



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

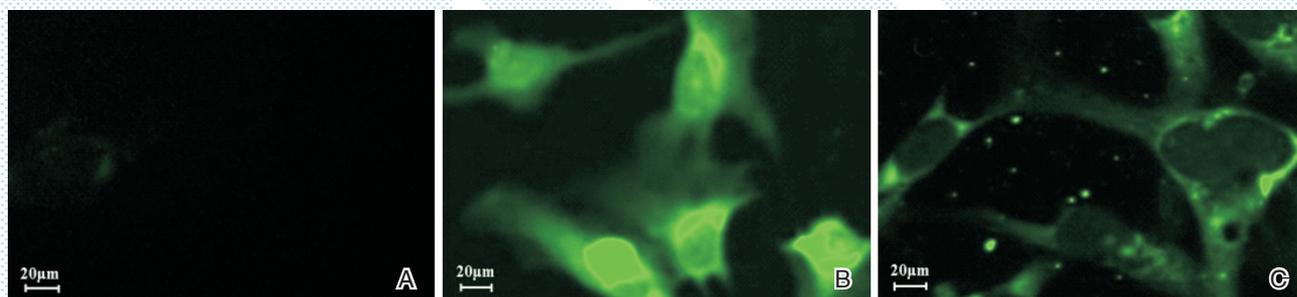
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2016年7月 第8卷 第4期 总第44期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 8 Number 4 July 2016



A: 一抗为抗E抗体(1:10); B: 一抗为抗NS1抗体(1:10); C: 一抗为抗NS1(1:50)

图(P259) 免疫荧光法检测抗NS1抗体与HMEC-1细胞交叉反应性

Figure(P259) The cuoss-reactivity of the anti-nonstructural protein 1 antibodies with HMEC-1 demonstrated immunofluorescence assay

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

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

分子诊断与治疗杂志

二〇一六年七月

第八卷 第四期

中山大学

鲁凤民



鲁凤民，《分子诊断与治疗杂志》第四届编辑委员会编委。

1963年4月出生。1981—1986年就读于河南医科大学医疗系，1992年毕业于哈尔滨医科大学，获医学博士学位。曾赴瑞典 Karolinska 研究所、美国 MCP-HAMMAN 病毒与肿瘤研究所、美国费城儿童医院做访问学者和博士后

研究。2001—2005年在宾夕法尼亚大学肿瘤中心工作。

现任北京大学基础医学院病原生物学系教授，博士生导师，系主任，兼任北京大学基础医学院副院长。为国务院学位委员会学科评议组成员，中国微生物学会病毒学工作委员会常委，北京市微生物学会常委，北京医学会病毒学分会常委，国家病原微生物卫生应急实验室网络专家委员会委员；作为学组秘书，全程参与了国家中长期科技发展规划“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项《病毒性肝炎领域》实施方案的编写和论证工作；作为召集人，完成了北京市《科技促进市民生活质量改善主题》“病毒性肝炎防治关键技术研究”重大专项的立项、申报和组织实施工作。兼任《生物学通报》、《中国病毒病杂志》、《中国输血杂志》、《中华肝脏病杂志》、《中华医学英文杂志》等多个学术期刊的常务编委或编委。

鲁凤民教授长期从事慢性病毒性肝炎及肝癌的致病机制和转化医学研究，在肝炎病毒相关检测技术及诊断试剂研发方面形成了一定的特色和优势，揭示了血清中 HBV RNA 的产生机制，提出了血清 HBV RNA 可作为乙肝抗病毒治疗安全停药潜在的标志物分析和验证了多个宿主基因遗传和表观遗传学改变在 HBV 感染相关肝癌中的作用；通过系统的分析研究，首次提出了 HBV 整合通过影响宿主基因功能致癌的新观点；在国际上首次将 CRISPR 技术与 microRNA 技术结合，在破坏 cccDNA 的同时，可抑制 cccDNA 池的补充，进而加快 cccDNA 的清除，此项工作在 2015 年的美国肝病年会上引起关注。承担及完成国家、省部级研究课题 20 余项，其中主持国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十一五”和“十二五”计划课题各 1 项；主持国家自然科学基金课题 5 项、参加国家“863”、“973”课题 3 项、国际合作课题 3 项。作为主要参加者获国家科技进步二等奖 2 项（署名分别为第 6 和第 10）、中华医学科技三等奖 1 项（署名第 4）。发表相关论文 100 余篇，其中 SCI 收录 80 余篇（“N Eng J Med”、“J Hepatol.”、“Cancer Res.”、“Oncogene”等）。作为主编、副主编或编委共参编专著 8 部。招收和培养博士后、博士及硕士研究生 30 余名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016年7月 第8卷 第4期 总第44期 Bimonthly Volume 8 Number 4 July 2016

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
顾问	来茂德 申子瑜
主编	李明
编辑部主任	徐伟文
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 叶萍萍 李彩珍
排版	钟华安
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	广州中大印刷有限公司
出版日期	2016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>
Consultant	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>XU Weiwen</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</i>
Typesetting	<i>ZHONG Huaan</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2016.7.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2016年7月 第8卷 第4期

目次

述 评

- 下一代测序技术的临床应用规范化问题
——参考美国医学遗传学与基因组学会行业标准 姜烈君 陆晓旭 黄华艺 (217)

论 著

- 法医学常用15个STR基因座的突变分析 邱平明 陈玲 余嘉欣 等 (222)
- 中国型 $C\gamma^+$ ($A\gamma\delta\beta$) 0 地中海贫血的基因诊断和临床特征分析
..... 王继成 秦丹卿 骆明勇 等 (227)
- 一种快速甄别总肠道病毒的基因分型方法 欧志英 吴韶清 尹应先 等 (231)
- 中国广东地区汉族人群P选择素糖蛋白配体-1 *Met62Ile* 基因多态性
与冠心病的相关性探讨 明凯华 雷秀霞 邹愉 等 (237)
- 地中海贫血实验室筛查指标评价 陈熙 肖克林 罗茗月 等 (242)
- 耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌耐药基因检测及分析 涂海健 陈淑娟 林群英 等 (246)
- ZEB1在散发性伯基特淋巴瘤中的表达及意义 张守华 黄慧 徐红艳 等 (252)
- II型登革病毒非结构蛋白1多克隆抗体制备和免疫特征分析
..... 杨小猛 赵丹 杜丽伟 等 (256)
- 2006-2015年东莞市无偿献血者丙肝病毒感染情况分析 钟焯辉 张玉翌 黄志森 等 (261)
- 广东地区育龄妇女细小病毒B19感染筛查结果分析 何天文 黄滨梅 王逾男 等 (265)
- 酒精对肝脏蛋白酶体成熟的影响 张莉 阎明 江堤 等 (268)
- 游离金雀异黄素和大豆苷元大鼠尿液排泄动力学研究 邹慧琴 刘亚兰 余梦杰 (272)

综 述

- 登革病毒治疗性抗体的基础研究进展 尹庆庆 王建宇 陈强 等 (277)

讲 座

- 《医疗器械生产监督管理办法》解读 刁春芳 黄海琪 高旭年 (287)

专家风采

- 鲁凤民 (封二)

实验室巡礼

- 北京大学医学部鲁凤民教授实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 4 July 2016

CONTENTS

COMMENTS

The standardization of the next generation sequencing technologies in clinical application :
in reference to the ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing

JIANG Liejun , LU Xiaoxu , HUANG Huayi (217)

ORIGINAL ARTICLES

Mutations of 15 Short Tandem Repeat Loci for forensic application

QIU Pingming , CHEN Ling , YU Jiaxin , LU Huijie , NIU Mufei , LIU Chao (222)

Genetic research and clinical analysis of deletional Chinese $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ - thalassemia

WANG Jicheng , QIN Danqing , LUO Mingyong , HE Tianwen (227)

A rapid genotyping assay for primary total enterovirus screening

OU Zhiying , WU Shaoqing , YIN Yingxian , LI Lixia , ZHOU Rong , XU Yi , GONG Sitang (231)

Investigate the relationship between P-selectin glycoprotein ligand-1 *M62I* gene polymorphism and
coronary heart disease in China Guangdong Han Population

MING Kaihua , LEI Xiuxia , ZOU Yu , YANG Na , XU Banglao , HUANG Ziyi (237)

Evaluation of laboratory index for screening thalassemia

CHEN Xi , XIAO Kelin , LUO Mingyue , MAI Guangxing , XIA Yong (242)

Detection and analysis of the drug resistant genes associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

TU Haijian , CHEN Shujuan , LIN Qunying , XU Guanghui (246)

Expression of ZEB1 in sporadic Burkitt lymphoma and its clinical significance

ZHANG Shouhua , HUANG Hui , XU Hongyan , WU Yan , ZENG Songtao , HUANG Chuansheng ,

YANG Wenping (252)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 4 July 2016

CONTENTS

- Preparation and immune signature analysis of anti-dengue virus type 2 nonstructural protein 1 in vitro
YANG Xiaomeng, ZHAO Dan, DU Liwei, CHEN Xiang, JIANG Lifang (256)
- Analysis of HCV infection among voluntary blood donors in Dongguan city from 2006 to 2015
ZHONG Chihui, ZHANG Yuzhao, HUANG Zhisen, HE Ziyi, ZENG Tao (261)
- Screening results on human parvovirus B19 infection in women of childbearing age in Guangdong area
HE Tianwen, HUANG Binmei, WANG Yunan, ZHONG Zhicheng, CHEN Keyi, YIN Aihua (265)
- Effect of alcohol on proteasome assembly in hepatic tissue
ZHANG Li, YAN Ming, JIANG Di, SUN Xianjiu, ZUO Haijun, LIU Meihong (268)
- Investigation of urinary pharmacokinetics of free genistein and daidzein in rats
ZOU Huiqin, LIU Yalan, YU Mengjie, WANG Haipeng, WANG Yu, XIE Baogang, ZHANG Shouhua (272)

REVIEWS

- Recent progress in basic research concerning the therapeutic anti-dengue antibodies
YIN Qingqing, WANG Jianyu, CHEN Qiang, ZHOU Xiaohong (277)

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016年7月 第8卷 第4期 总第44期 Bimonthly Volume 8 Number 4 July 2016

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
顾问	来茂德 申子瑜
主编	李明
编辑部主任	徐伟文
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 叶萍萍 李彩珍
排版	钟华安
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	广州中大印刷有限公司
出版日期	2016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>
Consultant	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>XU Weiwen</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</i>
Typesetting	<i>ZHONG Huaan</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2016.7.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

下一代测序技术的临床应用规范化问题 ——参考美国医学遗传学与基因组学会行业标准

姜烈君¹ 陆晓旭¹ 黄华艺^{1,2*}

[摘要] 下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术已经在临床实验室中得到应用。该技术的发展以及检测规模和应用范围的扩大,使基因检测成本大大降低。NGS技术在临床上的应用在不断地扩大,如疾病靶向基因组套检测、个体外显子组或全基因组分析等。同时,NGS技术也进一步改善了治疗决策和对某疾病高危人群的预测。然而,NGS技术的发展也充满了挑战性,包括测序平台和技术更新带来的选择困惑、测序结果的临床验证的不一致性问题等。为了帮助临床实验室更好地了解NGS技术、解决临床验证和正确选择NGS测序平台和方法,以及持续监控NGS并保证高质量的测序结果及其临床解释,本文结合美国医学遗传学和基因组学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)关于NGS技术在临床上的应用的专业标准和指南进行归纳和讨论,供我国分子诊断工作者制定国内行业标准时参考。

[关键词] 美国医学遗传学和基因组学会;下一代测序;疾病靶向的基因组套测序;外显子组测序;全基因组测序

The standardization of the next generation sequencing technologies in clinical application: in reference to the ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing

JIANG Liejun¹, LU Xiaoxu¹, HUANG Huayi^{1,2*}

(1. Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China, 530021; 2. Department of Surgical Oncology, Roswell Park Cancer Institute, Elm & Carlton Streets, Buffalo, New York, USA, 14263)

[ABSTRACT] Next-generation sequencing (NGS) technologies have been utilized in clinical laboratories. The advancement of technologies and expansion of the test scales and applications led to significant reductions in the cost of NGS test. The NGS technologies are still advancing in clinical laboratories, such as disease targeted gene panel, exome, and the whole genome sequencing. NGS technologies are also enhancing further advances in therapeutic decision making and disease prediction for populations who are at high risk of a potential disease. Nevertheless, the advancement of NGS is full of challenges in clinical applications including the fast update of platform and technologies leading to confusion in platform selection, the difficulties in clinical verification of sequencing data, etc. In order to help clinical laboratories with the validation of NGS methods and platforms, the ongoing monitoring of NGS testing to ensure quality results, and the interpretation and reporting of variants obtained using these technologies, this paper briefly summarized and discussed the standard and guidelines of NGS technologies in clinical applications in reference to the American College of Medical Genetics and Genomics to serve as a reference guidelines in establishing a local standard and guidelines for clinical laboratories in China.

[KEY WORDS] American College of Medical Genetics and Genomics; Next-generation sequencing; Disease-targeted gene panels; Exome sequencing; Genome sequencing

作者单位:1. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530021

2. 罗斯维尔帕克癌症研究所肿瘤外科,美国,纽约,布法罗 14263

*通讯作者:黄华艺, E-mail: Huayi.Huang@Roswellpark.org

下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术是一种利用克隆扩增或单分子模板技术进行的大规模平行测序。NGS技术发展很快,目前已广泛应用于临床。NGS技术具有高通量和低单碱基成本的特点,但至今为止,该技术用于临床检测仍存在许多问题。比如,测序流程的标准化、测序平台和技术原理不同使用户在选择上产生困扰、测序结果中数据分析的差异性以及结果与临床的不一致性问题等。为此,本文结合美国医学遗传学和基因组学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)关于NGS技术的专业标准和指南进行归纳和讨论,供我国分子诊断工作者参考。

1 NGS分析概况

1.1 NGS的3种分析水平

NGS技术按复杂度从低到高分为疾病靶向的基因检测组套、外显子测序(exome sequencing, ES)和基因组测序(genome sequencing, GS)3种。疾病靶向基因检测组套用于检测已知的疾病相关基因,它只对与某疾病相关的基因进行测序,因此分析的灵敏度和特异性较高。在设备选择方面,小型的台式测序仪即可满足此类检测的要求,其所产生的数据量也较小,对数据存储需求也不高。ES是一种检测基因组中所有编码区域的测序方法,该方法主要用于检测已知疾病相关基因突变或发现新型致病基因。ES的测序能力和成本介于疾病靶向基因组套和GS之间,分析灵敏度低于大多数疾病靶向基因组套测序,分析的特异性也可能随测序效率的减弱而相应地降低,因此需要进行Sanger测序确认以排除假阳性突变信号。GS是全基因组测序,覆盖编码和非编码区域,其优点是预测样品制备简单,不需要靶区域的PCR或杂交富集步骤。由于GS在非编码变异体的解释上不理想,所以通常先对编码区进行分析。如果未发现致病突变,那么可对数据进行重新分析寻找非编码区域的调节区域是否有变异。另外,GS分析产生的数据庞大,数据分析费时,结果差异大,目前广泛应用于临床尚不成熟。

1.2 NGS的操作流程

包括3个主要步骤:样品制备、测序和数据分析。样品制备包括患者样本的采集处理、DNA提

取、文库构建、生物分子标签(barcode)、目的区域/基因捕获富集、连接和扩增等;测序步骤即把制备好的标本上机测序;数据分析即对测序完成后所产生的序列数据通过专门检测DNA变异的计算机流水线进行分析处理,这种数据分析的主要流程包括碱基识别、读取对齐、变异识别和变异注释。

2 开展测序工作应考虑的因素

实验室开发NGS检测分析的影响因素主要有:测序内容、测序平台和的选择、数据分析工具的选择、变异体过滤、同源区域测序及变异文件格式等,这些是开展测序工作前必须考虑的重要因素。

2.1 测序内容

在进行NGS时,选择与疾病高度相关的靶向基因组套来开展,即这些组套已经有充足的科学证据证明其与该疾病的相关性。如果某靶向组套包含多重表型的基因,那么实验室应该向临床医生提供亚组套检测来达到进一步的针对性和减少实验分析的工作量。一般来说,分析的区域越大,所得的与临床表型相关的变异体数量也越多,数据分析的工作量也越大。

2.2 测序平台和的选择

选择测序平台时,实验室须仔细考虑测序区域的大小、需要的覆盖范围、预计的样本量、运行时间要求以及成本等来决定购买仪器的标准;也要根据要检测的变异体数量和规模来选择检测平台;测序模式有单向测序和双向测序,双向测序能使读长更明晰,尤其对重复区域碱基数据的读取十分必要。

2.3 数据分析工具

每个NGS检测平台均安装特定的碱基识别运算公式软件,一般用Phred样评分评估碱基识别的正确性。对于疾病靶向检测和ES,建议以参考基因组进行全长校准,以减少检测组套以外的错误测序信息产生,同时增加测序覆盖度来提高变异体识别的准确度;对于GS,序列比对后再进行局部比对有助于发现插入或缺失突变信息。

2.4 变异体过滤

实验室要设定变异体筛查方法,排除常见的

良性变异,识别罕见疾病的分子。对于疾病靶向组套的NGS,实验室需要建立自动分类工具,从罕见高外显率变异体中过滤掉常见的良性变异。可用参考使用的数据库工具包括dbSNP、NHLBI外显子组测序项目和1000基因组项目的自动分类。而在ES或GS分析中,为识别罕见疾病的分子可采用适当的家庭成员作参照。同时实验室必须把握好过度排除与过低排除的度,过度排除导致无意中排除掉致病突变,过低排除导致需分析过多的突变体,增加工作量。实验室可循序渐进,首先确定明确和明显的病因,必要时可以重设筛选标准,扩大搜索突变基因的范围。

2.5 同源区域测序

同源序列如假基因对短读测序法有干扰。当读取的序列被不正确地与同源区域对齐时,NGS序列读取的有限长度可能会导致假阳性变异应答;但当含突变的读取与同源位点对齐时也可能导致假阴性结果。因此,需找到在已知同源区域内能检测致病变异的方法,如用整体定位后再进行局部定位或配对末端测序的方法。实际上,在某些情况下可用Sanger测序法及其特异的互补引物配对来确认变异体所在区域。因此,实验室必须具备丰富的NGS技术相关经验,充分意识到所用技术的局限性,必要时使用同类技术对所有疾病靶向或诊断性检测结果进行确认。Sanger测序法是最常使用的确认性检测方法。

2.6 文件格式

NGS检测产物应遵守常用的格式(如.bam文件代表信号对合,.fastq文件记录序列信息与碱基质量),所采用的数据格式要易于转换到标准格式。目前标准格式-变异检出格式(.vcf)已被1000基因组项目使用。

3 NGS的运行校验

NGS检测的设备和试剂应有合法的产品注册证,其相关商品化产品需经临床实验室验证后才能成为诊断工具,其它未获批准的应注明“仅用于探索性”、“仅用于研究”或“专一性分析试剂”;被视为实验室自行开发的项目,需要进行一系列完整的批准程序。

3.1 测试验证和优化

验证的内容包括样品制备、测序平台和数据

分析方法等。测试流程选定后,应进行反复操作直到所有的测定条件以及分析设置达到最优化为止;实验室应通过分析各种已知序列的变异体数据(例如:SNPs、小的插入/缺失、大的拷贝数变异和结构变异)建立变异体识别操作规程。值得说明的是,使用合成的突变体有助于创建大批量试验数据,可用于不同测序平台的比较和优化、设置各平台阈值,因此,各实验室要建立测试的标准操作文件并严格执行。另外,优化过程应包含临床上所有的样本类型(例如:全血、唾液、福尔马林固定的石蜡包埋组织)。

实验室应利用Sanger数据库中存在的具有特征性的参考样品来确定NGS的有效性,这些样品不需包含特异的病理性突变,最好是可再生资源,用于设立基线数据,作为后续测试校准的参照。对于疾病靶向基因检测组套的实验验证应包括基因与疾病的特异相关性,及广谱的致病性突变基因。此外,还应留意高度同源区域测序是否准确。对于ES和GS,验证的重点在于高质量的外显子/基因组等指标上,比如外显子/基因组应达到平均覆盖率或所含碱基的百分比应达到最小覆盖阈值。实验室的任何变动,需使用先前的实验样本或特征性的参照样本,进行从头到尾的测试验证。

3.2 性能参数的验证

需要验证的性能包括分析的灵敏度、特异性、重复性和重现性。参数可以从技术层面开始制定,必须能反映整个测试的操作过程。

4 NGS分析的质量控制

实验室必须制定质量控制(quality control, QC)措施并用于监测每个检测,包括分析前、分析中及分析后的质量监测。监测内容包括样本质量、检测参数、人员资质、数据存储、参考材料、能力验证。

4.1 样本质量要求

运行NGS的DNA可从多种样本中提取。实验室应规定样本类型、最小样本量等。不同样本类型的DNA质量和突变检测需求并不一样,实验室需确定各种样本类型的可接受指标(例如样本体积、组织量),制定实验室操作手册与DNA提取和定量分析的质量管理方案,并在患者报告中注

明这些参数。对于不符合要求的样品需重新采样,若无法重新采样,在实验室精通全基因组扩增技术的前提下可行全基因组扩增,在报告单上备注可能存在的固有偏差以便临床医生和患者能悉知该技术的局限性。在任何情况下,实验室都应把操作时间、方法学选择等内容录入实验室操作手册中。

4.2 检测参数要求

实验室应建立 QC 监测点来进行质量保证监控。QC 监测的内容包括:DNA 质量、测序过程中错误率的监测、运行后/分析前数据质量的评估;QC 操作记录还应包括使用的仪器和试剂批号。在验证过程中,实验室应记录偏离标准规程的偏差及纠正措施;还必须记录 NGS 数据分析中的生物信息学操作流程,记录分析操作流程中的特殊性数据的情况;完善分析系统,以便实验室追踪软件的版本及每个具体版本的特异性变化。

4.3 人员资质要求

从事 NGS 的技术人员应该经过专门的岗前培训并获得资质,在变异序列评估方面有丰富经验;通晓疾病的发病机制及 NGS 技术性能。若实验室提供 ES 和 GS 服务,应配备精通基因与突变及疾病表型之间关系的专家。

4.4 数据存储

NGS 数据存储方法应遵循法规的要求,从而保证患者数据的可溯源性。实验室应在规程中明确标明文件类型和确定每种类型的保存时间,建议实验室每种文件类型至少保存 2 年以上,以便可以追溯初始实验结果、分析流程改进后重新分析的数据。此外,实验室应考虑记录保留 .vcf 文件及相关变异亚型的最终临床报告及解释,条件允许时,可重新解释突变基因与疾病相关的可能意义。

4.5 参考材料

实验室应使用具有广泛特征性的参考材料(reference materials, RMs)作为测序和拷贝数变异检测的参照。Coriell 提供的人类细胞系具有高度特异的基因组区域和非共有区域,这些材料已用于 GS 实验,但要注意随着时间推移基因组稳定性降低的情况;此外,还有其他一些组织如美国病理学家学会(College of American Pathologists, CAP),美国食品药品监督管理局用于评估仪器和测试性能

的 RMs。实际上,从全血中提取的基因组 DNA 是稳定的,可通过全基因组扩增技术,从少部分样本中获得大量可长期使用的 DNA。通过计算方法获得模拟电子序列作为 RM,可以和 QC 或能力验证的过程整合。这类模拟序列用于解决某一个特定区域的问题,如重复序列、已知的插入和缺失及 SNPs。

4.6 能力验证

根据美国临床实验室改进修订(Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA)的要求,必须建立能力验证(proficiency testing)操作程序并且定期进行能力验证。实验室须采用当前公认的能力验证方法来进行,若没有其他实验室进行平行的 NGS 测试,则需要实验室内部自定的能力验证方法来验证。

5 测序申请单、报告格式和结果解释

5.1 测序申请单

基因检测项目的申请要求开单医生提供患者的详细临床资料,如患者的临床特征、家族史及体格检查等来申请遗传学检测,以便实验室判断检测出的基因变异与患者一系列临床症状、体征是否相符,以及对患者预后进行评估。实验室则根据医生的要求进行基因测试和报告所检测的基因中潜在的致病变异,并说明检测方法和每个检测的操作参数。

5.2 报告格式

实验室主任确定报告的细节,报告必须清晰、简明地阐明任何相关结果及其临床意义,以便医生对检测结果的理解,并对所使用方法的优点和局限性进行描述。

所有 NGS 报告必须包括已鉴定的突变列表,以人类基因组变异协会命名指南进行注释,并根据 ACMG 指南进行临床分类(该指南定期更新,实验室应关注该指南的变更情况);另外,基因命名应遵循人类基因组组织基因命名的命名法进行。报告中需要详细列出每个变异位点对应的转录物的外显子编号、任意突变、方法学、引用的互联网站。建议实验室以结构形式来报告突变体数据,报告中还应提供靶向区域、外显子组或基因组有效区域水平的技术参数与分析检测中的局限性;对于伴随发现结果的报告,在符合公认的医学实

践和道德伦理的基础上,实验室应制定相关的方案来决定某些类型的伴随发现是否应该报告、什么时候报告。

5.3 结果解释

根据 ACMG 指南,在疾病靶向基因检测组套报告中每一种突变鉴定都需进行评估并归类,应包括与疾病相关突变基因功能和基因产物可能性的循证评估。ES 和 GS 测试中得到的实验结果,除了鉴定变异是否会改变基因或蛋白质功能外,还应评估已知的基因断裂表型与患者临床表型是否相关;如果检测到具有潜在临床意义的多联突变体,在解释中应讨论每个突变体与患者的表型可能存在的相关性,并排列突变的优先次序;ES 和 GS 测试的报告中,对无任何疾病关联的基因变异,即与诊断无关、意义未明的变异(variants of uncertain significance, VUSs),实验室应制定关于如何报告 VUSs 的规程,并且如实客观地报告检测中的首次发现,直至找到基因与疾病有关联的证据,也鼓励实验室存储临床测序数据到公共数据库中。

实验室应就遗传学检测结果数据再分析,及再分析是否另外收费等相关问题制定明确的政

策。建议实验室定期与临床沟通,并告知 VUSs 的相关知识是否已经更新。测序结果的解释必须慎重,实验室必须与临床保持充分沟通以避免产生不合理的解释。

6 总结

探究遗传异质性疾病的病因是一项长期艰苦的工作,NGS 克服了传统 Sanger 测序中无法大规模测序的缺点。然而,从与疾病相关的基因组套到整个基因组,NGS 在产生高质量序列数据的同时,还面临着许多难题,包括处理大量信息的障碍,生物学上的解释和数据的引用参考等等。未来关于该技术的具体临床应用还需要进一步完善。

参考文献

- [1] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing [J]. Genet Med, 2013, 15(9):733-747.

法医学常用 15 个 STR 基因座的突变分析

邱平明¹ 陈玲^{1*} 余嘉欣¹ 陆慧洁¹ 牛牧斐¹ 刘超^{1,2}

[摘要] **目的** 观察 Sinofiler 系统 15 个短串联重复序列(short tandem repeat, STR)基因座的突变现象和特点。**方法** 选择 Sinofiler 试剂盒检测的案件 8 261 例,筛选该试剂盒 15 个 STR 基因座的突变事件,判断突变等位基因的来源,统计各基因座的突变率,分析突变的特点。**结果** 在 15 个基因座上发现 175 个突变事件,167 例(95.43%)为一步突变,5 例(2.86%)为二步突变,2 例(1.14%)为三步突变,1 例(0.57%)为五步突变。平均突变率为 1.30×10^{-3} (95% CI $1.12 \times 10^{-3} \sim 1.51 \times 10^{-3}$),各基因座的突变率介于 $0.45 \times 10^{-3} \sim 2.56 \times 10^{-3}$ 。父、母来源突变比例为 13.33:1。增加重复单位和减少重复单位的突变事件比值为 1.10:1。15 个基因座的突变率与杂合度之间没有统计学上的相关性。**结论** 获得的 15 个 STR 基因座突变资料在亲子鉴定中有重要的应用价值。

[关键词] 法医物证学;短串联重复序列(STR);突变

Mutations of 15 Short Tandem Repeat Loci for forensic application

QIU Pingming¹, CHEN Ling^{1*}, YU Jiabin¹, LU Huijie¹, NIU Mufei¹, LIU Chao^{1,2}

(1. Department of Forensic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515;

2. Guangzhou Forensic Science Institute, Guangzhou, Guangdong, China, 510030)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the characteristics of 15 STR loci mutations and their roles in paternity tests. **Methods** 8 261 confirmed parentage cases detected by Sinofiler System were analyzed. The mutation events in 15 STR loci of Sinofiler System were screened, and the sources of mutant alleles were analyzed. Finally, the mutation rates of STR loci were calculated and the features of these mutations were examined. **Results** 175 mutation events were observed in 15 STR loci. Among them, 167 (95.43%) were one-step, 5 (2.86%) were two-step, one (1.14%) was three-step and one (0.57%) was five-step. The overall mutation rate was 1.30×10^{-3} (95% CI $1.12 \times 10^{-3} \sim 1.51 \times 10^{-3}$), and the locus-specific mutation rates ranged from $0.45 \times 10^{-3} \sim 2.56 \times 10^{-3}$. The ratio of paternal versus maternal mutation was 13.33:1. The ratio of repeat gains versus repeat losses was 1.10:1. No statistical correlation between mutation rate and heterozygosity at 15 STR loci was detected. **Conclusion** Mutations in the 15 STR loci can play a valuable role in paternity tests.

[KEY WORDS] Forensic biological evidence; Short tandem repeat (STR); Mutation

短串联重复序列(short tandem repeat, STR)具有高度多态性,被广泛用于个体识别和亲子鉴定。Sinofiler 检测试剂盒针对中国汉族人群的特点,将国际范围广泛应用的 Identifiler 试剂盒中的 TH01、TPOX 基因座替换为 D12S391、D6S1043 基

因座,对中国汉族人群的亲权鉴定具有极高的使用价值^[1]。D12S391 和 D6S1043 比 TH01、TPOX 具有更高的多态性^[2]。然而,高多态性常与高突变率并存。了解 STR 基因座的突变率和突变特点有利于亲子鉴定实践更准确、科学地进行结果评

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2015043)

作者单位:1.南方医科大学基础医学院法医学系,广东,广州 510515

2.广州市刑事科学技术研究所,广东,广州 510030

*通讯作者:陈玲, E-mail: lingpy@163.com

估。获得常用STR基因座准确的突变率需要基于大样本的研究数据。本文通过大样本分析,对Sinofiler系统15个STR基因座的突变进行系统研究,报道如下。

1 材料和方法

1.1 样本材料

从南方医科大学司法鉴定中心日常检案中选取Sinofiler试剂盒检测并肯定亲权的亲子鉴定案件8261例,其中三联体709例,父子二联体6726例,母子二联体826例。样本包括人体血样(17.4%)、唾液斑(74.1%)、带毛囊毛发(5.8%)、羊水(1.9%)、精斑(0.6%)、组织(0.3%)。

1.2 仪器与试剂

9700扩增仪(ABI,美国);3130xL基因分析仪(ABI,美国);AmpFLSTR[®]Sinofiler[™]试剂盒(ABI,美国);STRtyper-10G试剂盒(珠海科登生物科技有限公司);AmpFLSTR[®]Yfiler[™]试剂盒(ABI,美国);Investigator Argus X-12试剂盒(QIAGEN,德国)。

1.3 DNA提取与STR检测

采用chelex-100法提取DNA,扩增体系和热循环反应按试剂盒说明书进行,扩增产物在3130xL基因分析仪电泳, GeneMapper ID v3.2软件进行基因分型。

1.4 突变基因座、突变来源和突变步数的确定

用Sinofiler体系进行检测,若违反遗传规律基因座总数<3,参照亲权鉴定技术规范^[3]计算亲权指数(paternity index, PI)、增加检测STRtyper-10G系统,并增加X-STR或Y-STR检测。若PI>10 000,且X-STR或Y-STR不违反遗传规律,则认定亲子关系,违反遗传规律的基因座视为是突变基因座。

参照文献^[4]确定突变等位基因的来源:将孩子中的突变等位基因与发生突变的父方或母方等位基因相比较,相差步数最小的等位基因是突变的等位基因;若相差的步数相同,则判为来源不明。突变步数为重复单位的增加或减少,若同时存在增加或减少同步数的可能则判为不确定。短、中、长等位基因的确定参考文献^[5]。

1.5 统计分析

用confint.xls软件(<http://statpages.org/confint.html>)计算突变率以及95%CI值。SPSS 13.0软件进行Spearman相关性分析。

2 结果

2.1 突变率和突变来源

在8261例认定亲子关系案例中,观察8970次减数分裂,共发现175个突变事件。15个STR基因座的突变率见表1,其中D12S391基因座的突变率最高,vWA次之,D2S1338和D19S433的突变率最低。175个突变事件中,父系突变的有160个(91.43%),母系突变的有12个(6.86%),其余3个(1.71%)不能确定突变来源。父系突变与母系突变的比例为13.33:1。

表1 15个STR基因座的突变来源和突变率

Table 1 Mutation resource and mutation rate of 15 STR loci

基因座	突变次数	突变来源			突变率(10 ⁻³)	95%CI(10 ⁻³)
		父	母	不确定		
D12S391	23	21	1	1	2.56	1.63~3.84
vWA	21	19	2	0	2.34	1.45~3.58
FGA	20	19	1	0	2.22	1.36~3.44
D18S51	19	17	2	0	2.11	1.28~3.31
D8S1179	13	12	1	0	1.44	0.77~2.48
D21S11	12	10	2	0	1.33	0.69~2.34
D3S1358	10	10	0	0	1.11	0.53~2.05
D7S820	10	10	0	0	1.11	0.53~2.05
D13S317	10	9	0	1	1.11	0.53~2.05
D16S539	9	8	0	1	1.00	0.46~1.90
D6S1043	8	7	1	0	0.89	0.39~1.76
D5S818	7	6	1	0	0.78	0.31~1.61
CSF1PO	5	4	1	0	0.56	0.18~1.30
D2S1338	4	4	0	0	0.45	0.12~1.14
D19S433	4	4	0	0	0.45	0.12~1.14
合计	175	160	12	3	1.30	1.12~1.51

2.2 突变类型、突变步数和突变方向

本研究所观察到的175例突变家系中,均为单基因座突变。其中一步突变167例(95.43%),二步突变5例(2.86%),三步突变2例(1.14%)和五步突变1例(0.57%)。

65例表现为重复序列的增加,59例表现为重复序列的减少,另有51例不能确定增加或减少。重复序列增加与重复序列减少的比例为1.10:1。

2.3 突变与等位基因长度的关系

可确定突变中重复序列增减共 124 例。其中短、长等位基因突变例数分别为 14 例 (11.3%)、31 例 (25%), 而中等位基因突变例数为 79 例 (63.7%), 见表 2。中等位基因中重复序列

增加和减少的比例为 1.08:1; 短等位基因中重复序列减少与重复序列增加的比例为 3.67:1; 长等位基因中重复序列增加与重复序列减少的比例为 2.88:1。

表 2 不同长度等位基因发生重复序列增加或减少的次数

Table 2 Allele sizes versus number of repeat gain/loss

基因座	短等位基因			中等位基因			长等位基因					
	等位基因范围	增加	减少	合计	等位基因范围	增加	减少	合计	等位基因范围	增加	减少	合计
CSFIPO	7~9	0	0	0	10~13	3	2	5	14~16	0	0	0
D12S391	8~17.3	0	0	0	18~22	4	4	8	23~28	4	2	6
D13S317	5~8	0	0	0	9~12	3	2	5	13~15	0	2	2
D16S539	6~9	0	0	0	10~13	4	1	5	14~19	0	0	0
D18S51	8~15	8	1	9	16~21	3	2	5	22~28	1	2	3
D19S433	9~12.2	0	1	1	13~16	1	1	2	16.2~20.3	0	1	1
D21S11	26~30	3	0	3	30.2~33.1	0	2	2	33.2~40.3	2	0	2
D2S1338	14~18	0	0	0	19~23	1	0	1	24~28	1	1	2
D3S1358	10.3~13	0	0	0	14~17	3	2	5	18~20	0	1	1
D5S818	7~9	0	0	0	10~12	3	0	3	13~15	0	1	1
D6S1043	7.1~13	0	1	1	14~19.3	3	4	7	20~23.3	0	0	0
D7S820	6~9.1	0	0	0	9.2~11	2	1	3	11.3~15	2	0	2
D8S1179	8~11	0	0	0	12~15	5	2	7	16~19	1	1	2
FGA	13~20.2	0	0	0	21~25.2	3	3	6	26~34.2	1	4	5
vWA	12~15	0	0	0	16~19	3	12	15	20~22	1	3	4
合计		11	3	14		41	38	79		13	18	31

2.4 杂合度与突变率的关系

15 个 STR 基因座的杂合度与突变率情况见表 3, 多数基因座表现为杂合度高, 突变率也高。但个别存在差异。如 D6S1043 基因座表现为最高的杂合度, 但突变率仅为 0.000 89。Spearman's test 显示 15 个 STR 基因座的突变率与杂合度之间没有显著的相关性。

3 讨论

本研究获得的 15 个 STR 基因座的突变率介于 0.45×10^{-3} ~ 2.56×10^{-3} , 其中 D12S391 基因座的突变率最高, 其次为 vWA、FGA 和 D18S51, D2S1338 和 D19S433 基因座的突变率最低。这可能与基因座内重复序列的结构有关^[6-7]。亲权鉴定技术规范

规定用于亲权鉴定的遗传标记的突变率应低于 0.002^[3]。本研究所选取的案例中除了 D12S391、vWA、FGA、D18S51 基因座突变率大于 0.002 外, 均符合此规律, 因此采用这些 STR 基因座进行亲权鉴定时应注意其高突变率。

复制滑链错配学说是目前普遍接受的突变机制^[8]。在 DNA 复制过程中, 新生链复制到模板链的 STR 序列区域时, 由于序列是重复的, 因此很容易发生碱基错配, 形成一个或数个重复序列的环状结构。如果继续复制下去, 就会出现新生链比模板链加长或缩短的现象。即每个突变都是增加或减少一个或几个重复单位。然而, 对于 STR 突变模式有 2 种不同的观点: 一种是简单突变模式, 即等位基因的突变, 无论是延长或收缩多少个重

表3 杂合度与突变率的关系

Table 3 The relation of heterozygosity and mutation rate for 15 STR loci

基因座	杂合度	突变率
D12S391	0.845 8	0.002 56
D6S1043	0.880 0	0.000 89
CSF1PO	0.739 2	0.000 56
D2S1338	0.865 2	0.000 45
D3S1358	0.720 4	0.001 11
D5S818	0.776 6	0.000 78
D7S820	0.768 9	0.001 11
D8S1179	0.846 6	0.001 44
D13S317	0.787 0	0.001 11
D16S539	0.789 8	0.001 00
D18S51	0.863 9	0.002 11
D19S433	0.826 2	0.000 45
D21S11	0.817 1	0.001 33
FGA	0.854 4	0.002 22
vWA	0.797 3	0.002 34
<i>Spearman's test</i>		<i>P=0.605</i>

复单位都是一步完成。另一种是逐步突变模式,即突变是经过多步才能完成,每一步只是增加或减少一个重复单位,每一步都有一定的发生率,步数越多的,发生的机会就越少,这种观点为多数学者认可。本研究符合逐步突变模式,观察到一步突变 167 例,占总数的 95.43%。此外,研究结果还显示重复单位增加和减少的比例约为 1.1:1。这表明在 STR 基因突变中重复序列的增加和重复序列的减少是有差异的,增加比减少更为常见,这与陈玲^[5]、李茜等^[9]研究结果相符合。本研究观察到罕见的三步突变 2 例、五步突变 1 例,且排除是引物结合点变异导致的等位基因丢失,确认为突变。目前有文献报道过三步突变^[10-11]、四步突变^[12-13]。总体来看,多步突变发生的机率很低,判断多步突变需慎重。

本研究显示来自父系和母系来源的突变比例为 13.33:1,具有明显性别差异。突变与干细胞发生过程中细胞所经过的分裂次数有关。男性精母细胞分裂成精子需要的分裂次数比女性配子细胞成熟需要的次数要多得多,因此突变发生在男性的概率更大。与其他研究相比,刘素娟等^[14]观察

10 000 个三联体亲子鉴定,发现 PowerPlex™ 16 系统 15 个 STR 基因座的父、母源突变比值为 3.57:1。Qian^[15]发现 15 个 STR 基因座的父、母源突变比例为 5.2:1,其观察的减数分裂次数男女比例为 2.6:1。帅莉等^[16]报道父系和母系来源的突变比例为 10:1,但未指明父源、母源的等位基因传递次数。上述研究与本研究数据存在较大差异。产生这种现象的结果可能与不同研究的群体结构、样本数量有关。本研究样本人群主要以二联体为主,二联体中又以父子二联体为主,父源、母源等位基因传递次数的比值为 4.84:1,因此表现为父源突变比例偏高。

突变与等位基因长度关系的研究结果显示突变主要发生在中等位基因,且重复序列增加和重复序列减少的例数接近。长等位基因(重复次数多的等位基因)发生的突变案例中大部分表现为重复单位的减少,可见长等位基因基因的突变倾向于缩短。短等位基因(重复次数少的等位基因)发生突变的概率最低,14 例中有 11 例表现为重复单位的增加,提示短等位基因的突变倾向于延长。这表明 STR 等位基因的突变存在自控性,防止等位基因的无限变大或无限变小,从而支持等位基因的种类稳定,这与 Lu 等^[17]的研究结果一致。

参照文献^[18]获得本研究人群 15 个 STR 基因座的杂合度数据,并研究杂合度和突变率之间的相关性,结果表明杂合度与突变率之间无统计学上的相关性,这与 Leopoldino^[19]的研究结果一致。由于不同群体结构、样本数量和每个 STR 基因座的结构特征存在差异,表现为杂合度、突变率各不相同。因此,进行亲子鉴定时,应注意此现象的存在,尽量选取多态性高、突变率低的基因座进行鉴定。

STR 突变是法医物证鉴定中经常遇到的情形,而且是一个不可忽视的风险因素。为降低误判风险,建议做好以下几方面:(1)询问案情,如了解争议父或争议母与孩子之间是否有亲缘关系(如爷孙、姑侄关系等),若二者有亲缘关系,那争取两位可疑的父亲或母亲都参与鉴定。(2)若单亲出现突变,尽量追加父方或母方样品检测。(3)根据情况增加性染色体 STR、SNP 和(或)INDEL、线粒体 DNA 等其他遗传标记,必要时可应用二代测序技术辅助鉴定。

参考文献

- [1] 郭宏, 林源, 柳燕, 等. D6S1043 和 D12S391 基因座
在亲权鉴定中的应用[J]. 中国司法鉴定杂志,
2007, 23(5):345-346.
- [2] Huang S, Zhu Y, Shen X, et al. Genetic variation
analysis of 15 autosomal STR loci of AmpFISTR Sino-
filer PCR Amplification Kit in Henan (central China)
Han population[J]. Leg Med (Tokyo), 2010, 12(3):
160-161.
- [3] 中华人民共和国司法部, 司法鉴定管理局. 亲权鉴
定技术规范[S] SF/Z JD0105001-2010.
- [4] 吕德坚, 陆惠玲. DNA 亲权鉴定[M]. 广州: 暨南大
学出版社, 2005, 99:108-113.
- [5] 陈玲, 刘超, 邱平明, 等. STRtyper-10G 系统 9 个
STR 基因座突变分析[J]. 中国法医学杂志, 2014,
29(5):420-423.
- [6] Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, et al. Muta-
tion rate in human microsatellites: influence of the-
structure and length of the tandem repeat [J]. Am J
Hum Genet, 1998, 62(5):1408-1415.
- [7] Schlotterer C. Evolutionary dynamic of Microsatellite
DNA[J]. Chromosoma, 2000, 109(6):365-371.
- [8] Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing:
a major mechanism for DNA sequence evolution [J].
Mol Biol Evol, 1987, 4(3):203-221.
- [9] 李茜, 程良红, 魏天莉, 等. 亲子鉴定中 STR 基因
座的基因突变分析[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23
(6):394-396.
- [10] Attwell M, Pontikinas E, Nicholls C. Three step ma-
ternal mutation detected by STR analysis [J]. Forensic
Sci Int Genet, 2015, 16:138.
- [11] Jia YS, Zhang L, Qi LY, et al. Multistep microsate-
lite mutation leading to father-child mismatch of FGA
locus in a case of non-exclusion parentage [J]. Leg
Med (Tokyo), 2015, 17(5):364-365.
- [12] Liu YX, Zhang WQ, Jia YS, et al. Multistep micro-
satellite mutation in a case of non-exclusion parentage
[J]. Forensic Sci Int Genet, 2015, 16:205-207.
- [13] Dauber EM, Kratzer A, Neuhuber F, et al. Germline
mutations of STR-alleles include multi-step mutations
as defined by sequencing of repeat and flanking regions
[J]. Forensic Sci Int Genet, 2012, 6(3):381-386.
- [14] 刘素娟, 李成涛, 陈文静, 等. 常染色体 STR 突变率
的研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34
(3):326-330.
- [15] Qian XQ, Yin CY, Ji Q, et al. Mutation rate analysis
at 19 autosomal microsatellites [J]. Electrophoresis,
2015, 36(14):1633-1639.
- [16] 帅莉, 汪军, 景强, 等. 1483 例亲子鉴定 STR 基因
座突变的分析[J]. 法医学杂志, 2014, 30(1):44-
46.
- [17] Lu DJ, Liu QL, Wu WW, et al. Mutation analysis of
24 short tandem repeats in Chinese Han population
[J]. Legal Med, 2012, 126(2):331-335.
- [18] Chen L, Lu H, Qiu P, et al. Polymorphism analysis
of 15 STR loci in a large sample of Guangdong (South-
ern China) Han population [J]. Leg Med (Tokyo),
2015, 17(6):489-492.
- [19] Leopoldino AM, Pena SD. The mutational spectrum
of human autosomal tetranucleotide microsatellites [J].
Hum Mutat, 2003, 21(1):71-79.

· 论 著 ·

中国型 $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血的基因诊断和临床特征分析

王继成 秦丹卿 骆明勇 何天文*

[摘要] **目的** 对42例中国型 $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血患者进行基因诊断并分析其临床特征。**方法** 所有患者的外周血标本进行血红蛋白毛细管电泳和包括平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV),平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)等红细胞参数的分析,应用Gap-PCR、PCR-RDB的方法进行地中海贫血基因检测。**结果** 40例患者为中国型 $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 杂合子,血红蛋白正常或轻度下降,血红蛋白分析显示HbF为10.6%~20.6%;2例为中国型 $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 合并其它常见的 β 地中海贫血,表现为中重度的贫血,HbF为80.8%~93.1%。**结论** 中国人群中中国型 $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 是比较常见的缺失型 β 地中海贫血类型,其杂合子临床症状较轻,当合并其他地中海贫血时可改变原有的血液学表现。

[关键词] β 地中海贫血; $\delta\beta$ 地中海贫血; 基因诊断

Genetic research and clinical analysis of deletional Chinese $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia

WANG Jicheng, QIN Danqing, LUO Mingyong, HE Tianwen*

(Medical Genetics Center of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the genotype and clinical features of deletional Chinese $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia. **Methods** Blood cell count and hemoglobin electrophoresis analysis were performed on the blood samples of all 42 subjects. Gap-PCR and PCR-reverse dot hybridization analysis were used to detect globin gene mutations. **Results** Among all the subjects, 40 cases were identified to be heterozygote of deletional Chinese $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia. Hemoglobin analysis showed normal or mild anaemia. And the value of HbF was about 10.6%~20.6%. The other 2 cases were of Chinese $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ accompanied by other β -thalassemia. The value of HbF was around 80.8%~93.1%. And showed symptoms of severe anemia. **Conclusion** Chinese $\text{G}\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia is a common type of deletional β -thalassemia in Chinese people. The heterozygotes have mild clinical symptoms, when co-inherited with other thalassaemia, it will change the hematological manifestations.

[KEY WORDS] β -thalassemia; $\delta\beta$ -thalassemia; Gene diagnosis

地中海贫血简称地贫,又称海洋性贫血,是我国南方常见的遗传性血液学疾病,主要分 α 地中海贫血(简称 α 地贫)和 β 地中海贫血(简称 β 地贫)2种类型。 β 地贫主要是由 β 珠蛋白基因的突变引起,少数是由于 β 珠蛋白基因簇的大片段

缺失所致。 $\delta\beta$ 地贫是一类累及 δ 和 β 珠蛋白基因的缺失型地贫。这种缺失导致胎儿期的 γ 珠蛋白基因在成人期重新开放和持续表达,从而导致HbF的异常升高^[1]。目前全世界已发现多种不同缺失类型的 $\delta\beta$ 地贫。在我国人群中,中国型、云

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212246)

作者单位:广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511442

*通讯作者:何天文, E-mail:love830415@126.com

南型和广州型的 $\delta\beta$ 地贫已被报道,这些类型都是 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫,其中中国人最常见的是中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫^[2-5]。这种地贫首先由 Mann 等^[6]人在上世纪 70 年代报道。我们对 42 例中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫患者进行基因诊断并分析其临床特征,报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

2012 年至 2015 年来我院就诊,血红蛋白电泳显示 HbF 增高(>5%)且经基因检测确诊为中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫的 42 例的患者。所有患者均为广东籍居民,年龄为 18~38 岁,平均年龄为 27.6 岁。取其外周血用于血常规和血红蛋白电泳分析,提取外周血基因组 DNA 用于珠蛋白基因检测。

1.2 方法

1.2.1 红细胞参数和血红蛋白分析

提取 EDTA 抗凝静脉血 2 mL,用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司的 BC-2000 血液分析仪对外周血进行红细胞参数分析。抽取柠檬酸钠抗凝静脉血 2 mL,应用法国 SEBIA 公司的 sebia capillary2 毛细管电泳分析系统进行血红蛋白分析。

1.2.2 地贫基因诊断

使用 QIAmp DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取外周血基因组 DNA。应用亚能生物技术有限公司的地贫基因检测试剂盒进行基因检测,包括 3 种最

常见的缺失型 α 地贫(--SEA/- α 4.2/- α 3.7)、3 种最常见的点突变型 α 地贫(CS、WS、QS)以及 17 种常见的 β 地贫,操作严格按照试剂盒说明书进行。采用裂隙聚合酶链反应(gap polymerase chain reaction, Gap-PCR)的方法检测中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫,Gap-PCR 引物委托铂尚生物技术(上海)有限公司合成。PCR 扩增反应体系是 3 条引物双重 Gap-PCR,3 条引物的序列分别为:共同上游引物 5'-CCAGCCTCATGGTAGCAGAATC-3',缺失下游引物 5'-TGGTATCTGCAGCAGTTGCC-3',正常内对照下游引物 5'-GTGATTGTTGAGTTGCAGGATCG-3'。中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫缺失扩增产物长度为 211 bp,正常内对照扩增产物长度为 298 bp。PCR 扩增反应条件为 95℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环,最后 72℃延伸 7 min,琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物。

2 结果

2.1 血液学和血红蛋白电泳

40 例中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 杂合子患者的血液学指标表现差别较大,血红蛋白正常或轻度降低;MCV 和 MCH 有不同程度的下降,提示小细胞低色素性贫血的特征。血红蛋白电泳分析显示 HbA₂ 为 2.3%~3.1%,HbF 为 10.6%~20.6%;2 例为中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 复合其它常见的 β 地中海贫血,表现为中重度贫血,HbF 大幅增高到 80.8%~93.1%(表 1)。

表 1 红细胞参数、血红蛋白电泳及基因检测结果

Table 1 Results of hemotological parameters and gene diagnosis

基因型	例数	MCV(fL)	MCH(pg)	Hb(g/L)	HbA ₂ (%)	HbF(%)
$\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0/\beta^N$	40	66.2~78.7	22.6~26.4	102~154	2.3~3.1	11.5~20.6
$\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0/\beta^{-28}$	1	70	24.5	96	2.7	80.8
$\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0/\beta^{CD17}$	1	70.2	25.4	49	5.9	93.1

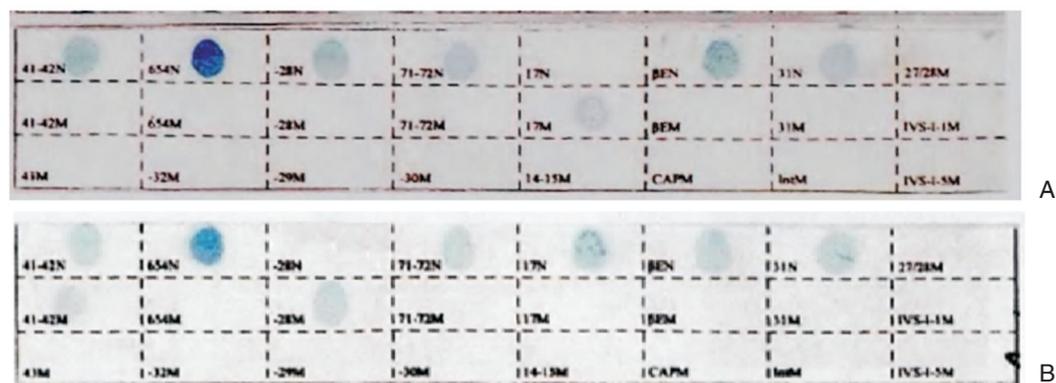
2.2 基因检测结果

应用基于反向斑点杂交方法的 β -地贫基因检测试剂盒检测到 2 例突变,分别为-28 和 CD17 纯合突变,PCR-RDB 结果见图 1。用 Gap-PCR 法共检测,42 例为中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 缺失型地贫。PCR 琼脂糖凝胶电泳图见图 2,其中 298 bp 为正常对照

的扩增产物,211 bp 为缺失型条带。

3 讨论

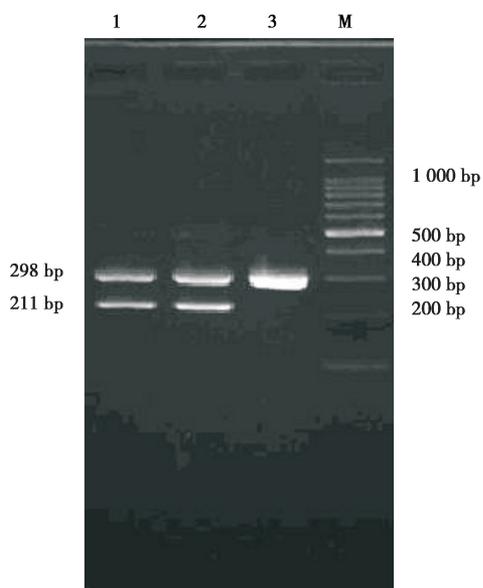
中国型 $\gamma^+(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫的缺失范围约 100 kb,包括部分 $\text{A}\gamma$ 珠蛋白基因、全部的 δ 和 β 珠蛋白基因以及 β 珠蛋白基因下游较远的具有调控功能的



A: CD17突变; B: 28突变

图1 中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地贫 PCR-RDB 结果

Figure 1 The PCR-RDB results of Chinese $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$



1: 中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 患者; 2: 中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 对照; 3: 正常对照; M: 1 000 bp DNA Marker

图2 中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地贫 Gap-PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 The Gap-PCR agarose gel electrophoresis results of Chinese $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$

DNA 序列^[7-8]。这种缺失致使 $\alpha\gamma$ 珠蛋白基因的高表达, 从而使 HbF 在胎儿出生后的持续性升高 (5%~20%) 和小细胞低色素性贫血成为中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 特征性的临床表现^[9]。HbF 是胎儿期表达的血红蛋白。出生 6 个月后, HbA ($\alpha_2\beta_2$) 成为红细胞中主要的血红蛋白, HbF 含量则低于 1%。但 HbF 在成人时期增高性的表达可以缓解 α 肽链和类 β 肽链比例失衡的程度从而起到代偿性的作用。从本研究 40 例确诊为中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$

杂合型患者的血细胞参数和血红蛋白电泳结果可知, 杂合子患者的血红蛋白的值为 102~154 g/L, 表现较轻的贫血或无贫血。但 MCV<80 fL 和 MCH<27 pg 均提示地贫的可能。杂合子患者的 HbA₂ 是正常的或轻微下降, 而 HbF 值为 10.6%~20.6%, 分布范围比较集中。但当合并其他常见的 β 地贫基因突变时, 表现为明显的中度或重度贫血 (Hb 显著降低), HbF 也上升为 80.8%~93.1%, 这与文献报道的相类似^[10-14]。所以进行血液学分析时, 若红细胞指标提示为小细胞低色素性贫血, 而 HbF 有相应程度的升高, 且也未检测到中国人常见的 17 种 β 地贫, 需考虑缺失型 β 地贫的可能。当然这首先要与中国人常见的 SEA-HPFH 相鉴别, 后者常有更高水平的 HbF 和很少有小细胞低色素性贫血样改变^[15]。

虽然中国人群中, β 地贫主要是因 β 珠蛋白基因的点突变所致, 但李志琴等^[16] 的调查显示在中国南方人群分别有 10% 和 13% 的中间型地贫的基因构成为中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地贫和 SEA-HPFH, 这提示这 2 种缺失型突变也是我国南方人群比较常见的类型。目前国内商业化的试剂盒普遍采用 PCR-RDB 的方法检测 β 地贫最常见的 17 种点突变, 并未常规检测包括中国型 $\alpha\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 在内的中国人比较常见的缺失型 β 地贫。 β 地贫的临床检验过程中, 当发现基因检测的结果与血液学分析的结果不相符时, 需考虑其他未在检测范围内的地贫类型的可能。图 1A 和 B 杂交膜条中的 -28 和 CD17 位点均无正常对照, 显示为此 2 个位点的纯合突变。然而这与此 2 位点真实的纯合突变的血

液学表现明显不同,包括 HbF 在内的数值也明显不一致。这些血液学表现与是否合并 α 地贫也有很大的相关性,故而常见 α 地贫的基因检测也必不可少。

在我国南方这些 β 地贫的高发区,通常先以血常规和血红蛋白电泳进行地贫的筛查,疑似病例再进行常规的基因检测,这时不能忽视包括中国型 $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 在内的缺失型 β 地贫存在的可能。这些缺失型地贫通常是大片段的缺失,断裂位点也比较明确,都可以采用 Gap-PCR 的方法来进行检测^[17]。杂合缺失型 β 地贫的患者与常见 β 地中海贫血携带者结合有可能导致中重度 β 地贫患儿出生的可能,所以准确的孕前基因检测和产前诊断就非常有必要。总之,罕见 β 地贫的正确诊断和鉴别,对于遗传咨询和产前诊断可以提供更好的依据。尤其当不符合遗传规律时,更具有指导性的价值。

参考文献

- [1] Panyasai S, Fucharoen S, Surapot S, et al. Molecular basis and hematologic characterization of deltabeta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in Thailand [J]. *Haematologica*, 2004, 89 (7) : 777-781.
- [2] 徐湘民. 见于中国人的 HPFH 和 $\delta\beta$ -地中海贫血的分子基础[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1988, 15(5) : 315-317.
- [3] So CC, So AC, Chan AY, et al. Detection and characterisation of beta-globin gene cluster deletions in Chinese using multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(12) : 1107-1111.
- [4] Chen W, Zhang X, Shang X, et al. The molecular basis of beta-thalassemia intermedia in southern China: genotypic heterogeneity and phenotypic diversity [J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11 : 31.
- [5] 唐斌, 王继成, 秦丹卿, 等. 中国型 $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 复合 β -地中海贫血的产前诊断分析[J]. *临床血液学杂志*, 2015, 28(4) : 630-632.
- [6] Mann JR, MacNeish AS, Bannister D, et al. $\delta\beta$ -thalassemia in a Chinese family [J]. *Brit J Haematol*, 1972, 23(4) : 393-402.
- [7] Henthorn PS, Smithies O, Mager DL, et al. Molecular analysis of deletions in the human beta-globin gene cluster: deletion junctions and locations of breakpoints [J]. *Genomics*, 1990, 6(2) : 226-237.
- [8] Fucharoen S, Pengjam Y, Surapot S, et al. Molecular and hematological characterization of HPFH-6/Indian deletion-inversion $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ and $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia/HbE in Thai patients [J]. *Am J Hematol*, 2002, 71(2) : 109-113.
- [9] Xu XS, Hong X, Wang G. et al. Induction of endogenous gamma-globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence [J]. *J Hematol Oncol*, 2009, 2 : 15.
- [10] 杜丽, 秦丹卿, 王继成, 等. 5 个家系 $\delta\beta$ 地中海贫血的家系分析及产前诊断 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 5(1) : 27-32.
- [11] 覃丽波, 陈萍, 陈文强, 等. 广西地区 $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -珠蛋白生成障碍性贫血的研究 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(3) : 1151-1153.
- [12] Changsri K, Akkarapathumwong V, Jamsai D, et al. Molecular mechanism of high hemoglobin F production in Southeast Asian-type hereditary persistence of fetal hemoglobin [J]. *Int J Hematol*, 2006, 83(3) : 229-237.
- [13] Yu X, Yang LY, Yang HT, et al. Molecular epidemiological investigation of thalassemia in the Chengdu region, Sichuan province, southwest China [J]. *Hemoglobin*, 2015, 39(6) : 393-397.
- [14] 王春芳, 韦传东, 雷茗, 等. $\gamma^+(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血复合 β 地中海贫血家系的表型与基因型分析的警示 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2015, 23(11) : 1191-1193.
- [15] Bollekens JA, Forget BG. Delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1991, 5(3) : 399-422.
- [16] 李志琴, 莫秋华, 钟雄林, 等. 一个 β 地中海贫血复合 $\delta\beta$ 地中海贫血家系的表型与基因型分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 18(4) : 310-313.
- [17] Tritipsombut J, Phylipsen M, Viprakasit V, et al. A single-tube multiplex gap-polymerase chain reaction for the detection of eight β -globin gene cluster deletion-common in Southeast Asia [J]. *Hemoglobin*, 2012, 36(6) : 571-580.

· 论 著 ·

一种初步快速甄别总肠道病毒的基因分型方法

欧志英* 吴韶清 尹应先 李丽霞 周荣 徐翼 龚四堂

[摘要] **目的** 建立并验证总肠道病毒5'-非编码区(5'-non coding region, 5'-NCR)PCR扩增测序并在NCBI数据库比对进行生物信息分析的方法,为手足口病的早期快速诊断提供敏感、高效的总肠道病毒分子分型检测方法。 **方法** 收集165例临床检测阳性的标本,提取总RNA扩增人肠道病毒A、B、C和D型5'端非编码区用于总肠道病毒初步基因分型,PCR产物测序并在Genbank中进行BLAST分析。 **结果** 成功从临床咽拭子标本中扩增了5'-NCR用于基因分型。165例总肠道病毒阳性标本中鉴定出12种肠道病毒类型,有77例人肠道病毒(enterovirus type 71, EV-71),37例人柯萨奇病毒(coxsackievirus, CV)CV-A16,31例CV-A4,20例其它型别。 **结论** 5'-NCR PCR测序是总肠道病毒基因分型和监测的敏感、简单、早期、快速的检测方法。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒; 分子流行病学; 分子分型

A rapid genotyping assay for primary total enterovirus screening

OU Zhiying*, WU Shaoqing, YIN Yingxian, LI Lixia, ZHOU Rong, XU Yi, GONG Sitang
(Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510623)

[ABSTRACT] **Objective** To establish and verify an analytical method for total enterovirus genotyping. Through 5'-non coding regions PCR amplification, sequencing and Blast in NCBI databases, this method aims to provide a sensitive, efficient and early rapid genotyping detection for hand, foot and mouth disease. **Methods** Throat swab samples from 165 cases of HFMD are collected for RNA extraction. Direct total enterovirus genotyping was carried out by amplifying the 5'-non coding region of human enterovirus species group A, B, C and D. PCR products were sequenced and blasted in Genbank. **Results** The 5'-non coding region was successfully amplified for total enterovirus genotyping. 12 types of enterovirus were successfully identified from 165 positive clinical cases. There are 77 cases of EV-71, 37 cases of CV-A16, 31 cases of CV-A4, 20 cases of other types. **Conclusion** The 5'-non coding region PCR-sequencing is a sensitive, simple, early, and rapid method for HFMD pathogen genotyping and surveillance.

[KEY WORDS] Hand, foot and mouth disease (HFMD); Enterovirus; Molecular epidemiology; Genotyping

手足口病是常见的儿童急性感染性疾病,主要由肠道病毒(enterovirus, EV)感染引起^[1],过去几十年在亚太地区很常见,曾在马来西亚、台湾、新加坡、中国大陆爆发流行^[2-3],导致成千上万儿童死亡,大多数患者症状较轻,为一过性自限疾病,

少数症状严重。感染后大部份患者会出现发烧,体温超过38.5℃^[4],并伴有手、足、口腔部位皮疹、疱疹、溃疡为典型表现^[5],个别重度感染可引起肺水肿、病毒性脑膜炎或脑膜脑炎、疱疹性咽峡炎、病毒性心肌炎甚至死亡^[6]。

基金项目:广东省自然科学基金(S2012010009538, 2016A030313501);广州市妇女儿童医疗中心博士启动基金(2008031)

作者单位:广州市妇女儿童医疗中心,广东,广州 510623

*通讯作者:欧志英, E-mail:ou_zhiying@qq.com

肠道病毒在分类上属微小核糖核酸(RNA)病毒科,人肠道病毒由至少72个血清型组成,种类有人脊髓灰质炎病毒、人柯萨奇病毒(coxsackievirus, CV)A组、B组、埃可病毒(Echo)和新型肠道病毒。人柯萨奇病毒A组有1~22型和24型,B组有1~6型,新型肠道病毒有68~72型^[7-8]。大多数手足口病是人柯萨奇病毒和新型肠道病毒感染引起^[5],人柯萨奇病毒A16型和EV-71是最常见类型。

近些年手足口病发病有上升趋势,呈普遍性、爆发性流行,危害儿童健康发展。临床上手足口病感染无特异、高效的疫苗和治疗药物,只能对症支持治疗,积极防止发生并发症。早确诊、早治疗是该病愈后的关键。目前手足口病实验室检测的方法有病毒分离培养、血清学实验、核酸分子检测,确诊的金标准仍然是病毒分离培养。病毒分离培养和血清学实验耗时较长,核酸分子检测一般针对EV-71和/或CV-A16进行检测,不利于疾病诊断、监测和治疗,亟待开发简单、高效、快速诊断的对总肠道病毒进行检测和分型的试剂。本研究的目的是建立并验证总肠道病毒5'-非编码区(5'-non coding region, 5'-NCR)PCR扩增测序并在NCBI数据库进行生物信息比对分析的方法,为手足口病的早期快速病原诊断提供敏感、高效的总肠道病毒分子分型检测方法。

1 材料与方 法

1.1 临床标本及RNA提取

2008年5月至7月在广州市妇女儿童医疗中心收集165例临床检测阳性的手足口病门诊患者的咽拭子标本。取200 μL 咽拭子浸出液,用RNA提取试剂盒QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, 美国)提取总RNA,最后溶解在无菌、无RNA酶的DEPC水中。

1.2 引物设计

通过生物信息比对分析,在NCBI数据库中找到所有肠道病毒核酸序列,在其保守区,即5'-NCR设计了一对简并引物:上游引物PEF:5'-AYCYTT-GTRCGCCTGTTTT-3',下游引物PER:5'-CCCA AAGTGTCGGTTCCGC-3'(图1)。血清型包括CV-A1~A24型、B1~B6型,EV-71的Taiwan、Shenzhen、Korea、Singapore病毒株,埃可病毒2~7、9、11~17、19~22、24~26和29~33型。

1.3 RT-PCR

50 μL 一步法RT-PCR扩增体系包含:1 \times 一步法RNA PCR缓冲液、上下游引物浓度分别为0.3 μM 、1.5 mM MgCl_2 、200 μM dNTP、40 U Rnase抑制剂、5 U AMV逆转录酶XL、5 U AMV Taq DNA聚合酶、8 μL RNA模板。逆转录条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;PCR扩增条件94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s;共35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳、0.5 mg/mL EB染色。

1.4 PCR产物纯化和测序分析

PCR产物胶分离后用割胶纯化试剂盒QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, 美国)纯化。测序试剂盒为ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit (Applied Biosystems Inc., 美国),测序仪为Genetic Analyzer 377 (Applied Biosystems Inc., 美国)。

1.5 序列解读

每个临床标本5'-NCR PCR-测序所得序列都与NCBI GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的各型人肠道病毒血清型序列两两比对,根据查询覆盖得分和同一性得分得出各标本的血清型。本研究中501 bp的5'-NCR序列一致性得分大于91%时被视为同一肠道病毒血清型。

1.6 敏感性和特异性

EV-71病毒标准株纯化培养用于检测本方法的灵敏性,病毒滴度分别稀释为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 和 1×10^0 拷贝数/ μL ,RNA分别提取并用一步法扩增。同时用EV-71和CV-A16的阳性标本、非肠道病毒标本流感A、流感B、呼吸道合胞病毒、疱疹病毒检测了本方法的特异性。

1.7 统计学分析

数据的统计评价用SPSS 19.0统计分析软件, $P<0.05$ 被视为有显著差异。

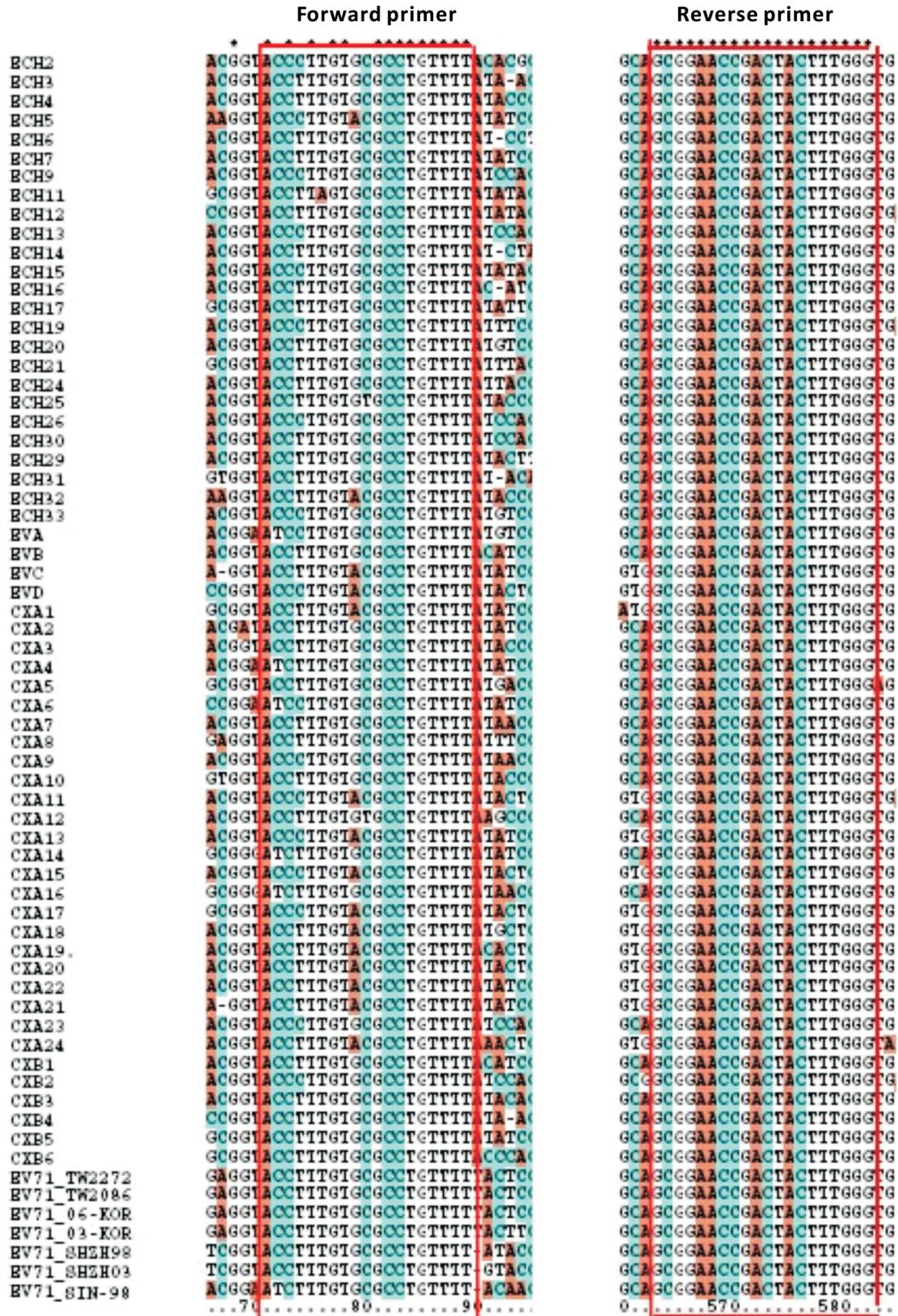
2 结 果

2.1 一步法RNA PCR

简并引物成功地扩增了临床标本,具有特异、有效的特点,扩增片段长度为501 bp,符合我们的设计(图2)。

2.2 手足口病患者血清型分布

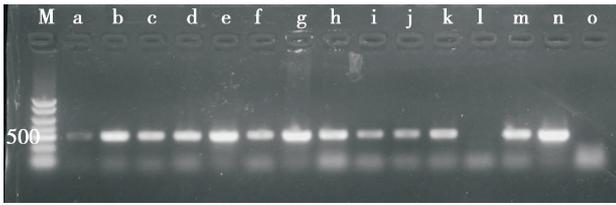
本研究165例肠道病毒感染阳性,其中77例



ECH:埃可病毒; CXA:柯萨奇病毒A型; CXB:柯萨奇病毒B型; EVA-EVD:肠道病毒A组-D组; EV71:肠道病毒71型

图1 简并引物对在肠道病毒基因组保守区中的位置

Figure 1 Primer pair located in the conserved region of the enterovirus genome



M: DNA marker; a-l: 临床标本 a 至 l; m: 柯萨奇病毒 A16; n: 肠道病毒 71 型; o: 阴性对照

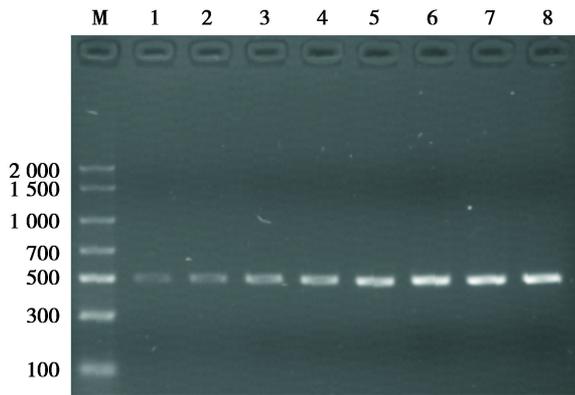
图 2 简并引物扩增 5'-NCR 的电泳图

Figure 2 Representative amplification by using primer PEF and PER on clinical samples and virus strains

EV-71(46.67%)、31 例 CV-A4(18.79%)、37 例 CV-A16(22.42%)、20 例(12.12%) 其他肠道病毒血清型,序列同源性基本达到 97%以上(表 1)。5'-NCR PCR 产物测序成功,获得 12 种肠道病毒血清型。

2.3 敏感性和特异性

用 EV-71 病毒检测本方法灵敏性,结果表明本方法能成功扩增 1×10^8 拷贝数/ μL 、 1×10^7 拷贝数/ μL 、 1×10^6 拷贝数/ μL 、 1×10^5 拷贝数/ μL 、 1×10^4 拷贝数/ μL 、 1×10^3 拷贝数/ μL ,PCR 条带的亮度随病毒滴度下降而变弱(图 3),本方法能有效扩增 EV-71 和 CV-A16,其他病原体流感 A、流感 B、腺病毒、呼吸道合胞病毒、疱疹病毒未扩增出任何条带(图 4)。



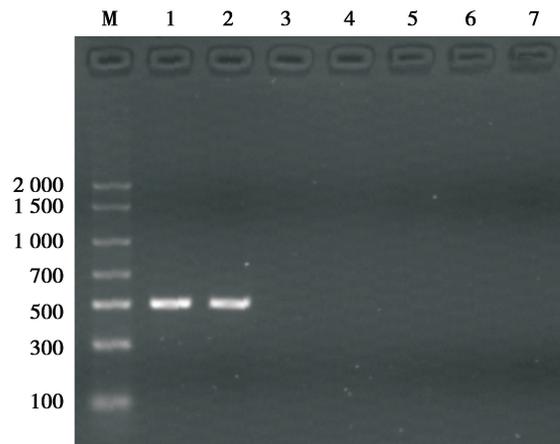
M: DNA marker; 1~8 分别表示病毒滴度 1×10^8 拷贝数/ μL 、 1×10^7 拷贝数/ μL 、 1×10^6 拷贝数/ μL 、 1×10^5 拷贝数/ μL 、 1×10^4 拷贝数/ μL 、 1×10^3 拷贝数/ μL 、 1×10^2 拷贝数/ μL 、 1×10^1 拷贝数/ μL

图 3 一步法 EV-71 RT-PCR 敏感性结果

Figure 3 Sensitivity of the EV-71 One step RNA PCR

3 讨论

手足口病是一类伴发热的疾病(体温大于 37.5°C),是相对温和的自限性疾病,过去几十年频



M: DNA marker; 1~7 泳道分别代表肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16、流感病毒 A 型、流感病毒 B 型、腺病毒、呼吸道合胞病毒、疱疹病毒

图 4 一步法 RT-PCR 特异性结果

Figure 4 Specificity of the One step RNA PCR

繁爆发,而且呈现出上升趋势,也有重症死亡的病例,成为亚太地区重要的公共卫生问题,手足口病重症致死与肠道病毒血清型有关,主要是肠道病毒 A 型感染引起。CV-A16、EV-71、Echo 和 CV-B 组是最常见的病因^[9-11]。CV-A16 最早于 1957 年在加拿大分离获得^[12],1968 至 1974 年日本爆发手足口病主要是 CV-A16 引起^[13]。20 世纪 70 年代以后 EV-71 成了手足口病的主要病因^[14]。本文提供了总肠道病毒同时检测的方法,2008 年 5 月至 7 月在我们医院就诊患者中手足口病爆发时检出 EV-71 和 CV-A16 为主(表 1),EV-71 感染可引起病毒性脑炎或脑膜脑炎, CV-A16 感染可引起病毒性心肌炎,因此结合临床症状,早期病原监测为患者争取更多的时间用于临床治疗意义重大。

肠道病毒鉴定的金标准是病毒分离和培养,随后用中和实验确定血清型。这一传统的诊断方法有其缺点:(1)耗时、费力,时间长;(2)64 种血清型抗体库中只有 40 种抗体,有时存在交叉反应;(3)全球范围 30 年前制备的抗血清有限;(4)毒株或抗原变异导致抗体凝集^[15-16];(5)有些肠道病毒在细胞中复制能力较差难以分型;(6)当需要更深入地了解更多详细的病毒特征时,需要同时接种多种细胞株进行病毒分离培养,找出敏感的细胞株,耗时费力,工作量非常大^[17]。

肠道病毒分子流行病学分析通常是以衣壳蛋白 VP1 为基础分析,VP1 具有型特异性^[15-16, 18],在

表1 手足口病病例和肠道病毒血清型分布
Table 1 Distribution of HFMD case and enterovirus serotypes

病毒类型	数量	病毒株/分离株	数量	同源性	登录号
CV-A2	2	A2 strain 431306	1	98%	JX867333.1
		A2 strain CVA2/SD/CHN/09	1	95%	HQ728259.1
CV-A4	31	A4 strain CVA4/SZ/CHN/09	31	98%	HQ728260.1
CV-A5	3	A5 strain CVA5/SD/CHN/09	3	97%	HQ728261.1
CV-A6	2	A6 isolate TW/20/09	1	92%	JQ946050.1
		A6 strain Gdula	1	93%	AY421764.1
CV-A9	2	A9 isolate CVA9_Alberta_2003	2	97%	JQ837913.1
CV-A10	1	A10 strain CVA10/SD/CHN/09	1	99%	HQ728262.1
		A16 isolate ZJ10-73 polyprotein gene	1	99%	KC755229.1
CV-A16	37	A16 strain GZ08	1	98%	FJ198212.1
		A16 strain KMM/08	1	99%	HQ423141.1
		A16 isolate BJ10-03	2	99%	KF193629.1
		A16 strain shzh00-1	2	98%	AY790926.1
		A16 strain CA16/GD09/119	3	99%	KC117318.1
		A16 strain SZ/HK08-3	27	99%	GQ279368.1
		CV-B1	1	B1 strain MSH/KM9/2009	1
CV-B3	6	B3 strain GZ803	1	100%	FJ357838.1
		B3 strain SSM-CVB3	1	97%	GU109481.1
CV-B5	2	B3 strain Fuyang19	4	98%	FJ000001.1
		B5 isolate 19CSF	1	99%	JX017381.1
Echo-E9	1	B5 isolate CVB5/SD/09	1	98%	JX276378.1
		E9 strain DM33	1	97%	KC238667.1
EV-71	77	EV A strain GZ08-831	7	99%	HQ456309.1
		EV A strain GZ08-522	14	99%	HQ456311.1
		EV71 isolate V06-2218645	1	98%	KC436267.1
		EV71 strain 121/SHENZHEN/08/China/HFMD Fatal/2008	1	100%	FJ607337.1
		EV71 strain 605/SHENZHEN/08/China/HFMD Severe/2008	1	100%	FJ607338.1
		EV71 strain BJ303	1	100%	HM002487.1
		EV71 strain BJ398	1	100%	HM002489.1
		EV71 strain EV71/Fuyang.Anhui.P.R.C/17.08/1	1	99%	EU703812
		EV71 strain EV71/GDSG/17/2008	1	99%	FJ194965.1
		EV71 strain H8-1	1	99%	JQ681218.1
		EV71 strain SD07-1/SD/CHN/2007	1	99%	JX678882.1
		EV71 strain SZ/HK08-6	2	98%	GQ279370.1
		EV71 strain TW/70516/08	2	98%	GQ231933.1
		EV71 isolate GZ-08-02	3	100%	FJ360545.1
EV71 strain FY17.08-4/AH/CHN/2008	5	100%	JX678875.1		
EV71 isolate V08-2221581	6	99%	KC436269.1		
EV71 isolate EV71/Zhejiang08	6	100%	EU864507.1		
EV71 isolate GZ-08-03	7	99%	FJ360546.1		
EV71 isolate GZ-08-01	16	99%	FJ360544.1		

EV:人肠道病毒; CV:柯萨奇病毒

疾病爆发早期能绕过病毒分离培养,有助于集中有限的资源,快速鉴定病例之间的流行病学关联分析。*VPI* 基因分析方法只针对一种血清型设计,一次分析无法针对所有的肠道病毒血清型,而且扩增效率不高,扩增片段短,简并引物不适合直接 PCR 产物测序、*VPI* 基因序列存在复杂变异等缺点限制了 *VPI* 在总肠道病毒分析中的应用,总肠道病毒基因分型需要多对引物和多个反应才能完成,目前没有快速有效的针对总肠道病毒进行基因分型的方法。在疾病爆发时总肠道病毒分析变得复杂,单个的 *VPI* 基因分析不足以监测和甄别不同类型的总肠道病毒。研究表明 5'-NCR 的系统发生与肠道病毒血清型无直接关系^[19]。但我们通过对所有肠道病毒序列比对分析表明,5'-NCR 存在高度同源性,但各血清型之间也存在差异性,于是在总肠道病毒的保守区设计引物扩增,确保单管单反应能扩增出所有肠道病毒血清型,我们的结果表明该方法能特异地扩增总肠道病毒,以不同病毒滴度的 EV-71 验证本方法的灵敏度,1×10³ 拷贝数/μL 的标本能成功扩增,方法学上达到了目前 PCR 方法的灵敏度标准。

肠道病毒血清型鉴定对临床患者管理有一定的意义,分子分型还可以在疾病监测方面提供有价值的流行病学信息。通过我们建立的 PCR-测序方法从临床样本中鉴定了 CV A 型、CV B 型、EV-71 的不同分离株和埃可病毒。从研究结果可知有 12 种肠道病毒与 2008 年手足口病爆发有关,其中 EV-71 和 CV 占的比例最大,可能是引起此次爆发的主要病原。

我们所建立的方法优点在于,首先是基于单管单反应,其次是一步法 RT-PCR 扩增测序获得了 501 bp 的扩增片段,含 746 核苷酸的 5'-NCR 是肠道病毒基因组的重要区域,负责起始 RNA 合成、病毒蛋白表达调节,是一个相对稳定的区域,对病毒宿主反应和致病性至关重要,具有 91% 以上同源性的序列分析表明 501 bp 扩增片段可以保证血清分型的准确性和特异性。获取临床标本后,1 h 内完成 RNA 提取,RT-PCR 扩增 2 h 内完成,测序也在 3 h 内完成,所以一旦有手足口病疫情,不管是哪一种肠道病毒引起,一天之内就可以出具分析报告,指导临床治疗和卫生决策。综上所述,本方法具有快速、方便、准确、高效的特点。

参考文献

- [1] Ooi MH, Wong SC, Mohan A, et al. Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak [J]. *BMC Infect Dis*, 2009, 9:3.
- [2] Yap MS, Tang YQ, Yeo Y, et al. Pluripotent human embryonic stem cell derived neural lineages for in vitro modelling of enterovirus 71 infection and therapy [J]. *Virology*, 2016, 13:5.
- [3] Xing W, Liao Q, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(4):308-318.
- [4] Lee DS, Lee YI, Ahn JB, et al. Massive pulmonary hemorrhage in enterovirus 71-infected hand, foot, and mouth disease [J]. *Korean J Pediatr*, 2015, 58(3): 112-115.
- [5] Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease [J]. *Progress in Medical Virology. Fortschritte Der Medizinischen Virusforschung. Progres En Virologie Medicale*, 1978, 24:114-157.
- [6] Tao Z, Wang H, Li Y, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus associated with aseptic meningitis in Shandong province, China, 2006-2012 [J]. *Plos one*, 2014, 9(2):e89766.
- [7] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [8] Brown BA, Pallansch MA. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus [J]. *Virus research*, 1995, 39(2-3):195-205.
- [9] Itagaki A, Ishihara J, Mochida K, et al. A clustering outbreak of hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackie virus A10 [J]. *Microbiology and immunology*, 1983, 27(11):929-935.
- [10] Lum LC, Chua KB, McMinn PC, et al. Echovirus 7 associated encephalomyelitis [J]. *Journal of clinical virology*, 2002, 23(3):153-160.
- [11] Chan YF, AbuBaker S. Recombinant human enterovirus 71 in hand, foot and mouth disease patients [J]. *Emerging infectious diseases*, 2004, 10(8): 1468-1470.
- [12] Drebot MA, Campbell JJ, Lee SH. A genotypic characterization of enteroviral antigenic variants isolated in eastern Canada [J]. *Virus research*, 1999, 59(2): 131-140.

(下转第 246 页)

· 论 著 ·

中国广东地区汉族人群 P 选择素糖蛋白配体-1 *Met62Ile* 基因多态性与冠心病的相关性探讨

明凯华* 雷秀霞 邹愉 杨娜 徐邦牢 黄子宜

【摘要】 目的 探讨 P 选择素糖蛋白配体-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) *Met62Ile* (*M62I*) 基因多态性在中国广东地区汉族人群中的分布特点及其与冠心病 (coronary heart disease, CHD) 的相关性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction restriction-fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析方法检测 200 名该地区冠心病患者和 200 名汉族健康人群 PSGL-1 *M62I* 基因型, 计算并比较各组基因型频率及等位基因频率。结果 200 名冠心病组中 P 选择素 PSGL-1 *M62I* 基因型以 *Met/Met* (*M/M*) 型发生频率最高 (73.0%), *Met/Ile* (*M/I*) 型次之 (27.0%), 未检测到 *Ile/Ile* (*I/I*) 型; *M*、*I* 各型等位基因频率分别为 86.5%、13.5%, 该位点基因多态性分布在男女间无显著性差异 ($P>0.05$)。200 名正常对照组中 P 选择素 PSGL-1 *M62I* 基因型以 *M/M* 型发生频率最高 (69.0%), *M/I* 型次之 (31.0%) 未检测到 *I/I* 型; *M*、*I* 各型等位基因频率分别为 84.5%、15.5%, 该位点基因多态性分布在男女间无显著性差异 ($P>0.05$)。两组人群间各基因型及等位基因分布无显著性差异 ($P>0.05$)。结论 中国广东地区冠心病患者和健康人群 PSGL-1 *M62I* 基因多态性在男女之间均无较大的差异。PSGL-1 *M62I* 位点可能不是冠心病的易感基因。

【关键词】 PSGL-1; 基因多态性; 冠心病; 性别

Investigate the relationship between P-selectin glycoprotein ligand-1 *M62I* gene polymorphism and coronary heart disease in China Guangdong Han Population

MING Kaihua*, LEI Xiuxia, ZOU Yu, YANG Na, XU Banglao, HUANG Ziyi

(Department of Laboratory Medicine Section, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510180)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the different age groups distribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) *Met62Ile* (*M/I*) gene polymorphism in the Chinese Han population and the relationship between the polymorphism and coronary heart disease (CHD). Methods Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used to detect the genotype and allele frequency of PSGL-1 *M62I* in 200 patients with CHD and then the genotype and allele frequencies were compared to a control population of 200 healthy, Han Chinese. Results In the 200 CHD patients of Guangdong area, the highest frequency of PSGL-1 *M62I* genotype is *M/M* (73.0%), followed by *M/I* (27.0%). The *I/I* genotype was not detected; *M*, *I* allele frequencies were 86.5% and 13.5%. These gene polymorphisms had no significant difference between males and females ($P>0.05$). In the healthy control population, the highest frequency of PSGL-1 *M62I* genotype is *M/M* (69.0%), followed by *M/I* (31.0%). The *I/I* genotype was also not detected. The allele frequencies of *M* and *I* were 86.75% and 13.25%. These gene polymorphisms had no significant difference between males and females ($P>0.05$). There were no significant differences between CHD

基金项目:广州市卫生医药科技项目(20151A010009)

作者单位:广州市第一人民医院检验科,广东,广州 510180

*通讯作者:明凯华, E-mail: kz-1979@163.com

group and normal group ($P>0.05$). **Conclusion** Between the CHD patients and healthy Han Chinese population of the Guangdong area in China, there were no significant differences in PSGL-1 *M62I* gene polymorphism. The PSGL-1 *M62I* gene may not be the susceptibility gene of CHD.

[KEY WORDS] PSGL-1; Genetic polymorphism; CHD; Gender

P选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)作为P选择素的配体被发现的粘附分子,是一种跨膜的糖蛋白,具有同源二聚体的结构,具有广泛的生物学活性,其单体分子量约为120 kD,表达于几乎所有类型的白细胞表面^[1]。分子生物学研究证实,PSGL-1基因存在多个位点多态性并影响其转录和表达^[2]。且PSGL-1基因多态性可能与炎症性疾病如冠心病等具有相关性。人类PSGL-1基因位于染色体的12q24区域,包含2个外显子^[3]。目前国外有一些关于PSGL-1基因多态性与疾病的研究报道,主要是M62I与可变数量的串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)等位点与心脑血管疾病的相关研究^[4-9]。这些基因多态性的存在可能影响PSGL-1基因表达和功能。由于国外的文献均是以欧美地区人群为研究对象,而我国仅有VNTR基因多态性与冠心病方面的报道^[10],但结果并无相关性。而M62I位点则无相关报道,这可能由于与该位点多态性在亚洲人群中少见或者与心脑血管疾病相关性不强有关。因此,本文旨在通过探讨我国广东地区汉族人群PSGL-1 M62I基因多态性的分布特点及与冠心病(coronary heart disease, CHD)间的相关性,了解我国汉族人群PSGL-1 M62I基因多态性的分布情况,分析PSGL-1 M62I基因与冠心病间的易感性。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 试剂

人白细胞DNA提取试剂为中山大学达安基因股份有限公司产品;Permixon Taq试剂为日本Takara公司产品;限制性内切酶Rsa I为美国Thermo公司产品;其余试剂均为分析纯。

1.1.2 引物设计与合成

参照有关文献^[8]设计一对引物,P1:5'-CTT-GCCAGAAACGGAAGCTCCAGAAGT-3',P2:5'-TTCCCCATGTTGGCCAGCTCCGT-3'。以上引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 实验对象

冠心病组:200例,均来自2015年3月至10月广州市第一人民医院心内科病房或冠心病监护病房,病例均符合1979年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)关于缺血性心脏病的命名和诊断标准。男性151例,女性49例,年龄37~83岁,平均年龄(54.7±10.2)岁。正常对照组:200例,随机选取广州市第一人民医院健康体检者作为正常对照组,男性151例,女性49例,年龄32~79岁,平均年龄(42.6±8.5)岁。临床、心电图和实验室检查均正常,排除肝、肾、内分泌和心脑血管疾病。所有研究对象均为自然人群、汉族且无血缘关系。

1.3 实验仪器

美国伯乐公司BIO-RAD S1000型PCR扩增仪和BIO-RAD Power Pac电泳仪;日本TOMY公司KIT-MAN高速冷冻离心机;英国UVI凝胶成像系统。

1.3 实验方法

1.3.1 取材

受检者禁食12 h以上,次晨用EDTA-K₂抗凝管采肘静脉血,-20℃保存备用。

1.3.2 人类基因组白细胞DNA提取

按照人白细胞基因组提取试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)的说明进行。

1.3.3 方法

聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction restriction - fragment length polymorphism, PCR-RFLP)。

1.3.4 PCR扩增条件

参照相关文献^[9]进行。反应体系为25 μL,其中含Permixon Taq 15 μL,引物P1、P2各20 pmol,模板DNA 2.0 μL,不足体积用灭菌双蒸水补足至25 μL,置PCR仪中进行扩增。反应条件为94℃ 5 min;再按下列程序循环35次:94℃ 30 s,61℃ 30 s,72℃ 45 s;末次循环后,72℃ 5 min。

1.3.5 扩增产物的限制性酶切

酶切产物经2%琼脂糖凝胶电泳,通过英国UVI凝胶成像系统判断结果。酶切条件见表1。

表1 PSGL-1 M62I酶切条件

Table 1 Digestion conditions of PSGL-1 M62I

位点	PCR产物 (μ L)	内切酶	温育时间 (min)	产物片段大小 (bp)
Met62Ile (G/A)	10	Rsa I	5	Met: 27 Ile: 147

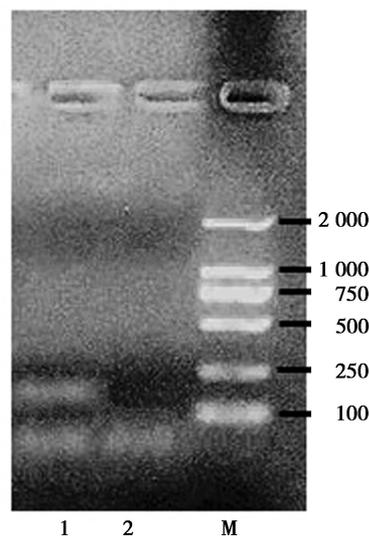
1.4 统计学方法

所有资料均以 SPSS 12.0 软件包分析。基因型和等位基因频率采用直接基因计数法计算。研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、单个基因型及组间等位基因频率比较采用四格表 χ^2 检验。男女间基因频率比较采用 $R \times C$ 列联表 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSGL-1 M62I 基因型检测结果

冠心病组与正常组中均存在 PSGL-1 M62I 基因多态性:PCR 扩增产物片段大小均为 174 bp, 根据限制性内切酶 Rsa I 酶切片段的的情况, 基因型有 2 种, Met/Met (M/M) 型 (27 bp 一条带), Met/Ile (M/I) 型 (27 bp、147 bp 2 条带), 均未检测到 Ile/Ile (I/I) 型 (147 bp 一条带)。见图 1。



M: DL-2000 Marker 分子量标准; 1: M/I 基因型; 2: M/M 基因型

图1 PSGL-1 M62I 基因多态性 2% 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Image of 2% agarose gel electrophoresis of PSGL-1 M62I polymorphism

2.2 PSGL-1 M62I 基因多态性分布情况

在冠心病组各基因型分布中 M/M 型 73.0%, M/I 型 27.0%, I/I 型 0; 等位基因频率分布为 M 型 86.5%, I 型 13.5%。男女间基因型、等位基因频率分布存在较大差异 ($P = 0.07$), 但差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。

表2 冠心病组男女 PSGL-1 M62I 基因型及等位基因分布 (%)

Table 2 Distribution of CHD group PSGL-1 M62I polymorphism genotype and allele frequencies in male and female (%)

组别	例数	基因型频率			P 值	等位基因频率		P 值
		M/M	M/I	I/I		M	I	
男性	151	115 (76.16)	36 (23.84)	0 (0)	0.07	266 (88.08)	36 (11.92)	0.10
女性	49	31 (63.27)	18 (36.73)	0 (0)		80 (81.63)	18 (18.37)	
合计	200	146 (73.00)	54 (27.00)	0 (0)		346 (86.5)	54 (13.5)	

男性 vs 女性 $P > 0.05$

在正常对照组各基因型分布中 M/M 型 69.0%, M/I 型 31.0%, I/I 型 0; 等位基因频率分布为 M 型 84.5%, I 型 15.5%。男女间基因型、等位基因频率分布均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 3)。

2.3 组间 PSGL-1 M62I 基因型频率及等位基因携带频率比较

排除年龄和性别影响后两组间 PSGL-1 M62I 多态性相比较, 发现 PSGL-1 M62I 基因型分布及等位基因携带频率均无显著差异 ($P > 0.05$) (表 4)。

3 讨论

冠心病是由环境和遗传等多种因素共同作用而导致的一类极其复杂的疾病, 炎症基因也被认为在冠状动脉粥样硬化形成中起了重要的作用。PSGL-1 是体内参与炎症反应的重要粘附分子。PSGL-1 是 90 年代初期发现的一种作为 P-选择素的配体的粘附分子, 是一种 I 型跨膜的糖蛋白, 选择素及其配体 PSGL-1 可在血流状态下介导白细胞在内皮细胞上的起始粘附, 进而引起一系列的

表3 正常组男女 PSGL-1 M62I 基因型及等位基因分布 (%)

Table 3 Distribution of normal group PSGL-1 M62I polymorphism genotype and allele frequencies in male and female (%)

组别	例数	基因型频率			P 值	等位基因频率		P 值
		M/M	M/I	I/I		M	I	
男性	147	103(70.07)	44(29.93)	0(0)	0.59	250(85.03)	44(14.97)	0.62
女性	53	35(66.04)	18(33.96)	0(0)		88(83.02)	18(16.98)	
合计	200	138(69.00)	62(31.00)	0(0)		338(84.50)	62(15.50)	

男性 vs 女性 $P > 0.05$

表4 CHD 组与正常组间 PSGL-1 M62I 多态性相比较 (%)

Table 4 Comparison of PSGL-1 M62I polymorphisms between CHD group and normal group (%)

组别	n	基因型频率		P 值	等位基因频率		P 值
		M/M	M/I		M	I	
CHD 组	200	146(73.00)	54(27.00)	0.38	346(86.50)	54(13.50)	0.42
正常组	200	138(69.00)	62(31.00)		338(84.50)	62(15.50)	

CHD 组 vs 正常组 $P > 0.05$

级联反应,最终促进了动脉粥样硬化斑块的形成^[11]。因此,PSGL-1在冠心病发病机制中可能发挥一定的作用。

近些年,国外仅有几篇关于 PSGL-1 M62I 基因多态性与心脑血管方面研究的文献^[2,4-5,9],而国内只有关于 PSGL-1 M62I 基因多态性与脑卒中方面研究^[12],心血管方面则无文献报道。因此,本研究率先分析了中国广东地区 200 名冠心病患者与 200 名正常对照人群 PSGL-1 M62I 基因多态性的遗传分布特点,结果显示 CHD 组和正常对照组各基因型和等位基因频率分布几乎一致,在我们所观察的 2 组人群中 M62I 均只表现出 2 种基因型: M/M 型和 M/I 型,这与国外文献报道相符^[2,5,9]。但并未发现 I/I 型,可能研究的样本量还不够。由此说明同其他国家和地区一样在我国广东地区汉族人群中存在 M62I 基因多态性,也证明基因多态性是人类基因组中非常普遍的现象。

性别差异在心血管疾病的病理有尚未得到广泛研究^[13-15]。有证据表明性别特异性影响人类基因型结构,包括生殖,生理和疾病特征^[16-18]。本次研究显示两组人群中 CHD PSGL-1 M62I 基因多态性在男女间差异均无显著性($P > 0.05$)。另外,本研究发现 CHD 组中 PSGL-1 M62I M/M 和 I/I 基因型在男女间存在较大差异($P = 0.07$),但未有显著性差异,可能与样本量不够大有关。本研究结果与 Volcik 等^[8]文献报道并不相符,这种差别可能

是导致冠心病在不同性别及种族间的发病率和临床表现存在显著不同的因素之一。

对 M62I 位点酶切多态性进行分析显示:CHD 组 M/M、M/I 基因型构成比分别为 73.0%和 27.0%,对照组中分别为 69.0%和 31.0%,PSGL-1 M62I 位点多态性在两组间的分布无统计学差异($P > 0.05$)。说明 M62I 位点可能不是 CHD 的易感基因,后期需加大两组间的样本量再行比较。

另外,本研究结合国外相关文献,将塞尔维亚^[8]、德国^[4]人群 PSGL-1 M62I 基因多态性研究结果与本研究进行对比分析,我们发现 PSGL-1 M62I 基因型和等位基因频率与西方这些国家人群均分别存在显著差异($P < 0.001$),M 型等位基因频率远低于以上 2 个地区人群水平,而 I 型等位基因频率则高于以上 2 个地区人群水平,说明 M62I 基因多态性在不同种族间呈现种族和地域的差异显著。这一结果符合遗传学规律,即亲缘关系越远,其基因型分布越显著。

综上,基因多态性是人类基因组中一个较为常见的现象,而心血管疾病的发生和发展受到多种因素的影响。本文以 PSGL-1 M62I 基因作为研究对象,研究我国汉族人群中 PSGL-1 M62I 基因多态性的分布特点并探讨该位点多态性与 CHD 的关系,从而为今后进一步研究我国汉族人群中某些疾病的发生发展与 PSGL-1 M62I 基因多态性的关系奠定基础。

参考文献

- [1] Moore KL, Stults NL, Diaz S, et al. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells[J]. *J Cell Biol*, 1992, 118(2):445-456.
- [2] Tregouet DA, Barbaux S, Poirier O, et al. SELPLG gene polymorphisms in relation to plasma SELPLG levels and coronary artery disease[J]. *Ann Hum Genet*, 2003, 67(6):504-511.
- [3] Veldman GM, Bean KM, Cumming DA, et al. Genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding human P-selectin glycoprotein ligand[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(27):16470-16475.
- [4] Schmalbach B, Stepanaow O, Jochens A, et al. Determinations of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke[J]. *Cerebrovascular Diseases*, 2015, 39(3-4):176-180.
- [5] Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, et al. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(9):997-1004.
- [6] Roldán V, González-Conejero R, Marín F, et al. Short alleles of P-selectin glycoprotein ligand-1 protect against premature myocardial infarction[J]. *Am Heart J*, 2004, 148(4):602-605.
- [7] Ozben B, Diz-Kucukkaya R, Bilge AK, et al. The association of P-selectin glycoprotein ligand-1 VNTR polymorphisms with coronary stent restenosis[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2007, 23(3):181-187.
- [8] Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, et al. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 195(1):e76-e82.
- [9] Zivković M, Kolaković A, Radak D, et al. The sex-specific association of Met62Ile gene polymorphism in P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) with carotid plaque presence: preliminary study[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(6):6479-6485.
- [10] 蒋小仙. P选择素糖蛋白配体-1 VNTR多态性与冠心病的相关性研究[D]. 杭州:浙江大学, 2007.
- [11] Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(1):181-213.
- [12] 李滔, 梅冰. P-选择素 P-选择素糖蛋白配体1血液水平及基因多态性与缺血性脑梗死[J]. *微循环学杂志*, 2015, 25(4):72-76.
- [13] Stanković A, Zivković M, Alavantić D. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in a Serbian population: a gender-specific association with hypertension[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2002, 62(6):469-475.
- [14] Petrović D, Bregar D, Guzić-Salobir B, et al. Sex difference in the effect of ACE-DD genotype on the risk of premature myocardial infarction[J]. *Angiology*, 2004, 55(2):155-158.
- [15] Plesković A, Vraspir-Porenta O, Zorc-Plesković R, et al. Deficiency of mast cells in coronary artery endarterectomy of male patients with type 2 diabetes[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10:40.
- [16] Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(12):911-922.
- [17] Liao YC, Lin HF, Guo YC, et al. Sex differential genetic effect of phosphodiesterase 4D (PDE4D) on carotid atherosclerosis[J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11:93.
- [18] Wang L, Yanuck D, Beecham A, et al. A candidate gene study revealed sex-specific association between the OLR1 gene and carotid plaque[J]. *Stroke*, 2011, 42(3):588-592.

地中海贫血实验室筛查指标评价

陈熙 肖克林* 罗茗月 麦光兴 夏勇

[摘要] **目的** 探讨多项实验室指标用于筛查地中海贫血(简称地贫)基因携带者的临床应用价值。**方法** 选取在深圳市宝安区妇幼保健院体检、婚检和产检的人员1 373例,对其均进行血常规红细胞分析、血红蛋白成份分析和地贫基因诊断。以基因诊断为金标准,对已明确诊断的 α -地贫组548例、 β -地贫组248例、 α -合并 β -地贫组33例和非地贫组544例,进行红细胞参数[红细胞数量(red blood cell count, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HB)含量、红细胞压积(hematocrit, HCT)、平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)和血红蛋白 A_2 (hemoglobin A_2 , Hb A_2)含量]比较;计算MCV、MCH和Hb A_2 3项血液学指标联合筛查结果的灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值。**结果** 地贫组与非地贫组比较,地贫组HB、HCT、MCV、MCH和MCHC均减低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与非地贫组相比较, β 地贫组Hb A_2 值明显升高($P < 0.05$)。MCV与MCH 2项平行联合筛查地贫的灵敏度及特异度分别为94.0%和82.9%;MCV、MCH和Hb A_2 -HPLC 3项平行联合筛查地贫的灵敏度及特异度为97.7%和39.2%。**结论** Hb A_2 定量分析是筛查 β -地贫极有价值的实验室指标,但对于筛查 α -地贫敏感性较差,漏检率高。MCV、MCH两者平行联合或与Hb A_2 -HPLC三者平行联合筛查有较高的检测灵敏度,但特异度不甚理想。因此在进行地贫筛查时,需综合分析实验室各项指标,以降低漏诊率。

[关键词] 地中海贫血;平均红细胞体积;平均血红蛋白含量;血红蛋白

Evaluation of laboratory index for screening thalassemia

CHEN Xi, XIAO Kelin*, LUO Mingyue, MAI Guangxing, XIA Yong

(Central Laboratory, Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518133)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value of several laboratory indexes (RBC, HB, HCT, MCV, MCH, MCHC and Hb A_2) for screening thalassemia. **Methods** 1 373 cases were recruited from Shenzhen Bao'an Maternity and Child Health Hospital, including 548 α -thalassemia, 248 β -thalassemia, 33 α - and β -combined thalassemia and 544 normal, all have been tested for routine blood erythrocyte parameters (red blood cell count, RBC; hemoglobin, HB; hematocrit, HCT; mean corpuscular volume, MCV; mean corpuscular hemoglobin, MCH; mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) and hemoglobin A_2 (Hb A_2) quantitative, α - and β -thalassemia associated genes. The sensitivity, specific, positive predictive value and negative predictive value of MCV, MCH and Hb A_2 for screening thalassemia were calculated by using gene examination results as the golden standard. **Results** In comparison with normal subjects, RBC, HB, HCT, MCV, MCH and MCHC of thalassemia cases declined ($P < 0.05$), Hb A_2 of β -thalassemia increased significantly ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of parallel test of MCV and MCH were 94.0% and 82.9%; The sensitivity and specificity of parallel test of MCV, MCH and Hb A_2 -HPLC were 97.7% and 39.2%. **Conclusion** Hb A_2 quantity is a reliable index for screening β -thalassemia, but not good for screening α -thalassemia because of the

作者单位:深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室,广东,深圳 518133

*通讯作者:肖克林, E-mail: lexkl@163.com

lower sensitivity and high misdiagnosis risk. The parallel tests of MCV, MCH and HbA₂-HPLC were of higher detection sensitivity, but specificity of that was not ideal. So the laboratory indexes of screening thalassemia should be analyzed comprehensively, in order to reduce the rate of misdiagnosis.

[KEY WORDS] Thalassemia; Mean corpuscular volume; Mean corpuscular hemoglobin; Hemoglobin

地中海贫血(简称地贫)是由于珠蛋白基因突变导致肽链表达失衡而产生的单基因常染色体隐性遗传性贫血病^[1]。根据生成减少的珠蛋白链种类将地贫分为 α -、 β -、 $\delta\beta$ -和 δ -型地贫等类型,其中 α -和 β -地贫较为常见。本病高发于地中海沿岸和东南亚各国,在我国多分布于广东、广西、海南、四川等省区^[2]。该病危害大^[3],重型地贫患者绝大多数于儿童期死亡。目前通过实验室方法对地贫进行筛查和产前基因诊断是杜绝重型地贫患儿出生的有效措施。地贫的常规实验室筛查项目主要为血液学检查内容,包括红细胞参数、血红蛋白分析等^[4]。地贫基因诊断则是确诊该病的金标准^[5],一般基于PCR、核酸杂交、基因芯片和DNA测序等技术。为合理选择实验室检查项目和方法进行地贫筛查,本研究对筛查地贫的各项实验室指标[红细胞数量(red blood cell count, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, HB)含量、红细胞压积(hematocrit, HCT)、平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、血红蛋白A₂(hemoglobin A₂, HbA₂)含量]进行系统分析,评价其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取从2012年1月至2013年12月在深圳市宝安区妇幼保健院体检、婚检和产检的人员1373例,年龄17~48岁,平均年龄为26.9岁,所选研究对象均进行血细胞分析、血红蛋白成份分析和地贫基因诊断。基因诊断确诊地贫基因携带者829例,非地贫患者544例。

1.2 仪器与试剂

Coulter LH750 血细胞分析仪(Beckman, 美国), Variant™ II 血红蛋白分析仪(Bio-Rad, 美国), Mastercycler5331 梯度PCR仪(Eppendorf, 德国), 凝胶成像分析系统(UVI, 英国), 电泳仪(北京六一仪器厂DYC系列), 杂交仪(UVP, 美国), 全血DNA快

速提取试剂盒(深圳亚能生物技术有限公司), α -/ β -地中海贫血基因检测试剂盒(深圳亚能生物技术有限公司), 电泳缓冲液:0.5×TBE(深圳亚能生物技术有限公司), 琼脂糖(solarbio, 西班牙)。

1.3 方法

1.3.1 红细胞参数检测

采用全自动血细胞分析仪检测红细胞参数, 严格执行实验室质控检测。设定成人MCV、MCH正常参考值范围分别为80~95 fL和27~31 pg, 取MCV<80 fL、MCH<27 pg为阳性截断值。

1.3.2 血红蛋白分析

采用离子交换高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)方法分离红细胞中的血红蛋白成份^[6], 根据出峰时间(保留时间)和出峰面积大小来分析不同血红蛋白的成份和含量。实验操作和结果分析均按说明书进行。设定成人HbA₂的正常参考值范围为2.5%~3.5%, 取HbA₂<2.5%或HbA₂>3.5%为阳性截断值。

1.3.3 地中海贫血基因诊断

首先通过柱式分离法提取全血DNA。再采用gap-PCR方法检测中国人群中常见的3种缺失型 α -地贫(--^{SEA}、- $\alpha^{3.7}$ 与- $\alpha^{4.2}$), 采用PCR-反向斑点杂交(PCR-reverse dot blot, PCR-RDB)技术检测常见的3种突变型 α -地贫($\alpha^{CS}\alpha$ 、 $\alpha^{QS}\alpha$ 、 $\alpha^{WS}\alpha$)和17种突变型 β -地贫{CD41-42(-TTCT), IVS-II-654(C→T), -28(A→G), -29(A→G), -30(T→C), -32(C→A), CD17(A→T), CD31(-C), CD43(G→T), CD71-72(+A), β E(GAG→AAG), CD14-15(+G), CD27/28(+C), IVS-I-1(G→A, G→T), IVS-I-5(G→C), CAP[CAP+1(A→C)/5'UTR; +43to+40(-AAAC)], Int(ATG→AGG)}。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 地中海贫血基因携带率

选取的1373例产检、婚检及健康体检者中共

检出 829 例地贫基因携带者。其中单纯 α-地贫基因携带者 548 例,携带率为 39.9%;β-地贫基因携带者 248 例,携带率为 18.1%;α 合并 β 地贫基因携带者 33 例,携带率为 2.4%。

2.2 地中海贫血基因突变类型

α-地贫基因突变类型包括 --^{SEA}、-α^{3.7}、-α^{4.2}、α^{CS}α、α^{QS}α、α^{WS}α,其中--^{SEA}型最为常见,占 66.8%。β-地贫共检出 11 种基因突变类型,其中 CD41-42 (-TTCT)和 IVS- II -654(C→T)为最常见的突变

类型。

2.3 血常规红细胞参数比较

统计红细胞 6 项参数:红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(HB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)。α-、β、α 合并 β 地贫组的 MCV、MCH、MCHC、HB、HCT 与非地贫组比较均降低,差异均有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 地贫患者与健康者红细胞参数测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The erythrocyte parameters of thalassemia patients and normal subjects($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HB(g/L)	HCT(%)
非地贫组	544	89.5±6.0	29.4±2.2	327.7±8.6	4.1±0.4	121.1±7.1	39.6±2.2
α-地贫*	548	72.8±7.5	22.9±2.6	314.7±11.0	4.7±0.5	107.2±10.6	34.0±3.1
β-地贫 ^Δ	248	66.0±4.3	20.7±1.3	313.8±10.2	4.8±0.5	98.3±9.4	31.3±3.0
α 合并 β 地贫 ^{ΔΔ}	33	68.8±4.8	21.7±1.4	315.3±11.3	4.8±0.5	104.5±9.1	33.2±3.0

*、^Δ、^{ΔΔ}与非地贫组比较,P 均=0.000; *MCV:t=40.950, P<0.001; *MCH:t=44.442, P<0.001; *MCHC:t=21.716, P<0.001; *RBC:t=-20.772, P<0.001; *HB:t=25.372, P<0.001; *HCT:t=17.974, P<0.001; ^ΔMCV:t=55.759, P<0.001; ^ΔMCH:t=57.474, P<0.001; ^ΔMCHC:t=19.806, P<0.001; ^ΔRBC:t=-19.625, P<0.001; ^ΔHB:t=37.506, P<0.001; ^ΔHCT:t=29.516, P<0.001; ^{ΔΔ}MCV:t=19.498, P<0.001; ^{ΔΔ}MCH:t=19.707, P<0.001; ^{ΔΔ}MCHC:t=7.836, P<0.001; ^{ΔΔ}RBC:t=-10.612, P<0.001; ^{ΔΔ}HB:t=12.686, P<0.001; ^{ΔΔ}HCT:t=9.363, P<0.001

2.4 HbA₂测定结果

与非地贫组比较,β-地贫组和 α 合并 β 地贫组 HbA₂ 值明显升高(P<0.05),α-地贫组 HbA₂ 轻度降低(P<0.05),见表 2。

表 2 非地贫组和地贫组 HbA₂结果比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 HbA₂ of thalassemia patients and normal subjects ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HbA ₂ (%)	t	P 值
非地贫组	544	2.514±0.380		
α 地贫	548	2.471±0.252	2.234	0.026*
β 地贫	248	5.099±0.370	-89.501	<0.001 ^Δ
α 合并 β 地贫	33	5.099±0.52	-36.986	<0.001 ^{ΔΔ}

*、^Δ、^{ΔΔ}与非地贫组比较

2.5 MCV、MCH、HbA₂联合实验检测

本研究采用 MCV、MCH 两者平行联合或与 HbA₂-HPLC 三者平行联合实验来筛查地贫携带率,当三者平行联合筛查时,灵敏度可达 97.7%,但特异度较低,见表 3、表 4。

表 3 MCV、MCH、HbA₂-HPLC 平行联合实验筛查地贫阳性例数(n)

Table 3 The positive cases of the parallel test for MCV, MCH, HbA₂-HPLC on screening thalassemia (n)

组别	n	MCV+MCH	MCV+MCH+ HbA ₂ -HPLC
非地贫组	544	93	331
地贫组*	829	779	810

*包含 α 地贫 548 例、β 地贫 248 例、α 合并 β 地贫 33 例

表 4 MCV、MCH、HbA₂-HPLC 平行联合实验检测地贫的评价指标(%)

Table 4 The effectiveness of the parallel test for MCV, MCH, HbA₂-HPLC on screening thalassemia (%)

联合试验组合方式	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值	准确率
MCV+MCH	94.0	82.9	89.3	90.0	89.6
MCV+MCH+HbA ₂ -HPLC	97.7	39.2	71.0	91.8	74.5

3 讨论

重型地贫患者需终生靠输血和去铁治疗维持,因此通过选择性引产是预防重型地贫患儿出生的有效对策^[7]。深圳是个移民城市,城市人员来自不同地区,为做好地贫基因产前诊断和遗传咨询工作,首先需了解这一区域地贫基因的常见缺失和突变类型。在本研究所选受检对象中, α -地贫携带率最高的为东南亚缺失型,这也是我国南方最主要缺失型^[8];CD41-42(-TTCT)和IVS-II-654(C→T)为常见 β -地贫基因突变类型,同广东省其他地区报道的类似^[9]; α 合并 β 复合型地贫的携带率为2.4%,高于广州报道的0.37%^[10],可能与选择的人群不同有关。

目前,实验室地贫筛查项目一般包括红细胞参数检测,红细胞渗透脆性试验、血红蛋白组分分析和血清铁代谢检测等。为建立准确、快速地筛查模式,本研究系统评价实验室各项地贫筛查指标,以简化诊断策略。红细胞参数检测对发现贫血有重要意义,一般患者MCV<80 fL, MCH<27 pg提示其可能是患缺铁性贫血或为地贫基因携带者,并且MCV和MCH的减低程度与地贫类型和贫血严重性相关^[11]。MCV及MCH等红细胞参数在地贫筛查中日益受到重视,已被国内外普遍应用于地贫筛查。本研究中地贫基因携带者和正常对照组的红细胞参数各项指标有明显差异,地贫组的MCV和MCH均降低($P<0.001$), β -地贫组、 α 合并 β 复合型地贫组较 α -地贫组降低更为明显。但需要注意,缺铁性贫血同样可能造成小细胞低色素性贫血,MCV、MCH值也会降低,这会造成地贫筛查时假阳性增高,临床中可以通过检测血清铁和铁蛋白进行排除。

血红蛋白组分分析是地贫筛查中重要检查项目^[12]。常用的血红蛋白分析技术有琼脂糖凝胶电泳、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)等。HPLC重复性好、操作简便,是定量检测HbA₂及HbF和分离鉴定异常血红蛋白的优良方法^[13]。HbA₂是筛查地贫极有价值的指标,当HbA₂大于3.5%提示携带 β -地贫可能性大,而 α -地贫的HbA₂值一般小于2.5%。本研究中, β -地贫组HbA₂值明显高于非地贫组,灵敏度、特异度、准确率较高。 α -地贫组HbA₂值相对非地贫组轻度降低,且有30.5%的 α -地贫基因携带者HbA₂含量正常,因此HbA₂定量分析用于 α -地贫筛

查时敏感性差,漏检率高。此外,在研究中发现 α 合并 β 地贫组的HbA₂值相对正常对照组显著增高,筛查如果仅靠HbA₂单项指标评估会造成漏诊,实验室人员不能因为HbA₂值升高而忽视了 β 合并 α 的复合型地贫类型,需结合其他指标进行分析,避免漏诊。

本研究中采用MCV、MCH两者平行联合或与HPLC三者平行联合筛查地贫,可以降低单项检测的假阴性率,提高检测阳性病例的灵敏度,用于地贫筛查时漏诊率低,但特异度相对较差,进一步确诊需要做基因分析。基因诊断方法因地贫的不同类型而异。对于已知的地贫基因检测,实验室常用技术为gap-PCR、PCR-RDB、实时PCR熔解曲线分析等^[14]。gap-PCR可以检测缺失和重排,是诊断缺失型地贫的常规方法。PCR-RDB能同时检测多个位点突变,多用作突变型地贫诊断。近年来实时PCR熔解曲线分析正逐渐受到人们的关注,其主要有荧光标记探针熔解曲线和高分辨熔解曲线2种分析技术,具有灵敏度高,特异性强等优点,适合临床应用推广。而DNA测序技术用来检测未知地贫突变基因结果准确,但操作繁琐,成本较高,可以选择作为罕见病例确证的方法。

综上所述,在进行地贫筛查时,需综合分析实验室各项指标联合检测的数据,以降低漏诊率和假阳性率^[15]。血常规红细胞参数联合血红蛋白成分分析是目前最为简单、经济的地贫筛查方案,适用于各基层医疗单位;根据筛查结果再进一步行基因诊断则可有效地避免重型地中海贫血患儿出生,极大地提高社会人口质量。

参考文献

- [1] Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, et al. Non-transfusion-dependent thalassemias [J]. *Haematologica*, 2013, 98(6):833-844.
- [2] 李朋, 张杰. 地中海贫血基因检测方法的研究进展 [J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(4):891-894.
- [3] Roshan C. Thalassemias: can we reduce the national burden [J]. *Mol Cytogenet*, 2014, 7(Suppl 1): 143.
- [4] da Fonseca SF, Amorim T, Purificação A, et al. Hemoglobin A₂ values in sickle cell disease patients quantified by high performance liquid chromatography and the influence of alpha thalassemia [J]. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2015, 37(5):296-301.

(下转第288页)

耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌耐药基因检测及分析

涂海健^{1*} 陈淑娟¹ 林群英² 许光辉¹

[摘要] 目的 分析耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KPN)耐药情况与耐药相关基因的关系,了解其耐药机制。方法 采用PCR技术检测29株碳青霉烯类耐药KPN与产碳青霉烯酶、超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, β -ESBLs)、ampC酶及喹诺酮类耐药相关基因 *blaKPC-2*、*blaIMP-4*、*blaCTX-M*、*blaCTX-M-15*、*blaVIM-1*、*blaTEM*、*blaSHV*、*ampC*、*gyrA*、*parC*,并对 *KPC-2*、*ampC*、*gyrA* 基因进行序列分析。结果 用PCR技术证实了29株为产KPC、IMP型碳青霉烯酶的KPN,并且携带TEM、SHV型 β -ESBLs,其中18株同时编码ampC基因;29株待测菌均检出喹诺酮类耐药相关 *gyrA*、*parC* 基因。KPC基因片段同源性分析显示,待测菌株之间核苷酸同源性为98%~100%,氨基酸同源性为97%~100%;与肺炎克雷伯氏菌Kpn-1504株之间的核苷酸同源性最高,为99%~100%。*gyrA*、*parC* 基因突变率分别为58.6%、62.1%。结论 产KPC-2、IMP-4型碳青霉烯酶同时携带多种 β -ESBLs、ampC基因及突变的喹诺酮类耐药相关 *gyrA*、*parC* 基因的KPN耐药情况更加严重,同时存在克隆性流行可能。

[关键词] 肺炎克雷伯菌; *blaKPC*; 超广谱 β -内酰胺酶; 基因; PCR

Detection and analysis of the drug resistant genes associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

TU Haijian^{1*}, CHEN Shujuan¹, LIN Qunying², XU Guanghui¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Putian College, Putian, Fujian, China, 351100; 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Putian College, Putian, Fujian, China, 351100)

[ABSTRACT] Objective To analyze the relationship between the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (KPN) and the related gene of drug resistance, and to understand the mechanism of drug resistance. Methods The genes of *blaKPC-2*, *blaIMP-4*, *blaCTX-M*, *blaCTX-M-15*, *blaVIM-1*, *blaTEM*, *blaSHV*, *ampC*, *gyrA* and *parC* of quinolone-resistance were detected by polymerase chain reaction (PCR), which related producing carbapenemase, extended-spectrum β -lactamases (β -ESBLs), *ampC* enzyme in 29 strains of carbapenem-resistant pneumonia *Klebsiella*. And *Kpc-2*, *parC* and *gyrA* were performed by DNA sequencing. Results 29 strains of KPN producing KPC and IMP type of carbapenemase were identified by PCR at the same time. They also carried *blaTEM* and *blaSHV* genes of *beta*-ESBLs, among which 18 strains encoded *AmpC* gene. In addition, *gyrA* and *parC* gene were detected in all strains. *KPC* gene fragment homologous analysis showed that the tested strains between nucleotide homology was 98% to 100%, while the homology of amino acid is 97%~100%. They showed the highest nucleotide homology of 99%~100% with

基金项目:福建省莆田市科技计划[2013S03(4)]

作者单位:1.莆田学院附属医院检验科,福建,莆田 351100

2.莆田学院附属医院呼吸内科,福建,莆田 351100

*通讯作者:涂海健, E-mail: tufangshu@126.com

Reber's bacteria Kpn-1504 strains. The gene mutation rate of *gyrA* and *Parc* were 58.6% and 62.1%, respectively. **Conclusion** The resistant situation of *KPC-2*, *IMP-4* type carbapenemase producing KPN which were carrying a variety of β -ESBLs, *AmpC* genes and mutation of resistance to quinolones *gyrA* and *Parc* genes is more serious, while there may exist the clonal epidemic.

[KEY WORDS] *Klebsiella pneumoniae*; *blaKPC*; Extended-spectrum β -lactamases; Gene; PCR

随着耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KPN) 出现和临床检出不断增多, 给临床抗感染治疗和医院内感染控制带来极大的困难, 严重威胁人们的健康^[1]。本研究对莆田学院附属医院检出 29 株耐碳青霉烯类抗生素 KPN 进行耐药基因检测和分析, 旨在了解本院耐碳青霉烯类抗生素 KPN 的耐药机制和特征, 为控制和预防耐碳青霉烯类抗生素药菌 KPN 流行提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

收集 2013 年 6 月至 2014 年 6 月莆田学院附属医院临床科室送检标本。质控菌株卫生部临床检验中心提供肺炎克雷伯菌 ATCC-700603、大肠埃希氏菌 ATCC-25922、铜绿假单胞菌 ATCC-27853。

1.2 主要试剂和仪器

法国生物梅里埃公司生产的 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定、药敏分析及配套 GN 鉴定卡、AST-13 药敏卡; 英国 OXOID 公司生产的药敏纸片; 德国 QIAGEN 公司生产飞 Taq PCR Master Mix Kit; 美国 Life Technologies 公司生产的 Veriti™ 96 孔梯度 PCR 仪。

1.3 药敏试验

采用 VITEK-2 Compact 药敏分析及 K-B 纸片扩散法进行药敏试验, 结果严格按美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (2010M100-S20) 的抗微生物药物敏感性试验操作方法和判断标准。

1.4 碳青霉烯酶筛选

1.4.1 改良 Hodge 法

将 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌 ATCC25922 均匀涂布在 MH 平板上, 中间贴亚胺培南的纸片 (10 μ g/片), 将实验菌株以亚胺培南纸片为起点, 沿离心方向划线, 35℃ 培养过夜, 抑菌圈内呈出现矢状者为阳性, 并设阴阳性对照。

1.4.2 EDTA 协同试验

取 0.5 麦氏单位的待测菌均匀涂布在 MH 平

板上, 贴美罗培南纸片 (10 μ g/片), 在距离 1 cm 地方贴一空白纸片, 在其上面滴加 0.5 mmol/L 的 EDTA 4 μ L, 35℃ 培养过夜, 观察美罗培南抑菌圈在靠近 EDTA 纸片侧明显扩大即为产金属酶菌。

1.5 耐药基因 DNA 提取

挑取 3~6 个新鲜菌落, 采用核酸提取试剂盒 (硅胶膜-离心柱法) (中山大学达安基因股份有限公司), 严格按说明书操作进行耐药相关基因 DNA 提取。

1.6 耐药基因 PCR 检测

PCR 引物设计合成: GenBank 上查找目的基因 DNA 序列, 采用 Primer express 2.0 软件在编码序列 (coding sequence, CDS) 区进行特异性引物设计, 引物合成由中山达安基因公司通过 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪合成, 具体见表 1。

PCR 反应体系配制: 按 QIAGEN Taq PCR Master Mix Kit 试剂盒说明书要求进行, Taq PCR Master Mix 50 μ L, F 上游引物 1 μ L, R 下游引物 1 μ L, 模板核酸 10 μ L, ddH₂O 38 μ L, 共 100 μ L。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3 min; 变性 94℃ 30 s, 退火 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物在新鲜配制 2% 琼脂糖凝胶, 以 Thermo-100bp-Marker 为对照进行电泳, 结果见图 1。

1.7 序列测定与分析

1.7.1 测序 PCR 体系配制

PCR 产物 10 ng, 测序 buffer 3 μ L, BigDye 2 μ L, 测序引物 (表 1) 1 μ L, 去离子水补到 20 μ L。按下述条件进行 PCR 反应: 预变性 96℃ 5 min; 变性 94℃ 30 s, 退火 60℃ 45 s, 72℃ 45 s, 40 个循环; 延伸 72℃ 10 min; 4℃ 保存。

1.7.2 测序产物纯化

每管分别加入 2 μ L 125 mmol EDTA 和 2 μ L 3 mol NaAc 到管底; 再加入 50 μ L 100% 酒精, 震荡混匀, 避光室温放置 15 min; 12 000 rpm 离心 30 min, 去上清; 每管加入 150 μ L 70% 冷酒精, 12 000 rpm 离

表1 靶基因引物和目的产物长度

Table 1 Primer sequencing of targeted genes and length of target products

序号	基因名称	PCR 引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
1	<i>blaCTX-M-15</i>	F11: TTTAGGGACTATTCATGTTGTTG R11: CTTATTCATCGCCACGTTATC	474
2	<i>ampC</i>	KP-F2: GAATAGGCTGGGAGCACTG KP-R2: ATGAATCCACCTCCTCGG	522
3	<i>gyrA</i>	KP-F3: GACCTTGCGAGAGAAATTACAC KP-R3: GCTCCGTACCGTCATAGTTG	454
4	<i>parC</i>	KP-F4: GATCATGGACAGGGCATTAC KP-R4: GCCTCGGTCTGGGAAATC	582
5	<i>blaTEM</i>	KP-F5: TTCAAATATGTATCCGCTCATG KP-R5: TTAGCTCCTTCGGTCCTCC	509
6	<i>blaKPC-2</i>	KP-F6: ACACCTAGCTCCACCTTCAA KP-R6: GCCCAACTCCTTCAGCA	462
7	<i>blaSHV-11</i>	KP-F7: ATTATCTCCCTGTTAGCCACC KP-R7: GCCTCATTACAGTTCCGTTT	482
8	<i>blaCTX-M</i>	F: CACTGCGCCAGTTCACG R: TCGCCCAATGCTTTACC	598
9	<i>blaIMP</i>	KP-F9: CTACGATGATTGCCAGCG KP-R9: CCATTTGATAATCGCCCTG	542
10	<i>blaVIM-1</i>	F: GTCGCAAGTCCGTTAGCC R: GCACAACCACCGTATAGCAC	582

心 15 min, 去上清(重复 1 次)。室温阴干酒精, 加入 10 μ L Hi-Di Formamide 振荡溶解 DNA。溶解后的样品在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 迅速置冰中冷却至少 2 min 后上仪器测序。

1.7.3 基因分析仪测序

纯化后的测序产物加入与基因分析仪配套的 96 孔板, 盖好, 记录加样顺序。用 ABI 公司 Data Collection[®] 软件进行数据收集得到 ab1、hd1 及 seq 格式的文件。*KPC-2* 序列采用 cluster W 软件进行同源性分析。*gyrA*、*parC* 序列用 chromas 软件作 BLAST Search 比对。

2 结果

2.1 耐碳青霉烯类抗生素 KPN 耐药情况

对碳青霉烯类抗生素亚胺培南、厄他培南耐药的 29 株菌株进行耐药基因研究, 具体结果见表 2。

2.2 碳青霉烯酶筛选结果

29 株标本改良 Hodge 法和 EDTA 协同试验均为阳性, 提示待测菌株产碳青霉烯酶和金属酶。

2.3 耐药基因 PCR 检测结果

PCR 扩增产物电泳结果见图 1, 相应产物长度 (bp) 见表 1, 琼脂糖凝胶电泳图中 1、8、10 号结果阴性对应的基因为 *CTX-M-15*、*CTX-M*、*VIM-1*; 2 号结果显示 2 条电泳条带分子量约 520 bp 对应的是 *ampC* 基因, 分子量约 200~300 bp 条带可能污染导致, 其他扩增产物都在相应位置显示阳性结果。

2.3.1 产超广谱 β -内酰胺酶基因

29 株耐碳青霉烯类抗生素 KPN 都检出 *bla-TEM*、*blaKPC*、*blaSHV*、*blaIMP* 耐药基因, *CTX-M*、*CTX-M-15*、*VIM-1* 未检出。

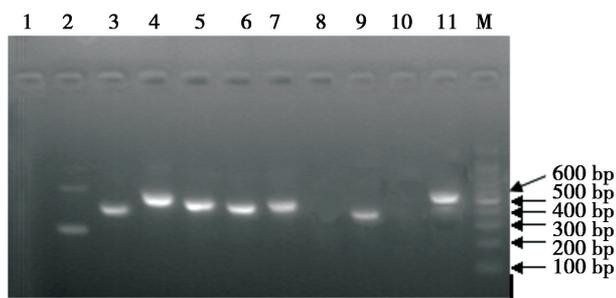
2.3.2 产 *ampC* 酶基因检出情况

共检出 18 株耐碳青霉烯类抗生素 KPN *ampC* 耐药基因, 检出率为 62.1% (18/29)。

表2 耐碳青霉烯类抗生素 KPN 耐药情况
Table 2 The resistance of carbapenem-resistant KPN

	MIC [#] (μg/mL)			敏感 (%)	中介 (%)	耐药 (%)
	S	I	R			
氨苄西林/舒巴坦	8/4	16/8	32/16	0	0	100
丁胺卡那霉素	16	32	64	0	0	100
氨基南	4	8	16	0	0	100
环丙沙星	1	2	4	0	0	100
头孢替坦	16	32	64	0	0	100
头孢曲松	1	2	4	0	0	100
头孢吡肟	8	16	32	0	0	100
厄它培南	0.5	1	2	0	0	100
头孢唑啉	2	4	8	0	0	100
呋喃妥因	32	64	128	0	0	100
庆大霉素	4	8	16	0	0	100
亚胺培南	1	2	4	0	0	100
左旋氧氟沙星	2	4	8	0	0	100
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶	2/38	-	14/76	0	0	100
头孢他啶	4	8	16	0	0	100
妥布霉素	4	8	16	0	0	100
哌拉西林/他唑巴坦	16/4	32/4-64/4	128/4	0	0	100
米诺环素*	116	13-15	12	100	0	0
多粘菌素 B*	12		11	100	0	0
舒普深*	122	18-21	17	3.45	0	96.6

*药物敏感试验使用 K-B 法, 抑圈单位用 mm; KPN 在 CLSI 选药范围内无多粘菌素 B, 检测时参考铜绿假单胞菌的标准; MIC[#]: 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)



M 为 Marker, 1~11 分别为 *blaCTX-M-15*、*ampC*、*gyrA*、*parC*、*blaTEM*、*blaKPC-2*、*blaSHV*、*blaCTX-M*、*blaIMP*、*blaVIM-1* 和 *ompK36*

图1 耐药相关基因琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of drug resistance related genes

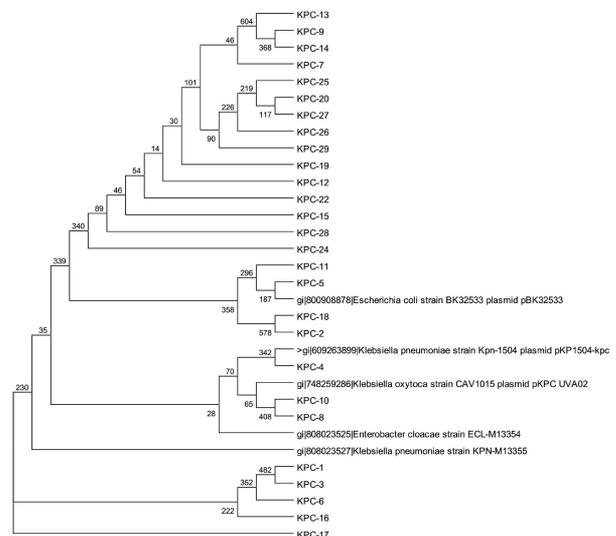


图2 KPC-2 基因序列进化树分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of KPC-2 genes

2.3.3 耐喹诺酮类药相关基因

29株待测菌均检出 *gyrA*、*parC* 基因。

2.4 耐药基因序列分析

2.4.1 *KPC-2* 基因片段同源性分析

同源性比较结果显示:待测菌株之间核苷酸同源性为98%~100%,氨基酸同源性为97%~100%;与

肺炎克雷伯氏菌 Kpn-1504 株之间的核苷酸同源性最高,为99%~100%,与肺炎克雷伯氏菌 Kpn-1504 株氨基酸同源性最高,为96%~99%。

2.4.2 *KPC-2* 基因序列进化树分析

将待测菌株与 GenBank 中发布的菌株序列构建进化树(图2)。

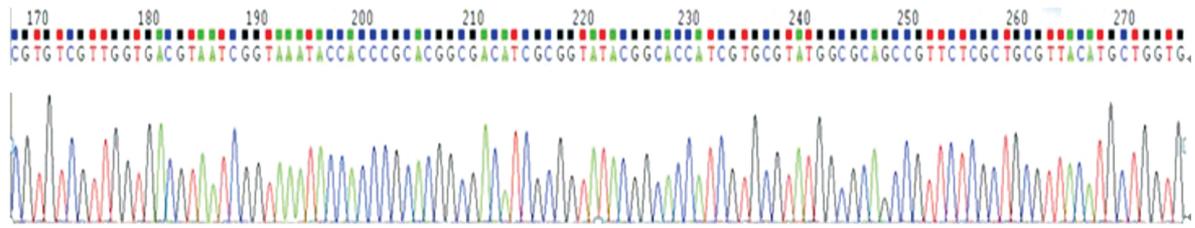


图3 *gyrA* 基因部份序列

Figure 3 Partial sequencing of *gyrA* gene

2.5 *gyrA*、*parC* 基因突变分析

对 *gyrA*、*parC* 基因序列(图3和图4)分析发现 *gyrA* 基因突变率为58.6%(17/29)、*parC* 基因突变

率为62.1%(18/29)。基因突变主要集中在 *gyrA* 编码基因第83、87位密码子和 *parC* 编码基因80位密码子上。

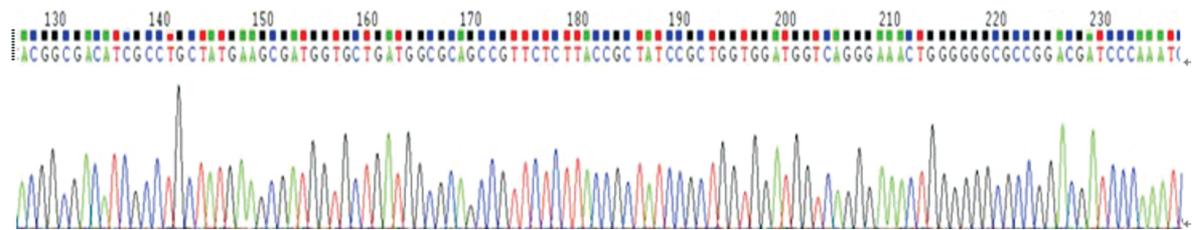


图4 *parC* 基因部份序列

Figure 4 Partial sequencing of *parC* gene

3 讨论

自2001年美国首次报道产碳青霉烯酶的KPN^[2],随着碳青霉烯类药物在临床上广泛使用,碳青霉烯类耐药KPN检出不断增多^[3-4],有关碳青霉烯酶的耐药机制的研究已成为国内外关注的焦点^[5-6]。本研究29株耐碳青霉烯类抗生素KPN对亚胺培南耐药,对其他抗菌药物包括加酶抑制剂在内临床常用的几乎所有β-内酰胺类药物耐药(舒普深耐药96.6%除外),对所有氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物耐药,仅对米诺环素和多粘菌素B敏感,表现为多重耐药或泛耐药菌,KPN此表现对多种抗生素的耐药率均高达100%,较为罕见,可能与研究对象选择导致的差异性有关,有待进一

步研究。

对29株耐碳青霉烯类抗生素KPN相关耐药基因检测,发现其同时存在分别编码非金属、金属型碳青霉烯酶的*KPC-2*和*blaIMP*基因,宁长秀^[7]和Wei等^[8]也有报道检测出同时产*KPC-2*和*IMP-4*酶的KPN株,认为其会导致KPN耐药更强,也证明了产碳青霉烯酶是KPN耐碳青霉烯类抗菌药物主要原因。

29株耐碳青霉烯类抗生素KPN菌还检测出携带编码产β-内酰胺酶的*blaTEM*、*blaSHV*基因,其中18株同时检测出*ampC*酶基因,说明耐碳青霉烯类抗生素KPN存在多种耐药基因积聚共存现象,高丽华等^[9]从耐碳青霉烯类抗生素KPN菌中检测出3株同时编码*ESBL*和*ampC*基因,其中2

株携带3种 β -内酰胺酶基因,Ogbolu^[10]和赵晓杰等^[11]也认为产 β -内酰胺酶的细菌往往同时携带其他种类抗菌药物的耐药基因。这种产生碳青霉烯酶和多种 β -内酰胺酶出现在单一细菌中,给临床抗感染治疗带来很大困难。

所研究29株菌都表现氟喹诺酮类抗生素耐药,目前认为氟喹诺酮类耐药决定区(quinnlone resistance determining region, QRDR)编码DNA旋转酶 $gyrA$ 基因及编码拓扑异构酶 $parC$ 基因突变与氟喹诺酮类耐药相关^[12]。29株碳青霉烯类耐药的KPN均检测出 $gyrA$ 、 $parC$ 基因,但 $gyrA$ 、 $parC$ 基因突变率分别为58.6%、62.1%,无法解释所有研究菌株都表现氟喹诺酮类抗生素耐药,说明氟喹诺酮类耐药还有其他机制导致。

对所检测菌株的KPC-2基因与Genbank进行BLAST比较发现铜绿假单菌(NG036544.1)、大肠埃希菌(KR052097.1)、粘质沙雷氏菌(CP011639.1)、阴沟肠杆菌(CP008901.1)、弗氏柠檬酸杆菌(KP987215.1)等菌的质粒均检出相同的基因其同源性达99%,说明质粒介导产碳青霉烯酶基因可在不同菌种中传播,Qi等^[13]认为编码KPC-2和IMP-4酶的基因位于可移动质粒上,可通过耐药基因水平和克隆播散,在不同菌种之间转移,造成医院内暴发流行;对待测菌株之间同源性分析,结果显示核苷酸同源性为98%~100%,氨基酸同源性为97%~100%;与肺炎克雷伯氏菌Kpn-1504株之间的核苷酸同源性最高,为99%~100%,提示存在克隆性流行可能。

综上耐碳青霉烯类抗生素KPN是多种耐药机制导致,不仅产 $blaKPC-2$ 、 $blaIMP-4$ 型碳青霉烯酶同时携带 β -ESBLs、 $ampC$ 基因及突变的喹诺酮类耐药相关 $gyrA$ 、 $parC$ 基因,从而使其耐药情况更加严重;29株研究菌 $blaKPC-2C$ 基因同源性高提示医院存在质粒介导克隆性耐药基因流行可能。

参考文献

- [1] Munoz-price LS, Poirel L, Bonoo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases [J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(9):785-796.
- [2] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamases, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4):1151-1161.
- [3] van Duin D, Perez P, Rudin SG, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(7):4035-4041.
- [4] Tijet N, Sheth PM, Lastovetska O, et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada [J]. *Plos One*, 2014, 9(12):2008-2011.
- [5] 甘龙杰,吴秀风,高丽钦,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基因检测及同源性分析[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26(3):316-318.
- [6] Nei G, Brandin ML, Jean BP, et al. Carbapenem resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention [J]. *Healthcare Epidemiol*, 2011, 53(1):60-67.
- [7] 宁长秀,胡龙华,汪红,等. 南昌4家教学医院碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药机制及同源性分析[J]. *临床检验杂志*, 2014, 30(4):306-310.
- [8] Wei ZQ, Yu T, Qi Y, et al. Coexistence of plasmid-mediated KPC-2 AND imp-4 carbapenemases in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from china [J]. *J Antimicrob chemother*, 2011, 66(11):2670-2671.
- [9] 高丽华,齐艳,吕凌云. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯氏菌多重 β -内酰胺酶基因研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(6):1426-1428.
- [10] Ogbolu DO, Daini OA, Oguanledun A, et al. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37(1):62-66.
- [11] 赵晓杰,康海全,姜飞,等. KPC-2基因和外膜蛋白介导的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药机制分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(3):214-219.
- [12] 林宁,孙海平. 多重耐药克雷伯菌 $gyrA$ 和 $parC$ 基因新变异型[J]. *中国临床感染病杂志*, 2013, 6(2):98-103.
- [13] Qi Y, Wei Z, Ji S, et al. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 66(2):307-312.

ZEB1 在散发性伯基特淋巴瘤中的表达及意义

张守华^{1,2} 黄慧¹ 徐红艳¹ 吴艳¹ 曾松涛¹ 黄传生³ 杨文萍^{1*}

[摘要] 目的 探讨 ZEB1 表达与散发性伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)临床病理参数之间的关系。方法 收集 33 例 BL 患者临床病理资料,免疫组化检测 Bcl-6、MUM1、ZEB1、E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白的表达,原位杂交检测 EB 病毒编码 RNA(epstein-barr virus RNA, EBER)。结果 33 例 BL 中 Bcl-6、MUM1、ZEB1 和 EBER 阳性率分别为 90.9%(30 例)、21.2%(7 例)、42.4%(14 例)、30.3%(10 例)。所有病例均不表达 E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白。ZEB1 表达与临床分期、MUM1 表达和生存状态无关($P>0.05$),与 Bcl-6 和 EBER 表达也无统计学意义($P=0.067, 0.057$)。结论 BL 不存在经典上皮间质转化现象,ZEB1 表达可能与 EB 病毒感染有关,其具体机制有待进一步研究。

[关键词] 伯基特淋巴瘤;免疫组织化学;ZEB1 蛋白

Expression of ZEB1 in sporadic Burkitt lymphoma and its clinical significance

ZHANG Shouhua^{1,2}, HUANG Hui¹, XU Hongyan¹, WU Yan¹, ZENG Songtao¹, HUANG Chuansheng³, YANG Wenping^{1*}

(1. Department of Pathology, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi, China, 330006; 2. Department of General Surgery, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi, China, 330006; 3. Department of Pathology, Jiangxi Provincial Cancer Hospital, Nanchang, Jiangxi, China, 330029)

[ABSTRACT] Objective To study the relationship between expression of ZEB1 and clinicopathological features of sporadic Burkitt lymphoma (BL). Methods The clinicopathological data of 33 patients with BL were retrospectively analyzed. The expressions of Bcl-6, MUM1, ZEB1, E-cadherin and N-cadherin were detected by immunohistochemistry and EBER by *in situ* hybridization. Results In 33 cases, the positive rates of Bcl-6, MUM1, ZEB1 and EBER were 90.9%(30 cases), 21.2%(7 cases), 42.4%(14 cases) and 30.3%(10 cases) respectively, and negative for E-cadherin and N-cadherin. There were no significant differences between ZEB1 expression and clinical stage. Bcl-6, MUM1 and prognosis were poorly associated with EBV infection status ($P=0.057$). Conclusion ZEB1 expression is associated with EBV infection status. Its mechanism requires further study.

[KEY WORDS] Burkitt lymphoma; Immunohistochemistry; ZEB1 protein

伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)是儿童最常见的淋巴瘤^[1],虽然治愈率逐步提高,但仍有少部分患者复发而死亡^[2],因此了解其发病机制将有助于开展靶向治疗。转录因子 ZEB1 与上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)有关,

在多种肿瘤中表达,与预后有关^[3],其在弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)和套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)中已有报道^[4-5],与 BL 临床病理参数之间的关系不清楚。本实验收集 33 例 BL 患者临床资料,应用免疫

基金项目:江西省卫生和计划生育委员会课题项目(20155603);江西省自然科学基金(20132BAB205047)

作者单位:1. 江西省儿童医院病理科,江西,南昌 330006

2. 江西省儿童医院普外科,江西,南昌 330006

3. 江西省肿瘤医院病理科,江西,南昌 330029

*通讯作者:杨文萍, E-mail: ywp07912000@163.com

组化检测 Bcl-6、MUM1、ZEB1、E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白的表达,原位杂交检测 EB 病毒编码 RNA (epstein-barr virus RNA, EBER),探讨 ZEB1 表达与散发性 BL 临床病理参数之间的关系。

1 资料与方法

1.1 病例来源

收集江西省儿童医院病理科和江西省肿瘤医院病理科 2000 年 1 月至 2013 年 12 月术后进行化疗的 33 例 BL 患者临床病理资料,诊断标准参考第四版世界卫生组织淋巴造血系统肿瘤分类标准^[6]。33 例 BL 中男孩 27 例、女孩 6 例;就诊年龄为 2~13 岁,平均年龄 5.8 岁;发病部位为腹腔(30 例)、颈部淋巴结(2 例)、睾丸(1 例);临床分期为 I+II 期(12 例)、III+IV 期(16 例)、未分期(5 例)。采用电话或查阅病例形式进行随访,随访截止时间为 2014 年 8 月 31 日。

1.2 免疫组化和原位杂交

免疫组化检测采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP), Bcl-6、

MUM1、ZEB1、E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白表达试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。根据 Bcl-6 和 MUM1 的表达,将 BL 分为生发中心型(germinal center, GC)(Bcl-6⁺/MUM1⁻)、晚生发中心型(late-GC)(Bcl-6⁺/MUM1⁺)、后生发中心型(post-GC)(Bcl-6⁻/MUM1⁺)和套细胞样型(mantle cell-like)(Bcl-6⁻/MUM1⁻)^[7]。EB 病毒编码 RNA (EBER)原位杂交检测试剂购自福建泰普国际生物学集团有限公司。操作按照说明书进行,当肿瘤阳性细胞>30%时判断为阳性。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学分析软件,率的比较采用 χ^2 检验,不满足 χ^2 检验时用 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 随访结果

33 例 BL 患者随访时间为 4~120 个月,其中生存 27 例、死亡 6 例(均为 III 或 IV 期,病例 4 和 5 未完整切除且未做骨髓穿刺)(表 1)。

表 1 6 例死亡患者的临床资料和免疫表型及 EBV 感染状态

Table 1 Clinical data, immunotype and EBV infect status in 6 died cases

病例	性别	年龄(岁)	临床分期	免疫表型和 EBER	死亡原因(生存/月)
1	男	4	III 期	Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁺ /ZEB1 ⁺ /EBER ⁻	骨髓复发(6)
2	男	2.5	III 期	Bcl-6 ⁻ /MUM1 ⁺ /ZEB1 ⁺ /EBER ⁺	肺部感染(18)
3	男	7	III 期	Bcl-6 ⁻ /MUM1 ⁺ /ZEB1 ⁻ /EBER ⁻	骨髓复发(9)
4	男	10	III~IV 期	Bcl-6 ⁻ /MUM1 ⁻ /ZEB1 ⁺ /EBER ⁺	肿瘤溶解(4)
5	男	13	III~IV 期	Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁻ /ZEB1 ⁻ /EBER ⁻	骨髓复发(5)
6	男	6	IV 期	Bcl-6 ⁺ /MUM1 ⁻ /ZEB1 ⁻ /EBER ⁻	骨髓复发(14)

2.2 免疫组化和原位杂交结果

33 例 BL 中肿瘤细胞 Bcl-6(图 1)、MUM1(图 2)、ZEB1(图 3)和 EBER(图 4)阳性率分别为 90.9%(30 例)、21.2%(7 例)、42.4%(14 例)、30.3%(10 例)。所有病例均不表达 E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白。根据 Bcl-6 和 MUM1 的表达,生发中心型 24 例、晚生发中心型 6 例、后生发中心型 1 例和套细胞样型 2 例。ZEB1 表达与临床分期、MUM1 表达和生存状态无关($P>0.05$),与 Bcl-6 和 EBER 表达也无统计学意义($P=0.067, 0.057$)。6 例死亡患者的临床资料和免疫表型及 EBV 感染状态见表 1。ZEB1 表达与临床病理参数之间的关系见表

2,因有 5 例无临床分期而未纳入统计分析。

3 讨论

恶性淋巴瘤发病率占儿童肿瘤第 3 位^[8],伯基特淋巴瘤为主要病理学类型,大约占儿童非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)的 30%~50%^[6],其特征是恶性度高、进展快、具有高度的侵袭性,常伴有中枢神经系统及骨髓的累及;传统治疗方案多采用高强度的化疗,但骨髓抑制及毒副作用常导致治疗失败。因此,亟待阐明高度侵袭性的分子调控机制,探寻新的治疗策略。EMT 是指上皮细胞在特定的生理与病理情况下失去极性

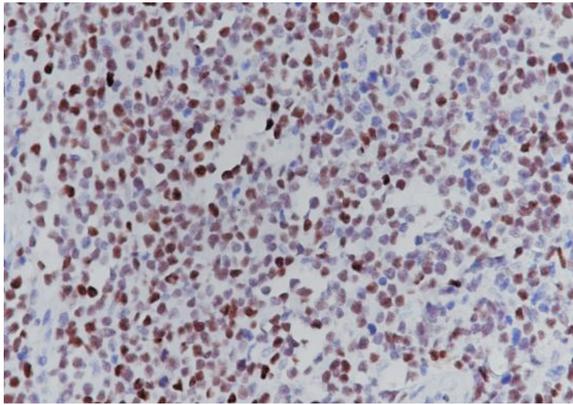


图1 BL组织 Bcl-6 的表达(SP法, ×400)
Figure 1 Bcl-6 in BL tissue(SP, ×400)

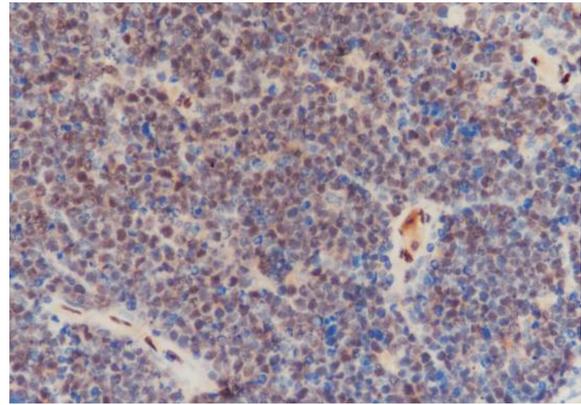


图3 BL组织 ZEB1 的表达(SP法, ×200)
Figure 3 ZEB1 in BL tissue(SP, ×200)

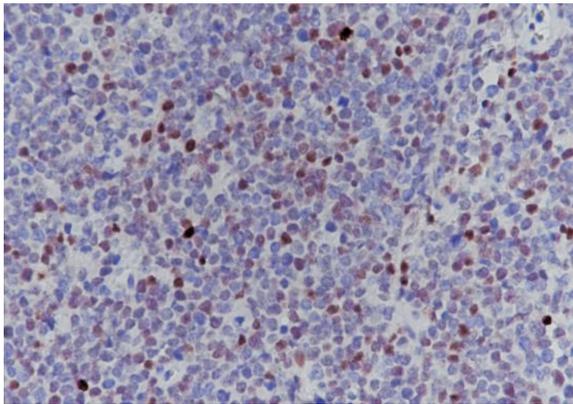


图2 BL组织 MUM1 的表达(SP法, ×400)
Figure 2 MUM1 in BL tissue(SP, ×400)

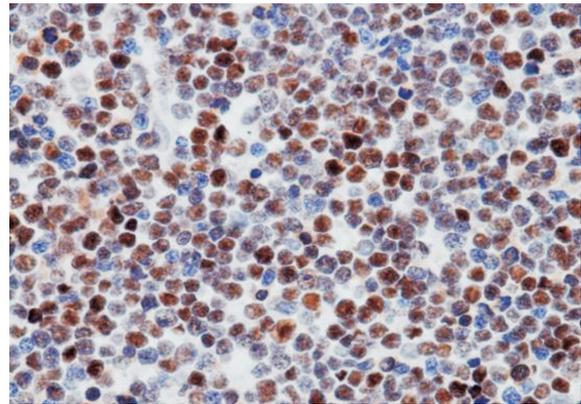


图4 BL组织 EBER 的表达(SP法, ×400)
Figure 4 EBER in BL tissue(SP, ×400)

和细胞间的连接性,向具有间质表型细胞转化的现象,促使细胞获得较强侵袭能力,同时 EMT 也被认为是影响肿瘤化疗疗效的一个新的重要机制^[9]。ZEB1 是 ZEB 转录因子家族一员,含有 2 个锌指结构簇和一个同源结构域其通过与 E-cadherin 启动子区保守的 E2 盒结合,抑制 E-cadherin 的表达,从而促进 EMT 的发生^[10]。Lemma 等^[4]研究发现 EMT 相关转录因子 ZEB1、Twist 和 Slug 在 DLB-CL 中存在异常表达,且与预后有关;同时有学者^[5]证实在 MCL 中 ZEB1 激活增殖和抗凋亡基因,抑制促凋亡基因,与肿瘤细胞的侵袭性及化疗耐药有关。早期的研究也证明 ZEB 在淋巴细胞造血细胞的生成和功能成熟起着重要的作用^[11],由此可见在淋巴造血系统肿瘤中可能存在 EMT(样)的调控机制,ZEB 起着关键作用。我们对 33 例 BL 进行研究,发现中 ZEB1 在 BL 中的阳性表达率为 42.4% (14 例),所有病例均不表达 E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白。因此,我们推测在 BL 中可能不存在经典的

表2 ZEB1 表达与临床病理参数之间的关系(例)
Table 2 The relationship between ZEB1 expression and clinicopathologic parameters(case)

参数	ZEB1 阳性	ZEB1 阴性	χ^2 值	P 值
临床分期				
I + II 期	4	8	2.333	0.252
III + IV 期	10	5		
Bcl-6				
阳性	11	19	4.479	0.067
阴性	3	0		
MUM1				
阳性	5	2	3.060	0.106
阴性	9	17		
EBER				
阳性	7	3	4.467	0.057
阴性	7	16		
随访结果				
生存	11	16	0.172	1.000
死亡	3	3		

EMT现象,是否与内皮间质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)有关有待进一步研究。

ZEB1的表达与多种肿瘤预后有关,然而其在不同的肿瘤中的作用与表达部位有关,如在DLBCL中,ZEB1表达于肿瘤细胞核、内皮细胞和组织细胞中,无细胞质阳性病例,核强阳性者预后较弱阳性者差^[4]。在食管鳞状细胞癌中,ZEB1在肿瘤细胞核、细胞质和肿瘤间质中均有表达,细胞质ZEB1弱阳性者预后更好^[12]。本实验也发现,ZEB1除了表达于肿瘤细胞外,在血管内皮细胞和间质中的一些细胞也呈现阳性。遗憾的是,本组未发现ZEB1的表达部位和表达强度与肿瘤预后有关,可能与病例较少或化疗方案不统一有关,有待积累更多病例来阐述ZEB1在BL中的表达意义。

Bcl-6和MUM1是肿瘤细胞起源的标记物,在DLBCL中Bcl-6和MUM1表达与预后的关系较大。有学者将BL分为生发中心型、晚生发中心型、后生发中心型和套细胞样型。虽然Bcl-6和MUM1表达与BL的预后关系不明显^[2],但本实验发现3例Bcl-6阴性BL均表达ZEB1,其意义有待进一步研究。

BL中存在与EBV相关的miRNA-127表达^[13],同时存在Wnt信号通路的异常^[14]。ZEB受EBV相关miRNAs的调控,在EBV阳性鼻咽癌中,通过抑制miRNA-200a和miRNA-200b的表达,上调EMT介导靶基因ZEB1和ZEB2,使肿瘤细胞的侵袭性和转移性增强^[3]。本课题组前期工作中也证实了EBV感染相关的BL与miRNA-127、miRNA-155相关^[15],本实验发现ZEB1表达与EBV感染状态有一定的关系,BL中ZEB1的表达是否与miRNA-127、miRNA-200a或Wnt信号通路等有关有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王佳,奚政君,李稻. 儿童非霍奇金淋巴瘤195例临床病理分析[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(11):1060-1062.
- [2] 黄慧,黄传生,刘志良,等. 儿童伯基特淋巴瘤的预后影响因素初步研究[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(8):1143-1145.
- [3] Wang L, Tian WD, Xu X, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) protein induction of epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cancer, 2014, 120(3):363-372.
- [4] Lemma S, Karihtala P, Haapasaafi KM, et al. Biological roles and prognostic values of the epithelial-mesenchymal transition mediating transcription factor Twist, ZEB1 and slug in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Histopathology, 2013, 62(2):326-333.
- [5] Sánchez-Tilló E, Fanlo L, Siles L, et al. The EMT activator ZEB1 promotes tumor growth and determines differential response to chemotherapy in mantle cell lymphoma[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(2):247-257.
- [6] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. Lyon, IARC Press, 2008, 312-319.
- [7] Gualco G, Queiroga EM, Weiss LM, et al. Frequent expression of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 in Burkitt lymphoma[J]. Hum Pathol, 2009, 40(4):565-571.
- [8] Magrath I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma[J]. Br J Haematol, 2012, 156(6):744-756.
- [9] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8):2657-2665.
- [10] Vandewale C, VanRoy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(5):737-787.
- [11] Postigo AA, Sheppard AM, Mucenski ML, et al. c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB[J]. EMBO J, 1997, 16(13):3924-3934.
- [12] Goscinski MA, Xu RP, Zhou FY, et al. Nuclear, cytoplasmic, and stromal expression of ZEB1 in squamous and small cell carcinoma of the esophagus[J]. APMIS, 2015, 123(12):1040-1047.
- [13] Onnis A, Navari M, Antonicelli G, et al. Epstein-Barr nuclear antigen 1 induces expression of the cellular microRNA hsa-miR-127 and impairing B-cell differentiation in EBV-infected memory B cells. New insights into the pathogenesis of Burkitt lymphoma[J]. Blood Cancer J, 2012, 2:e84.
- [14] 黄慧,曾华,杨文萍. 伯基特淋巴瘤发病机制的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(1):72-74.
- [15] 林云,杨文萍,黄慧,等. EB病毒感染相关的儿童散发性伯基特淋巴瘤中miR-127和miR-155表达及其意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(10):1076-1080.

Ⅱ型登革病毒非结构蛋白1多克隆抗体制备和免疫特征分析

杨小猛¹ 赵丹^{2*} 杜丽伟¹ 陈相¹ 江丽芳³

[摘要] 目的 制备抗Ⅱ型登革病毒(dengue virus type 2, DENV2)非结构蛋白1(nonstructural protein 1, NS1)多克隆抗体,分析该抗体的免疫特性。方法 采用NS1蛋白免疫BALB/c小鼠,取血分离血清,纯化获得抗NS1抗体。酶联免疫吸附试验法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析抗NS1抗体与NS1蛋白和DENV2结合特性。免疫荧光法测定抗NS1抗体与人微血管内皮细胞株1(human microvascular endothelial cell 1, HMEC-1)的交叉反应性。ELISA法分析抗NS1抗体、HMEC-1和新鲜同系小鼠血清共培养体系中活化补体的含量。结果 抗NS1抗体能与NS1和DENV2特异性结合,抗体最高滴度分别为1:1 280和1:640。抗NS1抗体能与HMEC-1细胞交叉结合,抗NS1抗体、HMEC-1和新鲜同系小鼠血清共培养上清液中C3a、C4a、C5a和sC5b-9含量均显著高于HMEC-1和新鲜同系小鼠血清共培养(均 $P<0.05$),以及PBS、HMEC-1和新鲜同系小鼠血清共培养(均 $P<0.05$)。结论 抗DENV2 NS1抗体能交叉结合于血管内皮细胞并激活补体系统,可能在登革出血热的免疫病理机制中起重要作用。

[关键词] Ⅱ型登革病毒;非结构蛋白1;抗非结构蛋白1抗体;膜攻击复合物

Preparation and immune signature analysis of anti - dengue virus type 2 nonstructural protein 1 *in vitro*

YANG Xiaomeng¹, ZHAO Dan^{2*}, DU Liwei¹, CHEN Xiang¹, JIANG Lifang³

(1. Shenzhen Luohu Maternity and Child Healthcare Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518019; 2. Shenzhen Luohu Chronic Disease Control, Shenzhen, Guangdong, China, 518023; 3. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] Objective To prepare the polyclonal antibodies directed against dengue virus type 2 (DENV2) nonstructural protein 1 (NS1) (anti-NS1 antibodies) and to analyze the immunological characteristics of the antibodies. Methods High titer polyclonal anti-NS1 antibodies were obtained from BALB/c mice immunized with DENV2 NS1. The binding ability of anti-NS1 antibodies to NS1 protein or DENV2 was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The cross-reactivity of the antibodies with human microvascular endothelial cell 1 (HMEC-1) was demonstrated using immunofluorescence assay. The levels of activated complement in the co-culture systems of anti-NS1, HMEC-1 and fresh syngenic mice sera were measured using ELISA. Results Anti-NS1 antibodies could bind to NS1 and DENV2. The highest titer of

基金项目:国家自然科学基金和广东省自然科学基金联合项目(U0632002);深圳市科技计划项目(JCYJ20120830091748817)

作者单位:1. 深圳市罗湖区妇幼保健院,广东,深圳 518019

2. 深圳市罗湖区慢性病防治院,广东,深圳 518023

3. 中山大学中山医学院,广东,广州 510080

*通讯作者:赵丹, E-mail:sysu_microbiology@126.com

the antibodies was 1:1 280 and 1:640 respectively. Anti-NS1 antibodies could cross bind to HMEC-1. The levels of C3a, C4a, C5a and sC5b-9 in the co-culture systems of anti-NS1, HMEC-1 and fresh syngenic mice sera were sharply higher than those in the co-culture systems of HMEC-1 and fresh syngenic mice sera ($P < 0.05$) and the co-culture systems of PBS, HMEC-1 and fresh syngenic mice sera ($P < 0.05$). **Conclusion** These results indicate that anti-NS1 antibodies can crosslink to vascular endothelial cell and activate the complement system, which may be involved in the immunopathologic mechanism of dengue hemorrhagic fever.

[KEY WORDS] Dengue virus type 2; Nonstructural protein 1; Anti-nonstructural protein 1 antibodies; Membrane attack complex

登革病毒(dengue virus, DENV)特异性抗体可以通过3种机制清除病毒:病毒中和效应、补体依赖的细胞毒效应和抗体依赖细胞介导的细胞毒效应^[1]。然而DENV特异性抗体也可能引起免疫损伤,免疫机制或自身免疫机制可能与DENV感染的致病机制有关^[2]。研究表明,DENV非结构蛋白1(nonstructural protein 1, NS1)与病毒感染宿主的小板和血管内皮细胞存在相似的抗原表位,抗DENV NS1抗体可能破坏宿主的小板和血管内皮细胞^[3],但其具体机制目前仍不完全清楚。为探讨抗DENV NS1抗体在DENV感染病理机制中的作用,本研究制备了高效价抗Ⅱ型登革病毒(dengue virus type 2, DENV2)NS1抗体,分析该抗体与人微血管内皮细胞1(human microvascular endothelial cell 1, HMEC-1)的交叉反应性以及激活补体系统的能力,探讨NS1蛋白介导的体液免疫应答在登革出血热的免疫病理机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

SPF级雌性BALB/c小鼠(3~6周龄)购自中山大学实验动物中心,实验动物许可证号为SCXK(粤)2004-0011/粤监证字2012A045。RPMI-1640培养液购自美国Gibco公司,使用前添加终浓度的10 mmol/L L-谷氨酰胺、10 ng/mL表皮生长因子、1 μg/mL氢化可的松和5%的热灭活胎牛血清,C3a、C4a、C5a和sC5b-9酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自深圳达科为公司。

1.2 基因工程菌和细胞株

含DENV2 NS1基因的基因工程菌(X-33/pPICZαB-NS1)由中山大学中山医学院微生物教研室构建并保存。HMEC-1细胞由美国疾病控制与预防中心赠送。

1.3 DENV2 NS1蛋白的表达和抗NS1抗体的制备

参照以往的方法^[4],采用DENV2 NS1基因工程菌表达NS1蛋白。取100 μg NS1蛋白溶于0.25 mL生理盐水,加入等体积弗氏完全佐剂充分乳化,腹腔注射BALB/c小鼠。第21天取50 μg NS1蛋白溶于0.25 mL生理盐水,加入等体积弗氏完全佐剂充分乳化,腹腔注射BALB/c小鼠。第31天时采用ELISA法测定小鼠血清中抗NS1抗体滴度,若抗体滴度低于1:10 000,则同第21天方法再次加强免疫。最后采用眼球摘除法收集小鼠血液,离心分离血清。采用二氨基乙基纤维素柱纯化血清中抗NS1抗体,并经0.22 μm的除菌滤器除菌,-20℃保存备用。

1.4 抗NS1抗体与NS1蛋白和DENV2结合能力分析

取96孔空白平板,第A至D行用NS1蛋白包被,第E至H行用灭活DENV2包被,整板经5%胎牛血清4℃封闭过夜。滴度为1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1 280、1:2 560和1:5 120的抗NS1抗体依次加入第1至10列,滴度为1:20的抗DENV2多克隆抗体加入第11列,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)加入第12列,每孔100 μL。平板置37℃、45 min,洗板。每孔加入100 μL辣根过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体(滴度为1:40 000),37℃、60 min,洗板。每孔加入100 μL酶反应底物,37℃、40 min,每孔加入50 μL终止液,轻微振荡混匀,酶标仪测定每孔OD₄₅₀。以PBS孔为阴性对照,按公式计算每孔截断值(the cut off value, Cut off),Cut off = 测定孔OD₄₅₀ / 阴性对照孔OD₄₅₀。以Cut off值≥2.1确定抗体的最高滴度。

1.5 抗NS1抗体与HMEC-1细胞的交叉反应性分析

HMEC-1细胞爬片培养于RPMI-1640液,待满载玻片后,固定液(50%甲醇和50%丙酮)固定载

玻片 20 min。分成 3 组,分别滴加 100 μL 抗 DENV E 蛋白抗体(抗 E 抗体,用作无交叉反应对照)(滴度 1:10)、抗 NS1 抗体(滴度 1:10)和抗 NS1 抗体(滴度 1:50),4℃、30 min。PBS 冲洗,滴加 100 μL FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体,阴凉避光处 30 min,PBS 冲洗。采用奥林巴斯 BX-51 型荧光显微镜分析载玻片荧光强度。

1.6 抗 NS1 抗体激活补体活性测定

共培养体系分为抗 NS1 抗体组、同系小鼠血清组和 PBS 对照组,每组 6 瓶。取规格为 25 cm² 的直角斜颈透气培养瓶,HMEC-1 细胞培养于 RPMI-1640 液中。待细胞贴壁长至 2/3,无菌吸出培养液。抗 NS1 抗体组加入 1 mL 抗 NS1 抗体、1 mL 新鲜同系小鼠血清和 3 mL RPMI-1640 液,同系小鼠血清组 1 mL 新鲜同系小鼠血清和 3 mL RPMI-1640 液,PBS 对照组加入 1 mL PBS、1 mL 新鲜同系小鼠血清和 3 mL RPMI-1640 液。3 组均置于 37℃、5% CO₂ 环境培养 6 h。收集上清液,采用 ELISA 法按试剂盒说明书测定 C3a、C4a、C5a 和 sC5b-9 的含量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验数据以均数 ± 标准差表示,两组间比较采用成组设计的 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗 NS1 抗体制备,抗 NS1 抗体与 NS1 蛋白和 DENV2 结合能力分析

BALB/c 小鼠经基础免疫后第 21 天,滴度为 1:1 280 的抗血清 Cut off 值为 1.49,小于 2.1,再次加强免疫。第 31 天滴度为 1:1 280 的抗血清 Cut off 值为 4.35,为获得较高滴度的抗血清进行后续实验,再次加强免疫,第 41 天滴度为 1:1 280 的抗血清 Cut off 值为 10.32(图 1)。抗血清经纯化处理获得的抗 NS1 抗体能与 NS1 蛋白、灭活的 DENV2 特异性结合,抗体最高滴度分别为 1:1 280 和 1:640(图 2)。

2.2 抗 NS1 抗体与 HMEC-1 细胞的交叉反应性

当第一抗体为抗 NS1 抗体时,HMEC-1 细胞爬片上可见绿色荧光,抗 NS1 抗体的滴度越大,结合强度越弱;当第一抗体为抗 E 抗体时,HMEC-1 细胞爬片上几乎无绿色荧光(图 3)。

2.3 抗 NS1 抗体激活补体活性

抗 NS1 抗体组上清液中 C3a、C4a、C5a 和 sC5b-9

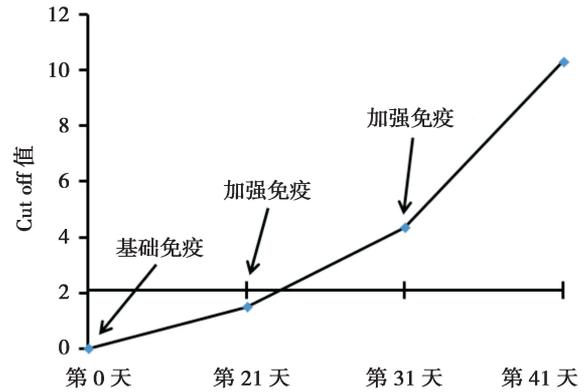


图 1 ELISA 法测定不同免疫次数的滴度为 1:1 280 的抗 NS1 抗体的 Cut off 值

Figure 1 The Cut off level of anti-NS1 (1:1 280) at different immune times detected using ELISA

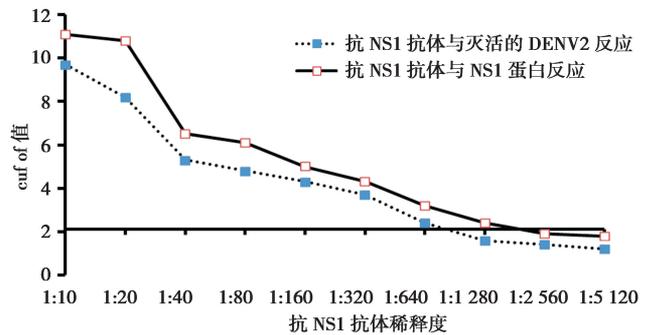


图 2 ELISA 法分析抗 NS1 抗体与 DENV2、NS1 的结合能力

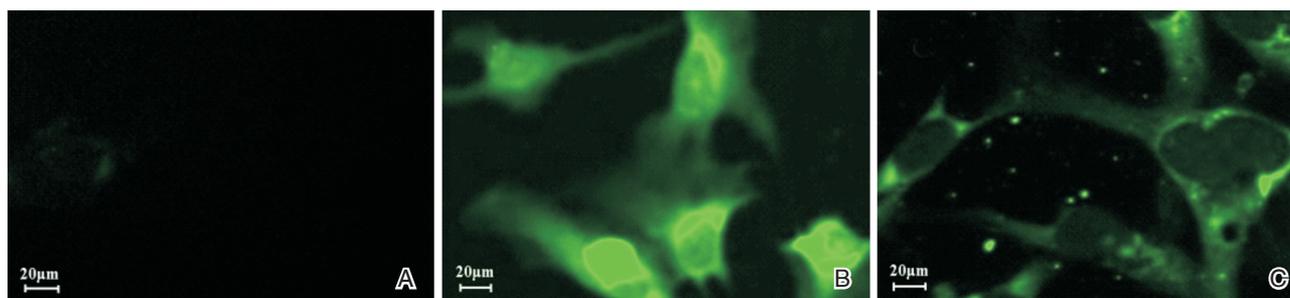
Figure 2 The binding capacity of anti-NS1 antibodies to NS1 protein or DENV2 detected using ELISA

的水平均显著高于同系小鼠血清组和 PBS 对照组(均 *P* < 0.05),而上述指标在同系小鼠血清组和 PBS 对照组间均无显著性差异(均 *P* > 0.05)(表 1)。

3 讨论

DENV 感染可导致宿主发生登革出血热/登革休克综合征,其临床症状主要表现为严重的血小板减少、血浆渗漏和肝肿大^[5]。近年来研究发现免疫或自身免疫反应在 DENV 感染的致疾机制中发挥重要作用^[6-7],病毒感染导致的自身免疫病理机制仍不明确,目前认为与分子模拟、旁观者激活和病毒持续感染等因素有关^[8]。

自身免疫反应是 DENV 感染所致疾病的一种重要机制,而 NS1 蛋白以及抗 NS1 抗体在这一机制中尤为关键^[9-10]。NS1 蛋白是 DENV 重要的非结构蛋白,是病毒生存必需的,其确切功能还不清



A: 一抗为抗E抗体(1:10); B:一抗为抗NS1抗体(1:10); C:一抗为抗NS1(1:50)

图3 免疫荧光法检测抗NS1抗体与HMEC-1细胞交叉反应性

Figure 3 The cross-reactivity of the anti-nonstructural protein 1 antibodies with HMEC-1 demonstrated immunofluorescence assay

表1 抗NS1抗体激活补体活性的测定结果

Table 1 The levels of the activated complement mobilized by anti-NS1 antibodies measured using ELISA

组别	n	C3a(g/L)	C4a(g/L)	C5a(g/L)	sC5b-9(mg/L)
抗NS1抗体组	6	14.5 ± 3.6 ^{ab}	4.3 ± 1.1 ^{ab}	1.5 ± 0.3 ^{ab}	7.7 ± 2.3 ^{ab}
同系小鼠血清组	6	2.8 ± 0.6 ^c	1.0 ± 0.3 ^c	0.5 ± 0.1 ^c	1.1 ± 0.3 ^c
PBS对照组	6	2.7 ± 0.8	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.2

与PBS对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;与同系小鼠血清组比较,^c $P < 0.05$

楚。NS1蛋白是一种高度保守的糖蛋白,以可溶性形式存在于感染细胞内或细胞表面,是DENV感染过程中体液免疫反应的主要靶分子^[11]。分子模拟机制导致的自身免疫反应与DENV感染所致疾病的病理机制有关,NS1蛋白诱导的自身抗体可以与细胞外基质、血液凝块、整联蛋白/外源凝集素蛋白反应,并且能够与血小板、内皮细胞结合^[12-13]。患者血清中抗NS1抗体与内皮细胞发生交叉反应,导致内皮细胞功能紊乱和凋亡,在疾病进展中发挥重要作用^[14];抗NS1抗体与血小板和内皮细胞结合还能导致血小板和内皮细胞的破坏和炎性激活。用NS1蛋白预处理可以抑制DENV患者血清引起的血管内皮细胞凋亡^[15],以上研究提示DENV NS1蛋白可能与血小板、血管内皮细胞具有相似的抗原决定簇,DENV感染能够通过分子模拟机制导致疾病的发生^[16]。本研究发现抗NS1抗体能够与人微血管内皮细胞结合,且结合强度与抗NS1抗体滴度呈正相关,结果提示抗DENV NS1抗体能够与血管内皮细胞发生交叉反应。

抗原抗体反应可激活机体补体系统,产生多种具有炎症介质作用的过敏毒素C3a、C4a和C5a,以及直接损伤靶细胞的攻膜复合体。抗NS1抗体与血管内皮细胞发生交叉反应,能够活化补体,损

伤病毒感染宿主血管内皮细胞,引起登革出血热/登革休克综合征患者血浆渗漏^[17]。以往研究发现登革出血热/登革热患者血清中C3a和C5a均显著升高,并且C3a和C5a与登革发病的严重程度密切相关^[18]。本研究发现抗NS1抗体与人微血管内皮细胞、新鲜血清共培养产生大量C3a、C4a和C5a,以及可溶性攻膜复合体sC5b-9,结果提示抗NS1抗体与人微血管内皮细胞交叉结合后能够激活补体系统。

综上所述,DENV NS1蛋白是病毒感染致病过程中的重要蛋白,机体产生的抗NS1抗体能够与宿主血管内皮细胞交叉反应并激活补体系统,与登革出血热/登革休克综合征患者的血浆渗漏有关。

参考文献

- [1] Rieth M, Beauharnais CA, Noel F, et al. Serologic imprint of dengue virus in urban Haiti: characterization of humoral immunity to dengue in infants and young children [J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 84 (4):630-636.
- [2] Cheng HJ, Luo YH, Wan SW, et al. Correlation between serum levels of anti-endothelial cell autoantigen and anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibody-

- ies in dengue patients [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2015, 92(5):989-995.
- [3] Lin YS, Yeh TM, Lin CF, et al. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(5):515-523.
- [4] 晏辉钧, 江丽芳, 方丹云, 等. 登革2型病毒 NS3 基因的酵母表达及其免疫反应性的测定 [J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(6):482-484, 488.
- [5] Wan SW, Lin CF, Yeh TM, et al. Autoimmunity in dengue pathogenesis [J]. *J Formos Med Assoc*, 2013, 112(1):3-11.
- [6] Singla M, Kar M, Sethi T, et al. Immune response to dengue virus infection in pediatric patients in New Delhi, India-association of viremia, inflammatory mediators and monocytes with disease severity [J]. *Plos Negl Trop Dis*, 2016, 10(3):e0004497.
- [7] Patra G, Ghosh M, Modak D, et al. Status of circulating immune complexes, IL8 titers and cryoglobulins in patients with dengue infection [J]. *Indian J Exp Biol*, 2015, 53(11):719-725.
- [8] Yacoub S, Mongkolsapaya J, Screaton G. Recent advances in understanding dengue [J]. *F1000Research*, 2016. Epub ahead of print.
- [9] Lin SW, Chuang YC, Lin YS, et al. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation [J]. *J Infect*, 2012, 64(3):325-334.
- [10] Cheng HJ, Lei HY, Lin CF, et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation [J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(2-3):398-406.
- [11] Paranavitane SA, Gomes L, Kamaladasa A, et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14:570.
- [12] Simmons CP, McPherson K, van Vinh CN, et al. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management [J]. *Vaccine*, 2015, 33(50):7061-7068.
- [13] Lin CF, Lei HY, Shiau AL, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage [J]. *J Med Virol*, 2003, 69(1):82-90.
- [14] Chen CL, Lin CF, Wan SW, et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies cause NO-mediated endothelial cell apoptosis via ceramide-regulated glyco-gen synthase kinase-3 β and NF- κ B activation [J]. 2013, 191(4):1744-1752.
- [15] Lin CF, Lei HY, Liu CC, et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients [J]. *J Med Virol*, 2001, 63(2):143-149.
- [16] Liu IJ, Chiu CY, Chen YC, et al. Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11):9726-9736.
- [17] Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19(5):429-436.
- [18] Marinho CF, Azeredo EL, Torrentes-Carvalho A, et al. Down-regulation of complement receptors on the surface of host monocyte even as in vitro complement pathway blocking interferes in dengue infection [J]. *Plos One*, 2014, 9(7):e102014.

· 论 著 ·

2006-2015年东莞市无偿献血者丙肝病毒感染情况分析

钟焯辉¹ 张玉翌² 黄志森¹ 何子毅³ 曾涛^{2*}

[摘要] 目的 了解本地区无偿献血人群丙肝病毒感染现状和流行趋势,为献血相关政策制定提供科学依据。方法 利用酶联免疫吸附法对本血站2006年1月至2015年12月共计703 427例无偿献血者的血标本进行抗-HCV检测。结果 本地区献血人群近10年抗-HCV总阳性率为0.31%,整体呈逐年下降趋势;女性献血者抗-HCV阳性率低于男性($P < 0.05$);抗-HCV阳性率随献血者的文化程度升高而大致呈下降趋势($P < 0.05$)。多次献血者抗-HCV阳性率明显低于初次献血者($P < 0.05$)。结论 女性、高文化程度、重复献血人群的HCV感染率较低,应作为东莞地区无偿献血的招募重点对象。

[关键词] 丙肝病毒;献血者;丙肝抗体;血液安全;东莞

Analysis of HCV infection among voluntary blood donors in Dongguan city from 2006 to 2015

ZHONG Chihui¹, ZHANG Yuzhao², HUANG Zhisen¹, HE Ziyi³, ZENG Tao^{2*}

(1. Department of Blood Donation Serve, Dongguan Central Blood Station, Dongguan, Guangdong, China, 523930; 2. Laboratory Medicine Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Laboratory Medicine, Dongguan Central Blood Station, Dongguan, Guangdong, China, 523930)

[ABSTRACT] Objective To provide scientific base for the relevant policies of voluntary blood donation by investigating the status and trends of hepatitis C virus (HCV) infection in local voluntary blood donors. Method Anti-HCV antibody in 703 427 cases of specimens obtained from the blood donors were detected by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) from January 2006 to December 2015. Results The total positive rate of anti-HCV in local blood donors was 0.31% among the most recent 10 years, which showed a declining trend year over year. Women were found to have a lower positive rate than men ($P < 0.05$). The positive rate was also negatively correlated with the growth of cultural degrees in blood donors. Moreover, the positive rate was significantly lower among repeated donors compared to first time donors ($P < 0.001$). Conclusion Female, better educated, and repeated donors should be regarded as the better objects for the recruitment voluntary blood donors in Dongguan city, because of the lower positive rate in HCV infection.

[KEY WORDS] Hepatitis C virus; Blood donors; Anti-HCV; Blood safety; Dongguan

基金项目:东莞市科技计划项目(20131051010021)

作者单位:1. 东莞市中心血站献血服务科,广东,东莞 523930

2. 南方医科大学南方医院检验医学科,广东,广州 510515

3. 东莞市中心血站检验科,广东,东莞 523930

*通讯作者:曾涛, E-mail: zengt@smu.edu.cn

临床输血在血液病、器官移植、手术、失血性休克等复杂环境下的救治,发挥着极其重要的作用。尽管血液制品经过严格程序的筛选、检测和后续处理,但依然存在发生传播感染性疾病及其他输血不良反应的风险^[1]。丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染即为较为常见的输血传染病之一,它能引起病毒性肝炎,还可导致肝硬化及肝癌等^[2],已成为全球关注的公共卫生问题^[3]。而血源安全与质量是保障输血安全的重要环节^[4]。因此,采供血机构须开展献血者的HCV筛查,避免招募感染HCV的献血者,从而降低输血后感染HCV的风险^[5]。为了解本地区献血人群HCV感染现状和流行趋势,本研究大规模分析了近10年共计703 427例献血者的丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)检测结果,为献血相关政策的制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

选取2006年1月至2015年12月本血站703 427例无偿献血者作为研究对象,所有献血者均经过健康征询、体检及快速实验筛查,符合《献血者健康检查要求》,年龄18~55岁,平均年龄为28.1岁,其中男性495 824例,女性207 603例。

1.2 仪器与试剂

采用BEP III全自动酶免处理系统(Dade Behring, 美国)、TECAN SUNRISE 酶标仪(Tecan, 瑞士)、TITRAMAX 1000 恒温孵育振荡仪(Heidolph, 德国)、酶联免疫吸附法ELISA诊断试剂盒(美国雅培公司与珠海丽珠试剂股份有限公司)和室内质控品(北京康彻思坦生物技术有限公司)等。所用试剂均批检合格,不同批号试剂均在有效期内使用。

1.3 检测方法

由2位具有专业技术资格证和血站上岗证的技术人员分别采用进口及国产2个厂家的抗-HCV试剂盒进行检测,整个检测过程均严格遵守试剂盒说明书要求及本实验室制定的《标准操作规程》进行。检测结果若出现双试剂或单试剂阳性,则对原标本管与剪取对应血袋辫子血样(剪管)进行复查;检测结果若再次为阳性则判定为阳性。

1.4 统计学方法

数据采用统计学软件SPSS 19.0进行处理,采用 χ^2 检验进行分析,以双侧 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

近10年来(2006~2015年),本市无偿献血者的抗-HCV总阳性率为0.31%(2 185/703 427);而且,抗-HCV阳性率从2006年(0.42%)至2008年(0.29%)大致呈逐年下降的趋势,但在2009年(0.39%)至2012年(0.37%)这段时间稍微有所反弹升高,之后呈整体下降;不同年份间差异有统计学意义($P<0.05$),见图1。

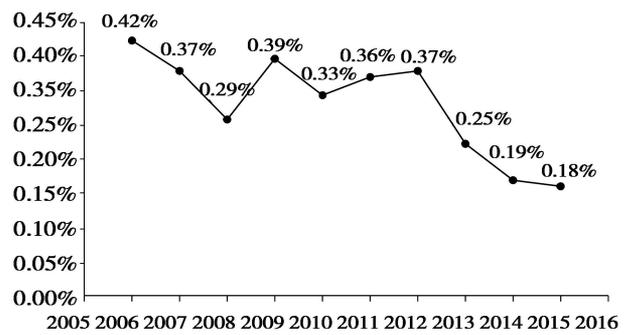


图1 2006~2015年东莞市无偿献血者抗-HCV阳性率趋势图

Figure 1 The positive rates trend of anti-HCV in voluntary blood donors in Dongguan between 2006 and 2015

按性别比较,女性献血者的抗-HCV阳性率低于男性($P<0.05$);35~45岁年龄段的献血人群抗-HCV阳性率最高(0.35%),明显高于低年龄段的献血者($P<0.05$);有趣的是,抗-HCV阳性率随献血者的文化程度升高而大致呈下降趋势($P<0.05$),研究生(0.27%)、本科生(0.20%)和大专生学历献血者(0.23%)的抗HCV阳性率较低;多次献血者抗-HCV阳性率明显低于初次献血者($P<0.05$),见表1。

3 讨论

为了保障输血安全及预防传染性疾病预防传播,东莞市中心血站对献血者进行严格筛选,包括HCV检测。抗-HCV是反映HCV携带情况的最常用、最主要检测指标^[6]。研究显示,抗-HCV筛查可排除85%携带HCV的献血者,可有效降低输血后丙肝的发生率^[7]。本中心采用了国外与国内2种不同的试剂盒来检测抗-HCV,从而提高献血者筛选的准确性。

表1 东莞市不同人群无偿献血者抗-HCV阳性率分布

Table 1 The positive rate distribution of anti-HCV in different voluntary blood donors population in Dongguan

项目	例数	抗-HCV阳性数[n(%)]	χ^2 值	P值	
性别	男性	495 824	1 599(0.32)	7.65	0.006
	女性	207 603	586(0.28)		
年龄段	18~24岁	288 859	822(0.28)	17.20	0.001
	25~34岁	264 271	856(0.32)		
	35~44岁	125 568	443(0.35)		
	45~55岁	24 729	64(0.26)		
学历	研究生	1 837	5(0.27)	96.82	< 0.001
	本科	67 507	136(0.20)		
	大专	89 059	201(0.23)		
	中专	97 796	300(0.31)		
	高中	182 067	560(0.31)		
	初中	251 252	943(0.38)		
	小学	11 637	61(0.52)		
	其他	2 272	9(0.40)		
献血次数	初次	477 659	1 931(0.40)	421.43	< 0.001
	多次	225 768	254(0.11)		

我们向社会民众大力宣传无偿献血法律法规与普及献血常识,强调经血传播疾病的风险及危害,着力建立健康、固定的无偿献血队伍。本研究统计发现,与国内其他地区基本相似,东莞市献血者的HCV感染率也呈逐年下降的趋势^[8-9]。而且,东莞市无偿献血人群的近10年HCV总感染率(0.31%)低于深圳(0.46%)、重庆(0.51%)与兰州(0.88%)等城市^[9-11]。

为提高招募无偿献血者的成效及明确招募的人群侧重点,我们还分析了不同年龄、性别、学历、献血次数亚人群的HCV感染情况。据报道,不同性别的献血者抗-HCV阳性率没有差异^[9, 12-13]。而在本次调查中,男性献血者抗-HCV阳性率明显高于女性^[4]。这可能与地区差异与本次调查标本量扩大有关。而且需要注意的是,男性在卫生习惯与身体健康意识等方面不如女性,导致HCV感染率及抗-HCV阳性率偏高。因此,我们应该鼓励本地区女性积极参与到无偿献血行列中来。有研究显示,献血者HCV感染发展成慢性肝炎后,年龄则成为影响HCV转阴的重要因素^[12]。我们发现,献血者抗-HCV阳性率随年龄的增长而逐渐升高,并与宋适恒等^[12]学者的结论一致。因此,年轻人

群还应该是无偿献血的主力军。文化程度较高的人群的生活条件更好及对疾病的防护知识的了解较多,并更自愿参与无偿献血,应为献血招募的重点^[14]。本研究也支持了这观点,大专以上学历的献血者的抗-HCV阳性率显著低于低学历的献血者。我们还应加大对无职业者以及工人等低学历者传染病预防知识与输血知识的宣传力度,更最大限度地降低普通人群HCV感染率,保障血液质量的安全^[14]。与国内外研究一致,在本调查中,具有以往传染病筛查与献血知识、经历的多次献血者抗-HCV阳性率明显低于初次献血者^[12]。多次献血者应作为无偿献血的最佳选择对象。采供血机构与工作人员应以优质服务和感恩的心来赢得献血者的信任,最大限度地把初次献血者发展成为自愿、积极的无偿献血者^[15]。

因此,我们还须继续加大献血相关知识与传染病危害的宣传与普及,严格把握感染相关性因素,建立招募一支低危的、固定的无偿献血者队伍,并提高献血服务质量及筛查技术水平,降低输血传播HCV等传染病的发生率,提高输血安全性。

参考文献

- [1] Seo DH. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion[J]. *World Journal of Hepatology*, 2015, 7(3):600-606.
- [2] Chemaitelly H, Mahmud S, Rahmani AM, et al. The epidemiology of hepatitis C virus in Afghanistan: systematic review and meta-analysis [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2015, 40:54-63.
- [3] Rezaee-Zavareh MS, Hadi R, Karimi-Sari H, et al. Occult HCV infection: the current state of knowledge [J]. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2015, 17(11):e34181.
- [4] Dodd RY, Foster GA, Stramer SL. Keeping blood transfusion safe from west nile virus: American Red Cross experience, 2003 to 2012[J]. *Transfusion Medicine Reviews*, 2015, 29(3):153-161.
- [5] Fadlalla FA, Mohamoud YA, Mumtaz GR, et al. The epidemiology of hepatitis C virus in the maghreb region: systematic review and meta-analyses [J]. *Plos One*, 2015, 10(3):e121873.
- [6] 杨涛,牛丽彬,李玲,等. 抗-HCV 酶免筛查反应性献血者确证策略研究[J]. *中国输血杂志*, 2016, 29(1):13-16.
- [7] Nunez TC, Dutton WD, May AK, et al. Emergency department blood transfusion predicts early massive transfusion and early blood component requirement [J]. *Transfusion*, 2010, 50(9):1914-1920.
- [8] 覃军. 柳州市 2004~2009 年无偿献血者丙肝抗体阳性调查[J]. *右江医学*, 2011, 39(3):285-286.
- [9] 熊姣梅,吴桂丹,郑欣,等. 深圳地区 2003~2012 年间无偿献血者抗-HCV 抗体与核酸检出情况分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(16):2306-2308.
- [10] 程颖,李维,程燃. 重庆市 2008~2012 年无偿献血者 HBsAg, ALT 及抗 HIV、抗 HCV、抗 TP 抗体检测结果的分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(10):1297-1298.
- [11] 张玉春,潘登,周克礼,等. 兰州地区无偿献血者血液感染因子检测结果调查与分析[J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(4):374-375.
- [12] 宋适恒,刘丽娟,李保欣,等. 献血人群 HCV 感染现状和流行趋势分析[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(14):2346-2347.
- [13] 李蕾. 无偿献血人群中丙型肝炎病毒(HCV)的感染情况分析[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(17):639-640.
- [14] 路艳. 无偿献血人群抗-HCV 阳性的特点分析[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2015, 2(13):2523-2524.
- [15] 周丽君,郭伟鹏,王丽鸿,等. 乌鲁木齐无偿献血者 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 检测结果分析[J]. *中国输血杂志*, 2013, 26(9):792-793.

(上接第 236 页)

- [13] Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003 [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2007, 45(1):112-120.
- [14] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998 [J]. *Journal of virology*, 1999, 73(12):9969-9975.
- [15] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1 [J]. *Journal of clinical microbiology*, 1999, 37(5):1288-1293.
- [16] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2000, 38(3):1170-1174.
- [17] Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2006, 44(8):2698-2704.
- [18] Li J, Sun Y, Du Y, et al. Characterization of coxsackievirus A6- and enterovirus 71-associated hand foot and mouth disease in Beijing, China, from 2013 to 2015 [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:391.
- [19] Sifakas N, Markoulatos P, Stanway G. Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects [J]. *J Mol Evol*, 2002, 55(6):638-652.

· 论 著 ·

广东地区育龄妇女人细小病毒B19感染筛查结果分析

何天文^{1,2} 黄滨梅^{1,2} 王逾男^{1,2} 钟志成^{1,2} 陈柯艺^{1,2} 尹爱华^{1,2*}

[摘要] 目的 通过对广东地区育龄妇女人细小病毒B19(human parvovirus B19, B19)感染筛查结果进行分析,了解广东地区育龄妇女人细小病毒B19感染情况。方法 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测广东地区育龄妇女血清中人细小病毒B19特异性IgM和IgG抗体,并对检测结果进行分析。结果 广东地区育龄妇女血清中人细小病毒B19特异性IgM和IgG抗体阳性率分别为1.40%(700/50 086)、16.72%(341/2 039)。结论 开展育龄妇女人细小病毒B19感染筛查工作,对优生优育、提高人口素质具有非常重要意义。

[关键词] 育龄妇女;人细小病毒B19;酶联免疫吸附试验

Screening results on human parvovirus B19 infection in women of childbearing age in Guangdong area

HE Tianwen^{1,2}, HUANG Binmei^{1,2}, WANG Yunan^{1,2}, ZHONG Zhicheng^{1,2}, CHEN Keyi^{1,2}, YIN Aihua^{1,2*}

(1. Medical Genetics Center of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442; 2. Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory of Guangdong, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] Objective To analyze the screening results and investigate the pathology of human parvovirus B19 infection in women of childbearing age in the Guangdong region. Methods An enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the specific IgM and IgG antibodies of human parvovirus B19 in women of childbearing age in Guangdong. Results The positive rates of specific IgM and IgG antibodies of human parvovirus B19 among the subjects were 1.40%(700/50 086) and 16.72%(341/2 039) respectively. Conclusion It is very important to carry out the screening of human parvovirus B19 infection in women of childbearing age and newborn for healthy child rearing and to improve the quality of life for the population.

[KEY WORDS] Women of childbearing age; Human parvovirus B19; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

人细小病毒B19(human parvovirus B19, B19)是细小病毒科细小病毒属的成员,是唯一对人类有致病性的细小病毒^[1-2]。B19感染呈全球分布,全年均可发生,以冬春季常见,而人群对B19普遍易感,尤以儿童和孕妇感染多见^[3]。B19感染呈非

特异性病毒感染症状或无症状,可引起多种临床表现,不同患者可有不同临床表现,主要可引起传染性红斑、急性再生障碍性贫血危象、急性关节炎或关节痛、血小板减少性紫癜等多种疾病^[4-5]。而妊娠期妇女感染B19除可发生上述症状外,还可

基金项目:国家自然科学基金(81000255)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511442

2. 广东省卫生厅妇幼代谢与遗传病医学重点实验室,广东,广州 511442

*通讯作者:尹爱华, E-mail: yinaiwa@126.com

何天文和黄滨梅为共同第一作者

发生自然流产和垂直传播给胎儿。胎儿感染B19可无症状,也可发生贫血、低白蛋白血症、肝炎、心肌炎,甚至导致宫内死胎和非免疫性胎儿水肿^[6-9]。本文对2012年1月至2015年3月就诊于广东省妇幼保健院妇科、产科、生殖健康科和医学遗传中心进行孕前检查、产前检查和不孕不育治疗的广东地区育龄妇女进行B19感染筛查,了解广东地区育龄妇女B19感染状况。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2012年1月至2015年3月就诊于广东省妇幼保健院妇科、产科、生殖健康科和医学遗传中心进行孕前检查、产前检查和不孕不育治疗的广东地区育龄女性50 086例,其中孕前检查女性4 298例,产前检查女性39 929例,不孕不育女性5 859例,年龄在14岁至50岁之间,平均年龄为26.7岁。

1.2 仪器与试剂

主要仪器有美国Thermo公司Multiskan MK3全自动酶标仪和德国Eppendorf公司5810型台式离心机;人细小病毒B19特异性IgM和IgG抗体检测试剂盒(酶联免疫吸附试验法,enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)及其质控品由德国维润赛润研发有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本采集

采集非抗凝血2 mL,4 h内送检,可置4~8℃保存2周,长时间保存则需分离血清后置-20℃保存,避免反复冻融。

1.3.2 B19特异性IgM和IgG抗体检测

非抗凝血用德国Eppendorf公司5810型台式离心机在3 000 rpm下离心5 min,分离血清;然后采用德国维润赛润研发有限公司的B19特异性IgM和IgG抗体检测试剂盒对已分离血清标本进行检测,使用美国Thermo公司Multiskan MK3全自动酶标仪读取吸光度值(OD值),所有操作严格按照说明书要求完成。

1.3.3 诊断标准

当标本检测OD值大于试剂盒设定的cut off值判为阳性,标本检测OD值小于等于试剂盒设定的cut off值判为阴性。

1.3.4 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,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 育龄妇女B19特异性IgM和IgG抗体检测结果

受调查的广东地区育龄妇女中B19特异性IgM和IgG抗体阳性率分别为1.40%(700/50 086)、16.72%(341/2 039),具体见表1。按照诊疗常规,孕前进行B19的IgG检测评估女性对B19免疫力情况,而孕期进行B19的IgM检测对孕妇筛查B19感染,研究对象中以孕期女性为主,导致B19特异性IgM和IgG抗体检测的基数不一致。

2.2 孕前和孕期女性B19感染情况

根据是否怀孕分为孕前组及孕期组,比较两组B19的IgM阳性率。孕前组和孕期组B19的IgM阳性率分别为2.02%(87/4 298)、1.23%(492/39 929)。孕前组B19的IgM阳性率比孕期组高,差异有统计学意义($P<0.01$),具体结果见表2。

表1 广东地区育龄妇女B19特异性IgM和IgG抗体检测结果

Table 1 Detection results of B19 specific IgM and IgG antibodies in women of childbearing age in Guangdong

抗体类型	检测例数	阳性例数	阳性率(%)
IgM	50 086	700	1.40
IgG	2 039	341	16.72

2.3 比较孕期女性与不孕不育女性B19感染情况

分析不孕不育女性B19的IgM阳性率,比较孕期女性与不孕不育女性B19的IgM阳性率。不孕不育组B19的IgM阳性率为2.07%(121/5 859),比孕期组B19的IgM阳性率1.23%(492/39 929)高,差异有统计学意义($P<0.01$),具体结果见表3。

表2 孕前和孕期女性B19的IgM阳性率情况

Table 2 The IgM positive rate of B19 in pre-pregnancy and pregnancy women

分组	例数	阳性(例)	阳性率(%)	χ^2	P
孕前组	4 298	87	2.02	18.8	0.000 0
孕期组	39 929	492	1.23	391	

表3 孕期女性和不孕不育女性 B19 IgM 阳性率情况

Table 3 The IgM positive rate of B19 in pregnancy and infertile women

分组	例数	阳性 (例)	阳性率 (%)	χ^2	<i>P</i>
孕期组	39 929	492	1.23	26.841 5	0.000 0
不孕不育组	5 859	121	2.07		

3 讨论

B19 感染呈全球分布,全年均可发生,而人群对 B19 普遍易感,尤以儿童和孕妇感染多见。B19 感染呈非特异性病毒感染症状,而大部分感染者无明显的临床症状,在妊娠妇女 B19 感染可发生垂直传播会导致胎儿发生不良结局。胎儿感染后可发生贫血、非免疫性水肿、窦性心肌炎、胸腔积液、抗磷脂综合症等,是胎儿发生流产和水肿的重要原因^[10]。B19 病毒抗体检测是进行 B19 病毒感染临床诊断和流行病学调查的主要方法,通常使用商用 ELISA 试剂盒、Western blot 或免疫荧光法针对 B19 病毒特异 IgM、IgG 抗体进行检测^[11]。而 ELISA 方法操作简便、经济和不需要特殊设备等优点,是临床 B19 感染筛查主要方法。本实验室采用进口 ELISA 试剂筛查 B19 感染,分析了 2012 年 1 月至 2015 年 3 月就诊于广东省妇幼保健院妇科、产科、生殖健康科和医学遗传中心进行孕前检查、产前检查和不孕不育治疗的进行 B19 感染筛查的广东地区育龄女性 50 086 例, B19 的 IgM 和 IgG 抗体阳性率分别为 1.40% (700/50 086)、16.72% (341/2 039)。本研究的 B19 的 IgM 阳性率较文献报道 6.72% 低^[12],可能因为不同地域阳性率不同还有检测方法的差别造成。而分组统计发现,孕前组 B19 的 IgM 阳性率比孕期组高,不孕不育组 B19 的 IgM 阳性率比孕期组高。B19 感染可能与不孕不育具有相关性,需要进一步研究探讨。相关文献也曾报道过, B19 可能是除 TORCH 感染之外造成孕妇复发性流产的重要病原体之一^[13],可能是由于免疫缺陷的孕妇不能产生特异性抗体来清除 B19 病毒,病毒的持续感染导致习惯性流产。相关文献还指出,体内 B19 IgG 为阳性的人群对细小病毒 B19 有一定的免疫能力,在感染 B19 后可迅速被机体清除,血清中 B19 IgG 抗体为阴性的人群易受细小病毒 B19 的感染^[14]。但有

约 50% 的孕妇在感染细小病毒 B19 后,不产生特异性的中和抗体,而且有 10%~50% 的 B19 IgG 抗体阳性者对细小病毒 B19 的再次感染无保护能力。由此可推测,这可能与细小病毒 B19 表面外露区域氨基酸残基的高度变异使病毒逃避机体免疫系统的监控有关。欧美有研究报道,在细小病毒 B19 感染的流行期,其中 3%~8% 的孕妇存在急性感染,胎盘垂直传播率为 33%~51%,有 5%~16% 的感染孕妇出现了严重胎儿发病和死亡,传染源主要为 2~7 岁急性感染儿童,呼吸道传播为主,还有血制品、母婴垂直传播^[15]。

因此育龄妇女 B19 感染越来越多地引起临床医生的关注,对育龄妇女进行 B19 感染筛查以便及早发现高危人群,针对高危人群进行及时处理和干预,预防出生缺陷,对优生优育、提高人口素质具有非常重要意义。

参考文献

- [1] de Jong EP, Walther FJ, Kroes AC, et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy: New insights and management[J]. *Prenat Diagn*, 2011, 31(5):419-425.
- [2] 杜小云, 李琴, 刘郁明, 等. 3 628 例妇女微小病毒 B19 血清学检测结果分析[J]. *微量元素与健康研究*, 2015, 32(6):27-29.
- [3] 陈军, 卢洪洲. 人类细小病毒感染研究进展[J]. *诊断学理论与实践*, 2008, 7(4):454-456.
- [4] 曹虹, 贡树基, 赵卫, 等. 人微小病毒 B19 感染的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2):332-337.
- [5] 彭燕, 莫吉祥, 罗利萍. 湖南湘潭地区育龄妇女人微小病毒 B19 流行病学调查[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(6):997-999.
- [6] 胡方兴, 孙馨. 微小病毒 B19 在自然流产患者中的感染状况研究[J]. *实用预防医学*, 2015, 22(6):741-743.
- [7] 许东亮, 张国成, 李飏, 等. 胎儿人细小病毒 B19 感染与孕妇自然流产及胎儿先天性畸形的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(6):324-326.
- [8] 漆洪波. 妊娠期人细小病毒 B19 感染[J]. *实用妇产科杂志*, 1998, 14(1):7-8.
- [9] 李冰琳, 屈新中, 王淑莉, 等. 妊娠期妇女人微小病毒 B19 感染与死胎及胎儿畸形关系的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2001, 36(1):24-26.
- [10] 曹懿, 李芬. 细小病毒 B19 与胎儿水肿[J]. *国外医学妇幼保健分册*, 2003, 14(3):141-144.

(下转第 271 页)

酒精对肝脏蛋白酶体成熟的影响

张莉¹ 阎明^{2*} 江堤¹ 孙贤久¹ 左海军¹ 刘美红¹

[摘要] 目的 建立大鼠酒精性肝病模型,分析蛋白酶体成熟蛋白(proteasome maturation protein, POMP)的表达量,探讨酒精对肝脏蛋白酶体成熟的影响。方法 利用灌胃的方法建立大鼠酒精性肝病模型,分批于6、8、10、12周处死大鼠。采用荧光定量PCR方法测定POMP mRNA表达量。结果 荧光定量PCR显示蛋白酶体成熟蛋白POMP基因表达水平随摄酒增多呈逐渐升高趋势($P<0.05$)。结论 酒精摄入可影响蛋白酶体成熟,酒精导致的蛋白酶体成熟机制异常可能在蛋白酶体功能下降机制中起重要作用。

[关键词] 大鼠;酒精性肝病;蛋白酶体;蛋白酶体成熟蛋白;蛋白质氧化损伤

Effect of alcohol on proteasome assembly in hepatic tissue

ZHANG Li¹, YAN Ming^{2*}, JIANG Di¹, SUN Xianjiu¹, ZUO Haijun¹, LIU Meihong¹

(1. Department of Gastroenterology, Donghua Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000; 2. Department of Gastroenterology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong, China, 250012)

[ABSTRACT] Objective To evaluate the expression of proteasome maturation protein (POMP) in the rat models of alcoholic liver, and investigate the effect of alcohol on proteasome assembly. Methods Establish the rat models of alcoholic liver disease by gastric perfusion method, and kill the rats after 6, 8, 10, 12 weeks. The expressions of mRNA for POMP were detected by fluorogenic quantitative polymerase chain reaction. Results The expressions of mRNA for POMP increased gradually along with the increase of alcohol administration. Conclusion Alcohol administration resulted in the assembly of proteasome. Ethanol induced proteasome malfunction might be responsible for the obstacles of proteasome mature mechanism.

[KEY WORDS] Rat; Alcoholic liver disease; Proteasome; Proteasome maturation protein; Protein oxidative damage

酒精性肝病发病率逐年升高,已成为我国仅次于病毒性肝炎的第二大肝病病因^[1]。长期酒精摄入可导致氧化应激,造成蛋白质氧化损伤。蛋白酶体可降解细胞中绝大部分的氧化蛋白,是机体重要的抗氧化保护机制^[2],当其功能受损时可导致氧化蛋白的蓄积,是肝细胞损伤的重要原因^[3]。长期酒精摄入所导致的肝细胞损伤是否由于蛋白酶体成熟障碍引起其功能降低致氧化蛋白不能被有效清除尚不清楚,本文通过测定肝脏蛋白酶体

成熟蛋白POMP的表达量,探讨酒精对肝脏蛋白酶体成熟的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

成年健康雄性Wistar大鼠40只(4周龄),体重180~200 g,购自山东大学医学院实验动物中心。

基金项目:山东省医药卫生科研重点项目(2007H056)

作者单位:1. 东莞东华医院消化内科,广东,东莞 523000

2. 山东大学齐鲁医院消化内科,山东,济南 250012

*通讯作者:阎明, E-mail: yanming011@126.com

1.1.2 试剂

Trizol 提取液 (Invitrogen, 美国), SYBR Premix Taq™ (大连宝生物工程有限公司), M-MLV 逆转录酶 (Promega, 美国), 引物 (上海英骏生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立

正常喂养 1 周后将大鼠随机分为 5 组: 对照组、模型组 (共 4 组), 各 8 只。模型组通过酒精灌胃方法建立动物模型: 40% 酒精 5 g/kg 至第 4 周末, 随后 50% 酒精 7 g/kg 至第 8 周末, 60% 酒精 10 g/kg 至第 12 周末, 每日量分 2 次给予。对照组给予相同体积生理盐水。大鼠分别于造模 6、8、10、12 周时处死^[4]。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 *POMP* 基因含量

按 Trizol 说明书进行肝组织 RNA 提取, 紫外分光光度法定量后进行逆转录。逆转录反应体系 (总 RNA 1 μL、M-MLV 逆转录酶 1 μL、逆转录缓冲液 7 μL、随机引物 2 μL, 加去 RNase 水补至 20 μL), 扩增参数: 37℃ 逆转录 1 h, 95℃ 灭活 10 min。PCR 反应体系 (SYBR 荧光染料 10 μL, 上下游引物各 0.6 μL, cDNA 1 μL, 双蒸水 7.8 μL)。POMP 上游引物序列为 5'-CCCCTGAAGTTA-CAGGTGGA-3', 下游引物序列为 5'-AGCGTAG CTCACCCATCAGT-3', 扩增产物长度为 169 bp; 内参 β-actin 上游引物序列为 5'-CGTTGACATCCG-TAAAGACC-3', 下游引物序列为 5'-TAGAGC-CACCAATCCACACA-3', 扩增产物长度为 176 bp。所有引物均采用 Primer5.0 设计并经过 NCBI Blast 验证产物特异性。扩增完成后根据 Ct 值计算相对表达量。

1.3 统计学处理

数据处理采用 SPSS 18.0 统计软件, 各组样本均数的比较采用 One-Way ANOVA 方差分析。

2 结果

2.1 肝组织病理学表现

灌酒 6 周时肝细胞排列尚整齐, 部分肝细胞内可见少量脂肪变性, 肝小叶中央区域明显; 8 周时肝细胞内脂滴明显增多, 细胞核被推挤至细胞一侧; 10 周时肝细胞排列紊乱, 细胞肿胀, 胞质疏松, 含有大量脂滴; 12 周时肝小叶结构破坏, 肝细胞脂肪变进一步加重, 可见明显肿胀及炎细胞浸

润 (图 1)。

2.2 血清生物化学指标检测

由表 1 可见, 灌酒 6、8、10、12 周大鼠血清甘油三酯 (triglyceride, TG)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate amino transferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 等指标均高于对照组, 并呈逐渐增高趋势, 差异有统计学意义。

表 1 血清生化指标含量测定 (mmol/L)

Table 1 The serum biochemical criterion (mmol/L)

组别	TG	ALP	AST	ALT
对照组	1.37±0.14	273.7±23.3	120.0±15.4	34.0±4.5
6 周	1.79±0.17 [*]	298.4±42.9 [*]	166.1±18.5 [*]	56.3±6.3 [*]
8 周	2.14±0.23 [*]	339.4±30.9 [*]	183.3±14.6 [*]	81.3±7.7 [*]
10 周	2.36±0.16 [*]	379.9±51.7 [*]	226.4±21.7 [*]	91.8±12.6 [*]
12 周	2.35±0.13 [*]	442.0±29.6 [△]	310.3±16.5 [△]	125.1±11.8 [△]

与对照组相比, ^{*}P<0.05, [△]P<0.01

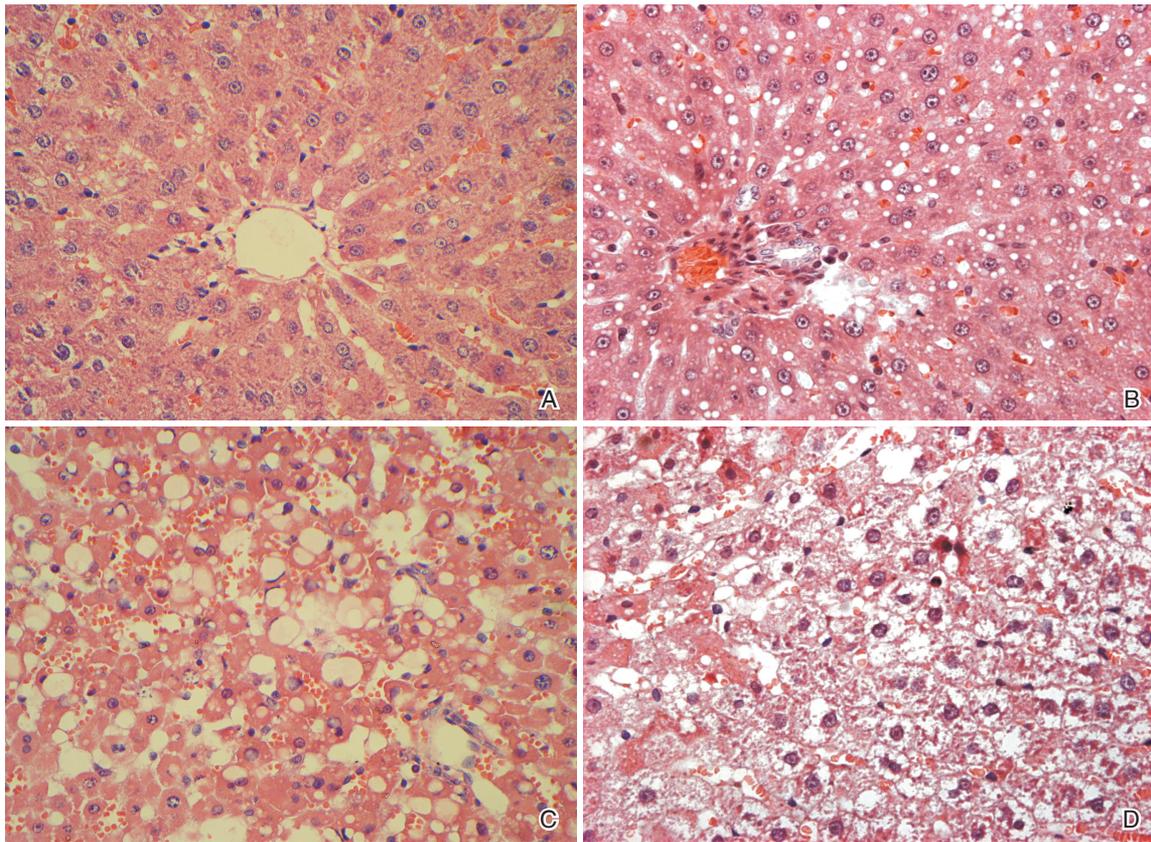
2.3 肝组织 *POMP* 基因荧光定量 PCR 溶解曲线分析

由表 2 结果可知, 随摄酒时间延长, 模型各组肝组织 *POMP* mRNA 相对表达量 (0.42±0.40、0.63±0.44、3.48±2.50、4.22±3.31), 模型组大鼠肝组织中 *POMP* 基因表达量逐渐升高, 模型 3 组及 4 组与正常对照组相比有明显差异 (P<0.05)。

3 讨论

酒精在肝脏内的氧化代谢可产生大量的自由基, 作用于氨基酸链, 造成蛋白质氧化损伤、功能丧失, 造成细胞损伤^[5]。受损的氧化蛋白不能被修复, 只能通过蛋白酶体系统降解, 如未能被降解, 则互相交联成为大分子, 失去其原有功能, 最终导致酒精性肝病^[6]。

蛋白酶体介导的氧化蛋白降解是肝细胞对抗氧化应激的重要机制, 蛋白酶体系统可特异性的对病理蛋白进行降解, 维持细胞的正常功能^[7]。有研究表明蛋白酶体 (proteasomes, PS) 可高效、高选择性降解体内绝大部分的氧化蛋白^[8], 如该系统功能下降, 则直接导致氧化蛋白累积并形成聚合物, 使得细胞无法正常工作, 诱导细胞坏死^[9]。本实验结果显示灌酒 6 周时开始出现肝细胞形态改变及生



病理染色采用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE)。A为灌酒6周时HE染色,放大200倍下观察;B为灌酒8周时HE染色,放大200倍下观察;C为灌酒10周时HE染色,放大400倍下观察;D为灌酒12周时HE染色,放大400倍下观察

图1 酒精导致肝损伤组织病理学观察

Figure 1 Histological features of alcoholic hepatitis

表2 各组大鼠蛋白酶体POMP基因表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of POMP mRNA in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	ΔCt (Ct, 目的基因-Ct, 内参基因)	$\Delta\Delta Ct$ (ΔCt , 模型组- ΔCt , 对照组)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (模型组目的基因量对对照组倍数)
对照组	8	4.52±1.91	1	1
6周	8	5.46±0.93	0.94±0.93	0.42±0.40* ($P=0.005$)
8周	8	5.21±0.75	0.69±0.75	0.63±0.44* ($P=0.048$)
10周	8	3.54±2.24	-0.98±2.24	3.48±2.50* ($P=0.026$)
12周	8	3.24±2.19	-1.27±2.19	4.22±3.31** ($P=0.002$)

与对照组相比, * $P<0.05$

化指标损害,至12周时病变明显。本实验的前期研究也表明随摄酒增多,大鼠肝细胞氧化蛋白含量明显升高,蛋白酶体活性亚基表达下降,表明酒精可造成蛋白酶体活性降低而引起细胞氧化损伤,氧化蛋白蓄积,破坏细胞稳态,造成细胞损伤。

POMP在蛋白酶体的组装过程中发挥重要作用,其只在前体中被检测到,装配完成后即降解

掉。蛋白酶体前体包括 α 环、 β 环及POMP,装配过程中POMP的存在使得 β 亚基活化位点被激活,从而无活性的前体被催化成活性中心颗粒^[11]。有研究表明,向细胞内加入蛋白酶体抑制剂MG132后可测得大量的POMP、未加工的前体成分,同时蛋白酶体活性下降。在敲除POMP基因的细胞内也可观察到 α 环、 β 环正常,但成熟的蛋

白酶体明显减少,表明 POMP 在蛋白酶体成熟过程中的重要作用^[12]。本实验也证实随着酒精摄入时间的延长及摄入量的增加,蛋白酶体成熟蛋白 POMP 逐渐增多,蛋白酶体成熟障碍、功能下降从而使得肝细胞蛋白质氧化损伤导致的氧化蛋白降解受损,造成氧化蛋白蓄积,即蛋白酶体活性的下降与 POMP 的表达密切相关。

综上所述,酒精摄入可影响蛋白酶体成熟,使得蛋白酶体功能下降,造成氧化蛋白蓄积,导致细胞损伤。酒精导致的蛋白酶体成熟机制异常在蛋白酶体功能下降中起重要作用。对其机制的进一步研究将有助于寻找改善蛋白酶体功能的新的途径。

参考文献

- [1] 厉有名. 酒精性肝病的流行病学及自然史[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3):171-172.
- [2] Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in alcoholic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(9): 2136-2142.
- [3] Bardag - Gorce F. Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(11):1349-1357.
- [4] 张莉, 阎明, 朱萍, 等. 酒精性肝病羰基应激状态下蛋白酶体 LMP7 亚基表达研究[J]. 山东大学学报, 2007, 45(8):747-777.
- [5] Galligan JJ, Smathers RL, Fritz KS, et al. Protein carbonylation in a murine model for early alcoholic liver disease[J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(5):1012-1021.
- [6] Donohue TM, Thomes PG. Ethanol - induced oxidant stress modulates hepatic autophagy and proteasome activity[J]. Redox Biol, 2014, 10(3):29-39.
- [7] Bardag - Gorce F. Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16 (11):1349-1357.
- [8] Höhn A, Jung T, Grune T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 71:70-89.
- [9] Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in alcoholic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(9): 2136-2142.
- [10] Jansen AH, Reits EA, Hol EM. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases[J]. Front Mol Neurosci, 2014, 7(73):3389-3461.
- [11] Gu ZC, Enenkel C. Proteasome assembly [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71 (24) : 4729-4745.
- [12] Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes [J]. Nature, 2005, 437(27) : 1381-1385.
- [11] 贾俊婷, 马玉媛, 向思龙, 等. 人细小病毒 B19 检测技术[J]. 临床输血与检验, 2015, 17(5):472-477.
- [12] 李洋远, 曾甲子, 翟燕红. 妊娠妇女人细小病毒 B19 感染状况分析[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(11): 1984-1985.
- [13] El-Sayed ZM, Goda H. Relevance of parvovirus B19, herpes simplex virus 2, and cytomegalovirus virologic markers in maternal serum for diagnosis of unexplained recurrent abortions [J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(6):956-960.
- [14] Adler SP, Manganello AMA, Koch WC, et al. Risk of human parvovirus B19 infections among school and hospital employees during endemic periods [J]. J Infect Dis, 1993, 168(2):361-368.
- [15] Jordan JA. Appreciating the differences between immunoassays used to diagnose maternal parvovirus B19 infection: understanding the antigen before interpreting the results [J]. Primary Care Update for OB/GYNs, 2002, 9(5):154-159.

(上接第 267 页)

游离金雀异黄素和大豆苷元大鼠尿液排泄动力学研究

邹慧琴¹ 刘亚兰¹ 余梦杰¹ 王海鹏¹ 王毓¹ 谢宝刚¹ 张守华^{2*}

[摘要] **目的** 建立大鼠尿液中游离金雀异黄素(genistein, GT)和大豆苷元(daidzein, DD)同时定量的分析方法, 获得其口服后大鼠尿液排泄动力学参数, 为大豆异黄酮生物利用度研究和评价提供新的方法。 **方法** 大鼠单次灌胃给予GT和DD混悬液(15.0 mg/kg), 在给药后不同时间段收集尿液, 尿液经冷冻干燥后, 加1.0 mL甲醇溶解提取目标化合物。采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定游离GT和大DD的浓度, 采用Kromasil C18色谱柱, 以甲醇-水(52:48)为流动相, 流速1.0 mL/min 柱温为30℃, 检测波长254 nm。 **结果** 建立的高效液相色谱法-紫外法(HPLC-UV)方法专属性强, 在0.5~10.0 μg/mL浓度范围内具有良好的线性关系, 良好的精密度及较高的准确度。尿液排泄动力学曲线图上第4.5 h和13.5 h分别显示小肠和肝肠循环2个吸收峰, 游离GT和DD清除半衰期分别为(7.5±0.59) h和(8.5±1.2)h, 72 h尿液累积量分别为(45.2±7.2) μg和(56.1±12.2) μg。 **结论** 所建立的方法可靠, 简便快速, 可用于比较和评价大豆异黄酮类制剂的口服吸收生物利用度和代谢动力学研究。

[关键词] 游离金雀异黄素和大豆苷元; 高效液相色谱; 尿液排泄动力学; 生物利用度

Investigation of urinary pharmacokinetics of free genistein and daidzein in rats

ZOU Huiqin¹, LIU Yalan¹, YU Mengjie¹, WANG Haipeng¹, WANG Yu¹, XIE Baogang¹, ZHANG Shouhua^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi, China, 330006;

2. Department of General Surgery, Jiangxi Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi, China, 330006)

[ABSTRACT] **Objective** To offer an alternative approach to evaluate the bioavailability of isoflavone by urinary excretion, establishing an HPLC method for the determination of free genistein and daidzein in rat urine and obtaining the parameters of urinary pharmacokinetics after their oral administration. **Method** The rats were orally administered with a single dose of genistein and daidzein (15 mg/kg). Urine samples were collected from different time periods. The samples were lyophilized and then extracted ultrasonically by 1.0 mL methanol. HPLC analysis was performed by a reversed-phase HPLC column (Kromasil 100A, C18). The elution conditions for HPLC were methanol and water at the ratio of 52 % (v/v) for isocratic elution, the column was maintained at 40℃, flow rate was 1.0 mL/min, and detection was set to 254.0 nm. **Results** An excellent liner relationship was obtained by developed HPLC-UV method in the range of 0.5~10.0 μg/mL with high specificity, good precision and high accuracy. A plot of urinary isoflavone concentration versus time suggests that there were two peaks at 4.5 h and 13.5 h related to absorption in intestine and enterohepatic circulation. The half-time in urine was found to be (7.5±0.59) h and (8.5±1.2) h for genistein and daidzein respectively. The cumulative excretions of genistein and daidzein for 72 h were (45.2 ± 7.2) μg and (56.1 ± 12.2) μg, respectively.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560631)

作者单位:1. 南昌大学药学院, 江西, 南昌 330006

2. 江西省儿童医院普外科, 江西, 南昌 330006

*通讯作者:张守华, E-mail:zshouhua416@163.com

Conclusion The method is reliable, simple, rapid and suitable for comparison and evaluation of oral bioavailability of isoflavone pharmaceuticals as well as pharmacokinetic study.

[KEY WORDS] Free genistein and daidzein; High performance liquid chromatography(HPLC); Urinary pharmacokinetics; Oral bioavailability

大豆异黄酮是一种重要的植物雌激素,它能通过与雌激素受体(estrogen receptor, ER)竞争性地结合从而干扰雌激素功能,发挥其生物学作用^[1-2]。金雀异黄素(genistein, GT)和大豆苷元(daidzein, DD)是大豆异黄酮的主要活性成分,具有轻度雌激素样作用,无明显副作用,是一种安全的天然植物雌激素。近年来,许多研究表明,这2种化合物具有抗氧化、抗癌、预防骨质疏松症、预防心血管疾病、改善妇女更年期障碍、抗衰老等诸多生理功能^[3-6]。欧洲一个大型流行病学调查发现,在男性血液中,拥有更高浓度GT的人患前列腺癌的几率更小^[7]。目前国外各种大豆异黄酮的医药制品和保健食品正在积极开发,并已有相关品种上市销售。

在体内,GT和DD发挥其雌激素样功能的物质基础可能其游离形式^[8-9],然而,血液中GT和DD主要以他们的代谢物如葡萄糖醛酸及硫酸酯代谢物存在,其游离形式不足总量的5%^[1,10]。因此,以血液为样品的药代动力学研究大多是测定血中总的GT和DD含量。迄今为止,国内外关于GT和(或)DD在大鼠或人体内药代动力学研究较多,但关注体内游离GT和DD排泄动力学方面的研究很少。鉴于此,本文建立样品预处理简单、重复性好的对大鼠尿液中游离GT和DD进行同时定量的HPLC-UV分析方法,在此基础上,获得大鼠口服GT和DD后的尿液排泄动力学参数,为大豆异黄酮各种制剂口服吸收生物利用度研究和评价提供新的方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试药

高效液相色谱仪(岛津10A-VP系统,配备双波长紫外检测器,日本岛津公司);冷冻干燥机(LGD-10D,北京四环科学仪器厂);CQ-250型超声波清洗仪(上海中船七院七二六所);Sartorius BP211D型十万分之一电子天平(德国沙多利斯公司)。GT和DD购自上海融禾生物科技发展有限公司(纯度大于98%,GT和DD批号分别为:20140708和20140904);另取大约5g GT和DD 80℃真空干燥至

恒重后作为对照品使用。色谱纯甲醇(上海陆都有机化学试剂有限公司),水为自制三重蒸馏水。

1.2 实验动物

Sprague-Dawley (SD)大鼠由南昌大学实验动物中心提供,合格证书:医动字第021-9602号,不含大豆成分饲料喂养,实验过程自由进食和水。

1.3 HPLC 色谱分析条件

采用Krommasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 迪马科技有限公司)色谱柱。以甲醇-水(52:48, v/v)为流动相,等度洗脱。流速1.0 mL/min,柱温为30℃,进样20 μL,检测波长254 nm。

1.4 给药方案

8只SD大鼠,体重(200±20)g,不锈钢代谢笼单独饲养,每天光照12h,室温(22~24℃),室内相对湿度30%~70%。适应喂养3d后,第4天上随机收集2只大鼠21:00~9:00夜间12h尿液,作为空白尿样。上述收集尿样马上于5000 rpm离心10 min于-20℃冷冻保存。分别称取GT和DD约50.0 mg,用0.2% CMC-Na溶液配制浓度为3.0 mg/mL的混悬溶液,第5天大鼠灌胃给药,第3h、6h、9h、12h、15h、24h、36h、48h、60h、72h后分别收集其尿液,5000 rpm离心,取上清置于-20℃冰箱备用。

1.5 尿液样品的处理

所收集的尿液样品自然解冻后,间隔3h样品(大约2~4 mL)全部用来冷冻干燥;间隔12h样品由于量较大,准确测定体积后取4.0 mL进行冷冻干燥。冻干粉末每管加1.0 mL甲醇,漩涡振荡、超声约2 min,于10℃14000 rpm离心10 min,取0.5 mL于1.5 mL离心管中,再加0.5 mL蒸馏水,HPLC进样20 μL测定游离GT和DD的含量。

1.6 对照品溶液的配制

一定浓度的GT和DD对照品溶液用水稀释使其终浓度为100.0 μg/mL和102.5 μg/mL的工作液。分别取5、10、20、40、80、100 μL到不同的EP管中,编号。各管分别加入3.0 mL空白尿液,冻干,按样品处理方法同样提取后分别进样色谱分析,以目标色谱峰面积与标准品浓度作图,得到尿样工作曲线。

2 结果

2.1 色谱条件的优化和方法的专属性

本实验色谱分离条件的优化主要考察流动相的组成和检测波长2个因素对样品分离效果的影响。考察了3个pH值(2.5, 4.0, 6.0)的10 mM乙酸铵溶液以及蒸馏水作为水相,甲醇或乙腈作为有机相的流动相对尿样提取物中GT和DD分离。结果表明实验的几种流动相对2种化合物均能达到基线分离,且色谱峰型对称。考虑到实验成本和流动相配制的方便,本实验选用甲醇-水溶液为流动相。鉴于尿样提取物样品较为复杂,8 min前有一定的干扰,流动相定为52%的甲醇,此时2种化合物出峰时间在8.5 min和12.0 min左右。鉴于GT和DD的最大吸收波长分别为260 nm和248 nm,考虑到需同时在尿液中检测GT和DD,故选择检测波长为254 nm定量,以获得较高的检测灵敏度。

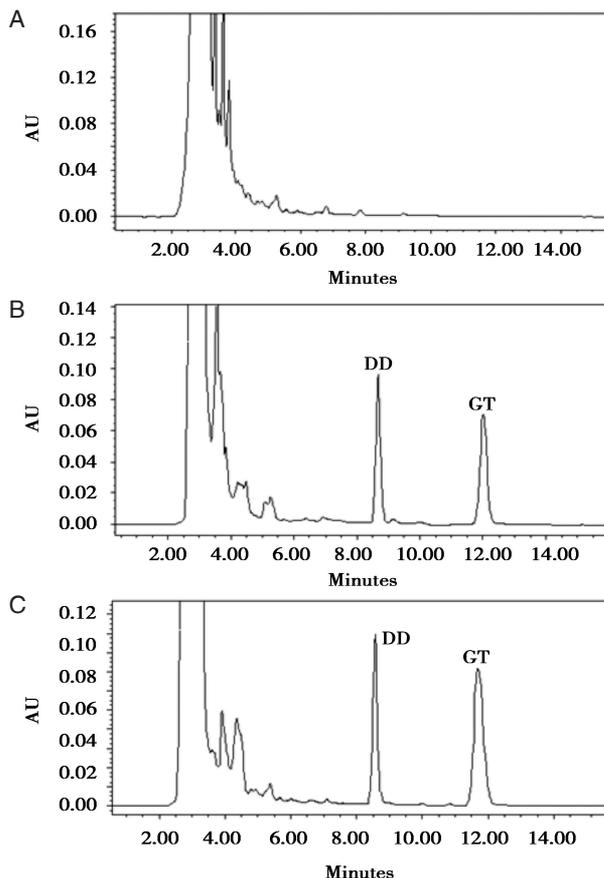
分别取空白尿液、空白尿液加入GT和DD对照品,以及大鼠给予GT和DD后所收集尿液,按建立的尿样处理方法和HPLC方法操作和进样,所得的色谱图见图1。从图上可看出,在建立的HPLC条件下及样品提取处理条件下,样品中的内源性成分及检测物质代谢物等对目标成分的含量测定没有干扰,说明该方法具有良好的专属性。

2.2 工作曲线的建立

按照上述尿液样品处理方法,配制含有GT和DD系列浓度的尿液对照品溶液,分别进行HPLC分析。以GT和DD的峰面积对应其浓度进行线性回归,得到对尿液样品中GT和DD定量的工作曲线。GT和DD的回归方程分别为: $A=91\ 344C+9\ 168.2$ 和 $A=76\ 402C+16\ 879$ (其中A为峰面积,C为浓度),2种化合物在0.5~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的线性相关系数均大于0.99,表明他们的浓度和色谱峰面积信号具有良好的相关性,满足定量的要求。根据色谱信号信噪比大于3:1的最低浓度为检测限,10:1为定量限的方法计算。逐步稀释标准品溶液,结果显示GT和DD2种化合物的检测限分别为0.014 $\mu\text{g/mL}$ 和0.030 $\mu\text{g/mL}$,定量限分别为0.06 $\mu\text{g/mL}$ 和0.07 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度

分别以空白尿液加终浓度为10.4 $\mu\text{g/mL}$ 的GT和12.2 $\mu\text{g/mL}$ 的DD对照品溶液在同一天(及第2天)重复进样5次,计算相关色谱峰的峰面积标准偏差表示日内(日间)精密度。GT精密密度为日内



A: 尿液空白样品; B: 尿液空白加金雀异黄素(GT)和大豆苷元(DD)标品; C: 给药后6 h尿液样品

图1 大鼠尿液HPLC色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of urine samples

2.12%, 日间精密密度为2.74%。DD日内精密密度为1.88%, 日间精密密度为3.3%。

2.4 稳定性

从以上日间精密密度实验数据可以看出,2种化合物在24 h内浓度变化相对标准偏差(relative standard deviation, R.S.D.)。小于5.0%,说明样品比较稳定。上述样品4℃放置一个月后按同样方法测定,以原来的标准溶液(4℃保存)建立新的工作曲线,计算其浓度分别为9.9 $\mu\text{g/mL}$ 和11.6 $\mu\text{g/mL}$,变化R.S.D.仍小于5.0%,表明实验样品具有良好的短和长期稳定性。

2.5 样品提取回收率及方法加样回收率

把含19.6 $\mu\text{g/mL}$ 的GT和20.4 $\mu\text{g/mL}$ 的DD对照品溶液尿液冻干粉用甲醇一次提取后,不溶物离心,沉淀再用0.5 mL甲醇溶解,溶解物进行HPLC分析,此时检测不到目标化合物的存在,说明加入1.0 mL甲醇一次提取就可以基本完全提取目标化合物。

按上述建立的方法,分别测定已知 GT 和 DD 含量的样品,得到色谱图,以及该样品加一定量对照品(1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、6.0 $\mu\text{g/mL}$ 3个浓度)的色谱图,以工作曲线计算相应的浓度,得到加样回收率的数据。GT 和 DD 样品加样回收率分别分别为(100.6 \pm 5.8)%($n=3$)和(102.6 \pm 4.5)%($n=3$)。

综合以上实验结果可知,应用 HPLC-UV 方法在尿样中同时定量 GT 和 DD 专属性强,在一定的浓度范围内具有良好的线性关系,良好的精密度及较高的准确度。

2.6 尿液游离 GT 和 DD 排泄动力学

图 2 是单位时间药物排泄量(Du/dt)对时间作图,从该图明显可以看出,GT 和 DD 在给药后 4.5 h、13.5 h 2 个时间点出现一大一小 2 个吸收峰。异黄酮药代动力学实验表明在给药后 2 h 及 7 h 左右,血液中出现 2 个吸收峰^[10],分别代表小肠和肝肠循环吸收。由于肾排泄的滞后性,因此在排泄动力学曲线图上给药后第 4.5 h(3~6 h 中点)、13.5 h(12~15 h 中点)2 个时间点出现 2 个峰,表明用尿液排泄动力学方法与血液药代动力学方法具有很好的相关性。

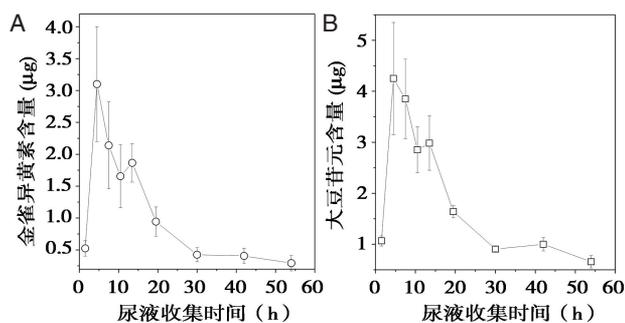


图 2 金雀异黄酮(GT)和大豆苷元(DD)尿液排泄动力学曲线

Figure 2 Mean urinary genistein (A) and Daidzein (B) concentration versus time curves

本实验以单位时间药物排泄量(LogDu/dt)与时间作图,对消除相线性回归,求得直线斜率 K,以 $T_{1/2} = 0.693/K$ 计算 GT 和大豆苷元在体内的消除半衰期,相应的尿液排泄动力学参数列于表 1。尿液 72 小时累积游离 GT 和 DD 分别为(45.2 \pm 7.2) μg 和 (56.1 \pm 12.2) μg 。

3 讨论

GT 和 DD 体内外检测方法文献报道较多,经过萃取、酸化等前处理过程, Uifălean 等^[11]以 0.1%

表 1 口服金雀异黄酮和大豆苷元尿样排泄动力学参数 (mean \pm S.E., $n=6-8$)

Table 1 The urinary pharmacokinetic parameters of genistein and daidzein after their oral administration (mean \pm S.E., $n=6-8$)

	金雀异黄酮(GT)	大豆苷元(DD)
Du/dt(max, Ug/hr)	3.5 \pm 0.6	4.7 \pm 1.3
t_{\max}	4.5	4.5
$T_{1/2}$	7.5 \pm 0.59	8.5 \pm 1.2
72 h 累积(μg)	45.2 \pm 7.2	56.1 \pm 12.2

Du/dt (max, Ug/hr): 最大排泄峰浓度; T_{\max} : 达峰浓度时间; $t_{1/2}$: 半衰期

乙酸和乙腈为流动性,利用 HPLC-UV 方法同时检测了大豆保健品中 GT、DD 和大豆黄素,线性范围为 5.0~80 $\mu\text{g/mL}$ 。Magiera^[12]以 0.05% 三氟醋酸和乙腈为流动相,利用超高效液相色谱 UHPLC-UV 技术同时在中草药保健品中同时检测了 GT、DD 及其他 14 种化合物。GT 和 DD 检测限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。本文利用冷冻干燥的方法先处理尿液样品,然后直接用甲醇提取,这样可以保证有效提取 GT 和 DD 的基础上消除尿液中蛋白的影响,样品用水适当稀释后直接进样;另外 HPLC-UV 分离 GT 和 DD 等化合物,文献大多采用较为复杂的流动相,流动相中如果含有三氟醋酸、三乙胺等化合物在 HPLC 过程中可能影响基线的稳定、提高方法的检测限。而对于生物样品的分析来说,降低方法的检测限是非常有必要的,本实验结果表明,直接用水和乙腈体系就能很好的在尿液样品中分离这 2 种代谢物,该方法对 GT 和 DD 2 种化合物的检测限分别为 0.014 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.030 $\mu\text{g/mL}$ 。当然,提高方法灵敏度的另外一种方法就是采用质谱检测器,如经酶解、固相萃取等前处理过程,利用 HPLC-MS 技术^[13],包括 GT 和 DD 在内的 13 种植物雌激素可以同时人体血液和尿液中定量,尿中 GT 和 DD 检测限小于 1.0 ng/mL ,具于 MS 的检测技术需要贵重的仪器,样品前处理复杂,分析成本高等缺点。经方法学确证,本文建立的在尿样中同时定量 GT 和 DD 的 HPLC-UV 方法,样品前处理简单、专属性强、检测限低,在 0.5~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内具有良好的线性关系,良好的精密度及较高的准确度,适应于含 GT 和 DD 制剂大鼠的排泄动力学研究。

人体口服大豆异黄酮后,血液中主要是 GT 和 DD 的葡萄糖醛酸及硫酸酯代谢物,其游离形式不

足总量的5%^[1,10],含量极低,一般低于HPLC-UV方法的检测限。因此,以血液为样品的药代动力学研究大部分得先酶解,然后测定血中总的GT和DD含量,获得GT和DD的药动学参数。然而,许多实验结果^[8,9,14]表明,GT和DD在体内发挥其雌激素样功能的物质基础是其游离形式,因此获得游离GT和DD的药动学参数可能更有利于不同制剂的评价。鉴于GT和DD为小分子化合物,且主要由肾脏排泄,其尿中的含量与体内血中的浓度具有一定的相关性^[5],因此本文建立了游离GT和DD在大鼠尿液中的HPLC-UV检测方法,并获得他们的排泄动力学参数。本文结果显示,口服GT和DD尿液清除半衰期为8h左右,大鼠单次给予GT和DD后尿样中游离GT和DD的变化满足单室一级排泄动力学模型,与文献报道结果一致^[10,14]。本实验结果显示单次口服给予大鼠GT和DD混悬剂(15.0 mg/kg),其尿液72h累积游离GT和DD分别为(45.2±7.2)μg和(56.1±12.2)μg。由于尿液累积排泄总量与血浆药物浓度—时间曲线下面积(AUC)成正相关,因此可用尿液中累积异黄酮量评价不同的异黄酮制剂的生物利用度。

总之,异黄酮的口服吸收生物利用度与其预防和治疗疾病的药理作用作用密切相关,到目前为止,以尿液为样品的游离GT和DD排泄动力学研究的报道很少。因此,本文建立了操作简单、重复性好的对大鼠尿液中游离GT和DD进行同时定量的HPLC-UV分析方法,实验结果表明该方法专属性强,在一定的浓度范围内具有良好的线性关系,良好的精密度及较高的准确度。本文研究结果显示基于尿液排泄动力学的分析方法可用于比较和评价大豆异黄酮类制剂的口服吸收生物利用度;亦可用于大豆异黄酮在中国居民的体内代谢动力学研究,为进行慢性病治疗、预防提供直接的理论数据。

参考文献

- [1] Ganai AA, Farooqi H. Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 76:30–38.
- [2] Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data [J]. *Acta Pol Pharm*, 2000, 57(2):135–155.
- [3] Taylor CK, Levy RM, Elliott JC, et al. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies [J]. *Nutr Rev*, 2009, 67(7):398–415.
- [4] Russo M, Russo GL, Daglia M, et al. Understanding genistein in cancer: the “good” and the “bad” effects: a review [J]. *Food Chem*, 2016, 196:589–600.
- [5] Levis S, Strickman-Stein N, Ganjei-Azar P, et al. Soy isoflavones in the prevention of menopausal bone loss and menopausal symptoms: a randomized, double-blind trial [J]. *Arch Intern Med*, 2011, 171(15):1363–1369.
- [6] Kim SH, Kim CW, Jeon SY, et al. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of genistein, a soy isoflavone, upon cancer development and progression in pre-clinical animal models [J]. *Lab Anim Res*, 2014, 30(4):143–150.
- [7] Travis RC, Spencer EA, Allen NE, et al. Plasma phyto-oestrogens and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(11):1817–1823.
- [8] Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions [J]. *Adv Nutr*, 2015, 6(4):408–419.
- [9] Suthar AC, Banavalikar MM, and Biyani MK. Pharmacological activities of genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part II—anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms [J]. *Indian J Exp Biol*, 2001, 39(6):520–525.
- [10] Kwon SH, Kang MJ, Huh JS, et al. Comparison of oral bioavailability of genistein and genistin in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(1–2):148–154.
- [11] Uifalean A, Farcas A, Ilies M, et al. Assessment of isoflavone aglycones variability in soy food supplements using a validated HPLC-UV method [J]. *Clujul Med*, 2015, 88(3):373–380.
- [12] Magiera S, Baranowska I, Lautenzleger A. UHPLC-UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102:468–475.
- [13] Wyns C, Bolca S, de Keukeleire D, et al. Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(13–14):949–956.
- [14] Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C] Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 164(2):206–215.
- [15] Pons DG, Nadal-Serrano M, Torrens-Mas M, et al. The phytoestrogen genistein affects breast cancer cells treatment depending on the ERalpha/ERbeta ratio [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(1):218–229.

· 综述 ·

登革病毒治疗性抗体的基础研究进展

尹庆庆¹ 王建宇¹ 陈强² 周晓红^{1*}

【摘要】 近年来蚊媒性传染病登革热在全球呈现快速蔓延和上升流行趋势,但目前仍没有特异性的治疗药物和有效疫苗应用于临床。登革病毒(dengue virus, DENV)治疗性抗体的研发面临抗体依赖性增强效应(antibody dependent enhancement, ADE)等方面的阻滞。本文就目前 DENV 治疗性抗体主要靶向表位及 ADE 等基础研究进行综述,为治疗性抗体和疫苗深入研究提供参考。

【关键词】 登革病毒; 治疗性抗体; 抗体依赖性增强效应; 人源中和抗体; E 蛋白二聚体依赖性表位

Recent progress in basic research concerning the therapeutic anti - dengue antibodies

YIN Qingqing¹, WANG Jianyu¹, CHEN Qiang², ZHOU Xiaohong^{1*}

(1. Key Laboratory of Prevention and Control for Emerging Infectious Diseases of Guangdong Higher Institutes, Department of Pathogen Biology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Biodesign Institute and School of Life Science, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, AZ 85281)

【ABSTRACT】 Recently, dengue fever, the mosquito-borne infectious disease, spread rapidly all around the world. However, there is neither specific medicine nor effective vaccine which can be used in clinic. The studies concerning therapeutic-antibodies against dengue virus(DENV) are facing major blocks of antibody-dependent enhancement(ADE), etc. This review highlights the current basic research to figure out the targeted epitope of therapeutic-antibodies against dengue virus and the molecular mechanism involving in ADE. This paper will provide valuable insight for the further studies of dengue fever.

【KEY WORDS】 Dengue virus; Therapeutic antibody; Antibody - dependent enhancement; Human - derived neutralizing antibody; E-dimer-dependent epitope

登革热(dengue fever, DF)是由登革病毒(dengue virus, DENV)引起的一种蚊媒传染性疾病,主要流行于热带和亚热带地区,目前疫情已快速蔓延至 100 多个国家,全球超出 1/3 人口正面临感染 DENV 的风险^[1]。平均每年感染 DENV 的 3.9 亿人口中近 25% 出现临床症状^[2],可导致普通 DF 和重

症 DF,重症 DF 患者有严重出血、休克及严重脏器损伤等高危临床表现^[3]。2014 年登革热在我国尤其在广东/广州大规模暴发流行,疫情以 DENV I 型为主,II 型、III 型散发,重症病例显著增多,其中血小板严重下降、多器官衰竭病例增多,结合近年来 I ~IV 型 DENV 均在广州出现,再次感染尤其是

基金项目:国家留学基金(留金发[2010]3009号);广州市对外科技合作专项(2012J5100026);南方医科大学交叉学科创新团队培育计划(B1012086)

作者单位:1.南方医科大学公共卫生与热带医学学院病原生物学系暨广东普通高校新发传染病防治重点实验室,广东,广州 510515

2.亚利桑那州立大学生物设计研究所和生命科学学院,亚利桑那州,坦佩 AZ 85281

*通讯作者:周晓红, E-mail:daizhouxh@163.com

出现交叉型别感染易增加病毒感染的抗体依赖性增强效应(antibody dependent enhancement, ADE),而登革热目前仍没有特异性治疗药物和有效疫苗,登革热防控形势依然严峻。因而,开展DENV中和性抗体相关研究一直是重要的防治研究方向,为治疗性抗体的进一步研制奠定基础,本文就其国内外基础研究进展进行综述。

1 登革病毒生物学特征

DENV是一种有包膜的单股正链RNA病毒,隶属于黄病毒属,其基因共编码10种蛋白,其中3种结构蛋白(C、M、E蛋白)和7种非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5蛋白)。病毒成熟期间,在furin蛋白酶作用下,前体蛋白(prM)可被切割为pr片段和膜结合蛋白(M),并使病毒颗粒表面的包膜蛋白(E)重排,形成含M蛋白的病毒颗粒。prM释放初期,病毒颗粒开始具感染性,E蛋白结合到细胞受体,介导病毒和细胞膜的融合,致使病毒的RNA进入细胞内^[4]。一个成熟的DENV外膜由90个E蛋白二聚体组合形成20面体结构。所有的E蛋白亚单位组成不相同的病毒表面蛋白结构、空间位置以及与其他因素的相互作用,导致E蛋白对受体亚单位和抗体的结合效应的时空动态性。E蛋白单体在中性pH条件下是一种维持亚稳定状态的可溶性蛋白,包括3个结构域:ED I、ED II和ED III。ED I对于稳定E蛋白的氨基端和D II的羧基端环状结构起重要作用;ED II包含疏水融合环(fusion loop, FL),促进弱酸性环境下与内体膜的融合^[5];ED III是DENV与细胞膜受体结合的主要功能区域,ED III空间构象改变或基因突变可能会影响与膜的融合,导致病毒毒力的减弱或致使病毒逃逸于机体的免疫中和效应。

DENV血清型分类是主要由E蛋白决定,分4种不同血清型(DENV I~IV)。非结构蛋白中特别是NS1蛋白在病毒感染和机体免疫过程中起重要作用。

NS1蛋白是DENV中一种高度保守的糖蛋白。Kyung等^[6]报道西尼罗病毒NS1蛋白也存在3个结构域:FR-I、FR-II和FR-III,但具体结构尚未解析。人体血液循环中游离的NS1蛋白已被用来作为DENV感染急性期的血清标本检测指标^[7]。

DENV感染宿主的特点有:(1)初次感染某种

血清型的DENV后,感染者能产生针对同型DENV长久免疫保护作用^[8];(2)当再次接触异型DENV时,体内抗体与异型病毒会有短暂的交叉反应且特异结合能力弱,由于ADE效应导致感染加重^[9],ADE效应多发于二次感染;(3)对于感染过某种类型DENV孕妇,出生婴儿若感染与母亲同型DENV时,由于婴儿体内抗体浓度较低,亦可能出现严重感染现象;(4)未完全成熟的DENV颗粒开始具有感染性。

2 登革中和性抗体研究现状

目前DENV抗体研究,从抗体来源分鼠源、人源化和人源3种类型,人源化抗体与鼠源抗体相比具有的特点:(1)免疫原性低于鼠源抗体;(2)亲和力弱于鼠源抗体,特异性优于鼠源抗体;(3)人源化抗体Fc段能够诱发机体的效应功能;(4)在体内半衰期长;(5)价格仍较昂贵。人源化抗体仍含有10%~30%的鼠源蛋白,在临床应用时仍存在免疫排斥反应的潜在威胁,因而人源抗体是DENV治疗性抗体的重要研发目标之一。构建全人抗体的方法主要有抗体库技术和转基因小鼠技术。但亦有报道对一些人源化和人源抗体进行序列比较分析,并没有显著性差异;人源化单抗与全人单抗的免疫原性之间的差异亦是微弱的;结合亲和力往往与交叉反应性相关,即与靶位点结合非常强烈的单抗亦可与结构相似非靶蛋白结合,因而,抗体亲和力增强也可导致特异性减弱^[10]。

DENV抗体中和性研究是深入研发治疗性抗体的重要基础。抗体中和活性检测方法多样,中和活性检测的金标准是噬菌斑减少中和试验,一种改进的基于酶联免疫斑点技术的微中和试验技术,使中和实验更为便捷^[11]。DENV抗体根据其识别特点,分为型特异性抗体和交叉反应性抗体。抗体产生ADE效应的功能大于中和效应,称为增强抗体。人体感染DENV后,产生的DENV抗体中有同时针对3种类型或4种类型的通用型抗体,亦有分别针对单一型别的特异性抗体,且部分抗体存在明确的ADE效应。由于NS1不是病毒颗粒的组成成分,因此认为抗NS1抗体一般不产生ADE效应。DENV中和抗体型别主要是IgG。大量体内、外实验证明:中和抗体能有效阻止DENV的感染,不仅能发挥病毒感染前的预防

作用,而且在病毒感染后的一段时期内,依然能发挥治疗病毒感染的作用。

2.1 DENV 中和抗体主要靶向表位

DENV 中和抗体对同型 DENV 的中和能力随毒株的不同,甚至同种毒株基因型的不同而不同^[12]。一般而言,对其诱发毒株的中和能力是最强的。DF 流行末期中中和抗体水平高于流行初期,轻症 DF 患者中和抗体水平高于重症患者^[13]。理想的 DENV 治疗性抗体是能同时针对 4 种血清型的广谱中和抗体,又能避免 ADE 效应。人体感染 DENV 后体内可以针对不同的登革抗原表位产生

多种单克隆抗体,其中就有多种是中和抗体。特异性的中和抗体大多在初次感染产生,而二次感染和恢复期患者的血清中有交叉反应抗体,同时也存在 ADE 效应。

目前研究认为,以 90 个密集的二聚体穿插分布在 DENV 膜表面的 E 蛋白是主要抗原,是治疗性抗体和疫苗研发的主要靶标^[14]。虽然研究表明单抗可结合到 DENV E 蛋白的所有 3 个结构域,但最高效的结合表位位于 ED III。ED III 存在 2 部分重叠区域,其旁一根突起的侧脊是与中和抗体高效结合的表位区。DENV 抗体研究靶向 PrM 和

表 1 具有 DENV 中和作用的单抗基础研究情况一览表

Table 1 A list of the recent progress in basic research concerning the therapeutic anti-dengue antibodies

作者名	实验机构	名称	靶标肽	氨基酸残基	制备抗体的病毒株溯源	类别	结构	功能特征
Shrestha, et al ^[16]	Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, United States of America	DENV1-E105/ DENV1-E106	ED III	E296-399(G328, T329 and D330)BC loop, (K361E and E362K) DE loop, (K385) FG loop	DENV I : 16007	鼠源	IgG	对 5 种 DENV I (TVP-2130; TVP-5175; West Pacific-74; 3146 Sri Lanka; 16007)均有中和作用
Cockburn, et al ^[17]	*Unite' de Virologie Structurale, De' partement de Virologie	4E11	ED	E296-400 (308, 312) A strand, (387, 389, 391) G strand	DENV I	鼠源	IgG	对 DENV I ~IV 均有交叉中和作用
Midgley, et al ^[18]	*Department of Medicine, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London, UK	2H12	ED III	(Lys310, Glu314, Thr315, Gln316, His317, Ile352, and Glu368) AB loop	DENV II : 16681	鼠源	IgG	对 DENV I ~IV 均有中和作用,少或无 ADE
Lok, et al ^[19]	*Purdue University	1A1D-2	ED III	304-310, 312, 323, 325, 364, 388-390, A strand	东南亚 DENV II : NGC	鼠源	IgG	对 DENV I ~III 均有中和作用
Austin, et al ^[20]	Washington University School of Medicine	DENV1-E111	ED III	(300-301)C strand, (334-351) C' strand, (382384) FG loop, CC' loop, (372) EF loop	DENV I : 16007	鼠源	IgG	对部分 DENV I 基因型具有高效中和作用
Batra, et al ^[21]	International Centre for Genetic Engineering & Biotechnology, India	抗 ED III-2 抗体	ED III	ED III-2	瑙鲁(I)、多米尼加(IV), 南太平洋岛国, 这是一个综合四型 E III 蛋白综合蛋白 GenBank: GU324240	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用

作者名	实验机构	名称	靶标肽	氨基酸残基	制备抗体的病毒株溯源	类别	结构	功能特征
Arora, et al ^[22]	International Centre for Genetic Engineering & Biotechnology, India	抗 Pp-HBcAg - ED III-2 抗体	ED III	HbcAg :c/e1 loop, ED III-2	GenBank: JQ723012	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Zou, et al ^[23]	*Novartis Institute for Tropical Diseases, Singapore	HM14c10	ED III	(T51k) DI/D II H-1	感染 DENV I 的 DF 患者血清	人源	IgG	对 DENV I 选择性中和作用
Saokaew, et al ^[24]	*Mahidol University, Bangkok, Thailand	HuScFv	ED III	(319-332) B strand - BC loop, (340-358) C-C' loop - C' strand, (374-391) Fstrand-FG loop	Hunman anti-body phage display library GenBank: JN692493.1	人源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Fibriansh, et al ^[25]	*Duke - NUS Graduate Medical School, Singapore	HMAbs 1F4 E	E	(46-52) D _o strand and D _o a loop, (136-138) E _o strand, (155-165) E _o F _o loop and F _o strand, G _o strand, (170-177) G _o H _o loop, (272-276) k1 loop	DF 患者血清	人源	IgG	能高效抑制不同时期的 DENV I 的感染
León-Juárez, et al ^[26]	Molecular Biomedicine, CINVESTAV, México City, México D.F	C21	ED II	(aa N66-S80), (aa Q77-V92), (aa D87-W102), (aa L97-G112)	DENV II rGST-E	鼠源	IgG	能与 DENV I ~IV 发生交叉反应,但在体外无法中和 DENV II
Li, et al ^[27]	National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan	DB32-6	E	(309H-310K-311E-312W/Y-H) E-D III A-strand	DENV II : 16681	人源	IgG	对 DENV II 具有中和作用,避免 ADE 作用
Sasaki, et al ^[28]	Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan	HuMAbs	E	aa52-132	二次感染 DENV II : 16681 的 DF 患者血清	人源	IgG	能中和 DENV I ~IV 且避免 ADE 作用
Tian, et al ^[29]	Third Military Medical University, China	4F5	NS3	U460-469 RVGRNPKNEN	DENV II : strain Tr1751	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Crill, et al ^[30]	*Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Service, U.S.	4G2/6B6C-1	ED II	G104, G106, L107, T231	美国加州 GenBank: AHX42424.1、 GenBank: AHX42423.1	人源	IgG	对 DENV II 具有中和作用且避免 ADE 作用
Sukupolvi-Petty, et al ^[31]	Washington University School of Medicine, USA	DV2-30	ED II	W101, G106, or L107, K88, Q233, or H244.	东南亚	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用且避免 ADE 作用
		DV2-106	ED III	K305, K307, and K310 (E383 and P384) FG loop, E327, P336, (M340 and H346) Cstrand and C-Loop	东南亚 GenBank: AI057157.1	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用,避免 ADE 作用

作者名	实验机构	名称	靶标肽	氨基酸残基	制备抗体的病毒株溯源	类别	结构	功能特征
Sukupolvi-Petty, et al ^[31]	Washington University School of Medicine, USA	DV2-30	ED II	W101, G106, or L107, K88, Q233, or H244.	东南亚	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用且避免 ADE 作用
		DV2-106	ED III	K305, K307, and K310(E383 and P384)FG loop、E327, P336, (M340 and H346)Cstrand and C-Cloop	东南亚 GenBank: AI057157.1	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用,避免 ADE 作用
Gromowski, et al ^[32]	*Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, and *Institute for Human Infections	9F16	ED III	M301, K305, K307, E383, P384, E327, D329	US Biological DENV II	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Gromowski, et al ^[33]	and Immunity, University of Texas Medical Branch, USA.	9F16	ED III	K305, K307, E383, P384, D329, L389, W391	US Biological DENV II	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Gromowski, et al ^[33]	*Pathology, Sealy Center for Vaccine Development	3H5	ED III	(K305 and P384) DENV-2	Chemicon DENV II : NGC	鼠源	IgG	对 DENV II (NGC; DAKHD10674; DAKAR578; H8-2027 and IB-H11208)均有中和作用
Sukupolvi-Petty, et al ^[34]	*Medicine, Washington University School of Medicine, USA	1F1	ED III	T303, G304, G330, (E383 and P384) FG loop	DENV II : 16681	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Erb, et al ^[35]	*Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, USA	3H5	ED III	(aa380 - 389) FG loop	DENV II :NGC	鼠源	IgG	对 DENV II 具有中和作用
Dejnirattisai, et al ^[36]	Division of immunology and inflammation, Department of Medicine, facultyof Medicine, Hammer smith Campus, Imperil college, London, UK	EDE1/EDE2	EDE	N67, N153 Leu 107 and Lys295 Trp101	DF 患者血清 DENV I / DENV II	人源	IgG	对 DENV I ~IV 具高效广谱中和作用
Yi, et al ^[37]	Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, PR China	2B11A35/2D73A7	ED III	EF loop 附近,同时跨越 G strand 部分区域/EF loop 附近,同时跨越 CC' loop	DENV I, Ha waii; DENV II, New Guinea -C; DENV III, Guanxi-80-2; DENV IV 241	鼠源	IgG	对 DENV I ~IV 具有中和作用
Ji ^[38]	Second military medical university	IG6	ED III	³⁸⁷ LTLH ³⁹⁰	DENV IV : train B5 Gen Bank : AF289029	鼠源	IgG	对 DENV IV 具有中和作用

作者名	实验机构	名称	靶标肽	氨基酸残基	制备抗体的病毒株溯源	类别	结构	功能特征
Rajamanonmani, et al ^[39]	School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Biopolis, Singapore	9F12	ED III	305, 307, 310 and 330 DENV II	DENV II TSV01	鼠源	IgG	对 DENV I ~IV 具有中和作用
Fibriansah, et al ^[40]	*Program in Emerging Infectious Diseases, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore	5J7	E	Mol A: DI-D II hinge (Q269 N270), mol B:D III, mol B': ED II 顶部, 包括 FL。(Thr 55 Lys 307)	DF 患者血清	人源	IgG	能与 DENV I ~IV 交叉结合, 对 DENV III 具有强中和作用
Smith, et al ^[41]	Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA	1C19	ED II	(R73 G78 E79) bc loop(aa37-39)F loop 附近	Natural wild-type field strain DF 患者血清	人源	IgG	对 DENV I ~IV 具有中和作用
de Alwis, et al ^[42]	A Microbiology and Immunology and j Epidemiology	1F4 5J7 2D22	E	G274-DI/D II hinge /Q269 _N271ins K DI-D II hinge/ R323G D III	DF 患者血清	人源	IgG	分别对 DENV I , DENV III DENV II 具高效型特异中和作用

*本机构非该抗体的直接研发机构,开展了抗体中和作用等功能研究工作

NS1 亦有报道^[15]。C 蛋白为补体结合抗原,一般不诱导机体产生中和性抗体。E、PrM 和 NS1 的相关抗体研究因抗原不同的特性而分别靶向中和作用、ADE 效应、诊断效能 3 个不同的领域。目前全球有关中和抗体的研究简况总结见表 1。

E 蛋白表面预测有 180 个潜在抗体结合位点^[43],有线性 and 立体构象型表位,并非均能成为抗体结合的有效表位。E 蛋白的 3 个结构域对应的单抗:抗 DE I 单抗具有群特异性的,由于空间位阻,抗 ED II 抗体不具备或仅具备弱的中和作用^[44]。ED III 参与病毒的感染过程,且该区相对保守,是 E 蛋白抗体的主要研究区域,抗 ED III 抗体保护作用主要是阻断 DENV 与宿主细胞的融合。ED III 在 3 个结构域中免疫原性最强,因而是 DENV 亚单位疫苗及 DNA 疫苗及中和抗体系列研究的重要靶标,可诱导中和抗体以及 Th1 为主的 T 细胞免疫反应的产生^[45]。研究证实交叉保护性鼠源单抗主要识别位于 ED I 和 ED II 间的疏水口袋区及 ED II 顶部的融合肽(FL)^[46],亚群特异性中和单抗识别 ED III A strand^[34],具血清型特

异性保护作用的抗体结合主要位于 ED III 蛋白 A 链和侧面的脊上重叠并且相邻的表位^[31-42]。

不同血清型对应 ED III 区中和抗体结合表位不同,多项研究发现,含有单一血清型特异性(type-specific, TS)表位、针对 2~3 种血清型的亚复合体反应(sub-complex reaction, sCR)表位以及同时针对 4 种血清型的复合体反应(complex reaction, CR)表位,多株鼠源单克隆抗体也分别定位到这些表位。大多数抗 DENV I ~ II ED II 鼠源中和性单抗表位集中 E 蛋白的 A 链和/或侧脊表位。有研究表明几个能产生免疫反应的弱中和性交叉反应抗体(5A2-7, 13D4-1 和 E111)结合的氨基酸残基是在 ED III AB loop^[34]。Rajamanonmani 等^[31]发现由 DENV-2 rED III 免疫小鼠制备中和 4 种血清型的高效中和性抗体 9F12 的识别表位为 A-strand 和 BC-loop, 9F12 单抗主要是在病毒感染早期起预防保护作用,其具广泛交叉中和病毒的能力,进行优化和人源化后可作为治疗严重登革病例的候选治疗性抗体。

李孝权等^[47-48]检测 107 株 E 蛋白单抗中的 94

株具有抗 EDⅢ 中和活性,通过酶联免疫吸附试验等筛选的单抗有 42 株为 TS 单抗、26 株为 sCR 单抗及 23 株针对 CR 单抗,另有 3 株黄病毒交叉反应单抗。其中 CR 单抗大都特异性识别相同序列 aa310-319,各血清型间在该位点高度保守且是免疫优势的复合体表位,进一步发现 AB loop 上的 Q316、H317 是该表位的关键残基,但该位点单抗中和活性较弱。对鼠源抗 EDⅢ CR 抗体靶位点的深入探究,发现 15 株能特异识别 DENV-1 EDⅢ aa309-320,但中和活性较弱,推测 AB loop 并不是一个良好的亚单位疫苗候选表位。2B11A35 和 2D73A7 则是 2 株能强力中和 DENV 4 种血清型的单抗。单抗 2B11A35 结合表位的关键氨基酸残基在 EDⅢ 蛋白 AB loop、D strand 区(315、316、317、318、356、368 aa)和 EF loop、G strand 区(372、374、391 aa)这 2 个区域附近,不与 AB loop 的线性多肽 309~310 aa 反应,因此推断 2B11A35 所识别表位的关键位点应该在 EF loop 附近,同时跨越 G strand 部分区域;2D73A7 所识别表位的关键氨基酸残基也应该在 EF loop 附近,同时跨越 CC loop,而单抗 2D73A7 的表位暴露性优于单抗 2B11A35 的表位。因而认为抗 EDⅢ 蛋白的交叉保护性中和抗体识别位于 EF loop 附近区域^[37]。

目前全球报道的 DENV 中和抗体表位多与 DENV E 蛋白有关,Dejnirattisai 等^[36] 2015 年报道自 DF 患者血清分离获得一类具有针对 4 种型别 DENV 的广泛强中和效应的人源抗体,经 X-射线晶体结构分析,揭示这些抗体与 DENV E 蛋白二聚体形成复合物,二者识别的决定性因素为 E 蛋白二聚体界面的 DENV 血清型别恒定区位,包括 E 蛋白的融合环主链和 2 个保守的糖链,识别表位为 E 蛋白二聚体依赖性表位(E-dimer-dependent epitope, EDE)。该广谱中和抗体结合靶位点位于 E 蛋白 2 个保守的糖基化位点 N67 和 N153,具有很强的中和能力,即使在低浓度下也有 50% 的中和率,并与抗 FL 中和抗体中和能力进行对比,发现该抗 EDE 抗体不能中和完全未成熟的 DENV,但中和完全成熟和部分成熟 DENV 能力相当。在未成熟颗粒中,覆盖在 E 蛋白 FL 上的 prM 与 E 蛋白的结合较弱,这就有利于抗 FLE 有效取代 prM 而与 FL 结合,这点在成熟微粒中就没那么明显,反而结合力有所减弱。且该抗 EDE 单抗 ADE 效应

显著低于抗 FLE 单抗产生的 ADE 效应,具 90% 的中和效价。

从上述有关 E 蛋白中和抗体基础研究情况可以看到:(1)针对 DENV EDⅡ: FL loop 对应的交叉中和性抗体(E53)大都中和效率低且易产生 ADE 效应;针对 BC loop 的交叉中和抗体(1C19)不仅能高效中和 DENV 且还能与低效抗 FL 抗体竞争结合。(2)针对 DENV EDⅢ: AB loop 对应交叉中和抗体一般具弱中和性,EF loop 附近形成的单抗(2B11A35/2D73A7)具高效交叉中和能力,A strand 表位(单抗, DB32-6)具有高效中和活性;(3)针对 EDE:单抗(EDE1/EDE2)是一类新型高效广谱的人源中和抗体。

由于 NS1 蛋白不属于病毒颗粒蛋白,体内产生的抗 NS1 抗体并不能直接与病毒接触,具体机制还有待研究。目前国内外研究中,有诸多关于 NS1 蛋白的免疫原性及制备单抗研究,并应用于临床 DF 的急性期诊断。

2.2 DENV 抗体与 ADE

李孝权等^[47]建立了通过抗原捕获定量检测培养上清中抗原 ADE 的检测方法。DENV 的 ADE 效应,目前研究表明主要发生在二次感染,抗体产生 ADE 的主要原因是抗体的交叉弱中和性,抗 prM 抗体是引起 ADE 的关键。在自然条件下,原发感染 DENV,人体产生抗体中大部分具交叉弱中和性,仅有一小部分是型特异性高效中和抗体^[42, 49-50]。交叉反应型抗 PrM 抗体在初次感染就有出现,二次感染患者体内的 prM 抗体水平显著升高。对于 DENV, M 蛋白开始出现时病毒始具感染性。无感染性的 DENV 在抗 PrM 抗体的作用下,也变得有感染力,抗 prM 抗体产生 ADE 不仅因为抗体的交叉性,还与 PrM 在病毒表面的存在有关。Dejnirattisai 等^[51]通过对抗 NS1 抗体、E 抗体和 prM 抗体进行比较分析发现,只有抗 prM 抗体在抗体低浓度和高浓度时均促进 ADE 发生,而在 DENV 各血清型中均有很强交叉反应,但即使在高浓度下也无法中和感染。推测病毒表面 prM 的部分裂解可减少病毒表面可中和病毒抗体的抗原密度,使 DENV 在存在抗 prM 抗体时更容易产生 ADE。ADE 不仅促进未成熟颗粒与 Fc γ II 受体结合使病毒进入细胞,而且增强病毒于细胞内的复制,调节细胞内抗病毒机制^[52]。靶细胞内 Furin 蛋白酶的活性对

内化的未成熟的登革病毒感染性至关重要,这些现象说明未成熟登革病毒存在潜在的高感染性和可能增强疾病的发生^[53]。

有研究表明,型特异性抗体高浓度时在体外和动物模型内有很强的中和能力,而低浓度时也可能增强病毒感染;一般情况下,交叉反应抗体中和能力较弱且能在一定条件下增强病毒感染表达Fc受体的细胞^[49]。因此,找到一个具交叉反应且高效中和能力抗体的保守位点很有必要。如高效交叉中和抗体(1C19)识别的保守位点(BC loop),能竞争抑制低效抗FL单抗的结合,这种特性可能可以用来拮抗、避免ADE^[41]。

为了避免ADE效应,有学者^[39]通过基因工程技术构建具有广谱中和活性的双可变区抗体DVD1A1D-1G6并对介导ADE效应的Fc段缺失突变,该双可变区抗体是将具有一定体内治疗作用的鼠源特异性抗DV-4 EDⅢ抗体1G6的可变轻重链序列、DV1-3抗体1A1D-2^[19]的轻重链可变区序列与人重链(Ig G1)和轻链(κ)恒定区连接构成全长人-鼠嵌合抗体。对黄病毒属的西尼罗病毒的研究中发现,在C1q和Fc γ R敲除小鼠中,抗体的体内保护活性不受影响,可能是由于抗体的中和能力发挥了比抗体后续效应功能重要得多的功能。通过抗体改造如进行Fc糖基化改造等也可在一定程度上降低或消除ADE效应,但同时也会降低细胞的ADCC效应。对于PrM产生的ADE,进一步找到抗PrM抗体的ADE相关表位,亦是重要的研究方向。

3 结语

综上所述,DENV抗体基础研究历时几十年,已取得系列重要进展。DENV的E蛋白及其抗体的结构以及相互作用分子机制的解析,已逐步清晰定位中和抗体的作用靶位点,2015年报道的针对EDE的高效广谱人源中和抗体,给深入的DENV治疗性抗体研发提供了更为明晰的思路。有关抗PrM单抗激发ADE效应的系列研究以及后续需要重点关注的ADE靶向表位的相关研究,相信会进一步推进DENV治疗性抗体的深入研发,而目前DENV治疗性抗体展现的包含ADE在内的多重复杂的分子交互作用机制,以及与人体细胞免疫等出现的协同作用,仍需要深入研究。

参考文献

- [1] Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence - based consensus [J]. Plos Negl Trop Dis, 2012, 6(8):e1760.
- [2] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue[J]. Nature, 2013, 496(7446):504-507.
- [3] 张复春. 登革热的诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014.
- [4] Klein DE, Choi JL, Harrison SC. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate[J]. J Virol, 2013, 87(4):2287-2293.
- [5] Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion[J]. J Gen Virol, 2006, 87(10):2755-2766.
- [6] Kyung MC, Nybakken GE, Diamond MS, et al. Antibodies against west nile virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc receptor-dependent and -independent mechanisms[J]. J Virol, 2006, 80(3):1340-1351.
- [7] Alcon S, Talarmin A, Flamand M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2):376-381.
- [8] Imrie A, Meeks J, Effler P, et al. Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection[J]. Viral Immunol, 2007, 20(4):672-675.
- [9] Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses [J]. Adv Virus Res, 2003, 60: 421-467.
- [10] Clark M. Antibody humanization: a case of the 'emperor's new clothes'?[J]. Immunol Today, 2000, 21(8):397-402.
- [11] Shanaka WW, Rodrigo I, Alcena DC, et al. An automated dengue virus microneutralization plaque assay performed in human Fc γ receptor - expressing CV - 1 cells[J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 80(1):61-65.
- [12] Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1[J]. Plos Pathog, 2010, 6(4):e1000823.
- [13] Alvarez M, Pavon-Oro A, Rodriguez-Roche R, et al. Neutralizing antibody response variation against dengue 3 strains[J]. J Med Virol, 2008, 80(10):1783-1789.

- [14] Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29:587-619.
- [15] Masrinoul P, Omokoko MD, Pambudi S, et al. Serotype-specific anti-Dengue virus NS1 mouse antibodies cross-react with prM and are potentially involved in virus production [J]. *Viral Immunol*, 2013, 26(4):250-258.
- [16] Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1 [J]. *Plos Pathog*, 2010, 6(4):e1000823.
- [17] Cockburn JJ, Navarro SME, Fretes N, et al. Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody [J]. *Structure*, 2012, 20(2):303-314.
- [18] Midgley CM, Flanagan A, Tran HB, et al. Structural analysis of a dengue cross-reactive antibody complexed with envelope domain III reveals the molecular basis of cross-reactivity [J]. *J Immunol*, 2012, 188(10):4971-4979.
- [19] Lok SM, Kostyuchenko V, Nybakken GE, et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(3):312-317.
- [20] Austin SK, Dowd KA, Shrestha B, et al. Structural basis of differential neutralization of DENV-1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope [J]. *Plos Pathog*, 2012, 8(10):e1002930.
- [21] Batra G, Raut R, Dahiya S, et al. *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies [J]. *J Virol Methods*, 2010, 167(1):10-16.
- [22] Arora U, Tyagi P, Swaminathan S, et al. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice [J]. *Vaccine*, 2013, 31(6):873-878.
- [23] Zou G, Kukkaro P, Lok SM, et al. Resistance analysis of an antibody that selectively inhibits dengue virus serotype-1 [J]. *Antiviral Res*, 2012, 95(3):216-223.
- [24] Saokaew N, Pongpair O, Panya A, et al. Human monoclonal single-chain antibodies specific to dengue virus envelope protein [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 58(3):270-277.
- [25] Fibriansah G, Tan JL, Smith SA, et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(3):358-371.
- [26] León-Juárez M, García-Cordero J, Santos-Argumedo L, et al. Generation and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the envelope protein from the four dengue virus serotypes [J]. *Apmis*, 2013, 121(9):848-858.
- [27] Li PC, Liao MY, Cheng PC, et al. Development of a humanized antibody with high therapeutic potential against dengue virus type 2 [J]. *Plos Negl Trop Dis*, 2012, 6(5):e1636.
- [28] Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, et al. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection [J]. *Antiviral Res*, 2013, 98(3):423-431.
- [29] Tian YP, Chen W, Yang Y, et al. Identification of B cell epitopes of dengue virus 2 NS3 protein by monoclonal antibody [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(4):1553-1560.
- [30] Crill WD, Chang GJ. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes [J]. *J Virol*, 2004, 78(24):13975-13986.
- [31] Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Engle M, et al. Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2 [J]. *J Virol*, 2010, 84(18):9227-9239.
- [32] Gromowski GD, Barrett ADT. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus [J]. *Virology*, 2007, 366(2):349-360.
- [33] Gromowski GD, Barrett ND, Barrett ADT. Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus [J]. *J Virol*, 2008, 82(17):8828-8837.
- [34] Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, et al. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes [J]. *J Virol*, 2007, 81(23):12816-12826.
- [35] Erb SM, Butrapet S, Moss KJ, et al. Domain-III FG loop of the dengue virus type 2 envelope protein is important for infection of mammalian cells and *Aedes aegypti* mosquitoes [J]. *Virology*, 2010, 406(2):328-335.
- [36] Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, et al. A

- new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(2):170-177.
- [37] 易海粟, 温坤, 朱伟, 等. 登革病毒包膜EDⅢ蛋白广谱中和抗体识别表位鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(7):612-617.
- [38] 姬广辉. 无感染增强的广谱抗登革病毒中和抗体的构建及机制研究[D]. 上海:第二军医大学, 2011.
- [39] Rajamanonmani R, Nkenfou C, Clancy P, et al. On a mouse monoclonal antibody that neutralizes all four dengue virus serotypes[J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(4):799-809.
- [40] Fibriansah G, Tan JL, Smith SA, et al. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins [J]. *Nat Commun.*, 2015, 6:6341.
- [41] Smith SA, de Alwis AR, Kose N, et al. The potent and broadly neutralizing human dengue virus-specific monoclonal antibody 1C19 reveals a unique cross-reactive epitope on the bc loop of domain II of the envelope protein[J]. *MBio*, 2013, 4(6):e00873-13.
- [42] de Alwis R, Smith SA, Olivarez NP, et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(19):7439-7444.
- [43] Dowd KA, Pierson TC. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view[J]. *Virology*, 2011, 411(2):306-315.
- [44] Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, et al. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody[J]. *J Virol*, 2007, 81(23):12766-12774.
- [45] Khanam S, Khanna N, Swaminathan S. Induction of neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors[J]. *Vaccine*, 2006, 24(42):6513-6525.
- [46] Lai CY, Tsai WY, Lin SR, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II [J]. *J Virol*, 2008, 82(13):6631-6643.
- [47] 李孝权. 登革病毒包膜E蛋白Ⅲ区抗体中和表位与功能研究[D]. 广州:南方医科大学, 2013.
- [48] Li XQ, Qiu LW, Chen Y, et al. Dengue virus envelope domain III immunization elicits predominantly cross-reactive, poorly neutralizing antibodies localized to the AB loop: implications for dengue vaccine design [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(10):2191-2201.
- [49] Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, et al. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(3):271-283.
- [50] Smith SA, de Alwis AR, Kose N, et al. Isolation of dengue virus-specific memory B cells with live virus antigen from human subjects following natural infection reveals the presence of diverse novel functional groups of antibody clones[J]. *J Virol*, 2014, 88(21):12233-12241.
- [51] Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsisakul N, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans [J]. *Science*, 2010, 328(5979):745-748.
- [52] Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(2):365-375.
- [53] Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen?[J]. *Plos Pathog*, 2010, 6(1):e1000718.

《医疗器械生产监督管理办法》解读

刁春芳 黄海琪 高旭年*

2014年6月1日,新修订的《医疗器械监督管理条例》(以下简称《条例》)(国务院令第650号)正式实施。2014年7月30日,国家食品药品监督管理总局发布新修订的《医疗器械生产监督管理办法》(以下简称《办法》),并于2014年10月1日实施。《办法》在2004年发布的《医疗器械生产监督管理办法》基础上遵循新修订《条例》中的“风险管理、落实责任、强化监管、违法严处”4项原则,借鉴国外的先进监管经验,结合我国现阶段的医疗器械市场发展及监管情况进行了修订。

新修订后的《办法》共有7章内容,明确生产许可的监管模式,规范委托生产产品的管理,细化医疗器械生产的监管,落实企业主体责任。本文将就《办法》中的主要章节内容进行解读。

1 生产许可与备案

《办法》第八条明确了先注册、后生产许可的监管模式。这种监管模式的改变一是为了鼓励国内企业创新;二是规范常规医疗器械生产。在我国,二、三类医疗器械产品要投入销售、使用,须先按照《医疗器械注册管理办法》或《体外诊断试剂注册管理办法》的相关规定向食药监部门申请产品注册,取得医疗器械注册批件后,方能申请医疗器械生产许可。而二、三类医疗器械产品注册申请时,须经过注册检验、临床评价、注册审评、注册体系核查等环节,并且每一环节均要做到符合相关法规或管理规范的要求。诚然,这对一些生产常规产品的医疗器械企业申请生产许可时提高了准入门槛。

医疗器械生产许可证有效期为5年。新申请或提交变更申请并符合规范要求的医疗器械生产许可企业,药监部门将批复《医疗器械生产许可

证》,并附医疗器械生产产品登记表,该表将载明生产产品的名称、注册号等信息。

此外,第一类医疗器械实行生产备案管理。生产备案凭证不设有效期,无须延续备案。

2 委托生产

2.1 委托双方资质要求

在产能不足的情况下,生产企业可以通过委托生产的方式来扩大产能。委托生产的产品可分为常规医疗器械产品和创新医疗器械产品。如是常规医疗器械产品办理委托生产,委托企业应拥有医疗器械产品生产许可或备案凭证,将产品委托给同样具有医疗器械生产许可或备案凭证的企业进行生产。委托双方通过合同来明确双方的权利、义务和责任,并由委托方向药监部门提交备案。如是按照创新医疗器械特别审批程序审批的产品,除了可以委托注册检测和临床试验用样品的生产,在取得产品注册证后,视企业发展需要仍可选择不办理生产许可,办理委托生产。

2.2 委托生产的限制

委托生产的时间应包含在委托生产产品的医疗器械注册证有效期内。除了绝对控股的企业,生产企业办理委托生产时,在同一个时期内同一种医疗器械产品的受托方只能选择一家。

高风险的植入性医疗器械则不得办理委托生产,这在《办法》第三十七条有作相应规定。由于植入性医疗器械大多数为针对人体内的医疗器械,为了产品的质量风险控制和管理,降低在临床使用时出现的可疑不良反应,保障产品的安全性和有效性,国家食品药品监督管理总局发布了《禁止委托生产医疗器械目录》的通告(2014年第18

基金项目:“863”计划重点项目(2011AA02A101);广州市科技计划(2014Y2-00220)

作者单位:中山大学达安基因股份有限公司产品注册与知识产权部,广东,广州 510065

*通讯作者:高旭年, E-mail:gaoxunian@126.com

号)。高风险医疗器械生产企业应参照执行。

3 落实主体责任

为进一步落实质量主体责任,细化生产质量管理的各项措施,生产质量管理在《办法》中作为单独一章表述。《办法》要求医疗器械生产企业必须按照规范建立医疗器械质量管理体系责任,确立了《医疗器械生产质量管理规范》的法律地位。

医疗器械生产企业应建立健全的、与所生产的产品相适应的质量管理体系,包括产品设计开发、生产过程、原材料采购、质量检测等,保持体系有效运行并实行定期自查和报告制度。

而监管部门依照医疗器械风险管理原则,对一、二、三类医疗器械生产企业进行分级管理,综合利用监督抽检、飞行检查、企业责任约谈、监管档案、信用记录等,对生产企业实施监管。在监管过程中,如企业没有保持有效运行质量体系,比如出现产品不符合产品技术要求或国家强制性标准,对出厂的产品未进行检验或未附合格证明文件、未按规定办理《医疗器械生产许可证》变更、未按规定办理委托生产备案手续、停产一年以上擅

自恢复生产等违法行为,企业将承担法律责任并按《条例》规定接受处罚。

健全的管理制度,严格的监管手段,严厉的处罚规定将使医疗器械生产企业强化自我监督,提高质量意识,提升质量管理水平,督促着生产企业要坚持按照质量管理体系文件的要求进行生产,以防在监管部门的检查中发现问题,面临整改或被列入“黑名单”。

4 总结

《办法》的新修订无疑对医疗器械生产企业的生产、质量管理及申报等环节的规范提出了更高的要求,医疗器械生产企业应自觉、主动建立质量管理体系,并积极按照医疗器械生产质量管理规范及相关要求进行对照整改,不断完善企业质量管理体系,进而提升质量管理保障能力。同时,按照《办法》规定办理《医疗器械生产许可证》或变更、办理委托生产备案,向监管部门提供真实资料,生产出符合国家标准以及经注册或备案的技术要求的医疗器械。只有这样,医疗器械生产企业才能做大、做强,走得更远。

(上接第 245 页)

- [5] 叶智良, 赵新, 蔡毅瑜, 等. MCV、RDW 和 RBC 渗透脆性试验联合检测在珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(2): 242-243.
- [6] Rachna K, Tejinder S, Nita K, et al. HPLC in Characterization of hemoglobin profile in thalassemia syndromes and hemoglobinopathies: a clinicohematological correlation [J]. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion, 2015, 31(1): 110-115.
- [7] 黄金芬. 地中海贫血的产前诊断研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(12): 123-125.
- [8] Yin AH, Li B, Luo MY, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong province, China [J]. Plos One, 2014, 9(2): e89855.
- [9] Lin M, Wen YF, et al. Hemoglobinopathy: molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka people in the Meizhou region, southern China [J]. Plos One, 2013, 8(2): e55024.
- [10] 李华, 何旭霞. 广州市黄埔区 5306 对夫妇孕期地中海贫血的筛查与诊断分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2016, 17(1): 37-39.
- [11] 刘贵建, 孙士鹏. 地中海贫血的实验诊断: 项目和方法的选择及临床应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 385-389.
- [12] Bernard G, Forget H, Franklin B. Classification of the disorders of hemoglobin [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013, 3(2): a011684.
- [13] Rachna K, Tejinder S, Nita K, et al. HPLC in characterization of hemoglobin profile in thalassemia syndromes and hemoglobinopathies: a clinicohematological correlation [J]. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion, 2015, 31(1): 110-115.
- [14] 陈兴, 肖奇志, 于雯, 等. 应用探针熔解曲线分析技术快速检测非缺失型 α -地中海贫血[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(14): 2009-2012.
- [15] 郑琳, 黄海龙, 范向群, 等. 血细胞和血红蛋白分析在地中海贫血中的应用价值[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(3): 547-549.

北京大学医学部鲁凤民教授实验室

北京大学医学部鲁凤民教授实验室位于北京市海淀区学院路38号，以北京大学基础医学院病原生物学系P2实验室为主体，由鲁凤民教授2006年回国后组建，是“丙型肝炎和肝病免疫治疗北京市重点实验室的成员单位”。现有技术人员7名，高级职称3名、中级职称4名，获博士以上学历者4名。实验室设有病原体检测、分子克隆、各种分子杂交、蛋白表达及纯化、细胞培养及动物实验等分子及细胞生物学实验平台。实验室拥有BD流式细胞仪、罗氏全自动DNA定量检测系统（Cobas TaqMan）、ABI实时荧光定量PCR扩增仪、Bioteck细胞成像微孔板检测仪、Odyssey红外激光成像系统、QIAGEN全自动电泳仪、PerkinElmer多模式微孔板检测仪、Leica倒置荧光显微镜、QIAGEN全自动样本制备工作站、Qiagen样品破碎系统、超速及高速低温离心机等分子生物实验设备，并在长期研究中积累了大量的病例资源。

该实验室长期从事肝炎病毒的病原学、分子生物学、流行病学、诊断及乙肝病毒相关肝癌的发病机理等研究。近几年在病毒性肝炎领域取得了多项科研成果，承担和参加了多项国家“863”计划、“973”计划、自然科学基金课题以及多项国际合作课题。目前主持国家“十二五”科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目”课题1项，承担子课题5项。研究成果曾获国家科技进步二等奖2项、中华医学科技三等奖1项。在包括“N Eng J Med”、“J Hepatol.”、“Cancer Res”、“Oncogene”等主流杂志发表SCI研究论文及通讯100余篇。

学科带头人鲁凤民教授长期从事慢性病毒性肝炎及肝癌的致病机制和转化医学研究，为中国微生物学会病毒学工作委员会常委、北京市微生物学会常委、北京医学会病毒学分会常委和国家病原微生物卫生应急实验室网络专家委员会委员。



→ 公司简介

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



→ 公司优势

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

→ 多元化产品系列



→ 企业使命

达生命之源,安健康之本

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



公司总部

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

营销中心

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