



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

# 分子诊断与治疗杂志

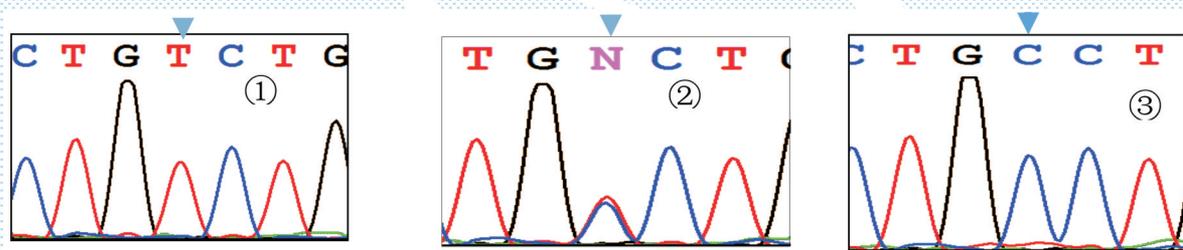
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2016年5月 第8卷 第3期 总第43期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 8 Number 3 May 2016



①、②、③分别代表TT、CT、CC基因型,箭头所示位置为基因突变位点

图(P162) miR-196a2 T>C(rs11614913)测序图

Figure(P162) Sequencing map of miR-196a2 gene rs11614913 T>C polymorphism

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

二〇一六年五月

第八卷 第三期

中山大学



## 黄彬

黄彬,《分子诊断与治疗杂志》第四届编辑委员会委员,审稿专家。

1971年5月出生。1997年毕业于重庆医科大学医学检验系,获医学硕士学位。2008年在中山大学获医学博士学位。1997年至今在中山

大学附属第一医院检验医学部工作。2012年10月~2013年9月在美国纪念斯隆-凯特琳癌症中心(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)从事博士后研究。

主任技师,硕士生导师。现任中山大学附属第一医院检验医学部副主任,分子诊断室负责人,中山大学医学检验系《分子诊断学》课程负责人。美国微生物学会会员、广东省中西医结合学会检验医学专业委员会副主任委员、广东省预防医学会微生物学与免疫学会常委、广东省健康管理学会检验医学专业委员会常委、广东省医学会检验医学分会青年委员、广东省医学会检验医学分会分子生物学组成员、广东省住院医师规范化培训基地评审专家、广东省临床检验质量控制中心专家库专家、广东省妇幼保健协会产前诊断技术专家库专家、卫生部人才中心全国卫生人才评价专家、国家自然科学基金同行评议专家、《中山大学学报·医学科学版》审稿专家、《检验医学教育》编委和《分子诊断与治疗杂志》编委等。

黄彬教授长期从事从事医学检验的临床、教学和科研工作,尤擅长分子诊断及临床微生物检验工作。筹建了检验医学部分子诊断室,搭建了较完整的分子诊断技术平台,包括核酸扩增技术、核酸杂交技术、基因芯片技术和高通量基因测序技术平台,申请并获得2个国家高通量基因测序试点项目(产前筛查与诊断、植入前筛查与诊断)。主要从事临床微生物分子流行病学调查和耐药机制研究,主持国家自然科学基金、广东省自然科学基金、广东省科技计划项目和教育部留学回国启动基金等多项科研课题,参与国家“十一五”科技重大专项课题、863计划、国家自然科学基金和广东省自然科学基金等多项课题的研究。在SCI收录期刊和核心期刊发表论文100余篇,其中SCI收录近20篇,作为主编、副主编编写全国医学检验专业规划教材各1部,主译专著1部,副主编专著1部,参编教材及专著10余部,获国家发明专利1项。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016年5月 第8卷 第3期 总第43期 Bimonthly Volume 8 Number 3 May 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 谭舜菁 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5月18日
定价	RMB 15.00元
<b>Responsible Institution</b>	<i>Sun Yat-sen University</i>
<b>Sponsor</b>	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
<b>Consultant</b>	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
<b>Editor in Chief</b>	<i>LI Ming</i>
<b>Managing Director</b>	<i>XU Weiwen</i>
<b>Editorial Office</b>	<i>&lt;JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY&gt; Editorial Office</i>
<b>Editors</b>	<i>LI Xiaolan TAN Shunjing LI Caizhen</i>
<b>Typesetting</b>	<i>ZHONG Huaan</i>
<b>Editing</b>	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
<b>Add</b>	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
<b>Tel</b>	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
<b>Fax</b>	<i>(020) 32290177</i>
<b>E-mail</b>	<i>jmdt@vip.163.com</i>
<b>CSSN</b>	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
<b>Printing</b>	<i>Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.</i>
<b>Publish Date</b>	<i>2016.5.18</i>
<b>Price</b>	<i>RMB 15.00</i>

# 分子诊断与治疗杂志

双月刊 2016年5月 第8卷 第3期

## 目次

### 述 评

EB病毒感染的核酸检测：标本类型的选择 ..... 郭建巍 (145)

### 论 著

- 一例 I 型神经纤维瘤病患者的 *NF1* 突变检测及家系分析  
..... 过丹丹 卢鑫鑫 黄肖利 等 (150)
- UCP2* 基因 rs660339 多态性与壮族儿童青少年单纯性肥胖的相关性分析  
..... 李伍高 李哲涛 黄际卫 等 (155)
- miR-196a2 基因多态性在广西人群中的分布 ..... 罗宏成 温旺荣 李珉珉 等 (160)
- 2014 年广州新塘地区手足口病病原体基因检测结果分析 ..... 杨勇 孙伟 李峥嵘 等 (165)
- B 族溶血性链球菌 (GBS) 感染对妊娠结局的影响 ..... 赵小娅 谢月英 周旭丽 等 (170)
- 促排卵药雷洛昔芬对小鼠着床窗期子宫内膜 COX-2 和 LPAR3 表达的影响  
..... 冼英杰 陈彩蓉 周秀琴 等 (174)
- NT-proBNP 在小儿病毒性心肌炎诊断和心功能评估中的应用 ..... 李舟文 (178)
- 心脏型脂肪酸结合蛋白和 D-二聚体及高敏肌钙蛋白 T 在急性冠状动脉综合征  
早期诊断中的应用 ..... 皮红泉 李德华 卢盛祥 等 (182)
- Treg 细胞和 IL-12 在肺结核合并老年慢性支气管炎患者外周血中的表达及意义  
..... 肖天津 张乐平 古中东 等 (188)
- 某国产 NAT 试剂盒应用于血液筛查的评价与应用 ..... 陈志忠 李结敏 廖扬勋 等 (192)

### 综 述

- 胞外信号调节激酶促进 DNA 损伤反应的作用机制  
..... 魏凤香 张蕾 王绍娟 (196)
- Gilbert 综合征及 Crigler-Najjar 综合征诊断方法 ..... 刘雪梅 骆子义 (201)
- 强直性脊柱炎及其相关基因 *HLA-B27* 检测的研究现状 ..... 白世杰 托娅 张保平 等 (206)

### 讲 座

浅谈医疗器械临床试验过程的质量控制和监查要点 ..... 林凯容 雷孝锋 陈琼 等 (212)

### 专家风采

黄彬 ..... (封二)

### 实验室巡礼

中山大学附属第一医院检验医学部 ..... (封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 3 May 2016

---

## CONTENTS

### COMMENTS

What kind of specimen is used for Epstein-Barr virus nucleic acid detection

*GUO Jianwei* ..... (145)

### ORIGINAL ARTICLES

*NF1* mutation detection and pedigree analysis in a patient with neurofibromatosis type 1

*GUO Dandan, LU Xinxin, HUANG Xiaoli, CHEN Xijun, ZHANG Biao, ZHENG Jiaying, WU Yanan* ..... (150)

Association of *UCP2* gene rs660339 single nucleotide polymorphism with simple obesity in Chinese

Zhuang children adolescents

*LI Wugao, LI Zhetao, HUANG Jiwei, YAN Tizhen, LI Jingwen, XU Zehui, TANG Ning* ..... (155)

Distribution of genetic polymorphism of miR-196a2 gene in Guangxi population

*LUO Hongcheng, WEN Wangrong, LI Minmin, WEI Ying, TAN Tan, WEI Yesheng* ..... (160)

Analysis on the gene detection results of hand-foot and mouth disease in the Guangzhou Xingtang area in 2014

*YANG Yong, SUN Wei, LI Zhengrong, WANG Dan* ..... (165)

Influence of group B streptococcus (GBS) infection on pregnancy outcome

*ZHAO Xiaoya, XIE Yueying, ZHOU Xuli, XIE Gang, WEN Jia, HONG Wei* ..... (170)

Effects of ovulation induction by raloxifene treatment on the expression of COX-2 and LPAR3 in

mouse uterine endometrium during periimplantation period

*XIAN Yingjie, CHEN Cairong, ZHOU Xiuqin, YAN Qiuxia, LIANG Xiaoqing, ZHAO Xiaoying* ..... (174)

Application of precursor of B-type natriuretic peptide for the diagnosis of viral myocarditis and

assessment of heart function in children

*LI Zhouwen* ..... (178)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 3 May 2016

---

## CONTENTS

Human heart-type fatty acid-binding protein, D-dimer and High-sensitive cardiac troponin T in the early diagnosis of acute coronary syndrome

*PI Hongquan, LI Dehua, LU Shengxiang, WANG Weihao, DENG Lehua* ..... (182)

Expression of regulatory T cells and interleukin-12 in aged patients with active pulmonary tuberculosis complicated with chronic bronchitis

*XIAO Tianjin, ZHANG Leping, GU Zhongdong, HUANG Yanping* ..... (188)

Evaluation and application of a domestic NAT kit used for blood screening

*CHEN Zhizhong, LI Jiemin, LIAO Yangxun, LIANG Jianfeng, YU Wenchao, TANG Xiaoying,*

*LIANG Liting, HUANG Juming, LU Qianwen, CHEN Shangliang* ..... (192)

## REVIEWS

The mechanism of ERK1/2 kinases facilitate DNA damage response

*WEI Fengxiang, ZHANG Lei, WANG Shaojuan* ..... (196)

Diagnostic methods in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes

*LIUXuemei, LUOZiyi* ..... (201)

Research status of ankylosing spondylitis and the detection of its related gene *HLA-B27*

*BAI Shijie, TUO Ya, ZHANG Baoping, WANG Lijuan, WANG Yafei* ..... (206)

## EB病毒感染的核酸检测:标本类型的选择

郭建巍\*

**[摘要]** 近年来的研究表明,EB病毒(epstein-barr virus, EBV)感染与多种疾病的发生有密切的关系。由于EB病毒独特的感染方式,其实实验室诊断特别是核酸检测显得尤为重要。本文就EB病毒的生物学特性、感染方式、抗体产生,特别是核酸检测中标本类型的选择、标准化以及未来的检测方向等问题进行了述评和展望,以期对EB病毒感染相关疾病的诊断和预后评判提供更准确的核酸检测结果。

**[关键词]** EB病毒;标本;血浆;外周血单个核细胞

What kind of specimen is used for epstein-barr virus nucleic acid detection

GUO Jianwei\*

(Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing, China, 100048)

**[ABSTRACT]** In recent years, many researchers have demonstrated that epstein-barr virus (EBV) infections are associated with a broad spectrum of diseases. Due to the unique mode of infection by EBV, nucleic acid detection appears to be particularly important. In this review article, the biological characteristics, infection modes, and production of antibodies of epstein-barr virus will be discussed, as well as the suitable type of specimens, standardization and future development direction of nucleic acid detection methods in an effort to supply more accurate results for diagnosis and prognostic evaluation of EBV-associated diseases.

**[KEY WORDS]** Epstein-barr virus; Specimen; Plasma; Peripheral blood mononuclear cells

EB病毒(epstein-barr virus, EBV)即人类疱疹病毒Ⅳ型(human herpesvirus type 4),是一种常见的人类疱疹病毒。EBV初次感染后就终生定居在B细胞中。据文献报道,约90%以上的成人EB病毒血清学反应阳性,提示在儿童或青少年时感染过EB病毒<sup>[1]</sup>。

近年来大量研究证明,EBV与人群鼻咽癌、何杰金病、T/NK细胞淋巴瘤(T/Natural killer cell lymphoma)、Burkitt淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、乳腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤发生、发展相关,还与免疫抑制剂使用患者和多种免疫缺陷性疾病患者移植后淋巴细胞增殖性异常(post-transplant lymphoproliferative disorders, PTLTD)、移植后平滑肌肿瘤、获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)相关性淋巴瘤、多发性

硬化、原发性中枢神经系统淋巴瘤或平滑肌肉瘤密切相关<sup>[2-7]</sup>。由于EBV广泛的疾病谱,EBV已成为许多学者研究和关注的焦点。

在EBV感染的临床诊断中,临床医生必须要弄清楚几个问题:患者是否感染EBV? EBV感染处于什么时相? 是否为EBV的活动性感染? 所患疾病是否与EBV感染相关? 只有弄清楚了这几个问题,才能对EBV相关疾病的诊疗有一个全面而整体的认识,才好有的放矢、对症治疗。而要回答这些问题,就必须要了解EBV的生物学特性及其特殊的感染形式。本文就EBV生物学特性及感染方式、EBV感染类型及免疫相关指标、感染后的实验诊断指标、核酸检测标本类型的选择、标准化等问题进行讨论,以期对EBV感染相关疾病的诊断和预后评判提供科学依据(表1)<sup>[8]</sup>。

作者单位:海军总医院检验科,北京 100048

\*通讯作者:郭建巍, E-mail: jwkuo@sohu.com

表1 EBV相关性疾病核酸检测建议使用的标本类型<sup>[8]</sup>

Table 1 Suitable type of specimens preferred in nucleic acid detections in different epstein-barr virus-associated diseases<sup>[8]</sup>

	全血	血浆/ 血清	外周血单个 核细胞	脑脊液	临床应用
<b>感染性疾病</b>					
传染性单核细胞增多症	--	++	--		原发性感染、病毒的复活、辅助诊断及与疾病严重程度密切相关的判断
EB病毒相关的嗜血细胞综合征		++			诊断及疗效评估
慢性活动性EB病毒感染		++	++		PBMC用于诊断;疾病的严重程度及预后评估
<b>免疫性疾病</b>					
鼻咽癌		++			治疗反应性、预后及生存评估;肿瘤复发评估
鼻腔T/NK细胞淋巴瘤		++	--		疾病状态及预后评估;监测反应及复发
何杰金淋巴瘤		++			治疗反应性及预后评估
非B细胞何杰金淋巴瘤	+	+	+		诊断、预后评估及随访
<b>免疫缺陷性疾病</b>					
移植受者及移植后淋巴细胞增生性疾病	++	+/-	+		指导免疫抑制治疗;预测及指示PTLD;评估PTLD对治疗的反应性;检测EBV的复活;预防移植抗宿主病;预防移植排斥
AIDS相关性淋巴瘤		+/-	+/-		EBV载量检测的作用不清;治疗反应性及预后评估;系统性B细胞淋巴瘤进展评估
AIDS相关性原发性中枢神经系统淋巴瘤		--	--	++	诊断
X-连锁淋巴细胞增生性疾病	++	++			检测EBV原发性感染;嗜血淋巴组织细胞增生症和PTLD至少每6个月进行一次检测

+:文献支持使用此标本; ++:推荐使用此标本; +/-:报道不一; --:未见文献报道

## 1 EBV生物学特性及感染方式

EBV是线性双链嗜B细胞DNA病毒,基因组长172 kb,包括编码衣壳抗原(viral capsid antigen, VCA)、早期抗原(early antigen, EA)和核抗原(nuclear antigen, NA)的基因。EBV基因组大部分是相同的,在编码EBV核抗原(EBV nuclear antigen, EBNA)2, EBNA 3A, EBNA 3B及EBNA 3C的基因亚型中存在一些等位基因多态性的亚型, I型在西方国家和东南亚居多,非洲地区I型和II型同时存在。

人是EBV感染的惟一宿主,由于B细胞表面有EBV受体分化群抗原21(cluster of differentiation antigen, CD21)分子,EBV能直接感染侵入B细胞并使其永生化,或以郎罕氏细胞介导的方式感染口咽部上皮细胞,入血后再感染B淋巴细胞。由于绝大多数上皮细胞缺少CD21分子,EBV侵入上皮细胞的机制要比侵入B细胞复杂。一般认为EBV原发性感染发生在口腔,口咽部上皮细胞和B细胞为EBV主要宿主细胞,EBV也可感染T细胞、NK细胞、平滑肌细胞和滤泡树突状细胞等。根据EBV感染时间和EBV感染后产生的特

异性抗体谱,可将EBV的感染分为原发感染、潜伏和激活3种类型。

EBV通过病毒包膜糖蛋白gp350与B细胞表面CD21分子结合,接着EBV gp42与B细胞上人白细胞抗原II类分子(human leucocyte antigen II, HLA-II)结合而促进膜融合,EBV进入B细胞并扩增,表达病毒特异性抗原分子,诱导机体免疫应答,活化NK细胞,诱导产生EBV特异性细胞毒T细胞(EBV-specific cytotoxic T lymphocytes, CTL),抑制并最终清除EBV阳性B细胞。EBV原发感染消退快,仅于部分记忆性B细胞内建立持续甚至终身性潜伏,因此传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)<sup>[9]</sup>一般呈良性自限性,IM发病过程是机体免疫控制EBV的结果。急性感染痊愈后的个体内有百万分之一的B细胞会携带有EBV基因组,这也是EBV感染的一个重要特性。

## 2 EBV感染类型及免疫相关指标

EBV原发感染后,体内首先出现EBV衣壳抗原特异性IgM抗体(viral capsid antigen IgM antibody, VCA-IgM),随后出现EBV衣壳抗原特异性IgG抗体(viral capsid antigen IgG antibody, VCA-IgG),急性感染的晚期出现抗早期抗原(early antigen, EA)抗体,而EBNA IgG抗体阴性。

在潜伏期,多数细胞中的EBV基因组处于潜伏状态,此时细胞只合成EBNA、EB病毒编码的小RNA(EBV encoded small RNA, EBER)和潜伏膜蛋白(latent membrane protein, LMP),包括EBNA 1-2, EBNA 3A-3C, EBER1, EBER2, LMP1及LMP2A。处于潜伏期的EBV并不复制,绝大多数存在于记忆性B细胞上,被感染的记忆性B细胞进入外周血循环时血中可检测到病毒。目前认为有5种EBV感染类型,即溶解型、0型、I型、II型和III型。不同的感染类型与不同的临床疾病密切相关。在溶解型中,被感染的细胞为淋巴组织中的浆细胞,浆细胞被感染后,EBV在浆细胞中复制,表达溶解基因,导致EBV复活,最后导致细胞的溶解;0型指EBV感染处于潜伏状态,被感染的细胞为外周血记忆细胞,处于0型感染的EBV在患者体内终生存在,此型感染属于EBV健康携带者;在I型潜伏感染中,被感染的细胞为外周血记忆细胞,主要见于Burkitt淋巴瘤细胞,EBNA只表

达EBNA1基因;在II型潜伏感染中,被感染的细胞为淋巴组织中的生发中心细胞,II型潜伏感染与鼻咽癌、NK细胞淋巴瘤和何杰金病有关,此时病毒处于沉默期,被感染细胞中出现EBNA1及LMP1/2A等病毒产物;在III型潜伏感染中,被感染细胞为淋巴组织中的幼稚细胞,表达EBNA1, EBNA2, EBNA3A-C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A+B等基因,活化B细胞,在急性传染性单核细胞增多或移植后淋巴组织增生性异常患者中可观察到III型潜伏感染。

EBV原发感染4~6个月后体内检测到的抗体主要为IgG型抗体,代表性抗体为VCA-IgG和EBNA-IgG<sup>[10]</sup>,EBV既往感染表明曾经发生EBV感染,但目前无活动性EBV感染的临床表现和实验室证据。免疫功能正常,EBNA-IgG抗体阳性者如EA抗体滴度显著高,一般表明存在EBV感染激活或再燃。EBV原发感染后,部分感染者特异性EA抗体可能持续数年而并无临床症状,因此,是否存在活动性EBV感染相关临床表现也是诊断EBV感染激活的重要依据。此时如果动态检测血液中的EBV核酸将对疾病的诊断及转归判断提供重要依据。

## 3 EBV感染后的实验诊断指标

可以说机体的免疫功能状况是决定EBV潜伏感染状态和EBV相关疾病发生乃至发展的重要因素。被感染的B细胞偶尔会受到刺激而重新激活,激活的病毒可再感染新的B细胞和上皮细胞,使处于潜伏状态下的EBV再次激活并大量复制,导致IM症状持续存在或退而复现称为慢性活动性EBV感染(chronic active EBV infection, CAEBV)。EBV感染T/NK细胞并造成其克隆性增生且不能产生足够的CTL可能是其发病的主要原因。目前对病毒再激活的分子机制目前仍无清晰的认识。深入了解每种基因产物在EBV相关疾病发病中作用会帮助临床医生制定出更多合理、有效的预防及治疗策略。

目前常用的用于EBV感染的实验室指标有嗜异性抗体检测、血液细胞分析即血常规、异型淋巴细胞分型、EBV特异性抗体检测及分型、EB病毒核酸定量和EBER原位杂交。EBER已成为组织和细胞中EBV检测的金标准,并广泛应用于临床病理学诊断。荧光定量PCR(fluorescent quantita-

tive polymerase chain reaction, FQ-PCR)可用于定量检测体液及组织样本中的EBV拷贝数,特别适用于移植病人EBV相关疾病的感染监测;通过检测脑脊液中的EBV核酸可诊断中枢神经系统是否有EBV感染;对非典型临床症状患者或嗜异凝集试验阴性的IM幼儿通过EBV核酸定量可做出实验室诊断;通过EBV核酸定量可评价抗EBV治疗的疗效;检测血浆中EBV核酸水平对鼻咽癌的诊断、转移、复发和预后判断均有重要意义<sup>[10]</sup>。

#### 4 EBV核酸检测标本类型的选择

关于血液中EBV检测标本类型的选择有许多争议,其焦点来源于EBV在血浆中拷贝数比在全血样本中的拷贝数低10~100倍,因此多数人还是倾向于全血。近年来,荧光定量PCR已广泛应用于EBV感染的实验室诊断<sup>[11]</sup>,也是EBV核酸定量的金标准,目前至少有10种不同的荧光定量PCR商用试剂在中国、美国和欧洲等国家和地区使用<sup>[12]</sup>,除在鼻咽癌的诊断中EBV DNA有一定的缺陷外,在其他感染性疾病的诊断中均发挥了重要的作用。

一般来说,外周血中的EBV DNA可以溶解的线型或游离循环DNA形式出现,线型的DNA在EBV重新活化、伴随着宿主细胞溶解和产生病毒体时均可在血液中检测到,游离的DNA在潜伏感染的B细胞中也可检测到。此外,凋亡的肿瘤细胞释放的裸露的无细胞EBV DNA也可在外周血中检测到。在EBV重新激活时释放病毒,此时要检测血清或血浆,因为其包含与细胞无关的DNA,如果要检测全血中与细胞相关DNA的话要选择外周血单个核细胞或B细胞作为首选标本。

关于在荧光定量PCR检测中如何选择合适的标本,表1根据不同疾病列出了EBV核酸定量中可供临床选择的适宜标本类型<sup>[8]</sup>。表中对各类疾病中最合适的标本类型进行了推荐,但由于EBV的特殊性,在EBV相关疾病的检测中标本选择目前仍不能做到唯一和绝对。通常情况下,外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中的EBV载量检测更加精确,因为它是B细胞的在血液中停留的重要地方。对移植患者,检测全血中EBV的核酸定量与PBMC中核酸定量同样有效,这样就可以避免了核酸定量检测中由于提取PBMC产生的花费与更长等待时间。也许

这个模式也可用于其它EBV相关疾病的核酸检测中,如鼻咽癌、T/NK细胞淋巴瘤、何杰金病、B细胞非何杰金淋巴瘤(B cell non-hodgkin lymphomas, B-NHL),因为这些疾病中病毒并不能从凋亡的肿瘤细胞中释放出来,而这些疾病目前还推荐用血浆进行EBV核酸的定量检测。对移植相关疾病,EBV的核酸定量显得非常必要,为提高检测的敏感性和特异性,对PTLD病人还要结合EBV特异性细胞免疫来进行综合判断<sup>[13-15]</sup>,这对区别PTLD复发和区分EBV感染后的慢性高病毒载量(chronic high viral loads, CHVL)具有重要意义。目前的临床实践中我们更倾向于使用PBMC和血浆中的EBV核酸定量结果来指导临床诊疗<sup>[16]</sup>,从这2种类型标本的检测结果还可以推算出全血中的EBV浓度,因此具有更高的实用价值。

#### 5 EBV核酸检测的标准化

在荧光定量PCR检测EBV核酸定量中,还有一个亟待解决的重要问题就是定量的标准化。目前评估病毒载量的单位有全血和血浆中copies/mL、DNA中copies/ $\mu$ g和copies/每个细胞,国内大多数实验室用全血和血浆中IU/mL、copies/mL来表示。如果统一使用国际单位及标准,就可使实验室内部的比较更加有效,疾病的诊断、预后判断及预先治疗就有了统一的标准。虽然有许多学者在这方面做了大量工作,并成立了专门的国际组织,但由于不同的厂家使用的EBV靶序列区域不同、引物和探针不同,导致扩增的效率也不同;此外,不同EBV基因组中重复序列不同,不同EBV相关疾病中EBV表达方式也不同,因此EBV核酸定量的标准化仍有一定的难度<sup>[17]</sup>。为了保证精确的定量,有学者推荐在核酸定量中设计引物和探针时,要使用EBV中的单个高度保守区域,不建议使用BamHI-W区域,如EBNA1和BALF-5基因的BamHI-K区域<sup>[18]</sup>。从2015年开始卫生部临床检验中心增加了巨细胞病毒核酸检测的室间质评工作,明确以IU/mL作为结果的表示方法。提示卫生部临床检验中心对国内临床实验室EBV核酸检测的质量控制及标准化监管指日可待。

#### 6 EBV核酸检测的展望

未来EBV的核酸定量中将会增加数字PCR技术<sup>[19]</sup>。数字PCR通过计数单个分子从而实现绝

对定量,它采用直接计数目标分子数而不依靠任何校准物及内标与外标,更容易实现检测中的质量控制和标准化。数字PCR在进行扩增反应前,将含有DNA模板的PCR溶液稀释后分布到独立反应室,在微流控芯片上单分子间通过稀释分离,独自进行PCR扩增,最后分析每个扩增产物。数字PCR操作方便、特异性强、灵敏度高、检测通量高,已成为分子生物学研究中的重要手段。与传统荧光定量PCR相比,除检测范围较窄的缺点外,数字PCR更加精确,可以检测更低拷贝数的目标DNA分子,同时还可以研究基因序列的变化,可为下一代测序定向克隆扩增出样本中的DNA分子,并实现病毒分子的绝对定量。在EBV的核酸检测中如果将数字PCR技术和荧光定量PCR技术配合使用,可以扬长避短,必将为EBV相关疾病的临床诊断提供更加准确和可靠的实验室结果。

#### 参考文献

- [1] Cohen JI. Epstein - Barr virus infection [J]. N Engl J Med, 2000, 343(7): 481-492.
- [2] Petersson F. Nasopharyngeal carcinoma: a review [J]. Semin Diagn Pathol, 2015, 32(1): 54-73.
- [3] Chen J N, He D, Tang F, et al. Epstein-barr virus associated gastric carcinoma: a newly defined entity [J]. J Clin Gastroenterol, 2012, 46(4): 262-271.
- [4] Zekri AR, Pahnassy AA, Mohamed WS, et al. Epstein-barr virus and breast cancer: epidemiological and molecular study on egyptian and iraqi women [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2012, 24(3): 123-131.
- [5] Pender MP, Khanna R. Epstein - barr virus - specific adoptive immunotherapy: a new horizon for multiple sclerosis treatment? [J], 2014, 6(6): 659- 661.
- [6] Tsao SW, Tsang CM, To KF, et al. The role of epstein-barr virus in epithelial malignancies [J]. J Pathol, 2015, 235(2): 323-333.
- [7] Suzuki R, Yamaguchi M, Izutsu K, et al. Prospective measurement of epstein-barr virus-DNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type [J]. Blood, 2011, 118(23): 6018-6022.
- [8] Ruf S, Wagner HJ. Determining EBV load: current best practice and future requirements [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2013, 9(2): 139-151.
- [9] Balfour HH, Dunmire SK, Hogquist KA. Infectious mononucleosis [J]. Clin Transl Immunology, 2015, 4(2): e33.
- [10] Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. Quantification of plasma epstein - barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. N Engl J Med, 2004, 350(24): 2461-2470.
- [11] Fan H, Robetorye RS. Epstein-barr virus (EBV) load determination using real - time quantitative polymerase chain reaction [J]. Methods Mol Biol, 2013, 999: 231-243.
- [12] Gulley ML, Tang W. Using Epstein-barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(2): 350-366.
- [13] D' Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, et al. The clinical value of concomitant epstein varr virus (EBV) - DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Transpl Immunol, 2011, 24(4): 224-232.
- [14] Worth A, Conyers R, Cohen J, et al. Pre - emptive rituximab based on viraemia and T cell reconstitution: a highly effective strategy for the prevention of epstein-barr virus-associated lymphoproliferative disease following stem cell transplantation [J]. Br J Haematol, 2011, 155(3): 377-385.
- [15] Macedo C, Webber SA, Donnenberg AD, et al. EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cells from asymptomatic pediatric thoracic transplant patients carrying chronic high EBV loads display contrasting features: activated phenotype and exhausted function [J]. J Immunol, 2011, 186(10): 5854-5862.
- [16] 郭建巍, 高毓蕊, 田占月, 等. EB病毒和人巨细胞病毒核酸检测的实验研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 105-107.
- [17] Hayden RT, Yan X, Wick MT, et al. College of american pathologists microbiology resource committee. factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficien - cy testing samples: a multivariate analysis [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 337-345.
- [18] Gärtner B, Preiksaitis JK. EBV viral load detection in clinical virology [J]. J Clin Virol, 2010, 48(2): 82-90.
- [19] White RA, Quake SR, Curr K. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus [J]. J Virol Methods, 2012, 179(1): 45-50.

# 一例 I 型神经纤维瘤病患者的 *NF1* 突变检测及家系分析

过丹丹<sup>1</sup> 卢鑫鑫<sup>1</sup> 黄肖利<sup>2</sup> 陈喜军<sup>2</sup> 张彪<sup>1</sup> 郑佳莹<sup>1</sup> 伍严安<sup>1,2\*</sup>

**[摘要]** 目的 对1例临床拟诊为I型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, NF1)患者进行致病基因突变研究。方法 提取先证者及其家系成员外周全血基因组DNA,通过目标捕获二代测序技术(targeted next-generation sequencing, TNGS)对先证者I型神经纤维瘤蛋白基因(neurofibromin 1, *NF1*)的全部编码区外显子及其侧翼序列进行高通量测序检测可疑突变,并用Sanger测序法进一步验证;对其家系成员*NF1*相同突变位点进行Sanger测序检测。结果 基因检测发现先证者*NF1*第45号外显子1个已知致病突变c.6790\_6791insA(p.Tyr2264Ter),有类似临床表现的父亲和姐姐检出相同突变,表型正常的母亲和妻子未检测到此突变,其4岁儿子也检测出该突变。结论 *NF1*的c.6790\_6791insA(p.Tyr2264Ter)突变存在与该家系NF1的发病密切相关。

**[关键词]** 突变检测; I型神经纤维瘤病; *NF1*基因; 目标捕获二代测序

## *NF1* mutation detection and pedigree analysis in a patient with neurofibromatosis type 1

GUO Dandan<sup>1</sup>, LU Xinxin<sup>1</sup>, HUANG Xiaoli<sup>2</sup>, CHEN Xijun<sup>2</sup>, ZHANG Biao<sup>1</sup>, ZHENG Jiaying<sup>1</sup>, WU Yanan<sup>1,2\*</sup>

(1. Provincial Clinical Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, China, 350004;

2. Department of Clinical Laboratory, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian, China, 350001)

**[ABSTRACT]** Objective To identify the genetic ecology in a patient with neurofibromatosis type 1 (NF1). Methods The genomic DNA was extracted from peripheral blood of the proband and his family members. All coding exons and the flanking sequences of neurofibromin 1 (*NF1*) from the proband were screened by targeted next-generation sequencing (TNGS), the suspected mutation was validated by Sanger sequencing. Finally, the same mutation site was detected in his family members by Sanger sequencing. Results A known pathogenic mutation c.6790\_6791insA (p.Tyr2264Ter) was identified in the exon 45 of *NF1* in the proband, his father and sister had similar clinical manifestations, but his mother and wife were asymptomatic. The same mutation was also detected in his 4-year-old son. Conclusion The mutation of c.6790\_6791insA (p.Tyr2264Ter) is closely related to the pathogenesis of the NF1 family.

**[KEY WORDS]** Mutation detection; Neurofibromatosis type 1; *NF1* gene; Targeted next-generation sequencing

I型神经纤维瘤病(neurofibromatosis type 1, NF1)(MIM#162200)是源于神经嵴细胞分化异常而导致多系统损害的常染色体显性遗传病,患病率约为1/2 500~1/3 000<sup>[1]</sup>。该病的临床表现为皮肤咖啡牛奶斑、雀斑、多发神经纤维瘤、虹膜 Lisch

结节、虹膜错构瘤、神经胶质瘤、骨骼异常等<sup>[2]</sup>。美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)于1988年提出了NF1的临床诊断标准,包括其中2项或2项以上即可诊断为NF1<sup>[3]</sup>。该病是由于I型神经纤维瘤蛋白基因(neurofibromin 1,

作者单位:1. 福建医科大学省立临床医学院,福建,福州 350004

2. 福建省立医院检验科,福建,福州 350001

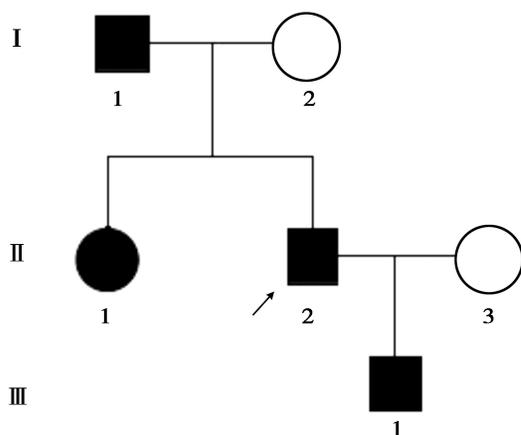
\*通讯作者:伍严安, E-mail: wyasly@126.com

*NF1*) (MIM#613113) 突变及表达异常所致<sup>[4-5]</sup>。本研究用目标捕获二代测序技术 (targeted next-generation sequencing, TNGS) 对一个 *NF1* 家系进行 *NF1* 突变的检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

先证者,男,32岁,汉族,于2015年因全身皮肤多发性结节到福建省立医院皮肤科就诊,按照NIH的诊断标准拟诊为*NF1*。先证者的母亲、妻子表型正常,父亲和姐姐均有类似的皮肤表现。有一4岁儿子。家系图见图1。



□代表男性;○代表女性;■与●代表*NF1*患者;白色代表家系中的未患病者;→为先证者

图1 *NF1* 家系系谱图

Figure 1 Pedigree of a family affected with *NF1*

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组DNA抽提

获得研究对象知情同意后,抽取该先证者、父母、姐姐、妻子及儿子的外周静脉血2 mL,均用EDTA抗凝。用QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, 德国) 抽提全血基因组DNA。检测所提取DNA的浓度及纯度,质控标准为:DNA浓度>100 ng/ $\mu$ L,总量>5  $\mu$ g, A260/A280 比值范围在1.8~2.0之间。

### 1.2.2 TNGS 及数据处理

检测先证者合格的1  $\mu$ g 基因组DNA,使用超声波仪 (Covaris S2, 美国) 进行随机打断,产生200~250 bp的随机片段。在片段两端加接头,进行文库构建。使用定制的2.1 M芯片 (customized capture array) (Roche NimbleGen, 美国) 进行目标

序列捕获。该芯片已经过大规模平行测序 (massive parallel sequence, MPS) 应用,显示有良好的敏感性和检测效率<sup>[6]</sup>。该芯片基因检测的目标区域捕获范围包括*NF1*全部外显子区域及其邻近10 bp的侧翼区。富集的DNA库在Illumina HiSeq2000测序平台上进行扩增并高通量测序。分别用SOAPsnp软件和Samtools分析单碱基变异和插入/缺失。建库、杂交、测序、序列比对及基因拷贝数变异分析的方法都与之前文章方法一致<sup>[6-7]</sup>。通过国际千人基因组计划 (the 1000 genome project)、NCBI单核苷酸多态性数据库 (NCBI dbSNP)、华大基因组数据库 (BGI-DB)、人类基因突变协会 (Human Genome Variation Society, HGVS) 命名规则、人类基因突变数据库 (the human gene mutation database, HGMD) 等数据库,明确是否存在突变及其性质。

### 1.2.3 Sanger 测序验证

采用常规Sanger测序方法对先证者二代测序检出的可疑突变所在外显子区域进行测序验证。使用Primer Premier 5.0软件进行引物设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。第45号外显子的上游引物序列:5'-CCGAGATTCAGTTTAGGAGTTA-3';下游引物序列:5'-CGCTTGAGAACATAC-TATCCAT-3',产物片段大小为376 bp。PCR反应体系:10 $\times$ ExTaq buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu$ L、20  $\mu$ mol/L上下游引物各2  $\mu$ L、DNA模板2  $\mu$ L、ExTaq DNA聚合酶0.25  $\mu$ L (TaKaRa, 日本),去离子水补足至50  $\mu$ L。用TP600PCR仪 (TaKaRa, 日本) 进行PCR反应。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,59 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸50 s,共36个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取2.5  $\mu$ L产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,对电泳显示在相应位置为清晰单一条带的PCR产物,用ABI3730测序仪 (ABI, 美国) 进行DNA双向测序。用同样方法对先证者父母、姐姐、妻子及儿子进行45号外显子的Sanger测序。

## 2 结果

### 2.1 临床特征

先证者自出生时即在躯干四肢发现几处褐色斑,随着年龄的增长,褐色斑逐渐增多增大,部分斑面增大发展为褐色斑片。青春期时,全身皮肤出现大量大小不一,呈粉红色或肤色的孤立性结

节,半球形,质地软硬不等,部分有蒂,在面部、躯干、四肢均有分布,在躯干较多。曾因躯干部位结节摩擦导致疼痛多次手术切除治疗。体检在躯干四肢可见数百枚肿物,大小约为0.3~2.5 cm,触之柔软。在腋窝处可见大量大小不一的雀斑(图2A、B、C)。眼科检查在裂隙灯下双眼虹膜均可见2个以上的Lisch结节,患者身高1.51 m,智力正

常,视力与听力正常,头颅及脊柱磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)未见明显神经系统异常,未见其他系统疾病。姐姐皮肤有类似表现,另曾于6年前因左外耳后神经纤维瘤进行手术切除,现又复发(图2DE),MRI显示左侧外耳软组织浸润性病变。儿子4岁,躯干及四肢发现多处褐色斑,但无皮肤结节(图2F)。



A: 先证者背部大小不一的孤立性结节及片状咖啡斑;B: 先证者躯干处囊肿状纤维软瘤;C: 先证者腋窝雀斑;D: 先证者姐姐左耳术后疤痕及复发,局部囊状突起;E: 先证者姐姐左手臂巨大咖啡牛奶斑;F: 先证者儿子躯干多处褐色斑

图2 先证者及其家系成员皮肤临床表现

Figure 2 Cutaneous clinical features of the proband and his family members

## 2.2 TNGS 结果及生物信息学分析

对 *NFI* 全部编码区外显子捕获测序,目标区覆盖度达到 100.00%,平均测序深度( $\times$ )约为 597,目标区平均深度  $> 30 \times$  位点所占比例约为 99%(图3)。在第 45 号外显子检测到一突变 c.6790\_6791insA (p.Tyr2264Ter),造成突变位点编码酪氨酸的密码子 UAC 变为终止密码子 UAA,导致蛋白质的翻译提前终止,形成由 2 264 个氨基酸组成的截短多肽。经检索为报道过的突变<sup>[8]</sup>。

## 2.3 Sanger 测序验证及突变性质分析

Sanger 测序证实了先证者存在 c.6790\_6791insA 突变,其父亲、姐姐及 4 岁儿子也检测出该突

变。表型正常的母亲和妻子未检测出此突变(图4)。

## 3 讨论

*NFI* 定位于染色体 17q11.2,包含 57 个组成性外显子和 3 个可变剪接外显子,全长 283 kb,有 3 个大小为 11~13 kb 的成熟转录本。其蛋白产物为神经纤维瘤素,由 2 818 个氨基酸组成,大量表达于神经元、星型胶质细胞、少突胶质细胞、许旺细胞、肾上腺细胞、性腺细胞和白细胞。*NFI* 是肿瘤抑制基因,其突变可干扰 Ras 循环的 cAMP 信号转导通路从而引发肿瘤<sup>[9]</sup>。*NFI* 表达的丢失导致神

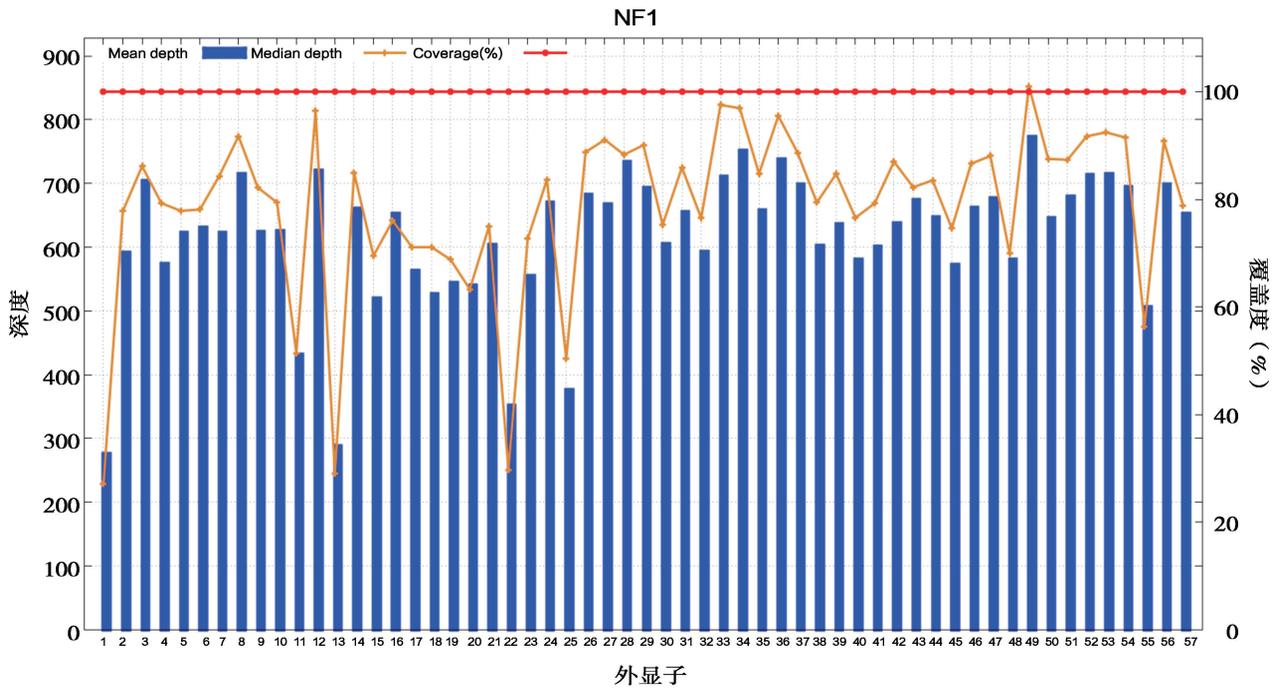
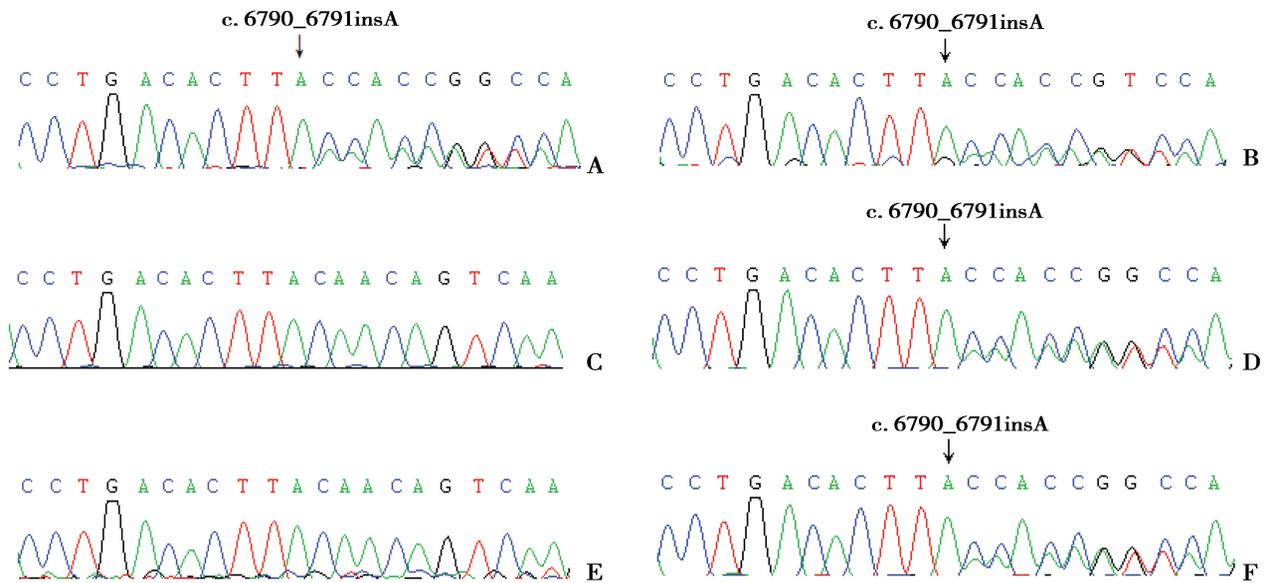


图3 先证者NF1二代测序图  
Figure 3 The proband *NF1* sequencing using TNGS



A: 先证者; B: 先证者父亲; C: 先证者母亲; D: 先证者姐姐; E: 先证者妻子; F: 先证者儿子

图4 *NF1* 第45号外显子的 Sanger 测序图  
Figure 4 Sanger sequencing of the *NF1* gene exon 45

经纤维素 RasGAP 功能的丧失,最终导致 RAS 活性的增加、细胞增生以及肿瘤的形成<sup>[10]</sup>。本研究通过 TNGS 和 Sanger 测序验证确定先证者家系存在遗传学病因——c.6790\_6791insA 突变。c.6790\_6791insA 造成突变位点编码酪氨酸的密码子

UAC→UAA(终止密码子),导致蛋白质的翻译提前终止,形成仅有 2 264 个氨基酸组成的截短多肽,影响蛋白质结构。*NF1* 是常染色体显性遗传性疾病,由于负显性效应机制导致患者患病。

NF1患者易患视神经胶质瘤和髓白血病,并可能出现认知功能障碍、血管畸形和骨骼畸形,NF1与多种组织和疾病的进展有关<sup>[11]</sup>。NF1异常增加了5倍的患恶性肿瘤的风险,有10%~13% NF1会发展为恶性外周神经鞘瘤<sup>[12]</sup>。本研究中先证者姐姐左外耳后神经纤维瘤手术切除后又复发,MRI显示左侧外耳软组织浸润性病变,不能排除恶变,因此需继续随访。其儿子目前只是躯干和四肢有多处褐色斑,没有皮肤结节。但由于经Sanger测序确定了其也存在NF1的c.6790\_6791insA突变,因此可以预测到青春期,该患儿将会出现与先证者类似的皮肤结节临床表现。

NF1基因庞大、外显子多、缺乏明显的突变热点,在还没有TNGS技术以前,国内外有一些文献报道通过PCR扩增NF1基因全部外显子,再逐一Sanger测序检测突变,该方法较为繁琐。近年来出现的TNGS通过芯片对目标基因编码区及邻近剪接区的DNA进行捕获和富集,使用高通量测序平台可对多外显子基因和多种遗传病的相关基因进行突变检测。目前国内外已有少数文献报道通过TNGS对NF1进行突变检测<sup>[13-15]</sup>,显示该方法具有高效、准确的优势。本研究用TNGS准确地检测出了患者的NF1突变位点。这一结果提示,该技术是NF1诊断的有效手段,值得在临床应用。

国内对NF1患者进行基因检测只有少量报道。临床很少对NF1患者进行基因诊断的原因可能是根据其根据临床表现易于诊断,但对患者做基因检测有明显的益处。NF1作为常染色体显性遗传性疾病,有50%的遗传率。基因检测不仅可以在基因水平明确病因,还可以为患者及其家系成员提供产前诊断的依据,为其提供生育无NF1健康孩子的机会。

#### 参考文献

- [1] Williams VC, Lucas J, Babcock MA, et al. Neurofibromatosis type 1 revisited[J]. Pediatrics, 2009, 123(1): 124-133.
- [2] Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1[J]. Genet Med, 2010, 12(1): 1-11.
- [3] National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis. Bethesda, Md, USA, July 13-15, 1987[J]. Neurofibromatosis, 1988, 1(3): 172-178.
- [4] Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, et al. Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway[J]. Nature, 1990, 347(6290): 291-294.
- [5] Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP[J]. Cell, 1990, 62(3): 599-608.
- [6] Wei X, Ju X, Yi X, et al. Identification of sequence variants in genetic disease-causing genes using targeted next-generation sequencing[J]. Plos One, 2011, 6(12): e29500.
- [7] Wei X, Dai Y, Yu P, et al. Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study[J]. Eur J Hum Genet, 2014, 22(1): 110-118.
- [8] Upadhyaya M, Spurlock G, Monem B, et al. Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas[J]. Hum Mutat, 2008, 29(8): E103-111.
- [9] Upadhyaya M, Osborn MJ, Maynard J, et al. Mutational and functional analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene[J]. Hum Genet, 1997, 99(1): 88-92.
- [10] Cappione AJ, French BL, Skuse GR. A potential role for NF1 mRNA editing in the pathogenesis of NF1 tumors[J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(2): 305-312.
- [11] Ferner RE, Huson SM, Thomas N, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1[J]. J Med Genet, 2007, 44(2): 81-88.
- [12] Evans DG, Baser ME, McGaughran J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1[J]. J Med Genet, 2002, 39(5): 311-314.
- [13] Pasmant E, Parfait B, Luscan A, et al. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? [J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(5): 596-601.
- [14] Uusitalo E, Hammis A, Palonen E, et al. Neurofibromatosis type 1 gene mutation analysis using sequence capture and high-throughput sequencing[J]. Acta Derm Venereol, 2014, 94(6): 663-666.
- [15] 朱铁山, 黄尚志, 伍建, 等. 一例神经纤维瘤病 I 型患者 NF1 基因新的插入缺失型突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(3): 318-322.

## UCP2 基因 rs660339 多态性与壮族儿童青少年单纯性肥胖的相关性分析

李伍高 李哲涛 黄际卫 严提珍 李静文 许泽辉 唐宁\*

**[摘要]** 目的 探讨 *UCP2* 基因位点 rs660339 单核苷酸多态性与广西柳州的壮族儿童青少年单纯性肥胖的相关性。方法 随机选取 285 名柳州市儿童青少年(年龄 3~18 岁),其中单纯性肥胖组 151 例,健康对照组 134 例,分别检测身高和体重,测定空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)、血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triacylglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)两组标本 *UCP2* 基因 rs660339 位点利用 SNaPshot 技术检测,统计基因型及等位基因分布频率,并分析两组等位基因构成比。结果 肥胖组中除年龄、身高外,与对照组的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。健康对照组和肥胖组 *UCP2* 基因 rs660339 C/C 型、C/T 型及 T/T 型基因型频率分别为 40.30%、49.25%、10.45% 和 37.09%、50.33%、12.58%, 两组 C、T 等位基因频率分别为 64.93%、35.07% 和 62.25%、37.75%, T 等位基因的 OR 值为 1.122, 95.9% 的可信区间为 0.797~1.580。基因型与等位基因频率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。rs660339 位点 TT 与 CC/CT 基因型与各代谢指标(血糖、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白)无显著相关性。结论 广西壮族儿童青少年单纯性肥胖组和健康对照组 *UCP2* 基因单核苷酸多态性位点 rs660339 位点基因型的构成比组间无显著性差异,各基因型携带者间代谢指标也无显著性差异。

**[关键词]** *UCP2* 基因;单核苷酸多态性;单纯性肥胖;体质指数

Association of *UCP2* gene rs660339 single nucleotide polymorphism with simple obesity in Chinese Zhuang children adolescents

LI Wugao, LI Zhetao, HUANG Jiwei, YAN Tizhen, LI Jingwen, XU Zehui, TANG Ning\*

(Department of Medical Genetics, Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, LiuZhou, Guangxi, China, 545001)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the relationship of *UCP2* gene rs660339 polymorphisms on obesity in Chinese Zhuang children and adolescents. Methods 285 cases were enrolled in the study, including 151 obese children and adolescents and 134 normal weights as the control. Height and weight of all the participants were collected. Fasting blood-glucose (FBG), total cholesterol (TC), triacylglyceride (TG), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) were detected. The genotype of rs660339 were typed by SNaPshot technique. Statistical analysis of genotype frequencies between obese participants and healthy controls was performed using the SPSS program. Results The metabolic parameters (FBG, TC, TG, HDL-C and VDL-C) of the obese group were significantly different when compared to that of the control group. The C/C, C/T, T/T genotype frequencies of *UCP2* rs660339 in simple obese group and normal control group were 40.30%, 49.25%, 10.45% and 37.09%, 50.33%, 12.58%,

基金项目:中国疾病预防控制中心妇幼保健中心合生元母婴营养与健康研究项目(2012FY009);广西壮族自治区卫生厅自筹课题(Z2013602)

作者单位:广西柳州市妇幼保健院医学遗传科,广西,柳州 545001

\*通讯作者:唐宁, E-mail:tn825@126.com

respectively. The C, T allelic frequencies in simple obese group and normal control group were 64.93%, 35.07% and 62.25%, 37.75%, respectively. Odds ratio (OR) is 1.122 (CI: 0.797-1.580). The genotype and allelic frequencies of rs660339 in simple obese children were not significantly different from those in controls ( $P>0.05$ ), and there was no significant association between rs660339 and obesity-related traits including FBG, TC, TG, HDL-C and VLDL-C. **Conclusion** rs660339 polymorphism in *UCP2* gene is not associated with simple obese in Chinese Zhuang children in Liuzhou, Guangxi province, and there was no significant association among the genotypes and metabolic parameters.

[KEY WORDS] *UCP2* gene; Single nucleotide polymorphism (SNP); Simple obesity; Body mass index (BMI)

随着物质生活水平的提高,青少年儿童肥胖已经成为了各个家庭关注的首要健康问题。流行病学研究发现,我国儿童单纯性肥胖率接近欧美发达国家水平达到7.2%<sup>[1]</sup>。青少年中的肥胖已成为困扰广大家长及儿童的精神负担,研究肥胖的原因以及如何预防已经被广泛的重视。解偶联蛋白与人体的能量平衡和体重调节有着密切的联系<sup>[2]</sup>,关于其基因 *UCP2* 的多态性与肥胖的关系在已有研究<sup>[3-6]</sup>。*UCP2* 在体内分布广泛,主要通过调节机体的基础代谢率(basal metabolic rate, BMR)来控制体重,人 *UCP2* 基因受  $\beta_3$ -AR、单环磷酸腺苷、甲状腺激素及过氧化物酶体增生物激活受体配体调节,一旦基因突变就可能发生肥胖。本研究以柳州市壮族儿童青少年为研究对象,探讨 *UCP2* 基因 rs660339 位点多态性与广西壮族儿童肥胖及其代谢指标的关系,旨在从分子生物学角度探讨肥胖在广西壮族人群中的遗传机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取柳州市中小学壮族儿童青少年 285 人,男 174,女 111,男女比例 1.57:1;年龄 6~18 岁,平均年龄  $12.85\pm 3.46$  岁,单纯性肥胖组体质指数(body mass index, BMI)超过中国肥胖问题工作组 2003 年制定的“中国学龄儿童青少年超重、肥胖筛查 BMI 值分类标准”中同年龄、同性别 BMI 标准第 95 百分位以上(超过平均体重 30%为中度,50%以上为重度),合计 151 例,平均年龄  $13.31\pm 4.13$  岁;健康对照组 BMI 处于标准的第 25 百分位至第 75 百分位之间,合计 134 例,平均年龄  $13.20\pm 2.57$  岁。两组均排除继发性肥胖症且未服用激素与影响脂代谢的药物,所有研究对象均取得监护人知情同意。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 BMI 及代谢指标测定

所有纳入研究的对象于相同条件下按照标准方法测量身高和体重,根据公式  $BMI=W(\text{kg})/H^2(\text{m}^2)$  计算 BMI,其中 W 代表体重,单位为千克, H 代表身高,单位为米。清晨空腹抽取外周血,分离血清,日本日立 7600 型全自动生化分析仪测定空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)、血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triacylglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)。全部测定由专人在固定仪器上进行,并按日常工作进行室内质控并合格方检测。同时抽取静脉血 2 mL 用乙二胺四乙酸二钾(EDTA- $K_2$ )抗凝,酚氯仿法抽提全基因组 DNA,标本  $-20^\circ\text{C}$  保存,用于基因分析。

#### 1.2.2 基因多态性检测

使用 SNaPshot 技术,毛细管电泳检测在美国 ABI3730xl 型全自动 DNA 测序仪上进行,*UCP2* 基因 rs660339 位点单核苷酸多态性的基因分型应用 GeneMapper 4.0 分析。

rs660339 位点 PCR 扩增正向引物为 F: 5'-CATCGCAGATCTCATCACCT-3',反向引物为 R: 5'-TGCTCCATACTCACGCTCAG-3'。反应过程中延伸引物序列分别为: 5'-CCAGTGC GCGCTA-CAG-3',上述引物均由上海立菲生物技术有限公司合成,PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu\text{L}$  (Mg<sup>2+</sup> free, invitrogen, 美国) 2  $\mu\text{L}$ , 10 mM dNTP 混合物 0.5  $\mu\text{L}$  (大连 Takara 公司), 50 mM MgCl<sub>2</sub> 0.8  $\mu\text{L}$  (invitrogen, 美国), 5U Platinum Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$  (invitrogen, 美国), PCR 正向和反向引物(10 pmol/L)各 0.5  $\mu\text{L}$  和 1  $\mu\text{L}$  DNA 模

板(20 ng/μL)。PCR反应程序:95℃预变性 2 min; 94℃变性 20 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 33 个循环;最后 72℃延伸 5 min, 4℃保存。PCR产物经过纯化处理后,在 ABI3730xl 型全自动 DNA 测序仪上进行毛细管电泳,运行 GeneMapper 4.0 软件分析实验结果。

### 1.2.3 统计学方法

计量资料采用  $\bar{X} \pm SD$  表示,组间差异进行方差分析,样本间率的比较用  $\chi^2$  检验。采用 SPSS 13.0 进行统计学处理,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

肥胖组 151 例,年龄  $13.31 \pm 4.13$  岁, BMI 值  $27.48 \pm 4.03 \text{ kg/m}^2$ , 正常组 134 例,年龄  $13.20 \pm 2.57$  岁, BMI 值  $18.88 \pm 2.50 \text{ kg/m}^2$ , BMI 值肥胖组高于正常组,组间的差异有统计学意义 ( $F=31.471, P < 0.05$ )。血糖、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白各指标在组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 UCP2 基因 rs660339 位点基因型及等位基因型频率在肥胖组和正常对照组的比较

UCP2 基因 rs660339 位点基因分型结果见图

表 1 肥胖组与对照组生理及代谢指标的比较  
Table 1 Physiological and metabolism indices between the obesity and the control groups

指标	正常组	肥胖组	t 值	P 值
例数	134	151		
年龄	$13.20 \pm 2.57$	$13.31 \pm 4.13$	-0.27	0.785
身高	$154.61 \pm 11.60$	$154.53 \pm 18.36$	0.04	0.968
体重	$45.63 \pm 9.48$	$67.73 \pm 20.99$	-11.66	0.000
BMI	$18.88 \pm 2.50$	$27.48 \pm 4.03$	-21.91	0.000
血糖	$4.24 \pm 0.39$	$4.57 \pm 0.75$	-4.62	0.000
总胆固醇	$4.09 \pm 0.74$	$4.40 \pm 0.86$	-3.23	0.001
甘油三脂	$0.85 \pm 0.35$	$1.17 \pm 0.88$	-4.20	0.000
高密度脂蛋白	$1.56 \pm 0.32$	$1.33 \pm 0.30$	6.33	0.000
低密度脂蛋白	$2.24 \pm 0.65$	$2.69 \pm 0.67$	-5.73	0.000

1, 健康对照组和肥胖组 UCP2 基因 rs660339 C/C 型、C/T 型及 T/T 型基因型频率分别为 40.30%、49.25%、10.45%和 37.09%、50.33%、12.58%,两组 C、T 等位基因频率分别为 64.93%、35.07%和 62.25%、37.75%,经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,其等位基因在两种人群中的分布符合遗传平衡,说明样本具有群体代表性。肥胖组的 BMI ( $27.48 \pm 4.03$ ) 显著高于健康对照组 ( $18.88 \pm 2.50$ ),差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),然而引起这一差异的原因与

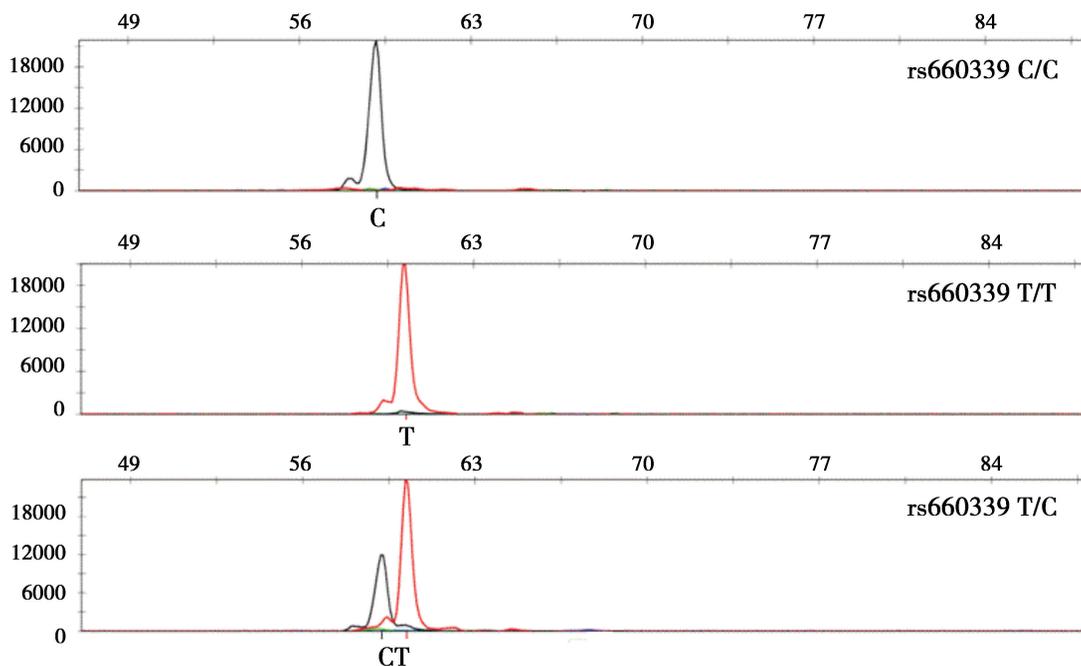


图 1 rs660339 位点基因分型毛细管电泳峰

Figure 1 Allele peaks of rs660339 genotyped by capillary electrophoresis

UCP2 基因 rs660339 位点多态性没有关联,该位点基因型的构成比在组间没有差异 ( $P>0.05$ ),并且 rs660339 位点等位基因 C、T 在肥胖组和对照组中频率分别为 88.43%、11.57% 和 84.10%、15.89%, C 等位基因的 OR 值为 1.122, 95% 的可信区间为 0.797~1.580; 等位基因频率差异均无统计学意义

( $P>0.05$ ), 见表 2。

### 2.2 UCP2 基因 rs660339 位点多态性与肥胖代谢指标间的相关性

rs660339 CC 基因型与 CT+TT 基因型各代谢参数 FBG、TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 间的差异无统计学意义(表 3)。

表 2 肥胖组和对照组 UCP2 基因 rs660339 位点基因型和等位基因频率

Table 2 The frequencies of genotype and allele of UCP2 gene rs660339 between the obesity and the control groups

组别	n	基因型[n(%)]			等位基因[n(%)]	
		野生型	杂合突变型	纯合突变型	野生型	突变类型
rs660339		CC	CT	TT	C	T
正常组	134	54(40.30)	66(49.25)	14(10.45)	174(64.93)	94(35.07)
肥胖组	151	56(37.09)	76(50.33)	19(12.58)	188(62.25)	114(37.75)
$\chi^2$			0.486		0.438	
P			0.784		0.503	
OR(95%CI)					1.122(0.797~1.580)	

表 3 UCP2 基因 rs660339 位点不同基因型与肥胖相关代谢组分比较

Table 3 rs660339 genotype and metabolism indices between the obesity and the control groups

SNP	基因型	例数	FBG	TC	TG	HDL-C	LDC-C
rs660339	CC+CT	132	4.53±0.75	4.36±0.82	1.17±0.90	1.33±0.27	2.65±0.64
	CT	19	4.81±0.71	4.74±1.09	1.17±0.74	1.33±0.48	2.93±0.78
t 值			-1.490	-1.838	0.035	0.016	-1.704
P			0.138	0.068	0.972	0.987	0.091

### 3 讨论

青少年儿童肥胖已经越来越受到家庭和社会的重视,因肥胖所带来的健康问题日益加剧,随着社会的发展,从根本上预防肥胖的发生已经成为了社会共识。

解偶联蛋白 2 (UCP2) 基因位于人染色体 11q13, 编码线粒体内膜上的载体蛋白。有多个研究报告 UCP2 基因多态与 T2DM 和肥胖的相关性<sup>[7-8]</sup>, 其中多态位点 rs660339, rs4684846 可能在肥胖发生发展和减肥过程中起到至关重要的作用, 可能被视为临床遗传易感性和减肥手术前的预测<sup>[9-10]</sup>。

在不同人群中发现 UCP2 基因多态位点 rs660339 与肥胖是否具有显著性相关并无定论。

在欧洲, 2012 年 Martinez-Hervas 等<sup>[11]</sup>人通过对 2 367 例样本研究发现, UCP2 基因的多态性 (rs660339 和 rs659366) 与中央型肥胖有关。Kosuge 等<sup>[12]</sup>在日本人群中分析发现 UCP2 基因 (rs660339) 可能是很肥胖的女性标记, Andersen 等<sup>[13]</sup>人通过对 17 636 个丹麦人分析表明 UCP2 基因多态性 (rs659366) 与肥胖有关。而在中国其他地区人群的研究中该多态位点与肥胖相关性研究发现却又结论不一<sup>[14-15]</sup>。

目前文献上并无报道关于广西壮族儿童单纯性肥胖与 UCP2 基因 (rs660339) 相关性研究。本研究在利用 SNaPshot 技术分析的基础上, 分析比较了广西柳州的壮族单纯性肥胖儿童青少年健康对照组和肥胖组 UCP2 基因 rs660339 的基因型, C/C 型、C/T 型及 T/T 型基因型频率分别为

40.30%、49.25%、10.45%和37.09%、50.33%、12.58%，两组C、T等位基因频率分别为64.93%、35.07%和62.25%、37.75%，T等位基因的OR值为1.122，95.9%的可信区间为0.797~1.580。基因型与等位基因频率差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。UCP2基因的变异在调节肥胖代谢参数的机制尚不明确。而我们在本研究中并未发现该位点的多态性与肥胖及其他相关代谢指标有关，分析原因可能是UCP2基因rs660339位点存在着种族和地域差异。肥胖的发生发展包括遗传因素、神经精神因素、继发性、环境效应、饮食生活因素等等，而单个基因位点变异的效应可能被其他基因或环境效应所掩盖或增强，故通过特定种族人群的Meta分析，扩大样本规模，多个基因多个多态位点联合分析提高检验效能，广泛选择肥胖表型，排除环境干扰，才能得出的更有意义的结论。

#### 参考文献

- [1] 全国儿童期单纯肥胖症研究协作组, 中国疾病预防控制中心妇幼保健中心. 全国0~6岁儿童单纯性肥胖流行病学研究[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(3): 179-184.
- [2] Oguzkan-Balci S, Col-Araz N, Nacak M, et al. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) gene polymorphisms are associated with childhood obesity and related metabolic disorders [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2013, 26(3-4): 277-283.
- [3] McCarty MF, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health [J]. Open Heart, 2015, 2(1): e262.
- [4] Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues [J]. J Transl Med, 2015, 13: 31.
- [5] Vimalaswaran KS, Cavadino A, Verweij N, et al. Interactions between uncoupling protein 2 gene polymorphisms, obesity and alcohol intake on liver function: a large meta-analysed population-based study [J]. Eur J Endocrinol, 2015, 173(6): 863-872.
- [6] Dinh CH, Szabo A, Camer D, et al. Bardoxolone methyl prevents fat deposition and inflammation in the visceral fat of mice fed a high-fat diet [J]. Chem Biol Interact, 2015, 229: 1-8.
- [7] Shen Y, Wen Z, Wang N, et al. Investigation of variants in UCP2 in Chinese type 2 diabetes and diabetic retinopathy [J]. Plos One, 2014, 9(11): e112670.
- [8] 闻杰. UCP2基因多态与2型糖尿病和肥胖的关联研究及Meta分析[D]. 华中师范大学生物化学与分子生物学, 2013.
- [9] Liou TH, Chen HH, Wang W, et al. ESR1, FTO, and UCP2 genes interact with bariatric surgery affecting weight loss and glycemic control in severely obese patients [J]. Obes Surg, 2011, 21(11): 1758-1765.
- [10] Lee YC, Liew PL, Lee WJ, et al. Prediction of successful weight reduction after laparoscopic adjustable gastric banding [J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(93): 1222-1226.
- [11] Martinez-Hervas S, Mansego ML, de Marco G, et al. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with body fat distribution and risk of abdominal obesity in Spanish population [J]. Eur J Clin Invest, 2012, 42(2): 171-178.
- [12] Kosuge K, Soma M, Nakayama T, et al. Human uncoupling protein 2 and 3 genes are associated with obesity in Japanese [J]. Endocrine, 2008, 34(1-3): 87-95.
- [13] Andersen G, Dalgaard LT, Justesen JM, et al. The frequent UCP2 -866G>A polymorphism protects against insulin resistance and is associated with obesity: a study of obesity and related metabolic traits among 17 636 Danes [J]. Int J Obes (Lond), 2013, 37(2): 175-181.
- [14] Liu L, Zhao X, Kang S, et al. An association between -866G/A polymorphism in the promoter of UCP2 and obesity: a meta-analysis [J]. Gene, 2013, 514(1): 41-47.
- [15] 左浩江, 张薇薇, 谢志梅, 等. 成都地区肥胖人群UCP2基因多态性研究及其与肠道菌群关系的初探 [J]. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(5): 865-868, 876.

## miR-196a2 基因多态性在广西人群中的分布

罗宏成<sup>1</sup> 温旺荣<sup>1</sup> 李珉珉<sup>1</sup> 韦颖<sup>2</sup> 谭昱<sup>2</sup> 韦叶生<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨广西人群 miR-196a2 T>C(rs11614913)等位基因及基因型频率分布情况,分析其与不同民族种族之间的差异性。方法 利用单碱基延伸 PCR 技术(polymerase chain reaction-single base extension, PCR-SBE)和 DNA 测序技术,检测 303 例广西人群中 miR-196a2 T>C 的基因型,并比较其与人类基因组计划(human genome project, Hapmap)数据库中公布的非洲人、欧洲人、日本人和中国北京人群的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)数据,揭示这 5 个不同民族种族人群的等位基因及基因型频率分布规律。结果 miR-196a2T>C 等位基因和基因型频率在广西男女间分布无差异性( $P>0.05$ )。广西人群 miR-196a2 T>C 多态性基因型及等位基因频率与非洲人、欧洲人、日本人比较有统计学差异意义( $P<0.05$ ),但与北京人群无差异性( $P$ 均 $>0.05$ )。结论 广西人群 miR-196a2T>C 存在基因多态性,与别的民族种族人群比较有明显的差异性,这种差异性对于基因组水平上疾病的研究可能会起到积极重要作用。

**[关键词]** miR-196a2; 单核苷酸多态性; 种族

Distribution of genetic polymorphism of miR-196a2 gene in Guangxi population

LUO Hongcheng<sup>1</sup>, WEN Wangrong<sup>1</sup>, LI Minmin<sup>1</sup>, WEI Ying<sup>2</sup>, TAN Tan<sup>2</sup>, WEI Yesheng<sup>2\*</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510632; 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000)

**[ABSTRACT]** Objective To study the frequencies of allele and genotype distribution of miR-196a2 T<C(rs11614913) gene, and to analyze the statistical differences between different races and nationalities. Methods The gene of single nucleotide polymorphisms (SNP) miR-196a2T<C were detected using polymerase chain reaction-single base extension (PCR-SBE) technique and DNA sequencing methods in 303 Chinese Guangxi populations, and compared with differences SNPs date among the European, African, Japanese and Chinese populations in Beijing from the human genome project (HapMap), and the distribution of allele and genotype frequencies of 5 nationalities were revealed. Results There were no statistical differences of allele and genotype distribution in miR-196a2T<C between female and male group ( $P>0.05$ ). There were significantly different frequencies of allele and genotype distributions of miR-196a2 T<C when compared with Europeans, Africans and Japanese, but no statistical differences when compared with Chinese in Beijing from China. Conclusion There were significant differences in allele frequencies and genotype distributions of the gene polymorphism miR-196a2T<C when compared with other racial and nationalities, and this difference in genome level may play a positive role in the research of disease.

**[KEY WORDS]** miR-196a2; single nucleotide polymorphisms (SNP); Ethnic

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560552,81060243)

作者单位:1.暨南大学第一临床医学院检验科,广东,广州 510632

2.右江民族医学院附属医院检验科,广西,百色 533000

\*通讯作者:韦叶生, E-mail:wysh22@163.com

微小核糖核酸(miRNAs)是一类长度约为22个核苷酸的内源性非编码单链小分子RNA。miRNAs主要通过部分互补结合到目的基因信使RNA(mRNA)的3'非编码区(3'UTRs),部分降解靶基因或者抑制其翻译表达<sup>[1]</sup>。miRNAs参与细胞增殖、分化、发育、凋亡、胰岛素分泌、肿瘤发生发展过程等多种生物学行为<sup>[2-5]</sup>。前体miRNAs(pre-miRNAs)可以影响成熟miRNAs的形成和表达水平,从而可能影响疾病的发展和归化。最近存在前体miRNAs的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)序列(miR-196a2T>C[rs11614913; chromosome 12, 54385599])被发现参与多种疾病的发病机制<sup>[6-8]</sup>。目前有关广西人群分布miR-196a2基因多态性在与疾病之间易感性未见报道。因此本文运用单碱基延伸PCR和DNA基因测序技术对303例广西人群miR-196a2基因型进行检测研究,为研究广西人群SNP与疾病易感性提供理论知识基础,也为深入认识miR-196a2基因在人类疾病发病机制的研究提供理论依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

随机选择2014年1月至2015年12月到右江民族医学院附属医院体检的无血缘关系健康人群303例,其中男性181例,女性122例,年龄21~86岁,平均年龄57±0.68岁。临床实验室各检查指标均正常,排除严重感染、心脑血管疾病及肿瘤的体检者。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA提取

抽取健康体检者静脉血3 mL于含EDTA-K2抗凝的管中;采用亚能生物技术(深圳)有限公司全血DNA提取试剂盒,严格按照说明书提取全血基因组DNA,-70℃保存备用。

#### 1.2.2 引物设计与合成

根据NCBI中Genebank基因库包含人miR-196a2 T>C(rs11614913)SNP位点的全长序列,用在线软件primer3.0设计引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。miR-196a2 T>C(rs11614913)上游引物序列:5'-CCCCTCCCTTCTCCTCCAGAT-3',下游引物序列为:5'-TT-

GTTCTGCAACCCCACTCACA-3',延伸引物序列:5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGCTCGCAACAAGAAACTG-3'。

#### 1.2.3 PCR扩增

miR-196a2 T>C(rs11614913)位点的PCR扩增标准反应体系20 μL体系包含有PCR缓冲液1x GC buffer I(TAKARA, 宝生物工程(大连)有限公司)2 μL,0.2 mmol/L dNTP 2.0 μL(GENERAY BIOTECH, 上海捷瑞生物工程有限公司),0.2 μmol/L上下游引物各1 μL,TaqDNA聚合酶1.0 U,模板DNA 1.0 μL,若体积不足20 μL用灭菌双蒸水补足。PCR产物用德国Qiagen公司的Hot-StarTaq进行多重PCR获得,8 μL的PCR产物经0.5U虾碱酶(SAP)(Promega, 美国)和4U外切酶I(EXO I)(Epicentre, 美国)纯化后,再用美国ABI公司的SNaPshot Multiplex kit技术于37℃孵育60 min,紧接着75℃孵育15 min进行延伸反应,延伸产物用虾碱酶(SAP)(Promega, 美国)纯化后用美国ABI3730XL测序仪电泳测序。SNP分型用GeneMapper4.0(Appliedbiosystems, 美国)来分析。PCR反应参数为:95℃预变性2 min;扩增阶段为:94℃预变性20 s,65℃退火40 s,72℃延伸1 min,循环11次;94℃预变性20 s,59℃退火30 s,72℃延伸1 min,循环24次;最后阶段72℃延长2 min。

#### 1.3 统计学分析

实验数据用SPSS 13.0统计软件包进行分析,基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算,采用 $\chi^2$ 检验比较各组间基因型及等位基因频率,以 $P<0.05$ 有统计学意义。

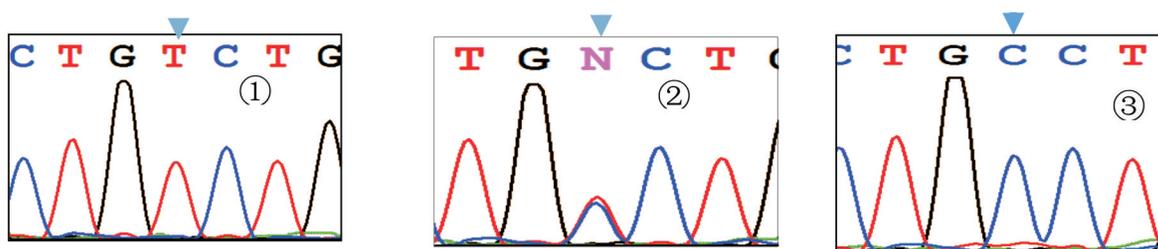
## 2 实验结果

### 2.1 miR-196a2 T<C基因型检测结果

miR-196a2 T<C基因均具有多态性,其PCR扩增产物的片段大小为:276 bp。miR-196a2 T<C基因有CC、CT、TT 3种基因型。基因测序仪ABI3730测序证实了我们的检测结果,结果见图1。

### 2.2 miR-196a2 T>C基因多态性在广西健康人群中的分布

miR-196a2 T>C基因型和等位基因频率,经 $\chi^2$ 检验,所有基因型及等位基因频率符合Hardy-Weinberg遗传平衡,样本来源具有群体代表性。



①、②、③分别代表TT、CT、CC基因型,箭头所示位置为基因突变位点

图1 miR-196a2 T>C(rs11614913)测序图

Figure 1 Sequencing map of miR-196a2 gene rs11614913 T>C polymorphism

miR-196a2 多态性位点基因型和等位基因频率在广西人群男女之间比较均无统计学差异( $\chi^2$  分别为 0.119 和 0.023,  $P$  值分别为 0.942 和 0.879,  $P$  均

大于 0.05), miR-196a2 T>C 基因以 CT 杂合子基因型多见, 占 52.5%, 等位基因 T 多见, 占 51.0%, 结果见表 1。

表 1 广西人群 miR-196a2 T>C(rs11614913)基因型和等位基因频率分布比较

Table 1 The distribution of allele and genotype frequencies of miR-196a2 T>C(rs11614913) gene in Guangxi population

组别	例数	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
		CC	CT	TT	C	T
男性	181	40(22.1%)	96(53.0%)	45(24.9%)	176(48.6%)	186(51.4%)
女性	122	29(23.8%)	63(51.6%)	30(24.6%)	121(49.6%)	123(50.4%)
合计	303	69(22.8%)	159(52.5%)	75(24.8%)	297(49.0%)	309(51.0%)

miR-196a2 T>C 基因型和等位基因频率在广西男女人群之间比较均无统计学意义基因型和等位基因频率在广西男女性别之间比较均无统计学意义,  $P > 0.05$

### 2.3 miR-196a2 T>C 基因在不同种族人群间的比较

miR-196a2 T>C 基因多态性分布频率分别与人类基因组计划公布(human genome project, HapMap)公布非洲人、欧洲人、日本人和中国北京人 4 个人群的 SNP 分型数据进行比较。广西人群 miR-196a2 T>C 多态性基因型及等位基因频率与非洲人、欧洲人、日本人比较有统计学差异意义( $\chi^2$  分别为 141.34、7.73、8.43 和 148.23、4.45、6.64;  $P$  均小于 0.05), 但与中国北京人比较差异无统计学意义( $\chi^2$  分别 1.91 和 0.05;  $P$  均大于 0.05), 见表 2。

### 3 讨论

miRNA 存在多种形式, 最原始的是 pri-miRNA(前体 miRNA), 长度大约为 300~1 000 个碱基,

pri-miRNA 经过一次加工后, 成为 pre-miRNA 即 miRNA 前体, 长度大约为 70~90 个碱基, pre-miRNA 再经过 Dicer 酶酶切后, 成为长约 20~24 核苷酸(nucleotide, nt)的成熟 miRNA。每个 miRNA 可能有多个靶基因, 而几个 miRNA 也可同时调节同一个靶基因。这种复杂的调节网络既可以通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达, 也可以通过几个 miRNA 的组合来精细调控某个基因的表达。miRNA 调节着人类三分之一的基因, 备受科学人员的关注。SNP 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种。越来越多的研究表明, 存在于前体 miRNA 的 SNP 会影响成熟 miRNA 的表达水平以及人类疾病易感性<sup>[9-10]</sup>。最近很多研究表明, miR-196a2 T>C(rs11614913)基因多态性与许多疾病的易感性有

表2 不同地区民族及种族 miR-196a2 T&gt;C(rs11614913)基因多态性频率分布比较

Table 2 The comparison of frequency distribution of miR-196a2 T&gt;C(rs11614913)gene Polymorphism among different ethnic and regional groups

组别	例数	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
		CC	CT	TT	C	T
非洲人*	226	164(72.6)	58(25.7)	4(1.8)	386(85.4)	66(14.6)
欧洲人*	222	76(33.6)	100(44.2)	50(22.1)	252(55.8)	200(44.2)
日本人*	172	30(17.4)	78(45.3)	64(37.2)	138(40.1)	206(59.9)
北京人	86	22(25.6)	38(44.2)	26(30.2)	82(47.7)	90(52.3)
广西人	303	69(22.8%)	15(52.5%)	75(24.8%)	297(49.0%)	309(51.0%)

非洲人、欧洲人、日本人 miR-196a2 T>C 基因型及等位基因频率与广西人群比较, \* $P < 0.05$

关, miR-196a2(rs11614913)与北印度人乳腺癌、肺癌等风险性密切相关<sup>[11-12]</sup>, miR-196a2 基因多态性会改变成熟 miR-196a2 的表达量而引起非霍奇金淋巴瘤<sup>[13]</sup>。刁吉东等<sup>[14]</sup>研究认为 miR-196a2 内的 SNP rs11614913 与中国皖南地区汉族人群支气管哮喘的发生有相关性。肖茗渊等<sup>[15]</sup>研究发现 miR-196a2(rs11614913)与中国华东地区人群系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)遗传易感性有关。miR-196a2 基因多态性通过结合到其同源异型基因 C8(HOXC8)靶基因就会增加中国儿童患急性淋巴细胞白血病的危险<sup>[16]</sup>。因此, 深入分析 miR-196a2 基因多态性在不同民族种族的分布规律, 有利于我们运用基因多态性去认识和解释更多疾病在不同种族民族人群中的发病率和发病机制。

本文采用单碱基延伸 PCR 技术和 DNA 测序技术对 303 例广西健康人群 miR-196a2 基因多态性进行研究, 统计其各自基因型和等位基因分布情况。分析结果表明 miR-196a2 均存在基因多态性, miR-196a2 T>C(rs11614913)存在 CC、CT、TT 3 种基因型。miR-196a2 T>C(rs11614913)以 CT 杂合子多见, 占 52.5%, 等位基因 T 多见, 占 51.0%, miR-196a CT(52.5%)均高于非洲人(25.7%)、欧洲人(44.2%)、日本人(45.3%)、北京人(44.2%), 原因可能是 miR-196a 基因多态性受各民族生活习惯及环境影响。miR-196a2 基因在广西健康男女人群中基因型和等位基因分布均无差异( $\chi^2$ 分别为 0.269 和 0.023,  $P$  均  $> 0.05$ )。miR-196a2 T>C 多

态性基因型及等位基因频率与非洲人、欧洲人、日本人比较有统计学差异意义( $\chi^2$ 分别为 141.34、7.73、8.43 和 148.23、4.45、6.64;  $P$  均小于 0.05), 但与中国北京人群无统计学差异( $\chi^2$ 分别为 1.910 和 0.050,  $P$  均大于 0.05), 与人类遗传学有关人类亲缘关系越近, 其基因型分布规律相似程度越高相符合。

以上研究表明, 广西健康人群 miR-196a2 基因型及等位基因与其他民族种族存在差异性, 正确分析其基因型在不同地区人群的分布特点, 为今后更深一步研究 miR-196a2 基因多态性在不同民族种族人群相关疾病的发病机制以及疾病的防治提供科学有效途径, 也为人类群体遗传学研究奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Yan H, Fang M, Liu XY. Role of microRNAs in stroke and poststroke depression [J]. Scientific World Journal, 2013, 2013: 459692.
- [2] Carissimi C, Fulci V, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity [J]. Autoimmun Rev, 2009, 8(6): 520-524.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression [J]. Genes Dev, 2004, 18(5): 504-511.
- [5] Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, et al. MicroRNAs in cancer management [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): e249-258.

- [6] Kang Z, Li Y, He X, et al. Quantitative assessment of the association between miR - 196a2 rs11614913 polymorphism and cancer risk: evidence based on 45, 816 subjects [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (7) : 6271-6282.
- [7] Zhou B, Dong LP, Jing XY, et al. Association between miR - 146aG>C and miR - 196a2C>T polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (8) : 7775-7780.
- [8] Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (2) : 420-430.
- [9] Gong J, Tong Y, Zhang HM, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(1) : 254-263.
- [10] Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(6) : 389-402.
- [11] Bansal C, Sharma KL, Misra S, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of breast cancer in the North Indian population [J]. *Ecancermedicalsecience*, 2014, 8:473.
- [12] Xu L, Tang W. The associations of nucleotide polymorphisms in mir - 196a2, mir - 146a, mir - 149 with lung cancer risk [J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15 (1) : 57-63.
- [13] Li T, Niu L, Wu L, et al. A functional polymorphism in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility to non-Hodgkin lymphoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5) : 3279-3284.
- [14] 刁吉东, 姜玉新, 赵蓓蓓, 等. pre - miR - 196a2 (rs11614913)、pre-miR-146a(rs2910164)基因多态性与中国皖南地区汉族人群支气管哮喘的相关性[J]. *牡丹江医学院学报*, 2015, 25(2) : 13-16.
- [15] 肖茗渊, 马怡, 陈兴国, 等. miR-499、miR-196a2、miR-149单核苷酸多态性与系统性红斑狼疮的关联性[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2015, 36(1) : 1-5.
- [16] Tong N, Xu B, Shi D, et al. Hsa-miR-196a2 polymorphism increases the risk of acute lymphoblastic leukemia in Chinese children [J]. *Mutat Res*, 2014, 759: 16-21.

## 2014年广州新塘地区手足口病病原体基因检测结果分析

杨勇<sup>1\*</sup> 孙伟<sup>2</sup> 李峥嵘<sup>3</sup> 王丹<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的** 了解2014年广州新塘地区手足口病病原体分布情况。 **方法** 采用实时荧光逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法对临床诊断为手足口病的患儿进行柯萨奇病毒A16型(coxsackievirus A16, CoxA16)、肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)及肠道病毒(enterovirus, EV)基因检测。 **结果** 病毒核酸阳性率为28.48% (1 225/4 301),其中CoxA16占20.73% (254/1 225),EV71占23.51% (288/1 225),EV占55.76% (683/1 225)。5月份就诊患儿最多,占22.20% (955/4 301);5岁以下的患儿占89.98% (3 870/4 301),男孩与女孩比例为1.62:1。 **结论** 2014年广州新塘地区手足口病病原体以EV为主,其次是EV71,主要分布于5岁以下儿童,5月份就诊患儿最多,男孩多于女孩。实时荧光RT-PCR方法在手足口病病原体检测中具有灵敏度高、简便、快捷、结果客观等优点,对手足口病的临床早期诊断、治疗及预防、控制具有重要意义,临床可推广、应用。

**[关键词]** 手足口病;柯萨奇病毒A组16型;肠道病毒71型;肠道病毒;逆转录-聚合酶链反应

Analysis on the gene detection results of hand-foot and mouth disease in the Guangzhou Xingtang area in 2014

YANG Yong<sup>1\*</sup>, SUN Wei<sup>2</sup>, LI Zhengrong<sup>3</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>

(1. Department of Dermatology, Hydropower Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511340; 2. Department of Clinical Laboratory, Hydropower Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511340; 3. Department of Paediatrics, Hydropower Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511340)

**[ABSTRACT]** **Objective** To find out the distribution of hand-foot and mouth disease (HFMD) pathogens in the Guangzhou Xingtang area in 2014. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect coxsackievirus A16 (CoxA16), enterovirus 71 (EV71) and enterovirus (EV) with HFMD. **Results** The positive rate of the viral nucleic acid was 28.48% (1 225/4 301), CoxA16 accounted for 20.73% (254/1 225), EV71 accounted for 23.51% (288/1 225), EV accounted for 55.76% (683/1 225). The peak of HFMD infection ratio was 22.20% (955/4 301) in May. Children under 5 years old accounted for 89.98% (3 870/4 301), the proportion of boys and girls was 1.62:1. **Conclusion** EV was the major pathogen in the Guangzhou Xingtang area in 2014, followed by EV71. The peak of HFMD was in May, mainly in children under the age of 5, and more prevalent in boys than girls. Real-time PCR can be used for pathogenic diagnosis of HFMD with the features of high sensitivity, simplicity, and efficiency, all of which play important roles in the early clinical diagnosis, treatment, prevention and control.

**[KEY WORDS]** Hand-foot and mouth disease; Coxsackie virus A16; Enterovirus 71; Enterovirus; Reverse transcription-polymerase chain reaction

作者单位:1. 广东省水电医院皮肤科,广东,广州 511340

2. 广东省水电医院检验科,广东,广州 511340

3. 广东省水电医院儿科,广东,广州 511340

\*通讯作者:杨勇, E-mail: yangyong1993@126.com

手足口病(hand-foot and mouth disease, HFMD)临床主要症状常表现为手、足、口腔等部位的斑丘疹、疱疹;多数呈良性过程,可治愈,少数可再发,但须高度警惕极少数中枢感染重症病例,预后差<sup>[1]</sup>。柯萨奇病毒 A16 型病毒(coxsackievirus A16, CoxA16)为本病常见的病原微生物,肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)和其他柯萨奇病毒(如 A5、A7、A9、A10、B3、B5)也可引起<sup>[2]</sup>。近年来,各地报告的病例数迅速增加,手足口病已成为重要的公共卫生问题。为了解广州新塘地区手足口病病原体分布情况,本文对 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 30 日到我院儿科门诊及皮肤科门诊就诊临床诊断为手足口病患儿进行柯萨奇病毒 A16 型(CoxA16)、肠道病毒 71 型(EV71)及肠道病毒(enterovirus, EV)基因检测,对其结果进行分析,为当地手足口病的早期临床诊断、治疗和预防、监测、控制提供一定的参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 检测对象及诊断标准

对象为 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 30 日在我院儿科及皮肤科就诊临床诊断为手足口病的患儿,

年龄范围 2 个月~8 岁,平均年龄 2.9 岁,男孩 2 661 例,女孩 1 640 例。诊断标准参照中国卫生部制订的《手足口病诊疗指南》(2010 年版)的诊断标准<sup>[3]</sup>。鉴于重症病例均转上级定点医院,因此不在本研究范围中。

### 1.2 取材方法

采集患儿发病 3 天内的咽拭子样本,用专用采样棉签,适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位,避免触及舌部及注意无菌操作。迅速将取材棉拭子置于采样管中,密闭。采集后的标本立即送检,不能立即检测的标本置于-20℃保存。

### 1.3 仪器与试剂

实验所用仪器为 DA7600 基因扩增仪。采用广州中山大学达安基因股份有限公司的柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂盒、肠道病毒 71 型核酸检测试剂盒、肠道病毒通用型核酸检测试剂盒进行核酸检测。核酸检测试剂盒以 *CoxA16*、*EV71*、*EV* 基因组编码区的高度保守区为靶区域,设计特异性引物及荧光探针,通过一步法实时荧光逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增对 *CoxA16* RNA、*EV71* RNA、*EV* RNA 进行定性检测。3 个试剂盒所用引物及荧光探针序列信息见表 1。

表 1 3 个试剂盒所用引物及荧光探针序列信息

Table 1 Primers and fluorescent probe sequence information for 3 kits

试剂盒	引物及荧光探针序列
肠道病毒通用型核酸检测试剂盒	上游引物:5'-GCAAGTCTGTGGCGGAACC-3' 下游引物:5'-TGTCACCATAAGCAGCCATGATA-3' 探针:AATAACAGGAAACACGGACACCCAAAGTA
肠道病毒 71 型核酸检测试剂盒	上游引物:5'-GTTACCTACATGCGCTTTGA-3' 下游引物:5'-TGGAGCAATTGTGGGACAAC-3' 探针:TCTTGCGTGACACCCACCG
柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂盒	上游引物:5'-CCTAAAGACTAATGAGACCACCC-3' 下游引物:5'-CTAAAGGCAGCACACAATTCG-3' 探针:CTTGTGCTTTCCAGTGTCCGGTGCA

### 1.4 样本处理与 RNA 提取

向无菌管中加入 5 mL 保存液,充分震荡摇匀,挤干棉拭子;充分振荡后离心,去掉部分上层液体直至剩余 100 μL,吸打混匀放置于 1.5 mL 灭菌离心管,加入 200 μL Trizol 试剂及 100 μL 氯仿,用振荡器强力振荡 20 s 后静置 3 min,然后 12 000 rpm 离心 2 min;小心吸取无色上层液体,转移至新

灭菌的 1.5 mL 离心管,然后加入 10 μL RNA 提取液 A(充分混匀后吸取),再用振荡器充分混匀,8 000 rpm 离心 1 min 后,小心弃去所有液体;加入溶液 C 400 μL,充分振荡混匀,8 000 rpm 离心 1 min,尽可能将液体去除干净;将装有沉淀的离心管于加热器中,60℃干燥 5 min,待沉淀物完全烤干,然后加入 30 μL DEPC H<sub>2</sub>O,吸打混匀管中沉

淀,得到白色的悬浊液,可直接用于检测。

### 1.5 PCR 扩增

反应体系:RT-PCR 反应液 15  $\mu$ L、逆转录酶 2  $\mu$ L、Taq 酶 3  $\mu$ L;上述 PCR 反应管中分别加入处理后的阴性质控品、待测样品混浊液、阳性质控品各 5  $\mu$ L,3 000 rpm 离心 30 s,放入 PCR 扩增仪。反应条件:40 $^{\circ}$ C 25 min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 3 min,1 个循环;93 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,40 个循环。

### 1.6 试验结果的判定

每次试验均检测阴性质控品、阳性质控品,满足质量控制要求时才进行检测结果的判定。阴性质控品:无典型 S 型扩增曲线或无 Ct 值。阳性质

控品:呈典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 30。阴性检测结果判定标准:无典型 S 型扩增曲线或 Ct 值 $>$ 35.1。阳性检测结果判定标准:扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 35.1。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计,计数资料采用  $\chi^2$  检验进行分析, $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 荧光定性 RT-PCR 检测曲线图

阳性检测结果扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 35.1。阴性检测结果无典型 S 型扩增曲线或 Ct 值 $>$ 35.1(图 1)。

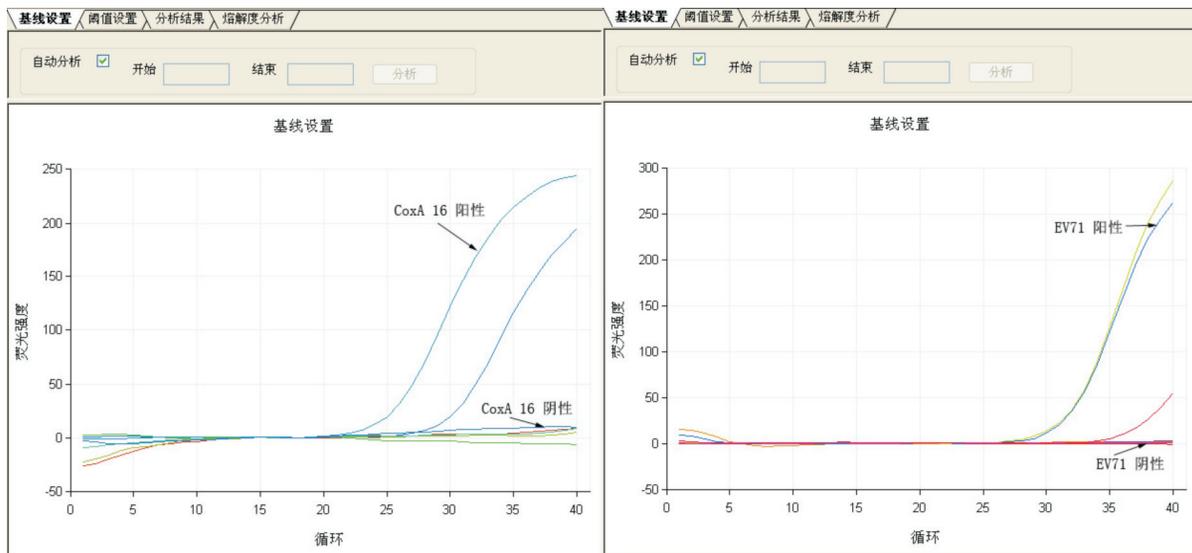


图 1 荧光定性 RT-PCR 检测曲线

Figure 1 The curve of RT-PCR

### 2.2 2014 年广州新塘地区各月份及季节 CoxA16、EV71、EV 检测结果

2014 年共收集标本 4 301 例,病毒核酸阳性率为 28.48% (1 225/4 301),其中 CoxA16 占 20.73% (254/1 225),EV71 占 23.51% (288/1 225),EV 占 55.76% (683/1 225);5 月份的就诊患儿最多占 22.20% (955/4 301)。春夏两季就诊患儿较多共计 3 372 例,秋冬两季就诊患儿较少共计 929 例。CoxA16 在不同季节流行情况的差异有统计学意义 ( $\chi^2=21.20, P < 0.05$ ),其中以春夏两季最高;EV71 在不同季节流行情况的差异有统计学意义 ( $\chi^2=20.26, P < 0.05$ ),其中以春夏两季最高;EV 在

不同季节流行情况的差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.49, P > 0.05$ )。具体结果见表 2、表 3。

### 2.3 手足口病不同性别感染情况

男孩 2 611 例,女孩 1 640 例,男孩多于女孩,男孩与女孩比例为 1.62:1。男孩阳性率为 29.95% (797/2 661),女孩阳性率 26.10% (428/1 640),差异有统计学意义 ( $\chi^2=7.40, P < 0.05$ )。CoxA16 阳性率男孩与女孩比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.07, P > 0.05$ ),EV71 阳性率男孩与女孩比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.05, P > 0.05$ ),EV 阳性率男孩与女孩比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.34, P > 0.05$ )。结果见表 4。

表2 2014年广州新塘地区各月份CoxA16、EV71、EV检测结果  
Table 2 The results of CoxA16、EV71 and EV during 2014 in Xintang, Guangzhou

月份	标本数 (例)	CoxA16		EV71		EV	
		阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)
1	35	4	11.43	0	0	4	11.43
2	45	2	4.44	3	6.67	8	17.78
3	204	19	9.31	13	6.37	38	18.63
4	789	56	7.10	80	10.14	146	18.50
5	955	62	6.49	49	5.13	107	11.20
6	769	45	5.85	70	9.10	107	13.91
7	408	30	7.35	30	7.35	79	19.36
8	247	16	6.48	12	4.86	49	19.84
9	370	16	4.32	12	3.24	70	18.92
10	231	2	0.87	5	2.16	32	13.85
11	108	2	1.85	4	3.70	19	17.59
12	140	0	0	10	7.14	24	17.14
合计	4 301	254	5.91	288	6.70	683	15.88

表3 2014年广州新塘地区各季节CoxA16、EV71、EV检测结果  
Table 3 The results of CoxA16、EV71 and EV in different seasons during 2014 in Xintang, Guangzhou

季节	标本数 (例)	CoxA16		EV71		EV	
		阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)
春	1 948	137	7.03	142	7.29	291	14.94
夏	1 424	91	6.39	112	7.87	235	16.50
秋	709	20	2.82	21	2.96	121	17.07
冬	220	6	2.73	13	5.91	36	16.36
合计	4 301	254	5.91	288	6.70	683	15.88

表4 手足口病不同性别感染情况  
Table 4 The different sexes infection of HFMD

年龄 (岁)	患儿数 (例)	阳性数 (例)	CoxA16		EV71		EV	
			阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)
0~1	974	246	18	1.85	21	2.16	207	21.25
1~5	2 896	931	228	7.87	255	8.81	448	15.47
5~	431	48	8	1.86	12	2.78	28	6.50
合计	4 301	1 225	254	5.91	288	6.67	683	15.88

#### 2.4 手足口病不同年龄段分布情况

按照手足口病患儿的年龄(0~1、1~5、5~)进行分组,在CoxA16病毒感染组中不同年龄组发病构成由低到高依次为0~1(1.85%)、5~(1.86%)、1~5(7.87%), $\chi^2=61.75, P < 0.05$ ;在EV71病毒感染组中不同年龄组发病构成由低到高依次为0~1(2.16%)、

5~(2.78%)、1~5(8.81%), $\chi^2=63.31, P < 0.05$ ;在EV病毒感染组中不同年龄组发病构成由低到高依次为5~(6.50%)、1~5(15.47%)、0~1(21.25%), $\chi^2=49.82, P < 0.05$ 。1岁以下患儿974例,1岁至5岁患儿2 896例,5岁以上患儿431例;5岁以下患儿3 870例,占89.98%(3 870/4 301)。结果见表5。

表5 手足口病不同年龄段分布情况  
Table 5 The distribution of different ages of HFMD

性别	患儿数 (例)	阳性数 (例)	CoxA16		EV71		EV	
			阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)	阳性数(例)	阳性率(%)
男	2 661	797	167	6.28	189	7.10	441	16.57
女	1 640	428	87	5.30	99	6.04	242	14.76
合计	4 301	1 225	254	5.89	288	5.30	683	15.88

### 3 讨论

手足口病于1957年新西兰首次报道,1958年分离出该病的常见病原体之一柯萨奇病毒A组16型,1959年被正式命名为手足口病,是一种全球性的儿童常见传染病之一。我国在2008年5月2日将该病作为第38种传染病列入《传染病防治法》按丙类传染病进行管理。

本次对广州新塘地区4 301例手足口病病原体进行检测分析,发现手足口病病原体病毒核酸检出率28.48%,其中CoxA16占20.73%,EV71占23.51%,EV占55.76%。EV71感染率略高于Cox16,以EV感染为主,这与近年来国内<sup>[4]</sup>国外<sup>[5-8]</sup>的资料相一致,提示在今后的临床工作中不能仅检测CoxA16和EV71,有条件的实验室应该开展其他肠道病毒的检测,以避免漏诊误诊的发生。疾病主要分布于5岁以下儿童,所以应该重视5岁以下儿童手足口病病毒检测和分型,可对进行疾病的早期诊断及治疗,有利于防止疾病的进一步恶化,能较好避免手足口病在本地区的流行爆发。男孩多于女孩(这可能与男孩生性好动活泼,与外界接触的途径较多有关)比例为1.62:1,与马占忠等<sup>[9]</sup>报道较接近。患儿数从3月份开始增多,5月份最多,4~6月为高峰,春夏两季就诊患儿比秋冬两季就诊患儿多,9月份以后才开始逐渐下降,分析原因可能与人群聚集、气温波动较大、阴雨天气增加有关,与邱惠芳等<sup>[10]</sup>、杨兴林等<sup>[11]</sup>报道相一致。其中重型病例按卫生主管部门要求均转上级定点医院治疗。

目前检测手足口病病原体有病毒分离、抗体检测和核酸检测等方法。病毒分离该法需时间长、耗费多,对标本的运送、保存等技术条件要求相当高,只能在极少数大型的医学研究中心应用,绝大部分医院不能开展,目前仅用于研究;酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent

assay, ELISA)法检测抗体经济快速,但由于病毒感染到抗体出现需要一段时间,且需要急性期与恢复期双份血清,用于疾病的早期诊断灵敏度不高<sup>[12]</sup>。RT-PCR利用荧光共振能量转移的原理,是一种相对比较简单分子生物学技术,具有特异性强、灵敏度高、速度快、定性准确、结果判断更为客观等优点,能及时检测手足口病病原体的特异性核酸,可满足疾病流行期间及时处理大量样本的需要,为手足口病的早期临床诊断、治疗和预防、监测、控制提供重要参考,具有良好的临床推广应用前景。

由于手足口病至今疫苗尚未研究成功,积极开展手足口病病原检测,提高早期病原学检测水平,有助于明确病原体不同时期分布特征及流行趋势,帮助本地区进行有针对性的控制预防。在手足口病流行季节,须加强疫情监测,重点在外来人群聚集区及托幼机构。对家长、幼儿园等托幼机构进行广泛有效的卫生知识宣传,早期发现、隔离患儿,帮助儿童养成良好的卫生习惯,以减少手足口病的发生与流行。

#### 参考文献

- [1] 吴志华. 临床皮肤性病学第1版[M]. 北京:人民军医出版社, 2011:187.
- [2] 张学军, 陆洪光, 高兴华. 皮肤性病学第8版[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014:70-71.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010年版)[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohyzs/83586/201004/46884.htm>, 2010-04-21/2015-12-31.
- [4] 顾红岩, 刘志达, 张玲, 等. 2013年北京地区手足口病住院患儿的病原分布及临床特点[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(6):459-463.
- [5] BrachoMA, González-Candelas F, ValeroA, et al. Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, (下转第187页)

## B族溶血性链球菌(GBS)感染对妊娠结局的影响

赵小娅\* 谢月英 周旭丽 谢纲 文佳 洪威

**[摘要]** **目的** 探讨妊娠晚期孕妇产前筛查B族溶血性链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)感染的临床价值及对妊娠结局的影响。 **方法** 以2014年1月至2014年12月在本院产科门诊就诊的4 091例妊娠晚期孕妇为研究对象,采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)检测是否感染GBS,以检测结果为阳性的孕妇为GBS阳性组,共225例,按1:1比例在检测结果为阴性孕妇中随机抽取225例作为阴性组,随访该2组孕妇的妊娠结局。 **结果** 4 091例孕妇GBS阳性检出率为5.4%(225/4 091)。GBS阳性组与阴性组比较,发生胎膜早破[20.4%(46/225)和11.1%(25/225)]、宫内感染[19.1%(43/225)和7.5%(17/225)]、新生儿感染[11.5%(26/225)和5.7%(13/225)]概率均明显增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。早产和难产发生率在GBS阳性和阴性孕妇中比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。 **结论** GBS感染会明显增加胎膜早破、宫内感染及新生儿感染的发生率,对妊娠结局造成不良影响,应对孕晚期孕妇常规进行GBS筛查。

**[关键词]** B族溶血性链球菌;实时荧光定量PCR;感染;妊娠结局;新生儿

Influence of group B *Streptococcus* (GBS) infection on pregnancy outcome

ZHAO Xiaoya, XIE Yueying, ZHOU Xuli, XIE Gang, WEN Jia, HONG Wei

(Department of Pathology, Xiangtan City Maternal and Child Health - Care Hospital, Xiangtan, Hunan, China, 411104)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the group B *Streptococcus* (GBS) infection rate in pregnant women during late pregnancy and its influence on pregnancy outcomes. **Methods** A total of 4 091 women in later stages of pregnancy who had regular antenatal examinations in the Xiangtan City Maternal and Child Health - Care Hospital were chosen from Jan. 2014 to Dec. 2014. The method of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was utilized to detect with the presence of GBS. A 1:1 matching case control study was carried out with 225 pregnant women positive of GBS and 225 women negative of GBS, and the pregnancy outcomes in the 2 groups were followed up. **Results** The late pregnancy GBS infection rate in 4 091 pregnant women was 5.4% (225/4 091). Compared with the GBS negative group, the GBS positive group had a higher incidence of premature rupture of membranes [20.4% (46/225) vs 11.1% (25/225)], intrauterine infection [19.1% (43/225) vs 7.5% (17/225)], neonatal infection [11.5% (26/225) vs 5.7% (13/225)], the difference were statistically significant ( $P<0.05$ ). There were no statistically significant differences in the premature birth and dystocia ( $P>0.05$ ). **Conclusions** Maternal GBS carrier in late gestation are more likely to have adverse pregnancy outcomes due to increased incidences of intrauterine infection, premature rupture of membranes and neonatal infections. It is necessary for women in later stages of pregnancy to take routine screening of GBS infection.

**[KEY WORDS]** Group B *Streptococcus* (GBS); Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR); Infection; Pregnancy outcome; Neonate

作者单位:湘潭市妇幼保健院病理科,湖南,湘潭 411104

\*通讯作者:赵小娅, E-mail:364973677@qq.com

B族溶血性链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)是孕妇生殖道感染的重要致病菌,20世纪70年代起,GBS被证实为新生儿及孕妇感染的主要原因<sup>[1-2]</sup>。正是由于GBS感染的严峻性,1990年美国疾病控制中心制定了GBS筛查和处理指南,美国妇产科协会、美国儿科协会建议对孕35~37周孕妇进行GBS产前检测,可有效降低新生儿早期败血症感染率达80%左右<sup>[3]</sup>。此观点渐渐引起了我国围生医学研究者的高度重视。自2014年起,本院采用实时荧光定量PCR技术(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)对晚期孕妇进行GBS感染检测,旨在探讨妊娠晚期GBS带菌状况及其对妊娠结局的影响,现报道如下:

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

2014年1月至2014年12月在本院产科门诊自愿接受GBS产前筛查的4 091例孕妇,年龄20~41岁,平均年龄28.1岁,孕34~39周,平均孕35.6周,一个月内未使用抗生素。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本采集

采集前先擦去外阴过多分泌物,将一根无菌棉拭子置孕妇阴道内旋转一周采集阴道下1/3的分泌物;再将另一根棉拭子置入肛门,在肛门括约肌上2~3 cm处轻轻取得直肠分泌物。标本置于加盖无菌试管中送检。

#### 1.2.2 检测方法

GBS RT-PCR检测试剂由福建泰普生物科学有限公司提供,荧光定量PCR仪为美国ABI公司7300Rt-PCR仪,按照B族链球菌抗酸检测试剂盒进行检测主要步骤如下:(1)样本前处理:在取样拭子管中加入1 mL B族链球菌检测清洗液,用震荡器高速震荡2 min制成标本悬浮液;取出全部样品放入1.5 mL离心管中,13 000 rpm离心5 min弃上清,加入1 mL B族链球菌检测清洗液;震荡重悬,13 000 rpm离心5 min弃上清;(2)核酸提取:沉淀用50  $\mu$ L清洗缓冲液重悬;加入提取固形物,高速涡旋震荡5 min破碎细胞。95 $^{\circ}$ C干浴2 min,立即冰浴2~5 min,13 000 rpm离心1 min,上清液用于PCR扩增。样本检测的其余操作步骤和PCR反应条件按照说明书进行。

### 1.2.3 诊断标准

(1)宫内感染:产时产妇发热、体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ;产妇脉搏 $> 100$ 次/min;胎儿心动过速,胎心率持续 $> 160$ 次/min,孕妇末梢血白细胞计数 $> 15.0 \times 10^9/\text{L}$ ,中性粒细胞比例明显增高;子宫压痛;羊水有臭味,符合以上任何2项者诊为宫内感染<sup>[4]</sup>。(2)新生儿感染:孕妇有宫内感染、胎膜早破等高危因素,新生儿体温升高及体温不升,肤色苍白,精神萎靡,拒奶、呕吐等临床表现,末梢血白细胞计数 $> 25.0 \times 10^9/\text{L}$ 。

### 1.3 统计学处理

所有资料应用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,计数资料以率表示,采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 妊娠晚期孕妇GBS感染率

4 091例孕检孕妇中,GBS阳性225例,阳性率为5.4%,部分样本实时荧光定量PCR扩增结果见图1。

### 2.2 妊娠妇女的一般情况

检测结果阳性孕妇作为GBS阳性组,共225例,按1:1比例在检测结果为阴性孕妇中随机抽取225例作为阴性组。GBS阳性组平均年龄26.9岁,平均孕35.5周;GBS阴性组平均年龄27.3岁,平均孕35.7周,两组年龄、孕周情况比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具体结果见表1。

### 2.3 GBS阳性组和阴性组孕妇的妊娠结局

GBS阳性组对用药顾虑未予抗生素干预治疗。GBS阳性组孕妇胎膜早破、宫内感染及新生儿感染率发生率较阴性组明显增高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而两组孕妇早产、难产发生率比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果详见表2。

## 3 讨论

GBS是一种革兰氏阳性链球菌,寄居于阴道和直肠,20世纪60年代首次发现其可以导致严重的新生儿感染,随后进行了大量的研究,发现GBS在围产期感染中是第一位的致病菌,可以导致围产儿死亡<sup>[5]</sup>,同时可以明显增加宫内感染的发生率,给母儿预后造成严重威胁。西方国家一直以来对其非常重视,美国疾病控制中心制订的GBS

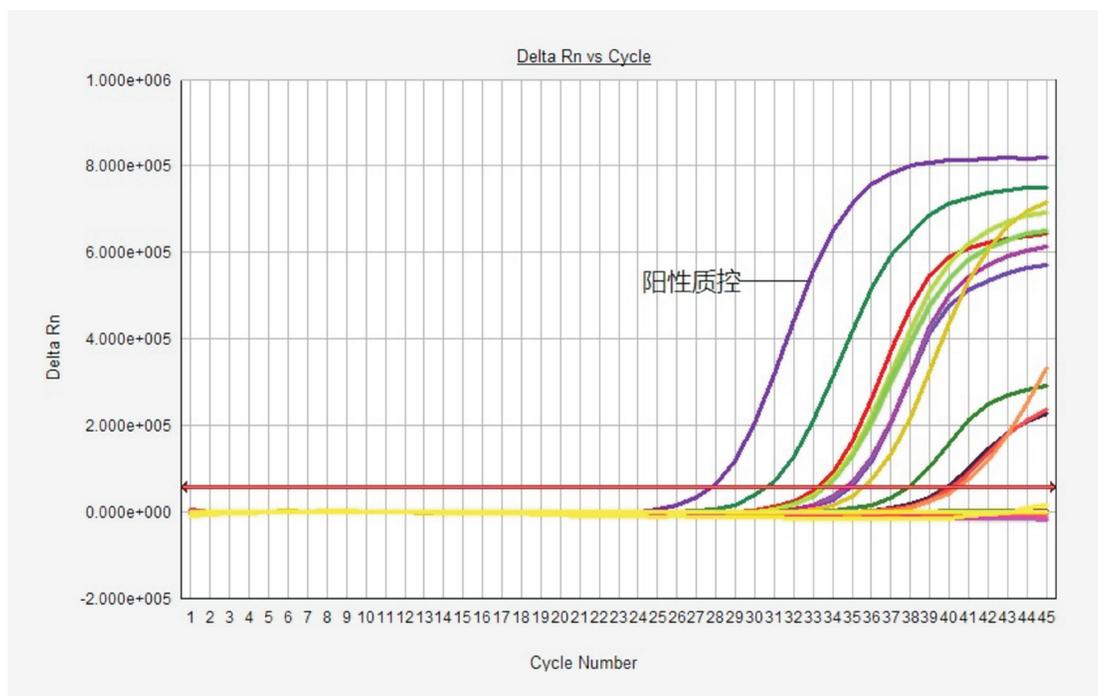


图1 RT-PCR方法样本扩增结果

Figure 1 Amplification curves of samples by RT-PCR

表1 2组妊娠妇女的一般情况

Table 1 Information for the 2 groups of pregnant women

一般情况	GBS 阳性组 (225 例)	GBS 阴性组 (225 例)	P
平均年龄(岁)	26.9	27.3	0.156
平均孕周(周)	35.5	35.7	0.370

表2 GBS 阳性与阴性组孕妇妊娠结局比较

Table 2 Comparison of the outcomes between the GBS-positive and GBS-negative cases

组别	例数	胎膜早破	宫内感染	新生儿感染	早产	难产
GBS(+)	225	46(20.4%)	43(19.1%)	26(11.5%)	33(14.6%)	3(1.3%)
GBS(-)	225	25(11.1%)	17(7.5%)	13(5.7%)	26(11.5%)	4(1.7%)
$\chi^2$		7.3 749	13.0 000	4.7 445	0.9 558	0.0 000
P 值		0.007	0.000	0.029	0.328	0.703

筛查和处理指南<sup>[5]</sup>已经很大程度上减少了围产期 B 族链球菌感染的发生率和危害。对于妊娠孕妇 GBS 带菌率文献报道各不相同,孕期 GBS 感染率在东西方国家一直存在较大差异,以美国及北欧为首的发达国家中,GBS 几乎成为围产期感染的主要致病菌,感染率为 5%~35%<sup>[6]</sup>,另有研究报道为 10%~30%<sup>[6-7]</sup>。

我国目前产妇 GBS 带菌情况尚不作为常规检

查,也无大标本的流行病学资料,但有条件的地区已经在做筛查和诊断性检查。马延敏等<sup>[8]</sup>报道北京地区孕妇 GBS 感染率为 11.07%;陈慧慧等<sup>[9]</sup>检测上海地区 992 名孕妇带菌率为 3.70%,黄永健等<sup>[10]</sup>报道江西地区孕妇 GBS 感染率为 8.76%。本研究采用 RT-PCR 对 4 091 例晚孕期孕妇进行检测,GBS 感染率为 5.4%,稍高于陈慧慧等的报道,但低于全国其他地区的报道。孕妇的 GBS 带菌率

受很多因素影响,如检测方法,以往常用的筛查方法是细菌培养,但是细菌培养耗时长,假阳性率高。另外,阴道菌种和菌落的可变性。例如,35周或更早的检查结果是阴性,但在分娩前可出现GBS感染。同时,不同人群由于社会经济和卫生保健水平的不同,孕妇GBS带菌率也会存在较大差异。

本研究结果发现,GBS阳性组妊娠晚期孕妇发生胎膜早破、宫内感染概率明显增高,这是由于GBS可上行感染胎膜,通过炎症细胞的吞噬作用及细菌产生的蛋白水解酶的直接侵袭,使胎膜局部张力减少,从而导致胎膜早破,病原微生物可上行入侵宫腔,引起羊水、胎膜、胎盘感染,即宫内感染。同时,GBS感染也将增加新生儿感染的风险,这与其他研究者<sup>[8-9]</sup>的报道相符。本研究中早产的发生率阳性组稍高于阴性组,但差异无统计学意义,可能与取样孕周定在35周以后,已将大部分早产排除在外,同时也可能与样本量少有关。近年来,RT-PCR因灵敏性和特异性高、稳定、及时、检测时间短,操作方便等优势,已成为临床筛查GBS的热门方法<sup>[11]</sup>。然而,在妊娠期孕妇GBS筛查之后预防性治疗方面还存在较多问题,有报道指出孕妇产时应使用预防抗生素以应对新生儿GBS感染<sup>[12]</sup>。但事实上尽管进行预防性治疗防治GBS感染,新生儿发病率和死亡率仍然很高,包括分娩期抗生素治疗实施不当、抗生素耐药等。面对中国庞大的患者群,如何进行筛查普及和预防性的治疗,以及如何避免过度治疗都是需要慎重考虑的。

#### 参考文献

- [1] Pettrsson K. Perinatal infection with group B streptococci[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2007, 12(3):193-197.
- [2] Ahmadzia HK, Heine RP. Diagnosis and management of group B streptococcus in pregnancy[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2014, 41(4):629-647.
- [3] Jordan HT, Failey MM, Craig A, et al. Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2008, 27(12):1057-1064.
- [4] Sweet RL, Gibbs RS. Infectious diseases of the female genital tract, fifth edition[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(7):1076.
- [5] 林穗青,程蔚蔚. 晚期妊娠宫内感染253例临床分析[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2012, 28(12):935-937.
- [6] Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, et al. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87(3):260-271.
- [7] Park JS, Cho DH, Yang JH, et al. Usefulness of a rapid real-time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization[J]. *Ann Lab Med*, 2013, 33(1):39-44.
- [8] 马延敏,吴连方,黄醒华,等. 孕妇B族溶血性链球菌带菌与母婴预后的探讨[J]. *北京医学*, 2005, 27(9):516-518.
- [9] 陈慧慧,范建霞,陆庭嫣,等. 孕妇B族溶血性链球菌感染对母婴的影响[J]. *上海医学*, 2009, 32(2):128-130.
- [10] 黄永健,陈波,张勇,等. 孕晚期妇女B族链球菌PCR检测结果分析[J]. *江西医药*, 2013, 48(7):581-584.
- [11] Morozumi M, Chiba N, Igarashi Y, et al. Direct identification of *Streptococcus agalactiae* and capsular type by real-time PCR in vaginal swabs from pregnant women[J]. *J Infect Chemother*, 2015, 21(1):34-38.
- [12] Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet*, 2012, 379(9815):547-556.

## 促排卵药雷洛昔芬对小鼠着床窗期子宫内膜COX-2和LPAR3表达的影响

冼英杰\* 陈彩蓉 周秀琴 颜秋霞 梁小青 赵晓英

**[摘要]** 目的 通过分析新促排卵药雷洛昔芬(raloxifene, RAL)对着床窗期小鼠子宫内膜容受性标志物环氧合酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)和溶血磷脂酸受体3(lysophosphatidic acid receptor 3, LPAR3)表达的影响,探讨雷洛昔芬是否损害小鼠子宫内膜容受性。方法 雌性昆明系小鼠60只,随机分为RAL用药促排卵组和自然受孕对照组。在雌鼠妊娠第4.5 d,采用免疫组化法检测COX-2和LPAR3在2组雌鼠子宫内膜中的表达。结果 COX-2、LPAR3 2个因子在RAL用药组和自然受孕对照组小鼠中的表达均无显著性差异, $P>0.05$ 。结论 通过RAL用药来进行促排卵,对着床期小鼠子宫内膜COX-2和LPAR3表达水平的影响不明显,对子宫内膜容受性未发现产生不良损伤。

**[关键词]** 雷洛昔芬; 环氧合酶2; 溶血磷脂酸受体3; 表达

Effects of ovulation induction by raloxifene treatment on the expression of COX-2 and LPAR3 in mouse uterine endometrium during periimplantation period

XIAN Yingjie\*, CHEN Cairong, ZHOU Xiuqin, YAN Qiuxia, LIANG Xiaoqing, ZHAO Xiaoying

(Reproductive Medicine Center, People's Hospital of Qingyuan, Qianyuan, Guangdong, China, 511500)

**[ABSTRACT]** Objective To explore the effect of ovulation induction by raloxifene treatment on endometrial receptivity by detection of the expression of COX-2 and LPAR3 in mouse endometrium during peri-implantation period. Methods 60 female non-pregnant Kunming mice were randomly divided into the RAL treatment group and the normal control group (natural conception). 4.5 days following pregnancy, the expression of COX-2 and LPAR3 in mouse endometrium was detected by immunohistochemical staining. Results There were no significant differences in the expression of COX-2 and LPAR3 in mouse endometrium between the RAL group and the normal controlled group. Conclusion Raloxifene treatment for ovulation induction does not change the expression of COX-2 and LPAR3 in mouse endometrium significantly, and has no harmful effects on the endometrial receptivity.

**[KEY WORDS]** Raloxifene(RAL); Cyclooxygenase-2 (COX-2); Lysophosphatidic acid receptor 3 (LPAR3); Expression

伴随着社会、生活和环境的变化,不孕不育已成为困扰部分人群的烦恼问题。近年来,体外受精-胚胎移植技术(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)得到快速发展与临床应用<sup>[1]</sup>。它

是指分别将卵子与精子从人体内取出进行体外受精,形成胚胎后再移植回母体子宫,让其继续发育至出生的一种辅助生殖技术。而成功实施该项技术有2个关键,一是通过控制性促排卵得到高质量

基金项目:清远市科技计划项目(2013B015)

作者单位:清远市人民医院生殖医学中心,广东,清远 511500

\*通讯作者:冼英杰, Email: xian2379180@126.com

的卵子,通过体外受精形成优质胚胎;另一关键是子宫内膜拥有良好的容受性,使胚胎能够成功植入,获得临床妊娠<sup>[2]</sup>。目前如克罗米芬(clomiphene citrate, CC)等常用的促排卵药,在临床上取得了很好的促排卵效果,但也均被发现会出现一些副作用,如影响子宫的容受性及精卵的种植效果等,导致低妊娠率<sup>[3-4]</sup>。

雷洛昔芬(raloxifene, RAL)为第2代选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulator, SERM),已获得了美国食品与药品管理局的许可,成为治疗绝经后妇女骨质疏松症和浸润性乳腺癌的新药<sup>[5]</sup>。日前,RAL被发现具有与传统药物克罗米芬具有相似的促排卵功效,但该药的促排卵应用在在国内外尚处于初步探索阶段,它对子宫内膜容受性的影响在国际上尚无定论<sup>[6]</sup>。据研究发现,子宫内膜分子标志物如环氧合酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)和溶血磷脂酸受体3(lysophosphatidic acid receptor 3, LPAR3)的表达水平能很好地反映子宫内膜的容受性状况<sup>[7-8]</sup>。本研究拟通过检测 RAL 用药对受孕小鼠着床窗期子宫内膜因子 COX-2 和 LPAR3 表达的变化,来探讨 RAL 对子宫内膜容受性的影响,从而为 RAL 在临床促排卵治疗中的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取由广东省实验动物中心提供的6周龄、体重20~24 g、未曾受孕的昆明系白小鼠90只(其中雌鼠60只、雄鼠30只),随机将雌鼠分成RAL给药促排卵组和自然周期正常对照组,每组30只雌鼠。让小鼠在环境温度 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%~80%、控光(每天于8:00~20:00间光照12 h)条件下,自由摄食和饮水。

### 1.2 材料与方法

#### 1.2.1 动物给药方法

每天上午8:30~9:00在雌鼠的第3个动情周期前期,对其进行灌胃。对于给药组的小鼠,用1 mL含0.97 mg/mL RAL(购自礼来苏州制药有限公司,规格为60 mg $\times$ 7片装/盒)的生理盐水溶液灌胃,每天给一次,连续2天。对于正常对照组的小鼠,用1 mL不含药物的生理盐水灌胃。

#### 1.2.2 子宫内膜标本获取

2天(即2次用药)后的下午17:00,分别往每只雌鼠腹腔注射5单位的人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)来诱发排卵,按雌雄1:1合笼。次晨7:00发现阴道栓者即定为妊娠第1d,计为D1;在D4.5时,采用脱臼法处死各组雌鼠,分离子宫。子宫内膜用10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋,制成蜡块切片。

#### 1.2.3 免疫组化检测

用免疫组化法检测子宫内膜组织中 LPAR3 和 COX-2 蛋白表达水平。石蜡块切片常规脱蜡至水,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温处理 10 min,蒸馏水洗涤 3 次;热修复抗原,PBS 洗涤 2 次。室温封闭 30 min 后,分别加入兔抗 COX-2 抗体(ab52237,购于 Abcam 公司)、兔抗 LPAR3 抗体(ab75732,购于 Abcam 公司),4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,PBS 洗涤 3 次;加入相应的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$  30 min,PBS 液冲洗 3 次;然后用 DAB 显色,充分水洗;苏木素复染后,脱水,透明,封片。组织切片染色情况由 2 位高年资病理医师采用双盲法进行评判。每例切片均选择 10 个高倍视野,腺上皮细胞中呈棕黄色颗粒为阳性表达;根据细胞的染色强度,把全部切片的染色结果评定为-(浅蓝色)、+(浅黄色)、++(棕黄色)、+++ (棕褐色),如图 1。

### 1.3 统计分析

采用 SPSS17.0 统计分析软件进行数据分析。两组间计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验,以双侧  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

免疫组化结果显示,COX-2 与 LPAR3 均主要分布于子宫内膜腺上皮细胞的胞浆中;而且,在着床窗期,RAL 用药组与正常对照组雌鼠子宫内膜腺上皮的 COX-2 表达水平没有显著的差异( $P > 0.05$ );两组雌鼠子宫内膜腺上皮 LPAR3 的表达水平也差别不明显( $P > 0.05$ ),见图 1 与表 1。

## 3 讨论

在过去的 50 多年中,CC 一直是促排卵治疗的一线药物。它是一种 SERM,具有弱的雌激素作用,通过阻断下丘脑和垂体上的雌激素受体部位的负反馈抑制而刺激垂体促性腺激素的分泌,从

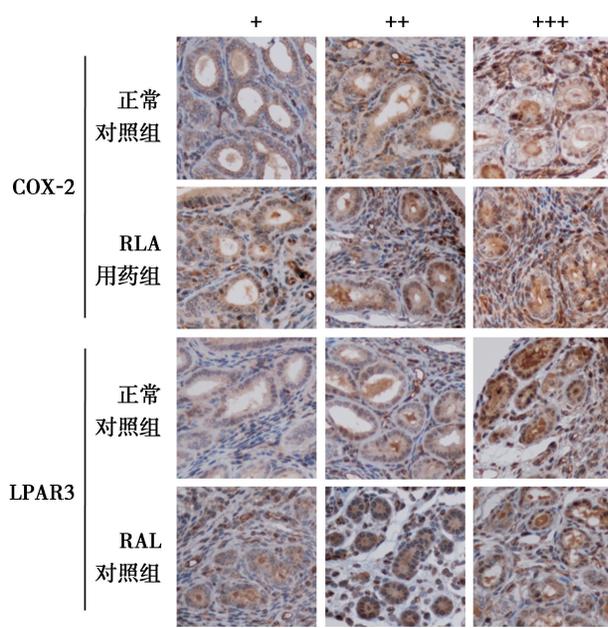


图1 免疫组化检测不同组雌鼠着床窗期子宫内膜的COX-2、LPAR3表达情况

Figure 1 Expression of COX-2 and LPAR3 in endometrium of female mice during periimplantation in different groups by immunohistochemical staining

表1 不同组雌鼠着床窗期子宫内膜的COX-2、LPAR3表达情况比较

Table 1 Comparison of the expression of COX-2 and LPAR3 in endometrium of female mice during periimplantation in different groups

	分组	染色强度占比(%)			P
		+	++	+++	
COX-2	正常对照组	3(10.0)	6(20.0)	21(70.0)	0.817
	RAL用药组	4(13.3)	6(20.0)	20(66.7)	
LPAR3	正常对照组	2(6.7)	7(23.3)	21(70.0)	0.669
	RAL用药组	3(10.0)	5(16.7)	22(73.3)	

雌性小鼠会出现多方面的生殖功能障碍,如排卵障碍、卵子受精率下降、胚胎着床及子宫蜕膜化障碍等<sup>[7]</sup>。LPAR3是一种G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR),通过结合溶血磷脂酸在哺乳动物生殖过程中发挥重要作用,与胚胎植入功能密切相关<sup>[14]</sup>。而且,LPAR3基因缺陷的小鼠与临床表现与COX-2基因缺陷的小鼠类似。敲除LPAR3基因的小鼠,COX-2的表达也显著降低。LPAR3还可能通过COX-2-前列腺素途径来影响胚胎的着床。因此,COX-2与LPAR3是2个预测子宫内膜容受性的良好参考指标<sup>[7,14]</sup>。本

而诱导卵泡的发育和排卵;但另一方面,CC也会对子宫和宫颈产生抗雌激素的副作用,进而导致子宫内膜过薄及宫颈粘液粘稠,对子宫内膜容受性具有抑制作用,导致其高排卵率和低妊娠率<sup>[9-10]</sup>。

RAL属于第2代SERM,已被用于治疗绝经后妇女骨质疏松症,并可降低浸润性乳腺癌的发病风险<sup>[11]</sup>。已有研究表明,RAL也通过竞争性结合下丘脑雌激素受体,抑制雌激素对下丘脑的负反馈作用,促进内源性卵泡刺激素和黄体生成素的释放及卵泡生长<sup>[12]</sup>。而在体外细胞实验中,RAL表现为雌激素拮抗作用或中立作用<sup>[13]</sup>。RAL的半衰期(32.5 h)较短,经口服后绝大部分体内的RAL及其代谢物在5 d内排出,对子宫内膜增殖的影响有限;至胚胎着床期,RAL已被清除干净,在促排卵治疗中对子宫内膜的影响不大。

信使因子COX-2是花生四烯酸合成前列腺素的关键酶,而前列腺素在胚胎着床、生长发育过程中起重要作用。因此,COX-2可通过影响前列腺素的合成调节女性生殖功能。COX-2基因缺陷的

研究发现,COX-2、LPAR3 2个因子标志物在RAL用药组和自然受孕对照组小鼠中的表达均无显著性差异。这提示使用RAL进行促排卵治疗并未降低着床窗期小鼠子宫内膜的COX-2和LPAR3表达,对子宫内膜容受性未产生明显损害。最近也有研究发现,RAL对子宫内膜的厚度也没有不良损伤<sup>[15]</sup>。因此,RAL是一种温和、安全、有效的促排卵新药。当然,使用RAL进行促排卵的应用研究在国内外生殖医学领域刚刚起步,尚处于摸索阶段,有待通过更广泛的临床研究及更深入的药效机制来加以探讨。

## 参考文献

- [1] Shih FF, Chen CH, Chiao CY, et al. Comparison of pregnancy stress between in vitro fertilization/embryo transfer and spontaneous pregnancy in women during early pregnancy [J]. *J Nurs Res*, 2015, 23(4): 280-289.
- [2] Cheng LY, Lin PY, Huang FJ, et al. Ectopic pregnancy following in vitro fertilization with embryo transfer: a single-center experience during 15 years [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2015, 54(5): 541-545.
- [3] Oktem M, Guler I, Erdem M, et al. Comparison of the effectiveness of clomiphene citrate versus letrozole in mild IVF in poor prognosis subfertile women with failed IVF cycles [J]. *Int J Fertil Steril*, 2015, 9(3): 285-291.
- [4] Badawy A, Gibreal A. Clomiphene citrate versus tamoxifen for ovulation induction in women with PCOS: a prospective randomized trial [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 159(1): 151-154.
- [5] Silverman S, Christiansen C. Individualizing osteoporosis therapy [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(3): 797-809.
- [6] de Paula GNE, Savaris RF, von Eye CH, et al. Prospective, randomized comparison between Raloxifene and clomiphene citrate for ovulation induction in polycystic ovary syndrome [J]. *Fertility and Sterility*, 2011, 96(3): 769-773.
- [7] Blitek A, Mendrzycka AU, Bieganska MK, et al. Effect of steroids on basal and LH-stimulated prostaglandins F(2 alpha) and E(2) release and cyclooxygenase-2 expression in cultured porcine endometrial stromal cells [J]. *Reprod Biol*, 2007, 7(1): 73-88.
- [8] Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(3): 522-529.
- [9] Satirapod C, Wingprawat S, Jultanas R, et al. Effect of estradiol valerate on endometrium thickness during clomiphene citrate-stimulated ovulation [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(1): 96-101.
- [10] Nelson LM, Hershlag A, Kurl RS, et al. Clomiphene citrate directly impairs endometrial receptivity in the mouse [J]. *Fertil Steril*, 1990, 53(4): 727-731.
- [11] Silverman S, Christiansen C. Individualizing osteoporosis therapy [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(3): 797-809.
- [12] Heringa M. Review on raloxifene: profile of a selective estrogen receptor modulator [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2003, 41(8): 331-345.
- [13] Bläuer M, Heinonen PK, Rovio P, et al. Effects of tamoxifen and raloxifene on normal human endometrial cells in an organotypic in vitro model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 592(1-3): 13-18.
- [14] Diao H, Li R, El ZAE, et al. Deletion of lysophosphatidic acid receptor 3 (Lpar3) disrupts fine local balance of progesterone and estrogen signaling in mouse uterus during implantation [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(5): 123.
- [15] Tremollieres F, Ribot C. Raloxifene in postmenopausal women [J]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2006, 34(2): 147-153.

## NT-proBNP 在小儿病毒性心肌炎诊断和心功能评估中的应用

李舟文\*

**[摘要]** **目的** 检测血浆 B 型钠尿肽前体(precursor of B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)在小儿病毒性心肌炎患者中的浓度水平,探讨将其作为评价小儿病毒性心肌炎诊断及心功能状态的价值。**方法** 门诊及住院病毒性心肌炎患儿 68 例,对照组 109 例。运用电化学发光免疫技术测定 NT-proBNP 浓度,超声心动图检测左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及左室缩短分数(left ventricular fraction of shortening, LVFS),根据改良 ROSS 评分对患儿心肌炎进行心功能分级。**结果** 病毒性心肌炎组 NT-proBNP 水平( $2\ 870\pm 492$  pg/mL)明显高于对照组( $156\pm 45$  pg/mL),两组之间差异有统计学意义( $P<0.01$ ),血浆 NT-proBNP 水平与 LVFS、LVEF 呈负相关,血浆 NT-proBNP 水平与心衰严重程度呈正相关。**结论** 血浆 NT-proBNP 水平可以反映病毒性心肌炎患儿左室功能不全的情况,可协助病毒性心肌炎的诊断,可用于该类患儿心功能的评估。

**[关键词]** B 型钠尿肽前体;小儿病毒性心肌炎;诊断;心功能评估

Application of precursor of B - type natriuretic peptide for the diagnosis of viral myocarditis and assessment of heart function in children

LI Zhouwen\*

(Clinical Skills Center Diagnostics Teaching Group, Medical College of Jiaying University, Meizhou, Guangdong, China, 514031)

**[ABSTRACT]** **Objective** To discuss the value of the precursor of B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) for assessment of viral myocarditis and heart function in children. **Methods** The plasma NT-proBNP level was measured by electrochemiluminescence and both of the left ventricular ejection fraction (LVEF) and the left ventricular (LVFS) were assessed by echocardiography in 68 children with viral myocarditis and 109 healthy children. The patients were provided cardiac function grading according to the modified ROSS score. **Results** There were significant differences among viral myocarditis cases and healthy cases. The level of NT-proBNP in the former ( $2\ 870\pm 492$  pg/mL) was higher than in the later ( $156\pm 45$  pg/mL). Plasma NT-proBNP level was negatively correlated with the level of LVFS and LVEF, while it was positively correlated with the severity of cardiac function. **Conclusion** The level of plasma NT-proBNP could reflect the left ventricular dysfunction in viral myocarditis children, and it may be used in diagnosing the viral myocarditis and assessing ventricular dysfunction.

**[KEY WORDS]** Precursor of B-type natriuretic peptide(NT-proBNP); Viral myocarditis in children; Diagnosis; Evaluation of cardiac function

作者单位:嘉应学院医学院临床技能中心诊断学教学组,广东,梅州 514031

\*通讯作者:李舟文, E-mail:lightframe2005@126.com

病毒性心肌炎是儿科临床常见心脏疾病,目前常用的生化检测指标包括肌酸激酶同工酶,肌钙蛋白I等<sup>[1]</sup>。B型钠尿肽(brain natriuretic peptide, BNP)是近年发现的一个非常重要的心脏激素,由心室肌细胞分泌的脑钠肽前体(precursor of brain natriuretic peptide, proBNP)降解形成。proBNP的降解也产生无活性的代谢产物B型钠尿肽前体(precursor of B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)。NT-proBNP是近年来研究较多的反映心脏功能的指标<sup>[2]</sup>。本文主要讨论NT-proBNP与小儿病毒性心肌炎的相关性及其与心功能分级的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集广东省梅州市人民医院2013年8月至2015年3月门诊及住院病毒性心肌炎患儿共68例,男39例,女29例。年龄2~12岁,平均年龄6.5岁。所有患儿需做胸部CT、心电图、心脏彩超检查。诊断均符合1999年9月昆明全国小儿心血管病学术会议修订的小儿病毒性心肌炎诊断标准<sup>[3]</sup>。同时根据改良ROSS评分对患儿心肌炎进行心功能分级<sup>[4]</sup>:0~2分为无心衰,3~6分为轻度心衰,7~9分为中度心衰,10~12分为重度心衰。对照组109例均为同期来医院门诊健康查体的正常儿童,排除病毒感染和心脏病史,男59例,女50例,年龄2~12岁,平均年龄7岁。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本收集与处理

入院2h内外周静脉采血,注入普通的真空采血管中,放置,摇匀,立即低温离心(3 000 rpm/min)10 min,取血浆分装,-20℃保存,2h内测定NT-proBNP浓度。NT-proBNP浓度采用法国梅里埃试剂盒,运用电化学发光免疫技术在梅里埃全自动免疫荧光分析仪上测定。测定线性范围20~25 000 pg/mL(2.4~3 000 pmol/L)。

#### 1.2.2 超声心动图检查

超声心动图是检测心功能及心室负荷的指标,于入院后24h内进行超声心动图检查,检测仪器采用飞利浦公司的Sonos5500超声诊断仪,2.5 MHz探头进行检查。参照美国心脏病协会(the

American Heart Association, AHA)推荐方法,取心尖四腔心切面,用改良的Simpson单平面法计算左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及左室缩短分数(left ventricular fraction of shortening, LVFS)。所有数据均连续测量4个心动周期取平均值。

#### 1.2.3 统计学分析

运用SPSS 13.0统计学软件对数据进行分析,对各组数据先进行正态分布检验,非正态分布数据分析采用非参数统计方法。两组间比较用Mann-Whitney-U检验,相关分析用Spearman相关分析。

## 2 结果

### 2.1 对照NT-proBNP水平

109例正常对照儿童,NT-proBNP呈偏态分布,分布范围为43.2~316.6 pg/mL,97.5%上限为211.2 pg/mL,3例正常对照儿童NT-proBNP超过211.2 pg/mL,其特异性为97.3%。病毒性心肌炎患儿组血浆NT-proBNP呈偏态分布,分布范围为176~11 059 pg/mL,97.5%上限为8 795 pg/mL,1例患儿NT-proBNP低于211.2 pg/mL,其敏感性为98.5%。病毒性心肌炎组NT-proBNP水平明显高于对照组,两组之间差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.2 血浆NT-proBNP水平与超声心动图心功能指标的关系比较

血浆NT-proBNP水平与左室心功能指标的关系发现,随着患儿病情的好转,LVEF与LVFS逐渐升高,心功能逐渐恢复,NT-proBNP水平逐渐下降,进行相关性分析显示,血浆NT-proBNP水平与LVFS呈负相关( $r=-0.61, P=0.008$ ),与LVEF亦呈负相关( $r=-0.67, P=0.007$ ),且衰竭程度越高,LVEF越低,NT-proBNP升高越为显著,结果见表1。NT-proBNP联合心脏超声检查指标,如LVEF、LVFS,可提高对小儿病毒性心肌炎发生心功能衰竭诊断的敏感性及特异性,对小儿病毒性心肌炎心衰的诊断意义重大。

### 2.3 血浆NT-proBNP与心功能分级的关系

根据改良ROSS评分标准,不同心功能衰竭级别组间NT-proBNP均存在明显差异( $P<0.05$ ),且随着心衰级别的升高,NT-proBNP值逐级升高。血浆NT-proBNP水平重度心衰组高于中度心衰

表1 血浆 NT-proBNP 浓度水平及超声心动图指标比较( $\bar{x} \pm s$ )Table 1 Comparison of the concentration levels and echocardiographic indexes of plasma NT-proBNP  $\bar{x} \pm s$ 

组别	例数	年龄(岁)	LVEF(%)	LVFS(%)	NT-proBNP(pg/mL)
心肌炎组	68	6.5±4	36±15*	22±9*	2870±492*
对照组	109	7±3	53±12	42±7	156±45

\*与对照组比较,  $P < 0.05$ 

组,中度心衰组高于轻度心衰组,轻度心衰组高于无心衰组,无心衰组与正常对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。相关性分析显示,NT-proBNP与心功能 ROSS 评分级别呈正相关,结果见表2。表明血浆 NT-proBNP 浓度变化,能够实时地反应心功能情况,适用于临床及时、准确的评估小儿病毒性心肌炎心脏功能。

表2 心功能不同的各组 NT-proBNP 水平比较

Table 2 Comparison of NT-proBNP levels in groups with different cardiac functions

项目	例数	NT-proBNP(pg/mL)
正常组	109	245±62
无心衰组	13	302±73
轻度心衰组	28	852±389*
中度心衰组	19	2 859±435*
重度心衰组	8	8 285±559*

\*与上一组比较,  $P \leq 0.05$ 

### 3 讨论

proBNP 是由心室合成和分泌的神经内分泌激素,是因心脏疾病使心肌收缩乏力,或心腔负荷过重导致心壁被拉伸时由心脏释放到血液中的化学物质。proBNP 从心脏释放到血液中就会分割为 NT-proBNP 和 BNP。NT-proBNP 在生物学上不活跃,半衰期为 60~120 min,可追踪的时间多达 24 h。由于半衰期长,因此 NT-proBNP 的稳定性为相应的检测提供了更高的灵敏度,能追溯更长的时间保持不变,可对其进行长时间跟踪,并且使用简便高效,且不受体位和运动的影响,在判断心功能方面优于 BNP<sup>[5]</sup>,有利于临床医生准确发现早期的和轻度的心力衰竭。

NT-proBNP 的正常参考值目前国内外仍不统一。曾祥林等<sup>[6]</sup>的研究认为心衰组、无心衰组及对照组血浆 NT-proBNP 水平差异有统计学意义( $\chi^2 =$

140.053,  $P = 0.000$ ),心衰组高于无心衰组及对照组( $Z = -10.275, -10.725, P$ 均=0.000),无心衰组与对照组比较差异无统计学意义( $Z = -1.120, P > 0.05$ )。本研究心肌炎组患儿 NT-proBNP 水平显著高于健康对照组,与改良 ROSS 评分具有良好的相关性<sup>[7]</sup>,根据改良 ROSS 评分,将心衰组分为轻、中、重度心衰 3 组,比较血浆 NT-proBNP 水平差异。心衰患儿血浆 NT-proBNP 水平明显高于无心衰患儿及健康儿童,血浆 NT-proBNP 水平可以反映小儿心衰的严重程度,对小儿心衰的临床诊断具有价值,与上述文献报道相符。因此,NT-proBNP 可作为判断心脏功能不全严重程度及心肌损害程度的标志物。

病毒性心肌炎是指由于病毒侵犯心脏引起的心肌细胞炎性病变,炎症可累及心脏间质组织、血管成分及心包,是儿科临床常见疾病,其发病率近年来呈快速上升趋势。小儿病毒性心肌炎临床表现轻重相差较大,重症者主要表现为严重心律失常、不同程度的心功能减退、心源性休克,甚至猝死,对患儿生命危害甚大。年龄越小,病情越重,婴幼儿死亡率最高,多数患儿是在过去没有心脏病的情况下,急性或较急发病,有的是偶然发现的。目前已证实能引起心肌炎的病毒有多种,其中以微小 RNA 病毒对心肌有亲嗜性,特别是柯萨奇 B 组病毒是最常见和最重要的病原,国内外近年调查认为柯萨奇病毒 B3、B4 型引起的心肌炎最多见,其次为轮状病毒。小儿病毒性心肌炎的治疗没有特效药,临床上多采用对症综合治疗方案,包括中西医结合抗病毒治疗<sup>[8]</sup>,保护心肌,营养心肌,免疫调节。桂俊<sup>[9]</sup>的研究表明黄芪通过上调 A20 的表达,抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,导致大量致病性炎症因子的下降和炎性细胞浸润的减少,减轻心肌组织的炎症病理损伤,从而使疾病病症得到改善。

小儿病毒性心肌炎的治疗虽然取得了较大进展,但目前缺乏统一有效的治疗方案,疗效差别较明显,早诊断早治疗有利于病情控制,减少并发症,降低患者急危重症风险。目前临床小儿病毒

性心肌炎的诊断标准仍缺乏特异的诊断指标<sup>[10]</sup>,主要靠临床综合分析,但其临床操作性较差,起病时多难符合其标准,等待符合心肌炎的诊断时再做治疗往往会延误病情,找到一种非常特异的检测指标是我们研究的方向。本研究以病毒性心肌炎患儿为研究对象,评估 NT-proBNP 在小儿病毒性心肌炎患者中的诊断及心功能评估中的价值。研究发现,有 2 例(5.56%)具有左室功能不全的病毒性心肌炎患儿其血浆 NT-proBNP 水平处于正常范围,所以 NT-proBNP 不能作为心肌炎患儿存在持久左室功能不全的最灵敏诊断指标<sup>[11]</sup>。超声心动图是目前检测心功能最安全、无创、有效的方法,但是它成本昂贵,需要专业人员操作,使用受到限制。临床儿科医生急需一种更简单、方便、快捷的检测方法来评价心功能。而 NT-proBNP 正是这样一个指标,随着心功能的下降而升高,客观准确,简单易行<sup>[12]</sup>。研究中我们比较了血浆 NT-proBNP 水平和左室心功能指标的关系发现,血浆 NT-proBNP 水平与 LVFS、LVEF 均呈显著相关性。即左室收缩功能下降,NT-proBNP 明显升高。笔者认为血浆 NT-proBNP 水平与左室功能不全间存在明显的相关性,可以用于评价病毒性心肌炎患儿左室功能不全的存在。

综上所述,血浆 NT-proBNP 水平可以反映病毒性心肌炎患儿左心室功能不全的情况,可协助病毒性心肌炎的诊断,可用于该类患儿心功能的评估。目前的临床工作中,常依据症状和体征判断心功能,存在一定的主观性。超声心动图在某些情况下受到透声窗的限制,心导管检查具有创伤性且价格昂贵。NT-proBNP 测定方法较客观,又简便、无创、快速、便于随访,适合于动态观察,可以弥补上述不足。本研究还存在一定的局限性,不足之处是未对治疗后的心肌炎患儿进行对比研究,且病例数较少,下一步需增加样本量研究<sup>[13]</sup>。

## 参考文献

- [1] 李友邕,周碧燕,覃李线,等. 病毒性心肌炎患儿血清中 TNF- $\alpha$ 、hs-CRP、cTnI 检测的临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(17):1368-1369.
- [2] 刘瑶. 肌钙蛋白心肌酶谱及 C 反应蛋白联合检测对病毒性心肌炎的诊断意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(13):964-965.
- [3] 张乾忠,郭继龙. 有关“小儿病毒性心肌炎诊断标准”的讨论-1999 年全国小儿心肌炎、心肌病学术会议侧记[J]. 中国实用儿科杂志, 2000, 15(1):60-61.
- [4] 陈劭,茶春喜,马鹏超. 血浆 N 末端脑利钠肽水平和心脏超声心功能参数对心功能分级的评估价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 27(5):496-498.
- [5] 曹悦群,吴军,侯巍. 冠心病患者血 NT-ProBNP 与 RDW 的比对分析[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(6):1077-1079.
- [6] 曾祥林. 血浆氨基末端 B 型利钠肽前体对小儿心力衰竭的诊断价值[D]. 暨南大学, 2013.
- [7] 邓明红,林春旺,江少虎,等. 氨基末端 B 型利钠肽前体和改良 Ross 标准对急性心力衰竭诊断界值的探讨[J]. 广东医学, 2013, 34(11):1698-1700.
- [8] 高玉婷. 分析中西医结合治疗病毒性心肌炎的疗效[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2014, 14(19):5-6.
- [9] 桂俊. 黄芪治疗病毒性心肌炎的分子机制[D]. 复旦大学, 2013.
- [10] 汪朝晖,廖玉华. 病毒性心肌炎[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(7):511-51, 561.
- [11] 丁丽,王晓琴,陶丹,等. 应用 ROC 曲线评价 N 末端 B 型脑钠肽(NT-proBNP)及生化指标在心血管疾病中的诊断价值[J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(4):294-297.
- [12] 张俊威. 联合检测 CTGF 和 NT-ProBNP 在心衰诊断中的应用价值[J]. 临床急诊杂志, 2013, 14(2):62-64.
- [13] 李博. 主动脉夹层与 D-二聚体、心肌损伤标志物及 NT-proBNP 之间的关系[D]. 吉林大学, 2014.

# 心脏型脂肪酸结合蛋白和D-二聚体及高敏肌钙蛋白T在急性冠状动脉综合征早期诊断中的应用

皮红泉<sup>1\*</sup> 李德华<sup>1</sup> 卢盛祥<sup>1</sup> 王蔚浩<sup>2</sup> 邓乐华<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 探讨心脏型脂肪酸结合蛋白(human heart-type fatty acid-binding protein, h-FABP)、D-二聚体(D-dimer)及超敏肌钙蛋白T(high-sensitive cardiac troponin T, hs-cTn T)对急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的早期诊断价值。方法 收集2014年3月至2015年5月东莞市常平医院急诊科157例胸痛患者、50名健康体检者(健康对照组)的静脉血,分离得血清及血浆。测定所有研究标本的h-FABP、D-二聚体和hs-cTn T。所有实验数据均通过SPSS13.0软件进行统计学处理。结果 ACS患者中的不稳定性心绞痛(unstable angina, UA)组、非ST段抬高心肌梗死(non-ST-elevation myocardial infarction, NSTEMI)组、ST段抬高心肌梗死(ST-elevation myocardial infarction, STEMI)组血清h-FABP水平、血浆D-二聚体水平、血清hs-cTn T水平均高于非缺血性胸痛(non-ischemic chest pain, NICP)组和健康对照组,差异具有统计学意义( $P=0.002$ )。胸痛3h以内组和3~6h组ACS患者血清h-FABP水平均高于健康对照组,差异具有统计学意义( $P=0.003$ )。胸痛3~6h组ACS患者血浆D-二聚体、血清hs-cTn T水平均高于健康对照组,差异具有统计学意义( $P=0.005$ )。单独应用h-FABP诊断ACS(胸痛3~6h)的敏感度为87.07%,特异度为73.62%,准确性为82.03%。h-FABP、D-二聚体及hs-cTn T联合应用诊断ACS(胸痛3~6h)的敏感度为97.41%,特异度为59.22%,准确性为87.65%。结论 血清h-FABP是ACS发病早期心肌缺血的敏感指标,优于hs-cTn T和血浆D-二聚体对ACS发病早期的心肌缺血诊断作用。联合检测h-FABP、D-二聚体及hs-cTn T可提高诊断的敏感性和准确性,对指导临床早期诊断ACS有一定价值。

**【关键词】** 急性冠状动脉综合征;心脏型脂肪酸结合蛋白;D-二聚体;高敏肌钙蛋白T

Human heart-type fatty acid-binding protein, D-dimer and High-sensitive cardiac troponin T in the early diagnosis of acute coronary syndrome

PI Hongquan<sup>1\*</sup>, LI Dehua<sup>1</sup>, LUSHengxiang<sup>1</sup>, WANG Weihao<sup>2</sup>, DENG Lehua<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Dongguan City Changping Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523573; 2. Department of Cardiology, Dongguan City Changping Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523573)

**【ABSTRACT】** Objective To investigate the value of early diagnosis of human heart-type fatty acid-binding protein (h-FABP), D-dimer and high-sensitive cardiac troponin T (hs-cTn T) in acute coronary syndrome (ACS). Methods All 157 blood samples of patients with chest pain in the emergency department of the Dongguan City Changping Hospital were selected. 50 healthy individuals were selected as the control group. h-FABP, D-dimer and hs-cTn T were measured in all the specimens. All the experimental data were statistically processed by SPSS 13.0 statistical software. Results The levels of h-FABP, D-dimer, hs-cTn T in the ACS group, which includes the unstable angina (UA) group, non-ST-elevation myocardial infarction

作者单位:1. 广东省东莞市常平医院检验科,广东,东莞 523573

2. 广东省东莞市常平医院心内科,广东,东莞 523573

\*通讯作者:皮红泉, E-mail:765226306@qq.com

(NSTEMI) group, and ST-elevation myocardial infarction (STEMI) group, were significantly higher than those of the non-ischemic chest pain (NICP) group and control group. There were significant differences between the ACS group and the NICP group and the control group ( $P=0.002$ ). The levels of h-FABP in the ACS group between 3 to 6 h, were significantly higher than that of the controls ( $P=0.003$ ). The levels of D-dimer and the hs-cTn T in the group between 3 to 6 h were significantly higher than those of the controls ( $P=0.005$ ). The sensitivity, specificity and accuracy was 87.07%, 73.62% and 82.03% of the h-FABP in a separate diagnosis of ACS (chest pain for 3~6 h), but the sensitivity, specificity and accuracy were 97.41%, 59.22% and 87.65% of the h-FABP, D-dimer and the hs-cTn T with the affiliation diagnosis (Chest pain for 3~6 h). **Conclusion** The serum h-FABP is a more sensitive indicator of ACS in early myocardial ischemia than hs-cTn T and plasma D-dimer. Serum h-FABP in combination with D-dimer and hs-cTn T could improve sensitivity and accuracy, which are valuable to guide clinical diagnosis of ACS in early stages.

[KEY WORDS] Acute coronary syndrome; Human heart-type fatty acid-binding protein; D-dimer; High-sensitive cardiac troponin T

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是在冠状动脉粥样病变的病理基础上, 冠状动脉血管痉挛、局部血栓形成, 造成心肌的缺血损害和坏死, 导致 ACS。心肌缺血是 ACS 常见的发病机制, 及早诊断心肌缺血并及时治疗, 有助于降低心肌梗死的发生率。目前 ACS 临床诊断主要依靠临床症状、心电图和传统的生化标志物, 如血清高敏肌钙蛋白 T (hs-cTn T)、肌酸激酶同工酶 CK-MB、肌红蛋白等。但 hs-cTn T 和 CK-MB 是在心肌组织坏死后释放入血, 才能被检测出, 不利于在 ACS 早期心肌损伤可逆阶段做出诊断; 肌红蛋白虽然在 ACS 早期出现, 但是其特异性较差, 其升高不能诊断 ACS。最近发现, 心脏型脂肪酸结合蛋白 (human heart-type fatty acid-binding protein, h-FABP) 是反映心肌缺血的一个敏感和早期的生化标志物, 对急性胸痛患者的心肌缺血诊断具有高度敏感性<sup>[1]</sup>。D-二聚体能反映凝血酶和纤溶酶活性, 其浓度升高可作为体内新鲜血栓形成的标志, 有人认为 D-二聚体与冠状动脉损伤的数目及病变的严重程度有关, 可作为冠状动脉事件的独立危险因素<sup>[2]</sup>。本研究通过测定以胸痛就诊患者的 h-FABP、D-二聚体和 hs-cTn T 水平变化, 探讨三者单独应用与联合应用对 ACS 早期诊断的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象

#### 1.1.1 对象

选取 2014 年 3 月至 2015 年 5 月东莞市常平医院急诊科胸痛就诊患者 157 例, 男性 85 例, 女性 72

例, 年龄在 42~68 岁之间, 平均年龄 ( $55\pm 13$ ) 岁。入选标准: (1) 胸痛发作 6 h 以内; (2) 血清白蛋白在 35~55 g/L 之间。排除标准: 妊娠、急性肾功能衰竭、急性脑血管病、恶性肿瘤、胃部疾病、肺栓塞、自身免疫性疾病、急慢性传染病等。选取同期本院体检科 50 名健康体检者作为对照组, 男 25 名, 女 25 名, 年龄在 40~68 岁之间, 平均年龄 ( $54\pm 13$ ) 岁。本研究经医院伦理委员会同意, 入选者均签署知情同意书。胸痛患者与健康对照组性别、年龄差异无统计学意义。

#### 1.1.2 病例分组

依据临床诊断将入选患者分为非缺血性胸痛 (non-ischemic chest pain, NICP) 组 41 例和 ACS 组 116 例 [其中不稳定性心绞痛 (unstable angina, UA) 亚组 62 例、非 ST 段抬高心肌梗死 (non-ST-elevation myocardial infarction, NSTEMI) 亚组 28 例、ST 段抬高心肌梗死 (ST-elevation myocardial infarction, STEMI) 亚组 26 例]。临床确诊 ACS 的标准参照《中华医学会心血管分会 2011 年急性心肌梗死诊断和治疗指南》、《2007 年欧洲心脏病学会非 ST 段持续性抬高急性冠脉综合征处理指南》<sup>[3-4]</sup>。

按胸痛发作至采血时间窗将入选患者分为 3 h 以内组 76 例, 其中 NICP 20 例, ACS 56 例 (UA 35 例、NSTEMI 11 例、STEMI 10 例); 3~6 h 组 81 例, 其中 NICP 组 21 例, ACS 组 60 例 (UA 27 例、NSTEMI 17 例、STEMI 16 例)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本采集

胸痛患者于就诊时即刻采集静脉血 5 mL, 健

康对照组于体检时空腹采血,分装2管,一管用枸橼酸钠抗凝,离心分离血浆,待检血中D-二聚体;一管不加抗凝剂,离心分离血清,待检血清hs-cTn T及h-FABP,剩余血清于-80℃保存。

### 1.2.2 检测方法

h-FABP测定采用宁波美康生物科技有限公司提供的h-FABP试剂盒、校准品、质控品,检测方法为乳胶增强免疫比浊法。血浆D-二聚体检测采用法国STA Compact全自动血凝仪。血清hs-cTn T检测采用德国罗氏2010电化学发光仪。D-二聚体、hs-cTn T检测采用原装配套试剂、校准品和质控品。

### 1.2.3 结果判断

h-FABP诊断ACS最佳截值取值为>7.0 ng/mL, D-二聚体>0.5 mg/L, hs-cTn T>100 ng/L时为阳性,反之为阴性。其中任一指标结果为阳性则联合诊断结果即为阳性,所有指标均为阴性则联合诊断结果为阴性。

### 1.3 统计学分析

所有检测实验数据均通过SPSS 13.0统计软件进行统计学处理。h-FABP、D-二聚体、hs-cTn T

为正态分布数据,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检验。检测指标单独和联合应用对ACS检验的敏感性、特异性和准确性比较采用配对 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ACS和NICEP组患者血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体水平的变化

入选的157例患者中,临床最后确诊为ACS患者116例,其中h-FABP(+)101例,D-二聚体(+)30例,hs-cTn T(+)21例;临床最后确诊为NICEP者41例,其中h-FABP(-)者33例,h-FABP(+)者8例。

UA、NSTEMI、STEMI亚组患者血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体水平均高于健康对照组和NICEP组( $P$ 均<0.05)。NICEP组患者与健康对照组相比,血浆D-二聚体水平升高( $P < 0.05$ ),血清h-FABP和hs-cTn T水平虽然有差异但无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表1。

表1 患者组与健康对照组间血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The levels of serum h-FABP, the hs-cTn T and D-dimer were compared between the patients and healthy controls ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	h-FABP(ng/mL)	D-二聚体(mg/L)	hs-cTn T(ng/L)
健康对照组	50	2.96±0.58	0.251±0.053	18±15
NICEP组	41	3.58±0.67	0.332±0.085	29±22
ACS组	116			
UA亚组	62	31.35±22.88 <sup>ab</sup>	0.527±0.136 <sup>ab</sup>	95±29 <sup>ab</sup>
NSTEMI亚组	28	32.79±22.71 <sup>ab</sup>	0.569±0.175 <sup>ab</sup>	88±30 <sup>ab</sup>
STEMI亚组	26	29.85±21.76 <sup>ab</sup>	0.766±0.102 <sup>ab</sup>	87±19 <sup>ab</sup>
F值		3.825	3.572	3.682
P值		0.001	0.003	0.002

h-FABP、D-二聚体和hs-cTn T与健康对照组比较,UA组 $q$ 值分别为4.39、4.06、4.01,NSTEMI组 $q$ 值分别为4.02、4.09、4.20,STEMI组 $q$ 值分别为4.19、3.53、3.99, $P$ 均<0.05;h-FABP、D-二聚体和hs-cTn T与NICEP组比较,UA组 $q$ 值分别为3.59、3.57、3.86,NSTEMI组 $q$ 值分别为3.49、3.82、4.23,STEMI组 $q$ 值分别为4.27、3.85、3.79, $P$ 均<0.05

### 2.2 不同胸痛时间ACS患者血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体水平的变化

胸痛时间3h以内组ACS患者血清h-FABP水平高于健康对照组、NICEP组( $P < 0.05$ )。血浆D-二聚体和hs-cTn T水平与健康对照组、NICEP组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。胸痛时间3~6h组ACS患者血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体

水平均高于健康对照组、NICEP组( $P < 0.05$ )。具体结果见表2。

### 2.3 血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体单独及联合应用对ACS的诊断效能

在胸痛发作(3~6h)时,单独应用h-FABP诊断ACS的敏感度87.07%,特异度73.62%,准确性82.03%,大于D-二聚体或hs-cTn T单独应用诊断

表2 不同胸痛时间ACS、NlCP患者与健康对照组血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体水平比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Levels of serum h-FABP, hs-cTn T and plasma D-dimer in patients with ACS, NlCP during different time stages of chest pain and healthy controls ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	h-FABP (ng/mL)	D-二聚体 (mg/L)	hs-cTn T (ng/L)
胸痛<3 h组	76	33.58±20.36 <sup>a</sup>	0.352±0.069	20±17
胸痛3~6 h组	81	65.35±23.71 <sup>a</sup>	0.759±0.204 <sup>a</sup>	93±28 <sup>a</sup>
NlCP组	41	3.58±0.67	0.332±0.085	29±22
健康对照组	50	2.96±0.58	0.251±0.053	18±15
F值		3.675	2.998	3.526
P值		0.003	0.005	0.004

h-FABP水平3 h以内组和3~6 h组与健康对照组、NlCP组比较q值分别为4.02、3.60, D-二聚体水平和hs-cTn T 3~6 h组与健康对照组、NlCP组比较q值分别为4.18、3.77, P<0.05。

ACS 敏感度 (25.86% , 18.97% ) 和 准确性 (37.12% , 39.02% ) , 但 特 异 度 低 于 hs - cTn T 91.15% 。 h - FABP、D - 二 聚 体 联 合 应 用 敏 感 度 95.69%、特 异 度 62.03%、准 确 性 85.29% ; h - FABP 与 hs - cTn T 联 合 应 用 敏 感 度 90.52%、特 异 度 68.22%、

准 确 性 84.58% ; h - FABP、D - 二 聚 体、hs - cTn T 联 合 应 用 诊 断 ACS 的 敏 感 度 97.41% , 特 异 度 59.22% , 准 确 性 87.65% ; 血 清 h - FABP、hs - cTn T 和 血 浆 D - 二 聚 体 水 平 2 项 或 3 项 联 合 应 用 敏 感 度、特 异 度、准 确 性 大 于 任 何 一 项 单 独 应 用。结 果 见 表 3。

表3 血清h-FABP、hs-cTn T和血浆D-二聚体单独及联合应用对ACS诊断效能  
Table 3 Serum levels of h-FABP, the hs-cTn T and plasma D- dimer were used alone or in combination in the diagnosis of ACS

检测指标项目	例数	阳性(例)		敏感度(%)		特异度(%)		准确性(%)	
		3 h	3~6 h	3 h	3~6 h	3 h	3~6 h	3 h	3~6 h
h-FABP	116	95	101	81.92	87.07	71.09	73.62	79.35	82.03
D-二聚体	116	1	30	0.86	25.86	0.88	65.33	1.25	37.12
hs-cTn T	116	2	22	1.72	18.97	89.52	91.15	9.96	39.02
D-二聚体、hs-cTn T	116	2	23	1.72	20.58	90.66	92.35	10.59	42.33
h-FABP、D-二聚体	116	95	111	81.92	95.69	60.32	62.03	81.08	85.29
h-FABP、hs-cTn T	116	95	105	81.92	90.52	65.95	68.22	82.95	84.58
h-FABP、D-二聚体、hs-cTn T	116	95	113	81.92	97.41	58.03	59.22	85.34	87.65

血清h-FABP与血浆D-二聚体联合检测准确性高于单独应用h-FABP或D-二聚体或hs-cTn T单独应用,差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.65、6.87、6.02, P$ 均<0.05);血清h-FABP与hs-cTn T联合检测准确性高于单独应用h-FABP或D-二聚体或hs-cTn T单独应用,差异有统计学意义( $\chi^2 = 3.85、6.99、7.38, P$ 均<0.05);血清h-FABP、血浆D-二聚体和hs-cTn T联合检测准确性高于单独应用h-FABP或D-二聚体或hs-cTn T单独应用,差异有统计学意义( $\chi^2 = 3.96、3.86、4.02, P$ 均<0.05)

### 3 讨论

ACS患者发病急、病情进展快、死亡率高,在心肌缺血胸痛发作早期及时明确诊断、并积极干预和治疗,对逆转病情、挽救濒死心肌至关重要。

h-FABP是1972年被英国Oeeker等发现的一种蛋白质,是心脏中富含的一种新型小胞质蛋

白。心肌缺血性损伤出现后,h-FABP可以早在胸痛发作后1~3 h在血液中被发现,6~8 h达到峰值而且血浆水平在24~30 h内恢复正常<sup>[5-6]</sup>。h-FABP是由132个氨基酸组成,分子量为15 KDa,h-FABP基因位于染色体I上。h-FABP是心脏最丰富的蛋白质之一,具有高度心脏特异性,但在心脏以外的组织中也有低浓度表达<sup>[7]</sup>。

短时间的心肌缺血不会导致心肌细胞的坏死,ACS患者长期心肌缺血会导致细胞的坏死,与细胞坏死相关的标志物如CK-MB、肌红蛋白、肌钙蛋白等就会升高。h-FABP反映的是实质性细胞坏死之前的一种变化,可以在不可逆损伤出现之前检测到心肌缺血状态,因此其作为心肌缺血的早期生化标志物,可大大提高对心肌肌钙蛋白和心电图阴性的ACS的诊断率<sup>[8]</sup>。贾红龙<sup>[9]</sup>研究认为,h-FABP是诊断缺血性胸痛的敏感指标,检测h-FABP可标志一种亚临床缺血状态,与传统检验手段相比,对疾病的诊断具有早预知、早发现的优势。

h-FABP可检测心肌缺血细胞坏死之前的状态,此时采取及时治疗措施可以预防心肌细胞坏死<sup>[10]</sup>。本研究通过对ACS组和NICEP组患者h-FABP水平进行观察发现,ACS胸痛患者h-FABP水平高于NICEP胸痛患者,胸痛发作小于3h血中浓度即有明显增高,h-FABP水平显著高于健康对照组,血清hs-cTn T和血浆D-二聚体水平变化不明显,表明h-FABP在早期诊断ACS患者缺血方面明显优于hs-cTn T和血浆D-二聚体。由此可见,h-FABP在诊断ACS患者心肌缺血早期更有意义<sup>[11-12]</sup>。

D-二聚体是交联纤维蛋白及其特异性降解产物,D-二聚体的改变可能提示早期存在微循环血栓形成和继发性纤溶的改变。出现ACS时,血管内斑块破裂出血,斑块下胶原和脂肪暴露,血小板黏附活化并聚集,形成微小血栓,可导致D-二聚体浓度升高。吴梅君<sup>[13]</sup>研究表明在老年冠心病中,D-二聚体可能参与了冠状动脉事件的发生。赵勇等<sup>[14]</sup>探讨了ACS患者血中D-二聚体与冠状动脉病变的相关性,结论提示血浆中D-二聚体与冠状动脉病变程度及斑块稳定性有关。研究表明,ACS患者中血浆D-二聚体水平明显高于NICEP组和正常对照组,胸痛3~6h组血浆D-二聚体水平明显高于3h以内组,提示D-二聚体水平与冠状动脉病变程度及病情变化密切相关,对判断冠状动脉病变严重程度具有一定的临床参考价值。

hs-cTn T检测应用于临床大大提高了ACS诊断的特异性和准确性。肌钙蛋白是心肌细胞特有的调节蛋白,具有独特的抗原表位,心肌特异度较高,其检测不受骨骼肌损伤的影响。但其在血清

中出现较晚(3~6h之后),往往hs-cTn T升高时心肌细胞已经受到不可逆的损伤,其敏感性有待进一步提高。

项目联合检测可以提高疾病的诊断效率。崔丽艳等<sup>[15]</sup>研究联合检测心型脂肪酸结合蛋白和缺血修饰白蛋白可能提高肌钙蛋白T未增高的ACS患者的诊断率,但是缺血修饰白蛋白检测比较复杂,不易普及,因此限制了其在临床上的应用。本研究显示h-FABP单独诊断ACS的敏感性和准确性大于D-二聚体或hs-cTn T单独应用诊断ACS敏感度和准确性,但特异性低于hs-cTn T。D-二聚体和hs-cTn T联合检测诊断ACS特异性虽然很高但敏感度低,对临床的早期诊断不能提供有意义的帮助。血清h-FABP、D-二聚体及血清hs-cTn T水平2项或3项联合应用敏感性、特异性、准确性大于任何一项单独应用,可以有助于ACS患者在心肌缺血的早期阶段被发现,对临床及时诊断及治疗和观察病情发展有很大指导意义。

综上所述,h-FABP是急性心肌缺血的生化标志物,对ACS发病早期的心肌缺血具有早预知、早发现的优势,优于hs-cTn T和血浆D-二聚体对ACS的诊断作用。D-二聚体水平对判断冠状动脉病变严重程度有一定的临床意义。联合检测h-FABP、D-二聚体及hs-cTn T,可以提高诊断的敏感度和特异性,对ACS的早期诊断有一定价值。

## 参考文献

- [1] 彭文忠,郑定容,杨庆珣.胶乳增强免疫比浊法测定心型脂肪酸结合蛋白的方法学评价[J].黑龙江医学,2014,38(11):1250-1252.
- [2] Smith A, Patterson C, Yarnell J, et al. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study [J]. Circulation, 2005, 112(20):3080-3087.
- [3] 陈明.2013年美国ST段抬高心肌梗死指南解读[J].中国医学前沿杂志,2013,5(2):47-50.
- [4] 中华医学会心血管病分会.非ST段抬高急性冠脉综合征诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2012,40(5):353-367.
- [5] Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Critical review and meta-analysis on the combination of heart-type fatty ac-

- id binding protein (h-FABP) and troponin for early diagnosis of acute myocardial infarction [J]. Clin Biochem, 2013, 46(1-2):26-30.
- [6] Alhadi HA, Fox KA. Heart-type fatty acid-binding protein in the early diagnosis of acute myocardial infarction: the potential for influencing patient management [J]. Sultan Qaboos Univ Med J, 2010, 10(1):41-49.
- [7] Choi IJ, Park HJ, Seo SM. Predictors of early and late target lesion revascularization after drug-eluting stent implantation [J]. J Interv Cardiol, 2013, 26(2):137-144.
- [8] 赵晓玲. 心型脂肪酸结合蛋白检测对早期急性冠状动脉综合征诊断的价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(8):1059-1064.
- [9] 贾红龙. 心脏型脂肪酸结合蛋白在心肌梗死患者诊断中的价值[J]. 中国民康医学, 2015, 27(11):10-13.
- [10] Furuhashi M, Saitoh S, himamoto K, et al. Fatty acid-binding protein4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases[J]. Clin Med Insights Cardiol, 2015, 8(suppl 3):23-33.
- [11] McCann CJ, Glover BM, Menown IBA, et al. Novel biomarker in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T [J]. Eur Heart J, 2008, 29(23):2843-2850.
- [12] Liyan C, Jie Z, Xiaozhou H. Prognostic value of combination of heart-type fatty acid-binding protein and ischemia-modified albumin in patients with acute coronary syndromes and normal troponin T values [J]. J Clin Lab Anal, 2009, 23(1):14-18.
- [13] 吴梅君. 超敏C-反应蛋白、同型半胱氨酸、D-二聚体水平与急性冠脉综合征的关系[J]. 浙江实用医学, 2011, 16(5):333-334.
- [14] 赵勇, 牛群, 刘燕. 血浆D-二聚体浓度与冠脉病变程度相关性[J]. 血管康复医学杂志, 2010, 19(3):260-262.
- [15] 崔丽艳, 张捷, 胡晓舟. 心脏型脂肪酸结合蛋白和缺血修饰白蛋白在肌钙蛋白T未增高的急性冠状动脉综合征患者中联合检测的价值[J]. 检验医学, 2010, 25(7):539-542.

(上接第169页)

- 2008[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(12):2223-2231.
- [6] Feder HM, Bennett N, Modlin JF. Atypical hand, foot, and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by Coxsackie virus A6 [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(1):83-86.
- [7] Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(2):337-339.
- [8] Puenpa J, Chiochansin T, Linsuwanon P, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Thailand, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(4):641-643.
- [9] 马占忠, 黄文波, 何凤屏, 等. 韶关市1190例手足口病病原体检测结果分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1):30-31.
- [10] 邱惠芳, 刘丹, 刘青, 等. 浦东新区2012年手足口病检测结果分析[J]. 海军医学杂志, 2013, 34(3):176-178.
- [11] 杨兴林, 李丽, 熊金凤, 等. 2011年贵阳地区手足口病病原学检测结果分析[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(12):2081-2082.
- [12] 乔凤娇, 刘红, 刘汉芬. 实时荧光PCR技术检测手足口病EV71与CA16病毒核酸[J]. 中国卫生工程学, 2011, 10(3):253.

# Treg 细胞和 IL-12 在肺结核合并老年慢性支气管炎患者外周血中的表达及意义

肖天津<sup>1\*</sup> 张乐平<sup>2</sup> 古中东<sup>1</sup> 黄延平<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 研究 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> 调节性 T 细胞(T regulatory cell, Treg)与白细胞介素 12(interleukin-12, IL-12)在肺结核合并老年慢性支气管炎(老慢支)患者外周血中的表达变化及临床意义。方法 收集河源市人民医院 2012 年 1 月至 2015 年 6 月新发肺结核合并老慢支的病人 80 例(观察组),并以同期单纯老慢支病人 80 例作为对照组 1,健康体检人群 80 例作为对照组 2。分别在治疗前、治疗 3 月末和 6 月末,抽取外周血,采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 IL-12 水平,流式细胞术检测 Treg 细胞的表达。采用 SPSS 17.0 软件,配对 *t* 检验比较各组间差异。结果 治疗前,观察组患者外周血 IL-12 水平显著低于两组对照组( $P<0.05$ ); CD4<sup>+</sup>T 细胞值低于两组对照组( $P<0.05$ ), Treg 细胞水平高于两组对照组( $P<0.05$ ),差异均具有统计学意义。治疗 3、6 个月末,观察组患者外周血调节性 T 细胞水平明显降低,而 IL-12 表达水平上升( $P<0.05$ ),差异均具有统计学意义。结论 外周血 Treg 细胞和 IL-12 表达水平与肺结核具有相关性,可以作为鉴别诊断、病情转归的辅助指标。

**[关键词]** 肺结核;老年慢性支气管炎;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>调节性 T 细胞;白细胞介素 12

Expression of regulatory T cells and interleukin-12 in aged patients with active pulmonary tuberculosis complicated with chronic bronchitis

XIAO Tianjin<sup>1\*</sup>, ZHANG Leping<sup>2</sup>, GU Zhongdong<sup>1</sup>, HUANG Yanping<sup>1</sup>

(1. Department of Outpatient, Heyuan People's Hospital, Heyuan, Guangdong China, 517000; 2. Department of Outpatient, Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen, Guangdong, China, 518020)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> regulatory Tregulatory cell (Treg) and interleukin-12 (IL-12) in the aged pulmonary tuberculosis complicated with chronic bronchitis. Methods 80 cases of aged patients with active pulmonary tuberculosis complicated with chronic bronchitis were included in an observation group from January 2012 to December 2015 in the People's Hospital of Heyuan city. 80 cases with simple old chronic bronchitis and 80 healthy people from physical examination were chosen as the control group 1 and group 2, respectively. The levels of Treg cell (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) ratio and peripheral blood IL-12 of the observation group were determined in 0, 3 and 6 month intervals and compared with the control groups. Results IL-12 level of observation group was significantly lower than the control groups before treatment, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ), and CD4<sup>+</sup>T cells ratio in the peripheral blood is lower than the control groups ( $P<0.05$ ), meanwhile the level of Treg cells is higher than the control groups ( $P<0.05$ ). Level of Treg cells decreased significantly and the expression of IL-12 increased after 3, 6 month treatment ( $P<0.05$ ). Conclusion Expression of Treg cells and IL-12 is associated with the aged pulmonary tuberculosis complicated with chronic bronchitis, and can be used as a indicators of differential diagnosis and clinical outcome of the disease.

**[KEY WORDS]** Tuberculosis; Old chronic bronchitis; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> regulatory T cell; Interleukin-12(IL-12)

作者单位:1.河源市人民医院门诊部,广东,河源 517000

2.深圳市慢性病防治中心门诊部,广东,深圳 518020

\*通讯作者:肖天津, E-mail:1091870961@qq.com

结核病是由结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染引起的慢性传染病。由于MTB属胞内寄生菌,T细胞介导的细胞免疫在机体抗结核感染中发挥主要作用。调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)是一类具有免疫抑制作用的T淋巴细胞亚群,膜表面高表达CD4和CD25,能识别靶细胞表面主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子所提呈的抗原肽,通过接触依赖或释放细胞因子等多种机制参与机体免疫耐受、免疫自稳等,近来在结核病等慢性感染性疾病中的作用日益受到关注。Treg细胞参与免疫抑制调节使它在结核病中具有双重作用,一方面可以抑制可能对宿主机体组织有害的过度炎症反应,但同时也可能抑制了保护性的免疫反应,反而有利于病原体的滞留<sup>[1]</sup>。巨噬细胞和树突细胞作为抗原提呈细胞吞噬结核分枝杆菌后生成白细胞介素12(interleukin-12, IL-12),IL-12参与Th1细胞从前体的分化,调节Th1/Th2细胞的平衡<sup>[2]</sup>。而Th1/Th2失衡是结核病的免疫学特征,Th2型细胞应答增强和效应因子分泌增加、炎症介质过度释放又可能与支气管炎相关。本研究选取肺结核并发老慢支患者,以老慢支患者和健康人群为对照,以了解Treg细胞以及IL-12与老年人慢性支气管炎病人并发肺结核的意义,为辅助鉴别诊断和免疫治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取河源市人民医院2012年1月至2015年6月期间新登记的菌阳肺结核合并老年慢性支气管炎患者80例为观察组,单纯老年慢性支气管炎患者80例为对照组1。并以同期健康体检人群80例作为对照组2。观察组纳入标准:肺结核诊断均按照中华医学会结核病学分会《肺结核诊断和治疗指南》<sup>[3]</sup>,肺部X线有浸润性病变,痰抗酸染色阳性或阴性,但痰培养抗酸杆菌阳性,经对硝基苯甲酸培养基初步鉴定为结核分枝杆菌排除标准:已经使用过抗结核药物化疗;合并肝炎、糖尿病及其他免疫相关性疾病;使用糖皮质激素及免疫抑制剂。剔除标准:凡治疗6个月后痰菌涂片或培养不阴转者剔除出组。最后纳入80例中男性61例,女性18例,其中年龄60~80岁,平均年龄66.4岁。对照组1均X线检测为慢性支气管炎,结核菌素试

验阴性,排除标准同观察组。纳入80例中其中男性65例,女性15例。年龄61~80岁,平均年龄67.9岁。对照组2为健康体检人群,结核菌素试验阴性,排除标准同观察组。男性65例,女性15例。年龄61~80岁,平均年龄67.0岁。所有研究均获得患者知情同意。

### 1.2 主要试剂和仪器

人淋巴细胞分离液购自美国Sigma公司;荧光标记抗体抗人CD3-FITC、CD4-PE、CD25-PerCP、CD127-APC,同型对照小鼠IgG1抗体均购自美国BD公司;IL-12酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒为法国DIA-CLONE公司产品。FACS Calibur流式细胞仪为美国BD公司产品。二氧化碳培养箱和Multiskan FC酶标仪购自美国Forma Scientific公司。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 标本采集

分别在治疗前、治疗3月末和6月末,采集观察组患者外周静脉血6 mL。其中3 mL肝素抗凝,用于流式细胞术检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中Treg细胞的比例。另3 mL于凝血管静置30 min后,1 000 rpm/min离心15 min,后分离血清,-80℃保存备用。对照组一次性采集外周静脉血6 mL,处理同上。

#### 1.3.2 Treg细胞检测

人淋巴细胞分离液分离PBMCs,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤2次后计数,调整浓度 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL。每管取 $1 \times 10^6$ 个细胞,加入CD3-FITC、CD4-PE、CD25-PerCP、CD127-APC单抗,同时做同型对照管,孵育30 min,PBS洗涤3次后重悬细胞,上流式细胞仪检测。按规程操作,检测结果以CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>T细胞占外周血单个核细胞的百分率表示。

#### 1.3.3 IL-12检测

应用双抗体夹心ELISA法,严格按试剂盒说明进行操作。建立标准曲线,酶标仪上读取吸光度(optical density, OD)值,波长为490 nm,以OD值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,建立标准曲线,根据血清样品的OD值计算IL-12浓度。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件,所有计量数据以均数( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数差异统计采用配对资料的t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者调节性T细胞水平变化

80例肺结核合并老慢支患者患者和对照组外周血CD4<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg细胞水平如下:治疗前外周血PBMCs中的CD4<sup>+</sup>T细胞低于单纯老慢支患者和健康对照人群,差异有统计学意义(分别为 $t=119.48$ ,  $P<0.05$ 和 $t=203.20$ ,  $P<0.05$ )。

外周血Treg细胞高于对照组,差异有统计学意义(分别为 $t=164.04$ ,  $P<0.05$ 和 $t=127.43$ ,  $P<0.05$ )。规范治疗3个月、6个月后观察组CD4<sup>+</sup>(%)水平上升,而Treg细胞/CD4<sup>+</sup>(%)下降。3月末、6月末CD4<sup>+</sup>T细胞比例上升,而Treg细胞/CD4<sup>+</sup>下降,与治疗前有统计学差异( $t=13.845$ ,  $P<0.05$ 、 $t=12.282$ ,  $P<0.05$ 、 $t=3.311$ ,  $P<0.05$ 、 $t=17.0765$ ,  $P<0.05$ ),具体见表1。

表1 患者外周血CD4<sup>+</sup>T细胞、Treg细胞及IL-12水平比较

Table 1 CD4<sup>+</sup>T cell, regulatory T cells and IL-12 expression in peripheral blood from different groups

组别(例数)	时点	CD4 <sup>+</sup> (%)	Treg细胞/CD4 <sup>+</sup> (%)	IL-12(ng/L)
观察组(n=80)	治疗前	25.85±4.28	9.81±2.43	28.05±13.24
	3月末	30.64±9.53	7.06±2.92	40.21±18.56
	6月末	41.24±17.16	5.35±2.37	58.29±31.53
对照组1(n=80)		36.27±5.51	3.56±1.84	53.07±26.22
对照组2(n=80)		46.82±7.16	4.84±1.96	50.71±18.31

### 2.2 外周血IL-12水平

治疗前老慢支合并肺结核患者患者外周血IL-12水平明显低于单纯老慢支患者( $t=68.156$ ,  $P<0.05$ )和健康对照组( $t=67.641$ ,  $P<0.05$ ),治疗3月末、6月末明显上升,与治疗前有统计学意义( $t=13.721$ ,  $P<0.05$ 、 $t=10.100$ ,  $P<0.05$ )。完成6个月疗程后观察组与健康对照组无统计学差异( $P>0.05$ )。

免疫低反应性和免疫抑制功能的特征,其升高导致免疫抑制作用增强,Th1/Th2免疫应答失衡,可能与结核病慢性发展病程相关。随着抗结核治疗,Treg细胞比例明显下降,Th1/Th2免疫应答恢复,证实Treg细胞参与了疾病的发生发展。Treg细胞的深入研究为结核病的免疫治疗提供了新的思路,Treg及相关免疫抑制性分子可以作为有前途的治疗靶点。

## 3 讨论

T细胞介导的免疫应答在特异性免疫反应中起重要作用。机体抗结核免疫机制主要由Th1、Th2、Treg细胞介导。Th1型免疫反应主要介导体对于结核病产生保护性免疫,已有研究表明,Th1型细胞免疫反应的过度下调和Th2细胞水平增加与结核病的进展有关<sup>[4]</sup>。而Treg细胞经细胞表面T细胞受体激活后,可以抑制 $\gamma\delta$ T-细胞分泌结核特异性IFN- $\gamma$ ,抑制其他CD4<sup>+</sup>T-cell的反应,使得结核分枝杆菌不能被清除,然而,Treg细胞在在宿主抗感染免疫中所扮演的角色利弊尚不完全清楚<sup>[5-7]</sup>。He和Pang等<sup>[8-9]</sup>报道Treg细胞在活动性结核患者表达增高,但也有报道在结核病患者中没有发现这种上升<sup>[10]</sup>。本研究中结核合并老慢支患者治疗前外周血中Treg细胞均比单纯老慢支及健康对照组高,分析可能是由于Treg细胞具有

结核分枝杆菌感染导致的宿主免疫应答和病原体免疫逃逸之间的相互作用取决于多种因素,其中细胞因子网络的调节平衡是关键因素之一。结核分枝杆菌早期感染后,DC细胞分泌IL-12,迁移到淋巴结,参与Th1细胞的成熟,诱导IFN- $\gamma$ 的产生<sup>[11]</sup>,因此IL-12在早期抗结核反应中是启动保护性免疫应答的关键性调控细胞因子<sup>[12]</sup>。IL-12的高亲和力受体IL-12R在Th1和Th2细胞表面都有表达,IL-12通过与其结合,促进CTL细胞和NK细胞的活化与增殖,并促使两者分泌IFN- $\gamma$ ,抑制IL-4的分泌,调节Th1/Th2细胞的平衡<sup>[13]</sup>。IL-12的表达水平可以在一定程度上反应机体Th1/Th2偏移情况,但在结核病患者中有关IL-12的表达研究结果报道不一<sup>[14-15]</sup>,可能与病例纳入与排除的标准不统一、样本数偏少、有些仅为横断面分析等因素有关。本研究对80例新等级菌阳患者的检测结

果提示,结核合并老慢支患者外周血治疗前 IL-12 的水平低于单纯老慢支患者和健康人群,而治疗 3 月末、6 月末逐渐上升,6 月末与健康对照组比较无统计学差异。表明 IL-12 作为 Th1 型细胞因子,在患者治疗前的低水平可能代表体内细胞免疫功能的低下及机体抗结核保护性免疫力的降低,结核分枝杆菌不能清除或者抑制。有效治疗后,IL-12 的上升伴随着 Treg 细胞水平的下降,表明经抗结核治疗后患者 Th1/Th2 免疫应答逐渐恢复平衡。因此 IL-12 水平检测对肺结核合并老慢支的鉴别诊断以及临床病情转归有一定意义。

本文研究了 Treg 细胞、IL-12 在肺结核合并老慢支患者外周血中与单纯老慢支患者、健康人群的表达差异以及治疗过程中的动态变化,这种差异进一步证实了 T 细胞亚群失衡参与结核病发病。针对 Treg 细胞在结核病发生的作用,降低患者体内 Treg 细胞的水平,调节宿主细胞的活化状态机免疫功能,可为结核病的免疫治疗提供新的作用靶点。IL-12 可作为判断患者免疫状态及肺结核活动性的临床参考指标,通过检测老年人特别是患有慢性支气管炎病人的细胞因子水平,对老年患者预防结核病有一定意义。

#### 参考文献

- [1] Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*) [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 551-589.
- [2] Zuñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, et al. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 193923.
- [3] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(2): 70-74.
- [4] Shahemabadi AS, Hosseini AZ, Shaghsempour S, et al. Evaluation of T cell immune responses in multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients to *Mycobacterium tuberculosis* total lipid antigens [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 149(2): 285-294.
- [5] Li L, Wu CY. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN- $\gamma$  in response to *M. tuberculosis* antigen ESAT-6 [J]. *Blood*, 2008, 111(12): 5629-5636.
- [6] Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, et al. Cutting edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Immunol*, 2007, 178(5): 2661-2665.
- [7] Urdahl KB. Understanding and overcoming the barriers to T cell-mediated immunity against tuberculosis [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(6): 578-587.
- [8] He XY, Xiao L, Chen HB, et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29(6): 643-650.
- [9] Pang H, Yu Q, Guo B, et al. Frequency of regulatory T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis from shanxi province, china [J]. *Plos One*, 2013, 8(6): e65496.
- [10] Nemeth J, Winkler HM, Boeck L, et al. Specific cytokine patterns of pulmonary tuberculosis in central Africa [J]. *Clinical Immunology*, 2011, 138(1): 50-59.
- [11] Bhatt K, Hickman SP, Salgame P. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2748-2751.
- [12] Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(5): 361-368.
- [13] 陈教,董德琼,杨渝浩,等. 白细胞介素 12 对结核病患者 TH1/TH2 平衡的影响 [J]. *中华结核与呼吸杂志*, 2002, 25(5): 292-295.
- [14] 盛学岐,刘欣,林存智,等. 初治肺结核病人强化治疗前后血清 IFN- $\gamma$  和 IL-12 变化 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2005, 41(2): 161-162.
- [15] 卓文基,钱明,陈涛,等. 肺结核患者血清 IL-6、IL-12、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  表达水平的临床意义分析 [J]. *现代医院*, 2014, 14(10): 4-6.

## 某国产 NAT 试剂盒应用于血液筛查的评价与应用

陈志忠 李结敏 廖扬勋 梁剑锋 余文潮 谭晓颖 梁丽婷 黄钜明 陆倩文 陈尚良\*

**[摘要]** 目的 评估、验证某国产血液 NAT 试剂盒用于血液筛查的技术性能指标。方法 对某国产血液 NAT 试剂盒进行了灵敏度、特异性、重复性、抗干扰能力和抗污染能力测试,并将其初步用于血液筛查。结果 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)DNA、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)RNA、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)RNA 三者检测灵敏度分别为不高于 50 IU/mL、50 IU/mL 与 100 IU/mL;特异性、重复性、抗污染能力能满足血站血液核酸检测需求;混检模式下,HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 三者的检出基本不受脂肪血颗粒的影响,但在单检模式下会导致 HIV RNA 的漏检,溶血对 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 的检出均有明显干扰。结论 某国产 NAT 检测分析系统的灵敏度、特异性、重复性、抗污染能力等指标均达《血站核酸检测质量控制指南》要求,脂肪血、溶血样本能明显干扰 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 的检出能力。

**[关键词]** 血液筛查; 核酸检测; HBV DNA; HCV RNA; HIV RNA

Evaluation and application of a domestic NAT kit used for blood screening

CHEN Zhizhong, LI Jiemin, LIAO Yangxun, LIANG Jianfeng, YU Wenchao, TANG Xiaoying, LIANG Liting, HUANG Juming, LU Qianwen, CHEN Shangliang\*

(Zhaoqing Blood Center, Zhaoqing, Guangdong, China, 526020)

**[ABSTRACT]** **Objective** To evaluate the capability of a domestic blood screening NAT kit. **Methods** The sensitivity, specificity, repeatability, anti-interference ability, and anti-pollution ability of the kit were analyzed. **Results** The sensitivity of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA detection were not more than 50 IU/mL, 50 IU/mL and 100 IU/mL respectively, and specificity, repeatability, anti-pollution ability met the demands for blood nucleic acid test. There was no interference due to fat particles in the analyses of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA in mini pool of 8 samples model, but HIV RNA was not detected in ID-NAT model due to fat particles. The detection of those 3 marks was interfered with by hemolysis. **Conclusions** The sensitivity, specificity, repeatability, anti-interference ability and anti-pollution ability of the kit could meet the demands for blood screen, but the interference from fat particles or hemolysis is a concern for the detection capability for HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA.

**[KEY WORDS]** Blood screening; Nucleic acid test; HBV DNA; HCV RNA; HIV RNA

为避免经输血传播疾病,各国采供血机构都对献血者进行了严格的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency

virus, HIV)病毒抗原或抗体检测。但血清学检测技术存在“窗口期”、病毒变异、免疫沉默等造成的漏检,血液的病毒安全性问题是全球关注的焦点问题<sup>[1]</sup>。为保障输血安全,世界各国不断开发和

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2015238);肇庆市科技创新计划(2014E1814)

作者单位:肇庆市中心血站,广东,肇庆 526020

\*通讯作者:陈尚良, E-mail:fimmu2000@163.com

引进新的血液筛查技术<sup>[2-5]</sup>。为了进一步保障血液安全,我们国家提出了“十二五”期末实现血液核酸检测全覆盖的目标。然而,进口核酸检测(nucleic acid test, NAT)试剂成本较高,综合考虑国家政策导向和自身实际情况,我们对国产产品—达安基因血液 NAT 试剂盒进行了评估,并应用于血液核酸检测,现将研究报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

ChemagicSTAR 核酸提取仪(HAMILTON, 瑞士),ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(Life Technologies, 美国),核酸分离试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司),核酸检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司),外部质控品(中山大学达安基因股份有限公司)。

### 1.2 灵敏度试验

按照厂家说明书要求,将外部质控品分别稀释至 2 倍检测极限(limit of detection, LOD)、1 倍 LOD、0.5 倍 LOD,即浓度分别 200 IU/mL、100 IU/mL、50 IU/mL,单采用检模式进行 3 次检测。检测标准:1 倍 LOD 处浓度应 100%检出。

### 1.3 特异性试验

将 8 份阴性质控品混合至一个 pool 检测;将 8 份阳性质控品混合至一个 pool 检测,然后再进行拆分检测。检测标准:阴性、阳性样品应该全部检出。

### 1.4 重复性试验

将阳性质控品每次随机进行混样检测,共检测 8 次;将阴性质控品采用单检模式进行 8 管检测。检测标准:阴性、阳性样品应该全部检出。

### 1.5 抗污染能力试验

将 8 份阴性血浆样本和 8 份阳性质控品,按照一阴一阳交叉排列,进行检测(单检模式)。检测标准:阴性、阳性样品应该全部检出。

### 1.6 抗干扰能力试验

将阳性质控品(200 μL),添加至脂肪血或者溶血样本(已确认为阴性),制备为含相应干扰物的阳性样本,再进行检测(单检模式)。检测标准:阴性、阳性样品应该全部检出。

### 1.7 血液样本 NAT 检测

全血样本进行 4 项目[乙肝表面抗原(hepatitis

B surface antigen, HBsAg)、HCV 抗体(Anti-HCV)、HIV 抗体(Anti-HIV)、梅毒抗体]2 遍酶联免疫吸附检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),全项阴性的样本进行 NAT 混样检测,呈反应性的检测 pool 再进行拆分确认试验,检测流程参见图 1。

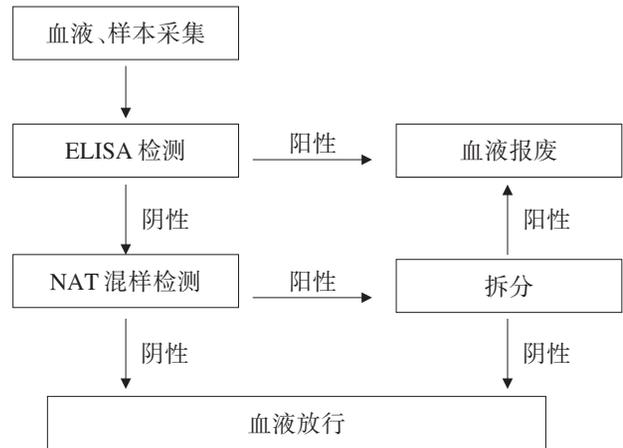


图 1 血液样本 NAT 检测流程图

Figure 1 The procedure of NAT for blood screening

## 2 结果

### 2.1 灵敏度试验

按照厂家说明书要求,将外部质控品分别稀释至 2 倍 LOD、1 倍 LOD、0.5 倍 LOD,即浓度分别 200 IU/mL、100 IU/mL、50 IU/mL,进行 3 次检测(单检模式),HBV DNA 与 HCV RNA 在 0.5 倍 LOD 处均全部检出,HIV RNA 在 1 倍 LOD 处全部检出,即 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 三者检测灵敏度分别为 50 IU/mL、50 IU/mL 与 100 IU/mL,符合试剂说明书所描述的性能,满足检测要求,结果见表 1。

### 2.2 特异性试验

将 8 份阴性质控品混合至一个 pool 检测,结果显示为阴性;将 8 份阳性质控品混合至一个 pool 检测,结果显示为阳性,然后再进行拆分检测,8 管全部为阳性。

### 2.3 重复性试验

将阳性质控品每次随机进行混样检测,共检测 8 次,均为阳性;将阴性质控品采用单检模式进行 8 管检测,结果均为阴性。

表1 NAT检测分析系统灵敏度试验评价  
Table 1 The evaluation of sensitivity for NAT Kit

样品	浓度 (IU/mL)	检测结果		
		HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
S1	200	+	+	+
S2	200	+	+	+
S3	200	+	+	+
S4	100	+	+	+
S5	100	+	+	+
S6	100	+	+	+
S7	50	+	+	-
S8	50	+	+	-
S9	50	+	+	-

每个浓度做3个测试

#### 2.4 抗污染能力试验

将8份阴性血浆样本和8份阳性质控品按照一阴一阳交叉排列,进行检测(单检模式),阴性和阳性样本全部通过,交叉污染率为0。

#### 2.5 抗干扰能力试验

将阳性质控品(200  $\mu$ L),添加至脂肪血或者溶血样本(已确认为阴性),制备为含相应干扰物的阳性样本,再进行检测(单检模式)。结果显示脂肪血对混检模式下HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA三者的检出均无影响,但在单检模式下会导致HIV RNA的漏检;溶血对HBV DNA HCV RNA、HIV RNA的检出均有明显干扰,结果见表2。

表2 干扰能力试验  
Table 2 Interference ability test

样品	干扰物	检测结果		
		HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
S1	溶血	-	F	F
S2(混检)	脂肪血	+	+	+
S2(单检)	脂肪血	+	+	-

F:实验失败,即样本循环阈值(cycle Threshold, CT)值无数值,内标CT值无数值。一般认为是溶血裂解产物在核酸制备环境可能已经导致RNA降解从而导致实验失败

#### 2.6 检测拆分率与拆分阳性率评估

试运行至今,共检测样本462份,20批次检

测,其中pool阳性2份,拆分阳性2份,均为HBV DNA阳性,拆分率和拆分阳性率分别为10%和100%,经过全项血液筛查(ELISA法)后,HBV DNA检出率为2/462(约4‰),结果见表3。

表3 血液NAT检测试运行结果  
Table 3 Results of Blood NAT screen at first stage

样本 总数	批次数	Pools 拆分数	拆分结果		
			HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
462	20	2	2*	0	0

\*对其中一位献血均追踪采用进行检测;HBV DNA定量(+),e抗原(+);另外一例失访

### 3 讨论

血液及血液制剂的病毒安全性一直是输血安全的热点问题<sup>[1,6]</sup>。至上世纪90年代,对输血传播疾病的筛查完全依赖于血清学试验,甚至今天,血清学筛查技术依然是血液筛查的重要手段。1998年德国红十字献血服务中心,将自己创建的NAT方法应用于血液筛查,开启了血液NAT新纪元。分子技术应用于血液筛查,可将HBV、HCV和HIV感染的平均窗口期分别由56天、70天、22天缩短为41天、12天和11天,使输血传播相关病毒的风险降到最低,更大程度地保障血液安全<sup>[7]</sup>。国外对血液NAT检测的研究较早,积累了较多经验,技术也较成熟,但由于试剂成本较高等原因,一直难以在国内全面推广应用<sup>[8-11]</sup>。为了贯彻实施国家卫计委关于“十二五”实现血液核酸检测全覆盖的目标以及响应国家关于大型医疗设备优先采购国产产品的号召,我们对某国产品牌的血液NAT试剂盒进行技术评价,并将其初步用于我站的血液筛查。

该国产品牌血液NAT试剂盒,采用混合8人份样本进行核酸提取,然后分别进行HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 3项扩增,最后通过实时读取数据判断是否具有反应性;反应性的pools再进行拆分确认试验。为了验证试剂盒的检出灵敏度,我们采用外部质控品对试剂盒进行灵敏度进行评价,结果显示HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA检测灵敏度分别为不高于50 IU/mL、50 IU/

mL 与 100 IU/mL, 均能达到国家相关要求。然而, 与国际知名品牌相比, 国产的试剂盒的灵敏度尚存在改进空间。例如 Roche 的 MPX 检测系统、Novarits 的 Tigris Ultrio Plus 系统其 HIV 最低检测限能达到不高于 50 IU/mL, HBV、HCV 的最低检出限更是达到了不高于 10 IU/mL 的高灵敏度。

为了评估该国产血液 NAT 检测系统的抗污染能力, 我们模拟日常工作, 将强阳性质控品与阴性质控品按照一阴一阳交叉排列, 采用单检模式进行核酸提取和扩展检测试验, 结果显示本检测系统的抗污染能力满足要求, 只要操作规范, 阳性样本不会造成交叉污染导致样品间或者实验室污染。同时为了考察检测系统的特异性, 我们按前述样本的排序, 分别采用混检和单检模式进行核酸提取和扩展检测试验, 其实验结果也与预期相符合, 显示了较好的特异性。

样本的质量是检测结果的关键保证。在临床检测中, 可以通过对患者下医嘱等措施, 实施样本采集前的质量控制, 而且不符合质量控制要求的样本, 可以重新进行样本采集。相比之下, 无偿献血行为大多为自发性行为, 样本采集难以做到很好的采集前质量控制; 同时考虑到血液制剂样本溯源性等问题, 对于脂肪血颗粒较多等不符合 NAT 检测要求的样本, 也不可能仿效临床检测进行重新采样。因此, 我们对血液筛查样本中最常见的脂肪颗粒、轻度溶血等不符合要求的样本进行抗干扰试验。我们的测试结果显示: 混检模式下, HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 三者的检出基本不受脂肪血颗粒的影响, 但在单检模式下会导致 HIV RNA 的漏检; 溶血对 HBV DNA HCV RNA、HIV RNA 的检出均有明显干扰。基于上述结果以及血液检测工作的特点, 提示我们在实际工作中, 应该尽量避免溶血样本, 对于难以避免的脂肪血样本, 应该评估脂肪颗粒的严重程度, 谨慎对待其核酸检测阴性结果。

通过前述的技术指标评估, 我们认为该国产血液 NAT 试剂盒能满足我们对血液筛查的技术要求, 因此试将其用于我站的血液筛查。参考兄弟单位的做法以及厂家的推荐意见, 我们初步拟定按照图 1 的流程进行筛查。试运行期间, 共检测样本 462 份, 20 批次检测, 其中 pool 阳性 2 份, 拆分阳性 2 份, 拆分率和拆分阳性率分别为 10% 和

100%。2 份阳性样本均为 HBV DNA 阳性, 为了进一步确认献血者感染状况, 我们追踪献血者重新采样进行检测, 但由于各种原因, 仅成功召回 1 号献血者, 采用 HBV DNA 定量检测系统, 能检测到其体内存在低拷贝 HBV DNA, 同时其 e 抗原也为阳性, 定义为隐匿性 HBV 感染 (occult HBV infection, OBI) 感染。以已经确认的数据来计算, 经过 ELISA 过筛后, 我们的 HBV DNA 检出率为 1/462; 如果以 2 例阳性来计算, HBV DNA 检出率为 2/462, 与国内报道大体相近<sup>[12-16]</sup>, 但远高于国外的参与风险<sup>[17]</sup>。当然, 我们试运行期间所取得的数据为小样本, 更多的检测效能验证有待后续开展, 但毫无疑问的是, 应用该国产血液 NAT 试剂于血液筛查, 将进一步提升血液安全特别是 HBV 病毒性安全。

#### 参考文献

- [1] Baylis SA, Chudy M, Nübling CM. Standardization of NAT for blood-borne pathogens [J]. *Transfus Med Hemother*, 2015, 42(4):211-218.
- [2] 陈尚良, 郑欣, 曾月婷, 等. 第四代 HIV 抗原抗体检测试剂在血液筛查中的应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(1):30-32.
- [3] Engelfriet CP, Reesink HW, Hernandez JM, et al. Implementation of donors screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology [J]. *Vox Sang*, 2002, 8(2):87-111.
- [4] Kumar R, Gupta S, Kaur A, et al. Individual donor-nucleic acid testing for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus and its role in blood safety [J]. *Asian J Transfus Sci*, 2015, 9(2):199-202.
- [5] Jain R, Aggarwal P, Gupta GN. Need for nucleic acid testing in countries with high prevalence of transfusion-transmitted infections [J]. *ISRN Hematol*, 2012, 2012:718671.
- [6] Chen SL, Zhang X, Chen ZZ, et al. Mutual blood donation is safer at small blood collection stations in China [J]. *Transfusion and Apheresis Science*, 2015, 53(3):31-39.
- [7] Moiz B, Moatter T, Shaikh U, et al. Estimating window period blood donations for human immunodeficiency virus type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus by nucleic acid amplification testing in Southern Pakistan [J]. *Transfusion*, 2014, 54(6):1652-1659.

(下转第 211 页)

## 胞外信号调节激酶促进DNA损伤反应的作用机制

魏凤香<sup>1,3</sup> 张蕾<sup>1</sup> 王绍娟<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 机体在长期进化中拥有一整套DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)系统来保证基因组的完整性,其中最重要的就是通过激活检验点以阻止细胞周期进程,并修复损伤的DNA。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是经典的细胞信号转导通路,具有调节细胞增殖、分化、凋亡等多种功能,二者的功能性联系都能调节细胞增殖。本综述旨在阐述ERK激酶在DNA损伤反应中的作用。

**[关键词]** DNA损伤反应(DDR);胞外信号调节激酶(ERK1/2);细胞周期阻滞;ATM;ATR

The mechanism of ERK1/2 kinases facilitate DNA damage response

WEI Fengxiang<sup>1,3</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, WANG Shaojuan<sup>2\*</sup>

(1. The Genetics Laboratory, Longgang District Maternity and Child Healthcare Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518172; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Longgang District Renmin Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518172; 3. Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, China, 563003)

**[ABSTRACT]** The DNA damage response (DDR) helps to maintain genome integrity, and a critical event in this process is the prevention of cell division by activating the checkpoint until the DNA lesions can be repaired. The extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is a classic pathway for signal transduction and possesses multiple functions in regulating cellular proliferation, differentiation, and apoptosis. The functional connection between the DDR and ERK is the regulation of cell proliferation. This review aims to describe our current understanding of the function of ERK kinases in DDR.

**[KEY WORDS]** DNA damage response (DDR); Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2); Cell cycle arrest; ATM; ATR

DNA是大而复杂的整体,它在细胞内外各种因素的作用下不断产生损伤。DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)可通过识别DNA损伤、激活检验点以阻断细胞周期进程,从而修复损伤的DNA,确保遗传物质准确地传递给子细胞提供时间,这是机体维持基因组稳定性的基础<sup>[1]</sup>。所有真核生物中,DNA损伤反应集中于对相关蛋白激酶:ATM(ataxia-telangiectasia mutated)和

ATR(ATM- and Rad3-related)。DNA损伤可激活ATM激酶,后者磷酸化其下游的反应元件使细胞周期阻滞。包括激活检验点激酶2(checkpoint kinases 2, CHK2)和上调蛋白p21<sup>CIP1</sup>。p21<sup>CIP1</sup>是CDK(cyclin-dependent kinases, CDK)的一种抑制剂<sup>[2]</sup>。CHK2随后使CDC25C失活,CDC25C的活性是激活CDK1和CDK2所必需的<sup>[3]</sup>。活化ATM和ATR,激活检验点,阻滞细胞周期进行。

基金项目:国家自然科学基金(81201568);深圳市海外高层次人才创新创业项目(KQCX20120814150420241);深圳市科技计划重点项目(201201009)

作者单位:1. 深圳市龙岗区妇幼保健院中心实验室,广东,深圳 518172

2. 深圳市龙岗区人民医院妇产科,广东,广州 518172

3. 遵义医学院,贵州,遵义 563003

\*通讯作者:王绍娟, E-mail:lgwsj@hotmail.com

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是经典的细胞信号转导通路,具有调节细胞增殖、分化、凋亡等多种功能。最新的研究发现通常在癌细胞中过表达并促进细胞增殖的ERK激酶,在DNA损伤反应中有重要作用<sup>[4]</sup>。本文简要阐述ATM/ATR介导的DNA损伤反应,ERK信号通路,以及ERK在DNA损伤反应中的作用。

## 1 ATM、ATR处于DNA损伤反应的核心

DNA损伤反应是维持真核细胞基因组完整性与保证遗传信息准确传递的重要监督机制。ATM、ATR同属于PIKK家族<sup>[1]</sup>,是DNA损伤检查点的主要成员,它们被不同类型的DNA损伤所激活。

普遍的观点认为,ATM主要被DNA双链断裂所激活,对双链断裂的ATM反应依赖于3个蛋白的三聚体复合物:Mre11、Rad50和Nbs1(MRN复合物),双链断裂立即在该处快速组装,并帮助将2个末端连接在一起。ATM与MRN复合物中的Nbs1亚单位相互作用,这不仅能将ATM招募到损伤位点处,也能使ATM从无活性的二聚体转变为有激酶活性的单体形式<sup>[5-6]</sup>。但最近也有研究显示,ATM的激活在没有DNA的情况下,ATP能够使ATM二聚体发生分子间自磷酸化(S1981位点)<sup>[7]</sup>,导致二聚体的分开,从而引起ATM的激活。最近发现了ATM发生自磷酸化的新位点:Ser367和Ser1893<sup>[8]</sup>。ATM的这种自磷酸化对其自身的激活可能是必需的。活化的ATM通过磷酸化它的靶蛋白来启动损伤反应。

而ATR能被很多不同形式的DNA损伤所激活,包括核苷酸损伤、复制叉停滞、双链断裂等,这是因为ATR能特定识别单链DNA区域,且在对损伤位点处理过程中单链DNA的产生对于反应是必需的<sup>[9]</sup>。ATR招募到单链DNA上可能需要通过与包被在单链DNA上的单链结合蛋白RPA相互作用。ATR与单链DNA和RPA复合物的相互作用部分依赖于RPA直接结合到与ATR相结合的接头蛋白亚单位ATRIP。带有ATRIP突变的细胞与ATR突变的细胞有相同的损伤反应缺陷,这表明ATRIP在ATR功能上的核心作用<sup>[10]</sup>。除了ATR-ATRIP复合物与包被在单链DNA上的RPA的结合是激活ATR所必需的以外,9-1-1复合物也

是ATR介导的DNA损伤反应所必需的<sup>[11]</sup>。9-1-1复合物与DNA的结合依赖于另一个大复合物RAD17-RFC,它为9-1-1复合物装载到损伤DNA上所必需。9-1-1复合物与ATR-ATRIP被独立地招募到DNA损伤位点,随后9-1-1复合物招募TOPBP1, TOPBP1能通过ATR和ATRIP亚基结合而激活ATR<sup>[12]</sup>。活性ATR能通过磷酸化一系列下游靶蛋白使细胞周期进程阻滞于S期并起始DNA损伤修复,包括磷酸化位于组蛋白H2AX尾部的SQE序列的S139、p53 S15和CHK1的S345<sup>[13]</sup>。

## 2 ERK激酶在DNA损伤反应中的作用

### 2.1 ERK MAP激酶

ERK1/2属于MAPK家族,是Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的重要成分。活化的ERK激酶在多种信号转导通路包括细胞增殖、分化和凋亡的通路中发挥作用。MEK1/2酶通过磷酸化Thr-Glu-Tyr位点的Thr183和Tyr185来激活ERK酶<sup>[14]</sup>。许多对于细胞的刺激,例如能激活一些转录因子及其它一些与细胞增殖、分化、细胞周期调节和细胞存活有关的丝/苏氨酸激酶的刺激,都能激活ERK1/ERK2。ERK1和ERK2是脯氨酸定向激酶,活化的ERK1/ERK2将磷酸化底物蛋白中一个脯氨酸引导的基团内的丝氨酸或苏氨酸残基,S/T-P是ERK1/ERK2进行底物识别的最严格的一致序列。许多ERK底物蛋白包含1~2个与ERK结合的位点,通过这些位点与ERK结合后能促进底物蛋白的磷酸化,这些位点包括DEJL(结合ERK、JNK和LXL的部位)和DEF(结合ERK、FXFP的部位)。它们的一致序列是(R/K)2X2-6(I/L)X(I/L)(X指任何残基)<sup>[15]</sup>。

### 2.2 ERK激酶在DNA损伤反应中发挥作用

DNA损伤反应与细胞分裂紧密联系。ATM或ATR的激活导致蛋白激酶Chk1和Chk2的活化,Chk1和Chk2对Cdc25磷酸酶家族的3个成员有复杂的抑制效应,因而Cdk1-cyclinB1的活性被阻断,阻止了有丝分裂的进入。抑制Cdk的活性或阻滞细胞分裂是ATM或ATR激酶诱导的最终结果。但最新研究表明,细胞分裂也能参与DNA损伤反应。Cdk的活性能促进DNA损伤诱导的ATM或ATR的激活<sup>[16]</sup>。这能够给相对于正常组织细胞恶性肿瘤细胞对基因毒性试剂更加敏感提供部分解释。

大量研究表明PIKKs的激活受特定的DNA序列和蛋白所调控,如NBS1对ATM的激活是必需

的, TOPBP1 对 ATR 的激活是必需的<sup>[17]</sup>。但是, DNA 损伤反应中 ATM 与 ATR 的激活机制仍是未知的。因此可根据现有的研究设想 DNA 损伤诱导 ERK 激酶激活, ERK 激酶再促进 ATM 和 ATR 的活化。

有报道称顺铂能强烈诱导卵巢癌细胞 A2780 中 ERK 的活化, 使用 ERK 活性抑制剂 PD98059 减少了顺铂诱导的 p53 S15 的磷酸化<sup>[18]</sup>。使用 U0126 抑制 ERK 活性减少了 H9c2 细胞中阿霉素诱导的 p53 S15 的磷酸化<sup>[19]</sup>。因 S15 不直接连接在脯氨酸之后, 故 ERK1/2 不能直接磷酸化 p53 S15。S15 连接在 QE 之后, 而 S/TQE 序列是 ATM 和 ATR 的磷酸化位点, 所以 DNA 损伤反应中的 p53 S15 是被 ATM 和 ATR 磷酸化激活的。由此推断, ERK 激酶是通过促进 ATM 和 ATR 的激活进而增强 p53 S15 的磷酸化的。有类似的报道支持上述假设, 在 U87 细胞中使用 MEK 抑制剂 PD184352 抑制 ERK 活性后, IR 诱导 ATM 的 S1981 磷酸化形成的核焦点显著减少<sup>[20]</sup>。类似的观察结果也在 MCF7 细胞中发现, U0126 减弱了 IR 诱导的 ATR 及 ATR 的下游靶酶包括 CHK1 的活化、CDC25 和 CDC2 的失活<sup>[21]</sup>。考虑到 ERK1/2 作为 MEK 的主要靶酶, 本课题组研究证实了敲除 ERK1 或 ERK2 能显著减弱 ETOP 诱导的 ATM 的激活(ATM S1981 的磷酸化及磷酸化的 ATM 的核焦点), 同时也减弱了 ATM 的底物的磷酸化, 包括 rH2AX 的 S139, p53 S15 和 CHK2 的 T68。CHK2 通过磷酸化 CDC25C 的 S216 使 CDC25C 失活从而导致 G2/M 阻滞, 敲除 ERK1 或 ERK2 能显著减弱 MCF7 细胞中 ETOP 诱导的 CD25C S216 的磷酸化并减弱 ETOP 诱导的 G2/M 检验点的阻滞<sup>[22]</sup>。

总之, DNA 损伤反应、ERK1 和 ERK2 都能参与调控细胞增殖。ERK 不仅能促进细胞周期进程, 也能通过依赖或不依赖于 p53 的机制、或处于 ATM 和 ATR 的下游、或促进 ATM 和 ATR 的活性来参与调控 DNA 损伤反应。

### 2.3 ERK 激酶调控 DNA 损伤反应具有细胞类型依赖性

ERK 通路一般情况下主要由生长因子激活, 但观察到当细胞受到各种基因毒性刺激(包括电离辐射、紫外线损伤、阿霉素、羟基脲、丝裂霉素 C 等)时, ERK 也能被激活<sup>[23]</sup>。ERK 激酶调控的检验点激活具有细胞类型依赖性。用 MEK 抑制剂

(PD98059 和 U0126) 和 MEK1K97M 能抑制 ERK 的活性, 这能减弱许多细胞系中包括 NIH3T3、MCF7、MEF 和 HCT116 中依托泊苷和羟基脲诱导的 G2/M 和 S 期阻滞<sup>[23]</sup>。与此一致, 敲除 ERK1 或 ERK2 基因也能减弱 MCF7 细胞中依托泊苷和羟基脲诱导的 G2/M 或 S 期阻滞<sup>[24]</sup>。相反, 使用活性诱变剂 MEK1Q56P 能增强 ERK1/2 的活性, 这能使 HU 诱导的 S 期检验点的激活更加敏感<sup>[25]</sup>。在果蝇细胞中发生的电离辐射诱导的检验点激活的内在原因是由于 MEK-ERK 通路的作用<sup>[26]</sup>。在足突状细胞中, cyb-9 能诱导 DNA 损伤、细胞周期阻滞以及 ERK 的激活, 抑制 ERK 活性能减弱细胞周期的阻滞<sup>[27]</sup>。在神经细胞中, MCC 能激活 ERK, 这促进了 MCC 诱导的细胞凋亡<sup>[28]</sup>。同样, 活性 ERK 也能促进 NIH3T3 细胞中 ETOP 诱导的细胞凋亡<sup>[23]</sup>, 也能促进 HeLa 细胞中顺铂诱导的细胞凋亡<sup>[29]</sup>, 以及人的恶性胶质瘤 T98G 细胞中顺铂和 UN 诱导的细胞凋亡<sup>[30]</sup>。但是, 也有报道称活性 ERK 抑制骨髓瘤细胞和白血病细胞中 DNA 损伤诱导的凋亡。在人的多种骨髓瘤细胞中, CHK1 的抑制剂能诱导 DNA 损伤, 同时激活 ERK。抑制 ERK 的活性使 MM 细胞中 Chk1 的抑制剂 UCN-01 诱导的 DNA 损伤及凋亡更敏感<sup>[31]</sup>。同样, 在急性粒细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML)、NB4 和 HL60 细胞中由阿糖胞苷诱导的 DNA 损伤中均有类似的报道<sup>[32]</sup>。此外, 对于 DNA 损伤诱导的细胞周期阻滞后的细胞周期重启, 活性 ERK 也有作用。KSR1 是促进 MEK 调控 ERK 激活的一种支架蛋白, 它在 MMC 诱导的 ERK 的激活中是必需的, 去掉 KSR1 蛋白后使细胞在经历 DNA 损伤后不能重新进入细胞周期<sup>[33]</sup>。活性 ERK 调节 HeLa 细胞中阿霉素和 ETOP 诱导的葡萄糖转移酶 3 的上调<sup>[34]</sup>, 也在电离辐射诱导的 NF- $\kappa$ B 的激活中发挥作用<sup>[35]</sup>。总之, 大量研究结果证明 ERK 激酶在 DNA 损伤反应中发挥重要作用。

虽然损伤 DNA 诱导 ERK 激活的机制仍不清楚, 但大量证据显示 MEK 激酶在 DNA 损伤反应中调控 ERK 激酶的活性, 因为用 MEK 抑制剂 (PD98059, U0126)、MEK siRNA 抑制 MEK 活性后, 能抑制各种基因毒试剂诱导的 ERK 的激活。然而, DNA 损伤是否是通过 Raf 来激活 MEK 还有待研究。MMC 在野生型而不是 p53 缺陷型 MEFs 中激活 ERK, 而 ETOP 在野生型和 p53 缺陷型

MEFs 中均诱导 ERK 激活。另外,顺铂和紫外线都能在缺乏功能性 p53 的人恶性胶质瘤 T98G 细胞中强烈激活 ERK。因此,虽然在一定情况下 p53 可能对 DNA 损伤诱导 ERK 的激活有作用,但 p53 的功能在 DNA 损伤诱导的 ERK 的激活中可能不是必需的。这能解释至少一半的癌症患者表达突变型 p53。ATM 是电离辐射诱导 DNA 损伤反应的上游激酶,与此一致,有研究称 U87 细胞中电离辐射诱导的 ERK 的激活部分由 ATM 调控。类似的观察结果也可从光解诱导的双链损伤中获得。

### 3 展望

近年来开展的大量研究都证实了 MEK/ERK 激酶促进 DNA 损伤反应,然而对于 DNA 损伤信号是如何激活 ATM 和 ATR 的机制仍然是未知的,故对于 DNA 损伤信号如何激活 ERK 激酶的机制也是未知的。但是,基于大量研究表明 ERK 激酶在 DNA 损伤反应中起重要作用,阐明 ERK 激酶对 DNA 损伤反应的生理作用将把 ERK-DDR 的相关研究推进到一个新的水平。因为 MEK/ERK 激酶能促进 ATM 和 ATR 的激活,这增加了 ERK 激酶在 DNA 损伤反应调控中的重要性,因此需要阐明该潜在机制。使用特异性抑制剂阻断 MEK 的活性,使 DNA 损伤诱导的 ATM 和 ATR 的激活减弱,这说明 ERK 激酶促进 ATM 和 ATR 的激活。那么 ERK 是直接磷酸化 ATM/ATR 吗? 还是磷酸化 ATM/ATR 活化所需的其它成分? 这些磷酸化在 ATM/ATR 的活化中有作用吗? 这些问题都有待解决。

本课题组研究发现 HU 强烈诱导 ATR 的 S428 磷酸化,且在敲除 ERK1 和 ERK2 基因后此事件显著减弱。磷酸化 S428 的酶和此事件对 ATR 功能的影响均是未知的。S428 直接位于脯氨酸之后,此位点能与 ERK 激酶的特异性底物匹配。此外,ERK 激酶在 DNA 损伤调控中的生理相关性将进一步在基因敲除的小鼠中进行检测。

虽然化疗药物通常能诱导 DNA 损伤,ERK 途径的小分子抑制剂也被积极探索用于癌症治疗。联合使用基因毒性药物和 ERK 激酶抑制剂用于治疗癌症的想法还需要谨慎考虑。因为 ERK 促进 DNA 损伤反应,可以设想上述联合疗法可能引起 DNA 损伤的积累。这将增强化疗药物的遗传毒性效应的敏感性。然而,另一方面,抑制 ERK 激酶的活性可能会使检查点的激活减弱因此使有 DNA

损伤的细胞增殖。这可能会导致突变并形成二级癌症。因此,更好的了解 ERK 激酶在 DNA 损伤反应中的作用,将为优化这种联合疗法做好准备。

### 参考文献

- [1] Li Z, Pearlman AH, Hsieh P. DNA mismatch repair and the DNA damage response [J]. DNA Repair (Amst). 2015. Epub ahead of print.
- [2] Orlando S, Gallastegui E, Besson A, et al. p27Kip1 and p21Cip1 collaborate in the regulation of transcription by recruiting cyclin-Cdk complexes on the promoters of target genes [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43 (14):6860-6873.
- [3] Magni M, Ruscica V, Buscemi G, et al. Chk2 and REG $\gamma$ -dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(21): 13150-13160.
- [4] Tang S, Hou Y, Zhang H, et al. Oxidized ATM promotes abnormal proliferation of breast CAFs through maintaining intracellular redox homeostasis and activating the PI3K-AKT, MEK-ERK, and Wnt- $\beta$ -catenin signaling pathways [J]. Cell Cycle, 2015, 14 (12): 1908-1924.
- [5] Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex [J]. Science, 2005, 308(5721):551-554.
- [6] Khalil HS, Tummala H, Hupp TR, et al. Pharmacological inhibition of ATM by KU55933 stimulates ATM transcription [J]. Exp Biol Med, 2012, 237 (6): 622-634.
- [7] Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, et al. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR [J]. Cancer Res, 2013, 73(8):2574-2586.
- [8] Kozlov SV, Graham ME, Peng C, et al. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation [J]. EMBO J, 2006, 25(15):3504-3514.
- [9] Abu-Odeh M, Hereema NA, Aqeilan RI. WWOX modulates the ATR-mediated DNA damage checkpoint response [J]. Oncotarget, 2015. Epub ahead of print.
- [10] Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, et al. Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 activates ATR-ATRIP and promotes TopBP1 recruitment to sites of UV-damage [J]. DNA Repair (Amst), 2014, 21:1-11.
- [11] Navadgi-Patil VM, Burgers PM. The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms [J]. Mol Cell, 2009, 36(5):743-753.
- [12] Kar A, Kaur M, Ghosh T, et al. RPA70 depletion in-

- duces hSSB1/2-INTS3 complex initiate ATR signaling [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(10):4962-4974.
- [13] Awasthi P, Foiani M, Kumar A. ATM and ATR signaling at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(23):4255-4262.
- [14] Wu PK, Park JI. MEK1/2 Inhibitors: Molecular Activity and Resistance Mechanisms [J]. *Semin Oncol*, 2015, 42(6):849-862.
- [15] Francis DM, Koveal D, Tortajada A, et al. Interaction of kinase-interaction-motif protein tyrosine phosphatases with the mitogen-activated protein kinase ERK2 [J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e91934.
- [16] Wu CS, Ouyang J, Mori E, et al. SUMOylation of ATRIP potentiates DNA damage signaling by boosting multiple protein interactions in the ATR pathway [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(13):1472-1484.
- [17] Zhang J. The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy [J]. *Cell Biosci*, 2013, 3(1):11.
- [18] Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(46):35778-35785.
- [19] Wei CD, Li Y, Zheng HY, et al. Palmitate induces H9c2 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species generation and activation of the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(3):855-861.
- [20] Booth L, Cruickshanks N, Ridder T, et al. PARP and CHK inhibitors interact to cause DNA damage and cell death in mammary carcinoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(5):458-465.
- [21] Kolb RH, Greer PM, Cao PT, et al. ERK1/2 signaling plays an important role in topoisomerase II poison-induced G2/M checkpoint activation [J]. *Plos One*, 2012, 7(11):e50281.
- [22] Wei F, Xie Y, Tao L, et al. Both ERK1 and ERK2 kinases promote G2/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells by facilitating ATM activation [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(11):1783-1789.
- [23] Ahn YT, Shin IJ, Kim JM, et al. Counteracting the activation of pAkt by inhibition of MEK/Erk inhibition reduces actin disruption-mediated apoptosis in PTEN-null PC3M prostate cancer cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5):1383-1389.
- [24] Wei F, Xie Y, Lihz H, et al. ERK1 and ERK2 kinases activate hydroxyurea-induced S-phase checkpoint in MCF7 cells by mediating ATR activation [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(1):259-268.
- [25] Wu D, Chen B, Parihar K, et al. ERK activity facilitates activation of the S-phase DNA damage checkpoint by modulating ATR function [J]. *Oncogene*, 2006, 25(8):1153-1164.
- [26] Dai Y, Grant S, Dent P. Enhancing CHK1 inhibitor lethality in glioblastoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(6):379-388.
- [27] Tang Y, Chiluiza D, Krishna S, et al. Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(25):18407-18420.
- [28] Lee JH, Kim KT. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and p53 by ERK1/2 pathway in the DNA damage-induced neuronal death [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(3):784-797.
- [29] Carmo CR, Lyons-Lewis J, Seckl MJ, et al. A novel requirement for Janus kinases as mediators of drug resistance induced by fibroblast growth factor-2 in human cancer cells [J]. *Plos One*, 2011, 6(5):e19861.
- [30] Hamdi M, Popeijus HE, Carlotti F, et al. ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses [J]. *DNA Repair*, 2008, 7(3):487-496.
- [31] Dai Y, Chen S, Pei XY, et al. Interruption of the Ras/MEK/ERK signaling cascade enhances Chk1 inhibitor-induced DNA damage in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells [J]. *Blood*, 2008, 112(6):2439-2449.
- [32] Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Inhibition of MEK signaling enhances the ability of cytarabine to induce growth arrest and apoptosis of acute myelogenous leukemia cells [J]. *Apoptosis*, 2000, 14(9):1108-1120.
- [33] Razidlo GL, Johnson HJ, Stoeger SM, et al. KSR1 is required for cell cycle reinitiation following DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(11):6705-6715.
- [34] Watanabe M, Naraba H, Sakyo T, et al. DNA damage-induced modulation of GLUT3 expression is mediated through p53-independent extracellular signal-regulated kinase signaling in HeLa cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(11):1547-1557.
- [35] Ahmed KM, Nantajit D, Fan M, et al. Coactivation of ATM/ERK/NF-kappaB in the low-dose radiation-induced radioadaptive response in human skin keratinocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(11):1543-1550.

## Gilbert综合征及 Crigler-Najjar综合征诊断方法

刘雪梅 骆子义\*

**[摘要]** 先天性高非结合胆红素血症包括 Gilbert 综合征 (Gilbert syndrome, GS) 和 Crigler-Najjar 综合征 (Crigler-Najjar syndrome, CNS), 目前研究表明其发病机制是尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UDP-glucuronosyl transferase 1A1, *UGT1A1*) 基因多态性导致酶的缺乏或活性降低, 导致胆红素代谢障碍。GS 和 CNS 的诊断依赖 *UGT1A1* 的基因突变位点检出。分子诊断是基因诊断的重要方式。本文就 *UGT1A1* 基因检出方法研究进展作一综述。

**[关键词]** Gilbert 综合征; Crigler-Najjar 综合征; *UGT1A1*; 基因诊断; 基因多态性

Diagnostic methods in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes

LIUXuemei, LUOZiyi\*

(Department of Digestive Disease, the Third People's Hospital affiliated to of Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong, China, 518020)

**[ABSTRACT]** Congenital unconjugated hyperbilirubinemias include Gilbert syndrome (GS) and Crigler-Najjar syndrome (CNS). The present study indicates that the pathogenesis of the disease is the gene polymorphism of UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene (*UGT1A1*) leading to absence or lack of enzymatic activity, resulting in bilirubin metabolism disorders. Diagnosis of GS and CNS depend on the detection of *UGT1A1* gene mutations. In this article, the progress of *UGT1A1* gene detection methods will be reviewed.

**[KEY WORDS]** Gilbert syndrome (GS); Crigler-Najjar syndrome (CNS); *UGT1A1*; Gene diagnosis; Gene polymorphism

Gilbert 综合征 (Gilbert syndrome, GS) 1901 年最先被 Gilbert 和 Lereboullet<sup>[1]</sup> 报道, 是一种具有家族性的先天性血清高胆红素血症, 其血清总胆红素水平为 (1~6) mg/dL [ (17.1~102.6)  $\mu\text{mol/L}$  ]。Bosma 等<sup>[2]</sup> 报道 GS 的发病率为 3%~7%, 其在任何年龄均可发病, 以男性多见。Crigler-Najjar 综合征 (Crigler-Najjar syndrome, CNS) 在 1952 年被 Crigler 和 Najjar<sup>[3]</sup> 报道, 多见于新生儿, 但其发病率极低, 在 100 万新生儿中约有 1 例<sup>[4]</sup>。1962 年 Arias 等<sup>[5-6]</sup> 提出 CNS 实际可以分为 2 型, 即 CNS-I [血清总胆红素水平为 (30~50) mg/dL (513~855)  $\mu\text{mol/L}$  ] 和 CNS-II [血清总胆红素水平为 (6~20) mg/dL (102.6~342)  $\mu\text{mol/L}$  ]。GS 和 CNS 是未结合型高胆

红素血症的 2 种表现形式, 目前研究认为, 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UDP-glucuronosyl transferase 1A1, *UGT1A1*) 基因多态性对其发病有显著影响。*UGT1A1* 存在多态性导致酶的缺乏或活性降低, 从而导致胆红素代谢障碍<sup>[7]</sup>。而多种药物亦有抑制 *UGT1A1* 活性的作用<sup>[8]</sup>, 若用药过程同时存在 *UGT1A1* 多态导致酶活性降低, 则有用药安全隐患。一直以来, GS 作为一种良性疾病, 并不需要特殊相关治疗, 而重点在于确立诊断并与其他原因引起的肝脏损害性疾病区分开来, 为临床用药和遗传咨询作出积极参考, 因此 GS 的诊断是临床研究的重要内容。本文就 GS 的诊断研究进展作如下综述。

作者单位: 广东医学院附属深圳市第三人民医院消化内科, 广东, 深圳 518020

\*通讯作者: 骆子义, E-mail: 13501569621@163.com

## 1 UGT1A1多态性

UGT1A1 基因在 1991 年被首次克隆<sup>[9]</sup>, GS、CNS-I 及 CNS-II 中有大量突变点, 目前被报道的 UGT1A1 基因突变有 130 种<sup>[10]</sup>, 有 91 种为单核苷酸替换突变, 21 种为单核苷酸缺失, 10 种为单核苷酸插入, 其余 8 种表现为基因启动子和内含子中。多数 GS 患者突变在启动子、增强子及编码区, UGT1A1 酶的活性低于正常的 30%<sup>[11]</sup>; 大多数 CNS-II 患者存在纯合子错义突变和多位点复合突变, 导致酶的活性低于正常酶活性的 10%<sup>[12]</sup>; 而 CNS-I 患者 UGT1A1 酶的活性则完全缺失。

## 2 基因诊断方式研究

### 2.1 基因组直接测序

DNA 测序是 GS 及 CNS 诊断的金标准, 有直接测序和间接测序。直接测序是基因测序中最常用的方法, 选取需要检测的突变位点, 根据 UGT1A1 多态性设计引物, 提取全血基因组, 以 DNA 为模板进行 PCR 扩增后直接测序<sup>[13]</sup>。目前基因组测序主要有第二代测序技术及第三代测序技术。第二代测序技术的基本原理是边合成边测序, 通过捕捉新合成的末端标记来确定 DNA 序列; 第三代测序技术主要有分子荧光测序及纳米孔测序, 与第二代相比, 测序速度及精确度更高, 不但可以直接测序 DNA, 还可以测序甲基化的 DNA。基因测序方法虽可准确检测出突变位点, 明确诊断, 但操作费时、测序机器昂贵、耗费大、效率低, 不适于大规模临床应用。

### 2.2 基因间接测序

此法主要有变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC), 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gelelectrophoresis, DGGE)、PCR-单链构象多态性 (polymerase chain reaction - single - strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)<sup>[14]</sup>。DHPLC 的原理: 在控制升高温度的条件下, 部分解链及解链的 DNA 会有不同的性质, 杂合子个体的 DNA 经 PCR 扩增后产生异源双链, 纯合子 DNA 则产生同源双链。但二者解链特征不同, 在变性温度下, 异源双链较同源更易解链形成 Y 型结构, 而在洗脱温度时, 单链片段分子的负电荷与双链相比较少, 故更早洗

脱。由于异源双链 PCR 产物比同源双链含有更高的单链的比例, 保留时间更短, 因此异源双链较同源双链较早洗脱。突变的样品呈异源及同源双链混合物的峰型特点, 未突变者则只有同源双链峰型特点。此技术的关键在于解链温度的控制及色谱柱的分离性能, 其不但可以检测已知突变, 还可检测未知突变。且与其他传统的杂合双链分析技术相比, 耗时较短, 自动化提高, 可在几分钟内分析一个样品, 无需使用凝胶剂放射性同位素; 但其劣势在于高效液相色谱仪价格昂贵<sup>[15]</sup>。PCR-SSCP 的原理是: 根据 DNA 序列设计相应引物, 用 PCR 扩增靶向序列后将扩增片段变性为单链, 由于单链 DNA 在中性条件下根据其碱基不同自身会折叠成不同的具有一定的空间结构的构象, 因此, 相同长度的单链 DNA 所形成的构象不同, 迁移率也不同。在此基础上, 被 PCR 扩增变性为单链 DNA 的片段在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 由于产物 DNA 含单个碱基置换、插入或缺失, 会发生迁移率的改变, 从而影响电泳的位置改变, 区分出变异 DNA 与正常的 DNA, 以此检测微小到一个基因突变的差异。此法是比较灵敏的检测技术, 但研究认为, 此方法在 RNA 的检出率明显高于 DNA, 原因可能是 DNA 次级结构较相对 RNA 稳定, 可变性较小, 若发生突变, 构象变化也较小, 导致迁移率改变不明显<sup>[16]</sup>。DGGE 的原理主要是基于突变型和野生型核酸序列的不同而导致其变性浓度的差异, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳的基础上加变性剂尿素或甲酰胺等区分同样长度的 DNA 片段, 此方法最初是用来检测点突变。不同的 DNA 片段碱基组成差异导致其解链浓度不同, 其中主要是 GC 碱基的含量影响 DNA 双链的解链区域及解链行为。当变性浓度达到最低的解链区域时, 该区域的序列解链, 解链部分的 DNA 片段在凝胶中的迁移率会急剧下降。同样长度的 DNA 片段序列不同, 其在凝胶中达到最低解链浓度的位置也不同, 因此可以被区分出来。本技术经过发展, 已衍生出温度梯度凝胶电泳、恒定变性凝胶电泳、瞬时温度梯度电泳等改良技术<sup>[17]</sup>。这种方法和 PCR 技术相结合被广泛应用于各种突变分析。澳洲学者<sup>[18]</sup>利用双变性梯度凝胶电泳检测 Gilbert 综合征患者 DNA 样本, 可以快速检测出 TA 插入异常, 并能区分出 TA 杂合子和 TA 纯合子。以上方法均是对基因组进行初步筛选后, 对

阳性标本进行测序,相比直接测序而言耗费较少,操作也较简化,但总体来说,用于大量标本检测仍较耗时。

### 2.3 基因芯片技术

本技术的基本原理是杂交原理,将探针固定在芯片预先设定的区域内,形成DNA微阵列,PCR扩增后的片段产物与芯片通过碱基配对原理进行杂交。反应结果用化学荧光、化学发光或同位素法标记,通过检测杂交信号的强弱并进行计算机分析,从而检测对应片段或某个位点的等位基因是否存在,以发现单核苷酸的插入、缺失、变换等。基因芯片自发展以来,多用于扫描全基因组、基因功能的研究和疾病临床检测及诊断等多方面。有研究把基因芯片中加入特异性探针对108例GS患者的*UGT1A1*启动子进行分析,成功识别其常见及罕见突变点,基因测序结果证实其准确率达100%<sup>[19]</sup>。基因芯片技术具有灵敏、准确、高通量及高自动化等优点,是比较可靠而有前途的基因诊断技术,但其芯片制作成本昂贵、技术复杂,重复性差、分析范围狭窄等缺点尚需改革。

### 2.4 内切酶酶切技术

在*UGT1A1*的诊断中用到的主要是聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymersae chain reaction- restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术,PCR-RFLP的基本原理是:用PCR扩增目标DNA序列,然后用限制性内切酶酶切目的片段,内切酶识别并切割相应的序列片段,酶切产物进行电泳,根据对比酶切图谱及片段多样性特点,分析不同基因序列差异,不同的等位基因酶切位点不同,酶切产物电泳条带也不同。聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术操作简单,基因分型的时间较短,目的DNA的含量和相对特异性都大大提高。有学者<sup>[20]</sup>提出用此检测*UGT1A1*基因编码的外显子1的突变点211G>A,准确性高,且与RFLP相比,以扩增替代了酶切,不需要克隆基因作探针,不依赖Southern blot技术,避免了RFLP繁琐的DNA酶切、转移、杂交等步骤。本项技术经过改良,可以同过添加创造酶切位点来提高酶切准确性,但其缺点是酶切位点的选择较复杂、缺乏效率,且可能会由于酶切不完全等原因出现假阳性结果,多重酶切分析难度增加,难以实现高通量检测。

### 2.5 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)技术

本项技术以荧光共振能量传递(fluorescence resonance energy transfer, FRET)为基础,包括探针类和非探针类,探针类特异性较高,是基因突变检测的常用类型,探针类型中最常用的是TaqMan探针,TaqMan探针属于一种寡核苷酸探针,其序列只有一个碱基的差异,探针设计为与目的序列上下游引物之间的碱基配对,根据荧光探针的杂交原理,将目的DNA进行PCR扩增。探针完整时,荧光基团与淬灭基团分别在探针5'末端和3'末端,淬灭基团吸收荧光,故不会有荧光发出;PCR扩增时,产物与探针相结合,Taq外切酶活性将探针酶切降解,随着荧光基团和淬灭剂分离,荧光基团在激发光的作用下发出荧光,PCR扩增与荧光信号累积完全同步,故荧光强度越高,扩增产物的数量越多,可在优化体系的条件下使用多重荧光定量PCR。此技术的优点在于简便、准确、快速及污染小、无需DNA测序,并可实现高通量检测。而缺点在于此法是对已知基因突变的检测,引物及探针的设计都要依据已知DNA序列而定,目前已知*UGT1A1*基因的突变位点有130个之多,而探针价格昂贵,临床中只能选择常见突变点做检测,在诊断时易忽略其他突变位点可能对检测目标水平的影响,且所设计的探针仅有一个碱基的差异,检测结果不能排除假阳性可能。

### 2.6 高分辨率熔解曲线(high resolution melting curve, HRM)分析技术

HRM技术是近年来国内外最新的分子诊断研究工具,其概念早在上世纪70年代提出<sup>[21]</sup>,是根据DNA特征性熔解曲线来研究DNA特征而发展起来的研究方法。此方法多为非探针标记,非探针标记的HRM是用特定的荧光染料插入DNA双链中<sup>[22]</sup>,DNA熔解曲线的变化取决于扩增子序列的特异性,依据序列GC含量不同和碱基互补差异,在PCR升温过程中,双链DNA不互补的位点会先解链,荧光染料从解链的DNA上释放出来,随着PCR的扩增,可以通过荧光强度和曲线与标准品的比较来分辨是否有基因突变。其特点是无需设计使用特异性探针,只要设计一对相应引物就可以分析等位基因的突变,同时HRM检测不受碱基位点和种类的局限,因此,对已知突变和未知突变都能进行筛查分析。有研究者<sup>[22]</sup>用

HRM 技术对 110 名健康受试者全血提取 DNA 后进行 *UGT1A1* 启动子和 11 个外显子筛选, 结果不仅确定了 5 个已知的变种的 *UGT1A1*, 还识别出 8 个未知的序列变异, 并与基因组直接测序结果完全相符。也有人<sup>[23]</sup>用本技术有效诊断 GS 的 TATA 盒变异。此技术对诊断 GS 的 *UGT1A1* 突变, 特别是 TATA 盒及 G211A 位点突变敏感性及特异性良好, 有相当于直接测序的准确性, 适用于亚洲人 Gilbert 综合征的诊断<sup>[24]</sup>。此外, HRM 已广泛用于临床病毒耐药或细菌基因突变的扫描及发现<sup>[25]</sup>、基因序列匹配<sup>[26]</sup>、甲基化筛查<sup>[27]</sup>、基因分型<sup>[28]</sup>等各个方面, 技术水平越来越成熟。虽然 HRM 对目的片段长度有限制, 对温度均一性及仪器精密度要求较高, 使结果不够稳定, 但随着仪器和荧光染料的不改, 以及本项技术不断进步, 与其他技术联合使用亦是未来发展趋势。有研究表明通过与实时荧光 PCR 技术结合应用, 可提高其精确性和稳定性<sup>[25]</sup>。目前各方面的研究表明, HRM 具有灵敏度高、特异性强、简单快速、高效、成本低廉、高通量、闭管操作、无 PCR 反应后电泳、测序等后续处理等优点, 有望成为临床基因分子诊断常规检查技术。

### 3 结语与展望

GS 和 CNS 作为一种常染色体隐性遗传性疾病, 肝脏无器质性病变, 以血清非结合型胆红素间歇性升高为主, 临床一般表现为皮肤巩膜黄染、上腹部不适等消化道症状。血清胆红素达 GS 或 CNS 的诊断水平值, 排除肝炎等明确因素及其他遗传性疾病, 结合基因突变位点的检出, 苯巴比妥治疗有效等可作出临床诊断。由于经济条件的限制, 基因突变的检出较难施行, 临床常依靠苯巴比妥试验、利福平试验、肝组织活检等来协助诊断, 不能完全确诊。目前基因诊断方式或因操作繁杂、效率低, 或因试剂、机器价格昂贵, 阻碍了临床有效应用。因此, 随着基因分子诊断研究进步, 新的高灵敏高特异性、简单快速、低成本、自动化、可大量施行的检测方式亟待开发。

#### 参考文献

- [1] Gilbert A, Lereboullet P. La cholemie simple familiale [J]. Sem Med, 1901, 21: 241-243.
- [2] Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome [J]. N Engl J Med, 1995, 333(18): 1171-1175.
- [3] Crigler JF, Najjar VA. Congenital nonhemolytic jaundice with kernicterus [J]. Pediatrics, 1952, 10(2): 169-180.
- [4] Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome) [J]. Best Practice and Research, 2010, 24(5): 555-571.
- [5] Arias IM. Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults [J]. J Clin Invest, 1962, 41: 2233-2245.
- [6] Arias IM, Gartner LM, Cohen M, et al. Chronic non-hemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity [J]. Am J Med, 1969, 47(3): 395-409.
- [7] Wang J, Fang LJ, Li L, et al. A new frame-shifting mutation of *UGT1A1* gene causes type ICrigler-Najjar syndrome [J]. Chinese Medical Journal, 2011, 124(23): 4109-4111.
- [8] Oda S, Fujiwara R, Kutsuno Y, et al. Targeted screen for human UDP-glucuronosyltransferases inhibitors and the evaluation of potential drug-drug interactions with zafirlukast [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(6): 812-818.
- [9] Ritter JK, Crawford JM, Owens IS. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells [J]. J Biol Chem, 1991, 266(2): 1043-1047.
- [10] Canu G, Minucci A, Zuppi C, et al. Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) gene mutation database [J]. Blood Cells Mol Dis, 2013, 50(4): 273-280.
- [11] Arias IM, Londin IM. Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease [J]. Science, 1957, 126(3273): 563-564.
- [12] Aono S, Yamada Y, Keino H, et al. Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type II [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(3): 1239-1244.
- [13] Minucci A, Canu G, Gentile L, et al. Identification of a novel mutation in UDP-glucuronosyltransferase (*UGT1A1*) gene in a child with neonatal unconjugated hyperbilirubinemia [J]. Clin Biochem, 2013, 46(1-2):

- 170-172.
- [14] 栾翔凌, 辛绍杰. 先天性非结合性高胆红素血症的分子诊断、治疗进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 15(3):440-443.
- [15] Iqbal F, Item CB, Ratschmann R, et al. Molecular analysis of guanidinoacetate-n-methyltransferase (GAMT) and creatine transporter (SLC6A8) gene by using denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC) as a possible source of human male infertility[J]. Pak J Pharm Sci, 2011, 24(1):75-79.
- [16] Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(4):871-878.
- [17] 刘上峰, 傅俊江. 变性梯度凝胶电泳的原理、应用及其进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2002, 25(2):74-76.
- [18] Parkin JD, Mayall BC. Use of double gradient denaturing gradient gel electrophoresis to detect (AT)<sub>n</sub> polymorphisms in the UDP-glucuronosyltransferase gene promoter associated with Gilbert's syndrome[J]. Electrophoresis, 1999, 20(14):2841-2843.
- [19] Fesenko EE, Heydarov RN, Stepanova EV, et al. Microarray with LNA-probes for genotyping of polymorphic variants of Gilbert's syndrome gene UGT1A1 (TA)<sub>n</sub>[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(6):1177-1184.
- [20] Shiu TY, Huanq HH, Lin HH, et al. Restriction fragment length polymorphism effectively identifies exon 1 mutation of UGT1A1 gene in patients with Gilbert's Syndrome[J]. Liver int, 2015, 35(8):2050-2056.
- [21] Guttman T, Vitek A, Pivec L. High resolution thermal denaturation of mammalian DNAs[J]. Nucleic Acids Res, 1977, 4(2):285-297.
- [22] Capper RL, Jin YK, Lundgren PB, et al. Quantitative high resolution melting: two methods to determine SNP allele frequencies from pooled samples[J]. BMC Genet, 2015, 16:62.
- [23] Tsai SY, Er TK, Lin CW, et al. Comprehensive analysis of UGT1A1 polymorphisms through high-resolution melting analysis and DNA sequencing[J]. Clin Lab, 2014, 60(6):1015-1026.
- [24] Angelo M, Paola C, Bruno G, et al. Rapid UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> genotyping by high resolution melting curve analysis for Gilbert's syndrome diagnosis[J]. Clinica Chimica Acta, 2010, 411(3-4):246-249.
- [25] Hsieh TY, Shiu TY, Chu NF, et al. Rapid molecular diagnosis of the Gilbert's syndrome-associated exon 1 mutation within the UGT1A1 gene[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(1):670-679.
- [26] Sady H, Al-Mekhlafi HM, Ngui R, et al. Detection of schistosoma mansoni and schistosoma haematobium by real-time PCR with high resolution melting analysis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(7):16085-16103.
- [27] Cui G, Zhang L, Xu Y, et al. Development of a high resolution melting method for genotyping of risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles and ethnic distribution of these risk alleles[J]. Gene, 2013, 514(2):125-130.
- [28] Mastoraki S, Chimonidou M, Dimitrakopoulos L, et al. A rapid and accurate closed-tube methylation-sensitive high resolution melting analysis assay for the semi-quantitative determination of SOX17 promoter methylation in clinical samples[J]. Clin Chim Acta, 2015, 444:303-309.

# 强直性脊柱炎及其相关基因 *HLA-B27* 检测的研究现状

白世杰<sup>1</sup> 托娅<sup>2\*</sup> 张保平<sup>2</sup> 王丽娟<sup>1</sup> 王雅菲<sup>1</sup>

**[摘要]** 强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是骶髂关节组织及中轴骨骼发生病变并伴发炎症及新骨形成的和自身免疫相关的慢性疾病,可伴有眼、胃肠道等器官病变,是一种致残率很高的疾病。1973年发现人类白细胞表面抗原B27(human leukocyte antigen-B27, HLA-B27)与AS之间具有相关性,随之HLA-B27的检测成为临床鉴别诊断AS的重要指标。本文就AS的研究现状及HLA-B27的检测手段做一综述。

**[关键词]** *HLA-B27*; 强直性脊柱炎; 致病机制; 检测方法

Research status of ankylosing spondylitis and the detection of its related gene *HLA-B27*

BAI Shijie<sup>1</sup>, TUO Ya<sup>2\*</sup>, ZHANG Baoping<sup>2</sup>, WANG Lijuan<sup>1</sup>, WANG Yafei<sup>1</sup>

(1. Academy of Inner Mongolia Medical University, Huhhot, Inner Mongolia, China, 010059; 2. Department of Clinical Test Center, Affiliated Hospital Inner Mongolia Medical University, Huhhot, Inner Mongolia, China, 010050)

**[ABSTRACT]** Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic autoimmune disease which can cause inflammation and the formation of new bone in the sacroiliac joint tissue and the axial skeleton. AS is a high morbidity disease which is often accompanied by eyes, gastrointestinal, and other organ damage. In 1973, the correlation between human leukocyte antigen-B27 (HLA-B27) and AS was found, and then the detection of HLA-B27 became an important indicator in clinical differential diagnosis of AS. This paper will summarize the research status of AS and the detection measure of gene HLA-B27.

**[KEY WORDS]** *HLA-B27*; Ankylosing spondylitis(AS); Pathogenic mechanism; Detection methods

流行病学调查表明强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)多发于青少年,全球发病率为0.1%~0.9%,我国发病率为0.2%~0.45%<sup>[1]</sup>,男、女比例为3~6:1。通常发病10年内便可出现骨关节活动障碍,并最终导致脊柱、骶髂关节发生不可逆病变<sup>[2]</sup>。目前的研究表明AS的发病原因可能与遗传因素,环境因素,免疫功能紊乱,微生物感染等有关。随着医学技术的发展,人们对AS发病机制的研究得到进一步深入,但其具体的致病机理还没有得到统一的认识。近些年AS相关基因人

类白细胞表面抗原B27(human leukocyte antigen-B27, HLA-B27)的检测方法也在不断地更新换代,逐渐被分子生物学方法取代。本文就近些年对HLA-B27的结构、检测手段和AS致病机理的研究现状以及治疗手段做一综述。

## 1 *HLA-B27*与强直性脊柱炎的关联研究

### 1.1 *HLA-B27*的亚结构及功能

*HLA-B27*位于人体第6号染色体短臂上,由8个外显子和7个内含子组成。其表达产物是

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0854);内蒙古医科大学附属医院重大科研项目(NYFY-ZD2012015)

作者单位:1. 内蒙古医科大学研究生学院,内蒙古,呼和浩特 010059

2. 内蒙古医科大学附属医院临床检验中心,内蒙古,呼和浩特 010050

\*通讯作者:托娅, E-mail: antuoya@163.com

HLA-B27分子,属于主要组织相容性复合体I类分子(major histocompatibility complex I, MHC I),由2条多肽链组成,分别为 $\alpha$ 链或重链、 $\beta$ 链或轻链(非HLA-B27编码)。其中 $\alpha$ 链是一种跨膜蛋白,由胞外区、跨膜区、胞内区3部分组成。胞外区含有一个抗原结合凹槽,在凹槽内有A、B、C、D、E、F 6个袋状结构能特异性结合9肽抗原分子,其中B结合袋由于其特殊的蛋白排列方式,能够特异的容纳抗原结构中精氨酸长长的侧链,是其他HLA-B分子所不具有的一种锚定方式。此外F结合袋在与抗原肽特异性结合过程中也有重要作用,它主要识别抗原结合肽的C末端残基,不同的HLA-B27亚型在选择识别抗原的过程中有所不同。轻链由15号染色体上非HLA基因编码,David等<sup>[3]</sup>利用鼠基因敲除模型发现敲除编码 $\beta$ 2M的基因的小鼠亦可发生关节炎,推测关节炎的发生主要和HLA-B27的重链相关。HLA-B27等位基因的多态性决定了HLA-B27分子亚型的多态性。由于HLA-B\*2705在全世界范围内都有发现,通常把它看作是“祖基因”,其他亚型被认为是从B\*2705进化而来<sup>[4]</sup>,如B\*2705和B\*2709在结构上仅有一个氨基酸的差别,但对疾病的预见却截然不同。

## 1.2 HLA-B27与AS的相关性

1973年Brewerton等<sup>[5]</sup>发现HLA-B27与AS之间具有强遗传相关性,AS患者中HLA-B27的阳性率达到90%<sup>[6-7]</sup>,而在正常人中HLA-B27的阳性率仅为5%<sup>[8-9]</sup>。在对AS患者一级亲属的调查中发现,HLA-B27阳性者占31.3%,并且这些亲属患AS的相对危险率达87.4,其危险性高出正常家庭对照组10.8倍<sup>[10]</sup>。近些年,随着分子生物学技术的发展,截至2011年世界范围内鉴定出的HLA-B27亚型有155种之多。其中常见AS相关亚型有B\*2705、B\*2704、B\*2703、B\*2702、B\*2701等。其中白种人B\*2705亚型占96%;非洲黑人以B\*2703为主,占61%;中国汉族人群中,HLA-B\*2705和HLA-B\*2704构成了HLA-B27的优势亚型,分别占40.68%和50.85%<sup>[11]</sup>。综合来看,以B\*2704与AS的关联性最强,其次是B\*2705、B\*2702和B\*2707。目前的研究认为,B\*2703和B\*2707与AS呈负相关,B\*2706和B\*2709被认为是一种保护性基因<sup>[12]</sup>。其中B\*2706广泛分布于东南亚人群中;B\*2707

主要存在于印度、中国和泰国人中;而B\*2703和B\*2709的分布分别局限于西非地区和意大利撒丁岛。马来西亚人中AS发病率很低,这可能就与B\*2706的保护作用相关<sup>[13]</sup>。除HLA-B27基因外还有一些HLA其他位点的基因以及非MHC基因与AS具有相关性。

## 2 AS的发病机制

AS主要以中轴关节和大关节受累为主要表现,可累及内脏和其他组织,包括前葡萄膜炎、弥漫性间质性肺纤维化和虹膜睫状体炎等,发病后期典型X线表现为骶髋关节破坏,脊柱呈“竹节样”改变<sup>[14-15]</sup>。目前认为AS主要与遗传、环境、微生物感染等有关,但是具体的致病机理还未定论,主要的几种致病假说有:分子模拟假说、蛋白错误折叠理论、细菌感染学说等。

### 2.1 分子模拟假说

研究发现某些微生物携带与人同源的肽段,可引起交叉反应<sup>[16-17]</sup>。正常情况下关节源性致命肽在正常人体中其递呈水平比较低,不能诱导免疫应答。而当含有某些同源性的蛋白的病毒或细菌感染时,则可致敏耐受的T淋巴细胞对低水平递呈的关节源致命肽进行识别,引起自身免疫反应并最终发展为AS。研究表明致病基因和保护性基因在识别抗原的过程中存在差别,Hülsmeier等<sup>[18]</sup>发现,携带B\*2705基因的AS患者体内存在血管活性肠肽受体衍生物(derived from vasoactive intestinal peptide type 1 receptor, pVIPR),而B\*2709阳性个体无此抗原肽。B\*2705可以2种不同的构象与pVIPR结合,而体外实验中B\*2709结合pVIPR只有一种构象,B\*2705以其中一种构象与pVIPR结合时能逃脱胸腺的阴性选择。Fiorillo等<sup>[19]</sup>发现,EB病毒的肽段潜在膜蛋白2衍生物与B\*2705和B\*2709结合时也呈现2种不同的构象,而且其与B\*2705结合时的构象与B\*2705/pVIPR相同,直接为该假说提供了证据。但该假说无法解释为什么一些HLA-B27阴性患者也会发生AS,而且在对转基因鼠炎症模型的研究中,发现它并不依赖CD8<sup>+</sup>T细胞。提示AS发病过程仍有其他因素作用。

### 2.2 蛋白错误折叠理论

HLA-B27分子在内质网中的折叠速率非常的慢并且容易发生错误折叠。错误折叠的HLA-B27

分子在内质网中不断积聚触发内质网的应激反应,激活未折叠蛋白反应,并最终导致炎症的发生<sup>[20]</sup>。通过大鼠模型发现随着错误折叠的减少,关节炎的发生率也同时在减低<sup>[21]</sup>。相同条件下疾病弱相关或者负相关的基因亚型如 *HLA-B\*2706* 和 *HLA-B\*2709* 表达的分子能够更加有效地进行折叠,这很好地解释了为什么不同基因亚型与 AS 的相关程度不同,此外,对相关致病基因折叠错误率高的研究可能为疾病的诊治提供新思路。

### 2.3 细菌感染假说

AS 和一些肠道病原菌的感染有关<sup>[22]</sup>,实验发现患者关节液内单核细胞增多,并富含相应菌体抗原。大样本调查中发现 60% 以上的 AS 患者都出现过肠炎症状,并且在疾病活动期进展为炎性肠病<sup>[23]</sup>。同时 B27/ $\beta$ 2M 转基因鼠在无菌环境下不会发病,提示环境因素也是致病因素之一。

此外,目前对于 MHC 其他位点基因以及非 MHC 分子与 AS 发病关系的研究也比较深入<sup>[24]</sup>。在其他 MHC 基因中,*HLA-60* 是目前被发现的仅次于 *HLA-B27* 的独立 AS 易患基因,并且此观点在对加拿大和日本人群研究中已经得到证实。非 MHC 分子的研究包括白介素、转化生长因子、神经丛蛋白等<sup>[25]</sup>。

迄今还没有一种说法能够完全解释 AS 疾病,对 AS 致病机制的研究仍在进行。任何一种疾病都不会由某单一组基因或某单一因素所掌控,而是复杂的网络调控的结果。因此,在 AS 致病机制的研究过程中,要从宏观到微观、从外环境因素到内环境因素、从蛋白表达到基因表达以及各种细胞因子之间的相互作用进行全面分析。

## 3 AS 的诊断

目前针对 AS 的国际诊断标准主要是 1966 年的纽约标准和 1987 年的修订的纽约诊断标准。随着认识的不断深入,纽约诊断标准已不符合临床实际,因此国际上一般采用修订后的纽约诊断标准。修订后诊断标准<sup>[26]</sup>的主要内容包括:(1)临床标准:①腰痛、晨僵 3 个月以上,活动好转,休息无改善;②腰椎额状面和矢状面活动受限;③胸廓活动度低于相应年龄、性别的正常人;(2)放射学标准:骶髂关节炎分级双侧  $\geq$  II 级或单侧 III~IV 级,其中骶髂关节 X 线分级:0 级为正常;I 级为可疑;

II 级为轻度异常;III 级为明显异常;IV 级为严重异常。(3)诊断:①肯定 AS:符合放射学标准和一项(或以上)临床标准者;②可能 AS:符合 3 项临床标准或符合放射学标准而不符合临床标准者。国内在 1997 年首届 AS 临床和流行病学全国协作组研讨会上制订了符合国内人群的 AS 诊断标准,但依旧以影像学为主。由于大多数患者都是在出现腰背不适等体征后才会就诊,甚至部分已经有了明显的影像学改变,而一般患者在患病早期不会出现明显的影像学改变,并且部分患者会出现误诊情况,导致 AS 延误确诊并影响预后。在这种情况下,对于 AS 的早期检查就显得尤为重要。

## 4 HLA-B27 的检测方法及评价

目前关于 *HLA-B27* 的检测方法主要有补体依赖性细胞毒法、酶联免疫吸附试验法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、流式细胞术法(flow cytometry, FCM)和 PCR 法等几种主要的检测方法。

### 4.1 补体依赖性微量细胞毒法

抗 *HLA-B27* 抗原的单克隆抗体可以与人类淋巴细胞表面 *HLA-B27* 抗原结合,在补体参与下,细胞膜被破坏而导致细胞死亡,阳性死亡细胞可被染料着色,使用倒置显微镜计数着色细胞的百分比可判定 *HLA-B27* 抗原的表达量从而进行疾病的诊断。此法是较早建立的检测 *HLA-B27* 的方法,具有操作简便、仪器设备要求不高、检测费用低等优点,适合于基层单位开展。其缺点是干扰因素相对较多,易受单抗效价、细胞纯度、补体差异以及 *HLA* 基因多态性的影响,易出现假阳性和假阴性,而且对标本量需求较大,标本不能长期保存。

### 4.2 ELISA 法

ELISA 法将 *HLA-B27* 的单克隆抗体包被在微孔板上,加入待检血清进行孵育,洗去未被结合的游离抗原,加酶标抗体(根据检测抗原的不同可选择不同抗体,如抗 CD45 抗体、抗 *HLA-B27* 抗体等)和底物进行显色。使用酶标仪读取吸光度,将结果与标准孔对比判断结果。ELISA 法是一种经典成熟的方法,具有操作简便、快捷无需特殊仪器等优点,极为适合基层医院开展。但多克隆抗体易与血清中的其他物质发生交叉反应。

### 4.3 FCM法

流式细胞技术结合荧光标记的单克隆抗体,通过荧光标记技术迅速区分淋巴细胞亚群,并且通过单克隆抗体检测出CD3<sup>+</sup>淋巴细胞中HLA-B27抗原阳性的细胞百分比,结果根据流式细胞仪内置的临界值判定。此法优点是操作简便、快速、特异性高,稳定性好、标本用量少、重复性高,自动化程度高减少了人为因素的影响,弥补了前2种方法的缺点,是目前较为理想的方法。国外已将FCM法作为检测HLA-B27的常规方法<sup>[27-28]</sup>。缺点是仪器比较昂贵,目前只在较大的医院可以开展,容易出现荧光淬灭。此外,相对基因检测,抗原检测属于间接检测,仪器在判定结果的过程中存在“灰区”。

### 4.4 序列特异引物聚合酶链反应(polymerase chain reaction-sequence specific primers, PCR-SSP)

该方法最大的优势在于它在分子生物学基础上对HLA-B27基因进行定性分型。目前该法的应用已经比较成熟,可以在临床广泛开展。该法一定程度上避免的FCM法存在检测“灰区”的缺点,它根据等位基因的碱基差异设计引物,特异性扩增与其相应的等位基因。因此,有无PCR扩增产物是鉴定特异性等位基因的基础,PCR扩增产物可通过琼脂糖凝胶电泳检出。检测时首先提取患者全血DNA,用血量更少,然后利用PCR技术进行产物扩增,最后通过琼脂糖凝胶电泳进行结果判读。PCR扩增技术具有极大的检测灵敏度,同时带来了检测错误进行放大的弊端。因此,PCR检测结果的报告必须慎重,必须有严格质控措施(如内参引物)并符合人类基因座位规则的情况下报告结果,对于人类稀有位点的报告必须重复测定。操作PCR基因扩增技术影响因素很多,操作不当会造成假阴性、假阳性结果。PCR临床实验室必须符合国家PCR实验室技术规范要求。此外,有些试剂盒对杂合子标本无法给出高分辨结果,需用基因测序方法进行区分<sup>[29-30]</sup>。

上述4种方法是目前检测HLA-B27的常用方法,补体依赖性微量细胞毒法因实验条件难以控制而逐渐被弃用;ELISA法操作简单快速,且无需特殊仪器,适用于中小医院开展以及大样本普查;FCM法以其操作简便、自动化程度高、重复性好等优点成为较理想的检测方法;PCR-SSP法近几年

也逐渐被得到认可,对抗原弱表达的HLA-B27基因携带者检测优势尤为显著。在条件允许的情况下建议采取2种方法互补检测以提高检测的准确性。

## 5 AS的治疗

目前对AS的治疗手段极其有限,主要包括药物治疗和非药物治疗。药物治疗主要包括:抗风湿类药物,如非甾体类抗炎药、糖皮质激素以及环孢素A等;缓解症状的药物包括:甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、沙利度胺等。近些年研究发现肿瘤坏死因子- $\alpha$ 拮抗剂对非甾体类抗炎药治疗无效的患者有效,尤其对中轴病变短期治疗有效,但是长期疗效缺乏评估<sup>[31-32]</sup>。非药物治疗主要包括对患者进行健康教育,要求患者体育锻炼、康复理疗如睡硬板床等。手术治疗仅针对一些髋关节严重受累或者脊柱严重畸形的患者。

## 6 结语

AS属于一种临床上比较常见的自身免疫性炎性疾病,具有诊断困难、病程较长、晚期致残率高、治疗手段局限等特点,目前主要依靠影像学手段确诊。上世纪70年代发现HLA-B27与AS具有较强相关性,可作为AS早期诊断的辅助指标,使得AS的确诊率得到了大幅提高,也使HLA-B27成为了研究热点。近些年来,对HLA-B27的结构以及检测手段的研究逐渐向分子生物学领域延伸,使我们对它得到了更加深入的认识,也使检测手段更加灵敏。AS发病机制的研究成果包括分子模拟假说、蛋白错误折叠理论、微生物-宿主-AS间的相互作用以及细胞因子与AS间的相互作用等,各因素可能同时作用,也可能在疾病进展的各阶段分别作用,这也是我们对AS发病机制进一步研究的方向。AS的治疗仍以药物治疗为主,免疫抑制剂成为了目前的常规用药,而新型生物制剂的研发将会成为未来发展的方向。虽然各方面的研究已有了长足的进步,但仍有一些问题需要进一步研究去解答,比如HLA-B27抗原仅表达于有核细胞,缘何AS的发病却有明显的组织特异性等等。随着研究的深入以及检测手段的不断发展,这些问题都会得到解决,新的检测指标会不断被发现,将为AS的病情变化、治疗监测提供帮助。

## 参考文献

- [1] 林蔚,肖平,吴祖长. HLA-B27 抗原检测在强直性脊柱炎诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(3):371-372.
- [2] Sheng W, Guixing L, Rui G, et al. Association of KIR genotype with susceptibility to HLA-B27-positive ankylosing spondylitis [J]. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(3):538-541.
- [3] David S, John SS, Padhan P, et al. Spontaneous inflammatory disease in HLA-B27 transgenic mice does not require transporter of antigenic peptides [J]. *Clin Immunol*, 2001, 98(3):364-369.
- [4] Rauner M, Stupphann D, Haas M, et al. The HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis has decreased bone mineral density and increased RANKL to osteopontin mRNA ratio [J]. *Rheumatology*, 2009, 36(1):120-126.
- [5] Brewerton DA, Cafrey M, Hart FD, et al. Ankylosing Spondylitis and HLA-B27 [J]. *Lancet*, 1973, 27(9):904.
- [6] Parasannanavar DJ, Rajadhyaksha A, Ghosh K, et al. Role of HLA-B alleles and clinical presentation of B27 negative spondyloarthritis patients from Mumbai, western India [J]. *Autoimmune Diseases*, 2014, 2014: 327315.
- [7] Muradiye A, Tulin C, Recep T, et al. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(10):3013-3105.
- [8] Liu Y, Wu X, Bradbury LA, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7):730-738.
- [9] Strepo JP, Mohna MP. Complete heart block in ankylosing spondylitis [J]. *Rev Bras Reumatol*, 2012, 52(5):800-803.
- [10] Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis [J]. *Lancet*, 2011, 377(9783):2127-2137.
- [11] 高文博,徐海栋,刘刚,等. 青壮年军人腰腿痛患者 HLA-B27 及其基因亚型检测分析[J]. 东南国防医药, 2015, 17(3):233-235.
- [12] Muradiye A, Tulin C, Recep T, et al. HLA-B27 subtypes in Turkish patients with ankylosing spondylitis and healthy controls [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(10): 3103-3105.
- [13] 黄建民,李荣需,周玲. 强直性脊柱炎与 HLA-B27 基因亚型动态定量表达的相关性研究[J]. 中国医学创新, 2013, 10(32):143-146.
- [14] Qi J, Li Q, Lin Z, et al. Higher risk of uveitis and dacrylitis and older age of onset among ankylosing spondylitis patients with HLA-B\*2705 than patients with HLA-B\*2704 in the Chinese population [J]. *Tissue Antigens*, 2013, 82(6):380-386.
- [15] 梁佐堂,李继峰,董乐. 比分析 X 线、CT 和 MRI 在早期强直性脊柱炎骶髂关节病变诊断中应用的价值 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2015, 13(2):84-87.
- [16] Ben DL, Barnea E, Beer I, et al. The HLA-B\*2705 peptidome [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2):420-429.
- [17] Reveille JD, Sims AM, Danoy P, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(2):123-127.
- [18] Hülsmeier M, Fiorillo MT, Bettosini F, et al. Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide [J]. *Exp Med*, 2004, 199(2):271-281.
- [19] Fiorillo MT, Racke M C, Hülsmeier M, et al. Allele-dependent similarity between viral and self-peptide presentation by HLA-B27 subtypes [J]. *Biol Chem*, 2005, 280(4):2962-2971.
- [20] Fabian H, Huser H, Loll B, et al. HLA-B27 heavy chains distinguished by a micropolymorphism exhibit differential flexibility [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(4):978-987.
- [21] Sorrentino R, Böckmann RA, Fiorillo MT. HLA-B27 and antigen presentation: At the crossroads between immune defense and autoimmunity [J]. *Molecular Immunology*, 2014, 57(1):22-27.
- [22] DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, et al. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9):2633-2643.
- [23] 汪洋,谢志军,邵铁娟,等. 从脾论强直性脊柱炎 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2):389-391.
- [24] Ziegler A, Loll B, Misselwitz R, et al. Implications of structural and thermodynamic studies of HLA-B27 subtypes exhibiting differential association with ankylosing spondylitis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, 64(9):177-195.
- [25] 杨媛媛,王庆文. 强直性脊柱炎易感基因研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(10):1308-1312.
- [26] 刘越,赵艳梅,夏群. 强直性脊柱炎的诊断与治疗进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(3):235-238.
- [27] Pazár B, Sáfrány E, Gergely P, et al. Association of ARTS1 gene polymorphisms with ankylosing spondyli-

- tis in the Hungarian population: the rs27044 variant is associated with HLA-B\*2705 subtype in Hungarian patients with ankylosing spondylitis [J]. *The Journal of Rheumatology*, 2010, 37(2):380-384.
- [28] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis [J]. *A Proposal Formodification of the New York Criteria* [J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27(4):361-368.
- [29] 闻海丰,冯忠军,韩文龙,等.实时荧光聚合酶链反应熔解曲线检测人类白细胞抗原 B27 方法建立及评价 [J]. *临床荟萃*, 2015, 30(6):674-677.
- [30] Elewaut D, Burgos-Vargas R, Stebbings S, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7):730-738.
- [31] 林丽,叶玲英,殷健,等.肿瘤坏死因子- $\alpha$ 拮抗剂对类风湿关节炎和强直性脊柱炎患者血清白细胞介素-17 和外周血 Th-17 细胞比例的影响 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(10):661-664.
- [32] Heldmann F, Brandt J, van der Horst Bruinsma IE, et al. The European ankylosing spondylitis infliximab cohort (EASIC): a European multicentre study of long term outcomes in patients with ankylosing spondylitis treated with infliximab [J]. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2011, 29(4):672-680.

(上接第 195 页)

- [8] Mohamud HS, Mohamed DH, Alqahtani FH, et al. Two years' experience of implementing molecular screening of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus 1, 2 in Riyadh blood donors [J]. *Transfusion and Apheresis Science*, 2015. Epub ahead of print.
- [9] Cable R, Lelie N, Bird A. Reduction of the risk of transfusion-transmitted viral infection by nucleic acid amplification testing in the Western Cape of South Africa: A 5-year review [J]. *Vox Sang*, 2013, 10(4):93-99.
- [10] Jain R, Perkins J, Johnson ST, et al. A prospective study for prevalence and/or development of transfusion-transmitted infections in multiply transfused thalassemia major patients [J]. *Asian J Transfus Sci*, 2012, 6(2):151-154.
- [11] 叶贤林,曾昭鉴,杨宝成,等.国产核酸扩增(PCR)试剂在献血者血液 HBV DNA 筛查中的应用研究 [J]. 2007, 6(5):301-306.
- [12] 任芙蓉,王憬惺,赵海燕,等.我国 5 城市合格献血者血液 HIV 及 HCV 残余风险研究 [J]. *中国输血杂志*, 2007, 20(6):469-475.
- [13] 吴丹青,吴亚玲,吕杭军.核酸检测在献血筛查中的应用 [J]. *浙江预防医学*, 2015, 27(5):501-503.
- [14] 曹晓,曹庆宝,李杰,等.核酸检测技术在唐山地区献血者血液筛查中的应用 [J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(5):634-637.
- [15] 谢敬文,蓝文莉,黎淑贞,等.番禺地区无偿献血者酶免阴性样本的核酸检测结果分析 [J]. 2014, 16(4):355-327.
- [16] Ren FR, Wang JX, Huang Y, et al. Hepatitis B virus nucleic acid testing in Chinese blood donors with normal and elevated alanine aminotransferase [J]. *Transfusion*, 2011, 5(1):2588-2595.
- [17] Carson JL, Grossman BJ, Kleinman S, et al. Red Blood Cell Transfusion: A Clinical Practice Guideline from the AABB [S]. *Ann Intern Med*, 2012, 15(7):49-58.

## 浅谈医疗器械临床试验过程的质量控制和监查要点

林凯容 雷孝锋 陈琼 高旭年\*

医疗器械是现代临床诊断、治疗、疾病防控、公共卫生和健康保障体系中最为重要的基础装备,其发展不仅需要新的科学技术的应用支撑,更需要通过科学的临床试验研究,确保新的科学技术应用于人体的有效性和安全性。

依据国家食品药品监督管理局(下称国家局)颁发的《医疗器械监督管理条例》以及《医疗器械注册管理办法》,申请第二类、第三类医疗器械注册,应当进行临床试验。临床试验是获得临床评价基础数据的重要途径之一,其真实性、准确性和科学性关系到产品的安全性和有效性的判定,关系到人的生命安全。由于医疗器械本身具有学科交叉、种类繁多、不同类型产品风险差异大、新技术应用快等特点,只有建立科学有效的质量保证和控制体系,对医疗器械临床试验过程实施有效的监督管理,才能保证产品的有效性和安全性。本文将依据医疗器械临床试验质量管理规范,结合日常工作经验,浅谈医疗器械临床试验过程的质量控制和监查要点。

### 1 医疗器械临床试验过程的质量保证体系

医疗器械临床试验,是指在国家认可的医疗器械临床试验机构中,对拟申请注册的医疗器械在正常使用条件下的安全性和有效性进行确认或验证的过程。对医疗器械临床试验质量实施监督管理,其目的不仅是为了保护医疗器械临床试验过程中受试者的权益并保障其安全,也是为了保证医疗器械临床试验过程遵从临床试验方案和相关法规条例,保证其试验记录和报告数据准确、真实,研究结果科学可靠。

医疗器械临床试验过程质量的保证和控制,主要是指通过质控步骤和独立于临床试验的质量保证管理部门按照标准操作流程进行系统检查、评价而达到质量的保证。

目前,医疗器械临床试验过程的质量保障体系主要包括4个方面:

第一,国家食品药品监督管理局及国家卫生计生委管理委员会颁发的相关法律法规以及管理条例;第二,医疗机构医学学术委员会及医学伦理委员会对临床试验方案的科学性以及受试者的安全性的审评监督;第三,经资质认定的医疗机构及其临床研究管理部门对临床试验申办方和研究者的资质、临床试验实施全过程的审查和监管;第四,研究者及申办方的监查员对临床试验的科学性、真实性、完整性形成内外部的监查。

#### 1.1 临床试验管理法律法规及条例

##### 1.1.1 《医疗卫生机构开展临床研究项目管理办法》(国卫医发[2014]80号)(下称[2014]80号)

2014年10月16号由国家卫生计生委、国家食品药品监督管理局、国家中医药管理局发布。其中第三条、第五条以及第六条,对开展医疗器械临床试验的医疗机构及其管理部门和伦理委员会作出了要求和规定。

##### 1.1.2 《医疗器械监督管理条例》(国务院第650号)

2014年3月7号由李克强总理颁布。其中第十八条提出,医疗器械临床试验遵从质量管理规范要求以及向管理部门备案。

##### 1.1.3 《医疗器械临床试验规定》(局令第5号)(下称2004年局令第5号)

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

2004年1月17号由国家局发布。其中第三条明确了医疗器械临床试验的定义;第四条提出了伦理方面应遵从的道德原则;第二十一条明确了承担医疗器械临床试验的医疗机构即为经国家局资质认定的药品临床试验基地。

1.1.4 《医疗器械临床试验质量管理规范(征求意见稿)》(食药监械函〔2012〕68号)

2012年8月28号由国家局发布。其中第二条明确了质量管理规范的范畴;第三条提出应遵从的相关法律法规及原则。

1.1.5 《医疗器械临床试验机构资质认定管理办法(征求意见稿)》(食药监械管便函〔2014〕75号)

2014年12月5号由国家局发布。其中第六条规定了承担医疗器械临床试验的医疗机构应具备的条件。

1.1.6 其他医疗器械临床试验相关通知

(1)2014年8月21号国家局发布《关于发布免于进行临床试验的第二类医疗器械目录的通告》(2014年第12号)。

(2)2014年8月21号国家局发布《关于发布免于进行临床试验的第三类医疗器械目录的通告》(2014年第13号)。

(3)2014年8月25号国家局发布《关于发布需进行临床试验审批的第三类医疗器械目录的通告》(2014年第14号)。

(4)2014年9月30号国家局发布《关于印发国家重点监管医疗器械目录的通知》(食药监械监〔2014〕235号)。

医疗器械临床试验质量的监督管理从以前按照《药物临床试验质量管理规范》(good clinical practice, GCP)的原则进行,到目前按照已颁布或逐步征求意见中的医疗器械相关的个性化法律法规实施和进行。由此可见,国家对医疗器械临床试验给予了极大的重视,法律法规正逐步完善形成体系,同时也采用了相关国际标准,按照医疗器械的不同风险等级,从医疗机构的资质认定及管理程序,医学学术委员会及医学伦理委员会的设立和审核,临床评价的方法选择,临床试验方案的制定,临床试验实施过程都做出了详细的规定,为医疗器械临床试验过程的质量保证和控制提供了重要的依据。

1.2 医学学术委员会及医学伦理委员会

依据〔2014〕80号规定,开展临床研究的医疗

卫生机构应当成立伦理委员会。医疗卫生机构的医学学术委员会及医学伦理委员会主要负责对医疗器械临床试验项目的科学性、伦理合理性进行审查。旨在保证受试者权益、安全和尊严,促进临床试验科学、健康地发展,提高公众对医疗器械临床试验的信任和支持。

参照2012年11月2号由国家局发布的《药物临床试验伦理审查工作指导原则》,医学学术委员会及医学伦理委员会由多学科背景的人员组成,包括从事医药相关专业人员、非医药专业人员、法律专家、以及独立于研究/试验单位之外的人员,至少5人,且性别均衡。确保伦理委员有资格和经验对临床试验的科学性和伦理合理性进行审阅和评估。伦理委员会的组成和工作不应受任何参与试验者的影响。

医疗机构医学学术委员会及医学伦理委员会对医疗器械临床试验项目的审查监督秉承4个原则,即知情同意原则、医疗最优化原则、医疗保密原则和生命价值原则,确保受试者充分知情自主作出选择参与临床试验,并以最小代价获取最大效果,同时其隐私得到保密、其生命价值得到尊重。伦理审查分为初始审查、跟踪审查、复核审查。其要点包括临床试验研究的科学设计与实施、研究的风险与受益、受试者的招募、知情同意、受试者的医疗和保护、隐私和保密以及涉及弱势群体研究的特殊审查。伦理审查的文件涵盖临床试验方案、临床试验方案增补、招募病人使用广告、受试者知情同意书、病人教育材料、诊治与补偿等。伦理委员会对临床试验的审查监督权力包括批准或不批准一项临床试验、对一项已批准的临床试验进行跟踪审查、终止或暂停一项已批准的临床试验。

任何有关人体的试验开展前,都必须先行伦理审查,并且获得伦理委员会投票决定的书面同意意见,即伦理审查批件。在临床试验实施过程中出现的临床试验方案修改、病例报告表修改、知情同意书修改或严重不良事件,申办方和研究者均应及时报告伦理委员会,并调整相应的工作。

医疗机构医学学术委员会及医学伦理委员会从人员组成,工作原则,审查类别、要点、文件、方式,以及审查监督权力上,对医疗器械临床试验的科学性和受试者的安全性给予了重要的保障。

### 1.3 经资质认定的医疗机构及其临床研究管理部门

依据[2014]80号文规定,医疗机构开展临床研究应当取得相应法律法规的资质,药物和医疗器械临床试验机构应具备相应的能力,并按相应要求获得资格认定;开展临床研究的医疗卫生机构应当成立临床研究管理委员会,临床研究管理部门在临床研究管理委员会的指导下,负责临床研究的立项审查、实施控制、档案管理等具体的管理工作。

同时,依据2004年局令第5号规定,承担医疗器械临床试验的医疗机构是指由国务院食品药品监督管理部门和国务院卫生行政部门认定的药品临床试验基地。药品临床试验基地,即国家药物临床试验机构,是经国家局认定的有资质开展药物临床试验的医疗机构。其资质认定主要依据2004年2月19号国家局发布的《药物临床试验机构资格认定办法(试行)》。对临床试验机构进行资质认定,是保证临床试验过程规范、结果科学可靠、保护受试者权益并保障其安全的有效手段,亦是保证临床试验研究质量的重要措施。

国家药物临床试验机构具备完善的管理制度、有素质的管理人员、严谨的质量控制和保证体系、科学的归档资料管理体系以及临床试验相关的辅助科室和实验室。在接受一项临床试验前,机构管理人员根据试验用医疗器械的特性,对相关资源进行评估,从而决定是否接受该临床试验;一旦接受该临床试验,便严格依照GCP以及《医疗器械临床试验质量管理规范(征求意见稿)》,对医疗器械临床试验全过程,包括方案设计、实施、监查、核查、检查、数据采集、记录、分析总结和报告等进行管理监督。确保医疗器械临床试验的数据真实、完整、可靠,确保医疗器械的有效性和安全性得到真实可靠的评价。

医疗器械临床试验由药物临床试验机构承担,虽然看是节省了资源,但是也出现了很多弊端。其一,由于药物临床试验机构数量有限,本身就需要承担和监管很多药物临床试验,难以再承担和监管目前正飞速发展的医疗器械临床试验。其二,药物临床试验机构资质认定主要关注药物相关的标准原则,并未覆盖医疗器械的个性要求,对医学相关工程技术研究人员也缺乏关注和要求。目前,为了细分药物和医疗器械临床试验的

管理工作,从机构个性遴选上对医疗器械临床试验质量加以保障,国家局也已经发布《医疗器械临床试验机构资质认定管理办法(征求意见稿)》,拟开展对医疗器械临床试验机构进行资质认定的工作。在此之前,医疗器械临床试验仍由国家药物临床试验机构的承担和监管,此后,医疗器械临床试验将由经资质认定的医疗器械临床试验机构承担和监管,其临床试验质量将得到更科学有效的保障。

### 1.4 研究者及监查员

研究者是临床试验机构中负责实施临床试验的人,在一个临床试验机构中是一组人员实施临床试验,研究者即是这个组的负责人,也称为主要研究者。研究者必须具备相应专业技术职务和资质、试验用医疗器械所要求的专业知识和经验,必要时应经过有关培训;熟悉申办者提供的与临床试验有关的资料、文献和要求;有能力支配、协调和使用进行该项临床试验的人员和设备,且有能力处理试验中因使用医疗器械发生的不良事件和其他关联事件;熟悉国家有关法律和法规,以及医疗器械临床试验质量管理和伦理规范。

2004年局令第5号第十一条“医疗器械临床试验方案应当由负责临床试验的医疗机构和实施者共同设计制定,报伦理委员会认可后实施”。只有具备承担医疗器械临床试验资质的研究者,才能采用明确的诊疗评价、可操作的量化指标、合理的统计方法等设计出科学的临床试验方案以及相关的标准操作规程,以保障医疗器械临床试验的科学合理性。

监查员是由申办者任命并对申办者负责的具备器械临床试验、医学和药学、以及项目管理等相关知识的人员,其任务是按照有关要求监查临床试验过程、报告临床试验进展情况和核实有关数据。监查员是研究者和申办方之间的主要沟通桥梁,其工作主要为了确保临床试验遵从试验方案,数据记录准确、完整,遵从法律法规以及试验的顺利进展。对医疗器械临床试验实施定期监查,是医疗器械临床试验质量保证和控制至关重要的途径,是保证完成高质量临床试验的重要措施。

由此可见,医疗器械临床试验的科学性和真实性,离不开研究者对临床试验的科学设计和有效实施,也离不开监查员对试验实施过程的监督

和核查,以此形成的内外部监查管理,是医疗器械临床试验过程质量保证体系中重要的组成。

## 2 医疗器械临床试验监查要点

获得有效、完整、真实的临床试验数据不仅需要科学严谨的试验设计,更需要对试验的执行情况实施有计划和有保障的监督。医疗器械临床试验监查工作不仅是医疗器械临床试验质量保证体系中重要的一部分,也是申办方对产品临床试验实施过程的主要监督途径。科学严谨的监查工作才能促成高质量的临床试验,因此,以下将以监查员的角度,从医疗器械临床试验前、临床试验进行中、临床试验结束后3个阶段谈谈医疗器械临床试验的监查工作及监查要点。

### 2.1 临床试验开始前

医疗器械临床试验开始前,监查员的工作主要包括试验用医疗器械以及器械相关记录文件的准备、试验研究文件的准备、试验人员的确定及培训。

#### 2.1.1 试验用医疗器械以及器械相关记录文件的准备

试验用医疗器械必须经过适当包装与标签,标明为临床试验专用,不得销售,不得用于非临床试验受试者,且需由被授权专人管理,由研究者负责其使用。其相关的记录文件包括统计师提供的随机盲底、检验报告、产品生产质量管理规范条件记录、包装标准操作流程、准备情况、以及其数量、装运、递送、接收、储藏、分配、使用、剩余器械的回收与销毁等信息记录表单。

#### 2.1.2 试验研究文件的准备

试验研究文件可分为试验中心文档、研究者文档、申办方研究文档。

试验中心文档主要是临床研究管理部门和伦理委员会申请及备案文档,主要包含申办者资质证明(营业执照、生产许可证、质量体系认证证书)、检验报告及产品技术要求、自测报告、临床使用操作说明/研究者手册、动物试验报告及国家局临床批件(首次植入第三类医疗器械)、临床试验方案/病例报告表/知情同意书(招募受试者广告、受试者学习材料)、研究者简历及GCP证书、监查员授权书、临床试验委托书及材料真实性申明、以及依据各医疗机构要求的其他资料等。

研究者文档主要是临床试验过程中各环节所建立的标准操作流程、签署的知情同意书、病例报告表、应急信封、研究报告等。

申办方研究文档主要是临床试验研究资料、自行设计的适用表格、与研究者的沟通信件、临床试验伦理委员会批件、临床试验合同等文件。

#### 2.1.3 试验人员的确定和培训

临床试验参与人员应包括专业负责人、主要研究者、研究者、研究护士、药师、研究协调员、辅助科室医生或技师。根据不同的教育背景和工作经历,以及临床试验方案的要求和特殊操作流程需要,试验参与人员由主要研究者授权,签署临床试验职责分工授权表、签名样张以及填写确认联系方式。

临床试验参与人员的培训应当包括GCP培训、试验方案培训、试验操作培训。通过临床试验启动会等方式,确保试验参与人员熟悉GCP管理规定、临床试验方案以及能正确使用试验用医疗器械,并保存相关培训记录,如会议PPT、会议签到表及会议记录。

### 2.2 临床试验进行中

医疗器械临床试验进行中,监查员的工作主要包括常规访视、临时访视、向伦理委员会报告及提交文件。

#### 2.2.1 常规访视

常规访视指监查员在依照原先的监查计划,在与研究者约定时间和地点后,按期到研究机构进行临床试验访视和监查。

常规访视的频率可以按照筛选期、治疗期和随访期进行计划安排。筛选期通常可安排在首次入选病例、入选一至两周、入选高峰期;治疗期通常可安排在各中心第一次治疗、第二次治疗、治疗一至两周,治疗一个月;随访期通常可安排在各随访点随访一至两次。

常规访视的要点主要有:(1)受试者的安全与受益:是否已签署知情同意书,不良事件/严重不良事件记录报告以及处理进展等;(2)试验进展:受试者的筛选和入组的进度,随访的进度等;(3)符合法规和伦理的要求:临床试验方案或知情同意书修改是否经伦理委员会备案批准等;(4)研究人员及设备:研究人员是否变更以及是否需再培训,研究设备是否定期校准;(5)研究方案、标准操作流程依从性:入排标准、随机方法等是否依从方

案,偏离情况是否有记录;(6)病例报告表审阅和原始数据核查:是否一致、完整、清晰;修改是否符合规定;(7)试验器械及用品等使用登记:是否及时、完整;是否需补充;(8)其他:研究者文档资料是否完整、及时更新;随访窗口期是否严格按照要求;试验用品是否在有效期内;物品运输情况记录等。(9)与研究人员沟通讨论:发现问题,解决问题,预约下次监查时间。

常规访视之后,书写监查报告,追踪未解决问题的处理,追踪随访后的信件,必要时召开下一步工作计划会议。

### 2.2.2 临时访视

在临床试验过程中,如若出现研究者变更、入组困难、出现严重不良事件、试验方案修改、出现特殊问题,或应对相关管理单位的稽查和视察,监查员应及时安排访视,积极配合研究者处理相关的问题。

### 2.2.3 向伦理委员会报告及提交文件

在临床试验过程中,临床试验方案修改或增补、病例报告表修改、知情同意书修改或严重不良事件,均应及时向伦理委员会报告,并提交备案的相关文件。

### 2.3 临床试验结束后

在临床试验结束后,监查员需要进行最后拜访研究者,以及按照监查清单,确保所有文件放置

在相应部位,确定文档资料完整,所有病例报告表正确并送回申办者处,解决遗留问题、完成监查报告并知会伦理委员会终止临床试验。

最后监查清单主要包括试验器械及物品的所有记录表格及已用和未用器械的处理,病例报告表信息完整且均有研究者签字、所有质疑均得到解决,知情同意书均正确签署及保存,研究者试验报告记录正确完整,研究中心文档、研究者文档以及申办方研究文档均完整保存。

## 3 结论

对医疗器械临床试验过程实施质量保证和控制,是健康所系、性命相托,是关乎国计民生的大事。综上所述,只有通过不断健全临床试验管理法律法规及条例,合理遴选医疗器械临床试验机构,科学设计临床试验方案和评价指标,建立临床试验各环节的标准操作流程,配备经验丰富的研究团队,发挥申办方监查员的监查作用,以及通过独立于临床试验单位的监督管理部门按照标准操作流程的系统检查、评价等形成的医疗器械临床试验质量保证体系,多道齐驱,多管齐下,相辅相成,才能保证和控制医疗器械临床试验的质量,才能保证医疗器械的有效性和安全性,才能促成医疗器械的健康发展,才能更多地造福于人类的生命健康。

## 中山大学附属第一医院检验医学部

中山大学附属第一医院检验医学部是华南地区乃至全国规模最大的集医、教、研为一体的检验医学基地之一，具有整体实力强、基础底蕴深厚、专业设置完整、临床资源丰富、人才梯队完整、科研方向明确、技术特色明显、医教研全面发展的优势和检测能力快速、准确、覆盖面广的特点。于2000和2003年分别获得临床检验诊断学硕士点和博士点，2007年成为全国首批医学检验专科医师培训基地之一，2012年被评为广东省临床重点专科，2013年被评为国家临床重点专科建设单位，2015年被国家卫计委首批批准为高通量测序试点单位。

该实验室以“区域一流、国内先进”为发展目标，确定了以“建立综合性疾病诊断平台、发展个体化疾病诊断技术、推动实验室标准化、促进病原微生物快速检测”的发展方向，力争在3年内建设成为管理水平先进、综合服务能力强、技术队伍结构合理、科研水平高、具可持续发展能力的国内一流的医学检验中心，发挥国家和省临床重点专科的辐射作用和模范效应，带动周围医院检验科的快速发展。

目前，该实验室下设临床生物化学检验室、临床免疫检验室、临床微生物检验室、分子诊断室和门急诊检验室等专业检验室。共有员工89人，其中执业医师5人，获博士学位14人，已形成一支既拥有高学历、高素质，又年轻、活跃、富有进取心的学科队伍。该实验室总占地约3800平方米，建立了完整的质量和安全管理体系统，拥有国内外先进的实验室检测技术和仪器，如Beckman生化免疫全自动检测系统、雅培全自动检测流水线、Sysmex全自动血球分析流水线、BD和Beckman流式细胞仪、BioMerieux全自动微生物标本接种仪、Vitek2全自动细菌鉴定仪、BacT/Alert 3D血培养仪、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪、ABI 7500、ViiA 7荧光定量PCR仪、Luminex 200液相芯片分析系统、illumina NextSeq 500高通量测序仪和Roche Cobas全自动病毒载量检测系统等。检测项目达700余项，年检测超过3000万项次。

该实验室医、教、研并重的风气蔚然成风。拥有完整的医学检验本科生、硕士生和博士生教育体系，医学检验本科生毕业就业率达100%，在全国的专业排名不断上升。承担并参与多项国家级及省级科研课题，主编及参编全国医学检验专业规划教材20余部。已培养临床检验诊断学专业硕士生、博士生30余人。全面负责中山大学医学检验系的教学工作，承担8门检验系专业课教学。是中山大学、广东医学院、广州医学院等医学检验专业本科学生的实习基地，接收来自全国各地的进修生，高质量地完成了带教任务。



承担并参与多项国家级及省级科研课题，主编及参编全国医学检验专业规划教材20余部。已培养临床检验诊断学专业硕士生、博士生30余人。全面负责中山大学医学检验系的教学工作，承担8门检验系专业课教学。是中山大学、广东医学院、广州医学院等医学检验专业本科学生的实习基地，接收来自全国各地的进修生，高质量地完成了带教任务。

### → 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