



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

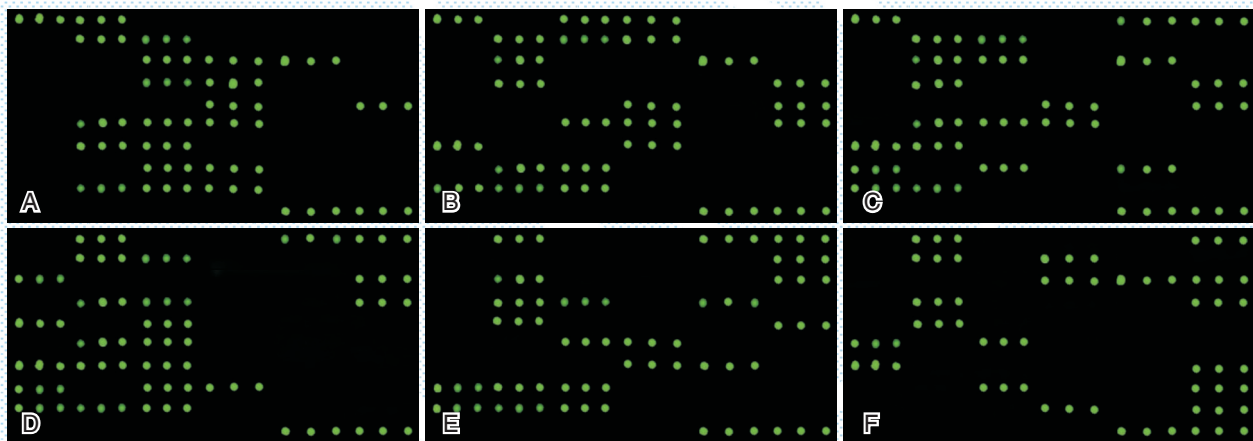
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2019年7月 第11卷 第4期 总第62期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 11 Number 4 July 2019



A:金黄色葡萄球菌; B: 肠球菌; C: 大肠埃希菌; D: 肺炎克雷伯菌; E: 鲍曼不动杆菌; F: 铜绿假单胞菌。

图(P273) 耐药基因芯片杂交图谱结果

Figure(P273) Results of drug-resistant gene chip hybridization

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



分子诊断与治疗杂志

二〇一九年七月

第十一卷 第四期

中山大学

罗良平



罗良平, 1964年6月出生, 1991年毕业于暨南大学, 获临床医学硕士学位; 1998年进入德国洪堡大学学习放射学专业, 获医学博士学位。

主任医师, 教授, 博士生导师。现任暨南大学医学部主任、暨南大学研究生院执行院长, 暨南大学医学学位评定分委会主席; 广州市分子与功能影像临床转化重点实验室主任、广东省医学影像人工智能精准诊疗工程技术研究中心主任; 广东省医学教育协会会长、广东省医学会放射分会副主任委员、广东省医师协会放射医师

分会副主任委员; 中华放射学第十五届心胸学组副组长、教育部全科医学教学指导委员会委员、中国医药教育协会毕业后与继续医学教育指导委员会副主任委员; 广东省社会医学会副会长、广东省医疗行业协会副会长兼医学影像管理分会主任委员; 《实用放射学杂志》、《心血管病防治知识》副主编; 中华放射学杂志、中华医学杂志英文版、磁共振成像杂志、Cancer Management and Research、Abdominal Radiology 等期刊编委和审稿专家。

罗良平教授长期从事肿瘤分子影像学教学与研究, 在基于多模态分子影像的新型抗肿瘤药物疗效评估方面形成了一定的特色和优势。承担及完成国家、省部级研究课题近15项, 其中主要包括国家自然科学基金课题、广东省自然科学基金重点项目、广东省科技厅前沿与关键技术创新项目等。获荣获广东省南粤教坛新秀、广东省南粤优秀教育工作者及国务院侨办科技进步三等奖、广东省科技进步三等奖、广东省教学成果二等奖各1项。发表相关论文100余篇, 其中SCI收录近30篇(“Cancer Research”, “Chest”, “Angiogenesis”, “Journal of Clinical Investigation”, “Theranostics”, “Journal of Magnetic Resonance Imaging”等)。申请获批国家发明专利2项; 主编、副主编及参编专著近10部; 培养和招收博士后、博士及硕士研究生90余名, 其中10余人现为不同层次学科学术带头人。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019年7月 第11卷 第4期 总第62期 Bimonthly Volume 11 Number 4 July 2019

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍 李卫鹭
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 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	国内外公开发行
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2019年7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 LI Weilu</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>2019.7.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年7月 第11卷 第4期

目次

述评

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)

论著

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
..... 赵舒杨 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)

综述

自然流产的遗传学检测研究进展 刘祥举(338)

专家风采

罗良平 (封二)

实验室巡礼

广州市分子与功能影像临床转化重点实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 4 July 2019

CONTENTS

COMMENTS

Advances of imaging quantitative techniques for liver fibrosis

MA Mengjie, XIAO Zeyu, LIANG Jianye, LUO Liangping (249)

ORIGINAL ARTICLES

Preparation and calibration of the national reference for detection of chromosome copy number variations

JIA Zheng, ZHANG Wenxin, LI Lili, SUN Nan, QU Shoufang, HUANG Jie (256)

Comparative study on clinical epidemiological characteristics and diagnostic methods of pertussis

LI Yue, YUAN Lin, WANG Qing, GAO Wei, SHI Wei, MENG Qinghong, YU Dan, YAO Kaihu (263)

Establishment and application of an antibiotics-resistance gene detection chip for common pathogenic bacteria

GUO Jianlian, XIAO Binlong, LIU Huina, JIANG Xianhai, XU Zhongyu (268)

The role of miR-21 in the protective effect of astragaloside on ox-LDL-induced endothelial cell inflammatory injury

CHANG Fangyuan, FENG Zerui, XU Yingchun, ZHANG Qiuxia (276)

miR-548c-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by targeting TRIM59

NIAN Shiyan, FENG Lei (283)

HD-5 inhibits gastric cancer proliferation, migration and tumor growth

SHANG Xiaoyu, GU Guowei, LIU Guoquan, QI Jing, XIE Qiang, LI Kun (290)

Effect of cellular immunity combined with operation on quality of life of patients with liver metastasis in colorectal cancer

XU Liguo, FENG Guangsen, LIN Yachao, LI Zhi (295)

Solanum nigrum combined with *KLF16* gene synergistically inhibit glioma cell proliferation and induce apoptosis

ZHAO Shuyang, LEI Yanjie, MA Shijie, GAO Ming (303)

Expression and clinical significances of *Galectin-3* mRNA, *MUC1* mRNA in peripheral blood of patients with rectal cancer

ZHAO Mei, ZHANG Zhihong, GUO Zhongyan, CHEN Ying (310)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 4 July 2019

CONTENTS

Effect of Epidural Anesthesia on Cognitive Function and Inflammatory Protein Expression in Patients with Radical Resection of Colon Cancer
CHEN Jiehua, MA Haiyan (315)

The changes and clinical significance of serum NT-proBNP, BUA, cTnT levels in patients with uremia before and after hemodialysis
XIE Xi, LIU Lili, LI Shuhui (320)

Relationship between the changes of PLT-I, PLT-F, RDW and MCHC indexes and different storage conditions of test specimens
HU Yaohua, ZHUO Shuwei, FU Chunmiao (325)

A surveillance of children lower respiratory tract infection cases in Dongguan City, from 2017 to 2018
SUN Zhihao, ZHANG Ronghua, ZHONG Chaozhen (329)

REVIEWS

Advances in genetic testing of spontaneous abortion
LIU Xiangju (338)

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 罗良平*

[摘要] 肝纤维化是慢性肝病的一个重要标志。对肝纤维化的早期诊断、干预,有助于延缓其发展甚至逆转病程。目前肝纤维化诊断的金标准是肝穿刺活检,穿刺活检有助于明确肝纤维化的诊断及分期,但穿刺活检同样存在一定的局限性,例如取样误差及一系列潜在并发症。近年来,分子影像定量检测技术发展迅速,在肿瘤成像等领域发挥出了重要的作用,其在肝纤维化定量检测中的应用,也受到越来越多的重视。笔者回顾目前主流分子影像成像方法在肝纤维化定量诊断中的应用,对其优缺点进行概述,以加深临床工作者对这些检查手段的认知。

[关键词] 肝纤维化;分子影像;定量成像;磁共振成像

Advances of imaging quantitative techniques for liver fibrosis

MA Mengjie, XIAO Zeyu, LIANG Jianye, LUO Liangping*

(Medical Imaging Center, the First Affiliated Hospital of Jinan University/Guangzhou Molecular and Functional Imaging Clinical Translational Laboratory, Guangzhou, Guangdong, China, 510632)

[ABSTRACT] Liver fibrosis is an important sign of chronic liver diseases. Liver fibrosis could be treated and even reversed if detected in early stages. At present, the gold standard for the diagnosis of liver fibrosis is liver biopsy, which is helpful for the diagnosis and staging of liver fibrosis. However, it also has some limitations, such as sampling error and a series of potential complications. In recent years, molecular imaging quantitative detection technology has developed rapidly and played an important role in tumor imaging and other fields. The application in the quantitative detection of liver fibrosis has also received more and more attention. In this review, the current application of molecular imaging in the quantitative diagnosis and staging of liver fibrosis was summarized, and the advantages and disadvantages to facilitate the better and more comprehensive understanding of these techniques were also discussed.

[KEY WORDS] Liver fibrosis; Molecular imaging; Quantitative imaging; Magnetic resonance imaging

肝纤维化是各种病因导致的慢性肝损伤,最终可导致不可逆的肝硬化。肝硬化治疗是世界性医学难题,除进行肝移植外,目前还没有明显有效的治疗方法,早期肝纤维化经过及时的临床治疗可以逆转其纤维化进程^[1]。临床判断肝纤维化程度最常采用的是Metavir系统(metavir score system),将肝纤维化分为F0-4:F0(无纤维化);F1(汇管区纤维

化,但无纤维间隔);F2(汇管区纤维化,并有少量间隔);F3(间隔纤维化);F4(肝硬化)。导致肝纤维化的主要病理类型包括慢性病毒性肝炎(乙型、丙型)和代谢性肝病(非酒精性脂肪肝、酒精性肝病等)。尽管2种病理类型的发展模式并不相同,但共同的特征是细胞外基质蛋白沉积与清除之间的不平衡^[2]。细胞外基质蛋白沉积是肝脏对急慢性损伤的

基金项目:国家自然科学基金面上项目(21317241);广东省自然科学基金重点项目(2018B0303110011);广东省医学科学技术研究基金项目(A2018132)

作者单位:暨南大学附属第一医院影像中心/广州市分子与功能影像临床转化重点实验室,广东,广州 510632

*通信作者:罗良平, E-mail:tluolp@jnu.edu.cn

一种修复反应,肝星状细胞通常处于静止状态,受炎症刺激后活化,通过增生和分泌细胞外基质参与肝纤维化过程,可导致纤维瘢痕形成^[3]。

目前肝纤维化的诊断及分期的“金标准”是穿刺活检,其优点是能直接评估肝纤维化阶段,及评估共存的其他疾病,如脂肪肝、铁沉积等。但是,活检的局限性同样非常明显,其取样标本非常局限,不能评估肝脏整体的纤维化状态,当样本为局灶性肝纤维化时,甚至可能出现漏诊^[4-5]。有研究表明,在33.1%的病例中,从肝脏提取的两个样本出现至少一个纤维化分级的差异^[6-7]。同时,穿刺的并发症同样不能忽视,疼痛、感染,甚至腹腔出血等,使其在临床的常规应用及随访观察中受到限制。因此,临床医生对非侵入性检查肝纤维化的期望值越来越高。传统影像通过信号、密度、回声等改变可以大致判断肝纤维化的一般情况,但缺乏可定量评价肝纤维化严重程度的功能学指标。与传统影像学检查手段相比,分子影像可以提供肝脏细胞及分子层面的信息,并且可以定量测量相关参数,具有更高的灵敏度及特异性,成为了时下研究的热点。本文将对这些定量成像手段进行简要概述,并分析各个成像手段的优缺点,以提高临床及科研工作者对非侵入性定量影像检查的认识。

1 磁共振分子成像(magnetic resonance imaging, MRI)

磁共振成像具有优异的软组织分辨率,以不同序列可以获得不同的疾病信息的特点,不仅可应用于肝纤维化的一般诊断,随着新序列及对比剂的研发,探索肝纤维化的微观结构改变也成为了可能。其中主要的技术方法包括弹性成像、灌注成像、体内不相干运动成像等。

1.1 弹性成像(elastography)

肝纤维化过程中,随着细胞外基质蛋白的沉积,并相互连接形成纤维网络,肝脏的应变力逐渐降低,肝脏的硬度随着纤维化程度的增高而不断增加,所以,肝脏的硬度可以反应肝纤维化程度。目前,弹性成像被认为是临床最可靠的无创肝纤维化检测和分期方法^[8-10]。磁共振弹性成像(magnetic resonance elastography, MRE)是一种动态检测横波传播的技术,剪切波长与组织的硬度相关,因此MRE可以通过分析机械波在组织中的传播,无创、定量的检测肝脏的硬度,并以此来检测肝纤维化分

期^[11]。MRE是在普通磁共振设备的基础上,加上一套剪切波产生装置,紧贴于检测部位浅表皮肤,经过激励后的肝组织会产生几微米到几十微米的小位移,采用运动敏感梯度对位移进行映射及测量,并通过后处理对弹性力学进行逆求解,得到肝组织弹性系数分布图。商业化运用的MRE已经在主要的磁共振(magnetic resonance, MR)仪器制造商中实现标准化,这意味着MRE的测量结果是可重复的,标准化的测量设备及序列意味着不同设备的测量结果具有可对比性。与穿刺活检相比,通过MR进行弹性成像,可以对整个肝脏进行检测,不同肝叶、肝段的纤维化程度区别,在MRE上都可以直观的显示。因此,MRE不存在取样区域不同导致的结果差异,通过MRE成像可以对整个肝脏的纤维化情况进行一体式评估。但是,与常规MR肝脏成像一样,MRE对肝的铁沉积敏感,过量的铁沉积会导致图像的信噪比降低,造成测量结果不可靠。MRE的主要局限在于其测量的并非是肝纤维化本身,而是通过肝脏的硬度来反映纤维化的程度,一些生物干扰因素(如餐后状态、伴脂肪变性、胆汁淤积等)会影响测量结果,这些干扰因素大多会导致肝脏硬度增高,进而造成对肝纤维化分期的高估。

弹性成像还可以在超声设备进行,通过超声探头产生低频机械脉冲波传导至肝脏形成剪切波,再通过探头获取并计算得到弹性数值。超声弹性成像主要包括瞬时超声弹性成像(transient elastography, TE)、实时超声弹性成像(real-time tissue elastography, RTE)、声辐射力弹性成像(acoustic radiation force impulse imaging, ARFI)和剪切波弹性成像(shear wave elastography, SWE)。SWE整合了解剖学和组织硬度的信息,同时兼有RTE和ARFI的优点,并且能立即获得测量结果,是近年来研究的热点。SWE通过超声探头发射声辐射,声辐射力激励检测平面内肝组织产生剪切波,并通过快速平面波采集技术跟踪剪切波的传播时的位移及速度,通过计算机分析得到杨氏模型,组织硬度越大,则杨氏模型量越大^[12]。Ferraioli等^[13]学者发现,SWE测量中不受腹腔积液、肥胖等常规超声成像的干扰因素的限制。与MRE相比,SWE操作便捷,价格更为低廉,而且具有不俗的诊断效能,这些优点使得SWE可以作为早期纤维化筛查手段。但是,与常规超声一样,SWE成像依赖于操作者对于扫描切面的

选择,不同操作者的操作习惯差异,导致测量的纤维化程度可能出现不同。

弹性成像具有非常高的诊断效能,MRE在诊断早期非酒精性肝纤维化的敏感度及特异性分别为0.84和0.90,SWE和MRE对非酒精性肝纤维化分期的诊断具有很高的准确率^[14]。

1.2 灌注成像(perfusion imaging)

MRE具有优异的诊断效能,但因其成像需要额外的激励设备,在各级医院普及有一定的难度。除了MRE外,能在常规MR设备上对肝纤维化定量检测的成像方法也有很多报道,而且都具有不错的诊断效能。静脉注射对比剂是临床常规使用的一种检查手段,能够增强血供丰富的肿瘤与正常组织的对比度,它在肝纤维化的定量检测方面也有很多的报道。肝脏具有双重血供,正常状态下,肝脏主要由门静脉供血,随着肝纤维化的进展,肝内血管及肝窦逐渐闭塞,导致门静脉供血减少,肝动脉血流增加,形成肝内分流。Miyazaki等^[15]学者的研究表明,晚期肝纤维化与对照组在几个灌注参数上存在显著差异,晚期纤维化患者肝动脉灌注、动脉分数、分布体积和平均转运时间均增加。灌注成像对肝纤维化F1-4期诊断的血药浓度-时间曲线下面积(area under curve, AUC)可以达到0.83,0.85,0.88,0.92,随着肝纤维化程度的加深,诊断效能也随之提高^[16]。灌注成像与常规增强扫描一样,静脉注射对比剂之后,可以在MR、电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)甚至超声设备上对病人灌注参数对照物是同一时间层面的其他器官、肌肉等灌注值,不同成像设备的测量值同样具有可对比性。

然而,灌注成像存在着标准化的问题,灌注参数的测量对扫描时间点的把握十分重要,目前国际上倾向于在动脉期(注射对比剂20 s后),门脉期(70 s),延迟期(3 min),但由于病人个体因素相差较大,导致测量的结果阈值难以界定^[16]。同时,灌注成像还存在着一些干扰因素,如空腹状态、肝脏充血、门静脉血流等。

肝纤维化过程中血管的变化除了用灌注成像反映外,还可以通过超声下微血管成像技术(micro-flow imaging, MFI)来观察血管形态。在静脉注入对比剂后,通过探头输出较高能量波将扫描区域内微气泡破坏,随后,邻近血管内的微泡再次灌注到该区域,此时转换为低能量模式观察,显示出区域

内血管的走向及分布。Sugimoto等^[17]学者研究显示,通过对门静脉分支角度、变细甚至中断及扭曲角度的测量,可以对纤维化定量分级,MFI对肝纤维化各期的诊断AUC可达0.91~0.96。

1.3 磁共振双对比剂成像(double contrast enhanced MR imaging)

除了通过注射对比剂来观测纤维化肝脏的血流灌注的差异,通过注射2种不同的对比剂后,最大化显示纤维成分,双对比成像在肝纤维化定量检测上也取得了不错的成绩。双对比剂是通过静脉连续注射超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)及钆对比剂(gadolinium, Gd)进行扫描成像。肝纤维化病人肝内Kupffer细胞密度降低,氧化铁积聚减少,注射SPIO增强后,增生结节在T2加权像(T2 weighted image, T2WI)上呈明显低信号;胶原纤维成分在注射Gd对比剂后,会出现渐进性强化。双对比剂增强扫描正是运用了上述2种对比剂增强的原理,使低信号的增生结节与高信号的纤维间隔对比增强。通过计算机纹理分析技术对肝纤维化进行诊断及分期。Bahl等^[18]采用二分法,将患者纤维化程度分为F2、F3,得出双对比剂成像诊断的敏感度和特异性分别为0.91,0.83。通常认为F2期纤维化是治疗的明确指标^[19],因此,这个研究让我们看到了双对比剂成像在肝纤维化分期上的巨大潜能。但是,2种对比剂势必会导致病人检查费用的增高及扫描时间的延长。同时,为获取精准评估纤维化的图像,呼吸及运动伪影需要尽可能避免,对于多数病人难以达到这种要求。此外,双对比剂对肾脏带来的负担及潜在的过敏反应不容忽视。

1.4 肝细胞功能成像(hepatocellular function imaging)

肝特异性对比剂(钆塞酸二钠、钆喷酸二甲葡胺等)的发现,使得放射科医生对肝小结节的诊断上更进一步,肝特异性对比剂除了在肝小结节的良恶性鉴别上具有喜人的成果,对于肝纤维化的定量检测也有令人惊喜的表现。肝细胞特异性对比剂,其摄取依赖于转运蛋白的表达,与肝细胞功能有关,肝纤维化过程中,原发病变(病毒性、代谢性疾病)对肝细胞的损伤,导致肝细胞功能进行性降低,肝纤维化程度越高,肝细胞功能越低。通过注射特异性对比剂进行扫描成像,可以评估纤维化的肝功能,进而对肝纤维化分期。增强扫描肝细胞特异期

的强化随着肝纤维化程度的加重而降低。肝细胞功能成像对不同阶段肝纤维化分期的诊断敏感度和特异性分别为0.78, 0.94^[20]。肝细胞功能成像在常规MR设备上可以进行,与灌注成像相同,功能成像仅需注射肝细胞特异性对比剂,即可进行检测,简便的操作使得功能成像在治疗效果的评价上具有良好的运用前景。但是,肝细胞特异性对比剂昂贵的售价及潜在的不良反应成为了临床常规使用的阻碍。同时,肝细胞特异性对比剂通常在注射对比剂之后的20分钟扫描,导致了扫描时间的延长。

1.5 体素内不相干运动成像(intravoxel incoherent motion Imaging, IVIM)

静脉注射对比剂可以很大程度上帮助肝纤维化的定量分期,但肝纤维化晚期的临床病人往往都有不同程度的肾损害,注射对比剂可能加重肾脏损伤。无需对比剂的肝纤维化定量成像手段为这些病人带来了希望。纤维化过程中过度生成的胶原纤维等细胞外基质会限制水分子的自由扩散。IVIM是基于弥散加权成像的一种成像技术,通过分析多个b值信号的衰减,可以分离水分子的真性扩散系数D及灌注相关系数(D*及f)。IVIM在肿瘤方面的应用很多研究都已证实其作用,肿瘤微灌注的检测^[21-22]等,在肝纤维化的诊断及分期上的应用,也具有很大的潜能^[23]。关于D、D*及f值与肝纤维化之间的关系,目前并没有明确,不同的实验组得出的结论大相径庭。三者之中,D*值的变化较为明显,目前研究倾向于D*与肝纤维化阶段之间存在负相关。Hu等^[24]学者使用IVIM对肝纤维化病人进行评估,得出D*对大于等于F2期纤维化诊断的AUC达0.90,对F4期AUC达0.91,D*值主要反应灌注相关参数,星状细胞的活化和胶原蛋白的沉积可能是导致灌注减少和门脉高压的原因。IVIM可以在常规MR仪器上进行扫描,不需要额外的硬件,不需要注射对比剂,扫描时间较快,这些特点使得IVIM的临床接受程度较高,但其诊断效能仍需要更多实验来验证。

IVIM对肝纤维化分期的评估也存在着许多不足。IVIM对于运动伪影十分敏感,临床操作中,病人配合与否难以控制,会导致测量结果偏差,尤其是对于心脏运动干扰的肝左叶。更重要的是,IVIM的成像依赖参数,场强、重复时间、回波时间和b值都会对测量结果产生影像,其中b值的大小及数量对不同组织、器官、疾病的诊断阈值有很大差异。

这些因素的差异最终会导致D值的结果偏离预测值,导致测量结果不可靠。因此,标准化扫描参数对于IVIM评估肝纤维化分期十分必要。

1.6 T1ρ定量成像(T1ρ mapping)

T1ρ,即旋转坐标系下的自旋-晶格弛豫时间常数,可以反应体内的水分子与大分子(如蛋白质)之间的化学交换。已有的动物实验及临床研究表明,T1ρ值与肝纤维化阶段有关,肝纤维化的分级越高,T1ρ亦增高。这可能与肝纤维化过程中细胞外基质蛋白的过度沉积有关。Li等^[25]研究者通过对比T1ρ成像与SWE对肝纤维化的诊断及分期,得出T1ρ对于F1-4诊断的AUC分别为0.85 0.84 0.79 0.69,相对的SWE诊断的AUC分别为0.86 0.90 0.87 0.84。有研究报道称,T1ρ值不受诸如餐后状态、肝负荷因素的影响。T1ρ可以在常规MR设备上扫描,无需增加额外的设备,且不需要注射对比剂^[26]。但是,T1ρ的变化机制尚不明确,胶原蛋白的沉积可能不是引起T1ρ增高的唯一因素,具体的变化机制还需要更多的实验来证实。

1.7 T1、T2定量(T1、T2 mapping)和细胞外体积分数(extracellular volume fraction, ECV)

无对比剂T1定量技术对肝纤维化评估已有报道具有较高的诊断效能,但无对比剂T1 mapping受场强的影响,且对肝脏铁含量、水肿等因素敏感^[27]。T2 mapping测量肝纤维化的研究表明,肝脏炎症、水肿区域与纤维化区域之间存在着密切的联系^[28]。ECV是细胞外空间的测量值,反应非细胞的体积分数,注射对比剂之后,对比剂在细胞外间隙残留,通过计算注射对比剂前后T1值,可以得到ECV。ECV不受场强及个体因素影响,具有量化肝纤维化程度的潜能。Luetkens等^[29]学者研究表明,随着纤维化程度的增加,T1、T2 mapping及ECV也随之增高,说明ECV可能是量化纤维化分期的一种非常有价值的指标。该实验的不足之处在于没有矫正脂肪及铁沉积对T1、T2 mapping及ECV的影响,而这种干扰因素的存在,会严重影响这些测量值的准确性。

1.8 磁共振靶向探针(targeted MR imaging probe)

胶原蛋白在纤维化过程中十分重要,随着纤维化程度进展而增加。Zhu等^[30]学者研究表明,MRI型胶原靶向探针EP-3533可以检测肝纤维化分期,但因其使用钆喷酸葡甲胺盐(gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid, Gd-DTPA)在骨及其他组

织中有残留,由于Gd相关的肾脏损伤,这种靶向探针未能进行临床转换。为了探索MR靶向探针在肝纤维化定量诊断方面的应用,Farrar等^[31]学者研究了一种新的分子对比剂CM-101,使用的是更加稳定的钆特酸葡胺(gadopentetate dimeglumine, Gd-DOTA),他们研究发现肝纤维化小鼠血液及其他组织中的Gd可以快速清除,而骨组织的积累量很少可以忽略不记,并且观察到肝硬化小鼠的肝脏信号大约是没有肝硬化小鼠的2倍。CM-101的发现让我们看到了MR靶向探针在肝纤维化定量诊断中应用的希望。

除了上述几种定量成像手段外,本课题组还使用了R2* mapping^[23]技术检测辐射诱导肝纤维化大鼠模型的早期肝纤维化,并且得出R2* mapping是检测早期肝纤维化的敏感指标。诸如T1和T2 Mapping、胶原靶向MR探针、R2* mapping等技术的发现让肝纤维化的无创检测更添活力,但是目前的临床相关实验研究较少,需要进一步临床验证,我们也期待这些检查手段在临床肝纤维化分期中提供更加精准的诊断。

肝纤维化过程中,激活的肌成纤维细胞增生不但生成细胞外基质,并伴随着一些特异性物质的表达^[32],例如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、整合素、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF β 1)等,针对这些特异性靶点,PET、光学成像等分子成像技术通过特异性分子探针开发用来检测肝纤维化,并希望以此达到早期诊断的目的。

2 正电子发射型计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET)

PET是通过能发射正电子的放射性核素标记到能与人体内代谢物、细胞受体甚至是DNA等特异性结合的化合物上,将含放射性核素的化合物注入体内,这些化合物在人体内与代谢物等特异性结合,发生湮灭反应释放正电子,通过照相机捕捉及计算机后处理,观测体内化合物分布情况,并对代谢物等物质体内分布进行成像。肝纤维化过程中星状细胞的活化、胶原蛋白沉积等病理生理改变,都可以通过PET特异性分子探针定量检测。

整合素 α v β 3在肝星状细胞细胞的活化过程中,在细胞间的信息传递(黏附、凋亡等)中起着重要的作用,是细胞间信息传递的受体感受器。在肝

纤维化过程中,随着星状细胞的不断活化,整合素 α v β 3的表达也越来越多,因此,人们寄希望于对肝内整合素 α v β 3的检测从而检测肝纤维化的进程,即通过检测整合素 α v β 3的测量,对肝纤维化进行分期。Rokugawa等^[33]人运用整合素 α v β 3特异性靶向药物18F-FPP-RGD2,对大鼠非酒精性肝纤维化模型进行检测,研究结果表明整合素 α v β 3与肝纤维化有良好的相关性,通过检测整合素 α v β 3,可以检测肝纤维化的发展。除了整合素 α v β 3外,Hatori等^[34]学者,采用[18F]FEDAC检测纤维化大鼠体内转位蛋白(主要表达于巨噬细胞和星状细胞),得出转运蛋白随着肝纤维化程度的加重而增加。

PET成像具有特异性、灵敏度高的特点,能提供详细的功能及代谢等分子水平信息。PET成像灵敏度高,可以测定组织中较低数量级的配体浓度,只需要少许的探针浓度,肝纤维化早期细胞间微小的改变,都可以被PET成像捕捉到。PET具有较高的敏感度,可以动态地获得较快的动力学信息,进行快速显像。而且,随着更多的特异性靶向药物的研发,对于肝纤维化的更全面、更精准的检测成为可能。

然而,目前大多数PET靶向探针成像的研究数据都是从动物实验得到的结果,关于PET特异性分子探针成像对于肝纤维化诊断的临床研究罕有报道,人体肝纤维化结构与纤维化机制比实验动物更加复杂,人体肝脏纤维化PET特异性分子探针成像的应用潜能,需要更多动物及人体体外实验来论证。

3 光学成像(optical imaging)

肝星状细胞在持续性肝脏损伤时激活,形成肌成纤维细胞并产生胶原纤维沉积导致肝纤维化。通过体外细胞实验证明,C1-3可以特异性地将药物传递给肌成纤维细胞^[35],但是,这种药物受到化学耦合反应的限制,无法在体内顺利进行。Luli等^[36]人将一种新的脂质特异性靶向受体与C1-3结合,并与荧光标记团结合,成功在小鼠体内将C1-3特异性结合肌成纤维细胞,并通过光学成像,成功观察到肝纤维化小鼠肝内肌成纤维细胞量。这个实验让我们看到了光学成像在肝纤维化分期中运用的潜能。光学成像最大的优势在于,将治疗药物与特异性受体结合后,可以通过光学成像观察药物在体内

的分布,达到诊疗一体化的效果。而且,光学成像还能够直接观察细胞和分子在体内的行为,有助于更深入了解疾病发病机制。

但是,光学成像由于结构分辨率较低,并不具备对组织解剖结构显像的能力。而且,光学成像还容易受到组织厚度的影响,对肝脏深部的显示容易出现误差,对于合并肥胖、腹水等干扰因素的病人,光学成像不能很好的对其纤维化进行准确分期。目前关于光学成像对肝纤维化评估的研究同样罕有,大多限于动物实验,活体实验的可行性仍需要进一步研究。

4 小结与展望

磁共振分子成像的主要优势在于可以将肝脏解剖及分子成像结合,得到关于肝脏整体纤维化情况的分布,解剖与功能结合,达到一体式评估,且不易受诸如腹水、肥胖等干扰因素的影响。超声成像则具操作便捷,成像速度快的优势,相较于其他检查,病人的接受程度更高,适合作为常规筛查手段。PET 成像因其特异性的分子探针,具有特异性、灵敏度高的优势,对早期纤维化的诊断效能高。光学成像则具有诊疗一体化潜能,而且能帮助深入研究疾病的发病机制。目前,分子成像尚未成为临床常规检测肝纤维化分期的主要手段,最接近临床甚至已应用于临床检查的只有 MRE 及超声弹性成像,其他成像手段主要问题是诊断效能及标准化等问题。不过,我们看到,越来越多分子成像手段展示了在肝纤维化早期诊断中的潜能,非侵入性分子成像有可能成为肝纤维化的常规检查、筛查的手段。未来,随着分子影像技术的飞速发展,使用各种非侵入性定量成像与临床、实验室检查结合的检测手段对肝纤维化进行筛查、早期诊断甚至是靶向治疗必将走向技术成熟。

参考文献

- [1] Sun M, Kisseleva T. Reversibility of liver fibrosis [J]. *Clinics And Research In Hepatology And Gastroenterology*, 2015, 39(Suppl 1):S60-63.
- [2] Caviglia GP, Rosso C, Fagoonee S, et al. Liver fibrosis: the 2017 state of art [J]. *Panminerva Medica*, 2017, 59(4):320-331.
- [3] Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis [J]. *World Journal Of Gastroenterology: WJG*, 2014, 20(32):11033-11053.
- [4] Shiha G, Ibrahim A, Helmy A, et al. Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) consensus guidelines on invasive and non-invasive assessment of hepatic fibrosis: a 2016 update [J]. *Hepatology International*, 2017, 11(1):1-30.
- [5] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL - EASD - EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Journal Of Hepatology*, 2016, 64(6):1388-1402.
- [6] Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, et al. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver [J]. *Lancet (London, England)*, 1986, 1(8480):523-525.
- [7] Pagliaro L, Rinaldi F, Craxì A, et al. Percutaneous blind biopsy versus laparoscopy with guided biopsy in diagnosis of cirrhosis. A prospective, randomized trial [J]. *Digestive Diseases And Sciences*, 1983, 28(1):39-43.
- [8] Venkatesh SK, Yin M, Ehman RL. Magnetic resonance elastography of liver: technique, analysis, and clinical applications [J]. *Journal Of magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 2013, 37(3):544-555.
- [9] Venkatesh SK, Ehman RL. Magnetic resonance elastography of abdomen [J]. *Abdominal Imaging*, 2015, 40(4):745-759.
- [10] Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data [J]. *Clinical Gastroenterology And Hepatology: The Official Clinical Practice Journal Of The American Gastroenterological Association*, 2015, 13(3):440-451.
- [11] Chen J, Yin M, Talwalkar JA, et al. Diagnostic performance of MR elastography and vibration - controlled transient elastography in the detection of hepatic fibrosis in patients with severe to morbid obesity [J]. *Radiology*, 2017, 283(2):418-428.
- [12] Taljanovic MS, Gimber LH, Becker GW, et al. Shear-wave elastography: basic physics and musculoskeletal applications [J]. *Radiographics*, 2017, 37(3):855-870.
- [13] Ferraioli G, Tinelli C, Dal BB, et al. Accuracy of real-time shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C: a pilot study [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2012, 56(6):2125-2133.

- [14] Xiao G, Zhu S, Xiao X, et al. Comparison of laboratory tests, ultrasound, or magnetic resonance elastography to detect fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis: Xiao et al[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5):1486-1501.
- [15] Miyazaki S, Yamazaki Y, Murase K. Error analysis of the quantification of hepatic perfusion using a dual-input single-compartment model[J]. *Physics In Medicine And Biology*, 2008, 53(21):5927-5946.
- [16] Ou HY, Bonekamp S, Bonekamp D, et al. MRI arterial enhancement fraction in hepatic fibrosis and cirrhosis [J]. *AJR. American Journal Of Roentgenology*, 2013, 201(4):W596-602.
- [17] Sugimoto K, Shiraishi J, Moriyasu F, et al. Analysis of intrahepatic vascular morphological changes of chronic liver disease for assessment of liver fibrosis stages by micro-flow imaging with contrast-enhanced ultrasound: preliminary experience[J]. *European Radiology*, 2010, 20(11):2749-2757.
- [18] Bahl G, Cruite I, Wolfson T, et al. Noninvasive classification of hepatic fibrosis based on texture parameters from double contrast-enhanced magnetic resonance images[J]. *Journal Of magnetic Resonance Imaging: JM-RI*, 2012, 36(5):1154-1161.
- [19] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story [J]. *Gut*, 2015, 64(5):830-841.
- [20] Haimerl M, Utpatel K, Verloh N, et al. Gd-EOB-DTPA-enhanced MR relaxometry for the detection and staging of liver fibrosis [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:41429.
- [21] Shi C, Liu D, Xiao Z, et al. Monitoring tumor response to antivascular therapy using non-contrast intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MRI [J]. *Cancer Research*, 2017, 77(13):3491-3501.
- [22] Pan JH, Zhu S, Huang J, et al. Monitoring the process of endostar-induced tumor vascular normalization by non-contrast intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MRI[J]. *Frontiers In Oncology*, 2018, 8:524.
- [23] Liang J, Song X, Xiao Z, et al. Using IVIM-MRI and R2mapping to differentiate early stage liver fibrosis in a rat model of radiation-induced liver fibrosis [J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018:4673814.
- [24] Hu F, Yang R, Huang Z, et al. Liver fibrosis: in vivo evaluation using intravoxel incoherent motion-derived histogram metrics with histopathologic findings at 3.0 T [J]. *Abdominal Radiology*, 2017, 42(12):2855-2863.
- [25] Li RK, Ren XP, Yan FH, et al. Liver fibrosis detection and staging: a comparative study of T1p MR imaging and 2D real-time shear-wave elastography [J]. *Abdominal Radiology (New York)*, 2018, 43(7):1713-1722.
- [26] Zhao F, Deng M, Yuan J, et al. Experimental evaluation of accelerated T1rho relaxation quantification in human liver using limited spin-lock times [J]. *Korean Journal Of Radiology*, 2012, 13(6):736-742.
- [27] Banerjee R, Pavlides M, Tunnicliffe EM, et al. Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease [J]. *Journal Of Hepatology*, 2014, 60(1):69-77.
- [28] Guimaraes AR, Siqueira L, Uppal R, et al. T2 relaxation time is related to liver fibrosis severity [J]. *Quantitative Imaging In Medicine And Surgery*, 2016, 6(2):103-114.
- [29] Luetkens JA, Klein S, Träber F, et al. Quantification of liver fibrosis at T1 and T2 mapping with extracellular volume fraction MRI: preclinical results [J]. *Radiology*, 2018, 288(3):748-754.
- [30] Zhu B, Wei L, Rotile N, et al. Combined magnetic resonance elastography and collagen molecular magnetic resonance imaging accurately stage liver fibrosis in a rat model [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2017, 65(3):1015-1025.
- [31] Farrar CT, Gale EM, Kennan R, et al. CM-101: type I collagen-targeted MR imaging probe for detection of liver fibrosis [J]. *Radiology*, 2018, 287(2):581-589.
- [32] Watsky MA, Weber KT, Sun Y, et al. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2010, 282:165-192.
- [33] Rokugawa T, Konishi H, Ito M, et al. Evaluation of hepatic integrin $\alpha\beta 3$ expression in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mouse by 18F-FPP-RGD2 PET [J]. *Ejnmri Research*, 2018, 8(1):40.
- [34] Hatori A, Yui J, Xie L, et al. Utility of translocator protein (18 kDa) as a molecular imaging biomarker to monitor the progression of liver fibrosis [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:17327.
- [35] Douglass A, Wallace K, Parr R, et al. Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury [J]. *Journal Of Hepatology*, 2008, 49(1):88-98.
- [36] Luli S, Di Paolo D, Perri P, et al. A new fluorescence-based optical imaging method to non-invasively monitor hepatic myofibroblasts in vivo [J]. *Journal Of Hepatology*, 2016, 65(1):75-83.

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 孙楠 曲守方* 黄杰*

[摘要] 目的 制备染色体拷贝数变异(CNVs)国家参考品,并进行标定。方法 收集3份正常人样本,24份染色体非整倍体异常样本,11份微缺失微重复样本,提取基因组DNA,制备成国家参考品。用4家协作单位的染色体拷贝数检测试剂盒对国家参考品性能进行验证,确定准确性,并考察国家参考品在不同条件下(37℃条件下放置4周;放置于37℃条件下4周,期间拿出反复冻融3次)的稳定性及均匀性。结果 对43份浓度为 $15(\pm 1)\text{ng}/\mu\text{L}$ 国家参考品的检测结果中,有三家单位均检测出国家参考品标示的结果,有1家单位漏检一例嵌合体样本(1p36 30%)。经不同条件(37℃条件下放置4周;放置于37℃条件下4周,期间拿出反复冻融3次)处理的国家参考品的稳定性结果均一致,均匀性的结果均一致,表明满足参考品的要求。结论 成功建立染色体拷贝数变异国家参考品,该参考品可满足对染色体拷贝数检测的要求,经多家实验室进行验证,可用于国内大多数试剂盒的性能评价及临床实验室的质量评价。

[关键词] 拷贝数变异; 国家参考品; 协作标定

Preparation and calibration of the national reference for detection of chromosome copy number variations

JIA Zheng, ZHANG Wenxin, LI Lili, SUN Nan, QU Shoufang*, HUANG Jie*

(Division of In Vitro Diagnostics for Non-Infectious Diseases, National Institutes for food and drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] Objective To prepare and calibrate the national reference for chromosome copy number variations (CNVs). Methods The national reference was prepared based on DNA extracted from 3 normal cases, 24 cases with aneuploidies, and 11 cases with microduplications or microdeletions. Moreover, the accuracy of the national reference was verified by chromosomal copy number variations detection kits from four manufacturers, and the stability and homogeneity under various conditions (storage at 37℃ for 4 weeks; 37℃ for 4 weeks and 3 cycles of freeze-thaw at -20℃ and 37℃) were also evaluated. Results All the 43 cases with the concentration of $15(\pm 1)\text{ng}/\mu\text{L}$ in the national reference were accurately detected by the four detection kits except for 1 case (1p36 30%) not detected by one of the kits. Additionally, the national reference treated with different conditions (storage at 37℃ for 4 weeks; 37℃ for 4 weeks and 3 cycles of freeze-thaw at -20℃ and 37℃) exhibited high stability and homogeneity, implying it is qualified to be a reference. Conclusion With the verification of multiple laboratories, the prepared national reference for chromosome copy number variations meets the requirements for the detection of CNVs and is applicable for the evaluation of performances of most domestic detection kits and quality control of clinical laboratories.

[KEY WORDS] Copy number variations (CNVs); National reference; Collaborative calibration

基金项目:生殖健康及重大出生缺陷防控研究(2016YFC1000300)

作者单位:中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所非传染病诊断试剂室,北京 100050

*通信作者:曲守方, E-mail:qushoufang@126.com; 黄杰, E-mail:jhuang5522@126.com

注:贾峥和张文新为并列第一作者

拷贝数变异(copy number variations, CNVs)指在人类基因组中广泛存在的,从1 000 bp到数百万bp范围的缺失、插入、重复和复杂多位点的变异,主要表现为染色体亚显微水平的缺失和重复,是由基因组发生重排而导致的^[1],常导致人类复杂性疾病如肿瘤^[2]、自闭症^[3]、精神分裂症^[4]、先天畸形^[5]、发育迟缓和智力低下^[6-8]。

随着分子生物学技术的发展,染色体拷贝数变异检测的方法也由传统的核型分析^[9],发展到荧光原位杂交技术法(fluorescence in situ hybridization, FISH)^[10]、荧光定量PCR(realtime fluorescence quantitative PCR, RTFQ PCR)和多重链接探针法(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)^[11-12]、染色体微阵列分析(chromosomal microarray, CMA)^[13-16]和高通量测序技术(Next generation sequencing technology, NGS)^[17]等。然而目前在染色体拷贝数变异检测中,国内外都缺乏统一认可的国家参考品。本实验室计划研制一套能够进行染色体拷贝数变异检测性能评估的国家参考品,为相关试剂盒的注册检定及临床检验室内质评提供优质可靠的国家参考品。

1 材料与方法

1.1 研究对象

招募自愿参与项目的临床样品捐献者。部分微缺失微重复样本是通过EB病毒转染永生化的外周血B淋巴细胞系样本。本研究共收集到3份正常人样本,24份染色体非整倍体异常样本,11份微缺失微重复样本。

1.2 主要试剂

康宁公司的DNA提取试剂盒AxyPrep Mag Tissue-Blood genomic DNA (gDNA) Kit(磁珠法);染色体拷贝数变异检测试剂盒(联合探针锚定聚合测序法),批号:28180101Y,深圳华大智造科技有限公司(以下简称为A公司)提供;染色体拷贝数变异检测试剂盒(可逆末端终止测序法),批号:GM016-P320180102,杭州杰毅麦特医疗器械有限公司(以下简称为B公司)提供;染色体拷贝数变异检测试剂盒,(可逆末端终止测序法),批号:R2000180301,杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司(以下简称为C公司)提供;13/16/18/21/22/X/Y染色体非整倍体检测试剂盒(微阵列芯片法),批号:201703,广州市达瑞生物技术股份有限公司

(以下简称为D公司)提供。

1.3 主要仪器

BGISEQ-500基因测序仪,A公司提供;Next-Seq CN500基因测序仪,B公司和C公司提供;GCS 3000Dx v.2微阵列基因芯片分析系统,D公司提供。

1.4 方法

1.4.1 国家参考品的制备

按照DNA提取试剂盒说明书进行38份样本基因组DNA的提取,选取5例微重复微缺失DNA与正常人的基因组DNA量进行3:7比例混合得到5例30%微缺失微重复嵌合样本,即最终得到43份样本。将提取的基因组DNA,在1%琼脂糖凝胶上电泳,检测DNA样本的完整性。使用NanoDrop对得到的基因组DNA测定OD260/OD280和OD260/OD230值来检测DNA样本的纯度,并使用琼脂糖凝胶电泳方法对基因组DNA的完整性进行检测。最后使用Qubit Fluorometer3.0对基因组DNA进一步准确定量,然后将DNA样本稀释到15(±1)ng/μL。采用NGS对每个DNA样本进行实验验证,将验证合格的DNA样本进行分装,并贴上标签。

1.4.2 国家参考品的性能验证

分别使用4家协作标定单位生产的染色体拷贝数检测试剂盒,按照试剂盒的说明书进行操作,评价国家参考品的性能。

1.4.3 国家参考品的稳定性和均匀性验证

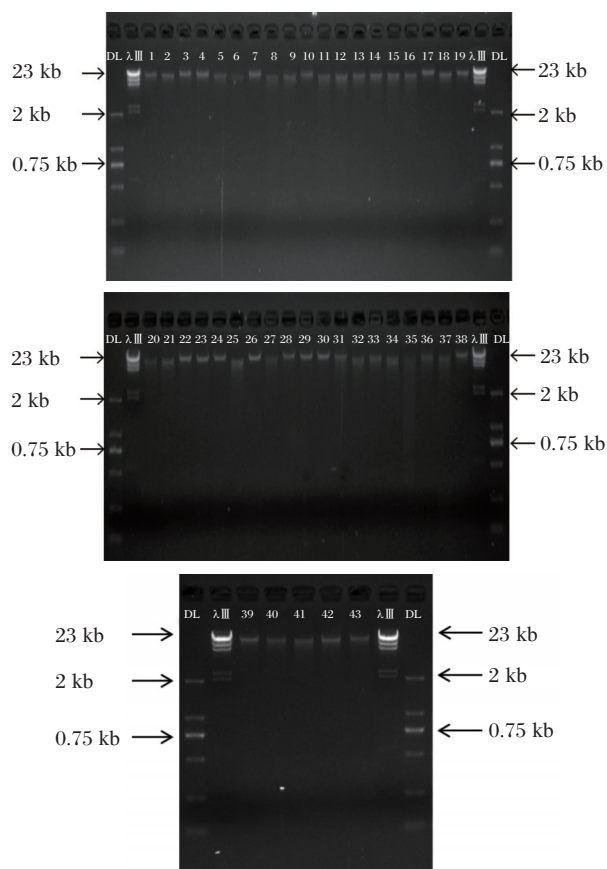
DNA样本常规均在-20℃以下保存,且运输过程中均使用干冰或冰袋保存。为了验证国家参考品的稳定性,随机选两套国家参考品,其中一套国家参考品放置于37℃条件下4周;另一套国家参考品放置于37℃条件下4周,期间拿出反复冻融3次(每隔4天一次)。采用A公司的染色体拷贝数变异检测试剂盒对这两套国家参考品进行检测,用来评价国家参考品的稳定性,同时随机取三套国家参考品,进行均匀性验证。

2 结果

2.1 国家参考品的制备及验证

在分子生物学实验中基因组DNA的提取是进一步研究基因组结构、功能和指纹遗传标记等的第一步,提取的DNA的完整性和纯度是后续诸多复杂高级实验分析成败的关键。对于43份样本提取的基因组DNA进行电泳,电泳图谱结果显示

DNA 条带完整和锐利,没有拖带或弥散带,符合实验室对基因组 DNA 完整性的要求,见图 1。采用紫外分光光度检测,提取的 DNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 值基本在 1.8~2.15 之间,表明 DNA 的纯度较高。经高通量测序方法对每个样本进行拷贝变异的检测,样本的 DNA 检测结果均与原始样本的信息一致,最后按照 17 μ L 体积进行分装。



注:DL为DL200 maker; λ III 为 λ DNA-Hind III Digest maker

图1 43份样本提取的DNA质量验证

Figure 1 The quality of extracted genomic DNA from 43 samples

2.2 国家参考品的性能验证

实验室邀请4家协作标定单位,选择了高通量测序法和基因芯片法对国家参考品进行性能验证。四家单位验证结果见表1,其中A单位和B单位对国家参考品43份样本的检测结果均与参考品标示的结果一致;C单位除了检测出参考品标示的结果外,还有9份样本多检出其他的拷贝数变异,包含了7份样本多检出1个小于1M的重复片段,1份样本多检出1个小于1M的缺失片段,另有1份样本检测出1个21.6M的缺失片段;D单位对国

家参考品中40号样本未检测到1p36嵌合型微缺失,其他42份样本均检测出参考品标示的结果,另外还有4份样本多检出其他的拷贝数变异,包括1份样本较其他三家单位多检出一个3.7M的片段重复以及其他3份样本分别多检测出11.3M,12.7M,29.8M的缺失片段。

为了评价试剂盒的嵌合体样本检测能力,设置了微缺失微重复嵌合体(约30%嵌合比例)样本。3家单位的基于高通量测序方法的试剂盒,对5份样本均能正确检出;而40号样本存在着两种嵌合体(约30%嵌合比例),基于基因芯片法的试剂盒存在着漏检现象。四家单位对Wolf-Hirschhorn综合征30%嵌合的检测结果如图2所示,4家协作单位均对该综合征检出。

2.3 国家参考品的稳定性和均匀性验证

标准物质的均匀性和稳定性亦是重要的条件。均匀性可保证一批原料所制备的标准物质均匀一致,稳定性可使一批标准物质长期分发使用,以保持特性值的连续性。实验室通过对两种不同的处理方法:37 $^{\circ}$ C放置4周,期间反复冻融(称为条件1);或者37 $^{\circ}$ C放置4周(称为条件2)后由A公司使用高通量测序方法进行国家参考品稳定性和均匀性验证,结果如表2所示。

通过对这两套国家参考品的稳定性进行检测,结果均与国家参考品标示的结果一致,表明国家参考品稳定性满足要求。同时使用一家协作标定单位的染色体拷贝数变异检测试剂盒,检测不同的3套国家参考品,作为参考品均匀性的验证,结果表明该3套国家参考品的结果均与国家参考品标示的结果一致,表明均匀性也满足要求。

3 讨论

大量研究表明,基因组变异是人类进化、疾病产生和发展的重要因素之一,其中拷贝数变异作为人类基因组中重要的结构性变异,在病理和生理中扮演着重要的角色。近年来,随着基因组测序技术的迅猛发展,拷贝数变异的检测精度已达到50 bp^[18]。其中特征性的CNVs可以作为染色体病的诊断指标,而准确的检测则是发现和揭示这些CNVs的前提。根据特征性的CNVs,可对相应的疾病进行准确诊断并提出相对应的最有效的解决方法。目前我国还没有拷贝数变异的国家参考品,而市场上存在高通量测序方法、微阵列比较基

表1 4家协作标定单位验证结果

Table 1 Verification results of references by detection kits from four manufacturers

样本编号	A单位	B单位	C单位	D单位
1-T2	2号染色体三体	2号染色体三体	2号染色体三体	2号染色体三体
2-T3	3号染色体三体	3号染色体三体	3号染色体三体	3号染色体三体
3-T4	4号染色体三体	4号染色体三体	4号染色体三体; 18q11.2(dup, 0.6 Mb)	4号染色体三体
4-T5	5号染色体三体	5号染色体三体	5号染色体三体	5号染色体三体
5-T6	6号染色体三体	6号染色体三体	6号染色体三体	6号染色体三体
6-T7	7号染色体三体	7号染色体三体	7号染色体三体	7号染色体三体
7-T8	8号染色体三体	8号染色体三体	8号染色体三体	8号染色体三体
8-T9	9号染色体三体	9号染色体三体	9号染色体三体	9号染色体三体
9-T10	10号染色体三体	10号染色体三体	10号染色体三体; 4q35.2(dup, 0.6 Mb)	10号染色体三体
10-T11	11号染色体三体	11号染色体三体	11号染色体三体	11号染色体三体
11-T12	12号染色体三体	12号染色体三体	12号染色体三体	12号染色体三体
12-T13	13号染色体三体	13号染色体三体	13号染色体三体	13号染色体三体
13-T14	14号染色体三体	14号染色体三体	14号染色体三体	14号染色体三体
14-T15	15号染色体三体	15号染色体三体	15号染色体三体	15号染色体三体
15-T16	16号染色体三体	16号染色体三体	16号染色体三体	16号染色体三体
16-T17	17号染色体三体	17号染色体三体	17号染色体三体	17号染色体三体
17-T18	18号染色体三体	18号染色体三体	18号染色体三体	18号染色体三体
18-T20	20号染色体三体	20号染色体三体	20号染色体三体	20号染色体三体
19-T21	21号染色体三体	21号染色体三体	21号染色体三体	21号染色体三体
20-T22	22号染色体三体	22号染色体三体	22号染色体三体; 2p24.3(dup, 0.8 Mb)	22号染色体三体
21-XO	X染色体单体	X染色体单体	X染色体单体	X染色体单体
22-47,XXX	X染色体三体	X染色体三体	X染色体三体	X染色体三体
23-47,XXY	XXY三体	XXY三体	XXY三体; 14q32.33(del, 0.7 Mb)	XXY三体
24-47,XYY	XYY三体	XYY三体	XYY三体	XYY三体
25-Jacobsen	11q23.3-q25(del, 14.0Mb),	11q23.3-q25(del, 14.2Mb)	11q23.3-q25(del, 14.1Mb)	11q23.3-q25(del, 14.1Mb)
26-Cri du Chat	5p15.33-p13.3(del, 33.2Mb)	5p15.33-p13.3(del, 33.1Mb)	5p15.33-p13.3(del, 33.1Mb); 17p13.3(dup, 0.5 Mb)	5p15.33-p13.3(del, 33.1Mb)
27-DiGeorge	22q11.21(del, 3.0Mb)	22q11.21(del, 2.7Mb)	22q11.21(del, 2.5Mb);	22q11.21(del, 3.6Mb); 22q11.1-q12.1(del 11.3Mb);
28-PWS	15q11.2-q13.1(del, 6.8Mb)	15q11.1-q13.1(del, 8.8Mb)	15q11.2-q13.1(del, 6.2Mb);	15q11.2-q13.1(del, 5.8Mb)
29-Angleman	15q11.2-q13.1(del, 5.0Mb)	15q11.2-q13.1(del, 5.4Mb)	15q11.2-q13.1(del, 4.8Mb);	15q11.2-q13.1(del, 5.3Mb)
30-Smith-Magenis	17p12-p11.2(del, 5.0Mb)	17p12-p11.2(del, 4.9Mb)	17p12-p11.2(del, 4.4Mb)	17p12-p11.2(del, 4.8Mb); 17p13.2-q12(del, 29.8Mb)
31-Williams-Beuren	7q11.23(del, 1.8M)	7q11.23(del, 1.5Mb)	7q11.23(del, 1.4Mb); 10q11.22(dup, 0.7Mb);	7q11.23(del, 1.4Mb); 11p11.12-q11(dup, 3.7Mb)
32-Wolf-Hirschhorn	4p16.3-p15.2(del, 26.0Mb)	4p16.3-p15.2(del, 26.0Mb)	4p16.3-p15.2(del, 25.9Mb);	4p16.3-p15.2(del, 25.9Mb)
33-1p36	XXY; 1p36.33-p36.22(del, 11.0Mb)	XXY; 1p36.33-p36.22(del, 10.8Mb)	XXY; 1p36.33-p36.22(del, 10.8Mb)	XXY; 1p36.33-p36.22(del, 10.7Mb)

续表 1

34-8p23.1	4q31.3-q35.2(del,37.4Mb8); 8p23.3-p21.3(dup,21.2Mb)	4q31.3-q35.2(del,38.1Mb); 8p23.3-p21.3(dup,21.1Mb)	4q31.3-q35.2(del,37.7Mb); 8p23.3-p21.3(dup,21.0Mb); 2p24.3(dup,0.8Mb)	4q31.3-q35.2(del, 37.9Mb); 8p23.3-p21.3(dup, 21.0Mb)
35-DiGeorge	22q11.21(del,2.7Mb)	22q11.21(del,2.7Mb)	22q11.21(del,2.9Mb)	22q11.21(del,3.2Mb); 22q11.1-q12.1(del, 12.7Mb)
36-Wolf- Hirschhorn30%	4p15.2-p16.3(del,26.0Mb) (36%嵌合)	4p16.3-p15.2(del,25.9Mb) (34%嵌合)	4p16.3-p15.2(del,26.0Mb) (35%嵌合)	4p16.3-p15.2(del, 24.5Mb) (26%嵌合)
37-Jacob sen30%	11q22.3-q25(del,13.7Mb) (29%嵌合)	11q23.3-q25(del,14.1Mb) (42%嵌合)	11q23.3-q25(del,14.2Mb) (34%嵌合); Xq13.3-q21.33(del,21.6Mb) (33%嵌合)	11q23.3-q25(del, 18.0Mb) (39%嵌合)
38-PWS30%	15q11.2-q13.1(del,5.0Mb) (42%嵌合)	15q11.2-q13.1(del,6.3Mb) (36%嵌合)	15q11.2-q13.1(del,6.2Mb) (42%嵌合)	15q11.2-q14(2del, 11.5Mb) (40%嵌合)
39-Angle man30%	15q11.2-q13.1(del,6.9Mb) (42%嵌合)	15q11.2-q13.1(del,6.5Mb) (33%嵌合)	15q11.2-q13.1(del,7.2Mb) (36%嵌合)	15q11.2-q13.3(del, 9.6Mb)(38%嵌合)
40-1p36 30%	XXY(30%); 1p36.33-p36.22 (del,11.0Mb) (35%嵌合)	XXY(28%嵌合); 1p36.33-p36.23(del,8.3Mb) (31%嵌合)	XXY(32%嵌合); 1p36.33-p36.22(del,11.0Mb) (36%嵌合)	不存在1p36缺失的情 况,存在X染色体嵌合型 重复
41-Normal	未检测到1M 以上的缺失 或者重复	未检测到1M 以上的缺失或 者重复	未检测到1M 以上的缺失 或者重复	未检测到1M 以上的缺 失或者重复
42-Normal	未检测到1M 以上的缺失 或者重复	未检测到1M 以上的缺失或 者重复	3p26.3(dup,0.6Mb)	未检测到1M 以上的缺 失或者重复
43-Normal	未检测到1M 以上的缺失 或者重复	未检测到1M 以上的缺失或 者重复	未检测到1M 以上的缺失 或者重复	未检测到1M 以上的缺 失或者重复

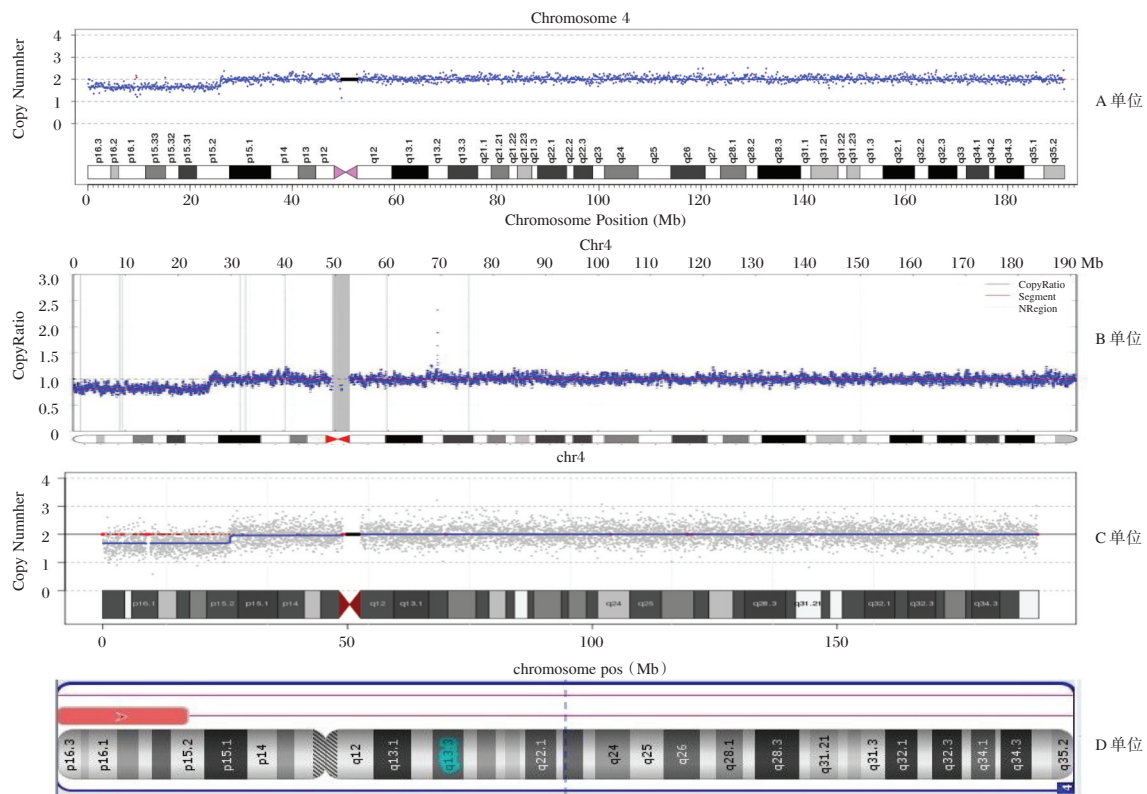


图 2 4家协作标定单位对 Wolf-Hirschhorn 综合征 30%嵌合样本的检测结果

Figure 2 Verification results of 30% Wolf-Hirschhorn syndrome by detection kits from four manufacturers

表2 不同处理条件对参考品稳定性的影响

Table 2 Stability of references treated under various conditions

样本编号	参考品标示结果	条件1处理后与参考品标示结果是否一致	条件2处理后与参考品标示结果是否一致
1-T2	2号染色体三体	一致	一致
2-T3	3号染色体三体	一致	一致
3-T4	4号染色体三体	一致	一致
4-T5	5号染色体三体	一致	一致
5-T6	6号染色体三体	一致	一致
6-T7	7号染色体三体	一致	一致
7-T8	8号染色体三体	一致	一致
8-T9	9号染色体三体	一致	一致
9-T10	10号染色体三体	一致	一致
10-T11	11号染色体三体	一致	一致
11-T12	12号染色体三体	一致	一致
12-T13	13号染色体三体	一致	一致
13-T14	14号染色体三体	一致	一致
14-T15	15号染色体三体	一致	一致
15-T16	16号染色体三体	一致	一致
16-T17	17号染色体三体	一致	一致
17-T18	18号染色体三体	一致	一致
18-T20	20号染色体三体	一致	一致
19-T21	21号染色体三体	一致	一致
20-T22	22号染色体三体	一致	一致
21-XO	X染色体单体	一致	一致
22-47, XXX	X染色体三体	一致	一致
23-47, XXY	XXY三体	一致	一致
24-47, XYY	XYY三体	一致	一致
25-Jacobsen综合征	11q23.3-q25 (del, 14.1 Mb)	一致	一致
26-Cri du Chat综合征	5p15.33-p13.3 (del, 33.1 Mb)	一致	一致
27-DiGeorge综合征	22q11.21 (del, 2.5 Mb)	一致	一致
28-PWS综合征	15q11.2-q13.1 (del, 6.2 Mb)	一致	一致
29-Angleman综合征	15q11.2-q13.1 (del, 4.8 Mb)	一致	一致
30-Smith-Magenis综合征	17p12-p11.2 (del, 4.7 Mb)	一致	一致
31-Williams-Beuren综合征	7q11.23 (del, 1.8 Mb)	一致	一致
32-Wolf-Hirschhorn综合征	4p16.3-p15.2 (del, 25.9 Mb)	一致	一致
33-1p36微缺失综合征	XXY三体; 1p36.33-p36.22 (del, 11.0 Mb)	一致	一致
34-8p23.1重复综合征	4q31.3-q35.2 (del, 37.9 Mb); 8p23.3-p21.3 (dup, 21.0 Mb)	一致	一致
35-DiGorge综合征	22q11.21 (del, 2.9 Mb)	一致	一致
36-Wolf-Hirschhorn综合征30%嵌合体	4p16.3-p15.2 (del, 25.9 Mb) (30%嵌合)	一致	一致
37-Jacobsen综合征30%嵌合体	11q23.3-q25 (del, 14.1 Mb) (30%嵌合)	一致	一致
38-PWS综合征30%嵌合体	15q11.2-q13.1 (del, 6.2 Mb) (30%嵌合)	一致	一致
39-Angleman综合征30%嵌合体	15q11.2-q13.1 (del, 4.8 Mb) (30%嵌合)	一致	一致
40-1p36微缺失综合征30%嵌合体	XXY三体(30%嵌合); 1p36.33-p36.22 (del, 11.0 Mb) (30%嵌合)	一致	一致
41-正常样本	未检测到1M以上的缺失或者重复	一致	一致
42-正常样本	未检测到1M以上的缺失或者重复	一致	一致
43-正常样本	未检测到1M以上的缺失或者重复	一致	一致

因组杂交芯片法(array-based comparative genomic hybridization, aCGH)及微阵列单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism array, SNP array)技术等多个不同原理的检测平台。所以为了更好的评价不同公司以及不同使用平台的体外诊断试剂盒

的生产质量和工艺优化水准,建立标准化的统一的国家参考品是非常必要的。

该国家参考品中除了1号和19号染色体属非整倍体外,其他染色体的非整倍体均已包含,同时增加了临床上相对常见或发病率较高的综合征样

本,更能有效的评价试剂盒的临床意义。根据生物制品国家标准物质制备和标定规程,用于制备标准物质的原材料应有足够的稳定性和高度的特异性,并有应有足够的数量^[31]。因此,本研究所制备的参考品选用了流产组织样本及细胞系能确保基因型背景明确、原料来源稳定,且满足标准物质制备的量要求及换批时一致性的样品。

在4家公司对参考品进行标定的结果中,除了一家协作标定单位在使用含有单核苷酸多态(SNP)探针的微阵列芯片法进行验证时,结果中有一例嵌合体参考品并未正确检出外,其他3家单位对国家参考品所有的标示结果均有正确检出。究其原因,可能是由于SNP探针的基因芯片法检测拷贝数的原理需要通过SNP位点信息来区分等位基因,对于真实临床样本的嵌合来说(包括父源和母源染色体),30%嵌合比例的样本可以用该芯片法进行准确判读。而国家参考品的嵌合参考品是由拷贝数正常和异常样本按照一定的比例配制而成的模拟样本,这种人工配制的嵌合型参考品会对SNP探针的微阵列芯片法的检测质控和结果均有一定程度的干扰,从而影响了微缺失微重复综合征(30%嵌合体)检测限样本的检测准确性。

从分析结果来看,该参考品具有较好的稳定性和均匀性,可满足运输稳定性的要求。该参考品需在低温冷冻条件下进行长期保存,根据国际惯例,目前人类基因检测相关试剂评价国家参考物质不设“有效期”,由我院对标准物质进行定期监测。

综上所述,本实验室制备了染色体拷贝数变异检测国家参考品,该参考品可满足染色体DNA拷贝数变异的检测要求,经多家实验室进行验证,可用于国内大多数试剂盒的性能评价及临床实验室质量评价。

参考文献

- [1] Lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large - scale variation in the human Genome [J]. *Nat Genet*, 2004,36(9):949-951.
- [2] Herrera L, Kakati S, Gibas L, et al. Gardner syndrome in a man with an interstitialdeletion of 5q [J]. *Am. J. Med. Genet*, 1986,25(3):473-476.
- [3] Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism [J]. *Science*, 2007,316(5823):445-49.
- [4] Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia [J]. *Nature*, 2008,455(7210):232-36.
- [5] Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*, 2012,367(23):2175-84.
- [6] Lisenka E. L. M. Vissers, I Bert B. A. Array - Based Comparative Genomic Hybridization for the Genome-wide Detection of Submicroscopic Chromosomal Abnormalities [J]. *Am. J. Hum. Genet*, 2003,73(6):1261-1270.
- [7] Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. Clinical applications of comparative genomic hybridization [J]. *Genet Med*, 1998,1(1):4-12.
- [8] Maria Kirchhoff, Hanne Rose, Claes Lundsteen. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics [J]. *J Med Genet*, 2001,38(11):740-744.
- [9] Lisa GS, Bassem AB. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays [J]. *Human Reproduction*, 2004,10(3):221-226.
- [10] Baart EB, Martini E, Van Opstal D. Screening for aneuploidies often different chromosomes in two rounds of FISH: A short and reliable protocol [J]. *Prenat Diagn*, 2004,24(12):955-961.
- [11] Reddy UM, Mennuti MT. Incorporating first trimester Down syndrome studies into prenatal screening: Executive summary of the National Institute of Child Health and Human Development workshop [J]. *Obstet Gynec*, 2006,107(1):167-173.
- [12] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002,30(12):e57.
- [13] Speicher MR, du Manoir S, Schröck E, et al. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA - amplification [J]. *Hum Mol Genet*, 1993,2(11):1907-1914.
- [14] Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, et al. High resolution-analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays [J]. *Nat Genet*, 1998, 20(2):207-11.
- [15] Rajcan-Separovic E, Qiao Y, Tyson C, et al. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(2):125-134.

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 高薇 史伟 孟庆红 于丹 姚开虎*

[摘要] **目的** 分析临床和实验室诊断百日咳病例的临床流行病学特点,并比较细菌培养与荧光定量 PCR 2种病原菌检测方法的应用价值。**方法** 收集北京儿童医院 864 例百日咳送检患儿的临床信息,并采用细菌培养和荧光定量 PCR 检测其鼻咽拭子标本,分析不同诊断标准下百日咳临床流行病学特点,以及 2 种实验室诊断的临床应用价值。**结果** 临床诊断与细菌培养和荧光定量 PCR 实验室诊断的百日咳病例的地区、季节和年龄分布相似,北京儿童医院就诊的百日咳患儿以河北(41.6%~45.2%)、北京(36.4%~42.9%)两地为主,诊断病例集中于夏秋季节(5月份-9月份),婴儿是百日咳发病的主要人群(77.5%~89.3%)。2 种实验室诊断方法相比,典型临床症状“吸气性回声”在细菌培养阳性样本组更为常见($\chi^2=5.086, P=0.024$)。以临床诊断为标准,细菌培养和荧光定量 PCR 诊断百日咳的灵敏度分别为 27.1%和 51.5%,特异度分别为 79.0%和 59.0%;不满足临床诊断标准的 458 例患儿中,细菌培养或荧光定量 PCR 检测为阳性的共 193 例(42.1%)。**结论** 临床诊断和实验室诊断百日咳揭示的临床流行病学特征相似。以临床诊断为标准,细菌培养诊断百日咳灵敏度低、特异度高,荧光定量 PCR 灵敏度较高、特异度较低。实验室检测能发现更多临床不典型病例。

[关键词] 百日咳实验室诊断;流行病学特点;细菌培养;荧光定量 PCR

Comparative study on clinical epidemiological characteristics and diagnostic methods of pertussis

LI Yue, YUAN Lin, WANG Qing, GAO Wei, SHI Wei, MENG Qinghong, YU Dan, YAO Kaihu*

(National Center for Children's Health/Beijing Children's Hospital, Capital Medical University/Beijing Pediatric Research Institute/National Clinical Research Center for Respiratory Diseases/Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education/Beijing Key Laboratory of Pediatric Respiratory Infection Diseases, Beijing, China, 100045)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the clinical epidemiological characteristics of clinical and laboratory diagnosis of pertussis cases, and to compare the application value of two kinds of pathogen detection methods: bacterial culture and quantitative real-time PCR. (RT-qPCR). **Methods** The clinical information of 864 children with pertussis in Beijing Children's Hospital was collected. The nasopharyngeal swab specimens were detected by bacterial culture and RT-qPCR. The clinical epidemiological characteristics of pertussis under different diagnostic criteria and two laboratory diagnoses were analyzed. **Results** The regional, seasonal and age distributions of pertussis cases diagnosed by laboratory diagnosis and bacterial culture and RT-qPCR were similar. The children with whooping cough in Beijing Children's Hospital are mainly in Hebei (41.6%~45.2%) and Beijing (36.4%~42.9%). The diagnosed cases are concentrated in

基金项目:国家自然科学基金(81701565)

作者单位:国家儿童医学中心/首都医科大学附属北京儿童医院/北京市儿科研究所/国家呼吸系统疾病临床医学研究中心/教育部儿科重大疾病研究重点实验室/儿童呼吸道感染性疾病研究北京市重点实验室,北京 100045

*通信作者:姚开虎, E-mail: yaokaihu@bch.com.cn

summer and autumn (May-September), and the baby is the main population of whooping cough (77.5%~89.3%). Compared to the two laboratory diagnostic methods, the typical clinical symptom "inhalation echo" is more common in the bacterial culture positive sample group ($\chi^2=5.086, P=0.024$). Based on clinical diagnosis, the sensitivity of bacterial culture and RT-qPCR for the diagnosis of whooping cough was 27.1% and 51.5%, and the specificity was 79.0% and 59.0% respectively. Among 458 children who did not meet the clinical diagnostic criteria, 193 (42.1%) were positive by bacterial culture or RT-qPCR. Conclusion Clinical diagnostic criteria and laboratory diagnostic criteria of pertussis revealed the similar epidemiological characteristics. Bacterial culture has a high specificity and low sensitivity, but RT-qPCR has a high sensitivity and low specificity. Laboratory detection can find more atypical pertussis cases.

[KEY WORDS] Pertussis laboratory detection; Epidemiological characteristics; Bacterial culture; Quantitative real-time PCR

百日咳是由百日咳鲍特菌引起的呼吸道传染病。百日咳早期诊断主要依赖患儿的典型临床表现,容易漏诊和误诊不典型病例。目前百日咳确诊依赖于实验室诊断,但不同国家和地区采用的实验室诊断标准常有差异。欧美发达国家多推荐细菌培养和核酸检测作为百日咳主要的实验室病原检测方法^[1]。普通PCR法灵敏度高于细菌培养法^[2],但检测样本易受污染且无法准确定量,荧光定量PCR法可以实现对微量病原核酸样本精准、实时、定量检测,是百日咳临床检测方法研究领域的前沿热点^[3]。本研究分别采用细菌培养和荧光定量PCR 2种方法,检测了北京儿童医院2017年4月至2018年3月一整年度共864例送检患儿的鼻咽拭子,探讨百日咳临床流行病学特点和2种实验室方法在检测儿童百日咳中的临床应用价值,以期为进一步认识这2种诊断方法所反应出的百日咳流行病学是否存在差异,为选择百日咳实验室诊断方法提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

北京儿童医院2017年4月至2018年3月共864例送检患儿的病历资料和采集的双侧鼻咽拭子,其中男520例(60.2%),女344例(39.8%),患儿中位年龄为5月龄,年龄范围为<1月龄~13.7周,404例患儿符合临床诊断的百日咳标准。临床诊断百日咳标准[美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC),2014]^[4]为患者咳嗽 ≥ 2 周,并具有 ≥ 1 个下列症状:①阵发性咳嗽;②吸气性回声;③咳嗽后呕吐;④呼吸暂停(伴或不伴有紫绀,仅适用于1岁以下婴儿)。收集临床资料包括患儿地区分布、时间分布、抗生素

治疗史等,临床表现包括咳嗽发汗、结膜下出血、舌系带溃疡等。

1.2 鼻咽拭子样本采集

采样人员手持细长拭子,经鼻垂直于面部或人体冠状面插入直至鼻咽后壁,充分接触和擦拭鼻咽后壁表面后取出。经左右侧鼻腔分别采集一份拭子样本^[5]。

1.3 实验室诊断方法

1.3.1 细菌培养

采集拭子后即刻床旁接种,以拭子反复“Z”字型划线接种于碳琼脂选择培养基,置于37℃孵箱培养。3天后开始每天检查培养皿至第7天。若见灰白色、圆形、半透明的疑似菌落,应继续分纯并对最终收集到的菌株进行百日咳鲍特菌血清玻片凝集试验,百日咳鲍特菌抗血清凝集阳性、副百日咳鲍特菌抗血清阴性确认为百日咳鲍特菌。鼻咽拭子在接种后放置于-70℃保存,后期进行统一PCR检测。

1.3.2 荧光定量PCR检测

采用离心柱法提取核酸,核酸提取纯化试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司(货号:Cat. #DA-451),按照试剂盒说明书提取核酸后收集待检测。百日咳鲍特菌核酸检测试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司在研项目(项目编号:G(2012)025),按照试剂盒说明书配置反应体系、设置反应条件。结果判定标准参照试剂盒说明书:检测通道无扩增曲线判为百日咳阴性,检测通道有扩增曲线且Ct值 < 40 判为百日咳阳性。

1.4 统计学分析

应用SPSS 19.0统计学软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料

以(%)来表示,两样本间率的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流行病学特征

细菌培养和荧光定量 PCR 2 种方法检出百日咳鲍特菌阳性样本分别数为 208 例和 399 例,分别占送检患儿总数的 24.1%(208/864)和 46.2%(399/864)。

2.1.1 年龄分布

临床诊断百日咳组、荧光定量 PCR 阳性组和细菌培养阳性组患儿的中位年龄相似,分别为 6 月龄、5 月龄和 5 月龄。不同标准诊断的患儿均以婴

儿为主(77.5%~89.3%),其中 ≥ 3 月龄~<6 月龄的婴儿最多,分别为 131 例(32.4%)和 132 例(33.1%)和 69 例(33.2%)。其他各年龄段人群分布,详见表 1。

2.1.2 地区分布

临床诊断百日咳组、荧光定量 PCR 阳性组和细菌培养阳性组患儿均以河北地区居多,分别为 168 例(41.6%)、175 例(43.9%)和 94 例(45.2%);第二位为北京,分别为 147 例(36.4%)、171 例(42.9%)和 88 例(42.3%)。其余患儿主要来自京津冀及周边地区,如天津、山东、内蒙、河南等,详见表 1。

表 1 临床诊断百日咳和实验室诊断百日咳患儿一般资料比较 [n(%)]
Table 1 General information of clinical and laboratory diagnosed pertussis patients [n(%)]

变量	分类	临床诊断百日咳 (n=404 例)	荧光定量 PCR 阳性 (n=399 例)	细菌培养阳性 (n=208 例)
年龄	<3 月龄	69(17.1)	83(20.8)	42(20.2)
	≥ 3 月龄~<6 月龄	131(32.4)	132(33.1)	69(33.2)
	≥ 6 月龄~<12 月龄	113(28.0)	99(24.8)	56(26.9)
	≥ 12 月龄~<18 月龄	49(12.1)	47(11.8)	18(8.7)
	≥ 18 月龄~<3 岁	19(4.7)	20(5.0)	12(5.8)
	≥ 3 岁	23(5.7)	18(4.5)	11(5.3)
地区	北京	147(36.4)	171(42.9)	88(42.3)
	河北	168(41.6)	175(43.9)	94(45.2)
	河南	9(2.2)	10(2.5)	4(1.9)
	山东	11(2.7)	6(1.5)	4(1.9)
	内蒙	11(2.7)	2(0.5)	0(0.0)
	天津	5(1.2)	5(1.3)	4(1.9)
	其他地区	53(13.1)	30(7.5)	14(6.7)
抗生素治疗	大环内酯单用	106(26.2)	104(26.1)	54(26.0)
	头孢单用	40(9.9)	38(9.5)	24(11.5)
	大环内酯且头孢	200(49.5)	192(48.1)	96(46.2)
	无抗生素治疗	40(9.9)	40(10.0)	21(10.1)

2.1.3 抗生素治疗

临床诊断百日咳组、荧光定量 PCR 阳性组和细菌培养阳性组抗生素使用比例均超过 50%,使用最多的抗生素种类主要为大环内酯类抗生素(72.1%~75.7%),其次为头孢类抗生素(58.6%~60.1%),详见表 1。

2.1.4 季节分布

2017 年 4 月至 2018 年 3 月全年 12 个月的细菌培养阳性样本数、荧光定量 PCR 阳性样本数以及临

床诊断百日咳患儿数变化趋势见图 1。5 月~9 月诊断病例数较多,占年诊断病例数的 63.4%~74.5%;在此期间月临床诊断病例中位数为 49 例(38 例~73 例),荧光定量 PCR 阳性样本中位数为 56 例(42 例~70 例),细菌培养阳性样本中位数为 32 例(21 例~53 例)。10 月份至次年 3 月份病例数减少,月临床诊断病例中位数为 20 例(5 例~35 例),荧光定量 PCR 阳性样本中位数为 19 例(9 例~22 例),细菌培养阳性样本中位数为 8 例(4 例~10 例),详见图 1。

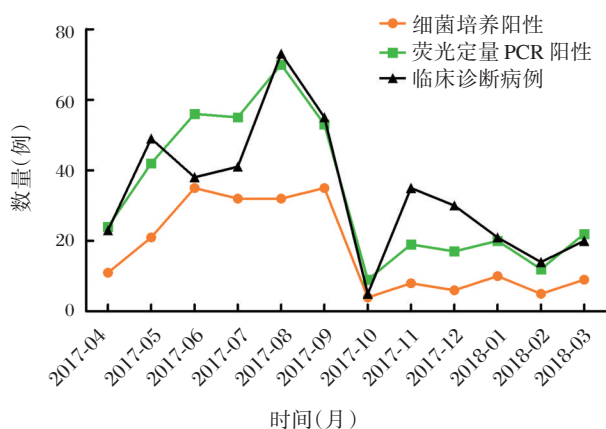


图1 全年百日咳检出数量随月份变化趋势

Figure 1 Pertussis detection yearly

2.2 2种病原菌检测方法的比较

2.2.1 患儿临床特征比较分析

以864例送检患儿为基数,荧光定量PCR阳性组和细菌培养阳性组中阵发性咳嗽、吸气性回声、咳嗽后呕吐、阵发性青紫、呼吸暂停、咳嗽发汗、结膜下出血等临床症状的比例,细菌培养阳性组均高于荧光定量PCR阳性组,其中吸气性回声比例在两组间具有显著性差异($\chi^2=5.086$, $P=0.024$),其他临床症状的差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表2。

表2 细菌培养与荧光定量PCR阳性患儿临床症状的比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of clinical characteristics of bacterial culture and Q-PCR positive samples [n(%)]

项目	细菌培养阳性组 (n=208例)	荧光定量PCR阳性 (n=399例)	χ^2 值	P值
阵发性咳嗽	163(78.4)	311(77.9)	0.014	0.905
吸气性回声	73(35.1)	105(26.3)	5.086	0.024
咳嗽后呕吐	144(69.2)	263(65.9)	0.680	0.409
阵发青紫	144(69.2)	271(67.9)	0.109	0.742
呼吸暂停	59(28.4)	97(24.3)	1.177	0.278
咳嗽发汗	44(21.2)	80(20.1)	0.102	0.749
结膜出血	10(4.8)	15(3.8)	0.380	0.537
舌系带溃疡	7(3.4)	16(4.0)	1.134	0.287

2.2.2 灵敏度和特异度比较分析

864例送检患儿中满足临床诊断标准者406例,458例不满足百日咳临床诊断标准。以临床诊断为标准,细菌培养和荧光定量PCR2种方法检测的灵敏度分别为27.1%(110/406)和51.5%(209/

406),特异度分别为79.0%(362/458)和59.0%(270/458)。细菌培养或荧光定量PCR检测为阳性但不满足临床诊断者193例,其中咳嗽不满2周者151例,咳嗽超过2周但缺乏典型咳嗽性状(阵发性咳嗽、吸气性回声和咳嗽后呕吐)者42例。咳嗽不满2周的151例中,具有至少一种典型咳嗽性状者133例。

3 讨论

中国疾病预防控制中心发布的2011-2017年百日咳流行病学特征显示,百日咳具有夏秋季多发,在男性、小年龄儿童中高发的流行病学特征^[6]。本研究数据同样显示,婴儿是诊断百日咳病例的主要易感人群,其中 ≥ 3 月龄~ < 6 月龄的小年龄婴儿最多,男性比例占60.2%,4月起百日咳诊断病例开始逐渐增多,5月-9月达高峰,9月后逐渐降低,以上流行病学特征与百日咳全国流行特点相符。以往研究^[2,7,8]中很少将临床诊断与病原学检测诊断所反应出的百日咳流行病学特点进行比较分析。本研究显示,临床诊断与2种病原学检测诊断的百日咳所反应的临床流行病学特征基本一致,提示只要严格执行标准,基于其中任何一种标准进行百日咳监测,都能反映百日咳的流行病学特征和动态变化。在无条件开展病原学检测的地方,完全可以通过临床诊断监测百日咳流行状况。

本研究数据以百日咳临床诊断为标准时,核酸检测法的灵敏度为细菌培养法灵敏度的1.9倍。大多数类似研究认为核酸检测法的灵敏度约为细菌培养法的2~6倍^[7-9],如袁林等^[9]研究显示核酸检测法的灵敏度为细菌培养法灵敏度的3倍,但也有报道中此比例高至29倍^[10]。造成这一比例高低不一的原因与方法学和患者特点有关。细菌培养法涉及的环节较多,各实验室样本采集、转运、分离培养、鉴定等环节的差异都会导致检测灵敏度不同^[11],核酸检测法中探针、引物、结果判定标准的差异也会导致灵敏度的不同^[12]。另外,不同研究中纳入的患儿接受抗生素治疗和疫苗接种的情况不同,抗菌药物治疗可降低呼吸道标本中病原菌丰度^[13];疫苗可以减轻百日咳发病和传播,也可能影响细菌增殖数量^[14],这些因素都可能间接影响2种检测方法的灵敏度。因此制定2种实验室诊断方法的标准操作规范和统一的指导原则对百日咳实验室诊断至关重要。

本研究中细菌培养或荧光定量 PCR 检测为阳性但不满足临床诊断者 193 例, 这些患者中主要是咳嗽持续时间不足 2 周的患儿, 咳嗽 2 周但缺乏百日咳典型咳嗽者较少, 提示临床诊断标准(美国 CDC, 2014)不能及时发现咳嗽时间不足 2 周的病例, 因此应该加强对咳嗽早期可疑病例, 尤其是咳嗽不足 2 周, 但具有典型咳嗽性状的筛查。另一方面, 百日咳治疗时早期应用抗生素对缓解症状及缩短病程均有益, 更加凸显了病原菌早期诊断的重要性。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)已对“咳嗽 \geq 2 周”作为百日咳临床诊断标准进行了修改, 在 WHO 更新的百日咳临床诊断标准(2018 年 9 月)^[15]中, “咳嗽 \geq 2 周”已不作为临床诊断百日咳的必须条件。

综上, 临床诊断、细菌培养和特异核酸诊断百日咳揭示的临床流行病学特征相似, 都可以作为百日咳临床连续监测的手段。以临床诊断为标准, 细菌培养诊断百日咳灵敏度低、特异度高, 荧光定量 PCR 灵敏度较高、特异度较低。实验室检测能发现更多临床不典型病例, 尤其有利于发现咳嗽早期不满足临床诊断标准的病例。核酸检测和细菌培养 2 种病原菌检测方法各具优势, 相互补充可降低临床漏诊、误诊率。核酸检测试剂也亟待标准化和商品化, 以尽快满足临床使用要求。

参考文献

- [1] 姚开虎, 邓继岩, 热夏提·达吾提. 百日咳诊断: 现行标准的局限性和 GPI 建议[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(9): 891-896.
- [2] Bruno A, Almeida M, Ruiz G. A place for Bordetella pertussis in PCR-based diagnosis of community-acquired pneumonia [J]. Infect Dis (Lond), 2018, 50(3): 232-235.
- [3] Mohammad R, Rusung T, Ghada N, et al. Evaluation of amplification targets for the specific detection of Bordetella pertussis using real-time polymerase chain reaction [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2014, 25(4): 217-221.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases: chapter 10: pertussis [EB/OL]. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt10-pertussis.html#laboratory>, 2014-01-01/2019-05-24.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Proper Technique for obtaining a nasopharyngeal specimen for isolation of Bordetella pertussis [EB/OL]. <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/specimen-collection.html#1>, 2017-08-07/2019-05-24.
- [6] 宁桂军, 高源, 吴丹, 等. 中国 2011-2017 年百日咳流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2018, 24(3): 264-273.
- [7] Lee A, Cassidy P, Pawloski L, et al. Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of Bordetella pertussis infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT) [J]. Plos One, 2018, 13(4): e0195979.
- [8] Schmidt G, Liese J, Porter F, et al. Polymerase chain reaction (PCR) compared with conventional identification in culture for detection of Bordetella pertussis in 7153 children [J]. Clinical Microbiology & Infection, 2010, 3(4): 462-467.
- [9] 袁林, 俞桑洁, 姚开虎, 等. 聚合酶链反应和细菌培养及血清学方法诊断百日咳的比较研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(4): 354-357.
- [10] 王增国, 杨杨, 刘莹, 等. 百日咳实验室诊断方法的应用分析与比较[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(10): 1010-1012.
- [11] 邓继岩, 王红梅, 田树凤. 儿童百日咳的临床特点及实验室诊断[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(22): 1692-1695.
- [12] Martini H, Detemmerman L, Soetens O, et al. Improving specificity of Bordetella pertussis detection using a four target real-time PCR [J]. Plos One, 2017, 12(4): e0175587.
- [13] 李亚绒. 百日咳治疗研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(22): 1696-1698.
- [14] Bechini A, Tiscione E, Boccalini S, et al. Acellular pertussis vaccine use in risk groups (adolescents, pregnant women, newborns and health care workers): a review of evidences and recommendations [J]. Vaccine, 2012, 30(35): 5179-5190.
- [15] World Health Organization (WHO). WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases [EB/OL]. https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/WHO_SurveillanceVaccinePreventable_16_Pertussis_R2.pdf ua=1, 2018-09-05/2019-05-24.

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 江先海 徐忠玉*

[摘要] 目的 评价新开发的一种基因芯片技术在6种常见致病菌的耐药基因检测中的作用,以期快速、高效地监测相关细菌的耐药情况。方法 收集临床分离的革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌41株、肠球菌33株)和革兰氏阴性菌(大肠埃希菌57株、肺炎克雷伯菌39株、鲍曼不动杆菌32株、铜绿假单胞菌35株),通过微生物鉴定药敏测试系统进行药敏测试;同时制备耐药基因芯片,对各菌株行多重PCR扩增、芯片杂交及检测;比较药敏实验和芯片检测结果的符合率。结果 研究显示6种常见致病菌的 β -内酰胺类、大环内酯-林可酰胺-链阳菌素、四环素类、氯霉素类、甲氧苄啶和磺胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因阳性率与药敏试验结果一致,总符合率在93%~100%,其中仅有肺炎克雷伯菌检出青霉素类耐药基因 *blaZ*,大肠埃希菌未检出碳青霉类耐药基因。大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌的糖肽类耐药基因阳性率与药敏试验结果一致,但金黄色葡萄球菌、肠球菌、铜绿假单胞菌糖肽类耐药基因阳性率与药敏试验结果存在差异。结论 新开发的芯片可检出6种常见致病菌的8类抗生素耐药基因,而青霉素类耐药基因 *blaZ* 可能在芯片设计上仅适用于肺炎克雷伯菌,碳青霉类耐药基因可能在该芯片设计上不适用于大肠埃希菌,有待进一步改进。

[关键词] 基因芯片; 耐药性; 药敏实验; 抗生素

Establishment and application of an antibiotics-resistance gene detection chip for common pathogenic bacteria

GUO Jianlian, XIAO Binlong, LIU Huina, JIANG Xianhai, XU Zhongyu*

(Clinical Laboratory, The 909th Hospital, Zhangzhou, Fujian, China, 363000)

[ABSTRACT] Objective To evaluate the role of a developed gene chip technique in the detection of drug resistance genes in 6 common pathogenic bacteria, in order to quickly and efficiently monitor the resistance of related bacteria. Methods The gram positive bacteria isolated from clinical (41 strains of *Staphylococcus aureus*, 33 strains of Enterococcus) and Gram-negative bacteria (57 strains of *Escherichia coli*, 39 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 32 strains of *Acinetobacter Baumannii*, 35 strains of *Pseudomonas aeruginosa*), were collected for the drug sensitivity test through microbial identification and drug sensitivity test system. At the same time, the drug resistance gene chip was prepared, then the strains are amplified by multiple PCR and hybridization with the chip. The coincidence rate was compared between the drug sensitivity test and the chip. Results The positive rate of resistance gene and drug sensitivity test are consistent among beta-lactam, cephalosporin macrolide-lynkamide streptogramin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim, sulfonamides, quinolones and aminoglycoside for 6 kinds of the bacteria. The total coincidence rate in 93%~100%. Penicillin resistant gene *blaZ* was only detected from *Klebsiella pneumoniae*. In addition, no carbapenems resistant genes were detected in *Escherichia coli*. The positive rate of the resistance gene of glycopeptides for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter Baumannii* was the same as that of

基金项目:南京军区面上项目南京军区医学科技创新课题(14AS086)

作者单位:联勤保障部队第九〇九医院检验科,福建,漳州,363000

*通信作者:徐忠玉, E-mail: xuzhongyu175@163.com

the drug sensitivity test, but the positive rate of the antibiotic resistance gene of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas aeruginosa* was different from that of the drug sensitivity test. Conclusion The developed chips can detect 8 kinds of antibiotic resistance genes of 6 common pathogens, but penicillins resistance gene *blaZ* may apply to *Klebsiella pneumoniae* in chip design. Carbapenems resistant genes may not be suitable for *Escherichia coli* in the chip design. The chip needs further improvement.

[KEY WORDS] Gene chip; Drug resistance; Antibiotic susceptibility test; Antibiotic

细菌耐药性的监测,对于控制医院感染耐药菌株的发生,促进抗菌药物的合理使用具有重要意义^[1]。目前常规检验手段是药敏实验,得出结果需要至少2~3天,甚至更长周期,而对于重症监护病房(intensive care unit, ICU)等对时效性要求较高的科室而言,如此长的周期给其及时诊治带来了障碍,临床迫切需要能快速、准确监测细菌耐药性的方法。随着分子诊断技术迅速发展,基因芯片在细菌耐药监测方面体现出极大的优势^[2]。本研究通过设计一种新的耐药基因芯片,对6种常见致病菌进行芯片检测^[3-4],以期快速、高效地监测其相应细菌的耐药情况,为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

收集2016年1月至2017年6月间临床送检的伤口分泌液中所分离的病原菌237株,其中革兰氏阳性菌74株(金黄色葡萄球菌41株、肠球菌33株),革兰氏阴性菌163株(大肠埃希菌57株、肺炎克雷伯菌39株、鲍曼不动杆菌32株、铜绿假单胞菌35株)。

1.2 主要试剂

NC33和PC50鉴定药敏板条(德国西门子公司);液体LB培养基[上海生工生物工程(上海)股份有限公司];CTAB/NaCl溶液(北京索莱宝科技有限公司);苯酚/氯仿/异戊醇混合液(国药集团化学试剂有限公司);探针用点样液(6×SSC, 0.1% SDS)(北京博奥生物有限公司);醛基化玻片(北京博奥生物有限公司);及杂交液(5×SSC, 5×Denhardt, 10 μg/mL 鲑鱼DNA, 0.3% SDS)均为北京博奥生物有限公司产品。

1.3 主要仪器

微生物鉴定药敏测试系统 MicroScan walk-Away-96(德国西门子公司);ABI 2720 PCR扩增仪[美国应用生物系统(ABI)公司];基因芯片扫描仪 GenePix 4000B(美国Axon公司)。

1.4 方法

1.4.1 细菌鉴定和药敏试验

通过微生物鉴定药敏测试系统 MicroScan walkAway-96,分别使用NC33和PC50鉴定药敏板条对革兰氏阴性菌(9类常用抗生素)和革兰氏阳性菌(11类常用抗生素)进行药敏测试。药敏结果按照CLSI-2013版标准^[5]进行判定。

1.4.2 检测引物和探针的设计

根据GeneBank和抗生素耐药基因数据库(Antibiotic Resistance Genes Database, ARDB)公共数据库下载得到常用类抗生素(革兰阳性菌11类和革兰阴性菌9类)的主要耐药基因的基因序列,然后使用MegAlign程序进行序列比对,选择序列保守区域使用PrimerSelect软件进行引物及探针设计。使用NCBI中的Primer-BLAST程序对引物及探针进行特异性检测,以确定引物和探针的特异性。耐药基因引物及探针序列见表1。

1.4.3 基因芯片制备和杂交

将制备的探针用点样液稀释至终浓度为50 μmol/L,各取6 μL置于384孔板上,用微阵列点样仪点到醛基化玻片上,每个点重复3次;同时设置空白对照,点样模式详见表2。将点样后的芯片室温放置至少20 h。使用时用0.2% SDS洗去芯片上的一些未共价结合的寡聚核苷酸,然后用超纯水冲洗残余的SDS,自然晾干,备用。

1.4.4 致病菌DNA基因组的提取和纯化

革兰氏阳性菌采用玻璃珠法,革兰氏阴性菌采用十六烷基三甲基溴化铵法,分别提取DNA基因组。取10 μL提取的基因组DNA溶液加1.99 mL水稀释后测量OD₂₆₀和OD₂₈₀值,蒸馏水作为空白,计算OD₂₆₀/OD₂₈₀比值和DNA浓度(1 OD₂₆₀=50 μg/mL DNA)。

1.4.5 多重PCR扩增反应

按照每一管检测6个耐药基因进行多重PCR扩增。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,53℃~58℃退火1 min,72℃延伸3 min,

表 1 耐药基因的引物和探针序列

Table 1 Sequences for primers and probes of drug-resistant genes

基因	引物	探针
<i>cmy2</i>	cmy2-F: TCCACCCGGTTATGCGAGAG cmy2-R: ATTCGGGCCGTCAGTTTGTA	cmy2-P: GTCGACATGGCGCATCAGCT
<i>ges</i>	ges-F: ATCGGCTTTACTCACGACCT ges-R: CGCCATTCTGGCTAACGIG	ges-P: GATCAGCCTTGTGCAGCGAC
<i>kpc</i>	kpc-F: TGCCCGTCGATTTCTGTGCGT kpc-R: CTGTGACCCGCAATCCTCC	kpc-P: GTCGCCGTACACTGCGCGTG
<i>tem</i>	tem-F: CGGTTGCGCTTCATTCTCTTT tem-R: TCTGAGAGGCCATATCTGACCG	tem-P: ATCGATCAAGCAAATACAGACAT
<i>ctxm-NG-1</i>	ctxm-NG-1-F: GAGGGCGTCAGGGCTTTGT ctxm-NG-1-R: GGCATTAGTCTCGCCCGTG	ctxm-NG-1-P: GCGGCGCATCTCGTGCGTT
<i>ctxm-NG-2</i>	ctxm-NG-2-F: AGTGCACGGACCGTCAA ctxm-NG-2-R: ATTACGTGGTTGGTGCAT	ctxm-NG-2-P: CTCCCGCATATAAGGCCGAC
<i>ctxm-1</i>	ctxm-1-F: AGTGGACGGTATCACTGCGT ctxm-1-R: GTCGCCGTTGCTATCCCACC	ctxm-1-P: CAGTCGGTTCGTTGGTTCGCTT
<i>OXA1</i>	OXA 1-F: TTAACAACGGCCGCGATG OXA 1-R: CGTCACCTGATTTCCAATC	OXA 1-P: TGACGGATACATAAGAGGATAC
<i>OXA10</i>	OXA 10-F: AAGGTTCTGTCCGAACCGG OXA10-R: GAATCACCCTAGTTTAAACCGTGA	OXA10-P: GACTCCTCCGATTCAGTAATTG
<i>OXA5</i>	oxa5-F: ACTAATGGCAGGGCACAGCC oxa 5-R: TATCCCCACAAACCCCAA	OXA5-P: CACCGAATACTTAGACTACGAAG
<i>mecA</i>	mecA-F: AAATAATCCAGCATAATCTATAA mecA-R: GCATCACATAATGAGATAACGG	mecA-P: ATTACGAGTTCTATCGAGAGGTTGAT
<i>SHV</i>	SHV-F: GGTGAGGCTGAATAGAAI'GAG SHV-R: CGCGGATTGCTTGATTCTG	SHV-P: GCCCGTCCATTATGCGGCAT
<i>blaZ</i>	blaZ-F: CACGATCTAAAGAACTAGAGGA blaZ-R: TGTACTTTGGTAACACCTCGT	blaZ-P: GTCGTTTGCCTAACAGATTAATAAAGTT
<i>aac3iia</i>	aac3iia-F: GTCGGGACGACTACCCACT aac3iia-R: GCTGGTACGAGAGTTAGTCG	aac3iia-P: GGTGCTTTCGCTCGCG
<i>aac6ia</i>	aac6ia-F: CACAACCTTGTTTTCGGTCGCTT aac6ia-R: TCATGGTTTTGTTTACCATGGTC	aac6ia-P: CCGTCCATACCGTTAAGCGGA
<i>aac6ib</i>	aac6ib-F: AAGCCATCGGATCCAAAGCC aac6ib-R: ATGCCGTGTCGTCTCAAGTG	aac6ib-P: TAGATCCTTGTAAGAGCGGACC
<i>aac6ie</i>	aac6ie-F: GCACTTGGGAGAATGATAGT aac6ie-R: GCACCACTACATTAACCCCTAAC	aac6ie-P: GCACAAGATCAATTAGAGCACCCG
<i>ant(6)-1</i>	ant(6)-1-F: GCACGGAGATGATGGAATATTTT ant(6)-1-R: AAAGTATCCCTACAATCACTC	ant(6)-1-P: TCGTCGGCGTCTAGTCATA
<i>aad9ib</i>	aad9ib-F: TTGGTTTCAGCGTAAAATGTGGGT aad9ib-R: CTATCAAGTGTGTAACAGATCAC	aad9ib-P: TCAGTATATGACCTAACATTCCA
<i>aadd</i>	aadd-F: ATCGTTGTGACAGGACCACGA aadd-R: AAGTATGACAGCACATACTG	aadd-P: TATTGACGACGCGTTGCTT
<i>aph3ia</i>	aph3ia-F: CGTCGATATGATCGGCAGAT aph3ia-R: CAACACCGTTTTACATTGTGCGA	aph3ia-P: TATGACGCATGCGCTATTTGCTGTG
<i>aph3iia</i>	aph3iia-F: GCGCCTTAGCGACATTGATGT aph3iia-R: TTCGATACCCTATGTCCCGC	aph3iia-P: CCGGCATCTGCATTGCAAAA
<i>aph6id</i>	ph6id-F: TTCTGCGAATTGACCGGGAG ph6id-R: GGGCCCGACTAGCAGTA	aph6id-P: GTCCAGCTGCATCGCGCTGC
<i>ermA</i>	ermA-F: TCGTTGAGAAGGGATTGCG ermA-R: TCAAATACAGATCGTACCTATGGC	ermA-P: TGTGCAAGCAGCTTTCGCTT
<i>ermB</i>	ermB-F: TCTTACCATTATAGCACAAA ermB-R: ATAGAGCTCATCGCTGAGCG	ermB-P: GGCAAGAGTAGCCTTCGTGTTCCA
<i>ermC</i>	ermC-F: AGTGGTAATTCGTTACTAGC ermC-R: CTGAATATTGTTTAAATCGCATAT	ermC-P: TATTAGCTTATCAAATCCCTT
<i>lunb</i>	lunb-F: ACAACAAGAATATATTGCATAAGTT lunb-R: AACTGAGCATGGGTCTTGCT	lunb-P: AGTCACTGACATCTAGCAATTAGACG

续表 1

<i>msrA</i>	<i>msrA</i> -F: TTGATACAGCTAATCATGGATGGGT <i>msrA</i> -R: TCATCCACCTACATACTTCGG	<i>msrA</i> -P: AGCCTACATTAATCACTCAAGTGGGA
<i>vatB</i>	<i>vatB</i> -F: ATTGTTGTCAGATAGCAAAGGA <i>vatB</i> -R: CAATGGATGCTCTCCAGAAC	<i>vatB</i> -P: GAAATCATCTTGCGGATAGGA
<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F: CGTGCGAGATGCGCTTCAT <i>tetA</i> -R: GGACAGACAGAGTAGAGCGG	<i>tetA</i> -P: CCGCAAACGGCCCCGAGTGAT
<i>tetB</i>	<i>tetB</i> -F: TATTTTGGTGCGTGGTGAGG <i>tetB</i> -R: CCTCCTGACGTTGAGGGTGT	<i>tetB</i> -P: TGCGATTAGGTCGATTAGACCCACT
<i>tetD</i>	<i>tetD</i> -F: GCCGTGCGCTTGTATCTCC <i>tetD</i> -R: GACTGCCCGGCCAGAGAAAT	<i>tetD</i> -P: ATTCGAGTCCGTCGATTCTGA
<i>tetG</i>	<i>tetG</i> -F: AACCGGGTCGTCGTTCTGC <i>tetG</i> -R: ATGCGCGCGACCAATCCAAT	<i>tetG</i> -P: GCGACCAGGCGTTGCGTTGA
<i>tetK</i>	<i>tetK</i> -F: TGGTTGTTTCTTGGTGGCTG <i>tetK</i> -R: AAGCGTTTAAACTAATAATCGCAT	<i>tetK</i> -P: TGTTCTACGGATGCGTATGGT
<i>tetL</i>	<i>tetL</i> -F: CGATCTCACTCTGATATGCT <i>tetL</i> -R: TTGTGAATTAAGCGCGCCAA	<i>tetL</i> -P: AGACGGTTAATCTTAAGGTT
<i>tetM</i>	<i>tetM</i> -F: CGACTTTTAGACGATCAGAGAAGG <i>tetM</i> -R: CTGTGTACGCATCCTTTTGAGC	<i>tetM</i> -P: ACAGAGCGCACCAGATATCCA
<i>tetW</i>	<i>tetW</i> -F: CCGCGGCCAATCGGATTTAT <i>tetW</i> -R: TTCTTACGGGAGAGCCGTGG	<i>tetW</i> -P: CCGGTTCCGATTGAAGGCAT
<i>catA1</i>	<i>catA1</i> -F: TTCGCCGCTGCATGAAGCT <i>catA1</i> -R: AGTGCCAGGTTTCATCCGTACAA	<i>catA1</i> -P: TAGCAGCAGCATTTGGCCGA
<i>catA9</i>	<i>catA9</i> -F: ATAGGTTGGCGGAAATTTTG <i>catA9</i> -R: CCTTGCATATGAACCATAACC	<i>catA9</i> -P: ACCTAATTGAATATAATTAGGCGT
<i>catB3</i>	<i>catB3</i> -F: CATTGGCTGCAGATCAGCCG <i>catB3</i> -R: CCGGCTTTGTCAATCTCCATGG	<i>catB3</i> -P: CGAATCAGCATTCCATGCCG
<i>cml-e1</i>	<i>cml-e1</i> -F: GTATGGCGGACGTCCTTGCT <i>cml-e1</i> -R: GCTAGATGAGCCGATCAGCT	<i>cml-e1</i> -P: GCGCCCGTATGTTTCGCTTT
<i>cml-e3</i>	<i>cml-e3</i> -F: GCGGCACGAGCTTTGTC <i>cml-e3</i> -R: CTAGGCGCTATCTCGGGGT	<i>cml-e3</i> -P: AGACGCTCCGGCCTCAT
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> -F: ACGAATATACGAGCAAATCA <i>vanA</i> -R: CCGGTTATCTTTAGAAAACAATT	<i>vanA</i> -P: ATTGCTATTGATGACCAAC
<i>vanD</i>	<i>vanD</i> -F: GGCGCCTGTTAGCAGGAAATC <i>vanD</i> -R: GGCCTGCTTCGATCATCGG	<i>vanD</i> -P: GATGACCATCGAGACGGCCA
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F: ATGCTGCGCATGGCCAGTAT <i>qnrA</i> -R: ACAAGTCGGAGGAGAAGTGG	<i>qnrA</i> -P: CGTCGGAAGTCGTTTCCGAT
<i>dfrA1</i>	<i>dfrA1</i> -F: CACATGGCTTTGGGTTGGCGA <i>dfrA1</i> -R: ACCCTTCCGCTGCGATGTCATT	<i>dfrA1</i> -P: TTGTGAAACTATCACTAATGG
<i>dfrA5</i>	<i>dfrA5</i> -F: GGCAGTGATGTGTTGCGTCG <i>dfrA5</i> -R: ATATCTCGCGGCCACCAACG	<i>dfrA5</i> -P: TCCACACATACCCTGGTCCG
<i>dfrA7</i>	<i>dfrA7</i> -F: AGCAAATGAGCGTAACGT <i>dfrA7</i> -R: CATACTGAAAGCTAGACATA	<i>dfrA7</i> -P: TTAGCCTTTTTTCCAAATCTG
<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i> -F: CGACATTTTCATCGTTGCGCT <i>dfrA12</i> -R: CGGTCACCCCGTAAGGTTGT	<i>dfrA12</i> -P: ATGAACTCGGAATCAGTAC
<i>dfrA15</i>	<i>dfrA15</i> -F: CCTCATGGGTAGCCAAAGCT <i>dfrA15</i> -R: CTCTTTGCCAATGTTGGTAACATT	<i>dfrA15</i> -P: CAACACTCATTGAAGTTCAATG
<i>dfrA16</i>	<i>dfrA16</i> -F: TGAGCTGCAIICGTCGAAAAG <i>dfrA16</i> -R: CGGTCCAATACAAAGCCATGT	<i>dfrA16</i> -P: ACCAGATATTCCATGGAGCG
<i>dfrA17</i>	<i>dfrA17</i> -F: CGTCGTAACGTGTAGTGTGCG <i>dfrA17</i> -R: GACCTTCAACGGATACAGTAACG	<i>dfrA17</i> -P: TTGAAAATATTATTGATTTCTG
<i>dfrB2</i>	<i>dfrB2</i> -F: TGAAAGCAACCGCTCCGC <i>dfrB2</i> -R: TTCGACCTGCCAAGGGC	<i>dfrB2</i> -P: AAGTAGCGATGAAGCCAACG
<i>sul1</i>	<i>sul1</i> -F: AGGACGTCGGGTATGTGCGAG <i>sul1</i> -R: ATGCGAGGTGAAGCCGCGT	<i>sul1</i> -P: CGGCGTGGGCTACCTGAACG

表2 基因芯片点样模式
Table 2 Gene chip dot pattern

	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18
1	<i>cmy2</i> (头孢类耐药基因)	<i>ges</i> (碳青霉索类耐药基因)	<i>kpc</i> (碳青霉索类耐药基因)	<i>tem</i> (头孢类耐药基因)	<i>ctxm-NG-1</i> (头孢类耐药基因)	<i>ctxm-NG-2</i> (头孢类耐药基因)
2	<i>ctxm-1</i> (头孢类耐药基因)	<i>OXA1</i> (头孢类耐药基因)	<i>OXA5</i> (头孢类耐药基因)	<i>OXA10</i> (头孢类耐药基因)	<i>mecA</i> (青霉索类耐药基因)	<i>SHV</i> (头孢类耐药基因)
3	<i>BlaZ</i> (青霉索类耐药基因)	<i>aac3iia</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aac6ia</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aac6ib</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aac6ie</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>ant(6)-1</i> (氨基糖苷类耐药基因)
4	<i>aad9ib</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aadd</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aph3ia</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aph3iia</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>aph6id</i> (氨基糖苷类耐药基因)	<i>ermA</i> (大环内酯-林克酰胺-链阳菌素类药物耐药基因)
5	<i>ermB</i> (大环内酯-林克酰胺-链阳菌素类药物耐药基因)	<i>ermC</i> (大环内酯-林克酰胺-链阳菌素类药物耐药基因)	<i>lunb</i> (大环内酯-林克酰胺-链阳菌素类药物耐药基因)	<i>msrA</i> (大环内酯-林克酰胺-链阳菌素类药物耐药基因)	<i>vatB</i> (大环内酯-林克酰胺-链阳菌素类药物耐药基因)	<i>tetA</i> (四环素类耐药基因)
6	<i>tetB</i> (四环素类耐药基因)	<i>tetD</i> (四环素类耐药基因)	<i>tetG</i> (四环素类耐药基因)	<i>tetK</i> (四环素类耐药基因)	<i>tetL</i> (四环素类耐药基因)	<i>tetM</i> (四环素类耐药基因)
7	<i>tetW</i> (四环素类耐药基因)	<i>catA1</i> (氯霉索类耐药基因)	<i>catA9</i> (氯霉索类耐药基因)	<i>catB3</i> (氯霉索类耐药基因)	<i>cml-el</i> (氯霉索类耐药基因)	<i>cml-e3</i> (氯霉索类耐药基因)
8	<i>vanA</i> (糖肽类耐药基因)	<i>vanD</i> (糖肽类耐药基因)	<i>qnrA</i> (喹诺酮类耐药基因)	<i>dfrA1</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>dfrA5</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>dfrA7</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)
9	<i>dfrA12</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>dfrA15</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>dfrA16</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>dfrA17</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>dfrB2</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)	<i>Sul1</i> (甲氧苄啶和磺胺类耐药基因)
10	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照

共40个循环;最后72℃延伸10 min。总共检测54个耐药基因。

1.4.6 芯片杂交和洗片

将PCR产物放入PCR扩增仪中95℃变性5 min,迅速置于0℃的冰上5 min;取变性过的PCR扩增液1 μL与9 μL杂交液混匀,然后转移至芯片的杂交区域。将芯片置于杂交盒中,50℃水浴保温1 h。将杂交后的芯片依次在室温下用洗液A(1×SSC,0.2% SDS)、洗液B(0.2×SSC)和洗液C(0.1×SSC)中各洗涤1 min,最后在ddH₂O中洗涤1 min。从ddH₂O中取出芯片后立即置于避光的50 mL离心管中,在台式冷冻离心机上以2 000 r/min离心3 min甩干(洗涤和甩干过程注意避光操作)。甩干后的芯片置于避光盒中扫描备用,同一天扫描,避免荧光信号随时间杂交信号延长而减弱。

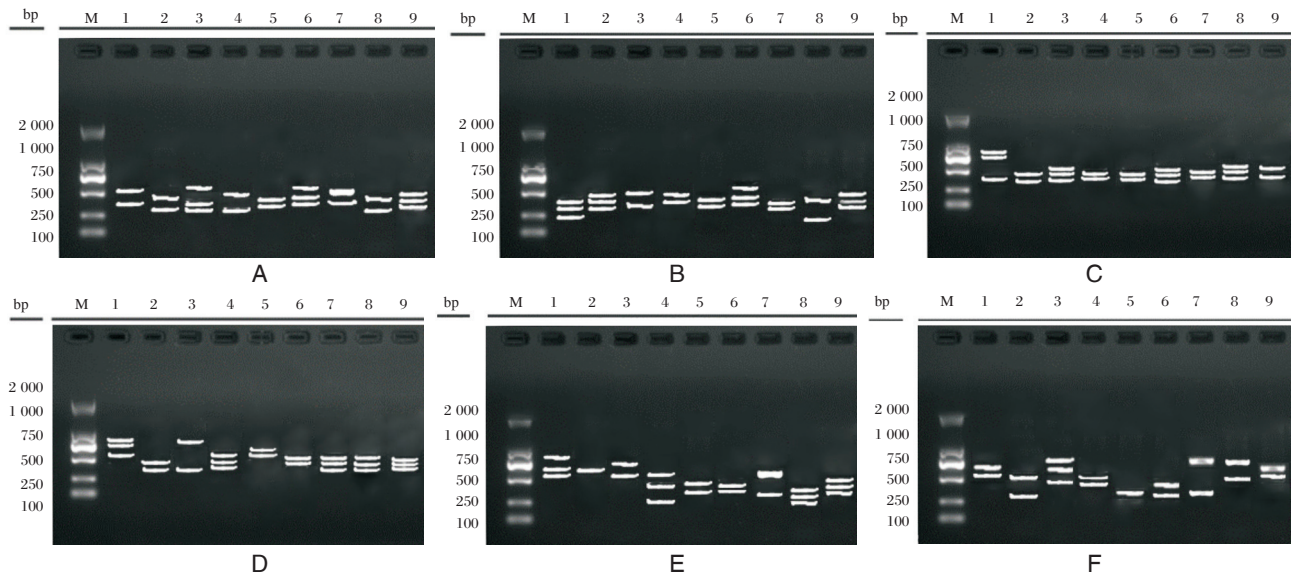
1.4.7 芯片扫描及结果

将杂交后的芯片置于基因芯片扫描仪上,打开分析软件GenePixPro4.0F进行图像扫描。使用绿色532 nm单色荧光、100% Power Gain、10 μm分辨率进行扫描,根据信号点的饱和程度调节PMT(光电倍增管)值,调节范围在PMT550~PMT700。

2 结果

2.1 多重PCR扩增和基因芯片杂交图谱

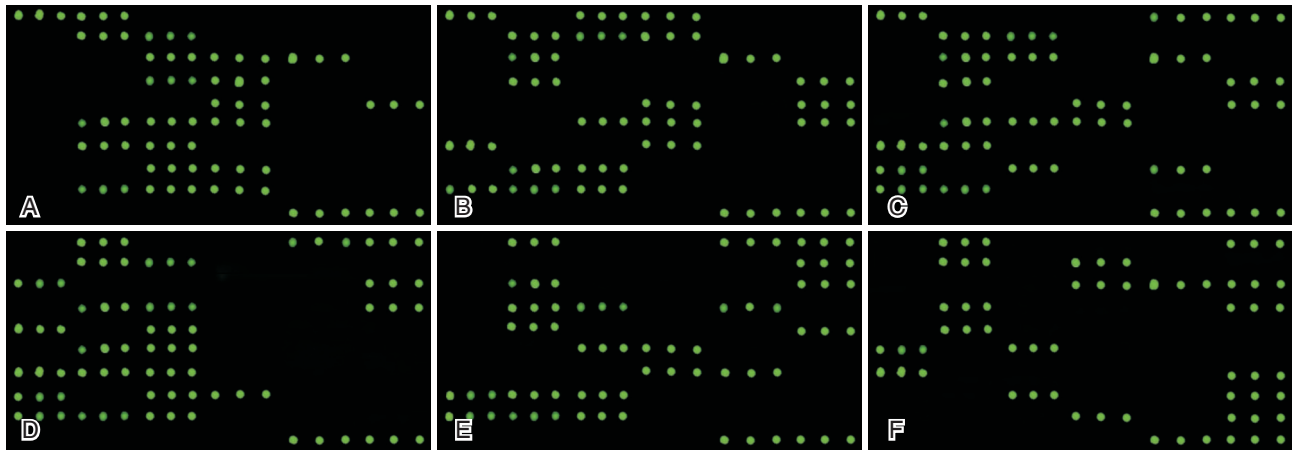
6种常见致病菌耐药基因多重PCR扩增结果见图1,图中标记的各检测基因行号与基因芯片点样模式行号相对应,每管检测6个基因,其具体每行对应的检测基因情况可参见表1基因芯片点样模式。基因芯片扫描结果见图2,分别检出的耐药基因种类见表3,其中青霉索耐药基因*blaZ*仅在肺炎克雷伯菌检出,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌



A:金黄色葡萄球菌; B:肠球菌; C:大肠埃希菌; D:肺炎克雷伯菌; E:鲍曼不动杆菌; F:铜绿假单胞菌。

图1 6种常见致病菌耐药基因多重PCR结果

Figure 1 Multiple PCR results of 6 common pathogenic bacteria resistance genes



A:金黄色葡萄球菌; B:肠球菌; C:大肠埃希菌; D:肺炎克雷伯菌; E:鲍曼不动杆菌; F:铜绿假单胞菌。

图2 耐药基因芯片杂交图谱结果

Figure 2 Results of drug-resistant gene chip hybridization

未检出糖肽类耐药基因,大肠埃希菌未检出碳青霉素类耐药基因。

2.2 药敏试验结果

药敏试验结果显示,6种常见致病菌对头孢类、四环素类、氯霉素类、喹诺酮类、氨基糖苷类抗生素普遍耐药,耐药率在33.3%~92.3%之间;对糖肽类耐药率较低,耐药率均低于5%。6种细菌对大环内酯-林克酰胺-链阳菌素耐药率在22.9%~71.9%之间;对甲氧苄啶和磺胺类耐药率在12.1%~88.6%之间;对青霉素类耐药率在10.5%~92.7%之间;对碳青霉素类耐药率在1.8%~85.4%之

间,见表4。

2.3 基因芯片与药敏试验符合率的比较

芯片检测结果显示,6种细菌的头孢类、大环内酯-林克酰胺-链阳菌素、四环素类、氯霉素类、甲氧苄啶和磺胺类、糖肽类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因阳性率与药敏试验结果基本一致,总符合率在90.9%~100%。除肺炎克雷伯菌外,其他5种细菌对青霉素类耐药基因阳性率与药敏试验结果均存在差异。除大肠埃希菌外,其余5种细菌对碳青霉素类耐药基因阳性率与药敏试验结果基本一致,总符合率在97.6%~100%(表5,表6)。

表3 6种常见致病菌检出的耐药基因种类

Table 3 The detection results of resistance genes in 6 common pathogenic bacteria

抗生素类型	n	头孢类	大环内酯-林克酰胺-链阳菌素	四环素类	氯霉素类	甲氧苄啶和磺胺类	糖肽类	喹诺酮类	青霉素类	氨基糖苷类	碳青霉素质类
金黄色葡萄球菌	41	<i>cmy2, OXA1, OXA5</i>	<i>msrA</i>	<i>tetA, tetD, tetG, tetK</i>	<i>catA1, catA9</i>	<i>dfrA1, dfrA12, dfrA15, dfrA16</i>	未检出	<i>qnrA</i>	未检出	<i>aac6ia, aac6ib, aac6ie, aph3ia, aph3iia</i>	<i>ges</i>
肠球菌	33	<i>cmy2, tem, OXA1, OXA5, OXA10</i>	<i>ermA, msrA</i>	<i>tetA, tetG, tetK, tetM, tetW</i>	<i>catB3</i>	<i>dfrA12, dfrA15, dfrA16</i>	<i>vanD</i>	<i>qnrA</i>	未检出	<i>aac3iia, aac6ie, aadd</i>	<i>kpc</i>
大肠埃希菌	57	<i>cmy2, ctxm-NG-1, ctxm-NG-2, OXA1, OXA5</i>	<i>ermA, msrA</i>	<i>tetA, tetD, tetG, tetK, tetW</i>	<i>catA1</i>	<i>dfrA5, dfrA12, dfrA15</i>	<i>vanA</i>	<i>qnrA</i>	未检出	<i>aac3iia, aac6ia, aac6ie, aadd</i>	未检出
肺炎克雷伯菌	39	<i>ctxm-NG-1, ctxm-NG-2, OXA1, OXA5</i>	<i>ermA, ermB, lnb</i>	<i>tetD, tetG, tetW</i>	<i>catA1, catA9</i>	<i>dfrA1, dfrA12, dfrA15, dfrA16</i>	<i>vanA</i>	<i>qnrA</i>	<i>blaZ</i>	<i>ant(6)-1, aadd, aph3ia</i>	<i>ges</i>
鲍曼不动杆菌	32	<i>ctxm-NG-1, ctxm-NG-2, SHV</i>	<i>ermC</i>	<i>tetA, tetG, tetK</i>	<i>catB3, cml-e1</i>	<i>dfrA12, dfrA15, dfrA16</i>	<i>vanA, vanD</i>	<i>qnrA</i>	未检出	<i>aac3iia, ant(6)-1, aadd, aph3ia, aph6id 9</i>	<i>ges</i>
铜绿假单胞菌	35	<i>ctxm-NG-2, OXA1, OXA10</i>	<i>ermA, ermC</i>	<i>tetB, tetG, tetW</i>	<i>cml-e3</i>	<i>dfrA7, dfrA17, sulI</i>	未检出	<i>qnrA</i>	未检出	<i>aac6ib, aac6ie, ant(6)-1, aadd</i>	<i>ges</i>

表4 6种常见致病菌药敏试验耐药率 [n(%)]

Table 4 Resistance rate of 6 common pathogenic bacteria by bacterial susceptibility test [n(%)]

抗生素类型	n	头孢类	大环内酯-林克酰胺-链阳菌素	四环素类	氯霉素类	甲氧苄啶和磺胺类	糖肽类	喹诺酮类	青霉素类	氨基糖苷类	碳青霉素质类
金黄色葡萄球菌	41	36(87.8)	29(70.7)	36(87.8)	37(90.2)	7(17.1)	2(4.9)	34(82.9)	38(92.7)	32(78)	35(85.4)
肠球菌	33	29(87.9)	15(45.5)	27(81.8)	11(33.3)	4(12.1)	0(0)	19(57.6)	4(12.1)	27(81.8)	2(6.1)
大肠埃希菌	57	30(52.6)	22(38.6)	49(86)	30(52.6)	46(80.7)	2(3.5)	35(61.4)	6(10.5)	29(50.9)	1(1.8)
肺炎克雷伯菌	39	16(41)	16(41)	36(92.3)	26(66.7)	20(51.3)	1(2.6)	28(71.8)	21(53.8)	9(23.1)	3(7.7)
鲍曼不动杆菌	32	24(75)	23(71.9)	29(90.6)	26(81.3)	27(84.4)	1(3.1)	13(40.6)	18(56.3)	17(53.1)	15(46.9)
铜绿假单胞菌	35	30(85.7)	8(22.9)	32(91.4)	19(54.3)	31(88.6)	1(2.9)	12(34.3)	15(42.9)	6(17.1)	6(17.1)

表5 6种常见致病菌基因芯片检测阳性率 [n(%)]

Table 5 The positive rate of resistant genes in 6 common pathogenic bacteria by the gene chips [n(%)]

抗生素类型	n	头孢类	大环内酯-林克酰胺-链阳菌素	四环素类	氯霉素类	甲氧苄啶和磺胺类	糖肽类	喹诺酮类	青霉素类	氨基糖苷类	碳青霉素质类
金黄色葡萄球菌	41	36(87.8)	30(73.2)	38(92.7)	37(90.2)	8(19.5)	0(0)	35(85.4%)	0(0)	34(82.9)	35(85.4)
肠球菌	33	31(93.9)	17(51.5)	28(84.8)	15(45.5)	6(18.2)	1(3.3)	19(57.6)	0(0)	27(81.8)	2(6.1)
大肠埃希菌	57	34(59.6)	24(42.1)	50(87.7)	33(57.9)	46(80.7)	2(3.5)	35(61.4)	0(0)	30(52.6)	0(0%)
肺炎克雷伯菌	39	18(46.2)	19(48.7)	36(92.3)	27(69.2)	21(53.8)	1(2.6)	28(71.8)	21(53.8)	10(25.6)	4(10.3)
鲍曼不动杆菌	32	27(84.4)	25(78.1)	29(90.6)	27(84.4)	27(84.4)	1(3.1)	13(40.6)	0(0)	18(56.3)	15(46.9)
铜绿假单胞菌	35	32(91.4)	11(31.4)	32(91.4)	19(54.3)	31(88.6)	0(0)	12(34.3)	0(0)	8(22.9)	6(17.1)

表6 6种常见致病菌药敏试验与基因芯片检测结果总符合率(%)

Table 6 The total coincidence rate of bacterial susceptibility tests and gene chip detection data for 6 common pathogenic bacteria (%)

抗生素类型	头孢类	大环内酯-林克酰胺-链阳菌素	四环素类	氯霉素类	甲氧苄啶和磺胺类	糖肽类	喹诺酮类	青霉素类	氨基糖苷类	碳青霉索类
金黄色葡萄球菌	100.0	98.6	97.4	100.0	97.9	95.1	98.7%	0.0	97.3	100.0
肠球菌	96.8	95.8	98.3	90.9	94.6	96.9	100.0	0.0	100.0	100.0
大肠埃希菌	95.4	97.5	99.1	96.6	100.0	100.0	100.0	0.0	98.8	0.0
肺炎克雷伯菌	96.4	94.5	100.0	98.5	98.3	100.0	100.0	100.0	97.9	97.6
鲍曼不动杆菌	94.6	96.4	100.0	98.3	100.0	100.0	100.0	0.0	98.0	100.0
铜绿假单胞菌	96.9	93.0	100.0	100.0	100.0	97.1	100.0	0.0	95.1	100.0

3 讨论

6种常见致病菌的头孢类、大环内酯-林克酰胺-链阳菌素、四环素类、氯霉素类、甲氧苄啶和磺胺类、糖肽类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因阳性率与药敏试验结果基本一致,总符合率在90.9%~100%,说明该定制化的耐药基因检测芯片的检测方法与传统标准的药敏检测方法相比高度一致。金黄色葡萄球菌、肠球菌、铜绿假单胞菌耐药基因阳性率与药敏试验结果存在差异。而青霉素类耐药基因 *blaZ* 仅在肺炎克雷伯菌中检出,可能在设计上引物探针存在强偏好性,使得更倾向于检测肺炎克雷伯菌,从侧面也体现检测该耐药基因的引物探针对其他细菌的检测灵敏度不足。同样的在舒丽红和丁显平^[6]对基因芯片方法耐异烟肼结核分枝杆菌准确性的分析结果显示,与传统方法相比,基因芯片技术检测敏感度、特异性为82%和97%,说明基因芯片技术在应用中有着灵敏度不足之处。但韩龙等^[7]研发的基于医院病原菌谱、可同时检测10种病原菌和13种耐药基因的检测芯片,拥有着和PCR技术相当的灵敏度,说明虽然基因芯片在灵敏度有所欠缺,但不能成为该技术的缺点。碳青霉索类耐药基因在大肠埃希菌中未检出,与药敏实验结果不符,同样的针对碳青霉索类耐药基因设计的检测引物探针也存在灵敏度不足的原因,导致无法达到和药敏实验一样的检测限,造成检测结果的假阴性,后续需要在设计上加大力度优化改进。

传统的药敏实验,操作繁琐、准确性低,且实验周期往往需要2~3天,甚至更长时间。其他可代替药敏实验的技术,如多重PCR技术,虽快速准确,但存在反应相互影响、引物探针设计困难等问

题^[8-9]。全基因组测序可以发现几乎所有细菌耐药相关基因和元件,但对参比数据库的要求非常严格,而目前国际上缺乏细菌耐药基因的权威数据库,且实验过程繁琐、价格高、通量低、分析耗时长。基因芯片技术是一种利用杂交原理,将大量的探针固定于固相表面,核酸样本经荧光标记或扩增后,利用核酸杂交的特异性对大批量未知样品进行检测、分析的方法,具有高通量、高效、快速、准确的优势^[10-11]。例如Perreten等^[12]开发的基因芯片可以检测117种细菌耐药基因,可同时检测金黄色葡萄球菌的15种耐药基因。雷向东等^[13]发明的细菌耐药基因检测芯片,利用实时荧光PCR技术,2h便可一次性检测170种不同类别的耐药性基因的190个靶点。

本研究针对ICU中常见、危害较大的6种常见致病菌,设计这些细菌对于10类抗生素的耐药基因芯片,可快速准确获得常见院感细菌的耐药数据,适合在ICU等对时效性要求较高的临床科室应用,可给临床合理用药带来极大帮助。并为医院及社区感染控制乃至细菌耐药性流行病学调查及制定防治预案提供数据支持。另外,此平台的搭建必将为临床其他耐药菌的基因芯片监测平台的建立奠定基础。

总之,常见细菌耐药基因检测芯片的建立及其应用充分说明,基因芯片与药敏实验的传统检测方法相比在准确性上高度符合且优势明显。但基因芯片的检测技术也存在局限性,比如成品化芯片检查耐药基因固化与实际研究目的不一致,缺乏商品化的芯片自主研发耗时长、优化难度大、成本高等。这些都会制约该技术大规模推广应用,需要更多科研人员的努力探索。

(下转第302页)

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 张秋霞

[摘要] 目的 探讨 miR-21 在黄芪甲苷保护氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)炎症损伤中的作用及其机制。方法 将体外培养的 HUVEC 分为对照组(未干预)、模型组(以 100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL 作用 24 h)、治疗-低剂量(L)组、治疗-中剂量(M)组和治疗-高剂量(H)组,其中治疗-L、M 和 H 组细胞以 100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL 作用 24 h 后,分别加入 10、20 和 40 mg/L 的黄芪甲苷作用 2 h。MTT 法检测细胞的存活率,ELISA 法检测细胞上清液中炎症相关因子 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 的含量,RT-PCR 检测细胞内 miR-21 和 TLR4 mRNA 的表达,Western blot 检测 TLR4 蛋白的表达。双荧光素酶报告基因实验检测 miR-21 和 TLR4 的靶向关系。转染 miR-21 模拟物和抑制剂构建 miR-21 过表达和低表达的 HUVEC 株,观察 miR-21 对 HUVEC 炎症因子分泌和 TLR4 表达的影响;同时,在给予 40 mg/L 的黄芪甲苷治疗的基础上,观察转染 miR-21 抑制剂下调 miR-21 表达对黄芪甲苷作用下 HUVEC 炎症因子的影响。结果 与对照组相比,模型组、治疗-L 组、治疗-M 组和治疗-H 组细胞存活率和细胞中 miR-21 表达显著降低,而细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 的含量以及细胞中 TLR4 mRNA、蛋白的表达显著升高($P<0.05$);与模型组相比,治疗-L 组、治疗-M 组和治疗-H 组细胞存活率和 miR-21 表达逐渐升高,而 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 的含量以及 TLR4 mRNA、蛋白的表达逐渐降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验证实 TLR4 是 miR-21 的潜在靶基因。miR-21 过表达降低 HUVEC 内炎症因子的分泌和 TLR4 的表达,反之,则促进 HUVEC 内炎症因子的分泌和 TLR4 的表达;下调 miR-21 表达后可逆转黄芪甲苷对 HUVEC 炎症因子的调控。结论 黄芪甲苷可减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤,其作用机制可能与上调 miR-21 靶向抑制 TLR4 表达有关。

[关键词] 黄芪甲苷;人脐静脉内皮细胞;炎症损伤;miR-21;TLR4

The role of miR-21 in the protective effect of astragaloside on ox-LDL-induced endothelial cell inflammatory injury

CHANG Fangyuan*, FENG Zerui, XU Yingchun, ZHANG Qiuxia

(Department I of cardiology, the second people, hospital of liaocheng, Shandong, China, 252600)

[ABSTRACT] Objective To investigate the role and mechanism of miR-21 in the inflammatory injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by astragaloside-protected oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). Methods HUVEC cultured *in vitro* were divided into control group (without intervention), model group (treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL for 24 h), treatment-low dose group (L), treatment-medium dose group (M) and treatment-high dose group (H). The cells in the treatment group-L, M and H were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL for 24 h, and then added with 10, 20 and 40 mg/L of astragaloside for 2 h. Cell viability was detected by MTT assay, the level of inflammatory related factors TNF- α , IL-6 and NF- κ B in cell supernatant were measured by ELISA, the expression of intracellular miR-21 and

基金项目:山东省 2017-2018 年度中医药科技发展计划项目(2017-496)

作者单位:山东省聊城市第二人民医院心内一科,山东,聊城 252600

*通信作者:常方圆, E-mail: cfycfy1985@163.com

TLR4 was detected by RT-PCR, the expression of TLR4 protein was tested by Western blot, and the targeting relationship between microRNA-21 and TLR4 was checked by dual luciferase reporter gene assay. In addition, HUVEC with over-and low-expression of miR-21 were constructed by transfecting mimic and inhibitor of miR-21, and the effects of miR-21 on the secretion of inflammatory factors and the expression of TLR4 in HUVEC were observed. At the same time, on the basis of 40 mg/L astragaloside treatment, the effects of down-regulation of miR-21 expression by transfection inhibitor of miR-21 on inflammatory factors in HUVEC under the action of astragaloside were observed. **Results** Compared with the control group, the cell survival rate and the expression of miR-21 in the model group, treatment-L, treatment-M and treatment-H groups were decreased significantly, while the level of TNF- α , IL-6 and NF- κ B in cell supernatant and the expression of TLR4 mRNA and protein in cells were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the cell viability and the expression of miR-21 were increased gradually, while the contents of TNF- α , IL-6 and NF- κ B and the expression of TLR4 mRNA and protein were decreased gradually in treatment-L group, treatment-M group and treatment-H group ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter assays confirmed that TLR4 was a potential target gene of miR-21. Overexpression of miR-21 reduced the secretion of inflammatory cytokines and the expression of TLR4 in HUVEC. Conversely, it promoted the secretion of inflammatory cytokines and the expression of TLR4 in HUVEC. Down-regulation of miR-21 expression reversed the regulation of Astragaloside on HUVEC inflammatory factors. **Conclusion** Astragaloside can alleviate the inflammation injury of HUVEC induced by ox-LDL, and its mechanism may be related to up-regulation of the expression of TLR4 targeting by miR-21.

[KEY WORDS] Astragaloside IV; Human umbilical vein endothelial cells; Inflammatory injury; miR-21; TLR4

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是一种氧自由基携带者,也是公认的造成动脉粥样硬化的独立危险因素,可通过调控内皮细胞通透性、诱导细胞凋亡和炎症反应等使内皮屏障功能降低,引起内皮细胞损伤^[1-3];而血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化公认的始动环节。因此,如何保护血管内皮免受包括炎症在内的细胞损伤,一直是动脉粥样硬化研究的热点。黄芪甲苷是中药黄芪的主要活性成分,具有抗氧化、抗炎和抗纤维化等作用^[4]。近年来,黄芪甲苷在抗动脉粥样硬化和在 ox-LDL 所导致的血管内皮细胞炎症损伤中的保护作用已得到证实^[5-6],但其具体的作用机制并不完全明确。有研究指出,ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞中微小 RNA (microRNA, miR)-21 表达降低^[7],而黄芪甲苷被证实可通过上调 miR-21 表达促进心血管疾病的血管生成^[8]。同时,采用生物信息学软件预测发现,miR-21 与炎症相关因子 TLR4 3' UTR 区域存在着互补的核苷酸序列。猜测 miR-21 可能通过靶向调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) TLR4 表达在黄芪甲苷保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症损伤过程中发挥着重要作用。因此,本研

究通过构建 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)损伤模型,观察黄芪甲苷减轻 ox-LDL 诱导诱导的 HUVEC 炎症损伤是否与 miR-21 有关。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

黄芪甲苷购于上海融禾医药科技有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青链霉双抗和胰蛋白酶购于美国 Hyclone 公司;氧化性低密度脂蛋白(ox-LDL)购于广州突源生物科技有限公司。噻唑蓝 (Methylthiazolyldiphenyl - tetrazolium bromide, MTT)试剂购于美国 Sigma 公司;脂质体 2000 购于美国 Invitrogen 公司。miR-21 模拟物、miR-21 抑制剂及其相应对照购于广州锐博生物公司。聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购于美国 Millipore 公司,抗人 Toll 样受体 4 (toll-like receptor -4, TLR4)单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,鼠抗人 β 肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体购于北京康为世纪生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠 IgG 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司, pmirGLO 载体购于深圳市伟通

生物科技有限公司, Trizol 试剂和二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒购于上海碧云天生物技术研究, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 酶联接免疫吸附剂测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司, 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) ELISA 试剂盒购于上海双赢生物科技有限公司, 荧光素酶检测试剂盒购于美国 Promega 公司。

1.2 细胞培养、分组及转染

采用含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青链霉双抗的 DMEM 高糖培养基于 37°C 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养来自于上海中乔新舟科技公司的 HUVEC。将对数生长期的 HUVEC 随机分为对照组 (未干预)、模型组 (100 μ mol/L ox-LDL 作用 24 h)、治疗-低剂量 (L) 组、治疗-中剂量 (M) 组和治疗-高剂量 (H) 组, 其中治疗-L、M 和 H 组细胞先加入 100 μ mol/L ox-LDL 作用 24 h 后, 再分别以 10、20 和 40 mg/L 的黄芪甲苷作用 2 h。后期将对数生长期的 HUVEC 分为模型组、miR-NC 组、miR-21 组、anti-miR-NC 组和 anti-miR-21 组, 采用脂质体法将 miR-21 模拟物阴性对照 miR-NC、miR-21 模拟物、miR-21 抑制剂阴性对照 anti-miR-NC 和 miR-21 抑制剂参照脂质体 2000 说明书步骤分别转染至 miR-NC 组、miR-21 组、anti-miR-NC 组和 anti-miR-21 组细胞中, 转染 48 h 后以 100 μ mol/L ox-LDL 作用 24 h, 观察 miR-21 过表达或低表达对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤的影响。另外, 设置模型组、治疗组 (ox-LDL 干预后给予 40 mg/L 的黄芪甲苷作用) 和治疗+anti-miR-21 组 (转染 miR-21 抑制剂后, 分别以 ox-LDL 和 40 mg/L 的黄芪甲苷干预), 观察 miR-21 低表达对黄芪甲苷作用下 HUVEC 炎症因子的影响。

1.3 MTT 法检测 HUVEC 存活率

向黄芪甲苷和 ox-LDL 处理结束后的各组细胞以及不含细胞只有培养基的空白孔中加入 5 g/L MTT 溶液 10 μ L, 细胞培养箱中孵育 4 h 后, 加入二甲基亚砜 150 μ L 溶解 MTT 晶体。采用酶标仪在 490 nm 波长处测定各组细胞光密度 (optical density, OD) 值, 计算各组细胞的存活率。计算公式: 存活率 (%) = (实验孔 OD - 空白孔 OD) / (对照孔 OD - 空白孔 OD) \times 100%。

1.4 ELISA 法检测 HUVEC 上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 含量

将对数生长期的 HUVEC 以适当密度接种至 10 cm 的培养皿中, 按照对照组、模型组、治疗-L 组、治疗-M 组、治疗-H 组的分组处理结束后, 弃培养液, 经磷酸缓冲液洗涤后, 转移至离心管中, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 参照 ELISA 试剂盒说明书步骤分别检测 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 含量。

1.5 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 HUVEC 中 miR-21 和 TLR4 mRNA 的表达

使用 Trizol 试剂抽提各组 HUVEC 总 RNA, 并采用超微量紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度。按照逆转录试剂盒说明书步骤将 RNA 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 根据上海生工生物工程有限公司合成的 miR-21 引物 (上游: 5'-GC-GCGCTAGCTTATCAAGCTGATG-3', 下游: 5'-GTGCAGGCTCCGAGGT-3')、U6 引物 (上游: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', 下游: 5'-AAC-GCTTCACGAATTTGCGT-3')、 β -actin 引物 (上游: 5'-GGCGGCAACACCATGTACCCT-3', 下游: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3') 和 TLR4 引物 (上游 5'-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3', 下游 5'-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件如下: 94°C 10 min, 94°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 30 s 循环 35 次。以 U6 和 β -actin 为内参, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 HUVEC 中 miR-21 和 TLR4 mRNA 的表达。

1.6 Western blot 检测 HUVEC 中 TLR4 蛋白的表达

胰蛋白酶消化收集各组 HUVEC, 加入细胞裂解液提取各组细胞总蛋白。采用 BCA 法对总蛋白定量后, 以等体积上样液与待测样品蛋白混匀, 沸水浴变性 5 min。取变性蛋白以每孔 80 μ g 上样至十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶孔中行电泳分离。电泳结束后, 电转至 PVDF 膜。经 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 1.5 h 后, 分别以一抗 (1:500) 4°C 孵育过夜, 二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h。电化学 (electrochemiluminescence, ECL) 法显影后, 采用凝胶成像分析 Quantity one 软件进行灰度分析。

1.7 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-21 和 TLR4 的靶向关系

采用 TargetScan 生物学信息学软件预测发现, miR-21 与 TLR4 3'UTR 存在互补的核苷酸序列。为了证实 miR-21 与 TLR4 是否存在靶向关系,由百奥迈科生物技术有限公司构建野生型(WT-TLR4)和突变型(MUT-TLR4)的 TLR4 的 3'-UTR 荧光素酶报告载体,参照脂质体 2000 说明书步骤行 miR-NC+WT-TLR4、miR-21(miR-21 模拟物)+WT-TLR4、miR-NC+MUT-TLR4、miR-21+MUT-TLR4 转染,于细胞培养箱中常规培养 48 h 后收集细胞,根据荧光素酶检测试剂盒说明书步骤检测各组细胞的荧光素酶的活性。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)形式表示,多组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-q,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 黄芪甲苷对 HUVEC 内炎症因子分泌的影响

与对照组相比,模型组、治疗-L 组、治疗-M 组和治疗-H 组细胞的存活率显著降低,而炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,治疗-L 组、治疗-M 组和治疗-H 组细胞存活率显著升高,而 TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 含量显著降低($P < 0.05$),且呈浓度依赖性,见表 1。

表 1 黄芪甲苷对 HUVEC 内炎症因子分泌的影响

Table 1 Effect of astragaloside IV on secretion of inflammatory factors in HUVEC

组别	存活率(%)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	NF- κ B(pg/mL)
对照组	97.56 \pm 5.18	58.36 \pm 4.25	96.72 \pm 5.43	88.45 \pm 6.92
模型组	55.84 \pm 3.35 ^a	399.23 \pm 28.32 ^a	558.38 \pm 32.06 ^a	358.75 \pm 22.13 ^a
治疗-L 组	68.12 \pm 4.26 ^{ab}	278.57 \pm 19.38 ^{ab}	369.75 \pm 20.18 ^{ab}	287.42 \pm 13.05 ^{ab}
治疗-M 组	75.49 \pm 6.13 ^{ab}	192.49 \pm 8.85 ^{ab}	231.46 \pm 15.25 ^{ab}	211.96 \pm 10.22 ^{ab}
治疗-H 组	85.25 \pm 6.76 ^{ab}	103.65 \pm 4.26 ^{ab}	156.82 \pm 9.36 ^{ab}	126.68 \pm 8.86 ^{ab}
<i>F</i> 值	27.374	217.833	287.096	209.342
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组相比, ^a $P < 0.05$;与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 黄芪甲苷对 HUVEC 内 miR-21 和 TLR4 表达的影响

与对照组相比,模型组、治疗-L 组、治疗-M 组和治疗-H 组细胞内 miR-21 表达水平均显著降低,而 TLR4 mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,治疗-L 组、治疗-M 组和治疗-H 组细胞内 miR-21 表达水平依次显著升高,而 TLR4 mRNA 和蛋白表达水平依次降低($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

2.3 miR-21 与 TLR4 靶向关系的验证

生物信息学软件 TargetScan 预测发现,TLR4 3'UTR 存在能够与 miR-21 互补的结合位点,结果见表 3。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 miR-NC+TLR4-WT 组相比,miR-21 过表达 miR-21+TLR4-WT 组细胞的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$),而 miR-NC+TLR4-MUT 组和 miR-21+TLR4-MUT 组间的荧光素酶活性差异无统计学意

表 2 黄芪甲苷对 HUVEC 内 miR-21 和 TLR4 表达的影响

Table 2 Effect of astragaloside IV on the expression of miR-21 and TLR4 in HUVEC

组别	miR-21	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白
对照组	1.00 \pm 0.08	0.98 \pm 0.06	0.18 \pm 0.02
模型组	0.41 \pm 0.03 ^a	3.86 \pm 0.15 ^a	0.70 \pm 0.05 ^a
治疗-L 组	0.58 \pm 0.03 ^{ab}	2.67 \pm 0.11 ^{ab}	0.52 \pm 0.03 ^{ab}
治疗-M 组	0.72 \pm 0.05 ^{ab}	1.92 \pm 0.09 ^{ab}	0.36 \pm 0.02 ^{ab}
治疗-H 组	0.85 \pm 0.06 ^{ab}	1.33 \pm 0.08 ^{ab}	0.22 \pm 0.02 ^{ab}
<i>F</i> 值	55.248	376.329	171.457
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

与对照组相比, ^a $P < 0.05$;与模型组相比, ^b $P < 0.05$

义($P > 0.05$),见表 4。

2.4 miR-21 对 HUVEC 内炎症因子分泌和 TLR4 表达的影响

与模型组相比,miR-NC 组和 anti-miR-NC 组细胞的存活率、细胞内炎症因子 TNF- α 、IL-6、NF-

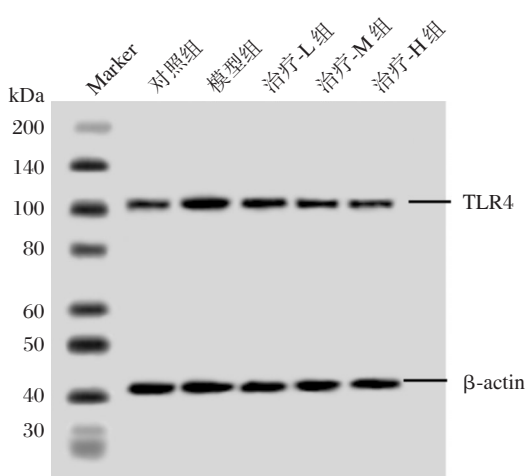


图1 Western blot 检测黄芪甲苷对 TLR4 蛋白表达的影响

Figure 1 The effect of astragaloside IV on the expression of TLR4 protein was detected by Western blot

κB 含量和 TLR4 mRNA 的表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；但是，与模型组相比，miR-21 组细胞存活率升高、细胞内 TNF-α、IL-6 和 NF-κB 含量以及 TLR4 mRNA、蛋白的表达水平均显著降低 ($P<0.05$)，而 anti-miR-21 组细胞存活率升高且细胞内 TNF-α、IL-6 和 NF-κB 含量以及 TLR4 mRNA、蛋白的表达水平均明显升高 ($P<0.05$)。见表 5 和图 2。

2.5 下调 miR-21 表达对 HUVEC 炎症因子分泌的影响

与模型组相比，治疗组、治疗+anti-miR-NC 组和 治疗+anti-miR-21 组细胞存活率显著升高，而细胞内 TNF-α、IL-6、NF-κB 含量和 TLR4 mRNA、蛋白的表达均显著降低 ($P<0.05$)；与治疗组相比，治疗+anti-miR-21 组细胞存活率显著降低，细胞内 TNF-α、

表 3 TLR4 3' UTR 与 miR-21 的结合位点

Table 3 Binding sites of TLR4 3' UTR and miR-21

基因	互补的核苷酸序列	结合位点
TLR4	5'...UUUUACGUCUUGCCUAUAAGCUA...3'	666-673 of TLR4
miR-21	3'.....AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU....5'	3' UTR

表 4 各组 HUVEC 荧光素酶活性的比较

Table 4 Comparison of luciferase activities in HUVEC

组别	荧光素酶活性
miR-NC+TLR4-WT	1.02±0.08
miR-21+TLR4-WT	0.38±0.04 ^a
miR-NC+TLR4-MUT	0.97±0.06
miR-21+TLR4-MUT	0.99±0.07
F 值	68.700
P 值	0.000

与 miR-NC+TLR4-WT 组相比，^a $P<0.05$ 。

IL-6、NF-κB 含量和 TLR4 mRNA、蛋白的表达均显著升高 ($P<0.05$)；而治疗+anti-miR-NC 组与治疗组相比无显著性差异 ($P>0.05$)。结果见表 6 和图 3。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性血管疾病，炎症反应存在与动脉粥样硬化的各个阶段。越来越多的证据显示，ox-LDL 通过调控 NF-κB/TNF-α

信号通路等诱导的炎症反应是导致血管内皮损伤的重要机制^[9-11]。本研究以 ox-LDL 刺激 HUVEC 后检测得到促炎相关因子 TNF-α、IL-6 和 NF-κB 含量均显著升高，且细胞存活率降低，这表明 ox-LDL 成功诱导 HUVEC 出现炎症损伤。

黄芪甲苷又称黄芪皂苷 IV，是黄芪皂苷中的主要成分，具有抗氧、抗炎症和免疫调节等药理作用。Qin 等^[12]指出，黄芪甲苷可通过调控 SDF-1/CXCR4 生物轴下调甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和上调高密度脂蛋白胆固醇水平发挥抗动脉粥样硬化的作用。马海涛等^[13]发现，黄芪甲苷可通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路逆转过氧化氢对 HUVEC 增殖和凋亡的调控改善氧化应激诱导的 HUVEC 损伤。You 等^[14]研究证实，黄芪甲苷对高葡萄糖诱导的 HUVEC 损伤具有显著的保护作用，其作用机制与抑制 JNK 信号通路促进细胞增殖、减少凋亡并降低炎症因子 TNF-α、IL-1β 的表达有关。上述研究表明，黄芪甲苷在改善动脉粥样硬化和改善血管内皮损伤方面的具有较好

表5 miR-21对HUVEC内炎症因子分泌和TLR4表达的影响

Table 5 Effect of miR-21 on inflammatory factor secretion and TLR4 expression in HUVEC

组别	存活率(%)	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	NF-κB(pg/mL)	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白
模型组	56.36±2.86	396.47±26.28	554.25±30.12	352.39±23.08	1.02±0.09	0.62±0.04
miR-NC组	55.72±3.02	387.52±28.15	529.46±32.05	348.72±22.45	1.00±0.11	0.63±0.05
miR-21组	75.64±5.25 ^a	202.64±16.38 ^a	317.73±18.32 ^a	168.68±12.36 ^a	0.62±0.04 ^a	0.17±0.02 ^a
anti-miR-NC组	56.28±2.55	401.33±22.48	542.87±35.12	359.22±20.65	0.99±0.08	0.60±0.04
anti-miR-21组	45.15±3.36 ^a	536.25±30.36 ^a	658.49±47.32 ^a	488.65±31.18 ^a	1.52±0.12 ^a	0.83±0.06 ^a
F值	29.148	66.703	40.406	75.322	36.162	90.696
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与模型组相比, ^aP<0.05。

表6 下调miR-21表达对黄芪甲苷刺激下HUVEC炎症因子分泌的影响

Table 6 Effect of down-regulation of miR-21 expression on secretion of inflammatory cytokines in HUVEC stimulated by astragaloside

组别	细胞存活率(%)	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	NF-κB(pg/mL)	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白
模型组	58.36±4.25	390.52±25.15	551.08±29.42	349.22±22.65	3.78±0.13	0.64±0.05
治疗组	83.25±5.17 ^a	105.48±5.06 ^a	151.52±7.85 ^a	122.48±9.05 ^a	1.29±0.10 ^a	0.38±0.03 ^a
治疗+anti-miR-NC组	85.08±6.12 ^a	102.65±5.48 ^a	155.36±6.95 ^a	130.45±11.02 ^a	1.31±0.12 ^a	0.34±0.03 ^a
治疗+anti-miR-21组	67.46±3.22 ^{ab}	223.16±11.32 ^{ab}	288.76±13.12 ^{ab}	261.35±18.96 ^{ab}	1.81±0.15 ^{ab}	0.46±0.03 ^{ab}
F值	21.373	270.129	367.463	133.361	261.798	40.846
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与模型组相比, ^aP<0.05; 与治疗组相比, ^bP<0.05。

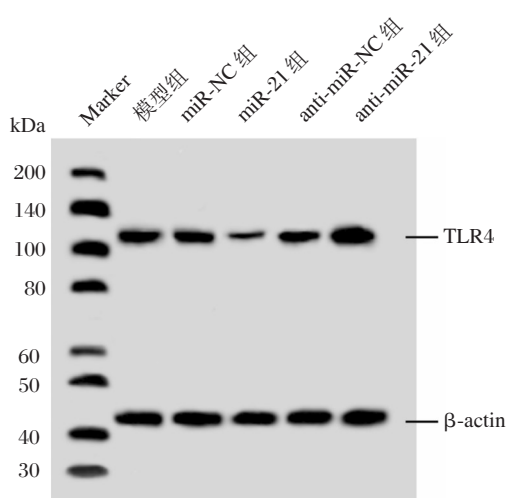


图2 Western blot检测miR-21对TLR4蛋白表达的影响
Figure 2 The effect of miR-21 on the expression of TLR4 protein was detected by Western blot

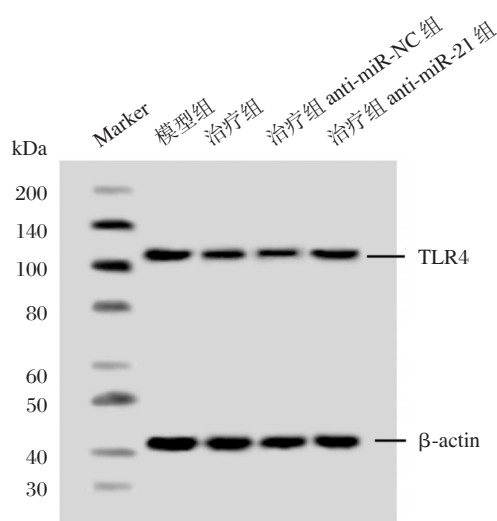


图3 Western blot检测下调miR-21对黄芪甲苷刺激下TLR4蛋白表达的影响
Figure 3 Down-regulation of miR-21 on the expression of TLR4 protein stimulated was detected by Western blot

的作用。本研究以 10、20 和 40 mg/L 的黄芪甲苷作用 HUVEC 后发现, ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤得到显著改善。该结果与魏冰等^[6]得到的黄芪甲苷具有保护 ox-LDL 所致血管内皮细胞炎症损伤的结果相似。结果表明, 黄芪甲苷可改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤。

TLR4 是 Toll 样受体家族成员, 可通过调控下游 NF- κ B 及炎症因子在炎症与免疫反应中发挥着重要作用^[15-17]。Tian 等^[18]研究以及蔡谦谦等^[19]研究均证实 TLR4 在 ox-LDL 诱导 HUVEC 炎症损伤过程中发挥着重要的促进作用。Tang 等^[7]研究指出, ox-LDL 可降低 miR-21 表达, 诱导细胞凋亡, 导致人主动脉内皮细胞损伤; 而 miR-21 过表达可消除 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤。Ma 等^[20]发现, 在脂多糖诱导的 HUVEC 炎症反应中, miR-21 靶向抑制 TLR4 表达。这些研究显示 miR-21 和 TLR4 在主动脉内皮细胞炎症损伤过程中发挥着重要作用。本研究通过 TargetScan 软件预测和双荧光素酶报告基因实验证实 TLR4 是 miR-21 的潜在靶基因。为了进一步探讨黄芪甲苷改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤的分子机制, 本研究进一步检测发现, 黄芪甲苷可呈浓度依赖性降低 ox-LDL 诱导的 TLR4 表达, 并升高 miR-21 表达。这与 Yu 等^[8]报道的黄芪甲苷可通过上调 miR-21 表达促进心血管疾病的血管生成的机制部分一致。另外, 本研究下调 miR-21 表达可逆转黄芪甲苷对 HUVEC 炎症损伤的保护作用。结果提示, 上调 miR-21 靶向抑制 TLR4 表达是黄芪甲苷减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤的重要机制。

综上所述, 黄芪甲苷可通过调控 miR-21 靶向抑制 TLR4 表达减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症损伤。本研究仅从细胞水平揭示了黄芪甲苷改善 HUVEC 炎症损伤的部分机制, 后期工作将从动物水平上进行验证, 以期黄芪甲苷抗动脉粥样硬化的治疗提供新的实验依据。

参考文献

- [1] Mundi S, Massaro M, Scoditti E, et al. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors - a review [J]. *Cardiovascular research*, 2017, 114(1):35-52.
- [2] Lin F, Pei L, Zhang Q, et al. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis and macrophage migration by regulating caveolin-1 phosphorylation [J]. *Journal of cellular physiology*, 2018, 233(10):6683-6692.
- [3] Zhang H, Liang B, Li T, et al. Ox-LDL Induced Endothelial Cell Inflammation via MAPK p38 and NF- κ B Signaling Pathway [J]. *IUBMB life*, 2018, 70(10):961-968.
- [4] Li L, Hou X, Xu R, et al. Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31(1):17-36.
- [5] 张志鑫, 李彦杰, 秦合伟, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控巨噬细胞自噬探讨黄芪甲苷抗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3575-3581.
- [6] 魏冰, 姜希娟, 卢斌, 等. ox-LDL 对内皮细胞 CD40 信号表达的影响及黄芪甲苷的抗炎作用 [J]. *天津中医药大学学报*, 2017, 36(4):282-285.
- [7] Tang F, Yang T L, Zhang Z, et al. MicroRNA-21 suppresses ox-LDL-induced human aortic endothelial cells injuries in atherosclerosis through enhancement of autophagic flux: involvement in promotion of lysosomal function [J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 359(2):374-383.
- [8] Yu P, Cheng S, Yang L, et al. Astragaloside IV stimulates angiogenesis after myocardial infarction by regulating microRNA-21 expression [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2016, 9(5):7818-7827.
- [9] Li J, Li A, Li M, et al. Ginkgolic acid exerts an anti-inflammatory effect in human umbilical vein endothelial cells induced by ox-LDL [J]. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 73(7):408-412.
- [10] Zhang Y H, He K, Shi G. Effects of MicroRNA-499 on the inflammatory damage of endothelial cells during coronary artery disease via the targeting of PDCD4 through the NF- κ B/TNF- α signaling pathway [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 44(1):110-124.
- [11] Guo J, Liang W, Li J, et al. Knockdown of FSTL1 inhibits oxLDL-induced inflammation responses through the TLR4/MyD88/NF- κ B and MAPK pathway [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 478(4):1528-1533.
- [12] Qin H, Liu P, Lin S. Effects of astragaloside IV on the SDF-1/CXCR4 expression in atherosclerosis of apoE^{-/-} mice induced by hyperlipaemia [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015, 64(16): 3851-54.

· 论 著 ·

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¹ 冯磊^{2*}

[摘要] 目的 研究 miR-548c-3p 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响和潜在的分子机制。方法 qRT-PCR 检测 TRIM59 mRNA 和 miR-548c-3p 的表达, Western blot 检测 TRIM59、增殖相关蛋白 CyclinD1 和 p21, 及迁移侵袭相关蛋白 MMP2 和 MMP9 的表达水平, MTT 法测定 HepG2 细胞增殖活性, Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, 双荧光素酶报告系统验证 miR-548c-3p 与 TRIM59 的调控关系。结果 与正常肝细胞 L02 相比, 在肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402 组中 TRIM59 的 mRNA 和蛋白表达量均显著升高 ($P < 0.05$), miR-548c-3p 的表达量则均显著降低 ($P < 0.05$); 过表达 miR-548c-3p 和抑制 TRIM59 表达均可抑制 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭; 双荧光素酶报告系统结果表明, miR-548c-3p 靶向负调控 TRIM59 的表达; 过表达 TRIM59 逆转了过表达 miR-548c-3p 对 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。结论 miR-548c-3p 通过靶向 TRIM59 基因抑制 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭, miR-548c-3p 是肝癌的潜在治疗靶点。

[关键词] 肝癌; miR-548c-3p; TRIM59

miR - 548c - 3p inhibits cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by targeting TRIM59

Nian Shiyan¹, Feng Lei^{2*}

(1. Intensive Care Unit, People's Hospital of Yuxi City, Yuxi, Yunnan, China, 653100; 2. Department of Laboratory, People's Hospital of Yuxi City, Yuxi, Yunnan, China, 653100)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of miR-548c-3p on proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells and the underlying mechanism. Methods qRT-PCR was used to measure the expression levels of TRIM59 mRNA and miR-548c-3p. Western blot was applied to detect the expression levels of TRIM59, proliferation-related proteins CyclinD1 and p21, as well as the migration and invasion related proteins MMP2 and MMP9. MTT assay was carried out to detect the proliferation of HepG2 cells. Transwell assay was carried out to determine the migration and invasion ability of HepG2 cells. Dual-luciferase reporter assay was implemented to verify the relationship between miR-548c-3p and TRIM59. Results Compared with human normal hepatocytes L02, the expression levels of TRIM59 mRNA and protein were significantly increased in hepatocellular carcinoma cells HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 ($P < 0.05$), while the expression level of miR-548c-3p was remarkably decreased ($P < 0.05$). Overexpression of miR-548c-3p and inhibition of TRIM59 inhibits the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells. The results of dual-luciferase reporter assay showed that miR-548c-3p targeted and negatively regulated the

基金项目:国家自然科学基金项目经费资助(项目编号:81460326);云南省高层次卫生技术人才培养专项经费资助(项目编号:D-201644)

作者单位:1. 玉溪市人民医院重症医学科, 云南, 玉溪 653100

2. 玉溪市人民医院检验医学科, 云南, 玉溪 653100

*通信作者:冯磊, E-mail: fngj2004@163.com

expression of TRIM59. Overexpression of TRIM59 reversed the inhibitory effect of overexpression of miR-548c-3p on the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells. Conclusion miR-548c-3p inhibits the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells by targeting TRIM59 gene, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

[KEY WORDS] Hepatocellular carcinoma; miR-548c-3p; TRIM59

肝细胞癌(简称肝癌, hepatocellular carcinoma, HCC)是全世界发病率第6高的癌症^[1]。在中国, 肝癌是第四大常见恶性肿瘤, 致死率位居肿瘤第三位^[2], 严重威胁人们的生命健康。外科手术(切除、肝移植)、局部切除(消融和栓塞治疗)和放疗、全身治疗等是其主要治疗方法^[3], 但5年生存率仍然低于5%^[4]。研究肝癌发生和发展的分子机制, 为肝癌的分子诊断和治疗提供新的靶点, 对临床来说尤其重要。

大量研究表明, miR-548c-3p在乳腺癌细胞^[5]、胶质瘤组织和细胞^[6]及骨肉瘤组织和细胞^[7]中表达下调, 过表达或上调 miR-548c-3p可抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭, 或促进凋亡。三基序蛋白59(tripartite motif containing 59, TRIM59)在肝癌组织^[8]、骨肉瘤组织和细胞^[9]中表达上调, 其过表达与肝癌恶性进展和患者预后密切相关, 促进骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。TRIM59在膀胱癌组织和细胞^[10]及胶质瘤细胞^[11]中高表达, 干扰或抑制 TRIM59表达可抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭, 降低胶质瘤细胞增殖、迁移及克隆形成能力。但 miR-548c-3p在肝癌细胞中的表达及其对肝癌影响, 其与 TRIM59在肝癌中的关系目前还尚不明确。本课题研究 miR-548c-3p影响肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的分子机制, 以及 TRIM59在此机制中的作用, 以期对肝癌的靶向治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2、SMC-7721、BEL-7402 和人正常肝细胞株 L02 购自美国 ATCC; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)、胰蛋白酶 Trypsin、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)和四氮唑蓝(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, MTT)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Transwell 板购自美国 Corning 公

司; 抗 TRIM59 抗体、抗 CyclinD1 抗体、抗 p21 抗体、抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体和抗 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司; 引物、miR-548c-3p 模拟物(miR-548c-3p)、miR-548c-3p 抑制剂(anti-miR-548c-3p)、TRIM59 的过表达载体(pcDNA-TRIM59)、TRIM59 干扰物(si-TRIM59)、空载体和阴性对照(pcDNA、miR-NC、anti-miR-NC 和 si-NC)及双荧光载体的构建购自上海吉玛制药有限公司; 双荧光素酶报告系统(Dual-Luciferase Reporter Assay System)购自美国 Promega 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂、Total RNA 提取试剂盒、real-time PCR 试剂盒、反转录试剂盒(RT-PCR)购自美国 Invitrogen 公司; 显微镜、发光仪、酶标仪及 Real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; BCA 蛋白检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10% FBS、1%青链霉素的 RPMI-1640 培养基培养肝癌细胞 HepG2、SMC-7721、BEL-7402 和人正常肝细胞株 L02 细胞。培养条件: 在 5% CO₂ 培养箱中培养, 温度恒定在 37℃, 饱和湿度。将细胞培养至对数生长期, 显微镜观察, 消化传代, 进行后续实验。

1.2.2 细胞转染

将对数生长期 HepG2 稀释至 1×10^6 个细胞/mL, 接种于 6 孔板中, 培养细胞至融合度为 80%~90% 时进行转染。先用无血清 OptiMEM 培养液稀释脂质体和各组片段及载体(包括 miR-548-3p 过表达组: miR-548c-3p 组和 miR-NC 组、TRIM59 抑制组: si-NC 组和 si-TRIM59 组、miR-548-3p 抑制组: anti-miR-548c-3p 组和 anti-miR-NC 组、miR-548-3p 和 TRIM59 同时过表达组: miR-548-3p+pcDNA 组和 miR-548-3p+pcDNA-TRIM59 组、双荧光载体组), 之后将稀释的等体积脂质体和各组载体片段轻柔混匀, 室温孵育 20 min, 将混合液滴入到培养好的 HepG2 细胞中, 轻柔混匀, 置于 37℃ 5%

CO₂培养箱培养6 h,换成RPMI-1640完全培养基,转染48 h,收集细胞,验证转染效果,进行后续实验。

1.2.3 Real-time PCR 检测 mRNA 的表达

收集正常肝细胞和各组肝癌细胞,根据Total RNA提取试剂盒的要求提取细胞总RNA,在-80℃下保存。然后以RNA为模板按照反转录PCR试剂盒说明书合成cDNA。以cDNA为模板按照real-time PCR的说明书进行反应,反应程序为:95℃ 2 min;95℃ 30 s、60℃ 45 s、72℃ 30 s,35个循环;72℃ 10 min。运用Bio-Rad PCR系统,2^{-ΔΔCt}方法进行数据分析。

1.2.4 MTT 实验测定细胞活性

HepG2细胞转染48 h后,收集细胞,Trypsin消化细胞,调整细胞浓度至1×10⁴个/mL,2×10³个/孔接种于96微孔板中,继续培养,分别在培养至24 h、48 h、72 h进行MTT实验,每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),培养4 h,弃上清培养液,再在每孔加入150 μL DMSO,室温混匀5 min,酶标仪测定OD_{490 nm}吸光度(A)值。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭

迁移实验:将转染后的各组HepG2细胞培养至对数生长期,收集细胞,加入含1% BSA的无血清RPIM-1640培养基,稀释细胞浓度为2.5×10⁵个/mL。在Transwell下层小室加入500 μL含10%FBS的RPIM-1640培养基作为迁移趋化物,上层小室中加入100 μL稀释好的细胞,将上层小室放入下层小室中,置于37℃ 5% CO₂培养箱培养24 h,用棉签拭去上层小室的细胞,冰甲醛固定迁移的细胞,结晶紫染色,显微镜观察计数。

侵袭实验:用4℃无血清培养基1:8比例稀释Matrigel,加入上层小室,37℃ 3 h烘干,以下步骤同迁移实验,上层小室加入100 μL细胞,下层加入500 μL含10%FBS的RPIM-1640培养基,培养24 h,甲醛固定细胞,结晶紫染色,计数。

1.2.6 双荧光素酶报告实验

收集转染48 h的HepG2细胞,消化,稀释,以1×10⁴个细胞/孔接种于24孔板中,继续培养24 h,当细胞融合度达到80%~90%,按照1.2.2进行转染,将构建好的TRIM59的野生型(WT-TRIM59)和突变型(MUT-TRIM59)双荧光素酶报告载体分别与miR-NC或miR-548c-3p共转染培养好的

HepG2细胞,转染48 h,收集细胞,验证转染效果,用裂解缓冲液室温裂解转染的细胞20 min,离心收集上清,加入荧光素酶底物,发光仪检测荧光素酶活性。以海肾荧光素酶活性为内参照,计算萤火虫荧光素相对酶活性。

1.2.7 Western blot 实验

将L02细胞和转染48 h后的各组HepG2细胞用RIPA裂解液裂解,超声破碎细胞收蛋白并检测浓度。将蛋白样本进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS - PAGE),转PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入稀释的一抗,抗TRIM59抗体(1:1 000)、抗CyclinD1抗体(1:2 000)、抗p21抗体(1:1 500)、抗MMP-2抗体(1:1 500)、抗MMP-9抗体(1:2 000)和抗GAPDH抗体(1:2 000),4℃孵育过夜。PBST洗膜2次,然后加入稀释的二抗,室温孵育1 h。以GAPDH为内参照,分析蛋白水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间的比较采用独立样本t检验和单因素方差进行分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-548c-3p 和 TRIM59 在肝癌细胞和正常肝细胞中的表达

结果表明,与正常肝细胞L02相比,在肝癌细胞HepG2、SMC-7721和BEL-7402组中TRIM59的mRNA和蛋白表达量均显著升高,差异有统计学意义(P<0.05),miR-548c-3p的表达量则均显著降低,差异有统计学意义(P<0.05),见图1和表1。TRIM59和miR-548c-3p在3个肝癌细胞株中的表达情况一致,后续实验选择HepG2细胞进行研究。

2.2 miR-548c-3p 过表达可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭

与miR-NC组相比,miR-548c-3p组HepG2细胞中的miR-548c-3p表达量显著升高(P<0.05),增殖相关蛋白CyclinD1表达显著降低(P<0.05),p21显著升高(P<0.05),细胞在48 h和72 h增殖活性显著降低(P<0.05),迁移侵袭蛋白MMP-2和MMP-9表达量显著降低(P<0.05),迁移和侵袭细胞数均

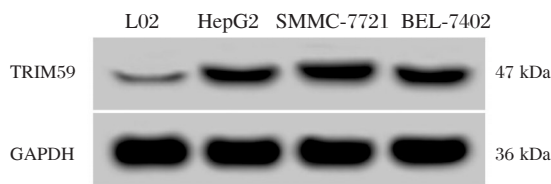


图1 TRIM59在肝癌细胞和正常肝细胞中的表达
Figure 1 Expression levels of TRIM59 in hepatocellular carcinoma cell lines and normal liver cells

表1 miR-548c-3p和TRIM59在肝癌细胞和正常肝细胞中的表达($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Expression levels of miR-548c-3p and TRIM59 in hepatocellular carcinoma cell lines and normal liver cells ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	miR-548c-3p	TRIM59 mRNA	TRIM59 蛋白
L02	1.01±0.09	0.98±0.09	0.19±0.02
HepG2	0.38±0.03*	3.02±0.29*	0.54±0.05*
SMMC-7721	0.51±0.05*	2.78±0.27*	0.63±0.06*
BEL-7402	0.46±0.04*	2.91±0.28*	0.58±0.06*
F 值	297.771	184.199	190.257
P 值	0.000	0.000	0.000

与L02组比较,*P<0.05

表2 miR-548c-3p过表达对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of miR-548c-3p overexpression on proliferation, migration and invasion of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	miR-548c-3p	细胞活性(OD _{490 nm})			迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
		24 h	48 h	72 h						
miR-NC	1.00±0.09	0.39±0.04	0.73±0.07	1.16±0.09	102.36±9.54	82.41±8.22	0.71±0.07	0.28±0.03	0.61±0.06	0.65±0.06
miR-548c-3p	2.76±0.27*	0.37±0.03	0.49±0.04*	0.64±0.06*	46.51±5.01*	32.41±5.12*	0.32±0.03*	0.66±0.06*	0.27±0.03*	0.23±0.03*
t 值	15.148	0.980	7.292	11.776	12.696	12.647	12.544	10.096	12.415	15.336
P 值	0.000	0.350	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与miR-NC组比较,*P<0.05

升高(P<0.05),细胞在48h和72h增殖活性显著降低(P<0.05),迁移侵袭蛋白MMP-2和MMP-9表达量显著降低(P<0.05),迁移和侵袭细胞数均显著下降(P<0.05),见图3和表3。说明抑制TRIM59可抑制HepG2细胞增殖、迁移和侵袭。

2.4 miR-548c-3p靶向调控TRIM59的表达

生物信息学预测结果显示,TRIM59的3'-UTR序列中含有与miR-548c-3p互补的核苷酸序列,见图4A。双荧光素酶报告系统结果如表4所示,与miR-NC组相比,miR-548c-3p组野生型WT-

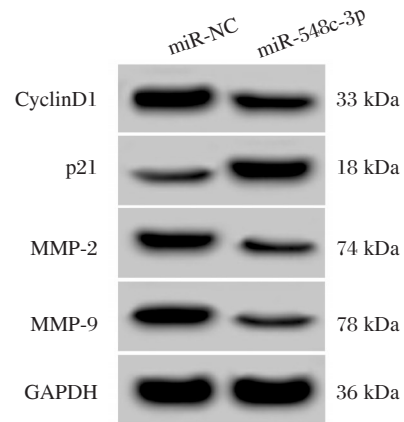


图2 增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达

Figure 2 Expression of proteins related to proliferation, migration and invasion

显著下降(P<0.05),见图2和表2。说明过表达miR-548c-3p可以抑制HepG2细胞增殖、迁移和侵袭。

2.3 抑制TRIM59表达可抑制肝癌HepG2细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与si-NC组相比,si-TRIM59组HepG2细胞中TRIM59蛋白表达量显著下降(P<0.05),增殖相关蛋白CyclinD1表达显著降低(P<0.05),p21显著

TRIM59的萤火虫荧光素酶相对活性显著下降(P<0.05);而突变型MUT-TRIM59的萤火虫荧光素酶相对活性没有明显变化。Western blot结果表明,与miR-NC组相比,miR-548c-3p组的TRIM59蛋白表达量显著下降(P<0.05);与anti-miR-NC组相比,anti-miR-548c-3p组的TRIM59蛋白表达量显著上升(P<0.05),见图4B和表5。

2.5 TRIM59过表达逆转了miR-548c-3p过表达对肝癌HepG2细胞增殖、迁移、侵袭的作用

与miR-NC组相比,miR-548c-3p组的TRIM59

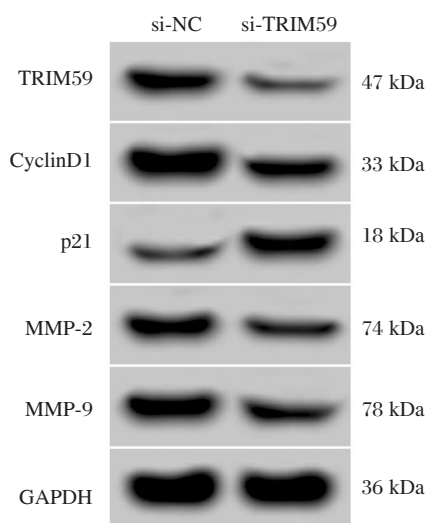


图3 TRIM59和增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达
Figure 3 Expression of TRIM59 and proteins related to proliferation, migration and invasion

蛋白表达量显著下降 ($P<0.05$), 增殖相关蛋白 CyclinD1 表达显著降低 ($P<0.05$), p21 显著上升 ($P<0.05$), HepG2 细胞在 48 h 和 72 h 增殖活性显著降低 ($P<0.05$), 迁移侵袭蛋白 MMP-2 和 MMP-9 显著下降 ($P<0.05$), 迁移和侵袭细胞数均显著下降 ($P<0.05$); 与 miR-548c-3p+pcDNA 组相比, miR-548c-3p+pcDNA-TRIM59 组 TRIM59 蛋白表达量显著上升 ($P<0.05$), 增殖相关蛋白 CyclinD1 表达显著升高 ($P<0.05$), p21 显著降低 ($P<0.05$), HepG2 细胞在 48 h 和 72 h 增殖活性显著上升 ($P<0.05$), 迁移侵袭蛋白 MMP-2 和 MMP-9 显著增多 ($P<0.05$), 迁移和侵袭细胞数均显著上升 ($P<0.05$)。说明过表达 TRIM59 逆转了过表达 miR-548c-3p 对 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

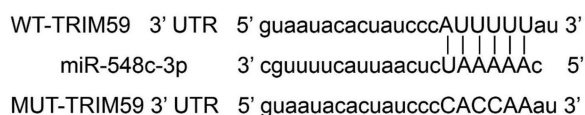
表3 抑制 TRIM59 表达对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of TRIM59 inhibition on proliferation, migration and invasion of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

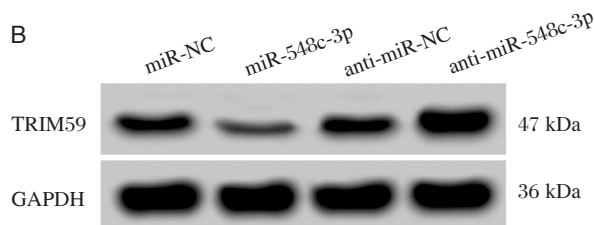
分组	TRIM59	细胞活性(OD _{600 nm})			迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
		24 h	48 h	72 h						
si-NC	0.59±0.05	0.41±0.04	0.75±0.07	1.18±0.09	113.45±10.28	89.24±8.24	0.73±0.07	0.26±0.03	0.63±0.06	0.67±0.06
si-TRIM59	0.22±0.03*	0.39±0.03	0.56±0.05*	0.73±0.06*	56.38±5.58*	44.68±4.07*	0.39±0.04*	0.53±0.05*	0.34±0.03*	0.32±0.03*
<i>t</i> 值	15.543	0.980	5.410	10.191	11.951	11.877	10.330	11.342	10.589	12.780
<i>P</i> 值	0.000	0.350	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与 si-NC 组比较, * $P<0.05$

A



B



A: TRIM59 的 3' UTR 中含有与 miR-548c-3p 互补的核苷酸序列; B: TRIM59 蛋白表达

图4 miR-548c-3p 靶向调控 TRIM59 的表达

Figure 4 miR-548c-3p targets and regulates the expression of TRIM59

表4 双荧光素酶报告实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Dual luciferase reporter assay ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	WT-TRIM59	MUT-TRIM59
miR-NC	1.02±0.09	1.01±0.08
miR-548c-3p	0.40±0.04*	0.98±0.09
<i>t</i> 值	15.420	0.610
<i>P</i> 值	0.000	0.555

与 miR-NC 组比较, * $P<0.05$

3 讨论

尽管肝癌治疗方法有极大的改进和提高^[12], 中晚期患者的治疗效果仍然很差。

研究表明, miRNA 参与肝癌的发生, 并与肝癌的诊断、转移复发、预后及生存率评估有关^[13-14]。miR-548c-5p 在乳腺癌复发患者中表达显著上调, 其高表达于缩短总生存期有关^[15]。Chang 等^[16]发

表5 miR-548c-3p 调控 TRIM59 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 miR-548c-3p regulates the expression of TRIM59 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	TRIM59 蛋白
miR-NC	0.53±0.05
miR-548c-3p	0.23±0.03*
anti-miR-NC	0.51±0.06
anti-miR-548c-3p	0.93±0.09#
F 值	263.629
P 值	0.000

与 miR-NC 组比较, *P<0.05; 与 anti-miR-NC 组比较, #P<0.05

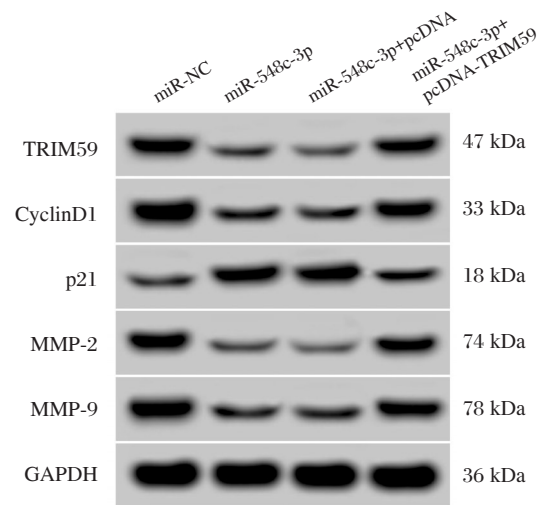


图5 TRIM59 和增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达

Figure 5 Expression levels of TRIM59 and proteins related to proliferation, migration and invasion in HepG2 cells

表6 TRIM59 过表达逆转了 miR-548c-3p 过表达对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的作用 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 6 Overexpression of TRIM59 reversed the effects of miR-548c-3p overexpression on proliferation, migration and invasion in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	TRIM59 蛋白	细胞活性(OD490 nm)			迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
		24 h	48 h	72 h						
miR-NC	0.54±0.05	0.40±0.04	0.73±0.06	1.17±0.09	106.58±9.64	84.24±8.07	0.71±0.07	0.29±0.03	0.63±0.06	0.62±0.06
miR-548c-3p	0.21±0.03*	0.37±0.03	0.48±0.04*	0.61±0.06*	43.65±4.21*	35.42±3.17*	0.33±0.03*	0.62±0.06*	0.25±0.03*	0.28±0.03*
miR-548c-3p+pcDNA	0.18±0.02	0.36±0.03	0.45±0.04	0.58±0.05	40.59±4.17	32.98±3.33	0.31±0.03	0.64±0.06	0.22±0.02	0.26±0.02
miR-548c-3p+pcDNA-TRIM59	0.42±0.04#	0.38±0.04	0.61±0.06#	0.88±0.08#	81.66±8.24#	67.24±6.56#	0.56±0.05#	0.41±0.04#	0.47±0.05#	0.51±0.05#
F 值	263.333	2.800	76.423	176.621	246.539	231.784	192.478	141.526	243.189	201.676
P 值	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与 miR-NC 组比较, *P<0.05; 与 miR-548c-3p+pcDNA 组比较, #P<0.05

现, miR-548c-3p 在幽门螺杆菌阴性胃癌肿瘤组织中表达上调, 与胃癌的发病机制有关。Habieb 等^[17]最新研究发现, miR-548c-3p 在肝癌患者中表达下调, 与 lncRNA-TSIX 和 SOGA1 一起是肝癌的潜在诊断标志物, 在区分肝癌患者与丙型肝炎患者和健康对照组方面显示出了很高的敏感性和特异性。miR-548c-3p 在肝癌中的表达尚不清楚。本研究结果表明, 与人正常肝细胞 L02 相比, miR-548c-3p 在肝癌细胞 HepG2、SMC-7721 和 BEL-7402 中表达均显著下调, 与 Habieb 等研究结果类似, 过表达 miR-548c-3p 可抑制 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭, 证实了 miR-548c-3p 在肝癌发展中的作用。

此外, 生物信息学预测结果发现, TRIM59 的 3'-UTR 序列中含有与 miR-548c-3p 互补的核苷酸序列, 提示 miR-548c-3p 与 TRIM59 之间可能存在调控关系, 假设 TRIM59 在肝癌中参与 miR-548c-3p 对肝癌的调控过程。

TRIM59 是三基序家族 TRIM 蛋白家族成员之一, 位于 3 号染色体上, 因具有 RING 结构被归为泛素连接酶, 在肝癌、肺癌、胃癌和结直肠癌等多种肿瘤组织中表达上调, 具有致癌基因的作用^[18]。Sun 等^[19]研究发现, 在肝癌细胞中, TRIM59 表达量显著高于人正常肝细胞, 敲除 TRIM59 可显著抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 而过度表达 TRIM59 可促进癌细胞生长和转移, TRIM59 的沉

默降低了 E-cadherin 的表达,增加了 N-cadherin 和波形蛋白的表达,而 TRIM59 的过表达对上述蛋白的影响相反,p53 蛋白表达水平受 TRIM59 调控,TRIM59 可能通过 p53 信号通路促进 HCC 细胞增殖和转移,TRIM59 可能是治疗肝细胞癌的潜在生物标志物和治疗靶点。本研究证实,TRIM59 在肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7402 组中 mRNA 和蛋白表达量均显著升高,抑制 TRIM59 可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭,与 Sun G 等研究结果一致,证实了 TRIM59 在肝癌发展中具有重要作用。

本研究通过 Western blot 和双荧光素酶报告系统结果进一步发现,miR-548c-3p 靶向负调控 TRIM59 的表达,过表达 TRIM59 逆转了过表达 miR-548c-3p 对 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用,证实了在肝癌中 miR-548c-3p 和 TRIM59 之间具有调控关系。

本研究阐述了在肝癌 HepG2 细胞中过表达 miR-548c-3p 可靶向抑制 TRIM59 的表达,进而抑制 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭。miR-548c-3p 和 TRIM59 有望成为肝癌诊断和治疗的分子靶点,为肝癌的诊断和治疗提供新的研究方向。

下一步将对肝癌患者血清或血浆等样本进行进一步的研究,确定 miR-548c-3p 和 TRIM59 在肝癌诊断中的价值。

参考文献

- [1] 陆录, 钦伦秀. 美国癌症联合委员会肝癌分期系统(第8版)更新解读[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(2):141-145.
- [2] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. 传染病信息, 2017, 16(7):705-720.
- [3] Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Semin Diagn Pathol, 2017, 34(2):153-159.
- [4] 姚海蓉, 陈豪, 陈建国, 等. 启东地区肝癌生存率长期趋势分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(12):921-925.
- [5] Guo X, Lee S, Cao P. The inhibitive effect of sh-HIF1A-AS2 on the proliferation, invasion, and pathological damage of breast cancer via targeting miR-548c-3p through regulating HIF-1 α /VEGF pathway in vitro and vivo [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:825-834.
- [6] Lu J, Zhang M, Yang X, et al. MicroRNA-548c-3p inhibits T98G glioma cell proliferation and migration by downregulating c-Myb [J]. Oncol Lett, 2017, 13(5):3866-3872.
- [7] Luo Z, Li D, Luo X, et al. Decreased Expression of MIR-548c-3p in Osteosarcoma Contributes to Cell Proliferation Via Targeting ITGAV [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2016, 31(5):153-158.
- [8] 夏修良, 薛栋, 相亭海, 等. TRIM59、Akt 及 MMP-9 在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2018, 21(8):17-20.
- [9] Liang J, Xing D, Li Z, et al. TRIM59 is upregulated and promotes cell proliferation and migration in human osteosarcoma [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6):5200-5206.
- [10] 赵凯, 陈伟, 苗陈岩, 等. Trim59 调控膀胱癌细胞侵袭及迁移能力的研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2018, 23(1):47-51.
- [11] 宋丽娜, 冯海忠. TRIM59 对神经胶质瘤形成的促进作用 [J]. 上海交通大学学报:医学版, 2017, 37(6):720-725.
- [12] Sherman M. Hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterologist, 2010, 20(4):703-720.
- [13] Song Y, Wang F, Huang Q, et al. MicroRNAs Contribute to Hepatocellular Carcinoma [J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(6):459-466.
- [14] 王丹. miRNA 在肝癌中的价值 [J]. 西南军医, 2017, 19(2):158-160.
- [15] Block I, Burton M, Sørensen K P, et al. Association of miR-548c-5p, miR-7-5p, miR-210-3p, miR-128-3p with recurrence in systemically untreated breast cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(10):9030-9042.
- [16] Chang H, Kim N, Park J H, et al. Different microRNA expression levels in gastric cancer depending on Helicobacter pylori infection [J]. Gut Liver, 2015, 9(2):188-196.
- [17] Habieb A, Matboli M, El-Tayeb H, et al. Potential role of lncRNA-TSIX, miR-548-a-3p, and SOGA1 mRNA in the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Mol Biol Rep, 2019. [Epub ahead of print]
- [18] 刘晓风. TRIM59 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(11):1098-1102.
- [19] Sun G, Sui X, Han D, et al. TRIM59 promotes cell proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Pharmazie, 2017, 72(11):674-679.

人防御素 HD-5 在胃癌发生发展中的作用研究

尚晓宇¹ 顾国威² 柳国权³ 齐靖⁴ 解强¹ 李坤^{5*}

[摘要] 目的 研究人防御素 HD-5 在胃癌发生发展中的作用,探讨其作为胃癌标志物的可能性。
方法 组织标本来自于广州市番禺区中心医院接受胃癌切除手术的患者,采用免疫组化、实时荧光定量 PCR 技术比较 HD-5 在胃癌组织和正常组织中的表达差异,并通过细胞培养、细胞转染技术在胃癌细胞系 AGS 中过表达 HD-5 基因,研究其对胃癌细胞增殖能力、迁移能力和裸鼠成瘤的影响。结果 HD-5 在胃癌组织中的 mRNA 水平和蛋白表达均明显低于周围正常组织 ($P<0.05$),胃癌细胞系 AGS 中过表达 HD-5 显著抑制细胞增殖能力 ($P<0.05$),细胞迁移能力 ($P<0.05$);此外,HD-5 过表达的 AGS 细胞在裸鼠体内的生长速度较对照组显著变慢 ($P<0.05$)。结论 HD-5 能够抑制胃癌的增殖、迁移和体内肿瘤生长速度,是一个潜在的肿瘤抑制因子。

[关键词] 胃癌;防御素;HD-5

HD-5 inhibits gastric cancer proliferation, migration and tumor growth

SHANG Xiaoyu¹, GU Guowei², LIU Guoquan³, QI Jing⁴, XIE Qiang¹, LI Kun^{5*}

(1. Department of Infectious Diseases, Panyu Central Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511400; 2. Zeng Cheng District People's Hospital Of Guangzhou, Guangdong, China, 511300; 3. Guangzhou Saiwang Biotechnology Co., Ltd. Guangzhou, Guangdong, China 510700; 4. Guangzhou Xinqi Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong China, 510000; 5. Institute of Antibody Engineering, School of Laboratory Medical and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To investigate the potential roles of human alpha defensin 5 (HD-5) as a tumor suppressor in gastric cancer. Methods The tissue specimens were obtained from patients undergoing gastric cancer resection in the Central Hospital of Panyu District, Guangzhou. Immunohistochemistry and real-time quantitative PCR were used to compare the expression of HD-5 in gastric cancer tissues and normal tissues. The HD-5 gene was overexpressed in the gastric cancer cell line AGS by cell culture and cell transfection techniques, and its effects on proliferation, migration and tumor formation of gastric cancer cells were studied. Results The mRNA level and protein expression of HD-5 in gastric cancer tissues were significantly lower than those in surrounding normal tissues ($P<0.05$). Overexpression of HD-5 in gastric cancer cell line AGS significantly inhibited cell proliferation ($P<0.05$), cell migration ability ($P<0.05$). In addition, the growth rate of HD-5 overexpressing AGS cells in nude mice was significantly slower than that of the control group ($P<0.05$). Conclusion HD-5 is a potential tumor suppressor that inhibits the proliferation, migration and tumor growth rate of gastric cancer.

[KEY WORDS] Gastric cancer; Defensin; HD-5

基金项目:国家自然科学基金(81802435)

作者单位:1. 广东省广州市番禺区中心医院感染疾病科

2. 广州市增城区人民医院

3. 广州赛旺生物科技有限公司

4. 广州鑫启生物技术有限公司

5. 南方医科大学检验与生物技术学院

*通信作者:李坤, E-mail:likun0732@163.com

2018年中国胃癌新发病例45.6万人,占有新发肿瘤病例的10.6%,仅次于肺癌,排名第2位^[1,2]。目前针对胃癌治疗仍然缺少有效手段,其5年生存率不足50%,严重威胁我国人民的健康^[1-3]。

防御素是普遍存在的一类带有正电荷的小分子多肽,具有抗菌、抗病毒、免疫调节的作用^[4]。在哺乳动物细胞中主要由特定的白细胞和上皮细胞表达分泌。人防御素根据结构和分泌细胞的不同分为 α 和 β 两个家族,其中 α -防御素包括人中性粒细胞防御肽1-4 (Human neutrophil peptide, HNP1-4),人防御素5和6(human defensin 5 and 6, HD-5, HD-6), β -防御素(human β defensin, HBD)包括HBD1-6^[5-7]。在不同的肿瘤组织中已经观察到防御素的异常表达,例如HNP1-3在包括肺癌、肾癌、膀胱癌、T细胞淋巴瘤等不同的肿瘤组织中高表达;HD-6在结肠癌组织中高表达^[8,9]。而HBD-1在包括前列腺癌、肾癌、结肠癌在内的多种肿瘤组织中低表达,在肿瘤发生过程中行使肿瘤抑制因子功能^[9]。此外,防御素的异常表达与肿瘤免疫密切相关。研究发现,在某些类型的肿瘤中,防御素表达缺失与肿瘤浸润减少具有相关性,表达HBD2的溶瘤病毒能够募集更多的免疫细胞到肿瘤部位,从而增强肿瘤抑制效果^[10]。笔者前期检索The Cancer Genome Atlas (TCGA)数据库发现 α -防御素家族成员HD-5在胃癌中表达量较癌旁组织显著降低。目前其低表达与免疫细胞的浸润减少存在相关性,且防御素在胃癌发生发展中的作用研究较少。因此本研究通过免疫组化、实时荧光定量PCR、细胞迁移、裸鼠成瘤等手段初步探讨HD-5的表达与胃癌发生发展的关系,以期为胃癌的治疗提供分子生物学依据,并指导胃癌治疗的预后。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胚肾细胞HEK293T和人胃腺癌细胞AGS购自中国协和医科大学细胞资源中心。DMEM培养基(Gibco, C11965500BT)、RPMI1640培养基(货号:C11875500BT)、胎牛血清(货号:10099-141)、青链霉素(货号:15070063)、谷氨酰胺(货号:15140-122)、CCK8细胞增殖检测试剂盒(货号:C35006)、RIPA裂解液(货号:R0278)、抗HA抗体(货号:26183)、Trizol(货号:15596018)、逆转录试剂盒(货号:K1651)均购自美国ThermoFisher公

司。Transwell小室(货号:3422)购自美国康宁公司。抗 β -actin(货号:A1978)抗体购自美国Sigma公司。SPF级BALB/c裸鼠(雌性,6-8周龄)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 人肿瘤样品的采集

筛选广州市番禺区中心医院接受手术切除治疗的胃腺癌患者24例,手术切除胃癌组织样本和距离癌组织3~5厘米处的癌旁组织,立即放于组织冻存液中,液氮速冻后置于 -80°C 条件下存储。本研究肿瘤样本的使用已得到医院人类研究伦理委员会(番医伦审批[2019]36号)批准,所有参与者均知情并同意。

1.3 荧光定量PCR

Trizol法提取癌组织和癌旁组织中的总RNA,用逆转录试剂盒将mRNA反转录合成cDNA。PCR引物序列如下:GAPDH:正义,5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3';反义,5'-TCAGCTCAGGGATGACCTTG-3';HD5:正义,5'-CCTCAGGTTCTCAGGCAAGA-3';反义,5'-GGC-CACTGATTTACACACC-3'。PCR反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s,共40个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min,进行熔解曲线分析以确认产物的特异性,4 $^{\circ}\text{C}$ 维持至结束。GAPDH作为正常化的内部对照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算分析基因的相对表达水平。

1.4 免疫组化

石蜡包埋组织标本经常规脱蜡及梯度酒精水处理。利用罗氏Ventana自动免疫组化仪进行抗原修复、HD-5抗体标记及DAB染色。经脱水、透明、封片后,镜检观察。

1.5 细胞培养

HEK293T在DMEM培养基中培养,AGS在RPMI 1640培养基中培养。所有培养基均补充有10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素,将细胞培养在有5% CO_2 的37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中。

1.6 HD-5稳定表达细胞系的构建及检测

克隆人HD-5的蛋白质编码序列到慢病毒载体PCDH上,将上述构建好的慢病毒载体连同包装质粒(psPAX和PMD2.G)共转染HEK293T细胞系。转染48 h后收集细胞培养上清液过滤后侵染AGS细胞,48 h后加入嘌呤霉素筛选得到HD-5稳定表达细胞系。收集细胞,用免疫印迹法检测外源蛋白表达。

1.7 CCK8 检测细胞增殖能力

取对数生长期且稳定表达 HA-Vec 和 HA-HD-5 的 AGS 细胞接种于 96 孔板中,每孔接种 5 000 个细胞,将 96 孔板在培养箱中培养过夜,每组设置 5 个平行。分别于 1、2、3、4 d 后于每孔中加入 CCK8 溶液(每孔 100 μ L 加入 10 μ L)。以加入相应量的细胞培养物和 CCK8,但未加入细胞的孔作为空白对照。在 37 度孵育 1 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值(OD)。

1.8 Transwell 细胞迁移实验

将 Transwell 小室置于 24 孔板中,下室加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 高糖培养基。将稳定表达 HA-vec 和 HA-HD-5 的 AGS 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 Transwell 小室的上室。培养 24 h 后,取出各组小室,用棉签沾取 PBS 后轻轻擦拭小室膜的上层以去除未穿膜的细胞,用 4% 多聚甲醛固定及 0.1% 结晶紫染色,于 100 倍正置显微镜下随机选取 5 个视野拍照计数。

1.9 裸鼠成瘤实验

将无血清培养基混悬的肿瘤细胞悬液 0.1 mL (含细胞数 1.0×10^7 , 50% Matrigel) 注射于每只小鼠左右两侧腋下皮下部位。肿瘤细胞接种后,以游标卡尺测量肿瘤长径 L 和短径 W, 计算肿瘤体积(Tumor Volume, TV), 计算公式为: $TV = 0.5 \times L \times W^2$ 。实验结束时,分离肿瘤组织并用数码相机进行拍照。

1.10 统计学分析

本研究采用 SPSS 15.0 软件对各比较组进行 T 检验统计学分析,数据结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $*P < 0.05$ 差异时有统计学意义。

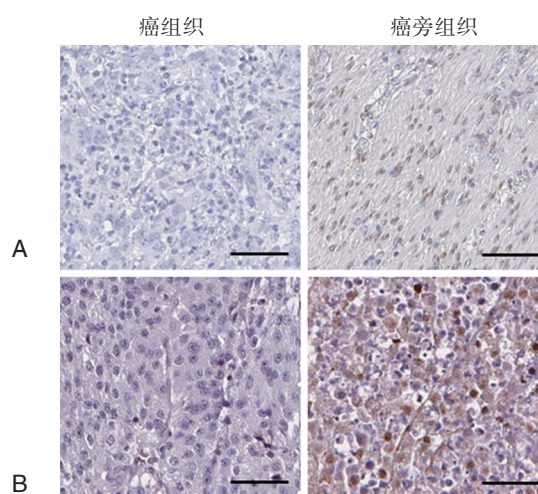
2 结果

2.1 qPCR 检测胃癌组织中 HD-5 表达

使用实时荧光定量 PCR 对手术切除的胃癌组织和癌旁组织样本进行检测,结果显示,与癌旁组织相比,胃癌组织中 HD-5 蛋白的表达水平显著降低,平均含量仅为癌旁组织的 50% (癌组织: 1.583 ± 0.176 , $N=24$, 癌旁组织: 3.613 ± 0.184 , $N=24$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化检测胃癌组织中的 HD-5 蛋白表达

通过免疫组化技术检测手术切除的胃癌组织和癌旁组织中 HD-5 蛋白的表达变化,检测结果显示 HD-5 蛋白在癌组织中的表达显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见图 1。



注: HE, $\times 400$, A、B 为两个不同病人样本, 图例为 100 μ m。

图 1 免疫组化检测 HD-5 在癌组织和癌旁组织中的表达
Figure 1 Immunohistochemical detection of HD-5 in cancerous and adjacent tissue

2.3 HD-5 过表达对胃癌细胞系构建

在胃癌细胞系 AGS 中通过转染技术过表达 HD-5 构建稳定高表达细胞系, 免疫印迹检测确定外源转染的 HD-5 基因在 AGS 细胞中稳定高表达。见图 2。

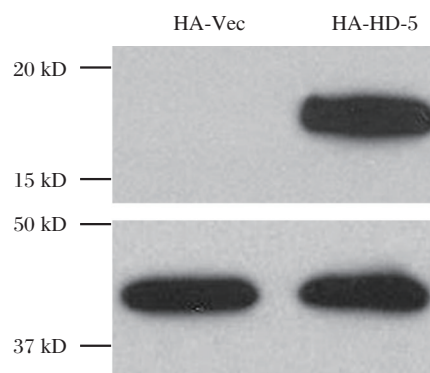


图 2 免疫印迹检测在 AGS 细胞中过表达的外源 HD-5
Figure 2 Western blot detection of exogenous HD-5 expression

2.4 HD-5 过表达抑制胃癌细胞增殖

采用 CCK8 方法检测细胞增殖能力, 结果显示 HD-5 过表达能够抑制胃癌细胞 AGS 的增殖能力, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.5 HD-5 过表达抑制胃癌细胞迁移

HD-5 过表达能够抑制 AGS 细胞系的迁移能力, HD-5 过表达组平均每个视野迁移细胞数目比对照组少约 30 个细胞, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

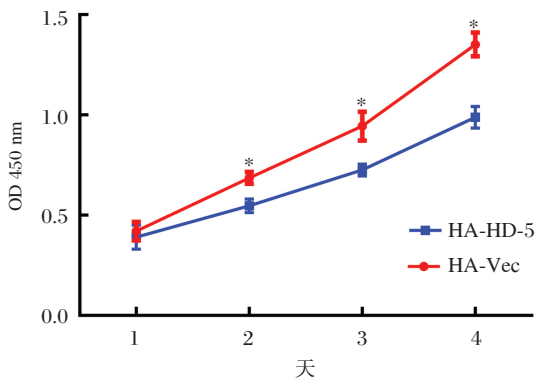


图3 CCK8检测高表达HD-5的AGS细胞的增殖能力
Figure 3 CCK8 detection of HD-5 overexpressed AGS cell proliferation

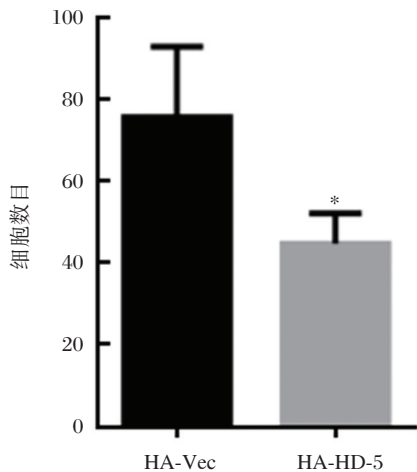


图4 对照细胞和HD-5高表达AGS细胞的迁移能力比较
Figure 4 Comparison of cell migration between control and HD-5 overexpressed AGS cell

2.6 HD-5对裸鼠成瘤的影响

实验结果显示,与对照细胞相比,HD-5高表达的AGS细胞在裸鼠体内生长速度明显变慢,第20天肿瘤体积约为500 mm³,仅为对照组体积的四分之一,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图5。

3 讨论

近年来肿瘤的治疗进展迅速,但针对胃癌靶向治疗药物的研发进程缓慢,其主要原因为胃癌的发生发展机制不明确。目前临床主要采用手术切除结合放化疗的标准疗法^[3, 11]。防御素作为广泛参与生物体的先天免疫和获得性免疫的关键分子,与肿瘤的发生发展以及肿瘤免疫密切相关^[6]。2001年,刘文超等人研究发现,中性粒细胞中提取的防御素对胃癌细胞具有良好的杀伤作用,但该

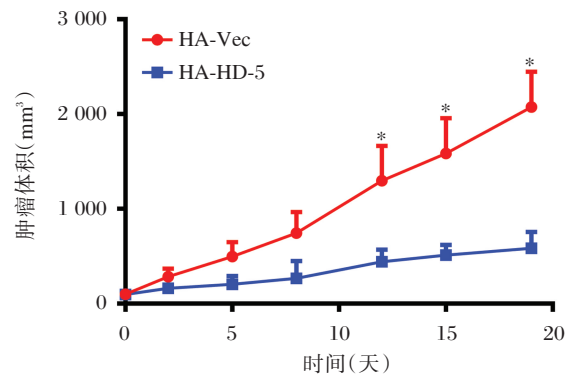


图5 HD-5过表达抑制AGS细胞在裸鼠皮下的生长速度 (* $P<0.05$)

Figure 5 Comparison of tumor growth by xenograft model (* $P<0.05$)

研究并未明确防御素的种类^[14]。2005年,Nomura等首次发现HD-5在部分胃癌细胞中表达缺失,提示其可能与胃癌的发生有关系^[12]。2013年,Inada等首次报道了HD-5有可能通过下调E-cadherin表达抑制食管鳞癌细胞的生长,明确HD-5可能行使类似肿瘤抑制因子的功能^[13]。笔者通过肿瘤样本的公开测序数据库挖掘分析也发现,HD-5在胃癌组织中表达缺失,这与2005年Nomura等发现一致。基于此,笔者设计一系列体内外实验,以深入研究HD-5在胃癌发生发展中的可能机制。

本研究中首次在临床样本中比较了人防御素HD-5在胃癌组织和癌旁组织中的表达差异,证实了HD-5在癌组织中低表达,对胃癌细胞的增殖、迁移、体内裸鼠成瘤有抑制作用,是一个潜在的肿瘤抑制因子,其缺失与胃癌的发生发展密切相关。

以往研究发现,防御素可通过其细胞毒作用直接接触破坏细胞膜结构,或者通过与细胞骨架蛋白结合诱导细胞发生凋亡^[6, 7]。此外,防御素除直接抑制肿瘤的细胞增殖外,还能通过募集免疫细胞改变肿瘤的免疫微环境,进而抑制肿瘤的生长,例如树突状细胞(Dendritic cells, DC)等^[6, 14]。HD-5在胃癌组织中缺失很有可能导致抑制性肿瘤免疫微环境的改变,进而导致肿瘤的快速增殖。已有报道证实,防御肽肿瘤中的高表达能够促进肿瘤内部免疫细胞浸润和肿瘤免疫治疗的活性。因此,HD-5对胃癌的抑制作用,一方面可能通过细胞毒类效果抑制细胞增殖和迁移,另一方面也可能是通过改变肿瘤免疫微环境实现。本研

究进行的采用免疫缺陷小鼠观察到的肿瘤抑制效果也从体内裸鼠成瘤实验侧面印证了HD-5的细胞毒类作用机制。本研究对HD-5在肿瘤免疫微环境中的调节作用并未探讨,未来研究中拟采用正常小鼠建立鼠源肿瘤模型,进一步验证HD-5在肿瘤免疫中的作用,尤其是与现有的免疫检查点抑制剂类药物(如PD-1/PD-L1抗体药物)、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和CAR-T(Chimeric Antigen Receptor T-cell Immunotherapy)等新型治疗方法的相互作用机制。防御素能否增强这类药物治疗效果将是下一步研究重点。综上,本研究首次证实了HD-5在胃癌发生发展中的作用,为防御素参与肿瘤调控提供了初步证据,为改善胃癌的治疗以及提高肿瘤免疫疗法效果提供了依据。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1):22.
- [3] Goetze OT, Al-Batran SE, Chevally M, et al. Multimodal treatment in locally advanced gastric cancer. *Updates Surg*, 2018, 70(2):173-179.
- [4] Khurshid Z, Zafar MS, Naseem M, et al. Human Oral Defensins Antimicrobial Peptides: A Future Promising Antimicrobial Drug [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(10):1130-1137.
- [5] Ehmann D, Wendler J, Koening L, et al. Paneth cell alpha-defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (9):3746-3751.
- [6] Fruitwala S, El-Naccache DW, Chang TL, Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 88, 163-172.
- [7] Semple F, Dorin JR. beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more [J]. *J Innate Immun*, 2012, 4(4):337-48.
- [8] Schroeder BO, Ehmann D, Precht JC, et al. Paneth cell alpha-defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide [J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(3): 661-71.
- [9] Alvarez AH, Martinez Velazquez M, Prado Montes de Oca E, Human beta-defensin 1 update: Potential clinical applications of the restless warrior [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 104, 133-137.
- [10] Sun T, Luo Y, Wang M, et al. Recombinant Oncolytic Vaccinia Viruses Expressing Human beta-Defensin 2 Enhance Anti-tumor Immunity [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 13, 49-57.
- [11] Feng W, Zhu X, Efficacy prediction of targeted therapy for gastric cancer: The current status (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (2): 1238-1246.
- [12] Inada KI, Mizoshita T, Tsukamoto T, et al. Paneth type gastric cancer cells exhibit expression of human defensin-5 [J]. *Histopathology*, 2005, 47 (3): 330-331.
- [13] Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, et al. Reduction of E-cadherin by human defensin-5 in esophageal squamous cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(1): 71-7.
- [14] Zhang L, McNeil BD, Beta-defensins are proinflammatory pruritogens that activate Mrgprs [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(5):1960-1962.
- [15] 刘文超,穆怀兴,等. 防御素对胃癌细胞系体外的杀伤作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2001.06.003.
- [16] Jinsong Gao, Congcong Liu, Fengxia Yao, et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion [J]. *Mol Cytogenet*, 2012, 16 (5):33.
- [17] He D, Furlotte N, Eskin E. Detection and reconstruction of tandemly organized de novo copy number variations [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(Suppl 11): S12.
- [18] Alkan C., Coe B. P., Eichler E. E. Genome structural variation discovery and genotyping [J]. *Nature reviews Genetics*, 2011, 12(5):363-376.

(上接第 262 页)

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^{1*} 冯广森¹ 林亚超¹ 李智²

[摘要] 目的 分析树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术对结直肠癌肝转移患者T淋巴细胞亚群、癌胚抗原(CEA)水平及生存质量的影响。方法 选取2016年1月至2018年3月本院收治的68例结直肠癌肝转移患者,简单随机化分为对照组(34例)、观察组(34例),对照组予以CT引导下氩氦刀冷冻消融术,观察组予以DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术,比较两组术后3个月缓解率、全血T淋巴细胞亚群(CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺)、血清糖类抗原242(CA242)、CEA、糖类抗原199(CA199)水平、微小RNA(miR)-21、miR-106a表达量、欧洲癌症研究治疗组织研发癌症患者生存质量评定量表评分(EORTC QLQ-C30)。结果 观察组术后3个月缓解率为61.76%高于对照组的20.59%($P<0.05$);观察组术后3个月CD³⁺(%)、CD⁴⁺(%)、CD⁴⁺/CD⁸⁺高于对照组($P<0.05$);观察组术后3个月血清CA242、CEA、CA199水平低于对照组($P<0.05$);观察组术后3个月miR-21、miR-106a表达量低于对照组($P<0.05$);观察组术后3个月功能量表、整体生活质量量表评分高于对照组,症状量表、单项测试项目评分低于对照组($P<0.05$)。结论 对结直肠癌肝转移患者联合应用DC-CIK细胞免疫、CT引导下氩氦刀冷冻消融术,能提高患者免疫功能、生存质量,增强对肿瘤杀灭作用,其机制可能与抑制促癌miR-21、miR-106a表达有关。

[关键词] 免疫治疗;氩氦刀冷冻消融术;结直肠癌肝转移;CEA

Effect of cellular immunity combined with operation on quality of life of patients with liver metastasis in colorectal cancer

XU Ligu^{1*}, FENG Guangsen¹, LIN Yachao¹, LI Zhi²

(1. Department of Interventional Medicine, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450014; 2. Department of interventional therapy, the first affiliated hospital of suzhou university, Suzhou, Jiangsu, China, 215006)

[ABSTRACT] Objective To analyze dendritic cell - cytokine - induced killer cells (DC - CIK) immunization combined with CT-guided cryoablation with argon-helium cryoablation for T lymphocyte subsets and carcinoembryonic antigen (CEA) in patients with liver metastases from colorectal cancer CA level and quality of life impact. Methods From January 2016 to March 2018, 68 patients with liver metastases from colorectal cancer admitted to our hospital were randomly divided into control group (34 cases) and observation group (34 cases). The control group was received Sputum cryoablation. The observation group was treated with DC-CIK cell immunization combined with CT-guided cryoablation with argon-helium cryoablation. The remission rate and T lymphocyte subsets (CD³⁺, CD⁴⁺, CD⁸⁺), Carbohydrate antigen 242 (CA242), CEA, CA199 levels, microRNA (miR)-21, miR-106a expression, European cancer research treatment organization

基金项目:江苏省青年医学重点人才培养(QNRC2016711)

作者单位:1. 郑州大学第二附属医院介入科,河南,郑州 450014

2. 苏州大学第一附属医院介入科,江苏,苏州 215006

*通信作者:许立国, E-mail: xuliguo8@sohu.com

developed cancer patient quality of life rating scale score (EORTC QLQ-C30) were compared between the two groups. **Results** In the observation group, the remission rate was 61.76% in the 3 months after operation, which was higher than that in the control group (20.59%) ($P<0.05$). The CD³⁺(%), CD⁴⁺(%), CD⁴⁺/CD⁸⁺ in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.05$). CA242, CEA and CA199 were lower than that of the control group at 3 months after operation ($P<0.05$). The expression of miR-21 and miR-106a in the observation group was lower than that in the control group at 3 months after operation ($P<0.05$). The scores of the 3 month functional scale and the overall quality of life scale were higher than those of the control group, and the scores of the symptom scale and individual test items were lower than those of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The combined application of DC-CIK cell immunity and CT-guided cryoablation with argon-helium cryoablation can improve the immune function and quality of life of patients with liver metastases from colorectal cancer, and enhance the killing effect on tumors. The mechanism may be related to the inhibition of the expression of microRNA-21 and microRNA-106a.

[KEY WORDS] Immunotherapy; Cryoablation with argon-helium Cryoablation; Liver metastasis of colorectal cancer; CEA

肝脏是结直肠癌最常见血行散播靶器官。约50%结直肠癌患者在初诊时出现肝转移,约15%~25%患者在病程中出现异时性肝转移,其中80%肝转移患者肝转移灶不能获得根治性切除,成为导致患者死亡的主要原因^[1]。因此如何预防、治疗结直肠癌肝转移成为临床研究热点。近年来过继免疫疗法治疗恶性肿瘤逐渐受到人们关注尤其是晚期癌症^[2]。树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(dendritic cell-cytokine-induced killer, DC-CIK)免疫技术是一种细胞生物免疫治疗技术,它利用树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞定向精准杀伤肿瘤^[3]。氩氦刀冷冻消融术是一种局部超低温冷冻消融肿瘤微创类先进医疗技术,能通过冷冻+热疗消除肿瘤^[4]。本研究选取结直肠癌肝转移患者,从全血T淋巴细胞亚群、血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)水平及生存质量等角度,观察DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术应用价值,为结直肠癌肝转移的治疗提供参考,报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2018年3月本院收治的68例结直肠癌肝转移患者,简单随机划分为对照组(34例)和观察组(34例),两组年龄、病程、肿瘤最大直径、性别、体质量指数、肝转移灶数量、原发病类型、转移类型、临床分期、病理分型、分化程度、合并疾病等资料均衡可比($P>0.05$),见表1。本研究患者均自愿签署知情同意书,经本院伦理委员会审核

批准。

1.2 纳入标准及排除标准

(1)纳入标准:无腹水、黄疸、出血倾向;符合结直肠癌肝转移诊断标准^[5];无其他脏器转移及肝功能衰竭;自愿签署知情同意书;(2)排除标准:存在其他原发性恶性肿瘤者;合并严重病毒、细菌感染;存在生物制品过敏史及自身免疫疾病者;存在药物无法控制高血压者;合并急性心脑血管疾病者;伴有传染类疾病者。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂/仪器

anti-CD3单克隆抗体(Peprotech公司,美国);GT-T551培养基(TaKaRa公司,日本);重组人干扰素 γ (rh IFN- γ)(Novoprotein公司);Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液(GE Healthcare公司,美国);重组人白介素-4(recombinant human Interleukin-4, rh IL-4)(Peprotech公司,美国);重组人肿瘤坏死因子(recombinant human tumor necrosis factor- α , rh TNF- α)(Peprotech公司,美国);粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)(Peprotech公司,美国);重组人白介素-1 α (recombinant human interleukin-1 α , rh IL-1 α)(Sinobiological公司);重组人白介素-2(recombinant human interleukin-2, rh IL-2)(北京四环生物制药有限公司);血细胞分离机(南京惠杰医疗科技有限公司);电子计算机断层扫描机(computed Tomography, CT)(中国新博医疗技术有限公司);冷冻消融系统(Galil Medical Ltd.公司,以色列)。

表1 两组临床资料对比
Table 1 Comparison of clinical data between two groups

资料	对照组(n = 34)	观察组(n = 34)	t/ χ^2 /u 值	P 值
年龄(岁)	45~82(70.02±5.91)	48~79(69.52±4.68)	0.387	0.700
病程(月)	3~6(4.43±0.65)	2~6(4.29±0.81)	0.786	0.435
肿瘤最大直径(cm)	1.8~6.0(4.97±0.57)	2.0~5.8(5.02±0.36)	0.433	0.667
女/男	15/19	11/23	0.996	0.318
体质量指数(kg/m ²)	19~23(20.55±0.71)	19~22(20.19±0.52)	2.385	0.020
肝转移灶数量(个)	2~7(4.25±1.08)	2~6(4.31±1.11)	0.226	0.822
原发病类型				
结肠癌	18(52.94)	17(50.00)	0.059	0.808
直肠癌	16(47.06)	17(50.00)		
转移类型				
同时性肝转移	24(70.59)	22(64.71)	0.269	0.604
异时性肝转移	10(29.41)	12(35.29)		
临床分期				
Ⅲ期	21(61.76)	19(55.88)	0.243	0.622
Ⅳ期	13(38.24)	15(44.12)		
病理分型				
腺癌	30(88.24)	32(94.12)	0.183	0.669
其他	4(11.76)	2(5.88)		
分化程度				
低分化	5(14.71)	8(23.53)	0.019	0.985
中分化	23(67.65)	17(50.00)		
高分化	6(17.65)	9(26.47)		
合并疾病				
高血压	2(5.88)	1(2.94)	0.000	1.000
冠心病	3(8.82)	1(2.94)	0.266	0.606
糖尿病	4(11.76)	2(5.88)	0.183	0.669
高脂血症	5(14.71)	8(23.53)	0.856	0.355

1.3.2 对照组治疗方法

对照组予以CT引导下氩氦刀冷冻消融术。(1)术前:实施CT定位扫描,整体评估手术可行性,明确进针数量、方向、冷冻范围、路径等,设计包含3、2、5 mm在内多种组合,以单刀或多刀组合方式进行穿刺,肿瘤组织尽可能全部被冰球包容,冷冻范围>肿瘤边缘1.0 cm,穿刺路径设计时注意重要神经与大血管。(2)手术方法:3.0T CT机,根据穿刺路径要求取合适体位实施CT扫描,再次明确进针方向、进针点,测量进针距离,标记定位肿瘤相应皮肤表面,常规消毒铺巾、局部浸润麻醉,CT引导下按预定路径插入氩氦刀至目标深度。核实无误后,开启氩氦靶向治疗系统冷冻消融系统按40%氩气输出功率超低温快速冷冻,维持-140℃~-160℃温

度15 min,启动氦气升温至20℃,再启动超低温快速冷冻,共重复2个循环,氩氦刀超导探头可拨动时退刀,再次实施CT扫描,观察冷冻效果、是否有出血等情况,穿刺通道止血,对应部位皮肤进行消毒、包扎。(3)术后嘱患者定期随访。

1.3.3 观察组治疗方法

观察组予以DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术(方法同对照组)。消融术实施DC-CIK细胞免疫:(1)先按流程制备DC-CIK细胞,确定细菌、真菌检验结果阴性,抽样5 mL,台盼蓝染色,观察计数活细胞与死细胞数量,并检测明确内毒素阴性,收集24瓶细胞,置于无菌离心瓶内,离心8 min后弃去上清,0.9%注射用水平衡细胞,离心清晰,弃去上清,收集细胞至注射用生理盐

水中(0.9%, 100 mL), 注入 50% 5 mL 人血白蛋白, 混匀后抽样 1 mL 置于-4℃以备用。(2)核对患者信息, 无误后进行回输, 1 个月 1 次, 共回输 3 次。

1.4 疗效评定

参照实体瘤疗效评判标准^[6]分为 4 个等级。完全缓解(complete response, CR): 病灶消失, 维持 4 周以上; 部分缓解(partial remission, PR): 病灶减少 $\geq 50\%$, 维持 4 周以上; 稳定(stable disease, SD): 病灶减少 $< 50\%$ 或增大 $< 25\%$, 无新发病灶, 维持 4 周以上; 进展(progressive disease, PD): 病灶增大 $\geq 25\%$ 。缓解率=(CR+PR)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.5 观察指标

1.5.1 标本采集与检测

采集 EDTA 抗凝静脉血 2 mL, 以流式细胞仪检测全血 T 淋巴细胞亚群(CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺)水平; 采集静脉血 3 mL, 4 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 利用化学发光免疫分析法检测血清糖类抗原 242(carbohydrate antigen 242, CA242)、CEA、糖类抗原 199(carbohydrate antigen 199, CA199)水平; 取 500 μ L 血清样本, 以 Trizol 法提取总 RNA, 以反转录试剂盒反转录为 cRNA, 以 U6 小核 RNA 为内参照, 以 cRNA 为模板, 设计内参 U6 上下游引物分别为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'、5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 微小 RNA(miR)-21 上下游引物分别为 5'-GCGGCGGTAGCTTATCAGACTG-3'、5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3', miR-106a 上下游引物分别为 5'-GCGGCGGAAAAGTGCTTACAGTG-3'、5'-ATCCAGTG-CAGGGTCCGAGG-3', 以荧光定量 PCR 检测 miR-21、miR-106a 表达, 反应体系包括 PCR 反应缓冲液 10 μ L、引物 1 μ L、逆转录产物 1.33 μ L、5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 应用无酶水补充至 25 μ L, 混合液稍离心后立即置于 PCR 仪上, 执行扩增, 反应条件 95℃预变性 15 min、94℃变性 15 s、55℃ 30 s、70℃ 34 s, 共 40 个循环, 最后在 72℃保温 7 min,

OCR 产物放置 4℃下电泳检测。

1.5.2 观察指标

(1)比较两组术后 3 个月缓解率。(2)比较两组术前、术后 3 个月 T 淋巴细胞亚群(CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺)水平。(3)比较两组术前、术后 3 个月 CA242、CEA、CA199 水平。(4)比较两组术前、术后 3 个月 miR-21、miR-106a 表达量。(5)比较两组术前、术后 3 个月生存质量: 以欧洲癌症研究治疗组织研发癌症患者生存质量评定量表(European Organisation for Research and Treatment Cancer Quality of Life-C30, EORTC QLQ-C30)^[3], 分为 5 个功能量表(包含 2 个条目认知功能量表、2 个条目社会功能量表、4 个条目情绪功能量表、5 个条目躯体功能量表、2 个条目角色功能量表)、1 个整体生活质量量表(2 个条目)、3 个症状量表(包含 2 个条目恶心呕吐量表、2 个条目疼痛量表、3 个条目疲乏量表)、6 个单项测量项目, 共 30 个条目, 整体生活质量量表分为 1(最低生活质量)~7 级(最高生活质量), 功能量表评分分为 1(最低功能)~4 级(最高功能), 其他条目分为 1~4 级, 整体生活质量量表、功能量表评分越高, 质量或功能越佳, 症状量表、单项测试项目评分越高, 对应测试条目越严重。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 *t* 检验, 计数资料用 *n*(%) 表示, 以 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组疗效比较

观察组术后 3 个月 CR、PR、SD、PD 分别有 3、13、11、2 例, 缓解率为 61.76%; 对照组 CR、PR、SD、PD 分别有 3、4、19、8 例, 缓解率为 20.59%, 两组比较差异具有统计学意义(P < 0.05), 见表 2。单个病例术前、术后 3 个月肝脏 CT 图见图 1。

表 2 两组疗效比较 [n(%)]

Table 2 Comparisons of curative effects between the two groups [n(%)]

组别	n	CR	PR	SD	PD	缓解率
观察组	34	8(23.53)	13(38.24)	11(32.35)	2(5.88)	21(61.76)
对照组	34	3(8.82)	4(11.76)	19(55.88)	8(23.53)	7(20.59)
χ^2 值						11.900
P 值						0.000

患者性别男,59岁,图1A为其术前肝脏CT图像,可见面积较大癌灶,经DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术治疗后3个月后癌灶面积明显减小,见图1B。

2.2 两组血清T淋巴细胞亚群比较

观察组术后3个月CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁴⁺/CD⁸⁺高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

2.3 两组CA242、CEA、CA199水平比较

观察组术后3个月CA242、CEA、CA199低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

2.4 两组miR-21、miR-106a表达比较

观察组术后3个月miR-21、miR-106a表达量低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表5。

2.5 两组EORTC QLQ-C30评分比较

观察组术后3个月功能量表、整体生活质量量表评分高于对照组,症状量表、单项测试项目评分低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表6。

3 讨论

CT引导下氩氦刀冷冻消融术是近年来发展起来冷冻治疗技术,能用于多种肿瘤治疗,尤其适用于不能耐受手术或不能手术切除患者,其主要通过能迅速降温的氩气,封闭肿瘤形成冰晶,促使癌细胞脱水、破裂,再利用能迅速升温的氦气,融化冰晶,促使癌灶发生肿胀、破裂。以往实践证明,氩氦刀冷冻消融术能保留更多正常肝组织,且安全性高^[7]。王猛等^[8]以CT引导下氩氦刀冷冻消融术治疗侵及胸膜或胸壁恶性肿瘤,发现患者术后病变得不同程度消融。但根据梁淑贞等^[9]报道,42个肝、肺恶性肿瘤病灶氩氦刀冷冻消融术后,16个病灶有肿瘤残存,可见单一依赖氩氦刀冷冻消融术不能将全部肿瘤完全消除。

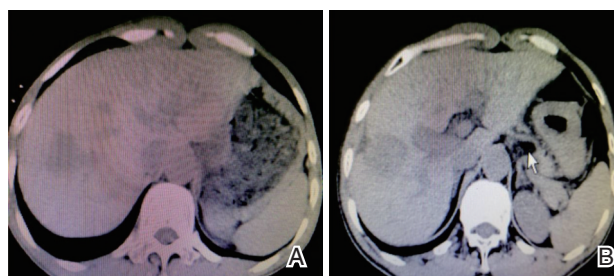


图1 治疗前后肝脏CT图像

Figure 1 CT image of liver before and after treatment

表3 两组血清T淋巴细胞亚群比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum T lymphocyte subsets between two groups ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	CD ³⁺ (%)	CD ⁴⁺ (%)	CD ⁴⁺ /CD ⁸⁺
术前	观察组	34	52.66±5.32	23.34±5.61	0.86±0.17
	对照组	34	53.21±4.88	24.47±7.32	0.88±0.16
	t值		0.444	0.714	0.499
	P值		0.658	0.478	0.619
术后3个月	观察组	34	64.48±10.23	34.09±8.21	1.27±0.24
	对照组	34	52.97±6.19	23.28±4.73	0.84±0.20
	t值		5.613	6.653	8.026
	P值		0.000	0.000	0.000

表4 两组CA242、CEA、CA199水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of CA242, CEA and CA199 levels between two groups ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	CA242 (IU/mL)	CEA (ng/mL)	CA199 (IU/mL)
术前	观察组	34	49.97±8.68	31.97±10.25	109.78±24.86
	对照组	34	48.36±7.14	33.25±8.57	112.49±30.07
	t值		0.835	0.559	0.405
	P值		0.407	0.578	0.689
术后3个月	观察组	34	21.15±3.36	5.02±1.15	40.95±10.26
	对照组	34	29.44±5.65	8.44±2.36	49.37±13.38
	t值		7.354	7.596	2.912
	P值		0.000	0.000	0.005

表5 两组miR-21、miR-106a表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the expression of microRNA-21 and microRNA-106 in two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-21		t值	P值	miR-106a		t值	P值
		术前	术后3个月			术前	术后3个月		
观察组	34	1.46±0.23	0.28±0.08	28.255	0.000	1.54±0.26	0.35±0.07	25.770	0.000
对照组	34	1.51±0.19	0.34±0.06	34.240	0.000	1.57±0.24	0.44±0.08	26.045	0.000
t值		0.977	3.499			0.494	4.937		
P值		0.332	0.001			0.623	0.000		

表6 两组 EORTC QLQ-C30 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)Table 6 Comparison of EORTC QLQ-C30 scores between the two groups ($\bar{x} \pm s$, score)

时间	组别	n	功能量表	整体生活质量量表	症状量表	单项测试项目
术前	观察组	34	36.88±5.91	6.80±0.32	21.12±4.91	20.06±2.01
	对照组	34	34.31±9.27	6.84±0.29	20.96±5.27	19.59±1.87
	t 值		1.363	0.540	0.130	0.998
	P 值		0.178	0.591	0.897	0.322
术后3个月	观察组	34	50.18±3.88	11.09±1.74	6.25±2.33	7.08±1.84
	对照组	34	44.36±6.35	9.25±0.76	8.99±1.75	10.83±1.59
	t 值		4.561	5.651	5.483	8.992
	P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

近年来研究发现,机体不能对癌细胞产生主动免疫或免疫作用较弱的原因在于缺少抗原递呈类分子,不能被T细胞识别,导致肿瘤组织在体内增殖、转移^[10]。而DC-CIK可激活T细胞因子,启动机体主动免疫,这为细胞免疫治疗癌症提供了理论基础。其中CIK来源于自体外周血单个核细胞,是类似于自然杀伤细胞的T细胞,能通过癌细胞细胞膜,裂解肿瘤细胞,且经过体外培养技术获得大幅度增长,杀伤癌细胞能力明显增强。但研究发现,单独应用CIK时常因癌细胞产生抵抗作用难以取得预期疗效^[11]。DC是机体一种功能最强大专职抗原递呈细胞,对T细胞活化及抵抗癌细胞免疫逃逸具有重要作用^[12]。国外相关资料指出,结直肠癌患者存在不同程度DC数量减少或功能缺陷^[13-15]。而体外试验表明,DC-CIK细胞能调节免疫状态,抑制肿瘤细胞生长^[16]。可见DC-CIK细胞可能有助于肿瘤治疗,故有学者对此进行探讨,如Zhang等^[17]指出,DC-CIK免疫治疗能延长晚期非小细胞肺癌患者总生存时间;Zhang等^[18]研究以DC-CIK细胞治疗肝癌,发现患者免疫功能增强,提示DC-CIK治疗非小细胞肺癌、肝癌有利于病情控制与改善。与Zhang L、Zhang J学者不同的是,本研究对象为结直肠癌肝转移患者,联合应用DC-CIK细胞免疫、CT引导下氩氦刀冷冻消融术两种方法,结果显示,观察组术后3个月缓解率(61.76%),高于对照组的缓解率(20.59%),且观察组CD³⁺(%)、CD⁴⁺(%)、CD⁴⁺/CD⁸⁺高于对照组($P < 0.05$),提示两种方法联合能提高结直肠癌患者的免疫功能,增强对肿瘤的杀灭作用,疗效显著。

CA242、CEA、CA199是常用血清肿瘤标志物^[19-21]。邱绪文等^[22]报道发现,CA242、CEA、CA199联合诊断结直肠癌准确性、敏感性可达

95.12%、81.69%,且Ⅲ~Ⅳ期结直肠癌明显高于Ⅰ~Ⅱ期患者。Huo等^[23]指出,血清CEA和CA125可反映患者预后。本研究结果显示观察组术后3个月CA242、CEA、CA199低于对照组($P < 0.05$),提示联合应用DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术能降低患者血清肿瘤标志物水平,从侧面印证了两种方法联合效果优于单一消融术。另观察组术后3个月功能量表、整体生活质量量表评分高于对照组,症状量表、单项测试项目评分低于对照组($P < 0.05$),提示DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术能提高患者生存质量。

miRNA是长度约为21~25 bp核苷酸非编码RNA分子,具有丰富结构、序列、丰度,因而表达方式多种多样,能通过抑制翻译、降解、切断调控靶基因。目前关于miRNA对原癌基因、抑癌基因影响尚处于探索阶段^[24-27]。Tusong等^[28]研究发现,与正常组织相比,miR-21、miR-106a在肾细胞癌中表达水平明显增加,提示两者可能与肾细胞癌发生有关,而不同癌细胞增殖、浸润受多种miRNA共同基因调控,故miR-21、miR-106a可能与其他类型肿瘤有关。Okugawa等^[29]指出,miR-21与结直肠癌患者肌肉减少症有关,而肌肉减少是无进展生存独立危险因素,说明miR-21与结直肠癌无进展生存时间有关。本研究对此进行探讨发现,观察组术后3个月miR-21、miR-106a表达量低于对照组($P < 0.05$),提示DC-CIK细胞免疫联合CT引导下氩氦刀冷冻消融术能抑制miR-21、miR-106a表达,这可能是两者发挥疗效作用机制之一,同时亦说明miR-21、miR-106a抑制剂可能有助于结直肠癌的治疗。但本研究资料有限,有待于后续深入探讨。同时以往学者指出,外周血miR-21、miR-106a

具有特异性循环表达特点,且稳定性良好,具有作为肿瘤标志物潜质^[30-32]。可见 miR-21、miR-106a 具有广阔前景与研究价值。值得注意的是,本研究 miR-21、miR-106a 的探讨基于结直肠癌,在其他恶性肿瘤中表达仍有待验证。

综上所述,对结直肠癌肝转移患者联合应用 DC-CIK 细胞免疫联合 CT 引导下氩氦刀冷冻消融术,能提高患者免疫功能,降低患者血清肿瘤标志物水平,增强对肿瘤的杀灭作用,提高患者生存质量,其机制可能与抑制促癌 miR-21、miR-106a 表达有关,miR-21、miR-106a 抑制剂可能为结直肠癌的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Mauri D, Zarkavelis G, Filis P, et al. Postoperative chemotherapy with single-agent fluoropyrimidines, after resection of colorectal cancer liver metastases: a meta-analysis of randomised trials [J]. *ESMO Open*, 2018, 3(4):e000343.
- [2] 孙雯雯, 窦金霞, 张琳, 等. 槐耳联合 DC-CIK 对荷结肠癌 HT29 干细胞瘤裸鼠的体内杀伤实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(1):168-173.
- [3] He W, Huang Z, Zhou S, et al. The effect of DC+CIK combined therapy on rat liver cancer model and its modulatory effect on immune functions [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(3):778-785.
- [4] Dwyer RH, Scheidt MJ, Marshall JS, et al. Safety and efficacy of synchronous robotic surgery for colorectal cancer with liver metastases [J]. *J Robot Surg*, 2018, 12(4):603-606.
- [5] 中华医学会外科学分会胃肠外科学组, 中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会, 等. 结直肠癌肝转移诊断和综合治疗指南(V2016) [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2016, 19(7):721-730.
- [6] 张百红, 岳红云. 实体瘤疗效评价标准简介 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2016, 43(11):845-847.
- [7] 庄炜钊, 黄晨, 姬智艳, 等. TACE 联合氩氦刀冷冻消融治疗中晚期肝癌的疗效分析 [J]. *医学影像学杂志*, 2016, 26(12):2247-2250.
- [8] 王猛, 潘元威, 周志刚, 等. CT 引导氩氦刀冷冻消融治疗侵及胸膜或胸壁恶性肿瘤的临床研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(5):395.
- [9] 梁淑贞, 牛立志, 穆峰. 氩氦刀冷冻消融术后 PET/CT 的标准化摄取值与肿瘤残存的相关性研究 [J]. *介入放射学杂志*, 2017, 26(9):811-814.
- [10] 李芳, 朱红卫, 张敬, 等. 同步放化疗对宫颈癌患者生存质量的影响因素分析 [J]. *中国医学装备*, 2017, 14(1):24-27.
- [11] 郭卫东. 探析 DC-CIK 联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床效果 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(5):335-336.
- [12] 靳燕宇, 王玉亮, 宋扬, 等. DC-GPC3 联合 CIK 对肝癌移植瘤的抑制作用 [J]. *天津医药*, 2017, 45(10):1021-1024.
- [13] Chen CL, Pan QZ, Weng DS, et al. Safety and activity of PD-1 blockade-activated DC-CIK cells in patients with advanced solid tumors [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(4):e1417721.
- [14] Zhang X, Du M, Zhang Q, et al. In vivo anti-tumor effect of DC-CIK cells on human lymphoma cell line Raji [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(3(Special)):1075-1079.
- [15] Mu Y, Zhou CH, Chen SF, et al. Effectiveness and safety of chemotherapy combined with cytokine-induced killer cell/dendritic cell-cytokine-induced killer cell therapy for treatment of gastric cancer in China: A systematic review and meta-analysis [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(9):1162-1177.
- [16] Ren PT, Yuan Z. Comparative investigation of the effects of specific antigen-sensitized DC-CIK and DC-CTL cells against B16 melanoma tumor cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):1533-1538.
- [17] Zhang L, Yang X, Sun Z, et al. Dendritic cell vaccine and cytokine-induced killer cell therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4):2605-2610.
- [18] Zhang J, Li H, Gao D, et al. A prognosis and impact factor analysis of DC-CIK cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma undergoing postoperative TACE [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(6):475-483.
- [19] 王科学. 血清 CEA、CA199、CA242 及 CA724 联合检测对结直肠癌诊断的临床价值 [J]. *中国医师杂志*, 2016, 18(3):422.
- [20] 王胜, 单绿虎, 束新华, 等. 血清胃蛋白酶原及 CA199、CA242、CEA 联合检测在胃癌早期诊断中的价值 [J]. *中华全科医学*, 2016, 14(4):646-648.
- [21] Murrell I, Wilkie GS, Davison AJ, et al. Genetic Stability of Bacterial Artificial Chromosome-Derived Human Cytomegalovirus during Culture In Vitro [J]. *J Virol*, 2016, 90(8):3929-3943.
- [22] 邱绪文, 王祖斌. 血清 CEA、CA199、CA724、CA242 与结直肠癌关系的临床研究 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2016, 19(4):326-327.

- [23] Huo YR, Huang Y, Zhao J, et al. Prognostic Value of Carcinoembryonic Antigen (CEA), AFP, CA19-9 and CA125 for Patients with Colorectal Cancer with Peritoneal Carcinomatosis Treated by Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Chemotherapy[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(3):1041-1049.
- [24] Sierzega M, Kaczor M, Kolodziejczyk P, et al. Evaluation of serum microRNA biomarkers for gastric cancer based on blood and tissue pools profiling: the importance of miR-21 and miR-331 [J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(2):266-273.
- [25] 郭楠, 李宝萍, 李慧萍, 等. 甲状腺结节组织和血浆 miRNAs 的差异表达及相关性分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(11):837-842.
- [26] Majd M, Hosseini A, Ghaedi K, et al. MiR-9-5p and miR-106a-5p dysregulated in CD4+T-cells of multiple sclerosis patients and targeted essential factors of T helper17/regulatory T-cells differentiation [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(3):277-283.
- [27] 陈晓华, 曹小龙, 黎秀月, 等. Hsa-miR-21 的生物学信息分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(2):104-108.
- [28] Tusong H, Maolakuerban N, Guan J, et al. Functional analysis of serum microRNAs miR-21 and miR-106a in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 18(1):1-7.
- [29] Okugawa Y, Yao L, Toiyama Y, et al. Prognostic impact of sarcopenia and its correlation with circulating miR-21 in colorectal cancer patients [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4):1555-1564.
- [30] 肖兴元, 王永强, 杨洁, 等. microRNAs 在结直肠癌患者粪便中的表达及其临床意义[J]. *贵州医药*, 2016, 40(5):478-479.
- [31] Zhao G, Jiang T, Liu Y, et al. Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer [J]. *Bmc Cancer*, 2018, 18(1):676.
- [32] Shirmohammadi K, Sohrabi S, Jafarzadeh Samani Z, et al. Evaluation of altered expression of miR-9 and miR-106a as an early diagnostic approach in gastric cancer[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2018, 9(1):46-51.

(上接第 275 页)

参考文献

- [1] 王生. 有关细菌耐药及耐药酶的检测分析[J]. *世界临床医学*, 2015, 9(6):121-122.
- [2] 车洁, 陈霞, 李娟, 等. 细菌耐药性检测技术方法及其应用[J]. *疾病监测*, 2017, 32(9):757-763.
- [3] 唐吉斌, 周东升, 沈志君, 等. 耐碳青霉烯类不动杆菌基因型检测及其耐药性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(5):337-341.
- [4] 陆士海, 姚慧琳, 刘培明, 等. 淮东北地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药机制[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(3):189-192.
- [5] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. twenty-third informational supplement, 2013, M100-S23.
- [6] 舒丽红, 丁显平. 基因芯片方法检测耐异烟肼结核分枝杆菌准确性的 Meta 分析[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(15):2121-2125.
- [7] 韩龙, 吕游, 姜可伟, 等. 基于医院外科病原菌谱的定制化快速病原菌及耐药基因检测芯片的建立及初步应用[J]. *中华普通外科杂志*, 2015, 30(12):983-986.
- [8] Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, et al. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 77(4):316-320.
- [9] Roschanski N, Fischer J, Guerra B, et al. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in enterobacteriaceae[J]. *Plos One*, 2014, 9(7):e100956.
- [10] 阮晔, 刘志民, 陈向芳. 应用基因芯片技术对 Graves 病免疫相关基因的研究[J]. *现代免疫学*, 2004, 24(4):321-327.
- [11] 毛红菊, 金根娣, 刘康栋, 等. 基因芯片在丙型肝炎病毒分型检测中的评价[J]. *现代免疫学*, 2005, 25(1):42-44.
- [12] Strauss C, Endimiani A, Perreten V. A novel universal DNA labeling and amplification system for rapid microarray-based detection of 117 antibiotic resistance genes in Gram-positive bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 108:25-30.
- [13] 雷向东. 一种细菌耐药性筛查 PCR 芯片, CN 104531877 A[P]. 2015.

· 论 著 ·

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

赵舒杨^{1*} 雷艳杰² 马世杰¹ 高明¹

[摘要] 目的 探讨龙葵碱联合 Krüppel 样转录因子 16 (*KLF16*) 基因对人胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制。方法 体外培养人胶质瘤 U87 细胞, 将特异性 *KLF16* siRNA 和阴性对照 siRNA Control 转染 U87 细胞, 分别命名为 si-*KLF16* 组和 si-NC 组, 应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测转染后细胞中 *KLF16* 的表达情况。使用不同浓度 (2.5、5、10、20、30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 的龙葵碱分别作用 si-NC 组和 si-*KLF16* 组细胞 48 h, 噻唑蓝 (MTT) 法测定细胞增殖抑制率并筛选半数抑制浓度 (IC_{50}), 以 IC_{50} 为龙葵碱后续实验浓度, 根据是否添加龙葵碱处理实验分为 4 组, si-NC 组、si-*KLF16* 组、si-NC+Sol 组、si-*KLF16*+Sol 组, 分别使用 MTT 和流式细胞仪测定各组细胞增殖和凋亡能力, Western blot 分析各组细胞中 Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况。结果 胶质瘤 U87 细胞转染后, si-*KLF16* 组细胞中 *KLF16* mRNA 和蛋白表达显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$)。筛选出浓度为 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的龙葵碱作为后续实验浓度。与 si-NC 组比, si-*KLF16* 组、si-NC+Sol 组和 si-*KLF16*+Sol 组细胞增殖能力均受到明显抑制 ($P<0.05$), 凋亡率升高 ($P<0.05$), Ki-67、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达下调 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达上调 ($P<0.05$)。与 si-*KLF16* 组和 si-NC+Sol 组比, si-*KLF16*+Sol 组细胞增殖抑制作用和凋亡促进作用更显著 ($P<0.05$)。结论 龙葵碱联合 *KLF16* 基因能够协同抑制胶质瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与调控 Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达有关。

[关键词] 龙葵碱; *KLF16* 基因; 胶质瘤 U87 细胞

Solanum nigrum combined with *KLF16* gene synergistically inhibit glioma cell proliferation and induce apoptosis

ZHAO Shuyang^{1*}, LEI Yanjie², MA Shijie¹, GAO Ming¹

(1. Department of Neurosurgery, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan, China, 466000;

2. Department of Pathology, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan, China, 466000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effects of solanine combined with Krüppel-like transcription factor 16 (*KLF16*) gene on proliferation and apoptosis of human glioma U87 cells. Methods Human glioma U87 cells were cultured *in vitro*, and specific *KLF16* siRNA and negative control siRNA Control were transfected into U87 cells, named si-*KLF16* group and si-NC group, respectively. The expression of *KLF16* in transfected cells was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot. The cells of si-NC group and si-*KLF16* group were treated with different concentrations (2.5, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) of solanine for 48 h. The inhibition rate of cell proliferation was determined by MTT assay and half of the cells were screened. Inhibitory concentration (IC_{50}), IC_{50} is the subsequent experimental concentration of Solanum. Divided into four groups according to whether or not to add the solanine treatment experiment, si-NC group, si-*KLF16* group, si-NC+Sol group, si-*KLF16*+Sol group. The proliferation and apoptosis of each

作者单位: 1. 周口市中心医院神经外科, 河南, 周口 466000

2. 周口市中心医院病理科, 河南, 周口 466000

*通信作者: 赵舒杨, E-mail: zhaoshuyang2012@126.com

group were determined by MTT and flow cytometry. The expressions of Ki-67, PCNA, Bax and Bcl-2 in each group were analyzed by Western blot. **Results** After transfection of glioma U87 cells, the expression of *KLF16* mRNA and protein in si-*KLF16* group was significantly lower than that in si-NC group ($P<0.05$). Solanine at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was selected as the subsequent experimental concentration. Compared with the si-NC group, the cell proliferation ability of the si-*KLF16* group, the si-NC+Sol group and the si-*KLF16*+Sol group were significantly inhibited ($P<0.05$), and the apoptotic rate was increased ($P<0.05$). Ki-67, PCNA and Bcl-2 protein expression was down-regulated ($P<0.05$), Bax protein expression was up-regulated ($P<0.05$). Compared with the si-*KLF16* group and the si-NC+Sol group, the cell proliferation inhibition and apoptosis promotion effects of the si-*KLF16*+Sol group were more significant ($P<0.05$). **Conclusion** Solanum nigrum combined with *KLF16* gene can synergistically inhibit glioma cell proliferation and induce apoptosis, which may be related to the regulation of Ki-67, PCNA, Bax and Bcl-2 protein expression.

[KEY WORDS] Solanum; *KLF16* gene; glioma U87 cells

胶质瘤是中枢神经系统中常见的恶性肿瘤,其中胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是恶性程度最高、最常见的亚型,5年生存率低于5%^[1]。目前,手术摘除、局部照射和常规化疗等治疗手段虽取得了一定的进展,但是胶质瘤患者的总体生存率仍无明显改善^[2]。放疗及化疗产生的严重副作用及并发症,严重影响患者预后,因此传统中药联合靶向基因治疗的方式越来越受到人们的关注。龙葵碱广泛存在于龙葵全草、马铃薯、番茄等茄科植物中,具有抗病毒、抗炎和抗肿瘤等作用^[3]。相关研究发现,龙葵碱可抑制肝癌、胰腺癌、乳腺癌等多种类型肿瘤细胞的生长^[4-6]。Krüppel样转录因子16(Krüppel-like transcription factor 16, *KLF16*)是Krüppel样转录因子家族成员之一,参与细胞周期和启动子依赖性方式的转录调节^[7]。*KLF16*在胰腺癌中通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡发挥肿瘤抑制作用^[8]。转录因子*KLF16*可通过细胞色素p450酶抑制子宫内膜生理和代谢^[9]。据报道,*KLF16*通过调节肝配蛋白受体A5(recombinant ephrin A5, EphA5)的表达影响视网膜神经节细胞中神经突向外生长^[10]。以上研究表明龙葵碱和*KLF16*在抑制肿瘤生长,诱导肿瘤细胞凋亡中,二者具有一致性。因此本实验探讨龙葵碱联合*KLF16*基因对胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响,并初步探讨其作用机制,以期为胶质瘤的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

龙葵碱(美国Sigma公司),质量分数>95%,用二甲基亚砜稀释至1 mg/mL,经0.22 μm 滤膜过滤

除菌,在-20℃条件下储存,使用时以DMEM培养基稀释到所用浓度。人胶质母细胞瘤U87细胞(中国科学院上海细胞库);DMEM培养基、胎牛血清(美国HyClone公司);胰蛋白酶、青链霉素(杭州四季青生物工程材料有限公司);二甲亚砜、MTT试剂(美国Sigma公司);转染试剂(美国赛默飞世尔公司);特异性*KLF16* siRNA和阴性对照 siRNA Control(广州市锐博生物科技有限公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(日本TaKaRa公司);Trizol试剂(碧云天生物技术研究所);逆转录试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix实时荧光定量PCR试剂盒(上海生工生物工程有限公司);兔抗人*KLF16*抗体、兔抗人Ki-67抗体、兔抗人PCNA抗体、兔抗人Bax抗体、兔抗人Bcl-2抗体及山羊抗兔IgG(美国Abcam公司)。

1.2 细胞培养

人胶质母细胞瘤U87细胞培养在含10%胎牛血清、含100 U/L青链霉素的DMEM培养基中,置入饱和湿度、体积分数为5% CO₂、37℃恒温培养箱中,根据细胞生长状态及时更换新鲜培养液,每隔1~2 d用胰蛋白酶传代1次。取对数增殖期的U87细胞用于实验。

1.3 特异性*KLF16* siRNA转染细胞

取对数生长期的U87细胞接种到6孔板中,接种密度为 5×10^5 个/孔,置于37℃培养箱继续培养,待细胞汇合密度达60%时,按照转染试剂说明说进行转染实验,其中转染特异性*KLF16* siRNA的U87细胞设置为si-*KLF16*组,转染阴性对照 siRNA Control的U87细胞设置为si-NC组,转染后各组U87细胞置37℃培养箱继续培养。

1.4 qRT-PCR 检测 U87 细胞中 *KLF16* mRNA 表达水平

转染 48 h 后分别收集 si-NC 组和 si-*KLF16* 组 U87 细胞,按照 Trizol 试剂说明书提取细胞中总 RNA,使用逆转录试剂盒合成 cDNA,以实时荧光定量 PCR 检测试剂盒进行扩增,*KLF16* 上游引物:5'-GTGTACCAAGCGGTTCCACC-3';下游引物:5'-CAGGTCGTCGCAGGAGTTC-3'。内参 GAPDH 上游引物:5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3';下游引物:5'-CCAAATCCGTTGACTC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各组细胞中 *KLF16* mRNA 相对表达水平。

1.5 Western blot 检测 U87 细胞中 *KLF16* 蛋白表达水平

转染 48 h 后,收集 si-NC 组和 si-*KLF16* 组 U87 细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,于冰上提取细胞中总蛋白,加入上样缓冲液,加热变性,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白后电转至 PVDF 膜上,将膜置 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,分别加入 *KLF16* 和 GAPDH 一抗(*KLF16* 一抗 1:800 稀释,GAPDH 一抗 1:1 000 稀释),4 ℃ 过夜杂交,再加入二抗(1:3 000 稀释),室温杂交 2 h。采用 ECL 法显色,在凝胶成像仪中拍照,采用 Image J 软件分析各条带灰度值,以 *KLF16* 条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示 *KLF16* 蛋白相对表达水平。

1.6 龙葵碱对 U87 细胞的毒性实验

对数生长期 si-NC 组和 si-*KLF16* 组 U87 细胞接种到 96 孔板中,调整细胞密度为 5×10^5 个/孔,分别向 si-NC 组和 si-*KLF16* 组 U87 细胞加入 0、2.5、5、10、20、30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的龙葵碱,每组 3 个复孔,分别孵育 48 h,向每孔细胞中加入 100 μL MTT 溶液,37 ℃ 常规培养箱中继续培养 4 h,除去旧培养液,再加入 150 μL 二甲基亚砜,混匀后,室温振荡反应 10 min,待紫色结晶完全溶解,在全自动酶标仪上测定 450 nm 波长处光密度值(optical density, OD 值),计算细胞增殖抑制率,增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。选取增殖抑制率接近 50% 的龙葵碱浓度即半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为实验加药标准浓度,并将 U87 细胞设成 4 组:si-NC 组、si-*KLF16* 组、si-NC+Sol 组和 si-*KLF16*+Sol 组。

1.7 噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)法检测细胞增殖能力

将对数生长期的 si-NC 组和 si-*KLF16* 组 U87 细胞接种到 6 孔板中,调整细胞密度为 5×10^5 个/孔,37 ℃ 培养箱过夜培养,待细胞覆盖率达 60% 时,分别向 si-NC+Sol 组和 si-*KLF16*+Sol 组 U87 细胞中加入标准浓度(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的龙葵碱,37 ℃ 培养箱处理 48 h,向各组 U87 细胞中加入 MTT 溶液 100 μL ,继续孵育 4 h,再加入 150 μL 二甲基亚砜,振荡反应 10 min,酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值,计算各组细胞增殖率,增殖率=实验组 OD 值/对照组 OD 值×100%。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

si-NC 组、si-*KLF16* 组、si-NC+Sol 组和 si-*KLF16*+Sol 组 U87 细胞按照 1.7 处理 48 h,收集各组细胞,PBS 洗涤细胞 3 次,用 1×Binding Buffer 结合缓冲液重悬细胞,向细胞悬液中分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL ,混匀后室温避光反应 20 min,立即上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.9 Western blot 检测各组 U87 细胞中增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)、Ki-67、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 Associated X Protein, Bax)和 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白表达水平。

si-NC 组、si-*KLF16* 组、si-NC+Sol 组和 si-*KLF16*+Sol 组 U87 细胞按照 1.7 处理 48 h,收集并提取细胞中总蛋白,检测各组细胞中 Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平,方法同 1.5。

1.10 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组数据间比较采用 *t* 检测分析,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两组间差异比较采用 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 *KLF16* 基因转染效果检测

分别将特异性 *KLF16* siRNA 和阴性对照 siRNA Control 转染胶质瘤 U87 细胞,48 h 后 qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,si-*KLF16* 组 U87 细胞中 *KLF16* mRNA 和蛋白表达水平显著低于 si-NC 组($t_1=12.277, t_2=14.742, P < 0.05$),见图 1 和表 1。

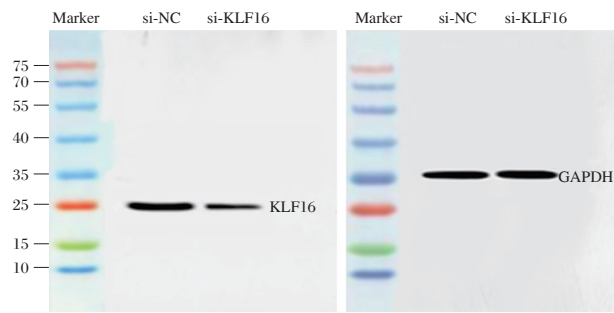


图1 Western blot 检测 si-NC 组和 si-KLF16 组 U87 细胞中 KLF16 蛋白表达情况

Figure 1 Western blot analysis of KLF16 protein expression in si-NC group and si-KLF16 group U87 cells

表1 转染后对 U87 细胞中 KLF16 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of KLF16 expression on U87 cells after transfection ($\bar{x} \pm s$)

组别	KLF16 mRNA	KLF16 蛋白
si-NC	1.00±0.10	0.33±0.03
si-KLF16	0.26±0.03 ^a	0.07±0.01 ^a

与 si-NC 组比, ^a $P < 0.05$ 。

2.2 龙葵碱对胶质瘤 U87 细胞的细胞毒性作用

本实验选择不同浓度(2.5、5、10、20、30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的龙葵碱作用于 si-NC 组和 si-KLF16 组 U87 细胞 48 h, MTT 法测定细胞增殖抑制率, 结果显示(见表 2), 龙葵碱呈浓度依赖性的抑制 si-NC 组和 si-KLF16 组 U87 细胞增殖 ($P < 0.05$), 且浓度为 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的龙葵碱作用于 si-NC 组和 si-KLF16 组 48 h 时细胞增殖抑制率分别为 (48.84±4.88)% 和 (51.34±5.13)%, 增殖抑制率均在 50% 左右, 因此选取 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的龙葵碱作为后续实验加药浓度。

表2 不同浓度的龙葵碱作用于胶质瘤细胞 48 h 后细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Inhibition rate of cell proliferation after different concentrations of solanine applied to glioma cells for 48 h ($\bar{x} \pm s$)

龙葵碱浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	增殖抑制率 (%)	
	si-NC 组	si-KLF16 组
0	0.00	0.00
2.5	0.68±0.45	0.72±0.61
5	14.72±1.47 ^a	15.79±1.59 ^a
10	32.18±3.22 ^a	35.05±3.50 ^a
20	48.84±4.88 ^a	51.34±5.13 ^a
30	78.34±7.84 ^a	81.36±8.14 ^a
F 值	172.082	169.595
P 值	<0.001	<0.001

与 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 龙葵碱组比, ^a $P < 0.05$ 。

2.3 各处理组对胶质瘤 U87 细胞增殖的影响

MTT 实验分析结果显示, 与 si-NC 组相比, si-KLF16 组、si-NC+Sol 组和 si-KLF16+Sol 组 U87 细胞增殖率明显降低 ($P < 0.05$), 与 si-KLF16 组和 si-NC+Sol 组相比, si-KLF16+Sol 组 U87 细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 各处理组对胶质瘤 U87 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, 与 si-NC 组相比, si-KLF16 组、si-NC+Sol 组和 si-KLF16+Sol 组 U87 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 与 si-KLF16 组和 si-NC+Sol 组相比, si-KLF16+Sol 组 U87 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 4。

2.5 各组 U87 细胞中 Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况

Western blot 检测各组胶质瘤 U87 细胞中

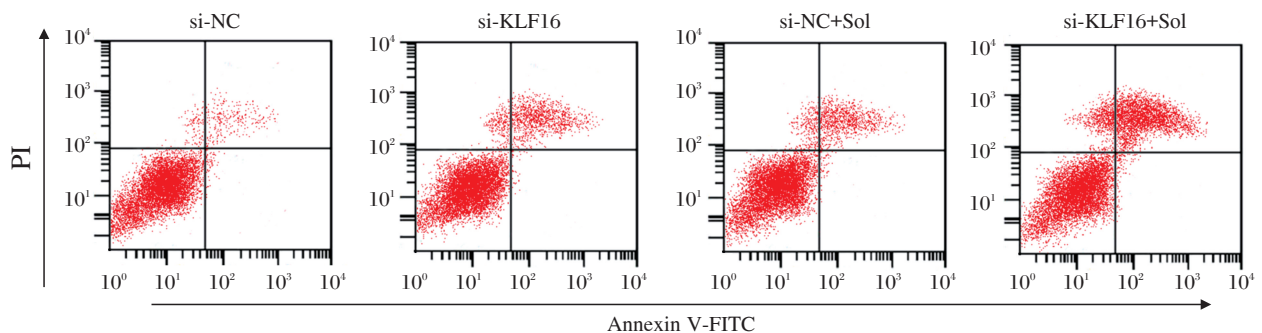


图2 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

Figure 2 Flow cytometry to detect apoptosis

表3 各处理组 U87 细胞增殖能力 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 U87 cell proliferation ability of each treatment group ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖率 (%)
si-NC	100
si-KLF16	48.58±2.19 ^a
si-NC+Sol	51.09±2.21 ^a
si-KLF16+Sol	86.79±4.24 ^{abc}
F 值	287.496
P 值	<0.001

与 si-NC 组比, ^a*P*<0.05; 与 si-KLF16 组比, ^b*P*<0.05; 与 si-NC+Sol 组比, ^c*P*<0.05。

表4 各处理组 U87 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of Apoptosis Rates of U87 Cells in Each Treatment Group ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率 (%)
si-NC	1.97±0.55
si-KLF16	26.66±4.29 ^a
si-NC+Sol	19.24±4.36 ^a
si-KLF16+Sol	58.79±5.68 ^{abc}
F 值	97.001
P 值	<0.001

与 si-NC 组比, ^a*P*<0.05; 与 si-KLF16 组比, ^b*P*<0.05; 与 si-NC+Sol 组比, ^c*P*<0.05。

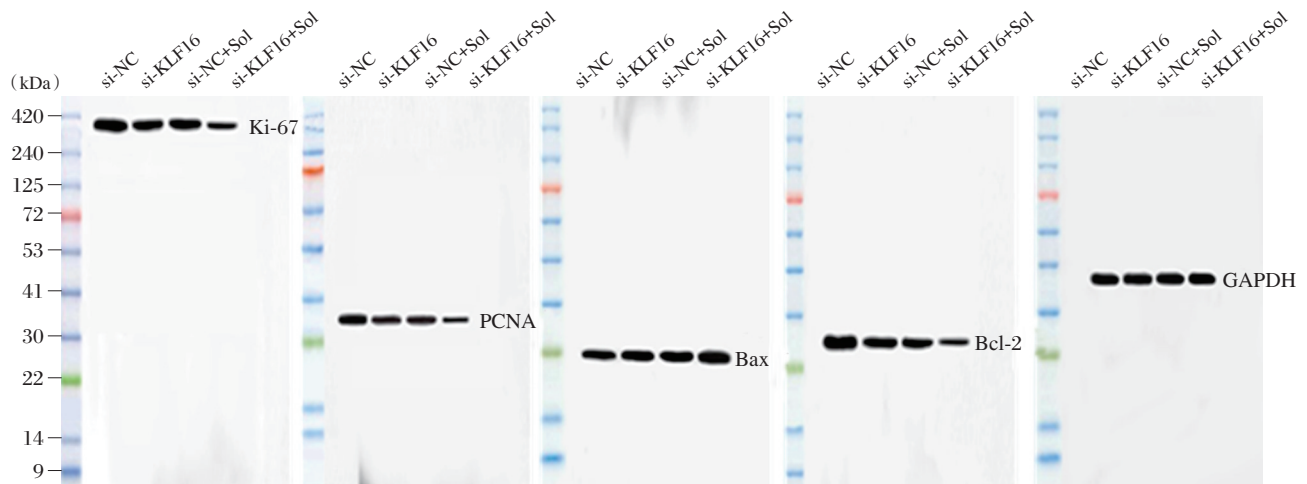


图3 Western blot 检测各组 U87 细胞中 Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白水平

Figure 3 Western blot analysis of Ki-67, PCNA, Bax and Bcl-2 protein levels in U87 cells

表5 各组 U87 细胞中 Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of Ki-67, PCNA, Bax and Bcl-2 protein expression levels in U87 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ki-67	PCNA	Bax	Bcl-2
si-NC	0.83±0.10	0.78±0.08	0.47±0.05	0.85±0.08
si-KLF16	0.58±0.06 ^a	0.49±0.05 ^a	0.86±0.09 ^a	0.53±0.05 ^a
si-NC+Sol	0.60±0.06 ^a	0.49±0.05 ^a	0.81±0.08 ^a	0.57±0.06 ^a
si-KLF16+Sol	0.31±0.03 ^{abc}	0.24±0.03 ^{abc}	1.21±0.11 ^{abc}	0.20±0.03 ^{abc}
F 值	30.011	47.545	37.811	63.485
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 si-NC 组比, ^a*P*<0.05; 与 si-KLF16 组比, ^b*P*<0.05; 与 si-NC+Sol 组比, ^c*P*<0.05。

Ki-67、PCNA、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况,结果显示,与 si-NC 组相比,si-KLF16 组、si-NC+Sol 组和 si-KLF16+Sol 组 U87 细胞中 Ki-67、PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达下调 (*P*<0.05), Bax 蛋白表达上调 (*P*<0.05); 与 si-KLF16 组和 si-NC+Sol 组相比, si-KLF16+Sol 组 U87 细胞中 Ki-67、PCNA 和 Bcl-2 蛋

白表达下调 (*P*<0.05), Bax 蛋白表达上调 (*P*<0.05)。见图 3 和表 5。

3 讨论

胶质瘤具有发病率高、复发率高、死亡率高、治愈率低的特点,是目前成人中最常见的原发性

脑肿瘤^[11]。传统的治疗策略通常将肿瘤切除与放疗和化疗相结合,但治疗效果往往不能令人满意^[12]。与此同时,放疗及化疗产生的多种毒副作用在很大程度上限制了胶质瘤的疗效。因此,探索更高效更合理的联合治疗手段对胶质瘤的治疗具有非常重要的意义。目前备受青睐的分子靶向治疗和中药联合使用具有良好的应用前景^[13]。*KLF16*在肺腺癌中发挥抑制基因的作用,其表达量的高低与患者生存率密切相关^[8]。本实验将特异性*KLF16* siRNA转染人胶质瘤U87细胞中,qRT-PCR和Western blot检测结果显示转染*KLF16* siRNA后U87细胞中*KLF16* mRNA和蛋白表达水平均明显降低,表明转染*KLF16* siRNA能够有效沉默U87细胞中*KLF16*。MTT实验和流式细胞仪检测结果显示,沉默*KLF16*基因后U87细胞增殖明显受到抑制,细胞凋亡增加。这与近期Chen等^[14]人的报道一致,该报道指出*KLF16*可通过靶向线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A,TFAM)抑制人脑胶质瘤细胞增殖和致肿瘤。另有研究表明,*KLF16*可抑制胰腺癌细胞生长和转化,阻滞细胞周期于S期,诱导细胞凋亡^[14]。Ma等^[16]人研究显示,*KLF16*通过调节p21和CDK4促进胃癌细胞的增殖。提示*KLF16*作为一种肿瘤细胞调控因子,参与肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡、侵袭和迁移等生物学过程。

相关研究显示,龙葵碱不仅具有抗炎作用还具有抗肿瘤活性^[17-18]。近期郭玲等人^[19]研究指出,龙葵碱能够呈浓度依赖性的抑制人胶质瘤U251细胞增殖、侵袭和迁移,并诱导细胞凋亡。本研究通过预实验结合郭玲等人的研究探索出龙葵碱对胶质瘤U87细胞的有效作用浓度,并将龙葵碱浓度分别配置成2.5、5、10、20、30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 作用于沉默*KLF16*或阴性对照组U87细胞,MTT实验检测龙葵碱对U87细胞毒性作用,并筛选出浓度为20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 龙葵碱为后续实验加药浓度。并且MTT实验和流式细胞仪检测结果发现,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的龙葵碱能够抑制U87细胞增殖,诱导细胞凋亡。为进一步探究二者联合使用的协同作用效果,本实验将沉默*KLF16*和20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的龙葵碱联合作用U87细胞,结果发现,二者联合作用对U87细胞增殖抑制及凋亡诱导作用更强。本实验通过Western blot检测各处理组U87细胞中Ki-67、PCNA、Bax和Bcl-2蛋白水平,结果发现龙葵碱或

沉默*KLF16*均可下调U87细胞中Ki-67、PCNA和Bcl-2蛋白表达,上调Bax蛋白表达,且龙葵碱联合沉默*KLF16*作用更强。增殖细胞核抗原Ki-67和PCNA是细胞处于增殖状态的标志物,已广泛在肿瘤细胞中应用^[20-21]。Bcl-2基因是细胞凋亡研究最多基因之一,其具有抑制细胞凋亡的功能。Bax是Bcl-2基因家族中促进细胞凋亡的基因,其过度表达能够拮抗Bcl-2的保护作用使细胞趋于凋亡^[22]。本实验结果提示龙葵碱联合*KLF16*基因对胶质瘤细胞增殖抑制和凋亡诱导作用机制可能与下调Ki-67、PCNA和Bcl-2蛋白表达,上调Bax蛋白表达有关。

综上,龙葵碱联合沉默*KLF16*基因对胶质瘤U87细胞有增殖抑制和凋亡促进作用,并且联合作用比单独使用龙葵碱或沉默*KLF16*基因效果更明显。本实验结果提示,中药和靶向基因治疗联合使用在治疗胶质瘤中有可能发挥较好作用,但其适用性和治疗效果尚待深入探究。

参考文献

- [1] Zhang G, Huang S, Zhang J, et al. Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: a clinical study in Chinese patients [J]. J Neurooncol, 2016, 127(2):355-362.
- [2] Qin L, Li A, Qu J, et al. Normalization of ADC does not improve correlation with overall survival in patients with high-grade glioma (HGG) [J]. J Neuro Oncol, 2018, 137(2):313-319.
- [3] 归小龙. 龙葵碱抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 36(10):1075-1077.
- [4] Meng XQ, Zhang W, Zhang F, et al. Solanine-induced reactive oxygen species inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Oncol Lett, 2016, 11(3):2145-2151.
- [5] 周怡, 李影, 孔鸿儒, 等. 龙葵碱对胰腺癌细胞裸鼠移植瘤的抑制作用及机制研究 [J]. 肝胆胰外科杂志, 2016, 28(3):209-212.
- [6] Mohsenkia M, Alizadeh AM, Khodayari H, et al. Therapeutic effects of dendrosomal solanine on a metastatic breast tumor [J]. Life Sci, 2016, 148:260-267.
- [7] Daftary GS, Lomberk GA, Buttar NS, et al. Detailed structural-functional analysis of the krüppel-like factor 16 (KLF16) transcription factor reveals novel mechanisms for silencing Sp/KLF sites involved in metabolism and endocrinology [J]. J Biol Chem, 2011, 287(10):7010-7125.

- [8] 黄志宏, 骆文志, 蔡兴东. KLF16在肺腺癌中表达的临床意义及机制[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(11):1978-1983.
- [9] Gada RP, Tabbaa ZM, Lomberk GA, et al. Uterine transcription factor KLF16 regulates endometrial physiology and metabolism via cytochrome p450 enzyme inhibition[J]. Fertil Steril, 2011, 96(3):S145-S145.
- [10] Wang J, Galvao J, Beach K M, et al. Novel roles and mechanism for krüppel-like factor 16 (KLF16) regulation of neurite outgrowth and ephrin receptor A5 (EphA5) expression in retinal ganglion cells[J]. J Biol Chem, 2016, 291(41):21422.
- [11] Sun Q, Xu R, Xu H, et al. Extracranial metastases of high - grade glioma: the clinical characteristics and mechanism. [J]. World J Surg Oncol, 2017, 15(1): 181-186.
- [12] Auffinger B, Spencer D, Pytel P, et al. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence [J]. Expert Rev Neurother, 2016, 15(7):741-752.
- [13] Uhm JH, Porter AB. Treatment of glioma in the 21st century: an exciting decade of postsurgical treatment advances in the molecular era [J]. Mayo Clin Proc, 2017, 92(6):995-1004.
- [14] Chen X, Li S, Ke Y, et al. KLF16 suppresses human glioma cell proliferation and tumorigenicity by targeting TFAM[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 29:1-8.
- [15] Fernandezzapico ME, Lomberk GA, Tsuji S, et al. A functional family - wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS - Mediated cell growth[J]. Biochem J, 2011, 435(2):529-537.
- [16] Ma P, Sun CQ, Wang YF, et al. KLF16 promotes proliferation in gastric cancer cells via regulating p21 and CDK4[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(6):3027-3036.
- [17] Yi YJ, Jia XH, Wang JY, et al. Solanine induced apoptosis and increased chemosensitivity to adriamycin in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Oncol Lett, 2018, 15(5):7383-7388.
- [18] Wang L, Sun QQ, Zhang SJ, et al. Inhibitory effect of α - solanine on esophageal carcinoma in vitro [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3):1525-1530.
- [19] 郭玲, 盛华均, 刘茜, 等. 龙葵碱对 U251 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中草药, 2017, 48(10):2081-2086.
- [20] Lopes JM, Hannisdal E, Bjerkehagen B, et al. Synovial sarcoma. evaluation of prognosis with emphasis on the study of DNA ploidy and proliferation (PCNA and Ki-67) markers[J]. Anal Cell Pathol, 2016, 16(1):45-62.
- [21] 张新华, 王庆亮, 赵坤. miR-214 对人舌鳞状细胞癌增殖能力影响的体外实验研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2014, 20(4):268-271.
- [22] Renault TT, Dejean LM, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl - xL and Bcl - 2 [J]. Mech Ageing Dev, 2017, 161(Pt B): 201-210.

(上接第 282 页)

- [13] 马海涛, 王辉. 黄芪甲苷对过氧化氢诱导损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(2):248-251.
- [14] You L, Fang Z, Shen G, et al. Astragaloside IV prevents high glucose-induced cell apoptosis and inflammatory reactions through inhibition of the JNK pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. Molecular medicine reports, 2019, 19(3):1603-1612.
- [15] 李兆欣, 刘江月, 王其新. Aliskiren 抑制 LPS 诱导 HUVECs 新生血管的形成及可能机制[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(4):602-609.
- [16] Wan C X, Xu M, Huang S H, et al. Baicalein protects against endothelial cell injury by inhibiting the TLR4/ NF - κ B signaling pathway [J]. Molecular medicine reports, 2018, 17(2):3085-3091.
- [17] 李如月, 向晓辉, 张斌, 等. TLR4 信号通路相关 miRNAs 在炎症反应调节中的研究进展[J]. 天津医药, 2017, 45(7):771-776.
- [18] Tian D, Sha Y, Lu J M, et al. MiR-370 inhibits vascular inflammation and oxidative stress triggered by oxidized low - density lipoprotein through targeting TLR4 [J]. Journal of cellular biochemistry, 2018, 119(7): 6231-6237.
- [19] 蔡谦谦, 周红, 张贵婷, 等. oxLDL/ β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物促进脐静脉内皮细胞迁移及炎症因子表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(7):865-869.
- [20] Ma L, Yang Y, Sun X, et al. Propofol regulates the expression of TLR4 through miR21 in human umbilical vein endothelial cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(6):9074-9080.

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 陈莹

[摘要] 目的 探讨直肠癌患者外周血中 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达及临床意义。方法 选取直肠癌患者 92 例、直肠腺瘤患者 31 例以及健康对照组 37 例为研究对象,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测受试人员外周血中 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达,分析不同临床特征患者 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达差异,探讨 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达与患者预后的关系。结果 直肠癌患者外周血 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 表达阳性率分别为 63.0% 和 53.3%,显著高于直肠腺瘤组和健康对照组 ($P < 0.05$),且 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达与肿瘤分期、组织分化以及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 阳性患者的 5 年生存率显著低于阴性患者 ($P < 0.05$)。结论 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 的表达与结肠癌的发生和发展密切相关,检测两种指标水平有助于对直肠癌患者预后评价。

[关键词] 半乳糖血凝素-3; 黏蛋白 1; 直肠癌

Expression and clinical significances of *Galectin-3* mRNA, *MUC1* mRNA in peripheral blood of patients with rectal cancer

ZHAO Mei, ZHANG Zhihong*, GUO Zhongyan, CHEN Ying

(Department of Clinical Laboratory, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou, Shandong, China, 277500)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and significance of *Galectin-3* mRNA, *MUC1* mRNA in peripheral blood of patients with rectal cancer. Methods 92 patients with rectal cancer, 31 patients with rectal adenoma and 37 healthy persons were enrolled in this study. Expression of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA in peripheral blood was analyzed by RT-PCR. The expressions of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA in patients with different clinical characteristics were analyzed. The relationship between the expression of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA and the prognosis of patients was investigated. Results The positive expression rates of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA were 63.0% and 53.3%, respectively in rectal cancer patients, which were significantly higher than those in rectal adenoma patients and healthy persons ($P < 0.05$). The positive expression of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA was significantly correlated with tumor stage, tissue differentiation and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The 5 year survival rate of patients with positive expression of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA was significantly lower than those with negative expression ($P < 0.05$). Conclusion The expression of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA is correlated with progression and metastasis of rectal cancer. Clinical examination of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* is helpful for the evaluation of prognosis in patients with rectal cancer.

[KEY WORDS] *Galectin-3*; *Mucin1*; Rectal cancer

作者单位:滕州市中心人民医院检验科,山东,滕州 277500

*通信作者:张志宏, E-mail: zzhmmok@126.com

直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,其发病率仅次于胃癌。目前我国直肠癌的发病率和死亡率逐年上升,且呈年轻化趋势。手术治疗和放化疗是直肠癌治疗的主要方法,但其临床效果欠佳,且治疗后5年生存率低于50%^[1-2]。直肠癌的临床症状和体征较少,早期诊断和治疗困难,导致多数直肠癌患者就诊时已是中晚期,失去最佳治疗时机^[3]。目前临床上多根据直肠癌TNM分期进行预后判断,然而实践证明,相同分期患者预后不尽相同,因此寻找有效的直肠癌预后评估指标具有重要意义。国内外研究发现,*Galectin-3*、*MUC1*与肺癌、卵巢癌、肝癌等恶性肿瘤的发生和发展有关,但两者与直肠癌关系的报道较少^[4-5]。本研究对直肠癌患者血清中*Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA的表达进行检测,分析不同临床特征患者血清*Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA的表达差异,并结合5年随访资料探讨其表达与直肠癌患者预后的关系,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2011年1月至2014年1月本院的123例直肠疾病患者的临床资料,其中直肠癌患者92例(直肠癌组),男51例,女41例;年龄28~81岁,平均(58.7±11.3)岁;TNM分期I期12例,II期23例,III期37例,IV期20例;高分化11例,中分化47例,低分化34例;淋巴结转移45例。纳入标准:(1)入选患者均经肠镜病理学活检确诊;(2)新发现肿瘤患者,尚未接受任何手术、放疗、化疗等抗肿瘤治疗;(3)积极配合治疗,依从性好。排除标准:(1)既往肿瘤性疾病患者;(2)心肝肾等脏器功能异常者;(3)合并感染、免疫系统疾病患者;

(4)已接受放化疗或其他干预治疗者;(5)中途转院及随访失联者。选取同期直肠腺瘤患者31例(直肠腺瘤组),男17例,女14例;年龄31~80岁,平均(59.1±12.7)岁。另选取37例健康志愿者为健康对照组,男20例,女17例;年龄29~81岁,平均(60.7±11.8)岁。各组性别、年龄等资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院伦理委员会审批,研究对象均知情同意。

1.2 标本采集

取3组受试人员外周血4 mL置于洁净EDTA抗凝管中,3 000 r/min离心10 min后弃去上层血浆,再加入红细胞裂解液静置15 min,3 000 r/min离心10 min弃上清,保留沉淀检测*Galectin-3* mRNA及*MUC1* mRNA。本研究所有操作均由专人严格按照操作说明书进行。

1.3 检测方法

1.3.1 仪器与试剂

TRIzol试剂(Invitrogen公司),miScript SYBR Green PCR试剂盒(Promega公司),逆转录试剂盒(上海生工生物工程公司),Taq酶(上海生工生物工程公司),低速离心机(Beckman公司),PCR仪(PE公司),电泳及成像系统(UVP公司)。引物根据GenBank中*Galectin-3*和*MUC1*基因序列,由上海生工生物工程公司合成,见表1。

1.3.2 总RNA提取

采用TRIzol进行总RNA提取,在260 nm和280 nm下检测RNA溶液吸光值,选择纯度较高样品进行后续试验。

1.3.3 逆转录和RT-PCR反应

应用逆转录试剂盒合成cDNA,反应体系共20 μ L,产物置于-20℃保存备用。应用miScript SYBR Green PCR Kit三步法进行RT-PCR,体系共

表1 引物序列

Table1 Oligonucleotide sequences of primers

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
<i>Galectin-3</i>	上游引物:5'-GCCACTGATTGTGCCTTAT-3'	233
	下游引物:5'-AAACCGACTGTCTTTCTTCC-3'	
<i>MUC1</i>	上游引物:5'-AATGAATGGCTCAAACTTGG-3'	213
	下游引物:5'-CAGTAGGTTCTCACTCGCTCAG-3'	
β -actin	上游引物:5'-TCGTCCTCATACTGCTCA-3'	268
	下游引物:5'-GAAACTACCTTCAACTCC-3'	

20 μL , 包括 cDNA 5 μL , 每种引物 0.5 μL , 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , ddH₂O 4 μL 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 循环 45 次。结束后采用 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色。将标准品与样品同时进行 RT-PCR 检测, 绘制标准曲线, 计算样本中 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 含量, 根据本院既往研究结果以 mRNA $>10^3$ 拷贝/mL 为阳性。所有标本均重复实验 3 次, 以 β -actin 作为内参, 阴性对照不加模板。

1.4 治疗方法

直肠癌患者接受直肠癌根治术治疗, 术后 3 周内接受 mFOLOFOX6 方案药物化疗: 奥沙利铂 85 mg/m², 亚叶酸钙 200 mg/m², 2 h 内静脉滴注完成; 首日氟尿嘧啶 400 mg/m² 静脉推注, 第 2 天及 3 d 氟尿嘧啶 1 200 mg/m² 静脉推注, 每 2 周为 1 个疗程, 共完成 6 个疗程化疗。化疗结束后每 3 个月以电话或门诊方式进行随访, 统计患者 5 年生存情况。

1.5 统计学方法

运用 SPSS 19.0 软件分析, 计数资料以率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 采用 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 表达情况

直肠癌组患者外周血中 *Galectin-3* mRNA 表达阳性率为 63.0% (58/92), 明显高于健康对照组

10.8% (4/37) 和直肠腺瘤组 25.8% (8/31), 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。直肠癌组患者外周血 *MUC1* mRNA 阳性率为 53.3% (49/92), 明显高于健康对照组 5.4% (2/37) 和直肠腺瘤组 19.4% (6/31), 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 2。

表 2 3 组患者外周血 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 表达情况 [n(%)]

Table 2 Expressions of *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA in 3 groups [n(%)]

组别	n	<i>Galectin-3</i> mRNA 阳性率	<i>MUC1</i> mRNA 阳性率
健康对照组	37	4(10.8)	2(5.4)
直肠腺瘤组	31	8(25.8)	6(19.4)
直肠癌组	92	58(63.0)	49(53.3)
χ^2 值		34.284	30.789
P 值		0.000	0.000

2.2 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性率与直肠癌病理特征的关系

92 例直肠癌患者中, I + II 期患者 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性率为 51.4% 和 37.1%, III + IV 期阳性率为 70.2% 和 63.2%, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。高、中分化组 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性率为 55.2% 和 43.1%, 低分化组为 76.5% 和 70.6%, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。无淋巴结转移患者 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性率为 46.8% 和 36.2%, 明显低于淋巴结转移患者 80.0% 和 71.1%, 差异均具有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 3。

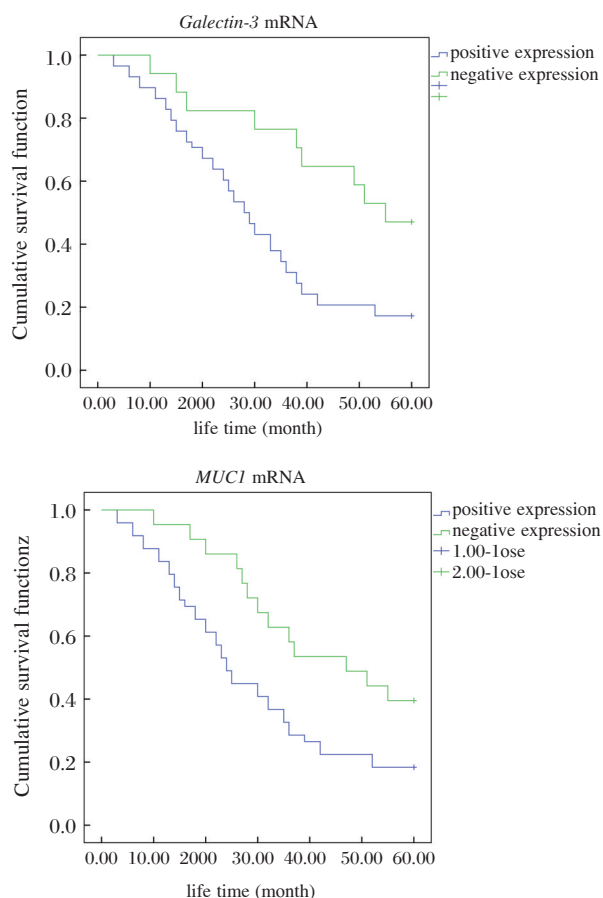
表 3 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性率与直肠癌病理特征的关系

Table 3 The relationship between expression of *Galectin-3* mRNA, *MUC1* mRNA and rectal cancer pathological features

临床病理指标	n	<i>Galectin-3</i> mRNA [n(%)]	χ^2 值	P 值	<i>MUC1</i> mRNA [n(%)]	χ^2 值	P 值	
性别	男	51	34(66.7)	0.645	0.516	28(54.9)	0.124	0.834
	女	41	24(58.5)			21(51.2)		
年龄(岁)	< 55	29	20(69.0)	0.637	0.491	16(55.2)	0.062	0.826
	≥ 55	63	38(60.3)			33(52.4)		
TNM 分期	I、II 期	35	17(51.4)	5.078	0.028	13(37.1)	5.895	0.019
	III、IV 期	57	41(70.2)			36(63.2)		
组织分化	高、中	58	32(55.2)	4.173	0.047	25(43.1)	6.505	0.017
	低分化	34	26(76.5)			24(70.6)		
淋巴结转移	无	47	22(46.8)	10.870	0.001	17(36.2)	11.275	0.000
	有	45	36(80.0)			32(71.1)		

2.3 直肠癌患者生存分析

Kaplan-Meier 曲线分析显示, *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性患者 5 年生存率均明显低于阴性表达患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。



A: *Galectin-3* mRNA 阳性组和阴性组 Kaplan-Meier 生存曲线 ($\chi^2 = 6.196, P = 0.013$); B: *MUC1* mRNA 阳性组和阴性组 Kaplan-Meier 生存曲线 ($\chi^2 = 6.881, P = 0.009$)。

图1 直肠癌患者 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 表达与 5 年生存期的关系

Figure 1 Relationship between *Galectin-3* mRNA, *MUC1* mRNA and 5-year survival in patients with rectal cancer

2.4 直肠癌患者血清 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 表达的相关性

Spearman 分析显示, 直肠癌患者血清 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 的表达存在显著相关性 ($P < 0.05$), 见表 4。

3 讨论

直肠癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 其发病

表 4 直肠癌患者血清 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 表达的相关性

Table 4 Correlation of serum *Galectin-3* mRNA and *MUC1* mRNA expression in patients with rectal cancer

<i>Galectin-3</i> mRNA	<i>MUC1</i> mRNA			r 值	P 值
	阳性	阴性	合计		
阳性	36	22	58	0.231	0.027
阴性	13	21	34		
合计	49	43	92		

率和死亡率较高, 我国直肠癌发病率约占全球的 1/3。以手术治疗为中心的综合疗法是直肠癌的主要治疗模式, 不同分期的直肠癌患者所采取的治疗方案也不完全相同, 因此, 准确的临床诊断和分期对治疗方案的拟定至关重要^[6]。目前直肠癌的临床诊断和分期主要以 MRI (Magnetic Resonance Imaging) 和肠镜超声为主, 其操作较为复杂, 而血清生物指标检测在直肠癌辅助诊断、病情评估方面也具有重要作用, 逐渐成为目前医学研究的热门课题^[7-8]。

Galectin-3 为 β 半乳糖凝集素家族成员, 存在于细胞质和细胞核内, 通过与胞内糖蛋白、细胞表面因子及胞外基质蛋白的相互作用, 减少肿瘤细胞的黏附, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 从而参与到肿瘤的发生、发展的全过程^[9-10]。研究发现, *Galectin-3* 可与 T 细胞表面 CD29/CD7 结合, 诱导 T 细胞凋亡, 阻止 T 细胞抗 Fas 抗体引起的凋亡, 从而利于肿瘤细胞的免疫逃逸^[11]。*MUC1* 为 I 型跨膜糖蛋白, 能介导细胞间信号转导、调节机体免疫等, 主要存在于多种组织器官的上皮细胞, 呈顶端表达、极性分布。*MUC1* 可与细胞核内 Kruppel 样因子 4 结合, 抑制 p53 的转录功能, 进而影响 p53 对损伤 DNA 的修复作用, 导致了肿瘤的发生^[12-13]。另有研究显示, *MUC1* 能够激活肿瘤坏死因子等受体因子, 抑制肿瘤细胞的凋亡^[14]。目前国内外研究对 *Galectin-3*、*MUC1* 作为肿瘤特异性标志物已基本认可, 但对两种因子与肿瘤患者预后关系的研究较少^[15-16]。

本研究采用 RT-PCR 技术对外周血中 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 进行检测, 结果显示, 直肠癌患者 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 表达阳性率均明显高于直肠腺瘤组和健康对照组, 提示 *Galectin-3* 和 *MUC1* 的表达与直肠癌的发生有关。

另外,研究发现 *Galectin-3* 和 *MUC1* mRNA 的表达与肿瘤的 TNM 分期、组织分化程度以及淋巴结转移有关, TNM 分期越高以及淋巴结转移患者, *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性发生率也越高, 因此, 对外周血中 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 检测对直肠癌恶性程度评估具有一定参考价值。经 5 年后随访发现, *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 阳性患者 5 年生存率均明显低于阴性患者, 提示 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 的表达与直肠癌患者预后存在相关性, 两者可作为评估患者预后的参考指标。

有研究表明, 细胞外 *Galectin-3* 可与细胞膜上 *MUC1* 结合, 导致 *MUC1* 极化分布, 暴露细胞表面多种黏附因子, 促进肿瘤细胞的集聚, 增强肿瘤细胞与血管内皮黏附性, 从而在肿瘤的侵袭转移过程中发挥重要作用^[17]。本研究发现, 直肠癌患者外周血中 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 的表达呈显著正相关关系, 说明 *Galectin-3* mRNA 和 *MUC1* mRNA 相互影响, 共同参与直肠癌的进展过程。

综上所述, 外周血 *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 表达与直肠癌的发生、发展以及转移密切相关, *Galectin-3* mRNA、*MUC1* mRNA 检测有助于对直肠癌患者预后评估提供参考。

参考文献

- [1] 许冰, 栾岚, 滕卫宁, 等. CES2、CA19-9 表达与结直肠癌患者临床病理特征及化疗预后关系的分析[J]. 结直肠肛门外科, 2019, 25(1):48-52.
- [2] 张杰, 贾军峰, 张其军, 等. 血清 CA19-9、sICAM-1、LDH 在结直肠癌患者血清中的表达及其用于预后评估的价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(2):196-200.
- [3] 马安然, 费素娟. 血清胱抑素 C 对结直肠组织良恶性病变诊断价值[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(2):139-142, 146.
- [4] 孙海霞. 血管内皮细胞生长因子 mRNA 和黏蛋白 1mRNA 在非小细胞肺癌患者外周血中的表达及意义[J]. 中国临床医生杂志, 2017, 45(4):53-55.
- [5] 王玉珏, 李云超, 庄雅娟, 等. 人脑胶质瘤细胞中半乳糖凝集素 3 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 及基质金属蛋白酶 2mRNA 的表达及意义[J]. 中国全科医学, 2014, 17(30):3579-3584.
- [6] 王颢, 傅传刚. 直肠癌术前准确分期价值及对治疗策略选择的影响[J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(1):37-40.
- [7] 王静, 袁玉军. 术前 CEA、D-二聚体、纤维蛋白原与结直肠癌临床病理特点、分期及预后相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(6):690-693.
- [8] 林双明, 郑志学, 步召德, 等. 术前血清肿瘤标志物水平在直肠癌术前分期中的应用评价[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(7):616-620.
- [9] 杨学振. 半乳糖凝集素-3 在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2016, 22(5):438-441.
- [10] Gao X, Balan V, Tai G, et al. Galectin-3 induces cell migration via a calcium-sensitive MAPK/ERK1/2 pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(8):2077-2084.
- [11] Gordon-Alonso M, Hirsch T, Wildmann C, et al. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):793.
- [12] Takahashi H, Jin C, Rajabi H, et al. MUC1-C activates the TAK1 inflammatory pathway in colon cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(40):5187-5197.
- [13] 王晓磊, 展鹏远, 郭伟, 等. Gal-3 和 MUC1 蛋白在结直肠癌中的表达及与预后的关系[J]. 实用肿瘤杂志, 2016, 31(3):250-254.
- [14] Mocan T, Matea C, Tabaran F, et al. In Vitro Administration of Gold Nanoparticles Functionalized with MUC-1 Protein Fragment Generates Anticancer Vaccine Response via Macrophage Activation and Polarization Mechanism[J]. *J Cancer*, 2015, 6(6):583-592.
- [15] 邓轩, 阳芳. MUC1-siRNA 对人舌癌 Tca 细胞迁移、侵袭及 PI3K-Akt 信号通路的影响[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(2):148-151.
- [16] 陈丽丽, 丁兆明. 甲状腺乳头状癌中 Galectin-3 和 miR-322 表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(10):900-904.
- [17] Zhao Q, Guo X, Nash GB, et al. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(17):6799-6806.

· 论 著 ·

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¹ 马海燕^{2*}

【摘要】目的 探究硬膜外阻滞对结肠癌根治术患者认知功能及炎性蛋白表达的影响,为优化结肠癌根治术麻醉方案提供理论依据。**方法** 本次探究对象为2015年2月至2017年2月于我院行结肠癌根治术的92例结肠癌患者,根据麻醉方案的不同进行分组,将采用单纯全身麻醉的45例患者设为对照组,采用硬膜外阻滞复合全身麻醉的47例患者设为观察组。记录2组患者出血量、苏醒时间等手术情况;术前、术后1 d、3 d采用简易精神状态量表(MMSE)评价2组患者认知功能;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测2组患者术前、术后1 d、3 d血清S-100 β 蛋白、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)水平、白细胞介素(IL-1 α)、高敏C反应蛋白(hs-CRP);比较2组患者术后1 d Steward 苏醒评分以及疼痛(VAS)评分;记录术后恶心呕吐发生情况。**结果** 观察组与对照组术中出血量、丙泊酚用量、瑞芬太尼用量差异无统计学意义($P>0.05$),观察组苏醒时间、拔管时间显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);观察组与对照组术后MMSE评分、血清S-100 β 蛋白、TNF- α 、IL-6、IL-1 α 、hs-CRP水平均显著高于术前,差异具有统计学意义($P<0.05$),术后1 d、3 d观察组MMSE评分显著高于对照组,血清S-100 β 蛋白、TNF- α 、IL-6水平显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);观察组术后Steward 苏醒评分显著高于对照组,VAS评分显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);观察组恶心呕吐发生率为12.77%,显著低于对照组(31.11%),差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 相较于单纯全身麻醉,硬膜外阻滞麻醉能显著提升术后认知功能,改善术后S-100 β 蛋白、TNF- α 等炎性因子水平,不良反应发生率更低。

【关键词】 硬膜外阻滞; 结肠癌根治术; 认知功能; S-100 β 蛋白

Effect of Epidural Anesthesia on Cognitive Function and Inflammatory Protein Expression in Patients with Radical Resection of Colon Cancer

CHEN Jiehua¹, MA Haiyan^{2*}

(1. Department of Anesthesiology, Huangshi Central Hospital, Edong Health Care, Huangshi, Hubei, China, 435000; 2. Department of Anesthesiology, Huangshi Maternity and Children's Health Hospital, Edong Health Care, Huangshi, Hubei, China, 435000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effect of epidural anesthesia on the cognitive function and the expression of inflammatory protein in patients with radical resection of colon cancer, and to provide the theoretical basis for the optimization of radical anastomosis of colon cancer. **Methods** 92 patients with radical resection of colon cancer in our hospital from February 2015 to February 2017 were selected and divided into groups according to the different anesthesia program, 45 patients with simple general anesthesia were included into the control group; and 47 patients with epidural anesthesia combined with general anesthesia were included into observation group. The bleeding, wake time and other surgical conditions of

基金项目:湖北省科技厅科研项目(EK070748)

作者单位:1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院麻醉科,湖北,黄石 435000

2. 鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院麻醉科,湖北,黄石 435000

*通信作者:马海燕, E-mail:455759577@qq.com

patients in two groups were recorded. The mini mental state examination (MMSE) were used to evaluate the cognitive function of the two groups preoperative and postoperative 1d and 3d. The levels of serum S-100 β protein, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 α (IL-1 α), and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the two groups preoperative and postoperative 1d and 3d; The postoperative 1d Steward recovery scores and visual analogue scale (VAS) scores were compared between the two groups; The incidence of postoperative nausea and vomiting were recorded. **Results** There was no significant difference between the two groups in the amount of intraoperative bleeding, the usage of propofol and remifentanil ($P>0.05$). The recovery time and extubation time of the observation group were significantly lower than those of the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The MMSE score, serum S-100 β , levels of TNF- α , IL-6, IL-1 α and hs-CRP in the two groups were statistically significant before and after surgery ($P<0.05$). The MMSE score of the observation group was significantly higher than that of the control group at 1 day and 3d after operation. The levels of serum S-100 β protein, TNF- α and IL-6 of the observation group were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). The score of Steward in the observation group was significantly higher than that in the control group, and the VAS score in the observation group was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). The incidence of nausea and vomiting in the observation group was 12.77%, which was significantly lower than that in the control group (31.11%), the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with general anesthesia, epidural anesthesia can significantly improve postoperative cognitive function, postoperative S-100 β protein and other inflammatory factors, and have a lower incidence of adverse reactions.

[KEY WORD] Epidural anesthesia; Radical resection of colon cancer; Cognitive function

目前,对于早中期结肠癌而言,外科手术是控制病情的有效治疗方案,通过手术切除可彻底清除病灶,达到改善患者预后的目的。目前腹腔镜结肠癌根治术以其创口小、恢复快的优势广泛应用于结肠癌的临床治疗^[1]。如同大多数腹腔手术,在行腹腔镜手术时需保证足够的麻醉深度。但临床观察发现,由于患者多为中老年人,单纯全身麻醉容易对患者的认知功能带来一定损害,王云川等^[2]报道称严重者甚至出现终身性的认知功能障碍,同时其研究认为硬膜外阻滞复合全身麻醉在预防术后认知功能障碍方面具有重要意义。尹彦玲等^[3]研究显示硬膜外阻滞复合全身麻醉相较于单独全麻术后患者简易精神状态量表(mini mental state examination, MMSE)评分更高。有研究显示,麻醉方式、感染、术式等导致的炎性反应是引发患者术后认知功能障碍的重要因素,而硬膜外阻滞麻醉术可降低各种刺激介导炎症介质释放的可能性^[4]。此外 S-100 β 蛋白作为一种存在于神经系统的炎性蛋白,可促使细胞骨架产生运动,调节酶的活性,调节血管内皮细胞、炎性细胞及神经元的活性,促进细胞生长、分化^[5]。由于 S-100 β 蛋白在中枢神经系统具有高度特异性,是反应脑损伤的特异性指标,因此临床上常通过 S-100 β 蛋白的浓度,判断患者认知

功能^[6]。此外,其他因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)、白介素 6(interleukin 6, IL-6)等作为代表性的促炎性细胞因子,是造成术后损伤的关键因子,二者水平的高低也可反映机体手术应激反应^[7]。鄂东医疗集团黄石市中心医院和鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院两院近年对部分患者采用了硬膜外阻滞复合全身麻醉,在保护术后认知功能方面取得了一定的效果。为进一步研究不同麻醉方式对患者术后认知功能的影响,本研究通过病历资料回顾性分析,比较单纯全身麻醉和硬膜外阻滞复合全身麻醉两种麻醉方式术后 MMSE 评分,探究硬膜外阻滞对结肠癌根治术患者认知功能及炎性蛋白的影响,为优化结肠癌根治术的麻醉方案,减轻手术麻醉对患者带来的不良影响提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本次探究对象为 2015 年 2 月至 2017 年 2 月于本院行结肠癌根治术的 92 例结肠癌患者,根据麻醉方案的不同进行分组,将采用单纯全身麻醉的 45 例患者设为对照组,对照组男性 25 例,女性 20 例;最低年龄 50 岁,最高 77 岁,平均(61.04 \pm 4.32)

岁;采用硬膜外阻滞复合全身麻醉的47例患者设为观察组,观察组男性27例,女性20例;最低年龄49岁,最高78岁,平均(60.43±4.34)岁。纳入标准:所有患者均经肠镜、病理学检查确诊为结肠癌;单发病灶;综合诊断适合行结肠癌根治手术;患者及家属同意手术方案;无消化系统手术史;未发生淋巴结转移;初中及以上文化水平。排除标准:凝血障碍者;有麻醉禁忌症;有化疗、免疫治疗史;合并精神疾病、脑卒中等影响认知功能的疾病;合并术前感染者。比较2组患者性别、年龄等一般资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

进入手术室后,给予患者开放外周静脉,心电图、血氧饱和度、动脉血压、脑电双频指数(bispectral index, BIS)、输血量、出血量、尿量监测,血氧饱和度不低于95%,动脉血压波动幅度不超过基础值20%,BIS值维持于40~60。建立人工CO₂气腹时压力保持12~15 mmHg。对照组患者行常规全身麻醉,静脉注射罗库溴铵(0.6 mg/kg)、芬太尼(2~4 μg/kg)、丙泊酚(1.5 mg/kg)、咪达唑仑(0.05 mg/kg)进行诱导麻醉;术中丙泊酚维持5~8 mg/(kg·h)瑞芬太尼维持0.15~0.25 μg/(kg·h),缝合皮肤时停止输入全身麻醉用药,恢复自主呼吸后吸痰拔管。观察组患者采用硬膜外阻滞复合全身麻醉,取左侧卧位,采用硬膜外穿刺,穿刺间隙选择T9~T10,于头侧置入硬膜外导管嘱咐患者行平卧位,给予3~4 mL利多卡因(1.5%),疼痛减退明确后平面控制于T₆水平以下,全身麻醉与对照组保持一致。2组患者均按《结肠癌D3手术规范化实施和关键点》^[8]中所述在淋巴清扫时彻底切除相应肠段的第3站淋巴组织的D3术式行结肠癌根治术。

1.3 指标判定标准

手术情况:记录2组患者术中出血量、丙泊酚

用量、瑞芬太尼用量、苏醒时间以及拔管时间。

炎性因子:术前、术后1 d、3 d采集患者外周静脉血,3 000 r/min离心10 min后分离血清,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测2组患者血清S-100β蛋白TNF-α、IL-6、白细胞介素1α(interleukin 1α, IL-1α)、超敏C反应蛋白(hypersensitive C reactive protein, hs-CRP)水平,ELISA检测试剂盒购自美国强生公司。

MMSE评分:术前、术后1 d、3 d采用MMSE^[9]评价2组患者认知功能,包括命名能力、复述能力、书写能力、三步命令、阅读能力、结构能力等,共9项,总分30,≥27分为认知功能正常,低于27分判断为认识功能障碍,21≥MMSE<27为轻度认知功能障碍、10≥MMSE<21为中度认知功能障碍、MMSE<10为重度认知功能障碍。

疼痛VAS评分:做一条10 cm的线段,患者根据自感疼痛严重程度在0~10 cm线段上做标记,值越大表示疼痛越严重;Steward苏醒评分:参照文献^[10],分值达4分以上才能离开手术室或恢复室;记录术后发生恶心呕吐情况。

1.4 统计学分析

所有数据SPSS 16.00统计软件进行分析处理。计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,重复测量资料采用重复测量方差分析,组内两两比较采用LSD- t 检验,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组手术情况比较

2组术中出血量、丙泊酚用量、瑞芬太尼用量差异无统计学意义($P>0.05$),观察组苏醒时间、拔管时间显著低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 2组手术情况比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of surgical conditions in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	观察组($n=47$)	对照组($n=45$)	t 值	P 值
术中出血量(mL)	98.43±12.43	102.45±14.02	1.457	0.149
丙泊酚用量(mg)	823.34±34.54	830.43±45.33	0.973	0.333
瑞芬太尼用量(μg)	1421.43±312.23	1451.43±316.56	0.458	0.648
苏醒时间(min)	6.87±2.31	7.87±2.56	2.166	0.033
拔管时间(min)	8.04±1.34	9.05±1.45	3.472	0.008

2.2 2组术前术后认知功能、炎性因子水平比较
2组术前、术后MMSE评分、血清S-100β蛋白、TNF-α、IL-6、IL-1α、hs-CRP水平差异具有统计学意义

($P<0.05$), 术后1d、3d观察组MMSE评分显著高于对照组, 血清S-100β蛋白、TNF-α、IL-6水平显著低于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表2。

表2 2组术前术后认知功能、炎性因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of preoperative and postoperative cognitive function and inflammatory factor levels in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	术前	术后1d	术后3d
MMSE 评分	观察组	28.45±1.03	23.04±1.54 ^a	26.60±1.43 ^{ab}
	对照组	28.39±1.05	24.76±1.69 ^a	28.04±1.04 ^{ab}
	<i>t/P</i>	0.277/0.783	5.106/0.000	-5.541/0.000
$F_{\text{时间}}=288.36, P=0.000; F_{\text{组别}}=135.03, P=0.000$				
S-100β (ng/mL)	观察组	75.65±12.43	98.45±15.43 ^a	84.56±13.04 ^{ab}
	对照组	76.04±11.89	120.45±20.31 ^a	102.32±14.56 ^{ab}
	<i>t/P</i>	0.154/0.878	5.866/0.000	6.169/0.000
$F_{\text{时间}}=67.72, P=0.000; F_{\text{组别}}=31.52, P=0.000$				
TNF-α (pg/mL)	观察组	68.54±10.43	123.43±15.65 ^a	88.56±13.54 ^{ab}
	对照组	69.04±9.67	112.34±14.65 ^a	98.87±14.89 ^{ab}
	<i>t/P</i>	0.238/0.812	3.386/0.001	3.477/0.001
$F_{\text{时间}}=311.89, P=0.000; F_{\text{组别}}=26.12, P=0.000$				
IL-6 (pg/mL)	观察组	103.54±15.43	157.56±19.07 ^a	126.43±16.55 ^{ab}
	对照组	105.05±14.99	170.45±20.43 ^a	140.45±18.54 ^{ab}
	<i>t/P</i>	0.476/0.635	3.130/0.002	3.830/0.000
$F_{\text{时间}}=148.11, P=0.000; F_{\text{组别}}=23.83, P=0.000$				
IL-1α (ng/L)	观察组	11.23±3.03	17.03±4.54 ^a	13.43±1.34 ^{ab}
	对照组	11.33±2.03	18.73±3.45 ^a	14.06±2.45 ^{ab}
	<i>t/P</i>			
$F_{\text{时间}}=130.52, P=0.000; F_{\text{组别}}=3.00, P=0.087$				
hs-CRP (mg/L)	观察组	2.12±0.43	3.98±0.76 ^a	2.57±0.65 ^{ab}
	对照组	2.14±0.35	4.04±0.45 ^a	2.59±0.64 ^{ab}
	<i>t/P</i>			
$F_{\text{时间}}=90.38, P=0.000; F_{\text{组别}}=2.605, P=0.110$				

表中 $F_{\text{组别}}$ 表示不同处理组间的差异检验, $F_{\text{时间}}$ 表示不同时间上的差异检验。与术前相比, ^a $P<0.05$; 与术后1d相比, ^b $P<0.05$ 。

2.3 2组 Steward 苏醒评分、VAS 评分比较
观察组术后 Steward 苏醒评分显著高于对照组, VAS 评分显著低于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表3。

2.4 2组恶心呕吐发生率比较
观察组恶心呕吐发生率为12.77%, 显著低于对照组(31.11%), 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表4。

表3 2组 Steward 苏醒评分、VAS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of Steward wake score and VAS score in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Steward 苏醒评分	VAS 评分
观察组	47	4.05±0.65	4.32±0.67
对照组	45	3.56±0.56	5.66±0.76
<i>t</i> 值	/	3.866	8.981
<i>P</i> 值	/	0.000	0.000

表4 2组恶心呕吐发生率比较

Table 4 Comparison of the incidence rate of nausea and vomiting in the 2 groups

组别	<i>n</i>	恶心呕吐(<i>n</i>)	发生率(%)
观察组	47	6	12.77
对照组	45	14	31.11
χ^2 值	/	/	4.548
<i>P</i> 值	/	/	0.033

3 讨论

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,肿瘤发生部位位于结肠,主要累及直肠与乙状结肠交界处,40~50岁人群发病率最高,男女发病率比约为2~3:1^[11]。结肠癌主要分型包括黏液腺癌、腺癌、未分化癌,其总发病率在胃肠道肿瘤中居高不下^[12]。结肠癌根治术是结肠癌临床治疗的首选方案之一,但有报道称,术后认知功能降低是结肠癌根治术后常见并发症之一^[13]。加之结肠癌患者以老年人群为主,其组织器官功能有所减退,对麻醉的承受力以及手术的耐受力减退,术后更易出现认知功能减退^[14]。当前众多研究表明,麻醉手术可能对手术患者认知水平造成一定程度的影响,严重者甚至出现社会活动、日常生活能力丧失^[15]。因此,为减轻麻醉手术后认知功能损伤,避免永久性的认知功能损伤的出现,选择适当的手术麻醉方法至关重要。随着麻醉学的发展以及对麻醉后遗症的研究深入,有研究认为全麻手术中硬膜外阻滞麻醉可能通过阻断手术区域内伤害性刺激传导至中枢神经,而减少患者相关炎性因子分泌以及神经损伤。

有报道认为,炎性反应是导致认知功能减退的独立危险因素之一,而相较于常规全身麻醉,硬膜外阻滞麻醉对伤害性刺激向中枢神经系统以及交感神经低级中枢的传导具有一定的阻滞作用,能显著减低炎症因子的释放,减少中枢神经受炎症因子的损伤程度^[16],S-100 β 蛋白在雪旺氏细胞以及中枢神经的星形胶质细胞中大量存在,是反应脑损伤的敏感指标之一^[17],其具有耐热性,其水平不受体外循环低温、溶血、异丙酚、肝素等影响,因此适合用于全麻后评价脑损伤情况;Karmakar等^[18]研究结果显示全麻手术术后血清S-100 β 蛋白水平与认识功能呈负相关,与本文结果一致。TNF- α 、IL-6水平是公认的反应机体炎症反应程度的细胞因子,本探究显示术后血清S-100 β 蛋白、TNF- α 、IL-6水平均显著上升,但观察组水平更低,提示手术过程中,采用硬膜外阻滞给患者带来的损伤更轻。认知功能评价显示术后3d观察组MMSE评分显著高于对照组,这与炎症反应导致认知功能减退这一机制相契合。Harris等^[19]报道指出硬膜外阻滞麻醉能够阻滞手术区域的交感神经及传入神经,阻断手术区域内

伤害性刺激传导至中枢神经,肾上腺皮质的功能受到抑制,使肾上腺髓质、脑垂体分泌的儿茶酚胺量降低,有效降低麻醉应激反应。因此观察组术后Steward苏醒评分、VAS评分以及恶心呕吐发生率均优于对照组。程向阳等^[20]临床研究显示硬膜外阻滞麻醉者苏醒时间、拔管时间与常规全麻无明显差异,但本探究显示差异显著,这可能因纳入对象有限造成一定误差,待日后条件成熟再做深入研究。本研究创新之处在于将反映脑组织损伤敏感指标血清S-100 β 蛋白与量化认知水平的MMSE评分量表相结合,研究硬膜外阻滞对认知功能保护的影响。

综上所述,相较于单纯全身麻醉,硬膜外阻滞麻醉能显著提升术后认知功能,改善术后S-100 β 蛋白等炎性因子水平,不良反应发生率更低。

参考文献

- [1] 杜兴. 肠系膜完整切除术治疗早期结肠癌疗效分析[J]. 河北医学, 2013, 19(1):116-117.
- [2] 孙瑜, 王清秀. 全身麻醉和硬膜外麻醉对老年骨科患者术后短期认知功能的影响[J]. 河北医学, 2017, 23(1):48-51.
- [3] 尹彦玲, 王政伟, 杨白雪, 等. 全麻与脊髓-硬膜外阻滞麻醉对手术患者术后认知功能的影响[J]. 临床军医杂志, 2015, 43(8):845-848.
- [4] 张百军, 杨赵栋, 郑旻, 等. 硬膜外麻醉和全身麻醉对老年骨科患者术后认知功能影响对比[J]. 浙江医学, 2015, 37(7):595-596.
- [5] Li K, Jia JJ, Wang ZF, et al. Elevated serum levels of NSE and S-100 β correlate with increased risk of acute cerebral infarction in Asian Populations[J]. Med Sci Monit, 2015, 21:1879-1888.
- [6] 齐英斌, 许卓, 李丽, 等. 急性脑梗死患者血清中NSE与S-100 β 蛋白的表达情况及其与脑损伤严重程度的相关性[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(12):2024-2026.
- [7] 王仲, 许卫东, 滕步伟. 微创手术与开腹手术治疗重症胰腺炎的围术期应激反应及术后炎症反应[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(12):1997-1998.
- [8] 林锋, 李勇. 结肠癌D3手术规范化实施和关键点[J]. 中国实用外科杂志, 2011, 7(6):481-484.
- [9] 林舜艳, 尹正录, 高巨, 等. 针刺麻醉对老年患者肠癌切除术后认知功能障碍影响及其S-100 β 蛋白的变化[J]. 中国针灸, 2013, 33(1):63-66.

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

[摘要] 目的 探讨尿毒症患者血液透析前后血清氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、血尿酸(BUA)、肌钙蛋白T(cTnT)水平变化及其临床意义。方法 选取2013年9月至2018年1月本院血液透析治疗的尿毒症患者160例,依据心血管疾病发生情况分为发生组($n=124$)和未发组($n=36$),同期选取健康人员作为健康对照组($n=160$),检测所有人员血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平,分析血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平变化与心血管疾病的关系。结果 尿毒症患者血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);发生组和未发组血液透析后血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平明显低于透析前,未发组血液透析后血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平明显低于发生组,差异有统计学意义($P<0.05$);单因素分析结果显示,年龄(>60 岁)、糖尿病、高血压和血液透析后血清NT-proBNP $>4\ 381$ ng/L、BUA >420 μ mol/L、cTnT >0.1 μ g/L水平与患者心血管疾病的发生有关($P<0.05$);Cox回归性分析结果显示,校正年龄、糖尿病、高血压后,NT-proBNP $>4\ 381$ ng/L、BUA >420 μ mol/L、cTnT >0.1 μ g/L仍与患者心血管疾病的发生有明显的相关性($P<0.05$)。结论 尿毒症患者血液透析后血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平下降,透析后NT-proBNP $>4\ 381$ ng/L、BUA >420 μ mol/L、cTnT >0.1 μ g/L与心血管疾病的发生密切相关。

[关键词] 尿毒症;血液透析;氨基末端脑钠肽前体;血尿酸;肌钙蛋白T;心血管疾病

The changes and clinical significance of serum NT-proBNP, BUA, cTnT levels in patients with uremia before and after hemodialysis

XIE Xi*, LIU Lili, LI Shuhui

(Department of Nephrology, People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang, Hubei, China, 443000)

[ABSTRACT] Objective To explore the changes and clinical significance of serum N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP), blood uric acid (BUA), troponin T (cTnT) levels before and after hemodialysis in uremic patients. Methods 160 patients with uremia who underwent hemodialysis in our hospital from September 2013 to January 2018 were enrolled. According to the cardiovascular disease, all patients were divided into occurrence group ($n=124$) and undeveloped group ($n=36$). In the same period, healthy people were selected as healthy control group ($n=160$). The levels of serum NT-proBNP, BUA and cTnT were measured in all subjects. The relationship between serum NT-proBNP, BUA and cTnT levels and cardiovascular disease was analyzed. Results The levels of serum NT-proBNP, BUA and cTnT in uremic patients were significantly higher than those in healthy controls ($P<0.05$). The serum NT-proBNP, BUA and cTnT levels after hemodialysis in the occurrence group and undeveloped group were significantly lower than those in the before hemodialysis. The serum NT-proBNP, BUA and cTnT levels after hemodialysis in the

作者单位:三峡大学人民医院肾内科,湖北,宜昌 443000

*通信作者:谢希, E-mail:xiexix2@126.com

occurrence group were significantly lower than those in the undeveloped group ($P<0.05$). Univariate analysis results showed, the age (>60 years old), diabetes, hypertension and blood serum after hemodialysis NT-proBNP $>4\ 381$ ng/L, BUA >420 mol/L, cTnT >0.1 μ g/L were associated with the occurrence of cardiovascular disease ($P<0.05$). The Cox regression analysis results showed that, the correction of age, diabetes, hypertension, NT-proBNP ($>4\ 381$ ng/L), BUA (>420 μ mol/L), cTnT (>0.1 μ g/L) were still statistically associated with the occurrence of cardiovascular disease in patients ($P<0.05$). **Conclusions** The serum NT-proBNP, BUA, cTnT levels were decreased after hemodialysis in uremic patients NT-proBNP ($>4\ 381$ ng/L), BUA (>420 μ mol/L) and cTnT (>0.1 μ g/L) after hemodialysis were closely related to the occurrence of cardiovascular disease.

[KEY WORDS] Uremia; Hemodialysis; N-terminal pro brain natriuretic peptide; Blood uric acid; Troponin T; Cardiovascular disease

尿毒症是高血压、糖尿病、慢性肾炎、高尿酸血症等慢性疾病终末期常见的一种严重并发症,目前主要的治疗方法为血液透析,但透析期间常易导致心血管疾病的发生,严重者可因心血管疾病而导致死亡,约占总病死率的50%^[1]。而最近的研究证实,氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro brain natriuretic peptide, NT-proBNP)、肌钙蛋白T(troponin T, cTnT)等临床上常用的心肌损伤指标,其对血液透析治疗后的尿毒症患者有预测价值^[2]。此外,也有研究表明,高尿酸血症可能导致多种心脏疾病的发生,提示血液中的尿酸(blood uric acid, BUA)水平可作为评估心血管疾病发生的重要指标^[3]。但目前关于尿毒症血液透析患者血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平与其心血管疾病发生的关系报道较少,故本研究通过检测尿毒症患者血液透析前后NT-proBNP、BUA、cTnT水平,并与健康人员比较,分析三者与心血管疾病发生的关系,为早期评估和监测尿毒症并发心血管疾病提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2013年9月至2018年1月本院宜昌市第一人民医院血液透析治疗的尿毒症患者160例,同期选取160例健康人员作为健康对照组。患者的纳入标准:①经临床症状、实验室、影像学等检查存在尿毒症^[4];②接受规律的血液透析 >3 个月;③年龄 >18 岁,无精神病史;④签署知情同意书。排除标准:①近1个月内有感染和/或手术史;②妊娠期、哺乳期女性或儿童;③有恶性肿瘤,预计生存期 <3 个月;④近1个月内发生过急性心肌梗死、不稳定心绞痛、急性心力衰竭、房颤者;

⑤失访或资料收集不完整。本次研究已经我院伦理委员会审批且通过。尿毒症患者中男82例,女78例,年龄42~76岁,平均 (63.47 ± 10.57) 岁,身体质量指数18.03~28.76 kg/m^2 ,平均 (24.48 ± 4.14) kg/m^2 。健康对照组中男84例,女76例,年龄40~78岁,平均 (62.47 ± 10.51) 岁,身体质量指数18.16~28.57 kg/m^2 ,平均 (24.62 ± 4.18) kg/m^2 。2组性别、年龄、身体质量指数等比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集

所有人员入院后常规收集和记录性别、年龄、身高、体重、身体质量指数等资料,尿毒症患者收集疾病史、透析时间等资料。

1.2.2 血液透析

尿毒症患者均采用一次性透析器,透析用水为反渗透水,膜材料为聚砜膜(面积1.3~1.5 m^2),透析液为碳酸氢盐透析液,血管通路为自体或人工动静脉内瘘或中心静脉置管。透析参数如下,温度为35.5~36.5 $^{\circ}\text{C}$,透析液流量为500 mL/min ,钙离子为1.25~1.50 mmol/L ,钠离子为138 mmol/L ,血流量为200~300 mL/min ,钾离子为2.0 mmol/L ,3次/周,4~5 h/次。

1.2.2 指标检测

尿毒症患者均常规监测血常规、肝功能、肾功能、血电解质、血压、血脂、血糖等指标。健康对照组于入院2 h内,尿毒症患者于血液透析前后抽取上臂空腹静脉血6 mL 置入无菌试管中,分离血清(3 000 r/min , 12 min ,离心半径8.5 cm)后采用酶联免疫吸附法检测血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平,其中NT-proBNP $>4\ 381$ ng/L、BUA >420 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、cTnT >0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 定义为该指标水平升高^[5-6],试剂盒均购自基蛋生物科技股份有限公司。

1.2.3 随访

尿毒症患者通过电话、复诊等方式进行随访,本研究随访3~22个月,平均(12.05±2.32)个月,观察和记录心肌梗死、心绞痛、充血性心力衰竭、心律失常、左心室扩大等心血管疾病发生情况,并依此将尿毒症患者分为发生组($n=124$)和未发组($n=36$)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件处理数据,对计数资料比较以(%)表示,采用 χ^2 检验,对计量资料比较以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验,对各组的时间差异比较采用两两比较LSD- t 检验,血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平变化与心血管疾病的关系统采用单因素分析和Cox回归性分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿毒症患者和健康对照组血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平比较

尿毒症患者血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平

明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 尿毒症患者和健康对照组血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平比较

Table 1 Comparison of serum NT-proBNP, BUA, cTnT levels in uremic patients and health persons

组别	n	NT-proBNP (ng/L)	BUA ($\mu\text{mol/L}$)	cTnT ($\mu\text{g/L}$)
健康对照组	160	246.26±26.45	241.46±25.34	0.04±0.01
尿毒症患者	160	5025.83±524.36	536.47±56.47	0.14±0.05
t 值		115.151	60.290	24.807
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 2组血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平比较

发生组和未发组血液透析后的血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平明显低于透析前,未发组血液透析后的血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平明显低于发生组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 2组血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平比较

Table 2 Comparison of serum NT-proBNP, BUA, cTnT levels in the 2 groups

组别	n	NT-proBNP(ng/L)		BUA($\mu\text{mol/L}$)		cTnT($\mu\text{g/L}$)	
		透析前	透析后	透析前	透析后	透析前	透析后
未发组	124	5021.36±512.36	3651.12±401.22*	534.21±54.32	332.46±38.21*	0.14±0.04	0.05±0.01*
发生组	36	5035.44±515.87	4405.12±468.21*	540.21±55.36	425.13±43.25*	0.15±0.04	0.11±0.03*
t 值		0.148	9.551	0.593	12.429	1.321	19.035
P 值		0.885	<0.001	0.554	<0.001	0.188	<0.001

与同组透析前比较,* $P<0.05$ 。

2.3 尿毒症患者血液透析治疗后心血管疾病的单因素分析

单因素分析结果显示,年龄(>60岁)、糖尿病、高血压和血液透析后血清NT-proBNP>4381 ng/L、BUA>420 $\mu\text{mol/L}$ 、cTnT>0.1 $\mu\text{g/L}$ 水平与患者心血管疾病的发病有关($P<0.05$),见表3。

2.4 血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平与心血管疾病关系的Cox回归性分析

Cox回归性分析结果显示,校正年龄、糖尿病、高血压后,NT-proBNP>4381 ng/L、BUA>420 $\mu\text{mol/L}$ 、cTnT>0.1 $\mu\text{g/L}$ 仍与患者心血管疾病的发病有明显的相关性($P<0.05$),见表4。

3 讨论

心血管疾病是尿毒症血液透析患者中发病率及病死率最高的并发症,其发病率高达20%,且>50%的患者是死于心血管意外,因此如何有效预防该并发症的发生具有重要的临床意义^[7-8]。目前,心脏超声及心脏导管等检查是诊断心血管疾病的常用方法,但该方法不能有效发现尿毒症血液透析患者的早期病变,在临床中应用存在局限性^[9-10]。

有研究显示,血液透析可有效缓解尿毒症患者的临床症状及控制其血液毒素成分,但因患者自身

表3 尿毒症患者血液透析治疗后心血管疾病发生的单因素分析 [n(%)]

Table 3 Single factor analysis of cardiovascular disease in uremic patients after hemodialysis [n(%)]

类别	未发组(n=124)	发生组(n=36)	χ^2/t 值	P值
性别				
男	64(51.61)	18(50.00)		
女	60(48.39)	18(50.00)	0.290	0.865
年龄				
≤60岁	60(48.39)	10(27.78)		
>60岁	64(51.61)	26(82.22)	4.815	0.028
身体质量指数(kg/m ²)	24.57±4.08	24.26±4.04	0.324	0.634
糖尿病	36(29.03)	18(50.00)	5.486	0.019
高血压	20(16.13)	16(44.44)	12.828	<0.001
高脂血症	36(29.03)	12(33.33)	0.246	0.620
透析时间(月)	14.01±2.51	14.26±2.56	0.524	0.601
血肌酐(μmol/L)	712.36±78.25	725.16±80.23	0.859	0.392
血红蛋白(g/L)	91.23±10.45	90.56±10.23	0.340	0.734
NT-proBNP>4 381 ng/L	34(27.42)	28(77.78)	29.811	<0.001
BUA>420 μmol/L	20(16.13)	20(55.56)	23.130	<0.001
cTnT>0.1 μg/L	12(9.68)	18(50.00)	29.777	<0.001

表4 血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平与心血管疾病关系的 Cox 回归性分析

Table 4 Cox regression analysis of the relationship between serum NT-proBNP, BUA, cTnT levels and cardiovascular diseases

因素	校正前			校正后		
	P值	HR	95%CI	P值	HR	95%CI
NT-proBNP>4 381 ng/L	0.000	14.13	6.21~32.12	0.000 ^a	7.15 ^a	2.45~24.20 ^a
BUA>420 μmol/L	0.001	2.05	1.89~13.48	0.008 ^a	3.19 ^a	1.43~12.62 ^a
cTnT>0.1 μg/L	0.026	2.42	1.10~5.32	0.032 ^a	2.01 ^a	0.63~4.65 ^a

^a为校正年龄、糖尿病、高血压等资料。

存在明显的微小炎症和代谢异常状态,长期处于此状态会逐渐引起心肌微损害,使多种心肌损伤指标水平升高,提示检测心肌损伤因子有利于评估患者心血管疾病的发生^[11-12]。而相关研究显示,NT-proBNP、cTnT是临床上常用的心肌损伤指标,NT-proBNP是与脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)同源且源于心室肌细胞的因子,且其在血清中较BNP稳定,可反映心肌细胞的容量和压力负荷,其水平升高提示心肌损害的发生;而cTnT是肌钙蛋白的3个亚单位之一,存在于心肌的肌丝中,在心肌损害时可被释放至血液中;其中NT-proBNP>4 381 ng/L和cTnT>0.1 μg/L可作为评估心血管疾病发生及预后不良(死亡)的临界

值^[13-14]。此外,也有研究表明,BUA升高与心血管疾病的发生发展有关,高BUA可沉积在血管壁而损伤血管内膜和刺激血小板聚集,且可激活血小板、破坏血管内皮细胞,使血小板粘附性增加而加速动脉粥样硬化,并经多因素分析显示,高尿酸血症(BUA>420 μmol/L)是心血管疾病发生的独立危险因素^[15-16]。

本研究通过检测尿毒症患者NT-proBNP、BUA、cTnT水平,并与健康对照组比较,结果显示尿毒症患者血清NT-proBNP、BUA、cTnT水平明显高于健康对照组,此结果与李芬^[17]、Pecoits-Filho等^[18]研究基本一致,表明尿毒症患者存在一定的心肌损害。这可能与尿毒症患者微小炎症和代谢

异常损害心肌有关。同时,本研究中,发生组和未发组血液透析后血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平明显低于透析前,未发组血液透析后血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平明显低于发生组,此结果与魏明明^[19]、Yukio 等^[20]研究基本一致,表明血液透析能够使患者血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平下降。这可能是由于本研究通过血液透析能够有效清除尿毒症患者体内的多种血液毒素,在一定程度上改善了患者的各项机能,从而使血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平下降。本研究的单因素分析结果显示,年龄(>60岁)、糖尿病、高血压与患者心血管疾病的发生有关,此结果与钟晓容^[21]、Bielez 等^[22]研究中年龄、糖尿病、高血压与患者心血管疾病发生有关的结果基本一致,提示尿毒症患者受年龄、糖尿病、高血压等因素影响,常易导致心血管疾病的发生。同时,本研究中血液透析后血清 NT-proBNP>4 381 ng/L、BUA>420 μmol/L、cTnT>0.1 μg/L 水平与患者心血管疾病的发生有关,这可能是由于在血液透析后未能有效清除体内的多种血液毒素,或使机体仍处于较为明显的微小炎症和代谢异常状态,会使心肌细胞持续受损,且透析后 BUA 较高,加速了心血管的动脉粥样硬化,从而增加了心血管发生的风险。此外,本研究的 Cox 回归分析结果显示,校正年龄、糖尿病、高血压后,NT-proBNP>4 381 ng/L、BUA>420 μmol/L、cTnT>0.1 μg/L 仍与患者心血管疾病的发生有明显的相关性,提示监测患者血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平变化对防治心血管疾病的发生具有重要的意义,尤其是对透析后 NT-proBNP>4 381 ng/L、BUA>420 μmol/L、cTnT>0.1 μg/L 的患者,应及时进行相关积极有效的干预。

综上所述,尿毒症患者血液透析后血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平下降,透析后 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平与心血管疾病的发生密切相关,提示应积极加强透析后对 NT-proBNP、BUA、cTnT 的水平检测,若结果为 NT-proBNP>4 381 ng/L、BUA>420 μmol/L、cTnT>0.1 μg/L 者应积极加强干预。但本研究也存在一定的局限性,如尿毒症患者血液透析后血清 NT-proBNP、BUA、cTnT 水平与心血管疾病发生的机制复杂,且纳入的病例数较少,不足以代表所有病患情况,故期待更深入和更大样本的研究。

参考文献

- [1] 李彩云,侍立峰,张峥程,等. 妇科尿毒症患者血液中分子代谢物的清除及作用机制探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(5):334-336.
- [2] 宋家志,刘婧,张丽涓,等. 血液透析患者心血管标志物水平变化与其预后的相关性研究[J]. 内科急重症杂志, 2017, 23(5):410-412.
- [3] Carnovale C, Venegoni M, Clementi E. Allopurinol overuse in asymptomatic hyperuricemia: a teachable moment[J]. JAMA Intern Med, 2014, 174(7):1031-1032.
- [4] 倪兆慧,刘玉宁,谢院生,等. 慢性肾衰竭中西医结合诊疗指南[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9):1029-1033.
- [5] Kleber ME, Delgado G, Grammer TB, et al. Uric acid and cardiovascular events: a mendelian randomization study[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2015, 26(11):2831-2839.
- [6] 张莹,梁剑波,江丽屏,等. 维持性透析患者颈动脉斑块形成的影响因素及与心血管疾病的关系[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(10):1540-1543.
- [7] Bonomi A, Sordi V, Dugnani E, et al. Gemcitabine-releasing mesenchymal stromal cells inhibit in vitro proliferation of human pancreatic carcinoma cells [J]. Cytotherapy, 2015, 17(12):1687-1695.
- [8] 刘华,杨敏,高小夏,等. 成纤维细胞生长因子 23 与血液透析患者心血管疾病的关系[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(19):1591-1593.
- [9] 张清,王昱,鲍晓荣. 维持性血液透析患者血清 BNP 水平变化及其临床意义分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(7):587-589.
- [10] Berezin AE. Predicting heart failure phenotypes using cardiac biomarkers: hype and hope[J]. J Dis Markers, 2015, 2(4):1035-1041.
- [11] 郭学娜,任建伟,康志敏. 血清 N 端脑钠肽与维持性血液透析患者心血管功能的关系[J]. 中国血液净化, 2015, 14(10):600-603.
- [12] Sengottuvelu G, Rajendran R. Optical coherence tomographic findings of myeloproliferative disorder presenting as acute myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2016, 37(22):1775.
- [13] 王晓玉,唐新仿,王锦年,等. 维持性血液透析患者高敏心肌肌钙蛋白 T 水平及其与左心室结构的关系[J]. 中国心血管病研究杂志, 2016, 14(11):1026-1029.
- [14] Lavebom E, Lindmark K, Skagerlind M, et al. NT-proBNP and troponin T levels differ after haemodialysis with a low versus high flux membrane[J]. Int J Artif Organs, 2015, 38(2):69-75. (下转第 328 页)

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

[摘要] **目的** 探讨电阻抗法血小板计数(PLT-I)、荧光通道血小板计数(PLT-F)、红细胞分布宽度(RDW)和红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)指标变化与检验标本不同保存条件的关系。**方法** 选取2017年1月至2018年10月体检的健康者460例,均采集静脉血标本,每个标本等分2份,在4℃、25℃下保存,分别于即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h检测PLT-I、PLT-F、RDW和MCHC水平。**结果** 4℃条件下,保存24 h后PLT-I和MCHC水平与即刻检测时的比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h PLT-F和RDW比较差异无统计学意义($P > 0.05$);25℃条件下,保存6 h、12 h和24 h后RDW和MCHC明显高于即刻检测时的,差异有统计学意义($P < 0.05$),保存24 h后PLT-I明显低于即刻检测时($P < 0.05$),即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h PLT-F比较差异无统计学意义($P > 0.05$);保存6 h、12 h和24 h时,25℃条件下,RDW水平明显高于4℃下的水平($P < 0.05$);保存12 h、24 h时,25℃下MCHC明显高于4℃下的水平($P < 0.05$)。**结论** PLT-I、PLT-F、RDW和MCHC指标变化与样本保存的温度、时间有关,以4℃,保存24 h内为宜,日常检测中应注意样本保存的时间和温度。

[关键词] 电阻抗法血小板计数;荧光通道血小板计数;红细胞分布宽度;红细胞平均血红蛋白浓度;保存条件

Relationship between the changes of PLT-I, PLT-F, RDW and MCHC indexes and different storage conditions of test specimens

HU Yaohua*, ZHUO Shuwei, FU Chunmiao

(Department of Clinical Laboratory, Hainan Provincial Hospital of traditional Chinese medicine, Haikou, Hainan, China, 570203)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between the changes of electrical impedance platelet count (PLT-I), fluorescent channel platelet count (PLT-F), red blood cell distribution width (RDW), and the mean hemoglobin concentration (MCHC) of red blood cells and the different storage conditions of test specimens. **Methods** 460 healthy subjects were selected from January 2017 to October 2018. All venous blood samples were collected. Each specimen was divided into 2 parts and stored at 4℃ and 25℃. PLT-I, PLT-F, RDW and MCHC levels were measured at 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h, respectively. **Results** At 4℃, the PLT-I and MCHC levels after 24 h of storage were significantly different ($P < 0.05$) compared with 0 h storage. immediate, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h PLT. There was no significant difference between PLT-F and RDW ($P > 0.05$) during 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h storages. At 25℃, RDW and MCHC levels after 6 h, 12 h and 24 h of storages were significantly higher than those at 0 h ($P < 0.05$). After 24 h of storage, PLT-I was significantly lower than that of 0 h ($P < 0.05$). There was no significant difference in PLT-F among 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h ($P > 0.05$). After 6 h, 12 h and 24 h of storage at 25℃, the RDW level was significantly higher than that at 4℃ ($P < 0.05$). After 12 h and 24 h of

基金项目:海南省卫生厅课题(No.15A200012)

作者单位:海南省中医院检验科,海南,海口 570203

*通信作者:胡耀华, E-mail: sunny_1806@126.com

storage at 25°C, the MCHC level was significantly higher than that at 4°C ($P < 0.05$). **Conclusion** The changes of PLT-I, PLT-F, RDW and MCHC indexes are related to the temperature and time of sample storage. It is suitable to store at 4°C for 24 h. The time and temperature of sample storage should be paid attention to in daily detection.

[KEY WORDS] Platelet count by impedance method; Fluorescence channel platelet count; Red blood cell distribution width; Mean corpuscular hemoglobin concentration; Preservation condition

血细胞参数是常规临床检测项目,而保证检测结果的可靠性、准确性是提高治疗方案合理性和临床治疗效果的重要基础。但有研究提示,血液标本经常受无法及时送检、保存环境温度欠佳等多种因素的影响^[1]。全自动血液分析仪凭借操作简便、检测快速及高精密度等优点,已在各医院应用广泛。有文献提示,为保证血液分析仪测定结果的可靠、准确,加强实验室分析全周期质量管理具有重要意义^[2]。为保证患者临床血液检验结果的安全、可靠,本研究探讨电阻抗法血小板计数(electro-impedance platelet count, PLT-I)、荧光通道血小板计数(fluorescent channel platelet count, PLT-F)、红细胞分布宽度(red cell volume distribution width, RDW)、红细胞平均血红蛋白浓度(erythrocyte mean hemoglobin concentration, MCHC)指标变化与检验标本不同保存条件的关系,旨在为临床检验提供参考性数据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2018年10月在海南省中医院检验科体检的健康者460例,其中男性288例,女性172例,年龄20~57岁,平均年龄(44.10±11.82)岁。纳入标准:(1)无高血压、糖尿病等基础性疾病;(2)年龄≥18岁;(3)汉族人群;(4)受试者知情同意。排除标准:(1)年龄<18岁;(2)少数民族。

1.2 实验方法

抽取患者肘静脉血5 mL,每个标本等分2份,分别于4°C、25°C下保存,使用全自动血液分析仪(美国Sysmex公司生产,型号: XN-3000)分别于即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h检测每份标本PLT-I、PLT-F、RDW和MCHC水平。所有标本检测过程严格遵守实验室规范进行,检测时保证标本温度稳定。

1.3 统计学处理

统计分析采用SPSS 19.0软件,计量资料用

($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用重复测量方差分析或方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4°C条件下不同时间各指标变化情况

4°C条件下,保存24 h后PLT-I和MCHC水平与即刻检测时的比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h PLT-F和RDW比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 4°C条件下不同时间各指标变化情况

Table 1 Variation of indicators in different time at 4°C

时间	PLT-I ($\times 10^9/L$)	PLT-F ($\times 10^9/L$)	RDW	MCHC (g/dL)
即刻	255.10±42.50	266.09±42.14	28.15±2.39	31.61±2.82
1 h	253.00±40.33	266.19±37.56	28.40±2.56	31.65±2.80
3 h	253.02±43.88	267.00±38.43	28.32±2.43	31.61±2.80
6 h	25239±42.01	267.06±37.90	28.31±2.40	31.90±2.72
12 h	251.00±40.03	267.21±39.67	28.32±2.37	32.14±2.70
24 h	241.011±40.10*	267.17±38.11	28.5±2.41	33.10±3.65*
F值	10.112	1.675	1.144	8.022
P值	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05

*与即刻时比较, $P < 0.05$ 。

2.2 25°C下不同时间各指标变化情况

25°C条件下,保存6 h、12 h和24 h后RDW和MCHC明显高于即刻时的检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$);保存24 h后,PLT-I明显低于即刻时的检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$);即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h PLT-F水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

2.3 不同温度下各指标水平比较

4°C和25°C条件下,即刻、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h时PLT-I、PLT-F比较差异无统计学意义($P > 0.05$);25°C条件下,保存6 h、12 h和24 h时RDW水平明显高于4°C下的水平($P < 0.05$);25°C条件下,保存12 h、24 h时MCHC明显高于4°C下的水平($P < 0.05$),见表1和表2。

表2 25℃条件下不同时间各指标变化情况
Table 2 Variation of indicators in different time at 25℃

时间	PLT-I($\times 10^9/L$)	PLT-F($\times 10^9/L$)	RDW	MCHC(g/dL)
即刻	255.10 \pm 42.50	266.09 \pm 42.14	28.15 \pm 2.39	31.61 \pm 2.82
1 h	254.08 \pm 41.03	266.10 \pm 41.09	28.22 \pm 2.31	31.60 \pm 2.90
3 h	254.00 \pm 41.11	266.17 \pm 39.43	28.17 \pm 2.32	31.62 \pm 2.81
6 h	253.48 \pm 40.06	266.21 \pm 38.11	29.52 \pm 2.09*	32.60 \pm 2.90*
12 h	251.95 \pm 39.77	265.09 \pm 41.16	29.91 \pm 2.22*	33.1 \pm 2.72*
24 h	240.44 \pm 38.21*	265.12 \pm 39.99	30.78 \pm 2.30*	33.90 \pm 2.77*
F值	9.011	1.892	8.102	9.101
P值	< 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05

*与即刻时比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

血常规查对临床诊疗中筛查各类外周血异常具有重要意义,特别是对血管性病变和造血系统疾病的诊断、鉴别具有重要的临床意义^[3-4]。本研究使用的XN-9000系列多功能全自动血液分析仪是近年来科技发展的结晶,它利用十二烷月桂酰硫酸钠法分析血红蛋白,鞘液电阻法分析PLT、RBC指标,核酸荧光染色和半导体激光流式细胞分析技术对白细胞进行分类和计数^[5-6]。该分析仪还具有血小板荧光检测通道,通过荧光素选择性标记血小板,有效地排除了红细胞的干扰^[7-8]。但在实际工作中发现,常规的血液检测从开始采样至上机检测存在较长的耗时和温度波动,这对生化检测结果是否存在影响也是分析质量的重点研究方向^[9-10]。

本研究结果显示,在25℃条件下,RDW和MCHC明显高于即刻检测时的结果,保存24 h后PLT-I明显低于即刻检测时,PLT-F比较差异无统计学意义。上述结果提示,在比较低的温度下,存放时间对PLT-I和MCHC水平具有重要影响;常温下,随着保存时间的延长,RDW和MCHC水平变高,PLT-I水平明显下降。这一结果与其他研究结果一致^[11],说明随着时间的延长,血小板极易破碎,随着血小板被破坏数量的增加,PLT-I水平明显下降。此外,在非冷藏条件下,由于温度偏高激活血小板,导致血小板聚集和黏附能力增加,进而出现自发性聚集,PLT-I水平明显下降^[12]。常温下,放置时间延长,红细胞内渗透压快速升高,抗凝全血标本渗透性升高,因此,渗透压降低的检测液中出现红细胞体积的快速增大,所以,MCHC水平较高。

研究发现随着标本放置时间的延长,MCV检测结果逐渐发生变化^[14]。这主要与抗凝血液标本渗透压的变化有关,同未与抗凝剂混合的血液相比,与抗凝剂混合的血液渗透压有所升高,使红细胞处于高渗环境中,导致细胞内水分与细胞外溶质的相互交换,使细胞内渗透压也随之升高,影响MCV检测结果,这也与本研究结果一致。

本研究中25℃条件下,RDW、MCHC水平明显高于4℃下的水平。这一结果提示随着温度的升高,RDW、MCHC水平较高。常温下MCHC水平较高可能是因为4℃条件下红细胞自身代谢能力较低,能量消耗缓慢,这有利于保持红细胞和白细胞数量和形态的稳定,也提示无法立即检测的标本需要放置在4℃条件下冷藏保存。常温下,红细胞代谢较4℃条件下速率高,而维持自身渗透压消耗的能量也较大,因此,红细胞形态多出现变化。相关研究发现PLT检测结果随标本放置时间的延长而呈下降趋势,是因为标本放置时间过长可导致血小板易于黏附、聚集,进而形成较大的颗粒,而分析仪只能区别颗粒大小,无法区别颗粒性质,致使部分血小板被误认为是小红细胞,无法纳入PLT检测范围^[15]。

本研究优势在于分析了PLT-I、PLT-F、RDW、MCHC指标变化与检验标本不同保存条件的关系,血细胞参数作为常规临床检测项目,可以为临床治疗方案提供合理建议,同样是临床效果的重要基础,但是检验标本不同的保存条件对血细胞参数指标变化的影响明显,对检验标本的保存条件影响还有待进一步开展多中心、大样本量、随机对照试验进行深入分析,本研究便补充了此方面的缺憾。

综上所述,PLT-I、PLT-F、RDW、MCHC 指标变化与样本保存的温度、时间有关,在日常检测中应注意样本保存的时间和温度。

参考文献

- [1] 李静静,邢辉,胡丽华. 红细胞分布宽度对电阻抗法血小板计数的影响[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2016, 28(5):788-790.
- [2] 周静,陈建安,陈丽莉,等. 红细胞MCV和RDW对不同方法计数低值血小板的影响[J]. 海南医学, 2016, 27(13):2129-2131.
- [3] 唐四海. 不稳定型心绞痛患者血清同型半胱氨酸水平与红细胞及血小板参数的关系[J]. 华西医学, 2017, 28(11):1749-1752.
- [4] 马广隆,吴阿兰,李晚泉. 心肌梗死及其预后与血小板、红细胞参数的相关性研究[J]. 河北医药, 2016, 38(24):3695-3699.
- [5] 庞晓文,林凯,朱赛楠,等. 寻常型、关节病型银屑病患者红细胞和血小板参数临床意义的初步分析[J]. 空军医学杂志, 2016, 32(4):252-254.
- [6] 赵长征. 红细胞体积分布宽度与血小板计数比值对STEMI冠状动脉介入治疗中无复流的预测价值[J]. 血栓与止血学, 2017, 23(5):829-832.
- [7] Zhang F, Chen Z, Wang P, et al. Combination of platelet count and mean platelet volume (COP-MPV) predicts postoperative prognosis in both resectable early and advanced stage esophageal squamous cell cancer patients[J]. Tumor Biology, 2016, 37(7):9323-9331.
- [8] 佟如,李苗立. 小红细胞/细胞碎片对Sysmex XE-2100血细胞分析仪血小板计数的影响[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(9):1391-1392.
- [9] Hennek J W, Kumar A A, Wiltshko A B, et al. Diagnosis of iron deficiency anemia using density-based fractionation of red blood cells [J]. Lab on A Chip, 2016, 16(20):3929.
- [10] 陶波,蒋学俊,方钊,等. 红细胞分布宽度对非ST段抬高型急性冠脉综合征患者预后的预测价值及其影响因素研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24(6):10-15.
- [11] Mallick M N, Khan W, Parveen R, et al. Exploring the Cytotoxic Potential of Triterpenoids-enriched Fraction of Bacopa monnieri by Implementing In vitro, In vivo, and In silico Approaches [J]. Pharmacognosy Magazine, 2017, 13(3):595-606.
- [12] 张雷,徐福胜,乔梁,等. 黄芪注射液对原发性肾病综合征患者红细胞、网织红细胞及血小板参数的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(2):157-159.
- [13] Yunchun L, Yue W, Jun F Z, et al. Clinical Significance of Red Blood Cell Distribution Width and Inflammatory Factors for the Disease Activity in Rheumatoid Arthritis [J]. Clinical Laboratory, 2016, 62(12):2327.
- [14] 周祥敏. 平均红细胞体积与平均红细胞血红蛋白联合筛查妊娠期地中海贫血诊断效果分析[J]. 山西医药杂志, 2016, 45(23):2730-2732.
- [15] 张会朵,齐凡星,李慧. 动脉粥样硬化性脑梗死患者的红细胞分布宽度水平及临床意义[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(3):98-101.
- [15] 张虹,童俊容,罗正茂,等. 维持性血液透析患者血清尿酸水平与心血管死亡风险的分析[J]. 浙江临床医学, 2015, 17(1):1-2.
- [16] Borghi C, Cosentino ER, Rinaldi ER, et al. Uricemia and ejection fraction in elderly heart failure outpatients [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2014, 44(6):573-577.
- [17] 李芬,朱现菊. 高敏心肌肌钙蛋白T水平与维持性血液透析患者心脏结构和功能的关系[J]. 中国血液净化, 2014, 13(5):377-379.
- [18] Pecoits-Filho R, Calice-Silva V. Unchain the heart: impact of left ventricular myocardial hypertrophy regression in kidney transplant outcomes [J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(7):1025-1026.
- [19] 魏明明,李甦,张少青,等. 腹膜透析联合血液透析对终末期肾脏疾病患者心血管病变的改善作用[J]. 临床肾脏病杂志, 2016, 16(4):224-227.
- [20] Yukio M, Keitaro Y, Masaaki N, et al. Combined therapy with peritoneal dialysis and hemodialysis: A multicenter retrospective observational cohort study in Japan [J]. Blood Purif, 2014, 38(2):149-153.
- [21] 钟晓容,杨枫,陈五星. 维持性血液透析患者血尿酸与心血管疾病的关系[J]. 福建医药杂志, 2016, 38(2):4-7.
- [22] Bielez B, Hecking M, Plischke M, et al. Correlations and time course of FGF23 and markers of bone metabolism in maintenance hemodialysis patients [J]. CUn Biochem, 2014, 47(1314):1316-1319.

(上接第324页)

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

[摘要] **目的** 利用液相芯片技术检测东莞地区儿童下呼吸道感染的病原体,获得病原谱流行病学特征,为临床的诊治提供可靠的依据。 **方法** 采集 2017 年 11 月至 2018 年 10 月在东莞市妇幼保健院住院的 2 850 例下呼吸道感染儿童的咽拭子标本,利用液相芯片技术进行 13 种呼吸道病原体的核酸检测,并对结果按照 0~≤6 月龄、>6~≤12 月龄、>1~≤3 周岁、>3~≤7 周岁、>7 周岁的年龄分组进行统计分析。 **结果** 2 850 例下呼吸道感染患儿中检出病原体阳性的有 1 720 例(60.35%),检出 2 种或 2 种以上病原体阳性的有 533 例(18.70%);在 13 种病原体中,检出率最高的前 3 种分别是呼吸道合胞病毒(RSV)661 例(23.19%),肺炎链球菌(SP)629 例(22.07%)和流感嗜血杆菌(Hi)282 例(9.89%);而混合感染率排名前 5 的病原体分别是卡他莫拉菌(MC, 98/119, 82.35%)、鼻病毒(HRV, 21/34, 61.76%),流感嗜血杆菌(Hi, 171/282, 60.64%),人偏肺病毒(hMPV, 44/75, 58.67%)和肺炎链球菌(SP, 357/629, 56.76%)。各年龄组间感染的病原谱存在差异,低年龄段患儿中最常见的呼吸道病原体是 RSV;SP 和肺炎支原体(MP)的检出率随着年龄的增长呈现上升的趋势。检出率随季节变化较明显的病原体是 SP、RSV、MC 和 Hi;SP 的检出率在 5-10 月份间均维持在较高水平(>20%);RSV 检出率在 3 月份有 1 个次高峰,在 9 月份达到最高峰;Hi 检出率在 5 月份达到高峰;MC 和 MP 的检出高峰期均是 10-11 月份。 **结论** SP、RSV、MC 和 Hi 在患儿中检出率存在明显的季节性变化;RSV、SP 和 MP 在各年龄组的检出率存在差异;在临床诊疗活动中应注意病原体流行的季节变化、年龄组常见病原体差异以及多重病原体的感染。

[关键词] 液相芯片技术;下呼吸道感染;东莞市

A surveillance of children lower respiratory tract infection cases in Dongguan City, from 2017 to 2018

SUN Zhihao*, ZHANG Ronghua, ZHONG Chaozhen

(Laboratory Department of Dongguan City Maternal and Child Health Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523120)

[ABSTRACT] **Objective** The liquid chip technology was used to detect the pathogens of children with lower respiratory tract infection in Dongguan, Guangdong province, and the epidemiological characteristics of pathogen spectrum were obtained, which provided a reliable basis for clinical diagnosis and treatment. **Methods** The throat swab specimens of 2850 children with lower respiratory tract infections who were hospitalized in Dongguan City Maternal and Child Health Hospital from November 2017 to October 2018 were collected. The nucleic acid of 13 respiratory tract pathogens was detected by liquid chip technology, and the results were analyzed statistically according to the age groups of 0~≤6 months, >6~≤12 months, >1~≤3 years, >3~≤7 years and >7 years. **Results** Of the 2850 children with lower respiratory tract infection, 1720 (60.35%) were positive for pathogens, and 533 (18.70%) were detected for two or more pathogens. Among 13 pathogens, The top three rates were 661 (23.19%) of respiratory syncytial virus (RSV), 629 (22.07%) of

作者单位:东莞市妇幼保健院检验科,广东,东莞 523120

*通信作者:孙志豪, E-mail:34188455@qq.com

Streptococcus pneumoniae (SP) and 282 (9.89%) of Haemophilus influenzae (Hi). The top 5 pathogens with mixed infection rates were Moraxella catarrhalis (MC, 98/119, 82.35%), rhinovirus (HRV, 21/34, 61.76%), Haemophilus influenzae (Hi, 171/282, 60.64%), human metapneumovirus (hMPV, 44/75, 58.67%) and Streptococcus pneumoniae (SP, 357/629, 56.76%). The pathogen spectrum of infection among different age groups is different. The most common respiratory pathogen in children of low age is RSV; the detection rate of SP and Mycoplasma pneumoniae (MP) increases with age. The pathogens whose detection rate changed significantly with the season were SP, RSV, MC and Hi. The positive rate of SP maintained a high level (>20%) from May to October; the positive rate curve of RSV showed a sub-peak in March and peaked in September; the positive rate of Hi peaked in May; the positive rate of MC and MP peaked in October and November. **Conclusion** The detection rates of SP, RSV, MC and Hi in children showed significant seasonal changes. The detection rates of RSV, SP and MP were different in different age groups. In clinical diagnosis and treatment, attention should be paid to the seasonal changes of pathogens and the difference of common pathogens among age groups and multiple pathogen infections.

[KEY WORDS] Liquid chip technology; Lower respiratory tract infection; Dongguan

呼吸系统感染是儿科的常见疾病,是发展中国家乃至发达国家低年龄段人口的重要死因之一,越来越受到公众的关注^[1-3]。在我国珠三角地区如广州、深圳等城市的流行病学研究中显示,社区获得性肺炎(community acquire pneumonia, CAP)往往伴随多种呼吸道病原体感染^[4-5]。东莞市位于珠江三角洲地区,地理上属于亚热带季风气候,雨热同期,受本地独特气候特点的影响,呼吸系统疾病的流行有其独特的规律。儿童下呼吸道感染的病原体的构成复杂,临床症状缺乏特异性,传统的病原学诊断常通过病原体分离培养实现,该方法缺耗时间长,且鉴定数量有限,难以满足临床诊断需求^[6]。而液相芯片技术的出现,恰好弥补了这些缺陷,有助于快速确诊、控制病情。液相芯片,也称为微球悬浮芯片,是基于美国 Luminex 公司开发的新型生物芯片技术平台,具有操作简单,杂交动力学快,应用灵活等优点^[7-10]。本研究采用基于液相芯片平台的核酸检测技术,对东莞市妇幼保健院住院患儿下呼吸道感染标本进行 13 种常见呼吸道病原体的核酸检测,并对结果进行分析,尝试在多重病原体、较大样本量的维度上研究儿童呼吸系统感染的流行规律,为儿童呼吸系统感染性病例的预防和控制提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究的研究对象选取自 2017 年 11 月至 2018 年 10 月在东莞市妇幼保健院因下呼吸道感

染住院的 2 850 例患儿。在对患儿进行呼吸道标本采集前均征得患儿家长/监护人知情同意并通过患儿所在医院伦理委员会批准。诊断标准依据《儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)》^[11-12],住院患儿入组符合下呼吸道感染标准:出现咳嗽、痰粘稠,肺部出现湿罗音,并有下列 3 种情况之一:①发热;②白细胞总数和(或)嗜中性粒细胞比例增高;③X 线显示肺部有炎性浸润性病变。排除标准:非感染性原因如肺栓塞、心力衰竭、肺水肿、肺癌等所致的下呼吸道的胸片改变。在 2 850 例患儿中,男性 1 781 例(62.49%),女性 1 069 例(37.51%);0~≤6 月龄患儿 1 051 例(36.90%),>6~≤12 月龄患儿 554 例(19.40%),>1~≤3 周岁患儿 956 例(33.50%),>3~≤7 周岁患儿 228 例(8.00%),>7 周岁以上患儿 61 例(2.10%),中位数年龄为 10 个月。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

在患儿入院当天采集咽拭子置于 2 mL 样品保存液中,4℃保存并在 24 h 内送至实验室进行检测,标本运输过程均保持 4℃。

1.2.2 试剂和仪器

试剂:核酸提取试剂盒采购自广州美基生物科技有限公司,PCR 试剂采购自中山大学达安基因股份有限公司,液相芯片检测试剂耗材采购自美国 Luminex 公司。

仪器:PCR 仪采购自安杰思医学科技有限公司,型号为 AGT9601。液相芯片检测仪采购自美国 Luminex 公司,型号为 Magpix50。

1.2.3 引物与探针

1.2.3.1 多重PCR引物设计 由于流感病毒A型、流感病毒B型、副流感病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒是RNA病毒,因此这6种RNA病毒的多重反转录PCR设计在一管中反应,这6种病毒,以及用于内参的人的GAPDH基因对应的PCR引物序列见表1。而博卡病毒、腺病毒、肺炎支原体、卡塔布兰汉菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、百日咳菌则是基于DNA水平检测,因此无需做反转

录,只需要基于PCR扩增即可,这7种基于DNA检测的病原体的多重PCR引物引物序列见表2。

所有的反向引物R引物的5'端均用生物素进行标记。

1.2.3.2 探针设计 针对8种病毒、5种细菌、1种支原体和1个人的内参基因一共设计了15条探针,探针序列如表3。

所有探针的5'端均用连续18个碳原子上加氨基修饰。

表1 检测RNA病毒的多重PCR引物序列
Table 1 Detection of RNA virus by multiplex PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'-3')	所检测的病原体
GAPDH-F	CAAGCTCATTTCTGGTATGACA	人的GAPDH基因做内参
GAPDH-R	GGGAGATTCAGTGTGGTGGG	
IA-F	AGYCTTCTAACCGAGGTCGAAAC	流感病毒A型
IA-R	TACGCTGCAGTCCTCGCTCA	
IB-F	GGCAAAGCAGAACTAGCA	流感病毒B型
IB-R	TTTCCTGGTCTTTGGGTTT	
PV3-F	GGATAAAATGGACATGGCATA	副流感病毒3型
PV3-R	TGTAATGCAGCTTGTGT	
MPV-F	TAGGCTCATCTCAACAGG	偏肺病毒
MPV-R	TATGTTGTTTGATGATCTGGC	
RV-F	CAAGYACTTCTGTYTCCC	鼻病毒
RV-R	CACGGACACCCAAAGTAGT	
RSV-F	GCTCCAGAATAYAGGCATGA	呼吸道合胞病毒
RSV-R	CTGCAAARATYCCTTCAACTCT	

表2 基于DNA检测的病原体的多重PCR引物序列
Table 2 Multiplex PCR primer sequences of pathogens based on DNA detection

引物名称	引物序列(5'-3')	所检测的病原体
Hbo-F	TATGATGTCACAACGAGG	博卡病毒
Hbo-R	TAATCCGTGATGACTTGC	
Had-F	TGCACATCGCCGGVCAGGA	腺病毒
Had-R	TCSGTGGTCACATCRTGSGT	
Spn-F	GTGTCGCTCTTTGCAGTA	肺炎链球菌
Spn-R	TTCATTATCAGTCCCAGTCG	
Mpn-F	TACTACTTCCACAATAACCCC	肺炎支原体
Mpn-R	AATAAAGGCATCAACCACA	
Mca-F	GTGTTGACCGTTTTGACT	卡他布兰汉菌
Mca-R	AGATTAGGTTACCGCTGAC	
Hin-F	GTTATTGGGTAAACTATAATTACGA	流感嗜血杆菌
Hin-R	CAAGTTCTTTTACCAACGGA	
Bpe-F	CAAGGCCGAACGCTTCAT	百日咳杆菌
Bpe-R	GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA	

表3 探针序列
Table 3 Probe sequence

探针名称	探针序列(5'-3')	所检测的病原体
GAPDH-P	TGGGGAGTCCCTGCCACAC	人的GAPDH基因内参
IA-P	TCGGCTTTGAGGGGGCCTGAYG	流感病毒A型
IB-P	CCAAGGCAGAGTCTAGGTCA	流感病毒B型
PV3-P	TTGTTTCCTGGTCTTGATAGCAC	副流感病毒3型
RSV-P	GTAATAACCAAATTAGCAGCAGG	呼吸道合胞病毒
RV-P	TCCTCCGGCCCCCTGAATG	鼻病毒
MPV-P	TGACACCCACCTTAGCA	偏肺病毒
Hbo-P	CATGAGAGTAGTTGTTGCCAT	博卡病毒
Had-P	CTGGTGCAGTTCGCCCCGCGC	腺病毒
Spn-P	ATTCTGAGTAATTAGAAGTCGCAT	肺炎链球菌
Mpn-P	TTGACAAGACCGTCCAATCCA	肺炎支原体
Mca-P	CCGACATCAACCCAAGCTTT	卡他布兰汉菌
Hin-P	CAATGGCAGAAGTGGTTAAATATG	流感嗜血杆菌
Bpe-P	AGTCGGCCTTGCGTGAGTGG	百日咳杆菌

1.2.4 核酸提取及扩增

待检样本送至实验室后使用核酸提取试剂对样本进行DNA和RNA的提取。完成核酸提取后,取出-20℃保存的13项呼吸道病原体核酸检测试剂盒(RNA/DNA)扩增试剂,解冻、分装加入PCR八联管。将待检核酸与扩增试剂混合后进行PCR扩增。按照PCR扩增试剂盒的操作说明书,根据病原体核酸种类不同,使用不同的扩增程序进行扩增,并选择GAPDH作为内对照进行质控。

检测DNA的病原体为:人博卡病毒(*human Bocavirus*, hBoV)、腺病毒(*adenovirus*, AdV)、流感嗜血杆菌(*haemophilus influenza*, Hi)、肺炎支原体(*mycoplasma pneumonia*, MP)、卡他莫拉菌(*morrela catarrhalis*, MC)、肺炎链球菌(*streptococcus pneumonia*, SP)和百日咳杆菌(*bordetella pertussis*, BP);检测RNA的病原体为:呼吸道合胞病毒(*respiratory syncytial virus*, RSV)、流感病毒A型(*Influenza A virus*, FluA)、流感病毒B型(*Influenza B virus*, FluB)、人偏肺病毒(*human partial pulmonary virus*, hMPV)、副流感病毒(*parainfluenza virus*, PIV)和鼻病毒(*human rhinovirus*, HRV)。

设置如下程序进行PCR扩增:①检测DNA病原的扩增程序为:37℃ 10 min,反应1个循环;95℃ 10 min,反应1个循环;95℃ 30 s;52℃ 1 min;65℃ 1 min;95℃ 30 s,反应30个循环;95℃ 30 s;65℃ 45 s;72℃ 45 s;95℃ 30 s,反应25个循环;72℃ 5

min,反应1个循环;12℃保持至反应管从仪器上移走。②检测RNA病原的扩增体系为:50℃ 30 min,反应1个循环;94℃ 2 min,反应1个循环;94℃ 30 s;52℃ 45 s;72℃ 30 s;94℃ 30 s,反应30个循环;94℃ 30 s;65℃ 30 s;72℃ 30 s;94℃ 30 s,反应25个循环;72℃ 5 min,反应1个循环;12℃保持至反应管从仪器上移走。扩增结束后,取出并检查样本标记是否依旧清晰,管内试剂是否挥发,已扩增样本尽快进行杂交检测,如需保存需放置4℃冰箱。

1.2.5 核酸杂交

开启Luminex Magpix液相芯片检测平台,进行仪器和软件设置,建立检测程序;将扩增产物分别加入核酸杂交试剂中,在PCR仪上进行杂交显色反应;显色结束后将样品放入Magpix96孔板加热模块中,运行已保存的待检测批次,进行检测,得到结果。

1.3 统计学分析

数据统计通过SPSS 22.0软件完成。计数资料采用例数和百分比表示,组间采用t检验、 χ^2 检验或Fisher确切概率法检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原学检测结果

在2 850例患儿的标本中检测出病原体阳性的例数为1 720例(60.35%),检出2种及2种以上

病原体阳性的例数为 533 例 (18.70%); 在 1 720 例病原学阳性患儿中, 检出 1 种病原体阳性例数为 1 187 例 (41.65%), 检出 2 种病原体阳性例数为 440 例 (15.44%), 检出 3 种病原体阳性例数为 85 例 (2.98%), 检出 4 种病原体阳性例数为 8 例 (0.28%)。在 13 种病原体中, 检出率最高的前 3 种

分别是 RSV 661 例 (23.19%), SP 629 例 (22.07%) 和 Hi 282 例 (9.89%); 而混合感染率排名前 5 的病原体分别是 MC (98/119, 82.35%)、HRV (21/34, 61.76%), Hi (171/282, 60.64%), hMPV (44/75, 58.67%) 和 SP (357/629, 56.76%)。具体检测情况详见表 4 至表 6。

表 4 2 850 例患儿下吸呼吸道感染标本病原体检测结果

Table 4 Detection of pathogens in 2 850 children with lower respiratory tract infections

病原体	病原体												
	BP	HRV	hBoV	SP	MP	PIV	RSV	MC	FluA	FluB	Hi	hMPV	AdV
单一病原体感染的数量	87	13	36	272	69	79	399	21	16	6	111	31	47
单一病原体感染的阳性率 (%)	3.05	0.46	1.26	9.54	2.42	2.77	14.00	0.74	0.56	0.21	3.89	1.09	1.65

单一病原体阳性率 (%) 表示该病原体单独感染的检出率, 不包括两重感染、三种及以上病原体感染。

表 5 2 850 例患儿下吸呼吸道感染标本病原体检测结果

Table 5 Detection of pathogens in 2 850 children with lower respiratory tract infections

病原体	病原体												
	BP	HRV	hBoV	SP	MP	PIV	RSV	MC	FluA	FluB	Hi	hMPV	AdV
病原体感染数量合计	127	34	63	629	119	139	661	119	24	8	282	75	74
病原体阳性检出率 (%)	4.14	0.81	1.89	19.58	3.82	4.07	21.40	2.84	0.67	0.28	8.07	2.39	2.28

病原体阳性检出率 (%) 表示该病原体总的检出率, 包括单一感染、两重感染、三种及以上病原体感染。

表 6 2 850 例患儿下吸呼吸道感染标本病原体检测结果

Table 6 Detection of pathogens in 2 850 children with lower respiratory tract infections

不同类型病原体感染情况	病原体												
	BP	HRV	hBoV	SP	MP	PIV	RSV	MC	FluA	FluB	Hi	hMPV	AdV
1 种病原体	87	13	36	272	69	79	399	21	16	6	111	31	47
2 种病原体	31	10	18	286	40	37	211	60	2	2	119	37	18
3 种病原体	9	11	8	64	9	21	48	30	5	0	45	7	7
4 种病原体	0	0	1	7	1	2	3	8	1	0	7	0	2
混合感染病原体合计	40	21	27	357	50	60	262	98	8	2	171	44	27
病原体合计	127	34	63	629	119	139	661	119	24	8	282	75	74
混合感染率* (%)	31.50	61.76	42.86	56.76	42.02	43.17	39.64	82.35	33.33	25.00	60.64	58.67	36.49
病原体阳性率 (%)	4.46	1.19	2.21	22.07	4.18	4.88	23.19	4.18	0.84	0.28	9.89	2.63	2.60

*混合感染率=某种病原体检出阳性数中检出 2 种及以上其他病原体的例数/该种病原体检出阳性总数×100%。

2.2 不同年龄组的病原体检出情况

通过比较各年龄别组间 (0~≤6 月龄组、>6~≤12 月龄组、>1~≤3 周岁组、>3~≤7 周岁组和 >7 周岁以上组) 的检出率发现, BP、SP、Hi、MP、RSV、

AdV、hBoV、HRV 和 PIV 的检出率在组间存在差异。其中低年龄段患儿中最常见的呼吸道病原体是 RSV, 在 3 周岁以下的 3 个年龄组检出率均在 20% 以上, 而 3 周岁以上患儿中检出率不足 2%; SP

在0~≤6月龄组仅检出72例(6.85%),随着年龄的增长呈现上升的趋势;MP的检出率也随着年龄的增长逐渐上升;Hi在中间的3个年龄组(>6~≤12

月龄组、>1~≤3周岁组和>3~≤7周岁组)检出率均超过10%,而其他2组的检出率较低。13种呼吸道病原体在各年龄组中的检出率详见表7。

表7 不同年龄组下呼吸道感染患儿的病原体检测结果

Table 7 Pathogen detection results of children with lower respiratory tract infection in different age groups

年龄组	病原体												
	BP	HRV	hBoV	SP	MP	PIV	RSV	MC	FluA	FluB	Hi	hMPV	AdV
0~≤6月 (n=1051)	84(7.99)	10(0.95)	8(0.76)	72(6.85)	15(1.43)	57(5.42)	318(30.26)	31(2.95)	7(0.67)	0(0.00)	82(7.8)	21(2.00)	6(0.57)
>6~≤12月 (n=554)	19(3.43)	5(0.90)	26(4.69)	99(17.87)	14(2.53)	37(6.68)	132(23.83)	29(5.23)	3(0.54)	1(0.18)	60(10.83)	17(3.07)	9(1.62)
>1~≤3周岁 (n=956)	21(2.20)	15(1.57)	28(2.93)	356(37.24)	44(4.60)	42(4.39)	206(21.55)	44(4.60)	9(0.94)	5(0.52)	115 (12.03)	33(3.45)	40(4.18)
>3~≤7周岁 (n=228)	3(1.32)	4(1.75)	0(0.00)	84(36.84)	30(13.16)	3(1.32)	4(1.75)	14(6.14)	5(2.19)	2(0.88)	23(10.09)	4(1.75)	17(7.46)
>7周岁以上 (n=61)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.64)	18(29.51)	16(26.23)	0(0.00)	1(1.64)	1(1.64)	0(0.00)	0(0.00)	2(3.28)	0(0.00)	2(3.28)
χ ² 值	52.25	26.09	33.68	306.23	144.22	17.65	106.71	9.22	6.88	8.23	15.51	7.70	50.12
P值	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.100	0.360	0.080	<0.001*	0.260	<0.001*

理论值小于5的格子数过多,采用Fisher确切概率法;带*病原体表示检出率存在组间差异。

2.3 各病原体检出率的季节变化

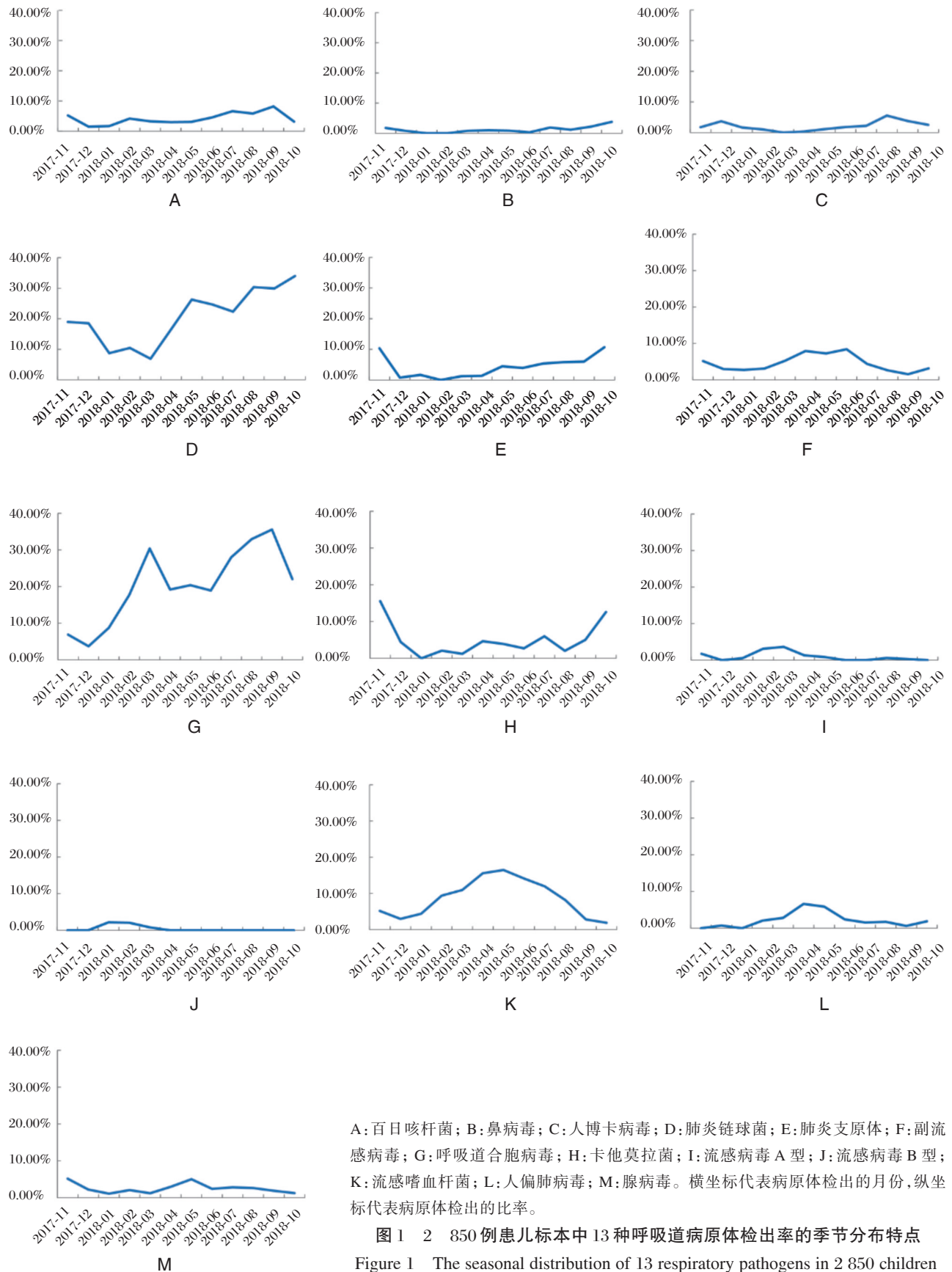
SP的检出率在4月份开始升高,5-10月份间均维持在较高水平(>20%);RSV检出率在3月份有1个次高峰,4-6月份有所下降,然后在7月份开始上升并在9月份达到最高峰,并在达到高峰之后迅速下降;Hi的检出率亦呈现明显的季节性,在2月份开始逐渐上升并在5月份达到高峰,之后缓慢下降在10月份之后维持一个较低的水平;MC和MP的检出高峰期均是10-11月份;BP、HRV、hBoV、PIV、FluA、FluB、hMPV和AdV全年各月的检出率均低于10%,其中PIV的检出高峰期是4-6月份,hMPV的检出高峰期是4-5月份。总的来说儿童下呼吸道感染病原体春季检出率春季较其它季节低,具体情况详见图1。

3 讨论

下呼吸道感染是儿童时期的常见病,世界范围内每年5岁以下儿童发生肺炎约1.6亿,中国约0.21亿^[11-13]。据世界卫生组织统计,在5岁以下儿童死亡原因中,下呼吸道感染占第二位^[11-13]。液相芯片技术是近年来发展迅速的一种高通量、高灵敏度、高灵活性的检测平台,广泛

运用于临床诊断的各个领域,包括激素水平测定、核酸检测和免疫学分析等^[5-10]。本研究的检测均是基于Luminex Magpix液相芯片平台,在提高检测通量的同时也确保了检测结果的稳定性和可重复性。

本研究的监测时间历时1年,在2850例社区活动性肺炎患儿临床标本中发现了1720份(60.35%)病原学阳性标本,其中呼吸道合胞病毒(23.19%)、肺炎链球菌(22.07%)和流感嗜血杆菌(9.89%)是这1年间东莞市儿童社区活动性肺炎病例中检出率最高的3种病原体。呼吸道合胞病毒的检出率在13种病原体中最高,这提示临床医师在临床上不应忽视病毒性肺炎的存在,在进行诊断的时候除了参考常规的体格检查、血常规和X线检查之外,应更加重视病原学实验室检测的结果,科学合理地使用抗生素,避免对单一的病毒性肺炎病例使用抗生素^[3]。混合感染率最高的前5位病原体在严格意义上讲均是条件致病微生物(卡他莫拉菌、鼻病毒,流感嗜血杆菌,人偏肺病毒和肺炎链球菌),通常寄生于正常人体呼吸道粘膜中,在机体免疫力下降或原发感染出现之后引起继发性感染,在临床上检出此类病原体的时候应



注意有无其他病原体的合并感染,避免漏诊了原发感染病原体而延误病情^[2, 7, 14-18]。

在对各病原体的检出率就行年龄组间比较之后发现有9种病原体的组间检出率存在差异,其中百日咳杆菌、副流感病毒和呼吸道合胞病毒随着年龄组的增加,检出率逐步下降,呈现比较明显的下降趋势。这一结果与国内过往其他研究的结果^[19-22]类似,均是从低年龄组向高年龄组逐渐下降。这可能与低年龄组婴儿的自身免疫力较低有关。例如,目前的免疫规划要求新生儿应在6个月内完成百白破疫苗的接种,而这段时间恰好是新生儿对百日咳杆菌抵抗力最低的时段,离开了母体的保护,主动免疫屏障尚未形成,这都可以解释低年龄组相对较高的百日咳杆菌检出率。而肺炎链球菌、肺炎支原体的检出率与上述3种病原体恰好相反,随着年龄的增加,检出率呈现逐渐上升的趋势。这一趋势与国内其他同类研究的结果^[20-23]类似,这可能与机体呼吸道正常菌群的建立过程有关。婴儿期的呼吸道生态位特异性细菌群落以葡萄球菌属为优势种群,随着年龄的增加葡萄球菌属逐渐被嗜血杆菌属和链球菌属所替代,这也许可以解释肺炎链球菌在不同年龄组之间的检出率差异。但肺炎支原体检出率的组间差异仍然需要进一步的研究。

13种病原体中检出率季节性变化最明显的是呼吸道合胞病毒,呈现非常明显的双峰曲线,2个检出率高峰分别在3月份和9月份,造成这个月间差异的原因可能是与东莞本地典型的亚热带季风气候相关,3月份阴冷潮湿,9月份高温多雨,这种高湿度的环境可能对呼吸道合胞病毒的定植入侵有一定的帮助。此外,副流感病毒、人偏肺病毒、腺病毒和流感嗜血杆菌检出率较高的月份是在4-6月份,而百日咳杆菌、肺炎链球菌、肺炎支原体和卡他莫拉菌检出率较高的月份是在10-12月份,这一结果提示在日常的监测工作中可以根据不同的时间段有的放矢地关注特定的病原体,提高临床诊断过程的效率。

与传统的病原学分离培养及核酸分离培养检测技术相比,基于液相芯片法的流式PCR技术检测效率更高,通量更大,如果能够大规模运用于社区获得性肺炎监测项目,可大大减少监测哨点医院的工作量。但是该检测技术也存在短板,仅仅是对病原体的核酸进行检测,结果的特异性不如

传统的病原学分离培养方法^[8-10]。这2种检测技术互有优劣,建议在实际监测工作中串联使用,用液相芯片法进行病原学初筛,然后对阳性标本进行病原学分离培养,可有效提高监测系统的效率,更好地指导临床工作。

参考文献

- [1] Leung DT, Chisti MJ, Pavia AT. Prevention and control of childhood pneumonia and diarrhea [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2016, 63(1):67-79.
- [2] Yao KH, Wang LB, Zhao GM, et al. Pneumococcal serotype distribution and antimicrobial resistance in Chinese children hospitalized for pneumonia [J]. *Vaccine*, 2011, 29(12):2296-2301.
- [3] Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2010, 375(9725):1545-1555.
- [4] Kuriakose T, Hilt DA, Jackwood MW. Detection of avian influenza viruses and differentiation of H5, H7, N1, and N2 subtypes using a multiplex microsphere assay [J]. *Avian Dis*, 2012, 56(1):90-96.
- [5] Wu W, Tang YW. Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses [J]. *Clin Lab Med*, 2009, 29(4):673-693.
- [6] 应华娟,翁跃颂,傅中明,等. 不同方法检测支气管扩张患者下呼吸道病原体的评价 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(7):961-964.
- [7] 袁翔,陈文碧,刘靳波,等. 儿童下呼吸道临床分离菌的分布及耐药性 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(5):552-557.
- [8] 黎俊宏,姚萍,李琼,等. 多重PCR液相芯片技术在腹泻病原体检测中的应用 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(18):3390-3394.
- [9] 隋竑,王大燕,舒跃龙. 呼吸道病毒多病原检测技术研究进展 [J]. *病毒学报*, 2013, 29(2):238-244.
- [10] 王宇平,陈永义,张建明. 液相芯片技术在人类传染病检测中的应用 [J]. *现代预防医学*, 2015, 42(4):708-709, 716.
- [11] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 编辑委员会中华儿科杂志. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013修订)(上) [J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(10):745-752.
- [12] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 编辑委员会中华儿科杂志. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013修

- 订)(下)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(11):856-862.
- [13] 宁桂军, 王旭霞, 刘世文, 等. 2015-2016年甘肃省白银市5岁以下儿童社区获得性肺炎疾病负担回顾性调查[J]. 中国疫苗和免疫, 2017, 23(1):18-21.
- [14] 董泽丰, 郑田利, 范雪佳, 等. 2011-2013年成都地区发热呼吸道症候群住院患儿鼻病毒流行病学特征[J]. 吉林大学学报(医学版), 2016, 42(1):177-181.
- [15] 胡云鹤, 刘泉波. 儿童百日咳247例临床特点及重症百日咳危险因素分析[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(9):684-689.
- [16] 曾志奇, 刘文宽, 陈德晖, 等. 广州地区儿童呼吸道合胞病毒与肺炎支原体流行病学分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(22):1701-1704.
- [17] 刁连东, 徐爱强, 代表中华预防医学会. 百日咳免疫预防专家共识[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(6):550-553.
- [18] Makela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2):539-542.
- [19] 任吟莹, 黄莉, 王美娟, 等. 儿童呼吸道人副流感病毒临床特征及流行病学特点[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(4):270-274.
- [20] 靳淑雁, 刘世新, 郑静, 等. 2012-2014年深圳市5岁以下儿童肺炎流行特征与病原学分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(6):701-704.
- [21] 陈翊, 连广琬, 张莹莹, 等. 2012至2013年广州地区儿童社区获得性肺炎病原学分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2014(6):521-525.
- [22] 刘慧, 肖新才, 陆剑云, 等. 2009-2012年广州市社区获得性肺炎流行特征和病原学研究[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(12):1089-1094.
- [23] 张存, 周晓玉. 新生儿呼吸道微生物生态与疾病的关系[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(17):1358-1360.

(上接第319页)

- [10] 李鄂安, 张颖妍, 余文凯, 等. 全身麻醉联合硬膜外阻滞对腹腔镜结肠癌根治术患者POCD的影响[J]. 中国现代普通外科进展, 2016, 19(7):519-522.
- [11] 杨华, 郝雪莲, 何文龙. 全麻联合硬膜外阻滞对老年腹腔镜结肠癌根治术后认知功能障碍的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(10):1512-1516.
- [12] Nonaka T, Hara M, Miyamoto C, et al. Comparison of the analgesic effect of intravenous acetaminophen with that of flurbiprofen axetil on post-breast surgery pain: a randomized controlled trial[J]. Journal of Anesthesia, 2016, 30(3):405-409.
- [13] 陈永浩, 尹述洲, 文世雄. 硬膜外麻醉对老年患者术后认知功能的影响[J]. 医学综述, 2015, 21(24):4562-4564.
- [14] Steinmetz J, Rasmussen LS. Peri-operative cognitive dysfunction and protection[J]. Anaesthesia, 2016, 71(S1):58-63.
- [15] 王海斌, 邱正国, 鲍红. 不同全身麻醉方法对老年患者术后认知障碍的影响研究[J]. 山西医药杂志, 2016, 45(19):2295-2297.
- [16] 秦娅, 齐敦益, 焦皓. 依托咪酯乳剂复合硬膜外麻醉对老年妇科患者术后早期认知功能的影响[J]. 徐州医学院学报, 2017, 37(8):510-512.
- [17] 郭红利, 张先杰, 周裕凯, 等. 不同麻醉药物对老年骨科手术患者术后认知功能的影响及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(7):643-646.
- [18] Karmakar MK, Samy W, Lee A, et al. Survival analysis of patients with breast cancer undergoing a modified radical mastectomy with or without a thoracic paravertebral block: a 5-year follow-up of a randomized controlled trial[J]. Anticancer Research, 2017, 37(10):5813-5820.
- [19] Harris T, Kerry SM, Victor CR, et al. Application of lidocaine combined with parecoxib in elderly patients undergoing laparoscopic radical resection for colon cancer[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2014, 384(14):S3.
- [20] 程向阳, 顾尔伟. 相同麻醉深度下全麻联合硬膜外阻滞和单纯全身麻醉的比较[J]. 蚌埠医学院学报, 2013, 38(2):137-138.

自然流产的遗传学检测研究进展

刘祥举*

[摘要] 临床导致自然流产(SA)的病因复杂,其中染色体异常是主要原因。对流产物进行染色体异常排查,不仅可以明确本次流产的原因,还可以通过结合遗传咨询及辅助生殖手段指导再次妊娠。随着分子生物学技术的发展,自然流产的遗传学检测方法也越来越多,各具优势。近年来发展起来的高通量检测方法不仅可以一次性扫描全部染色体,而且提高了自然流产检测的成功率和准确性。本文就SA的遗传学检测技术研究进展进行综述,旨在为临床选择合适的染色体异常检测技术提供参考。

[关键词] 自然流产;染色体异常;遗传学检测方法

Advances in genetic testing of spontaneous abortion

LIU Xiangju*

(Taian Maternal and Child Health Hospital Prenatal Diagnosis Center, Taizhou, Shandong, China, 271000)

[ABSTRACT] Spontaneous Abortion (SA) has a complex etiology, and chromosomal abnormalities are the main cause of SA. The chromosomal abnormality of the convective products can not only clarify the cause of the abortion, but also guide the re-pregnancy by combining genetic counseling and assisted reproductive means. With the development of molecular biology, there are more and more genetic methods to test abortion tissue with their own advantages. The high-throughput technique developed in recent years can scan all chromosomes at one time, and improve the success rate and detection accuracy. This review summarizes the advances on the SA detection in molecular biology technique, in order to provide a reference for selecting proper chromosomal abnormality detection technologies.

[KEY WORDS] Spontaneous Abortion; Chromosome abnormality; Genetic testing method

自然流产(Spontaneous Abortion, SA)发病率占确诊妊娠案例的10%~15%,其病因复杂,相关研究认为遗传特别是染色体异常是导致SA的主要因素^[1-2]。染色体异常包括染色体数目异常、结构异常、多倍体以及嵌合体等^[3]。目前临床上染色体异常的遗传学检测方法包括G显带染色体核型分析、荧光原位杂交技术(fluorescent in situ hybridization, FISH)、荧光定量PCR(quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR)、多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)、染色体微芯片技术(chromosomal microarray, CMA)以及下一代测序技术(next-

generation sequencing, NGS)等^[4]。SA能增加再次妊娠失败的发生率及其他妊娠合并症的发病率。采用合适的检测方法对染色体情况进行分析,阐明SA病因,对再次妊娠有重要的指导意义。因此,本文就SA的遗传学检测技术研究进展进行综述,旨在为临床选择合适的染色体异常检测方法提供参考。

1 自然流产概述

SA是产科最常见的妊娠合并症。据报道大约有10%~15%已确诊的妊娠会在妊娠20周前发生自然流产^[1-5]。根据流产发生时间的不同,将孕12

作者单位:泰安市妇幼保健院产前诊断中心,山东,泰州 271000

*通信作者:刘祥举, E-mail: taishan5068@163.com

周前流产称为早期流产,孕12周及以后的自然流产称为晚期流产。根据流产次数将与同一性伴侣连续遭受2次或2次以上的自然流产称为复发性自然流产^[6]。目前已知的自然流产诱发因素众多,涉及遗传、免疫、感染、内分泌、环境及其他未知因素等^[7]。遗传因素中染色体异常是目前公认的导致SA的最主要因素,超过50%的SA是由染色体异常引起的^[8]。染色体异常的类型有染色体数目异常、染色体结构异常、嵌合体及多倍体等。在SA病例中,染色体数目异常出现频率最高(高达90%),结构异常约占6%,其他嵌合体约占1-2%,而多倍体出现频率较低^[9-10]。SA并发症众多,不利于孕妇的身心健康,且随着流产次数的增加,提升了再次妊娠流产的几率^[11]。目前,对于遗传因素引起的SA尚无有效诊治方法。对流产物及孕妇夫妻双方进行染色体排查,并结合遗传咨询和辅助生殖手段,对再次妊娠的指导具有重要的意义。

2 自然流产的主要遗传学检测技术

染色体异常是SA的主要原因,其检测常通过采集流产组织、刮宫组织、引产组织等样品,从中挑取由受精卵发育成的胎儿、胚胎或绒毛等组织进行细胞培养或者DNA提取,采用分子生物学检测方法对其进行检测,通过对其染色体异常状况进行分析,再结合夫妻双方的遗传背景辅助分析发生SA的遗传因素,为后续的生育提供科学依据和合理指导。临床上常见的SA遗传学检测方法有以下几种。

2.1 G显带染色体核型分析

G显带染色体核型分析是流产物染色体检测的“金标准”^[4]。该方法通过对流产物进行细胞培养后制备染色体标本,利用显微镜观察染色体数目及形态结构进而分析检测结果。核型分析技术优点在于能够检测染色体的数目异常(如三体、单体或多倍体)和5兆碱基(mega base, Mb)以上的结构异常(如易位、倒位)^[12],尤其是对染色体平衡易位的检测是其他分子生物学方法无法取代的。此外,G带型的相对稳定也使得该技术仍在临床上应用最为普遍^[13]。张建林、朱蕊等^[2, 14]通过对自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析证实了胚胎染色体异常是造成自然流产的重要原因;邱惠国、王瑾等^[15-16]分别通过G显带染色体核型分析

技术检测出了染色体数目异常、染色体结构异常(包括平衡易位、罗伯逊易位、倒位、插入和缺失等)及染色体多态性,证实染色体核型异常是导致不孕不育、SA的主要原因。由此可见,G显带核型分析技术可以检出多种染色体异常类型,为SA病因分析提供了全面指导,同时对流产夫妇双方的染色体核型辅助分析也为胚胎停育的病因分析提供了依据。G显带染色体核型分析技术虽然有其不可替代的优势,但该技术主要依赖于细胞培养,培养过程容易受到母体细胞污染,且在实际临床应用常常出现因为所取流产物过于陈旧影响染色体的制备情况,进而影响检测结果;甚至因为其冗长的培养过程使检测周期可长达一个月,这些都在一定程度上限制了其在临床上的应用,同时也促进了其他分子生物学技术的诞生。

2.2 荧光原位杂交技术

核型分析技术的局限性使得FISH技术逐渐应用于流产物的检测。FISH技术是将荧光标记的已知核酸序列作为探针,与待检测染色体中的靶序列进行杂交,然后在荧光显微镜下观察荧光信号从而分析待测样本染色体情况^[17]。该技术免去了细胞培养这一复杂且失败率高的步骤,从标本制备到患者拿到报告这一过程仅需24-48h,极大地缩短了临床报告时间,这些优势在一定程度上弥补了G显带染色体核型分析技术的不足,使其在流产物的检测中得到一定程度的应用^[4, 17]。Leung等^[18]对大样本研究结果显示的极高成功率更是证实了FISH技术应用于流产物检测的可行性,国内近年来的研究也显示了该技术用于流产物检测的高成功率^[19, 20],这些证据为FISH的临床应用提供了信心。然而,FISH技术的高成功率仅表现于对染色体数目异常的检测,其对染色体的结构异常亦无能为力。而且由于该技术探针的局限性,常常仅针对常见的已知染色体异常进行检测。综合其检测成功率、成本、操作及实验周期等因素,该技术目前在临床上仍有一定的应用比例。

2.3 荧光定量PCR

QF-PCR技术是采用多对经荧光标记的引物对染色体特异的多态性短串联重复序列(short tandem repeat, STR)进行PCR扩增,然后对PCR产物进行毛细管电泳,再根据引物荧光信号强度比较杂合性STR位点双峰的比值,进而诊断染色体数

目。该技术在1993年首次应用于染色体异常的检测,因其报告时间短、自动化程度高、价格相对便宜,迅速在临床上得到广泛应用^[21]。Coelho等^[22]采用QF-PCR对130例流产样本的染色体异常检测结果(54.6%)显示了其与常规染色体核型分析结果(48%)的一致性,且检出8例(11.3%)多倍体亦与传统的细胞遗传学检测结果(12%)相符,证实了QF-PCR技术用于染色体非整倍体及多倍体检测的可靠性。此外,该技术还可以根据STR位点判断染色体的来源,排除母体污染情况,为下次妊娠提供更多的遗传咨询信息^[23]。目前国内外已经有成熟的商品化试剂盒,如Aneufast、TrueScience™Aneuploidy STR Kits以及达安基因自主研发生产的21三体性和染色体多倍体检测试剂盒等。然而,这些试剂盒都只对21、18、13及X和Y 5条染色体进行检测,并不能检测剩余染色体的数目异常,也不能检测染色体的结构异常,同时,尚未有基于中国人群STR位点的大样本研究数据,这也是目前QF-PCR多被应用于产前诊断的原因。

2.4 多重连接探针扩增技术

2002年,Schouten等^[24]报道了一种可于同一反应管中同时检测40个不同核苷酸序列的拷贝数变化的新方法。MLPA为一种定性和半定量技术,每一个待测基因均包含一长一短的两个荧光标记探针,这对探针能够与染色体靶序列进行分子杂交,经连接酶连接、多重PCR扩增后将产物用序列基因分析仪电泳分析检测结果。MLPA技术具有通量相对高(可同时检测几十个样本)、速度快(24~48 h可得到检测结果)、分辨率高(可识别50~70 bp的拷贝数变异)的特点^[4]。该技术自诞生后已在基因拷贝数分析、异倍体检测、产前诊断、突变缺失、单核苷酸多态性等多方面检测研究中广泛应用^[25]。早在2009年国外就将MLPA与FISH及染色体核型分析检测结果进行了比对,结果显示MLPA检测灵敏度、特异度可达100%,证实了MLPA用于染色体非整倍体检测的有效性^[26]。随着MLPA技术的推广运用,研究者逐渐发现MLPA应用于SA组织染色体异常的检测具有一定的临床应用价值,但也存在一定的局限性,如无法检测多倍体、平衡易位以及无法对探针不涉及的未知染色体变异进行检测等。MLPA技术存在自身的优势与劣势,应从实验室自身具体情

况出发,选择合适的检测分析方法,以期为患者提供更全面的遗传咨询信息。

2.5 染色体微芯片技术

CMA技术是近年来发展起来的高通量检测技术,主要包括两大类:微阵列比较基因组杂交技术(array comparative genomic hybridization, array-CGH)和单核苷酸多态性微阵列技术(single nucleotide polymorphism array, SNP-array)。

比较基因组杂交技术(comparative genomic hybridization, CGH)是自1992年后发展起来的一种分子细胞遗传学技术,其基本原理将待测DNA和对照DNA分别标记不同的荧光素后与正常染色体杂交,经荧光数字成像系统扫描后通过比较两种荧光素的相对浓度来检测两种DNA拷贝数的变化。CGH检测分辨率约为3~10Mb^[27],与核型分析技术检测分辨率相当,为了提高分辨率,研究者将微阵列技术引入,诞生了array-CGH技术。Array-CGH技术通量高,分辨率可达200 kb,并且能一次性扫描全基因组拷贝数变异(copy number variation, CNV),尤其是对全基因组微小染色体异常的检测更是将染色体病的诊断提高到基因水平。临床已将该技术应用于发育迟缓/智障、自闭症、先天畸形等方面的病因筛查^[28]。而Gao J等^[29]的研究则证实了该技术用于流产病因分析的可靠性和适用性,但该研究结果也表明array-CGH技术并不适用于多倍体的检测。同时,基于其检测原理,array-CGH技术对于芯片探针无法覆盖的染色体区段将无法检测,这将限制了发现新发疾病或突变的可能;对于单亲二倍体(uniparental disomy, UPD)的检测也受到限制。Agilent公司的芯片是目前array-CGH技术的主流平台。

与array-CGH技术检测原理不同,SNP-array技术只需将杂交后的待测样本与一整套正常基因组对照资料进行对比即可获得诊断。除了array-CGH技术的检测范围以外,SNP-array技术还能够检出核型分析、MLPA、FISH及array-CGH都无能为力杂合性缺失(Loss of Heterozygosity, LOH)和UPD^[30]。UPD与完全性葡萄胎相关,也是导致流产的原因之一^[31]。虽然SNP-array技术具有独一无二的检测能力,但高昂的成本阻碍了该技术在临床上的普及,目前只有有限的临床科室在使用该技术。与array-CGH技术局限相同的是,SNP-array技术也不能检测未知的突变或疾病。此外,

SNP-array 技术对于染色体的平衡易位、倒位、多倍体(除三倍体外)等也无法检测。Affymetrix 公司的芯片是目前 SNP-array 技术的主流平台。

CMA 技术具备其他检测技术所不能达到的检测能力,且对样本要求低,对于流产物样本常为陈旧标本尤为适宜。但其高分辨率也是一把“双刃剑”,虽然能为流产病因分析提供全面的信息,但检测出的小片段 CNV 常常也给临床报告解读医生带来困扰,尤其是对于现有数据库中尚未明确的 CNV 的解读需要更加谨慎。

2.6 下一代测序技术

自 2005 年以来,NGS 从生物医学研究领域逐渐应用到临床诊断,将临床分子诊断推进一个新高潮。NGS 技术的基本原理是基于 PCR 扩增,将带有标志物的碱基加入反应中,根据碱基互补原则,碱基结合 DNA 模板时采集生物标志物发出的信号进行序列信息的读取,以达到测序的目的。根据采集信号的不同,目前临床上常用的 NGS 平台分别有以采集光信号为代表的 Illumina 公司的 Solexa 测序平台及以采集 H⁺流信号为主 Life Technologies 公司的 Ion torrent 半导体测序平台^[32]。NGS 最早用于临床染色体异常检测为无创产前诊断(noninvasive prenatal testing, NIPT),其检测的准确性及可靠性已得到大规模临床应用数据的支持^[33, 34]。随着 NGS 技术的进步和测序成本的大幅下降,NGS 在临床各领域的应用如雨后春笋般普及开来。受益于其成本的下降及操作的简便,NGS 也在流产物检测中得到应用。Shen 等^[35]采用 436 例早期自然流产的样本评估 array-CGH 技术和 NGS 技术流产物检测的应用效能,结果显示 array-CGH 和 NGS 检出率高,能够检测出传统核型分析漏检的对于复发性流产夫妇遗传咨询尤为重要的染色体的微重复和微缺失。郭依琳等^[36]的研究结果也证明了 NGS 技术用于流产物遗传学分析的价值。与前面介绍的几项技术相比,NGS 除了具有高分辨率、高敏感性和准确性、自动化程度高、成本低、对样本要求低、能够一次性扫面全基因组等优点以外,还可以发现 CMA 平台未能覆盖的 CNV 以及尚未有报道的新发突变,这对于流产的病因分析,尤其是反复性流产夫妇的遗传咨询尤为重要。尽管 NGS 在流产物检测上有众多的优势,该技术平台也存在自身的局限,如 NGS 不能检出 UPD 及多倍体异常,而且 NGS 分辨较 CMA 平台

更高,因此,在临床应用时应该了解技术平台的局限性,为患者的遗传咨询提供准确信息。

3 小结与展望

染色体异常为 SA 的主要病因。目前临床上用于染色体异常检测的分子生物学技术已经大幅度提高染色体异常检出率,但各具局限性。已有研究将 NGS 和 QF-PCR 技术进行联合检测,有效地检出了染色体多倍体。这提示我们在日常临床工作中,应了解各项检测技术的优缺点,通过联合检测手段,在现有技术基础上增加染色体异常检出率,为后续遗传咨询提供更多更准确的信息。

参考文献

- [1] 马韵翼,吴东,霍晓东,等.孕早期自然流产组织基因组拷贝数变异分析[J].中华实用诊断与治疗杂志,2018,32(10):971-973.
- [2] 朱蕊,曾爱群,杜晶春.131例早期自然流产绒毛细胞培养及染色体核型分析[J].贵州医科大学学报,2017,42(10):1179-1182.
- [3] Hyde K J, Schust D J. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015,5(3):a23119.
- [4] 李志毅,刘欣燕.流产组织的遗传学检测进展[J].中国计划生育和妇产科,2016,8(2):17-22.
- [5] Wang M Z, Lin F Q, Li M, et al. Semiconductor Sequencing Analysis of Chromosomal Copy Number Variations in Spontaneous Miscarriage [J]. Med Sci Monit, 2017,23:5550-5557.
- [6] 张娜.自然流产与自然流产夫妇染色体异常的关系[D].天津医科大学,2015.
- [7] Krieg S, Westphal L. Immune Function and Recurrent Pregnancy Loss [J]. Semin Reprod Med, 2015, 33(4):305-312.
- [8] Kim J W, Lee W S, Yoon T K, et al. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment [J]. BMC Med Genet, 2010, 11: 153.
- [9] Hyde K J, Schust D J. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015,5(3):a23119.
- [10] Perez-Duran J, Najera Z, Trujillo-Cabrera Y, et al. Aneusomy detection with Karyolite-Bac on Beads (R) is a cost-efficient and high throughput strategy in the molecular analyses of the early pregnancy conception losses [J]. Mol Cytogenet, 2015,8:63.

- [11] 庞冬. 复发性流产与染色体异常的相关研究[D]. 广西医科大学, 2018.
- [12] Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(11):2913-2922.
- [13] Shaffer L, McGowan J, Schmid M, et al. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature[J]. 2013.
- [14] 张建林, 张俊荣, 杨益梅, 等. 226例早期自然流产绒毛组织的细胞遗传学分析[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(17):3958-3960.
- [15] 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.
- [16] 王瑾, 陶靖, 鲁婷, 等. 2178对自然流产史夫妇染色体分析[J]. *实用妇产科杂志*, 2018, 34(1):42-45.
- [17] 曹懿, 徐军. 自然流产的分子细胞遗传检测技术研究进展[J]. *上海医学*, 2016, 39(09):574-578.
- [18] Leung W C, Lau E T, Lao T T, et al. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4(3):333-337.
- [19] 施建有, 童郁, 蔡晓晓, 等. 应用FISH技术快速诊断512例稽留流产者绒毛组织染色体数目异常[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2018, 26(7):22-24.
- [20] 范雪梅, 唐欣然, 付一元, 等. 应用荧光原位杂交技术分析581例自然流产绒毛染色体异常的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(1):46-47.
- [21] Mansfield E S. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms[J]. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(1):43-50.
- [22] Coelho F F, Marques F K, Goncalves M S, et al. Detection of aneuploidies in spontaneous abortions by quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers: a retrospective study [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3).
- [23] Comas C, Echevarria M, Carrera M, et al. Rapid aneuploidy testing versus traditional karyotyping in amniocentesis for certain referral indications [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010, 23(9):949-955.
- [24] Schouten J P, McElgunn C J, Raymond W, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation - dependent probe amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(12):e57.
- [25] 杨斌, 张帆, 苏日娜, 等. 多重连接探针扩增技术及其在疾病诊断中的应用[J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(11):20-24.
- [26] Van Opstal D, Boter M, de Jong D, et al. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation - dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples [J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(1):112-121.
- [27] Acmg, 姚怡心. 芯片技术及其在医学遗传染色体异常诊疗中的应用指南[J]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2013, 5(2):50-53.
- [28] 李颖. 染色体微阵列分析在自然流产、死胎中的应用[D]. 广州医科大学, 2014.
- [29] Gao J, Liu C, Yao F, et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion[J]. *Mol Cytogenet*, 2012, 5(1):33.
- [30] 张建林, 张玉泉. 细胞分子学技术在自然流产绒毛组织中的应用及进展[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(1):214-215.
- [31] 阳鑫妙, 李雯雯. 荧光原位杂交和SNP array分析用于流产组织查因的对比研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2018, 26(9):6-8.
- [32] 邵向阳, 徐伟文. 下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(5):289-296.
- [33] Pescia G, Guex N, Iseli C, et al. Cell-free DNA testing of an extended range of chromosomal anomalies: clinical experience with 6, 388 consecutive cases [J]. *Genet Med*, 2017, 19(2):169-175.
- [34] Zhang H, Gao Y, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146, 958 pregnancies [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45(5):530-538.
- [35] Shen J, Wu W, Gao C, et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology [J]. *Mol Cytogenet*, 2016, 9:7.
- [36] 郭依琳, 顾茂胜, 王莉, 等. 高通量测序技术用于流产物遗传学分析的价值[J]. *中华围产医学杂志*, 2018, 21(12):808-816.

广州市分子与功能影像临床转化重点实验室

广州市分子与功能影像临床转化重点实验室位于广东省广州市天河区黄埔大道西613号,依托暨南大学附属第一医院,2019年经广州市科学技术局批准,以分子影像与功能影像技术为核心,以疾病为导向,围绕肿瘤与神经系统重大疾病两大主要方向的市级重点实验室。支撑学科影像医学与核医学专业系广东省珠江学者设岗单位,广东省特色重点学科、省临床重点专科。实验室现有高级职称21人,博士生导师19人,硕士生导师20人,涵盖基础医学、医学影像学、药学、化学材料学、生物信息学、计算机学、心理学、精神医学、神经康复学等中青年骨干。岗位平台的基础科研及临床研究与转化条件已达到国内先进水平,设备硬件总价值超过1亿元,包括PET/CT-MRI多模式分子影像系统、MRI 3台、320排640层动态容积CT 1台、临床型CT 3台、数字一体化介入复合手术室1个、DSA 3台、SPECT及SPECT/CT(2台)、DXA骨密度仪(2台)、Bruker小动物9.4T磁共振系统1套;拥有医用回旋加速器正电子药物生产系统一套(美国GE公司,可生产 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 三种正电子核素)。

该实验室以分子影像与功能影像技术为核心,以疾病为导向,围绕肿瘤与神经系统重大疾病两大主要方向,通过分子生物学、纳米科学、药理学、物理学、化学、计算机学等多学科的交叉与融合,开展基于分子影像与功能影像的多种肿瘤和神经系统疾病的发生发展机理研究,和诊断、活体疗效及预后分析的精准可视化定量评估,致力于在获得一系列重大原创性成果的同时,实现基础研究向临床应用的过渡与转化。

实验室近三年主持国家级重点重大项目4项,国家自然科学基金项目15项,省部级重点重大专项8项,项目经费总额近4000万元。累计申请国内外发明专利及计算机软件著作权40余项,其中近三年获授权13项。获国家科学技术进步二等奖1项,广东省科学技术进步一等奖1项、二等奖1项及三等奖1项,广东省丁颖科技奖2项,广州市科学技术奖励二等奖1项。近年来承担国家自然科学基金项目近10项和省部级科研项目15项。获广东省科学技术奖二等奖1项。获授权国家发明专利8项。2015年以来共发表科研论文200余篇,其中SCI收录文章80余篇。主编及参编专著20余部。近3年共培养50余名硕士及博士毕业生,在读全日制硕士及博士研究生60余名。

学术带头人罗良平,德国医学博士,医学影像学二级教授,博士生导师,暨南大学医学部主任、暨南大学研究生院执行院长,暨南大学医学学位评定分委员会主席,广东省医学领军人才。广州市分子与功能影像临床转化重点实验室主任,广东省医学影像人工智能肿瘤精准诊疗工程研究中心主任,第十五届中华放射学会心胸学组副组长,广东省医学会放射学分会副主任委员,广东省医师协会放射学分会副主任委员,广东省医学教育协会会长;从事肿瘤分子影像学研究,先后主持国家级、省部级科技项目15项,其中包括国家自然科学基金项目、广东省自然科学基金重点项目、广东省科技厅前沿与关键技术创新项目等。



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。

