年龄(岁)	感染部位	
				腹腔感染	肺部感染
对照组	80	46/34	56.32±10.57	57(71.25)	23(28.75)
观察组	86	43/43	57.50±11.32	66(76.74)	20(23.26)
t值		1.115	0.199	0.936	
P值		0.323	0.843	0.420	

1.2 研究相关标准

诊断标准:①符合美国重症医学会及欧洲重症医学会联合拟定的脓毒症诊断标准^[7],即存在以下任意2项或以上者:发热(38℃以上)或低温(36℃以下);呼吸急促(20次/min以上);心动过速(90次/min以上);白细胞升高($12.0 \times 10^9/L$ 以上)或降低($4.0 \times 10^9/L$ 以下)。②肝损伤诊断依据患者总胆红素(total bilirubin, TBIL)及谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)检测结果^[8],即TBIL>34.1 μmol/L或ALT>80 U/L;③肝损伤分级标准:轻度损伤:ALT升高至正常值上限1~3倍或TBIL升高至正常值上限1~2倍;中度损伤:ALT升高至正常值上限3~5倍或TBIL升高至正常值上限2~3倍;重度损伤:ALT升高至正常值上限5倍以上或TBIL升高至正常值上限3倍以上。

纳入标准:①符合以上脓毒症及肝损伤相关诊断分级标准;②年龄36~80岁;③初诊治患者,遵循医嘱配合治疗,依从性良好;④临床资料完整。排除标准:①既往慢性肝炎病毒感染、肝脏肿瘤、胆结石、脂肪肝、梗阻性黄疸及肝功能障碍者;②中毒或药物性肝损伤者;③合并心肺肾功能异常、恶性肿瘤或自身免疫性疾病患者;④妊娠期或哺乳期女性;⑤临床资料不全或中途转院者。

1.3 研究方法

①记录患者入院时性别、年龄、感染部位、APACHE II评分、血常规等基础资料情况,统计患者入院28 d后生存预后情况;②收集患者入院当天肘静脉血5 mL,1 000 g离心15 min,取血清-80℃保存待检;采用酶联免疫吸附法检测血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平,检测试剂盒购自上海生物制品研究所,伯乐800型全自动酶标仪购于美国BIO-RAD公司。

1.4 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,符合正态分布数据,采用 t 检验或方差分析,不符合正态分布数据采用秩和检验;计数资料以频数或(%)表示,用 χ^2 检验;多变量Logistic回归分析影响预后的危险因素,受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)研究血清HMGB1、TGFβ1及GP73检测对预后的评估效能; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平比较

观察组患者血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平比较
[($\bar{x} \pm s$), μg/L]

Table 2 Comparison of serum HMGB1, TGF-β1 and GP73 levels between two groups [($\bar{x} \pm s$), μg/L]

组别	n	HMGB1	TGF-β1	GP73
对照组	80	21.12±5.82	26.49±4.69	44.48±18.05
观察组	86	30.65±7.95	36.43±9.95	68.27±19.21
t 值		8.759	8.134	0.168
P 值		0.000	0.000	0.000

2.2 不同程度肝损伤患者血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平比较

重度肝损伤患者血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平显著高于中度损伤和轻度损伤患者,而中度肝损伤患者各指标又高于轻度组($P < 0.05$)。见表3。

2.3 影响脓毒症合并肝损伤患者预后的单因素分析

单因素分析显示,生存组和死亡组在年龄、性

表3 不同肝损伤程度患者血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平比较 [($\bar{x} \pm s$), μg/L]

Table 3 Comparison of HMGB1, TGFβ1, GP73 levels in patients with different degrees of liver injury [($\bar{x} \pm s$), μg/L]

组别	n	HMGB1	TGF-β1	GP73
轻度损伤	25	26.48±5.40	30.16±6.39	57.46±14.95
中度损伤	42	30.63±8.16	35.38±8.22	68.39±17.81
重度损伤	19	36.17±7.09	46.99±8.86	82.24±19.57
F 值		9.648	24.817	11.046
P 值		0.000	0.000	0.000

别、机械通气时间方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而死亡组患者APACHE II评分、血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平均高于生存组($P < 0.05$);不同预后患者肝损伤程度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4。

表4 影响脓毒症合并肝损伤患者预后的单因素分析

Table 4 Single factor analysis affecting prognosis of patients with sepsis and liver injury

变量	生存组 (n=64)	死亡组 (n=22)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	56.59±11.07	60.14±10.95	1.299	0.198
性别(男/女)	31/33	12/10	0.981	0.396
APACHE II评分(分)	17.47±6.15	26.14±6.83	5.542	0.000
机械通气时间(d)	4.38±2.17	5.14±2.11	1.395	0.167
肝损伤程度(轻/中/重)	24/36/4	1/6/15	151.592	0.000
HMGB1(μg/L)	28.49±6.96	36.92±7.39	4.819	0.000
TGF-β1(μg/L)	33.30±7.85	45.53±9.94	5.881	0.000
GP73(μg/L)	61.97±15.57	86.62±17.36	6.221	0.000

2.4 多因素Logistic回归分析

以患者预后情况为因变量,以APACHE II评分、肝损伤程度、血清HMGB1、TGFβ1及GP73表达情况为协变量进行Logistic回归分析。APACHE II评分高、肝损伤严重、血清HMGB1、TGFβ1及GP73水平升高是导致脓毒症合并肝损伤患者不良预后的危险因素($P < 0.05$)。见表5。

表5 多因素Logistic回归分析

Table 5 Multivariate Logistic regression analysis

指标	B	S.E.	Wald	P 值	OR	95%CI
HMGB1	0.172	0.068	6.474	0.011	1.188	1.040~1.356
TGF-β1	0.171	0.065	6.855	0.009	1.187	1.044~1.349
GP73	0.125	0.056	5.021	0.025	1.133	1.016~1.264
APACHE II评分	0.375	0.167	5.008	0.025	1.454	1.048~2.019
肝损伤程度	1.887	0.926	4.153	0.042	6.600	1.075~40.521

2.5 血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 检测对脓毒症并发肝损伤患者预后的评估效能

以死亡患者为阳性组,以生存患者为阴性组,绘制 ROC 曲线分析各指标对患者预后的评估效能。血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 检测的 AUC 分别为 0.805、0.827、0.855,三者评估预后的最佳临界值分别为 HMGB1>33.44 μg/L、TGFβ1>40.63 μg/L 及 GP73>79.84 μg/L, HMGB1、TGFβ1 及 GP73 对预后评估的灵敏度和特异度接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。HMGB1、TGFβ1 及 GP73 联合检测的 AUC 为 0.917,联合检测的评估灵敏度与单独检测差异无统计学意义($P>0.05$),而联合检测的特异度则明显高于三项指标单独检测($P<0.05$)。见表 6、图 1。

表 6 血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 检测对脓毒症并发肝损伤患者预后的评估效能 (μg/L, %)

Table 6 Value of HMGB1, TGFβ1, GP73 in evaluating the prognosis of sepsis complicated with liver injury (μg/L, %)

指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	Youden 指数	AUC	95% 可信区间
HMGB1	33.44	77.3	79.7	0.570	0.805	0.693-0.917
TGF-β1	40.63	77.3	78.1	0.554	0.827	0.720-0.934
GP73	79.84	72.7	82.8	0.555	0.855	0.765-0.945
联合检测		72.7	95.3	0.680	0.917	0.851-0.983

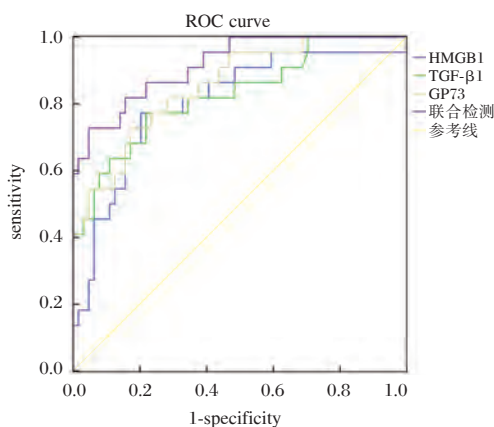


图 1 血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 评估预后的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curves of serum HMGB1, TGFβ1 and GP73 for prognosis

3 讨论

脓毒症是全球医学界共同关注的感染性疾病,可引起机体反应失调进而造成多器官功能损伤^[9]。肝脏参与机体免疫、氧化应激、炎症反应以

及凝血等多项生理过程,是脓毒症病程中最为常见的受累靶器官^[10]。肝损伤可发生于脓毒症的任何病理阶段,脓毒症患者由于持续性全身炎症反应,导致机体氧化应激反应被激活,释放大炎症介质和氧化产物,影响肝脏正常生理活动,造成肝组织损伤^[11];另外,脓毒症危机状态下,机体血液优先供应脑、心脏等维持生命活力器官,肝脏血流处于低灌注状态,可能导致肝组织细胞缺血性坏死^[12]。目前,临床上评价肝损伤程度的生物指标包括谷丙转氨酶和谷草转氨酶等,但其特异性较差,容易受其他疾病的影响。

近年研究^[13]表明,血清中一些新型标志物与肝损伤具有较好相关性,可为肝细胞损伤的诊断和预后评估提供新的方向。HMGB1 是一种高度保守的核蛋白,分布广泛,具有调节转录、稳定核酸结构等生物学功能。当机体受到创伤、感染等刺激时, HMGB1 被活化的免疫细胞释放至细胞外环境,通过与相关受体结合继发炎症反应,导致组织损伤; HMGB1 还可促进白细胞介素 6、肿瘤坏死因子等炎症因子的表达,放大炎症反应,参与脓毒症进展和器官损伤过程^[14]。TGFβ1 为一种具有免疫调节作用的细胞因子,在血管及胚胎的形成、细胞生长分化和机体免疫的生理过程中起重要调控作用。张雷等^[15-16]研究指出,脓毒症炎症反应过程中, TGFβ1 能够通过与其受体结合,抑制炎症介质释放,防止机体发生过度炎症反应,起到抗炎作用;然而当 TGFβ1 持续升高时,会刺激肝急性反应蛋白的生成,造成组织器官损伤,加快病情进展。GP73 是高尔基体膜上一种新型膜蛋白,在正常肝脏组织中表达量极少,但当各种病因引起的肝脏损伤时,肝细胞内 GP73 的表达量均会出现不同程度升高^[17]。因此, GP73 可作为一种新型肝损伤标志物。Xu 等^[18]研究发现,血清 GP73 水平与肝脏损伤程度密切相关,尤其对于慢性乙肝病毒感染但尚未引起 ALT 等表达异常患者,更具有参考价值。本研究结果表明,脓毒症并发肝损伤的观察组患者血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 水平显著高于未并发肝损伤的对照组,且随着肝损伤严重程度的增加,患者血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 水平也呈显著上升趋势;证实血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 表达与脓毒症患者肝损伤存在相关性,脓毒症病程过程中,免疫应答和炎症机制激活,造成炎症介质分泌增多,进而引起靶器官损伤。

采用 Logistic 回归分析探索脓毒症合并肝损伤预后的影响因素, 结果发现 APACHE II 评分高、肝损伤严重、血清 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 水平升高是导致患者死亡的重要危险因素; 分析其原因可能是: ① APACHE II 评分升高患者感染严重, 组织器官处于低血流灌注状态, 导致脏器功能衰竭, 增加病死率; ② 血清 HMGB1、TGF β 1 表达升高患者炎症反应过度, 造成组织器官氧化应激损伤, 因此预后较差; ③ 而 GP73 升高则表明患者肝损伤严重, 肝细胞缺血、坏死, 极大影响患者预后。通过 ROC 曲线分析发现, 血清 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 对评估脓毒症合并肝损伤患者预后具有一定参考意义。脓毒症并发肝损伤是一个复杂的病理过程, 其预后情况受多方面因素影响, 单独参考某项指标必然存在缺陷, 为获取更为准确的预后评判信息, 需要联合多项指标共同分析, 以获取更为准确的预测效能。本研究同样证实联合检测血清 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 水平可提高对脓毒症并发肝损伤患者预后的评估效能。但本研究缺乏各项指标的动态观察, 导致研究存在一定不足, 因此后期应进行深入全面观察, 进一步探索 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 在脓毒症并发肝损伤中的作用机制, 为判断患者病情转归提供依据。

综上所述, 血清 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 表达与脓毒症并发肝损伤情况密切相关, 联合检测血清 HMGB1、TGF β 1 及 GP73 水平有助于对患者预后评估提供一定参考。

参考文献

- [1] Jensen IJ, Sjaastad FV, Griffith TS, et al. Sepsis-Induced T Cell Immunoparalysis: The Ins and Outs of Impaired T Cell Immunity [J]. *J Immunol*, 2018, 200(5): 1543-1553.
- [2] 曹瑛, 栾正刚, 王亮, 等. 脓毒症相关肝损伤临床特点及预后分析 [J]. *中国实用内科杂志*, 2019, 39(2): 163-167.
- [3] 王玉梅, 冯颖, 李四保. 影响脓毒症患儿肝损伤的危险因素 [J]. *肝脏*, 2019, 24(3): 259-262.
- [4] Woźnica EA, Ingot M, Woźnica RK, et al. Liver dysfunction in sepsis [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(4): 547-551.
- [5] 宋华峰, 胥萍. 肝脏损伤新的血清学标志物的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(30): 2681-2688.
- [6] Cao Z, Li Z, Wang H, et al. Algorithm of Golgi protein 73 and liver stiffness accurately diagnoses significant fibrosis in chronic HBV infection [J]. *Liver Int*, 2017, 37(11): 1612-1621.
- [7] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [8] Kobashi H, Toshimori J, Yamamoto K. Sepsis-associated liver injury: incidence, classification and the clinical significance [J]. *Hepatol Res*, 2013, 43(3): 255-266.
- [9] Schuler A, Wulf DA, Lu Y, et al. The Impact of Acute Organ Dysfunction on Long-Term Survival in Sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2018, 46(6): 843-849.
- [10] Sukkumee W, Jittisak P, Wonganan P, et al. The prominent impairment of liver/intestinal cytochrome P450 and intestinal drug transporters in sepsis-induced acute kidney injury over acute and chronic renal ischemia, a mouse model comparison [J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 314-325.
- [11] 邓辉. 脓毒症患儿 Treg/Th17 失衡与全身炎症反应、氧化应激所致肝损伤的相关性 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(21): 2968-2971.
- [12] Li J, Xia K, Xiong M, et al. Effects of sepsis on the metabolism of sphingomyelin and cholesterol in mice with liver dysfunction [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5635-5640.
- [13] Inkaya AC, Demir NA, Kolgelier S, et al. Is serum high-mobility group box 1 (HMGB-1) level correlated with liver fibrosis in chronic hepatitis B? [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(36): e7547.
- [14] Yu Y, Yang Y, Bian Y, et al. Hydrogen Gas Protects Against Intestinal Injury in Wild Type But Not NRF2 Knockout Mice With Severe Sepsis by Regulating HO-1 and HMGB1 Release [J]. *Shock*, 2017, 48(3): 364-370.
- [15] 张雷, 邢静, 李润玖. 转化生长因子 β 1 对脓毒症大鼠模型免疫功能的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47(12): 1111-1115.
- [16] Han K, Zhang Y, Yang Z. Cilostazol protects rats against alcohol-induced hepatic fibrosis via suppression of TGF β 1/CTGF activation and the cAMP/Epac1 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 2381-2388.
- [17] 姚明解, 王雷婕, 关贵文, 等. 血清高尔基体蛋白 73 在辅助诊断慢性乙型肝炎患者中度以上肝损伤中的应用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(4): 755-759.
- [18] Xu Z, Shen J, Pan X, et al. Predictive value of serum Golgi protein 73 for prominent hepatic necroinflammation in chronic HBV infection [J]. *J Med Virol*, 2018, 90(6): 1053-1062.

miR-137 靶向下调 SETD7 表达对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激的影响研究

王彦利^{1*} 李纪明² 罗进光¹

[摘要] 目的 探讨 miR-137 对缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤的作用及其机制。方法 心肌细胞 H9C2 分为空白组、缺氧复氧组、缺氧复氧组+miR-con、缺氧复氧+miR-137 组、缺氧复氧+miR-137+pcDNA 组、缺氧复氧+miR-137+pcDNA-SETD7 组。qPCR 检测 H9C2 细胞中 miR-137 和 SETD7 mRNA 表达, Western blot 检测 SETD7、Cyclin D1、Cleaved Caspase-3 蛋白表达, MTT 法检测细胞增殖, 比色法检测 LDH、MDA 水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡, TargetScan 预测结合双荧光素酶报告实验分析 miR-137 和 SETD7 的靶向关系。结果 缺氧复氧明显降低 H9C2 细胞中 miR-137、Cyclin D1 表达量和细胞存活率 ($P<0.05$), 显著提高 SETD7 mRNA 及蛋白水平、LDH 活性、MDA 含量、Cleaved Caspase-3 蛋白水平和细胞凋亡率 ($P<0.05$)。上调 miR-137 表达促进缺氧复氧处理 H9C2 细胞内 miR-137、Cyclin D1 表达量和细胞存活率 ($P<0.05$), 明显降低 SETD7 蛋白、LDH、MDA、Cleaved Caspase-3 水平和细胞凋亡率 ($P<0.05$)。miR-137 靶向调控 SETD7 表达。过表达 SETD7 部分逆转 miR-137 保护缺氧复氧处理 H9C2 细胞的作用。结论 miR-137 通过靶向下调 SETD7 表达来促进缺氧复氧处理的心肌细胞增殖并抑制细胞凋亡, 保护缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激损伤。

[关键词] miR-137; 缺氧复氧; SETD7; 心肌细胞; 增殖

Effect of miR-137 targeting down-regulation of SETD7 expression on oxidative stress induced by hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes

WANG Yanli^{1*}, LI Jiming², LUO Jinguang¹

(1. Department of cardiovascular medicine, Anyang people's hospital, Anyang, Henan, China, 455000;
2. Department of cardiology, Dongfang hospital affiliated to Tongji university Shanghai, China, 200092)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effects of miR-137 on cardiomyocyte injury induced by hypoxia-reoxygenation and the underlying mechanism. Methods Cardiomyocytes H9C2 were divided into blank group, hypoxia-reoxygenation group, hypoxia-reoxygenation group+miR-con, hypoxia-reoxygenation+miR-137 group, hypoxia-reoxygenation+miR-137+pcDNA group, and hypoxia-reoxygenation + miR-137 + pcDNA-SETD7 group. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-137 and SETD7 mRNA in H9C2 cells. The expression levels of SETD7, Cyclin D1 and Cleaved Caspase-3 protein were determined by Western blot. The cell proliferation was tested by MTT assay. The levels of LDH and MDA were detected by colorimetry. Targeted relationship between miR-137 and SETD7 was analyzed by Target Scan method in combination with dual luciferase assay. Results Hypoxia - reoxygenation significantly decreased the expression of miR-137, Cyclin D1 and cell viability in H9C2 cells ($P<0.05$), and greatly increased SETD7 mRNA and protein levels, LDH activity, MDA content, Cleaved Caspase-3 protein levels and cells apoptosis rate ($P<0.05$). Up-regulation of miR-137 promotes the Cyclin D1 expression and the cell viability in hypoxia-reoxygenation treatment of H9C2 cells ($P<0.05$), reduces SETD7, LDH, MDA, Cleaved Caspase-3 levels and inhibits cell apoptosis ($P<0.05$). MiR-137 targets to the expression of SETD7. Overexpression of SETD7

基金项目:国家自然科学基金委员会资助项目(818702961003236)

作者单位:1. 安阳市人民医院心血管内科,河南,安阳 455000

2. 同济大学附属东方医院心内科,上海 200092

*通信作者:王彦利, E-mail: fuping-2008@163.com

partially reversed the protective effect of miR - 137 on H9C2 cells induced by hypoxia - reoxygenation. Conclusion miR - 137 promotes hypoxia - reoxygenation treated cardiomyocyte proliferation and inhibits apoptosis by targeting down - regulation of SETD7 expression, and protects the oxidative stress injury of cardiomyocytes induced by hypoxia-reoxygenation.

[KEY WORDS] miR-137; Hypoxia-reoxygenation; SETD7; Cardiomyocytes; Proliferation

急性心肌梗死是全世界死亡和致残的主要原因之一。在急性心肌梗死患者中,心肌再灌注可以打开闭塞的冠状动脉,但会诱发心肌缺血再灌注(Ischemia reperfusion, IR)损伤^[1-2]。心肌IR损伤是在缺氧或缺血一段时间后,当血液供应回到心脏组织时,导致额外的心肌损伤^[3]。目前,对于心肌IR损伤的分子机制尚未完全阐明。因此,探究心肌IR损伤的细胞和分子机制对于发现新的心肌IR损伤治疗策略具有重要意义。微小RNA(MicroRNA, miRNA/miR)是一类高度保守的短链RNA^[4],多项研究已证明miRNA参与心肌IR损伤过程^[5-6]。资料显示,miR-137与缺氧诱导相关^[7],可以保护神经元免受IR损伤^[8]。但关于miR-137在心肌IR损伤中的作用鲜见报道。本研究以缺氧复氧刺激心肌细胞H9C2,构建心肌IR损伤模型,观察miR-137在缺氧复氧诱导的H9C2细胞增殖和凋亡的影响,进一步探索其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

心肌细胞H9C2购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司,RIPA裂解液、MTT购自美国Sigma公司,Lipofectamine 2000、qPCR试剂盒购自美国赛默飞世尔有限公司,TRIzol试剂购自Invitrogen公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所, β 肌动蛋白(β -actin)、SETD7、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Cleaved Caspase-3)抗体购自美国Cellular Signaling Technology公司,辣根过氧化物酶标记二抗购自博士德生物公司,miR-137、anti-miR-137、pcDNA-SETD7购自广州锐博生物有限公司。

1.2 细胞培养、细胞转染与分组

H9C2细胞加入DMEM培养基(含10%胎牛血

清),于37℃、5% CO₂条件下培养。当细胞密度达约80%时,加入胰酶消化、传代。细胞转染前,在6孔板接种1×10⁵个/mL H9C2细胞,当密度达约80%,按照Lipofectamine 2000说明书的指示,将miR-137、anti-miR-137、pcDNA-SETD7及各自阴性对照转染入细胞。H9C2细胞随机分为空白组(H9C2细胞)、缺氧复氧组(缺氧复氧处理H9C2细胞)、缺氧复氧组+miR-con(转染miR-con,并进行缺氧复氧处理)、缺氧复氧+miR-137组(转染miR-137,并进行缺氧复氧处理)、缺氧复氧+miR-137+pcDNA组(共转染miR-137和pcDNA,并进行缺氧复氧处理)、缺氧复氧+miR-137+pcDNA-SETD7组(共转染miR-137和pcDNA-SETD7,并进行缺氧复氧处理)。其中,缺氧复氧处理为缺氧6h,复氧6h。

1.3 qPCR检测miR-137和SETD7 mRNA表达

TRIzol试剂提取H9C2细胞总RNA,逆转录为cDNA,以制成的cDNA为模板,U6为参照,依据qPCR试剂盒说明书,进行检测。miR-137上游引物序列5'-ACTCTCTTCGGTGACGGGTA-3',下游引物序列5'-CGCTGGTACTCTCCTCGACT-3',SETD7 mRNA上游引物序列5'-CCCTGATGAAAGGACTGCCC-3',下游引物序列5'-TACACCGAACTTCCAGGCATC-3'。以2^{-ΔΔCt}法计算miR-137和SETD7 mRNA相对表达量。

1.4 Western blot检测SETD7、Cyclin D1、Cleaved Caspase-3蛋白表达

RIPA裂解液提取H9C2细胞总蛋白,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS - PAGE),将其转至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭1h,加入1:1 000稀释的一抗,同时加入内参 β -actin一抗,4℃孵育过夜,次日充分洗膜,加入1:5 000稀释的二抗,孵育1h,充分洗膜,进行显色,显影,分析SETD7、Cyclin D1、Cleaved Caspase-3蛋白相对表达量。

1.5 MTT法检测细胞增殖

96孔板中接种1×10⁵个/mL H9C2细胞,每孔

加入 20 μ L 浓度为 5 mg/mL MTT 溶液, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 弃上清, 加 150 μ L DMSO, 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 10 min, 于酶标仪检测各孔细胞在 490 nm 波长处的吸光值(OD 值), 细胞存活率(%)=实验组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%。

1.6 比色法检测 LDH、MDA 水平

H9C2 细胞接种于 96 孔板, 待密度达 80%, 按照 LDH 检测试剂盒指示测定 LDH 活性。PBS 裂解 H9C2 细胞, 离心获取上清, 依据 MDA 检测试剂盒说明书测定 MDA 含量。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒步骤, H9C2 细胞重悬后, 加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 10 μ L PI 染色液, 轻轻混匀, 室温避光孵育 20 min, 上流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.8 双荧光素酶报告实验

TargetScan 软件 (<http://www.targetscan.org/>) 预测出 miR-137 与 SETD7 的 3' 非编码区(3' untranslated region, 3' UTR) 中部分碱基存在互补配对现象。构建野生型 SETD7 3' UTR(WT-SETD7) 和突变型 SETD7 3' UTR(MUT-SETD7) 报告质粒, 分别转染 miR-con 或 miR-137, 48 h 后检测双荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据整理与分析, 结果以($\bar{x} \pm s$)表示。两组间数据比较采用 *t* 检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧复氧处理对心肌细胞 miR-137 和 SETD7 表达的影响

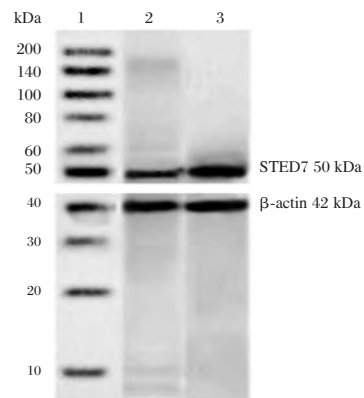
与空白组比较, 缺氧复氧明显降低 H9C2 细胞中 miR-137 表达量 ($P < 0.05$, 表 1), 显著提高 SETD7 mRNA 和蛋白水平 ($P < 0.05$, 表 1、图 1)。

表 1 缺氧复氧处理心肌细胞影响 miR-137 和 SETD7 表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Effects of hypoxia-reoxygenation on the expression of miR-137 and SETD7 in cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-137	SETD7 mRNA	SETD7 蛋白
空白组	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.14	0.44 \pm 0.04
缺氧复氧组	0.29 \pm 0.06 ^a	4.78 \pm 0.08 ^a	0.76 \pm 0.08 ^a
<i>t</i> 值	27.272	70.328	10.733
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

与空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。



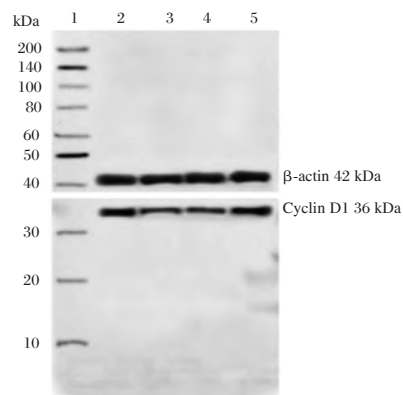
1. Marker; 2. 空白组; 3. 缺氧复氧组。

图 1 心肌细胞中 SETD7 蛋白表达

Figure 1 SETD7 protein expression in cardiomyocytes

2.2 上调 miR-137 表达促进缺氧复氧处理心肌细胞增殖

相比于空白组, 缺氧复氧显著降低 H9C2 细胞中 miR-137、Cyclin D1 表达量和细胞存活率 ($P < 0.05$, 表 2、图 2), 明显提高 LDH、MDA 水平 ($P < 0.05$, 表 2)。相比于缺氧复氧+miR-con 组, 转染 miR-137 显著提高 H9C2 细胞内 miR-137、Cyclin D1 表达量和细胞存活率 ($P < 0.05$, 图 2、表 2), 明显降低 LDH、MDA 水平 ($P < 0.05$, 表 2)。



1. Marker; 2. 空白组; 3. 缺氧复氧组; 4. 缺氧复氧组+miR-con 组; 5. 缺氧复氧组+miR-137 组。

图 2 心肌细胞中 Cyclin D1 蛋白表达

Figure 2 Cyclin D1 protein expression in cardiomyocytes

2.3 上调 miR-137 表达抑制细胞凋亡

与空白组相比, 缺氧复氧显著增加 H9C2 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白水平和细胞凋亡率 ($P < 0.05$, 表 3、图 3)。与缺氧复氧+miR-con 组相比, 转染 miR-137 明显减少 H9C2 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量和细胞凋亡率 ($P < 0.05$, 表 3、图 3)。

表2 转染 miR-137 促进缺氧复氧处理心肌细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Transfection of miR-137 promoted the survival rate of myocardial cells treated with hypoxia-reoxygenation ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-137	Cyclin D1	LDH(U/L)	MDA(nmol/mL)	细胞存活率(%)
空白组	1.00±0.11	0.83±0.08	489.43±34.14	4.67±0.43	100.00±5.37
缺氧复氧组	0.31±0.05 ^a	0.38±0.05 ^a	823.82±56.28 ^a	13.58±1.28 ^a	56.46±4.86 ^a
缺氧复氧组+miR-con	0.28±0.04	0.42±0.04	842.78±63.39	14.29±3.04	59.72±5.16
缺氧复氧+miR-137组	4.97±0.50 ^b	0.68±0.06 ^b	621.58±52.77 ^b	7.78±1.07 ^b	78.69±7.08 ^b
F 值	681.458	117.511	92.761	63.423	112.307
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

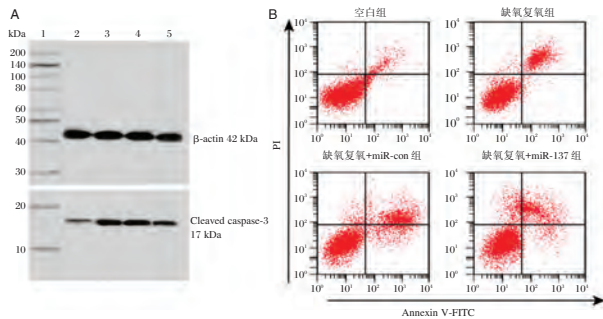
与空白组比较,^a*P*<0.05;与缺氧复氧+miR-con 组比较,^b*P*<0.05。

表3 转染 miR-137 抑制缺氧复氧处理心肌细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Transfection of miR-137 inhibited apoptosis of myocardial cells treated with hypoxia-reoxygenation ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Cleaved Caspase-3 蛋白	细胞凋亡率 (%)
空白组	0.28±0.04	4.78±0.39
缺氧复氧组	0.67±0.06 ^a	20.68±1.25 ^a
缺氧复氧+miR-con 组	0.71±0.07	22.36±1.39
缺氧复氧+miR-137 组	0.54±0.05 ^b	10.38±1.08 ^b
t 值	107.619	527.099
P 值	0.000	0.000

与空白组比较,^a*P*<0.05;与缺氧复氧+miR-con 组比较,^b*P*<0.05。



1. Maker; 2. 空白组; 3. 缺氧复氧组; 4. 缺氧复氧组+miR-con 组; 5. 缺氧复氧组+miR-137 组。
A: 检测心肌细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达; B: 检测心肌细胞凋亡。

图3 转染 miR-137 影响缺氧复氧处理心肌细胞 Cleaved Caspase-3 蛋白表达和细胞凋亡

Figure 3 Transfection of miR-137 affected Cleaved caspase-3 protein expression and apoptosis in cardiomyocytes treated with hypoxia-reoxygenation

2.4 miR-137 靶向调控 SETD7 的表达

TargetScan 软件预测发现,SETD7 3'UTR 中含有与 miR-137 互补的核苷酸序列(图 4A)。双荧光素酶报告实验结果表明,WT-SETD7 荧光素酶相对活性被 miR-137 显著抑制 (*P*<0.05), MUT-

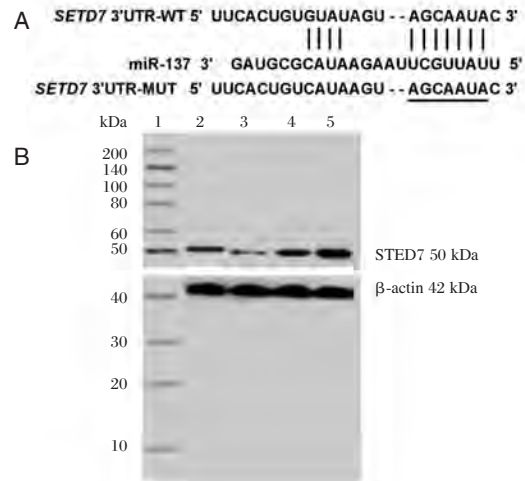
SETD7 荧光素酶相对活性无显著变化 *P*>0.05(表 4)。上调或下调 miR-137 显著调控 SETD7 蛋白水平 (*P*<0.05,图 4B、表 5)。

表4 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Dual luciferase reporting experiment ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	WT-SETD7	MUT-SETD7
miR-con 组	1.06±0.09	1.06±0.11
miR-137 组	0.39±0.05 ^a	1.09±0.12
t 值	19.523	0.553
P 值	0.000	0.588

与 miR-con 组比较,^a*P*<0.05。



1. Maker; 2. miR-con; 3. miR-137; 4. anti-miR-con; 5. anti-miR-137
A: SETD7 的 3'UTR 中含有与 miR-137 互补的核苷酸序列;
B: miR-137 对 SETD7 表达的影响。

图4 miR-137 靶向调控 SETD7 的表达

Figure 4 miR-137 targeted to regulate the expression of SETD7

2.5 上调 SETD7 部分逆转 miR-137 对缺氧复氧处理心肌细胞的保护作用

缺氧复氧组和缺氧复氧+miR-137 组明显影响 H9C2 细胞 Cyclin D1、Cleaved Caspase-3 蛋白表达、LDH 活性、MDA 含量、细胞存活率和细胞

表5 miR-137靶向SETD7调控其表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 5 miR-137 targeted SETD7 to regulate its expression ($\bar{x} \pm s, n=9$)

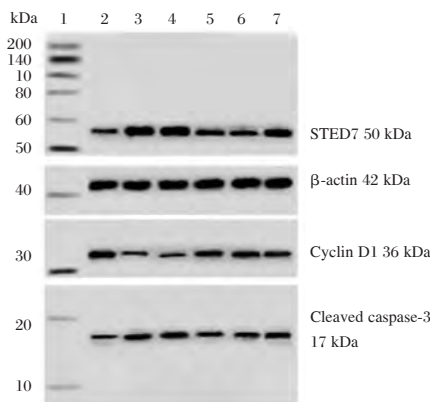
组别	SETD7 蛋白
miR-con 组	0.46±0.04
miR-137 组	0.18±0.03 ^a
anti-miR-con 组	0.49±0.05
anti-miR-137 组	0.78±0.06 ^b
F 值	251.826
P 值	0.000

与 miR-con 组比较, ^a $P<0.05$; 与 anti-miR-con 组比较, ^b $P<0.05$ 。

表6 过表达SETD7部分逆转miR-137对缺氧复氧处理心肌细胞的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 6 Overexpression of SETD7 partially reversed the protective effect of miR-137 on myocardial cells treated with hypoxia and reoxygenation ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	SETD7 蛋白	Cyclin D1 蛋白	Cleaved Caspase-3 蛋白	LDH (U/L)	MDA (nmol/mL)	细胞存活率 (%)	细胞凋亡率 (%)
空白组	0.31±0.07	0.71±0.05	0.27±0.03	467.27±36.29	4.55±0.46	100.00±5.37	3.54±0.32
缺氧复氧组	1.24±0.09 ^a	0.26±0.04 ^a	0.61±0.06 ^a	853.14±50.25 ^a	14.21±1.33 ^a	56.41±4.92 ^a	21.46±4.86 ^a
缺氧复氧+miR-con 组	1.14±0.11	0.19±0.03	0.71±0.07	877.02±61.47	15.19±2.83	59.35±5.44	23.72±5.16
缺氧复氧+miR-137 组	0.64±0.07 ^b	0.58±0.06 ^b	0.47±0.06 ^b	613.74±48.49 ^b	7.62±1.15 ^b	78.56±7.37 ^b	9.69±7.08 ^b
缺氧复氧+miR-137+pcDNA 组	0.58±0.06	0.52±0.04	0.51±0.05	602.78±62.37	7.08±1.28	79.63±7.59	11.72±5.16
缺氧复氧+miR-137+pcDNA-SETD7 组	0.88±0.07 ^c	0.38±0.04 ^c	0.67±0.05 ^c	751.58±49.61 ^c	11.25±1.28 ^c	63.75±6.74 ^c	16.69±7.08 ^c
t 值	176.638	180.671	77.640	84.893	66.712	60.796	17.625
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与空白组比较, ^a $P<0.05$; 与缺氧复氧+miR-con 组比较, ^b $P<0.05$; 与缺氧复氧+miR-137+pcDNA 组比较, ^c $P<0.05$ 。



1. Marker; 2. 空白组; 3. 缺氧复氧组; 4. 缺氧复氧+miR-con 组; 5. 缺氧复氧+miR-137 组; 6. 缺氧复氧+miR-137+pcDNA; 7. 缺氧复氧+miR-137+pcDNA-SETD7 组。

图5 心肌细胞中SETD7、Cyclin D1、Cleaved Caspase-3 蛋白表达

Figure 5 The protein expression of SETD7, Cyclin D1 and Cleaved caspase-3 in cardiomyocytes

外模型^[10]。本研究也利用缺氧复氧处理 H9C2 细胞构建体外心肌 IR 损伤模型,评价 miR-137 在其中的作用。

大量证据表明,miRNA 是心肌 IR 损伤等各种病理过程的重要调节因子^[11],如 miR-126^[12]、miR-

137^[13]。miR-137 被认为是前列腺癌^[14]、骨肉瘤^[15]在内的多种癌症类型的肿瘤抑制因子,同时参与缺血性星形胶质细胞损伤^[16]和缺氧诱导的视网膜疾病^[17]。研究发现,miR-137 在缺氧的小鼠脑中表达下调^[7],与本研究缺氧复氧抑制 miR-137 表达一致。Cyclin D1 是一种重要的有丝分裂原细胞周期调节剂,Cleaved Caspase-3 与细胞凋亡密切相关,LDH 是心肌损伤的标志物,MDA 是氧化应激的产物之一,其含量高低可以反映细胞氧化应激损伤程度。在缺氧复氧刺激的心肌细胞损伤中,Cyclin D1 蛋白表达、细胞存活率显著降低,Cleaved Caspase-3 蛋白水平、LDH、MDA 水平、细胞凋亡率明显提高^[18-19],这与本实验结果相同。miR-137 促进缺氧复氧处理 H9C2 细胞增殖、Cyclin D1 表达,并抑制细胞凋亡、Cleaved Caspase-3、LDH 和 MDA 水平,可以保护缺氧复氧刺激的心肌细胞氧化应激损伤,其保护作用同样出现在神经元 IR 损伤中^[8]。

3 讨论

资料显示,氧化应激和细胞凋亡在心肌 IR 损伤中扮演着重要角色^[9]。因此,抑制氧化应激和细胞凋亡可能成为针对心肌 IR 损伤的策略和目标。目前,缺氧复氧损伤已被广泛用作心肌 IR 损伤体

亡率($P<0.05$,表6、图5)。缺氧复氧处理 H9C2 细胞中 SETD7 蛋白表达量明显增加,转染 miR-137 后,其表达量显著降低($P<0.05$,表6、图5)。

miRNA 通过转录后在各种生物活动中发挥关键作用。利用 TargetScan 工具和双荧光素酶报告实验证实 SETD7 是 miR-137 的靶基因。研究表明,抑制 SETD7 表达显著抑制缺氧复氧诱导的心

肌细胞凋亡,减少 ROS 产生,通过下调 Keap1 和促进 Nrf2 介导的抗氧化信号传导,减弱缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤^[20]。本实验中,缺氧复氧抑制 SETD7 表达,上调 SETD7 逆转了 miR-137 对缺氧复氧处理心肌细胞的保护作用。提示 miR-137 通过直接靶向 SETD7 实现对缺氧复氧处理心肌细胞的保护作用。

综上所述,miR-137 可以保护缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激损伤,促进缺氧复氧处理的心肌细胞增殖并抑制细胞凋亡,机制与靶向调控 SETD7 表达有关,这为心肌 IR 损伤提供了新治疗靶点。

参考文献

- [1] Hu SY, Zhang Y, Zhu PJ, et al. Liraglutide directly protects cardiomyocytes against reperfusion injury possibly via modulation of intracellular calcium homeostasis [J]. *Journal of geriatric cardiology: JGC*, 2017, 14 (1): 57-66.
- [2] Zhou H, Wang J, Zhu P, et al. NR4A1 aggravates the cardiac microvascular ischemia reperfusion injury through suppressing FUNDC1-mediated mitophagy and promoting Mff-required mitochondrial fission by CK2 α [J]. *Basic research in cardiology*, 2018, 113 (4): 23-42.
- [3] Joladarashi D, Garikipati VNS, Thandavarayan RA, et al. Enhanced cardiac regenerative ability of stem cells after ischemia-reperfusion injury: role of human CD34⁺ cells deficient in microRNA-377 [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015, 66 (20): 2214-2226.
- [4] 韩俊,赵静,张立群. 丙泊酚调控 miR-133a/SOX4 表达对结肠直肠癌 HCT116 细胞增殖凋亡的影响 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 238-244.
- [5] Yang F, Li T, Dong Z, et al. MicroRNA-410 is involved in mitophagy after cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting high-mobility group box 1 protein [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2018, 119 (2): 2427-2439.
- [6] 赵建强,邢金平,来春林,等. 微RNA-98 在姜黄素保护缺氧-复氧心肌细胞损伤中的作用及其机制 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2019, 25(2): 136-141.
- [7] Li W, Zhang X, Zhuang H, et al. MicroRNA-137 is a novel hypoxia-responsive microRNA that inhibits mitophagy via regulation of two mitophagy receptors FUNDC1 and NIX [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(15): 10691-10701.
- [8] Shi F, Dong Z, Li H, et al. MicroRNA-137 protects neurons against ischemia/reperfusion injury through regulation of the Notch signaling pathway [J]. *Experimental cell research*, 2017, 352(1): 1-8.
- [9] He Y, Li C, Ma Q, et al. Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2018, 501(1): 139-144.
- [10] Yang Y, Ding S, Xu G, et al. MicroRNA-15a inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by targeting mothers against decapentaplegic homolog 7 [J]. *Molecular medicine reports*, 2017, 15(6): 3699-3705.
- [11] Ong SB, Katwadi K, Kwek XY, et al. Non-coding RNAs as therapeutic targets for preventing myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2018, 22(3): 247-261.
- [12] Yang HH, Chen Y, Gao CY, et al. Protective effects of MicroRNA-126 on human cardiac microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury and inflammatory response by activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Cellular physiology and biochemistry*, 2017, 42(2): 506-518.
- [13] Guedes EC, da Silva IB, Lima VM, et al. High fat diet reduces the expression of miRNA-29b in heart and increases susceptibility of myocardium to ischemia/reperfusion injury [J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(6): 9399-9407.
- [14] Wu QQ, Zheng B, Weng GB, et al. Downregulated NOX4 underlies a novel inhibitory role of microRNA-137 in prostate cancer [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2019, 120(6): 10215-10227.
- [15] Feng Q, Wu Q, Liu X, et al. MicroRNA-137 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting enhancer of zeste homolog 2 [J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2017, 13(6): 3167-3174.
- [16] Ziu M, Fletcher L, Rana S, et al. Temporal Differences in MicroRNA Expression Patterns in Astrocytes and Neurons after Ischemic Injury [J]. *Plos One*, 2011, 6 (2): e14724.
- [17] Li H, Zhu Z, Liu J, et al. MicroRNA-137 regulates hypoxia-induced retinal ganglion cell apoptosis through Notch1 [J]. *International journal of molecular medicine*, 2018, 41(3): 1774-1782.
- [18] 赵丽华,尹宏磊,吕风华,等. HMGB1 对缺氧复氧环境下心肌细胞凋亡的影响及机制研究 [J]. *实用预防医学*, 2018, 25(6): 746-750.
- [19] 王文刚,王静,杜建峰,等. siRNA 技术沉默 SOCS3 对缺氧复氧心肌细胞增殖、凋亡的影响以及作用机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(9): 1360-1365.
- [20] Dang Y, Ma X, Li Y, et al. Inhibition of SETD7 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced injury through regulating Keap1/Nrf2 signaling [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 842-849.

基于分子标签二代测序技术的非小细胞肺癌驱动基因变异分析

刘小云 吴小延 邵琼 龙亚康 王海云 邓玲*

[摘要] **目的** 通过对非小细胞肺癌(NSCLC)患者的血浆 ctDNA 标本采用基于分子标签(UMI)的二代测序(NGS)技术进行相关驱动基因突变分析,评估血浆 ctDNA 二代测序技术指导靶向用药的价值及注意事项。**方法** 纳入了163例2017年7月至2019年7月期间在中山大学附属肿瘤医院就诊的NSCLC患者血液标本,采用基于分子标签的二代测序方法,检测患者血浆 ctDNA 中与NSCLC相关的11个驱动基因的突变情况。**结果** 98例初诊初治的NSCLC患者中,37.8%(37例)患者未检出肺癌驱动基因突变。其余患者中 *TP53*、*EGFR*、*ERBB2*、*RET*、*KRAS*、*ALK*、*PIK3CA*、*BRAF*、*MET*、*ROS1*、*NRAS* 的突变频率分别为33%、24%、10%、8%、7%、6%、4%、3%、3%、3%和1%。57例EGFR-TKI靶向治疗后进展的NSCLC患者中,21例(36.8%)检出T790M突变,3例(27.3%)接受三代EGFR-TKI治疗后进展的患者出现T790M与T797S顺式耐药突变。其他耐药突变包括*KRAS*基因突变(2例)、*MET*基因扩增(1例)以及*PIK3CA*基因突变(8例)。29例组织样本ARMS-PCR检测结果阳性的患者,组织*EGFR*突变阳性患者与ctDNA检测*EGFR*阳性患者之间的一致性为13.8%。**结论** 该方法不仅能够检出初诊初治NSCLC患者中靶向治疗的敏感突变,还可以对靶向治疗进展后的耐药突变情况进行监测。因此,可选择基于分子标签的二代测序检测技术来指导NSCLC患者的个性化用药。

[关键词] 非小细胞肺癌;二代测序;分子标签;液体活检;循环肿瘤游离DNA;耐药突变

Analysis of driving gene mutations in non-small cell lung cancer using UMI-based next-generation sequencing

LIU Xiaoyun, WU Xiaoyan, SHAO Qiong, LONG Yakang, WANG Haiyun, DENG Ling*

(State Key Laboratory of Oncology in South China / Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510060)

[ABSTRACT] **Objective** Next-generation sequencing (NGS) based on unique molecular identifiers (UMI) was performed on circulating tumor DNA from non-small cell lung cancer patients to investigate its clinical application value. **Methods** The blood samples of 163 NSCLC patients who visited the Affiliated Cancer Hospital of Sun Yat sen University from July 2017 to July 2019 were enrolled. A panel of 150 genes was used to detect the genetic mutations of the plasma samples, the mutations of 11 driving genes related to NSCLC in plasma ctDNA of patients were detected by using the NGS based on UMI. **Results** Among 98 patients with TKI-naïve patients (including 73 lung adenocarcinomas, 8 squamous carcinomas and 17 with unknown pathological types) of NSCLC, 37.8% (37 cases) had no lung cancer driving gene mutation. The mutation frequencies of *TP53*, *EGFR*, *erbB2*, *RET*, *KRAS*, *ALK*, *PIK3CA*, *BRAF*, *MET*, *ROS1* and *NRAS* were 33%, 24%, 10%, 8%, 7%, 6%, 4%, 3%, 3%, 3% and 1%, respectively. Among 57 NSCLC patients who developed after EGFR-TKI targeted therapy, T790M mutation was detected in 21 (36.8%) patients, and

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81602468)

作者单位:中山大学肿瘤防治中心;华南肿瘤学国家重点实验室;肿瘤医学协同创新中心,广东,广州 510060

*通信作者:邓玲, E-mail: dengling@sysucc.org.cn

T790M and t797s CIS resistant mutations were detected in 3 (27.3%) patients who developed after three generations of EGFR-TKI treatment. Other resistant mutations included *KRAS* gene mutation (2 cases), *MET* gene amplification (1 case) and *PIK3CA* gene mutation (8 cases). Among 29 NSCLC patients with positive *EGFR* mutations in tissues, only 4 matched plasma samples were detected positive, and the consistency of *EGFR* detection rates between matched tissue and plasma samples were 13.8%. **Conclusion** This method can detect the sensitive mutations of targeted therapy in patients with primary NSCLC and monitor the drug-resistant mutations after the progress of targeted therapy. Therefore, the NGS based on molecular tags can provides valuable information about targeted treatment to guide the personalized medication of NSCLC patients.

[KEY WORDS] Non-small Cell Lung Cancer; Next Generation Sequencing; Unique Molecular Identifiers; Liquid Biopsy; Circulating Tumor DNA; Resistance Mutations

肺癌是世界上发病率和死亡人数较高的恶性肿瘤。肺癌主要分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)两大类,其中,NSCLC占85%以上。早期的NSCLC治疗主要选择手术,但多数NSCLC患者初诊时已是中晚期,不适于手术,只能选择以药物治疗为主^[1]。随着精准医疗和分子诊断技术的发展,靶向治疗使NSCLC的治疗朝着更加精准的方向发展^[2-4]。近年来,多项研究致力于评估液体活检应用的可能性^[5-6]。液体活检分析的肿瘤生物标志物包括血浆游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)、循环肿瘤细胞、外泌体等。

cfDNA和循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)都是血液生物标志物,cfDNA是癌细胞和正常细胞凋亡后释放入外周血的DNA片段,ctDNA是肿瘤细胞破裂后释放入外周血的DNA片段。血浆cfDNA基因检测可用于识别靶向药物靶点、评估治疗反应、监测耐药性、检测肿瘤残留病灶等^[7-8]。目前,NSCLC常见的驱动基因包括*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*KRAS*、*ERBB2*、*RET*、*PIK3CA*、*BRAF*等^[9]。对于携带相应基因敏感突变的NSCLC患者,采用靶向药物治疗可以显著延长患者的生存期,改善患者的生存质量。因此,对于初诊患者可以检测基因突变情况,确定精准的治疗方案。对于已采用靶向治疗患者,需要监测患者耐药突变情况,以及时改进治疗方案。

本实验针对血浆ctDNA标本采用基于分子标签的高通量二代测序技术,分析NSCLC患者的相关驱动基因突变情况,评估血浆ctDNA二代测序技术用于指导靶向用药及进展后耐药监测的临床价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究经中山大学附属肿瘤医院医院伦理委员会批准,患者知情同意。共纳入163例2017年7月至2019年7月期间在中山大学附属肿瘤医院就诊的NSCLC患者的血液标本,其中男性97例(59.5%),女性66例(40.5%)。患者年龄28~88岁,其中60岁以上90例(55.2%),60岁以下73例(44.8%)。无吸烟史57例(35.0%),有吸烟史42例(25.8%),情况不明64例(39.2%)。肺腺癌130例(79.8%),肺鳞癌8例(5.0%),分型不明25例(15.2%)。临床分期为I~II期的33例(20.2%),III~IV期的101例(62.0%),分期不明的29例(17.8%)。

1.2 血浆游离肿瘤DNA提取及石蜡包埋组织DNA提取

采集10 mL外周血样品至EDTA抗凝管。为避免血浆cfDNA被血细胞溶解释放的基因组DNA污染,抽取的外周血样品需在4℃下保存并于2 h内进行血浆分离。采用2次离心法分离血浆。先将10 mL血液样品在4℃,1 600 g条件下离心15 min。吸取上清,将上清置4℃,16 000 g条件下离心15 min。吸取上清至新的1.5 mL离心管中。利用血浆用比色卡进行比色,评估血液的溶血程度。采用QIAamp Circulating Nucleic Acid extract kit(Qiagen)提取样品中的cfDNA。石蜡包埋组织DNA使用QIAamp DNA FFPE Tissue Kits(Qiagen公司)进行提取。提取后的ctDNA及肿瘤组织DNA样本均使用Qubit dsDNA HS Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)进行定量分析。

1.3 组织样本ARMS-PCR检测

利用组织样本ARMS-PCR检测试剂盒(人

EGFR 基因突变检测试剂盒,金菩嘉)对组织样本的 *EGFR* 突变情况进行检测。实验操作按照试剂盒说明进行操作。该试剂盒可对突变体 DNA 含量 >1% 的样本实现稳定检测。检测覆盖 *EGFR* 基因 18、19、21 号外显子 36 个 *EGFR*-TKI 敏感突变位点,20 号外显子包括 T790M、S768I、插入突变等 9 个耐药突变位点。

1.4 高通量捕获测序

利用血清/血浆游离 DNA 高通量测序试剂盒(思路迪)对 cfDNA 样品进行二代测序文库构建、捕获,包括建库和目标区域捕获。ctDNA 的投入量为 60 ng,最低不低于 30 ng。目标区域捕获采用 150 基因 panel 进行捕获。实验操作按照试剂盒(血清/血浆游离 DNA 高通量测序试剂盒,思路迪)说明进行操作。将捕获的 DNA 片段于 Illumina NextSeq500 测序仪(Illumina)上测序,选用双端 75 bp 测序模式。血浆 ctDNA 测序深度要求为平均测序深度大于 10 000X,有效测序深度大于 2 000X。

1.5 血浆 ctDNA 二代测序数据分析

Illumina NextSeq500 测序仪(Illumina)产生的下机数据为 bcl 格式文件,使用 bcl2fastq Conversion Software (Illumina)将 bcl 格式文件转换为 fastq 格式的文件。获取拆分的原始测序数据后,首先利用 BWA MEM^[10]将测序序列比对到参考人类基因组上(hg19),比对软件参数设置为默认。比对结果处理步骤包括利用 fgbio 软件,根据基因组比对信息和分子标签信息,将来源于同一条 DNA 片段的序列(reads)分类为一组,生成一致性序列(consensus reads)。利用 BWA MEM 将生成的 consensus reads 比对到参考人类基因组上。基于比对后的测序数据,统计各个样本原始下机数据量、捕获区域原始测序深度、捕获区域有效测序深度、捕获上靶率、reads 比对成功率、捕获区域 95%位点达标有效深度等质控信息。基于去重后的比对结果,完成单碱基替换类型位点和短片段插入/缺失的查找。进一步基于背景测序错误率估计、正常人 cfDNA 背景模型、变异的正负链平衡、变异位点在被检测序列中出现的位置以及变异位点是否由平台系统错误造成等条件完成过滤,保留高可信度的体细胞变异。完成所有高可信度变异的注释,并过滤去除所有良性变异位点。

2 结果

2.1 初诊初治 NSCLC ctDNA 驱动基因突变谱

共纳入 98 例初诊初治的 NSCLC 患者,其中肺癌 73 例,肺鳞癌 8 例,其他 17 例分型不明。98 例初诊初治的 NSCLC 患者中 11 个驱动基因的详细突变信息见图 2,包括单碱基突变、小片段插入缺失、融合突变、拷贝数扩增 4 种突变类型。图中每列代表一例患者中 11 个驱动基因的突变情况,每行代表一个基因在 98 例患者中的突变情况,图中也展示了 98 例患者的性别、年龄、肿瘤分型、临床分期、吸烟史情况,上方条形图统计了每例样本中 11 个驱动基因的突变个数,右方条形图统计了每个基因在 98 例患者中的突变频数。其中,37 例(37.8%)患者未检出肺癌驱动基因突变。其余患者中 *TP53*、*EGFR*、*ERBB2*、*RET*、*KRAS*、*ALK*、*PIK3CA*、*BRAF*、*MET*、*ROS1*、*NRAS* 的突变频率分别为 33%、24%、10%、8%、7%、6%、4%、3%、3%、3%和 1%(见图 2)。*TP53* 基因突变是 NSCLC 患者中检出率最高的,其突变在各功能域的分布,见图 1。23 例(24%)*EGFR* 突变患者中,最为常见的为 L858R 突变(34.8%,8 例)和 19 号外显子缺失突变(26.1%,6 例),2 例(8.7%)检出 20 号外显子插入突变,1 例(4.3%)检出 *EGFR* 拷贝数扩增,1 例(4.3%)检出 *EGFR* A864V、E746_A750del 和 *EGFR* 拷贝数扩增 3 种突变,其他突变包括 K757R、A613T、A647T、T678M、L833V+H835L(21.7%,5 例),*EGFR* 详细突变信息见图 1(不包括 *EGFR* 拷贝数扩增)。7 例患者(7.0%)检出 *KRAS* 突变,1 例为 *KRAS* 拷贝数扩增,其他 6 例检出 2 号外显子突变(5 例 G12V/C/R 突变,1 例 G13D 突变)。*ALK* 融合在 3 例患者中被检测,均为 *ALK-EML4* 融合。3 例患者检出 *ERBB2* Y772_A775dup 突变。在 1 例患者中检出 *NRAS* G12D 突变。

2.2 *EGFR*-TKI 靶向治疗进展后耐药突变

共有 65 例接受一代、二代或三代 *EGFR*-TKI 靶向治疗的 NSCLC 患者,其中 57 例患者接受 *EGFR*-TKI 治疗进展,8 例未出现进展,未纳入进展后耐药突变分析。57 例治疗进展的患者中,42 例接受一代 TKI 治疗,1 例接受二代 TKI 治疗,1 例接受三代 TKI 治疗,3 例接受一代 TKI 治疗后改用二代 TKI 治疗,10 例接受一代 TKI 治疗后改

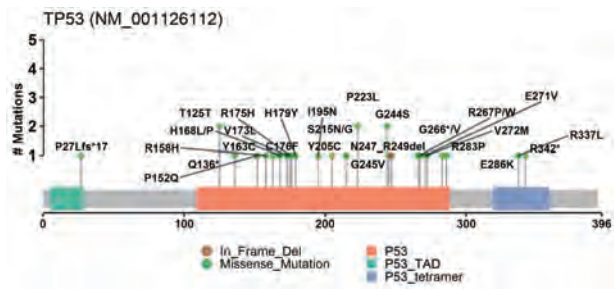


图1 TP53 基因和 EGFR 基因突变功能域分布

Figure 1 Mutation distribution in the functional domains of TP53 and EGFR

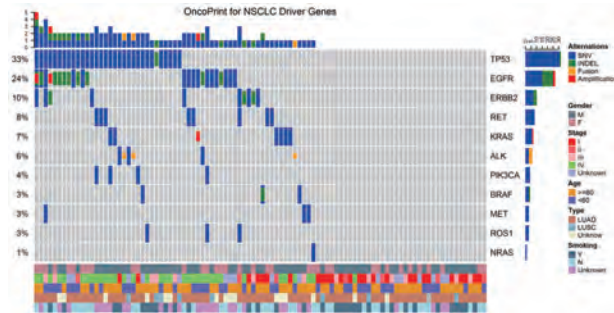


图2 98 例初诊初治 NSCLC 患者突变谱分布热图

Figure 2 The mutation spectrum of 98 patients with tyrosine kinase inhibitor (TKI)-naïve non-small cell lung cancers

用三代 TKI 治疗。21 例 (36.8%) 接受 EGFR-TKI 治疗进展的患者检出 T790M 耐药突变。共 11 例患者接受三代 TKI 靶向药治疗, 其中 3 例 (27.3%) 进展患者出现 T790M 与 T797S 顺式耐药突变。其他耐药突变包括 KRAS 基因突变 (2 例)、MET 基因扩增 (1 例) 以及 PIK3CA 基因突变 (8 例)。11 个 NSCLC 驱动基因在各 EGFR-TKI 靶向治疗进展患者中的突变分布情况, 见图 3。



图3 一代、二代、三代 EGFR-TKI 靶向治疗进展后耐药突变分布

Figure 3 Resistance mutation distribution in 57 EGFR-TKI relapsed patients

2.3 ARMS-PCR 组织 EGFR 突变检测与 NGS ctDNA EGFR 突变检测结果对比

在纳入的 163 例 NSCLC 患者中, 29 例患者存在配对的组织样本 ARMS-PCR 检测结果。29 例患者均为组织样本检测结果为 EGFR 突变阳性, 包括 13 例检出 EGFR 基因 19 号外显子缺失突变, 15 例检出 EGFR 基因 L858R 突变, 1 例检出 EGFR 基因 20 号外显子错义突变。29 例 NSCLC 患者中, 18 例患者的临床分期为 I ~ II 期, III ~ IV 期患者为 4 例, 7 例患者的临床分期为不详。29 例患者的病理分型均为肺腺癌, 3 例患者肿瘤直径 > 5 cm, 其余患者肿瘤大小均不超过 3 cm。4 例患者 ctDNA 二代测序方法检出 EGFR 突变 (1 例 K757R、1 例 L858R、1 例 E746_A750del、1 例 L858R 合并 V834L 突变) (见图 4)。采用 ctDNA 二代测序方法检出 EGFR 突变的 4 例患者中, 3 例肿瘤大小 > 5 cm, 3 例临床分期为 III ~ IV 期, 1 例分期为 I 期。

3 讨论

近年来, 随着精准医疗成为关注的热点, NSCLC 驱动基因相关研究也取得了巨大进展。特别是二代测序技术的广泛应用, 使得 NSCLC 治疗由标准化的治疗方法向基于基因突变的靶向治疗方法转变。EGFR 基因突变是 NSCLC 患者最常见的突变之一, 目前常用的 EGFR 靶向治疗药物包括一代/二代/三代 TKI。同时, 一代/二代 EGFR-TKI

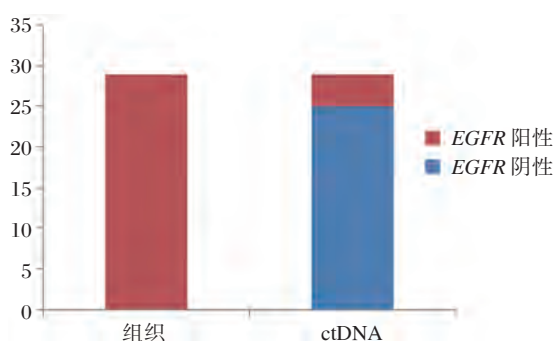


图4 ARMS-PCR 组织 *EGFR* 突变与 NGS ctDNA *EGFR* 突变检测结果对比

Figure 4 The comparison between *EGFR* mutations in tissues by ARMS-PCR and in plasma by NGS

靶向用药的最常见耐药机制为 *EGFR* T790M 突变。目前,临床上基因突变检测的金标准是肿瘤组织检测,但由于肿瘤组织取材限制、肿瘤的异质性、难于采用肿瘤组织动态监测靶向用药后基因变异状况等^[11-12],液体活检作为一种无创、易取样、利于动态监测的检测方法,对于指导靶向治疗具有极大应用前景。纳入 163 例 NSCLC 患者,分析了 NSCLC 相关的 11 个驱动基因的突变情况。根据结果分析,ctDNA 用于初诊初治 NSCLC 驱动基因突变检测和 NSCLC 靶向治疗耐药突变情况检测可能存在以下问题。

首先,采用 ctDNA 二代测序方法检测 NSCLC *EGFR* 突变的检出率为 24%,低于文献报道的亚洲人群中 *EGFR* 突变率^[13]。由于纳入的初诊初治 NSCLC 患者中,早期肺癌患者有 33 例,临床分期不详患者 17 例,而血液中 ctDNA 含量与肿瘤分期或肿瘤负荷有关,导致突变的检出率低于文献报道的检出率。其次,早期肿瘤患者 cfDNA 中 ctDNA 含量可能低于 1%^[14],正常组织释放的 cfDNA 对肿瘤细胞释放的 ctDNA 具有稀释作用,导致检测结果不可避免的出现假阴性的情况。因此,对于初诊初治患者,需要根据患者的肿瘤分期或肿瘤负荷情况来确定是否选择 ctDNA 检测。在 ctDNA 检测结果为阴性时,需要考虑假阴性的情况,仍需建议患者以肿瘤组织检测作为治疗依据。

EGFR T790M 突变是一代/二代 *EGFR*-TKI 靶向治疗进展耐药的最常见机制,可在 50% 以上的耐药患者中检出此突变^[15-16]。靶向治疗后耐药进展的患者中,T790M 突变的检出率为 36.8%,低于

文献中报道的突变率。由于部分耐药进展患者在 ctDNA 基因检测前接受过化疗,导致本次 ctDNA 突变检测结果可能并不能够代表患者真实的耐药分子机制。进而导致 T790M 的检出率低于文献中报告的检出率。因此,采用 ctDNA 二代测序方法监测患者耐药情况时,需要对患者采血时间精准把控。采用 ctDNA 二代测序方法监测耐药情况的优势在于,相比于肿瘤组织,血浆 cfDNA 基因检测可以及时有效的监测治疗过程中耐药突变情况,且抽血过程相对无创,患者能够接受多次采样,容易实现对治疗反应的动态监测。目前,多项研究开发了针对低丰度变异的二代测序检测技术^[17-20],以在体内正常 cfDNA 的背景噪音中检测这些罕见的 ctDNA 变异。

组织 *EGFR* 突变阳性患者与 ctDNA 检测 *EGFR* 阳性患者之间的一致性仅为 13.8%。对 29 例患者的临床分期及肿瘤大小分析发现,仅 4 例为 III~IV 期,7 例患者的临床分期为不详,仅 3 例患者肿瘤直径 >3 cm,其余患者肿瘤直径均不超过 3 cm。根据文献报道,早期肿瘤患者和肿瘤直径小于 3 cm 的肿瘤患者中基因突变的检出率相对较低^[21-22]。基于一致性结果,对于早期肿瘤患者需要进行基因检测指导靶向治疗时,选择样本类型时需谨慎,仍需选择肿瘤组织作为检测的金标准,避免采用血浆 ctDNA 检测出现假阴性的情况,耽误患者治疗。

综上所述,虽然对于早期 NSCLC 患者或者肿瘤负荷较低的患者,二代测序检测血浆 ctDNA 存在假阴性的可能,但此方法不仅能够检出初诊初治 NSCLC 患者中靶向治疗的敏感突变,还可以对靶向治疗进展后的耐药突变情况进行监测。采用的基于分子标签的二代测序方法,能够减少建库操作和测序过程中产生的错误,用于血浆 ctDNA 基因突变检测时可提高真实突变的检出。因此,在对抽血对象的肿瘤分期和肿瘤负荷、患者治疗情况以及抽血时间点进行严格把控的条件下,可选择基于分子标签的二代测序检测技术来指导 NSCLC 患者的个性化用药。

参考文献

- [1] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer [J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359 (13):1367-1380.

- [2] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *New England Journal of Medicine*, 2010, 362(25):2380-2388.
- [3] Waqar SN, Morgensztern D, Sehn J. MET mutation associated with responsiveness to crizotinib [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2015, 10(5):e29-e31.
- [4] Solomon BJ, Cappuzzo F, Felip E, et al. Intracranial Efficacy of Crizotinib Versus Chemotherapy in Patients With Advanced ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From PROFILE 1014 [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2016, 34(24): 2858-2865.
- [5] Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas [J]. *Clinical cancer research*, 2011, 17(24): 7808-7815.
- [6] McCoach CE, Blakely CM, Banks KC, et al. Clinical Utility of Cell-Free DNA for the Detection of ALK Fusions and Genomic Mechanisms of ALK Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2018, 24(12): 2758-2770.
- [7] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(8): 786-792.
- [8] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA [J]. *Journal of clinical oncology*, 2014, 32(6): 579-586.
- [9] Zhu QG, Zhang SM, Ding XX, et al. Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 57680-57692.
- [10] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [11] Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, et al. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine [J]. *Genome biology*, 2014, 15(8): 453.
- [12] Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: challenges and opportunities on the path to clinical utility [J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(21): 4786-4800.
- [13] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *New England Journal of Medicine*, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [14] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nature medicine*, 2008, 14(9): 985.
- [15] Eberlein CA, Stetson D, Markovets AA, et al. Acquired resistance to the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 is associated with increased dependence on RAS signaling in preclinical models [J]. *Cancer research*, 2015, 75(12): 2489-2500.
- [16] Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(31): E2127-E2133.
- [17] Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA [J]. *Nature biotechnology*, 2016, 34(5): 547.
- [18] Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(23): 9530-9535.
- [19] Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, et al. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(36): 14508-14513.
- [20] Lou DI, Hussmann JA, McBee RM, et al. High-throughput DNA sequencing errors are reduced by orders of magnitude using circle sequencing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(49): 19872-19877.
- [21] Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(4): 223-238.
- [22] Chen Y, Han T, Zhou Y, et al. Comparing the efficacy of targeted next-generation sequencing in the identification of somatic mutations in circulating tumor DNA from different stages of lung cancer [J]. *Neoplasma*, 2019, 66(4): 652-660.

PSCA 基因单核苷酸多态性位点与胃溃疡易感性的研究

莫大超* 李君久 彭亮 刘志远 王杰云 袁积汝

[摘要] 目的 探讨 PSCA 基因多态性位点与胃溃疡的遗传学关联。方法 采用候选基因的遗传学关联研究策略,基于来自中国汉族人群的 688 名胃溃疡患者以及 1 442 名健康对照受试者,对覆盖 PSCA 基因的 11 个 SNP 位点与胃溃疡的潜在关联进行考察。利用 χ^2 检验来对单个 SNP 位点的关联信号进行统计分析。结果 SNP 位点 rs2294008 与胃溃疡的疾病状态存在显著性关联 ($OR=0.73$, $P=4.78 \times 10^{-5}$),该 SNP 的 T 等位基因在对照组中的分布频率高于病例组差异有统计学意义 ($P<0.05$),因而具有一定的保护性作用。结论 PSCA 基因可能是胃溃疡的易感基因。

[关键词] 胃溃疡; PSCA 基因; 遗传多态性; 中国汉族人群; 遗传学关联

Study on the single nucleotide polymorphisms of PSCA gene and susceptibility to gastric ulcer

MO Dachao*, LI Junjiu, PENG Liang, LIU Zhiyuan, WANG Jieyun, YUAN Jiru

(Department of General surgery, Dongguan Tungwah hospital, Dongguan, China, 523110)

[ABSTRACT] Objective To explore the genetic relationship between PSCA gene polymorphism and gastric ulcer. Methods A total of 688 gastric ulcer patients and 1442 healthy control subjects from Chinese Han population were recruited. The potential association between gastric ulcer and 11 SNP loci covering PSCA gene was investigated by using the genetic association strategy of candidate genes. χ^2 test was used to analyze the correlation signals of single SNP locus. Results The results indicated that there was a significant correlation between the SNP locus rs2294008 and the disease status of gastric ulcer ($OR=0.73$, $P=4.78 \times 10^{-5}$). The distribution frequency of the SNP T allele in the control group was significantly higher than that in the case group ($P<0.05$). Therefore, it has a certain protective effect. Conclusion PSCA gene may be the susceptible gene of gastric ulcer.

[KEY WORDS] Gastric ulcers; PSCA; genetic polymorphisms; Chinese Han population; genetic association

胃溃疡属于消化性溃疡的一种,是一类发生于胃部的粘膜损伤。作为一类发生于消化道的常见病和多发病,胃溃疡病程较长且较易反复发作,严重的影响了患者的生活质量^[1-3]。既往的流行病学研究表明包含胃溃疡在内的消化性溃疡是一类遗传和环境共同作用的复杂疾病,遗传学因素可以解释其 39% 的发病风险^[3]。既往研究表明包含幽门螺旋杆菌感染、吸烟、饮酒以及多个易感基因均对胃溃疡的发生和发展造成一定影响^[4-6]。一项

基于日本人群的大样本全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)提示位于 PSCA 基因上的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点 rs2294008 与消化性溃疡的疾病状态存在显著性的关联^[7]。然而由于不同群体遗传背景的差异,这一研究结果在中国人群中的有效性尚待验证。本课题采用候选基因的遗传学关联研究策略,以中国汉族人群作为研究对象,对覆盖 PSCA 基因的若干 SNP 位点与胃溃疡的

基金项目:东莞市社会科技发展一般项目(201750715046006)

作者单位:东莞东华医院普外科,广东,东莞 523110

*通信作者:莫大超, E-mail:melodyjiaju@163.com

潜在关联进行研究,在中国人群中评估该基因相关 SNP 对胃溃疡发病风险的贡献情况。

1 资料与方法

1.1 临床资料

研究对象主要包括胃溃疡病例组和健康对照组,所有个体均来自于东莞东华医院普外科就诊患者。两组受试者均为东莞及其周边地区汉族居民,且无血缘关系。所有受试者均接受胃镜检查,并在胃镜检查期间取出了两个活组织检查样本。胃溃疡患者纳入标准:①反复上腹部疼痛或不适,②胃镜提示胃溃疡病变,③胃镜病理活检提示良性病变。本研究对象的排除标准包括:①受试者服用过非甾体抗炎药、铋盐和抗生素,②罹患胃部肿瘤、增加胃酸分泌的疾病、肾衰竭,③存在器官移植的情况。本研究经伦理委员会批准,并获得每位受试个体的书面知情同意。受试者的基本临床数据通过询问病史获得(年龄、吸烟和饮酒情况)。胃溃疡组 688 例,其中男 372 例,女 316 例,平均年龄(46.4 ± 13.5 岁);健康对照组 1 442 例,其中男 783 例,女 659 例,平均年龄(46.5 ± 14.2 岁)。

1.2 方法

1.2.1 幽门螺旋杆菌感染状态

利用快速尿素酶试验与组织病理学检查(吉姆萨染色和抗幽门螺旋杆菌 IgG 抗体检测)判断所有参与者的幽门螺旋杆菌感染状态。使用直接酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(130226, 郑州博赛生物有限公司)在所有参与者的血清样品中检测抗幽门螺旋杆菌 IgG 抗体,操作步骤严格按照说明书进行。

1.2.2 DNA 的提取

依据 DNA 提取试剂盒(Genomic DNA kit, Ax-ygen Scientific Inc., CA, USA)中的说明书,从外周血白细胞中提取了基因组 DNA,并将所提取的 DNA 储存在 -80°C 的环境下备用。

1.2.3 SNP 选择与基因分型

利用千人基因组数据库中的北京汉族人群数据,选取 *PSCA* 基因内最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) ≥ 0.02 且杂合度 ≥ 0.2 的 SNPs 位点,共计 63 个。对这 63 个 SNPs 以 $r^2 \geq 0.7$ 为条件进行标签 SNP 的遴选,总计 11 个标签 SNPs (rs2978974, rs184389994, rs117340570, rs2978977, rs146194718, rs10956997, rs587606222,

rs117919141, rs13262164, rs2294008, rs2976391) 被纳入本研究的后续分析。本研究使用高通量 Sequenom MassARRAY 平台(Sequenom, San Diego, CA, USA)对选择的标签 SNP 进行基因分型,并使用 Sequenom Typer 4.0 软件处理结果。本研究中每个标签 SNP 的基因分型成功率均大于 99%,整体基因分型成功率也大于 99%。

1.2.4 统计学处理

分别统计病例组和对照组基因型分布频率,经 Hardy-Weinberg 平衡检验后,用 Plink 软件包进行分析^[8]。应用 χ^2 检验分析病例组和对照组基因型的分布差异,用比值比(OR)及 95%CI 表示相对危险度。部分 SNP 由于计数资料稀疏性采用 Fisher 精确检验。利用 Haploview 软件绘制了本次研究所纳入的候选 SNP 构成的连锁不平衡(LD)图谱^[9]。采用 Bonferroni 法对多重检验结果进行校正, $P < 0.005$ 为差异,具有统计学意义。

2 结果

2.1 *PSCA* 基因 11 个 SNPs 的基因型频率

本次研究所纳入 11 个 *PSCA* 基因的相关 SNP 位点全部位于非编码区。所选 SNP 的 MAF 均大于 0.01,且在对照组中均处于哈迪温伯格平衡状态,见表 1。

2.2 连锁不平衡图谱

11 个 SNP 位点的连锁不平衡图谱显示这些位点间的关联关系较弱,最大的 r^2 值为 0.66 存在于 SNP rs587606222 和 rs117919141 之间,见图 1。

2.3 *PSCA* 基因 rs2294008 多态性与胃溃疡易感性

遗传学关联结果显示 *PSCA* 基因 SNP 位点 rs2294008 的多态性与胃溃疡易感性存在显著性关联($OR=0.73$, $P=4.78 \times 10^{-5}$, 见表 2)。该 SNP 的 T 等位基因在对照组中的分布频率(26.2%)高于病例组(20.5%),差异具有统计学意义($P < 0.005$)。T 等位基因可能是胃溃疡的保护性因子。其他 10 个 SNP 的基因型和等位基因在病例组和对照组中的差异均无统计学意义($P > 0.005$)。

2.4 性别、吸烟、饮酒状态以及幽门螺旋杆菌感染情况与 *PSCA* 基因 rs2294008 多态性和胃溃疡易感性的关系

对性别、吸烟、饮酒状态以及幽门螺旋杆菌感染情况这四种非遗传学因素的分层分析发现 SNP rs2294008 与胃溃疡的易感性在除抽烟之外不同因

表1 11个所选SNP的基本信息及次等位基因频率和哈迪温伯格检验结果

Table 1 Basic information including minor allele frequency and results of Hardy-Weinberg equilibrium tests for 11 selected SNPs

染色体	位置	SNP	Allele1	Allele2	MAF	P值	功能区域
8	142670446	rs2978974	A	G	0.304	0.493	5'非编码区
8	142670471	rs184389994	C	G	0.047	0.566	5'非编码区
8	142673587	rs117340570	C	T	0.037	0.461	内含子
8	142674302	rs2978977	A	C	0.148	0.528	内含子
8	142674428	rs146194718	G	A	0.097	0.172	内含子
8	142676182	rs10956997	T	A	0.066	0.281	内含子
8	142677319	rs587606222	C	G	0.037	0.461	内含子
8	142677886	rs117919141	T	G	0.048	0.129	内含子
8	142679754	rs13262164	T	C	0.084	1.000	内含子
8	142680513	rs2294008	T	C	0.244	0.277	内含子
8	142681306	rs2976391	A	C	0.364	0.333	内含子

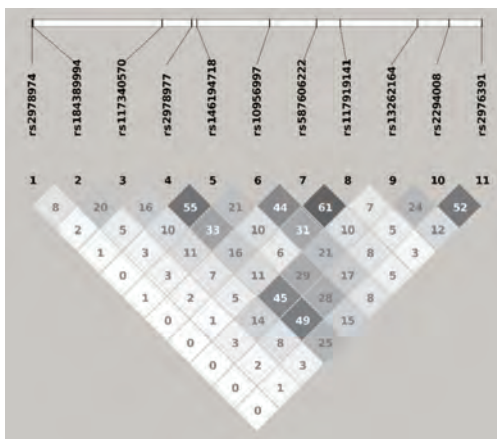


图1 PSCA 基因 11 个 SNPs 的连锁不平衡图示

Figure 1 Linkage disequilibrium plot made from 11 selected SNPs of gene PSCA

素的亚组中均差异有统计学意义,其OR值在不同的亚组中基本保持一致(详见表3)。抽烟的亚组内并未发现SNP rs2294008与胃溃疡的易感性,可能的原因是病例和对照的样本数过少导致的统计效力偏低所造成。

3 讨论

PSCA 基因可以编码一类糖蛋白,这些糖蛋白可以由糖基磷脂酰肌醇锚定在细胞膜上^[10-12]。既往研究表明 PSCA 基因在多种肿瘤细胞中的表达水平较高,此外通过小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 对 PSCA 的表达进行干扰后,细胞的生长也会受到显著性的抑制^[13-14]。这些研究提示 PSCA 基因所编码的蛋白对与细胞的增殖过程中扮演了重要的角色。在胃溃疡的发病过程

中,表皮细胞的增殖情况起到了较大的作用^[15-16]。此外,既往研究表明 PSCA 基因相关的多肽可以作为 T 细胞靶向位点对前列腺癌进行免疫治疗,而在细胞基质中存在的 PSCA 蛋白往往要比依附于细胞表面的 PSCA 蛋白更容易的被水解^[14]。由于 SNP rs2294008 的 C 等位基因在被研究中被发现是胃溃疡的风险等位基因,因此我们推测其可能会通过加速 PSCA 蛋白的水解过程并通过 CD4+ 或 CD8+T 细胞的激活诱发下游的一系列免疫反应来提高包括胃溃疡在内的消化道溃疡的发病风险。关于 PSCA 基因在胃溃疡发病和发展过程中的作用,还需后续基于动物模型或细胞层面的深入研究。

本研究在我国广东地区汉族人群中发现 rs2294008 位点的基因型频率以及等位基因频率均在胃溃疡病例组和对照组间的分布存在着显著性的差异,该位点的 T 等位基因在胃溃疡病例中的分布频率显著性的高于对照组。针对 PSCA 基因多态性与消化道溃疡的遗传学关联研究既往开展较少,目前仅见较早前发表的基于日本人群的针对十二指肠溃疡的研究一项^[3]。在该研究中,学者发现 rs2294008 的 T 等位基因对十二指肠溃疡具有显著性的保护作用,其 OR 值为 0.67,这与本次研究获得的关联信号结果基本一致。此次研究结果提示广东地区汉族人群胃溃疡的遗传风险可能与 PSCA 基因 rs2294008 位点的基因型有关,后续研究可以通过检查该位点的变异情况从遗传流行病学的角度对胃溃疡的易感人群进行筛查。在后续的针对性别、吸烟、饮酒状态以及幽门螺旋杆菌感染情况这四种非遗传因素的分层分析中发现

表2 基于单个位点的关联分析结果

Table 2 results of single marker based genetic association analyses for 11 selected SNPs

染色体	SNP	A1	A2	分析类型	病例组	对照组	* χ^2	OR(95%置信区间)	P值
8	rs2978974	A	G	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	64/296/328	126/620/696	0.200	-	0.905
				等位基因(A1/A2)	424/952	872/2 012	0.147	1.03(0.89~1.18)	0.701
8	rs18438994	C	G	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	3/56/629	4/130/1 308	-	-	0.625
				等位基因(A1/A2)	62/1 314	138/2 746	0.162	0.94(0.69~1.28)	0.687
8	rs117340570	C	T	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	2/45/641	3/104/1 335	-	-	0.118
				等位基因(A1/A2)	49/1 327	110/2 774	0.166	0.93(0.66~1.31)	0.684
8	rs2978977	A	C	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	20/169/499	34/355/1 053	0.570	-	0.752
				等位基因(A1/A2)	209/1 167	423/2 461	0.201	1.04(0.87~1.25)	0.654
8	rs146194718	G	A	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	10/117/561	18/242/1 182	0.174	-	0.917
				等位基因(A1/A2)	137/1 239	278/2 606	0.107	1.04(0.84~1.29)	0.744
8	rs10956997	T	A	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	4/81/603	9/173/1 260	-	-	0.987
				等位基因(A1/A2)	89/1 287	191/2 693	0.036	0.98(0.75~1.27)	0.849
8	rs587606222	C	G	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	2/45/641	3/104/1 335	-	-	0.118
				等位基因(A1/A2)	49/1 327	110/2 774	0.166	0.93(0.66~1.31)	0.684
8	rs117919141	T	G	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	3/61/624	6/124/1 312	-	-	0.964
				等位基因(A1/A2)	67/1 309	136/2 748	0.048	1.03(0.77~1.40)	0.826
8	rs13262164	T	C	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	4/103/581	10/225/1 207	-	-	0.912
				等位基因(A1/A2)	111/1 265	245/2 639	0.223	0.95(0.75~1.19)	0.637
8	rs2294008	T	C	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	22/238/428	107/542/793	19.080	-	7.18×10 ⁻⁵
				等位基因(A1/A2)	282/1 094	756/2 128	16.530	0.73(0.62~0.85)	4.78×10 ⁻⁵
8	rs2976391	A	C	基因型(A1A1/A1A2/A2A2)	90/326/272	181/684/577	0.130	-	0.937
				等位基因(A1/A2)	506/870	1046/1 838	0.102	1.02(0.89~1.17)	0.749

*部分 SNP 由于计数资料的稀疏性无法进行 χ^2 , 我们采用 Fisher 精确检验。

表3 rs2294008 位点遗传学关联效应分层分析

Table 3 Stratification analyses for SNP rs2294008

项目	等位基因	病例/对照 样本数	病例等位 基因频率	对照等位 基因频率	χ^2 值	OR(95%置信区间)	P值
性别							
男性	T	372/783	0.21	0.26	7.855	0.74(0.60~0.91)	0.005
女性	T	316/659	0.20	0.26	8.758	0.71(0.56~0.89)	0.003
抽烟							
是	T	72/150	0.22	0.28	1.921	0.72(0.45~1.15)	0.166
否	T	616/1 292	0.20	0.26	14.620	0.73(0.62~0.86)	0.000
饮酒							
是	T	156/328	0.20	0.26	4.860	0.69(0.50~0.96)	0.027
否	T	532/1 114	0.21	0.26	11.770	0.74(0.62~0.88)	0.001
幽门螺旋杆菌感染							
是	T	492/560	0.20	0.25	6.687	0.76(0.62~0.94)	0.010
否	T	196/882	0.21	0.27	6.465	0.71(0.54~0.93)	0.011

在不同的分层中 SNP 位点 rs2294008 对胃溃疡的发病风险贡献情况基本一致, 这提示 PSCA 基因 SNP 位点 rs2294008 的遗传学作用可能是独立于这些已知的危险因素而存在的。

本次研究所使用的 DNA 多态性位点为单核苷酸多态性位点, 该位点为第 3 代遗传标记, 具有

覆盖度高、密度大和分型成本低的特点, 可以基本满足遗传学关联分析的需要^[17]。此外本次研究使用了 Sequenom MassARRAY 平台对所选 SNP 进行基因分型, 该平台主要基于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MAL-

DI-TOF-MS)技术,是目前最为常用的 SNP 检测技术,具有高通量以及高准确度的特点,完全可以适合于本次研究的大规模筛查需要^[18]。

群体分层是遗传学关联研究的主要混杂因素,这一混杂因素如果不能得到有效控制,会显著地提升遗传学关联信号的假阳性率^[19]。本研究作为一项基于候选基因的遗传学关联研究,分型的 SNP 位点数目有限,因此无法使用目前常见的统计学手段对潜在的群体分层进行校正。然而在样本纳入过程中,通过对受试者来源地进行限制,可以部分的对受试者的遗传背景的遗传异质性进行控制,从而部分的消除了群体分层这一混杂因素的干扰。本次研究中由于研究经费和人力的限制采用了候选基因的研究策略,选取了 11 个遗传多态性位点进行的研究,这 11 个位点所包含的信息并不能够覆盖整个 *PSCA* 基因区域,因此在进行研究的过程中可能遗漏了某些较为重要的遗传学位点。在未来的研究中通过选取更高密度的遗传学变异位点对 *PSCA* 基因与胃溃疡的遗传学关联进行更加系统性的研究,或许可以弥补这一缺憾。此外,由于目前 *PSCA* 基因 rs2294008 位点与胃溃疡易感性的作用机制尚未明确,因此有关该 SNP 位点的基于细胞或动物模型的功能分析尚待开展,以期获得更有说服力的结果。

参考文献

- [1] Kavitt RT, Lipowska AM, Anyane-Yeboah A, et al. Diagnosis and treatment of peptic ulcer disease [J]. *The American journal of medicine*, 2019, 132(4): 447-456.
- [2] 梅杰,李芳,陈建敏,等. 胃黏膜屏障与胃溃疡的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(6): 841-843.
- [3] 曹章,胡扬喜. 胃溃疡不同治疗方式的临床效果观察[J]. *中国医药导刊*, 2012, 14(5): 744-745.
- [4] Salih BA, Abasiyanik MF, Bayyurt N, et al. H pylori infection and other risk factors associated with peptic ulcers in turkish patients: a retrospective study [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(23): 3245-3248.
- [5] 孙保华,卢世云,陈登登,等. 胃、十二指肠溃疡幽门螺杆菌感染及相关病因回顾性分析 204 例[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(6): 628-630.
- [6] 谢华,李东,徐福明. 老年胃溃疡患病的相关影响因素[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(1): 132-133.
- [7] Tanikawa C, Urabe Y, Matsuo K, et al. A genome-wide association study identifies two susceptibility loci for duodenal ulcer in the Japanese population [J]. *Nature genetics*, 2012, 44(4): 430-434.
- [8] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses [J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(3): 559-75.
- [9] Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 263-265.
- [10] Marra E, Uva P, Viti V, et al. Growth delay of human bladder cancer cells by prostate stem cell antigen down-regulation is associated with activation of immune signaling pathways [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(7): 129.
- [11] Xia B, Wang Y, Wang X, et al. In utero and lactational exposure of DEHP increases the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring through *PSCA* hypomethylation [J]. *Toxicology letters*, 2018, 292: 78-84.
- [12] Heinrich MC, Göbel C, Kluth M, et al. *PSCA* expression is associated with favorable tumor features and reduced PSA recurrence in operated prostate cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 612.
- [13] Gu Z, Yamashiro J, Kono E, et al. Anti-prostate stem cell antigen monoclonal antibody 1G8 induces cell death in vitro and inhibits tumor growth in vivo via a Fc-independent mechanism [J]. *Cancer research*, 2005, 65(20): 9495-9500.
- [14] Raff AB, Gray A, Kast WM. Prostate stem cell antigen: a prospective therapeutic and diagnostic target [J]. *Cancer letters*, 2009, 277(2): 126-132.
- [15] Yee EU, Kuo E, Goldsmith JD. Pathologic features of infectious gastritis [J]. *Advances in anatomic pathology*, 2018, 25(4): 238-253.
- [16] Bagheri N, Razavi A, Pourgheysari B, et al. Up-regulated Th17 cell function is associated with increased peptic ulcer disease in helicobacter pylori-infection [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 60: 117-125.
- [17] Srinivasan S, Clements JA, Batra J. Single nucleotide polymorphisms in clinics: Fantasy or reality for cancer? [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2016, 53(1): 29-39.
- [18] Cho YT, Su H, Wu WJ, et al. Shiea J. Biomarker characterization by MALDI - TOF/MS [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 69(3): 209-254.
- [19] Sudmant PH, Mallick S, Nelson BJ, et al. Global diversity, population stratification, and selection of human copy - number variation [J]. *Science*, 2015, 349(6253): aab3761.

FBNI 基因 c.2418A>G 突变对转录影响的研究

张岳 李金洁 刁艳君 杨柳 郝晓柯*

[摘要] 目的 探究 c.2418A>G 突变对原纤维蛋白-1 (*FBNI*) 基因转录过程的影响, 探讨其分子发病机制。方法 利用 Life Tech Ion PGM 高通量测序技术对 1 名既往无致病因素的早发性胸主动脉瘤患者的 15 个与遗传性主动脉疾病相关基因进行组合检测, 发现其 *FBNI* 基因携带 c.2418A>G 杂合突变。软件预测该突变会导致 mRNA 异常剪接的发生。利用 Minigene 技术构建分别带有 c.2418A>G 位点和正常位点的重组表达载体, 转染 HeLa 细胞后抽提 RNA, 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Sanger 测序分析。提取患者和健康人血液中淋巴细胞的 RNA, 利用 qRT-PCR 和测序确认该突变对 mRNA 剪接的影响。结果 MUT-HeLa 细胞内未检测到含有 c.2418A>G 突变位点的 mRNA, *FBNI* 基因的相对表达量与正常对照组相比明显降低 ($t=3.354, P<0.01$); 患者淋巴细胞内未检测到含有 c.2418A>G 突变位点的 mRNA, 并且 3 个不同外显子区域的相对表达量明显低于健康人 ($t=4.979, P<0.01$; $t=3.243, P<0.05$; $t=5.017, P<0.01$), 提示异常 mRNA 发生完全降解。结论 c.2418A>G 突变使 mRNA 发生降解, 可能是该患者的致病原因。

[关键词] 主动脉瘤和夹层; *FBNI* 基因; 杂合突变; mRNA 降解

Study on the effect of *FBNI* gene c.2418A>G mutation on transcription

ZHANG Yue, LI Jinjie, DIAO Yanjun, YANG Liu, HAO Xiaoke*

(Department of Laboratory Medicine, Xijing Hospital Affiliated to Air Force Military Medical University, Xi'an, Shanxi, China, 710032)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of c.2418A>G mutation on the transcriptional process of fibrillin-1 (*FBNI*) gene and to explore its molecular pathogenesis. Methods Life Tech Ion PGM high-throughput sequencing technology was used to detect 15 genes associated with hereditary aortic diseases in a patient with early-onset thoracic aortic aneurysm without previous pathogenic factors. The *FBNI* gene was found to carry c.2418A>G heterozygous mutation. The software predicts that this mutation will lead to the occurrence of abnormal splicing of mRNA. The recombinant expression vector with c.2418A>G locus or normal locus was constructed by using Minigene technology. After transfecting HeLa cells, RNA was extracted and analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Sanger sequencing. The RNA of lymphocytes in the blood of patient and healthy people was extracted, and the effect of the mutation on mRNA splicing was confirmed by qRT-PCR and sequencing. Results The mRNA containing c.2418A>G mutation was not detected in MUT-HeLa cells, and the relative expression of *FBNI* gene was significantly lower than that in the normal control group ($t=3.354, P<0.01$). No mRNA containing c.2418A>G mutation was detected in the lymphocytes of patients, and the relative expression of three different exon regions was significantly lower than that of healthy subjects ($t=4.979, P<0.01$; $t=3.243, P<0.05$; $t=5.017, P<0.01$), indicating that abnormal mRNA is completely degraded. Conclusion The c.2418A>G mutation causes the degradation of mRNA, suggesting the cause of the disease in this patient.

[KEY WORDS] Aortic aneurysm and dissection; *FBNI* gene; Heterozygous mutation; mRNA degradation

作者单位:空军军医大学西京医院检验科,陕西,西安 710032

*通信作者:郝晓柯, E-mail:haoxkg@fmmu.edu.cn

原纤维蛋白-1(Fibrillin-1, *FBNI*)基因位于人15号染色体长臂(15q21.1),包含66个外显子,其编码的原纤维蛋白-1由2871个氨基酸组成。原纤维蛋白-1是一种富含半胱氨酸的分泌糖蛋白,参与细胞外基质中10~12 μm微纤维的组成并形成弹性纤维,为主动脉及其他结缔组织提供韧性和受力支撑^[1]。当*FBNI*基因突变时原纤维蛋白-1结构及活性发生改变,干扰细胞外基质中微纤维的形成,从而破坏细胞外基质的稳定结构,削弱主动脉壁中膜弹性进而导致主动脉瘤和夹层的发生^[2]。

胸主动脉瘤和夹层(Thoracic aortic aneurysm and dissection, TAAD)是一类以胸主动脉扩张、主动脉瘤或夹层为主要特征的主动脉疾病,既往无致病因素的早发性胸主动脉瘤患者通常具有较强的遗传倾向。遗传性TAAD约占20%,在临床上分为综合型和非综合型。其中,非综合型以心血管系统异常表现为主,不累及其他结缔组织和系统,一般为常染色体显性遗传^[3]。目前已知*FBNI*基因突变是导致马凡综合征(Marfan syndrome, MFS)的主要原因,但有文献报道4%的非综合型TAAD与*FBNI*基因突变有关^[3-4]。本研究对1名早发性胸主动脉瘤患者的15个与遗传性主动脉疾病相关基因进行组合检测(包括*FBNI*、*FBN2*、*TGFB2*、*TGFBR1*、*TGFBR2*、*SMAD3*、*SMAD4*、*MYH11*、*ACTA2*、*MYLK*、*COL3A1*、*SLC2A10*、*NOTCH1*、*PRKG1*基因)^[5],寻找该患者的致病基因并探讨分子致病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患者30岁男性,身高185 cm,体重90 kg,血压106/76 mmHg。心脏彩超提示升主动脉及主动脉窦部内径瘤样增宽(升主动脉58 mm,主动脉窦部55 mm),主动脉弓内径增宽,升主动脉至降主动脉内膜与管壁剥离,主动脉瓣先天性发育不良伴返流,其他系统尚无阳性发现。患者来源于西京医院,该研究获得本医院伦理委员会批准,并经患者知情同意后签署书面知情同意书。

1.2 材料

Hela细胞和质粒pcDNA3.1(-)由本科室提供;胎牛血清购自BI公司;DMEM培养基购自吉诺生物;TRIzol™ Reagent试剂及转染试剂Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司;高保

真酶(PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase)、逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT Master Mix)、T4 DNA连接酶、EcoRI和HindIII限制性内切酶以及实时荧光定量PCR试剂盒(TB Green™ Premix Ex Taq™ II)购自大连宝生物公司;胶回收试剂盒(QIAquick® Gel Extraction Kit)购自德国QIAGEN公司;感受态细胞DH5α购自中国Solarbio公司;引物合成和Sanger测序由西安擎科生物公司负责。

1.3 方法

1.3.1 基因检测及突变分析

采集4 mL患者外周静脉血并经EDTA-K2抗凝,按照核酸自动提取仪的标准化操作流程提取基因组DNA(仪器及试剂盒均有西安天隆科技有限公司提供),并用Qubit 2.0荧光定量仪(美国赛默飞公司)检测基因组DNA浓度。使用遗传性心血管疾病基因检测试剂盒(北京诚真基因生物技术有限公司),按照其说明书对样本进行基因检测。测序所需的ABI 9700型PCR仪、ABI 2720型PCR仪、Ion Chef™ System、Ion Torrent PGM及Ion Torrent 318 v2芯片、Ion PGM™ Hi-Q™试剂盒均由美国赛默飞公司提供。

基因检测结果通过Coverage Analysis及Variant Caller与人类基因组参考序列hg19(GRCh37)进行比对,采用Ion Reporter™对所有的变异位点进行注释,筛选出可疑突变位点并用Sanger测序法进行验证,验证结果根据美国医学遗传学与基因组学学会制定的《遗传变异分类标准与指南》^[6]判定突变位点的致病性质。对判定为致病、可能致病或临床意义未明患者的家属相同突变位点进行Sanger测序。

1.3.2 生物信息学分析

使用dbSNP数据库、Mutation Taster和Human Splicing Finder(HSF)等生物信息学软件分析突变对剪接位点分值的影响。

1.3.3 Minigene技术

1.3.3.1 重组载体构建 以健康人和患者基因组DNA作为模板,使用高保真酶和F-EcoRI、R-HindIII扩增目的片段(包括Exon19 71 bp、Intron19 1040 bp、Exon20 126 bp、Intron20 511 bp和Exon21 53 bp),扩增条件为98℃预变性5 min,98℃变性10 s,60℃退火5 s,68℃延伸4 min,30个循环;4℃保温。1817 bp基因组片段(其5'端包含EcoRI酶切位点,3'端包含HindIII酶切位点)和质粒pcD-

NA3.1(-)经酶切纯化后于16℃连接过夜,连接产物以热激法转化感受态细胞DH5α,经氨苄青霉素抗性筛选的单克隆菌落进行PCR和测序鉴定。相关引物序列如表1所示。

表1 PCR引物
Table 1 PCR primers

引物名称	引物序列(5'-3')
F-EcoRI	GGAATTCCTTCGTGGGACCTATAAATGT
R-HindIII	CCCAAGCTTGCTGTTCTTGCAGACTCCAT
GAPDH-F	CCTGCACCACCAACTGCTTA
GAPDH-R	GGCCATCCACAGTCTTCTGG
Exon4-6F	GGCTCCAGATCCATACAACACTGC
Exon4-6R	CACACCTTCTCCATTGAGACAGC
Exon25-26F	CCTATGCCGAGGTGGTGTTT
Exon25-26R	TGTCGATACACGGGAGATG
Exon55-56F	AGGAACCCCGTCACCAAATC
Exon55-56R	GGTCATGAATCCTCGGCCAT

1.3.3.2 细胞培养与转染 HeLa细胞用含15%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、5%CO₂培养箱中培养。转染前1d,胰酶消化HeLa细胞并调整细胞密度为2.5×10⁵个/mL,接种到6孔板,培养24h使其贴壁。按照Lipofectamine 3000说明书转染两种重组质粒进行瞬时表达,48h后收集细胞。

1.3.3.3 qPCR与Sanger测序 TRIzol法提取HeLa细胞总RNA,测定浓度并反转录为cDNA。按照实时荧光定量PCR试剂盒说明书,以F-EcoRI、R-HindIII为引物进行qPCR。设置程序:95℃ 30s;95℃ 5s;60℃ 30s,40个循环;溶解曲线;以GAPDH为参照物检测FBN1基因mRNA的表达水平,记录每个反应的Ct值,以2^{-ΔΔCt}公式计算基因相对倍比关系。相关引物序列如表1所示。实验重复3次。PCR产物通过1.5%琼脂糖凝胶电泳分析目的片段大小是否改变,纯化后测序分析。

1.3.4 血液淋巴细胞RNA验证

提取患者和健康人血液中淋巴细胞的RNA并反转录为cDNA,以F-EcoRI、R-HindIII为引物进行常规PCR,通过1.5%琼脂糖凝胶电泳分析患者目的片段大小是否改变,回收纯化后测序分析。此外,分别针对Exon 4~6、Exon 25~26和Exon 55~56设计引物通过qPCR分析3个外显子区域mRNA的表达水平,验证异常mRNA是否发生完全降解。相关引物序列如表1所示。

1.4 统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0进行统计分析并作图,两组间比较采用独立样本t检验,以P<0.05为差异,有统计学意义。

2 结果

2.1 家系分析

经基因检测和Sanger测序证实患者FBN1基因第20号外显子存在c.2418A>G杂合突变,其他基因未发现可疑致病性突变。通过口腔拭子对其家族成员相同位点进行Sanger测序,发现患者父亲该位点为杂合突变,经全面体格检查未发现心血管系统存在异常表现。此外,患者女儿因未及1周岁而未进行基因检测,其余亲属基因检测均无阳性发现。家系图谱见图1。

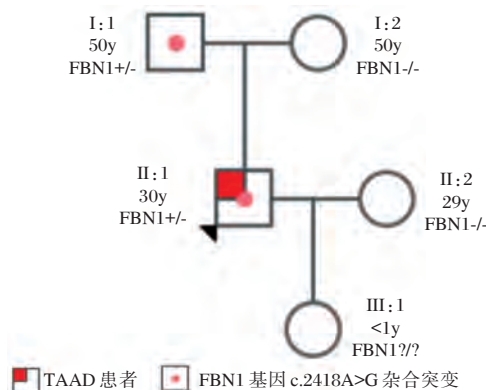


图1 本例TAAD家系图

Figure 1 The family tree of TAAD

表2 dbscSNV数据库预测结果

Table 2 dbscSNV database prediction results

算法	dbscSNV_ADA	dbscSNV_RF
得分	0.999 2	0.994

dbscSNV_ADA或dbscSNV_RF>0.6即认为影响剪接,dbscSNV数据库提示c.2418A>G突变可以影响FBN1基因的剪接。

2.2 c.2418A>G突变影响FBN1基因剪接

2.3 Minigene技术验证结果

2.3.1 重组表达载体鉴定

野生型和突变型重组表达载体分别命名为WT和MUT。菌落PCR电泳(图2A)和Sanger测序(图2B和2C)证实载体构建成功,MUT已引入c.2418A>G突变。

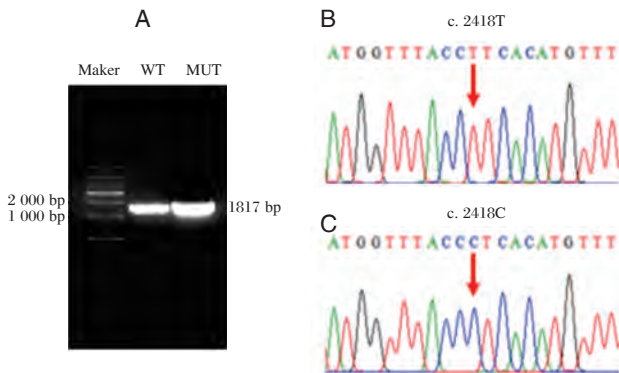
2.3.2 qPCR及测序结果

qPCR检测结果(图3A)所示,与WT-HeLa细

表3 HSF和Mutation Taster预测结果
Table 3 HSF and Mutation Taster prediction results

软件	HSF		Mutation Taster	
	Donor decreased	Donor gained	Donor decreased	Donor gained
5'Motif				
Ref Score	8.14	-2.29	0.98	-
Mut Score	4.45	5.25	0.86	0.48

HSF和Mutation Taster提示原有的剪接供体位点被沉默,一个新的剪接供体位点被激活。

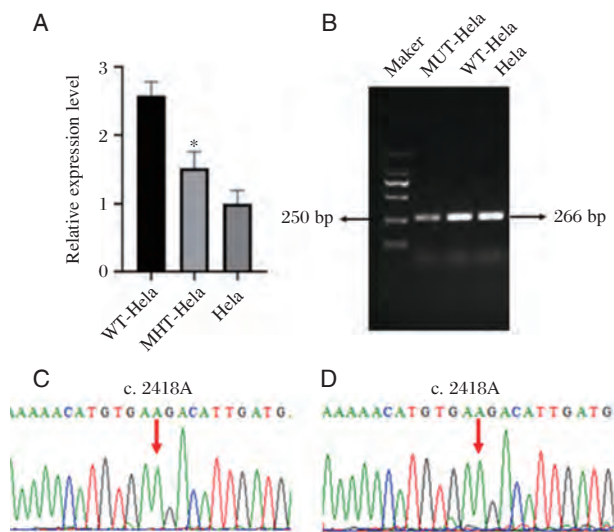


A: 菌落PCR电泳结果; B: WT测序结果(图中所示为反向互补序列); C: MUT测序结果(图中所示为反向互补序列)

图2 WT和MUT鉴定结果

Figure 2 Identification results of WT and MUT

胞相比, MUT-Hela细胞内 *FBN1* 基因 mRNA 的相对表达量明显降低($t=3.354, P<0.01$)。PCR产物电泳(图3B)显示,两种细胞内的扩增片段大小均为266 bp, Sanger测序发现(图3C和图3D)2种产



A: *FBN1* 基因 mRNA 相对表达量($*P<0.05$ WT-Hela vs MUT-Hela); B: PCR产物电泳; C: WT-Hela细胞PCR产物测序结果; D: MUT-Hela细胞PCR产物测序结果

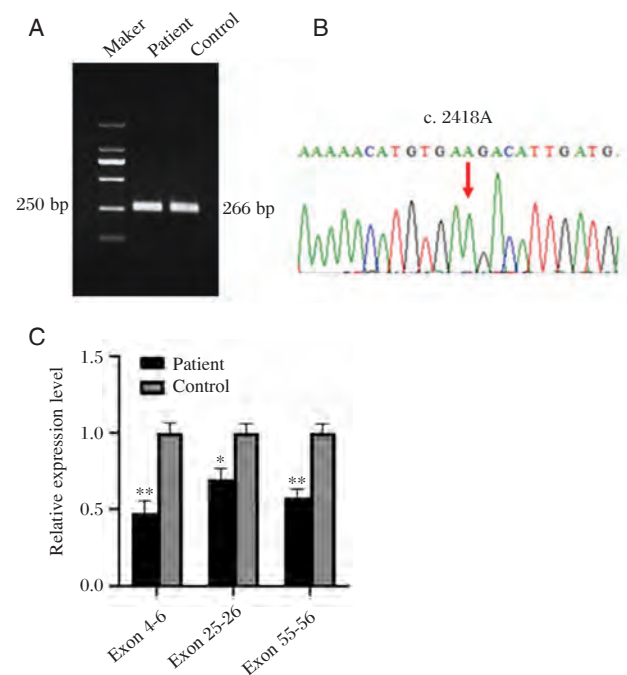
图3 细胞转染结果

Figure 3 Experimental results of cell transfection

物的序列完全一样,内含子被去除并且外显子正确地连接在一起,并且MUT-Hela细胞扩增片段内原有的突变位点消失。

2.4 血液淋巴细胞RNA验证结果

常规PCR产物电泳(图4A)显示患者与健康人目的片段大小均为266 bp,患者常规PCR产物测序也明确c.2418A>G突变位点的消失(图4B)。qPCR结果(图4C)显示,与健康人相比,患者血淋巴细胞内 *FBN1* 基因 mRNA 的相对表达量在3个不同外显子区域明显降低($t=4.979, P<0.01; t=3.243, P<0.05; t=5.017, P<0.01$),提示异常mRNA发生完全降解。



A: 常规PCR产物电泳结果; B: 患者常规PCR产物测序结果; C: *FBN1* 基因 mRNA 相对表达量($*P<0.05, **P<0.01$ Patient vs Control)

图4 血液淋巴细胞RNA实验结果

Figure 4 Experimental results of Blood lymphocyte-derived RNA

3 讨论

胸主动脉瘤和夹层是一种致命性主动脉疾病,约20%具有遗传性,包括MFS、Loeys-Dietz综合征、Ehlers-Dalos综合征以及非综合征性TAAD等。随着对遗传性TAAD认识的不断深入,人们已经筛选出11种强致病基因^[5],临床医生可以利用基因检测技术在患者症状完全表现之前进行初步诊断,对患者家属进行筛查和患者手术方案的选择及预后判断也有一定的指导作用^[7]。在本研究中,该患者除主动脉瘤和夹层症状外无其他部位的异常表现,不符合典型MFS的诊断标准^[8]。患者为青年男性,存在胸主动脉瘤和夹层以及主动脉瓣先天畸形,排除了高血压等后天疾病和创伤对主动脉的影响,考虑为非综合征型TAAD,其主动脉疾病表型可能受到遗传因素的影响。因此本研究选择15个与遗传性主动脉疾病相关的基因对患者进行检测,并通过Sanger测序法确认该患者*FBNI*基因第20号外显子存在c.2418A>G杂合突变。

外显子与内含子交界处的经典剪接区域在RNA剪接过程中提供供体剪接位点和受体剪接位点,发生突变时可能会导致外显子跳跃、内含子的保留和内含子中假外显子的产生等^[9]。影响mRNA剪接的突变在*FBNI*突变中约占10%,部分剪接突变还会介导mRNA发生降解^[10-11]。c.2418A>G突变位于*FBNI*基因第20号外显子3'端,属于经典剪接序列,但现有文献和临床资料未能证实该突变的致病性质以及是否会引起mRNA的异常剪接。ClinVar数据库根据《遗传变异分类标准与指南》暂时将该突变归为临床意义未明。因此,本研究在体外模拟了c.2418A>G突变对转录过程的影响,同时还分析了患者的血样,均没有发现含有突变位点的mRNA并且mRNA相对表达量低于健康对照。综合上述两种实验结果,c.2418A>G突变使异常mRNA发生了降解,从而使mRNA表达水平下降,因此在测序时没有检测到异常mRNA而造成假阴性结果。该突变使得体内mRNA含量减少从而造成*FBNI*单倍体不足,削弱主动脉壁中膜弹性进而导致患者发生主动脉瘤和夹层^[12-13],如果获得患者的结缔组织标本应检测组织内*FBNI*的含量和组织病理情况加以验证。

虽然非综合征型TAAD具有一定常染色体显性遗传,但遗传异质性较强,很多综合征型TAAD的致病基因也可导致非综合征型TAAD^[14-15]。不同非综合征型TAAD家系的外显率不一,突变并不是在所有的家族成员中共分离,其中*FBNI*基因突变就存在未受影响的突变携带者^[16]。此外,非综合征型TAAD外显率还与发病年龄相关,Yale-New Haven医院对598名胸主动脉瘤患者进行分析^[17],非综合征型TAAD患者的平均发病年龄(56.8岁)显著高于MFS患者(24.8岁)。患者的父亲(50岁)尚未达到非综合征型TAAD的平均发病年龄,本研究应继续密切关注其主动脉及全身其他动脉的变化,定期随访。

综上所述,本研究证实了c.2418A>G会使异常mRNA发生降解,并认为患者主动脉疾病的临床表现与原纤维蛋白-1减少导致主动脉脆性增强有关。希望该实验结果能为*FBNI*基因c.2418A>G突变致病性质的研究提供临床资料和参考证据,进而对遗传性TAAD的产前咨询和诊断有所帮助。

参考文献

- [1] Ramirez F, Caescu C, Wondimu E, et al. Marfan syndrome; A connective tissue disease at the crossroads of mechanotransduction, TGFbeta signaling and cell stemness[J]. Matrix Biol, 2018(71-72):82-89.
- [2] Takeda N, Komuro I. Genetic basis of hereditary thoracic aortic aneurysms and dissections [J]. Cardiol, 2019, 74(2): 136-143.
- [3] Wang WJ, Han P, Zheng J, et al. Exon 47 skipping of fibrillin - 1 leads preferentially to cardiovascular defects in patients with thoracic aortic aneurysms and dissections [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(1): 37-47.
- [4] 中华医学会心血管病学分会精准心血管病学学组,宋雷,惠汝太等.单基因遗传性心血管疾病基因诊断指南[J]中华心血管病杂志, 2019, 47(3): 175-196.
- [5] Renard M, Francis C, Ghosh R, et al. Clinical Validity of Genes for Heritable Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(6):605-61, 5.
- [6] Nykamp K, Anderson M, Powers M, et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria [J]. Genet Med, 2017, 19(10): 1105-1117.

- [7] Cirino AL, Harris S, Lakdawala NK, et al. Role of Genetic Testing in Inherited Cardiovascular Disease [J]. *JAMA Cardiology*, 2017, 2(10):1153-1160.
- [8] Loeys BL, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome [J]. *Journal of Medical Genetics*, 2010, 47(7):476-485.
- [9] 邹永新, 龚瑶琴. 影响RNA剪接的基因变异[J]. *遗传*, 2017, 39(3):200-207.
- [10] Baudhuin LM, Kotzer KE, Lagerstedt SA. Increased frequency of FBN1 truncating and splicing variants in Marfan syndrome patients with aortic events [J]. *Genet Med*, 2015, 17(3):177-187.
- [11] Caputi M, Kendzior RJ Jr, Beemon KL. A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(14):1754-1759.
- [12] Vollbrandt T, Tiedemann K, El-Hallous E, et al. Consequences of cysteine mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules of fibrillin-1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31):32924-32931.
- [13] Torrado M, Maneiro E, Trujillo-Quintero JP, et al. A Novel Heterozygous Intronic Mutation in the FBN1 Gene Contributes to FBN1 RNA Missplicing Events in the Marfan Syndrome [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:3536495.
- [14] Keramati AR, Sadeghpour A, Farahani MM, et al. The non-syndromic familial thoracic aortic aneurysms and dissections maps to 15q21 locus [J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11:143.
- [15] Tan L, Li Z, Zhou C, et al. FBN1 mutations largely contribute to sporadic non-syndromic aortic dissection [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(24):4814-4822.
- [16] Francke U, Berg MA, Tynan K, et al. A Gly1127Ser mutation in an EGF-like domain of the fibrillin-1 gene is a risk factor for ascending aortic aneurysm and dissection [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 56(6):1287-1296.
- [17] Coady MA, Davies RR, Roberts M, et al. Familial patterns of thoracic aortic aneurysms [J]. *Arch Surg*, 1999, 134(4):361-367.

(上接第450页)

- [10] Pallier C, Castera L, Soulier A, et al. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine [J]. *J Virol*, 2006, 80(2):643-653.
- [11] Kasirga E. Lamivudine resistance in children with chronic hepatitis B [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(6):896-902.
- [12] Tan YW, Ye Y, Ge GH, et al. Natural YMDD-motif mutants affect clinical course of lamivudine in chronic hepatitis B [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(7):2089-2095.
- [13] Calica UA, Karabay O. Treatment of chronic hepatitis B patients with tyrosine-methionine-aspartate-aspartate mutations [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(4):1727-1728.
- [14] Zhang Q, Liao Y, Chen J, et al. Corrigendum: epidemiology study of HBV genotypes and antiviral drug resistance in multi-ethnic regions from Western China [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(6):20451.
- [15] Westland CE, Yang H, Delaney WT, et al. Activity of adefovir dipivoxil against all patterns of lamivudine-resistant hepatitis B viruses in patients [J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(1):67-73.
- [16] 王晓英, 余会元. 拉米夫定抗乙型肝炎病毒治疗的耐药问题 [J]. *肝脏*, 2012, 17(4):284-286.
- [17] 王创俊, 王庆, 曹治家, 等. NGS检测乙型肝炎病毒耐药基因突变情况及其临床意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(1):28-32.
- [18] Vivekanandan P, Singh OV. Molecular methods in the diagnosis and management of chronic hepatitis B [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(7):921-935.
- [19] 张秀娟. 基于高通量测序技术的乙肝耐药基因突变检测方法研究 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [20] Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(11):1544-1557.
- [21] Fernandez-Marmiesse A, Gouveia S, Couce ML. NGS technologies as a turning point in rare disease research, diagnosis and treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(3):404-432.
- [22] 宋世会, 齐俊英, 杨道锋, 等. 乙型肝炎病毒基因型与YMDD变异的关系 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2005, 15(4):199-201.
- [23] 张笠, 高武, 刘小荣. 慢性乙型肝炎患者YMDD突变与HBV DNA定量水平相关性研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(22):2724-2725.

慢病毒介导 *HMGN5* 基因沉默对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制研究

孙娟* 信艳萍 张国梅 田晓娜 刘会敏

[摘要] 目的 观察慢病毒介导的高迁移率族核小体结合域5(*HMGN5*)基因沉默对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并对其机制进行初步探讨。方法 RT-qPCR法检测人卵巢上皮细胞株 IOSE 及4株不同卵巢癌细胞中 *HMGN5* 的表达情况,将 *HMGN5* shRNA 慢病毒载体转染至人卵巢癌细胞 SKOV3 中,RT-qPCR 和 Western blot 检测 SKOV3 细胞中 *HMGN5* mRNA 和蛋白表达情况,MTT 法检测沉默 *HMGN5* 基因对细胞增殖能力的影响,划痕实验检测沉默 *HMGN5* 基因对细胞迁移能力的影响,Transwell 实验检测沉默 *HMGN5* 基因对细胞侵袭能力;Western blot 检测 SKOV3 细胞中 PCNA、MMP-9、Wnt1 和 β -连环蛋白(β -catenin)蛋白表达水平。结果 与卵巢上皮细胞株 IOSE 相比,*HMGN5* 在卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780、HO-8910、Caov3 中的表达明显升高($P<0.05$)。与 Blank 组和 NC 组相比,sh-*HMGN5* 组 SKOV3 细胞中 *HMGN5* mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力均明显下降($P<0.05$),细胞中 PCNA、MMP-9、Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达水平明显下调($P<0.05$)。结论 沉默 *HMGN5* 可能通过阻碍 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力。

[关键词] *HMGN5* 基因;卵巢癌细胞;增殖;迁移;侵袭;Wnt/ β -catenin 信号通路

Effect of lentivirus mediated *HMGN5* gene silencing on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells and its mechanism

SUN Juan*, XIN Yanping, ZHANG Guomei, TIAN Xiaona, LIU Huimin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450007)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effects of lentiviral-mediated high mobility group nucleosome binding domain 5 (*HMGN5*) gene silencing on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells, and to explore the mechanism. Methods RT-qPCR was used to detect the expression of *HMGN5* in human ovarian epithelial cell line IOSE and four different ovarian cancer cells. *HMGN5* shRNA lentivirus vector was transfected into human ovarian cancer cell line SKOV3. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression of *HMGN5* mRNA and protein in SKOV3 cells. MTT method was used to detect the effect of *HMGN5* gene silencing on cell proliferation, scratch test was used to detect the effect of *HMGN5* gene silencing on cell migration, and Transwell test was used to detect the invasion of *HMGN5* gene silencing on cell. Western blot was used to detect the expression of PCNA, MMP-9, Wnt1 and β -Catenin in SKOV3 cells. Results The expression of *HMGN5* in SKOV3, A2780, HO-8910 and CAO3 was significantly higher than that in IOSE ($P<0.05$). Compared with blank group and NC group, the expression level of *HMGN5* mRNA and protein in SKOV3 cells of sh-*HMGN5* group was significantly lower ($P<0.05$), the proliferation, migration and invasion ability of SKOV3 cells were significantly lower ($P<0.05$), and the

作者单位:郑州大学附属郑州市中心医院妇产科,河南,郑州 450007

*通信作者:孙娟, E-mail: 858286086@qq.com

expression levels of PCNA, MMP-9, Wnt1 and β -Catenin cells were significantly lower ($P < 0.05$).

Conclusion Silencing *HMGN5* may inhibit the proliferation, migration and invasion of human ovarian cancer SKOV3 cells by blocking the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[KEY WORDS] *HMGN5* gene; ovarian cancer cells; proliferation; migration; invasion; Wnt/ β -catenin signaling pathway

卵巢癌是世界上最常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,也是女性死亡最常见的原因,在过去几十年中其发病率不断上升^[1]。近年来随着医学技术的发展及医疗设施的改善,卵巢癌的诊断和治疗取得了较大进展,但患者预后仍不理想^[2]。由于卵巢癌早期症状不明显,且缺乏有效的诊断方法,大多数卵巢癌患者被诊断时已处中晚期,患者5年生存率 $<30\%$ ^[3]。因此,亟需了解卵巢癌的发病机制,以期建立针对这种致命疾病的新型治疗和诊断策略。高迁移率核小体结合域5(High-mobility group nucleosome-binding domain 5, *HMGN5*)是HMGNs家族成员之一,该基因位于人Xq13.3染色体区域^[4]。最近的研究表明*HMGN5*与染色质调节因子结合调节DNA复制、DNA修复、组蛋白修饰和基因转录和表达^[5]。目前大量研究证实,*HMGN5*在多种类型的肿瘤中过度表达,包括乳腺癌、神经胶质瘤和肾癌,发挥致癌作用^[6-9]。例如,Liu等报道,敲除*HMGN5*显著抑制食管鳞状细胞癌细胞生长并诱导细胞凋亡,此外,敲低*HMGN5*增加了食管鳞状细胞癌细胞对顺铂的敏感性^[10]。Gan等研究显示,*HMGN5*的敲低降低了人尿路上皮膀胱癌5637细胞的活力、集落形成和侵袭,增加了细胞对顺铂的化学敏感性^[11]。然而,*HMGN5*在卵巢癌中的功能和分子机制尚未阐明。因此,本研究探究了*HMGN5*在卵巢癌细胞中的作用及其相关的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢上皮细胞株 IOSE 及卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780、HO-8910、Caov3(美国 ATCC 细胞库);MTT 试剂(美国 Sigma 公司);RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(杭州四季青生物工程材料有限公司);*HMGN5* shRNA 慢病毒载体及阴性对照(上海吉玛制药有限公司);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳所用试剂(美国 Amresco 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司);

SYBR premix Ex Taq Kit 检测试剂盒(日本 TaKaRa 公司);Transwell 小室(美国 Millipore 公司);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司);*HMGN5*、PCNA、MMP-9 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Wnt1 和 β -catenin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞培养

分别将人卵巢上皮细胞株 IOSE 及卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780、HO-8910、Caov3 培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 5% CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中。在倒置显微镜下观察细胞生长状态,细胞贴壁后,及时更换新鲜培养液,待细胞汇合度达 80% 以上时,使用胰蛋白酶消化细胞,以 1:3 进行传代培养,处于对数期的细胞进行实验。

1.3 SKOV3 细胞慢病毒转染

HMGN5 shRNA 慢病毒载体及阴性对照慢病毒载体由上海吉玛制药有限公司构建并包装。将对数生长期 SKOV3 细胞种植于 6 孔板中,种植密度为 1×10^5 /孔,于 37℃ 恒温培养箱继续培养,待细胞生长密度达 50% 时进行感染,向每孔细胞中加入 1:1 比例混合的 RPMI-1640 培养液和慢病毒溶液 2 mL,感染 12 h 后更换为正常培养液。其中感染 *HMGN5* shRNA 慢病毒载体的 SKOV3 细胞记为 sh-*HMGN5* 组,感染阴性对照慢病毒载体的 SKOV3 细胞记为 NC 组,未进行感染处理的 SKOV3 细胞记为 Blank 组,各组 SKOV3 细胞置于 37℃ 培养箱中继续培养。

1.4 RT-qPCR 法检测

分别收集对数生长期的卵巢上皮细胞、不同卵巢癌细胞及转染 48 h 后各组 SKOV3 细胞,采用 Trizol 法裂解细胞,分别提取细胞中总 RNA,按照逆转录盒使用说明书将 RNA 合成 cDNA,并调整 cDNA 浓度,使用 SYBR premix Ex Taq Kit 检测试剂盒进行 RT-qPCR 检测。内参基因为 GAPDH,RT-qPCR 反应程序设置为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共设 40 个循环。反应结束后分析熔链曲线以确定产物特异

性,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各细胞中 *HMGN5* mRNA 相对表达量,其中 $\Delta\Delta CT$ =目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值。实验重复 3 次,取均值。

1.5 Western blot 检测

收集转染 48 h 后各组 SKOV3 细胞,向细胞中加入 RIPA 细胞裂解液,裂解 30 min 提取细胞中总蛋白。以 BCA 法检测提取蛋白的浓度。取 40 μ g 蛋白样品进行上样,行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶电压设置为 80 V,分离胶电压设置为 120 V,待蛋白分离后电转至硝酸纤维素膜上。将膜置于封闭液中室温孵育 2 h。分别加入相应稀释的一抗,(*HMGN5* 一抗 1:800 稀释、*PCNA* 一抗 1:500 稀释、*MMP-9* 一抗 1:500 稀释、*Wnt1* 一抗 1:500 稀释、 β -catenin 一抗 1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 下过夜孵育, TBST 洗膜,加入 1:3 000 稀释的二抗,室温孵育 1 h。TBST 洗膜,以 ECL 化学发光,使用凝胶成像仪拍照。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 图像分析软件对各条带灰度值进行分析。分别计算目的蛋白相对表达水平,实验重复 3 次,取均值。

1.6 MTT 法检测

对数生长期的 SKOV3 细胞以 1×10^3 /孔接种到 96 孔板中,待细胞生长汇合度达 50% 时按照上述 1.3 方法进行感染和分组,分别在感染 24、48、72 h 时,向每孔细胞中加入 MTT 溶液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h,弃上清液,向细胞中加入 150 μ L 二甲亚砜,振荡反应 10 min,待沉淀完全溶解后,在酶标仪 450 nm 波长处测定各孔细胞吸光度值(A 值)。每组 SKOV3 细胞每个时间点设置 4 个复孔,实验重复 3 次,取均值。

1.7 细胞划痕实验

感染后各组 SKOV3 细胞以 3×10^4 /孔接种到 6 孔板中,放置在 37 $^{\circ}$ C 培养箱继续培养,待细胞生长汇合达 90% 以上时,将培养液更换成低浓度(0.5%)胎牛血清的培养液,使用划痕仪对细胞进行划痕,以 PBS 洗涤划掉的细胞,加入 0.5% 胎牛血清的培养液,放置在 37 $^{\circ}$ C 培养箱继续培养 24 h,分别在划痕 0 和 24 h 观察细胞划痕宽度,计算细胞迁移率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度。实验重复 3 次,取均值。

1.8 Transwell 实验

Matrigel 基质胶以无血清培养基继续稀释,将稀释的 Matrigel 胶加入到 Transwell 小室的上室,室温包被待用。待测各组 SKOV3 细胞以胰蛋白

酶消化,以无血清培养液重悬细胞,制成 1×10^5 /mL 的细胞悬液。取 200 μ L 细胞悬液加入到 Transwell 小室的上室,下室加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的培养液。将 Transwell 小室放置在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 48 h。用棉签拭去上室未穿膜的细胞,PBS 洗涤 1 次,以 4% 甲醛固定 10 min,以 0.1% 结晶紫染色 30 min,以 PBS 洗涤后风干,在倒置显微镜下随机选取 5 个视野观察并计数穿膜细胞数。实验重复 3 次,取均值。

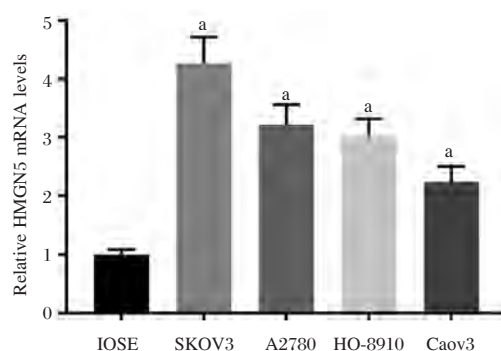
1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两组间差异比较采用 SNK-*q* 检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *HMGN5* 在卵巢癌细胞中呈高表达

采用 RT-qPCR 检测卵巢上皮细胞株 IOSE 和 4 株不同卵巢癌细胞中 *HMGN5* 的表达情况,结果如图 1 所示,与 IOSE 细胞相比,卵巢癌 SKOV3、A2780、HO-8910、Caov3 细胞中 *HMGN5* 的表达量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。*HMGN5* 在卵巢癌 SKOV3 细胞中的表达量最高,因此以 SKOV3 细胞为研究对象进行后续实验。

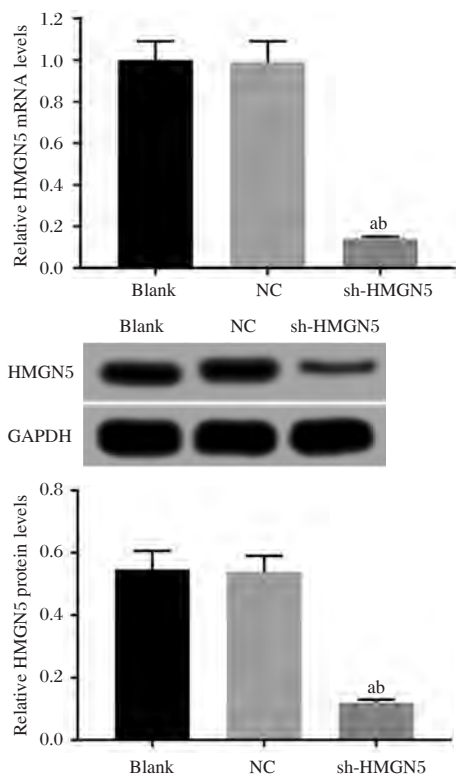


与 IOSE 细胞比, $^*P < 0.05$ 。

图 1 RT-qPCR 检测 5 种细胞中 *HMGN5* 的表达量
Figure 1 RT-qPCR detection of *HMGN5* expression in five cells

2.2 转染 *HMGN5* shRNA 慢病毒载体可沉默 SKOV3 细胞中 *HMGN5* 基因

采用慢病毒转染 SKOV3 细胞后,RT-qPCR 和 Western blot 检测结果如图 2 所示,与 Blank 组和 NC 组相比,sh-*HMGN5* 组 SKOV3 细胞中 *HMGN5* mRNA 和蛋白表达水平显著降低,差异具有统计



与 Blank 组比, ^a $P < 0.05$; 与 NC 组比, ^b $P < 0.05$ 。

图2 各组 SKOV3 细胞中 *HMGN5* mRNA 和蛋白表达水平比较

Figure 2 Comparison of *HMGN5* mRNA and protein expression levels in SKOV3 cells

学意义 ($P < 0.05$); 与 Blank 组相比, NC 组 SKOV3 细胞中 *HMGN5* mRNA 和蛋白表达水平无明显改变, 差异具有统计学意义 ($P > 0.05$)。提示沉默 *HMGN5* 基因的 SKOV3 细胞株构建成功。

2.3 沉默 *HMGN5* 基因抑制 SKOV3 细胞增殖能力

MTT 检测结果如图 3 所示, 与 Blank 组和 NC 组相比, sh-HMGN5 组 SKOV3 细胞在 24、48、72 h

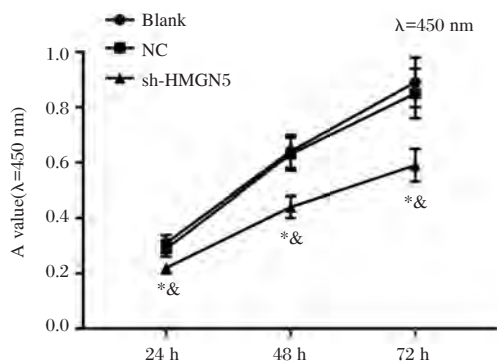


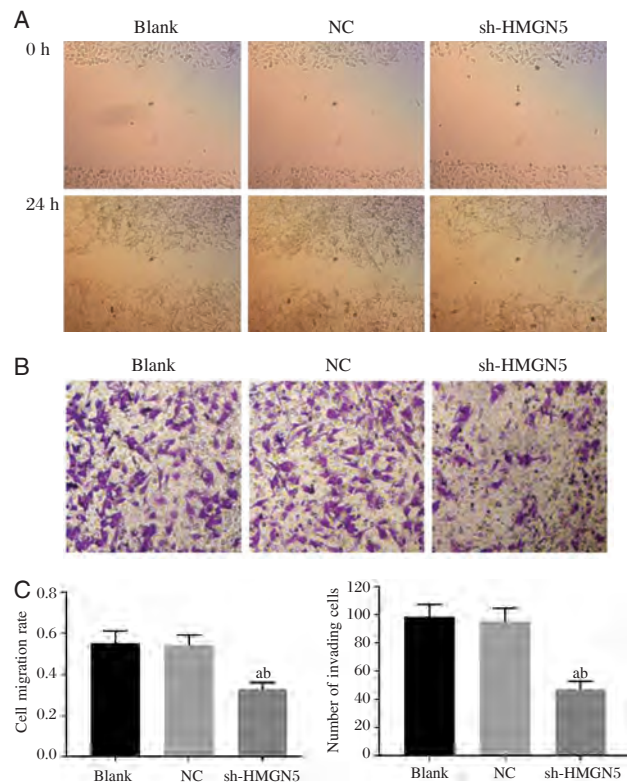
图3 MTT 检测各组 SKOV3 细胞在不同时间 A 值

Figure 3 MTT detection of SKOV3 cells in each group at different time A value

时 A 值明显下降 (F 值分别为 27.409、38.966、36.182, $P < 0.05$), 差异有统计学意义; 与 Blank 组相比, NC 组 SKOV3 细胞在 24、48、72 h 时 A 值无明显改变 ($P > 0.05$), 差异无统计学意义。提示沉默 *HMGN5* 基因能够抑制 SKOV3 细胞增殖。

2.4 沉默 *HMGN5* 基因抑制 SKOV3 细胞迁移和侵袭

划痕实验结果显示 (见图 4A 和 4C), 与 Blank 组和 NC 组相比, sh-HMGN5 组 SKOV3 细胞迁移率明显降低 ($P < 0.05$), 与 Blank 组相比, NC 组 SKOV3 细胞迁移率无明显改变, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Transwell 实验检测结果显示 (见图 4B 和 4C), 与 Blank 组和 NC 组相比, sh-HMGN5 组侵袭细胞数明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 Blank 组相比, NC 组侵袭细胞数无明显改变 ($P > 0.05$)。提示沉默 *HMGN5* 基因能够阻碍 SKOV3 细胞迁移和侵袭能力。



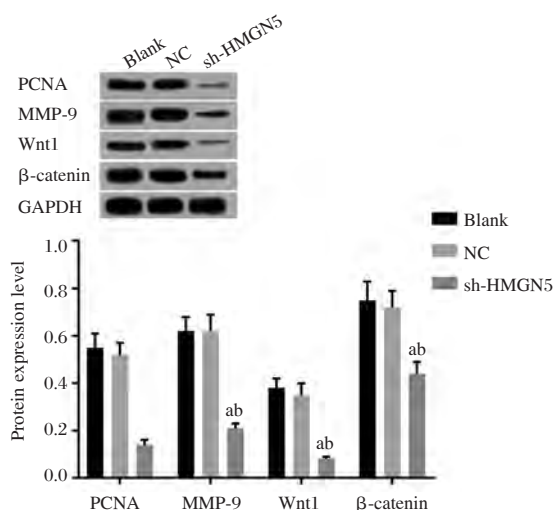
A: 划痕实验检测细胞迁移能力; B: Transwell 实验检测细胞侵袭能力; C: 各组细胞迁移率和侵袭细胞数对比。与 Blank 组比, ^a $P < 0.05$; 与 NC 组比, ^b $P < 0.05$ 。

图4 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力

Figure 4 Scratch test and Transwell test to detect cell migration and invasion

2.5 沉默 *HMGN5* 基因对 SKOV3 细胞中蛋白表达的影响

Western blot 检测结果如图 5 所示,与 Blank 组和 NC 组相比, sh-*HMGN5* 组 SKOV3 细胞中 PCNA、MMP-9、Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$),与 Blank 组相比,NC 组 SKOV3 细胞中 PCNA、MMP-9、Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达水平无明显改变($P > 0.05$)。提示沉默 *HMGN5* 基因能够抑制 SKOV3 细胞中 PCNA 和 MMP-2 蛋白表达及 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。



与 Blank 组比, ^a $P < 0.05$; 与 NC 组比, ^b $P < 0.05$ 。

图 5 Western blot 检测各组 SKOV3 细胞中各蛋白表达情况

Figure 5 Western blot analysis of protein expression in SKOV3 cells

3 讨论

有研究表明,*HMGN5* 在卵巢癌组织中呈高表达,且 *HMGN5* 的表达量与卵巢癌的 TNM 临床分期、肿瘤大小及患者生存时间密切相关^[12]。在本研究中,通过 RT-qPCR 检测发现 4 株不同卵巢癌细胞中 *HMGN5* 的表达显著高于正常卵巢上皮细胞。这些数据表明 *HMGN5* 过表达可能与卵巢癌的进展相关。在过去的几年中,*HMGN5* 的异位高表达水平已在几种恶性肿瘤中得到证实,包括前列腺癌、肺癌、骨肉瘤和胶质瘤,*HMGN5* 能够促进某些类型癌症的肿瘤进展,表明该蛋白在癌症治疗中的潜在作用^[13-15]。Wu 等研究显示,*HMGN5* 在膀胱癌组织中过表达,并且 *HMGN5* 蛋白表达水平对膀胱癌临床病理分期和预后具有重要影响^[16]。Xin 报道指出,*HMGN5* 的表达恢复部分消除了

miR-488 介导的肾细胞癌细胞生长和转移抑制^[17]。然而,目前尚未说明 *HMGN5* 在卵巢癌中的作用。为阐明 *HMGN5* 在卵巢癌中的作用,本实验采用功能丧失的方法即在卵巢癌 SKOV3 细胞中转染 *HMGN5* siRNA 慢病毒载体敲低内源性 *HMGN5* 表达,探究 *HMGN5* 对 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及可能涉及的机制。

本实验筛选 *HMGN5* 基础表达最高的卵巢癌细胞株 SKOV3,并通过慢病毒转染法将 *HMGN5* siRNA 慢病毒载体转染至 SKOV3 细胞,通过 RT-qPCR 和 Western blot 验证成功构建了 *HMGN5* 沉默的 SKOV3 细胞株。MTT 法检测结果显示,沉默 *HMGN5* 基因能够显著抑制 SKOV3 细胞增殖。划痕实验证实沉默 *HMGN5* 基因可阻碍 SKOV3 细胞体外迁移能力。Transwell 实验表明沉默 *HMGN5* 基因能够抑制 SKOV3 细胞侵袭能力。所有这些数据与先前研究的 *HMGN5* 促进肿瘤进展的数据相一致。PCNA 与细胞中 DNA 合成密切相关,在启动细胞增殖过程中发挥重要作用,目前已将其作为细胞处于增殖状态的良好指标^[18]。MMP-9 属于 MMP 家族成员,在降解细胞外基质中扮演重要角色,目前研究证实 MMP-9 通过促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力促使肿瘤发生转移^[19]。本实验 Western blot 结果表明,沉默 *HMGN5* 基因明显抑制 SKOV3 细胞中 PCNA 和 MMP-9 蛋白表达。这与已有关于敲低 *HMGN5* 减少细胞中 MMP-9 表达的研究相符。

Zhao 等^[20]强调,与正常胰管上皮细胞和邻近的正常胰腺组织相比,*HMGN5* 的表达在胰腺导管腺癌细胞系和组织中显著上调,*HMGN5* 通过激活胰腺导管腺癌中 Wnt/ β -catenin 信号通路促进增殖和侵袭。Wnt1 是一种激活 Wnt 信号通路的分泌配体,其与肿瘤发生和进展密切相关^[21]。 β -catenin 是从细胞质到细胞核的 Wnt 信号的关键转导物^[22]。近期研究显示,Wnt/ β -catenin 信号通路在卵巢癌中异常激活,在卵巢癌的发生和发展中发挥重要作用^[23-25]。类似于 Zhao 等人的研究结果,在本研究中观察到在卵巢癌 SKOV3 细胞中 *HMGN5* 沉默后,Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt1 和 β -catenin 的表达明显下调。本实验表明 *HMGN5* 可能正向调节 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的激活。提示 *HMGN5* 沉默对 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制可能的机制是通过阻碍 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的活化实现的。所

有这些数据显示 *HMGN5* 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号传导途径促进肿瘤进展。

总之,本研究首次证明 *HMGN5* 在卵巢癌细胞系中表达上调,此外,沉默 *HMGN5* 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活抑制 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭。本实验为卵巢癌的进展的机制提供了新的见解,并表明 *HMGN5* 可能是卵巢癌诊断和治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] Coburn SB, Bray F, Sherman ME, et al. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype [J]. *International Journal of Cancer*, 2017, 140(11):2451-2460.
- [2] Yu Han-Jun, Li Zhao-Nan, Zhu Wei, et al. Study for Prognosis and Survival Rate of Ovarian Cancer [J]. *Acta Mathematicae Applicatae Sinica*, 2018, 34(4):718-729.
- [3] 刘影, DUBEAU Louis. 卵巢上皮癌的组织起源及其分子生物学特性 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(2):140-144.
- [4] Qu J, Runmin Yan, Juxiang Chen, et al. *HMGN5*: a potential oncogene in gliomas [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2011, 104(3):729-736.
- [5] He S, Li Y, Wang Z, et al. *HMGN5* interacts with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair in prostate cancer [J]. *European Urology Supplements*, 2018, 17(2):e364.
- [6] Zhan S, Tang R, Ding W, et al. Research advances in *HMGN5* and cancer [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(2):1531-1539.
- [7] 马爽, 杨连赫, 奚卓. 星形细胞瘤中 *HMGN5* 的表达及与临床病理因素的关系 [J]. *解剖科学进展*, 2018, 24(3):296-299.
- [8] Yao K, Tang J, Tang Y, et al. AB264. MiR-186 inhibits the malignant behaviours of urothelial bladder cancer cell lines by targeting *HMGN5* [J]. *Translational Andrology & Urology*, 2016, 5(S1):AB264-AB264.
- [9] 谭真, 王善宗, 葛运贞. 肺癌组织 *HMGN5* 基因表达水平及与临床病理特征的相关性分析 [J]. *中国医学创新*, 2017, 14(10):122-125.
- [10] Liu X, Ma W, Yan Y, et al. Silencing *HMGN5* suppresses cell growth and promotes chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Journal of Biochemical & Molecular Toxicology*, 2017, 31(12).
- [11] Gan Y, He L, Yao K, et al. Knockdown of *HMGN5* increases the chemosensitivity of human urothelial bladder cancer cells to cisplatin by targeting PI3K/Akt signaling [J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(6):6463-6470.
- [12] 张洁, 张培先, 龙轶, 等. 卵巢癌组织 *HMGN5* 基因表达与临床病理特征关系分析 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(1):97-100.
- [13] Guo Z, Zhang X, Li X, et al. Expression of oncogenic *HMGN5* increases the sensitivity of prostate cancer cells to gemcitabine [J]. *Oncology Reports*, 2015, 33(3):1519-1525.
- [14] Meng Y, Gao, R ma J, et al. MicroRNA-140-5p regulates osteosarcoma chemoresistance by targeting *HMGN5* and autophagy [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):416-428.
- [15] 许彦, 邬麟, 吴宏伟, 等. *HMGN5* 基因在肺癌中的表达及其意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(23):60-63.
- [16] Wu J, Wang J. *HMGN5* expression in bladder cancer tissue and its role on prognosis [J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2018, 22(4):970-975.
- [17] Xin W, Yu Lili, Kong Xiangbo. miR-488 inhibits cell growth and metastasis in renal cell carcinoma by targeting *HMGN5* [J]. *Oncotargets & Therapy*, 2018, 11:2205-2216.
- [18] Slade D. Maneuvers on PCNA Rings during DNA Replication and Repair [J]. *Genes*, 2018, 9(8):416-433.
- [19] Pego E R, Fernández I, Núñez M J. Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: A review [J]. *Urologic Oncology Seminars & Original Investigations*, 2018, 36(6):272-282.
- [20] Zhao J, Wang Y, Wu X. *HMGN5* promotes proliferation and invasion via the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(3):4013-4019.
- [21] Nusse R, Clevers, Hans. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6):985-999.
- [22] 徐焕基, 夏洪伟, 唐秋琳, 等. β -catenin 和 IQGAP1 的调控环路及其在肠癌细胞增殖中的作用 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2018, 35(1):81-86.
- [23] Arend RC, Londo? o-Joshi, Angelina I, Straughn, J. Michael, et al. The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: A review [J]. *Gynecologic Oncology*, 2013, 131(3):772-779.
- [24] Doo D.W, Londono A, Moore D. J, et al. Inhibiting the wnt/ β -catenin pathway modulates immune response in ovarian cancer [J]. *Gynecologic Oncology*, 2018, 149(3):625.
- [25] 武金玉, 张苑珑, 黄明莉, 等. Wnt/ β -catenin 通路在卵巢癌中的调控机制研究进展 [J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(4):311-313.

术后早期PTX-3及PCT检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染的预测价值

杨秉融¹ 王瑾^{2*}

[摘要] **目的** 探讨术后早期检测正五聚蛋白3(PTX-3)及降钙素原(PCT)对肺部感染的预测价值。**方法** 选择2016年6月至2018年12月期间的264例全麻腹腔镜妇科手术患者为研究对象,术前及术后24 h检测外周血PTX-3及PCT水平,依据术后是否发生肺部感染分为感染组($n=31$)及非感染组($n=233$),比较2组患者术前及术后PTX-3、PCT水平;采用Pearson相关分析术后24 h PTX-3、PCT水平的相关性,采用绘制受试者工作曲线(ROC),评估术后24 h PTX-3、PCT水平对肺部感染的预测价值。**结果** 2组术前PTX-3水平差异无统计学意义($P>0.05$),感染组术后PTX-3、PCT水平均高于非感染组($P<0.05$),术后24 h PTX-3、PCT变化率感染组高于非感染组($P<0.05$)。术后24 h PTX-3与PCT水平呈现正相关关系($r=0.546, P=0.000$)。术后24 h PTX-3、PTX-3变化率、PCT及PCT变化率预测肺部感染的曲线下面积分别为0.861, 0.924, 0.836, 和0.817, 截断值分别为2.965 ng/mL, 102.420%, 1.265 $\mu\text{g/L}$ 和468.900%。**结论** 术后早期PTX-3及PCT检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染具有较好的预测价值,结合PTX-3及PCT变化率有助于肺部感染的早期诊断。

[关键词] 正五聚蛋白3; 降钙素原; 全身麻醉; 肺部感染; 妇科腹腔镜

Predictive value of early detection of PTX-3 and PCT for pulmonary infection after gynecological laparoscopic surgery under general anesthesia

YANG Bingrong¹, WANG Jin^{2*}

(1. Department of Anesthesiology, Cangzhou Maternal and Child Health Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000; 2. The Second Central Hospital of Baoding City Gynecology, Zhuozhou, Hebei, China, 072750)

[ABSTRACT] **Objective** To explore predictive value of Pentraxin 3 (PTX-3) and procalcitonin (PCT) for pulmonary infection after operation. **Methods** From June 2016 to December 2018, 264 cases of laparoscopic gynecological surgery under general anesthesia were selected as the study objects. The PTX-3 and PCT levels in peripheral blood were measured before and 24 hours after operation. According to whether there was pulmonary infection after operation, they were divided into infection group ($n=31$) and non-infection group ($n=233$). The PTX-3 and PCT levels of the two groups were compared before and after operation. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between PTX-3 and PCT levels at 24 hours after operation. To evaluate the predictive value of PTX-3 and PCT levels on pulmonary infection 24 hours after operation, ROC was drawn. **Results** Level of PTX-3 was no significant difference before operation ($P>0.05$), level of PTX-3 and PCT was higher after operation in infection group than in non-infection group ($P<0.05$). Change rates of PTX-3 and PCT was higher in infection group than in non-infection group ($P<0.05$). There was a positive correlation between PTX-3 and PCT level 24 hours after operation ($r=0.546, P=0.000$). The area under the curve of PTX-3, PTX-3, PCT and PCT were 0.861, 0.924, 0.836, and 0.817, respectively. The cutoff values were 2.965 ng/mL, 102.420%, 1.265 $\mu\text{g/L}$ and 468.900%, respectively. **Conclusion** Levels of PTX-3 and PCT after operation has a good predictive value for pulmonary infection

基金项目:河北省保定市科技计划项目(18ZF130)

作者单位:1.沧州市妇幼保健院麻醉科,河北,沧州 061000

2.保定市第二中心医院妇科,河北,涿州 072750

*通信作者:杨秉融, E-mail:17603171291@outlook.com

after gynecological laparoscopic surgery under general anesthesia. The combination of PTX-3 and PCT change rate is helpful for the early diagnosis of pulmonary infection.

[KEY WORDS] N-pentamer 3; Procalcitonin; general anesthesia; Pulmonary infection; Gynecological laparoscopy

妇科腹腔镜技术是妇科的微创手术技术,广泛应用于治疗子宫、卵巢疾病。妇科腹腔镜手术需要全身麻醉支持,但其在应用的过程中存在气管插管等情况,导致患者易于发生肺部感染等情况,对患者术后的康复效果与速度均极为不利^[1-2],故全麻手术患者术后肺部感染的防控与治疗是临床关注的重点,与之相关的研究也不断增多。正五聚蛋白3 (Pentraxin 3, PTX-3)及降钙素原(procalcitonin, PCT)作为与创伤及感染密切相关的研究指标,其在外周血中的检测水平有助于了解机体的创伤应激及感染情况^[3-4],对感染性疾病的诊断具有重要的价值。妇科腹腔镜术后肺部感染是影响患者康复的重要因素之一,而术后肺部感染往往在术后2~3 d才会出现明显的症状,因此早期对肺部感染进行有效的预测对于改善预后具有重要的意义。本研究就术后早期PTX-3及PCT对全麻腹腔镜妇科手术患者术后肺部感染的预测价值进行了探索。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2016年6月至2018年12月期间在沧州市妇幼保健院妇产科264例全麻腹腔镜手术患者为研究对象。纳入标准:原发病具备腹腔镜手术指征;年龄≥20岁者;术前不存在肺部感染者;排除标准:既往复杂盆腔手术史;术前存在肺部感染者;合并其他感染者;合并心脑肾肺肝等功能不全者;合

并代谢性疾病者;恶性肿瘤患者;精神病史者;术中存在创伤者。根据围术期术后阶段(住院期间)是否发生肺部感染(诊断标准^[5]):①咳嗽、咳痰等呼吸道症状,②肺部湿啰音;③发热;④白细胞计数增高或核左移;⑤影像学检查肺部斑片影或间质改变等感染征象;其中1~4中一项合并第5项则诊断为肺部感染,并除外其它肺部疾病,如结核、肺炎等)分为感染组($n=31$)及非感染组($n=233$),2组患者年龄、孕次、疾病种类及美国麻醉医师协会风险分级(American Society of Anesthesiologists Risk Classification, ASA)分级等基线资料无统计学差异($P>0.05$),见表1。患者及家属均已签署知情同意书,研究内容经医院医学伦理委员会批准,符合医学伦理学要求。

1.2 标本采集与检测

于术前及术后24 h采集264例患者外周静脉血标本,低温离心,离心速度为3 000 r/min,离心时间为5 min,吸取血清保存于深低温保存以备分批检测。采用酶联免疫吸附法检测血清PTX-3及PCT水平,检测试剂盒购自深圳市晋百慧生物有限公司,检测仪器为Multiskan型酶标仪(美国赛默飞公司)。检测板洗涤后设置样品孔、标准品孔和对照孔,依次滴加稀释样品、标准品和空白对照液,温育后滴加生物素标记的一抗,然后滴加亲和素标记的辣根过氧化物酶,充分反应或滴加底物及终止液,显色后在450 nm处检测吸光度,计算样品浓度,检测过程严格按照试剂及仪器实用说明书进行。

表1 2组基本资料比较 [$n(\%)$, $\bar{x} \pm s$]

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

基本资料	感染组($n=31$)	非感染组($n=233$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	41.62±5.66	41.75±5.53	0.095	0.461
孕次(次)	1.15±0.23	1.20±0.19	1.036	0.151
疾病种类			0.039	0.843
子宫肌瘤	9(29.0)	65(27.9)		
子宫腺肌症	5(16.1)	31(13.3)		
卵巢囊肿	17(54.8)	137(58.8)		
ASA分级			0.027	0.869
I级	11(55.0)	53(53.0)		
II级	9(45.0)	47(47.0)		

1.3 PTX-3 及 PCT 变化率计算

PTX-3 及 PCT 变化率依据术前及术后检测值计算,变化率=(术后 24 h 检测值-术前检测值)/术前检测值×100%。

1.4 统计学处理

数据分析采用 SPSS 11.5 统计学软件,计数资料用 % 表示,组间比较采用 χ^2 检验,计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验,相关检验采用 Pearson 相关性分析,各指标对肺部感染的预测价值采用 ROC 曲线, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 术前及术后两组的外周血 PTX-3 及 PCT 水平比较

术前 2 组的外周血 PTX-3 及 PCT 水平,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),术后 24 h 两组患者 PTX-3 及 PCT 均较术前增高 ($P < 0.05$),感染组 PTX-3 及 PCT 明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组患者术前及术后 PTX-3、PCT 水平比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of PTX-3 and PCT levels in 2 groups before and after operation [n(%)]

组别	n	PTX-3 (ng/mL)		PCT (μg/L)	
		术前	术后 24 h	术前	术后 24 h
感染组	31	1.72±0.27	4.35±1.29 ^a	0.21±0.05	1.32±0.26 ^a
非感染组	233	1.68±0.25	2.76±0.74 ^a	0.20±0.04	0.84±0.41 ^a
<i>t</i> 值		0.829	10.110	1.268	6.408
<i>P</i> 值		0.408	0.000	0.206	0.000

^a表示同术前比较 $P < 0.05$ 。

2.2 术后早期两组患者 PTX-3 变化率及 PCT 变化率比较

感染组 PTX-3 及 PCT 术后 24 h 变化率高于非感染组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 术后早期患者 PTX-3 与 PCT 关系

Pearson 相关性分析显示,术后 24 h 外周血 PTX-3 与 PCT 水平呈现一定的正相关关系 ($r = 0.546, P = 0.000$)。见图 1。

表 3 2 组患者术后早期 PTX-3 及 PCT 变化率比较 [n(%)]

Table 3 Comparison of early change rate of PTX-3 PCT in 2 groups [n(%)]

组别	n	PTX-3 变化率	PCT 变化率
感染组	31	162.23±59.78	532.52±192.77
非感染组	233	71.15±27.21	318.50±101.97
<i>t</i> 值		14.598	9.649
<i>P</i> 值		0.000	0.000

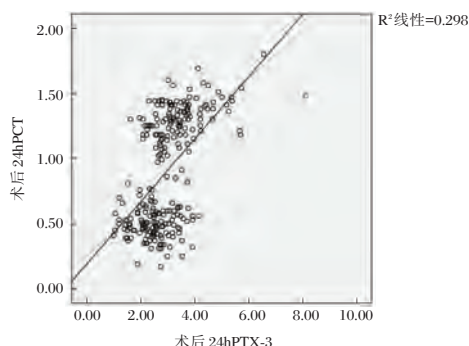


图 1 术后早期患者 PTX-3 与 PCT 关系

Figure 1 Relevance between PTX-3 and PCT in early postoperative patients

2.4 术后早期 PTX-3、PCT 水平及变化率对肺部感染的预测价值

术后早期 PTX-3、PCT 水平及变化率对肺部感染具有较好的预测价值,PTX 变化率 AUC 值最大 (0.924),PTX-3 敏感度最高 (0.871),PCT 变化率特异度最高 (0.923)。见表 4,图 2。

3 讨论

子宫切除术患者围术期的安全影响因素较多,其中麻醉对于患者预后影响较大。全麻术对于子宫切除术患者的术中及术后影响不同程度存在,尤其气管插管的侵入性干预方式,导致呼吸系统感染发生率相对较高,因此肺部感染是本类患者常见的并发症之一^[6-7]。而肺部感染的发生不仅仅不利于患者术后的康复速度与效果,且较大程度地影响到患者的生存质量,增加了患者的经济负担,对于本类全麻手术患者进行肺部感染预测因素的研究与掌

表 4 各指标对术后肺部感染的预测价值

Table 4 Predictive Value of Table 2 Indicators for Postoperative Pulmonary Infection

指标	AUC	<i>P</i> 值	95%CI	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)
PTX-3 (ng/mL)	0.861	<0.01	0.788~0.934	2.965	0.871	0.601
PTX-3 变化率 (%)	0.924	<0.01	0.874~0.973	102.420	0.774	0.888
PCT (μg/L)	0.836	<0.01	0.772~0.900	1.265	0.710	0.760
PCT 变化率 (%)	0.817	<0.01	0.715~0.919	468.900	0.710	0.923

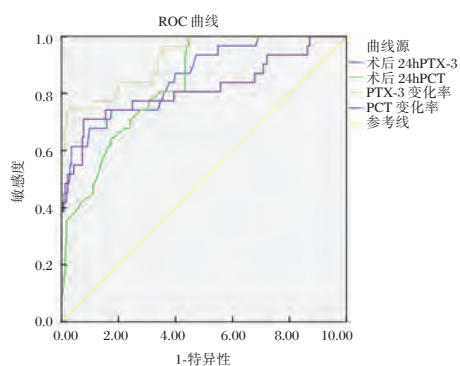


图2 各指标对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染预测价值的ROC曲线

Figure 2 ROC Curve of indicators in predicting pulmonary infection after gynecological laparoscopic surgery under general anesthesia

握更有助于肺部感染的防控。全麻术后的肺部感染与有创操作引起的肺部细菌入侵有关^[8-9],术后早期由于器官插管对气道粘膜的刺激,患者往往有不同程度的呼吸道分泌物增多,甚至伴有咳嗽、咳痰等症状,而明显的肺部感染症状如发热、咳脓痰、肺部啰音的出现往往具有一定的滞后性,因此肺部感染的早期诊断较为困难。因此早期对患者术后肺部感染进行有效的预测并采取干预措施,具有重要的临床意义。

PCT及PTX-3均是新型的炎性细胞因子。PCT是甲状旁腺C细胞分泌的多肽,无生物活性,对细菌感染极为敏感,在细菌感染时能够迅速升高,并且与感染的严重程度有关^[10-11],在重症感染的治疗和评估中具有重要的价值。在不明原因的感染中,PCT的水平已经作为抗菌药使用的临床指标^[12],并且列入抗菌药应用指南中。PTX-3是体内巨噬细胞、内皮细胞等多种细胞分泌的五聚体蛋白,是一种急性期反应蛋白^[13],在发生感染及炎症时,数小时内既可明显增高,不仅能够预测细菌感染,而且对脓毒血症等严重感染患者预后也具有评估价值^[14-15]。在对本组资料分析发现,在术后24h发生肺部感染患者PCT及PTX-3增高的更为明显,而未发生感染患者PCT及PTX-3升高的要较感染组患者低,其增高原因与手术及麻醉创伤引起的炎性应激反应有关,升高的幅度相对较小。而感染组患者受感染因素引起的增高则更为明显,而且PCT与PTX-3具有正相关关系,说明其在对机体创伤及感染引起的炎性反应中具有有一致性。在对ROC曲线计算发现,术后早期PCT及PTX-3水平对妇科全麻腹腔镜手术后肺部感染具有较好的预测价值

(AUC>0.6),而且PCT及PTX-3变化率具有很高的特异性,PCT及PTX-3水平受其基础水平的影响,但其变化率受基础水平的影响较小,则更能够反应其升高的幅度。庄海涛等人在肺癌术后对肺部感染的研究中发现,PCT能够很好的预测肺部感染发生的风险,但是因为肺癌术后中对肺部存在手术操作创伤的因素,因此并不能完全预测其与气管插管导致肺部感染的风险。舒化青对PTX-3研究发现,PTX-3不仅与肺部感染有关,在对呼吸机机械通气的过程中,PCT-3参与对肺部的机械损伤过程,其不仅是感染发生的炎性标志物,可能也参与肺部感染发生的过程,但是在对机械通气后肺部感染发生预判上,并未进行相关的研究。本研究在相关研究的基础上,对其PCT和PTX-3进行动态监测,评价其对全麻术后肺部感染的预测价值进行了进一步的研究,病情证实具有较好的临床应用价值。

综上所述,术后早期(24h)进行PCT与PTX-3及其变化率检测能够较早的预测妇科全麻腹腔镜术后潜在的肺部感染,对提高全麻术后的围手术期安全具有重要的意义。

参考文献

- [1] 王琰,张品,党萌,等.老年腹部手术患者全麻联合硬膜外麻醉的肺功能及肺部感染状况分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(19):4464-4467.
- [2] 方洁,徐珊.围手术期全麻术后患者发生肺部感染的危险因素分析[J].中国卫生检验杂志,2018,28(6):731-733.
- [3] 刘亚楠,杨杰,李琢,等.正五聚蛋白3联合中性粒细胞与淋巴细胞比值评估脓毒症患者病情的严重程度及预后的价值研究[J].中华急诊医学杂志,2019,28(3):370-373.
- [4] 韩伟平,肖洋,李瑞华.中性粒细胞CD64指数、PCT及NLR在感染性疾病诊断中的价值[J].中国微生态学杂志,2018,30(3):304-307.
- [5] 中华人民共和国卫生部.医院感染诊断标准(试行)[J].现代实用医学,2003,15(7):460-465.
- [6] 徐恒艺,王钱荣,姚煜明.不同麻醉方式与下呼吸道感染的关系[J].中华医院感染学杂志,2013,23(7):1582-1583.
- [7] 项余华,曹志得,罗苹,等.喉罩通气全麻术后下呼吸道感染相关因素的调查分析[J].中华医院感染学杂志,2009,19(7):2276-2277.
- [8] 冷洪雷,于纯磊,王小侠,等.麻醉相关因素对全麻气管插管患者术后下呼吸道感染的影响及预防措施分析[J].陕西医学杂志,2017,46(7):935-937.

(下转第502页)

· 论 著 ·

不同 HBV 基因型慢性乙型肝炎患者的血清 HBV DNA、PreS1、HBeAg 检测结果分析

吴湃¹ 吴坤河² 刘海燕¹ 张斗星¹ 胡安群^{1*}

[摘要] **目的** 调查安徽安庆地区慢性乙型病毒性肝炎患者所感染的乙型肝炎病毒(HBV)的基因型构成,并探讨不同HBV基因型患者的血清HBV DNA、PreS1、HBeAg检测结果及临床价值,为乙型病毒性肝炎患者的个体化医疗提供依据。**方法** 选取慢性乙肝患者共226例,采用巢式PCR技术对其进行基因分型检测,采用实时荧光定量聚合酶链反应法(RT-PCR)检测患者血清HBV DNA,用酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测血清PreS1抗原与HBeAg。**结果** 在调查的乙型病毒性肝炎患者中,以B基因型(占58.0%)与C基因型(占41.1%)HBV感染为主。B基因型患者血液中HBV DNA阳性率(57.2%)与C型患者(63.4%)没有统计学差异;B基因型患者血液中PreS1抗原阳性率(48.1%)与C型患者(48.4%)也没有明显差异;C基因型HBV感染的患者血液HBeAg阳性率(46.2%)高于B基因型患者(32.1%)。**结论** 安徽安庆地区在慢性乙肝的卫生防治策略上,应重点关注B、C型基因型HBV感染的防治。而C基因型HBV感染患者具有高HBeAg阳性率,应采取更积极、有效干预措施。

[关键词] 慢性乙型病毒性肝炎; HBV基因型; HBV DNA; Pre S1; HBeAg

Serum HBV-DNA, preS1, HBeAg in patients with various HBV genotype of chronic virus hepatitis B

WU Pai¹, WU Kunhe², LIU Haiyan¹, ZHANG Douxing¹, HU Anqun^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, The affiliated Anqing Hospital, Anhui Medical University, Anqing, Anhui, China, 233001; 2. Department of Pathology, Guangdong Women and Children's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients with chronic virus hepatitis B in Anqing city of Anhui Province, and study the expression and clinical significances of serum HBV DNA, preS1, HBeAg in various HBV genotypes, s provide the base for individualized treatment of the virus hepatitis B. **Methods** The HBV genotypes of 226 patients with chronic virus hepatitis B were determined by nested polymerase chain reaction (PCR). The level of serum HBV DNA in patients was detected by Real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction (RT-qPCR). The levels of serum preS1 and HBeAg were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Among the investigated hepatitis B patients, HBV infection was mainly caused by genotype B (58.0%) and genotype C (41.1%). The positive rate of HBV DNA in the blood of patients with genotype B (57.2%) was not statistically different from that of patients with genotype C (63.4%); the positive rate of PreS1 antigen in the blood of patients with genotype B (48.1%) was not significantly different from that of patients with genotype C (48.4%); the positive rate of HBeAg in the blood of patients with genotype C (46.2%) was higher than that of patients with genotype B (32.1%). **Conclusions** More attention should be

基金项目:安徽医科大学科研基金项目(2011xkj092)

作者单位:1. 安徽医科大学附属安庆医院检验科,安徽,安庆 233001

2. 广东省妇幼保健院病理科,广东,广州 511400

*通信作者:胡安群, E-mail:haq0828@hotmail.com

paid in the genotype B, C of HBV infection in the prevention and treatment of chronic virus hepatitis B in Anqing city of Anhui Province. More active and effective intervention measures should be taken to control the genotype C of HBV infection, which has a higher positive rate of HBeAg, higher infection, more serious progression of disease.

[KEY WORDS] Chronic virus Hepatitis B; HBV Genotype; HBV DNA; PreS1; HBeAg

乙型病毒性肝炎(简称乙肝)是一种在我国比较发高的传染病,它是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染引起。根据基因组序列异质性,HBV可分为8种基因型(A型~H型)^[1]。各种基因型HBV对于药物的效果及患者的预后有一定的差异^[2]。因此,有必要对患者感染的HBV进行基因分型。据报道,各种基因型HBV在全球不同地区的分布呈现不同的流行病学特点^[3]。我国感染的HBV主要以B型和C型为主,其中B型以Ba型为主。HBV在我国北方以C型为主,而在南方则为B型较高^[4]。

对HBV感染进行监测及病情评估,对于患者的治疗方案选择与疗效非常重要。在临床实践中,HBV DNA、乙型肝炎E抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)、乙肝病毒前S1蛋白抗原(Pre-S1 antigen, PreS1)是反映HBV感染状态和预后的重要指标^[5]。而这3个指标在不同基因型HBV感染患者血液中的表现的研究,在国内外研究尚少,并存在一定的争议。因此,本研究通过检测并比较HBV DNA含量、HBeAg、PreS1抗原在不同基因型HBV感染患者中的差异,为乙型病毒性肝炎的个体化与有效诊疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 患者与标本采集

随机选取2017年1月份至8月份在安徽医科大学附属安庆医院住院的慢性乙肝患者共226例,其中男153例,女73例,年龄17~73岁。所有患者均符合2015年中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会联合制订的《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准^[6];乙型肝炎病毒表面抗原定性实验为阴性结果或乙型肝炎病毒表面抗原定量结果低于0.05 IU/mL的患者均不纳入本研究。本研究严格保密患者的个人信息与隐私,遵守安徽医科大学附属安庆医院对医学伦理方面的相关规定。于患者入院第二天清晨,采集空腹血清用于后续检测。

1.2 材料与方法

1.2.1 试剂

病毒基因组DNA提取试剂盒购自于天根生物(北京)有限公司,巢式PCR选用日本takara生物公司的Pyrobest DNA polymerase试剂盒,50 bp DNA分子量标准(50 bp~400 bp)购自于北京庄盟生物公司,引物由上海生工生物公司合成。HBV DNA荧光定量PCR试剂盒由中山大学达安基因公司生产,HBeAg体外检测试剂盒购自于厦门英科科创科技公司,乙肝病毒前S1抗原体外检测试剂盒购自于上海阿尔法生物技术公司。

1.2.2 HBV DNA基因分型检测

先按照病毒基因组DNA提取试剂盒说明书操作流程,提取患者血液标本中的乙型肝炎病毒DNA基因组;然后采用巢式PCR技术进行两轮扩增及检测,引物设计如表1。第一轮PCR扩增之引物针对HBV保守序列设计,扩增程序为:94℃预变性2 min,94℃变性30 s,58℃退火30s,72℃延伸2.5 min,进行30个循环,最后72℃延伸10 min。第二轮PCR扩增之引物针对人群中HBV主要类型(B、C亚型)特异基因序列设计,扩增程序为:94℃预变性2 min,94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,进行35个循环,最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳分析,50 bp DNA分子量标准作为电泳参照。

1.2.3 HBV DNA定量检测

HBV DNA定量检测采用实时荧光定量PCR法,使用美国ABI 7300型荧光定量PCR仪进行扩增检测。患者血液中HBV DNA含量 $\geq 1\ 000$ IU/mL则判断为阳性。

1.2.4 HBeAg检测

HBeAg检测采用一步法双抗体夹心ELISA法,严格按照HBeAg体外检测试剂盒说明书进行操作,并根据说明书给出的公式计算出临界值(Cut-off value)及判读结果。

1.2.5 PreS1抗原检测

PreS1抗原检测采用两步法双抗体夹心ELISA

表1 巢式PCR检测HBV基因型的引物

Table 1 Primers for detection of HBV genotypes by nested PCR

目标基因	引物标号	引物序列	扩增位点
HBV 基因保守序列	HBV-U1(正义)	5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'	nt 2823-2845
	HBV-U2(反义)	5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3'	nt 685-704
HBV-B 亚型特异基因	Type B1(正义)	5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'	nt 67-86
	Type B2(反义)	5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3'	nt 324-345
HBV-C 亚型特异基因	Type C1(正义)	5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'	nt 67-86
	Type C2(反义)	5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'	nt 165-186

法,严格按照乙肝病毒前S1抗原体外检测试剂盒说明书进行操作,并根据说明书给出的公式计算出临界值及判断结果。

1.3 统计分析

本研究的实验数据统计分析运用SPSS 20.0版本软件包。计数资料采用百分比(%)表示,采用 χ^2 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 患者感染的HBV基因分型结果

选择两对引物(HBV保守序列引物、B或C亚型特异性引物),运用巢式PCR技术对226例乙型肝炎病毒性肝炎患者血清进行基因型检测分析。其中,B基因型引物的阳性扩增片段产物为279 bp,C基因型引物的阳性扩增片段产物为120 bp,与理论上目标基因产物片段大小一致。统计结果显示,B基因型占比为58.0%(131例/总数226例),C基因型占41.1%(93例/226例),其他基因型占0.9%(2例/226例),HBV以B、C基因型为主。

2.2 B、C基因型患者中的HBV DNA表达情况

采用荧光实时定量PCR法对乙肝病毒患者HBV DNA进行检测,结果显示,B基因型患者中HBV DNA阳性率为57.2%(75/131);C基因型患者中HBV DNA阳性率为63.4%(59/93)。卡方检验结果显示,HBV DNA阳性率在B型患者和C型患者中无显著性差异,见表2。

表2 B、C基因型患者中的HBV DNA表达情况

Table 2 Expression of HBV DNA in genotype B, C infected patients

组别	n	HBV DNA (+)	HBV DNA (-)	χ^2 值	P值
B型	131	75(57.2)	56(42.8%)	0.867	0.352
C型	93	59(63.4)	34(36.6%)		

2.3 B、C基因型患者的PreS1抗原表达情况

采用双抗体夹心ELISA法两步法对乙肝病毒患者PreS1抗原进行检测,结果发现,B基因型患者中PreS1抗原阳性率为48.1%(63/131);C基因型患者中PreS1抗原阳性率为48.4%(45/93)。卡方检验结果显示,PreS1抗原阳性率在B型患者和C型患者中差异不显著($P > 0.05$),见表3。

表3 B、C基因型患者的PreS1抗原表达情况

Table 3 Expression of PreS1 in genotype B, C infected patients

组别	n	PrsS1(+)	PrsS1(-)	χ^2 值	P值
B型	131	63(48.1%)	68(51.9%)	0.002	0.965
C型	93	45(48.4%)	48(51.6%)		

2.4 B、C基因型患者中的HBeAg表达情况

采用双抗体夹心ELISA法两步法对乙肝病毒患者中的HBeAg抗原进行检测,结果发现,B基因型患者中HBeAg阳性率为32.1%(42/131);C基因型患者中HBeAg阳性率为46.2%。卡方检验结果显示,HBeAg阳性率在B型患者和C型患者中差异显著($P < 0.05$),见表4。

表4 B、C基因型患者中的HBeAg表达情况

Table 4 Expression of HBeAg in genotype B, C infected patients

组别	n	HBeAg(+)	HBeAg(-)	χ^2 值	P值
B型	131	42(32.1%)	89(67.9%)	4.641	0.031
C型	93	43(46.2%)	50(53.8%)		

3 讨论

控制患者体内HBV病毒复制是乙型肝炎治疗的一个重要策略。干扰素和核苷酸类抑制物是目前常规的乙肝抗病毒药物,而这两类药物在不同基因型患者中的治疗效果有一定差异^[7-9],这很可能是由于不同基因型患者产生的耐药突变

率各异^[10-12]。因此,乙肝患者的基因分型对乙肝的诊断和治疗中有重要的指导意义。本研究针对各基因型 HBV 基因设计特异性引物,并应用巢式 PCR 技术对安徽安庆地区慢性乙型病毒性肝炎患者进行基因分型检测,经统计分析发现,该地区慢性乙肝患者的 HBV 感染是以 B 基因型(占 58.0%)与 C 基因型(占 41.1%)为主,其他基因型较少见。该调查结果与同行在我国中部地区的调查报道一致,这为该地区的乙肝疫情的预防政策制定及患者诊疗的药物选择提供了重要的依据^[3]。

大量研究已证实,HBV DNA、HBeAg、PreS1 抗原是评估患者体内乙肝病毒感染状况、病情进展及治疗效果的重要指标,在临床患者诊疗中应用广泛^[5]。本研究检测了不同 HBV 基因型患者中这 3 个指标的表达情况。研究结果显示,C 基因型 HBV 感染的患者血液 HBeAg 阳性率明显高于 B 基因型患者,而血液中 HBV DNA 阳性率与 PreS1 抗原阳性率在 B 型与 C 型患者中没有明显差异,本研究结果与秦望森等报道的结果一致^[13-14]。

HBV DNA 含量检测是反映乙肝病毒在患者体内复制状况的最直接指标。本研究发现在不同 HBV 基因组 HBV DNA 阳性率没有显著差别,这与以往同行的实验结果是一致的^[15-16]。但据报道,C 基因型患者中 HBV DNA 高拷贝者($\geq 100\ 000$ IU/mL)比例明显比 B 基因型要高^[17],这提示 C 型 HBV 患者有更高的病毒复制^[18]。但国内也有乙肝病毒高拷贝组在 B 型和 C 型中没有明显差异的报道^[19],这可能与研究对象选取范围的差异有关。

PreS1 抗原在 HBV 感染的最早期即可出现,因而可以起到早期诊断的作用。它与 HBV DNA 检出率高度吻合,随 HBeAg 消失而消失,可作为病毒清除与病毒转阴的指标。PreS1 抗原阳性的患者具有更大的病毒传染性,它能反映 HBV 病毒复制和传染性的指标^[19]。本研究结果显示,PreS1 抗原在不同 HBV 基因型中无显著性差别,与 HBV DNA 检测结果一致。

HBeAg 是乙肝病毒核心颗粒中的一种可溶性蛋白质。它的出现往往迟于 HBsAg,而消失却早于 HBsAg。它在乙肝活动期检出率升高,表明肝细胞有较严重的损伤,患者有很强的传染性。因此,它是一个反映乙肝病情进展及病毒传染性的血清学标志物^[21]。本研究发现,C 基因型 HBV 患者比 B 基因型有更高的 HBeAg 阳性率,与国内同行的研究报道一致^[14]。这提示 C 基因型 HBV 患者可能病毒复

制活动更活跃,病情更严重,疗效与预后更差。

因此,在安徽安庆地区等我国中部地区慢性乙肝患者的卫生防治政策上,应重点关注 HBV 主要基因型(B 与 C 型)的防治。HBV DNA 含量与 PreS1 抗原检测,对准确评估病毒复制情况及患者的病情非常有帮助。而 C 基因型 HBV 感染患者具有高 HBeAg 阳性率、高传染性及严重的病情发展,更应引起高度重视及采取有效的诊治措施。

参考文献

- [1] Karayiannis P. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(6): 500-508.
- [2] Tsai KN, Kuo CF, Ou JJ. Mechanisms of hepatitis B virus persistence [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(1): 33-42.
- [3] 殷继明,李卓,金荣华,等.慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型和亚型分布调查[J]. *实用肝脏病杂志*, 2010, 13(1):19-21.
- [4] 胡忠金,李英姿,邓小够,等.乙型病毒性肝炎血清流行病学调查及病毒基因型研究 [J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(14): 1893-1897.
- [5] Charre C, Levrero M, Zoulim F, et al. Non-invasive biomarkers for chronic hepatitis B virus infection management [J]. *Antiviral Res*, 2019, 169:104553.
- [6] 石光英,郭新文,杨丽丽,等.聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗新疆地区不同 HBV 基因分型乙肝患者的临床疗效[J]. *新疆医科大学学报*, 2015, (9):1124-1127.
- [7] 刘键,陆学东,黄烈,等.拉米夫定和阿德福韦酯抗病毒疗效与 HBV 基因型的关系 [J]. *检验医学与临床*, 2015, (20):3055-3057.
- [8] 谢伟贤,黄泽棋,香瑶英,等.干扰素和核苷酸类对不同 HBV 基因型慢性乙型肝炎患者的疗效研究 [J]. *医学检验与临床*, 2012, 23(5):42-44.
- [9] 王清,曾勇彬,林锦骝,等.福州地区乙型肝炎患者 HBV P 区突变模式与其基因型及血清标志物的关系 [J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(2):85-89.
- [10] 刘艾芹,唐曙明,陈卫布,等.深圳地区乙肝病毒基因分型与耐药性研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(14):1787-1791.
- [11] 许建平,钟国权.乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型研究 [J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(9): 1240-1242.
- [12] 秦望森,沈立萍,张爽,等.乙肝患者 HBV 感染指标、病毒复制水平与基因分型的关系分析 [J]. *中华实验临床病毒学杂志*, 2012, 26(5):328-330.
- [13] 杨娜,胡雪梅. HBeAg 阳性慢性乙肝患者 HBsAg 定量与 HBeAg、HBV DNA、基因型的相关性 [J]. *临床输血与检验*, 2016, 18(1):43-46. (下转第 507 页)

南京地区 1 776 例外周血淋巴细胞染色体核型分析

余梦瑶 顾敏 赵鸿*

[摘要] 目的 探讨染色体核型异常与南京地区常住人口染色体病的分布关系。方法 收集 2006 年 1 月至 2016 年 1 月间本院进行染色体检查的 1 776 位居民肝素锂抗凝外周血,将其中淋巴细胞分离培养,显微镜观察并记录 G 显带染色体核型,按照人类细胞遗传学命名国际体系(ISCN 2013)统计染色体核型。结果 在 1 776 例受检者中,检出染色体异常核型样本 280 例(15.76%)。其中常染色体数目异常 26 例(1.46%),常染色体结构异常 33 例(1.86%),性染色体数目异常 140 例(7.88%),性染色体结构异常 29 例(1.63%),性别扭转 39 例(2.20%),嵌合体 13 例(0.73%);806 例具有临床表现的男性样本中检出染色体异常核型 108 例(13.40%),429 例女性样本中检出染色体异常核型 65 例(15.15%)。结论 通过染色体核型分析结合临床表现可以明确病因,诊断染色体病,为临床诊断、遗传咨询等提供重要依据及指导意义。

[关键词] 染色体核型分析;核型异常;染色体病

Chromosome karyotype analysis of 1 776 peripheral blood lymphocytes in Nanjing Area

YU Mengyao, GU Min, ZHAO Hong*

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

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between abnormal karyotypes and the distribution of chromosomal diseases in Nanjing. Methods 1 776 samples from January 2006 to January 2016 with heparin lithium anticoagulant peripheral blood were collected for chromosome examination in the first affiliated hospital, Nanjing Medical University. Lymphocytes were separated and cultured respectively. Karyotype was observed by G banding and recorded by the International System of Human Cytogenetic Naming (ISCN 2013). Results Among 1 776 cases, 280 (15.76%) were abnormal karyotypes. Within them, 26 cases (1.46%) were abnormal in the number of autosomal chromosomes, 33 cases (1.86%), 140 cases (7.88%), 29 cases (1.63%), 39 cases (2.20%) were abnormal in the number of sex chromosomes, 13 cases (0.73%) were abnormal in the structure of sex chromosomes, 108 cases (13.40%) were abnormal in the 806 male samples with clinical manifestations, and 429 female samples. 65 cases (15.15%) were abnormal karyotype. Conclusion karyotype analysis combined with clinical manifestations can identify the cause of disease, and provide important information for clinical diagnosis and genetic consultation.

[KEY WORDS] Chromosome karyotype analysis; Abnormal karyotype; Chromosomal diseases

染色体疾病是由于染色体数目或者结构异常引起的疾病。对高危人群进行染色体核型分析是一个重要的遗传学检查手段,对临床诊断及指导优生优育有重要意义。现对近 10 年来院就诊的 1 776 例南京居民患者进行外周血淋巴细胞染色体核型分析,旨在分析和评估其与南京地区常住人口染色体病分布情况关系。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2006 年 1 月至 2016 年 1 月间由医生开具染色体检查项目,来院进行常规染色体检查的南京地区居民共计 1 776 人的肝素锂抗凝外周血。其中,男性 1 124 人,占 63.3%(1 124/1 776),女性 652 人,占

作者单位:南京医科大学第一附属医院/江苏省人民医院检验学部,江苏,南京 210029

*通信作者:赵鸿, E-mail: 1312136325@qq.com

36.7%(652/1 176),受检者年龄分布在12~45岁之间。

1.2 方法

1.2.1 外周血淋巴细胞培养及染色体制备

无菌条件下抽取肝素锂抗凝外周血2 mL,上下颠倒混匀。吸取1 mL加入淋巴细胞培养基(达晖生物),培养72 h。收获前2.5 h加入10 μg/mL的秋水仙素150 μL/每瓶。2 500转离心10 min弃上清,加入0.075 mol/L KCL溶液9 mL,重悬沉淀。37℃水浴15 min。加入新鲜配置固定剂(甲醇:乙酸=3:1)1 mL混匀。2 500 r离心10 min弃上清,加入固定剂10 mL室温静置10 min,2 500转离心10 min。重复固定一次。弃上清液,加入适量固定剂调成适宜浓度的细胞悬液。将细胞悬液滴在预冷的洁净湿片上,放烤箱80℃烘烤4 h,自然冷却。

1.2.2 G显带

玻片置入0.05%胰酶消化60 s。流水冲净,Giemsa(Sigma)染色显带。按照人类细胞遗传学命名国际体系(ISCN 2013)统计染色体核型。

2 结果

2.1 280例异常核型分布情况

1 776例样本中共检出染色体核型异常280例,占15.76%(280/1 776)。其中常染色体数目异常26例,占异常染色体核型的1.46%(26/1 776);常染色体结构异常33例,占异常染色体核型的1.86%(33/1 776);性染色体数目异常140例,占异常染色体核型的7.88%(140/1 776);性染色体结构异常29例,占异常染色体核型的1.63%(29/1 776);性别扭转39例,占异常染色体核型的2.20%(39/1 776);嵌合体13例,占异常染色体核型的0.73%(13/1 776)。如表1所示,染色体数目异常者中,最为常见的核型为47,XXY,占染色体数目异常总数的56.02%(93/166);其他比较常见核型分别为45,XO,占22.89%(38/166);47,XY+21,占12.05%(20/166);染色体结构异常者的主要核型分别为:46,X,i(Xq),占结构异常总数的12.90%(8/62);45,XY,rob(13;14),占8.06%(5/62);46,X,i(Xp),占9.68%(6/62)。性别扭转或性分化异常(男:46,XX;女:46,XY)共计39例,占异常核型总数13.93%(39/280)。嵌合体中,常见异常核型为45,XO/46i(Xq),占异常总数的2.14%(6/280)。其他比较罕见的染色体异常核型详见表1,约占染色体异常总数的23.21%(65/280)。

表1 280例异常染色体核型及其分布 [n(%)]

Table 1 Distribution of 280 abnormal chromosome karyotype [n(%)]

染色体异常分类	结果	例数(n)	
染色体数目异常 常染色体数目异常	47,XY+21	20	
	47,XX+21,+(7;14)(p21;q23)	4	
	47,XX+?	1	
	44,XX-13-18	1	
	性染色体数目异常	47,XXY	93
		45,XO	38
		48,XXY+mar	2
		47,XXX	2
		47,XXY,inv(9)	1
		47,XY,i(xq)	1
		48,XXYY	1
	47,XXY	1	
	44,X,rob(13;14)	1	
	染色体结构异常 常染色体结构异常	45,XY,rob(13;14)	5
45,XX,rob(13;14)		3	
45,XY rob(14;21)		2	
45,XX,rob(13;21)		1	
46,XX inv(9)		1	
46,XY inv(9)		1	
46,XX+(1q;14q+)		1	
46,XX,t(8;11)(q21;p15)		1	
46,XY,t(14;21)		1	
46,XY,t(2p-;7q+)		1	
46,XY,14pt		1	
46,X,del(q21;q28)		1	
46,XY,t(10;13)(p14;q13)		1	
46,XY,15p+		1	
46,XY,9p+		1	
46,XX,13p+		1	
46,XX,inv(9)(p11;q13)		1	
46,XX,t(1;19)(p21;p14)		1	
46,XX,t(7;11)(p22;q23)		1	
46,XX,t(1;4)(p36;q25)		1	
46,XY,t(1;2)(p12;q35)		1	
46,XY,t(4;7)(q31.3;p15)		1	
46,XY,inv(9)(p11;q13)		1	
46,XY,inv(10)(p21;q25)		1	
46,XX,inv(6)(p22;q22)		1	
46,XY,inv(3)		1	
性染色体结构异常		46,Xi(Xq)	8
	46,Xi(Xp)	6	
	46,XXp-	4	
	46,XXi(Xq)	2	
	46,Xi,dic(X)	2	
	46,XYq-	1	
	46,Xi(Xq-)	1	
	46,XY(小Y)	1	
	46,XY,Yq+	1	
	46,X,inv(Y)(p11;q11)	1	
	46,X,Yp+	1	
	46,X,-X,+?	1	
	性别扭转	男 46,XX	13
女 46,XY		26	
嵌合体	45,XO/46i(Xq)	6	
	46,XX/45,XO	2	
	46,XXq-/45,XO	1	
	47,XXY/46,XX	1	
	46,Xdel(Xp-)/45,XO	1	
	46,XX/45,XO,inv(9)	1	
	45,XO/46,X+?	1	

2.2 核型异常患者的主要临床表现

男性受检者中,临床诊断为第二性征发育不良者共计460例,导致其异常的主要核型为47,XXY(11.74%)、46,XX(1.30%)和45,XY,rob(13;14)(0.65%);弱/无精症患者312例,检出的异常核型主要为47,XXY(6.73%)和45,XY,rob(13;14)(1.28%);智力低下患者19例,主要核型为47,XY+

21(73.68%);两性畸形者15例,核型为46,XX(40.00%)。女性受检者中,临床诊断为原发闭经者共计156例,异常核型主要为45,XO(12.18%)、46,XY(5.13%)和46,X,i(Xq)(3.85%);第二性征发育不良者128例,其染色体核型大部分正常;矮小、迟缓发育者131例,主要异常核型为45,XO(7.63%);两性畸形者14例,异常核型为46,XY(71.43%)。

表2 常见染色体核型异常者临床表现与核型分类及异常检出率 [n(%)]

Table 2 Clinical manifestations, karyotype classification and abnormal detection rate of common chromosomal karyotype abnormalities [n(%)]

表型	临床诊断	受检例数(%)	异常核型	检出例数(n)	异常检出率(%)
男性	第二性征发育不良	460(25.90)	47,XXY	54	11.74
			46,XX	6	1.30
			45,XY,rob(13;14)	3	0.65
	弱/无精症	312(17.57)	47,XXY	21	6.73
			45,XY,rob(13;14)	4	1.28
智力低下	19(1.07)	47,XY+21	14	73.68	
两性畸形	15(0.84)	46,XX	6	40.00	
女性	原发性闭经	156(8.78)	45,XO	19	12.18
			46,XY	8	5.13
			46,X,i(Xq)	6	3.85
	第二性征发育不良	128(7.21)	46,XY	3	2.34
			45,XO	1	0.78
			46,X,i(Xq)	1	0.78
			45,XO	10	7.63
	矮小、发育迟缓	131(7.38)	46,X,i(Xq)	4	3.05
			46,XY	3	2.29
			46,XY	10	71.43
两性畸形	14(0.79)				

3 讨论

遗传咨询患者中经常出现的染色体异常包括染色体数目异常、染色体结构异常及嵌合体等^[1-2]。染色体异常又是导致染色体病的重要因素^[3]。染色体病可造成患者的畸形和残疾,或者出现多器官、多系统功能异常等^[4],危害患者身心健康,也会给社会家庭带来压力与经济负担。目前临床上尚未有有效的染色体病治疗方法,进行染色体核型分析结合临床表现可以明确病因,为临床诊断、遗传咨询及优生优育等提供重要依据及指导意义。

本次研究中对南京地区1776例患者进行了细胞遗传学分析,共检测出染色体异常280例,异常率为15.76%,显著高于一般人群染色体异常频率5%^[5],这可能与本研究剔除了多态性核型相关;此外,此次研究核型异常率也高于周静等^[6]2012年对南京地区核型异常率(6.37%),可能与两者研究抽样人群、样本量及检测技术的进步相关;但本研究异常率与柯买春^[7]2019年对九江地区的研究异常率(11.9%)接近,表明染色体核型异常为遗传咨询患者中常见病因。

本文中染色体异常以性染色体数目异常为主,占比50%,其次为性别扭转、常染色体结构异常、性染色体结构异常和常染色体数目异常,嵌合体比例最低。性染色体数目异常又以47,XXY为主,占性染色体数目异常的66.43%(93/140),与邱惠国等研究结果相符^[5];47,XXY称为克氏综合征,本研究的460例第二性征不良和312例弱/无精症男性受检者中,检出75例,表明该核型异常发生频率高,应通过染色体检查,为患者的诊断和治疗提供指导性依据。而女性染色体数目异常则以45,XO为主,即特纳氏综合征(Turner syndrome, Turner's 综合征),占比为27.14%(38/140)。Turner's 综合征临床表现为身材矮小、第二性征发育不良、闭经等,本研究在156例原发性闭经患者中检出19例(12.18%),在128例第二性征发育不良患者中检出1例(0.78%);在131例矮小、发育迟缓患者中检出10例(7.63%),与王新红^[8]等人的研究结果一致。性别扭转是指社会性别为女性,而染色体核型46,XY;以及社会性别为男性,而染色体核型为46,XX。本研究中共检出性别扭转39例(2.20%),性别扭转可能导致性别应有性

征不明显,比如:XY女性出现原发闭经、阴毛稀少及腹股沟包块等;男性出现乳房发育、阴囊小及喉结不明显等^[9]。本次研究中,检出常染色体结构异常33例(1.86%),其中罗伯逊易位核型12例,又以13、14号染色体易位为主,占比高达75%(9/12),与陈春等^[10]研究结果相符。罗伯逊易位表型一般正常,但其易位原理决定了其不能产生配子或导致胎儿流产或死胎^[7]。本研究临床诊断为第二性征发育不良患者中检出罗伯逊易位3例,弱/无精症4例。因此,十分有必要对于这类患者进行染色体核型分析指导生育,以达到优生优育的目的。本次研究中嵌合体检出占比为0.73%,比例较低,可能由于核型分析检测技术分辨率有限,且嵌合体可因其嵌合比例的不同从而导致临床表型的严重程度不同,因此,或许可以联合其他比较先进的分子诊断技术进行检测,为临床提供更全面准确的诊断依据及咨询指导。

染色体核型分析是一种重要的遗传学检查手段,具有不可替代的临床价值。然而,传统的染色体核型分析技术易受环境因素影响,且其分辨率不高,对于小于10 Mb片段的缺失或重复难以检出,这些缺陷均在一定程度上限制了其临床应用^[11]。近年来,随着分子检测技术的不断发展,染色体微阵列分析技术、比较基因组分析、光谱核型分析等基因检测技术的普及使得能够对基因进行精细定位,从而明确染色体复杂结构异常的具体发病机制,提高了染色体病的确诊率,为指导优生优育、预防、诊断及治疗染色体病提供更为全面准确的依据。

接下来的研究将结合传统细胞遗传染色体核型分析技术与FISH、CMA等多种分子遗传学技术,提高对因染色体疾病导致不孕不育的确诊

率。笔者将进行跟踪随访,并检测部分弱精患者外周血DNA中相关基因甲基化水平。相信新的研究不仅能为不育男性找出可能病因,也助于其选择更加合适的辅助生育治疗方式,因此对高危人群进行染色体检查是非常有必要的。

参考文献

- [1] Du Y, Chen L, Lin J, et al. Chromosomal karyotype in chorionic villi of recurrent spontaneous abortion patients[J]. Biosci Trends, 2018, 12(1):32-39.
- [2] Wang MZ, Lin FQ, Li M, et al. Semiconductor Sequencing Analysis of Chromosomal Copy Number Variations in Spontaneous Miscarriage [J]. Med Sci Monit, 2017, 23:5550-5557.
- [3] 刘彦吉. 357例遗传咨询者的外周血染色体分析[J]. 中国医药指南, 2018, 16(9):68.
- [4] 万涛. 外周血染色体核型分析在染色体病诊断中的价值研究[J]. 中外医学研究, 2018, 16(19):56-58.
- [5] 邱惠国,潘华,张栋栋,等. 厦门地区2947例遗传咨询者的染色体核型分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(4):441-443.
- [6] 周静,惠伟戎,许争峰. 南京地区4335例遗传咨询者外周血染色体核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(9):28-30.
- [7] 柯买春. 九江地区835例遗传咨询患者外周染色体核型分析[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(1):58-59.
- [8] 王新红,王秋伟,孙达成,等. 常州地区闭经患者细胞遗传学分布特点[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(22):3372-3373.
- [9] 林晖,韩璐,邱惠国,等. 厦门地区61例性染色体病的细胞遗传学检验及临床分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(4):473-474.
- [10] 陈春,李运星,秦胜芳,等. 3156例生殖异常患者的染色体核型异常分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2015, 7(4):32-35.
- [11] 史博,俞冬熠,李朔. 细胞与分子遗传学技术联合应用诊断性染色体复杂结构异常病例的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(6):12-14.
- [9] 杨亚琴. 气管插管全麻术后下呼吸道感染相关因素分析[J]. 河南医学研究, 2017, 26(16):2920-2921.
- [10] 张晶晶,胡建峰,王鹏,等. 降钙素原与中性粒细胞淋巴细胞计数比对心内科住院患者病原菌感染的早期诊断研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(19):4363-4366.
- [11] 沈妍,秦晓娟. 血浆BNP和PCT对老年重症肺部感染患者预后的预测价值比较[J]. 河北医学, 2018, 24(8):1285-1289.
- [12] 刘小艳,刘莹,赵锁林,等. 血清HMGB-1、PCT水平变化对术后感染程度的预测价值[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(6):880-882.
- [13] 罗麟洁,唐凤鸣,万宁,等. 慢性阻塞性肺疾病患者诱导痰正五聚蛋白3水平的相关性研究[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(8):1392-1393.
- [14] 王钿,王列,尹梅,等. 正五聚体蛋白3评估小儿脓毒症严重程度及心血管功能损害的价值[J]. 河北医药, 2018, 40(10):1483-1487.
- [15] 康霞艳. 正五聚体蛋白3与脓毒症心血管功能障碍[J]. 中国小儿急救医学, 2014, 21(6):390-392.
- [16] 庄海涛,卢秀花,许洋. 降钙素原动态监测对肺癌术后合并肺部细菌感染的诊断价值[J]. 中国实用医刊, 2019, 46(1):88-91.
- [17] 舒化青. 穿透素3在呼吸机所致肺损伤中作用机制的研究[D]. 华中科技大学,武汉,2008.

(上接第494页)

· 论 著 ·

血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平检测对妊娠期糖尿病的诊断价值及与患者胰岛素抵抗的关联性

李茂香¹ 李玉² 吕媛媛¹ 曹永献^{3*}

[摘要] 目的 探讨血清趋化素(Chemerin)、25-羟基维生素 D3 [25(OH)D3]、内脂素(visfatin)水平检测对妊娠期糖尿病(GDM)的诊断价值及与患者胰岛素抵抗(IR)的关联性。方法 选取2017年2月至2019年3月本院GDM患者80例设为研究组,另选取同期正常体检妊娠女性80例设为对照组。入院后抽2组血液样本,测定对比研究组、对照组血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平、稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),并统计分析血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平与 HOMA-IR 关联性、Chemerin、25(OH)D3、visfatin 单独与联合应用对 GDM 的诊断效能。结果 研究组血清 25(OH)D3 水平为(27.26±5.11)nmol/L,低于对照组(38.71±8.63)nmol/L,血清 Chemerin、visfatin 水平分别为(273.92±40.20)ng/mL、(23.54±2.66)ng/mL,高于对照组(186.14±26.06)ng/mL、(11.68±1.80)ng/mL($t_1=10.211$ 、 $t_2=16.388$ 、 $t_3=33.028$, P 均<0.001);研究组 HOMA-IR 为(3.89±1.38)高于对照组(1.62±0.46)($t=13.958$, $P<0.001$);经 Spearman 相关分析,血清 25(OH)D3 水平与 HOMA-IR 呈显著负相关,血清 Chemerin、visfatin 水平与 HOMA-IR 呈显著正相关($r_1=-0.576$ 、 $r_2=0.604$ 、 $r_3=0.792$, P 均<0.001);Chemerin、25(OH)D3、visfatin 联合诊断 GDM 的敏感度 95.00%高于单一指标诊断($\chi^2=14.546$, $P=0.002$)。结论 血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平与 GDM 患者胰岛素抵抗密切相关,在疾病发生、进展中具有重要作用,3者联合检测可提升 GDM 诊断敏感度,为临床诊断提供一定依据。

[关键词] 趋化素; 25-羟基维生素 D3; 内脂素; 妊娠期糖尿病; 胰岛素抵抗

The diagnostic value of serum chemerin, 25 (OH) D3, visfatin levels in gestational diabetes mellitus and their association with insulin resistance

LI Maoxiang¹, LI Yu², LV Yuanyuan¹, CAO Yongxian^{3*}

(1. Department of gynecology and obstetricsbirth clinic, Women And Children's Health Care Hospital Of Rizhao, Rizhao, Shandong, China, 276800; 2. Department of Obstetrics, Rizhao People's Hospital of Rizhao, Rizhao, Shandong, 276800; 3. Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China, 266071)

[ABSTRACT] Objective To investigate the diagnostic value of serum chemoattractant (Chemerin), 25-hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] and visfatin levels in gestational diabetes mellitus (GDM) and insulin resistance in patients (IR) relevance. Methods 80 patients with GDM in our hospital from February 2017 to March 2019 were enrolled, and 80 women with normal physical examination during the same period were recruited as the control group. Two groups of blood samples were collected after admission, and serum Chemerin, 25 (OH) D3, visfatin levels, steady - state model insulin resistance index (HOMA - IR) were measured. The correlation between the levels of serum Chemerin, 25 (OH) D3, visfatin and HOMA-IR was statistically analyzed. The diagnostic efficacy of Chemerin, 25 (OH) D3, visfatin alone and in combination was evaluated. Results The level of serum 25 (OH) D3 in the study group was (27.26 ± 5.11) nmol/L,

作者单位:1.日照市妇幼保健院妇产科产房,山东,日照 276800

2.日照市人民医院产科,山东,日照 276800

3.青岛大学附属医院检验科,山东,青岛 266071

*通信作者:曹永献, E-mail: cathycaoqd@163.com

lower than that in the control group (38.71 ± 8.63) nmol/L, and the levels of serum Chemerin and visfatin were (273.92 ± 40.20) ng/mL, (23.54 ± 2.66) ng/mL, higher than that in the control group (186.14 ± 26.06) ng/mL, (11.68 ± 1.80) ng/mL ($t_1 = 10.211$, $t_2 = 16.388$, $t_3 = 33.028$, respectively, $P < 0.001$). The HOMA-IR of the study group was (3.89 ± 1.38) higher than that of the control group (1.62 ± 0.46) ($t = 13.958$, $P < 0.001$). By Spearman correlation analysis, the serum 25 (OH) D3 level was negatively correlated with HOMA-IR, the serum Chemerin and visfatin levels were positively correlated with HOMA-IR ($r_1 = -0.576$, $r_2 = 0.604$, $r_3 = 0.792$, $P < 0.001$). The sensitivity of chemerin, 25 (OH) D3 and visfatin in the diagnosis of GDM was 95.00% higher than that of single index ($\chi^2 = 14.546$, $P = 0.002$). **Conclusion** The levels of serum Chemerin, 25 (OH) D3 and visfatin are closely related to insulin resistance in GDM patients, and play an important role in the occurrence and progression of the disease. The combined detection of three can improve the diagnostic sensitivity of GDM.

[KEY WORDS] chemokine; 25-hydroxyvitamin D3; visfatin; gestational diabetes; insulin resistance

妊娠期糖尿病 (Gestational diabetes mellitus, GDM) 为一种于妊娠期首次发现或发生的内分泌代谢疾病, 可造成孕妇代谢功能紊乱, 引发羊水过多、巨大儿、胎膜早破、酮症酸中毒等并发症, 严重威胁母婴生命健康^[1-3]。有研究指出, 在我国 GDM 发病率约为 4.3%~5.1%, 同时随人们运动量减少、膳食结构变化等因素影响, 其发病率呈逐步升高趋势^[4]。临床研究指出, 胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 为引起 GDM 的主要原因, 在妊娠期间各组织脏器对胰岛素敏感性显著降低, 尤其于妊娠中晚期对胰岛素敏感性约降低至正常水平的 45%~80%^[5-6]。近年来, 有研究报道, 人体脂肪细胞与其分泌因子和妊娠期 IR 具有密切关系^[7]。趋化素 (Chemerin) 为新型脂肪细胞因子之一, 可参与脂肪细胞炎症反应、成熟分化, 与 2 型糖尿病、心血管疾病、肥胖、IR 等具有密切关系^[8-9]。内脂素 (visfatin) 是一种于内脏脂肪组织呈特异性高表达的脂肪因子, 可起到拟胰岛素作用, 能加速脂肪细胞及肌肉组织转运葡萄糖, 并阻止肝细胞糖原分解, 可能参与 GDM 发生、进展^[10-11]。25-羟基维生素 D3 (25-hydroxyvitamin D3, [25(OH)D3]) 可评价机体维生素 D 状况, 能保护胰岛 β 细胞, 其水平降低会引起不同程度糖代谢异常^[12-13]。本研究选取 80 例 GDM 患

者, 分析血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平与 GDM 患者 IR 的关联性, 并首次探讨 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 联合与单独诊断 GDM 的价值, 旨在为疾病诊治提供一定参考。报告如下。

1 资料及方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 2 月至 2019 年 3 月本院 GDM 患者 80 例设为研究组, 另选取同期正常妊娠女性 80 例设为对照组。2 组一般资料 (年龄、孕周、孕前体重质量、GDM 家族史、产妇类型等) 均衡可比 ($P > 0.05$), 差异无统计学意义, 见表 1。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准: 研究组均符合《妇产科学》^[14] 中 GDM 临床诊断标准, 首次发现或罹患糖尿病; 对照组均为健康妊娠女性; 自然受孕; 单胎妊娠; 知晓本研究, 自愿签订知情同意书。排除标准: 存在巨大儿分娩、早产、死胎、流产史者; 合并多囊卵巢综合征、恶性肿瘤、肥胖症、高血压者; 合并肝、心、肾等脏器功能严重异常者; 合并精神系统疾病、免疫系统疾病、急慢性感染者; 近期应用影响血糖水平药物者。合并其他妊娠期疾病者。

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

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

组别	例数	年龄(岁)	孕周(周)	孕前体质量(kg)	GDM 家族史	产妇类型	
						经产妇	初产妇
研究组	80	20~37(28.71±4.06)	25~39(32.48±2.74)	42~81(53.80±5.41)	9(11.25)	21(26.25)	59(73.75)
对照组	80	21~38(29.02±3.59)	26~38(32.70±2.52)	43~83(54.46±5.25)	3(3.75)	23(28.75)	57(71.25)
t/χ^2 值		0.512	0.529	0.783	3.243	0.125	
P 值		0.610	0.598	0.435	0.072	0.723	

1.3 方法

采集受检者 5 mL 清晨空腹肘静脉血样,以离心机离心处理(转速:3 000 r/min,时间:10 min),取上层血清;以葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(Fasting blood-glucose, FBG)水平,放射免疫法测定空腹胰岛素(Fasting insulin, FINS)水平,计算稳态模型胰岛素抵抗指数(Homeostasis model insulin resistance index, HOMA-IR)值, $HOMA-IR=FBG \times FINS/22.5$;以酶联免疫吸附法测定血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平,检测试剂盒均购自上海拜力生物科技有限公司,操作均严格按试剂盒说明书由专门检测人员执行。

1.4 观察指标

①研究组、对照组血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平;②研究组、对照组 HOMA-IR 值;③分析血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平与 HOMA-IR 关联性;④观察 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 单独与联合应用对 GDM 的诊断效能,诊断界值:Chemerin 为 210 ng/mL、25(OH)D3 为 28.2 nmol/L、visfatin 为 25 ng/mL,4 者联合诊断时任意一项阳性则判定为阳性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 *t* 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,采用 Spearman 进行相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平比较

研究组血清 25(OH)D3 水平低于对照组,血清 Chemerin、visfatin 水平高于对照组 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of Chemerin, 25(OH)D3 and visfatin between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Chemerin (ng/mL)	25(OH)D3 (nmol/L)	Visfatin (ng/mL)
研究组	80	273.92±40.20	27.26±5.11	23.54±2.66
对照组	80	186.14±26.06	38.71±8.63	11.68±1.80
<i>t</i> 值		16.388	10.211	33.028
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 两组 HOMA-IR 水平比较

研究组 HOMA-IR 为 (3.89 ± 1.38) 高于对照组 (1.62 ± 0.46) ,差异有统计学意义 ($t=13.958, P < 0.001$)。

2.3 血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平与 IR 关联性分析

经 Spearman 相关分析,血清 25(OH)D3 水平与 HOMA-IR 呈显著负相关,血清 Chemerin、visfatin 水平与 HOMA-IR 呈显著正相关 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平与 IR 关联性分析 ($n=80$)

Table 3 Analysis of correlation between serum levels of Chemerin, 25(OH)D3 and visfatin and IR ($n=80$)

项目	Chemerin	25(OH)D3	visfatin
HOMA-IR <i>r</i> 值	0.604	-0.576	0.792
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 血清指标单独与联合诊断 GDM 的价值

联合诊断敏感度高于 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 单独诊断 ($P < 0.05$);联合诊断特异度、准确度与 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 单独诊断相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 血清指标单独与联合诊断 GDM 的价值 [$n, (\%)$]

Table 4 The Value of Serum Indicators in the Diagnosis of GDM Individually and Jointly [$n, (\%)$]

诊断方式	敏感度	特异度	准确度
25(OH)D3	72.50(58/80)	82.50(66/80)	77.50(124/160)
Chemerin	80.00(64/80)	86.25(69/80)	83.13(133/160)
Visfatin	82.50(66/80)	87.50(70/80)	85.00(136/160)
联合诊断	95.00(76/80)	81.25(65/80)	88.13(141/160)
χ^2 值	14.546	1.612	6.920
<i>P</i> 值	0.002	0.657	0.075

3 讨论

多数学者指出,在遗传基因缺陷基础上伴有 IR 为 GDM 发病重要原因,有效防治 IR 为治疗 GDM 的关键^[15]。本研究结果中,研究组 HOMA-IR 高于对照组。表明 GDM 患者常存在严重 IR,与上述研究一致,也证实 IR 为 GDM 重要发病机制。孕妇 IR 程度及胰岛素分泌能力高于正常女性,但妊娠期胎盘生长激素、孕酮等均存在胰岛素拮抗效应,且随妊娠时间延长,机体对胰岛素的敏感性逐渐下降,

而此时对胰岛素需求量不断增高,孕妇胰岛素分泌能力的增高无法弥补IR的提升,呈现出胰岛素分泌相对不足状况,进而导致孕妇血糖显著增高,更易发生GDM^[16-17]。

近年来,有关研究指出,脂类快速趋化因子、瘦素等多种脂肪因子于孕妇IR发生、发展中均有重要作用^[18-19]。Chemerin为重要脂肪因子,实验研究发现,糖尿病大鼠脂肪组织内Chemerin含量显著降低,且与IR程度具有密切关系^[20]。潘宝龙等^[21]研究指出,肥胖GDM患者血清Chemerin水平会显著增高,且与患者总胆固醇、甘油三酯水平密切相关,亦提示Chemerin可通过影响患者血脂代谢,进而引发妊娠期肥胖与IR。本研究中,研究组血清Chemerin水平高于对照组,且血清Chemerin水平与HOMA-IR呈显著正相关,与上述研究一致。表明血清Chemerin与GDM患者IR密切相关,在疾病发生、进展中具有重要作用。分析其原因为Chemerin可通过作为一种特异趋化因子,参与机体炎症反应、免疫应答、脂肪细胞分化及成熟、脂质代谢等进程,影响IR及GDM发生进展^[22-23]。

Visfatin属新型脂肪细胞因子之一,能促使3T3-L1脂肪细胞、L6肌细胞摄取葡萄糖,抑制H4IIEC3肝细胞大量释放葡萄糖,在预防IR中具有一定作用^[24-25]。但临床实际中,GDM孕妇常存在IR程度重、高血糖、血清Visfatin高表达共存现象,付颖等^[26]研究发现,GDM患者血清、胎盘组织中Visfatin表达可显著增高,且血清Visfatin表达与IR呈显著正相关。本研究显示,研究组血清visfatin水平高于对照组,且血清visfatin水平与HOMA-IR呈显著正相关,与上述研究一致。也表明血清visfatin水平与GDM患者IR密切相关,在疾病发生、进展中具有重要作用。分析其原因可能为GDM患者IR程度重,分泌胰岛素相对不足,升高的Visfatin虽能部分替代胰岛素起到降血糖效应,但不能彻底代偿机体IR程度的提升;同时,胰岛素受体与Visfatin相结合后,会使胰岛素受体构象产生改变,降低胰岛素同该受体间的结合力,从而一定程度影响胰岛素信号传导,明显降低胰岛素调控血糖的能力,进而IR程度重、高血糖、血清Visfatin高表达共存现象^[27]。

此外,25(OH)D3为评价维生素D状况的常用指标,付丹^[28]研究显示,GDM患者血清25(OH)D3显著降低,且与IR有密切关系。本研究中,研究组血清25(OH)D3水平低于对照组,且血清25(OH)

D3水平与HOMA-IR间显著负相关,与上述研究一致。表明血清25(OH)D3水平与GDM患者IR密切相关,在疾病发生、进展中具有重要作用。分析其原因为25(OH)D3可提高细胞外钙离子浓度,促使 β 细胞分泌钙结合蛋白,进而使 β 细胞中钙离子含量亦迅速增加,促进胰岛素分泌,对胰岛 β 细胞与IR起到保护作用,防止GDM发生、进展^[29-31]。本研究还首次探究了Chemerin、25(OH)D3、visfatin联合与单独诊断GDM的价值,结果显示,联合诊断敏感度高于单一指标诊断($P<0.05$)。提示应用三者联合检测可提升GDM诊断敏感度,可将其作为GDM的补充诊断指标。

综上所述,血清Chemerin、25(OH)D3、visfatin水平与GDM患者IR密切相关,在疾病发生、进展中扮演着重要角色,应用三者联合检测可提升GDM诊断敏感度,为临床诊断提供一定参考。

参考文献

- [1] Sahbaz A, Cicekler H, Aynioglu O, et al. Comparison of the predictive value of plateletcrit with various other blood parameters in gestational diabetes development[J]. J Obstet Gynaecol, 2016, 36(5): 589-593.
- [2] 李华,殷红梅,李英. 尿酸联合糖化血红蛋白早期检测对高龄孕妇妊娠期糖尿病发病的预测[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6): 411-416.
- [3] Osorioyáñez C, Qiu C, Gelaye B, et al. Risk of Gestational Diabetes Mellitus in Relation to Maternal Dietary Calcium Intake[J]. Public Health Nutr, 2017, 20(6): 1082-1089.
- [4] 李宁,尹倩,庄艳艳,等. 氧化应激在妊娠期糖尿病发病机制中的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(13): 2134-2136.
- [5] 张凌燕,张晓娜,折开娥,等. 妊娠期糖尿病孕妇血清和胎盘组织中FOXO3a的表达水平及其与胰岛素抵抗的关系[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(19): 4405-4408.
- [6] 石华. 妊娠期糖尿病患者血清Chemerin的变化与胰岛素抵抗的关系[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2016, 33(2): 43-45.
- [7] 沈丽芳,宋歌,黄庆,等. 妊娠糖尿病患者血清FABP4、Chemerin、Nesfatin-1与胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能的关系分析[J]. 疑难病杂志, 2017, 16(2): 160-163.
- [8] Fatima S S, Alam F, Chaudhry B, et al. Elevated levels of Chemerin, Leptin and Interleukin-18 in Gestational Diabetes Mellitus [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 30(9): 1023-1028.

- [9] 杨静,王祥珍,杨建恩. 妊娠期糖尿病患者血清脂联素、趋化素、视黄醇结合蛋白4与胰岛素抵抗的关系[J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 10(7):76-79.
- [10] 康瑛,续靖宁. 妊娠期糖尿病孕妇血内脂素的变化及其对新生儿体重的影响[J]. 陕西医学杂志, 2017, 46(10):1402-1404.
- [11] 彭久君,王淮燕,张铭,等. 妊娠期糖尿病患者脐血 Visfatin 水平变化及意义[J]. 山东医药, 2017, 57(46):55-57.
- [12] 徐进芳,冯鑫,徐艺,等. 妊娠晚期糖尿病患者的血清 25-羟维生素 D3 水平和胰岛素抵抗及骨代谢指标的相关性[J]. 医学临床研究, 2017, 34(5):993-995.
- [13] 胡可佳,张继东,肖玉会,等. 妊娠期糖尿病患者维生素 D 水平检测及其对胰岛素抵抗程度、脂肪细胞因子和 TNF- α 水平的影响[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(2):228-231.
- [14] 谢幸,苟文丽. 妇产科学[M]. 第8版. 北京:人民卫生出版社, 2013:75-78.
- [15] Deepaklal M C, Joseph K, Rekha K, et al. Insulin aspart in patients with gestational diabetes mellitus and pregestational diabetes mellitus [J]. Indian J Endocrinol Metab, 2015, 19(5):658-662.
- [16] 贺艳. 孕妇血清 PAPP-A、IR 与妊娠期糖尿病的临床相关性分析[J]. 广州医药, 2016, 47(5):31-33.
- [17] 王智. 孕妇血清妊娠相关蛋白、胰岛素抵抗指数与妊娠期糖尿病的关系[J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(11):69-71.
- [18] 孟喜燕,黄亚娟. 脂肪因子与妊娠期糖尿病相关性研究进展[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(11):1424-1426.
- [19] 卢敏,王英,陈青,等. 炎性及脂肪细胞因子与妊娠期糖尿病发病的相关性及在产褥期的变化[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(8):1767-1770.
- [20] 刘炯炯. 西格列汀对 2 型糖尿病大鼠血清及组织中 chemerin 水平的影响[D]. 安徽医科大学, 2015.
- [21] 潘宝龙,马润玫. 血清脂肪因子 omentin-1、chemerin 的水平与妊娠期糖尿病的相关性[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(9):1231-1236.
- [22] 周彩霞. 脂肪细胞因子和 C 反应蛋白在妊娠期糖尿病患者血清中的水平及其临床意义[J]. 中华保健医学杂志, 2017, 19(4):301-303.
- [23] Yang X, Quan X, Lan Y, et al. Serum chemerin level during the first trimester of pregnancy and the risk of gestational diabetes mellitus [J]. Gynecol Endocrinol, 2017, 33(10):770-773.
- [24] Liang Z, Wu Y, Xu J, et al. Correlations of serum visfatin and metabolisms of glucose and lipid in women with gestational diabetes mellitus [J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(2):247-252.
- [25] Zhang W, Dan Z, Meng Z, et al. Association between circulating visfatin and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. Acta Diabetol, 2018, 55(11):1113-1120.
- [26] 付颖,吴南楠,马唯. 内脏脂肪素在妊娠期糖尿病患者血清、胎盘组织及脐血中的表达及其临床意义[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(5):431-434.
- [27] 王涛,赵倩,侯倩男,等. 内脂素在妊娠期糖尿病患者中的检测价值[J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9(3):65-67, 78.
- [28] 付丹. 25-羟基维生素 D 与妊娠期糖尿病孕妇胰岛素抵抗的关系及意义[J]. 中国医药导报, 2018, 15(20):85-88.
- [29] 侯雪晶,孙燕,陈秀英. 妊娠期糖尿病与肥胖症、炎症因子、25-(OH)D3 和胰岛素抵抗的关系[J]. 中国热带医学, 2016, 16(3):262-265.
- [30] 朱庆霞. 血清 C 反应蛋白、25-羟基维生素 D3 在妊娠期糖尿病发病中的意义[J]. 山东医药, 2016, 56(14):55-56.
- [31] 蔡娅琼,詹瑛,顾峰,等. 青岛地区妊娠期糖尿病与血清 25-羟维生素 D₃ 的关系[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(3):280-282.

(上接第 498 页)

- [14] 王威,王海峰,薛飞肖,等. 西安市乙肝患者 HBV 基因型分布及临床相关性指标的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 16(4):475-477.
- [15] 慎强,董飞波,洪玲珍,等. HBV 基因变异对荧光定量 PCR 系统检测 HBV-DNA 准确性的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 12(3):521-524.
- [16] 江必武,叶丽化,王平,等. HBV 复制及其基因分型与 HBV 相关慢性肝病关系的临床研究[J]. 华中科技大学学报(学报), 2013, 42(2):231-233.
- [17] Lin S, Liu C, Shang H, et al. HBV serum markers of 49164 patients and their relationships to HBV genotype in Fujian Province of China [J]. J Clin Lab Anal, 2013, 27(2):130-136.
- [18] 刘涛,薛秀云. 慢性乙肝患者血清标志物及基因型与病毒载量的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23):3198-3199.
- [19] Choe WH, Kim H, Lee SY, et al. Three types of preS1 start codon deletion variants in the natural course of chronic hepatitis B infection [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(7):1370-1378.
- [20] van Bömmel F, Berg T. Stopping long-term treatment with nucleos(t)ide analogues is a favourable option for selected patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B [J]. Liver Int, 2018, 38(Suppl 1):90-96.

CEA、NSE、SCCA联合miR-21检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性研究

汤乔雅¹ 宫郡茗¹ 马艳凌^{2*}

[摘要] 目的 研究癌胚抗原(CEA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、鳞状上皮癌细胞抗原(SCCA)联合miR-21检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性。方法 选择87例肺癌患者作为实验组和同期体检的健康人作为对照组,采用电化学发光免疫法检测各组患者血清中CEA、NSE、SCCA的表达,实时定量PCR检测血清中miR-21的表达,治疗前分析肿瘤标志物CEA、NSE、SCCA及miR-21与肺癌患者中的性别、年龄、病理类型及TNM分期临床病理特征的相关性,治疗后分析与疗效及预后的相关性。结果 ①与对照组相比,实验组患者CEA、NSE、SCCA及miR-21的表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);②CEA、SCCA、miR-21的表达水平与肺癌患者临床病理特征无关,差异无统计学意义($P>0.05$),NSE与肺癌的TNM分期相关,差异有统计学意义($P<0.05$);③CEA、NSE、SCCA及miR-21的表达水平与疗效相关,差异有统计学意义($P<0.05$);④生存曲线显示,CEA、NSE、SCCA及miR-21的表达水平与患者生存预后相关,差异有统计学意义($P<0.05$);⑤4种指标联合诊断肺癌的灵敏度显著优于单项指标,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 肺癌患者血清中CEA、NSE、SCCA和miR-21的表达水平显著高于正常人,可作为肺癌的诊断、疗效及预后的指标。

[关键词] 癌胚抗原;神经元特异性烯醇化酶;鳞状上皮癌细胞抗原;miR-21;肺癌

Correlation between CEA, NSE, SCCA combined with miR - 21 and clinicopathological features, efficacy and prognosis in patients with lung cancer

TANG Qiaoya¹, GONG Junming¹, MA Yanling^{2*}

(1. Tianjin Medical University, Tianjin, China, 300070. 2. Department of Oncology, Third People's Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei, China, 430033)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between CEA, NSE, SCCA combined with miR - 21 and clinicopathological features, curative effect and prognosis in patients with lung cancer. Methods 87 patients with lung cancer were selected as the experimental group and 87 healthy people in the same period of physical examination as the control group. The expression levels of CEA, NSE and SCCA in serum were detected by electrochemiluminescence immunoassay, and miR-21 was detected by real-time PCR. The correlation of tumor markers CEA, NSE, SCCA and miR-21 with sex, age, pathological type and clinicopathological characteristics of TNM stage in patients with lung cancer was analyzed before treatment, and the correlation with curative effect and prognosis was analyzed after treatment. Results ① compared with the control group, the expression levels of CEA, NSE, SCCA and miR-21 in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). ② The expression levels of CEA, SCCA

基金课题:天津市滨海新区卫生计生委科技项目(2015BWKY002)

作者单位:1. 天津医科大学,天津 300070

2. 湖北省第三人民医院肿瘤科,湖北,武汉 430033

*通信作者:马艳凌,女, E-mail: 1904227737@qq.com

and miR-21 were not correlated with clinicopathological features of lung cancer ($P>0.05$). NSE was correlated with TNM stage of lung cancer ($P<0.05$). ③The expression levels of CEA, NSE, SCCA and miR-21 were correlated with the curative effect ($P<0.05$). ④The survival curve showed that the expression levels of CEA, NSE, SCCA and miR-21 were correlated with the survival prognosis of the patients ($P<0.05$). ⑤The sensitivity of the combination of the four indexes in the diagnosis of lung cancer were significantly better than those of single index, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** the expression levels of CEA, NSE and SCCA in serum of patients with lung cancer are significantly higher than those of normal controls, and the expression level of miR-21 is significantly lower than that of normal controls, which could be used as indicators of diagnosis, curative effect and prognosis of lung cancer.

[KEY WORDS] Carcinoembryonic antigen; neuron specific enolase; squamous cell carcinoma antigen; miR-21; lung cancer

肺癌(lung cancer)是最常见的癌症之一,导致约25%的癌症死亡^[1]。研究表明,90%~95%的肺癌来自上皮细胞,其覆盖较大和较小的气道。肺癌倾向于在早期阶段扩散或转移,身体的任何器官都可能受到肺癌肿瘤的侵袭^[2]。为防止肺癌复发,建议在手术后进行化疗治疗^[3]。肿瘤标志物的精确测量和肿瘤的治疗效果监测是早期诊断的关键,包括癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)、神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)、鳞状上皮癌细胞抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCCA)^[4]。据相关研究 mRNA-21 过表达缩短了人类原发性鳞状细胞肺癌的生存时间,表明 miRNA-21 可能是这种疾病的诊断和预后标志。目前由于单个肿瘤标志物通常不足以用于癌症诊断,检测一组肿瘤标志物可以显著提高诊断价值^[5]。本文将研究 CEA、NSE、SCCA 联合 miR-21 检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择本院自2016年2月至2019年3月期间接受肺癌治疗的患者87例,其中男性45例,女性42例,年龄37~83岁,平均年龄(58.46±3.12)岁,其中病理类型鳞癌28例,腺癌59例。纳入标准:①患者具有明确的细胞学或病理学确诊证明;②患者的病灶经影像学检查认为具有研究价值。排除标准:①患者治疗前没有进行肿瘤标志物 CEA、NSE、SCCA 血清检查;②患者患有其他恶性肿瘤、免疫系统疾病或严重感染性疾病。以上患者及其家属已知情并签署同意书,本课题已通过我院伦理委员会。选取87例肺癌患者作为实验组和同期

体检的87例健康人作为对照组。

1.2 用电化学发光免疫法检测各组肿瘤标志物的表达

采用电化学发光免疫分析仪(UniCel DxI800)检测 CEA、NSE、SCCA 的表达水平,所有受试者与上午空腹抽取静脉血5 mL,室温静置后用离心机进行离心,3 000 r/min,10 min,去沉淀取上清液,使用电化学发光免疫分析仪进行检测。

1.3 用实时定量PCR检测血清中miR-21的表达

从健康人和肺癌患者静脉采血约5 mL,离心3 000 rpm 十分钟分离去血清,放于-80℃备用。从血清中提取总RNA并对其检测是否完整,用实时定量PCR检测血清中miR-21的表达,GAPDH作为内部参考。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达水平。

1.4 疗效评价标准

肺癌临床疗效评价标准^[6]:①完全治愈(Complete Response, CR),体内无肿瘤,完全治愈;②部分治愈(Partial Response, PR),体内肿瘤数量减少和肿瘤体积减少超过原始体积一半;③病情稳定(Stable Disease, SD),体内肿瘤体积减少小于一半或增加小于原来体积的25%;④病情发展(Progressive Disease, PD),体内肿瘤体积大于原来体积的25%或者出现肿瘤扩散。

1.5 统计学方法

以上数据采用SPSS 20.0软件系统,采用Kruskal-Wallis H检验肺癌患者血清中CEA、NSE、SCCA和miR-21的表达和肺癌患者临床病理特征的关系,采用Spearman等级相关性分析CEA、NSE、SCCA和miR-21和临床病理特征的关系,采用Kaplan-Meier生存分析法分析CEA、NSE、SCCA

和 miR-21 表达高低的生存曲线;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清中 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达对比

根据实验结果显示,实验组患者肿瘤标志物 CEA、NSE、SCCA 表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);实验组患者血清中 miR-21 的表达显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Expression of CEA, NSE, SCCA and miR-21 in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	CEA ($\mu\text{g/L}$)	NSE ($\mu\text{g/L}$)	SCCA ($\mu\text{g/L}$)	miR-21
对照组	2.35 \pm 0.26	6.14 \pm 0.79	1.41 \pm 0.11	0.92 \pm 0.14
实验组	11.65 \pm 1.75	14.51 \pm 1.62	2.94 \pm 0.16	2.13 \pm 1.13
<i>P</i> 值	0.032	0.027	0.029	0.041

表 2 实验组 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 与肺癌临床病理特征的关系 ($\mu\text{g/L}$)

Table 2 Relationship between CEA, NSE, SCCA and miR-21 in experimental group and clinicopathological features of lung cancer ($\mu\text{g/L}$)

	CEA	<i>P</i> 值	NSE	<i>P</i> 值	SCCA	<i>P</i> 值	miR-21	<i>P</i> 值
性别		0.85		0.86		0.91		0.87
男	10.27		12.88		2.88		2.22	
女	11.96		12.98		2.98		3.23	
年龄		0.79		0.81		0.83		0.76
<60	10.51		15.14		2.75		2.50	
\geq 60	11.60		11.28		2.99		2.42	
病理类型		0.68		0.76		0.69		0.52
鳞癌	12.24		15.89		3.09		3.10	
腺癌	9.57		16.16		3.09		2.28	
TNM 分期		0.76		0.03		0.35		0.49
I	10.05		12.37		2.79		2.65	
II	15.27		14.98		3.21		2.38	
III	13.96		15.76		2.93		2.38	

表 3 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 与肺癌患者疗效的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Relationship between CEA, NSE, SCCA and miR-21 and the efficacy of lung cancer patients ($\bar{x} \pm s$)

疗效 (%)	例数	CEA		NSE		SCCA		miR-21	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
PR (26.4%)	23	2.41 \pm 1.32	2.13 \pm 1.12	15.19 \pm 5.69	14.54 \pm 5.98	2.98 \pm 0.18	2.08 \pm 0.17	2.45 \pm 1.26	1.48 \pm 0.95
SD (40.2%)	35	6.17 \pm 2.31	5.79 \pm 1.89	16.37 \pm 6.12	16.08 \pm 5.59	3.45 \pm 0.26	2.45 \pm 0.21	2.89 \pm 1.21	1.56 \pm 0.84
PD (33.3%)	29	5.87 \pm 2.69	5.19 \pm 2.09	15.39 \pm 6.34	14.92 \pm 6.03	3.28 \pm 0.14	2.36 \pm 0.11	2.63 \pm 1.36	1.76 \pm 0.59
<i>P</i> 值		0.039		0.028		0.027		0.041	

2.2 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 与肺癌临床病理特征的关系

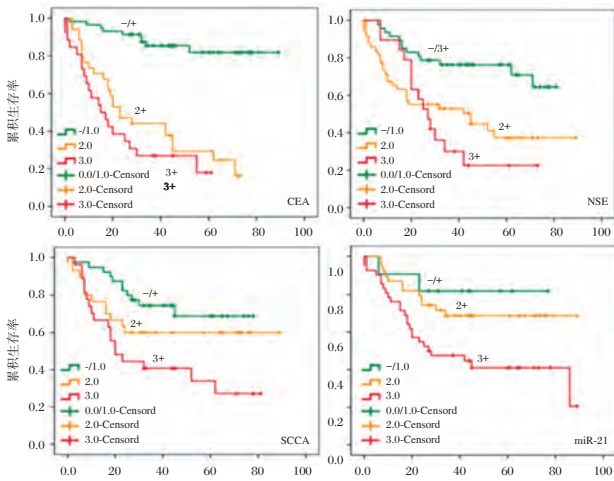
根据分析结果,肺癌患者 CEA、SCCA 及 miR-21 的表达与性别、年龄、病理类型和 TNM 分期无关,差异无统计学差异 ($P > 0.05$)。肺癌患者 NSE 的表达与性别、年龄、病理类型无关,差异无统计学差异 ($P > 0.05$),与临床分期相关,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);临床分期从 I ~IV 逐渐升高,NSE 的表达从 12.37、14.98、15.76 逐渐增加,与临床病理呈正相关。见表 2。

2.3 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 与肺癌患者疗效的关系

实验数据显示,未有完全痊愈的患者。PR 患者 (26.4%, $\chi^2=5.78$) 治疗后 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达显著低于治疗前,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);SD 患者 (40.2%, $\chi^2=8.26$) 治疗后 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达显著低于治疗前,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);PD 患者 (33.3%, $\chi^2=4.91$) 治疗后 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达显著低于治疗前,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达与患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存曲线显示,随着 CEA、NSE 及 SCCA 表达的阳性率增加,生存曲线越低,患者存活时间越短,表明 CEA、NSE 及 SCCA 表达越高,患者预后情况越差。miR-21 的表达情况与以上 3 种肿瘤标志物与患者生存情况一致。生存分析结果显示:CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达表达的高低对患者预后情况有重要意义。见图 1。



其中 P 均 < 0.05 。

图 1 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 的表达与患者预后关系的对比

Figure 1 Comparison of CEA, NSE, SCCA and miR-21 expression and patient prognosis

2.5 血清中单个项目及联合检测的灵敏度和特异度

实验结果显示,CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 诊断肺癌的灵敏度分别是 51.7%、37.9%、52.9%、63.2%, 特异度分别是 90.8%、82.7%、85.1%、81.6%, 四种指标联合诊断的灵敏度为 85.1%, 显著高于单项指标, 但特异度为 70.1%, 显著低于单项指标。见表 4。

表 4 血清中单个项目及联合检测的灵敏度和特异度对比 [n(%)]

Table 4 comparison of sensitivity and specificity of single item and combined detection in serum [n(%)]

项目	CEA	NSE	SCCA	miR-21	4 种联合
灵敏度	51.7(45)	37.9(33)	52.9(46)	63.2(55)	85.1(74)
特异度	90.8(79)	82.7(72)	85.1(74)	81.6(71)	70.1(61)

3 讨论

肺癌是主要癌症发病率和死亡率的最常见原

因^[7]。该癌症的常见治疗方法包括手术,化学疗法,姑息治疗和放射治疗^[8]。目前,肺癌的诊断常用支气管镜检查、组织病理学检查和计算机断层扫描,但这些方法均存在侵袭性差、敏感性低、特异性差等缺点;低剂量螺旋 CT 检查是筛查肺癌的推荐方法^[9],由于潜在的辐射危险,患者对 CT 检查感到不适,这限制了该技术在常规筛查中的应用。因此,在临床诊断中检测肿瘤标志物可能是对肺癌早期筛查的补充。然而,由于肿瘤标志物的低特异性,通常单一的肿瘤标志物不足以诊断癌症。并且检测一组肿瘤标志物可以显著提高诊断价值。因此,多生物标志物免疫测定法引起了越来越多的关注。此外,就成本,测定时间,样品消耗,劳动力和便利性而言,多生物标记物免疫测定法比单生物标记物免疫测定法具有显著优势。本文将研究 CEA、NSE、SCCA 联合 miR-21 检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性。

对某些特异 miRNAs 的研究表明,其可作为治疗的靶点。例如, Kim 等人指出 miR-21 具有抑制肿瘤的作用,可以作为肝癌治疗的新靶点^[10-13]。Yang 等人指出 miRNA-21 可以预测 NSCLC 的复发和低生存率。mRNA-21 过表达缩短了人类原发性鳞状细胞肺癌的生存时间,表明 miRNA-21 可能是这种疾病的诊断和预后标志^[14]。miRNA 在基因表达调控中起着关键作用,其异常表达与肿瘤的发生和发展有关^[15]。肺癌的高发病率和高死亡率已成为威胁人类健康的重要因素,故本课题研究 miR-21 的表达与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性。实验结果显示,肺癌患者 miR-21 的表达水平显著高于正常人,与肺癌患者临床病理特征无关,与疗效及患者生存预后相关。

肿瘤标志物的精确测量是早期诊断癌症和监测肿瘤的治疗效果的关键,包括癌胚抗原(CEA),神经元特异性烯醇化酶(NSE);鳞状上皮癌细胞抗原(SCCA)^[16]。CEA 是一种广谱肿瘤标志物,可用于预测许多癌症的复发率和存活率,例如结肠癌、胃癌和肺癌等^[17-18]。NSE 是神经元和外周神经内分泌细胞的高度特异性标记物^[19]。SCCA 是鳞状细胞癌的特异性标志物,是宫颈鳞状细胞癌的独立预后因素^[20]。这些标志物大多数研究集中于这些标志物对肺癌的预后和存活率的预测价值。故本课题研究 CEA、NSE、SCCA 检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性。实验结果

显示,实验组患者 CEA、NSE、SCCA 的表达水平显著高于正常人,CEA 和 SCCA 的表达水平与肺癌患者临床病理特征无关,NSE 与肺癌的 TNM 分期相关,3 者的表达水平与疗效及生存预后相关。

灵敏度即用来衡量诊断患有疾病方法的能力,将患者正确判定为真阳性;所谓特异性就是指该指标在诊断某疾病时,不误诊的机会有多大。故本课题将血清中单个项目及联合检测的灵敏度和特异度进行对比,四种指标联合诊断肺癌的灵敏度显著高于 CEA、NSE、SCCA 及 miR-21 诊断肺癌的灵敏度,但是四种联合诊断肺癌的特异性低于单项指标。任何一个诊断指标,都有两个最基本的特征,即灵敏度和特异性,如果提高其诊断的灵敏度,必然降低其诊断的特异性,换句话说,减少漏诊必然增加误诊,反之亦然。综上可知,肺癌患者血清中 CEA、NSE、SCCA 和 miR-21 的表达水平显著高于正常人,可作为肺癌的诊断、疗效及预后的指标,四种指标联合诊断肺癌的灵敏度显著提高肺癌的诊断率,为未来诊断和治疗肺癌提供了新思路,但提高诊断肺癌的特异度还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Xiong W, Zhao Y, Xu M, et al. The relationship between tumor markers and pulmonary embolism in lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):41412-41421.
- [2] 嵇桂娟. 外周血肿瘤标志物水平与肺癌患者化疗疗效的相关性研究[J]. *徐州医科大学学报*, 2017, 37(10):677-680.
- [3] Jiang ZF, Wang M, Xu JL. Thymidine kinase 1 combined with CEA, CYFRA21-1 and NSE improved its diagnostic value for lung cancer[J]. *Life Sci*, 2018, 194:1-6.
- [4] Shintani T, Matsuo Y, Iizuka Y, et al. Prognostic significance of serum CEA for non-small cell lung cancer patients receiving stereotactic body radiotherapy[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(9):5161-5167.
- [5] 田德全, 徐婷, 张燕, 等. 血清肿瘤标志物在晚期肺癌患者一线化疗疗效评估和生存预测中的价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(9):693-699.
- [6] Dai L, Qu Y, Li J, et al. Serological proteome analysis approach-based identification of ENO1 as a tumor-associated antigen and its autoantibody could enhance the sensitivity of CEA and CYFRA21-1 in the detection of non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22):36664-36673.
- [7] 宋晓, 蔡振旭, 杜炜, 等. 血清肿瘤标志物在非小细胞肺癌放疗后疗效评估和预后判断中的价值[J]. *中国医药*, 2016, 11(5):664-666.
- [8] Li X, Zhang Q, Jin X, et al. Combining serum miRNAs, CEA, and CYFRA21-1 with imaging and clinical features to distinguish benign and malignant pulmonary nodules: a pilot study: Xianfeng Li et al. combining biomarker, imaging, and clinical features to distinguish pulmonary nodules [J]. *World J Surg Oncol*, 2017, 15(1):107.
- [9] 黄宇筠. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与扩增的比较及其与血清 CEA 水平的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(1):22-26.
- [10] 杨卫京, 牛东, 王辉. 肺癌患者化疗前后血清 CYFRA21-1、NSE 和 CA125 水平的变化及意义[J]. *医学综述*, 2017, 23(20):4150-4153.
- [11] Holdenrieder S, Wehnl B, Hettwer K, et al. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(8):1037-1045.
- [12] 陈超. 五种血清肿瘤标志物检测在肺癌临床诊断中的意义[J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20(11):1853-1856.
- [13] Rosa Rama Ana, Hernández Rosa. Specific driving of the suicide E gene by the CEA promoter enhances the effects of paclitaxel in lung cancer [J]. *Cancer gene therapy*, 2019. [Epub ahead of print]
- [14] Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 10(3):297-308.
- [15] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2018, 141(5):672-675.
- [16] Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, et al. Circulating microRNA as potential markers of human drug-induced liver injury [J]. *Hepatology*, 2017, 54(5):1767-1776.
- [17] Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2016, 10(1):42-46.
- [18] Etheridge A, Lee I, Hood L, et al. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers [J]. *Mutat Res*, 2017, 717(1-2):85-90.
- [19] Rapicetta Cristian, Lococo Filippo, Davini Federico. Is Adjuvant Chemotherapy Worthwhile After Radical Resection for Single Lung Metastasis From Colorectal Cancer? A Multicentric Analysis Evaluating the Risk of Recurrence [J]. *Frontiers in oncology*, 2019, 9:763.
- [20] Wang Yuhui, Wang Zhenming. The Application Value of Serum HE4 in the Diagnosis of Lung Cancer [J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 2019, 20(8):2405-2407.

· 论 著 ·

卵巢癌患者血清 miR-21 及糖类抗原 125 水平变化及意义

尤娟*

[摘要] **目的** 探讨卵巢癌患者血清微小 RNA-21(miR-21)及糖类抗原 125(CA125)水平变化及意义。**方法** 收集本院 80 例卵巢癌患者(恶性组)、50 例卵巢良性病变患者(良性组)以及 50 例健康女性(健康组)外周血标本,检测各组血清 miR-21 及 CA125 水平表达,分析血清 miR-21、CA125 检测对卵巢癌的诊断价值及其与卵巢癌病理特征的关系。**结果** 恶性组血清 miR-21 及 CA125 表达水平均高于良性组和健康组,良性组血清 miR-21 及 CA125 表达量又高于健康组($P<0.05$)。血清 miR-21 与 CA125 联合检测诊断卵巢癌的 AUC 为 0.959,诊断灵敏度显著高于单独检测($P<0.05$),联合检测的诊断特异度与单独检测差异不显著($P>0.05$)。不同临床分期、组织分化程度以及有无淋巴结转移的卵巢癌患者血清 miR-21 与 CA125 异常率比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与术前相比,恶性组患者手术 1 个月后血清 miR-21 和 CA125 表达水平均显著降低($P<0.05$)。**结论** 卵巢癌患者血清 miR-21 和 CA125 表达明显升高,两者联合检测有助于卵巢癌的临床诊断和病情评估。

[关键词] 卵巢癌;微小 RNA-21;糖类抗原 125

Changes and significance of serum miR - 21 and carbohydrate antigen 125 in patients with ovarian cancer

YOU Juan*

(Department of obstetrics and gynecology, Rugao people's hospital, Rugao, Jiangsu, China, 226500)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the changes of serum microRNA21 (miR - 21) and carbohydrate antigen 125 (CA125) in ovarian cancer patients and its clinical significance. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 80 patients with ovarian cancer (malignant group), 50 patients with benign ovarian lesions (benign group) and 50 healthy women (healthy group). The expressions of serum miR-21 and CA125 in each group were detected. The diagnostic values of serum miR-21 and CA125 in ovarian cancer were analyzed and their correlation with the pathological characteristics of ovarian cancer. **Results** The expression levels of serum miR-21 and CA125 in malignant group were higher than those in benign group and healthy groups, and the expressions of serum miR-21 and CA125 in benign group were higher than those in healthy group ($P<0.05$). The AUC of the combined detection of serum miR - 21 and CA125 in ovarian cancer was 0.959, the diagnostic sensitivity of the combined detection was significantly higher than that of individual detection ($P<0.05$), while the diagnostic specificity has no significant difference between combined detection and individual detection ($P>0.05$). The abnormality rates of serum miR - 21 and CA125 were significantly different in ovarian cancer patients with different clinical stages, tissue differentiation and lymph node metastasis ($P<0.05$). Compared with before surgery, the expression of serum miR - 21 and CA125 in malignant group significantly reduced 1 month after surgery ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of serum miR-21 and CA125 increased significantly in patients with ovarian cancer. The combined detection of the two indexes is helpful for diagnosis and evaluation of ovarian cancer.

[KEY WORDS] Ovarian cancer; microRNA-21; Carbohydrate antigen 125

作者单位:如皋市人民医院妇产科,江苏,如皋 226500

*通信作者:尤娟, E-mail:313536273@qq.com

卵巢癌是妇科常见生殖系统肿瘤,恶性程度高、治疗难度大,严重威胁女性身体健康^[1]。卵巢癌发病隐匿,早期症状不典型,临床也缺乏明确诊断方法,导致60%~70%卵巢癌患者确诊时已发展至晚期,错失最佳治疗时机^[2]。病理活检是诊断卵巢癌的金标准,但其属于有创操作,部分患者依从性较差。血清肿瘤标志物在肿瘤筛查和诊断方面的应用日益广泛,成为目前临床研究的热点,糖类抗原125(Carbohydrate antigen 125, CA125)是一种常用妇科肿瘤标记物,具有较高敏感性^[3]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类小分子非编码RNA,参与细胞生长、凋亡以及能量代谢等生理过程。近年研究^[4-5]发现,微小RNA-21(miRNA-21, miR-21)与多种肿瘤疾病的发生密切相关,但其在卵巢癌发病过程中的作用尚不清楚。本研究分析了80例卵巢癌患者血清miR-21及CA125水平变化,探讨两者对卵巢癌的诊断价值及其与病例特征的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2016年1月至2018年1月本院接受手术治疗的80例卵巢癌患者为恶性组,患者年龄37~65岁,平均(53.68±6.32)岁;临床分期:I~II期45例,III~IV期35例;分化程度:低分化33例,中高分化47例;淋巴结转移28例,无淋巴结转移52例。选取同期卵巢良性肿瘤患者50例为良性组,患者年龄35~65岁,平均(54.22±6.29)岁;卵巢囊肿29例,卵巢纤维瘤11例,卵巢包块4例,畸胎瘤6例。另选取同期50例健康女性为健康组,年龄32~65岁,平均(53.85±6.41)岁。3组研究对象基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准^[6]:(1)临床资料完整,病理诊断报告证实疾病;(2)初诊治,尚未接受治疗;(3)所有患者均知情同意;(4)研究方案经医学伦理委员会审核通过。

排除标准:排除肝肾功能不全、血液系统及免疫系统疾病患者;排除其他部位恶性疾病患者;排除近半年使用过激素和免疫调节类药物者;剔除病理资料不全,中途随访失联者。

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集

恶性组患者于入院次日和术后1个月采集空

腹外周静脉血样10 mL,良性组和健康组分别于初诊治或体检时采集空腹静脉血标本4 mL。将外周血以1 000 g离心15 min,分离血浆分装后置于-80℃保存备检。

1.3.2 试剂与仪器

Trizol试剂购于美国Invitrogen公司, RNA提取试剂购于Miltenyi Biotec公司,引物由上海生工公司设计合成(见表1),反转录试剂盒购于美国Invitrogen公司,实验仪器为ABI7300荧光PCR仪。CA125检测试剂购于罗氏公司,检测仪器为罗氏Conbase601分析仪。

表1 miR-21及内参引物序列
Table 1 miR-21 and internal primer sequences

基因	引物序列
miR-21	上游 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3'
	下游 5'-CUAUACAACCUACUACCUCAUU-3'
U6	上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3'
	下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.3.3 检测方法

①使用Trizol试剂提取外周血总RNA,然后采用反转录试剂盒进行cDNA合成。通过RT-PCR实验扩增mRNA,反应体系共10 μL,扩增条件:95℃ 15 min, 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 70℃ 30 s, 循环50次。测定mRNA的Ct值,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miR-21相对含量。②采用化学发光免疫法检测血清CA125水平,实验操作由专人根据说明书执行。

1.4 统计学方法

采用SPSS19.0软件分析,所有计量资料以($\bar{x} \pm s$)进行描述,多组比较用单因素方差分析,两两比较用LSD法检验;计数资料以率(%)描述,组间比较采用 χ^2 检验;根据受试者工作特征曲线(Receiver operator characteristic curve, ROC)分析血清miR-21及CA125在卵巢癌诊断中的价值,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清miR-21及CA125表达情况比较

恶性组血清miR-21及CA125表达水平均高于良性组和健康组,良性组患者血清miR-21及CA125表达又高于健康组($P<0.05$)。见表2。

2.2 血清miR-21及CA125检测对卵巢癌的诊断价值

以恶性组为阳性组,健康组与良性组合并为

表2 各组血清 miR-21 及 CA125 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of expression levels of serum miR-21 and CA125 in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-21	CA125(U/mL)
健康组	50	1.02±0.36	19.34±4.85
良性组	50	1.55±0.42	29.91±6.23
恶性组	80	2.39±0.72	52.66±18.83
F 值		87.123	107.454
P 值		0.000	0.000

表3 血清 miR-21 及 CA125 检测对卵巢癌的诊断价值 (U/mL, %)
Table 3 Diagnostic value of serum miR-21 and CA125 in ovarian cancer (U/mL, %)

指标	最佳临界值	灵敏度	特异度	Youden 指数	AUC	95%可信区间
miR-21	2.13	78.8	92.0	0.708	0.925	0.888~0.961
CA125	35.50	62.5	98.0	0.605	0.872	0.822~0.922
联合检测		91.3	92.0	0.833	0.959	0.931~0.986

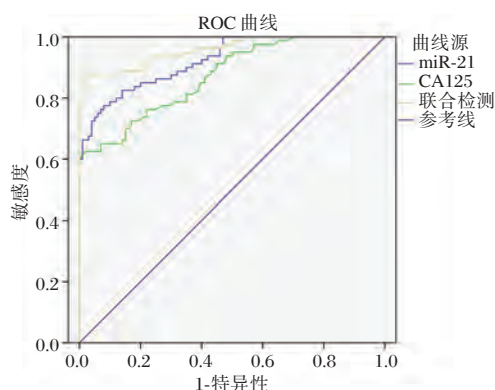


图1 血清 miR-21 及 CA125 检测对卵巢癌诊断的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of serum miR-21 and CA125 detection for the diagnosis of ovarian cancer

2.3 不同临床病理特征患者血清 miR-21 及 CA125 表达情况

根据 ROC 分析所得血清 miR-21 及 CA125 表达临界值为界定标准,超出临界值表示表达阳性,低于临界值者表示表达阴性。临床分期 III~IV 期、低分化程度以及存在淋巴结转移的卵巢癌患者血清 miR-21 及 CA125 阳性率分别高于 I~II 期、中高分化和未发生淋巴结转移患者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 恶性组手术前后血清 miR-21 及 CA125 表达情况

恶性组患者手术 1 个月后血清 miR-21 及 CA125 表达水平较术前明显降低,差异具有统计

阴性组。绘制 ROC 曲线分析发现,血清 miR-21 和 CA125 单独检测诊断卵巢癌的 AUC 分别为 0.925、0.872,两者最佳诊断临界值分别为 miR-21 < 2.13、CA125 < 35.50 U/mL;在此诊断标准下 miR-21 和 CA125 的诊断灵敏度分别为 78.8%、62.5%,特异度为 92.0%、98.0%。联合检测的 AUC 为 0.959,诊断灵敏度为 91.3%,显著高于 miR-21 和 CA125 单独检测 ($P < 0.05$);诊断特异度为 92.0%,与单独检测差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3、图 1。

学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

近年来,随着生活方式的改变和环境污染的加剧,卵巢癌的发生率逐年升高且呈年轻化趋势^[7]。早期卵巢癌患者生存率较高,经系统治疗后五年生存率可达 90% 以上;但由于早期症状不明显且缺乏敏感的筛查指标,多数患者确诊时已处于晚期,导致预后较差,五年生存率低于 40%^[8-9]。因此,早期诊断和筛查对卵巢癌患者的临床治疗和远期预后尤为重要。

多种细胞因子参与肿瘤疾病的发生和发展过程,能够辅助临床医生监测治疗效果和判断预后^[10]。CA125 属于糖蛋白类肿瘤抗原,是目前临床上应用最为广泛的肿瘤标志物,在肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤患者血清中均显著提高,并对患者的预后有一定指示作用^[11]。本研究结果显示,与卵巢良性肿瘤及健康女性相比,卵巢癌患者血清 CA125 水平显著升高,提示 CA125 对卵巢癌的诊断同样具有重要参考价值。另外,CA125 在不同临床分期、组织分化程度以及是否发生淋巴结转移患者血清中也存在明显差异,且卵巢癌患者术后 1 个月时血清 CA125 水平也明显降低,说明 CA125 在卵巢癌病理过程中发挥重要作用,可作为评估患者病情的辅助指标。

癌症的发生和发展是多基因共同参与的过程,miRNA 是一类单链非编码 RNA,通过与 3' 端

表4 不同临床病理特征患者血清 miR-21 及 CA125 表达情况比较 [n(%)]

Table 4 comparison of serum miR-21 and CA125 expression in patients with different clinical and pathological characteristics [n(%)]

临床特征	miR-21				CA125				
	高表达	低表达	χ^2 值	P 值	高表达	低表达	χ^2 值	P 值	
临床分期	I~II期(n=45)	30(66.67)	15(33.33)	23.220	0.000	23(51.11)	22(48.89)	14.670	0.000
	III~IV期(n=35)	33(94.29)	2(5.71)			27(77.14)	8(22.86)		
分化程度	中高分化(n=47)	31(65.96)	16(34.04)	31.869	0.000	22(46.81)	25(53.19)	32.175	0.000
	低分化(n=33)	32(96.97)	1(3.03)			28(84.85)	5(15.15)		
转移	否(n=52)	35(67.31)	17(32.69)	39.521	0.000	29(55.77)	23(44.23)	7.988	0.007
	是(n=28)	28(100.00)	0(0.00)			21(75.00)	7(25.00)		

表5 卵巢癌患者手术前后血清 miR-21 及 CA125 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of serum mir-21 and CA125 expression levels in ovarian cancer patients before and after surgery ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-21	CA125(U/mL)
术前	80	2.39±0.72	52.66±18.83
术后1个月	80	1.87±0.53	38.52±9.57
t 值		5.465	5.787
P 值		0.000	0.000

配对而干扰正常 mRNA 的合成,实现对靶基因表达的调控作用^[12]。研究^[13-14]发现,miRNA 通过对原癌基因或抑癌基因的调控作用,介导肿瘤细胞的免疫逃逸、新血管生成等途径,参与肿瘤疾病的病理过程。miR-21 是一种具有类似癌基因的 miRNA,通过负调控肿瘤抑制基因 TPM1、PTEN、SPRY2 等靶向位点,促进肿瘤细胞的生长、分裂和侵袭,从而在血液系统以及实体器官肿瘤中发挥作用^[15-17]。本研究发现,卵巢癌患者血清 miR-21 相对表达量较卵巢良性肿瘤和健康女性显著升高,且不同临床分期、组织分化程度以及是否存淋巴结转移的患者血清 miR-21 表达也存在显著差异,提示 miR-21 在卵巢癌发病过程中可能发挥促癌作用,其相关作用机制还需进一步研究。

绘制 ROC 曲线分析 miR-21 及 CA125 对卵巢癌的诊断价值,结果显示,血清 miR-21 和 CA125 单独检测诊断卵巢癌的 AUC 均大于 0.8,提示两者对卵巢癌的诊断均具有良好效果;其中 miR-21 对卵巢癌诊断的 AUC 和灵敏度均大于 CA125,提示 miR-21 对卵巢癌诊断效能较高。卵巢癌恶性程度较高,对患者危害严重,避免漏诊是临床诊治的关键,单项指标检测必然会存在一定缺陷性,因此推荐多指标联合检测进行疾病筛查。本研究发现,

miR-21 和 CA125 联合检测的 AUC 大于单独检测,且联合检测的诊断灵敏度较单独检测也显著提高,说明 miR-21 和 CA125 联合检测可进一步提高灵敏度,降低漏诊率。

综上所述,血清 miR-21 和 CA125 表达情况与卵巢癌的发生发展密切相关,可作为卵巢癌早期诊断的参考指标,而 miR-21 和 CA125 联合检测更有助于提高卵巢癌筛查诊断的准确性,降低漏诊率。

参考文献

- [1] 谭丽珊,陈玉英,余健华,等. 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[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3): 153-157.
- [2] Salomon - Perzyński A, Salomon - Perzyńska M, Michalski B, et al. High-grade serous ovarian cancer: the clone wars [J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295(3): 569-576.
- [3] 凌玲,程文国,傅丹,等. CA125、CA19-9、AFP 及 CEA 在卵巢肿瘤诊断中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20): 2538-2541, 2544.
- [4] 陈薇,游佳,陈靖,等. 微小 RNA-21 对肝癌患者的 HepG2 细胞增殖的调控作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(1): 21-24.
- [5] 支亚丽,张诗蒙,栗俊杰,等. 宫颈癌宫颈脱落细胞中 miR-21 的表达及其诊断价值的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(5): 798-800.
- [6] 沈铿,崔恒,丰有吉. 常见妇科恶性肿瘤诊治指南 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2014: 90-91.
- [7] Lee KC, Lin H, ChangChien CC, et al. Difficulty in diagnosis and different prognoses between colorectal cancer with ovarian metastasis and advanced ovarian cancer: An empirical study of different surgical adoptions[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2017, 56(1): 62-67.
- [8] 徐文莉,林燕华,罗艺,等. 上皮性卵巢癌血浆中 microRNA-30a-5p 含量与分级及分期的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(6): 381-385.

水翁花对过氧化氢诱导神经细胞凋亡的影响

于广周* 谭文刚 张昊

[摘要] 目的 探讨水翁花对过氧化氢(H_2O_2)诱导神经细胞 PC12 凋亡的影响及其作用机制。方法 构建 PC12 氧化应激损伤模型,不同浓度的水翁花干预 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率;检测细胞 SOD 水平。qRT-PCR 法检测水翁花对 miR-422a 表达的影响;过表达 miR-422a 或抑制 miR-422a 表达对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡及 SOD 活性的影响。Western blot 法测定细胞中 Bcl-2、Bax 的表达变化。结果 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), SOD 活性降低 ($P<0.05$), 抑制 miR-422a 表达 ($P<0.05$), 而水翁花处理后, PC12 细胞凋亡率降低 ($P<0.05$), SOD 活性增强 ($P<0.05$), 促进 miR-422a 表达 ($P<0.05$), Bcl-2 表达上调 ($P<0.05$), Bax 表达下调 ($P<0.05$); 过表达 miR-422a 可抑制 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡 ($P<0.05$), 增强 SOD 活性 ($P<0.05$); 抑制 miR-422a 表达可逆转水翁花对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡、SOD 活性的影响。结论 水翁花可通过上调 miR-422a 表达对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤发挥保护作用,其可能作用机制与抗细胞凋亡及抗氧化作用相关。

[关键词] 水翁花; 过氧化氢; miR-422a; PC12 细胞; 凋亡

Effect of cleistocalyx operculatus flower buds on hydrogen peroxide induced apoptosis of nerve cells

YU Guangzhou*, TAN Wengang, ZHANG Hao

(Henan Province Zhumadian Central Hospital Sankei Third Branch, Zhumadian, Henan, China, 463000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of cleistocalyx operculatus flower buds on the apoptosis of PC12 induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) and its mechanism. Methods PC12 oxidative stress injury model was established. Different concentrations of cleistocalyx operculatus flower buds intervened in H_2O_2 -induced PC12 cells, and apoptosis rate was detected by flow cytometry. Cell SOD levels were measured according to the kit. The effect of operculatus flower on the expression of miR-422a was detected by qRT-PCR. Overexpression of miR-422a or inhibition of miR-422a expression on H_2O_2 -induced apoptosis and SOD activity in PC12 cells were measured. The expression of Bcl-2 and Bax in cells was determined by Western blot. Results H_2O_2 -induced apoptosis of PC12 cells increased ($P<0.05$), SOD activity decreased ($P<0.05$), and miR-422a expression was inhibited ($P<0.05$). After treatment with water flower, the apoptosis rate of PC12 cells decreased, the activity of SOD increased ($P<0.05$), the expression of miR-422a and Bcl-2 was up-regulated ($P<0.05$). The expression of Bax was down-regulated ($P<0.05$). Overexpression of miR-422a inhibited H_2O_2 -induced apoptosis of PC12 cells and enhanced SOD activity. Inhibition of miR-422a expression reversed the effect of water flower on H_2O_2 -induced apoptosis and SOD activity in PC12 cells. Conclusion Cleistocalyx operculatus flower buds can protect H_2O_2 -induced PC12 cell injury by up-regulating miR-422a expression, and the possible mechanism is related to anti-apoptosis and anti-oxidation.

[KEY WORDS] Cleistocalyx operculatus flower buds; hydrogen peroxide; miR-422a; PC12 cells; apoptosis

作者单位:河南省驻马店市中心医院神内三科,河南,驻马店 463000

*通信作者:于广周, E-mail:53124897@qq.com

阿尔茨海默病属于退行性神经系统病变,并严重危害老年人健康,既往研究显示氧化应激可促进退行性神经系统病变发生^[1-2]。因而寻找具有清除氧自由基活性的药物对降低退行性神经系统病变发生率具有重要意义。研究表明水翁花对过氧化氢(H_2O_2)诱导的神经细胞损伤具有保护作用^[3-4]。但水翁花对 H_2O_2 诱导PC12细胞损伤的保护机制尚未完全阐明。研究表明 H_2O_2 诱导PC12细胞中微小RNA-422a(microRNA-422a, miR-422a)与bcl-w蛋白表达呈负相关,miR-422a可能通过负向调控bcl-w表达而参与 H_2O_2 诱导的PC12细胞凋亡过程^[5]。基于水翁花对神经系统具有较好的保护作用,本研究采用 H_2O_2 诱导PC12细胞损伤模型,探讨水翁花对miR-422a表达及神经细胞凋亡的影响,分析其可能作用机制,旨在为临床治疗退行性神经系统病变提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PC12细胞购自上海中国科学院上海生化细胞所。水翁花购自安徽广印堂中药股份有限公司,经实验室鉴定为桃金娘科植物水翁的干燥花蕾。RPMI 1640培养基与胎牛血清均购自美国Gibco公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司;30%过氧化氢(H_2O_2)购自天津富宇试剂有限公司;PBS购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗鼠Bcl-2、Bax多克隆抗体均购自美国Sigma公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;miR-422a mimics及阴性对照(miR-NC)、miR-422a抑制物(anti-miR-422a)及阴性对照(anti-miR-NC)均购自上海吉玛制药技术有限公司;Trizol、逆转录及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒均购自日本TaKaRa公司;超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;Lipofectamine2000购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 药物处理与实验分组

用不同浓度(100、200、300 nmol/L)的 H_2O_2 处理PC12细胞,通过检测PC12细胞凋亡率筛选适宜浓度构建 H_2O_2 模型。实验分组:PC12组(正常

对照组)、 H_2O_2 模型组(300 nmol/L)、水翁花干预组(10、20、40、60 mg/L),PC12细胞培养于含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,放入37℃、体积分数5% CO_2 培养箱内培养24 h,除PC12组、 H_2O_2 模型组外,其余各组加入相应药物浓度处理12 h,除PC12组外,其余各组加入相同浓度的 H_2O_2 处理12 h。后续实验中又将 H_2O_2 模型组PC12细胞分为miR-NC组(转染miR-422a mimics阴性对照培养12 h)、miR-422a组(转染miR-422a mimics培养12 h)、水翁花40 mg/L+anti-miR-NC组(转染阴性对照后使用浓度为40 mg/L的水翁花处理12 h)、水翁花40 mg/L+anti-miR-422a组(转染miR-422a抑制物后使用浓度为40 mg/L的水翁花处理12 h),收集各组转染成功的细胞,使用浓度为300 nmol/L的 H_2O_2 处理12 h。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

弃旧培养基,用2 mL预冷PBS洗涤各组对数生长期PC12细胞,胰蛋白酶消化细胞,收集细胞置于无菌无酶的EP管内,4℃条件下,1 000 r/min转速离心5 min,弃上清,加入1 mL生理盐水制备细胞悬液,4℃条件下,1 000 r/min转速离心5 min,加入缓冲液,加入5 μ L Annexin V-FITC,室温避光孵育10 min,加入5 μ L PI,室温避光染色5 min,于1 h内上机,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.3 检测SOD活性

收集各组细胞,4℃条件下,1 000 r/min转速离心5 min,用PBS洗涤3次,加入预冷细胞裂解液,冰上裂解10 min,4℃条件下,12 000 r/min转速离心5 min,吸取上清,按照试剂盒说明书检测细胞SOD活性,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blot)检测Bcl-2、Bax蛋白表达

取对数生长期PC12细胞,加入预冷细胞裂解液,冰上裂解30 min,4℃条件下,12 000 r/min转速离心10 min,吸取上清(细胞总蛋白),采用BCA法检测蛋白浓度,高温条件下使蛋白变性,取20 μ g蛋白样品上样,经12% SDS-PAGE电泳分离蛋白,电泳结束后将分离蛋白凝胶转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入相关一抗(稀释比1:1 000)于4℃封闭24 h, TBST洗膜,再加入二抗(稀释比1:5 000)封闭1 h,加

入ECL发光显影,置于凝胶成像系统曝光成像,采用Quantityone软件检测条带灰度值,蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参照条带灰度值。

1.2.5 qRT-PCR检测细胞中miR-422a表达水平

采用Trizol法提取PC12细胞总RNA,应用紫外分光光度计测定RNA浓度,按照逆转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,严格按照qRT-PCR检测试剂盒说明书配反应体系,反应体系:SYBR Premix Ex Taq II (2×)10 μL,cDNA 2 μL,上下游引物各 0.8 μL,ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL,ddH₂O 6 μL。反应条件:95℃预变性 5 min 循环 1 次,95℃变性 15 qs,60℃退火 60 s,72℃延伸 30 s,共循环 40 次,放入ABI 7500 实时荧光定量PCR仪检测miR-422a相对表达量。

1.3 统计学处理

应用SPSS 21.0统计学软件分析数据,计量资料均符合正态分布,数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05为差异具有统计学意义。

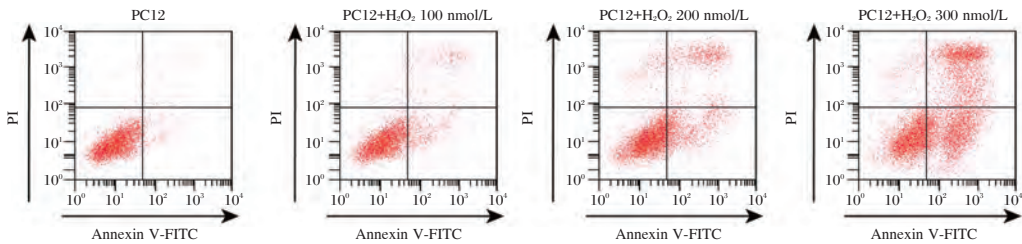


图1 不同浓度的H₂O₂对神经细胞PC12凋亡的影响

Figure1 Effects of different concentrations of hydrogen peroxide on apoptosis of PC12 neurons

2.2 水翁花对H₂O₂诱导的神经细胞PC12凋亡及SOD表达的影响

用不同浓度的水翁花处理PC12细胞后使用H₂O₂(300 nmol/L)干预细胞,结果显示,与对照组相比,PC12细胞凋亡率显著降低(P<0.05),SOD活性显著增强(P<0.05),Bcl-2蛋白表达量显著升高(P<0.05),而Bax蛋白表达量显著降低(P<0.05),且随着使用剂量的增加而变化(P<0.05),呈剂量效应,见图2、表2。表明水翁花可抑制H₂O₂诱导的神经细胞PC12凋亡,并可减轻氧化应激反应程度。选用水翁花(40 mg/L)进行后续实验。

2.3 水翁花对H₂O₂诱导的神经细胞PC12中miR-422a表达的影响

qRT-PCR检测结果显示,与PC12组相比,

2 结果

2.1 H₂O₂诱导神经细胞PC12损伤

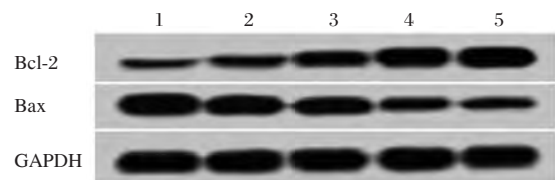
与PC12组相比,PC12+H₂O₂ 100 nmol/L组、PC12+H₂O₂ 200 nmol/L组、PC12+H₂O₂ 300 nmol/L组PC12细胞凋亡率显著升高(P<0.05),SOD活性显著降低(P<0.05),差异有统计学意义,见表1、图1。由于PC12+H₂O₂ 300 nmol/L组PC12细胞凋亡率较高,因此选取选用H₂O₂ 300 nmol/L构建损伤模型,用于后续实验研究。

表1 H₂O₂诱导神经细胞PC12损伤($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Hydrogen peroxide induces PC12 damage in neurons ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	SOD(U/mL)	凋亡率(%)
PC12	17.72±1.68	7.58±0.52
PC12+H ₂ O ₂ 100 nmol/L	14.95±1.34 ^a	11.23±1.20 ^a
PC12+H ₂ O ₂ 200 nmol/L	10.02±1.00 ^a	17.21±1.76 ^a
PC12+ H ₂ O ₂ 300 nmol/L	6.72±0.58 ^a	55.78±4.33 ^a
F值	97.706	504.091
P值	0.000	0.000

与PC12组比较,^aP<0.05。



1. 对照; 2. 水翁花 10 mg/L; 3. 水翁花 20 mg/L; 4. 水翁花 40 mg/L; 5. 水翁花 60 mg/L。

图2 水翁花对H₂O₂诱导的神经细胞PC12凋亡蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of Pulsatilla chinensis on apoptotic protein expression of PC12 induced by hydrogen peroxide in nerve cells

PC12+H₂O₂ 300 nmol/L组PC12细胞中miR-422a的表达水平显著降低(P<0.05);相对于PC12+H₂O₂ 300 nmol/L组,PC12+H₂O₂ 300 nmol/L+水翁

表2 水翁花对H₂O₂诱导的神经细胞PC12凋亡及SOD表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of Herba Anemoniae on Apoptosis and SOD Expression of PC12 Neurons Induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组 (mg/L)	SOD (U/mL)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	凋亡率 (%)
对照	6.71±0.54	0.26±0.03	1.23±0.12	52.58±4.52
水翁花 10	9.66±0.84 ^a	0.45±0.04 ^a	0.94±0.09 ^a	33.93±3.24 ^a
水翁花 20	12.01±1.12 ^{ab}	0.58±0.06 ^{ab}	0.71±0.07 ^{ab}	24.81±2.56 ^{ab}
水翁花 40	15.62±1.37 ^{abc}	0.76±0.08 ^{abc}	0.43±0.04 ^{abc}	12.26±1.13 ^{abc}
水翁花 60	16.23±1.41 ^{abc}	0.82±0.08 ^{abc}	0.37±0.04 ^{abc}	10.25±1.01 ^{abc}
F 值	79.023	82.984	125.961	227.141
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与水翁花 10 mg/L 组比较, ^b*P*<0.05; 与水翁花 20 mg/L 组比较, ^c*P*<0.05。

花 40 mg/L 组 PC12 细胞中 miR-422a 的表达水平显著升高 (*P*<0.05), 见表 3。

表3 水翁花对H₂O₂诱导的神经细胞PC12中miR-422a表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 The effect of Herba Pulsatillae on the expression of microRNA-422a in neuron PC12 induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	miR-422a
PC12	1.12±0.11
PC12+H ₂ O ₂ 300 nmol/L	0.12±0.01 ^a
PC12+H ₂ O ₂ 300 nmol/L+水翁花 40 mg/L	0.83±0.08 ^b
F 值	256.161
P 值	0.000

2.4 过表达 miR-422a 对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡及 SOD 活性的影响

结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-422a 组 PC12 细胞凋亡率显著降低 (*P*<0.05), SOD 活性显著降低 (*P*<0.05), Bcl-2 蛋白表达量显著增加 (*P*<0.05), 而 Bax 蛋白表达量显著降低 (*P*<0.05), 见图 3、表 4。

2.5 抑制 miR-422a 表达能逆转水翁花对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡、SOD 活性的影响

相对于水翁花 40 mg/L+ anti-miR-NC 组, 水翁花 40 mg/L+ anti-miR-422a 组 PC12 细胞凋亡率显著升高 (*P*<0.05), SOD 活性与 Bcl-2 蛋白表达量均显著降低 (*P*<0.05), Bax 蛋白表达量显著升高 (*P*<0.05), 见图 4、表 5。表明抑制 miR-422a 表达可逆转水翁花对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡、SOD 活性的影响。

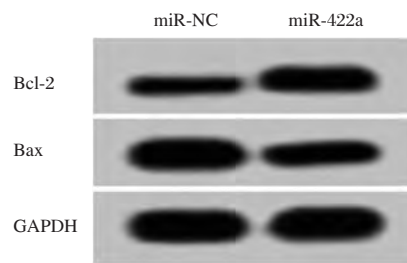


图3 过表达 miR-422a 对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡蛋白表达的影响

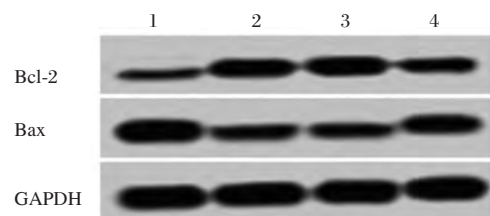
Figure 3 Effects of overexpression of microRNA-422a on apoptotic protein expression of PC12 induced by hydrogen peroxide in nerve cells

表4 过表达 miR-422a 对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡及 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of over-expression of microRNA-422a in on apoptosis and SOD activity of PC12 neurons induced by hydrogen peroxide ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	SOD (U/mL)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	凋亡率 (%)
miR-NC	6.71±0.54	0.26±0.03	1.23±0.12	52.58±4.52
miR-422a	14.37±1.28 ^a	0.65±0.06 ^a	0.53±0.05 ^a	19.71±1.58 ^a
t 值	13.506	14.241	13.190	16.815
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

与 miR-NC 组比较, ^a*P*<0.05。



1. 对照; 2. 水翁花 40 mg/L; 3. 水翁花 40 mg/L+anti-miR-NC; 4. 水翁花 40 mg/L+anti-miR-422a。

图4 抑制 miR-422a 表达能逆转水翁花对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡蛋白表达的影响

Figure 4 Inhibiting the expression of miR-422a reverses the effect of Saussurea chinensis on apoptotic protein expression of PC12 induced by hydrogen peroxide in nerve cells

3 讨论

PC12 细胞源自大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤, 其结构、功能及形态均与神经细胞相似可被用于神经药理学方面的研究, H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤是氧化应激损伤的经典模型, 研究表明活性氧介导的氧化应激损伤在神经退行性疾病中发挥重要作用

表5 抑制 miR-422a 表达能逆转水翁花对 H₂O₂ 诱导的神经细胞 PC12 凋亡、SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
 Table 5 Inhibits the expression of microRNA-422a and reverses the effects of Saussurea chinensis on apoptosis and SOD activity of PC12 neurons induced by hydrogen peroxide ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	miR-422a	SOD(U/mL)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	凋亡率(%)
对照	0.12±0.01	6.71±0.54	0.26±0.03	1.23±0.12	52.58±4.52
水翁花 40 mg/L	0.83±0.08 ^a	15.62±1.37 ^a	0.76±0.08 ^a	0.43±0.04 ^a	12.26±1.13 ^a
水翁花 40 mg/L+anti-miR-NC	0.84±0.08	15.84±1.41	0.75±0.07	0.42±0.04	12.19±1.16
水翁花 40 mg/L+anti-miR-422a	0.57±0.06 ^b	9.67±0.99 ^b	0.48±0.05 ^b	0.89±0.09 ^b	22.82±2.22 ^b
F 值	165.527	95.402	93.864	143.525	312.153
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,^aP<0.05;与水翁花 40 mg/L+ anti-miR-NC 组比较,^bP<0.05。

用,而机体内代谢产生的 H₂O₂ 相当于活性氧,可加重机体氧化应激损伤^[6-7]。天然生产药物对清除自由基活性及保护细胞免受氧化损伤已成为研究热点^[8]。因此,本研究拟寻找减轻神经细胞氧化损伤的药物,并探究其可能作用机制。

水翁花属于广东地产药材,具有解暑、清热解毒、抗炎、镇痛等功效^[9]。研究表明水翁花提取物可抑制脂肪酶等生成,还具有抗高血压、白内障、神经细胞氧化损伤等多种功能^[10-11]。本研究采用不同浓度的 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞,结果发现 H₂O₂ 300 nmol/L 时细胞凋亡率较高,因而选取 H₂O₂ 300 nmol/L 构建神经细胞损伤模型。用不同浓度的水翁花处理 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞,结果发现细胞凋亡率降低,Bcl-2 表达下调,而 Bax 表达上调,H₂O₂ 可破坏细胞或线粒体膜性结构而促进细胞凋亡,而线粒体在细胞凋亡过程中发挥重要作用,研究表明 Bcl-2 可抑制凋亡蛋白参与凋亡途径,Bcl-2/Bax 比值降低细胞趋向凋亡^[12-13]。本研究结果提示水翁花可通过降低 Bax 表达表达及升高 Bcl-2 表达而抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡。SOD 属于机体内自由基清除系统,其可清除机体氧化应激产生的 MDA 等过氧化物^[14]。本研究结果表明 H₂O₂ 可降低自由基清除系统的活力而诱导细胞凋亡,水翁花可增强 SOD 活性,抑制神经细胞凋亡从而发挥抗细胞凋亡作用。

miR-422a 是脑组织中特异性 miRNA,其可作为缺血性脑卒中、动脉粥样硬化等疾病的诊断标志物,还可通过调控细胞凋亡而参与该疾病发生及发展过程^[15-16]。本研究结果表明 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞中 miR-422a 表达水平降低,而水翁花可上调 miR-422a 表达,进一步研究显示上调 miR-422a 表达对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡具有抑制作用,并可增强 SOD 活性。同时本研究结果表明抑

制 miR-422a 表达可逆转水翁花对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡及 SOD 活性的作用。提示水翁花对神经细胞具有积极调控作用,并可抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡,其可能通过上调 miR-422a 表达而发挥作用。

综上所述,水翁花可通过上调 miR-422a 表达而减轻 H₂O₂ 诱导的神经细胞凋亡,并增强机体抗氧化能力,为临床进一步应用水翁花防治氧化应激导致的神经系统退行性疾病提供理论依据。但关于 miR-422a 下游靶基因及其相关信号通路的关系仍需深入研究。

参考文献

- [1] 范焯,杨亚超,许凡宇,等.一种基于 MRI 数据库的阿尔茨海默病进程数理模型预测方法[J].中华生物医学工程杂志,2016,22(2):101-107.
- [2] 傅贻,肖世富.氧化应激与阿尔茨海默病的神经病理机制研究进展[J].中华临床医师杂志(电子版),2010,4(9):1646-1648.
- [3] 胡涛,刘晓岩,郭宏宝,等.三种中药活性部位对 H₂O₂ 致 PC12 细胞损伤保护作用的比较研究[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(1):53-58.
- [4] 卢艳花,杜长斌,吴子斌,等.水翁花对神经细胞氧化损伤保护作用的量效值[J].中国临床康复,2005,9(41):171-173.
- [5] 刘松.过氧化氢诱导 PC12 细胞凋亡中 miR-422a 作用机制初探[D].中山大学,2008:1-44.
- [6] 张秋芳,汪选斌,戢艳琼,等.二氢石蒜碱对过氧化氢损伤的 PC12 细胞的保护作用[J].中国新药杂志,2012,21(11):1288-1291.
- [7] Friedlander RM. Mechanisms of disease: Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases [J]. New Engl J Med, 2003, 348(14):1365-1375.

血浆 miR-192、miR-29c 水平对 2 型糖尿病肾病诊断的临床意义

何爽 黄萍 范明娟*

[摘要] 目的 探讨血浆微小 RNA-192(miR-192)与微小 RNA-29c(miR-29c)联合检测对 2 型糖尿病肾病的诊断价值。方法 选取 2017 年 12 月至 2018 年 12 月本院收治的 166 例 2 型糖尿病患者为研究对象,分为糖尿病无肾损害组(DM 组)与糖尿病肾病组(DN 组),同时以同时期本院健康体检健康人群 60 例为正常对照组(NC 组)。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组血浆 miR-192、miR-29c 的表达水平;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)水平;采用 Pearson 法分析 DN 患者血浆 miR-192、miR-29c 与 NGAL 的相关性;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析血浆 miR-192、miR-29c 表达对 DN 的诊断价值;分析血浆 miR-192、miR-29c 联合诊断 DN 的诊断效能。结果 与 NC 组比较,DM 组与 DN 组患者尿 NGAL 水平、miR-29c 的表达水平显著升高($P<0.05$),DN 组显著高于 DM 组($P<0.05$);与 NC 组相比,DM 组与 DN 组患者血浆 miR-192 的表达水平均显著降低($P<0.05$),DN 组显著低于 DM 组($P<0.05$);miR-192 与尿 NGAL 呈负相关($r=-0.338, P=0.002$),miR-29c 与尿 NGAL 呈正相关($r=0.516, P<0.001$);miR-192 诊断 DN 的灵敏度 52.50%,特异度 75.58%;miR-29c 诊断 DN 的灵敏度 50.00%,特异度 86.05%;联合诊断灵敏度 97.50%,特异度 95.34%,准确度为 96.39%;联合检测时灵敏度与准确度均高于单项检测($P<0.05$)。结论 血浆 miR-192、miR-29c 表达异常与 2 型糖尿病肾病发生发展密切相关,二者联合检测可提高 2 型糖尿病肾病诊断效能。

[关键词] miR-192; miR-29c; 2 型糖尿病肾病

The clinical significance of plasma mir-192 and mir-29c levels in diagnosis of type 2 diabetic nephropathy

HE Shuang, HUANG Ping, FAN Mingjuan*

(Geriatrics department of guangzhou first people's hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510000)

[ABSTRACT] Objective To explore the diagnostic value of combined detection of plasma microRNA-192 (miR-192) and microRNA-29c (miR-29c) in type 2 diabetic nephropathy. Methods 166 patients with type 2 diabetes admitted to our hospital from December 2017 to December 2018 were enrolled. According to the clinical diagnostic criteria of diabetic nephropathy, they were divided into renal damage (DM) group and diabetic nephropathy group (DN group). At the same time, 60 healthy people were taken as the normal control group (NC group). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of miR-192 and miR-29c in plasma. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The correlation between plasma miR-192, miR-29c and NGAL in DN patients was analyzed by Pearson method. The diagnostic value of plasma miR-192 and miR-29c expression on DN was analyzed by receiver operating characteristic curve (ROC). The diagnostic efficacy of plasma miR-192 and miR-29c combined with diagnosis of DN was analyzed by clinical pathological diagnosis. Results Compared with the NC group, the expression levels of urinary NGAL and miR-29c in the DM group and the DN group increased significantly ($P<0.05$), and the DN group was significantly higher than the DM group ($P<0.05$). Compared with the NC group, the expression levels of plasma miR-192 in the DM group and the DN group were significantly lower ($P<0.05$), and the DN group was significantly lower than the DM group ($P<0.05$). miR-192 was negatively correlated

作者单位:广州市第一人民医院老年病科,广东,广州 510000

*通信作者:范明娟, E-mail:3286084848@qq.com

with urinary NGAL ($r=-0.338$, $P=0.002$), and miR-29c was positively correlated with urinary NGAL ($r=0.516$, $P<0.001$). The sensitivity of miR-192 for diagnosis of DN was 52.50% and the specificity was 75.58%. The sensitivity of miR-29c for diagnosis of DN was 50.00% and the specificity was 86.05%. The combined diagnostic sensitivity was 97.50%, the specificity was 95.34%, and the accuracy was 96.39%. The sensitivity and accuracy of the joint detection were higher than the single test ($P<0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of miR-192 and miR-29c in plasma is closely related to the occurrence and development of type 2 diabetic nephropathy. The combined detection of the two can improve the diagnostic efficiency of type 2 diabetic nephropathy.

[KEY WORDS] miR-192; miR-29c; type 2 diabetic nephropathy

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是临床常见疾病,其中2型糖尿病是主要病理类型,而糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是2型糖尿病的主要并发症之一, DN早期症状较为隐匿,目前尚缺乏有效诊断指标^[1-3]。因而积极寻找分子标志物对2型糖尿病肾病的诊断及改善患者预后具有重要临床意义。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性非编码小RNA分子,并可通过调控下游靶基因表达而参与多种生理病理过程,研究表明部分miRNA异常表达与2型糖尿病肾病发生过程密切相关,并可能作为诊断早期糖尿病肾病的分子标志物^[4]。但miRNA诊断2型糖尿病肾病存在一定假阳性或假阴性,因而需积极探寻miRNA分子并分析其对2型糖尿病肾病的诊断价值。相关报道指出微小RNA-192(microRNA-192, miR-192)在DN患者血清中呈低表达,并可能调控DN发生发展过程^[5]。研究表明微小RNA-29c(microRNA-29c, miR-29c)可通过调控靶基因Sprouty homolog 1表达而促进糖尿病肾病发展,抑制miR-29c的表达可减缓糖尿病肾病的进展^[6]。但miR-192与miR-29c对2型糖尿病肾病的诊断价值尚未可知。尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL)可参与多种肾脏疾病的发生及发展过程,并可作为反映急性肾损伤的重要指标^[7-8]。本研究主要探讨血浆miR-192、miR-29c与NGAL的相关性,分析血浆miR-192与miR-29c联合检测对2型糖尿病肾病的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2017年12月至2018年12月本院收治的166例2型糖尿病患者为研究对象,所有患者均符合糖尿病诊断标准^[9]。II型糖尿病患者符合下列任何一项者:①大量白蛋白尿;②糖尿病视网膜病变伴

微量蛋白尿即诊断为II型糖尿病肾病^[10]。其中DM组患者尿微量清蛋白/Crea低于30 mg/gCrea, DN组患者尿微量清蛋白/Crea处于30~300 mg/gCrea之间^[11]。同时以本院同时期健康体检人群60例为NC组。DM组患者年龄为68~75岁,平均年龄为(71.35±6.13)岁;DN组患者年龄为62~76岁,平均年龄为(72.35±4.49)岁;正常组年龄为66~76岁,平均年龄为(70.32±5.31)岁。所有患者知情且签署同意书。排除标准:合并内分泌、心血管等疾病患者;原发性肾病、肾动脉狭窄等疾病患者;心脏与肝脏等全身疾病引发的肾脏疾病患者。各组研究对象年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 采集样本

所有研究对象均于入组后空腹12 h,取清晨静脉血5 mL置于EDTA抗凝管,4℃条件下,2 500 r/min转速离心10 min,分离血浆,吸取血浆置于1.5 mL EP管内,置于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2.2 主要试剂与仪器

miRNAacute miRNA提取分离试剂盒、miRNAacute miRNA cDNA第一链合成试剂盒、荧光定量检测试剂盒均购自广州真知生物有限公司;尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL)检测试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司。ABI 7500型荧光定量PCR仪购自北京拓普塞斯生物技术有限公司。

1.2.3 时荧光定量聚合酶链反应(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测血浆miR-192、miR-29c的表达水平

采用miRNAacute miRNA提取分离试剂盒分离并提取RNA,按照miRNAacute miRNA cDNA第一链合成试剂盒进行反转录合成cDNA,参照荧光定量检测试剂盒进行荧光定量检测,其中U6为内参,正向引物为5'-ATTGGAACGATACAGAGAA-

GATT-3', 反向引物为: 5'-GGAACGCTTCAC-GAATTTG-3'; miR-192 正向引物为 5'-GGGGCT-GACCTATGAATTGA-3', 反向引物为: 5'-CAGTG-CAGGGTCCGAGGT-3'; miR-29c 正向引物为 5'-GTAGCACCATTTTGAATCAG-3', 反向引物为: 5'-TTGGCACTAGCACATT-3'。反应体系: cDNA 2.0 μ L, Primer 1.0 μ L, RNase H₂O 7 μ L, SYBR Primix Ex Taq™ 10 μ L。反应条件: 95℃预变性 2 min, 95℃变性 15 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共循环 40 次。采用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法计算 miR-192、miR-29c 的相对表达量。

1.2.4 临床指标

所有研究对象均留取清晨中段尿 5 mL, 室温条件下, 3 000 r/min 转速离心 10 min, 吸取上清置于 EP 管内, -80℃条件下冻存。采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 结果判定

根据糖尿病肾病临床诊断标准, 2 型糖尿病患者糖尿病无肾损害组 (DM 组) 86 例与糖尿病肾病

组 (DN 组) 80 例。采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 分析血浆 miR-192、miR-29c 表达对 2 型糖尿病肾病的诊断价值, 根据临床检测结果比较分析血浆 miR-192、miR-29c 诊断 2 型糖尿病肾病的效能分析。

1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 21.0 进行分析, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; Pearson 法进行相关性分析; ROC 分析血浆 miR-192、miR-29c 表达对 2 型糖尿病肾病的诊断价值; 计数资料采用 χ^2 检验, 各组数据均以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料比较

与正常组比较, DM 组与 DN 组患者空腹血糖均显著升高 ($P<0.05$), DN 组显著高于 DM 组 ($P<0.05$); 相较于正常组, DM 组与 DN 组患者尿 NGAL 均显著升高 ($P<0.05$), DN 组显著高于 DM 组 ($P<0.05$), 而各组研究对象性别、年龄、体质指数等比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 各组一般资料比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of general data of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	男/女	年龄(岁)	空腹血糖(mmol/L)	尿 NGAL(μ g/L)	体质指数(kg/m ²)
NC 组	60	38/22	61.32 \pm 8.31	4.32 \pm 0.32	8.31 \pm 1.21	26.58 \pm 3.25
DM 组	86	53/33	61.35 \pm 8.13	7.96 \pm 1.59*	16.58 \pm 3.12*	26.45 \pm 3.21
DN 组	80	50/30	62.35 \pm 6.49	8.52 \pm 1.52**	39.57 \pm 6.58**	26.47 \pm 3.35
<i>F</i> / χ^2		0.044	0.454	49.238	988.014	0.031
<i>P</i> 值		0.978	0.636	0.000	0.000	0.970

与 NC 组相比, * $P<0.05$; 与 DM 组相比, ** $P<0.05$ 。

2.2 各组血浆 miR-192、miR-29c 表达水平比较

与 NC 组相比, DM 组与 DN 组患者血浆 miR-192 的表达水平均显著降低 ($P<0.05$), DN 组显著低于 DM 组 ($P<0.05$); 相对于 NC 组, DM 组与 DN 组患者血浆 miR-29c 的表达水平显著升高 ($P<0.05$), DN 组显著高于 DM 组 ($P<0.05$), 见表 2。

2.3 血浆 miR-192、miR-29c 表达与 DN 患者 NGAL 的相关性分析

采用 Pearson 法分析 DN 患者血浆 miR-192、miR-29c 表达水平与尿 NGAL 的相关性, 结果显示, miR-192 与尿 NGAL 呈负相关 ($r=-0.338, P=0.002$), miR-29c 与尿 NGAL 呈正相关 ($r=0.516, P=0.000$), 见图 1。

表 2 各组血浆 miR-192、miR-29c 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of plasma miR-192 and miR-29c expression levels in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-192	miR-29c
NC 组	60	1.00 \pm 0.09	1.01 \pm 0.13
DM 组	86	0.62 \pm 0.15*	2.16 \pm 0.24*
DN 组	80	0.31 \pm 0.02**	3.22 \pm 0.57**
<i>F</i> 值		751.971	597.004
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.4 血浆 miR-192、miR-29c 对 2 型糖尿病肾病的诊断价值

ROC 分析血浆 miR-192 对 II 型糖尿病肾病的

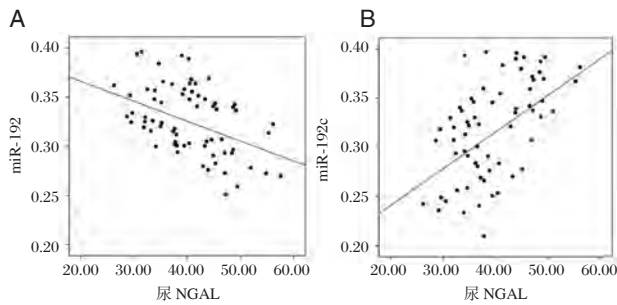


图1 血浆 miR-192、miR-29c 表达与 DN 患者 NGAL 的相关性分析

Figure 1 Correlation analysis between plasma miR-192 and miR-29c expression and NGAL in patients with DN

诊断价值,结果显示 miR-192 诊断 2 型糖尿病肾病的灵敏度为 52.50%, 特异度为 75.58%, AUC 为 0.679, 95% CI: 0.602~0.749, 截断值为 0.40, 见图 2A。ROC 分析血浆 miR-29c 对 II 型糖尿病肾病的诊断价值,结果显示 miR-29c 诊断 2 型糖尿病肾病的灵敏度为 50.00%, 特异度为 86.05%, AUC 为 0.796, 95% CI: 0.726~0.854, 截断值为 2.94, 见图 2B。

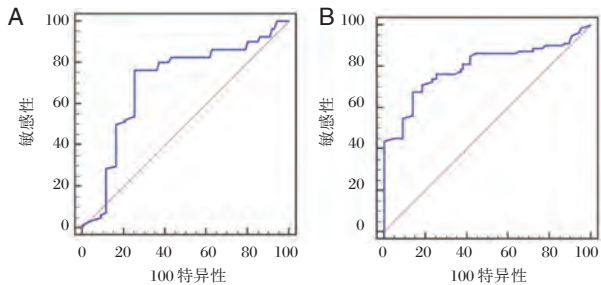


图2 ROC 分析血浆 miR-192、miR-29c 对 II 型糖尿病肾病的诊断价值

Figure 2 ROC analysis of the value of plasma miR-192 and miR-29c in the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy

2.5 联合检测对 2 型糖尿病肾病的诊断价值

联合检测时,诊断灵敏度为 97.50%, 特异度为 95.34%, 准确度为 96.39%, 见表 3。miR-29c 对 2 型糖尿病肾病的诊断特异度高于 miR-192, 联合检测时灵敏度与准确度均高于单项检测 ($P < 0.05$), 见表 3、表 4。

3 讨论

2 型糖尿病是一种内分泌代谢性疾病, 机体长时间处于高血糖状态可促进内皮细胞释放内皮血管活性物质从而促使肾小球硬化导致糖尿病肾病的发生^[12]。糖尿病肾病是糖尿病微血管并发症, 临床主要通过检测微量尿蛋白诊断糖尿病肾病, 由于微量

表 3 miR-29c 和 miR-192 联合检测对 II 型糖尿病肾病的诊断价值

Table 3 Diagnostic value of combined detection of miR-29c and miR-192 in type 2 diabetic nephropathy

临床标准	阳性	阴性	合计
阳性	78	2	80
阴性	4	82	86
	82	84	166

表 4 miR-29c 和 miR-192 联合检测与单项检测对 II 型糖尿病肾病的诊断价值分析

Table 4 Diagnostic value of combined detection and single detection of miR-29c and miR-192 in type 2 diabetic nephropathy

	灵敏度	特异度	准确度
miR-192	52.50% (42/80)*	75.58% (65/86)	64.46% (107/166)*
miR-29c	50.00% (40/80)*	86.05% (74/86)	72.29% (114/166)*
联合检测	97.50% (78/80)	95.34% (82/86)	96.39% (160/166)
χ^2 值	9.578	1.064	7.070
P 值	0.008	0.587	0.029

与 NC 组相比, * $P < 0.05$; 与 DM 组相比, # $P < 0.05$ 。

尿蛋白受多种因素的影响导致其对肾损伤程度的诊断缺乏特异性^[13]。因而寻找敏感、特异且无创性的指标诊断 2 型糖尿病肾病具有重要意义。研究表明 miRNA 在糖尿病患者血清中异常表达并可能作为诊断糖尿病肾病的有效指标^[14]。因此本研究积极探索与 2 型糖尿病肾病发生发展相关的 miRNA, 进一步分析其对 2 型糖尿病肾病的诊断价值。

miR-192 在成人心脏手术后急性肾损伤血浆中的表达水平异常, 并可作为急性肾损伤的早期诊断标志物^[15]。miR-192 在 2 型糖尿病肾病患者中的表达水平降低且伴随尿白蛋白肌酐比值 (UACR) 的降低, miR-192 低表达与肾脏纤维化密切相关^[16]。研究表明 miR-192 通过靶向早期生长反应因子 1 (Egr1) 的表达影响 DN 的进展^[17]。本研究结果显示 2 型糖尿病肾病患者血浆中 miR-192 的表达水平显著降低, 提示 miR-192 表达下调可能参与 2 型糖尿病肾病发生发展过程。本研究结果显示 2 型糖尿病患者尿 NGAL 水平显著高于正常组, 而 2 型糖尿病肾病患者尿 NGAL 水平显著高于 DM 组, 进一步分析发现 2 型糖尿病肾病患者中 miR-192 表达与尿 NGAL 水平呈负相关, 说明 NGAL 可反应 2 型糖尿病肾病患者肾功能损伤状况, 肾小管损害可引起血浆 miR-192 的低表达。提示 miR-192 表达下调可能促进疾病进展并损害肾小球及内皮细胞功能。沉默 miR-29c 可能通过

AMPK / mTOR 信号抑制糖尿病肾病肾纤维化,并可能作为治疗糖尿病肾病肾纤维化的有效靶点^[18]。miR-29c 在狼疮性肾炎患者中呈高表达,还可作为狼疮性肾炎早期肾纤维化的预测因子^[19]。研究表明 miR-29c 还可作为诊断 HTLV-1 感染的新型潜在生物标志物^[20]。本研究结果显示 2 型糖尿病患者血浆中 miR-29c 的表达水平显著升高,且 DN 组显著高于 DM 组,提示随着 miR-29c 表达水平的升高可促进 2 型糖尿病肾病的发生及发展。

基于以上研究结果,本研究结果显示 2 型糖尿病肾病肾病患者中 miR-29c 与 NGAL 水平呈正相关,提示 miR-29c 与 NGAL 在 2 型糖尿病肾病发生发展过程中可能存在一定正向调控作用。目前关于 miRNA 与 2 型糖尿病肾病诊断的研究较多,但关于 miR-29c、miR-192 联合检测对 2 型糖尿病肾病的诊断价值尚未见报道,本研究采用 ROC 分析血浆 miR-192、miR-29c 表达对 2 型糖尿病肾病的诊断价值,结果显示 miR-192 对 2 型糖尿病肾病的诊断灵敏度与特异度较低,而 miR-29c 对 2 型糖尿病肾病的诊断灵敏度与特异度高于 miR-192,进一步采用联合检测,结果显示联合检测显著高于单项检测。提示联合血浆 miR-192、miR-29c 表达水平检测可显著提高 2 型糖尿病肾病的诊断效率及准确率。

综上所述,血浆 miR-192、miR-29c 联合检测 2 型糖尿病肾病具有较高的诊断效能,可能成为 2 型糖尿病肾病的诊断指标。但血浆 miR-192、miR-29c 与微量尿蛋白指标的比较仍需进一步研究,关于 miR-192、miR-29c 与 NGAL 在 2 型糖尿病肾病发生发展过程中的作用机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] 王欣,徐焱成. 2 型糖尿病及糖尿病前期患者脂联素基因启动子甲基化的研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2017, 23(1):11-14.
- [2] 张华贞,赵晓琴,吴琼皎. 厄贝沙坦与前列地尔联用治疗糖尿病肾病的可行性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):60-63.
- [3] 王凌旭. 血浆胱抑素 C 水平对糖尿病肾病早期诊断的临床意义[J]. 医学信息, 2016, 29(9):61-62.
- [4] 王钱虎,陈锂,彭亮. 血清 miRNA-21、Smad1 联合尿 NGAL 检测对早期糖尿病肾病的诊断价值[J]. 浙江实用医学, 2018, 23(5):321-323.
- [5] 李洁,周平,胡秀梅,等. 糖尿病肾病患者血清 miR-192 的表达及其对转化生长因子 β 信号通路的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(5):388-391.
- [6] Long J, Wang Y, Wang W, et al. MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy[J]. J Biol Chem, 2011, 286(13):11837-11848.
- [7] 梁雅灵,杨茂君,李衍辉,等. 尿 L-FABP、KIM-1、NGAL 和血清 cystatin C 在糖尿病肾病中的变化及意义[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2016, 36(2):92-95.
- [8] 施璇,孔建平,涂岩,等. 血清 NGAL 与慢性肾脏病患者肾功能和蛋白尿的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(21):5386-5387.
- [9] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2010年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(1):54-109.
- [10] 中华医学会糖尿病学分会微血管合并症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(11):792-801.
- [11] 苏洋,梅秋雁. 血浆 NGAL、Cys C 和尿 NAG/Crea 联合检测对早期糖尿病肾病诊断价值的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1):99-105.
- [12] 赵元明,李新建,马生聘,等. 联合检测尿中 NGAL、mAlb、 α 1-MG 在糖尿病肾病中的早期诊断价值[J]. 中华全科医学, 2015, 13(10):1678-1680.
- [13] 董喜环. 血清 NGAL、CysC、RBP 及 MMP-2 联合检测对糖尿病肾病的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(14):1965-1967.
- [14] 曾健英,何凤,童俊容,等. 三种血清微小 RNA 的检测在糖尿病肾病诊断中的价值评估[J]. 新医学, 2012, 43(8):531-533.
- [15] 徐源,张路路,严玉澄. 循环 miR-192 对心脏手术后急性肾损伤的早期诊断作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(6):824-828.
- [16] Ma X, Lu C, Lv C, et al. The Expression of miR-192 and Its Significance in Diabetic Nephropathy Patients with Different Urine Albumin Creatinine Ratio[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016(1):1-6.
- [17] Liu F, Zhang ZP, Xin GD, et al. miR-192 prevents renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy by targeting Egr1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(13):4252-4260.
- [18] Shao H, Huang Y, Hu HL, et al. Effect of miR-29c on renal fibrosis in diabetic rats via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14):6250-6256.
- [19] Solé C, Cortés-Hernández J, Felip ML, et al. miR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(9):1488-1496.
- [20] Fayyad-Kazan M, ElDirani R, Hamade E, et al. Circulating miR-29c, miR-30c, miR-193a-5p and miR-885-5p: Novel potential biomarkers for HTLV-1 infection diagnosis[J]. Infect Genet Evol, 2019, 74(2):103938-103948.

脓毒症患者血清中白细胞介素-6和降钙素原表达及其临床意义

刘蕾蕾 华玮 居培红 张雯艳 黄侃 李铮*

[摘要] 目的 探讨白细胞介素-6(IL-6)、降钙素原(PCT)在脓毒症患者中的表达水平及其临床意义。方法 分析80例脓毒症患者,根据脓毒症分级标准分为普通脓毒症组($n=38$)、严重脓毒症组(不伴休克)($n=22$)、脓毒症休克组($n=20$),并纳入40例无感染者为对照组,比较四组受试者IL-6、PCT水平,ROC分析IL-6、PCT对脓毒症的诊断效能,建立Logistic风险预测模型,分析IL-6、PCT对脓毒症预后的预测价值。结果 普通脓毒症组、严重脓毒症组(不伴休克)、脓毒症休克组血清IL-6、PCT水平与对照组(无感染者)对比均明显升高($P<0.05$);普通脓毒症组、严重脓毒症组(不伴休克)和脓毒症休克组间差异显著($P<0.05$),IL-6、PCT以表达水平高低排序为脓毒症休克组>严重脓毒症组(不伴休克)>普通脓毒症组;ROC分析结果显示IL-6、PCT的AUC分别为0.806(95%CI:0.96~10.61, $P=0.000$),0.892(95%CI:1.28~9.16, $P=0.000$),IL-6、PCT其灵敏度、特异度分别为89.61%、86.76%;90.35%、87.26%;IL-6>56.12 pg/mL、PCT>1.10 ng/mL在脓毒症预后预测模型中OR分别为:9.35(98%CI:1.96~8.92)、12.98(95%CI:0.89~12.39),是预测脓毒症患者不良结局的独立预测因子。结论 IL-6、PCT在脓毒症患者以及不同感染程度脓毒症患者中均有不同程度的表达,可用于脓毒症早期诊断,提示能预测脓毒症患者预后。

[关键词] 脓毒症;白细胞介素-6;降钙素原

Expression of interleukin -6 and procalcitonin in serum of patients with sepsis and its clinical significance

LIU Leilei, HUA Wei, JU Peihong, ZHANG Wenyan, HUANG Kan, LI Zheng*

(Department of emergency Yangpu Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai, China, 200093)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and clinical significance of interleukin-6 (IL-6) and procalcitonin (PCT) in patients with sepsis. Methods According to the criteria of sepsis classification, 80 patients with sepsis was divided into the general sepsis group, the severe sepsis group (without shock), and the septic shock group according to the sepsis grading criteria, and 40 patients with no infection were included as controls group. The levels of IL-6 and PCT in the four groups were compared. ROC was used to analyze the diagnostic efficacy of IL-6 and PCT for sepsis. A Logistic risk prediction model was established to analyze the predictive value of IL-6 and PCT for the prognosis of sepsis. Results Serum IL-6 and PCT levels in the general sepsis group, severe sepsis group (without shock), and septic shock group were significantly higher than control group ($P<0.05$). There were significant differences between the general sepsis group, the severe sepsis group (without shock), and the septic shock group ($P<0.05$). IL-6 and PCT were ranked as sepsis in the three groups. Shock group> severe sepsis group (without shock)> general sepsis group. ROC analysis showed that the AUC of IL-6 and PCT were 0.806 (95%CI: 0.96~10.61, $P=0.000$), 0.892 (95%CI: 1.28~9.16, $P=0.000$). The sensitivity and specificity of IL-6 and PCT were 89.61% and 86.76%; 90.35% and 87.26%. IL-6>56.12 pg/mL, PCT>1.10 ng/mL in the prognosis prediction model of sepsis were: 9.35 (98%CI: 1.96~8.92), 12.98 (95%CI: 0.89~12.39), with independent predictor of adverse outcomes in patients with sepsis. Conclusion The expression of IL-6 and PCT in sepsis patients and sepsis patients with different degrees of infection can be used for early diagnosis of sepsis, suggesting that they can predict the prognosis of sepsis patients.

[KEY WORDS] Sepsis; Interleukin-6; Procalcitonin

基金项目:上海市杨浦中心医院2017年立项(Se1201710)

作者单位:同济大学附属杨浦医院急诊科,上海市200093

*通信作者,李铮, E-mail:779036012@qq.com

脓毒症(Sepsis)是病原体进入血液循环而导致的全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS),被称为“不受控制的感染”,可导致循环衰竭和多脏器功能衰竭。脓毒症在全球发达国家和发展中国家均具有极高的发病率和致死率^[1],相关统计显示^[2]全球罹患脓毒症的人数以2 000~3 000万/年的速度增加,每日约有1 400人死于脓毒症。资料显示每年1%~2%患者因脓毒症住院,其中,ICU脓毒症的患病率达25%,是导致ICU患者死亡的主要原因^[3],且ICU脓毒症患病率逐年升高^[4]。因此,早期诊断脓毒症是降低脓毒症致死率的关键,目前,与脓毒症预后判断的相关生物标记物多达200多种^[5],选择具有高诊断价值的生物标记物是重点。白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)和降钙素原(procalcitonin, PCT)是两种重要炎症分子,其预测价值还尚未完全被确定。本文通过分析不同严重程度脓毒症患者体内IL-6和PCT的表达水平,探究IL-6和PCT在脓毒症早期诊断和预后预测的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

分析2015年6月至2017年6月我院急诊科收治并经血液培养及鉴定确诊的脓毒症患者80例,脓毒症诊断标准参照2012年美国胸科医师协会(ACCP, American College of Chest Physicians)、危重症医学协会(SCCM, Society of Critical Care Medicine)、欧洲重症协会(ESICM, European Society of Intensive Care Medicine)和美国胸科协会(ATS, American Thoracic Society)基于循证医学颁布的诊治指南^[6],患者入院24 h以上,排除免疫性疾病、肿瘤和血液系统疾病患者等。根据感染程度以及有无多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)、循环衰竭分为普通脓毒症组、严重脓毒症组(不伴休克)、脓毒症休克组。普通脓毒症组38例,患者出现SIRS,但不出现MODS及循环衰竭,男18例,女20例,年龄56~89岁,平均(75.51±12.37)岁;严重脓毒症组(不伴休克)22例,患者出现明显SIRS且出现MODS或可纠正的灌注不足,男12例,女10例,年龄59~88岁,平均(74.38±10.64)岁;脓毒症休克组20例,患者出现严重的MODS以及不可逆转的灌注不足,男9例,女11例,年龄66~90岁,平均(76.73±13.65)岁。另选择40例无感

染者作为对照组,男20例,女20例,年龄54~90岁,平均(74.38±10.52)岁,研究组与对照组在性别、年龄方面差异无统计学意义($P>0.05$),但具有可比性。

1.2 方法

IL-6及PCT检测:电化学发光法,试剂均为德国罗氏诊断公司生产,检测仪器为罗氏Cobas E601电化学发光免疫分析仪。

1.4 统计分析

采用SPSS 22.0进行数据录入和分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用one-way ANOVA分析组间差异,两两对比采用SNK-q检验,四格表法计算各检测指标灵敏度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、准确度、Youden指数,ROC工作者特征曲线分析IL-6、PCT对脓毒症患者的诊断效能,Logistic回归分析IL-6、PCT对脓毒症患者预后的预测价值, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组中IL-6、PCT的比较

普通脓毒症组、严重脓毒症组(不伴休克)、脓毒症休克组血清IL-6、PCT水平均较无感染对照组显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。普通脓毒症组、严重脓毒症组(不伴休克)、脓毒症休克组组间差异显著($P<0.05$),IL-6和PCT水平从低到高的顺序分别为普通脓毒症组<严重脓毒症组<脓毒症休克组。见表1。

表1 不同研究组和对照组患者IL-6、PCT水平比较
[$n, (\bar{x}\pm s)$]

Table 1 Comparison of IL-6 and PCT levels in different study groups and control groups [$n, (\bar{x}\pm s)$]

组别	n	PCT (ng/L)	IL-6 (pg/mL)
无感染对照组	40	0.01±0.35	9.163±2.647
普通脓毒症组	38	0.85±0.95*	40.16±16.23*
严重脓毒症组	22	2.28±2.74**	98.62±36.49**
脓毒症休克组	20	4.267±3.769**△	106.294±42.135**△

*: vs 无感染对照组, $P<0.05$; #: vs 普通脓毒症组, $P<0.05$; △: vs 严重脓毒症组, $P<0.05$ 。

2.2 IL-6、PCT对脓毒症的诊断价值分析

根据脓毒症确诊标准,分析IL-6、PCT诊断脓毒症的效能,IL-6、PCT的AUC分别为0.806和0.892,IL-6和PCT诊断脓毒症的灵敏度、特异度、阳性似然比、准确度、Youden指数具体结果,见表2、图1。

表2 IL-6、PCT对脓毒症的诊断价值分析 (ng/mL,%)

Tab. 2 Analysis of the diagnostic value of IL-6 and PCT for sepsis (ng/mL,%)

检测指标	灵敏度	特异度	阳性似然比	阴性似然比	Youden	准确度	AUC	截断值
PCT	90.35	87.26	6.38	0.16	72.68	94.26	0.892	1.110
IL-6	89.61	86.76	5.12	0.29	69.21	92.37	0.806	56.127

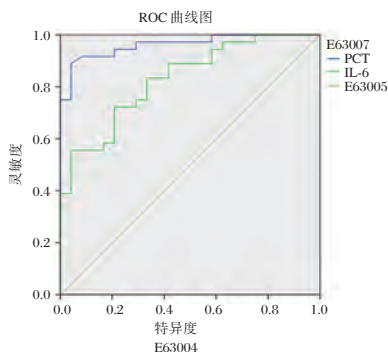


图1 IL-6、PCT诊断脓毒症的ROC图

Figure 1 ROC diagram of IL-6 and PCT for diagnosis of sepsis

2.3 IL-6、PCT对脓毒症患者预后的非条件 Logistic 分析

80例脓毒症患者中,死亡15例,存活65例,对比死亡组患者和存活组患者IL-6、PCT的水平,根据2.2中截断值为限,分为两个亚组,PCT>1.110 ng/mL亚组中死亡率与PCT≤1.110 ng/mL亚组中死亡率有显著性差异,有统计学意义($\chi^2=4.20, P=0.041$);同理IL-6>56.12 pg/mL亚组和IL-6≤56.12 pg/mL亚组中死亡率有显著性差异,有统计学意义($\chi^2=7.49, P=0.006$)。见表3。

表3 IL-6、PCT与脓毒症患者预后的单因素分析

Table 3 Single factor analysis of prognosis in patients with IL-6, PCT and sepsis

组别	存活组 (n=65)	死亡组 (n=15)	χ^2 值	P值
PCT				
≤1.110 ng/mL	27(41.54)	2(13.33)	4.20	0.041
>1.110 ng/mL	38(58.46)	13(86.67)		
IL-6				
≤56.127 pg/mL	29(44.62)	1(6.67)	7.49	0.006
>56.127 pg/mL	36(55.38)	14(93.33)		

将PCT>1.110 ng/mL、IL-6>56.127 pg/mL纳入logistic风险预测模型,最终结果是PCT>1.110 ng/mL、IL-6>56.127 pg/mL是预测脓毒症患者不良结局的独立预测因子,OR分别为:9.35(98%CI:1.96~8.92)、12.98(95%CI:0.89~12.39),表4。

表4 IL-6、PCT预测脓毒症患者预后的 Logistic 分析

Table 4 Logistic analysis of prognosis in patients with sepsis predicted by IL-6 and PCT

项目	β	SE	OR值	P值	95%CI
PCT>1.10 ng/mL	1.86	0.06	9.35	0.001	1.96~8.92
IL-6>56.12 pg/mL	2.83	0.15	12.98	0.001	0.89~12.39

3 讨论

IL-6是具有多重免疫调节功能的前炎症细胞因子,由单核、巨噬、内皮细胞在炎症因子刺激下产生,同时还具有刺激机体产生CRP、PCT等炎症因子的作用,在细菌感染2~3h即可达到峰值,在临床多用于诊断感染性疾病,且在鉴别诊断细菌感染和病毒感染具有较高的价值。国内其他研究者也有关于IL-6在脓毒症中的诊断评价研究,如曹令仪等^[7]和付阳等^[8],其结果也与本研究结果基本一致。此外,国外的研究也认为IL-6是脓毒症的独立预警标志物^[9],Srisangthong等研究显示IL-6与脓毒症患者预后呈负相关,即IL-6水平越高,脓毒症预后越差^[10]。本研究在比较不同组别IL-6的水平发现,随着脓毒症的不断加重,IL-6水平是呈现升高的趋势,这一结果与Srisangthong等研究契合。同时,我们的研究发现,IL-6>56.12 pg/mL是预测脓毒症患者不良结局的独立预测因子,OR为:9.35(98%CI:1.96~8.92),提示IL-6可以作为鉴别脓毒症的有效指标,并预示脓毒症患者预后。但也有报道显示,IL-6在非感染性疾病中也有不同程度的增高,可能在其他非感染性疾病中也存在影响IL-6表达的因素,这也给IL-6作为脓毒症的有效鉴别指标带来了困难^[11]。因此,需要进一步深入的研究IL-6作为脓毒症的诊断指标的特异性研究。

PCT是甲状腺细胞产生的降钙素前体,在正常人血清中含量极低,在机体遭受细菌感染时受内毒素诱导可明显升高,在早期感染(4h内)中即可被快速检测到^[12],并在血清中维持6~24h^[13]。随着感染

得到控制,PCT可在较短时间内降至正常水平,同样随着感染的加重PCT可出现持续高水平的状态。因而,PCT被认为是诊断感染的敏感性指标^[14]。当PCT>0.5 ng/L时,患者存在较大的发生脓毒症风险,刘慧琳等研究显示PCT>1.0 μg/L,诊断脓毒症的灵敏度和特异度分别达到80.3%、72.2%^[15]。本研究的PCT截断值为1.110 ng/L,其诊断脓毒症的灵敏度为90.35%,特异度为87.26%,Youden指数为72.68,AUC为0.892(95CI:1.28~9.16, $P<0.001$),提示PCT具有潜在的脓毒症诊断价值。Tian等^[16]研究显示PCT水平在脓毒症患者与SIRS患者中显著的差别,并且在脓毒症不同分型中也有着显著的差异,可作为鉴别脓毒症感染程度的指标。本研究也发现了类似的现象,PCT在脓毒症不同分型中同样有着显著的统计学差异,脓毒症休克组、严重脓毒症不伴休克组和普通脓毒症组患者PCT分别为(4.267±3.769)ng/L、(2.28±2.74)ng/L和(0.85±0.95)ng/L,PCT随着感染程度的加重表达水平逐渐增高。PCT>1.10 ng/mL, $OR=12.98(95\%CI:0.89\sim12.39)$ 提示PCT是脓毒症患者不良结局的独立预测因子。因此,PCT不仅在脓毒症诊断及分型鉴别中均具有较高的价值,而且对脓毒症患者预后是个很有价值的预测指标,可指导临床治疗。

值得思考的是,IL-6和PCT作为独立的预测因子,在脓毒症的早期诊断和预后预测中有重要的价值,但单独的预测因子难免会受其他因素的影响,比如IL-6水平的变化在其他非感染性疾病中也会出现,同样PCT可能也有一定的局限性。下一步的研究可以将PCT和IL-6联合检测,分析其在脓毒症诊断和预后分析中的价值。

综上,IL-6、PCT在脓毒症患者以及不同感染程度脓毒症患者中均有不同程度的表达,可用于脓毒症早期诊断,并能预测脓毒症患者预后。尽管本研究初步得出上述结论,但由于样本量较小,结果可能会产生偏倚,在今后的研究中,应扩大样本量,以充实研究结果。

参考文献

- [1] Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al. Nationwide Trends of Severe Sepsis in the 21st Century (2000-2007)[J]. Chest, 2011, 140(5):1223-1231.
- [2] 马朋林. 认识与挑战:脓毒症流行病学变化的启示[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(11):1015-1018.
- [3] Zou Q. Presepsin as a novel sepsis biomarker [J]. World Journal of Emergency Medicine, 2014, 5(1):1619.
- [4] 邵俊,郑瑞强,陈齐红,等. ICU感染性休克流行病学的回顾性调查[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(11):185-186.
- [5] 刘瑶,黄勋. 脓毒症相关生物标记物的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(18):4318-4320.
- [6] Dellinger RR, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012 [J]. Intensive Care Medicine, 2013, 39(2):165-228.
- [7] 曹令仪,陈英杰,冯武超,等. PCT联合IL-6在ICU感染性疾病中的诊断价值探讨[J]. 临床医学工程, 2015, 22(12):1630-1631.
- [8] 付阳,陈捷,蔡蓓,等. 血清降钙素原和免疫炎症因子C反应蛋白、白介素-6、血清淀粉样蛋白A在脓毒症中的诊断价值[J]. 四川大学学报:医学版, 2012, 43(5):702-705.
- [9] Uusitaloseppala R, Koskinen P, Leino A, et al. Early detection of severe sepsis in the emergency room: Diagnostic value of plasma C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2011, 43(11-12):883-890.
- [10] Srisangthong P, Wongs A, Kittiworawitkul P, et al. Early IL-6 response in sepsis is correlated with mortality and severity score [J]. Critical Care, 2013, 17(suppl 2):34.
- [11] Stammel P, Devaux Y, Azuaje F, et al. Assessment of Procalcitonin to Predict Outcome in Hypothermia-Treated Patients after Cardiac Arrest [J]. Critical Care Research and Practice, 2011, 2011:631062.
- [12] 何传周. 血清降钙素原测定在ICU感染中的应用研究[J]. 安徽医学, 2012, 33(9):1194-1195.
- [13] 戈艳蕾,李立群,王红阳,等. 老年重症社区获得性肺炎入住ICU患者血清B型钠尿酸、降钙素原、C反应蛋白水平及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(10):2384-2385.
- [14] 谈宜斌,金学兰,李源,等. 综合重症监护病房导管相关性感染目标性监测分析[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(3):230-233.
- [15] 刘慧琳,刘桂花,马青变,等. 降钙素原对急诊脓毒症患者早期诊断的价值[J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24(5):298-301.
- [16] Tian G, Pan SY, Ma G, et al. Serum levels of procalcitonin as a biomarker for differentiating between sepsis and systemic inflammatory response syndrome in the neurological intensive care unit [J]. Journal of Clinical Neuroscience, 2014, 21(7):1153-1158.

D-乳酸和降钙素原对细菌性脑膜炎的诊断价值

范文兵 周银锁*

[摘要] **目的** 探讨D-乳酸联合降钙素原(PCT)在细菌性脑膜炎、病毒性脑膜炎及结核性脑膜炎中的表达水平及对细菌性脑膜炎的诊断价值。**方法** 观察细菌性脑膜炎(BM)、病毒性脑膜炎(TM)及结核性脑膜炎(TM)患者D-乳酸、PCT、C反应蛋白(CRP)、红白细胞计数、葡萄糖、氯离子和脑脊液总蛋白浓度水平;采取受试者工作特征曲线(ROC)、敏感性和特异性分析D-乳酸和PCT对细菌性脑膜炎的诊断价值。**结果** D-乳酸、PCT、CRP、红白细胞计数、脑脊液总蛋白和葡萄糖在BM组与VM组间差异有统计学意义($u=110.0、100.5、95.5、185.0、177.5、150.0、80.5;P<0.05$)。BM组与TM组比较,D-乳酸、PCT、CRP及白细胞计数差异有统计学意义($u=51.5、45.0、60.0、54.5;P<0.05$)。ROC曲线分析显示,D-乳酸的曲线下面积(AUC)为0.907,PCT的AUC面积为0.878。D-乳酸敏感性为91.7%,特异性为89.9%;PCT敏感性为85.6%,特异性为98.6%。**结论** D-乳酸联合降钙素原作为细菌性脑膜炎早期诊断指标是非常有必要和有可行性的。

[关键词] D-乳酸;降钙素原;细菌性脑膜炎;ROC曲线

Diagnostic value of D-lactic acid and procalcitonin in bacterial meningitis

FAN Wenbing, ZHOU Yinsuo*

(Clinical laboratory, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China, 010050)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of D-lactic acid combined with procalcitonin (PCT) in bacterial meningitis, viral meningitis and tuberculous meningitis and its diagnostic value. **Methods** The levels of D-lactate, PCT, CRP, red leukocyte count, glucose, chloride ion and total cerebrospinal fluid protein in patients with bacterial meningitis (BM), viral meningitis (VM) and tuberculous meningitis (TM) were measured. The diagnostic value of D-lactic acid and PCT in bacterial meningitis was analyzed by receiver operator characteristic curve (ROC), sensitivity and specificity. **Results** There were significant differences in D-lactate, PCT, CRP, RBC count, CSF total protein and glucose between BM group and VM group ($u=110.0, 100.5, 95.5, 185.0, 177.5, 150.0, 80.5; P<0.05$). The difference of D-lactate, PCT, CRP and leukocyte count between BM group and TM group was statistically significant ($u=51.5, 45.0, 60.0, 54.5; P<0.05$). ROC curve analysis showed that area under the curve (AUC) of D-lactate was 0.907, and AUC area of PCT was 0.878. The sensitivity of D-lactate was 91.7%, the specificity was 89.9%, the sensitivity of PCT was 85.6%, the specificity was 98.6%. **Conclusion** D-lactate combined with PCT is necessary for the early diagnosis of bacterial meningitis.

[KEY WORDS] D-lactate; Procalcitonin; Bacterial meningitis; Receiver operator characteristic curve

细菌性脑膜炎是严重威胁人类健康的疾病,致残率和病死率非常的高,及时有效的治疗措施是减低风险危害的最好方法^[1]。传统的检测鉴别

方法包括细胞计数和分类,脑脊液生化检查,革兰氏染色,细菌培养等,但均存在敏感性差,特异性不强,花费时间长等问题^[2]。如何早期快速确切

作者单位:内蒙古医科大学附属医院检验科,内蒙古,呼和浩特 010050

*通信作者:周银锁, E-mail: fanghuei@yeah.net

地诊断细菌性脑膜炎,是有效准确治疗细菌性脑膜炎的关键。研究表明D-乳酸和降钙素原(procalcitonin, PCT)在人体细菌性感染性疾病中有很高的诊断价值^[3-4]。因此,本研究通过分析D-乳酸和降钙素原对细菌性脑膜炎诊断的敏感性和特异性,探讨早期利用D-乳酸联合降钙素原诊断细菌性脑膜炎的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2016年3月至2017年6月在内蒙古医科大学附属医院确诊为脑膜炎患者68例的脑脊液标本。纳入标准:①所有研究对象均行胸片影像学检查、结核菌素试验、脑脊液常规检查、脑脊液生化检查、细胞培养等;②年龄>18岁;③初次发病患者。排除标准:①合并其他颅内感染性疾病;②有颅内手术史;③合并其他部位感染;④合并其他血液性疾病、免疫系统疾病或肿瘤等重大疾病。通过生化检查和临床诊断,根据不同感染类别分为3组,即病毒性脑膜炎(viral meningitis, VM)组17例;结核性脑膜炎(tuberculosis meningitis, TM)组20例;细菌性脑膜炎(bacterial meningitis, BM)组31例。同时,选择无神经系统症状和疾病,无血液性疾病和无感染症状需要外科手术腰麻的患者的脑脊液标本28例作为对照组。本研究经患者知情同意,并经本院伦理委员会审核通过(伦理号:20160113)。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器

总蛋白检测试剂盒(上海樊克生物科技有限公司);C反应蛋白试剂盒(上海康郎生物科技有限公司);降钙素原测定试剂盒(南京澳林生物科技有限公司);D-乳酸检测分析试剂盒(日本Sigma公司);离心机(上海安亭离心机厂);AU640全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司);显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2.2 脑脊液相关指标实验室检查

采用腰椎穿刺术采集患者脑脊液标本,放入无菌专用试管内,送检。送至实验室后立即离心(3 000 r/min, 15 min),收集上清液,采用AU640全自动生化分析仪,2 h内测定脑脊液总蛋白、氯离子和葡萄糖浓度。其中,脑脊液总蛋白检测采用邻苯三酚红钼法^[5]。氯离子检测采用的是离子选

择间接法^[5]。葡萄糖检测采用葡萄糖激酶法^[5]。采用免疫比浊法^[6]测定C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平,完全按照C反应蛋白测定试剂盒说明书操作。采用免疫透射比浊法^[7]测定降钙素原(PCT)水平,完全按照试剂盒说明书操作。CRP和PCT均采用全自动生化分析仪测定。D-乳酸检测采用比色法^[5]。红细胞和白细胞的数量检测是由检验科专职人员按照第四版全国临床检验操作规程^[8]进行镜检。

1.3 统计学分析

采用的是SPSS 16.0软件进行分析,采用F检验是否服从正态分布。计量资料采取 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,正态分布计量资料采取t检验和单因素方差分析;非正态计量资料采取Kruskal-Wallis秩和检验和Mann-Whitney检验。受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)采用的是MedCalC15.1软件分析。逐步概率化处理采用二元Logistic分析。 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 各组临床资料和脑脊液相关指标实验室检查结果

见表1, D-乳酸、PCT、CRP、红白细胞计数、脑脊液生化三项指标在实验组间差异有统计学意义。通过F检验,所列资料均为非正态分布。通过Mann-Whitney秩和检验可以发现D-乳酸、PCT、CRP、红白细胞计数、脑脊液总蛋白、氯离子和葡萄糖在BM组与对照组间有统计学差异($u = 25.0、32.5、60.5、76.0、90.0、10.5、46.5、40$; $P < 0.05$)。而D-乳酸、PCT、CRP、红白细胞计数、脑脊液总蛋白和葡萄糖在BM组与VM组间有统计学差异($u = 110.0、100.5、95.5、185.0、177.5、150.0、80.5$; $P < 0.05$)。在BM组与TM组的比较中, D-乳酸、PCT、CRP、白细胞计数是有统计学差异($u = 51.5、45.0、60.0、54.5$; $P < 0.05$)。

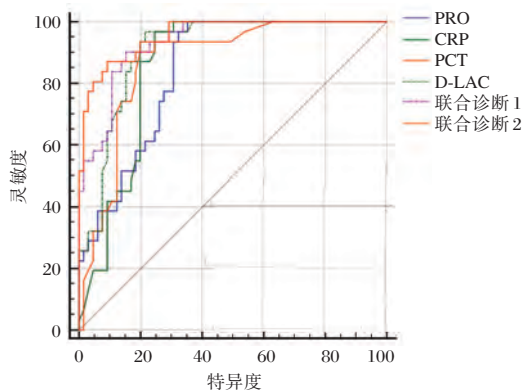
2.2 ROC曲线分析细菌性脑膜炎各诊断指标的曲线下面积(area under the curve, AUC)

见图1和表2,在这些诊断指标中, D-乳酸的AUC面积最大,可达0.907,其次是PCT,为0.878。而CRP、红白细胞计数、氯离子、脑脊液总蛋白和葡萄糖的AUC面积分别为0.826、0.788、0.836、0.630、0.644、0.845。将AUC面积最大的D-乳酸和PCT进行二元Logistic逐步概率化处理^[9],

表1 实验分组的临床资料和脑脊液相关指标实验室检查结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Clinical data and laboratory examination results of cerebrospinal fluid related indexes in experimental groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	VM组	TM组	BM组	F值	P值
年龄(岁)	42.5±10.6	44.6±8.9	38.5±8.7	45.8±11.3		
性别(男/女)	16/12	8/9	12/8	17/14		
葡萄糖(mmol/L)	4.1±1.3	3.3±1.2	2.9±1.0	2.66±0.9	9.6	0.006
氯离子(mmol/L)	119.8±8.9	113.7±7.3	115.3±6.9	111.1±7.2	15.3	0.002
总蛋白(mg/L)	294.9±31.6	367.9±42.5	2035.3±837.6	2465.6±1021	68.3	<0.001
白细胞(/ μ L)	2±1.8	10.3±7.6	685.6±427.6	812.9±471.3	85.9	<0.001
红细胞(/ μ L)	7±5.8	136.3±98.6	191.6±133.3	211.2±173.2	12.3	<0.001
CRP(mg/L)	0.239±0.092	0.411±0.185	0.627±0.312	0.678±0.252	42.6	<0.001
PCT(μ g/L)	0.048±0.075	0.052±0.024	0.057±0.033	0.165±0.183	52.6	<0.001
D-乳酸(mmol/L)	3.77±1.97	10.23±5.26	32.59±14.3	43.58±14.3	62.7	<0.001



D-LAC: D-乳酸。PCT:降钙素原。CRP:C反应蛋白。PRO:脑脊液总蛋白。联合诊断1包括D-乳酸和PCT。联合诊断2包括D-乳酸,PCT,CRP,红白细胞计数,葡萄糖,氯离子和脑脊液总蛋白。

图1 细菌性脑膜炎相关诊断指标 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of diagnostic index related to bacterial meningitis

表2 脑脊液各诊断指标 AUC 面积

Table 2 AUC of cerebrospinal fluid diagnostic indexes

诊断指标	AUC 面积	P 值	95%可信区间
葡萄糖(mmol/L)	0.630	0.007	0.625~0.726
脑脊液总蛋白(mg/L)	0.845	<0.001	0.761~0.914
氯离子(mmol/L)	0.644	0.005	0.540~0.739
白细胞计数(/ μ L)	0.836	<0.001	0.770~0.919
红细胞计数(/ μ L)	0.788	<0.001	0.698~0.824
CRP(mg/L)	0.826	<0.001	0.746~0.899
PCT(μ g/L)	0.878	<0.001	0.769~0.919
D-乳酸(mmol/L)	0.907	<0.001	0.794~0.935
联合诊断1	0.933	<0.001	0.905~0.998
联合诊断2	0.957	<0.001	0.924~1.024

组成名为联合诊断1的AUC面积可以达到0.933。此外,将这8个项目组成的联合诊断2的AUC面积可达0.957。

2.3 细菌性脑膜炎各诊断指标的 诊断界值、敏感性和特异性

见表3,在这些诊断指标中,D-乳酸 cutoff 值为 37.9 mmol/L,敏感性为 91.7%,其敏感性在所有指标中最高。而PCT的 cutoff 值为 0.168 μ g/L,敏感性和特异性分别为 85.6%和 98.6%,其特异性在所有指标中最高。将D-乳酸和PCT进行二元 Logistic 逐步概率化处理,组成名为联合诊断1的敏感性和特异性分别为 85.1%和 99.5%。此外,将这8个项目组成的联合诊断2的敏感性和特异性分别为 83.9%和 100%。

表3 脑脊液各诊断指标的 cutoff 值、敏感性和特异性

Table 3 Cutoff value, sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid diagnostic indicators

诊断指标	cutoff 值	敏感性(%)	特异性(%)
葡萄糖(mmol/L)	2.6	62.3	86.5
脑脊液总蛋白(mg/L)	1983.5	85.3	90.3
氯离子(mmol/L)	113.6	65.3	80.3
白细胞计数(/ μ L)	552.6	85.5	91.6
红细胞计数(/ μ L)	175.3	72.7	88.7
CRP(mg/L)	0.586	87.3	85.7
PCT(μ g/L)	0.168	85.6	98.6
D-乳酸(mmol/L)	37.9	91.7	89.9
联合诊断1		85.1	99.5
联合诊断2		83.9	100.0

3 讨论

脑膜炎依据微生物感染类型可主要分为病毒性脑膜炎、结核性脑膜炎和细菌性脑膜炎。其中,细菌性脑膜炎是中枢神经系统严重的感染性

疾病,预后较差^[10]。许多细菌均可引起本病,其中脑膜炎球菌所致者最多,其余依次为流感杆菌、肺炎球菌、厌氧菌等。传统的实验室鉴别诊断手段包括脑脊液常规检测、脑脊液生化检查以及脑脊液涂片和培养等。脑脊液常规和生化检查灵敏度较高,但是特异性较差,难以有效鉴别感染类型。而脑脊液涂片和培养特异性虽可以,但是检出率太低,假阴性率可达70%,且需要3 d时间,非常耗时^[11]。所以,有效的鉴别细菌性脑膜炎是治疗的关键。

本研究将主要的细菌性脑膜炎诊断指标进行统计学分析,结果发现,BM组D-乳酸、PCT水平显著高于其他3组。说明D-乳酸、PCT在细菌性脑膜炎中表达显著升高。李幽然等^[12]研究发现D-乳酸水平与PCT水平在细菌性脑膜炎患者中表达明显增高,研究结果与本研究结果一致。商怀玉等^[13]得出相同结果。分析原因,当机体收到严重细菌感染时,机体内除甲状腺C细胞以外的细胞如肝脏的巨噬细胞、单核细胞,肺部、肠道组织的淋巴细胞等,会收到细菌内毒素的诱导合成分泌PCT,所以细菌脑膜炎PCT水平升高。乳酸是糖代谢的中间产物,当细菌性脑膜炎时,感染的病原体和被破坏的细胞均能释放出酶分解葡萄糖,脑脊液中的葡萄糖被消耗产生乳酸,所以细菌脑膜炎D-乳酸水平升高。但更深入具体的发生机制,还有待深入的探讨研究。

本研究通过ROC曲线分析各指标的诊断价值,发现D-乳酸ROC曲线下面积在各诊断指标中最高,达到0.907,说明其诊断价值最高。其次是降钙素原,AUC面积达0.878。说明这两个指标在诊断细菌性脑膜炎中有可信价值。Li等^[14]研究发现脑脊液中D-乳酸对细菌性脑膜炎有较高的诊断价值。张国新等^[15]研究发现,降钙素原对细菌性脑膜炎有较高的诊断价值。联合诊断1和2的AUC面积可以达到更高,分别为0.933和0.957,进一步说明多指标联合诊断的重要性。进一步分析细菌性脑膜炎各诊断指标的敏感性和特异性,发现D-乳酸敏感性为91.7%,特异性为89.9%,敏感性最高。PCT对细菌性脑膜炎诊断敏感性和特异性分别为85.6%和98.6%,特异性在所有指标中最高。进一步说明二者联合诊断的重要性,敏感性和特异性达到99.5%和100%。陈嘉蕾^[16]研究发现脑脊液乳酸联合降钙素原是颅内感染的有效辅助诊断指标。此研究结果与本文一致。分析原因,D-乳酸作为L-乳酸的同分异构体,是细菌发酵

的产物,而人体细胞产生的仅是L-乳酸^[17-18]。大部分细菌可以产生D-乳酸脱氢酶,催化丙酮酸和D-乳酸之间快速的转化,所以D-乳酸对细菌性感染有较高的敏感性及诊断价值。降钙素由甲状腺C细胞产生,是降钙素相关多肽A基因的产物^[19]。目前普遍认为,在免疫反应过程中产生的细菌内毒素和细胞因子阻止了降钙素合成过程的最后一步,从而造成降钙素前体PCT的大量蓄积,而在病毒性感染中水平变化不大,所以PCT对于诊断细菌脑膜炎的诊断价值、特异性、敏感性均较高。

因此,细菌性脑膜炎中D-乳酸和降钙素原的含量是增加的,结合上述的ROC曲线下面积,敏感性和特异性的分析,将D-乳酸和降钙素原作为细菌性脑膜炎早期诊断指标是非常有必要和有可行性的。当然,如果可以结合上述的传统实验室诊断指标联合诊断效果会更好。

参考文献

- [1] Taskin E, Turgut M, Kilic M, et al. Serum procalcitonin and cerebrospinal fluid cytokines level in children with meningitis inflame[J]. *Mediators Inflamm*, 2004, 13(4):269-273.
- [2] Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro [J]. *J lab Clin Med*, 1999, 134(1):49-55.
- [3] Wellmer A, Prange J, Gerber J, et al. D- and L-lactate in rabbit and human bacterial meningitis[J]. *Scand J Infect Dis*, 2001, 33(12):909-913.
- [4] 杜斌. 脑脊液降钙素原和CRP在颅内感染鉴别诊断中的应用价值[J]. *实用心脑血管杂志*, 2014, 22(11):75-76.
- [5] 郑铁生. *临床生物化学检验*[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2004.
- [6] 胡敏, 李延武, 胡永红. 免疫增强透射比浊法测定超敏C-反应蛋白的方法学评价[J]. *湖南医科大学学报*, 2003, 28(4):415-417.
- [7] 戴婉如, 周欢, 林燕辉, 等. 免疫透射比浊法在AU5800全自动生化分析仪检测降钙素原的方法学评价[J]. *检验医学与临床*, 2015, 11(10):1447-1448.
- [8] 尚红, 王毓三, 申子瑜. *全国临床检验操作规程*[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [9] 刘润幸. 使用SPSS作多变量观测值的ROC曲线分析[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(9):1151-1152.

GATA3、CK20在膀胱尿路上皮癌中的表达和意义

曾玉梅 杜娟 陈应智 储兵*

[摘要] 目的 探讨GATA3、CK20在膀胱尿路上皮癌(BUC)组织中的表达与意义。方法 采用免疫组化法分别检测89例BUC、16例尿路上皮良性病变组织中GATA结合蛋白3(GATA3)、细胞角蛋白20(CK20)的表达,分析两者与BUC病理参数的关系。结果 BUC组织中的GATA3阳性率为85.4%,在良性病变组织的阳性表达率达到100.0%,CK20在BUC组织中的阳性表达率为62%,而在良性病变组织中,CK20均为阴性;两者在高级别病变、伴有肌层浸润及伴有淋巴结转移的BUC组织中的阳性表达率均明显高于低级别病变、非肌层浸润及无淋巴结转移的BUC组织($P<0.05$)。结论 GATA3和CK20均可能作为独立的预后因子判断肿瘤的疾病进展。

[关键词] 膀胱尿路上皮癌; GATA3; CK20

Expression and significance of GATA3 and CK20 in bladder urothelial carcinoma

ZENG Yumei, DU Juan, CHEN Yingzhi, CHU Bing*

(Department Pathology of Zhongshan City People's Hospital, Guangdong Province Affiliated Zhongshan Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhongshan, Guangdong, China, 528400)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and significance of GATA3 and CK20 in bladder urothelial carcinoma (BUC). Methods The levels of GATA-binding protein 3 (GATA3) and cytokeratin 20 (CK20) were detected by immunohistochemical assay from 89 cases of BUC and 16 cases of benign lesions. The correlation between the expressions and the pathological parameters was analyzed. Results The positive rate of GATA3 was 85.4% in BUC, 100.0% in benign lesions, 62% in BUC, and 62% in benign lesions. The positive rate of CK20 in BUC with high grade lesions, myometrial infiltration and lymph node metastasis was significantly higher than that in BUC with low grade lesions and non myometrial infiltration and BUC without lymph node metastasis ($P<0.05$). Conclusion GATA3 and CK20 may be used as independent prognostic factors to predict tumor progression.

[KEY WORDS] Bladder urothelial carcinoma; GATA3; CK20

膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤,在世界范围内其发病率高居恶性肿瘤的第9位^[1]。其中膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BUC)发病率居全球男性恶性肿瘤的第6位^[2],具有多灶发生及易复发的特点,如能早期发现并治疗,能明显降低患者的死亡率,因此寻找与膀胱尿路上皮癌有关的生物学标记物意义重大。GATA结合蛋白3(GATA-binding protein 3, GATA3)是一种具有较强的特异性细胞内转录因子,参与

了肿瘤细胞的增殖、分化和细胞凋亡等过程,且仅在膀胱癌中高表达,而在肾癌和前列腺癌中不表达或低表达^[3];细胞角蛋白20(cytokeratin 20, CK20)是近年来新发现的一个可以用于早期诊断尿路上皮癌并判断其预后的肿瘤标记物,其阳性表达报道不一^[4]。本研究拟采用免疫组织化学方法对BUC进行GATA3、CK20的检测,探讨两者在BUC组织中的阳性表达情况及临床应用价值。

作者单位:中山市人民医院(中山大学附属中山医院)病理科,广东,中山 528400

*通信作者:储兵, E-mail: dachubing@aliyun.com

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院病理科2015年1月至2016年7月膀胱活检和手术切除标本共计105例,其中BUC 89例,尿路上皮良性病变16例,BUC病例中男性66例,女性23例;年龄34~79岁,中位年龄57岁;其病理分级按世界卫生组织(World Health Organize, WHO)分类标准^[5]分为低级别和高级别,25例患者为低级别,64例患者为高级别;其中无肌层浸润的膀胱尿路上皮癌52例,有肌层浸润的尿路上皮癌37例。16例良性病变中腺性膀胱炎12例,内翻性乳头状瘤4例。

1.2 方法

所有标本经10%中性缓冲液甲醛固定,石蜡标本切片3 μm,常规脱蜡至水化;抗原修复;高压锅120℃保压8 min,自来水缓冲10 min,冷却至室温;3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,室温10 min;分别加入即用型GATA3和CK20鼠源单克隆抗体(购自罗氏诊断产品上海有限公司);于37℃培养箱孵育1 h;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(pH 7.4)冲洗3次,每次3 min;滴加Envision两步法试剂盒二抗(购自北京中杉金桥生物技术有限公司),37℃培养箱孵育15 min;PBS(pH 7.4)冲洗3次,每次3 min;DAB显色2 min, Mayer苏木素复染,逐级乙醇脱水,中性树胶封片,镜下观察。以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

光镜下观察,GATA3以细胞核着色为阳性表达,CK20以细胞膜着棕黄色或棕褐色为阳性结果。随机选择5个高倍视野,判断标准:>10%~25%为弱阳性(1+),>25%~50%为中度阳性(2+),>50%为强阳性(3+)。GATA3以无阳性细胞或阳性表达率≤10%为阴性,CK20以无阳性细胞或仅有伞细胞表达为阴性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 15.0进行数据分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GATA3在膀胱组织中的表达

GATA3在良性病变及膀胱尿路上皮癌中均有表达,分别为100%及85.4%,而在尿路上皮癌的组

织中,GATA3在高级别、有肌层浸润及有淋巴结转移的肿瘤中的阳性表达率均高于低级别、无肌层浸润及无淋巴结转移的肿瘤,其差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1,图1。

表1 GATA3表达与膀胱肿瘤临床病理参数的关系
Table 1 Relationship between GATA3 expression and clinicopathological parameters of bladder tumor

项目	n	GATA3				P值
		0	1+	2+	3+ 阳性率(%)	
病变性质						0.365
良性病变	16	0	1	4	11	100.0
尿路上皮癌	89	13	9	32	35	85.4
性别						0.395
男	66	1	2	19	38	89.4
女	23	4	1	6	12	82.6
组织学分级						0.021
高级别	25	0	1	6	18	100.0
低级别	64	12	8	18	26	81.2
肌层浸润						0.020
无	52	15	1	13	27	78.8
有	37	2	8	11	16	94.6
淋巴结转移						0.021
无	35	11	6	10	9	71.4
有	13	0	1	3	6	100.0



A:尿路上皮良性病变(EnVision,×200); B:低级别膀胱尿路上皮癌(EnVision,×400); C:高级别膀胱尿路上皮癌(EnVision,×200)。

图1 尿路上皮良性病变、低级别及高级别膀胱尿路上皮癌组织中GATA3的阳性表达

Figure 1 Positive expression of GATA3 in benign lesions of urinary tract, low grade and high grade BUC

2.2 CK20在膀胱组织中的表达

CK20在良性病变的尿路上皮仅表达在伞细胞,在尿路上皮癌中则呈100%阳性表达,在低级别和高级别膀胱尿路上皮癌中的阳性表达率分别为40.0%、71.9%,在浸润性和非浸润性的膀胱尿路上皮癌中的阳性表达率分别为86.5%、51.9%,有淋巴结转移及无淋巴结转移的肿瘤中阳性表达率分别为92.3%、62.9%,其差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表2、图2。

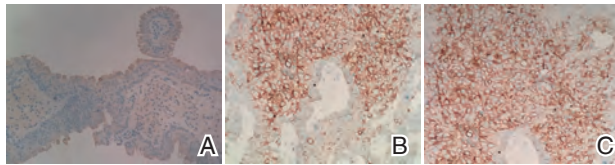
3 讨论

GATA3是一个新近发现的尿路上皮癌的诊断标记物^[6-7],是细胞分化成熟的关键调节因子,在人

表2 CK20表达与膀胱肿瘤临床病理参数的关系

Table 2 Relationship between expression of CK20 and clinicopathological parameters of bladder tumor

项目	n	CK20				P值
		阴性	弱表达(1+)	强表达(2-3+)	阳性率(%)	
病变性质						<0.001
良性病变	16	16	0	0	0.0	
尿路上皮癌	89	34	23	32	61.7	
性别						0.902
男	66	21	19	26	68.2	
女	23	7	8	8	69.6	
组织学分级						0.049
低级别	25	15	4	6	40.0	
高级别	64	18	25	21	71.9	
肌层浸润						0.048
无	52	25	18	9	51.9	
有	37	5	12	20	86.5	
淋巴结转移						0.044
无	35	13	12	10	62.9	
有	13	1	5	7	92.3	



A. 尿路上皮良性病变 (EnVision, ×200); B. 低级别膀胱尿路上皮癌 (EnVision, ×400); C. 高级别膀胱尿路上皮癌 (EnVision, ×200)。

图2 尿路上皮良性病变、低级别及高级别膀胱尿路上皮癌组织中CK20的阳性表达

Figure 2 Positive expression of CK20 in benign lesions of urinary tract, low grade and high grade BUC

体多种恶性肿瘤组织中异常表达,在多种恶性肿瘤细胞的生长调节和分化中起作用^[8-9],并与肿瘤的分级和预后关系密切^[10-11]。本实验采用免疫组化方法检测105例膀胱尿路上皮肿瘤GATA3的表达,其中良性病变中的尿路上皮细胞100.0%出现GATA3的阳性表达,膀胱尿路上皮癌中85.4%表达GATA3(图1)。以上结果与Hiroshi等^[12]的研究结果接近:GATA3在良性病变和尿路上皮癌中均高表达,大多数(98%)膀胱上皮良性病变的细胞表达GATA3,而在小部分(14%)尿路上皮癌中表达缺失。因此,本研究认为,GATA3可作为一个有用的免疫组化标记,区分尿路上皮癌与其他泌尿生殖系统肿瘤,如前列腺癌与肾细胞癌。但GATA3表达的特异性在其他类型的组织,如上皮其他变种癌、尿道肿瘤、转移性尿路上皮肿瘤,还需进一步研究。此外,在尿路上皮癌中,GATA3在高级别、有肌层浸润及有淋巴结转移的肿瘤中的阳性表达率均高于低级别、无肌层浸润及无淋巴结转移的肿瘤,由此可见,

GATA3阳性表达的肿瘤相比GATA3阴性表达的肿瘤,具有更高的疾病进展的风险,可作为膀胱尿路上皮癌的独立预后判断因子,此结论与Wilson等^[13]的研究基本吻合。而Nandi等^[14]研究发现,在高级别浸润性尿路上皮癌中GATA3高表达,其与肿瘤浸润程度密切相关,并且与一些预后较好的指标相关,与本研究的观点有分歧,因此还需要更多的临床随访资料论证。

角蛋白20(CK20)是角蛋白家族(Cytokeratin, CK)中的一员,分布于上皮细胞的中间纤维丝,是构成细胞骨架的重要物质,具有严格的上皮特异分布^[15],既往研究^[9]发现CK20在膀胱尿路上皮病变中的表达具有较高的特异性和敏感性,但是否与BUC的分级与预后有关尚无明确结论。本研究和既往的研究^[16]均发现CK20在膀胱尿路上皮病变中的表达具有较高的特异性和敏感性,而且有“仅表达在恶性尿路上皮”的特点,表达强度往往与膀胱尿路上皮癌的分级有明显的关系。本研究显示,CK20在膀胱组织中的表达情况与性别无关,在16例尿路上皮良性病变中,无一例出现CK20异常表达,而在BUC组织中总的阳性表达率为61.7%,说明CK20在BUC诊断中敏感性较强。在低级别和高级别膀胱尿路上皮癌中的阳性表达率分别为40.0%、71.9%,在浸润性和非浸润性的膀胱尿路上皮癌中的阳性表达率分别为86.5%、51.9%有淋巴结转移及无淋巴结转移的肿瘤中阳性表达率分别为92.3%、62.9%,其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。说明CK20表达与肿瘤分化程度和侵袭、转

移能力相关,其可能原因是肿瘤细胞中间纤维丝合成活跃,细胞运动性强,导致其侵袭力及转移力增强。因此CK20高表达提示肿瘤恶性程度高,发生转移的可能性大,预后差。综上,GATA3和CK20两者的检测可为评估BUC的生物学行为、判断预后提供依据,联合应用两者对指导BUC的治疗可能具有重要价值,可作为膀胱活检的常规检测项目。

参考文献

- [1] Grigorieva IV, Mirczuk S, Gaynor KU. Gata3-deficient mice develop parathyroid abnormalities due to dysregulation of the parathyroid-specific transcription factor Gcm2[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6):2144-2155.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30.
- [3] 钟凯华. GATA-3蛋白在调控膀胱尿路上皮癌生物学行为中的作用及与复发的关系研究[J]. *解剖学研究*, 2017, 39(1):9-12.
- [4] 朱江宁, 李俊君, 高敬峰, 等. 细胞角蛋白20在尿路上皮癌中的表达及意义[J]. *宁夏医学杂志*, 2015, 37(12):1076-1077.
- [5] Ferry JA, Harris NL, Young RH, et al. Malignant lymphoma of the testis, and spermatic cord. A clinicopathologic study of 69 cases with immunophenotypic analysis[J]. *Am J Surg Pathol*, 18(4):376-390.
- [6] Keshari RP, Wang W, Zhang Y, et al. Decreased expression of the GATA3 gene is associated with poor prognosis in primary gastric adenocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e87195.
- [7] Ordóñez NG. Value of GATA3 immunostaining in tumor diagnosis: a review[J]. *Adv Anat Pathol*, 2013, 20(5):352-360.
- [8] Hosoya T, Maillard I, Engel JD. From the cradle to the grave: activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation[J]. *Immunol Rev*, 2010, 238(1):110-125.
- [9] Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation[J]. *Int Immunol*, 2011, 23(7):415-420.
- [10] 邵贺, 王丹, 梁艳, 等. 复合维生素、维生素E对高同型半胱氨酸血症小鼠抗氧化酶活性及GATA-3的影响[J]. *武警医学*, 2014, 25(1):56-58.
- [11] Li Y, Ishiguro H, Kawahara T, et al. Loss of GATA3 in bladder cancer promotes cell migration and invasion[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(4):428-435.
- [12] Miyamoto H, Izumi K, Yao JL, et al. GATA binding protein 3 is down-regulated in bladder cancer yet strong expression is an independent predictor of poor prognosis in invasive tumor[J]. *Human Pathology*, 2012, 43(11):2033-2040.
- [13] Wilson BJ, Giguère V. Meta analysis of human cancer microarrays reveals GATA3 is integral to the estrogen receptor alpha pathway[J]. *Mol Cancer*, 2008, 7(10):49-54.
- [14] Nandi S, Ioshikhes I. Optimizing the gata-3 position weight matrix to improve the identification of novel binding sites[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(4):16-20.
- [15] 丁佩芬, 戎丹平, 顾霞, 等. p53、CK20表达与膀胱尿路上皮癌分级的关系[J]. *肿瘤基础与临床*, 2013, 26(6):461-463.
- [16] 余东海, 周四维, 章慧平, 等. CK20、Cjun在膀胱肿瘤的表达式和临床意义[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2005, 20(5):288-290.
- [9] El Bairi K, Kandhro AH, Gouri A, et al. Emerging diagnostic, prognostic and therapeutic biomarkers for ovarian cancer [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40(2):105-118.
- [10] 杨文国. 血清CA15-3、CA125联合MMP-1和IL-10检测在乳腺癌诊断和预后评估中的价值探讨[J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(8):1107-1113.
- [11] 庞艳, 桂玉然. 血清人附睾蛋白4、糖类抗原125及卵巢癌恶性风险模型指数在卵巢癌诊断中的应用[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(23):5382-5384.
- [12] 崔开颖, 赵素芬, 朱根海. 上皮性卵巢癌组织中miR-21-5p、miR-29-3p、miR-139-5p表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(22):65-67.
- [13] 周树林, 刘锦辉, 姜旖, 等. 微小RNA-331-3p在上皮性卵巢癌血清中的表达及其临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2018, 23(12):1095-1099.
- [14] Link A, Kupcinskis J. MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(30):3313-3329.
- [15] 贾珊, 刘晓唤, 马维冬, 等. miRNA-21通过TPM1参与高糖诱导的人主动脉平滑肌细胞表型转化与增殖[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(3):310-314, 326.
- [16] 曾玉, 陈辰, 吴畏, 等. 血清miRNA-21和miRNA-203在上皮性卵巢癌中的表达及诊断价值[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2016, 21(8):722-726.
- [17] 刘韵, 展望, 游文健, 等. 下调miRNA-21通过PTEN/PI3K/Akt信号转导抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的实验研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2019, 40(1):27-31, 91.

(上接第516页)

循环肿瘤DNA的临床应用研究进展

程筱雯*

[摘要] 近年来,基因组的深入研究和各种分子生物学新技术的快速发展使得循环肿瘤DNA(ctDNA)的检测分析正在从研究领域向临床应用过渡。大量研究结果表明 ctDNA 在肿瘤的预测诊断、病情监测和预后判断等多方面显示出广阔的发展前景。ctDNA 是肿瘤患者血液中存在的异常的细胞游离DNA(cfDNA),尽管 cfDNA 的生物学机制还不甚清楚,但 ctDNA 分析已经开始在临床上应用,这有助于推进肿瘤精准医疗的发展。本文主要从 ctDNA 的检测方法、ctDNA 在肿瘤精准医疗中的应用及 ctDNA 检测分析面临的挑战等方面进行了综述,以期进一步探讨 ctDNA 切实可行的临床应用方向。

[关键词] 循环肿瘤DNA; 定量PCR; 下一代测序; 肿瘤精准医疗

Progress in clinical application of circulating tumor DNA

CHENG Xiaowen

(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230022)

[ABSTRACT] With the rapid development of various new molecular methods and the improvements in genomic, the analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) is gradually shifting from basic research to clinical application. Numerous studies have shown that ctDNA has a broad prospect for prediction, monitoring and prognostication of tumors. ctDNA is an abnormal cell-free DNA (cfDNA) present in the blood of tumor patients. Although the biological mechanism of cfDNA is not clear, ctDNA analysis has begun to be applied in clinical practice, which is helpful to promote the development of accurate tumor treatment. In this paper, the detection methods of ctDNA, the application of ctDNA in cancer precision medicine and the challenges of ctDNA detection and analysis are reviewed, in order to further explore the practical clinical application of ctDNA.

[KEY WORDS] Circulating tumor DNA; Quantitative PCR; Next-generation sequencing; precision medicine of tumor

1948年,法国科学家Mandel首次描述了人类血液中存在游离的无细胞核酸片段(cell-free DNA, cfDNA)。1977年,Leon等^[1]第一次报告了肿瘤患者血清中cfDNA水平增高,远高于健康人群。随后不久研究者^[2-4]就在肿瘤患者血液发现了与结直肠癌、胰腺癌及肺癌相关的KRAS突变,而且在血浆中发现的KRAS突变与患者肿瘤组织中发现的KRAS突变相同,证实了血浆中的突变DNA片段来

源于肿瘤,突变的cfDNA是肿瘤高度特异性的生物学标志物,研究者从而提出了“循环肿瘤DNA”(circulating tumor DNA, ctDNA)的概念,ctDNA是一些从肿瘤细胞释放至血液中的DNA片段。

Vogelstein^[5]在1999年利用数字PCR(digital PCR, dPCR)技术实现了罕见突变片段的准确识别和绝对量化,使在不同病情阶段的结直肠癌患者血浆中突变的等位基因比例得以量化。2012年,

基金项目:国家青年科学基金(81302150);安徽省级质量工程(2014jyxm761)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,安徽,合肥 230022

*通信作者:程筱雯, E-mail: windy135@sina.com

Forsheew 等^[6]使用标记的扩增子片段对 cfDNA 中多个基因进行了深度测序,证明了直接在癌症患者血浆中鉴定突变的可能性,且能够在单个测定中监测多种肿瘤特异性突变。此后不久,血浆 cfDNA 的全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)被证明能够识别肿瘤衍生的染色体畸变、聚焦扩增和基因重组^[7-8]。2013年新英格兰医学杂志指出,无创 ctDNA 检测能够真实反映实体瘤组织中基因突变频率及图谱,是疗效评估及预后监测的重要指标^[9]。

本文主要从 ctDNA 检测方法、ctDNA 在肿瘤精准医疗中的应用及 ctDNA 检测分析面临的挑战等方面进行综述,以期进一步探讨 ctDNA 切实可行的临床应用方向。

1 ctDNA 的检测方法

1.1 dPCR

微流控平台上的 dPCR 被广泛用于量化 ctDNA 水平^[10]。dPCR 是分配扩增,终点检测,先将样品稀释到单分子水平,再平均分配到 20 000 个单元中进行反应,每个单元包含一个或多个拷贝 DNA 模板,在每个反应单元中分别对靶分子进行 PCR 扩增,扩增结束后对每个反应单元的荧光信号进行收集,利用泊松分布的数学模型计算目标片段拷贝数,可以实现单分子 DNA 绝对定量。dPCR 可更好地检测稀有突变,且常用于癌症热点突变分析,其缺点是仅检测已知突变且通量低,如样品需分成多个反应,会增加采样误差,并损害极低拷贝数突变体 DNA 检测的整体性能。

1.2 扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)

该法检测已知突变,利用模板和引物碱基错配有效抑制 PCR 反应区分等位基因。根据已知点突变设计引物,其 3'端碱基分别与突变和正常模板碱基互补,碱基与模板互补后,则引物不间断延伸,PCR 正常进行得到特定长度扩增带。反之,则不能延伸,从而区分有某种点突变的模板与正常模板。该法检测灵敏度高,检测限可达 100 copies/mL,对肿瘤组织检测限可达 0.1%的突变率^[11]。ARMS 结合实时 PCR 可实现闭管扩增,步骤简便,产物无需后处理,从而最大程度地防止了扩增产物污染,现已成为国际上肿瘤个体化分子检测最重要、最先进的技术之一,临床应用认可率高^[12]。

1.3 磁珠乳液扩增方法(bead emulsion amplification magnetic, BEAMing)

该方法结合流式细胞术和 dPCR,利用特异性引物扩增靶突变区,与磁珠混合进行油包水单分子扩增反应。磁珠上固定有特异 PCR 引物,每一类 DNA 分子专一与磁性珠相连。反乳化过程使得颜色各异的荧光探针结合磁珠上的 PCR 产物,发出绿色或红色荧光,使用流式细胞仪分析磁珠颜色来确定突变情况。这种方法是基于小珠(bead)、乳浊液(emulsion)、扩增(amplification)、磁性(magnetic)这4个主要组分来构建的,故被称为 BEAMing。该法用于检测血液样品中低拷贝数的已知基因突变效果较好。但此技术成本高、操作复杂,且成功率偏低,目前临床应用率低^[13]。

1.4 测序技术

NGS 技术的出现使得在保证敏感性的基础上检测出尽可能多的 ctDNA 中肿瘤特异性的基因突变或是拷贝数异常成为可能,包括未知突变的检出。NGS 的优势是能一次性对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,通过增加测序深度可使灵敏度达到 0.01%甚至更高的水平,是目前公认最有效的分析方法^[14-16]。

标记扩增深度测序(tagged-amplification deep sequencing, TAM-Seq)技术利用定制化突变位点库作为筛选器,对样本进行靶向捕获后再进行深度测序,其对肿瘤灵敏度更高,特异性更强,与全外显子测序相比经济可行。肿瘤个体化深度测序(cancer personalized profiling by deep sequence, CAPP-Seq)技术的基本原理是先利用特异性引物进行 15 个循环目标区域预扩增,再利用不同特性的接头标签进行二次扩增,通过双向重复测序提高了测序精度,特异性和敏感性较高,成本较低,适于临床应用^[17]。TAM-Seq 和 CAPP-Seq 主要针对已知突变检测,而全基因组测序、全外显子测序技术则可检出未知突变。然而,上述测序在临床实际应用中尚存在诸多问题,由这些技术带来的昂贵费用和庞大数据,及如何获取高质量 DNA 样本是目前需要克服的问题^[15, 18]。

2 ctDNA 在肿瘤精准医疗中的应用

2.1 ctDNA 与肿瘤的分期和预后相关

一项包括有 640 例不同类型和分期的癌症患者

的研究发现,Ⅳ期癌症患者的 ctDNA 浓度与 I 期患者相比增加了 100 倍^[19],表明血浆中 ctDNA 的浓度可能与肿瘤发展阶段相关。ctDNA 浓度变异主要由癌症转移扩散程度或疾病负荷的差异造成。有实验提示复发性高级浆液性卵巢癌患者 ctDNA 水平与肿瘤体积显著相关,肿瘤体积每增加 1 立方厘米,每毫升血浆则增加 6 个突变体拷贝^[20]。ctDNA 浓度显著变化可能与个体差异相关,如肿瘤血管形成可能阻碍 ctDNA 释放入血液,或者可通过产生缺氧和细胞死亡来促进 ctDNA 释放。ctDNA 水平与癌症分期关系表明 ctDNA 可作为预后指标^[21-22]。具有可检测 ctDNA 的结直肠癌患者的 2 年总体生存率为 48%,而没有 ctDNA 的患者则为 100%^[23],相比常规蛋白质类肿瘤标志物,ctDNA 是具有更好监测效果的预后预测因子,ctDNA 浓度越高,影像学检查结果和临床疗效就越差。一项对转移性乳腺癌的研究发现 ctDNA 浓度与总体存活率间存在显著相反关系,ctDNA 浓度高于 2 000 copies/mL 的患者预后均很差^[24]。

2.2 ctDNA 在肿瘤早期诊断中的应用

癌症的早期干预可明显改善患者生存质量,许多研究已证明了无创技术进行疾病早期诊断的潜在价值^[25-26]。有研究显示 82% Ⅳ期癌症患者检测到 ctDNA,而 I 期患者检出率在 47%^[19]。50% I 期非小细胞肺癌(non small-cell lung cancer, NSCLC)患者可检测到 ctDNA^[27]。使用 dPCR 技术在早期乳腺癌患者血浆中显示了 93.3% 的突变敏感性^[28]。一种基于无创产前检测(noninvasive prenatal testing, NIPT)技术改编的浅层全基因组测序(shallow whole-genome sequencing, sWGS)方法最近被应用于临床研究,检测出了 16 例早期卵巢癌病例中的 6 例(37.5%)^[29]。这些研究提示了早期癌症中 ctDNA 检测的可能性。

2.3 ctDNA 在肿瘤组织定位中的应用

cfDNA 中的甲基化和核小体占有模式可以编码组织特异性和细胞特异性信息,研究血浆中组织特异性甲基化信号,使每个组织对整个 cfDNA 池的相对贡献量子化,这使得今后通过测定组织特异性 ctDNA 来确定癌症转移扩散部位或位点成为可能^[30-31],即提示了来自液体活检的原始组织信息可能有助于肿瘤定位。

2.4 ctDNA 在肿瘤病情实时监测中的应用

ctDNA 半衰期短以及可重复采样的特点,

使液体活检能够实时监测肿瘤负荷对治疗效果的反应程度。在治疗期间对患者进行的研究显示^[6,32],ctDNA 动力学与治疗反应相关,并且可以比临床检测更早地识别反应。在复发性卵巢癌中,化疗后 ctDNA 减少程度与进展时间显著相关,并且比 CA125 水平更有价值^[20]。

最近的一项研究表明^[33],在黑素瘤患者免疫治疗开始后的第一周,ctDNA 水平的早期尖峰可能反映出细胞死亡数目的短暂增加,然而,这种细胞死亡峰值可能会根据所使用的药物的药理学特性和对它们的生物反应而变化。在结直肠癌患者化疗早期以及 NSCLC 患者接受表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂治疗后早期,未发现早期尖峰的出现,如果在治疗开始后立即对血浆进行分析可以可靠地检测出敏感性癌细胞的破坏,这表明也许可以利用突变的早期动力学差异来快速鉴定抗性亚克隆的存在^[34]。在免疫治疗的背景下,液体活检可以通过从不同的 T 细胞克隆释放的 cfDNA 的分析来提供监测 ctDNA 和免疫系统反应的机会^[35]。另外,在手术或治疗后,没有任何其他临床证据时,ctDNA 的存在可识别可能患有复发风险的患者,即 ctDNA 的检测有助于微小残留病(minimal residual disease, MRD)的诊断^[36]。

2.5 ctDNA 在肿瘤异质性分析中的应用

在对肿瘤的深入研究中,人们逐渐认识到肿瘤异质性的潜在混杂效应,但对患者行多次肿瘤活检通常既不可行也不可取。单独活检的分析可能无法准确反映患者基因组结构,进而会对个性化药物的选择和疗效产生错误判断。ctDNA 从多个肿瘤区域释放,从而可以反映肿瘤异质性和空间分离的病灶,ctDNA 分析可检测到在相应组织样品中已经漏掉的突变^[37],比传统活检更全面地分析肿瘤异质性。有一项晚期胃癌 ctDNA 的研究分析了 70 例晚期胃癌患者 ctDNA 和配对肿瘤组织中人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor, HER2)扩增的一致性,比较了其中 30 例晚期胃癌患者的 ctDNA 和原发肿瘤的突变谱,其中 5 例患者多次组织活检以对肿瘤突变进行综合分析,结果显示 ctDNA 中大多数突变也显示在成对的肿瘤组织中,ctDNA 与肿瘤组织的 HER2 扩增具有高度一致性(91.4%, Kappa 指数=0.784, $P < 0.001$),这意味着基于 ctDNA 的评估可以部分克服

肿瘤的异质性,并可能成为胃癌HER2分析的潜在替代指标^[38]。

多区域肿瘤测序数据显示^[39-40],肿瘤原发灶和转移灶组织中存在相同的固有突变,这种固有突变在血浆ctDNA中的检出率高于区域肿瘤的个体突变检出率,因此检测这种固有突变对于跟踪血浆肿瘤负荷(肿瘤负荷是指人体中肿瘤细胞的数量、肿瘤的大小或肿瘤病灶的总量)将是一种可靠的方法。

3 ctDNA检测分析面临的挑战

尽管ctDNA与临床表型的相关性已得到证实,但要提高其在临床应用的准确性,仍需大规模人群队列研究,而提高ctDNA分析质量是成功应用的关键。提高ctDNA分析质量需考虑的重要因素之一是血液样品预分析处理,目前ctDNA分离程序涉及将血液样品送到实验室,通过离心分离血浆和从血浆中纯化ctDNA,程序复杂且耗时,且需对样品进行强烈处理,这可能导致ctDNA降解或血细胞溶解引起基因组释放,从而对样本造成污染。检测ctDNA的血液样本可通过含有独特抗凝剂和细胞稳定剂的特殊采血管进行采集、运输和保存,但在抽血后如能立即进行ctDNA纯化,最大限度地缩短处理样品和纯化所需总时间,将有利于进一步提高ctDNA分析质量,包括浓度和含量。ctDNA检测能否成为实现肿瘤早期筛查的特异性生物标记物取决于更高灵敏度的ctDNA浓度检测技术的发现。目前关于ctDNA的检测尚缺乏统一的行业质控检测标准,而对罕见变异的临床界定也仍需大量临床信息积累,同时测序技术的高成本及结果的解读还有待于完善等,这些都是现阶段ctDNA检测分析所面临的挑战。

4 展望

目前我们对cfDNA释放和清除机制的理解有限,不清楚不同部位肿瘤细胞释放出的ctDNA或同一部位肿瘤的不同亚克隆体释放出的ctDNA的种类、性质和数量是否与总ctDNA池(即血液中所有的ctDNA)呈现出正相关?肿瘤血管分布和代谢特性是否会影响ctDNA在血流中的分布?但现有研究充分表明ctDNA可能是药物开发、肿瘤异质性和克隆进化研究的有利研究工具。

ctDNA的临床应用将取决于患者和临床医生的实际情况、所需基础设施及其成本效益。组织活

检对于癌症的组织学诊断来说依然是“金标准”。2016年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了血浆突变检测试剂的应用,而新兴的ctDNA突变检测临床试验也在积极进行,这是个性化肿瘤学检测的里程碑,表明ctDNA检测目前正在扩大临床应用,以使患者更大程度地受益。进一步探索ctDNA的生物学特性,改进技术使肿瘤无创分子分析的范围越来越广,为基因组研究开辟新途径,这将有助于大大提高临床诊疗的决策水平。

参考文献

- [1] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3):646-650.
- [2] Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors [J]. *Science*, 1992, 256(5053):102-105.
- [3] Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, et al. Detection of K ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(13):3568-3573.
- [4] Mao L, Hruban RH, Boyle JO, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(7):1634-1637.
- [5] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16):9236-9241.
- [6] Forsheve T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(136):136ra68.
- [7] Ulz P, Belic J, Graf R, et al. Whole-genome plasma sequencing reveals focal amplifications as a driving force in metastatic prostate cancer [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:12008.
- [8] Pertile MD, Halks-Miller M, Flowers N, et al. Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(405).
- [9] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13):1199-1209.
- [10] Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(8):1014-1022.

- [11] Zhu L, Zhang S, Xun Y, et al. Comparison of the amplification refractory mutation system, super amplification refractory mutation system, and droplet digital PCR for T790 M mutation detection in non-small cell lung cancer after failure of tyrosine kinase inhibitor treatment[J]. *Pathol Oncol Res*, 2018,24(4):843-851.
- [12] Wang W, Song Z, Zhang Y. A Comparison of ddPCR and ARMS for detecting EGFR T790M status in ctDNA from advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance[J]. *Cancer Med*, 2017,6(1):154-162.
- [13] Schmiegel W, Scott RJ, Dooley S, et al. Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissuebased RAS testing[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(2):208-219.
- [14] Postel M, Roosen A, Laurent-Puig P, et al. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(1): 7-17.
- [15] Chae YK, Davis AA, Jain S, et al. Concordance of genomic alterations by next-generation sequencing in tumor tissue versus circulating tumor DNA in breast cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017,16(7):1412-1420.
- [16] Giroux LE, Herbretau G, Dumenil C, et al. Circulating tumor DNA evaluated by Next-Generation Sequencing is predictive of tumor response and prolonged clinical benefit with nivolumab in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(5): e1424675.
- [17] Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(5):547-555.
- [18] Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, et al. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancerpatients: impact on biomarker testing[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(6):665-672.
- [19] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra24.
- [20] Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed high-grade serous ovarian carcinoma: a retrospective study [J]. *Plos Med*, 2016, 13(12): e1002198.
- [21] Faria G, Silva E, Da Fonseca C, et al. Circulating cell-free DNA as a prognostic and molecular marker for patients with brain tumors under perillyl alcohol-based therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1610.
- [22] Hadano N, Murakami Y, Uemura K, et al. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreaticcancer [J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(1):59-65.
- [23] Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis[J]. *Int J Cancer*, 2002,100(5):542-548.
- [24] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13):1199-1209.
- [25] Babayan A, Pantel K. Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer [J]. *Genome Med*, 2018, 10(1):21.
- [26] Cohen PA, Flowers N, Tong S, et al. Abnormal plasma DNA profiles in early ovarian cancer using a non-invasive prenatal testing platform: implications for cancer screening[J]. *BMC Med*, 2016, 14(1):126-131.
- [27] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. *Nat Med*, 2014, 20(5):548-554.
- [28] Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10):2643-2650.
- [29] Cohen PA, Flowers N, Tong S, et al. Abnormal plasma DNA profiles in early ovarian cancer using a non-invasive prenatal testingplatform: implications for cancer screening[J]. *BMC Med*, 2016, 14(1):126.
- [30] Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin[J]. *Cell*, 2016,164(1-2):57-68.
- [31] Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016,113(13):E1826-E1834.
- [32] Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(136):136ra68.
- [33] Xi L, Pham TH, Payabyab EC, et al. Circulating tumor DNA as an early indicator of response to T cell transfer immunotherapy in metastatic melanoma [J]. *Clin. Cancer Res*, 2016, 22(22):5480-5486.
- [34] Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients [J]. *J Thorac Oncol*, 2015,10(10):1437-1443.

- [35] 易鑫, 吕小星, 赵美茹, 等. 一种检测血浆 cfDNA 中 BCR 和 TCR 免疫组库的方法: 中国, CN105087789B [P]. 2018-08-03.
- [36] Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(346):346ra92.
- [37] Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasmagenotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(28):3375-3382.
- [38] Gao J, Wang H, Zang W, et al. Circulating tumor DNA functions as an alternative for tissue to overcome tumor heterogeneity in advanced gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(9):1881-1887.
- [39] Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Horswell S, et al. Detection of ubiquitous and heterogeneous mutations in cell-free DNA from patients with early-stage non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(5):862-867.
- [40] Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8760.

(上接第 534 页)

- [10] 曾丽春, 何玲. 新生儿细菌性脑膜炎 99 例临床特点分析 [J]. *实用临床医学*, 2015, 16(9):57-60.
- [11] Ross D, Rosegay H, Pons V. Differentiation of aseptic and bacterial meningitis in postoperative neurosurgical patients [J]. *J Neurosurg*, 1988, 69(5):669-674.
- [12] 李幽然, 张国军, 高之宪, 等. 脑脊液降钙素原在鉴别颅内细菌性感染与无菌性脑膜炎中的作用 [J]. *中华神经外科杂志*, 2015, 31(10):997-1000.
- [13] 商怀玉, 刘威, 杨冬梅. 小儿化脓性脑膜炎和病毒性脑炎、脑膜炎时血清和脑脊液中降钙素原变化的对比研究 [J]. *中国实用医药*, 2013, 8(10):120-121.
- [14] Li Y, Zhang G, Ma R, et al. The diagnostic value of cerebrospinal fluids procalcitonin and lactate for the differential diagnosis of post-neurosurgical bacterial meningitis and aseptic meningitis [J]. *Clinical Biochemistry*, 2015, 48(1-2):50-54.
- [15] 张国新, 隋明亮, 张劲松. 脑脊液降钙素原对开颅术后细菌性脑膜炎的早期诊断价值 [J]. *中国综合临床*, 2015, 12(11):995-999.
- [16] 陈嘉蕾. 脑脊液乳酸与血清降钙素原在儿童颅内感染定性中的应用 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- [17] Smith SM, Buccini F. Use of D-lactate measurements in the diagnosis of bacterial infections [J]. *J Infect Dis*, 1986, 154(4):658-664.
- [18] Halperin ML, Kamel KS. D-lactic acidosis: turning sugar into acids in the gastrointestinal tract [J]. *Kindney Int*, 1996, 49(1):1-8.
- [19] 张翼, 余刚. 降钙素原在颅内感染中的临床运用研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2012, 24(10):2732-2734.

(上接第 521 页)

- [8] Forte L, Torricelli P, Boanini E, et al. Quercetin and alendronate multi-functionalized materials as tools to hinder oxidative stress damage [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(12):3293-3303.
- [9] 程少璋, 罗清, 高玉桥, 等. 水翁花抗炎镇痛解热作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(2):375-376.
- [10] 刘文君, 李兆亮, 程宁波, 等. 水翁花中 1 个抗炎活性的新橙酮 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(7):1467-1470.
- [11] Zhang L, Lu Y. Inhibitory activities of extracts from *Cleistocalyx operculatus* flower buds on pancreatic lipase and α -amylase [J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235(6):1133-1139.
- [12] 朱贝贝, 刘萍萍, 李淑玲, 等. 当归红芪超滤膜提取物对过氧化氢致 PC12 细胞凋亡的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(6):68-72.
- [13] 程智勇, 杨雁鸿, 杨丽莉, 等. Tip30 基因过表达对人胃癌细胞生长的影响及分子机制 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(2):78-82.
- [14] 高健美, 雷鸣, 令狐浪, 等. 基于 ROS/GSK-3 β 信号通路研究淫羊藿次苷 II 对过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(5):23-27.
- [15] Li SH, Su SY, Liu JL, et al. Differential Regulation of microRNAs in Patients with Ischemic Stroke [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2015, 12(3):214-221.
- [16] Bidzhekov K, Gan L, Denecke B, et al. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(4):619-625.

2019年第11卷中文总目录

述评&专家讲座

- 遗传代谢病诊疗新进展及面临的新挑战 郝虎 肖昕(1)
- ctDNA 检测在结直肠癌临床诊疗中的应用进展 谢英超 周春莲 徐伟文(73)
- 循环外泌体 miRNAs 在结直肠癌中的标志作用和临床转化中的挑战 刘学娟 甘海宁 张丽妹 等(157)
- 肝纤维化的影像学定量技术进展评述 马孟杰 肖泽宇 梁建业 等(249)
- 高灵敏度 HBV DNA 检测的临床应用及意义 王杰 于广鑫 鲁凤民(343)
- 丙型肝炎病毒生活周期中脂蛋白代谢的研究进展 杨银荣 王谦(441)

论 著

- 广东佛山地区人群 *CYP2C19* 基因多态性及氯吡格雷药效反应的影响因素分析 林静 杨洁飞 梁权辉 等(6)
- 乌鲁木齐地区维吾尔族 *ORMDL3* 基因单核苷酸多态位点与哮喘易感性的研究 王玲 魏研荣 王丽霞 等(11)
- miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究 田敬华 杨金玲 秦杰 等(17)
- 遗忘性轻度认知功能障碍与 *MTHFR* C677T 基因多态性及血浆同型半胱氨酸水平研究 邢红宇 卢瑞丽 梁宁 等(22)
- 三亚市汉族和黎族女性 *MTHFR* 与 *MTRR* 基因多态性分布特征 吴利 陈少金 李周扬 等(28)
- 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义 王静 李馨筱 吴琳娜 等(33)
- 应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响 王宝 孙媛 宋康 等(39)
- 血浆 NT-proBNP 水平对持续性房颤患者射频消融术后预后的预测价值 孙小艳 徐立彦 李晨 等(44)
- 人免疫球蛋白对终末期肝病合并感染患者肝功能、免疫功能及凝血功能的干预作用 段红光 周爱静 程崇勇 等(49)
- 厄贝沙坦与前列地尔联用治疗糖尿病肾病的可行性分析 张华贞 赵晓琴 吴琼皎(54)
- 血清癌胚抗原、甲状腺球蛋白及半乳凝集素-3 水平在甲状腺癌鉴别诊断中的价值 温琥玲 谢建平 林师宇 等(58)
- 利用 NGS 技术同时检测缺失和点突变型地中海贫血 黄杰 杨旭 孙楠 等(79)
- 两种错义突变 p.Glu502Lys 和 p.Gly542Ser 所致遗传性XII缺陷症家系的分析 翁妙珊 林芬 章金灿 等(86)
- PPARGC1* 启动子甲基化与 II 型糖尿病发病相关性分析 梁爽 王伟伟 孙力 等(91)
- ASAP1* 和 *GSTM3* 基因多态性与肺结核易感性的相关性研究 张国栋 宋刚 李明辉(96)
- 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究 李飞 李丽娟 梁德志 等(101)
- 泸州地区冠心病 PCI 治疗患者 *CYP2C19* 基因多态性分布的研究 彭胡 唐克彬 颜彪 等(107)
- HBV DNA 高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价 余学高 邓间开 何小洪 等(111)
- 左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者 Treg/Th17 细胞、血清炎症因子和肾功能指标的影响 鲁冰 任东升 栗明(117)
- 乳腺癌患者血清性激素、IGF-1、VEGF 和组织 LOX 水平与淋巴结转移的相关性分析 邢海霞 赵明燕 郭勇(122)
- 2 型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析
..... 韩晨鹏 徐清芳 张美华 等(128)
- 血小板生长因子、白介素-17 在肺纤维化诊断及预后的价值 徐林 罗义华 李霞(132)
- 代谢综合征对行根治术前列腺癌患者预后的影响 曾明坤 刘玲 张晓梅 等(136)
- 玉溪地区高敏肌钙蛋白 T 在人群中的分布特点分析 叶丹 冯磊 吴英松(141)
- B 群链球菌 CAMP 阴性株的表型及分子特征初步分析 邓颖颖 孔银波 姜长宏 等(164)
- 中国南方客家人群乙醛脱氢酶 2 基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究 侯经远 谢运泉 赵平森 等(170)
- 利多卡因对发育期海马神经细胞生长的抑制作用及相关机制研究 陈兰涛 孙鑫 尹辉 等(176)
- 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药机制研究和同源性分析 谭坪海 陈利达 郭鹏豪 等(182)
- 胃幽门螺杆菌感染后 *Semaphorin 5A* 致胃癌可能机制的研究 刘涛 李睿 龚琳 等(189)

结肠癌患者组织中 AKT2、Annexin A1 表达水平及其临床意义 孙清森 孙连生 徐建利 等(194)

长链非编码 RNA *LINC00393* 在子宫内膜癌临床预后判断中的意义 麦碧 陈永秀 胡桂英 等(198)

防城港市 2 292 例女性宫颈 HPV 感染与基因分型分析 蓝家富(204)

循环肿瘤细胞(CTC)在乳腺癌预后与化疗评估中的应用 梁志洪 陈结贞 陈永雪 等(209)

丙型肝炎抗体阳性患者 HCV RNA 与肝功能指标联合检测的意义 朱少美 刘集鸿 周潇(214)

LASP-1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征的相关性分析 李君强 蒋茂芬 唐晶晶 等(219)

普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响 韩莉莎 王琼 李丹 等(224)

Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及利福平耐药性的应用价值研究 翁绳凤 李宁 邢俊蓬 等(229)

全自动核酸提取检测仪选择和评价方案的建立和应用 戎国栋 赵鸿 吴蕾 等(233)

丙泊酚调控 miR-133a/SOX4 表达对结直肠癌 HCT116 细胞增殖凋亡的影响 韩俊 赵静 张立群(238)

染色体拷贝数变异国家参考品的制备及标定 贾峥 张文新 李丽莉 等(256)

百日咳临床流行病学特点及诊断方法的比较研究 李玥 袁林 王青 等(263)

一种常见致病菌耐药基因检测芯片的建立及其应用 郭健莲 肖斌龙 刘惠娜 等(268)

miR-21 在黄芪甲苷保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症损伤过程中的作用 常方圆 冯泽瑞 许迎春 等(276)

miR-548c-3p 通过调控 TRIM59 表达对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响 年士艳 冯磊(283)

人防御素 HD-5 在胃癌发生发展中的作用研究 尚晓宇 顾国威 柳国权 等(290)

细胞免疫联合手术对结直肠癌肝转移患者生存质量的影响 许立国 冯广森 林亚超 等(295)

龙葵碱联合 *KLF16* 基因对胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究 赵舒扬 雷艳杰 马世杰 等(303)

直肠癌患者外周血中 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达及临床意义 赵梅 张志宏 郭忠燕 等(310)

硬膜外阻滞麻醉术对结肠癌根治术患者认知功能及炎性蛋白表达的影响研究 陈杰华 马海燕(315)

尿毒症患者血液透析前后血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平变化及其临床意义 谢希 刘莉莉 李书会(320)

PLT-I、PLT-F、RDW、MCHC 指标变化与检验标本不同保存条件的关系 胡耀华 卓书伟 符春苗(325)

东莞市 2017-2018 年儿童下呼吸道感染病例监测结果 孙志豪 张荣华 钟超珍(329)

乙型肝炎病毒核酸实时荧光 PCR 超敏检测方法的建立与评价 夏乔 廖丽丽 董志强 等(348)

高灵敏乙型肝炎病毒核酸检测在术前筛查中的应用价值 李宝琪 陈培松 黄浩 等(355)

高敏与普通荧光定量 PCR 技术在慢乙肝患者抗病毒疗效监测中的对比研究 卢建华 杨莉 赵召霞 等(361)

高灵敏度 HBV DNA 检测在乙型肝炎相关性肝细胞肝癌中的临床应用价值研究 周莹 张军霞 黄舒 等(365)

双靶标高敏 HBV DNA 检测技术在 HBeAg 阴性患者临床诊断中应用 冯磊(369)

两种 HBV DNA 定量检测方法的临床对比研究 王爽 郭杰 王大刚 等(374)

高灵敏度 HCV RNA 检测在慢性丙型肝炎患者中的诊断及治疗检测应用 黄成军 程书权(379)

两种 HCV RNA 定量检测方法的临床对比研究 彭亚柏 彭雅兰 管吉鹏 等(383)

HBeAg 与抗-HBe 双阳性的慢性乙型肝炎患者临床特征分析 罗琳 张廷超 刘书刚(387)

胱抑素 C 和肝动脉阻力指数在肝硬化患者中的临床意义 邵小梅 杨杨 韩丽霞(391)

抗乙型肝炎病毒对肝癌 TACE 术后复发转移的临床疗效及免疫功能研究 陈明 曹洋(396)

miR-3182 调控肝癌细胞凋亡和放射敏感性机制研究 于凤芹 徐云芳 张青(401)

外周血细胞因子在慢性乙型肝炎的治疗效果判断的价值研究 隋佳 于梦 朱淑珍 等(408)

丙型肝炎患者 HCV RNA 载量与 HCV-cAg 及 SOD、FFA 相关性分析 方伟祯 古文深 房绮梅 等(414)

miR-122、miR-150 在隐匿性乙型肝炎鉴别诊断中的研究 马青松 张云芬(418)

下一代测序法检测乙型肝炎病毒 YMDD 突变的方法学建立及性能评价 余学高 邓间开 陈耀铭 等(446)

Snail 基因甲基化与 TGFβ1 诱导前列腺癌细胞发生 EMT 的相关性研究 杜彦丹 牛艺卿 郑海军 等(451)

血清 HMGB1、TGFβ1 及 GP73 检测对脓毒症并发肝损伤预后的评估价值 宋莹 李世朋 焦伟伟(457)

miR-137 靶向下调 SETD7 表达对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激的影响研究 王彦利 李纪明 罗进光(462)

基于分子标签二代测序技术的非小细胞肺癌驱动基因变异分析 刘小云 吴小延 邵琼 等(468)

PSCA 基因单核苷酸多态性位点与胃溃疡易感性的研究 莫大超 李君久 彭亮 等(474)

FBN1 基因 c.2418A>G 突变对转录影响的研究 张岳 李金洁 刁艳君 等(479)

慢病毒介导 *HMGN5* 基因沉默对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制研究 孙娟 信艳萍 张国梅 等(485)

术后早期 PTX-3 及 PCT 检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染的预测价值 杨秉融 王瑾(491)

不同 HBV 基因型慢性乙型肝炎患者的血清 HBV DNA、PreS1、HBeAg 检测结果分析 吴湃 吴坤河 刘海燕 等(495)

南京地区 1 776 例外周血淋巴细胞染色体核型分析 余梦瑶 顾敏 赵鸿(499)

血清 Chemerin、25(OH)D3、visfatin 水平检测对妊娠期糖尿病的诊断价值及与患者胰岛素抵抗的关联性
..... 李茂香 李玉 吕媛媛 等(503)

CEA、NSE、SCCA 联合 miR-21 检测与肺癌患者临床病理特征、疗效及预后的相关性研究 汤乔雅 宫郡茗 马艳凌(508)

卵巢癌患者血清 miR-21 及糖类抗原 125 水平变化及意义 尤娟(513)

水蓼花对过氧化氢诱导神经细胞凋亡的影响 于广周 谭文刚 张昊(517)

血浆 miR-192、miR-29c 水平对 2 型糖尿病肾病诊断的临床意义 何爽 黄萍 范明娟(522)

脓毒症患者血清中白细胞介素-6 和降钙素原表达及其临床意义 刘蕾蕾 华玮 居培红 等(527)

D-乳酸和降钙素原对细菌性脑膜炎的诊断价值 范文兵 周银锁(531)

GATA3、CK20 在膀胱尿路上皮癌中的表达和意义 曾玉梅 杜娟 陈应智 等(535)

综述

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

α 地中海贫血筛查及诊断技术的进展 沈茹 陈云明 杨晓红 等(68)

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

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

树突状细胞及中性粒细胞在狼疮发病中的研究进展 卿平英 刘毅(245)

自然流产的遗传学检测研究进展 刘祥举(338)

高灵敏度 HBV DNA 临床检测应用现状及发展趋势 里进 李一荣(422)

高敏 HCV RNA 检测技术的临床应用 刘娜 李春霞 东冰 等(428)

乙型肝炎病毒耐药性研究进展 张劲丰 安宏亮 苏荣 等(434)

循环肿瘤 DNA 的临床应用研究进展 程筱雯(539)

专家风采

王青 (封二)

陈填烽 (封二)

徐学虎 (封二)

罗良平 (封二)

鲁凤民 (封二)

王谦 (封二)

实验室巡礼

南方医科大学珠江医院神经内科 (封三)

广东省纳米化学创新药物工程技术研究中心 (封三)

广东省产科重大疾病重点实验室 (封三)

广州市分子与功能影像临床转化重点实验室 (封三)

北京大学基础医学院鲁凤民教授实验室 (封三)

山东大学齐鲁医院(青岛)检验科 (封三)

Total Contents (Volume 11, 2019)

COMMENTS

The recent advances and challenges in diagnosis and therapy of inherited metabolic disorders <i>HAO Hu, XIAO Xin</i>	(1)
Progress in the application of circulating tumor DNA detection in clinical diagnosis and treatment of colorectal cancer <i>XIE Yingchao, ZHOU Chunlian, XU Weiwen</i>	(73)
The role of circulating exosomal miRNAs in colorectal cancer and the challenges in clinical transformation <i>Liu Xuejuan, Gan Haining, Zhang Limei, Xu Xuehu</i>	(157)
Advances of imaging quantitative techniques for liver fibrosis <i>MA Mengjie, XIAO Zeyu, LIANG Jianye, LUO Liangping</i>	(249)
Clinical application and significance of high-sensitivity hepatitis B virus-DNA detection <i>WANG Jie, YU Guangxin, LU Fengmin</i>	(343)
Research progress on lipoprotein metabolism in the hepatitis C virus life cycle <i>YANG Yinrong, WANG Qian</i>	(441)

ORIGINAL ARTICLES

Analysis of <i>CYP2C19</i> gene polymorphism and influence factors of clopidogrel effect in foshan population, Guangdong <i>LIN Jing, YANG Jiefei, LIANG Quanhui, LI Weixuan</i>	(6)
Study on single nucleotide polymorphism loci of <i>ORMDL3</i> gene and susceptibility to asthma in Urumqi Uygur Autonomous State <i>WANG Ling, WEI Yanrong, WANG Lixia, ZHANG Yanli, WANG Jing</i>	(11)
The role of miR-34 promoter methylation in the pathogenesis of gastric cancer <i>TIAN Jinghua, YANG Jinling, QIN Jie, ZHAO Linlin, LIU Min, HONG Yanying</i>	(17)
Relationship between amnesic mild cognitive impairment, <i>MTHFR</i> C677T gene polymorphism and plasma homocysteine level <i>XING Hongyu, LU Ruili, LIANG Ning, ZHOU Junxia</i>	(22)
Distribution characteristics of <i>MTHFR</i> and <i>MTRR</i> gene polymorphisms among Han and Li women in Sanya city <i>WU Li, CHEN Shaojin, LI Zhouyang, CHEN qian, LI Yuanli</i>	(28)
Expression and significance of nuclear factor κ B/p65, Bcl-2 and Bax in diffuse large B-cell lymphoma <i>WANG Jing, LI Xinxiao, WU Linna, LIU Fan</i>	(33)
Effects of stress hyperglycemia on inflammatory states, levels of peripheral blood lactate and MMP-9 and 28 d mortality rate in patients with craniocerebral injury <i>WANG Bao, SUN Yuan, SONG Kang, GU Changwei</i>	(39)
Predictive value of plasma NT-proBNP level in prognosis of patients with persistent atrial fibrillation after radiofrequency ablation <i>SUN Xiaoyan, XU Liyan, LI Cheng, WU Linna, WEI Lijuan</i>	(44)
Intervention of human immunoglobulin on liver function, immune function and coagulation function in patients with end-stage liver disease complicated with infection <i>DUAN Hongguang, ZHOU Aijing, CHENG Chongyong, GAO Feng</i>	(49)
Feasibility analysis of irbesartan combined with alprostadil in the treatment of diabetic nephropathy <i>ZHANG Huazhen, ZHAO Xiaoqin, WU Qiongjiao</i>	(54)
The value of serum carcinoembryonic antigen, thyroglobulin and galectin-3 in differential diagnosis of thyroid cancer <i>WEN Huling, XIE Jianping, LIN Shiyu, WEN Dan</i>	(58)
Simultaneous detection of deletion and point mutation thalassemia using NGS technology <i>HUANG Jie, YANG Xu, SUN Nan, SUN Binyu, QU Shoufang</i>	(79)
A pedigree analysis of hereditary XII deficiency caused by two missense mutations of p.Glu502Lys and p.Gly542Ser <i>WENG Miaoshan, LIN Fen, ZHANG Jincan, WU Jiaoren, LI Dengsong, XIE Yuqiang, YANG Liye</i>	(86)
Correlation analysis between <i>PPARGC1</i> promoter methylation and type II diabetes <i>LIANG Shuang, WANG Weiwei, SUN Li, ZOU Guanghui, DONG Zhiwu</i>	(91)
Correlation between <i>ASAP1</i> and <i>GSTM3</i> gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis <i>ZHANG Guodong, SONG Gang, LI Minghui</i>	(96)
Investigation on antimicrobial resistance characteristics and mechanism of imipenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>LI Fei, LI Lijuan, LIANG Dezhi, WANG Fengping, ZHANG Bashan</i>	(101)
Study of the distribution of <i>CYP2C19</i> gene polymorphism in patients with coronary heart disease treated with PCI in Luzhou area <i>PENG Hu, TANG Kebin, YAN Biao, QIU Houbin, ZHU Bin</i>	(107)

Performance verification and clinical evaluation of HBV DNA high-sensitivity detection kit <i>YU Xuegao, DENG Jiankai, HE Xiaohong, CHEN Peisong, CUI Danli, HUANG Bin</i>	(111)
Effects of L-carnitine combined with hemodialysis on Treg/Th17 cells, serum inflammatory factors and renal function indexes in uremia patients <i>LU Bing, REN Dongsheng, LI Ming</i>	(117)
Correlation between serum sex hormones, IGF-1, VEGF and tissue LOX levels and lymph node metastasis in patients with breast cancer <i>XING Haixia, ZHAO Mingyan, GUO Yong</i>	(122)
The evaluation of combined detection of serum resistin, VEGF and glycated albumin in early diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes <i>HAN Chenpeng, XU Qingfang, ZHANG Meihua, CAO Liang</i>	(128)
The value of platelet growth factor and interleukin-17 in the diagnosis and prognosis of pulmonary fibrosis <i>XU Lin, LUO Yihua, LI Xia</i>	(132)
Effect of metabolic syndrome on prognosis of patients undergoing radical prostatectomy <i>ZENG Mingkun, LIU Ling, ZHANG Xiaomei, MA Tao</i>	(136)
Analysis of distribution characteristics of high-sensitivity troponin T in the population in Yuxi area, Yunnan <i>YE Dan, FENG Lei, WU Yingsong</i>	(141)
Preliminary analysis of phenotypic and molecular characterization of CAMP-negative Group B Streptococcus clinical isolate <i>DENG Yingying, KONG Yinbo, JIANG Changhong, DENG Jiankai, JIANG Lingxiao</i>	(164)
Association between acetaldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and acute myocardial infarction in a southern Chinese Hakka population <i>HOU Jingyuan, XIE Yunquan, ZHAO Pingsen, ZHONG Zhixiong</i>	(170)
Inhibitory effect of lidocaine on the growth of hippocampal neurons in developing period and related mechanisms <i>CHEN Lantao, SUN Xin, YIN Hui, YAO Yafei, DUAN Baomin</i>	(176)
Detection of drug-resistance gene and homology analysis of Acinetobacter baumannii <i>TAN Pinghai, CHEN Lida, GUO Penghao, LIAO Kang, WU Zhongwen, YE Daning, HUANG Bin</i>	(182)
Study on the mechanism of gastric cancer induced by <i>Semaphorin 5A</i> after <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>LIU Tao, LI Rui, GONG Lin, LI Geng, PAN Guoqing</i>	(189)
Expression levels and clinical significance of AKT2 and Annexin A1 in tissues of patients with colon cancer <i>SUN Qingsen, SUN Liansheng, XU Jianli, GU Bin, LI Chao</i>	(194)
Long non-coding RNA <i>LINC00393</i> in endometrial cancer and its prognostic implications <i>MAI Bi, CHEN Yongxiu, HU Guiying, LUO Xiping, LIU Tingyan</i>	(198)
Analysis of the HPV infection and genotyping distribution in 2 292 women in Fangchenggang city <i>LAN Jiafu</i>	(204)
Application of circulating tumor cells (CTC) in prognosis and chemotherapy evaluation of breast cancer <i>LIANG Zhihong, CHEN Jiezheng, CHEN Yongxue, GU Wenxin, WU Zehua</i>	(209)
Significance of combined detection of HCV RNA and liver function indexes in HCV antibody positive patients <i>ZHU Shaomei, LIU Jihong, ZHOU Xiao</i>	(214)
Expression of LASP-1 Protein in Non-small Cell Lung Cancer and Its Correlation with Clinicopathological Features <i>LI Junqiang, JIANG Maofen, TANG Jingjing, WANG Min, LIU Chunjiao, XIAO Weihua, MA Haifen</i>	(219)
Effects of pravastatin combined with metoprolol on the cardiac function, glucolipid metabolism and other related indexes in patients with diabetes mellitus complicated with coronary heart disease <i>HAN Lisha, WANG Qiong, LI Dan, WANG Siqu</i>	(224)
Clinical value of Xpert MTB/RIF in detection of Mycobacterium tuberculosis (MTB) and Rifampicin (RIF) resistance <i>WENG Shengfeng, LI Ning, XING Junpeng, ZHANG Changhai, GUO Wei</i>	(229)
Establishment and application on the selection and evaluation of automated nucleic acid extraction systems <i>RONG Guodong, ZHAO Hong, WU Lei, HUANG Peijun, WANG Fang, ZHANG Yan, XU Ting</i>	(233)
Propofol inhibits the HCT116 cell proliferation and promotes apoptosis of HCT116 cells by regulating the expression of microRNA-133a/SOX4 <i>HAN Jun, ZHAO Jing, ZHANG Liqun</i>	(238)
Preparation and calibration of the national reference for detection of chromosome copy number variations <i>JIA Zheng, ZHANG Wenxin, LI Lili, SUN Nan, QU Shoufang, HUANG Jie</i>	(256)
Comparative study on clinical epidemiological characteristics and diagnostic methods of pertussis <i>LI Yue, YUAN Lin, WANG Qing, GAO Wei, SHI Wei, MENG Qinghong, YU Dan, YAO Kaihu</i>	(263)
Establishment and application of an antibiotics-resistance gene detection chip for common pathogenic bacteria <i>GUO Jianlian, XIAO Binlong, LIU Huina, JIANG Xianhai, XU Zhongyu</i>	(268)
The role of miR-21 in the protective effect of astragaloside on ox-LDL-induced endothelial cell inflammatory injury <i>CHANG Fangyuan, FENG Zerui, XU Yingchun, ZHANG Qiuxia</i>	(276)
miR-548c-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by targeting TRIM59 <i>NIAN Shiyang, FENG Lei</i>	(283)

HD-5 inhibits gastric cancer proliferation , migration and tumor growth <i>SHANG Xiaoyu , GU Guowei , LIU Guoquan , QI Jing , XIE Qiang , LI Kun</i>	(290)
Effect of cellular immunity combined with operation on quality of life of patients with liver metastasis in colorectal cancer <i>XU Liguu , FENG Guangsen , LIN Yachao , LI Zhi</i>	(295)
Solanum nigrum combined with <i>KLF16</i> gene synergistically inhibit glioma cell proliferation and induce apoptosis <i>ZHAO Shuyang , LEI Yanjie , MA Shijie , GAO Ming</i>	(303)
Expression and clinical significances of <i>Galectin-3</i> mRNA , <i>MUC1</i> mRNA in peripheral blood of patients with rectal cancer <i>ZHAO Mei , ZHANG Zhihong , GUO Zhongyan , CHEN Ying</i>	(310)
Effect of Epidural Anesthesia on Cognitive Function and Inflammatory Protein Expression in Patients with Radical Resection of Colon Cancer <i>CHEN Jiehua , MA Haiyan</i>	(315)
The changes and clinical significance of serum NT-proBNP , BUA , cTnT levels in patients with uremia before and after hemodialysis <i>XIE Xi , LIU Lili , LI Shuhui</i>	(320)
Relationship between the changes of PLT-I , PLT-F , RDW and MCHC indexes and different storage conditions of test specimens <i>HU Yaohua , ZHUO Shuwei , FU Chunmiao</i>	(325)
A surveillance of children lower respiratory tract infection cases in Dongguan City , from 2017 to 2018 <i>SUN Zhihao , ZHANG Ronghua , ZHONG Chaozhen</i>	(329)
Establishment and evaluation of a hypersensitivity method of real-time fluorescent PCR for hepatitis B virus detection <i>XIA Qiao , LIAO Lili , DONG Zhiqiang , YANG Honghui , JIANG Xiwen</i>	(348)
The application value of high-sensitivity HBV nucleic acid test in preoperative screening <i>LI Baoqi , CHEN Peisong , HUANG Hao , YU Xuegao , HUANG Bin</i>	(355)
Comparative study of high-sensitivity and conventional fluorescence quantitative PCR in the monitoring of antiviral efficacy in patients with chronic hepatitis B <i>LU Jianhua , YANG Li , ZHAO Zhaoxia , LI Qianlin , LI Minran , LIU Yuzhen , DAI Erhei , CHEN Xiuli</i>	(361)
Clinical value of high sensitive HBV DNA detection in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma <i>ZHOU Ying , ZHANG Junxia , HUANG Shu , LIU Liming , GUO Wei</i>	(365)
Application of dual-target hyper-sensitivity hepatitis B DNA detection technology in clinical diagnosis of HBeAg negative patients <i>FENG Lei</i>	(369)
Clinical comparative study of two quantitative methods for HBV DNA detection <i>WANG Shuang , GUO Jie , WANG Dagang , SHI Jingren , PAN Meichen , YIN Shangqi , HE Chaonan , MENG Huan , ZHANG Xiang , WANG Yajie</i>	(374)
The clinical application of high sensitivity HCV RNA detection for diagnosis and treatment in patients with chronic hepatitis C <i>HUANG Chengjun , CHENG Shuquan</i>	(379)
Clinical comparative study of two methods for quantitative detection of HCV RNA <i>PENG Yabai , PENG Yalan , GUAN Jipeng , WANG Min</i>	(383)
Clinical characteristics of chronic hepatitis B patients with both HBeAg and HBeAb positive <i>LUO Lin , ZHANG Tingchao , LIU Shugang</i>	(387)
Clinical significance of cystatin C and hepatic artery resistance index in patients with liver cirrhosis <i>SHAO Xiaomei , YANG Yang , HAN Lixia</i>	(391)
The clinical effect and immune function of anti HBV on recurrence and metastasis of liver cancer after transarterial chemoembolization <i>CHEN Ming , CAO Yang</i>	(396)
miR-3182 promotes the apoptosis of hepato-carcinoma cells and enhance the radio-sensitivity of liver cancer cells <i>YU Fengqin , XU Yunfang , ZHANG Qing</i>	(401)
Study on the value of peripheral blood cytokines in the treatment of chronic hepatitis B <i>SUI Jia , YU Meng , ZHU Shuzhen , WEI Qinzheng</i>	(408)
Correlation analysis of HCV RNA , HCV-cAg , SOD and FFA in hepatitis C patients <i>FANG Weizhen , GU Wenshen , FANG Qimei , ZENG Wuyi , DING Rui , DUAN Chaohui</i>	(414)
Study on miR-122 and miR-150 in differential diagnosis of occult hepatitis <i>MA Qingsong , ZHANG Yunfen</i>	(418)
Establishment and evaluation of next-generation sequencing for the detection of hepatitis B virus YMDD-motif mutations <i>YU Xuegao , DENG Jiankai , CHEN Yaoming , CHEN Peisong , HE Xiaohong , ZHONG Liangying , HUANG Bin</i>	(446)
Correlation between methylation of snail gene and EMT induced by TGFβ1 in prostate cancer cells <i>DU Yandan , NIU Yiqing , ZHENG Haijun , WANG Xiaoyan , JIANG Yuhai , CHEN Haiqiu , LI Yinyan , SUN Gang , LI Chunyu , LU Desheng , SUN Hui</i>	(451)
Evaluation of serum HMGB1 , TGF-β1 and GP73 in the prognosis of sepsis complicated with liver injury <i>SONG Ying , LI Shipeng , JIAO Weiwei</i>	(457)

Effect of miR-137 targeting down-regulation of SETD7 expression on oxidative stress induced by hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes
WANG Yanli, LI Jiming, LUO Jinguang (462)

Analysis of driving gene mutations in non-small cell lung cancer using UMI-based next-generation sequencing
LIU Xiaoyun, WU Xiaoyan, SHAO Qiong, LONG Yakang, WANG Haiyun, DENG Ling (468)

Study on the single nucleotide polymorphisms of PSCA gene and susceptibility to gastric ulcer
MO Dachao, LI Junjiu, PENG Liang, LIU Zhiyuan, WANG Jieryun, YUAN Jiru (474)

Study on the effect of FBN1 gene c.2418A>G mutation on transcription
ZHANG Yue, LI Jinjie, DIAO Yanjun, YANG Liu, HAO Xiaoke (479)

Effect of lentivirus mediated HMGN5 gene silencing on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells and its mechanism
SUN Juan, XIN Yanping, ZHANG Guomei, TIAN Xiaona, LIU Huimin (485)

Predictive value of early detection of PTX-3 and PCT for pulmonary infection after gynecological laparoscopic surgery under general anesthesia
YANG Bingrong, WANG Jin (491)

Serum HBV-DNA, preS1, HBeAg in patients with various HBV genotype of chronic virus hepatitis B
WU Pai, WU Kunhe, LIU Haiyan, ZHANG Douxing, HU Anqun (495)

Chromosome karyotype analysis of 1 776 peripheral blood lymphocytes in Nanjing Area
YU Mengyao, GU Min, ZHAO Hong (499)

The diagnostic value of serum chemerin, 25(OH)D3, visfatin levels in gestational diabetes mellitus and their association with insulin resistance
LI Maoxiang, LI Yu, LYU Yuanyuan, CAO Yongxian (503)

Correlation between CEA, NSE, SCCA combined with miR-21 and clinicopathological features, efficacy and prognosis in patients with lung cancer
TANG Qiaoya, GONG Junming, MA Yanling (508)

Changes and significance of serum miR-21 and carbohydrate antigen 125 in patients with ovarian cancer
YOU Juan (513)

Effect of cleistocalyx operculatus flower buds on hydrogen peroxide induced apoptosis of nerve cells
YU Guangzhou, TAN Wengang, ZHANG Hao (517)

The clinical significance of plasma mir-192 and mir-29c levels in diagnosis of type 2 diabetic nephropathy
HE Shuang, HUANG Ping, FAN Mingjuan (522)

Expression of interleukin -6 and procalcitonin in serum of patients with sepsis and its clinical significance
LIU Leilei, HUA Wei, JU Peihong, ZHANG Wenyan, HUANG Kan, LI Zheng (527)

Diagnostic value of D-lactic acid and procalcitonin in bacterial meningitis
FAN Wenbing, ZHOU Yinsuo (531)

Expression and significance of GATA3 and CK20 in bladder urothelial carcinoma
ZENG Yumei, DU Juan, CHEN Yingzhi, CHU Bin (535)

REVIEWS

Regulation of miRNAs on the growth, development and function of natural killer cells
HUANG Qiuping, YUAN Huan, WANG Yilin, HUANG Qingsheng, LI Qi (63)

Progress in screening and diagnostic techniques for α-thalassemia
SHEN Ru, CHEN Yunming, YANG Xiaohong, WANG Xiaoyan (68)

Advances in the application of imaging and molecular detection technology in the diagnosis of Alzheimer’s disease
LI Zhuoran, WEI Xinhua, JIANG Xinqing (146)

Application of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Genetic related Intellectual Disability
SHEN Ru, REN Baoyan, JIANG Hongchao, WANG Xiaoyan (152)

Research progress of dendritic cells and neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus
QING Pingying, LIU Yi (245)

Advances in genetic testing of spontaneous abortion
LIU Xiangju (338)

Current status, questions and trend of the clinical ultrasensitive hepatitis B virus DNA detection
LI Jin, LI Yirong (422)

Clinical application of hypersensitive HCV RNA detection technology
LIU Na, LI Chunxia, DONG Bing, ZHOU Lulu, ZHANG Ruiqin, XU Guanghua (428)

Progress in research on hepatitis B virus resistance
ZHANG Jinfeng, AN Hongliang, SU Rong, LV Weifeng (434)

Progress in clinical application of circulating tumor DNA
CHENG Xiaowen (539)

2019年第11卷作者索引(按汉语拼音字母顺序排列)

- A**
安宏亮(5):434
- C**
曹亮(2):128
曹洋(5):396
曹永献(6):503
常方圆(4):276
陈海秋(6):451
陈杰华(4):315
陈结贞(3):209
陈兰涛(3):176
陈利达(3):182
陈明(5):396
陈培松(2):111
(5):355
(6):446
陈谦(1):28
陈少金(1):28
陈秀丽(5):361
陈耀铭(6):446
陈营(4):310
陈应智(6):535
陈永秀(3):198
陈永雪(3):209
陈云明(1):68
程崇勇(1):49
程书权(5):379
程筱雯(6):539
储兵(6):535
崔丹荔(2):111
- D**
戴二黑(5):361
邓间开(2):111
(6):446
邓间开(3):164
邓玲(6):468
邓颖颖(3):164
刁艳君(6):479
丁睿(5):414
东冰(5):428
董志强(5):348
董志武(2):91
杜娟(6):535
杜彦丹(6):451
段宝民(3):176
段朝晖(5):414
段红光(1):49
- F**
范明娟(6):522
范文兵(6):531
房绮梅(5):414
方伟祯(5):414
冯广森(4):295
冯磊(2):141
(4):283
(5):369
冯泽瑞(4):276
符春苗(4):325
- G**
甘海宁(3):157
高峰(1):49
高明(4):303
高薇(4):263
宫郡茗(6):508
龚琳(3):189
谷斌(3):194
古长维(1):39
古文深(5):4141
古文鑫(3):209
顾国威(4):290
顾敏(6):499
管吉鹏(5):383
郭杰(5):374
- 郭健莲(4):268
郭鹏豪(3):182
郭威(3):229
郭威(5):365
郭勇(2):122
郭忠燕(4):310
- H**
韩晨鹏(2):128
韩俊(3):238
韩莉莎(3):224
韩丽霞(5):391
郝虎(1):1
郝晓柯(6):479
何超男(5):374
何爽(6):522
何小洪(2):111
(6):446
洪燕英(1):17
侯经远(3):170
胡安群(6):495
胡桂英(3):198
胡耀华(4):325
华玮(6):527
黄彬(2):111
(3):182
(5):355
(6):446
黄成军(5):379
黄浩(5):355
黄杰(2):79
(4):256
黄侃(6):527
黄珺璐(3):233
黄萍(6):522
黄庆生(1):63
黄秋萍(1):63
黄舒(5):365
- J**
贾峥(4):256
姜长宏(3):164
姜玉海(6):451
蒋鸿超(2):152
蒋茂芬(3):219
蒋析文(5):348
江凌晓(3):164
江先海(4):268
江新青(2):146
焦伟伟(6):457
居培红(6):527
- K**
孔银波(3):164
- L**
蓝家富(3):204
雷艳杰(4):303
李宝琪(5):355
李超(3):194
李晨(1):44
李春霞(5):428
李春雨(6):451
李丹(3):224
李邓松(2):86
李飞(2):101
李庚(3):189
李纪明(6):462
李金洁(6):479
李君久(6):474
李君强(3):219
李坤(4):290
李丽娟(2):101
李丽莉(4):256
李茂香(6):503
李敏然(5):361
李明辉(2):96
- 李宁(3):229
李琦(1):63
李芊璘(5):361
李睿(3):189
李世朋(6):457
李书会(4):320
李炜焯(1):6
李霞(2):132
李馨筱(1):33
李一荣(5):422
李玉(6):503
李玥(4):263
李铮(6):527
李智(4):295
李周扬(1):28
李卓然(2):146
里进(5):422
栗明(2):117
黎元莉(1):28
梁德志(2):101
梁建业(4):249
梁宁(1):22
梁权辉(1):6
梁爽(2):91
梁志洪(3):209
廖康(3):182
廖丽丽(5):348
林芬(2):86
林静(1):6
林师宇(1):58
林亚超(4):295
刘春姣(3):219
刘凡(1):33
刘海燕(6):495
刘会敏(6):485
刘惠娜(4):268
刘集鸿(3):214
刘蕾蕾(6):527
刘莉莉(4):320
刘黎明(5):365
刘玲(2):136
刘敏(1):17
刘娜(5):428
刘书刚(5):387
刘涛(3):189
刘婷艳(3):198
刘祥举(4):338
刘小云(6):468
刘学娟(3):157
刘毅(3):245
刘玉珍(5):361
刘志远(6):474
柳国权(4):290
龙亚康(6):468
鲁冰(2):117
鲁凤民(5):343
陆德生(6):451
卢建华(5):361
卢瑞丽(1):22
罗进光(6):462
罗良平(4):249
罗琳(5):387
罗喜平(3):198
罗义华(2):132
吕微风(5):434
吕媛媛(6):503
- M**
马海芬(3):219
马海燕(4):315
马孟杰(4):249
马青松(5):418
马世杰(4):303
马涛(2):136
马艳凌(6):508
麦碧(3):198
孟欢(5):374
- 孟庆红(4):263
莫大超(6):474
- N**
年士艳(4):283
牛艺卿(6):451
- P**
潘国庆(3):189
潘美晨(5):374
彭胡(2):107
彭亮(6):474
彭亚柏(5):383
彭雅兰(5):383
- Q**
齐靖(4):290
秦杰(1):17
卿平英(3):245
邱厚兵(2):107
曲守方(2):79
(4):256
- R**
任保艳(2):152
任东升(2):117
戎国栋(3):233
- S**
尚晓宇(4):290
邵琼(6):468
邵小梅(5):391
沈茹(1):68
(2):152
时景仁(5):374
史伟(4):263
宋刚(2):96
宋康(1):39
宋莹(6):457
苏荣(5):434
隋佳(5):408
孙彬裕(2):79
孙刚(6):451
孙辉(6):451
孙娟(6):485
孙力(2):91
孙连生(3):194
孙楠(2):79
(4):256
孙清森(3):194
孙媛(1):39
孙小艳(1):40
孙鑫(3):176
孙志豪(4):329
- T**
谭坪海(3):182
谭文刚(6):517
唐晶晶(3):219
唐克彬(2):107
汤乔雅(6):508
田敬华(1):17
田晓娜(6):485
- W**
王宝(1):39
王大刚(5):374
王芳(3):233
王凤平(2):101
王杰(5):343
王杰云(6):474
王瑾(6):491
王晶(1):11
王静(1):33
王丽霞(1):11
王玲(1):11
王敏(3):219
王敏(5):383
- 王谦(6):441
王青(4):263
王琼(3):224
王爽(5):374
王思琪(3):224
王伟伟(2):91
王晓岩(1):68
(2):152
王晓艳(6):451
王雅杰(5):374
王彦利(6):462
王宜林(1):63
魏丽娟(1):44
魏青政(5):408
魏新华(2):146
魏研荣(1):11
文丹(1):58
温晓玲(1):58
翁妙珊(2):86
翁绳凤(3):229
吴教仁(2):86
吴坤河(6):495
吴蕾(3):233
吴利(1):28
吴琳娜(1):33
(1):44
吴湃(6):495
吴琼皎(1):54
吴小延(6):468
吴英松(2):141
吴泽华(3):209
伍众文(3):182
- X**
夏乔(5):348
肖斌龙(4):268
肖维华(3):219
肖昕(1):1
肖泽宇(4):249
张瑞芹(5):428
谢建平(1):58
谢希(4):320
谢英超(2):73
谢裕强(2):86
谢运泉(3):170
解强(4):290
信艳萍(6):485
邢海霞(2):122
邢红宇(1):22
邢俊蓬(3):229
徐光华(5):428
徐建利(3):194
徐立彦(1):44
徐林(2):132
徐清芳(2):128
徐婷(3):233
徐伟文(2):73
徐学虎(3):157
徐云芳(5):401
徐忠玉(4):268
许立国(4):295
许迎春(4):276
- Y**
颜彪(2):107
杨秉融(6):491
杨鸿辉(5):348
杨洁飞(1):6
杨金玲(1):17
杨莉(5):361
杨立业(2):86
杨柳(6):47
杨晓红(1):68
杨旭(2):79
杨杨(5):391
杨银荣(6):441
姚开虎(4):263
姚亚飞(3):176
- 叶大柠(3):182
叶丹(2):14
尹辉(3):176
殷商启(5):374
寅雁(6):451
尤娟(6):513
于丹(4):263
于凤芹(5):401
于广鑫(5):343
于广周(6):517
于梦(5):408
余梦瑶(6):499
余学高(2):111
(5):355
余学高(6):446
袁欢(1):63
袁积汝(6):474
袁林(4):263
- Z**
曾明坤(2):136
曾无艺(5):414
曾玉梅(6):535
张拔山(2):101
张长海(3):229
张斗星(6):495
张国栋(2):96
张国梅(6):485
张昊(6):517
张华贞(1):54
张劲丰(5):434
张军霞(5):365
张丽妹(3):157
张立群(3):238
张美华(2):128
张青(5):401
张秋霞(4):276
张荣华(4):329
张瑞芹(5):428
张廷超(5):387
张文新(4):256
张雯艳(6):527
张响(5):374
张晓梅(2):136
张燕(3):233
张艳丽(1):11
张岳(6):479
张云芬(5):418
张志宏(4):310
章金灿(2):86
赵鸿(3):233
(6):499
赵静(3):238
赵琳琳(1):17
赵梅(4):310
赵明燕(2):122
赵平森(3):170
赵舒杨(4):303
赵晓琴(1):54
赵召霞(5):361
郑海军(6):451
钟超珍(4):329
钟良英(6):446
钟志雄(3):170
周爱静(1):49
周春莲(2):73
周君霞(1):22
周路路(5):428
周潇(3):214
周银锁(6):531
周莹(5):365
朱彬(2):107
朱少美(3):214
朱淑珍(5):408
卓书伟(4):325
邹广慧(2):91

2019年第11卷主题词索引(按汉语拼音字母顺序排列)

- 25-羟维生素 D3(6):503
2 型糖尿病肾病(6):522
5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(1):28
AKT2(3):194
Annexin A1(3):194
Bax(1):33
Bcl-2(1):33
CAMP 因子(3):164
CEA(4):295
Child-pugh 评分(1):49
CK20(6):535
CYP2C19 基因(2):107
CYP2C19 基因多态性(1):6
DLBCL(1):33
D-乳酸(6):531
FAM83A(5):401
FBN1 基因(6):479
Gap-PCR(2):79
GATA3(6):535
GBS(3):164
HBsAg(-)(5):369
HBsAg(5):387
(6):495
HBV DNA(2):111
(3):233
(5):348
(5):355
(5):361
(5):408
(6):495
HBV 基因型(6):495
HBV 耐药基因(6):446
HCV RNA(5):379
(5):414
HD-5(4):290
HMGN5 基因(6):485
Hp(3):189
HPV 感染(3):204
HPV 亚型(3):204
IGF-1(2):122
KDM4A(6):451
KLF16 基因(4):303
LASP-1 蛋白(3):219
LINC00393(3):198
MBLs 基因(2):101
miR-122(5):418
miR-133a(3):238
miR-137(6):462
miR-150(5):418
miR-192(6):522
miR-21(4):276
(6):508
miR-29c(6):522
miR-3182(5):401
miR-34(1):17
miR-422a(6):517
miR-548c-3p(4):283
miRNA(1):63
mRNA 降解(6):479
NF-κB/p65(1):33
NK 细胞(1):63
oprD 基因(2):101
ORMDL3 基因(1):11
PC12 细胞(6):517
PCI 治疗(2):107
PCR-膜杂交法(3):204
PFGE(2):101
PPARGC1(2):91
PPARγ(2):91
Pre S1(6):495
Pre-NAT 系统(2):111
PSCA 基因(6):474
ROC 曲线(6):531
Sanger 测序法(6):446
Semaphorin 5A(3):189
SETD7(6):462
Snail1(6):451
SOX4(3):238
S-100β 蛋白(4):315
T2DM(2):91
Taq-man(5):348
TGFβ1(6):451
TLR4(4):276
Treg/Th17(2):117
TRIM59(4):283
VEGF(2):122
Wnt/β-catenin 信号通路(6):485
Xpert 检测(3):229
YMDD(6):446
α 地中海贫血(1):68
- A**
阿尔茨海默病(2):146
癌胚抗原(1):58
(6):508
氨基末端脑钠肽前体(4):320
- B**
白介素-17(2):132
白细胞介素-6(6):527
百日咳实验室诊断(4):263
半乳糖凝集素-3(1):58
半乳糖凝集素-3(4):310
保存条件(4):325
鲍曼不动杆菌(3):182
丙氨酸氨基转移酶(5):408
丙泊酚(3):238
病毒载量(5):374
(5):383
(5):428
丙型肝炎(3):214
(5):414
丙型肝炎病毒(5):383
(5):428
(6):441
丙型肝炎病毒 RNA(3):214
(5):387
- C**
长链非编码 RNA(3):198
超敏(5):428
超氧化物歧化酶(5):414
持续性房颤(1):4
串联质谱技术(1):1
磁共振成像(4):249
磁珠(3):233
- D**
代谢综合征(2):136
单核苷酸多态性(1):11
(1):28
低病毒载量(5):365
地中海贫血(2):79
电阻抗法血小板计数(4):325
凋亡(5):401
(6):517
定量成像(4):249
定量 PCR(6):539
东莞市(4):329
毒力基因(3):164
- E**
厄贝沙坦(1):54
二代测序(2):152
(6):468
- F**
发育迟缓(2):152
放射敏感性(5):401
防御素(4):290
肺癌(6):508
肺部 CT 评分(2):132
肺部感染(6):491
肺结核(2):96
肺结核易感性(2):96
肺纤维化(2):132
非小细胞肺癌(3):219
(6):468
分布特点(2):141
分化程度(3):219
分子标签(6):468
分子机制(1):68
分子影像(4):249
分子诊断(2):146
妇科腹腔镜(6):491
- G**
肝癌(4):283
(5):396
(5):401
肝动脉阻力指数(5):391
肝功能(1):49
(3):214
(5):387
肝损伤(6):457
肝细胞癌(5):365
肝纤维化(4):249
(5):391
肝硬化(5):391
干扰素(5):434
高尔基体糖蛋白 73(6):457
高灵敏(5):379
高灵敏度(5):422
高灵敏度 HBV DNA 检测(5):343
(5):365
高敏肌钙蛋白 T(2):141
高敏荧光定量 PCR(5):361
高敏荧光定量 PCR 法(5):355
高迁移率族蛋白 1(6):457
高通量测序(2):79
冠心病(2):107
(3):224
胱抑素 C(5):391
国家参考品(4):256
过氧化氢(6):517
- H**
海马神经细胞(3):176
核苷(酸)类似物(5):434
核苷(酸)类药物(5):343
核型异常(6):499
红细胞分布宽度(4):325
红细胞平均血红蛋白浓度(4):325
化学发光微粒子免疫分析法(5):355
黄芪甲苷(4):276
- J**
肌钙蛋白 T(4):320
急性心肌梗死(3):170
基因多态性(1):22
(2):96
(3):170
基因突变(2):86
基因芯片(4):268
基因诊断(1):68
基因治疗(1):1
基质金属蛋白酶-9(1):39
甲基化(1):17
(2):91
甲硫氨酸合成酶还原酶(1):28
甲胎蛋白(5):387
甲状腺癌(1):58
甲状腺球蛋白(1):58

- 家系分析(2):86
降钙素原(6):491
(6):527
(6):531
胶质瘤 U87 细胞(4):303
结肠癌(3):194
结肠癌根治术(4):315
结核分枝杆菌(3):229
结直肠癌(2):73
(3):157
(3):238
结直肠癌肝转移(4):295
聚合酶链式反应(5):422
- K**
抗病毒治疗(5):361
抗生素(4):268
抗体(3):214
抗-HBe(5):387
拷贝数变异(4):256
客家人群(3):170
- L**
利多卡因(3):176
利福平耐药(3):229
疗效(5):396
疗效监测(5):361
淋巴结转移(2):122
(3):219
临床分期(3):219
临床应用(2):73
鳞状上皮癌细胞抗原(6):508
凝血因子Ⅻ(2):86
流行病学特点(4):263
颅脑损伤(1):39
泸州地区(2):107
卵巢癌(6):513
卵巢癌细胞(6):485
罗氏培养(3):229
氯吡格雷药效反应(1):6
龙葵碱(4):303
- M**
慢性丙型肝炎(5):379
慢性 HBV 感染(5):40
慢性乙型病毒性肝炎(6):495
慢性乙型肝炎(5):361
(5):387
美托洛尔(3):224
免疫功能(1):49
(5):396
免疫耐受(3):245
免疫治疗(4):295
免疫组化(3):194
- N**
耐药性(3):182
(4):268
(5):434
耐药突变(6):468
- 内脂素(6):503
黏蛋白 1(4):31
尿毒症(4):320
脓毒症(6):457
(6):527
- P**
膀胱尿路上皮癌(6):535
普伐他汀(3):224
普敏检测法(5):369
- Q**
气相色谱-质谱技术(1):1
前列地尔(1):54
前列腺癌(2):136
(6):451
迁移(6):485
侵袭(6):485
趋化素(6):503
全自动核酸检测系统(2):111
全身麻醉(6):491
缺失型别(2):79
缺氧复氧(6):462
- R**
染色体病(6):499
染色体核型分析(6):499
染色体异常(4):338
人工智能(2):146
人免疫球蛋白(1):49
人脐静脉内皮细胞(4):276
人乳头瘤病毒(3):204
妊娠期糖尿病(6):503
认知功能(4):315
乳酸(1):39
乳腺癌(2):122
(3):209
- S**
三亚黎族(1):28
筛查方法(1):68
上皮间质转化(6):451
射频消融(1):44
神经元特异性烯醇化酶(6):508
生存分析(1):33
(3):198
生化复发(2):136
肾功能(1):54
(2):117
实时荧光 PCR(5):348
受试者工作特征曲线(5):418
术前筛查(5):355
树突状细胞(3):245
双靶标高敏乙肝检测方法(5):369
水翁花(6):517
- T**
糖化白蛋白(2):128
糖类抗原 125(6):513
糖尿病(3):224
糖尿病肾病(1):54
(2):128
- 铜绿假单胞菌(2):101
同型半胱氨酸(1):22
同源性分析(3):182
突变型别(2):79
- W**
外泌体(3):157
胃癌(1):17
(3):189
(4):290
胃溃疡(6):474
维吾尔族(1):11
微小 RNA(5):418
微小 RNA-21(6):513
- X**
细胞凋亡(3):238
细胞发育(1):63
细胞功能(1):63
细胞因子(5):408
细胞增殖(3):238
细胞周期(3):176
细菌培养(4):263
细菌性脑膜炎(6):531
系统性红斑狼疮(3):245
下呼吸道感染(4):329
下一代测序(6):539
下一代测序法(6):446
相关性(5):348
(5):383
哮喘(1):11
协作标定(4):256
心肌细胞(6):462
心血管疾病(4):320
性激素(2):122
性能验证(2):111
(3):233
血管内皮细胞生长因子(2):128
血浆 NT-proBNP(1):44
尿酸(4):320
血清抵抗素(2):128
血小板生长因子(2):132
血液透析(2):117
(4):320
循环 miRNAs(3):157
循环肿瘤 DNA(2):73
循环肿瘤 DNA(6):539
循环肿瘤细胞(3):209
循环肿瘤游离 DNA(6):468
- Y**
亚胺培南耐药(2):101
亚甲基四氢叶酸还原酶(1):22
氩氮刀冷冻消融术(4):295
炎症损伤(4):276
炎症因子(1):39
炎症因子(2):117
药敏实验(4):268
药物靶标(5):434
液体活检(2):73
(6):468
- 液相芯片技术(4):329
遗传代谢病(1):1
遗传多态性(6):474
遗传学关联(6):474
遗传学检测方法(4):338
遗传诊断(2):152
遗忘性轻度认知功能障碍(1):22
胰岛素抵抗(6):503
乙肝病毒(5):396
乙醛脱氢酶 2(3):170
乙型肝炎病毒(5):343
(5):365
(5):387
(5):422
(5):434
乙型肝炎病毒 DNA(5):374
一致性(5):374
(5):383
荧光定量 PCR(3):233
(4):263
(5):374
荧光通道血小板计数(4):325
应激性高血糖(1):39
硬膜外阻滞(4):315
隐匿性 HBV 感染(5):343
隐匿性乙型肝炎(5):418
影像技术(2):146
影响因素(1):6
营养状态(2):117
游离脂肪酸(5):414
预后价值(1):44
院内感染(3):182
- Z**
杂合突变(6):479
载脂蛋白(6):441
早期筛查(2):141
增殖(6):462
(6):485
诊断(5):428
正五聚蛋白 3(6):491
直肠癌(4):310
脂蛋白(6):441
脂蛋白代谢(6):441
智力障碍(2):152
质量控制(5):422
治疗(5):379
中国汉族人群(6):474
中性粒细胞(3):245
肿瘤标志物(2):73
肿瘤精准医疗(6):539
肿瘤转移(3):209
终末期肝病合并感染(1):49
主动脉瘤和夹层(6):479
转化生长因子 β 1(6):457
子宫内膜癌(3):198
自然流产(4):338
左卡尼汀(2):117

山东大学齐鲁医院(青岛)检验科

山东大学齐鲁医院(青岛)检验科是集医教研三位一体的具有现代化医学管理模式的二级学科,科室始终秉承以患者为中心、以质量为保证、以科学为原则的工作理念,为临床诊断、疾病防治提供了准确、及时、客观的优质服务和科学的循证依据。

齐鲁医院检验科始建于1908年,历史文化名人、国内外著名实验诊断学专家于复新教授发明的“于氏环”实验享誉国内外,由于复新教授编著的《实验诊断学》是国内第一部临床医师及检验专业教材。1996年检验科获批硕士点,2002年成为全国第一批博士点。现任山东大学齐鲁二院院长、国家科技部重大科技首席专家、国务院特殊津贴享受者、泰山学者特聘专家王传新教授的领导下,我院检验科成功获得首批“国家临床重点专科”。青岛院区检验科的发展就是沿着这条坚实的道路发展起来的。

目前,青岛院区检验科设有临床基础检验、免疫学、生化、微生物学、分子生物学及细胞学检验六大三级学科,还设有样本处理中心和抽血中心。现有专业技术人员55名,其中高级职称9名,博士研究生导师1名,硕士研究生导师4名,具有硕博学位27名,形成了以青年医师为主的老中青人才梯队。检验科是一个勇往直前积极向上的科室,一个敢于创新超越自我的科室!我们站在国家级医学平台的高度上,坚持医教研紧密结合,精研医疗技术,始终紧盯医学前沿,及时掌握行业新动态,不断强化自主创新,树立敢为天下先的志向,敢于探索医学的新疆界,勇于挑战医学前沿问题。目前检验科承担各级课题19项,承担山东大学临床医学院、公卫学院、药学院、口腔学院的《实验诊断学》,公卫学院《临床检验基础》、《血液学及血液学检验》、《实验室管理学》理论授课。与加拿大Laval大学建立了联合培养硕博研究生的长效机制。

从医学检验到检验医学的转变,使检验科的专业定位和观念也发生了根本变化。我院检验科不断对业务流程进行严格的审核和优化,与世界先进检验理念接轨。实验室建立了全面质量控制体系,并实施在每项工作中,检验科对流程的科学管理,使可能影响结果的各种因素和环节都处于受控状态。随着学科平台的不断发展,检验科对临床医疗的影响力也不断提高,为临床疾病诊疗和干预提供了精准实验信息,以提升对疾病防治水平。在充分满足临床工作的基础上,我院检验科注重打造两大平台的建设。分子肿瘤及免疫转化医学平台由6名具有硕博学位的专职人员,带领硕博研究生参与的肿瘤分子肿瘤学免疫研究团队,以消化系统、生殖系统、血液系统为主攻方向,注重转化医学研究,旨在将科研内容积极转化为临床应用成果。细胞学检验实验室,由4名具有硕博学位专职人员为主导,具备了细胞形态学(Morphology)、免疫学(Immunology)、细胞遗传学(Cytogenetics)和分子生物学(Molecular biology)完善的MCIM分型,对血液病的诊断和治疗发挥了重要指导作用。近5年来,针对以上两大平台获得国家级资助课题7项,中加国际合作项目1项,省部级科研项目4项。



杂志简介：

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

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

