



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

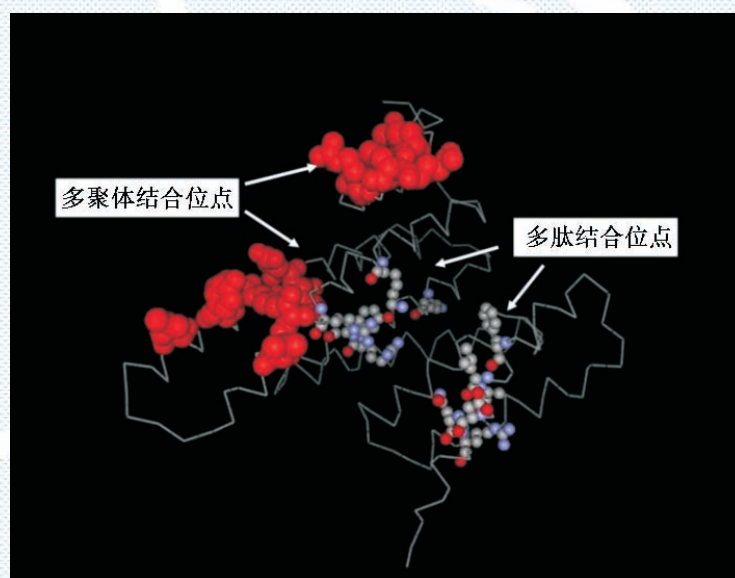
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2015 年 5 月 第 7 卷 第 3 期 总第 37 期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 7 Number 3 May 2015



图(P154) Swiss-model 分析细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的三维结构

Figure (P154) 3D structure model of *Eg14-3-3zeta*

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

05>



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收录期刊
中国生物医学期刊引文数据库收录期刊

· 专家风采 ·



郭建巍

郭建巍，1965 年 8 月出生。2002 年毕业于华西医科大学，获免疫学专业博士学位。2005 年在军事医学科学院完成博士后研究。

主任医师，教授。为军事医学科学院分子免疫学专业和南方医科大学临床检验诊断学专业硕士研究生导师。担任海军总医院检验科副主任、分子诊断实验室主任。并担任全军防生物危害专业委员会委员、海军检验医学专业委员会委

员、国家自然科学基金委员会同行评审专家、总后医疗物资采购评审专家、国家药监局医疗器械评审专家、《中国肿瘤生物治疗杂志》《生物医学工程与临床》《转化医学杂志》《武警医学》《肿瘤防治与研究》《航天医学杂志》等多家杂志特约编委和审稿专家。

郭建巍创建了海军总医院分子诊断实验室，建立了分子诊断全面质量管理体系，在分子诊断、临床免疫学检验、病原微生物检验等医学检验领域和抗体工程研究方面具有较高造诣。主持完成中国博士后基金、军队医药卫生基金、国家自然科学基金、军队“十一五”专项、海后卫生部重点项目等多项课题的研究。根据军事反恐斗争的需要，研制成功具有高度中和活性及自主知识产权的蓖麻毒素中和性单抗，填补了我国蓖麻毒素侦检及拮抗剂研究的空白，获得的具有自主知识产权的 6 条蓖麻毒素单抗的轻、重链可变区基因全部成功登录 Genebank。研究成果“生物恐怖用毒素-蓖麻毒素抗体及小分子拮抗肽制剂的研制和应用”获军队科技进步二等奖；“BCG-HSP70 活化的肝癌 DC 疫苗实验研究”获甘肃省科技进步三等奖；“沙眼衣原体 ELISA 检测试剂盒的研制”获军队医疗成果三等奖；“中国海域细菌分布及抗生素敏感性研究和应用”获军队医疗成果二等奖。获中国发明专利 5 项。在国内外重要期刊发表研究论文 100 多篇，参编海战外科学专著 1 部。培养硕士研究生 4 名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2015 年 5 月 第 7 卷 第 3 期 总第 37 期 Bimonthly Volume 7 Number 3 May 2015

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
总编辑	黄绮生
执行主编	李明
编辑部主任	徐伟文
编辑部执行主任	邓子华
编辑	李晓兰 谭舜菁
排版	钟华安
编辑出版	《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	2015 年 5 月 18 日
定价	RMB 15.00 元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co.Ltd.</i>
Editor in Chief	<i>HUANG Qisheng</i>
Execute Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>XU Weiwen</i>
Execute Managing Director	<i>DENG Zihua</i>
Editors	<i>LI Xiaolan TAN Shunjing</i>
Typesetting	<i>ZHONG Huaan</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co.Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020)32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020)32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929</i>
	<i>CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2015.5.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2015 年 5 月 第 7 卷 第 3 期

目 次

述 评

蛋白质组学在肝细胞癌诊断研究中的进展与展望 彭征 戴盛明 (145)

论 著

细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白的生物信息学分析 符瑞佳 吕刚 尹飞飞 等 (151)

广东男男性行为 HIV-1 感染者中耐药情况及基因型分布 于国龙 秦冰 鄢心革 等 (156)

重组慢病毒载体介导不同启动子驱动的绿色荧光蛋白在多种 (不同) 细胞中的表达影响

..... 张玲 翁云层 张云 等 (161)

TIP30 基因敲除小鼠 EGFR 下游信号通路活性 陈逢生 陈晓华 李爱民 等 (166)

广州地区 579 例儿童过敏性鼻炎患者吸入过敏原的临床分析

..... 张大威 丘小汕 何健荣 等 (171)

Xpert MTB/RIF 技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究 王怡心 陈雄豪 林惠玲 等 (176)

牙齿缺失对急性缺血性卒中患者预后影响的临床研究 唐爱群 朱瑾华 朱飞奇 (180)

曼氏迭宫绦虫 annexinB8 的生物信息学分析和基因克隆 梁培 吕刚 周晓君 等 (185)

综 述

腺相关病毒载体: 通往肿瘤基因治疗的桥梁 陈秀生 林创珍 雷川 等 (193)

论华法林相关基因突变检测技术 孙雪 况赞 阳喜定 等 (199)

细胞因子信号转导抑制因子 (SOCS) 与免疫调节 黄元兰 闫伟 付兆强 等 (205)

实时荧光定量 PCR 检测血清/血浆 microRNAs 临床应用前的准备 邓开凤 戴盛明 (211)

专家风采

郭建巍 (封二)

实验室巡礼

中国人民解放军海军总医院分子诊断实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 3 May 2015

CONTENTS

COMMENTS

New progress and future direction of diagnostic research in hepatocellular carcinoma proteomics	
<i>PENG Zheng, DAI Shengming</i>	(145)

ORIGINAL ARTICLES

Application of bioinformatic analysis in 14-3-3zeta protein of <i>Echinococcus granulosus</i>	
<i>FU Ruijia, LV Gang, YIN Feifei, LIANG Pei</i>	(151)
Investigation of HIV-1 drug resistance and gene subtype prevalence in man have sex with man in Guangdong province	
<i>YU Guolong, QIN Bing, YAN Xinge, DIAO Limei, LI Jie, ZHOU Pingping, YAN Jin, LI Yan, YANG Fang, LIN Peng</i>	(156)
Green florescence protein expression in various cells driven by different promoters among lentivirus	
<i>ZHANG Ling, WENG Yunceng, ZHANG Yun, SHUAI Lifang, LI Tingting, WANG Wenjing, LI Hongwei, ZHAO Wei, LI Chengyao</i>	(161)
EGFR downstream signal molecules in TIP30 knockout mice	
<i>CHEN Fengsheng, CHEN Xiaohua, LI Aimin, ZHOU Jin, LUO Rongcheng</i>	(166)
Clinical analysis of inhaled allergens in 579 children with allergic rhinitis in Guangzhou	
<i>ZHANG Dawei, QIU Xiaoshan, HE Jianrong, LIU Li</i>	(171)
Application research of Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosisin in the primary laboratory	
<i>WANG Yixin, CHEN Xionghao, LIN Huiling, JIANG Ying</i>	(176)
A clinical research on tooth loss and the prognosis of acute ischemic stroke	
<i>TANG Aiqun, ZHU Jinhua, ZHU Feiqi</i>	(180)
Sequence bioinformatics analysis and gene cloning of annexinB8 from <i>Spirometra mansoni</i>	
<i>LIANG Pei, LV Gang, ZHOU Xiaojun, CHEN Xinxin, CHEN Xiaojing, FU Ruijia</i>	(185)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 3 May 2015

CONTENTS

REVIEWS

Adeno-associated virus (AAV) -based vector: a bridge towards tumor gene therapy <i>CHEN Xiusheng, LIN Chuangzhen, LEI Chuan, QU Xiangming, NIE Xin, HU Ao, CHEN Si, DU Hongyan</i>	(193)
The overview of warfarin related gene mutation detection technologies <i>SUN Xue, KUANG Yun, YANG Xiding, GUO Chengxian, YANG Guoping</i>	(199)
The suppressor of cytokine signaling and immunoregulation <i>HUANG Yuanlan, YAN Wei, FU Zhaoqiang, DENG Anmei</i>	(205)
The preparation of real-time fluorescent quantitative PCR detection of serum/plasma microRNAs before clinical application <i>DENG Kaifeng, DAI Shengming</i>	(211)

• 述 评 •

蛋白质组学在肝细胞癌诊断研究中的进展与展望

彭征 戴盛明*

[摘 要] 近些年研究发现,对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)进行蛋白质组学研究有助于寻找新的能更早期、更准确、更直接地反映 HCC 病情的蛋白肿瘤标志物或蛋白质组模式。笔者从血清、组织和细胞阐述该领域的最新研究进展与发展前景。

[关键词] 肝细胞癌;蛋白质组学;肿瘤标志物;蛋白质组模式

New progress and future direction of diagnostic research in hepatocellular carcinoma proteomics

PENG Zheng, DAI Shengming*

(Liuzhou Key Laboratory of Tumor Diseases and Prevention, Clinical Laboratory, Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi, China, 545005)

[ABSTRACT] Proteomics research on HCC helps to find new more accurate, more direct protein biomarkers or proteomic patterns for the early diagnosis of HCC. This paper expatiates on new advances and prospects in this field from serum, cell and tissue aspect.

[KEY WORDS] Hepatocellular carcinoma; Proteomics; Tumor marker; Proteomic pattern

HCC(hepatocellular carcinoma,HCC)是我国常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率都位居全球第一,严重威胁着我国人民的健康水平^[1]。HCC 侵袭性极强,预后差,早期诊断、早期治疗对 HCC 尤其重要。甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是目前临床诊断 HCC 最常用的肿瘤标志物之一,但存在敏感性不高(70%左右)、特异性较低(64%)等缺点。寻找新的 HCC 早期诊断指标物是 HCC 相关研究的一大热点。蛋白质组学(proteomics)是一门大规模、高通量、系统化研究某一类型细胞、组织、体液中的所有蛋白质组成、功能及蛋白之间相互作用的新兴学科。随着蛋白质组学的兴起,国内外众多研究学者纷纷把目光投向这个新兴领域,力图通过对 HCC 蛋白组的分析,从整体、动态、定量的角度去研究 HCC 发生发展过程中蛋白质种类、数量、性质、功能及其动态改变,寻找到新的能更准

确、更直接反映 HCC 病情的蛋白诊断指标或蛋白质组模式,并用于 HCC 的早期诊断^[2]。蛋白质组学可以分为表达蛋白质组学、结构蛋白质组学和功能蛋白质组学。目前国内外对 HCC 蛋白组学的研究主要集中在表达蛋白组学方面,并分别从血清水平、组织水平和细胞水平 3 个层面展开。本文从这 3 个方面就近年来国内外学者在 HCC 蛋白质组学的研究进展进行阐述。

1 蛋白质组学概述

蛋白质组(proteome)一词由澳大利亚 Macquarie 大学的 Marc Wilkins 和 Keith Williams 2 位科学家在 1994 年意大利 Siena 召开的双向电泳会议上首次提出,代表基因组表达的全套蛋白质。现在一般指某一物种、个体、器官、组织、细胞乃至体液在精确控制其环境条件之下,特定时刻的全

基金项目:广西柳州市科技局科技创新能力与条件建设资助项目(2014G020403)

作者单位:广西医科大学第四附属医院医学检验科,柳州市肿瘤疾病与防治重点实验室,广西,柳州 545005

*通讯作者:戴盛明, E-mail:daishm@sina.com

部蛋白质表达图谱。1995 年 Wasinger 发表第一篇关于蛋白质组的论文,并提出蛋白质组学(proteomics)一词。1996 年澳大利亚成立第一个蛋白质组研究中心。1997 年法国召开第一届国际蛋白质组学会议。从此蛋白质组学在各国政府机构的重视和支持下进入飞速发展阶段,并成为生命科学的一个全新领域。蛋白质组学研究流程大致分为分离和鉴定分析 2 步。首先从体液、组织或细胞中提取蛋白质,然后去除无关的蛋白,并对获取的感兴趣的蛋白部分进行生物质谱分析,最后对得到的蛋白数据进行比对和鉴定。其主要技术手段有双向凝胶电泳、差异凝胶电泳、质谱分析、蛋白质芯片技术等,其中质谱技术包括生物质谱、飞行时间质谱、电喷雾质谱等,通常与其它分离和标记技术联用,具有灵敏、准确、自动化程度高等优点,是蛋白鉴定的核心技术^[3]。

2 HCC 蛋白质组学研究进展

2.1 血清水平的 HCC 蛋白质组学研究

血清水平的 HCC 相关蛋白研究已经发现了一些新的诸如 AFP-L3、GP73 等与 HCC 诊断、进展和预后相关的标志物。一项在泰国和冈比亚开展的临床研究中^[4],研究人员将收集的 10 例 HCC 患者、10 例慢性肝病患者(CLD,含 HBV 和 HCV)、10 例健康对照的血清进行蛋白组学分析,通过差异比对,最终选取了差异最显著的骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和人潜伏转化生长因子 β 结合蛋白 2(LTBP2)作为候选蛋白进行后续的大批量独立交叉验证。通过对 183 例 HCC 患者、274 例 CLD 患者和 227 健康人血清进行 ELISA 分析,他们发现在区分 CLD 患者和 AFP<20 ng/mL 的 HCC 患者的方面,OPN 联合 LTBP2 检测的受试者工作曲线下面积(AUC)能达到 0.85。另外,他们对来自韩国的 115 例 CLD 患者进行了为期 6 年的前瞻性队列研究,发现共有 21 例患者发展为 HCC,而且这 21 例患者的血清 OPN 和 LTBP2 水平在被确诊为 HCC 两年前已显著升高。在另外一项研究中^[5],研究人员收集了 183 名 HCC 和肝硬化志愿者的血清,从血清蛋白中分离出 N-连接糖蛋白并甲基化后,通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱技术筛选可区分 HCC 和肝硬化的肿瘤标记物。通过对所获取的数据进行全球比对和量化分

析,他们找到了 11 种在 HCC 和肝硬化之间差异表达的 N-连接糖蛋白,并发现这些 N-连接糖蛋白与糖基转移酶的活性密切相关,而后者可调节肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。在另一项研究中,研究人员对 399 例尼日利亚 HCC 患者的 3 个共血清的混合样本进行液相色谱-电喷雾-四级杆-飞行时间质谱法分析后,发现了 26 个差异表达蛋白,并通过酶联免疫吸附测定法对其中的血红素结合蛋白(Hp)、 α -1-抗胰蛋白酶(α 1-AT)、载脂蛋白 A1(APOA1)和补体 C3 等 4 个蛋白进行验证。结果表明这些蛋白在区分肝硬化和 HCC 方面的检测效力远大于谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT),而且其灵敏度、特异度和 AUC 等指标均高于 AFP^[6]。在一项 15 例无血管侵袭、15 例微血管侵袭和 15 例大血管侵袭 HCC 患者的血清标本蛋白组学比较研究中,研究人员发现 24 种差异蛋白。接着他们对这些蛋白进行了两个队列的验证标本组 Western blot 验证,并采用 ELISA 方法进行了 387 例标本的大批量验证和 200 例组织标本的免疫组化定位分析,免疫组化结果显示对氧磷脂酶-1(paraoxonase 1, PON1)与血管侵袭程度相关;ELISA 结果显示 PON1 对 HCC 血管转移诊断效力很高,微血管侵袭和大血管侵袭的 AUC 分别为 0.847 和 0.889,并认为 PON1 与 HCC 血管侵袭的发生关系密切^[7]。而 Ying 等^[8]收集了 32 例 HCC 患者、16 例慢性肝炎患者、16 例肝硬化患者和 16 例健康人的血清,通过运用弱阳离子交换型(WCX)纳米磁珠联合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术进行检测,并使用 ClinPro Tools v2.2 软件对结果进行分析,建立可以将 3 组区分的肽组合模式。最终质荷比为 5 247.62、7 637.05、1 450.87、4 054.21、1 073.37、3 883.6、5 064.37、4 644.96、5 805.51、1 866.47、6 579.6 等的 11 个肽峰被筛选出并组成了一个可以明确将 HCC 患者、肝硬化患者、慢性肝炎患者以及健康人区分开来的肽组合模式^[7]。在另外一项包含 57 例 HCC 患者、27 例肝硬化患者、37 例慢性肝炎患者和 52 例健康人的血清的比较蛋白组学研究中,研究人员通过基于抗体的检测,比较人羧酸酯酶 1(hCE1)和 AFP 的诊断灵敏度与特异度。经过约登指数和 AUC 分析,发现 hCE1 在 HCC 中的水平明显高于其它组,AUC 为 0.918,而 AFP 为 0.744,二者联合检测为

0.938。通过这些结果,他们认为 hCE1 在鉴别 HCC 和肝硬化方面具有更好的灵敏度和特异度,在 HCC 诊断方面和 AFP 显示出很强的互补性^[9]。另外一组研究中,研究成员根据 2002 国际抗癌联盟制定的 TNM 分期标准收集了 28 例发生转移的 HCC 患者血清和 28 例未转移 HCC 患者血清,运用小麦胚芽凝集素对这些标本组成的混合样本进行凝集素亲和层析来纯化和富集血清中的糖蛋白,并进一步进行 8 标 iTRAQ 技术结合 2D LC-MS/MS 分析,共发现了 15 个差异糖蛋白,其中 9 个上调,6 个下调。而且他们通过 Western blot 和生化方法对 α -1-抗胰蛋白酶(SERPINA1)和 APOA1 进行了验证,并认为 SERPINA1 有望成为 HCC 转移的糖蛋白分子标志物^[10]。而在另外一项涉及 80 例 HCC 患者、80 例肝炎患者和 60 例健康人血清的研究中,研究者通过 SELDI-TOF-MS 技术寻找新的 HCC 标志物,最终发现质荷比为 7 777.27 的蛋白质仅在 HCC 血清表达,经肽质量指纹谱鉴定为巨噬细胞炎性蛋白 15(CCL15),并进行了免疫组化验证。另外,他们还通过细胞迁移和侵袭实验,认为 CCL15 可能在肿瘤侵袭迁移中发挥作用,并有望成为新的 HCC 诊断标志物^[11]。

2.2 组织水平的 HCC 蛋白质组学研究

肝癌组织标本的蛋白组学分析结果,可以直接的获取反映 HCC 进展的蛋白标志物或蛋白组模式。正是基于这样的研究思路,一组研究人员对复发和非复发 HCC 患者的既往组织标本进行双向电泳和 MALDI 串联飞行时间质谱技术分析,结果他们发现了 148 个差异表达的蛋白点,其中差异在 2 倍以上的有 12 个,并通过免疫组化分析和 Western blot 检测,最终筛选出 70 kDa 热休克蛋白 1(HSP70)、精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)和 UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶亚型 2(UGP2)等 3 个蛋白可作为 HCC 复发的预测指标,而且这 3 个指标联合检测可以取得很高的灵敏度和特异度^[12]。另一组研究人员收集了 71 例 HCC 患者的癌组织和癌旁组织标本,通过免疫组化分析,他们发现骨膜素(periostin, POSTN)在 HCC 组织阳性表达率可达 73.2%,而癌旁组织仅有 19.7%,并通过相关性分析发现 POSTN 与 HCC 结节、血管侵袭、肿瘤分级等临床病理特征相关。另外,他们还发现 POSTN 阳性表达的 HCC 组织有更高的血管密度

和血管内皮生长因子浓度^[13]。另外,Sun 等^[14]通过运用多蛋白酶消化和固相标记法获取 HCC 组织和正常肝组织的 N 连接糖蛋白组,并通过 GoMiner 软件进行量化检测。结果发现多蛋白酶消化可提升 N 连接糖蛋白组的覆盖范围和定量准确度,而且通过比较膜和分泌蛋白中 N 型糖蛋白的表达百分比,发现 HCC 组织 N 型糖蛋白百分比明显高于正常肝组织,并认为蛋白质的糖基化可能在 HCC 的发展中发挥重要的作用。而另一组研究人员对收集的组织标本进行多凝集素亲和层析,纯化和富集血清中的糖蛋白后,通过 2DE 和 MS 联合分析,发现 28 个差异表达蛋白。经 Western blot 分析,证实结合珠蛋白和肝羧酸酯酶 1 在 HCC 水平相对下降,而与刀豆蛋白凝集素 A 特异结合的组织蛋白酶 D 前体(ConA-pCD)明显升高,AUC 分析显示 ConA-pCD 对肝癌诊断的敏感度和特异度可分别达到 85%和 80%,认为 ConA-pCD 有望成为 HCC 诊断标志物^[15]。在另外一项包含 HCC 组织标本和非肿瘤肝组织标本各 7 例的研究中,研究人员通过运用双向胶内差异凝胶电泳和 LC-MS 联用等蛋白质组学定量技术,发现了 573 种差异表达蛋白。并经过进一步研究发现,只有 51 种差异表达蛋白和研究方法等因素无关,并通过 Western blot 和免疫组化分析证实了无机焦磷酸酶 1、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1、甜菜碱-同型半胱氨酸 S-甲基转移酶 1 (BHMT)、穹隆主体蛋白(MVP)、凝溶胶蛋白和氯化物细胞内通道蛋白 1 等 6 种蛋白在肝癌组织呈高表达。但在后续的 33 例验证标本组的实验中,只有 MVP 和 BHMT 通过验证,认为二者是潜在的 HCC 肿瘤标记物^[16]。另一组研究人员利用基质辅助激光解吸附电离成像质谱技术,对收集的 30 例微血管侵袭和 26 例无微血管侵袭 HCC 组织进行比较分析后,发现了 30 个差异表达的蛋白峰,有 28 个在伴有微血管侵袭的 HCC 组织高表达,其中 2 个蛋白峰经进一步鉴定分别为 N-乙酰 H4-K20 (甲基化)和 N-乙酰 H4-K20(甲基化)-K16(乙酰化),而且这 2 个蛋白在独立的验证标本组通过验证,可望成为 HCC 微血管转移的早期标志物^[17]。Guo 等^[18]根据巴塞罗那临床 HCC 分期标准收集了 15 例早期 HCC 和 25 例晚期 HCC 组织标本,通过双向凝胶电泳和质谱联用等蛋白质组学定量技术寻找差异表达蛋

白,结果发现蛋白点 SSP2215 在早期 HCC 组织表达显著增高,经过 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定和数据比对发现是异质性胞核核糖核蛋白 K (hnRNP K),并进一步通过 Western blot 和免疫组化分析得到证实。另外,他们发现 hnRNP K 对早期 HCC 诊断灵敏度可达 66.67%, 特异度可达 84%, 明显高于血清 AFP。而 hnRNP K 和血清 AFP 联合检测对早期 HCC 诊断灵敏度和特异度可分别提高到 93.33% 和 96%。在另一项研究中,研究人员对比了 27 例 HCC 患者的癌组织标本和相应的癌旁组织标本的 2DE 图谱,找到了 43 个差异蛋白质点,经液相色谱-质谱(LC-MS)联合检测获得串联质谱图,22 个差异在 2 倍以上的蛋白经 SEQUEST 被鉴定出来,包括 15 种上调和 7 种下调表达的蛋白;并通过 RT-PCR、Western blot 和免疫组化分析证实过氧化物酶 3 (PRDX3) 在 HCC 组织高表达,而且与 HCC 低分化等临床病理特征相关^[19]。另外,在一项涉及 40 例 HCC 患者癌组织和相应癌旁组织标本、20 例肝硬化患者组织标本以及无肝脏疾病的供体捐赠的肝组织标本的研究中,研究人员通过运用双向电泳和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱等蛋白质组学手段,发现人核纤层蛋白 B1 (LMNB1) 和人波形蛋白(vimentin, VIM) 在 HCC 组织水平明显高于癌旁组织、正常肝组织和肝硬化组织,并通过收集的血清标本进行 ELISA 检测和 PCR 分析,ELISA 检测显示 VIM 对早期 HCC 诊断灵敏度为 40.91%, 特异度为 87.5%, PCR 分析显示 LMNB1 的 mRNA 水平对早期 HCC 诊断灵敏度为 76%, 特异度为 82%。通过与 AFP 比较,他们认为 LMNB1 和 VIM 有望成为新的 HCC 分子标志物^[20]。

2.3 细胞水平的 HCC 蛋白质组学研究

由于技术方法的限制,血清和组织水平的蛋白质组学研究不能反映在细胞水平的低丰度蛋白变化,但这些蛋白却往往是很重要的调控因子,获取这些蛋白的变化对于 HCC 的进展、预后等判断帮助会更大。在一项针对 Hep3B 细胞的研究中^[21],研究人员中对肿瘤干细胞克隆株和对照株在球体形成、耐药性和致瘤性方面进行比对分析,并通过同位素相对标记与绝对定量 iTRAQ 技术对二者的蛋白表达谱进行分析,从鉴定出的 1 127 个蛋白中

筛选出 50 个在这株克隆间差异两倍以上蛋白,通过 GeneGo 软件进一步分析发现这些蛋白分别参与代谢通路、免疫应答以及细胞骨架重构,并和 HCC 等肝脏疾病相关。另外,在这 50 个蛋白中,他们发现 S100P、S100A14 和 VIM 等存在于多个 HCC 细胞系,并对 S100A14 和 VIM 的功能做了进一步研究和确认。而另一组研究人员则通过“细胞表面捕获(CSC)”方法对 HepG2 细胞系进行了细胞表面糖蛋白分析,系统收集 HCC 细胞表面蛋白信息,从而对 HCC 进行有效鉴定和分期,并找到更多的可用于检测和诊断的生物分子标记。最终他们在 79 种蛋白的 116 个单肽糖上发现了 119 个糖基化位点,82% 属于膜蛋白,68% 具有跨膜域,其中 65 个是首次发现。另外,他们在肿瘤细胞膜发现了 26 个 CD 抗原分子,并发现 CD44、CD147、EGFR 等和肿瘤密切相关^[22]。来自美国的一组研究人员则首先运用蛋白质组学技术研究发现 Annexin A2 在 HCC 中明显表达上调,然后他们运用免疫组化和 ELISA 分别在 224 例组织标本、95 例早期 HCC 和 74 例 AFP 阴性 HCC 血清标本进行验证,免疫组化结果显示 Annexin A2 在 60.7% 的 HCC 组织过表达,ELISA 结果显示 Annexin A2 在 HCC 患者血清水平明显增高,并在 83.2% 早期 HCC 和 78.4% AFP 阴性 HCC 呈过表达,诊断早期 HCC 的 AUC 曲线下面积为 0.79,而 AFP 的 AUC 曲线下面积为 0.73。而且 Annexin A2 和 AFP 联合检测可大大提升检测效力,灵敏度可达 87.4%。另外,这些检测结果也在 HCC 模型小鼠中得到验证^[23]。而 Pan 等^[24]先期通过对收集的组织标本进行免疫组化分析,发现 VIM 在 HCC 呈高表达,并与肿瘤分级和侵袭性相关,接着在 HCC 细胞系 SK-Hep-1 进行针对波形蛋白的基因沉默实验,发现 SK-Hep-1 细胞侵袭性和转移性明显下降,认为波形蛋白在调节 HCC 转移方面具有重要作用。另外,他们还结合其他相关的波形蛋白蛋白质组学研究结果,认为波形蛋白通过提升泛素系统的活性从而起到抑制细胞骨架蛋白表达和促进其降解的作用。在另外一项研究中,研究者通过对比 5-氟尿嘧啶(5-FU)耐药的 HCC 细胞系 Bel7402/5-FU 和其父本细胞系 BEL7402 的二维凝胶电泳图谱,并使用 iTRAQ 结合 LC-MS/MS 技术获得串联质谱图,最终从 660 种蛋白中筛选出 52 种在这两个细胞株

明显差异表达的蛋白,并对其中一些蛋白进行 Western blot 和荧光定量 PCR 验证。其中在 Bel7402/5-FU 细胞株高表达的膜联蛋白 A3 (ANXA3)被证实和多药耐药性密切相关^[25]。

3 讨论

HCC 蛋白组学可以让我们从整体角度,动态地量化地观察 HCC 发展过程中蛋白质种类数量和修饰状态等方面的改变,丰富了对 HCC 的认知。随着技术的进步和研究的深入,新的 HCC 相关蛋白质或蛋白质组模式不断涌现,Masuzaki 等总结了 2012 年以前 HCC 相关研究,列举了 AFP-L3、DCP、GPC3、OPN、IGF-1、VEGF、VEGFR-1 等备选蛋白标记物^[26]。Liu 等遴选了 16 篇 HCC 蛋白标记物相关研究报道,并对研究结果进行了整理,发现了 27 种报道三次以上且研究结论相互一致的蛋白,其中 HSP70 表达上调^[27]。本文对近三年来 HCC 蛋白组学的最新研究成果进行综述,并

按照它们在 HCC 的早期诊断、鉴别诊断、复发和转移预测等多个方面的功能进行了归类(见表 1)。通过表 1 我们可以发现,在对新发现的 HCC 相关蛋白的大批量标本验证方面还有大量的工作要做。随着新肿瘤标记的研究不断加强,如何将这些新指标与传统诊断指标结合并制定标准化检测方法,并最终实现服务临床也是今后发展的方向。另外,作为一个子学科,HCC 蛋白组学也存在不少蛋白组学发展中遇到的共性问题,如低丰度蛋白、极酸极碱蛋白和溶解性差的蛋白的分离和鉴定,而且目前尚无统一的操作标准和程序,加上受到样本质量、制备方法、仪器性能等诸多因素影响,导致不同学者的研究结果不尽相同。因此,规范标本采集和制备程序、提升蛋白质分离和鉴定技术是目前蛋白组学研究首要解决的问题。相信随着技术的进步和研究的深入,越来越多的 HCC 相关蛋白质或蛋白质组模式将被发现,并对 HCC 的早期预防、诊断和治疗提供帮助。

表 1 本文综述涉及的 HCC 相关蛋白分类归纳表

Table 1 Classification table of hepatocellular carcinoma associated proteins involved in this review

分类	HCC相关蛋白名称	经过大批量标本验证
早期诊断	OPN和 LTBP2,一些 N-连接糖蛋白, hCE1, ConA-pCD ^[15] , hnRNP K ^[18] , Annexin A2 ^[23]	OPN 和 LTBP2
鉴别诊断	Hp、α1-AT、ApoA1 和 C3, MVP 和 BHMT ^[16] , LMNB1 和 VIM ^[20]	Hp、α1-AT、ApoA1 和 C3
侵袭转移	SERPINA1 ^[10] , CCL15 ^[11] , VIM ^[24]	
血管侵袭	PON1, POSTN ^[13] , N-乙酰 H4-K20(甲基化)和 N-乙酰 ^[17]	H4- K20(甲基化)-K16(乙酰化) ^[17] , PON1
复发预测	HSP70、ASS1 和 UGP2 ^[12]	
耐药	ANXA3 ^[25]	
相关,但尚未分析	蛋白质的糖基化 ^[14] ,过氧化物酶 3 ^[19] , CD44、CD147 和 EGFR ^[22] , S100A14 和 VIM ^[21]	CD44、CD147 和 EGFR

参考文献

[1] Chen W, Zeng H, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2007[J]. Chin J Cancer Res, 2012, 24(1):1-8.

[2] Liang S, Xu Z, Xu X, et al. Quantitative proteomics for cancer biomarker discovery[J]. Comb Chem High Thro-ughput Screen, 2012,15(3):221-231.

[3] Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H. Quantitative mass

spectrometry-based proteomics: an overview[M]. Meth-ods Mol Biol, 2012:85-100.

[4] Costa AN, Plymoth A, Santos-Silva D, et al. Osteopon-tin and latent-TGFβ binding-protein 2 as potential diag-nostic markers for HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2015,136(1):172-181.

[5] Tsai TH, Wang M, Di Poto C, et al. LC-MS profiling of N-glycans derived from human serum samples for

- biomarker discovery in hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2014,3(11):4859–4868.
- [6] Fye HKS, Wright-Drakesmith C, Kramer HB, et al. Protein profiling in hepatocellular carcinoma by Label-Free quantitative proteomics in two west african populations [J]. *Plos One*, 2013,8(7):e68381.
- [7] Huang C, Wang Y, Liu S, et al. Quantitative proteomic analysis identified paraoxonase 1 as a novel serum biomarker for microvascular invasion in hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2013,12(4):1838–1846.
- [8] Ying X, Han S, Wang J, et al. Serum peptidome patterns of hepatocellular carcinoma based on magnetic bead separation and mass spectrometry analysis[J]. *Diagn Pathol*, 2013,8(1):130.
- [9] Na K, Jeong SK, Lee MJ, et al. Human liver carboxylesterase 1 outperforms alpha-fetoprotein as biomarker to discriminate hepatocellular carcinoma from other liver diseases in Korean patients[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(2):408–415.
- [10] Qin X, Chen Q, Sun C, et al. High-throughput screening of tumor metastatic-related differential glycoprotein in hepatocellular carcinoma by iTRAQ combines lectin-related techniques[J]. *Med Oncol*, 2013,30(1):1–11.
- [11] Li Y, Wu J, Zhang W, et al. Identification of serum CCL15 in hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2013,108(1):99–106.
- [12] Tan GS, Lim KH, Tan HT, et al. Novel proteomic biomarker panel for prediction of aggressive metastatic hepatocellular carcinoma relapse in surgically resectable patients[J]. *J Proteome Res*, 2014.
- [13] Lv Y, Wang W, Jia WD, et al. High-level expression of periostin is closely related to metastatic potential and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2013,30(1):1–9.
- [14] Sun Z, Sun D, Wang F, et al. Differential analysis of N-glycoproteome between hepatocellular carcinoma and normal human liver tissues by combination of multiple protease digestion and solid phase based labeling [J]. *Clin Proteomics*, 2014,11(1):1–12.
- [15] Qi YJ, Ward DG, Pang C, et al. Proteomic profiling of N-linked glycoproteins identifies ConA-binding procathepsin D as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *Proteomics*, 2014,14(2–3):186–195.
- [16] Megger DA, Bracht T, Kohl M, et al. Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and non-tumorous liver tissue investigated by a combined gel-based and label-free quantitative proteomics study[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013,12(7):2006–2020.
- [17] Poté N, Alexandrov T, Le Faouder J, et al. Imaging mass spectrometry reveals modified forms of histone H4 as new biomarkers of microvascular invasion in hepatocellular carcinomas[J]. *Hepatology*, 2013,58(3):983–994.
- [18] Guo Y, Zhao J, Bi J, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis[J]. *J Hematol Oncol*, 2012,5:37.
- [19] Qiao B, Wang J, Xie J, et al. Detection and identification of peroxiredoxin 3 as a biomarker in hepatocellular carcinoma by a proteomic approach[J]. *Int J Mol Med*, 2012,29(5):832.
- [20] Wong KF, Luk JM. Discovery of lamin B1 and vimentin as circulating biomarkers for early hepatocellular carcinoma[M]. *Methods Mol Biol*, 2012,909:295–310.
- [21] Ko CH, Cheng CF, Lai CP, et al. Differential proteomic analysis of cancer stem cell properties in hepatocellular carcinomas by isobaric tag labeling and mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(8): 3573–3585.
- [22] Mi W, Jia W, Zheng Z, et al. Surface glycoproteomic analysis of hepatocellular carcinoma cells by affinity enrichment and mass spectrometric identification[J]. *Glycoconj J*, 2012, 29(5–6): 411–424.
- [23] Sun Y, Gao G, Cai J, et al. Annexin A2 is a discriminative serological candidate in early hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2013 ,34(3):595–604.
- [24] Pan TL, Wang PW, Huang CC, et al. Network analysis and proteomic identification of vimentin as a key regulator associated with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Proteomic*, 2012, 75 (15): 4676–4692.
- [25] Tong SW, Yang YX, Hu HD, et al. Proteomic investigation of 5-fluorouracil resistance in a human hepatocellular carcinoma cell line[J]. *J Cell Biochem*, 2012,113 (5):1671–1680.
- [26] Masuzaki R, Karp SJ, Omata M, et al. New serum markers of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Oncol*, 2012,39(4):434–439.
- [27] Liu Z, Ma Y, Yang J, et al. Upregulated and downregulated proteins in hepatocellular carcinoma: a systematic review of proteomic profiling studies[J]. *OMICS*, 2011,5 (1–2):61–71.

• 论 著 •

细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白的生物信息学分析

符瑞佳 吕刚 尹飞飞 梁培*

[摘要] **目的** 应用生物信息学技术对细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)14-3-3zeta 蛋白的结构和功能进行预测和分析,为进一步的实验研究提供依据。**方法** 利用美国国家生物技术信息中心(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(ExPASy, <http://expasy.org/>)提供的各种有关基因和蛋白序列、结构信息分析的工具,并结合其它生物信息学分析软件,对该蛋白质的结构和功能进行预测和分析。**结果** 该基因全长为 771 bp,编码 256 个氨基酸,其编码的蛋白相对分子量理论预测值和等电点分别是 29.4 kDa 和 5.04。预测该蛋白无信号肽和跨膜区,二级结构含 8 个 α -螺旋和 12 个 β -折叠股,氨基酸序列中有 9 个潜在抗原表位。**结论** 初步认识了细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白的基本特征,为深入研究该蛋白的生物学功能奠定了基础。

[关键词] 细粒棘球绦虫; 14-3-3zeta 蛋白; 生物信息学; 结构; 功能

Application of bioinformatic analysis in 14-3-3zeta protein of *Echinococcus granulosus*

FU Ruijia, LV Gang, YIN Feifei, LIANG Pei*

(School of Tropical and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China, 571101)

[ABSTRACT] **Objective** To predict and analyze the structure and function of 14-3-3zeta protein from *Echinococcus granulosus* by bioinformatics technology. **Methods** The structure and function of Eg14-3-3zeta protein was identified from two biological information sites, USA National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and Expert System for analysis of protein of the Swiss Institute of bioinformatics (ExPASy, <http://expasy.org/>), which offer the analysis of various related gene and protein sequence, structure information tools, and other bioinformatics analysis software. **Results** The full-length cDNA sequence encoding Eg14-3-3zeta included a complete open reading frame (ORF) of 771 bp coding to a putative protein with 256 amino acids. Molecular weight of Eg14-3-3zeta was predicted to be 29.4 kDa and its isoelectric point was 5.04. The protein had no signal peptide site and transmembrane domain. Secondary structure of Eg14-3-3zeta contained 8 alpha-helices and 12 beta-strands. There were 9 potential epitopes in the sequence of amino acids of Eg14-3-3zeta. **Conclusion** The characteristics of 14-3-3zeta protein from *Echinococcus granulosus* was identified.

[KEY WORDS] *Echinococcus granulosus*; 14-3-3zeta; Bioinformatics; Structure; Function

细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 是一种重要的人兽共患的寄生虫,其成虫寄生于犬科食肉动物,幼虫能够寄生于人及多种食草动物,引起一种严重的囊型棘球蚴病 (*Cystic echinococcosis*),又称为囊型包虫病。在人与动物

之间互相传播,人因误食虫卵而感染,其包虫囊肿在肝脏内最为多见,偶尔侵袭肺部、脑部、骨骼等其它器官^[1-2]。在我国西部和北部广大的农牧地区,生活水平落后,群众防范意识较差,导致该病的感染十分严重^[3]。同时,近年来全国各地养家犬数

基金项目:国家自然科学基金(81260254);海南省自然科学基金(814289)

作者单位:海南医学院热带医学与检验医学院,海南,海口 571101

*通讯作者:梁培, E-mail: liangpeilp@163.com

量的增加,可能会导致棘球蚴病的向多地蔓延,严重影响了人民的生命健康,且对当地的畜牧业造成很大的经济损失。

随着分子生物学技术的不断发展,许多国内外的学者近年来在棘球蚴病的预防和治疗方面取得了一定的进展,但依然没有达到理想的效果^[4-7]。因此,有必要寻找新的候选基因,并对其生物学相关功能进行鉴定,为棘球蚴病的防治奠定基础。本研究选取了细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白,采用生物信息技术对其结构和功能进行预测和分析,为进一步的实验研究提供议论依据,判定该蛋白在细粒棘球蚴病的防治和诊断过程中是否存在一定的价值。

1 材料

细粒棘球绦虫成虫全长 cDNA 质粒文库由上海联合基因公司构建,大规模测序得到多个表达序列标签(EST)。编码细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的核酸序列从该文库中获取,GenBank 中的登录号为 EUB61917.7。

2 方法

通过 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)BLASTx (<http://expasy.org/>)程序,将基因

序列编码的氨基酸序列与 GeneBank 中的蛋白质序列进行对比,推测该基因的功能,判断是否全长基因。利用 ORF Finder 查找其完整的编码序列,然后再用 Translation 程序推导并输出其氨基酸序列。编码的氨基酸序列与其他物种的序列利用 Vector NTI suite 8.0 进行多序列比对和利用 Tree-View software 分析进化树。通过蛋白分析系统 Expasy (<http://www.expasy.org/>)所提供的蛋白组学和序列在线分析工具,如 Protparam 进行该蛋白理化性质的预测;MotifScan 对理论蛋白质进行功能位点预测;TargetP 分析亚细胞定位序列;PredictProtein 预测氨基酸序列的跨膜区和拓扑结构以及二级结构、分子的亲水性、溶液中的分子形态等;BepiPred 进行 B 细胞表位预测;Swiss-molde 分析蛋白质的三维结构。

3 结果

3.1 基因的识别和鉴定

利用 Blastx 对该基因进行核苷酸水平的相似性分析,发现了文库中有一条相似度为 100%的序列,属于细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白序列。该基因全长为 771 bp,开放阅读框为 35 bp~805 bp,编码 256 个氨基酸,见图 1。

```

1 ATGGCTGAGCTTCTG TCCACTGAGTGGCTT AAGGATTGCCCCCTG AAGGATCGTGATTCTG TATGTTAATACGGCA AAATGCTTGAGCAG 90
  M A E L L S T E W L K D L P L K D R D S Y V N T A K C L E Q
91 GCTGAACGGTTCGAT GACATGGCTGTTTGT ATGAAGGAAGTGACG AGGTTTGACAAGGAA TTAACAATGAGGAA CGAAATCTCCTTTCC 180
  A E R F D D M A V C M K E V T R F D K E L N N E E R N L L S
181 GTTGCAITTAATAAAT GTTGTGGGCTCTCGA CGCAACTCTTATCGA GTGCTGTCAAGTCGG CTGGCTCGAACTCAG GATCCTGAAAAACAG 270
  V A F K N V V G S R R N S Y R V L S S R L A R T Q D P E K Q
271 GCTCTTACGAGGGAG TATTAGATATTCTT CAGAAAGAAGCTTAAT GCCATCTGCTCGGAT GTCTTGCAACTCAIT GAGGAGAGGCTATAT 360
  A L T R E Y L D I L Q K E L N A I C S D V L Q L I E E R L Y
361 CCTTCATGTTCCAAT GCCGAGGGGAAGGTC TTCTACAAGAAGATG ATGGGGGACTACTAT CGATATAAAGCAGAA AACGCCAAAGGCGAG 450
  P S C S N A E G K V F Y K K M M G D Y Y R Y K A E N A K G E
451 GACCACAAGCAGGTC GTGGAGGCCTCTCTT AAGGCTTATGAAGAG GCCACTGAGATTGCA AACGAGAAGCTTAGT TGCACGCATCCAAT 540
  D H K Q V V E A S L K A Y E E A T E I A N E K L S C T H P I
541 CGICTTGGTCTTGCT TTGAATAATTCGTC TTTTATTATGAAATC ATGAATAGTCCTGAC AGAGCGTGCCAACCT GCTAAGAAGGCTTTT 630
  R L G L A L N Y S V F Y Y E I M N S P D R A C Q L A K K A F
631 GATGATGCTGTACGC GATGTTGGCAGTTCC AAGGACGAATTGGTGC AAGGACAGTAGTCTT TTCTGCAGCTCGTT GGCGATAACCGTTCA 720
  D D A V S D V G S S K D D W C K D S S L F L Q L V G D N R S
721 CTTTGGACTTCGGAT CCCGAGGAGAGAGGG AATCCGAGGGTCTGA GAATAA
  L W T S D P E E R G N S E G R E *
    
```

3个核苷酸对应一个氨基酸;底纹部分为多聚体结合位点;加下划线部分为多肽结合位点

图 1 细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的 ORF 编码及氨基酸序列

Figure 1 ORF sequence of *Eg*14-3-3zeta and amino acid sequence

细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 功能域的分析结果, 在, 见图 2。
显示有多个多肽结合位点和多聚体结合位点存

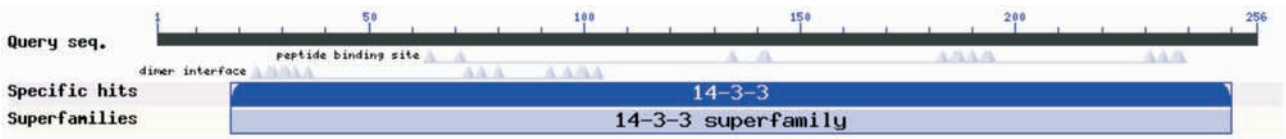


图 2 细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 功能域分析

Figure 2 Analysis of functional domain of *Eg*14-3-3zeta

3.2 蛋白质的理化性质

预测该蛋白质的理论等电点(PI)为 5.04, 分子量为 29.4 kDa。当二硫键全部打开的时候, 280 nm 处摩尔消光系数为 34 380 U·M⁻¹·cm⁻¹, 0.1% 浓度的 Abs 为 1.168; 当二硫键全部为二硫键时, 280 nm 处摩尔消光系数为 34 755 U·M⁻¹·cm⁻¹, 0.1% 浓度的 Abs 为 1.181。当蛋白序列 N 端的一个氨基酸为蛋氨酸时, 在哺乳动物网状红细胞体外表达的半衰期为 30 h, 在酵母和大肠埃希杆菌中体内表达的半衰期分别大于 20 h 和 10 h。在液体环境中的不稳定指数为 50.32, 高于阈值 40, 在溶液中性质不稳定。其疏水指数为 76.60, 总的亲水性

为-0.675, 蛋白质的总体呈疏水性。

3.3 蛋白质亚细胞定位、信号肽、跨膜结构预测

该蛋白存在于细胞内, 没有发现信号肽系列, 也没有发现线粒体、叶绿素等定位序列, 为非分泌性蛋白。同时, 该蛋白不存在跨膜结构。

3.4 B 细胞表位分析

利用 BepiPred 分析对该蛋白质上的 B 细胞线性表位进行了分析, 发现它可能有 9 个潜在的抗原表位(aa15-aa22, aa50-aa54, aa82-aa92, aa121-aa127, aa141-aa155, aa161-aa169, aa197-aa202, aa210-aa226, aa240-aa256)。相应表位的序列见表 1。

表 1 细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 抗原肽分布

Table 1 The epitopes distribution of *Eg*14-3-3zeta

No.	Start Position	End Position	Peptide	Peptide Length
1	15	22	LKDRDSYV	8
2	50	54	ELNNE	5
3	82	92	ARTQDPEKQAL	11
4	121	127	PSCSNAE	7
5	141	155	RYKAENAKGEDHKQV	15
6	161	169	KAYEEATEI	9
7	197	202	NSPDRA	6
8	210	226	FDDAVSDVGSSKDDWCK	17
9	240	256	SLWTSDPEERGNSEGRE	17

3.5 蛋白质二级结构预测

预测结果显示, 该蛋白质二级结构以 α 螺旋(H)为主, 占 74.6%; β 折叠(E)占 52%, 无规则卷曲(T)占 13.3%, 见图 3。

3.6 蛋白质三维结构预测

应用 Swiss-model 在线分析系统和三维视屏程序对细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 进行三维结构的

同源建模, 并将多聚体结合位点和多肽结合位点以聚集成团的方式显示出来, 见图 4。

3.7 同源性和进化树分析

将已知的其他物种的 14-3-3zeta, 包括人(NP_663723.1)、大鼠(NP_037184.1)、恶性疟原虫(AAC17516.1)、华支睾吸虫(AE089649.1)、曼氏迭宫绦虫(AGC74030.1)、马来布鲁丝虫(CDP94500.1)、



图 3 细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的二级结构
Figure 3 The secondary structure of *Eg*14-3-3zeta by predictprotein

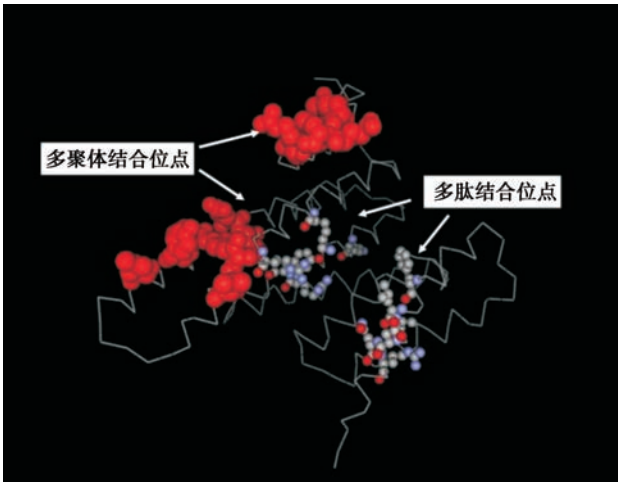


图 4 Swiss-model 分析细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的三维结构
Figure 4 3D structure model of *Eg*14-3-3zeta

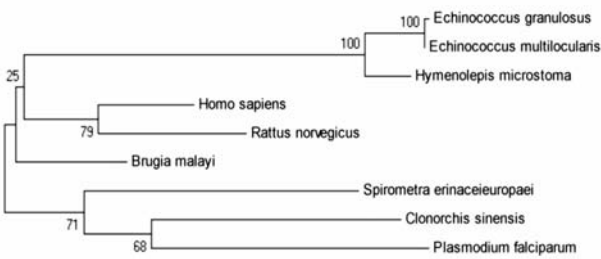


图 5 细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的分子进化树
Figure 5 Molecular evolution tree of the *Eg*14-3-3zeta

多房棘球绦虫 (CDJ05598.1)、小口膜壳绦虫 (CDS31680.1) 与细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的推测氨基酸序列进行多序列比对, 结果如图 5 所示, 图中显示了细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 与多房棘球绦虫、小口膜壳绦虫的亲缘关系最近, 属于同一分支,

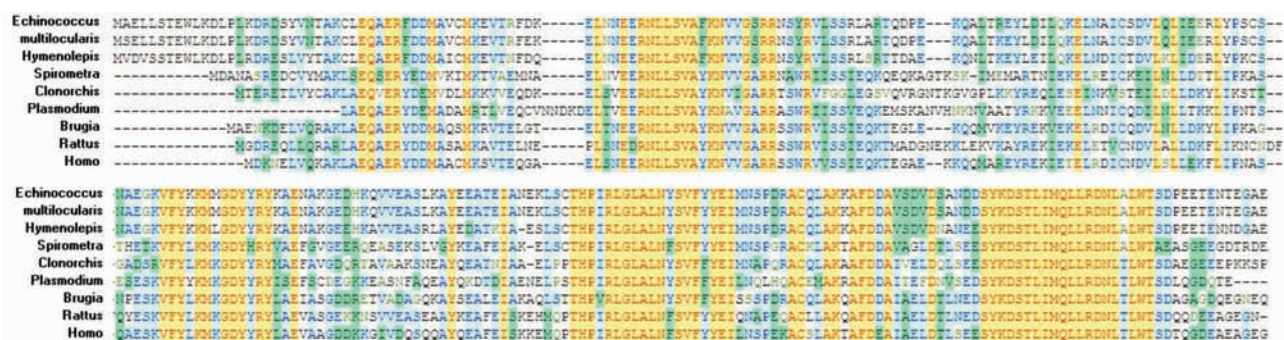


图 6 细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 与其他物种 14-3-3zeta 的序列比对

Figure 6 Alignment of Eg14-3-3zeta amino acid sequence with 14-3-3zeta from other species

同源性分别为 99% 和 86%。同时,我们将 Eg14-3-3zeta 与人和大鼠的 14-3-3zeta 进行了全长序列的对比,显示了细粒棘球绦虫与人和大鼠在该基因上的同源程度分别为 60% 和 56%,结果如图 6 所示。

4 讨论

14-3-3 蛋白广泛存在于植物、酵母、蠕虫、原虫、昆虫以及人类等多种哺乳动物真核细胞内,是高度保守的多功能蛋白质,它能够与靶蛋白磷酸化的丝氨酸或苏氨酸的位点结合,参与细胞内信号传递,在细胞发育、分化、增殖、凋亡、免疫应答反应以及肿瘤的转化等过程中都起到非常重要作用^[8-9]。14-3-3 蛋白在细胞信号传导代谢过程中与一些病理反应密切相关,因此以信号通路作为靶点进行疾病治疗是目前生物学界研究的热点。而在寄生虫中,14-3-3 蛋白功能主要体现为调节虫体的增殖和发育,在不同的生长阶段,例如幼虫、成虫、虫卵,都存在着不同的 14-3-3 蛋白异构体调节与发育相关蛋白的活性^[10],因此将其作为疫苗候选分子也获得了肯定^[11]。有文献报道,弓形虫 14-3-3 蛋白能够诱导 BALB/c 小鼠产生有效的免疫应答,说明其具有一定的抗原性和免疫原性,是一种新型的疫苗候选分子^[12],而这为 14-3-3 蛋白作为其它寄生虫疫苗和药物靶蛋白的研究提供了坚实的基础。有研究表明,14-3-3 蛋白广泛存在于血吸虫的成虫及虫卵中,是血吸虫成虫及虫卵排泄分泌物中的高丰度蛋白质分子,因此信号传导蛋白 14-3-3 可作为血吸虫高丰度循环抗原之一,具有一定的诊断价值^[13]。

本研究运用了生物信息学技术对细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的理化性质、结构、功能进行预测和

分析,该基因全长为 771 bp,编码 256 个氨基酸,其编码的蛋白相对分子量理论预测值和等电点分别是 29.4 kDa 和 5.04,属于非稳定性蛋白,蛋白质的总体呈疏水性,定位于细胞内,这有助于采取合理的克隆和表达方法,提高目的蛋白的表达效率,获得活性重组蛋白。预测该蛋白无信号肽和跨膜区,二级结构含 8 个 α -螺旋和 12 个 β -折叠股,氨基酸序列中有 9 个潜在抗原表位。三维结构和功能域预测结果显示,细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白有多个多肽结合位点和多聚体结合位点,说明该蛋白能够与多种配体结合成为信号转导和细胞周期调控介质,通过相互之间的作用,参与多种生物学功能,这也提示了 14-3-3zeta 在虫体生长发育、生理代谢等过程中有重要作用。分子进化分析可见细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 与多房棘球绦虫、小口膜壳绦虫的亲缘关系最近,属于同一分支,同源性分别为 99% 和 86%。但是 14-3-3zeta 与人和大鼠在该基因上的同源程度分别为 60% 和 56%,并且进化分析亲缘性较远,这提示了 14-3-3zeta 具有潜在的诊断价值。综上所述,我们初步认识了细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白的基本特征,这有利于我们今后合理的设计实验方案,深入了解细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 的生物学功能,及其在虫体生长发育和致病过程中的作用,判定该蛋白是否有望能成为细粒棘球绦病的防治和诊断的一个重要靶标。

参考文献

- [1] 古努尔·吐尔逊,米晓云,等. 细粒棘球绦虫成虫表膜糖抗原的免疫性分析[J]. 中国农业科学, 2012,45(22): 4713-4719.

(下转第 175 页)

• 论 著 •

广东男男性行为 HIV-1 感染者中耐药情况及基因型分布

于国龙^{1*} 秦冰² 鄢心革¹ 刁丽梅¹ 李杰¹ 周平平³ 颜瑾¹ 李艳¹ 杨放¹ 林鹏¹

[摘要] 目的 了解 2013 年在广东省新发现的男男性行为(man have sex with man, MSM)人类免疫缺陷病毒-1(human immunodeficiency virus 1, HIV-1)感染者中基因型耐药情况及亚型分布。

方法 采用 In-House 方法,扩增 HIV-1 pol 基因蛋白酶区(protease region, PR)基因全长和逆转录酶区(reverse transcriptase region, RT)基因部分片段,通过 HIV-1 耐药数据库,获得个体耐药突变位点、基因亚型及药物耐受情况。 **结果** 在 203 人中,HIV-1 病毒载量拷贝数中值为 4.27×10^4 拷贝/mL,平均值拷贝数为 9.37×10^4 拷贝/mL;高度基因型耐药病例 2 人,占 1.2%;中度耐药 1 人,占 0.6%;低度耐药 7 人,占 4.1%;潜在耐药 26 人,占 15.4%。PR 区未见主要耐药突变;RT 区主要耐药突变有:K70R、M184V、T215IT、K219E、K103KN、V106I、E138EG、V179E/D;出现了针对核苷类逆转录酶抑制剂 3TC 及 FTC 的高度耐药 1 例,占 0.6%;针对非核苷类逆转录酶抑制剂 EFV 及 NVP 高度耐药 1 例,占 0.6%;亚型方面,主要以 CRF01_AE 及 CRF_BC 重组亚型为主,同时 B 亚型在 MSM 人群中占 20.1%。 **结论** 广东省目前 MSM 感染者中 HIV-1 高度耐药毒株尚处于低流行,潜在耐药毒株可能已经在人群中传播;MSM 人群中以 CRF01_AE、CRF_BC 重组亚型及 B 亚型毒株流行为主。

[关键词] 男男性行为;高效抗逆转录病毒治疗;HIV-1 耐药

Investigation of HIV-1 drug resistance and gene subtype prevalence in man have sex with man in Guangdong province

YU Guolong¹, QIN Bing², YAN Xinge¹, DIAO Limei¹, LI Jie¹, ZHOU Pingping³, YAN Jin¹, LI Yan¹, YANG Fang¹, LIN Peng¹

(1. Institute of AIDS Control and Prevention, Guangdong Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, China, 510300; 2. The Preventive Drugs Department of Guangdong Provincial Institute of Biological Products and Drugs, Guangzhou, Guangdong, China, 510440; 3. The Center Lab of Guangdong Provincial Institute of Public Health, Guangzhou, Guangdong, China, 511430)

[ABSTRACT] Objective To estimate the drug resistance and subtype distribution among human immunodeficiency virus 1(HIV-1)-infectors(man have sex with man, MSM) in Guangdong province in 2013.

Methods The full length of HIV-1 protease gene and part of reverse transcriptase gene were amplified with the In-house method. The obtained sequences were blasted with the stanford HIV-1 drug resistance database to get the drug resistance mutations, gene subtypes and drug resistance. **Results** In 203 patients, the median viral load was 4.27×10^4 copies/mL, and the average value was 9.36×10^4 copies/mL. It was showed that 2

基金项目:“十二五”重大科技专项(2012ZX10004902);广东省医学科研基金(WSTJJ2014A088)

作者单位:1. 广东省疾病预防控制中心艾滋病预防控制所,广东,广州 510300

2. 广东省生物制品与药物研究所预防药物研究室,广东,广州 510440

3. 广东省公共卫生研究院中心实验室,广东,广州 511430

*通讯作者:于国龙,E-mail:guolongy@126.com

individuals (1.2%) were highly resistant, 1 individual (0.6%) was intermediate resistant, 7 individuals (4.1%) were with low level of resistance, and 26 individuals (15.4%) were with potential low level of resistance. No major resistance mutation was found in protease region (PR). The major drug resistance mutations in reverse transcriptase region (RT) were K70R, M184V, T215IT, K219E, K103KN, V106I, E138EG and V179E/D. One high drug resistance to 3TC and FTC was found in nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), and one high drug resistance to NVP and EFV was found in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI). The high drug resistance in NRTI and NNRTI was 0.6% and 0.6%, respectively. The CRF_01AE was the main subtype among the MSM population, which was followed by CRF_BC, and the proportion of B subtype in MSM population was 20.1%. **Conclusion** Although the HIV-1 strains with high resistance level are now prevailing at a low level, the potential resistance viral strains might have been prevailing among MSM population. And the CRF01_AE, CRF_BC and B subtype are the prevalent HIV-1 subtypes among the MSM population.

[KEY WORDS] Man have sex with man; Highly active antiretroviral therapy; HIV-1 drug resistance

随着艾滋病病毒在我国的传播,目前传播途径已经从吸毒为主转为经性传播为主。广东省作为全国重要的流行地区之一,经性传播已成为人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)传播的主要方式,2013 年经性传播比例达到 84.9%,其中男男性传播比例从 2008 年的 6.0%逐年上升到 27.1%^[1]。由于抗病毒治疗在我国的广泛开展,必然会出现耐药毒株在人群中的传播。对新近或新发人群的耐药监测,是了解耐药毒株在人群中传播的主要方式之一。既往调查显示,男男性行为者(man have sex with man, MSM),有可能出现更高的原发性耐药比例^[2]。在我国的 MSM 中 HIV 原发耐药水平在 4.9%,蛋白酶抑制剂耐药是主要的耐药形式,且存在着地区分布不均等因素^[3]。对深圳市 2010 年的 MSM 人群调查显示,该人群中原发性耐药仍处于较低水平^[4],但对近年该人群的研究资料较少。本研究拟对 2013 年我省部分地区新发现的 MSM 感染者进行基因型耐药检测,了解该人群中原发性耐药情况。

1 材料方法

1.1 目标人群

广东省 2013 年男男性行为人群新发感染评估项目中的新发现的 HIV 感染者 203 人。调查对象入选标准:年龄在 18 周岁及以上,平均年龄 29.6 岁;最近一年内与同性发生过口交或肛交性行为的男性;在知情同意基础上自愿接受问卷调查和 HIV 相关检测。

1.2 病毒载量检测

运用瑞士 ROChe Cobas Amplicor 全自动病毒载量检测仪及配套的 Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test 检测试剂盒(瑞士,ROCHE 公司),检测 HIV-1 病毒载量。样本进入仪器后,核酸提取及载量检测由载量仪自动完成。详细过程见试剂盒操作说明书。

1.3 病毒 RNA 提取和目的基因扩增

所有检测到病毒载量的样本,用 QIAamp Viral RNA Extraction Mini kit 试剂盒(德国,Qiagen 公司),在 QIAGEN QIAcube 自动核酸提取仪上提取 HIV-1 病毒 RNA, -70 °C 保存待用。QIAGEN 公司一步法 RT-PCR 试剂盒(德国,Qiagen 公司)进行第一轮 PCR 扩增,总反应体系 50 μL,含 RT-PCR Buffer Mg²⁺离子浓度 2.5 mmol/L、dNTP 400 μmol/L、PRO-1 0.6 μmol/L、RT-20 0.6 μmol/L、酶混合物 2 U、cDNA 5 μL;反应条件:50 °C 30 min,进行逆转录,95 °C 15min 灭活逆转录酶;94 °C 变性 3 min 后进行 PCR 扩增:94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min 30 s,共 35 个循环。取第一轮 PCR 产物 5 μL 作为反应模板,运用 QIAGEN Taq PCR Master Mix 试剂盒,进行第二轮 PCR 扩增,反应体系如下:总体系 50 μL,包含 TaqMix 25 μL、MAW-26 0.4 μmol/L、RT-22 0.4 μmol/L 及首轮 PCR 产物 5 μL;反应条件为:94 °C 变性 3 min 后进行 PCR 扩增:94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,共 35 个循环。所有反应均采用国家疾控中心推荐的 In-house 方法使用的扩增及测序引物,见表 1。

表 1 基因型耐药检测使用引物

Table 1 The primers for detected the HIV-1 genotypic resistance

引物名称	引物序列
PRO-1(正向外引物)	5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3'
RT-20(反向外引物)	5'CTG CCA GTT CTA GCT CTG CTT C-3'
MAW-26(正向内引物)	5'-TGG AAA TGT GGA AAG GAA GGA C-3'
RT-22(反向内引物)	5'-TTCTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG -3'
PROS3(测序引物)	5'-GCC AAC AGC CCC ACC A -3'
RTAS(测序引物)	5'-CTC AGA TTG GTT GCA C -3'
RTBS(测序引物)	5'-GTA TAA ACA AT GAGA CAC -3'
PROC1S(测序引物)	5'-GCT GGG TGT GGT ATT CC -3'
RT20S3(测序引物)	5'-GTT CTA GCT CTG CTT C -3'

1.4 基因测序及基因型耐药分析

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,与目的扩增片段大小一致,将扩增产物送北京诺赛基因有限公司测序;测定后的序列用 sequencer5.0 软件进行拼接、编辑、校正。将整理后的序列提交 Stanford HIV Drug Resistance Database^[5]行基因型耐药分析,获得耐药突变位点、耐药类型及毒株的亚型结果。

2 结果

2.1 病毒载量检测结果

在 203 份样本中,18 份样本感染者因为样本量不够未进行病毒载量检测,但进行了耐药基因型检测,185 份进行病毒载量检测。其中病毒载量拷贝数小于 $1 \times 10^3/\text{mL}$ 的样本占 3.2%(6/185);病毒载量拷贝数在 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4/\text{mL}$ 的样本占 8.6%(16/185);病毒载量拷贝数在 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$ 的样本占 64.3%(119/185);拷贝数为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$ 的样本占 23.2%(43/185);病毒载量拷贝数大于 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的样本占 0.5%(1/185)。病毒载量检测中值:拷贝数为 $4.27 \times 10^4/\text{mL}$,平均值:拷贝数为 $9.36 \times 10^4/\text{mL}$ 。

2.2 PCR 扩增及基因型耐药结果

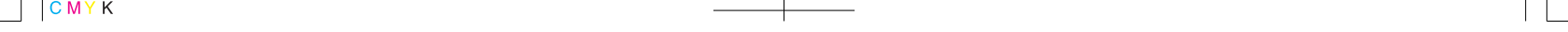
有效扩增并成功测序进行基因型耐药分析 169 人,扩增成功率为 89.8%(169/203);总体样本中高度耐药 2 例,占 1.2%;中度耐药 1 例,占 0.6%;低度耐药 7 例,占 4.1%;潜在耐药 26 例,占 15.5%;其中蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors, PIs)潜在耐药 2 人,占 1.2%;PIs 低度耐药病例 3 人,占 1.8%;PIs 区未见中度及高度耐药病例,

核苷类逆转录酶抑制剂 (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs) 潜在及低度耐药各 3 人,分别占 1.8%;高度及中度耐药各 1 人,各占 0.59%;非核苷类逆转录酶抑制剂(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs)潜在耐药 21 人,占 12.4%,低度耐药 2 人,占 1.2%,未见中度耐药,高度耐药 1 例占 0.6%。不同类型药物的耐药程度及比例见表 2。

表 2 不同类型药物耐药程度及所占比例
(检测人数 $n = 169$)

Table 2 The percent of HIV-1 genotypic resistance in MSM(total number $n = 169$)

耐药程度	耐药数目	百分比
高度耐药	2	1.2%
中度耐药	1	0.6%
低度耐药	7	4.1%
潜在耐药	26	15.4%
PI潜在耐药	2	1.2%
PI低度耐药	3	1.8%
PI中度耐药	0	0.0%
PI高度耐药	0	0.0%
NRTI潜在耐药	3	1.8%
NRTI低度耐药	3	1.8%
NRTI中度耐药	1	0.6%
NRTI高度耐药	1	0.6%
NNRTI 潜在耐药	21	12.4%
NNRTI 低度耐药	2	1.2%
NNRTI 中度耐药	0	0.0%
NNRTI高度耐药	1	0.6%



2.3 常见耐药突变耐药药物类型

核苷类逆转录酶编码区导致高度耐药突变位点为 M184MV、T215IT,各占 0.59%(1/169);非核苷类逆转录酶抑制剂导致高度耐药突变 K103KN 占 0.59%。在蛋白酶编码区,尚未出现高度耐药突变,其它类型突变及突变百分比详见表 3。在耐药药物类型方面,针对核苷类逆转录酶抑制剂拉米夫定(lamivudine, 3TC)及恩曲他滨(emtricitabine, FTC)的高度耐药 1 例,针对非核苷类逆转录酶抑制剂依法韦仑(efavirenz, EFV),奈韦拉平(nevirapine, NVP)高度耐药 1 例,未见对其他类型药物的高度耐药,针对出现的其它不同类型药物的中度及潜在耐药结果见表 4。

2.4 HIV-1 亚型比例

本次所有测序成功样本中,亚型结果均根据斯坦福耐药数据库中直接给出的基因亚型来进行亚型分类,由于该亚型分类仅仅能将 BC 亚型分出,不能区分 07BC 及 08BC 亚型,所以本研究中仅给出 CRF_BC 亚型的比例。其中,CRF_01AE 亚型 78 例,占 46.2%(78/169);B 亚型 34 例,占 20.1%(34/169),CRF_BC 亚型 56 例,占 33.2%(56/169);其它 1 例,占 0.6%(1/169)。

表 3 常见耐药突变类型及比例

Table 3 The genotype mutation and percent in MSM populations

突变区域	突变类型	突变例数	突变比例
PI主要耐药突变	0	0	0
PI次要耐药突变	A71ATV	14	8.3%
	L10IL	9	5.3%
	V10I	3	1.8%
	V11VI	2	1.2%
	L23I	1	0.6%
	V58E	1	0.6%
	合计	30	17.8%
NRTI主要耐药突变	K70R	1	0.6%
	M184MV	1	0.6%
	T215IT	1	0.6%
	K215E	1	0.6%
	K219E	1	0.6%
	合计	5	3.0%
NNRTI主要耐药突变	K103KN	1	0.6%
	V106I	3	1.8%
	E138EG	2	1.2%
	V179E/D	23	13.6%
	合计	29	17.5%

表 4 针对不同类型药物耐药数及耐药水平

Table 4 The drug resistance level and number of patients with drug resistance

	PIs				NRTIs				NNRTIs							
	ATV	FPV	IDV	LPV	NFV	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
P	2	2	2	2	0	0	1	1	1	2	0	2	14	0	14	0
L	0	0	0	0	2	0	1	1	2	0	0	0	2	2	2	2
I	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0

P: 代表潜在耐药; L: 低度耐药; I: 代表中度耐药; H: 高度耐药。ATV: 阿扎那韦, atazanavir; FPV: 福沙那韦, fosamprenavir; IDV: 印地那韦, indinavir; LPV: 洛匹那韦, lopinavir; NFV: 奈非那韦, nelfinavir; 3TC: 拉米夫定, lamivudine; ABC: 阿巴卡韦, abacavir; AZT: 齐多夫定, zidovudine; D4T: 司他夫定, stavudine; DDI: 地丹诺辛, didanosine; FTC: 恩曲他滨, emtricitabine; TDF: 替诺福韦, tenofovir; EFV: 依法韦仑, efavirenz; ETR: 依曲韦林, etravirine; NVP: 奈韦拉平, nevirapine; RPV: 利匹韦林, rilpivirine

3 讨论

HIV-1 病毒在男男性行为人群中目前已经出现高流行的趋势,我国的哨点监测发现,该人群的发病率已经处于首位,高于其它高危人群。既往我国 MSM 人群研究资料报道,HIV-1 原发耐

药在4.9%左右,蛋白酶抑制区的耐药发生率比较高^[3],广东地区 MSM 人群中是否也存在这一现象,近年的相关研究资料较少。既往的研究资料表明,广东地区 MSM 人群中的耐药发生率 2% ~ 3% 之间^[4,6],低于全国的研究报道,逆转录酶区(reverse transcriptase region, RT)区耐药检出率仅

2.79%,蛋白酶区(protease region, PR)的耐药程度更低^[6]。这些研究资料的差异可能是由于时间及人群选择的差异造成。随着 HIV-1 的疫情在 MSM 人群中的快速传播,及时了解广东地区 MSM 人群中的 HIV-1 耐药流行情况,亚型及药物耐药类型,对于地区 HIV-1 治疗及防控策略的制定与调整具有重要意义。

本研究通过对广东省 2013 年新报告的 MSM 中 HIV-1 感染者的基因型耐药分析发现,目前在广东地区的 MSM 感染者中,高度耐药仍然处于低流行水平。本研究中出现的两例高度耐药分别为针对核苷类逆转录酶抑制剂 3TC 及 FTC 及非核苷类逆转录酶抑制剂 EFV 和 NVP 的高度耐药。导致核苷类逆转录酶抑制剂高度耐药的基因突变位点为 M184MV、T215IT,而导致非核苷类逆转录酶抑制剂高度耐药的基因突变位点为 K103KN,与之前针对广东省长期治疗病人中出现的高度耐药类型及突变位点一致^[7]。针对这一结果的可能解释之一,这些原发性的毒株可能来源于长期治疗人群中的耐药毒株。在针对药物耐药类型方面,HIV-1 蛋白酶区的耐药突变仍处于较低水平,不同于之前的研究报道^[3],与省内深圳地区基本相同^[6]。在非核苷类逆转录酶抑制剂方面,本研究人群中的潜在耐药明显增高,达到了 12.4%(表 2)。虽然高度耐药及低度耐药在 MSM 人群中仍然处于低流行水平,但该人群中总体潜在耐药比例达到了 15.4%(表 2),已经远超 2012 年深圳地区^[6]及我国其他地区 MSM 人群中报道的耐药水平^[4,6,8-9]。如果按照耐药警戒线检测的标准判定,当某一地区 HIV-1 耐药水平大于 15%,说明该地区已近处于耐药的高流行水平。按照此标准判定,在该人群中,潜在的耐药突变毒株可能已经开始在人群中出现传播。由于目前 MSM 人群 HIV-1 发病率高居首位^[1],其人群性活跃程度较高,一旦出现耐药毒株,容易出现在人群中的快速传播,所以在 MSM 人群中进行耐药常规的监测及检测已经非常必要。

在基因亚型方面,MSM 人群中 HIV-1 流行毒株主要以 CRF_01AE 亚型为主,占 46.2%,为 MSM 中的主要流行亚型;其次为 BC 重组亚型,占 33%;该 MSM 人群中处于第三位的流行毒株为 B 亚型,占 20.1%,与我国其它地区 MSM 中流行亚型所占

比例大致相同^[10-12]。但与广东深圳地区 2008-2009 年发现的 MSM HIV-1 感染者中所报道的 B 亚型比例(47.8%)差异较大^[6]。本实验室正在进行的对广东省 2013 年新发现的 HIV-1 感染者进行分子流行病学研究发现,目前广东省新发现的 HIV-1 感染者中,CRF01_AE 占 53.1%、CRF07_BC 占 26.0%和 CRF08_BC 占 8.6%,是广东省主要流行的 3 种亚型,B 亚型仅仅占 1.2%。这也说明 B 亚型在 MSM 人群中不同于普通人群及吸毒人群^[13],是主要的流行毒株之一。造成这种毒株差异的原因之一可能为,MSM 人群中性活跃程度较高,B 亚型毒株在该人群中所占的比例短期内应不会明显下降。

综上所述,广东省目前 MSM 感染者中 HIV-1 高度耐药毒株尚处于低流行,潜在耐药毒株可能已经在人群中传播;MSM 人群中以 CRF01_AE、CRF_BC 重组亚型及 B 亚型毒株流行为主。

参考文献

- [1] 广东省卫生和计划生育委员会. 2014 年艾滋病工作情况通报 [EB/OL]. <http://www.gdwt.gov.cn/a/zhgg/2014120112585.html>, 2014-12-01/2015-03-06.
- [2] Wang X, He C, Xing H, et al. Short communication: emerging transmitted HIV type 1 drug resistance mutations among patients prior to start of first-line antiretroviral therapy in middle and low prevalence sites in China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012, 28(12):1637-1639.
- [3] Yang J, Xing H, Niu J, et al. The emergence of HIV-1 primary drug resistance genotypes among treatment-naive men who have sex with men in high-prevalence areas in China[J]. Arch Virol, 2013,158(4):839-844.
- [4] 黄丹,李玉锋,谭唯,等. 深圳市 2010 年感染 HIV 的男性接触者原发耐药基因突变监测[J]. 现代预防医学, 2013,40(3):521-522.
- [5] Stanford University. HIV Drug Resistance Database [EB/OL].<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>. 2014-02-27/2015-03-06.
- [6] 赵广录,于微,蔡于茂,等. 深圳市男男性接触人群中 HIV-1 原发耐药性调查[J]. 中华医学杂志, 2012,92(17):1165-1169.
- [7] 于国龙,鄢心革,秦冰,等. 广东省艾滋病长期抗病毒治疗患者耐药情况调查[J]. 新医学, 2013,44(7):463-466.

(下转第 198 页)

• 论 著 •

重组慢病毒载体介导不同启动子驱动的绿色荧光蛋白在多种(不同)细胞中的表达影响

张玲¹ 翁云层¹ 张云² 帅丽芳³ 李婷婷¹ 王文敬¹ 李红卫¹ 赵卫⁴ 黎诚耀^{1*}

[摘 要] 目的 比较不同启动子的慢病毒转导细胞后,在不同细胞系中驱动绿色荧光蛋白表达的效率高低。方法 采用 3 种不同启动子的转移质粒,与包装质粒共转染 293T 细胞,转染 60 h 后,收集慢病毒上清。用等量的三种慢病毒液转导 5 种细胞系(293A、MOLT-4、PC3、DU145 及 RM1),72 h 后,荧光显微镜下观察转导效果;流式细胞仪计数转导效率。结果 不同启动子(Ubiquitin,EF1 α ,CMV)在 5 种细胞系中驱动绿色荧光蛋白的表达及转导效率不同。在 293A 和 PC3 细胞中,CMV 为最强启动子,转导率分别为(94.83 $\pm$ 2.87)%和(20.90 $\pm$ 3.15)%;但在 MOLT-4 和 DU145 细胞中,EF1 α 为最强启动子,转导率分别为(74.27 $\pm$ 2.14)%和(25.13 $\pm$ 4.95)%;在 RM1 细胞中,Ubiquitin 为最强启动子,转导率为(16.77 $\pm$ 0.38)%。结论 在慢病毒载体介导基因表达研究中,要考虑选取合理的细胞和启动子以获得高效的转导效率。

[关键词] 重组慢病毒;绿色荧光蛋白

Green florescence protein expression in various cells driven by different promoters among lentivirus

ZHANG Ling¹, WENG Yunceng¹, ZHANG Yun², SHUAI Lifang³, LI Tingting¹, WANG Wenjing¹, LI Hongwei¹, ZHAO Wei⁴, LI Chengyao^{1*}

(1. Department of Transfusion Medicine, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Department of Orthopaedics, Linqi Traditional Chinese Medicine Hospital, Weifang, Shandong, China, 262600; 3. Guangzhou Millitary Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 4. School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To compare the GFP expression efficiency of transduced cells driven by lentivirus with different promoters. Methods 293T cells were co-transfected with packaging plasmids and three kinds of transfer plasmids. Then the supernatant was collected after 60 hours. 5 cell lines (293A, MOLT-4, PC3, DU145 and RM1) were transduced by equal load of these lentivirus. 72 hours later, GFP expression was observed with florescence microscope and transduction efficiency was counted by FASC. Results GFP expression and transduction efficiency among 5 cell lines were different. Among 293A and PC3 cells, CMV promoter was the strongest one and transduction efficiency can achieve (94.83 $\pm$ 2.87)% and (20.90 $\pm$ 3.15)%, respectively. But among MOLT-4 and DU145 cells, EF1 α promoter was the strongest one and transduction efficiency can achieve (74.27 $\pm$ 2.14)% and (25.13 $\pm$ 4.95)%, respectively. In RM1 cells, Ubiquitin promoter was the strongest one and it can achieve (16.77 $\pm$ 0.38)%. Conclusion In the study of gene expression mediated by lentivirus, proper cell lines and promoters should be selected to obtain high efficiency.

[KEY WORDS] Recombinant lentivirus; Green florescent protein

基金项目:国家自然科学基金(81301433)

作者单位:1. 南方医科大学生物技术学院输血医学系,广东,广州 510515

2. 临朐县中医院骨外科,山东,潍坊 261000

3. 广州军区疾病预防控制中心,广东,广州 510515

4. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院,广东,广州 510515

*通讯作者:黎诚耀, E-mail:chengyaoli@hotmail.com

慢病毒(lentiviru, LV)由 HIV-1 改建而来,基因转移效率高而稳定。不论是细胞处于有丝分裂活跃期还是处于分裂缓慢期及分裂终末期, LV 均可以进行转导;由 LV 携带整合入宿主基因组的目的基因可以在宿主细胞中进行长期而稳定的表达;LV 可兼容多个转录启动子, 可以进行多个基因的表达研究;可容纳较长片段的外源基因(10 kb), 大多数的 cDNA 都能被克隆入 LV^[1-10]。LV 的上述优点使其成为体内和体外基因转移的一种有效工具。本文意在构建不同启动子的转移质粒, 包装重组慢病毒, 观察不同启动子在不同细胞系中驱动绿色荧光蛋白表达效率高低。

1 材料与方法

1.1 不同启动子的转移质粒(pTY-EF1 α -eGFP 和 pTY-CMV-eGFP) 及 pFUGW

不同启动子的转移质粒 pTY-EF1 α -eGFP 和 pTY-CMV-eGFP 由本室前期构建完成, pFUGW 及包装质粒 pSPAX2 和 pMD2.G 由南方医科大学肿瘤研究所提供。

1.2 3 种不同启动子的慢病毒包装及滴度测定

应用 Qiagen 公司无内毒素的质粒大量提取试剂盒提取 pFUGW、pTY-EF1 α -eGFP、pTY-CMV-eGFP、pSPAX2 及 pMD2.G 用以转染。紫外分光光度计测定质粒的浓度与纯度。测得的浓度分别为 pMD2.G:0.85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pPAX2:0.93 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pFUGW:0.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pTY-EF1 α -eGFP:1.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pTY-CMV-eGFP:1.21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。慢病毒的制备采用文献报道方法^[11]。转染采用脂质体法进行, 转染前一天消化传代 293T 细胞, 分别在 3 个 T75 细胞培养瓶中培养, 待第二天细胞长满至 90% 左右可以进行转染。该包装系统中 pMD2.G:pPAX2:pTY-EF1 α -CMV (pTY-CMV-eGFP、pFUGW) = 8:15:20 (质量比)。转染前 30 min~60 min, 去除 293T 细胞培养基, 加入 Opti-MEM[®] RI medium 1.7 mL; 轻轻混匀(上下混)脂质体 2000, 吸 17 μL 至 0.5 mL Opti-MEM[®] RI medium(一个 EP 管)中, 混匀, 室温放置 5 min(Solution B); 将 1.2 μg pMD2.G、4.0 μg pPAX2、6.7 μg pTY-EF1 α -eGFP 或 3.3 μg pTY-CMV-eGFP 或 3.3 μg pFUGW 加入 0.5 mL Opti-MEM[®] RI medium 中(另一个 EP 管)混匀(Solution A); 将 A 液加入 B 液中, 混匀后室温

放置 20 min; 将 AB 混合液加入 293T 细胞中(加液体时细胞面朝上, 以免冲落细胞); 6~8 h 后用吸管吸去瓶中的 AB 混合液, 加入完全培养基 3 mL; 12 h 在倒置荧光显微镜下观察转染情况, 60 h~72 h 后收集病毒上清, 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 rpm, 离心 15 min, 吸取上清, 再经过 0.45 μm 一次性滤器过滤。收集病毒液, 滴度测定采用本室已建立的慢病毒荧光定量 PCR 方法, 包装的慢病毒核酸能达到 10⁹ copies/mL。

1.3 病毒滴度测定

病毒滴度测定采用 RT-QPCR 法, 针对 LV 3'-LTR, 参考^[12]设计引物和探针, 合成了用以定量 LV 核酸拷贝数的引物和探针, Probe (LTR-3): AG TAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTG; Primer Forward (LTR-1): TAAAGCTTGCCCTTGAGTGCT; Primer Reverse (LTR-2): GTCTGAGGGATCTCTA GTTACCAG。对 3 种包装的 LV, 及其中 LV-EF1 α -EGFP 病毒浓缩前后的病毒 RNA, 全部进行逆转录, 将 cDNA 产物和质粒标准品同时进行 Real Time PCR 反应定量。pTY-EF1 α -eGFP 质粒标准品浓度 1.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 换算成核酸拷贝数为 1.06 $\times 10^{14}$ copies/mL。10 倍倍比稀释为 7 个浓度, 即 standard 1:1.06 $\times 10^{14}$, standard 2:1.06 $\times 10^{13}$, standard 3:1.06 $\times 10^{12}$, standard 4:1.06 $\times 10^{11}$, standard 5:1.06 $\times 10^{10}$, standard 6:1.06 $\times 10^9$, standard 7:1.06 $\times 10^8$, 同时设一个阴性对照。Real Time PCR 反应体系如下: 2.5 μL 10 $\times$ PCR buffer (MgCl₂), 0.5 μL dNTP (10 mM), 0.4 μL ROX Dye II (50 $\times$), 1 μL LTR1 (10 μM) 1 μL LTR2 (10 μM) 1 μL LTR3 (5 μM), 0.4 μL FastStart Taq (5 U/ μL) 14.2 μL ddH₂O, 4 μL LV cDNA, 总反应体系为 25 μL 。在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应。在 Stratagene Mx3005P 荧光定量 PCR 仪上进行定量 PCR 反应, 反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 预变性, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火与延伸 1 min, 进行 45 个循环反应; 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 延伸的步骤对荧光信号进行采集。由标准曲线可得病毒滴度。

1.4 不同启动子的慢病毒转导不同细胞系

293A、DU145、PC3、RM1 细胞为贴壁细胞, 待培养瓶中细胞生长到 80%~90% 时, 消化传代细胞, 调整细胞浓度为 5 $\times 10^5$ 个/孔, 后铺 6 孔板, 每孔 3 mL, 每种细胞铺 4 个孔, 3 孔用以加病毒液,

并设 1 个空白细胞对照。上述贴壁细胞铺板培养 12 h 后,吸掉细胞培养基上清,校正病毒液至 10^9 copies/mL,然后将 3 种 LV 按每孔加入 200 μ L 病毒液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后每孔加入 2.8 mL 2% FBS DMEM 维持液;MOLT-4 为悬浮细胞,将适宜密度的 MOLT-4 细胞吹打分散均匀,调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL 后铺 6 孔板,每孔 3 mL 细胞液,铺 3 个细胞孔,并设 1 个空白细胞对照。将 3 种 LV (LV-UBI-eGFP、LV-EF1 α -eGFP、LV-CMV-eGFP) 直接加入 MOLT-4 细胞孔,每孔加入 200 μ L LV。将 6 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 的细胞培养箱继续培养。将实验重复进行 3 次。72 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况或通过 FACS 计数 GFP 表达阳性率。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 One-Way ANOVA 进行方差分析。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 eGFP 表达情况

LV-CMV-eGFP、LV-EF1 α -eGFP、LV-Ubi-eGFP 3 种 LV 转导 293A、MOLT-4、PC3、DU145、RM1 细胞系 72 h 后,荧光显微镜下观察,不同启动子驱动的 GFP 表达情况不同,如图 1 所示。在 293A 细胞中,3 种启动子驱动蛋白表达作用均较强,但 CMV 驱动绿色荧光蛋白作用最强;在 MOLT-4 和 DU145 细胞中,EF1 α 驱动绿色荧光蛋白作用最强;在 PC3 细胞中,CMV 驱动绿色荧光蛋白作用最强;在 RM1 细胞中,Ubiquitin 驱动绿色荧光蛋白作用最强。

2.2 流式细胞技术检测 LV 转导不同细胞系的转导效率高

采用流式细胞技术对不同启动子的 LV 转导不同细胞系的转导效率进行了分析。3 种不同启动子 (Ubiquitin, EF1 α , CMV) 的 LV 在 5 种细胞系 (293A、MOLT-4、PC3、DU145 及 RM1) 中的转导效率不同 (见表 1)。在 293A 和 PC3 细胞中,启动子为 CMV 的 LV 转导率最高分别为 $(94.83 \pm 2.87)\%$ 和 $(20.90 \pm 3.15)\%$;但在 MOLT-4 和 DU145 细胞中,启动子为 EF1 α 的 LV 转导率最高,分别为 $(74.27 \pm 2.14)\%$ 和 $(25.13 \pm 4.95)\%$;在 RM1 细胞中,启动子为 Ubiquitin 的 LV 转导率最

高,为 $(16.77 \pm 0.38)\%$ 。

2.3 统计学分析

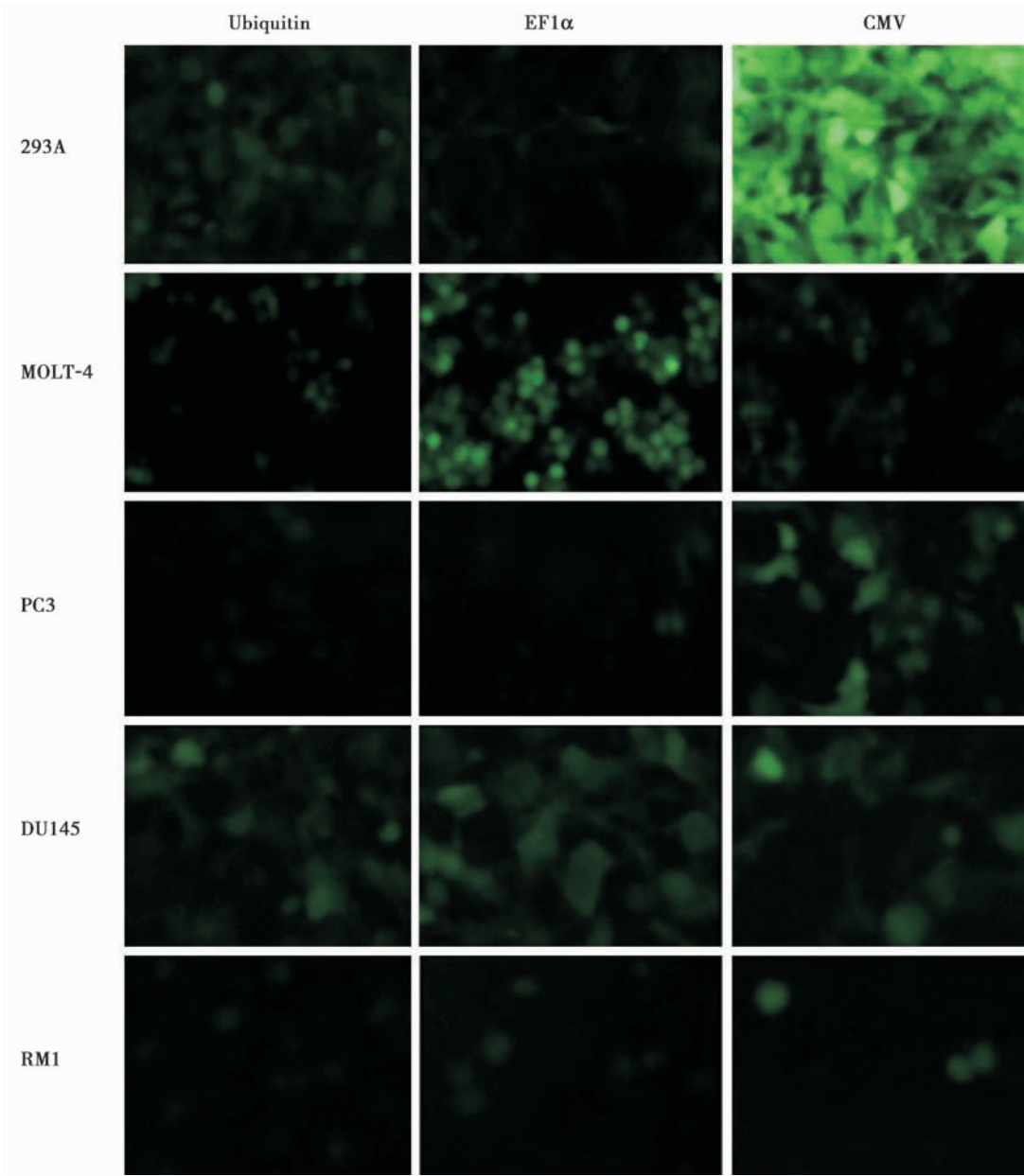
对于 UBI、EF1 α 和 CMV 不同启动子介导的不同细胞系转导率分析, P 值均为 0.000,3 种启动子在 5 种细胞组内的转导率差异显著,两两比较,UBI、EF1 α 和 CMV 启动子均在 293A 细胞上为转导率最高。对于 UBI、EF1 α 和 CMV 不同启动子介导的同一细胞系转导率分析,对于 DU145 细胞系, $P > 0.05$,显示 3 种启动子的转导率无显著差异。对于 293A、PC3、RM1 细胞系, $P < 0.05$,显示 3 种启动子在同种细胞中转导率差异显著。两两比较,293A 和 PC3 中 CMV 启动子最强,RM1 中 UBI 最强。

3 讨论

本研究比较了含有 3 种不同启动子 (EF1 α 、CMV、UBI) 的 LV,分别转导不同的细胞系 293A、MOLT-4、DU145、PC3 及 RM1。实验观察到不同启动子介导的不同细胞转导率差异显著。

据报道,CMV 是目前最强的启动子^[12]。但我们的研究表明,并不是在所有的细胞系中 CMV 驱动活性都最强。结果如图 1 所示,在 293A 细胞中,3 种启动子驱动蛋白表达作用均较强,但 CMV 驱动绿色荧光蛋白作用最强;在 MOLT-4 和 DU145 细胞中,EF1 α 驱动绿色荧光蛋白作用最强;在 PC3 细胞中,CMV 驱动绿色荧光蛋白作用最强;在 RM1 细胞中,Ubiquitin 驱动绿色荧光蛋白作用最强。这与流式细胞技术检测的不同启动子的 LV 在 5 种细胞系上的转导效率结果相一致 (表 1)。文献^[13-14]探讨了 CMV、EF1 α 和 PGK 启动子在 293T、HOS 及 Hela 细胞中的活性,结果表明,在 293T 细胞中,CMV 驱动 GFP 表达能力是 EF1 α 和 PGK 的 4.2~6.3 倍,在 HOS 细胞中,CMV 和 EF1 α 有相同的驱动活性。但在 Hela 细胞中,EF1 α 驱动活性最强。这与我们在 293 细胞系中监测的结果一致,CMV 启动子驱动活性最强,且不同启动子在不同细胞系中的驱动活性是不一致的,提示基因表达研究时选取适宜的启动子以驱动目的基因的表达。

Li^[15]等研究了不同启动子的 LV 转导神经系统细胞活性的研究。在不同的神经元和细胞培养物中,蛋白表达水平差异显著。他们系统地评价了不同启动子驱动的外源基因在小鼠大脑皮层神经



3 种启动子 (Ubiquitin, EF1α, CMV) 驱动的 GFP 在 5 种细胞系 (293A、MOLT-4、PC3、DU145 及 RM1) 中的表达

图 1 不同启动子驱动的 GFP 在不同细胞系中的表达

Figure 1 GFP expression among various cells lines

表 1 流式细胞术检测 LV 转导 72 h 后各细胞系阳性细胞百分率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The percentage of positive counts among different cell cultures transduced with lentivirus for 72 h by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$)

细胞系	n	阳性细胞百分比 (%)		
		LV-UBI-EGFP	LV-EF1α-EGFP	LV-CMV-EGFP
293A	3	89.13 ± 4.28	79.90 ± 6.25	94.83 ± 2.87
MOLT-4	3	64.83 ± 13.01	74.27 ± 2.14	5.87 ± 1.70
PC3	3	5.57 ± 0.31	14.07 ± 1.20	20.90 ± 3.15
DU145	3	24.10 ± 5.53	25.13 ± 4.95	16.87 ± 3.92
RM1	3	16.77 ± 0.38	10.23 ± 1.12	9.53 ± 0.65

元、小脑颗粒细胞及分化和未分化的神经母细胞瘤中表达活性的强弱。在原代皮层神经元中, Ubiquitin C 启动子驱动外源基因表达作用最强。PGK 启动子驱动基因表达活性也较强,但是 CMV 和 MND 启动子驱动活性较弱,只有少量神经元细胞表达外源基因。但在小脑颗粒细胞及分化的 SH-SY5Y 细胞中,CMV 驱动活性最强。这为 LV 应用于神经系统提供了指导作用。MOLT-4 为人急性淋巴细胞性白血病细胞系,PC3、DU145 为人前列腺癌细胞、RM1 为小鼠前列腺癌细胞,启动子在上述细胞系中的驱动活性研究,为选用适宜启动子的 LV 以使目的基因在上述靶细胞中高效表达奠定基础。

研究表明不同启动子在不同细胞内驱动 EGFP 表达能力不同。针对特定靶细胞和组织,选择最适宜的启动子构建重组 LV,有效驱动外源基因的高效表达,进而对实现 LV 转导的基因治疗具有重要指导意义。

参考文献

- [1] Lois C, Hong EJ, Pease S, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. Science, 2002,295 (5556):868-872.
- [2] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors:Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99(4):2140-2145,2988-2993.
- [3] Lai Z, Brady RO. Gene transfer into the central nervous system in vivo using a recombinant lentivirus vector [J]. J Neurosci Res, 2002,67(3):363-371.
- [4] Zufferey R. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery[J]. J Virol, 1998,72 (12):9873-9880.
- [5] Yu X, Zhan X, Cheng L, et al. Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells[J]. Molecular Therapy, 2003,7 (6):827-838.
- [6] Xiang Y, Li B, Wang JM, et al. Gene transfer to human trabecular meshwork cells in vitro and ex vivo using HIV-based lentivirus[J]. Int J Ophthalmol, 2014,7 (6): 924-929.
- [7] Yi Y, Noh MJ, Lee KH. Current advances in retroviral gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2011,11(3):218-228.
- [8] Lombardi G, Calistri A, Curtarello M, et al. HIV-1-mediated delivery of a short hairpin RNA targeting vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelium cells[J]. Br J Ophthalmol, 2009,93(2):244-248.
- [9] Valtink M, Stanke N, Knels L, et al. Pseudotyping and culture conditions affect efficiency and cytotoxicity of retroviral gene transfer to human corneal endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011,52(9):6807-6813.
- [10] Ghanbari JA, Salehi M, Zadeh AK, et al. A preliminary step of a novel strategy in suicide gene therapy with lentiviral vector[J]. Adv Biomed Res, 2014,3:7.
- [11] Tian X, Wang G, Xu Y, et al. An improved tet-on system for gene expression in neurons delivered by a single lentiviral vector[J]. Hum Gene Ther, 2009,20(2):113-123.
- [12] Foecking MK, Hofstetter H. Powerful and versatile enhancer promoter unit for mammalian expression vectors [J]. Gene, 1986,45(1):101-105.
- [13] Gensheng M, Francesco M, Jia Y, et al. DNA context and promoter activity affect gene expression in lentiviral vectors[J]. ACTA BIOMED, 2008,79(3): 192-196.
- [14] Gonzalez P, Caballero M, Liton PB, et al. Expression analysis of the matrix GLA protein and VE-cadherin gene promoters in the outflow pathway[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004,45(5):1389-1395.
- [15] Mingjie L, Nada H, Ying L, et al. Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2010,189(1): 56-64.

• 论 著 •

TIP30 基因敲除小鼠 EGFR 下游信号通路活性

陈逢生¹ 陈晓华² 李爱民¹ 周瑾¹ 罗荣城^{1*}

[摘 要] 目的 探讨 TIP30 基因敲除后是否影响小鼠 EGFR 下游信号通路的活性。方法 获取野生型及 TIP30 基因敲除的 BALB/c 小鼠乳腺组织及乳腺癌组织,用免疫组化检测 EGFR 下游信号通路相关分子 pAKT 及 pErk1/2 的表达。结果 Tip30^{-/-}小鼠乳腺上皮细胞 pErk1/2 及 pAkt 阳性率分别为 (27.83 ± 8.46)% 和 (30.83 ± 6.65)% ($n=4$), 显著高于 Tip30^{+/+}小鼠乳腺上皮细胞的 (12.58 ± 5.87)% 和 (14.94 ± 5.77)% ($n=4$), P 值分别 0.02 和 0.011。而 Tip30^{-/-}小鼠乳腺肿瘤细胞 pErk1/2 及 pAkt 阳性率分别为 (51.68 ± 8.57)% 和 (56.08 ± 8.44)% ($n=4$), 则显著高于 Tip30^{-/-}小鼠乳腺上皮细胞阳性率, P 分别为 0.002 和 0.001。结论 TIP30 基因缺失可能通过使 EGFR 下游 ERK/MAPK 及 PI3K/AKT 信号通路的活化,从而导致 TIP30 基因缺失小鼠发生乳腺癌。

[关键词] TIP30; 表皮生长因子受体; 乳腺癌

EGFR downstream signal molecules in TIP30 knockout mice

CHEN Fengsheng¹, CHEN Xiaohua², LI Aimin¹, ZHOU Jin¹, LUO Rongcheng^{1*}

(1. The Combination of Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Cancer Center of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510315; 2. Oncology Center of Panyu District Hospital in Guangzhou City, Guangzhou, Guangdong, China, 511400)

[ABSTRACT] Objective To investigate whether deletion of TIP30 in mice affect activity of EGFR downstream signal molecules. Methods Mammary glands and breast cancer tissues of Tip30^{+/+} and Tip30^{-/-} BALB/c mice were obtained. pAKT and pErk1/2 were detected in these samples by immunohistochemistry. Results Positive rates of pErk1/2 and pAkt in Tip30^{-/-} mice mammary gland were (27.83 ± 8.46)% and (30.83 ± 6.65)% ($n=4$), which were significantly higher than (12.58 ± 5.87)% and (14.94 ± 5.77)% in Tip30^{+/+} mice respectively. P values were 0.02 and 0.011. Moreover, positive rates of pErk1/2 and pAkt in Tip30^{-/-} mice mammary tumor were (51.68 ± 8.57)% and (56.08 ± 8.44)%, significantly higher than Tip30^{-/-} mice mammary gland, P values were 0.002 and 0.001 respectively. Conclusion Deletion of TIP30 in BALB/c mice resulted in mammary tumor partly through upregulation of EGFR downstream signal molecules activity.

[KEY WORDS] TIP30; EGFR; Breast cancer

TIP30 基因, 又称 CC3 或 Htatip2, 是 1998 年肖华等在研究人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的体外转录时发现一种分子量为 30 kD 的 Tat (transactivator of transcrip-

tion) 结合蛋白 (tat interactive protein)^[1]。研究发现 TIP30 在多种肿瘤组织中表达异常, 如肺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、肝细胞癌和前列腺癌等^[2-7], 提示 TIP30 与肿瘤之间存在密切联系。Hua 等研究发

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (B2014267); 广州市番禺区珠江科技新星专项 (2013-专 15-6.10)

作者单位: 1. 南方医科大学中西医结合医院肿瘤中心, 广东, 广州 510315

2. 广州市番禺区中心医院肿瘤科, 广东, 广州 511400

*通讯作者: 罗荣城, E-mail: lrc01@163.com

现, TIP30 基因敲除小鼠可以自发形成多种肿瘤^[7-8]。这些研究提示 TIP30 是一种肿瘤抑制基因。TIP30 具有多种功能, 可以作为一种转录共分子参与凋亡及增殖相关基因的调控^[9-10], 它还可以作为细胞核转运抑制因子调节细胞凋亡^[11]。近年已有研究发现, 在肝癌和肺癌中, TIP30 可以调控 EGFR 下游信号通路的活性^[12-13]。我们先前的研究发现, 在 BALB/c 背景的小鼠中敲除 TIP30 能诱发小鼠乳腺癌发生^[14]。然而在该模型的乳腺及乳腺癌组织中, TIP30 是否具有调控 EGFR 下游信号通路的作用仍未明确。为了进一步研究其可能的机制, 我们对该小鼠模型 EGFR 下游信号分子进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物的饲养

通过杂交的方法, 获得 Tip30 基因敲除的 BALB/c 小鼠, 连续传代 7 代以上, 获得纯合背景的 Tip30^{-/-} BALB/c 小鼠。Tip30 基因敲除的 BALB/c 小鼠均由美国密西根州立大学肖华实验室赠送。共 47 只雌性小鼠均在南方医科大学动物中心 SPF 级层流柜内分笼饲养。

1.2 实验动物的处死和标本处理

所有小鼠均为同系来源, 共有 47 只雌性未孕小鼠完成 18 个月的实验观察并进入实验统计, 其中 Tip30^{+/+} BALB/c 小鼠 19 只和 Tip30^{-/-} BALB/c 小鼠 28 只。所有小鼠均以二氧化碳吸入处死, 并详细检查小鼠乳腺及其它器官肿瘤发生情况。用 4% 多聚甲醛固定全部小鼠乳腺及肿瘤组织, 组织在 4℃ 下过夜, 然后用 30%、50%、70% 梯度酒精对组织脱水各 30 min, 滴加二甲苯 3 次, 使其脱脂及透明, 然后用石蜡包埋。部分组织立即置于液氮中冻存, 最后放入 -80℃ 冰箱中保存。

1.3 石蜡切片免疫组织化学 (immunohistochemistry paraffin chemical, IHC) 检测

1.3.1 脱蜡和水化

将 3~5 μm 石蜡切片置于二甲苯中浸泡 10 min, 更换二甲苯后再浸泡 10 min; 然后于 100%、90%、80%、70% 梯度酒精水化各浸泡 2 min; 去离子双蒸水洗 2 次。

1.3.2 抗原修复

应用高压热修复法。首先配置存储溶液 A:

0.1 mol/L Citrate Acid, 溶液 B: 0.1 mol/L Sodium Citrate. 于 4℃ 长期保存。工作液配置: 9 mL 溶液 A + 41 mL 溶液 B + 450 mL dH₂O, 调整 PH 为 6.0。然后将脱蜡水化后的玻片置于装有工作液的烧杯中, 高压锅内高压 20 min, 121℃, 压力 15psi。然后于室温内放置 30 min 待其冷却。

1.3.3 免疫组织化学染色

将组织切片脱蜡水化后, 置入 3% H₂O₂ 溶液室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 降低染色背景。应用 PBST 浸洗组织切片 3 次, 各 5 min。然后用 5% BSA-PBST 封闭液 (150 μL /片) 封闭组织 1 h。同时准备一抗, 根据各抗体稀释需要, 应用 5% BSA-PBST 稀释配置抗体, 兔抗小鼠 pAkt 单克隆抗体 (Cell Signaling) 和兔抗小鼠 pErk1/2 单克隆抗体 (Cell Signaling) 均按 1:100 稀释。吸除切片上的封闭液, 加入事先配好的一抗 (150 μL /片), 随后将切片置于湿盒内, 4℃ 孵育过夜。第二天应用 PBST 浸洗切片 3 次, 每次 5 min。根据一抗种属选择并滴加适当比例稀释的生物素结合的二抗 (用 1% BSA-PBST 稀释液按 1:200 稀释), 于室温孵育 30 min。同时配好 ABC (美国 Vector Laboratories 公司) 工作液 (用 PBST 按 1:100 稀释, 并混合均匀), 于室温放置 30 min。室温孵育完成后, 用 PBST 浸洗切片 3 次, 每次 5 min。切片滴加 ABC 液 150 μL /片, 室温孵育 30 min 后, 用 PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min。随后用新鲜配制的 0.5 mg/mL 的 DAB 显色液显色, 显微镜下观察显色情况, 决定显色时间, 显色完成后蒸馏水终止显色反应。应用苏木精复染细胞核 1.5 min, 双蒸水冲洗 15 min。应用 90% 酒精、100% 酒精脱水各 2 次, 每次 10s, 二甲苯透明 2 次, 每次 10s。最后用永久封片液封片, 并将切片置于显微镜下观察。

1.3.4 乳腺组织及肿瘤组织中 pAkt、pErk1/2 细胞计数方法

将每个切片置于光学显微镜 (Olympus 公司) 5 个高倍视野 (10×40 倍) 下进行观察, 胞浆、胞核染色为棕黄或棕褐色为阳性细胞。分别统计乳腺组织中、肿瘤组织中阳性细胞数百分比, 取平均值。

1.4 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。实验结果以表示, 均数比较采用单因素方差分析, 多重比较

采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

我们前期研究发现, 28 只 $Tip30^{-/-}$ 小鼠中有 8 只发现乳腺自发肿瘤(发病率 28.6%), 而 19 只 $Tip30^{+/+}$ 小鼠中均未发现有乳腺自发肿瘤(0%); 对 $TIP30$ 基因敲除小鼠形成的乳腺癌组织进行 H&E 染色发现^[14], 该模型乳腺癌组织为中分化浸润性导管癌, 癌组织存在非典型上皮细胞组成的腺样、管状、巢状和微乳头结构。为了进一步探讨小鼠 $TIP30$ 基因敲除后形成的乳腺癌组织 EGFR 下游信号通路可能的变化, 我们对 PI3K 及 MAPK 相关信号通路进行了研究, 结果如下:

2.1 $TIP30$ 基因敲除可致小鼠乳腺及肿瘤 EGFR 下游 PI3K 信号通路的活化

为了检测 $TIP30$ 基因敲除对 EGFR 下游 PI3K 信号通路的影响, 我们应用免疫组化检测小鼠乳腺及肿瘤组织的 pAKT 活化情况。检测结果如图 1 和表 1 示, 应用方差分析法, $Tip30^{-/-}$ 小鼠乳腺组织中 pAKT 阳性细胞百分率为 $(30.83 \pm 6.65)\% (n=4)$, 显著性高于 $Tip30^{+/+}$ 小鼠乳腺上皮细胞的 pAkt 阳性率 $(14.94 \pm 5.77)\% (n=4)$, $P=0.011$; 而 $Tip30^{-/-}$ 小鼠乳腺肿瘤组织 pAkt 阳性率 $(56.08 \pm 8.44)\% (n=4)$ 则显著性高于 $Tip30^{-/-}$ 小鼠乳腺组织, $P=0.001$ 。

2.2 $TIP30$ 基因敲除可致小鼠乳腺及肿瘤 EGFR 下游 MAPK 信号通路的活化

为了进一步检测 $TIP30$ 基因敲除后对小鼠乳腺及肿瘤组织 EGFR 下游 MAPK 通路的影响, 我们同样应用了免疫组化对小鼠乳腺及肿瘤组织进行检测。见图 1 和表 1, $Tip30^{+/+}$ 小鼠乳腺组织 pErk1/2 阳性细胞百分率为 $(12.58 \pm 5.87)\% (n=4)$, 显著性低于 $Tip30^{-/-}$ 小鼠乳腺上皮细胞 $(27.83 \pm 8.46)\% (n=4)$, $P=0.021$; 而 $Tip30^{-/-}$ 小鼠乳腺肿瘤细胞

pErk1/2 阳性率为 $(51.68 \pm 8.57)\% (n=4)$, 显著高于 $Tip30^{-/-}$ 小鼠乳腺组织, $P=0.002$ 。

3 讨论

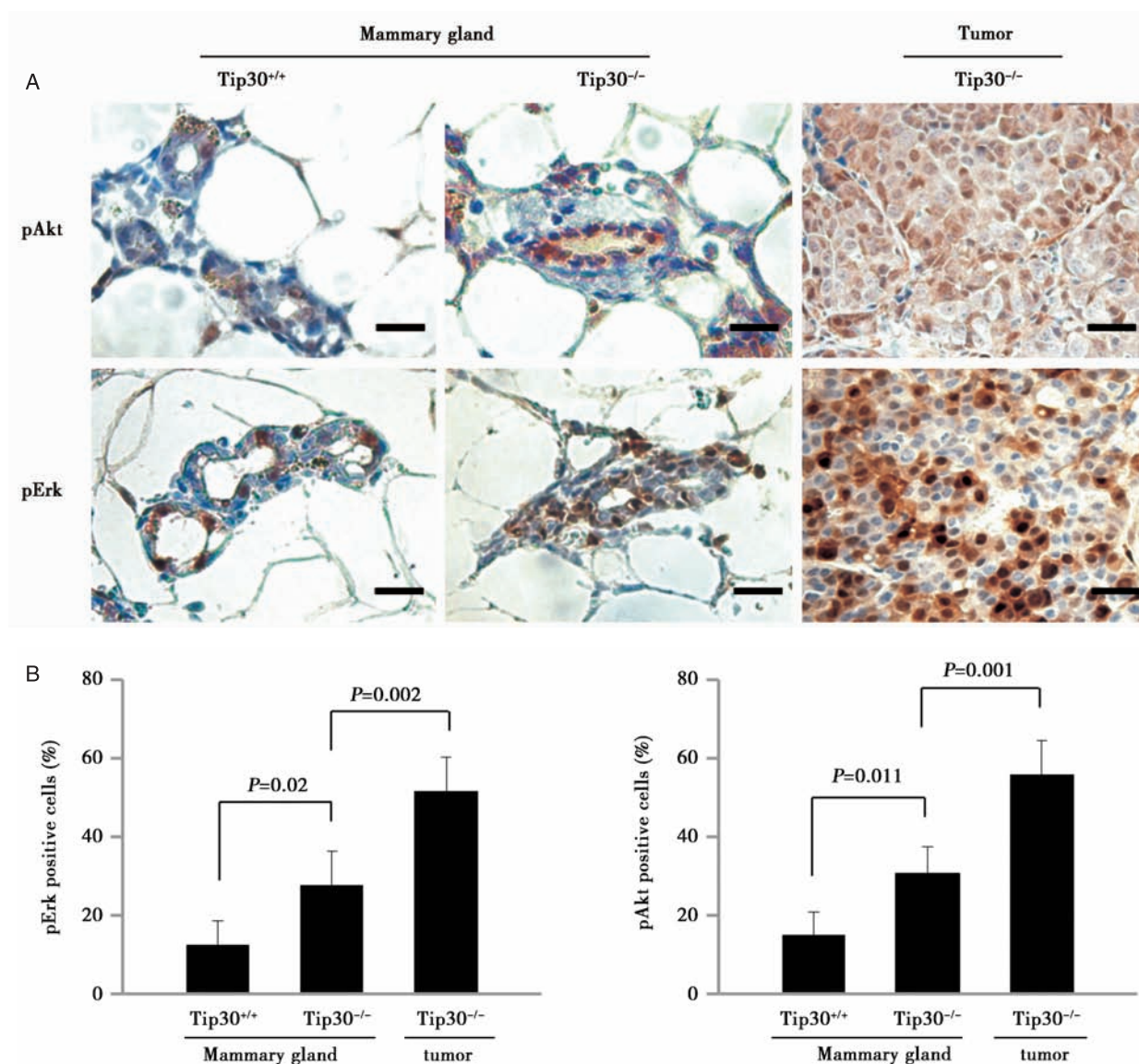
$TIP30$ 基因作为一种肿瘤抑制基因, 在多种肿瘤的发生发展中起了重要的作用^[2-7]。研究发现多种肿瘤组织中 $TIP30$ 表达异常, 而且 $TIP30$ 基因敲除小鼠可以形成多种肿瘤^[7-8]。近来研究还发现, 在肝癌和肺癌中, $TIP30$ 可以调控 EGFR 细胞浆内转运和下游信号通路的活性^[12]。我们的前期研究发现 $TIP30$ 基因敲除的 BALB/c 小鼠中, 28% 的小鼠能自发形成乳腺癌。而本研究对该模型小鼠 EGFR 信号分子通路的改变进行了初步的探讨, 发现 $TIP30$ 缺失会导致 EGFR 下游信号通路的活化, 而这可能是 $TIP30$ 基因敲除小鼠形成乳腺癌的原因之一。

MAPK 信号传递途径起着极为重要的作用, 控制着细胞多种生理过程, 如细胞生长、发育、分裂、死亡等。ERK 是 MAPK 家族的主要成员, 遵循 MAPKs 的三级酶促级联反应, 即上游激活蛋白 $\rightarrow$ MAPK 激酶的激酶 (MAPKKK) $\rightarrow$ MAPK 激酶 (MAP-KK) $\rightarrow$ MAPK, 它的信号传递途径是涉及调节细胞生长、发育及分裂的信号网络的核心。ERK 和其信号途径一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号, 另一方面通过 ERK 信号级联反应作用于核转录因子如 AP-1、NF- κ B 等, 调控基因表达, 从而在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用。本研究显示 $TIP30$ 基因敲除的小鼠乳腺组织较野生型小鼠的 pERK 表达水平明显上升, 并且在乳腺肿瘤组织中有更高的 pERK 表达水平。这些结果提示 $TIP30$ 基因敲除后, 可能通过影响 MAPK 信号通路而在乳腺癌的发生发展中起一定的作用。已有研究发现

表 1 免疫组化检测小鼠乳腺组织及 $Tip30^{-/-}$ 乳腺肿瘤 pErk 和 pAkt 阳性细胞率 ($\%, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Percentage of pErk and pAkt positive cells in mouse mammary gland and $Tip30^{-/-}$ mammary tumor by IHC ($\%, \bar{x} \pm s$)

Genotype	n	pAKT positive cells (%)	pERK positive cells (%)
$Tip30^{+/+}$ mammary gland	4	14.94 ± 5.77	12.58 ± 5.87
$Tip30^{-/-}$ mammary gland	4	30.83 ± 6.65	27.83 ± 8.46
$Tip30^{-/-}$ mammary tumor	4	56.08 ± 8.44	51.68 ± 8.57
F value		34.708	25.975
P value		<0.001	<0.001



A: 免疫组织化学方法检测 pERK 和 pAKT 在乳腺组织及乳腺肿瘤的表达; B: pERK 和 pAKT 表达阳性的细胞百分比($\bar{x} \pm s$), 比例尺: 20 μm

图 1 TIP30 基因敲除活化小鼠乳腺及肿瘤组织 EGFR 下游信号分子 ($\times 400$)

Figure 1 TIP30 deletion activates downstream molecules of EGFR in mice ($\times 400$)

ERK 的活性或表达水平在乳腺癌中明显升高。Mueller 等^[15]研究发现, 与 18 例癌旁正常组织相比, 131 例原发性乳腺癌组织存在 ERK 活性的上调。Sivaraman 等^[16]的研究显示与良性乳腺疾病相比, 乳腺癌组织中 ERK 活性升高 5~10 倍。因此提示 TIP30 缺失可能通过调节 ERK 活性来达到促进乳腺癌发生的作用。

本研究还发现, EGFR 下游 PI3K 通路在 TIP30 基因敲除的小鼠乳腺组织中活化明显强于野生型小鼠, 而且 TIP30 基因敲除的小鼠的乳腺

肿瘤组织 pAKT 表达更高。提示该通路的激活可能与该小鼠模型乳腺癌的发生发展存在一定关系。既往已经有很多研究发现, PI3K 通路的激活不但与乳腺癌的发生发展有关, 还与其它多种肿瘤如黑色素瘤、淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌等发生发展有着密切关系。在 PI3K 信号通路中, AKT 是信号通路中的核心分子, AKT 下游包括 NF- κ B、VEGF、FOXO 等等, 是促增殖抑凋亡的因子。PI3K/AKT 途径通过抑制肿瘤细胞凋亡、增强细胞对低氧和营养缺乏的耐受能力, 辅助肿瘤生长。异

常活化的 PI3K 通路还可以阻断肿瘤细胞的极化,从而增强其侵袭和转移能力。值得一提的是,研究发现乳腺上皮细胞内单纯的 AKT 活化在小鼠体内并不足以诱发乳腺癌^[17],因此提示乳腺癌发生还和其它多种机制相关^[8,10]。有数据表明,TIP30 基因缺失可以增强 c-Myc 和 IGF-1 等基因的表达,提示 TIP30 基因敲除后可能通过多种机制来诱导乳腺癌发生。

因此,本研究通过对 TIP30 基因敲除 BALB/c 小鼠模型的研究发现,TIP30 缺失会导致 EGFR 下游 ERK/MAPK 及 PI3K/AKT 信号通路的活化,从而导致 TIP30 基因缺失小鼠发生乳腺癌,而 pERK 和 pAKT 阳性细胞表达率是否存在关联仍有待我们进一步研究。本研究对 TIP30 基因及其相关 EGFR 信号通路的研究,进一步阐明了乳腺癌发生的可能分子机制,还为寻找乳腺癌治疗潜在靶点提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] Xiao H, Tao Y, Greenblatt J, et al. A cofactor, TIP30, specifically enhances HIV-1 Tat-activated transcription [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998,95(5):2146–2151.
- [2] Tong X, Li K, Luo Z, et al. Decreased TIP30 expression promotes tumor metastasis in lung cancer[J]. *The American Journal of Pathology*, 2009,174(5):1931–1939.
- [3] Li X, Zhang Y, Cao S, et al. Reduction of TIP30 correlates with poor prognosis of gastric cancer patients and its restoration drastically inhibits tumor growth and metastasis [J]. *International Journal of Cancer*, 2009,124(3):713–721.
- [4] Zhang H, Zhang Y, Duan HO, et al. TIP30 is associated with progression and metastasis of prostate cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2008,123(4):810–816.
- [5] Zhao J, Ni H, Ma Y, et al. TIP30/CC3 expression in breast carcinoma: relation to metastasis, clinicopathologic parameters, and P53 expression[J]. *Human pathology*, 2007,38(2):293–298.
- [6] Chen X, Cao X, Dong W, et al. Expression of TIP30 tumor suppressor gene is down-regulated in human colorectal carcinoma[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2010,55(8):2219–2226.
- [7] Ito M, Jiang C, Krumm K, et al. TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis[J]. *Cancer Research*, 2003,63(24):8763–8767.
- [8] Pecha J, Ankrapp D, Jiang C, et al. Deletion of Tip30 leads to rapid immortalization of murine mammary epithelial cells and ductal hyperplasia in the mammary gland[J]. *Oncogene*, 2007,26(53):7423–7431.
- [9] Xiao H, Palhan V, Yang Y, et al. TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes [J]. *The EMBO Journal*, 2000,19(5):956–963.
- [10] Jiang C, Ito M, Piening V, et al. TIP30 interacts with an estrogen receptor alpha-interacting coactivator CIA and regulates c-myc transcription[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004,279(26):27781–27789.
- [11] King FW, Shtivelman E. Inhibition of nuclear import by the proapoptotic protein CC3[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004,24(16):7091–7101.
- [12] Zhang C, Li A, Zhang X, et al. A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011,286(11):9373–9381.
- [13] Zhang C, Mori M, Gao S, et al. Tip30 deletion in MMTV-Neu mice leads to enhanced EGFR signaling and development of estrogen receptor-positive and progesterone receptor-negative mammary tumors[J]. *Cancer Research*, 2010,70(24):10224–10233.
- [14] Chen F, Li A, Gao S, et al. Tip30 controls differentiation of murine mammary luminal progenitor to estrogen receptor-positive luminal cell through regulating FoxA1 expression [J]. *Cell Death & Disease*, 2014,15(7):785–788.
- [15] Mueller H, Flury N, Eppenberger-Castori S, et al. Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients[J]. *International Journal of Cancer*, 2000,89(4):384–388.
- [16] Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, et al. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997,99(7):1478–1483.
- [17] Hutchinson J, Jin J, Cardiff RD, et al. Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001,21(6):2203–2212.

• 论 著 •

广州地区 579 例儿童过敏性鼻炎患者吸入过敏原的临床分析

张大威^{1*} 丘小汕^{2*} 何健荣^{1,2} 刘立¹

[摘要] **目的** 通过皮肤点刺试验,考察广州地区过敏性鼻炎患儿吸入过敏原的种类及其分布,为诊断、预防和治疗儿童过敏性鼻炎提供参考。**方法** 采用常见的 11 种吸入过敏原,对 579 例诊断为过敏性鼻炎患儿进行皮肤点刺试验,计算各种过敏原阳性率反应,并结合过敏原的种类、数量及患者年龄等临床资料进行分析。**结果** 过敏原皮肤点刺试验阳性率为 77.72%,以户尘螨、粉尘螨阳性率最高,分别为 73.58%和 74.78%,其次依次为狗毛 > 猫毛 > 德国小蠊 > 多支 > 霉菌 II > 树 I > 交链 > 杂草 > 葡萄球菌。只对单一类别的变应原呈阳性反应的有 121 例,占有阳性例数的 26.9%,其中主要为螨类,占 107 例。对两类变应原呈阳性反应的有 261 例,对三类或三类以上变应原呈阳性反应的有 68 例。此外,皮肤点刺阳性率与患者年龄相关($P<0.001$),11 岁~14 岁儿童(86.5%)> 7 岁~10 岁儿童(75.0%)> 5 岁~6 岁儿童(64.1%)。**结论** 分析结果提示户尘螨和粉尘螨阳性率显著高于其他过敏原,是广州地区儿童过敏性鼻炎最主要的吸入过敏原。过敏患者多数具有敏感体质,往往同时对多种过敏原产生过敏反应。值得注意的是皮肤点刺试验阳性率与患者年龄具有一定关系。

[关键词] 过敏性鼻炎;吸入过敏原;皮肤点刺试验;临床分析

Clinical analysis of Inhaled allergens in 579 children with allergic rhinitis in Guangzhou

ZHANG Dawei^{1*}, QIU Xiaoshan^{2*}, HE Jianrong^{1,2}, LIU Li¹

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong, China, 523808; 2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] **Objective** Based on the study of the types and distribution of inhaled allergens in children with allergic rhinitis (AR) in Guangzhou by skin prick test(SPT), to provide reference for the diagnosis, treatment, and prevention of AR in children. **Methods** A total of 579 cases of children with AR were subjected to SPT with 11 common inhaled allergens. The positive rates of allergic reactions, the types of allergens, and the ages distribution were subjected to data analysis. **Results** Positive rate of skin prick test was 77.72%; house dust mite-positive and dermatophagoides farinae-positive were accounting for 73.58% and 74.78%, respectively. The next in order were dog dander, cat dander, *Blattella germanica*, *Cladosporium herbarum*, mould II, tree I, *Alternaria*, weed and *Staphylococcus*. 121 cases were positive with a single allergen occupying 26.9% of the total number of all positive cases including 107 cases of mites. Besides, 261 cases were positive with two types of allergens and 68 cases with three or more allergens. The positive rate of SPT test was related to age ($P<0.001$), 11~14 years old (86.5%) > 7~10 years old (75.0) > 5~6 years old (64.1%). **Conclusion** Household dust mites and dermatophagoides were the most common allergens in children with AR in Guangzhou. Most allergy suffers possessed allergic constitutions, and were allergic to more than one type of allergens. It is noticeable that the positive rate of SPT was related to age.

[KEY WORDS] Allergic rhinitis; Inhaled allergen; Skin prick test; Clinical analysis

基金项目:国家自然科学基金(81402933); 2013 年度国家级和省级大学生创新创业训练计划项目(1057113046)

作者单位:1. 广东医学院药学院,广东,东莞 523808

2. 中山大学附属第一医院儿科,广东,广州 510080

*通讯作者:张大威, E-mail:d.w.zhang@163.com; 丘小汕, E-mail:xshqiu@163.com

儿童过敏性疾病如过敏性鼻炎(allergic rhinitis, AR)、特应性皮炎、哮喘并非各自独立存在,婴儿或儿童早期出现的某种变态反应症状常预示未来其他过敏性疾病的发生,这种现象被称为过敏性疾病的自然进程(allergic march)^[1]。因此,对儿童早期出现的 AR 等过敏性疾病应引起足够重视。据国际儿童哮喘和变应性疾病研究项目(the International Society for Augmentative and Alternative Communication, ISAAC)研究,在全球大多数地区儿童 AR 的发病率呈现逐年上升趋势^[2],在部分欧洲国家甚至高达 40%^[3]。AR 可显著影响患儿的生活质量和学习效率等,增加社会和家庭的经济负担,已经发展成为全球性问题^[4]。

AR 即变应性鼻炎是特应性个体接触致敏原后出现由免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)介导的炎症等引起的鼻部症状性疾病,主要症状包括鼻痒、喷嚏、流涕、鼻塞等^[5]。AR 的过敏原(allergen)可分为吸入过敏原和食物过敏原,常见的吸入性过敏原如花粉、尘螨、羽毛、昆虫、真菌等;食入性过敏原如花生、牛奶、大豆、海鲜等。现实生活中,因食物过敏原致 AR 的情况较为少见,绝大多数是吸入过敏原所致 AR,而尘螨是过敏性疾病的重要元凶。过敏原检测方法主要包括体外试验特指血清特异性 IgE (serum specific IgE, sIgE) 检测试验和体内试验包括皮肤点刺试验(skin prick test, SPT)和过敏原激发试验(allergen provocation)。上述检测方法中激发试验存在潜在的危险性,对医护人员和实验设备条件要求较高,而体外试验血清检测成本较高,出结果时间较长, SPT 是一种既比较简便而又具有比较高特异性的试验方法,近年被国际变态反应学界广泛采用。

AR 的病因主要是由过敏原引起,其病因诊断首先要明确患者是对什么过敏原过敏,这对于预防、诊断、治疗具有重要的临床价值。因此,本论文对广州市儿童医院耳鼻喉科门诊的 579 例诊断为 AR 儿童进行吸入过敏原 SPT 试验,分析 AR 儿童的主要过敏原和分析相关影响因素,为 AR 的治疗和预防提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 6 月~2012 年 9 月在广州妇女儿

童医疗中心耳鼻咽喉头颈外科门诊就诊,具有疑似 AR 严重症状、且症状持续或反复发作的患儿 579 例。受试者中男童 322 例,女童 257 例;年龄范围 4~14 岁,平均年龄 7.80 ± 2.53 岁。患儿均符合 2010 年重庆会议制订的儿童 AR 诊断标准。所有患儿受试前均征得监护人同意,受试前患儿停用抗组胺药和皮质类固醇的时间符合世界卫生组织(World Health Organization, WHO)文件“allergic rhinitis and its impact on asthma, ARIA”要求,既往未行过敏原检查及未进行特异性脱敏治疗者^[6]。对入选儿童家长进行一般问卷调查,收集一般社会人口学情况、居住环境、饮食习惯、过敏症状与家族史等。

1.2 研究材料

国际标准化变应原购自浙江我武生物科技股份有限公司,包括 11 种常见吸入变应原:粉尘螨、户尘螨、德国小蠊、狗上皮、猫上皮、交链孢菌属、多主枝孢菌属、葡萄球菌属、树 I (桉木、榛属、杨属、榆科及柳属),杂草类(艾蒿、荨麻、蒲公英、长叶车前草)、霉菌 II (曲菌、风毛霉菌、特异青霉、芽霉菌属、根霉菌属)。并以 10 g/L 的盐酸组胺为阳性对照,以生理盐水为阴性对照。选用浙江我武生物科技股份有限公司一次性皮肤点刺针[注册证号:浙湖食药监械(准)字 2009 第 1010019 号(更)]。

1.3 研究方法

1.3.1 SPT 原理

对某些物质有速发型过敏反应的患者,当某种变应原进入其皮肤时,会立即特异性引起皮肤内肥大细胞脱颗粒,释放组胺等活性物质,导致局部毛细血管扩张(红斑),毛细血管通透性增强(水肿、风团)。此即为阳性反应,表示对该抗原过敏。

1.3.2 SPT 操作前注意事项

进行皮肤点刺试验前,如果患儿有以下准则未得到遵循,点刺试验必须延迟:询问患儿是否进食、有无晕针;试验前 1 d 必须停用 10 mg 的全身性的强的松龙,同时不能在 SPT 试验臂部使用可的松油膏;试验前 3 d 必须停用所有抗组胺药;息斯敏需停药 > 7 d;如果 AR 患儿使用了浴液、润肤露等,则需在试验前清洗 SPT 臂部。

1.3.3 SPT 操作流程

选择患儿前臂曲侧面皮肤进行消毒处理;以圆珠笔标上数字 1~12,相邻标记部位间距约 3

cm~4 cm;在标记旁边,自上而下分别滴加阳性对照液、各种过敏原、阴性对照液各 1 小滴;点刺针垂直通过滴在皮肤的试液,轻压刺破皮肤(以不出血为度),残留液 2 min~3 min 后拭去;点刺后 12 min 左右观察结果,用笔描记并以透明胶带记录反应情况,随后转移到适当的表格中,记录风团直径或红晕面积。

1.4 评定标准

以阳性对照液的风团或红晕面积为参照,阴性对照液的风团或红晕面积做校正。根据点刺液风团或红晕的面积/阳性对照风团或红晕的面积,确定其反应级别。如:若点刺液风团或红晕面积为阳性对照面积的 0~25%或与阴性对照所致风团或红晕面积相同,则为阴性(-);若为 25%~50%,则为阳性(+);若为 51%~100%,则为阳性(++);若为 100%~200%,则为(+++);若为≥200%,则为(++++)。

1.5 统计学方法

采用校正 χ^2 检验, $P<0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 SPT 阳性反应的种类分布

如表 1 所示,在 579 例诊断为 AR 患儿中,450 例呈阳性反应,阳性率为 77.72%。其中以户尘螨、粉尘螨阳性率最高,分别为 73.58%和 74.78%($P<0.05$),其余过敏原阳性率依次为:狗毛>猫毛>德国小蠊>多支>霉菌 II>树 I>交链>杂草>葡萄球菌。

表 1 579 例 AR 患儿中 11 种常见吸入性变应原的分布
Table 1 Analysis of 579 cases of children with AR by SPT test with 11 standardized common inhaled allergens

变应原	+	++	+++	++++	合计	阳性率 (%)
粉尘螨	23	52	124	234	433	74.78*
户尘螨	26	35	134	231	426	73.58*
狗毛	8	12	9	9	38	6.56
猫毛	4	4	16	7	31	5.35
交链	2	3	0	3	8	1.38
霉菌 II	2	3	1	4	10	1.72
葡萄	0	0	2	1	3	0.52
多支	2	5	3	5	15	2.59
杂草	2	2	1	2	7	1.21
树 I	0	2	4	2	8	1.38
德国小蠊	2	7	5	11	25	4.32

2.2 SPT 阳性反应的数量分布

考虑到变应原的同源性,将变应原分为螨类、动物皮毛、蠋类、真菌、树草类分别进行统计。结果如表 2 所示,对单一类别的变应原呈阳性反应的 AR 患儿有 121 例,占有阳性例数的 26.9%,其中螨类 107 例,蠋类 6 例,霉菌 4 例,其他 4 例,见图 1。对 2 类变应原呈阳性反应的有 261 例,占到总阳性例数的 58.0%;对 3 类或 3 类以上变应原呈阳性反应的有 68 例,占到总阳性例数的 15.1%(表 2)。

表 2 过敏原皮肤点刺阳性反应的数量分布
Table 2 The analysis of positive results of SPT test

	单一类变应原	2 类变应原	3 类或 3 类以上变应原
数目/例	121	261	68
比例	26.9%	58%	15.1%

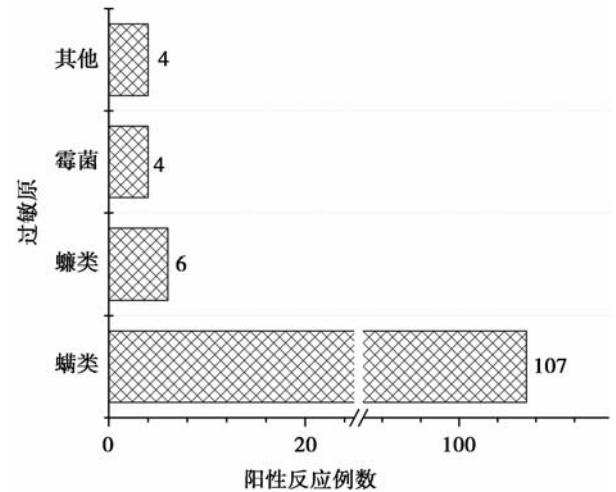


图 1 单一过敏原致皮肤点刺阳性反应的过敏原的种类分布
Figure 1 Results of SPT test with one of 11 standardized common inhaled allergens

2.3 SPT 阳性及阳性强度的年龄分布

如表 3 所示,不同年龄段 AR 患儿过敏原阳性及阳性强度具有一定差异。阳性率随年龄层的不同而有所改变,其中 $4<X\leq 7$ 岁, SPT 阳性为 64.1%; $7<X\leq 10$ 岁, SPT 阳性为 75%;值得注意的是 $10<X\leq 14$ 岁儿童, SPT 阳性率最高,为 86.5%($P<0.05$)。

3 讨论

2008 年,WHO 的规范文件 ARIA 指南明确指出儿童过敏性鼻炎的治疗体系分为:避免接触过敏

表 3 过敏原阳性率及不同阳性强度在 AR 患儿中的分布
Table 3 The rate and distribution of positive results of SPT test in children with AR

患者人群 (年龄/岁)	例数	SPT 阳性	阳性			
			++++	+++	++	+
4<X≤7	92	59 (64.1%)	47 (79.7%)	6 (10.2%)	4 (7.0%)	2 (3.1%)
7<X≤10	264	198 (75%)	125 (63.1%)	41 (20.7%)	14 (7.1%)	18 (9.1%)
10<X≤14	223	193 (86.5%)	116 (60.1%)	23 (11.9%)	23 (11.9%)	31 (16.1%)
χ ²		24.0949	3.5601			
P		<0.0001	0.7360			

原 (avoid contact with allergens)、药物治疗 (drug treatment)、特异性免疫治疗 (specific immunotherapy, SIT)、患者教育 (patient education) 等四个方面^[6]。但上述治疗方案的前提是必须首先明确过敏原,因此 SPT 是诊断 IgE 介导的变态反应性疾病的主要检测方法,对于明确鼻炎的类型及有针对性地避免接触过敏原具有重要意义^[7]。

本文中 579 例患儿针对 11 种吸入性过敏原的 SPT 结果提示,阳性率达 77.72%,且绝大多数为螨过敏,其中户尘螨、粉尘螨阳性率最高,其次依序为狗毛 > 猫毛 > 德国小蠊 > 多支 > 霉菌 II > 树 I > 交链 > 杂草 > 葡萄球菌。上述结果提示尘螨是儿童 AR 患者室内室外的主要过敏原,广州地区气候有利于尘螨的生长,且随着城市的快速发展工业、尾气和雾霾等污染问题逐渐显现,一定程度上增加了 AR 的诱因。其次,猫、狗等宠物也是不容忽视的因素,在英美等发达国家对猫毛皮屑过敏也是变态反应性疾病中最常见的一种类型^[8]。国内其他地区的研究结果也都证实螨是儿童的主要吸入过敏原,所不同的是常州地区混合真菌的阳性率居第二位 (25.8%)^[9],乌鲁木齐市食物过敏也占相当比例^[10]。

本研究发现,在 450 例过敏原皮肤试验阳性反应中,对单一的过敏原反应阳性相对较少,表现为仅 121 例 (26.9%) 患者对上述 11 种过敏原中的单独 1 种发生阳性反应;而多数为对 2 种或 2 种以上过敏原有反应,占总患者的 73.1%,其中有 261 例对 2 种过敏原反生阳性反,68 例对 3 种或 3 种以上过敏原发生阳性反应。高越等^[10]针对乌鲁木齐市 176 例 3~7 岁 AR 患儿的研究更是发现 155 例对 2 种或 2 种以上过敏原有反应。可见,过敏是一种体质,过敏患者往往对多种过敏原过敏,很少有只对一种过

敏原过敏的患者;特别是对某种螨过敏者,一般对其它种螨过敏原呈阳性反应,只是反应的程度不同,原因是不同种螨过敏原主要决定簇有相似性^[8]。

临床研究过敏性鼻炎与患者年龄的关系有许多论述,认为该类患者是由幼儿时渐增,17~18 岁达到高峰,50 岁以后减少。许小鹏等^[9]采用德国敏筛过敏原检测系统测定常州地区 AR 患儿血清中 IgE 水平及比较不同年龄组过敏原阳性率,结果提示 473 例 0~12 岁患儿过敏原阳性率 71.9%,且随年龄增长阳性率均呈升高趋势。本文结果也显示了相似的规律,年龄越小皮试阳性率越低,其中 4 < X ≤ 7 岁 SPT 阳性为 64.1%,7 < X ≤ 10 岁 SPT 阳性为 75%,而 10 < X ≤ 14 岁 SPT 阳性为 86.5%,阳性率最高。这一结果可能与细胞免疫功能的完善程度随年龄增长而增强有关。此外,儿童过敏原致敏不仅与过敏原的暴露有关,还与过敏原的暴露时间等因素有关^[11]。一项对北京地区过敏原谱分析研究结果提示,儿童过敏性鼻炎对粉尘螨和户尘螨的敏感程度明显高于成人^[12]。本研究也显示,AR 的过敏原阳性强弱与年龄具有相关性,户尘螨和粉尘螨是最主要的过敏原。因此,鉴于儿童和青少年对过敏原的敏感程度高和症状较重,应该给予恰当的治疗和足够的重视。由于本研究主要针对年龄 4~14 岁,在年龄跨度上尚有一定的局限,还需要深入研究。

综上所述,皮肤点刺试验简便、快速、痛苦小、安全性高,患儿易于接受,值得临床推广应用。本次研究表明,尘螨是广东地区儿童 AR 变应性鼻炎的首要过敏原。过敏性疾病的治疗需要患者配合医生采取控制接触过敏原,坚持用药等途径来达到理想的治疗效果。因此,明确患者的过敏原,对于 AR 的预防、诊断、治疗具有重要的临床价值。

参考文献

- [1] Li M. Current evidence of epidermal barrier dysfunction and thymic stromal lymphopoietin in the atopic march[J]. *Eur Respir Rev*, 2014, 23(133):292–298.
 - [2] Santos AF, Borrego LM, Rotiroti G, et al. The need for patient-focused therapy for children and teenagers with allergic rhinitis: a case-based review of current European practice[J]. *Clin Transl Allergy*, 2015,5(1):2.
 - [3] Stenner M, Rudack C. Diseases of the nose and paranasal sinuses in child[J]. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2014,doi:10.3205/cto000113.
 - [4] Seidman MD, Gurgel RK, Lin SY, et al. Clinical practice guideline: allergic rhinitis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015,152(1 Suppl):S1–S43.
 - [5] Aboshady OA, Elghanam KM. Sublingual immunotherapy in allergic rhinitis: efficacy, safety, adherence and guidelines[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2014, 7(4): 241–249.
 - [6] World health organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2010 revision [EB/OL]. <http://www.guideline.gov/content.aspx?id=24599>, 2010–12–23/2015–01–30.
 - [7] Carr WW, Martin B, Howard RS, et al. Comparison of test devices for skin prick testing[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005,116(2):341–346.
 - [8] 韩虹,邱前辉,陈少华,等. 变应性鼻炎吸入性变应原皮肤试验结果比较分析[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2006,14(5):283–285.
 - [9] 许小鹏,史梅,史伟峰. 常州地区过敏性鼻炎儿童吸入性过敏原分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014,35(23): 3217–3219.
 - [10] 高越,廖建军,徐佩茹. 乌鲁木齐市 3~7 岁过敏性鼻炎患儿过敏原检测分析[J]. *中国儿童保健杂志*, 2013,21(8):839–842.
 - [11] 王洁,周丽枫,陈彦球,等. 广州地区儿童变应性鼻炎患者吸入变应原谱分析 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012,26(22):1026–1029.
 - [12] 王成硕,张罗,韩德民,等. 北京地区变应性鼻炎患者吸入变应原谱分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2006,20(5):204–207.
-
- (上接第 155 页)
- [2] Zhang W, Wang S, McManus DP. *Echinococcus granulosus* genomics: a new dawn for improved diagnosis, treatment, and control of echinococcosis[J]. *Parasite*, 2014,21(66):1–5.
 - [3] 林宇光,卢明科,洪凌仙. 我国棘球绦虫及棘球蚴病研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012,28(6):616–627.
 - [4] 广剑冰,马秀敏,魏晓丽,等. 细粒棘球绦虫 eg95 基因疫苗和重组抗原诱导小鼠免疫应答的比较研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006,22(4):5.
 - [5] Benito A, Carmena D. Double-antibody sandwich elisa using biotinylated antibodies for the detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs[J]. *Acta Trop*, 2005,95(1):9–15.
 - [6] Hernandez-Gonzalez A, Muro A, Barrera I, et al. Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (uhd) and postsurgical follow-up of patients treated for uhd[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(1):147–153.
 - [7] Li J, Zhang WB, Loukas A, et al. Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage[J]. *Gene*, 2004,326,157–165.
 - [8] Wang X, Chen W, Li X, et al. Identification and molecular characterization of a novel signaling molecule 14-3-3 epsilon in *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products[J]. *Parasitol Res*, 2012,110(4):1411–1420.
 - [9] 孙敏,何深一,赵广会,等. 刚地弓形虫 14-3-3 蛋白真核表达载体的构建与表达[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012,30(6):438–441.
 - [10] Pan D, Bera AK, De S, et al. Relative expression of the 14-3-3 gene in different morphotypes of cysts of *Echinococcus granulosus* isolated from the Indian buffalo[J]. *J Helminthol*, 2010, 84(4):394–397.
 - [11] Siles-Lucas M, Merli M, Gottstein B. 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens[J]. *Exp Parasitol*, 2008,119(4):516–523.
 - [12] Meng M, He S, Zhao G, et al. Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice[J]. *Parasitol Vectors*, 2012,26(5):273.
 - [13] Luo QL, Qiao ZP, Zhou YD, et al. Application of signaling protein 14-3-3 and 26 kDa glutathione-S-transferase to serological diagnosis of schistosomiasis japonica[J]. *Acta Trop*, 2009,112(2):91–96.

Xpert MTB/RIF 技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究

王怡心¹ 陈雄豪^{2*} 林惠玲¹ 蒋英¹

[摘要] **目的** 评估结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF)在基层实验室结核病诊断中的可行性与准确性。**方法** 对 1 042 例来自区级结核病防治单位门诊初诊者的痰液样品,分别进行涂片镜检、固体培养、传统比例法药敏试验和 Xpert MTB/RIF 检测,分析比较 Xpert MTB/RIF 法和传统方法检测痰标本中的 Mtb 及其耐药性的敏感度、特异度及检测耗时。**结果** 以固体培养试验结果作为金标准,Xpert Mtb/RIF 方法检测痰标本 Mtb 的敏感度和特异度分别 93.7%(655/699)和 87.5%(300/343)。以传统比例法药敏试验结果为金标准,Xpert Mtb/RIF 方法检测利福平耐药的敏感度和特异度分别为 86.8%(79/91)和 95.3%(531/557)。Xpert MTB/RIF 系统平均检测耗时为 2 h。**结论** Xpert Mtb/RIF 检测操作简单、快速,检测敏感度高于涂片镜检法,与固体培养法有极好的一致性,同时该方法可以诊断患者是否对利福平耐药,在我国县(区)级实验室具有非常好的应用前景。

[关键词] 结核分支杆菌;利福平;Gene Xpert 检测;敏感度与特异度

Application research of Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis in the primary laboratory

WANG Yixin¹, CHEN Xionghao^{2*}, LIN Huiling¹, JIANG Ying¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Futian District Hospital for Prevention and Treatment of Chronic Diseases, Shenzhen, Guangdong, China, 518048; 2. Department of Laboratory Medicine, Futian District Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518048)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the feasibility and accuracy of Xpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis in primary laboratory. **Methods** 1 042 sputum samples from patients with clinically suspected tuberculosis from clinics in Shenzhen were collected. And the sensitivity, specificity and test time of different detection methods, including smear test, solid culture, traditional proportion method drug susceptibility test, and Xpert MTB/RIF test, in the detection rate of mycobacterium tuberculosis (MTB) and rifampicin resistance, were analyzed. **Results** Compared with the results of the solid culture test, the sensitivity and specificity of the Xpert MTB/RIF for MTB respectively were 93.7% (655/699) and 87.5% (300/343). Compared with the results of traditional proportion method drug susceptibility test, the sensitivity and specificity of the Xpert MTB/RIF for in the detection rate of rifampicin resistance respectively were 86.8%(79/91) and 95.3% (531/557), and the mean of test time of Xpert MTB/RIF was 2.1 hours (range, 1.8–2.6 hours). **Conclusion** Compared with other test methods, Xpert MTB/RIF test significantly improved the diagnostic sensitivity and specificity for MTB. Xpert MTB/RIF test can be used to detect rifampicin resistance. And Xpert MTB/RIF test will provide a specific method for the early diagnosis of tuberculosis.

[KEY WORDS] Mycobacterium tuberculosis; Rifampin; Gene Xpert test; Sensitivity and specificity

作者单位:1. 深圳市福田区慢性病防治院检验科,广东,深圳 518048

2. 深圳市福田区妇幼保健院检验科,广东,深圳 518048

*通讯作者:陈雄豪, E-mail:raky1111@163.com

在当今社会结核病仍然是一个重要的公共卫生问题,据报道世界上约有三分之一的人口感染结核杆菌,其中每年新发病人约有 900 万,死亡人数高达 300 万^[1]。随着耐多药的病例日益增多,这将造成结核病更加疯狂的流行。而在我国结核疫情十分严峻,具有感染人数多、死亡人数多、耐药人数多和传染性肺结核患病率高的特点。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)强调遏制结核病的主要方法是普及高效和以人为本的检测诊断技术,而快速检测和可靠的耐药性测试是先决条件^[2]。然而,世界的许多地区,结核病诊断仍然依赖于不敏感、缺乏标准化的抗酸杆菌染色法和耗时很长且要求标本含有存活的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*)才能培养。至于药敏试验,目前 WHO 已经推荐了常用的固体和液体培养基的一线 and 二线抗结核药物药敏试验方法所需要的药物临界浓度和临界比例^[3],但固体培养和液体培养方法分别需要 4 w 和 2 w 才能报告药敏结果。基于上述提到的现有实验室诊断方法的局限性,随着结核病实验室诊断技术的不断发展,新型的分子检测方法即结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(xpert mycobacterium tuberculosis/rifampin, Xpert MTB/RIF)已经受到广泛关注。目前 WHO 十分认可 Xpert MTB/RIF,并认为“这种检测方法可能对结核病的治疗和控制带来革命性变化,是全球结核病诊断和治疗方面的一个重要里程碑”。在经过了 18 个月的严格评估,2010 年 12 月 WHO 正式推荐使用 Xpert MTB/RIF 技术作为一种全新的结核病快速检测新方法用于结核病及利福平耐药的检测。为了评估该技术在基层实验室结核病诊断中的可行性与准确性,本研究拟对 1 042 例疑似结核患者的痰标本分别采用传统方法和 Xpert MTB/RIF 法进行检测,通过比对检测的敏感度、特异度及检测耗时评价 Xpert MTB/RIF 法在基层实验室的应用前景。

1 方法

1.1 实验对象

1 042 份痰标本来自 2012 年 10 月至 2014 年 12 月在深圳市 6 个区级慢性病防治院就诊的疑似结核病患者。

1.2 研究方法

所有标本分别进行涂片镜检、罗氏固体培养、比例法药敏试验和 Xpert MTB/RIF 检测。

1.2.1 抗酸染色

按照中国结核病防治规划《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》中要求进行操作。

1.2.2 分离培养及药敏试验

采用 4% 氢氧化钠处理法,用无菌操作的方法将标本接种于改良罗氏培养基的斜面上,37℃ 分别培养 3 d 和 7 d 后各观察 1 次。此后,每周观察 1 次生长情况并记录,培养至阳性结果出现,或 60 天后无生长判断为阴性结果。一旦培养基上出现菌落,即进行抗酸染色涂片确认是抗酸杆菌,然后进行生化实验菌种鉴定及药敏,培养阳性标本参照《结核病细菌学检验规程》^[4]。

1.2.3 Xpert MTB/RIF 检测

将标本与含氢氧化钠及异丙醇的处理液常规按 1:2 比例混合(若痰中含脓球则为 1:3),震荡,室温静置 15 min,再将混合液转移至一次性多室塑料反应盒中,置于 Gene Xpert 检测系统(美国 Cepheid 公司)进行全自动检测,约 2 h 即可在检测软件窗口直接读取结果。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对 Xpert MTB/RIF 及涂片法与固体培养法的检测结果进行一致性检验(Kappa 检验), $K < 0.4$ 为一致性差,在 0.40 ~ 0.75 之间为一致性好, $K \geq 0.75$ 为一致性极好。涂片法与 Xpert MTB/RIF 的敏感度、特异度比较及 Xpert MTB/RIF 与比例法检测利福平耐药率的比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 Xpert MTB/RIF 对痰标本 *Mtb* 的检测结果

表 1 中显示,以固体培养结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 1 042 例样本中 *Mtb* 的敏感度为 93.7%(655/699)、特异度为 87.5%(300/343),总体符合率为 91.7%;涂片法检测结果的敏感度为 84.3%(589/699)、特异度为 94.5%(324/343),总体符合率为 87.6%。对 Xpert MTB/RIF 和固体培养进行 Kappa 检验, $K = 0.811$,两者具有极好的一致性。对涂片法和固体培养进行 Kappa 检验, $K = 0.737$,两者具有好的一致性。但以固体培养结果为

金标准,涂片法与 Xpert MTB/RIF 的敏感度、特异度比较均有统计学差异 (χ^2 值分别为 31.787 与 10.213, 相对应的 P 值分别为 0.000 与 0.001),

Xpert MTB/RIF 法敏感度优于涂片法, 涂片度的特异性优于 Xpert MTB/RIF 法。

表 1 以固体培养试验为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 *Mtb* 分析
Table 1 *Mtb* analysis by Xpert MTB/RIF based on the solid culture result

实验方法	样本 总数	阳性 例数	阴性 例数	假阳性 例数	假阴性 例数	敏感度 (%)	特异度 (%)	总体符合率 (%)	K 值	P 值
固体培养法	1 042	699	343	—	—	—	—	—	—	—
Xpert MTB/RIF 法	1 042	698	344	43	44	93.7	87.5	91.7	0.811	0.019
涂片法	1 042	608	434	19	110	84.3	94.5	87.6	0.737	0.021

2.2 Xpert MTB/RIF 检测对利福平耐药分析

表 2 结果中,以比例法药敏结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 648 例利福平耐药结果的敏感度为 86.8%(79/91)、特异度为 95.3%(531/557),Xpert MTB/RIF 与比例法对利福平耐药性的检出率无统计学差异, χ^2 值为 1.178, $P=0.278>0.05$ 。

表 2 以比例法药敏试验金标准,Xpert MTB/RIF 检测对利福平耐药分析

Table 2 Rifampin resistance analysis of Xpert MTB/RIF based on the conventional drug susceptibility test result

Xpert MTB/RIF 法	比例法		合计
	敏感	耐药	
敏感	531	12	543
耐药	26	79	105
合计	557	91	648

2.3 检测时间

本次实验全部完成的时间仅用 2 h,比目前大多数的肺结核实验室诊断技术有很大的时间优势。

3 讨论

Gene Xpert 实时荧光定量核酸扩增检测技术采用的是巢式实时荧光聚合酶链反应体外诊断方法,它整合了传统 PCR 检测所需的样品的制备,核酸的提取、扩增,目标序列的检测等全部步骤。其采用了独立的一次性试剂盒,并由系统自动完成,相比传统的 PCR 方法,具有操作简便、生物安全性高、检测过程不易受干扰等优点。Xpert MTB/RIF

检测试剂盒能检测样本中的结核杆菌和与利福平耐药相关的 *rpoB* 基因,能对耐多药患者进行初筛,此外它有很高的敏感性和特异性,检验周期也非常短。正是基于上述的巨大优势,WHO 将这一检测方法纳入其工作规划的建议和指导,并且发布各国的推荐和执行手册,推荐将此新技术合并到各国的结核病防治计划,并强烈推荐此方法应作为低中收入国家对耐药性结核病和结核病/艾滋病联合感染的首选检测方法。因痰液行抗酸染色阳性率较低,且结核病痰样本结核菌数目需 $>5\ 000$ 条/mL 才能得到阳性结果^[5]。涂片法亦有其它缺点,如抗酸杆菌包括结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌,即使抗酸染色阳性亦不能说明是否为结核分枝杆菌感染。本次实验中的 Xpert MTB/RIF 法对结核杆菌检测的敏感度为 93.7%,明显优于涂片法的 84.3%,与固体培养法进行比较,两者具有极好的一致性,同时在 110 例涂片法阴性而固体培养法为阳性样品中,Xpert MTB/RIF 检测结果阳性 80 例,阴性 30 例,由此可见该方法可作为抗酸染色镜检的后续检测手段^[6-9]。

本实验在区级结核病防治机构采用临床就诊的疑似结核病患者的痰标本,通过 Xpert MTB/RIF 检测其 *Mtb* 及利福平耐药性的敏感度、特异度及检测耗时。结果显示,*Mtb* 的敏感度到达 93.7%、特异度为 87.5%,其中,敏感度与 2010 年在南美洲、非洲和亚洲多个国家级结核病实验室共同对 1 843 例患者进行 Xpert MTB/RIF 检测报道的结果 96.0% 相近,而特异度略低于国外报道的 98.6%^[10],特异度略低于国外相关报道,可能是由于我国是以传统固体培养试验作为金标准,而国

外多以敏感性较高的液体培养作为金标准^[11]的原因所导致。同时近年来国内有研究发现,针对不同的检测标本 Gene Xpert 的敏感度和特异度显示出不同的差异。李辉等^[12]提出 Xpert MTB/RIF 检测 *Mtb* 对于涂片阳性标本检测的敏感度高,对于临床诊断为肺结核标本的敏感度较低,而特异度则相反,这说明用 Xpert MTB/RIF 检测方法在检测不同标本时,敏感度与特异度之间需要需求平衡,但对于不同标本 Gene Xpert 都显示出很高的特异度。

目前,利福平耐药作为耐多药的主要参考标准,以比例法药敏试验为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 *Mtb* 对利福平耐药性检测的敏感度和特异度分别为 86.8% 和 95.3%,敏感度也略低于国外相关报道的 97.6%^[10],张治国等^[11]提出将比例法药敏试验和差异菌株测序结果联合作为金标准,其敏感度和特异度都能得到提升。耐利福平分支杆菌的耐药基因虽然多集中在 81 bp 的核心突变区,但在我国不同的地域人群中利福平耐药菌株的 *rpoB* 基因的突变频率不尽相同^[13],但 Gene Xpert 是通过检测 *rpoB* 基因片段核心突变区来诊断耐利福平结核病。有研究通过比较我国不同地域标本,结果显示 *Mtb* 对利福平耐药具有较高的敏感度和特异度以及与传统金标准药敏试验较高的一致性^[12]。这个就进一步显示出 Xpert MTB/RIF 检测方法在我国具有较强的实用性。

Xpert MTB/RIF 的检测平均耗时为 2 小时,而痰涂片要 1 天,液体培养需要半个月、固体培养要超过 1 个月才能得出结果,而对利福平的药敏检测则需要超过 2 个月的时间。这其中时间成本的差别是显而易见的。

Xpert MTB/RIF 也存在某些自身的问题及局限性,如本次实验就有 51 例无利福平耐药结果。这可能除了跟 Gene Xpert 仪器的注射器和探测信号有关,更大程度可能是与留取的标本质量有关,如标本不足 1mL、标本为唾液、标本为带有血液或食物残渣的不合格样本^[14],这些都有可能导致测试失败。其它不足之处还有:Xpert MTB/RIF 在儿童结核病诊断方面的实验结果并不乐观^[15-16];该技术不能检测异烟肼等耐药情况;对肺外标本有关的检测证据有限;试剂盒成本较高等。而且到目前为止,全球尚未发表有关该系统对结核病传播控

制的效果研究报告,而且绝大部分研究都是在参比实验室完成,缺乏在门诊或县区级实验室使用效果的详细数据^[17]。但是 Xpert MTB/RIF 作为一种快速、直接可靠、高敏感度、特异度地检测出结核病患者及是否对利福平耐药的新诊断技术,可以帮助临床医生发现越来越多的常规检测不易发现的结核病人,以及比常规方法预先发现耐多药结核病。而且目前 Gene Xpert 仪器除了用于普通结核病诊断外,已经开始用于检测白血病、肠病毒和链球菌等多种病原微生物,但是由于设备价格和使用成本比较高,短期而言要大范围推广会有一定的困难。从 2013 年起中国全球基金给全国几十家基层结核病防治机构陆续配发了 Gene Xpert 检测系统并在全国范围内举行了多期培训班,这就大大促进了 Gene Xpert 检测系统的推广和使用。WHO 建议加快 Xpert MTB/RIF 检测技术作为一种全新的结核病快速诊断新工具的使用。由于该仪器仅需要两个独立区域,这种较低的硬件设施要求使其未来可以在更多的县、区级基层实验室开展,有助于结核病患者较早的得到准确的诊断、充分的治疗和患者管理^[18]。本实验也在某种程度上再次证明该方法在我国基层实验室对于结核病诊断及利福平耐药患者的筛查方面具有一定的意义和前景。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing[R]. World Health Organization Press, 2010.
- [2] Raviglione MC. The global plan to stop TB, 2006–2015[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006,10(3):238–239.
- [3] World health organization. Policy guidance on drug susceptibility testing (DST) of second line antituberculosis drugs[G]. World Health Organization Press, 2008.
- [4] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版, 2006:17–18.
- [5] 徐大叶. 某结核病定点医院痰涂片阳性率低的调查及应对措施[J]. 医学动物防制杂志, 2014,30(10):1177–1178.
- [6] World Health Organization. Policy statement:automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF System[R]. World Health Organization Press, 2011. (下转第 192 页)

牙齿缺失对急性缺血性卒中患者预后影响的临床研究

唐爱群^{1*} 朱瑾华² 朱飞奇²

[摘要] **目的** 探讨牙齿缺失对急性缺血性卒中患者预后的影响。 **方法** 选择 2011 年 10 月至 2012 年 6 月汕头大学医学院附属粤北人民医院神经内科住院的急性期缺血性卒中患者 164 例,采集患者的人口学资料、既往病史和牙齿缺失等情况,检测血脂、血糖、同型半胱氨酸、超敏 C 反应蛋白、白细胞、纤维蛋白原、肌酐等血清学指标,入院 3 天内完成美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分,出院后每半年及研究截止时通过电话随访评定患者改良 Rankin 量表(mRS)评分。采用 *t* 检验或秩和检验比较各组变量指标,组间频率比较采用卡方检验,并行 ROC 曲线及 Logistic 回归分析。 **结果** 缺血性卒中预后不良相关因素 Logistic 单因素分析显示,年龄($OR = 1.04$, 95% CI: $1.01 \sim 1.07$, $P = 0.02$)、肌酐($OR = 1.01$, 95% CI: $1.00 \sim 1.02$, $P = 0.04$)、牙齿缺失数($OR = 1.05$, 95% CI: $1.01 \sim 1.08$, $P = 0.01$)及入院时 NIHSS 评分($OR = 1.22$, 95% CI: $1.12 \sim 1.33$, $P < 0.001$)是预后不良的危险因素。而经 Logistic 多因素分析,校正年龄及其他因素的影响后,仅 NIHSS 评分($OR = 1.24$, 95% CI: $1.11 \sim 1.40$, $P < 0.001$)和牙齿缺失数($OR = 1.07$, 95% CI: $1.02 \sim 1.12$, $P = 0.004$)与缺血性卒中预后不良相关。 **结论** 牙齿缺失数可能是与 NIHSS 评分相同,均是影响缺血性卒中预后不良的危险因素。

[关键词] 牙齿缺失;缺血性卒中;预后;改良 rankin 评分

A clinical research on tooth loss and the prognosis of acute ischemic stroke

TANG Aiqun^{1*}, ZHU Jinhua², ZHU Feiqi²

(1. Cadre Health Care Office of Health and Population-Family, Planning Bureau of Luohu, Shenzhen, Guangdong, China, 518023; 2. Department of Neurology, the Affiliated Yuebei People's Hospital, Shantou University Medical College, Shaoguan, Guangdong, China, 512026)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the result of tooth loss effect on the prognosis of acute ischemic stroke. **Methods** 164 subjects with acute ischemic stroke were recruited. After admission, the general conditions of patients and medical history were collected, as well as the number of missing teeth. The medical fasting blood tests such as lipids, blood glucose, homocysteine, high-sensitivity C-reactive protein, white blood cells, fibrinogen, and creatinine were undertaken within 24 hours. The severity of stroke evaluated with the national institute of health stroke scale (NIHSS) within three days. Modified rankin scale (mRS) was assessed in the form of telephone follow-up when half-year after discharge and at the end of the study. T test, rank sum test and the chi-square test were employed to compare the differences between groups statistically, and logistic regression analysis was employed for the risk factors screening. **Results** According to the univariate logistic regression, age ($OR = 1.04$, 95% CI: $1.01 \sim 1.07$, $P = 0.02$), creatinine ($OR = 1.01$, 95% CI: $1.00 \sim 1.02$, $P = 0.04$), number of tooth loss ($OR = 1.05$, 95% CI: $1.01 \sim 1.08$, $P = 0.01$) and NIHSS score ($OR = 1.22$, 95% CI: $1.12 \sim 1.33$, $P < 0.001$) were the risk factors of poor prognosis after stroke. In the multiple logistic regression analysis, number of tooth loss ($OR = 1.07$, 95% CI: $1.02 \sim 1.12$, $P = 0.004$) and NIHSS score ($OR = 1.24$, 95%

基金项目:深圳市科技研发资金知识创新计划基础研究项目(JCYJ20130326111250015)

作者单位:1. 广东省深圳市罗湖区干部保健委员会办公室,广东,深圳 518023

2. 汕头大学医学院附属粤北人民医院神经内科,广东,韶关 512026

*通讯作者:唐爱群, E-mail: tangaiqun@126.com

CI: 1.11 ~ 1.40, $P < 0.001$) were included. **Conclusions** Both of the number of tooth loss and NIHSS score were the risk factors of poor prognosis after stroke.

[KEY WORDS] Tooth loss; Ischemic stroke; Prognosis; Modified rankin scale

牙齿缺失和缺血性卒中均是老年人群常见疾病,牙齿缺失是慢性牙周病的最严重阶段,既往有大量的研究表明牙周病与脑血管病之间存在密切的关系^[1]。我们既往研究发现牙齿缺失是急性缺血性卒中后认知功能障碍独立的危险因素,但是牙齿缺失对急性缺血性卒中患者预后影响与否尚待研究,为此本研究为改善急性缺血性卒中预后对牙齿缺失的急性缺血性卒中患者半年后采用改良 Rankin 量表(modified rankin scale, mRS)进行评分。

1 材料和方法

1.1 入选及排除标准

选择 2011 年 10 月至 2012 年 6 月在汕头大学医学院附属粤北人民医院神经内科住院的急性期缺血性脑卒中患者,总共 164 例,最大者 89 岁,最小 27 岁,年龄中位数为 61 岁,男性 125 例(65.8%),女性 65 例(34.2%)。入选标准:(1)发病 7 天以内并配合口腔相关检查;(2)符合全国第四届脑血管疾病会议修订的脑梗塞诊断标准^[2],局灶性神经功能缺损症状/体征超过 24 h,或症状/体征未超过 24 h 但头颅 CT 或磁共振弥散加权成像可见新发梗死灶;(3)获得知情同意。排除标准:(1)头颅 CT 提示脑出血;(2)近 3 个月内有其他感染性疾病和/或使用过抗生素;(3)排除短暂性脑缺血发作、面神经麻痹、多发性硬化、颅内肿瘤、低血糖等引起的神经功能缺损;(4)病情过重无法配合检查及未获得知情同意者。

1.2 研究资料收集

设计患者调查表,详细记录每一位患者的人口学资料,包括:性别、年龄、职业、经济状况、受教育情况;既往病史及家族遗传病史如高血压病、糖尿病、高脂血症、冠心病、缺血性卒中史、短暂性脑缺血发作史、心肌梗死史、牙周病史、饮酒、心房纤颤史、家族缺血性卒中史和家族牙周病史等。根据家庭人均月收入情况分 3 组:低收入($\leq 1\,000$ 元/月)、中等收入($1\,001 \sim 3\,000$ 元/月)、高收入($> 3\,000$ 元/月)。根据受教育年限分 3 组:小学水平及

以下(≤ 6 年),初中、中专教育水平($7 \sim 9$ 年),高中、专科、大学教育水平(> 9 年)。根据 1984 年关于吸烟调查方法标准建议:每日吸烟 1 支以上,时间持续 1 年以上者为吸烟。采集患者牙齿缺失的个数、牙齿缺失原因等。入院 3 天内完成美国国立卫生研究院卒中量表(national institute of health stroke scale, NIHSS)评分,通过电话随访评定患者出院后每半年至研究截止时的 mRS 评分,随访最长者 16 个月,最短者 9 个月,平均 13.6 个月,患者 mRS 评分 0 ~ 2 分定义为预后良好、mRS 评分 3 ~ 6 分定义为预后不良。

1.3 血清学检查

入选者均于入院第二天抽取空腹前臂静脉血,由粤北人民医院检验科专业技术人员检测超敏 C 反应蛋白(hypersensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、纤维蛋白原、血白细胞计数、同型半胱氨酸、总胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、肌酐、空腹血糖、糖化血红蛋白等临床血清学指标。

1.4 统计学分析

所有的数据均使用 SPSS19.0 统计分析软件进行处理,以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。组间频率定性资料差异的比较采用卡方(χ^2)检验;计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间临床变异的差异用 t 检验、秩和检验,同时进行 Logistic 回归等相关性分析(将 $P < 0.10$ 纳入多因素回归分析主要是避免漏掉一些有用的信息,在这里并不意味着有显著性差异)。

2 结果

2.1 缺血性卒中预后不良相关因素的分析

预后不良组较预后良好组年龄大,为(68.2 ± 10.0)岁比(63.6 ± 12.3)岁($P = 0.021$);同型半胱氨酸高,为(17.4 ± 9.4) $\mu\text{mol/L}$ 比(14.7 ± 6.7) $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.047$);牙齿缺失数多,为(13.5 ± 10.4)颗比(9.0 ± 9.3)颗($P = 0.009$);NIHSS 评分高,为(7.3 ± 6.6)分比(2.8 ± 3.3)分($P < 0.001$);两组在体重超重比例方面存在差异,为 9.8%比 27.4%($P = 0.026$),见表 1。

表 1 预后不良与预后良好组间资料
Table 1 Baseline characteristics of patients with good and poor prognosis subjects

变量	预后良好	预后不良	检验值	P 值
例数	113	51		
人口学信息				
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	63.6 $\pm$ 12.3	68.2 $\pm$ 10.0	-2.33 ^a	0.021 *
男性[例(%)]	78(69.0)	31(60.8)	1.07 ^b	0.301
超重[例(%)]	31(27.4)	5(9.8)	7.28 ^b	0.026 *
既往病史				
脑梗死[例(%)]	30(26.5)	14(28.0)	0.02 ^b	0.897
糖尿病[例(%)]	19(16.8)	8(16.0)	0.00 ^b	0.994
高血压病[例(%)]	61(54.0)	31(63.3)	1.20 ^b	0.273
高脂血症[例(%)]	4(3.6)	2(4.1)		1.000
心房纤颤[例(%)]	1(0.9)	2(4.0)		0.223
吸烟[例(%)]	49(43.4)	20(40.0)	0.16 ^b	0.689
血清学指标				
HCY ($\bar{x} \pm s$, mol/L)	14.7 $\pm$ 6.7	17.4 $\pm$ 9.4	-2.00 ^a	0.047 *
空腹血糖 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	5.9 $\pm$ 1.9	6.3 $\pm$ 2.3	-0.76 ^a	0.448
糖化血红蛋白($\bar{x} \pm s$, %)	6.5 $\pm$ 1.7	6.5 $\pm$ 1.4	0.13 ^a	0.899
肌酐 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	92.1 $\pm$ 27.1	106.2 $\pm$ 48.1	-1.84 ^a	0.071
总胆固醇 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	4.6 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 1.0	0.24 ^a	0.812
甘油三酯 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	1.4 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.7	0.83 ^a	0.409
低密度脂蛋白($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	2.7 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.6	-0.04 ^a	0.972
高密度脂蛋白($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	1.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	0.71 ^a	0.476
炎症指标				
白细胞($\bar{x} \pm s$, 10 ⁹ /L)	7.9 $\pm$ 2.5	8.7 $\pm$ 2.7	-1.73 ^a	0.087
hs-CRP ($\bar{x} \pm s$, mg/L)	0.8 $\pm$ 2.0	0.9 $\pm$ 2.0	-0.34 ^a	0.738
纤维蛋白原($\bar{x} \pm s$, g/L)	3.1 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.9	-1.11 ^a	0.269
牙齿缺失数($\bar{x} \pm s$, 颗)	9.0 $\pm$ 9.3	13.5 $\pm$ 10.4	-2.65 ^a	0.009 *
NIHSS 评分($\bar{x} \pm s$, 分)	2.8 $\pm$ 3.3	7.3 $\pm$ 6.6	-4.39 ^c	< 0.001 *

^a 为 t 值, ^b 为 χ^2 值, ^c 为 Z 值, *表示 $P < 0.05$

2.2 缺血性卒中预后不良相关因素的 Logistic 回归分析

单因素分析显示,年龄(OR = 1.04, 95% CI: 1.01 ~ 1.07, $P = 0.02$)、肌酐(OR = 1.01, 95% CI: 1.00 ~ 1.02, $P = 0.04$)、牙齿缺失数(OR = 1.05, 95% CI: 1.01 ~ 1.08, $P = 0.01$)及入院 NIHSS 评分(OR = 1.22, 95% CI: 1.12 ~ 1.33, $P < 0.001$)是预后不良的危险因素,同型半胱氨酸、白细胞也与预后不良相关($P < 0.10$),见表 2。而将上述因素行多因素 Logistic 回归分析,校正年龄及其他因素的影响后,进入方程的变量只剩下 NIHSS 评分(OR = 1.24, 95% CI: 1.11 ~ 1.40, $P < 0.001$)和牙齿缺

失数(OR = 1.07, 95% CI: 1.02 ~ 1.12, $P = 0.004$),见表 3。结果提示 NIHSS 评分与牙齿缺失均是缺血性卒中预后不良的独立危险因素。

3 讨论

牙周病是指发生在牙周支持组织的各种疾病,而通常所指的牙周病是由日常生活中粘附在牙齿表面生物膜或牙菌斑上致病微生物引起的炎症性疾病,包括牙龈炎与牙周炎;细菌侵入牙龈、牙周组织引起局部炎症,机体保护性地产生体液和细胞免疫,细菌以及机体的免疫反应都会释放水解酶等物质,进而造成牙周组织的破坏^[3]。牙龈

表 2 预后不良 (mRS≥3) 相关因素 Logistic 单因素分析
Table 2 Logistic univariate analysis of risk variables with poor prognosis (mRS≥3)

变量	回归系数	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
人口学信息					
年龄 (岁)	0.04	5.16	0.023 *	1.04	1.01–1.07
男性 a	−0.36	1.07	0.302	0.70	0.35–1.39
超重 b	−0.16	6.43	0.011 *	0.85	0.75–0.96
既往史					
缺血性卒中	0.07	0.04	0.847	1.08	0.51–2.67
TIA	0.29	0.06	0.804	1.34	0.14–13.17
糖尿病	−0.00	0.00	0.994	0.99	0.42–2.34
冠心病	−0.20	0.08	0.779	0.82	0.21–3.24
高血压	0.38	0.02	0.892	1.13	0.20–2.92
高血脂	0.12	0.54	0.461	1.78	0.38–6.37
心房纤颤	1.54	1.55	0.213	4.67	0.41–52.70
吸烟	−0.14	0.16	0.689	0.87	0.44–1.71
血清学指标					
HCY (μmol/L)	0.04	3.52	0.061 *	1.04	0.99–1.09
总胆固醇 (mmol/L)	−0.04	0.06	0.811	0.96	0.68–1.35
甘油三酯 (mmol/L)	−0.19	0.67	0.412	0.82	0.52–1.31
LDL (mmol/L)	0.01	0.00	0.972	1.01	0.62–1.64
HDL (mmol/L)	0.55	0.51	0.474	1.74	0.38–7.84
肌酐 (mmol/L)	0.01	4.14	0.042 *	1.01	1.00–1.02
空腹血糖 (mmol/L)	0.07	0.58	0.448	1.08	0.89–1.32
糖化血红蛋白 (%)	−0.02	0.02	0.898	0.98	0.77–1.26
炎症指标					
白细胞 (10 ⁹ /L)	0.11	2.75	0.097 *	1.12	0.98–1.28
hs-CRP (mg/L)	0.03	0.11	0.737	1.03	0.87–1.21
纤维蛋白原 (g/L)	0.19	1.14	0.286	1.20	0.86–1.69
其他项目					
牙齿缺失数	0.05	6.55	0.010 *	1.05	1.01–1.08
NIHSS 评分	0.20	20.22	< 0.001 *	1.22	1.12–1.33

a与女性相比; b 男性 BMI≥25, 女性 BMI≥24; *表示 P < 0.10

表 3 预后不良 (mRS≥3) 相关因素 Logistic 多因素分析
Table 3 Logistic multivariate analysis of risk variables with poor prognosis (mRS≥3)

变量	回归系数	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
NIHSS 评分	0.21	13.80	< 0.001	1.24	1.11–1.40
牙齿缺失数	0.07	8.19	0.004	1.07	1.02–1.12

炎只发生在牙龈组织,是最轻度的牙周病;牙周炎可进一步累及牙龈、牙周膜、牙槽骨和牙骨质等牙周支持组织,造成牙周袋形成、牙槽骨吸收、牙齿松动、移位、咀嚼无力,严重者全口牙齿脱落,为牙

周病的最严重阶段^[3]。因此牙齿缺失数是反应牙周病严重程度的重要指标。
本研究中,我们发现预后不良组较预后良好组年龄大(P = 0.021)、同型半胱氨酸含量高(P =

0.047)、牙齿缺失数多($P = 0.009$)及 NIHSS 评分高($P < 0.001$), 两组还在体重超重比例方面有差异, 提示上述因素都是急性缺血性卒中预后不良的潜在因素。但是行多因素分析后发现只有 NIHSS 评分及牙齿缺失数跟急性缺血性卒中预后有关。

NIHSS 评分被许多研究证实对缺血性卒中的预后影响最大。加拿大卡尔加里卒中研究项目^[4]共纳入 274 988 名患者, 运用 Logistic 回归模型分析脑卒中院内病死率的影响因素, 发现 NIHSS 评分对预后的模型的贡献最大, 是死亡的最强预测因子。NIHSS 评分越高, 表示损害越严重, 预后越差。本研究不是以死亡作为终点指标, 而是以 mRS 评分 3 ~ 6 分作为预后不良, 同样得出 NIHSS 评分是缺血性卒中预后不良的最强预测因子。

牙齿缺失是本研究发现的另一个与缺血性卒中预后不良相关的因素。Slowik 等^[5]对 169 例首发缺血性卒中病人的研究发现, 牙周健康者和轻度牙周炎患者相比, 重度牙周炎或无牙患者的入院时的神经功能缺失显著加重, 表明牙周病与缺血性卒中后神经功能有关。

牙齿缺失导致缺血性卒中预后不良的可能机制有以下两种。其一, 牙齿缺失可能是通过炎症机制影响缺血性卒中的预后。成人牙齿缺失多由牙周炎引起^[3]; 牙周炎可通过细菌感染、促进炎症因子(如 hs-CRP)释放、激活补体系统等炎症方式影响缺血性卒中的预后, 还可通过影响高血压等进而加重缺血性卒中的神经功能缺失^[1]。研究中大部分患者牙齿缺失均由牙周炎所致, 缺牙多的 hs-CRP 等炎症指标水平更高, 炎症指标可能通过以下途径影响缺血性卒中的预后^[6-7]: 一是增加脑小血管疾病的风险; 二是通过激活经典补体系统, 造成神经元损伤; 三是通过造成血管动脉粥样硬化进而造成脑血管损害; 通过以上 3 种途径造成缺血性卒中近期预后不良。但是, 本研究未发现炎症指标是缺血性卒中近期预后不良的危险因素, 未能提供证据表明牙齿缺失通过炎症途径影响缺血性卒中的预后, 有待进一步的研究来证实这种假设。其二, 牙齿缺失还可能通过减少咀嚼功能来导致缺血性卒中预后不良的发生。有研究表明^[8-9], 正常的咀嚼活动使牙根部的机械感受器产生感官刺激传入大脑并保持大脑神经元的活动; 而牙齿缺失后, 这种咀嚼引起的感官刺激就被中断了。

在鼠中的研究显示, 因牙齿缺失导致的咀嚼刺激减少可导致空间记忆障碍, 加快海马神经元的退化^[10]。本研究发现牙齿缺失是缺血性卒中预后不良的危险因素, 可能是通过减少咀嚼功能产生的感官刺激而加快了大脑神经元的退化, 从而影响缺血性卒中后神经功能的康复。

本研究表明, 牙齿缺失为判断急性缺血性卒中预后不良指标之一, 可为临床早期发现急性缺血性卒中提供帮助。

参考文献

- [1] 朱瑾华, 陈略, 朱飞奇. 牙周病与缺血性卒中[J]. 国际脑血管病杂志, 2012, 20(011):849-853.
- [2] 中华医学会第四届全国脑血管病学术会议. 各类脑血管病诊断要点[J]. 中华神经内科学杂志, 1996, 29(6):379.
- [3] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases [J]. The Lancet, 2005, 366(9499):1809-1820.
- [4] Smith EE, Shobha N, Dai D, et al. Risk score for in-hospital ischemic stroke mortality derived and validated within the get with the guidelines-stroke program clinical perspective[J]. Circulation, 2010, 122(15):1496-1504.
- [5] Slowik J, Wnuk MA, Grzech K, et al. Periodontitis affects neurological deficit in acute stroke[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2010, 297(1-2):82-84.
- [6] Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? [J]. Circulation, 2012, 125:2520-2544.
- [7] Fentoglu O, Koroglu BK, Kara Y, et al. Serum lipoprotein-associated phospholipase A(2) and C-reactive protein levels in association with periodontal disease and hyperlipidemia[J]. J Periodontol, 2011, 82(3):350-359.
- [8] Kubota K, Nagae K, Shibani S, et al. Degenerative changes of primary neurons following tooth extraction [J]. Anatomischer Anzeiger, 1987, 166(1-5):133-139.
- [9] Jacobs R, Van SD. From osseoperception to implant-mediated sensory-motor interactions and related clinical implications[J]. Journal of oral rehabilitation, 2006, 33(4):282-292.
- [10] Kubo KY, Yamada Y, Iinuma M, et al. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice[J]. Neuroscience Letters, 2007, 414(2):188-191.

• 论 著 •

曼氏迭宫绦虫 annexinB8 的生物信息学分析和基因克隆

梁培¹ 吕刚¹ 周晓君² 陈新新¹ 陈小静¹ 符瑞佳^{1*}

[摘要] **目的** 通过生物信息学预测曼氏迭宫绦虫 annexinB8 (*SmannexinB8*) 的生物学特征,及潜在功能和结构,并且进行基因克隆,为下一步 *SmannexinB8* 参与宿主免疫调节研究提供依据。 **方法** 通过 NCBI 的 ORF finder 工具对 *SmannexinB8* 的开放阅读框进行分析,利用 ExPASy 网站进行蛋白的物理化学参数、信号肽、跨膜螺旋、潜在分子生物学功能的预测,通过 NCBI/BLAST 对蛋白保守功能域进行检测。不同物种的 annexin 序列从 NCBI 网站获取,并利用 Vector NTI suit 8.0 和 TreeView 软件进行分析。利用 SWISS-MODEL 网站和 SPDBV 4.10 软件分析 *SmannexinB8* 蛋白的三维空间结构。此外,对 *SmannexinB8* 基因进行扩增,并克隆到原核表达载体 pET-28a(+). **结果** *SmannexinB8* 是一个全长基因,编码 347 个氨基酸。蛋白由 4 个典型的 annexin 重复结构域组成,序列当中没有信号肽,是一个稳定的可溶性蛋白分子。三维空间立体结构分析结果显示 *SmannexinB8* 是一个保守的蛋白。*SmannexinB8* 与多房棘球绦虫、口膜壳绦虫、细粒棘球绦虫、华支睾吸虫以及人类的 annexin 基因的同源性分别是 68%, 67%, 65%, 46% 和 40%。分子进化分析显示 *SmannexinB8* 与绦虫属的亲源性最近,而与其他物种,如吸虫、哺乳动物亲源性较远。 **结论** *SmannexinB8* 可能具有抑制磷脂酶 A2 的活性,促进细胞融合、参与调节免疫反应和离子通道形成的功能,可能在参与宿主免疫调节中起到关键性的作用。

[关键词] 曼氏迭宫绦虫; annexin B8; 生物信息学分析; 多功能

Sequence bioinformatics analysis and gene cloning of annexinB8 from *Spirometra mansoni*

LIANG Pei¹, LV Gang¹, ZHOU Xiaojun², CHEN Xinxin¹, CHEN Xiaojing¹, FU Ruijia^{1*}

(1. Department of Pathogen Biology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China, 571199; 2. Clinical Laboratory, Hainan Province People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570311)

[ABSTRACT] **Objective** To provide information and solid materials for further research on annexinB8 of *Spirometra mansoni* (*SmannexinB8*) which may participate in mediating host immune response. **Methods** The open reading frame of *SmannexinB8* was found with ORF finder tool in NCBI website. ExPASy website was used to predict the physical and chemical parameters of protein, signal peptide, transmembrane helices and potential molecular and biological functions. The conserved domains of the protein were detected by NCBI/BLAST Home. In order to analyze the homology and phylogenetic tree, sequences of annexins from various species were obtained from NCBI website, and the results were analyzed by Vector NTI suit 8.0 and TreeView software. The three-dimensional structure of *SmannexinB8* was predicted by SWISS-MODEL and was analyzed by SPDBV 4.10. Moreover, the gene was amplified and cloned into a prokaryotic expression vector pET-28a (+). **Results** *SmannexinB8* was full-length gene and encoded 347 amino acid residues. The protein was composed of four annexin repeats without signal peptide and a stably soluble molecule. It

基金项目:国家自然科学基金课题(81260254);海南省自然科学基金课题(814289)

作者单位:1. 海南医学院病原生物学教研室,海南,海口 571199

2. 海南省人民医院检验科,海南,海口 570311

*通讯作者:符瑞佳, E-mail: 18171809@qq.com

was a conservative annexin in three-dimensional structure. *SmannexinB8* was homologous to annexins from *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma*, *Echinococcus granulosus*, *Clonorchis sinensis* and *Homo sapiens* with 68%, 67%, 65%, 46% and 40% identities, respectively. *SmannexinB8* clustered with the annexins from the *tapeworm genus*, but not with other species like *trematode* and mammal animals. **Conclusions** *SmannexinB8* might have a multitude of functions: inhibition of phospholipase A2, promoting fusion, mediating immune response and formation of ion channel. *SmannexinB8* might play a critical role in the host immune response.

[KEY WORDS] *Spirometra mansoni*; AnnexinB8; Bioinformatics analysis; Multi-functions

曼氏迭宫绦虫是迭宫绦虫属之一,其主要分布在中国、日本、韩国和泰国^[1]。裂头蚴是曼氏迭宫绦虫的幼虫,能够导致严重的人兽共患寄生虫病和威胁公共健康。在中国,超过 1 000 人感染了裂头蚴,他们分别来自 27 个省、自治区和直辖市^[2]。曼氏迭宫绦虫的终宿主是肉食哺乳动物,包括狗和猫,第一中间宿主是绕足动物,第二中间宿主是脊椎动物,如爬行动物、鸟类和哺乳动物^[3]。尽管有关于人感染曼氏迭宫绦虫成虫的报道,但是人通常作为第二中间宿主^[4]。人感染裂头蚴主要是通过喝了含有裂头蚴感染剑水蚤的生水或是食用感染有裂头蚴的生青蛙肉或蛇肉。另外一个不可忽视的感染途径是将含有裂头蚴的生青蛙肉或是蛇肉用于治疗皮肤溃疡或是眼部炎症^[5,6]。裂头蚴进入人体之后,能够寄生在各种组织,例如眼睛、皮下组织、内脏器官和脑部。裂头蚴感染能够导致严重的眼部疾病、组织损伤和脑部功能紊乱。

annexin 是依赖钙离子的磷脂结合蛋白,具有多种生物学功能,25 年前就已被发现,第一个被分离和纯化是人 annexinA7^[7]。annexin 分为 A 家族(在脊椎动物中)、B 家族(无脊椎动物)、C 家族(在真菌类和一些单细胞真核生物)、D 类家族(在植物中)和家族 E(在原生生物中)^[8]。annexin 独特的核心区域是 4 个相似的重叠结构域,每个重叠结构域由约 70 个氨基酸组成,并且含有一个结合钙离子特征性的“type II”或“type III”结构。annexin 能够与各种参与细胞的结构组成、细胞信号转导和控制生长的细胞膜成分相互作用。annexin 还能够作为非典型的钙离子通道。许多研究显示 annexin 在寄生虫中参与了寄生虫与宿主之间的相互作用,并参与宿主的免疫调节^[9]。猪带绦虫囊尾蚴的 annexinB1 被证实在体外能够抑制磷脂酶 A2 的活性,并且是 annexins 中的一个分泌成分^[10]。在

华支睾吸虫中,annexinB30 被证实是华支睾吸虫的分泌排泄抗原成分之一,能够在钙离子存在的情况下结合磷脂和人纤溶酶原^[11]。牛裂体吸虫的 annexin 在体外具有溶解纤维蛋白和抗凝的特性,可能对寄生虫在血液中存活发挥重要作用^[12]。曼氏裂体吸虫的 annexin 2 被认为是一个潜在的疫苗候选分子^[13]。在麝猫后睾吸虫中,annexin 定位在寄生虫的体表,并且可能在免疫反应调节中发挥了作用^[14]。

在本次研究中,我们鉴定了来源于曼氏迭宫绦虫的 *SmannexinB8* 基因,并且进行了关于潜在生物化学特性的生物信息学分析。我们的结果表明 *SmannexinB8* 可能是一个分泌蛋白,能够抑制磷脂酶 A2 的活性,在寄生虫和宿主相互作用中发挥了非常重要的作用。

1 材料与方法

1.1 *SmannexinB8* 核酸序列分析

从狗肠中分离的成虫用来构建曼氏迭宫绦虫的 cDNA 文库,得到的 EST 标签由上海联众基因科技研究院完成测序,编码 *SmannexinB8* 的 cDNA 序列从该文库调取,其开放阅读框是通过利用(<http://www.expasy.org/>)中的 ORF finder tool 进行查找。

1.2 *SmannexinB8* 氨基酸序列分析

SmannexinB8 蛋白的物理化学参数是通过 ExPASy ProtParam 获取。并利用 ExPASy 网站进行该蛋白的信号肽和跨膜螺旋的预测。*SmannexinB8* 的保守功能域是通过 NCBI/BLAST Home 进行检测。利用 ExPASy PredictProtein 进行 *SmannexinB8* 分子功能和生物学过程本体分析,预测该蛋白具有的潜在分子生物学功能。

1.3 同源性和分子进化树分析

为了进行同源性和分子进化树分析,我们通

过 NCBI 中获取了不同物种的 annexin 序列,利用生物信息学分析软件 Vector NTI suit 8.0 和 TreeView 进行结果分析。

1.4 *SmannexinB8* 结构模型构建

SmannexinB8 三维空间是利用编码蛋白的氨基酸通过 SWISS-MODEL 进行预测和 SPDBV 4.10 进行结果分析。

1.5 *SmannexinB8* 基因克隆

SmannexinB8 的开放阅读框以曼氏迭宫绦虫文库中的 cDNA 作为模板利用 PCR 的方法进行扩增,特异性的 PCR 引物是通过 Primer Premier 5.0 and PCRDESIGN 软件进行设计的,上游和下游引物分别是 5'- TAAGAGCTCATGCTGCGTTACAG

TCG-3'; 5'-TTCTCGAGTTAGCACCCAATTAGG GC-3'。扩增的反应条件如下:94 ℃变性 45 s, 55 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 1 min,共 35 循环,72 ℃稳定 10 min。PCR 产物纯化后,利用相同的限制性内切酶进行酶切并与预先酶切好的原核表达载体 pET-28a(+)进行连接。重组的质粒通过 DNA 测序验证,然后转入到大肠埃希菌 DH5α 中。

2 结果

2.1 核酸序列分析

ORF finder 结果显示 *SmannexinB8* 核酸序列是全长序列,由 1 044 个碱基对组成,见图 1。



图 1 曼氏迭宫绦虫 *SmannexinB8* 的开放阅读框

Figure 1 The open reading frame of *SmannexinB8*

2.2 编码氨基酸的特征

SmannexinB8 蛋白由 347 个氨基酸组成,如图 2 所示。氨基酸组成部分主要为 Leu, Ala, Glu 和 Asp,分别占了 12.4%, 10.4%, 8.9% and 7.5%。预测该蛋白的理论分子量是 38.7 kDa, 理论 pI 值是 4.95。该蛋白在哺乳动物中的半衰期是 30 h,在酵母和大肠埃希杆菌中体内表达的半衰期分别大于 20 h 和 10 h。该蛋白是一个稳定的蛋白,其不稳定系数是 31.15。预测的 C 值、S 值和 Y 值都低于 0.5,这提示了该蛋白没有信号肽,如图 3A 所示。跨膜螺旋分析结果显示了该蛋白不是一个跨膜蛋白,可能是一个可溶性的蛋白分子,如图 3B 所示。

2.3 同源性和进化树分析

通过 annexin 的多序列比对,结果如图 4 显示,*SmannexinB8* 编码氨基酸序列与多房棘球绦虫、口膜壳绦虫、细粒棘球绦虫、华支睾吸虫和人

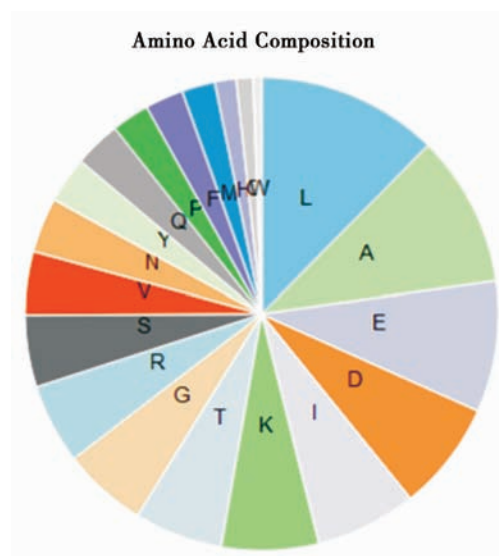
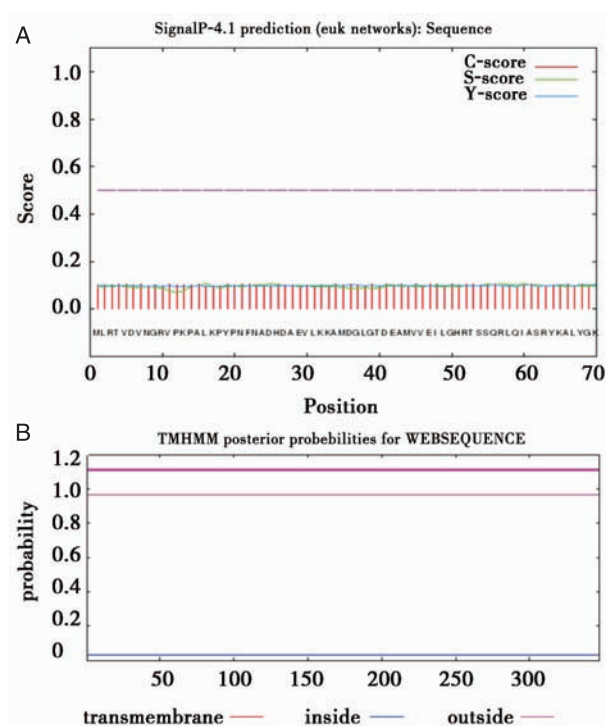


图 2 曼氏迭宫绦虫 *SmannexinB8* 的氨基酸组成

Figure 2 Amino acid composition of *SmannexinB8*



A. 曼氏迭宫绦虫 *Smannexin B8* 信号肽分析;

B. 曼氏迭宫绦虫 *Smannexin B8* 跨膜螺旋分析

图 3 曼氏迭宫绦虫 *Smannexin B8* 的功能区域分析

Figure 3 Analysis of *Smannexin B8* functional domains

的 annexin 基因的同源性分别是 68%, 67%, 65%, 46% and 40%。该蛋白是由 4 个 annexin 重复结构域组成, 同源功能域包含了一个特殊的 type III (“GxGTDE”结构) 钙离子结合位点, 这个结构能够增强钙离子和磷脂之间的亲和力。此外, K/H/RGD 结构分别在重复结构域 II 和 III 中。IRI 结构与人、猪带绦虫和粪类圆线虫中的重复结构域 IV 相互识别, IRI 结构具有肌动蛋白结合功能, 而在 *SmannexinB8* 中编码氨基酸发生了变化。

SmannexinB8 的分子进化树结果显示 *SmannexinB8* 与绦虫属 (多房棘球绦虫和口膜壳绦虫) 亲源性更近, 而与其他例如吸虫属和哺乳动物亲源性较远, 见图 5。

2.4 *SmannexinB8* 结构模型

SmannexinB8 的保守功能区由 4 个 annexin 重复结构域组成 (图 6A)。该结构域的组成分别是 26 (aa)-88 (aa)、100 (aa)-171 (aa)、204 (aa)-268 (aa) 和 280 (aa)-344 (aa)。通过 SWISS-MODEL 对 *SmannexinB8* 的三维空间结构进行预测, 如图 6B

所示。其中, 4 个结构域分别由 4 种不同原子方式显示出来。

2.5 分子功能和生物过程的本体论分析

分子功能分析显示 *SmannexinB8* 能够与钙离子依赖性磷脂、钙离子、磷脂酰丝氨酸和真核细胞表面等相结合, 该蛋白还具有结构分子活性和抑制磷脂酶 A2 的功能。同时, *SmannexinB8* 在抗凋亡、细胞形状调节、细胞增殖、信号转导、细胞内钙离子平衡、细胞之间黏附和炎症反应的生物过程中都发挥重要的作用。

2.6 *SmannexinB8* 基因的分子克隆

SmannexinB8 全长基因经特异性引物进行 PCR 扩增后得到, 然后克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 中, 重组质粒通过 DNA 测序和限制性内切酶 *SacI* 和 *XhoI* 酶切鉴定证实, 双酶切得到的条带分别与 PCR 产物和 pET-28a(+) 质粒的条带相一致 (图 7)。

3 讨论

annexin 是一个存在多种真核细胞中并参与钙离子和膜结合蛋白表达的家族^[15]。该家族成员具有各种功能, 如参与细胞的活动、钙离子信号转导和生长调节。在本实验研究中, *SmannexinB8* 是第一次被鉴别和进行生物信息学分析。*SmannexinB8* 的结构和潜在功能特征也进行了描述。在我们实验研究中, *SmannexinB8* 的全长序列从曼氏迭宫绦虫的成虫 cDNA 文库中分离得到 (图 1), 由 347 氨基酸组成。虽然 annexins 是胞内蛋白, 不仅能定位在细胞质中, 也能与细胞膜和细胞骨架蛋白结合^[16]。尽管 *SmannexinB8* 缺乏分泌信号肽且不属于膜蛋白, 但是许多研究证实该蛋白存在于细胞外^[17-20]。在猪带绦虫中, annexinB1 通过蛋白印迹分析在囊尾蚴的囊液中和囊尾蚴感染的猪血清中检测到^[10]。这结果提示 annexinB1 属于 annexin 家族中的分泌蛋白。annexinB30 也分别通过 LC-MS/MS^[21] 和蛋白印迹实验证实是华支睾吸虫的分泌排泄抗原之一^[11]。另外, 进化树分析结果显示, *SmannexinB8* 与多房棘球绦虫和华支睾吸虫亲源性也较近。综合以上结果, *SmannexinB8* 可能是曼氏迭宫绦虫分泌排泄抗原成分之一。虫体释放的分泌排泄抗原能够导致病理变化和参与逃避宿主免疫清除和寄生虫吸收营养^[22-23]。因此, *SmannexinB8* 可能在寄生

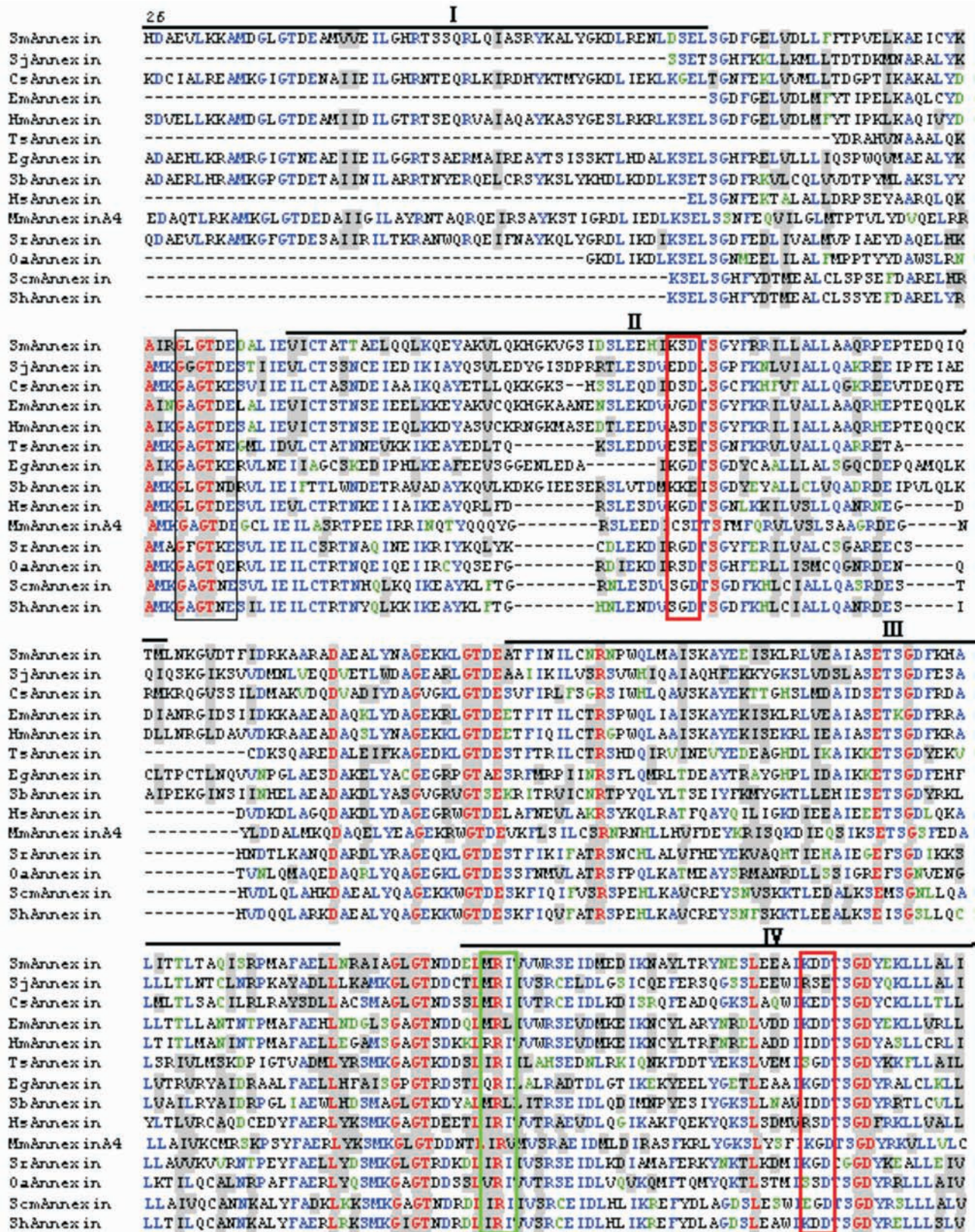


图 4 曼氏迭宫绦虫 annexinB8 与其他物种 annexin 的序列比对

Figure 4 Alignment of *SmannexinB8* amino acid sequence with annexin from other species

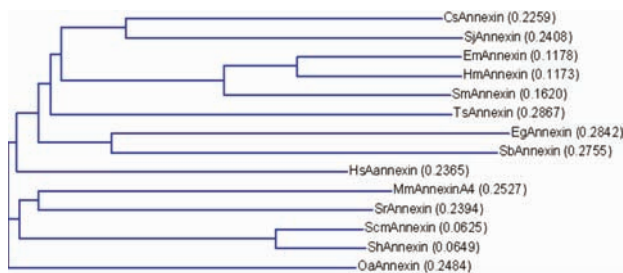
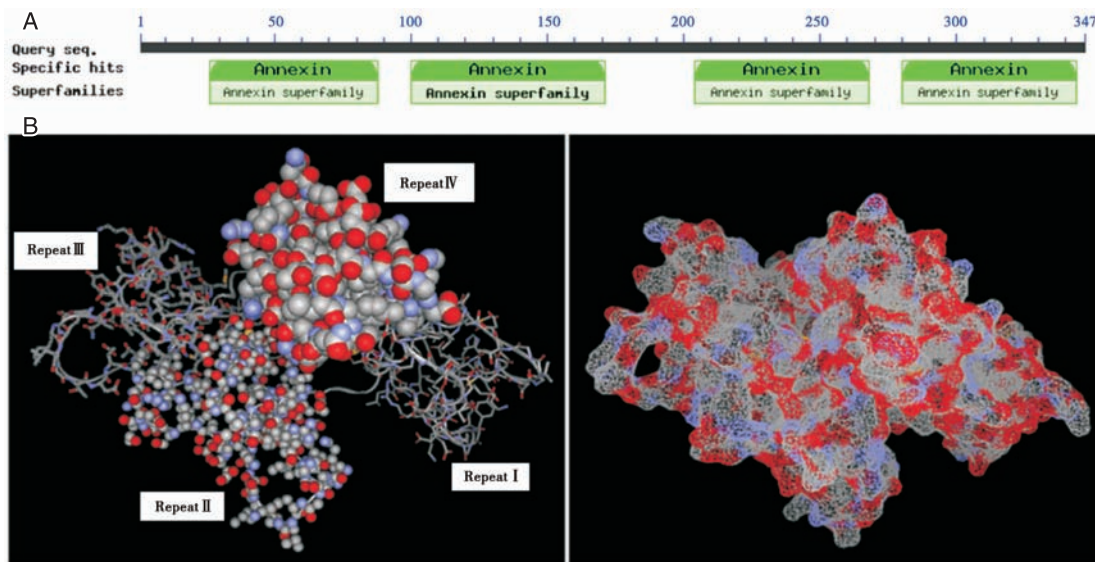


图 5 细粒棘球绦虫 annexinB8 的分子进化树

Figure 5 Molecular evolution tree of the SmannexinB8

虫存活和寄生虫与宿主相互作用中是一个至关重要的分子。

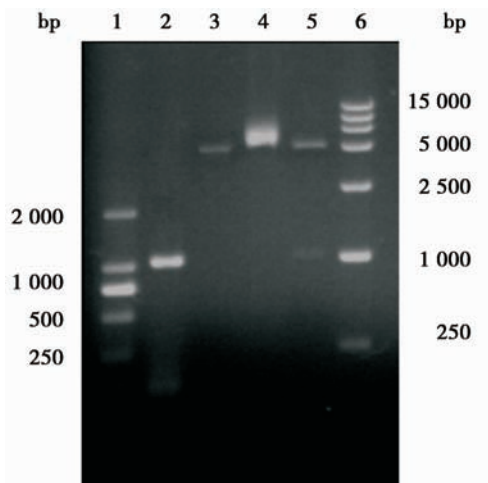
annexin 多序列比对结果显示 SmannexinB8 的编码氨基酸序列与人 annexin 序列相似性只有 40%。由于 SmannexinB8 与人 annexin 的同源性相对较低,所以 SmannexinB8 有望成为控制人类裂头蚴病的有价值的疫苗开发靶点。该蛋白同源功能域中含有“GxGTDE”结构,说明 SmannexinB8 拥有特征性的 type III 的钙离子结合位点。该位点能够



A. 曼氏迭宫绦虫 annexinB8 的保守功能域; B. Swiss-model 分析曼氏迭宫绦虫 annexinB8 的三维结构

图 6 曼氏迭宫绦虫 annexinB8 典型的 4 个重复序列分析

Figure 6 Analysis of 4 repeats of SmannexinB8



1-6 泳道分别是 DL2000 marker、PCR 产物、pET-28a 空载质粒、重组质粒、重组质粒双酶切鉴定和 DL15000 marker

图 7 SmannexinB8 基因的原核表达载体构建

Figure 7 Cloning of gene encoding Smannexin B8

使其与钙离子和磷脂高亲和力结合^[8,16]。由于结合钙离子的 KGD 结构位于 repeat II 和 repeat III 之间,SmannexinB8 可能拥有在钙离子存在时结合磷脂的特性。此外,KGD 结构在膜相互作用和受体靶标中的作用阐明了 annexin 的功能^[24]。然而,与人 annexin 相比,IRI 肌动蛋白结合结构被其他氨基酸代替。有些 annexin 在体外直接与聚合肌动蛋白相互作用,从而参与调节、稳定和介导细胞膜肌动蛋白^[25]。事实上,也有报道提示了 IRI 结构存在与否都不影响 annexin 结合肌动蛋白^[26]。此外,该蛋白的保守功能域和它的三维空间结构分析显示 SmannexinB8 保持它的结构完整性。生物过程和分子功能本体论分析提示 SmannexinB8 参与多种重要生物功能,例如钙离子依赖的磷脂相互作用、抗凋亡、细胞增生和炎症调节。SmannexinB8 还参与

细胞内钙离子平衡和抑制磷脂酶 A2 的活性,磷脂酶 A2 是脂质炎症调节中的限速步骤。而控制磷脂酶 A2 的活性是调节炎症过程的重要环节^[27]。在猪带绦虫研究中发现,annexinB1 通过抑制哺乳动物的磷脂酶 A2 来下调宿主的炎症反应^[10]。此外,还有研究报道 annexin 也可能是通过释放 IL-10 介导炎症反应^[28]。这些都提示了 *SmannexinB8* 可能通过抑制磷脂酶 A2 活性和介导 IL-10 释放来参与免疫反应。在生物学过程的本体论分析中,*SmannexinB8* 在抗凋亡中发挥重要作用。凋亡是生理细胞死亡的过程,在这个过程当中,细胞可以在没有诱发免疫反应的情况下,从体内清除^[27]。McKanna 的研究发现在经历凋亡的乳腺导管的肺泡细胞中,annexin1 的表达中显著增加^[29]。许多的研究也证实了在一些细胞中,annexin1 可能通过发挥钙离子流的作用来参与调节细胞的凋亡^[30]。此外,*SmannexinB8* 的理论分子量和 pI 值分别是 38.7 kDa 和 4.95。该蛋白是属于稳定的蛋白,并且原核表达质粒已经构建成功。这些实验结果为进一步的实验研究奠定了扎实的基础。

参考文献

- [1] Anantaphruti MT, Nawa Y, Vanvanitchai Y. Human sparganosis in Thailand: an overview[J]. Acta Trop, 2011,118(3):171-176.
- [2] Cui J, Li N, Wang ZQ, et al. Serodiagnosis of experimental sparganum infections of mice and human sparganosis by ELISA using ES antigens of *Spirometra mansoni* spargana[J]. Parasitol Res, 2011,108(6):1551-1556.
- [3] Hong ST, Kim KJ, Huh S, et al. The changes of histopathology and serum anti-sparganum IgG in experimental sparganosis of mice[J]. Kisaengchunghak Chapchi, 1989,27(4):261-269.
- [4] Lee SH, Chai JY, Seo BS, et al. Two cases of human infection by adult of *Spirometra erinacei*[J]. Kisaengchunghak Chapchi, 1984,22(1):66-71.
- [5] Fukushima T, Yamane Y. How does the sparganosis occur?[J]. Parasitol Today, 1999,15(3):124.
- [6] Magnino S, Colin P, Dei-Cas E, et al. Biological risks associated with consumption of reptile products[J]. Int J Food Microbiol, 2009,134(3):163-175.
- [7] Creutz CE, Pazoles CJ, Pollard HB. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules[J]. J Biol Chem, 1978,253(8):2858-2866.
- [8] Moss SE, Morgan RO. The annexins[J]. Genome Biol, 2004,5(4):219.
- [9] Hofmann A, Osman A, Leow CY, et al. Parasite annexins—new molecules with potential for drug and vaccine development[J]. Bioessays, 2010,32(11):967-976.
- [10] Gao YJ, Yan HL, Ding FX, et al. Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction[J]. Acta Trop, 2007,101(3):192-199.
- [11] He L, Ren M, Chen X, et al. Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products[J]. Parasitol Res, 2014,113(7):2743-2755.
- [12] Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Siles-Lucas M, et al. Molecular and functional characterization of a *Schistosoma bovis* annexin: fibrinolytic and anticoagulant activity[J]. Vet Parasitol, 2012,184(1):25-36.
- [13] Tararam CA, Farias LP, Wilson RA, et al. *Schistosoma mansoni* Annexin 2: molecular characterization and immunolocalization[J]. Exp Parasitol, 2010,126(2):146-155.
- [14] Yonglitthipagon P, Pairojkul C, Chamgramol Y, et al. Up-regulation of annexin A2 in cholangiocarcinoma caused by *Opisthorchis viverrini* and its implication as a prognostic marker[J]. Int J Parasitol, 2010,40(10):1203-1212.
- [15] Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,322(4):1166-1170.
- [16] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function[J]. Physiol Rev, 2002,82(2):331-371.
- [17] Rocha V, Lozano JJ, Haindl AH. Evidence for differential localization of annexin VI during mammary secretory differentiation[J]. Biochem Soc Trans, 1990,18(6):1110-1113.
- [18] Hajjar KA, Guevara CA, Lev E, et al. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2[J]. J Biol Chem, 1996,271(35):21652-21659.
- [19] Donnelly SR, Moss SE. Annexins in the secretory pathway[J]. Cell Mol Life Sci, 1997,53(6):533-538.
- [20] Vergnolle N, Pagès P, Guimbaud R, et al. Annexin 1 is secreted in situ during ulcerative colitis in humans[J]. Inflamm Bowel Dis, 2004,10(5):584-592.

- [21] Zheng M, Hu K, Liu W, et al. Proteomic analysis of excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization and serological reactivity of a excretory-secretory antigen-fructose-1,6-bisphosphatase[J]. *Parasitol Res*, 2011,109(3):737–744.
- [22] Liang P, Sun J, Huang Y, et al. Biochemical characterization and functional analysis of fructose-1,6-bisphosphatase from *Clonorchis sinensis*[J]. *Mol Biol Rep*, 2013,40(7):4371–4382.
- [23] Devito francesco G, Granati A, Sperduto B. Danger from the smoke during manufacturing of silicon-iron[J]. *Med Lav*, 1971,62(4):181–184.
- [24] Morgan RO, Martin-Almedina S, Iglesias JM, et al. Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004,1742(1–3):133–140.
- [25] Babiychuk VS, Draeger A, Babiychuk EB. Smooth muscle actomyosin promotes Ca^{2+} -dependent interactions between annexin VI and detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains [J]. *Acta Biochim Pol*, 2000,47(3):579–589.
- [26] Konopka-Postupolska D. Annexins: putative linkers in dynamic membrane-cytoskeleton interactions in plant cells[J]. *Protoplasma*, 2007,230(3–4):203–215.
- [27] Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein[J]. *Inflamm Res*, 2004,53(4):125–132.
- [28] Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2003,3(10–11):1363–1369.
- [29] McKanna JA. Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression[J]. *Anat Rec*, 1995,242(1):1–10.
- [30] Wang HG, Pathan N, Ethell IM, et al. Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD [J]. *Science*, 1999,284(5412):339–343.

(上接第 179 页)

- [7] World Health Organization. Road for rolling out Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of TB and MDR-TB[R]. World Health Organization Press, 2010.
- [8] Abu-Raddad LJ, Sabatelli L, Achterberg JT, et al. Epidemiological benefits of more effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009,106(33):13980–13985.
- [9] World Health Organization. Tuberculosis diagnostics automated DNA test. WHO endorsement and recommendations[R]. World Health Organization Press, 2010.
- [10] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. *N Engl J Med*, 2010,263(9):1005–1015.
- [11] 张治国,欧喜超,孙倩,等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术检测痰标本中结核分枝杆菌及其耐药性的研究[J]. *中国防痨杂志*, 2013, 35(1):13–16.
- [12] 李辉,谭耀驹,李洪敏,等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术的诊断效果的对比研究[J]. *中国防痨杂志*, 2014,36(6):472–476.
- [13] 李辉,马晓光,石洁,等. 线性探针法 MtbDRplus 用于涂阳肺结核的耐多药检测研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013,23(2):380–383,386.
- [14] Durovni B, Saraceni V, Cordeiro M, et al. Operational lessons drawn from pilot implementation of Xpert MTB/Rif in Brazil[J]. *Bull World Health Organ*, 2014,92(8):613–617.
- [15] Nicol MP, Workman L, Isaacs W, et al. A descriptive study of the accuracy of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of pulmonary tuberculosis in hospitalized children in a high HIV prevalence area[J]. *Lancet Infect Dis*, 2011,11(11):819–824.
- [16] Hatherill M, Hanslo M, Hawkridge T, et al. Structured approaches for the screening and diagnosis of childhood tuberculosis in a high prevalence region of South Africa [J]. *Bull World Health Organization*, 2010,88(4):312–320.
- [17] 郑志刚. Xpert MTB/RIF 检测结核杆菌和利福平耐药的研究及应用进展[J]. *应用预防医学*, 2014,20(2):120–123.
- [18] 夏辉,赵雁林. Xpert MTB/RIF 在我国的应用前景[J]. *实用医学杂志*, 2013,29(23):3799–3800.

• 综 述 •

腺相关病毒载体:通往肿瘤基因治疗的桥梁

陈秀生¹ 林创珍² 雷川¹ 翟向明¹ 聂鑫¹ 胡奥¹ 陈思¹ 杜红延^{1*}

[摘 要] 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种有缺陷的非致病的人类细小病毒。腺相关病毒载体作为基因治疗的载体,对长期基因矫正和基因治疗具有一定优越性。由于其低致病性、易操作性等优点,腺相关病毒载体被作为转导目的基因的理想载体,现已广泛地应用于多种肿瘤等疾病的基因治疗研究中。通过对腺相关病毒载体的改造优化,增加其靶向性,减少免疫原性,有望为相关疾病的基因治疗研究提供新的手段和方法。本文就目前腺相关病毒在肿瘤治疗中的应用研究加以综述,旨在对病毒载体在肿瘤生物治疗领域中的应用提供相应的参考。

[关键词] 腺相关病毒; 基因治疗; 应用; 研究进展

Adeno-associated virus (AAV)-based vector: a bridge towards tumor gene therapy

CHEN Xiusheng¹, LIN Chuangzhen², LEI Chuan¹, QU Xiangming¹, NIE Xin¹, HU Ao¹, CHEN Si¹, DU Hongyan^{1*}

(1. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515;

2. The First Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Adeno-associated virus(AAV) is a kind of human parvovirus that is defective and non-pathogenic. AAV vector, as the vector of gene-therapy, has superiority in long-term gene-correction and gene-therapy. AAV vector is considered to be the ideal vector to transfect target gene because of its mildly pathogenicity and easy to operation and now it has been widely used in different kinds of research on gene-therapy to neoplastic disease. Through improving its targeting and reducing its immunogenicity by reforming and optimizing the AAV vector, it is hopeful to provide new methods and measures to the research about gene-therapy of tumor. In this paper many researches on application of AAV vector in tumor gene therapy are summarized, which will be helpful for studies on tumor gene therapy.

[KEY WORDS] Adeno-associated virus (AAV); Gene therapy; Application; Research progress

基因治疗是生物治疗的重要组成部分,是指将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿缺陷基因原本的功能,从而达到治疗分子病的生物治疗方法^[1]。该疗法作为一种全新的医疗手段日益引

起人们的重视,具有良好的应用前景。该治疗方法的关键在于寻找有效的治疗基因以及如何将安全的治疗基因通过合适的载体运送到靶细胞^[2]。传统基因载体分为病毒载体和非病毒载体 2 类。一般

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2012AA020205);国家自然科学基金(81401920);2013 国家教育部博士点基金(20134433120020);2013 年国家级“大学生创新创业训练计划”项目(1212113058);南方医科大学基础 Research 前期启动项目(QD2013N005);广东省“大学生创新训练计划”(201412121094)

作者单位:1. 南方医科大学生物科技学院,广东,广州 510515

2. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

*通讯作者:杜红延, E-mail:gzduhongyan@126.com

注:陈秀生,林创珍为共同第一作者

来说,病毒类载体在表达强度和组织靶向性方面比非病毒类载体优越。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种有缺陷的非致病的人类细小病毒,作为基因治疗的载体,对长期基因矫正和基因治疗具有显著优越性,有着良好的应用前景^[3]。腺相关病毒载体是生物技术产品,可发挥较强的抗肿瘤作用,且诱发的免疫反应极低,其临床应用符合相关规定,因此腺相关病毒载体已广泛被应用于癌症、白血病、艾滋病的治疗研究,并已获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准,进入了临床试验^[4]。本文主要就腺相关病毒载体作一综述,讨论其特点、制备方法、不同的改进策略以及在肿瘤基因治疗领域应用的研究进展。

1 腺相关病毒载体

1.1 腺相关病毒载体的结构

AAV 是一种简单的非致病性的单链 DNA 病毒,其不自我复制而是依赖于辅助病毒如腺病毒(adenovirus, Ad)或单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)来进行复制^[5]。AAV 基因组长 4 675 bp,两侧是 145 bp 长的对病毒的复制和包装具有决定性作用的倒转末端重复序列(inverted terminal repeats, ITRs),其中外侧的 125 个核苷酸呈发夹结构,在复制时有弱启动子作用,中间基因组编码两个蛋白:作为病毒衣壳蛋白的 Cap 蛋白和参与病毒复制整合的 Rep 蛋白。Rep 蛋白能帮助病毒基因组整合到人类第 19 号染色体的 AAVS1 位点^[6]。

1.2 腺相关病毒载体的安全性

腺相关病毒载体是利用天然存在的腺相关病毒某些特征经过基因工程改造后产生的一种可供人工转基因方向应用的载体。源于非致病的野生型腺相关病毒的重组腺相关病毒载体,通过改造后其具有安全性好、宿主细胞范围广、免疫原性低等特点^[7],有很大的应用前景,在基因治疗和疫苗研发中得到广泛应用。腺相关病毒载体与人类已知疾病没有关联,流行病学资料表明,世界各地大多数人感染过野生型 AAV^[8],尚无证据表明 AAV 的感染与某种疾病的发生有关^[9]。另一方面,腺相关病毒载体能转导外源基因进入非分裂细胞,长期表达外源基因,其现已逐渐成为主流的高效基

因转移载体,用于神经肌肉基因治疗、神经退行性病变基因治疗等方面^[10]。为了提高腺相关病毒载体的安全性,改进措施不断被提出。有研究表明,去掉所有腺病毒基因部分的载体比单纯只删掉 E1 区域的腺相关病毒载体能够装载更大的外源基因,并减少了细胞毒性反应和免疫原反应。删除腺相关病毒载体的末端反向重复序列能够减少靶基因在宿主细胞内的随机整合^[11]。这些改造措施都极大的增强了腺相关病毒载体的安全性。

1.3 腺相关病毒载体的靶向性

腺相关病毒载体对不同组织器官的感染效率不同,例如其相较于淋巴细胞、造血干细胞等更偏爱于侵染骨骼肌、肝细胞^[12]。腺相关病毒具有多种血清型,在体内能成功转导多种组织,目前已有数种不同血清型的 AAV 用于基因治疗研究。体内外实验均证明,不同的 AAV 血清型具有不同的组织或细胞特异性^[13],可利用 AAV 血清型不同以及所转导的组织不同来进行靶向治疗,其中 AAV8 对肝脏的转导效率最高^[14],肌肉注射 AAV5 相较于使用 AAV2 载体更能增加分泌型转基因产物的血清水平,AAV1 载体比 AAV5 载体更能有效的转导外源基因到肌肉细胞,AAV2 载体是目前在临床上运用最为广泛的血清型^[15]。研究表明,可以通过基因改造技术来使特异性配体表达于病毒衣壳表面,通过配体与靶组织表面受体特异性结合,从而使 AAV 载体拥有组织特异性,增强其靶向性。同样,用特定多肽替换 AAV 结构蛋白的环 VI 区域能够使 AAV 载体靶向更广泛的细胞株,如使 AAV2 载体靶向小鼠黑色素瘤细胞,这是野生型 AAV2 载体无法做到的^[16]。并且有相关研究发现,对不同血清型的腺相关病毒部分单个氨基酸进行突变可以提高靶器官的感染效率^[17-18],这给基因治疗发展又提供了一个有力的支持。

1.4 腺相关病毒载体的制备

腺相关病毒载体的制备和纯化工艺在很大程度上决定了最终产品的性质和异物含量。异物主要于腺相关病毒载体的准备阶段引入,包括宿主细胞蛋白、哺乳动物 DNA 和其他污染物,这些会影响最终产品的免疫原性。现阶段,唯一能应用于人类血管内高剂量注射的 AAV 载体来源于 HEK293 细胞的重转染,多用于治疗血友病 B^[17]。通过其它技术如杆状病毒表达系

统或借助辅助病毒制备的病毒载体同样可用于人类疾病的治疗,但基本都是通过肌内或视网膜下注射^[19]。除了使用宿主细胞平台来制备 AAV 载体,另一个决定载体品质高低的关键因素是下游纯化过程。一般来说,柱层析法并不适合分离空的病毒衣壳,而在纯化过程中加入梯度离心步骤能有效提高分离病毒衣壳的效率^[20]。

除了选择表达系统和纯化手段以外,构建腺相关病毒载体也有一定的要求,包括治疗基因的长度不能过大,AAV 的总容量为 4.7kb;不需要目的基因立刻表达;不需要基因高水平表达等。为了增加 AAV 介导的基因转导效率,可以构建自身互补 AAV (self-complementary adeno-associated virus, scAAV) 载体,其含有双链 DNA,越过了第二链合成的障碍,但其包装容量只是传统单链 AAV 包装容量(4.8 kb)的一半^[21]。

腺相关病毒载体能够高效的把外源 DNA 导入真核细胞的细胞核内。为进一步提高腺相关病毒载体的转导效率,还可对其进行优化改造。其中通过修饰病毒衣壳而改变靶向性,或是制造重组载体来提升将外源 DNA 插入到染色体的效率,这些都能够有效提升腺相关病毒载体的性能^[22]。

2 腺相关病毒载体在肿瘤基因治疗中的研究进展

AAV 因其独特的生物学性状,与以往的几种病毒载体相比具有许多优点:低致病性、低免疫原性、易操作等,尤其是可长期稳定表达外源基因的特点能够弥补腺病毒载体只能短期表达的不足。由此,其已经广泛应用于多种肿瘤的基因治疗研究中。

2.1 腺相关病毒载体与肺癌

广泛的研究表明新生血管的形成在实体恶性肿瘤的生长和侵袭中起关键作用,如果离开新血管系统的维持,肿瘤的直径只能保持在几毫米以内,因而抑制血管形成的治疗手段成为肿瘤治疗中很有前景的方案。血管形成是促进和抑制因子之间的平衡调控,利用腺相关病毒载体过表达血管生成抑制因子可以对抗肿瘤引起的血管生成,从而有效抑制肿瘤的增殖^[23]。色素上皮源性因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是一个 50 kDa 分泌性糖蛋白,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂

超家族,但没有蛋白酶抑制剂的活性。PEDF 能够通过 Fas/Fas-L 途径激活上皮细胞的凋亡,并且打破促进和抑制血管生成因子之间的平衡,从而对肿瘤血管的生成产生强烈的抑制作用^[24]。He^[25]等人检测了 AAV 介导的肿瘤内表达 PEDF 对 Lewis 肺癌的抑制效果,将 Lewis 肺癌细胞用藻酸盐包被成微球后移植到 C57BL/6 小鼠背部,次日向小鼠注射 AAV-PEDF 并构建对照组,11 天后取出微球离心测量上清的荧光强度,发现 AAV-PEDF 处理的小鼠荧光强度较于对照组显著降低,并且发现 AAV-PEDF 处理的小鼠中微血管密度降低 73%,同时肿瘤体积降低 58%,从而说明 PEDF 能够显著抑制 Lewis 肺癌组织血管的形成,进而抑制肿瘤增殖。腺相关病毒载体表达 PEDF 的治疗手段在肺癌的治疗中有重要的意义和良好的前景。

2.2 腺相关病毒载体与神经胶质瘤

神经胶质瘤亦称胶质细胞瘤,是发生于神经外胚层的肿瘤。由于肿瘤浸润性生长,与脑组织间无明显边界,难以做到全部切除,治愈难度大,近期运用基因治疗作为替代治疗方案取得了令人期待的效果^[26]。逆转录病毒载体和腺相关病毒载体是运用于神经胶质瘤治疗最主要的基因治疗载体。主流的基因治疗方法包括:把无毒的酶导入到肿瘤细胞内,该酶能够把药物前体转化为有毒的化合物从而杀死肿瘤细胞;通过病毒载体使特定毒素大量表达,该毒素针对神经胶质瘤细胞表面特定受体,从而使肿瘤细胞死亡;通过病毒载体使细胞因子如 GM-CSF 等过量表达,激活 T 细胞免疫或动员树突状细胞,增强免疫反应,达到治疗效果^[27]。腺相关病毒载体因为其安全性和高效性在对神经胶质瘤基因治疗中发挥重要作用。Zolotukhin 等^[28]为了提高腺相关病毒载体转导基因进入神经胶质瘤细胞的能力,设计出 2 种改善 AAV 的方案,其一是去掉 AAV2 衣壳表面暴露的酪氨酸残基,因为磷酸化的酪氨酸残基是遍在化的一个信号,去掉酪氨酸残基后减弱了蛋白酶体降解活性从而有利于病毒载体向细胞核定位,进而增强了基因转导效率;其二是 ShH19,即改组的 AAV2,部分序列是来自其他血清型的病毒。研究发现改变衣壳的腺相关病毒载体转导外源基因进入神经胶质瘤 GL261 细胞的能力显著增强,腺相关病毒载

体在神经胶质瘤的基因治疗中发挥着重大作用,前景看好。

2.3 腺相关病毒载体与胰腺导管腺癌

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是常见的胰腺肿瘤,是一种恶性程度高、诊断和治疗都很困难的消化道恶性肿瘤,其发病率和死亡率逐年上升。运用腺相关病毒载体进行基因治疗,把治疗基因转入 PDAC 细胞中,是目前治疗胰腺癌的一种很有前景的方法。通过修饰病毒衣壳表面,使其展示一种特异性结合网蛋白-1 的多肽,从而使基因改造的 AAV2 载体能够特异性靶向 PDAC 细胞^[29]。这种特异性结合网蛋白-1 的多肽(plectin-1 targeting peptide, PTP)被插入到 AAV2 衣壳的环 VI 区域,Konkalmatt 等人^[30]检测了重组载体体内和体外实验的转导效果,发现 AAV2-PTP 相较于非胰腺细胞能够更好的靶向人类 PDAC 细胞,包括 PANC-1、MIAPaCa-2、HPAC 等胰腺细胞株。AAV-PTP 对 PANC-1 肿瘤移植物的亲嗜性比其他组织的 37 倍左右。改造后的 AAV 载体并不整合入宿主的染色体,而是作为稳定的游离基因长期进行基因表达。综上所述,腺相关病毒载体介导的基因治疗在胰腺癌的治疗中具有相当的潜力。

2.4 腺相关病毒载体与宫颈癌

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,近年来其发病有年轻化的趋势。尽管宫颈癌的发病率和死亡率已有明显下降,但仍是全球妇女中仅次于乳腺癌和结直肠癌的第三个常见的恶性肿瘤^[31]。LIGHT 是肿瘤坏死因子超家族中的一种配体,能够在肿瘤位点构建淋巴样组织并且能招募初始 T 细胞进入肿瘤,显示出了强大的抗肿瘤活性,在肿瘤治疗中有很大的应用前景^[32]。腺相关病毒载体由于其高转导效率和低免疫原性被选为 LIGHT 的转导载体。Maitituoheti 等人^[33]发现在体外 AAV-LIGHT 能够刺激 T 淋巴细胞的增殖和活化,并且通过构建 C57BL/6 小鼠 TC-1 CC 动物模型,发现皮下注射 AAV-LIGHT 能够显著降低肿瘤的大小和重量,表明 AAV-LIGHT 能够通过活化细胞毒性 T 细胞和增强肿瘤位点的淋巴细胞浸润来起到抑制肿瘤生长的作用,腺相关病毒载体介导的基因治疗在宫颈癌的治疗中显示了巨大的应用前景。

2.5 基因疫苗载体

基因疫苗是指将编码外源性抗原基因通过合适的载体系统导入人体或动物体内,让其在宿主细胞中表达抗原蛋白,直接诱导机体产生免疫应答从而达到预防疾病的目的。抗原基因在一定时限内的持续表达,不断刺激机体免疫系统产生应答反应,从而到达预防疾病的目的。其中人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)腺相关载体疫苗已在人体进行了免疫试验。在利用腺病毒载体表达人疟原虫 CS 抗原蛋白进行免疫研究中证明,其免疫效果甚至比放射孢子体的免疫效果还要好^[34]。尽管人源腺相关病毒在试验动物体内取得较好的免疫效果,但是在多数人不同程度的存在人腺相关病毒的中和抗体的情况下,这些中和抗体会阻碍腺相关病毒载体在体内有效地表达外源基因。怎样避免腺相关病毒特异性的中和抗体是目前腺相关病毒载体疫苗研究中的一个主要的问题^[35]。

除此之外,其他表达转基因的腺相关病毒载体也显示出比较好的治疗效果。有报道称利用表达粒性巨噬细胞集落刺激因子的腺相关病毒载体治疗黑色素瘤的临床试验,显示了强大的抗癌效果^[36]。病毒性肿瘤、致癌基因过表达引起的肿瘤能够表达诱导 T 细胞免疫反应的肿瘤抗原。但是许多肿瘤却可以规避有效的抗肿瘤 T-细胞免疫反应^[37]。研究表明,用腺相关病毒载体连续表达多个肿瘤抗原的 CTL 表位,具有很好的抗肿瘤活性。肿瘤组织选择性复制的腺相关病毒载体被用来表达抗肿瘤细胞因子激活物具有明显的抗癌效果^[38]。

3 结论与展望

腺相关病毒载体是将天然存在的腺相关病毒经过基因工程改造后产生的一种基因载体。由于有众多的腺病毒种类,使得我们可以根据不同的需要来研究开发不同的腺相关病毒载体。可以根据需要改变病毒衣壳表面来改变腺病毒的宿主亲嗜性,制造出靶向定位的腺相关病毒载体,从而将载体靶向到特定的组织器官中来治疗人类各种疾病;也可以改变腺病毒基因组从而扩大载体容量,使腺相关病毒载体更好地为人类服务。随着研究的深入,腺相关病毒载体广泛用于基因治疗和基因疫苗载体。通过对载体的改造和

所装载外源治疗基因的选择,对于攻克威胁人类健康的癌症和各种遗传性疾病具有潜在的应用价值。

尽管腺相关病毒载体在基因治疗和基因疫苗治疗等方面研究较多,但在临床运用上还存在问题^[39]。重组的 AAV 是由待转导的真核基因和病毒衣壳构成的重组分子,不能编码任何病毒蛋白质,但重组的病毒衣壳仍与野生型病毒衣壳很相似,因此当暴露于机体免疫系统时仍然会激发针对核衣壳和外源基因的免疫反应^[40]。相信随着病毒分子生物学技术和疫苗技术的不断发展,腺相关病毒载体疫苗和治疗药物必将会从研究走向临床应用,为人和动物的卫生健康服务。

参考文献

- [1] Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges[J]. *Nature Rev Genet*, 2011,12(5):341–345.
- [2] Marshall E. Gene therapy on trial[J]. *Science*, 2000, 288(5468):951–957.
- [3] Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery[J]. *J Control Release*, 2007,121(1–2):64–73.
- [4] Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase trial[J]. *Lancet*, 2007,369 (9579): 2097–2105.
- [5] Enger PO, Thorsen F, Lonning PE, et al. Antitumor efficacy of AAV-mediated systemic delivery of interferon-beta[J]. *Cancer Gene Ther*, 2006,13(1):99–106.
- [6] Matsushita T, Elliger S, Elliger C, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus[J]. *Gene Ther*, 1998,5(7):938–945.
- [7] Galli A, Cervelli T. Inverted terminal repeats of adeno-associated virus decrease random integration of a gene targeting fragment in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *BMC Mol Biol*, 2014,15:5.
- [8] Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, et al. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*, 2009,199(3):381–390.
- [9] Schlehofer JR, Boeke C, Reuland M, et al. Presence of DNA of adeno-associated virus in subfertile couples, but no association with fertility factors. *Hum Reprod*, 2012,27(3):770–778.
- [10] Hammerschmidt DE. Development of a gutless vector [J]. *J Lab Clin Med*, 1999,134(3):C3.
- [11] Harding TC, Dickinson PJ, Roberts BN. Enhanced gene transfer efficiency in the murine striatum and an orthotopic glioblastoma tumor model, using AAV-7 and AAV-8-pseudotyped vectors. *Hum[J]. Gene Ther*, 2006, 17(8):807–820.
- [12] Okada T, Takeda S. Current challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of duchenne muscular dystrophy [J]. *Pharmaceuticals*, 2013,6(7):813–836.
- [13] Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*, 2006,14(3):316–327
- [14] Jacobs F, Gordts SC, Muthuramu I, et al. The liver as a target organ for gene therapy: state of the art, challenges, and future perspectives [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012,5(12):1372–1392.
- [15] Kotin RM. Large-scale recombinant adeno-associated virus production[J]. *Hum Mol Genet*, 2011,20(R1):R2–6.
- [16] Girod A, Ried M, Leike K. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2[J]. *Nat Med*, 1999,5(12):1052–1056.
- [17] Gabriel N, Hareendran S, Sen D, et al. Bioengineering of aav2 capsid at specific serine, threonine, or lysine residues improves its transduction efficiency in vitro and in vivo[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2013,24(2): 80–93.
- [18] Sen D, Gadkari RA, Sudha G, et al. Targeted modifications in adeno-associated virus serotype 8 capsid improves its hepatic gene transfer efficiency in vivo[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2013,24(2):104–116.
- [19] Mease PI. Improving the routine management of rheumatoid arthritis: the value of tight control[J]. *J Rheumatol*, 2010,37(8):1570–1578.
- [20] Ayuso E, Mingozzi F, Montane J, et al. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency[J]. *Gene Ther*, 2010,17(4):503–510.
- [21] Maheshri N, Koerber JT, Kaspar BK, et al. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors[J]. *Nat Biotechnol*, 2006,24(2): 198–204.
- [22] Vandenberghe LH, Wang L, Somanathan S, et al. Heparin binding directs activation of T cells against adeno-

- associated virus serotype 2 capsid[J]. *Nat Med*, 2006, 12(8):967-971.
- [23] Kirsch M, Schackert G, Black PM. Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors[J]. *J Neurooncol*, 2000,50(1-2):149-163.
- [24] Chen QR, Zhang L, Gasper W. Targeting tumor angiogenesis with gene therapy[J]. *Mol Genet Metab*, 2001, 74(1-2):120-127.
- [25] He SS, Shi HS, Yin T, et al. AAV-mediated gene transfer of human pigment epithelium-derived factor inhibits Lewis lung carcinoma growth in mice[J]. *Oncology Reports*, 2012,27(4):1142-1148.
- [26] Assi H, Candolfi M, Baker G, et al. Gene therapy for brain tumors: basic developments and clinical implementation[J]. *Neurosci Lett*, 2012,527(2):71-77.
- [27] Girod A, Ried M, Leike K. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2[J]. *NatMed*, 1999,5(12):1052-1056.
- [28] Zolotukhin I, Luo D, Gorbatyuk O, et al. Improved adeno-associated viral gene transfer to murine glioma[J]. *J Genet Syndr Gene Ther*, 2013,4(133):12815.
- [29] Beytia Mde L, Vry J, Kirschner J. Drug treatment of duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives[J]. *Acta Myol*, 2012,31(1):4-8.
- [30] Konkalmatt PR, Deng D, Thomas S, et al. Plectin-1 targeted AAV vector for the molecular imaging of pancreatic cancer[J]. *Original Research Article*, 2013,3:84.
- [31] Michelin M, Murta EF. Potential therapeutic vaccine strategies and relevance of immune system in uterine cervical cancer[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2008,29(1):10-18.
- [32] Yu P, Fu YX. Targeting tumors with LIGHT to generate metastasis-clearing immunity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2008,19(3-4):285-294.
- [33] Maitituoheti M, Li Y, Wang W, et al. Adeno-associated virus-mediated local delivery of light suppresses tumorigenesis in a murine cervical cancer model[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2011,34(8):581-587.
- [34] Bruna-Romero O, Rocha CD, Tsuji M, et al. Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium* lacking the GPI-anchoring motif[J]. *Vaccine*, 2004,22(27-28):3575-3584.
- [35] 卢曾军,曹轶梅,刘在新,等. 腺病毒载体在基因治疗和疫苗研究中的应用[J]. *中国病毒学*, 2006,21(6):622-626.
- [36] Aghi M, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy[J]. *J Gene Med*, 2000,2(3):148-164.
- [37] Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2009,360(5):447-458.
- [38] Takayama K, Ikegami A, Inoue H, et al. VEGF promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for the treatment of malignant pleural mesothelioma[J]. *Mol Ther*, 2004,9(S1):S238.
- [39] Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy[J]. *Blood*, 2013,122(1):23-36.
- [40] Hosel M, Broxtermann M, Janicki H, et al. Toll-like receptor2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells towards adeno-associated viral vectors[J]. *Blood*, 2011,117(24):6459-6468.

(上接第 160 页)

- [8] 谢美榕,严延生,颜苹苹,等. 福建省 MSM 人群中 HIV-1 感染者原发性耐药基因突变研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013,29(1):27-29,42.
- [9] 杨绍敏,钟敏,杨壁琿,等. 云南省 2008-2012 年 HIV-1 耐药基因型检测情况[J]. *中国艾滋病性病*, 2014,20(1):9-13.
- [10] 袁丹,秦光明,肖林,等. 四川省 MSM 人群 HIV-1 原发性耐药性分析[J]. *预防医学情报杂志*, 2011,27(3):169-172.
- [11] 王欣,于茂河,柳忠泉,等. 天津市 HIV/AIDS 病人未治疗人群 POL 基因多态性及耐药性分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2012,18(8):511-514.
- [12] 类延花,胡中旺,王海,等. 合肥市男男性行为人群 HIV-1 感染者原发耐药性分析[J]. *中国病毒病杂志*, 2012, 2(6):50-54.
- [13] 于国龙,刁丽梅,李杰,等. 广东省吸毒人群新报告 HIV-1 感染者 POL 基因多态性和耐药分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2008,22(4):198-200.

• 综 述 •

论华法林相关基因突变检测技术

孙雪^{1,2} 况赞^{1,2} 阳喜定^{1,2} 郭成贤² 阳国平^{2*}

[摘 要] 华法林为一种常用的口服抗凝药,主要用于治疗血栓栓塞性疾病。但其治疗窗窄、个体差异大,容易引起血栓或出血的风险。代谢酶 CYP2C9 和作用靶点 VKORC1 基因多态性对华法林个体剂量差异有显著影响,因此 CYP2C9 和 VKORC1 基因突变的检测对于华法林的个体化治疗具有重要的参考价值。目前用于 CYP2C9 和 VKORC1 突变检测的方法有 PCR-RFLP、TaqMan、pyrosequencing、HRM、POCT、熔解曲线分析技术、MS、DHPLC 等。本文将对这些检测方法的特点进行比较分析,以发现适合临床应用推广的技术检测方法。

[关键词] 华法林; CYP2C9; VKORC1; 基因突变检测

The overview of warfarin related gene mutation detection technologies

SUN Xue^{1,2}, KUANG Yun^{1,2}, YANG Xiding^{1,2}, GUO Chengxian², YANG Guoping^{2*}

(1. Pharmaceutical College of Central South University, Changsha, Hunan, China, 410013; 2. Center of Clinical Pharmacology, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, China, 410013)

[ABSTRACT] Warfarin is a kind of commonly prescribed oral anticoagulant for preventing thromboembolic disease. However, it is prone to cause thromboembolism or bleeding due to its narrow therapeutic window. The predominant polymorphisms in CYP2C9 and VKORC1 genes, encoding for metabolizing enzyme cytochrome P450 2C9(CYP2C9) and target enzyme vitamin K epoxide reductase complex subunit 1(VKORC1), have significant impact on individual differences in dose requirement. So the detection of CYP2C9 and VKORC1 mutation has important reference value to individualized therapy. At present, the usually detection methods of CYP2C9 and VKORC1 include PCR-RFLP, TaqMan, pyrosequencing, HRM, POCT, melting curve analysis, MS, DHPLC, and so on. The characteristics of these detection methods will be compared in this article to find out the most suitable technical detection methods for clinical application and promotion.

[KEY WORDS] Warfarin; CYP2C9; VKORC1; Gene mutation detection

自 2009 年国际华法林药物基因组协会(International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, IWPC)推出华法林剂量计算公式以来,国内外对华法林的随机对照临床研究成为遗传药理学研究的一项热点。近年来大多数临床试验旨在探索代谢酶 Cytochrome P450 2C9(CYP2C9)*2(rs1799853)、*3(rs1057910)和作用靶点维生素 K

环氧化物还原酶 1(vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, VKORC1)(rs9923231)对华法林剂量的影响,并对 IWPC 公式进行修正及验证等。有研究表明,CYP2C9*2 及*3 可解释华法林个体剂量差异的 12%,而 VKORC1 可解释华法林个体剂量差异的 30%^[1]。因此,在华法林的临床应用中,对华法林进行基因突变检测显得

基金项目:科技部国际科技合作与交流专项(2014DFA30900);国家自然科学基金(81373476)

作者单位:1. 中南大学药学院,湖南,长沙 410013

2. 中南大学湘雅三医院临床药理中心,湖南,长沙 410013

*通讯作者:阳国平, E-mail: ygp9880@163.com

十分重要。高效灵敏的 CYP2C9、VKORC1 基因突变检测技术能为华法林个体治疗提供快捷的指导。本文将对 CYP2C9、VKORC1 基因突变检测方法的研究近况进行综述,以期发现适合临床应用推广的检测方法。

1 常用的检测方法

1.1 聚合酶链式反应连接的限制性片段长度多态性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

PCR-RFLP 是用特异设计的 PCR 引物扩增目的 DNA,扩增产物再用特异性内切酶消化切割成不同大小片段,并直接在凝胶电泳上分辨的方法。不同等位基因的限制性酶切位点分布不同,会产生不同长度的 DNA 片段条带。该法与限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 相比,区别是以扩增替代了酶切,避免了 RFLP 繁琐的 DNA 酶切、转移、杂交等步骤,具有方法简便、分型时间短等优点。PCR-RFLP 大大提高了目的 DNA 的含量和相对特异性,是目前国内外华法林研究最为常用的基因突变检测方法^[2-9]。

Gu 等^[10]在进行华法林影响因素的研究时,使用了 PCR-RFLP 对 127 名关节置换患者及 133 名健康对照者 DNA 样本进行 CYP2C9 及 VKORC1 三个位点的基因分型,结果表明该法分型快速而准确。

1.2 TaqMan 等位基因辨别分析

TaqMan 等位基因辨别分析采用不同的荧光基团分别标记两种特异探针,探针的两端分别标记了荧光基团和淬灭基团。在 PCR 延伸过程中,具有 5'→3' 外切活性的 DNA 聚合酶只外切并降解与模板完全互补的探针,当被外切后,荧光基团和淬灭基团分离,从而激发出荧光。如果一种荧光信号明显强于另一种,则表明该基因型为野生型。如果 2 种荧光信号都增强,则表明其为突变型。

TaqMan 技术的优点在于仅使用一个反应且操作简单,可以在单管反应中检出样本的基因型,可以在 2 小时内快速对 96 个样本进行基因突变的检测。TaqMan 技术最先在 Sevall 发表的文章中提及^[11]。2010 年 1 项对 Invader、Verigene 和 TaqMan 三种基因突变检测方法进行 50 个样本分型的对比研究表明,TaqMan 基因检测方法较为经济,且所需样本 DNA 量较其他两种方法少,仅需 5~20 ng^[12]。

2009 年 IWPC 建立最大样本量的模型时,即使用了 TaqMan 对 5 052 个样本进行 CYP2C9 及 VKORC1 的基因分型^[13]。该研究通过随机抽取 480 个样本进行基因分型的质量控制,结果表明,TaqMan 对 CYP2C9 基因分型结果的一致性为 97.8%,对 VKORC1 基因分型结果的一致性为 97.7%。先后国内外在华法林的研究中,对 CYP2C9 及 VKORC1 基因突变检测也广泛应用了该方法^[14-18]。

1.3 焦磷酸测序法 (pyrosequencing)

焦磷酸测序法是测序法的一种,是新近发展起来的基于酶催化化学反应的测序技术,可以快速准确地测定一段较短的目标片段。其基本原理是 4 种脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 之一被加入引物延伸反应体系中,当加入的 dNTP 恰好与 DNA 模板的下一个碱基配对,则会在 DNA 聚合酶的作用下,添加到测序引物的 3' 末端,同时释放出一分子的焦磷酸,这个焦磷酸分子是一系列后续化学发光反应的必备材料。如果没有掺入 dNTP 就不会产生光信号,而在加入下一种 dNTP 之前,反应体系中剩余的 dNTP 会在酶的作用下发生降解。因此,观察导致发光的 dNTP 类型就能确定单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的基因型。

焦磷酸测序法具有省时、低费用、准确性高、易于实现全自动化、可对 SNP 位点进行突变频率的定量分析等优点,是近年来一种备受关注的 SNP 基因分型方法。与一些标准基因分型方法相比,焦磷酸测序法还存在一些不足。首先,该方法在进行 PCR 反应时,生物素标记引物价格较高;其次,该方法的应用限于短片段 PCR 产物 (建议不超过 200 bp),无法对较长片段的产物进行精确的测序分析,这就限制了焦磷酸测序技术在基因测序中的广泛应用;再者,该方法对测序片段中连续的相同碱基 (3 个以上) 的判读容易出现误差。2008 年 King 等^[19]将其与其他三种商业测序方法 INFINITI analyzer、Invader assay、Tag-It Mutation Detection assay 进行比较研究,对 112 个样本进行 CYP2C9 及 VKORC1 基因分型,结果表明焦磷酸测序法对 CYP2C9*2、CYP2C9*3 及 VKORC1 分型的准确率分别为 99%、100%、100%,且分型时间约为 4 小时。

近年又发展了一种单筒聚合酶链式反应-焦磷酸测序法 (single-tube PCR-pyrosequencing),且在

华法林研究中有应用^[20-21]。与简单的焦磷酸测序法相比,该法每次可对 96 个样本进行测定,具有更省时且更经济的特点。2014 年 Kim 等^[22]使用了 1 种新型的基因突变检测方法,即多元焦磷酸测序对 250 个样本进行 CYP2C9 及 VKORC1 基因突变的检测,其结果与单焦磷酸测序法结果 100% 一致。测序结果通过直接测序法进行验证,表明多元焦磷酸测序方法所得结果快速而可靠。

1.4 高分辨率熔解曲线分析技术(high resolution melting, HRM)

HRM 是近几年兴起的 SNP 及突变研究工具,HRM 通过实时监测升温过程中双链 DNA 荧光染料与 PCR 扩增产物的结合情况,来判断是否存在 SNP。不同 SNP 位点、不同基因型等都会影响熔解曲线的峰形,因此 HRM 分析能够有效区分不同 SNP 位点与不同基因型。HRM 是在熔解曲线分析技术的基础上发展起来的,二者的差别在于,常规熔解曲线升温时每步升高 0.5 ~ 1 °C,而高分辨率熔解曲线每步升温 0.02 ~ 0.1 °C;两种熔解曲线所使用的荧光染料亦不相同,高分辨率熔解曲线必需使用饱和荧光染料,而普通熔解曲线由于对分辨率要求不高,则可使用非饱和荧光染料。HRM 由于使用新型的饱和染料和高分辨率的仪器,有着极高的分辨率。

作为新一代的遗传扫描工具,HRM 具有灵敏度高、速度快、操作简单、选择性好、价格低廉、实现了真正的闭管操作等优点,使其越来越多的受到了广大研究者的关注^[23]。

2012 年相关研究者新建立了一种用于检测 CYP2C9 及 VKORC1 的 HRM 方法^[24],对 100 个华法林治疗患者的样本进行 CYP2C9 * 3 及 VKORC1 的基因分型,并将该方法与传统的 PCR-RFLP、直接测序法及 TaqMan 探针法进行了比较,证明了该方法更简单、更经济、更快速。该结果促进了后续华法林研究中对 HRM 的使用^[25-26]。

1.5 即时检测(point-of-care testing, POCT)

POCT 是一种新型的即时检测技术。2009 年欧盟遗传药物学和抗凝治疗(european pharmacogenetics of anticoagulant therapy, EU-PACT)成员发表香豆素类大型随机对照临床试验方案^[27],说明将使用 POCT 进行基因分型,并指出该方法可在 1.5 小时内得到分型结果。2011 年 EU-PACT 试验组

成员 Howard 等^[28]发表以 HyBeacon 为探针而建立的新型荧光 PCR 基因分型方法,并以适用于 POCT 的标准 PCR 仪器 Genie 1 进行分型。该方法从指尖无菌采血或采静脉血于真空管中,直接使用未经提取 DNA 的血样进行基因分型。该研究通过随机选取 128 个新鲜或冷冻的血液进行基因分型,同批血样分别在其他实验室进行 Taqman 及 PCR-RFLP 分型进行方法验证,结果表明 3 种方法一致性为 100%。2013 年 EU-PACT 研究者将华法林试验结果文章发表于新英格兰杂志^[29],通过对 455 个患者的样本进行基因分型,表明该方法从收到血样至得到分型结果仅需 2 小时。通过与标准的 Taqman 及 PCR-RFLP 验证比较,结果表明该方法更高效。

POCT 的优点在于无需在实验室操作,实现了床旁检测;无需提取 DNA,操作简单;耗时短,可快速得到结果,适用于华法林研究及其临床应用;费用较低,每个分析约需 50 美元,一般研究可以负担;准确性高。但该方法的缺点在于需要特定的 HyBeacon 探针及 Genie 1 分型仪器,一般实验室可能尚不具备;POCT 目前仅在 EU-PACT 大型临床试验中得以验证,其准确性有待进一步通过大样本量验证,因此该方法有待临床进一步验证和推广。

2 其他检测技术

2.1 熔解曲线分析技术(melting curve analysis)

熔解曲线分析技术的基本原理是利用荧光标记的 DNA 探针与目标 DNA 互补,进而发射荧光,而未被结合的荧光标记 DNA 探针将猝灭。与探针结合序列的多态性将引起碱基对的错配,从而破坏探针,使其融解即变性。与野生型相比,突变型在不同温度下发射的荧光也有相应的改变,荧光的负导数的变化作为温度的函数,将生成表明样本基因型的特征峰。

2008 年的一项比较研究表明,该方法的缺陷为目的基因临近的未知基因多态性的干扰,这也限制了该方法的广泛应用^[30]。但通过设计更好的探针,可消除该潜在缺陷。

2.2 质谱法(mass spectrometry, MS)

MS 检测方法的原理是使用质谱直接或间接检测等位基因特异性延伸来区分反应产物。各种等位基因区分反应如单碱基延伸及其变化形式、等位基因特异性肽核酸(peptide nucleic acid,

PNA)、Invader、碱基特异性裂解和等位基因特异性 PCR 均已成功地和质谱检测法联合应用。因为质谱法测定的是 DNA 分子的基本性质即反应产物的分子量,因而是最直接的检测方法,不需任何标记物。2009 年 IWPC 研究中,部分 VKORC1 的基因分型即应用了该方法。

MS 检测方法的优点是高分辨率,可以轻易区分仅相差一个碱基的 DNA 分子;分析时间短,分析每个样品只需几毫秒,所以即使 MS 逐个分析每个样品,检测通量仍然很高;通过合理的设计探针,可实现中度的多重化。MS 检测方法的最大缺点是对分析样品纯度要求苛刻,随着对产品纯化过程的改进,可以克服这个不足。

2010 年 Yang 等^[31]报告了一种新型的表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF MS)分型方法。通过 DNA 双向测序法对 189 个样本的 SELDI-TOF MS 检测结果进行准确性评估,结果一致性为 100%。该方法与传统的 MS 法比较,简化了操作过程,取消了许多繁琐的试验步骤,检测 CYP2C9 及 VKORC1 三个位点突变所需时间少于 5 小时,该分型方法的准确性已通过双向 DNA 测序得以证实。这种新型的多重复路基因分型方法提供了良好的临床试验平台,促进了华法林个体化用药的临床研究。

2.3 变性高效液相色谱法 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)

DHPLC 是利用发生错配的杂合双链 DNA 与纯合双链 DNA 解链特征的差异将它们分离开来。由于杂合双链 DNA 错配位点处氢键被破坏而形成“鼓泡”,在部分加热变性的条件下,更易于解链形成 Y 形结构,与固定相结合能力降低,所以杂合双链将先于纯合双链被洗脱出来,通过洗脱峰的不同就可判断是否有突变存在。部分研究者也使用了该方法进行 CYP2C9 及 VKORC1 的基因突变检测^[32-33]。

与测序法相比,DHPLC 简单、快速、敏感性高,不仅可用于已知突变的检测,还可以用于未知突变的扫描。但该方法尚未通过大样本量的验证,因此目前其临床应用相对较少。

3 基因分型试剂盒及平台

基因分型平台不仅可为华法林的大型临床研

究提供技术支持,也为华法林的临床应用提供了一定的保障,但基因分型平台需要较特殊的仪器设备。基因分型试剂盒,由于便于携带,操作简便,可为华法林的临床应用带来便利。

3.1 目前已获 CFDA 批文的 CYP2C9 及 VKORC1 基因分型试剂盒

(1) 上海百傲科技股份有限公司研发的 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(PCR-芯片杂交法)于 2012 年获 CFDA 批准,是国内首个获批准的检测 CYP2C9 及 VKORC1 的试剂盒,该试剂盒每次可对 12 个标本进行基因突变的检测。

(2) 中山大学达安基因股份有限公司的 VKORC1 和 CYP2C9 基因检测试剂盒 (PCR-电化学基因芯片法)也于 2014 年获 CFDA 批准,可一次检测 24 个标本。

3.2 目前已获 FDA 及 CFDA 批文的 CYP2C9 及 VKORC1 基因分型平台

(1) 美国 TrimGen 公司研发的 eQ-PCR™ LC 华法林基因分型平台于 2009 年获得 FDA 批准上市,510(k)编码为 k073071,需使用特殊设备 LightCycler® Real-Time PCR System instrument model 1.2^[34]。

(2) 美国 ParagonDx 有限责任企业研发的可对 CYP2C9 和 VKORC1 快速基因分型分析的平台于 2008 年获 FDA 批准上市,510(k)编码为 k071867,需使用特殊设备 Cepheid Smart Cycler Dx^[35]。

(3) 美国 Nanosphere 公司研发的 Verigene 华法林代谢核酸测试系统于 2007 年获 FDA 批准上市,510(k)编码为 k070804,需使用特殊设备 The Verigene® System^[36]。

(4) 美国 Osmetech 分子诊断公司研发的 eSensor® 华法林敏感性测试,eSensor® XT-8 系统于 2008 年获 FDA 批准上市,510(k)编码为 k073720,需使用特殊设备 The eSensor® XT-8 Instrument^[37]。

(5) 美国 GenMark 诊断公司研发的 eSensor 华法林敏感性唾液测试平台于 2011 年获 FDA 批准上市,510(k)编码为 k110786,需使用特殊设备 OraGene·Dx collection device (k110701) models OGD-500,OGD-575,OXD-525 and OYD-500,eSensor® XT-8 Instrument^[38]。

(6) 美国 Autogenomics 公司研发的 INFINITI 2C9-VKORC1 华法林多元检测技术平台于 2007 年获 FDA 批准上市,510(k)编码为 k073014,需使

用特殊设备 Autogenomics INFINITI Analyzer^[39]。

(7) 佛山达安医疗设备有限公司开发生产的电化学基因芯片检测仪, 于 2014 年获 CFDA 批准, 与中山大学达安基因股份有限公司的 VKORC1 和 CYP2C9 基因检测试剂盒配套使用。

4 结语

PCR-RFLP 及 TaqMan 技术由于操作简单, 耗时短, 近年被广泛用于 CYP2C9 及 VKORC1 基因突变的检测。HRM 及 POCT 虽然应用时间较短, 但由于其具有高灵敏度、高通量且省时、经济等优越性, 有望成为 CYP2C9 及 VKORC1 基因突变检测的主流方法。MS 及 DHPLC 目前应用于华法林研究尚不多, 有待进一步临床研究加以验证。

目前用于 CYP2C9 及 VKORC1 基因突变检测的试剂盒较少, 国内仅一个试剂盒获 CFDA 批准上市。美国 FDA 已批准一些分型平台上市, 这些分型平台为华法林的临床研究和应用奠定了一定的基础, 但这些分型平台均需要较特殊的仪器设备, 尚未得到普遍应用。因此研发高准确性、高灵敏度、简单、省时、经济的 CYP2C9 及 VKORC1 基因分型平台及试剂盒, 对华法林的临床研究及使用均具有重要意义。

华法林为抗凝治疗的一线药物, 但由于个体差异大, 易引起血栓及出血等风险, 导致其在中国的使用率非常低。多项研究表明 CYP2C9 及 VKORC1 对个体剂量差异有显著影响, 因此有效的基因分型方法对华法林的临床应用有重要的意义。通过对上述分型方法的分析比较, PCR-RFLP、TaqMan 由于操作简便、省时、且通过了大量研究验证等特点, 均适于临床推广应用。HRM 由于省时、操作简便、价格低廉等更突出的优越性, 加以大样本验证, 最适于临床推广应用。POCT 具备极为省时且操作简单、准确性高等特点, 如果其所需的特殊探针及仪器设备能够普及, 则推荐其大规模临床应用。

参考文献

- [1] Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting[J]. *Blood*, 2009, 113(4):784-792.
- [2] Zhang H, Yang L, Feng Q, et al. Association between VKORC1 gene polymorphisms and ischemic cere-

- brovascular disease in Chinese Han population[J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(2):166-170.
- [3] Natarajan S, Ponde CK, Rajani RM, et al. Effect of CYP2C9 and VKORC1 genetic variations on warfarin dose requirements in Indian patients[J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(5):1375-1382.
- [4] Nahar R, Saxena R, Deb R, et al. Pharmacogenetic typing for oral anti-coagulant response among factor V Leiden mutation carriers[J]. *Indian J Hum Genet*, 2012, 18(3):326-331.
- [5] Gaikwad T, Ghosh K, Kulkarni B, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on warfarin dosage, over anticoagulation and other adverse outcomes in Indian population[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 10(1-3):80-84.
- [6] Nahar R, Deb R, Saxena R, et al. Variability in CYP2C9 allele frequency: a pilot study of its predicted impact on warfarin response among healthy South and North Indians[J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(1):187-194.
- [7] 余靓平, 宋洪涛, 曾志勇, 等. 基于药物基因组学的华法林给药模型的验证[J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(7):614-619.
- [8] Ivashchenko D, Rusin I, Sychev D, et al. The frequency of CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms in Russian patients with high thrombotic risk[J]. *Medicina(Kaunas)*, 2013, 49(12):517-521.
- [9] Djaffar-Jureidini I, Chamseddine N, Keleshian S, et al. Pharmacogenetics of coumarin dosing: prevalence of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms in the Lebanese population[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011, 15(11):827-830.
- [10] Gu Q, Kong Y, Schneede J, et al. VKORC1-1639G>A, CYP2C9, EPHX1691A>G genotype, body weight, and age are important predictors for warfarin maintenance doses in patients with mechanical heart valve prostheses in southwest China[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, 66(12):1217-1227.
- [11] Sevall JS. Rapid allelic discrimination from real-time DNA amplification[J]. *Methods*, 2001, 25(4):452-455.
- [12] Lefferts JA, Schwab MC, Dandamudi UB, et al. Warfarin genotyping using three different platforms[J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(4):441-446.
- [13] Klein TE, Altman RB, Eriksson N, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8):753-764.
- [14] 姜莹, 韩璐璐, 李彦, 等. 六种基因多态性对中国汉族人群华法林稳定剂量的影响[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(3):367-371.
- [15] Botton MR, Bandinelli E, Rohde LE, et al. Influence of

- genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011,72(3):442–450.
- [16] Yin OQ, Gallagher N, Fischer D, et al. Effects of nilotinib on single-dose warfarin pharmacokinetics and pharmacodynamics: a randomized, single-blind, two-period crossover study in healthy subjects[J]. *Clin Drug Investig*, 2011,31(3):169–179.
- [17] Mazzaccara C, Conti V, Liguori R, et al. Warfarin anticoagulant therapy: a southern Italy pharmacogenetics-based dosing model[J]. *Plos One*, 2013,8(8):1–8.
- [18] You JH, Wong RS, Wayne MM, et al. Warfarin dosing algorithm using clinical, demographic and pharmacogenetic data from Chinese patients[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2011,31(1):113–118.
- [19] King CR, Porche-Sorbet RM, Gage BF, et al. Performance of commercial platforms for rapid genotyping of polymorphisms affecting warfarin dose [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008,129(6):876–883.
- [20] 施宏,虞闰六,马金飞,等. 单管 PCR-Pyrosequencing 快速检测华法林代谢酶基因多态性的建立[J]. *遗传*, 2011,33(11):1283–1290.
- [21] Okada Y, Nakamura K, Adachi A, et al. Development of a single-tube PCR-pyrosequencing method for the simultaneous and rapid detection of four variant alleles of CYP2C9 gene polymorphism[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2008,33(2):187–192.
- [22] Kim KA, Song WG, Lee HM, et al. Multiplex pyrosequencing method to determine CYP2C9*3, VKORC1*2, and CYP4F2*3 polymorphisms simultaneously: its application to a Korean population and comparisons with other ethnic groups[J]. *Mol Biol Rep*, 2014,41(11):7305–7312.
- [23] Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, et al. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye[J]. *Clin Chem*, 2004,50(8):1328–1335.
- [24] 崔广林,丁虎,徐宇军,等. 高分辨率熔解曲线方法在指导华法林使用起始剂量基因分型中的应用及临床各种基因分型方法的比较[J]. *中华心血管病杂志*, 2012,40(6):477–481.
- [25] 庄文芳,吴德沛,王兆钺. 上海地区服用华法林人群相关基因型及非遗传因素对用药剂量的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2014,35(1):13–17.
- [26] Chen C, Li S, Lu X, et al. High resolution melting method to detect single nucleotide polymorphism of VKORC1 and CYP2C9[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014,7(5):2558–2564.
- [27] van Schie RM, Wadelius MI, Kamali F, et al. Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design[J]. *Pharmacogenomics*, 2009,10(10):1687–1695.
- [28] Howard R, Leathart JB, French DJ, et al. Genotyping for CYP2C9 and VKORC1 alleles by a novel point of care assay with HyBeacon probes[J]. *Clin Chim Acta*, 2011,412(23–24):2063–2069.
- [29] Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin[J]. *N Engl J Med*, 2013,369(24):2294–2303.
- [30] Carlquist JF, McKinney JT, Nicholas ZP, et al. Rapid melting curve analysis for genetic variants that underlie inter-individual variability in stable warfarin dosing [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2008,26(1):1–7.
- [31] Yang S, Xu L, Wu HM. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms influencing warfarin drug response by surface-enhanced laser desorption and ionization time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry[J]. *J Mol Diagn*, 2010,12(2):162–168.
- [32] 黄盛文,向道康,吴海丽,等. 五种基因多态性对华法林用量个体差异影响的研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011,28(6):661–665.
- [33] Huang SW, Chen HS, Wang XQ, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2009,19(3):226–234.
- [34] Howard D. 510(k) summary[EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/k073071, 2009–02–06/2014–12–21.
- [35] Deborah K. 510(k) summary[EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/k071867, 2008–04–28/2014–12–21.
- [36] Sue K. 510(k) summary[EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/k070804, 2007–09–17/2014–12–21.
- [37] Robert D. 510(k) summary[EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/k073720, 2008–07–17/2014–12–21.
- [38] John R. 510(k) summary[EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/k110786, 2011–12–02/2014–12–21.
- [39] Evelyn L. 510(k) summary[EB/OL]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/k073014, 2008–01–28/2014–12–21.

• 综 述 •

细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)与免疫调节

黄元兰¹ 闫伟¹ 付兆强¹ 邓安梅^{2*}

[摘 要] 细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)是一类可由多种细胞因子诱导产生,又能通过多种途径对细胞因子的信号转导进行负向调节的蛋白质分子。众多研究发现 SOCS 蛋白家族是一个非常重要的可以负向调节 JAK/STAT 信号通路的分子家族。本文将着重阐述介绍 SOCS 家族在炎症和自身免疫性疾病中的作用。

[关键词] SOCS; 固有免疫; 炎症

The suppressor of cytokine signaling and immunoregulation

HUANG Yuanlan¹, YAN Wei¹, FU Zhaoqiang¹, DENG Anmei^{2*}

(1. Clinical Laboratory, The Four Five Five Hospital of PLA, Shanghai, China, 200052; 2. Laboratory Department of Changhai Hostital, Shanghai, China, 200052)

[ABSTRACT] The suppressor of cytokine signalling is a protein family which can be induced by various cytokines. But, it can negatively regulate the signal transduction of the cytokines through a variety of ways. Many studies were found that the SOCS family played an important role in negatively regulating the JAK/STAT signalling pathway. In this review, we will introduce the relationship between the SOCS and inflammation, autoimmune diseases.

[KEY WORDS] SOCS; Innate immune; Inflammation

细胞因子在骨髓细胞及淋巴细胞的发育、分化以及发挥功能等几个方面起着重要的作用。如白介素、干扰素以及造血生长因子等能活化 JAK 的信号转导以及促进 STAT 通路的转录^[1-2]。在 JAK/STAT 信号通路中,细胞因子的结合可以导致受体的低聚反应从而启动 JAK 激酶(JAK1, JAK2, JAK3 以及 Tyk2)的活化。而 CIS/SOCS(细胞因子信号通路阻抑蛋白家族)是其中重要的调节细胞因子信号通路的蛋白质家族^[3-5]。CIS 是这个家族中第一个被发现的细胞因子诱导的含有 SH2 区域的蛋白成员^[6],研究者认为 CIS 是由 EPO(红细胞生成素)诱导出来的具有调节早期基

因功能的分子。报导指出 CIS 是 STAT5 信号通路的负反馈调节因子,它可以通路其 SH2 结构区与细胞因子受体的磷酸氨基酸残基结合,从而掩盖 STAT5 的结合位点。已有 CIS 转基因小鼠的体内实验指出, CIS 是一个非常特异的 STAT5 的负向调节因子^[7]。这个家族的第二个成员是由 3 个不同的研究小组通过不同的方法验证到,并为之命名 SOCS1(细胞因子信号通路阻抑蛋白 1)或 JAB(JAK 结合蛋白)^[3,8-9]。研究指出该 SOCS1 分子可以与 JAK 激酶相结合进而极强地抑制 JAK 酪氨酸激酶的活性。与此同时,众多的研究发现 SOCS 蛋白家族是一个非常重要的可以负向调节 JAK/

基金项目:国家自然科学基金(81273282, 811070263)

作者单位:1. 中国人民解放军第四五五医院检验科,上海 200052

2. 长海医院检验科,上海 200052

*通讯作者:邓安梅, E-mail:amdeng70@163.com

STAT信号通路的分子家族。除此之外,最新的基因缺陷小鼠研究还指出 SOCS 蛋白家族在免疫功能、动脉粥样硬化、代谢性疾病以及肿瘤中也起着的调控作用^[10-16]。本文将着重阐述介绍 SOCS(细胞因子信号抑制蛋白)家族与炎症和自身免疫之间的相互作用。

1 CIS/SOCS 家族

CIS/SOCS 家族是一组胞内蛋白,是由细胞分泌产生却能反馈性抑制细胞因子信号转导的负向调节因子。该家族由 8 个成员所组成:分别是 CIS、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6 和 SOCS7。它们有着相似的结构,都包括中央的 SH2 结构域,长度和序列可变的氨基端结合区以及称之为 SOCS 盒含有约 40 个氨基酸残基的羧基端保守序列即 CH 结构域^[17]。Yasukawa^[18]等指出 SOCS1 和 SOCS3 都可以通过 KIR(N-末端的激酶抑制结构)直接抑制 JAK 酪氨酸激酶的活性。Sasaki^[19]等指出 SOCS3 结构中 SH2 区域对 JAK 激酶的活化没有很高的亲和力,而反过来,SOCS3 蛋白中的 KIR(激酶抑制结构)却与 JAK2 有着较高的亲和力。SOCS3 相结合的受体可以活化 STAT3,因此 SOCS3 对 STAT3 有着较为特异的抑制作用,此外,在受到 IL-12 活化后,SOCS3 还能抑制 STAT4 的活性^[20]。SOCS1 和 SOCS3 不仅可以抑制 STAT 活性,还能抑制其它信号通路,如 Ras/ERK,以及 PI3K 从而影响细胞的增殖、分化和凋亡等^[20]。经细胞因子或生长因子刺激后,SOCS3 酪氨酸磷酸化,而 Y221 受到磷酸化的 SOCS3 作用可以与 P120-RasGAP 相互作用,从而促进了 ERK 的活化。虽然 SOCS 蛋白可以抑制生长因子的反应性,然而经磷酸化 SOCS3 却能通过 Ras 通路保证细胞的存活以及增殖^[21]。

2 SOCS 与炎症的关系

2.1 SOCS1 与组织炎症

SOCS1 是机体炎症反应的重要调节因子。早期正常的小鼠将 SOCS1 敲除 3 周后可发现生长停滞及死亡现象,同时出现外周 T 细胞的活化,肝脏的坏死以及主要器官中巨噬细胞的浸润^[22]。此外 Alexander 等研究指出 SOCS1 敲除小鼠对 IFN γ 信号通路出现了高敏反应从而导致小鼠出现炎症

继而死亡。如果 SOCS^{-/-}小鼠中的 IFN γ 基因或是 IFN γ 受体基因缺失的话,则新生小鼠的死亡率则会大大降低^[22]。Tanaka 等^[23]通过分析 T 细胞特异性 SOCS1 敲除小鼠实验证实 SOCS1 是一个极为重要的 T 细胞负向调节因子。经特异性敲除的小鼠出现了各种炎症性疾病以及 IFN γ 水平的高表达。此外,还有报导指出 SOCS1 可以通过调节固有免疫细胞和非免疫细胞来抑制炎症反应。Torisu 等通过研究肝脏特异性 SOCS1 敲除小鼠发现肝细胞中 SOCS1 基因的缺失可以促进凋亡信号通路的活化(包括 STAT1 和 JNK 信号通路)从而引起 ConA(伴刀豆球蛋白 A)诱导的肝炎^[24]。NKT 细胞中 SOCS1 基因的缺失可以出现 I 型 NKT 细胞的大量减少,II 型 NKT 细胞的增多从而引起 ConA(伴刀豆球蛋白 A)诱导的肝炎。然而 SOCS1 缺失小鼠中 I 型 NKT 细胞与 II 型 NKT 细胞之间平衡机制则有待研究和阐述。除此之外,研究还发现巨噬细胞中 SOCS1 缺失可引起机体对 LPS 的高度反应性^[25],DC 细胞 SOCS1 缺失可以促进 Th1 细胞的超活化从而引起狼疮样自身免疫性疾病以及抗肿瘤免疫反应^[26-27]。Chinen 等^[10]指出 SOCS1 通过调节抑制前列腺素 E-2(PGE2)介导的 DC 以及巨噬细胞从而在肠道免疫平衡中起着重要的作用。研究指出 SOCS1/Rag2 敲除的新生小鼠虽然不会立即死亡,但是在其 2~6 个月之后就会出现严重的结肠炎,析其原因主要是由于 PGE-2 介导的抗炎性机能的损伤。有报导指出 PGE2 能通过 C-Fos 来抑制 NF- κ B 的活化从而阻抑了 TLR 信号通路^[28]。而 SOCS1 缺失的 DC 细胞中该抑制系统受到损伤导致了 STAT1 的超活化。此外,还有报导指出 SOCS1 还参与了糖皮质激素介导的 STAT1 抑制机制^[29-30]。

2.2 SOCS1 与感染

结核杆菌感染后 SOCS1 水平明显增高且其对 IL-12 的反应性降低从而引起巨噬细胞分泌 IFN- λ 的能力受损。在感染早期,巨噬细胞中表达的 SOCS1 以 IFN- λ 依赖的方式阻碍了结核杆菌的清除。而另一方面,非巨噬细胞中表达的 SOCS1 则保护机体使其免受感染诱导的炎症反应^[31]。同样地,机体在受到刚地弓形虫感染后,SOCS1 的表达也增高。丙型肝炎病毒核心蛋白能通过与 Gc1qR 补体受体相互作用从而启动 SOCS1 的表达^[32]。以

上这些研究都表明巨噬细胞经各种病毒感染后可以诱导 SOCS1 的表达进而抑制 TLR 信号通路,减少 IL-12 的分泌以及降低 IFN- λ 的反应性。这是各种病原微生物躲避宿主免疫一个重要的机制。

2.3 SOCS3 调节 IL-6 介导的抗炎和促炎反应

SOCS3 在固有免疫炎症中的作用机制较为复杂。Yasukawa 等^[33]研究发现 SOCS3 缺陷小鼠巨噬细胞可以促进 STAT3 的抗炎效应从而减少炎症因子的产生从而能使小鼠不患内毒素血症。此外研究还发现巨噬细胞特异的 SOCS3 敲除小鼠可以降低 IL-12 的反应性从而更易患弓形虫病。SOCS3 在抑制 IL-6 信号通路促进机体对控制刚地弓形虫感染的免疫反应中起着重要的作用^[34]。研究还发现,造血细胞中 SOCS3 缺陷的小鼠在成长过程中更易患致命性炎症性疾病,并在关节中出现大面积的病理组织的改变以及 IL-6 表达的增高^[35]。总得来说 SOCS3 对机体的炎症反应既可以发挥抗炎作用也具有促进炎症反应的效应,这种选择效应主要依赖于 IL-6 在机体中起着促炎或是抗炎作用。

3 SOCS 与固有免疫

机体对病原微生物的免疫作用通常可以分为固有免疫与获得性免疫两种,而固有免疫则可以通过各种途径非特异性的防御各种入侵的病原体。TLR 信号通路就可以在机体受到病原体入侵时启动自身的固有免疫反应从而清除相应的病原体。而这一作用机制应受到严密的调控以防止过度的炎症反应对机体造成的损伤。

3.1 SOCS1 与 TLR 信号通路

有研究表明,SOCS1 缺陷小鼠对 LPS 呈现高反应性和敏感性从而导致肿瘤坏死因子(TNF)及 IL-12 的产生增高^[36]。众所周知,IFN- λ 是内毒素休克一个非常重要的调节因子。而在 SOCS1 敲除的小鼠中体内注射 LPS 后,发现自然杀伤细胞(NK 细胞)及 T 细胞分泌 IFN- λ 急剧增加致小鼠发生内毒素休克^[37]。另有研究报道^[26,36,38],SOCS1 敲除小鼠中巨噬细胞,树突状细胞以及成纤维细胞与 Toll 样受体配体结合反应后分泌的促炎症因子如 TNF,IL-12,IFN- λ 以及 NO 水平增高。目前,对 SOCS1 抑制细胞因子产生分泌的机制也有了较多的报导和研究。如 SOCS1 可以直接作用于 TLR-

NF- κ B 信号通路,它可以与 NF- κ B 的亚基 p65 结合并促进 p65 的泛素化从而使 p65 降解。Mal 是一类具有介导特定 TLR 功能的含有 TIR 结构域的衔接蛋白,Mansell 等^[39]采用基因转染技术发现 SOCS1 能对 Mal 信号进行调控,它通过与 BTK 激素相互作用,使 Mal 发生泛素化及酪氨酸磷酸化并促进 Mal 分子的降解,抑制了 Mal 依赖的 p65 磷酸化及 NF- κ B 的活化最终起到抑制多种致炎性细胞因子的分泌。此外,SOCS1 还能对 MyD88 非依赖的信号进行调控,它通过抑制 JAK/STAT 信号通路的活性来调节巨噬细胞的活化^[40-41]。TRIF (TIR domain-containing adapter including INF- β) 是另一个含有 TIR 结构域的衔接蛋白,它能特异性介导 MyD88 非依赖的信号途经。Toll 受体通过该信号通路能活化 NF- κ B 以及干扰素调节因子 3 (interferon regulator factor3, IRF3),从而诱导 INF- β 的表达促使机体产生免疫反应。而反过来,INF- β 又能通过各种方式活化 JAK/STAT1 信号通路。

3.2 SOCS3 与 TLR 信号通路

IL-6 是在众多炎症性疾病的发病过程中起重要作用的促炎症因子。IL-10 是具有潜在抗炎活性的免疫调节因子,它可以经 TLR 信号通路抑制靶基因的活化。SOCS3 是巨噬细胞中一个非常重要的诱导蛋白,LPS 刺激后,SOCS3 能通过 Toll 受体调节 IL-6 和 IL-10 的活性^[33,42]。现有的研究已知,STAT3 是调节 IL-6 和 IL-10 生物学活性的一个重要的因素,然而对于 IL-6 和 IL-10 为何有着截然不同的生物学作用,尚没有相关报导。在正常情况下,组织细胞内 SOCS3 的表达水平比较低,然而在 LPS 刺激下,许多细胞因子如 IL-10 和 IL-6 迅速诱导 SOCS3 的转录,且研究发现这种诱导效应具有较为明显的组织和细胞特异性^[33]。SOCS3 能与 IL-6 受体的亚基 gp130 结合从而选择性抑制 IL-6 信号通路,因此在 IL-6 的作用下,SOCS3 能够被短暂活化。相反,因 SOCS3 不能与 IL-10 受体结合,所以 SOCS3 对 IL-10 的反应较为持久。最近的研究指出 SOCS3 持续活性可以抑制 LPS 诱导的巨噬细胞产生 IL-6 和肿瘤坏死因子^[43-44]。我们可以得出,STAT3 持续活化对机体起着重要的抗炎作用,而 STAT3 的瞬时活化则促进机体的炎症反应。SOCS3 则能通过与乙酰胆碱受体结合促进

STAT3 的活化从而抑制 TLR 信号的传导。STAT3 的超活化能抑制肿瘤细胞分泌 NF- κ B 介导的趋化因子和细胞因子从而阻断了机体的抗肿瘤免疫反应^[45]。总的来说,SOCS3 主要通过调节 STAT3 的活化来调控 TLR 信号通路。

3.3 SOCS 与 DC 的活化

树突状细胞(dendritic cell, DC)是固有免疫与获得性免疫的桥梁,是一种重要的抗原递呈细胞。它们可以与受体结合捕获并递呈抗原,迁移至淋巴器官并表达各种共刺激性分子以促进抗原特异性细胞的活化。SOCS 蛋白在 DC 的成熟及免疫应答中起着重要的作用。GM-CSF 是诱导未成熟 DC 转化为成熟 DC 一个重要的细胞因子,而 SOCS1 能通过 TLR 信号途径抑制 GM-CSF 的活化从而调节 DC 的功能^[46]。此外,SOCS1 也可以负向调控 LPS 和 IL-4 诱导 DC 的成熟。SOCS1 在 DC 的发育,成熟以及活化过程中都起着重要的作用。有研究显示,SOCS1 缺失小鼠更容易患系统性自身免疫病^[27]。SOCS3 对 DC 介导的 T 细胞的分化起着重要的作用。报导指出 SOCS3 转导的 DC 其细胞表面表达低水平 MHCII 分子和 CD86 分子。该类细胞分泌高水平 IL-10,而 IL-12, IFN- λ 和 IL-23 p19 的水平则较低。该研究还指出 SOCS3 转导的 DC 可以有效地促进 Th2 细胞的分化^[47]。往野生型小鼠中注射 SOCS3 转导的 DC 可以抑制 EAE(实验性自身免疫性脑脊髓炎)——一种 Th17 介导的自身免疫性中枢神经系统疾病的发展。其根本原因可能是 SOCS3 转导的 DC 一方面可以促进 Th2 细胞的分化,另一方面它又能降低 IL-23 的产生,抑制 Th17 的分化。

4 SOCS 与炎症性疾病

有数据显示有许多自身免疫性疾病和恶性肿瘤都是由炎症所引发,或者说因炎症而恶化。原发性胆汁性肝硬化患者肝脏的炎性浸润是 PBC 发病的一个重要因素^[48],HCV 的感染是 HCC(肝细胞癌)发病的一个主要原因^[49]。研究还发现 SOCS1 是 PBC 发病的机制的一个重要因素,而 HCV 感染的患者其 SOCS1 的表达也发生的改变^[15]。其肝脏的损伤与 STAT1 的超活化及 STAT3 的低活化有关。而降低 SOCS1 的表达可以促进 STAT1 的超活化从而引起肝脏组织的炎症损伤最终导致肿瘤的发生。

因此我们总结 SOCS1 可以通过抑制慢性炎症损伤从而保护机体不受肿瘤的侵袭^[50]。SOCS3 在肿瘤的发生、发展的过程中也起着一定的作用。HCV 感染的患者其癌组织中的 SOCS3 表达水平下调,经研究发现 SOCS3 的下调可使 STAT3 发生超活化从而诱导多种促肿瘤基因的表达最终促进肿瘤的发生。

5 结语

自 1997 年首次发现 SOCS 家族开始,在过去的几十年中,对 SOCS 蛋白的结构和功能的研究已有较多的报导。SOCS 家族是一类由细胞分泌产生却能反过来负向调节抑制细胞因子信号转导的调节因子,它可以调控机体的免疫反应和炎症。SOCS 家族的各个成员参与了各种炎症和感染,这为以后深入研究炎症性疾病以及与感染相关疾病奠定了一定的基础。同时,SOCS 分子可以作为负向调节 JAK-STAT 信号通路的一个重要的调节因子从而参与了许多疾病如自身免疫性疾病,炎症和肿瘤的发生发展。因此对 SOCS 的深入了解和研究可能为探寻自身免疫性疾病、肿瘤等疾病的发病机理提供新的思路,进而更好地指导临床治疗。

参考文献

- [1] O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway[J]. *Cell*, 2002,109(4):121-131.
- [2] Adamson AS, Collins K, Laurence A, et al. The current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players[J]. *Curr Opin Immunol*, 2009,21(2):161-166.
- [3] Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases[J]. *Nature*, 1997,387(6636):921-924.
- [4] Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity[J]. *Nat Immunol*, 2003,4(12):1169-1176.
- [5] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007,7(6):454-465.
- [6] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated inter-

- leukin 3 and erythropoietin receptors[J]. *EMBO J*, 1995,14(12):2816–2826.
- [7] Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, et al. Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice[J]. *Mol Cell Biol*, 1999,19(9):6396–6407.
- [8] Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor [J]. *Nature*, 1997,387(6636):924–929.
- [9] Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling[J]. *Nature*, 1997, 387(6636):917–921.
- [10] Chinen T, Komai K, Muto G, et al. Prostaglandin E2 and SOCS1 have a role in intestinal immune tolerance [J]. *Nat Commun*, 2011,2(8):190.
- [11] Hiwatashi K, Tamiya T, Hasegawa E, et al. Suppression of SOCS3 in macrophages prevents cancer metastasis by modifying macrophage phase and MCP2/CCL8 induction[J]. *Cancer Lett*, 2011,308(2):172–180.
- [12] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011,31(5):980–985.
- [13] Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, et al. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis [J]. *J Exp Med*, 2009,206(10):2067–2077.
- [14] Mori H, Hanada R, Hanada T, et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity[J]. *Nat Med*, 2004,10(7) : 739–743.
- [15] Yoshida T, Ogata H, Kamio M, et al. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis[J]. *J Exp Med*, 2004,199(12):1701–1707.
- [16] Ogata H, Chinen T, Yoshida T, et al. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production[J]. *Oncogene*, 2006,25(17):2520–2530.
- [17] Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, et al. Cloning and characterization of novel CIS family genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997,239(2):439–446.
- [18] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop[J]. *EMBO J*, 1999,18(5):1309–1320.
- [19] Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain[J]. *Genes Cells*, 1999,4(6):339–351.
- [20] Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, et al. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,310(4):1188–1193.
- [21] Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras[J]. *Nat Cell Biol*, 2001,3(5):460–465.
- [22] Marine JC, Topham DJ, McKay C, et al. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality[J]. *Cell*, 1999,98(5):609–616.
- [23] Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, et al. Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads[J]. *J Immunol*, 2008,180(6):3746–3756.
- [24] Torisu T, Nakaya M, Watanabe S, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by inhibiting apoptosis[J]. *Hepatology*, 2008,47(5):1644–1654.
- [25] Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation[J]. *Immunity*, 2002,17(5):583–591.
- [26] Hanada T, Tanaka K, Matsumura Y, et al. Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene[J]. *J Immunol*, 2005,174(7): 4325–4332.
- [27] Hanada T, Yoshida H, Kato S, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity[J]. *Immunity*, 2003,19(3):437–450.
- [28] Koga K, Takaesu G, Yoshida R, et al. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein[J]. *Immunity*, 2009,30(3):372–383.
- [29] Bhattacharyya S, Zhao Y, Kay TW, et al. Glucocorticoids target suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and type 1 interferons to regulate Toll-like receptor-induced STAT1 activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(23):9554–9559.
- [30] Haffner MC, Jurgeit A, Berlato C, et al. Interaction and

- functional interference of glucocorticoid receptor and SOCS1[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(32):22089–22096.
- [31] Carow B, Ye X, Gavier-Widen D, et al. Silencing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in macrophages improves *Mycobacterium tuberculosis* control in an interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent manner [J]. *J Biol Chem*, 2011,286(30):26873–26887.
- [32] Zhang P, Zhao Y, Zhu X, et al. Cross-talk between phospho-STAT3 and PLCgamma1 plays a critical role in colorectal tumorigenesis[J]. *Mol Cancer Res*, 2011,9(10):1418–1428.
- [33] Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2003,4(6):551–556.
- [34] Whitmarsh RJ, Gray CM, Gregg B, et al. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*[J]. *Cell Host Microbe*, 2011,10(3): 224–236.
- [35] Wong PK, Egan PJ, Croker BA, et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis[J]. *J Clin Invest*, 2006,116(6):1571–1581.
- [36] Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses [J]. *Immunity*, 2002,17(5):677–687.
- [37] Car BD, Eng VM, Schnyder B, et al. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock [J]. *J Exp Med*, 1994,179(5):1437–1444.
- [38] Chinen T, Kobayashi T, Ogata H, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates inflammatory bowel disease in which both IFNgamma and IL-4 are involved [J]. *Gastroenterology*, 2006,30(2):373–388.
- [39] Mansell A, Smith R, Doyle SL, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation[J]. *Nat Immunol*, 2006,7(2):148–155.
- [40] Gingras S, Parganas E, de Pauw A, et al. Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 2004,279(52):54702–54707.
- [41] Baetz A, Frey M, Heeg K, et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(52):54708–54715.
- [42] El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, et al. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response [J]. *J Immunol*, 2006,177(11):7880–7888.
- [43] Williams LM, Sarma U, Willets K, et al. Expression of constitutively active STAT3 can replicate the cytokine-suppressive activity of interleukin-10 in human primary macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2007,282(10):6965–6975.
- [44] Nishinakamura H, Minoda Y, Saeki K, et al. An RNA-binding protein alphaCP-1 is involved in the STAT3-mediated suppression of NF-kappaB transcriptional activity[J]. *Int Immunol*, 2007,19(5):609–619.
- [45] Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells[J]. *Nat Med*, 2004,10(1):48–54.
- [46] Bartz H, Avalos NM, Baetz A, et al. Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation[J]. *Blood*, 2006,108(13):4102–4108.
- [47] Li Y, Chu N, Rostami A, et al. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo[J]. *J Immunol*, 2006,177(3):1679–1688.
- [48] Qian C, Jiang T, Zhang W, et al. Increased IL-23 and IL-17 expression by peripheral blood cells of patients with primary biliary cirrhosis[J]. *Cytokine*, 2013,64(1): 172–180.
- [49] Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development[J]. *Cancer Sci*, 2006,97(6):439–447.
- [50] Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, et al. IFNgamma-dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(6):1391–1397.

• 综 述 •

实时荧光定量 PCR 检测血清/血浆 microRNAs 临床应用前的准备

邓开凤 戴盛明*

[摘 要] 现已证明血清/血浆 microRNAs(miRNAs)表达谱的变化与多种疾病的发生、发展相关。血清/血浆 miRNAs 分子稳定,不易降解,且标本采集创伤小、便捷,非常适合应用于临床实验室检测。因此 miRNAs 极有可能成为未来疾病诊断和预后评估的分子标志物乃至治疗靶标。实时荧光定量 PCR 检测法(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)操作简便,需要的 RNA 量较少,灵敏度极高,能在短时间内获得结果,并可同时检测多种 miRNAs 表达,有良好的应用前景。本文将详细探讨现阶段用于血清/血浆 miRNAs 定量检测的 RT-qPCR 方法,以及总结血清/血浆 miRNAs 定量检测应用于临床检验应注意的问题。

[关键词] MicroRNAs; 血清/血浆; 实时荧光定量 PCR

The preparation of real-time fluorescent quantitative PCR detection of serum/plasma microRNAs before clinical application

DENG Kaifeng, DAI Shengming*

(Liuzhou Key Laboratory of Tumor Diseases and Prevention, Clinical Laboratory, Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi, China, 545005)

[ABSTRACT] It has been proved that the changes of serum/plasma microRNAs(miRNAs) expression relates to the occurrence and development of various diseases. The molecular of serum/plasma miRNAs are stable and hard to degrade. It is easy to obtain blood specimen from small wound and suitable to detect for clinical laboratory. Therefore, miRNAs are most likely to become a potential biomarker for disease diagnosis and prognosis evaluation, even the target spot of treatment. As is easy to operate with few RNA, and with high sensitivity to detect a variety of miRNAs expression in a short time, real time fluorescence quantitative PCR(RT-qPCR) detection method has a good application prospect. In this paper, a review on the detection methods of serum/plasma miRNAs with RT-qPCR at the present stage will be discussed, and the counter-measures on the clinical application of serum/plasma miRNAs quantitative detection will be summarized.

[KEY WORDS] MicroRNAs; Serum/plasma; Real-time quantitative PCR

miRNAs发现始于1993年, Lee等研究人员在秀丽新小杆线虫(*caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)中意外发现控制着线虫时序性发育的双链小RNA分子lin-4^[1]。直至2000年, Reinhart^[2]等发现第二个具有转录后调节功能的RNA小分子

let-7, miRNAs才逐渐进入人们的视野成为一个崭新的研究领域。越来越多的研究人员相继发现了这类具有调控作用的小RNA分子。目前人们普遍的共识是:miRNAs是一类高度保守, 长度在19~24个核苷酸(nucleotide, nt)左右的内源性非

基金项目:国家自然科学基金(81160269)

作者单位:广西医科大学第四附属医院医学检验科, 柳州市肿瘤疾病与防治重点实验室, 广西, 柳州 545005

*通讯作者:戴盛明, E-mail:daishm@sina.com

编码小分子 RNA。而外周血循环 miRNAs 是组织细胞分泌产生^[3],成熟的 miRNAs 在细胞内被脂质或脂蛋白包被成外切酶体(exosome),分泌至胞外并进入血液,外切酶体通过内吞作用进入受体细胞,释放出 miRNAs 发挥生物学功能^[4]。生物信息学预测发现,哺乳动物 miRNAs 能调控超过 60% 的基因,在细胞发育、凋亡、分化、增殖等重要的生理病理过程中均发挥重要作用^[5]。疾病时期,血清/血浆中相关 miRNAs 表达谱以及含量的改变提示人们 miRNAs 或可成为一种新的有助于疾病预测、诊断和预后的标志物^[6]。血清/血浆 miRNAs 的稳定使其定量检测成为可能。由于 miRNAs 分子量小,表达水平极低,因而需要极为灵敏的定量分析方法,实时荧光定量 PCR 检测法(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)被认为是 miRNAs 定量的金标准^[7],本文将详细探讨现阶段用于血清/血浆 miRNAs 定量检测的 RT-qPCR 技术及存在的问题。

1 血清/血浆 miRNAs 实时荧光定量 PCR 检测

RT-qPCR 是指在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量。其能在短时间内获得结果,可同时检测多个 miRNAs 表达,需要的 miRNAs 量较少(1~10 ng 总 RNA),因而特别适合于 miRNAs 含量极低的血清/血浆检测^[8]。miRNAs 是极有吸引力的候选生物标志物,而 RT-qPCR 检测血清/血浆 miRNAs 如要应用于临床,在实验的每个阶段都必须有统一的质量控制标准,才能获得准确、可重复的结果,包括分析前的质量控制,如标本的选择,采集与运送保存;分析中 miRNAs 提取操作流程,cDNA 的合成策略,RT-qPCR 中引物设计,校参选择,扩增产物检测,以及后续的数据分析,都应具备最可靠的溯源。

1.1 分析前

标本的选择,采集与运送保存:尽管 miRNAs^[9-11]在其他体液如乳汁、尿液甚至是唾液中也存在(含量更微),但血液检测最方便、可信,因此血液检测仍然是目前临床上最常用的检测标本。已有实验证明^[12],血浆与血清 miRNAs 含量无

明显差异,且具有很强的相关性,均适合作为疾病的标志物检测样本。实验室定量实验前应根据前期目的 miRNAs 筛选样本,或者通过比较实验选取最佳的样本类型,如是血浆还需注意抗凝剂对 PCR 扩增效率的影响^[13]。标本细胞残留、溶血、脂血、黄疸对检查都有影响;某些目的 miRNAs 在血细胞中亦有表达^[14-15],则须在血清/血浆收集时优化离心力的大小、离心次数,以尽可能的消除残余细胞污染;溶血可干扰 PCR 反应过程^[16],则应避免造成血球破裂的动作,如用太细的针头抽血、或病人本身因疾病或治疗造成的败血或溶血现象等可能影响结果的因素都必须列入评估;脂血、黄疸等异常标本也应通过实验验证对检测结果产生何种影响。

miRNAs 在血清/血浆中存在较稳定^[17],耐 RNA 酶降解,煮沸、反复冻融、酸碱环境等各种处理方法均不会造成 miRNAs 损失^[4,18],但随着保存时间的延长,依然能观察到血清/血浆 miRNAs 会发生不同程度的降解^[19]。因此需要制定统一规范的标本采集、运送与分装保存流程,以期尽可能减少 miRNAs 的降解,保证检测结果的重复性与准确性,以及不同病程时期结果的可比性。

1.2 分析中

1.2.1 miRNAs 提取

目的 miRNAs 提取量的多少直接决定后续检测结果。血清/血浆 miRNAs 分子量小,且含量极低,如何从样本中分离出全面、且浓度高的 RNA 组分是 miRNAs 检测的前提。目前实验室常用的 RNA 提取纯化方法,如有机溶剂抽提加乙醇沉淀法,能较好地保留小分子 RNA,然而后续的脱盐和沉淀步骤容易导致 miRNAs 流失、盐类和有机溶剂残留,影响定量实验操作反应^[20];而硅胶膜离心柱法只能富集较大分子的 RNA(>200 nt),小分子 RNA 往往被漏掉,因而不适用于小分子 RNA 的分离纯化。这两种方法都存在标本需要多、人为误差大、提取效率有差异、获得的 miRNAs 种类及数量差异大等缺点^[21],因此无法保证 miRNAs 检测结果的重复性与准确性。商品化的试剂盒因其优化的实验设计和统一的操作流程,能有效快速地纯化 miRNAs,实现样本处理的标准化,因此选择最优的 miRNAs 提取试剂盒是保证结果稳定准确的另一前提。

1.2.2 cDNA 合成

成熟的 miRNAs 只有 19 ~ 24 nt, 无 Poly A 尾, 使得 miRNAs 的逆转录较 mRNA 更为复杂。目前, miRNAs 逆转录的方法主要有特异性茎环引物法和 miRNAs 加尾法。茎环引物法^[22](见图 1)针对目的 miRNAs 设计一段特殊的茎环状引物, 该引物中除含有一段与被检 miRNAs 互补的特异序列外, 还含有一段较长的本身有部分碱基互补配对并形成环状的共有序列。茎环状引物与被检 miRNAs 退火反转录后, 能得到一段较长的 cDNA, 然后以此为模板, 针对特异的 miRNAs 设计引物进行 PCR 扩增, 一条 miRNAs 序列特异对应一个茎环状结构的 RT 引物; miRNAs 加尾法则先利用 Poly(A)聚合酶对总 RNA 进行加尾处理, 使所有 miRNAs 的 3'端加上一段 Poly(A)尾, 然后用带有特殊 Poly(T)接头序列的引物进行反转录合成 cDNA 第 1 链, 以此为模板, 针对目的 miRNAs 设计引物进行 PCR 扩增。

与茎环状引物法相比, RNA 加尾法的最大优点是能一次性对所有的 miRNAs 进行加尾反应, 将所有的 miRNAs 反转录为相应 cDNA, 操作及引物设计简单, 但是 RNA 在反转录前需要进行末端 Poly(A)加尾, 特异性稍低。因此, 茎环法可特异针对成熟的目标 miRNAs, 是目前最常用的定量检测已知 miRNAs 方法。综合比较, 设计特异的茎环状引物针对目的 miRNAs 是血清/血浆定量检测的较好选择, 其优点在于可以不用对 miRNAs 进行加尾, 防止引物与 miRNAs 前体及其他 RNA 结合, 逆转录引物 5'端的茎环结构形成的碱基堆积和空间限制能显著增强逆转录的特异性, 同时茎环结构打开后可以增加 miRNAs 的长度, 为 PCR 扩增提供合适的模板。primer5.0、DNastar、dnaman 以及 miRprimer 都可以设计 miRNAs 特异性茎环引物, 选择其中最合适的引物进行后续的试验。

1.2.3 qPCR 引物设计

研究人员发现越来越多的 miRNAs, 其同一家族的 miRNAs 序列往往相似, 有时只有一个碱基差异^[8]。特异性茎环逆转录引物合成后, cDNA 的 qPCR 特异性引物设计又是一大挑战。通常, 上游引物是根据 miRNAs 自身序列设计, 如 GC 含量太低, 可以在上游引物 5'端加入 GCGCC 等的保护碱基; 下游引物则在 RT 引物的反向互补序列中

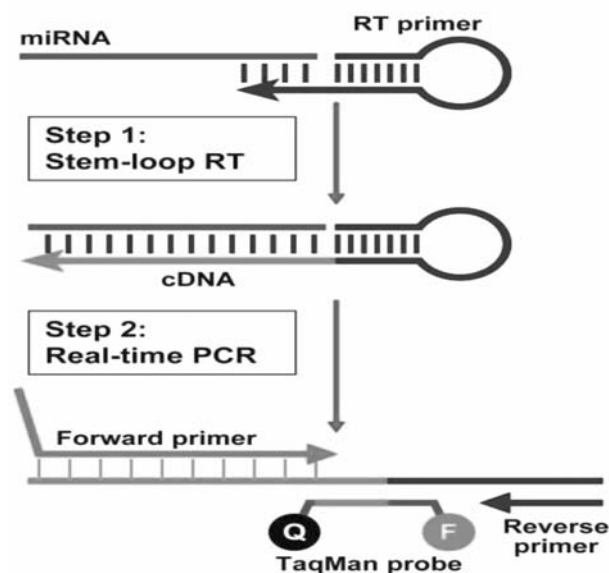


图 1 茎环法 real-time PCR 原理图^[22]

Figure 1 Schematic description of stem-loop RT real-time PCR^[22]

找。也即上游引物是每个 miRNAs 所特有的, 下游引物为通用引物。通常情况下, 上游引物序列与待测 miRNAs 序列基本一致, 并将原有的 U 替换成 T, 通过增加或减少碱基来调整 Tm 值与下游引物接近即可。

1.2.4 校参选择

qPCR 结果需要进行标准化以消除非生物学变化对结果的影响, 使用外源性小 RNA 或内源性基因是两种标准化的常用介质。早先研究人员使用外源性小 RNA 校正 qPCR 定量结果, 如线虫的 miR-39^[23]、miR-238^[24]等。但后来的研究发现, 如果把纯化出的 miRNAs 加入到血清/血浆中时, 会发生降解的现象^[25]。因此, 外源性小 RNA 不能很好的监测 miRNAs 的提取效率, 更无法校正 cDNA 合成效率以及 qPCR 定量结果, 而不具有参照作用。这一结果也提示研究人员在目的 miRNAs 提取后应采取措施避免靶核酸的降解, 尽快进行后续的逆转录以及定量 PCR 反应。

内源性基因是目前使用最广泛的校参策略。理想的内参基因应该在所要研究的疾病体系或样品类型中都表达恒定。早前的内源性基因如 miR-16, 在后来的研究中发现, 其在肿瘤的发生发展中也扮演着重要的角色^[3], 并且在癌症患者与正常对

照之间表达有显著差异,溶血也会影响 miR-16 含量检测^[26],说明其无法作为某一疾病的内参;而 U6 snRNA (简称 U6),在血清血浆中表达水平较低,并且在肝癌患者中表达下调,说明也无法胜任肝脏疾病的内参^[27]。可见必须根据病种筛选适合试验体系的特异性稳定表达的内参基因^[28]。采用多个内源性基因以组合的方式作为内参的研究,Chen^[29]利用 Illumina 筛选检测以及 RT-qPCR 验证,发现血清中 Let-7d、Let-7g 和 Let-7i 的 miRNAs 组合模式优于前人用过的 U6、RNU44、RNU48 等,并可作为多种疾病定量的内参选择。专用于筛选稳定性内参基因的软件,如 GeNorm、BestKeeper 和 NormFinder,在研究某一疾病 miRNAs 表达谱变化时,即可利用以上软件确定在疾病患者样本中稳定表达的内参基因^[30-31]。Han 利用 NormFinder 和 BestKeeper 程序软件发现 U6 与 miR-192 既可以单独也可以组合的模式用于胸腔积液合并肺脓肿与肺腺癌恶性肿瘤病人血清 RT-qPCR 的内参选择^[32]。Fritz^[33]则提出利用样本自身 miRNAs (21/10b) 定量比值作为肾透明细胞癌的一个血清标志物,直接简便,前提是通过大样本的标准化筛选实验证明该比值的敏感性与特异性达到临床诊断的要求。Albonico 发现 miR-17-5p/miR-155 比值可作为犬脾淋巴瘤的分子诊断工具^[34]。

1.2.5 RT-qPCR 产物检测与数据分析

qPCR 产物检测主要有 SYBR-Green I 和 TaqMan 探针 2 种方法,目前主流使用的是 TaqMan 探针。TaqMan 探针与特异性产物结合的短序列,其 5' 端标记荧光报告基团,3' 端含有淬灭基团,探针完好时淬灭基团吸收报告基团的荧光。当 PCR 反应进行时,Taq 酶水解探针,荧光报告基团发出荧光信号,每合成一个双链就产生一个荧光信号被仪器捕捉。TaqMan 探针不受 miRNAs 前体、引物二聚体和非特异性扩增产物的干扰,对于家族 miRNAs 的检测特异性高。

RT-qPCR 数据分析存在许多种算法。其中最简单原始的方法是 ΔCt 法,此法仅分析 Ct 值,公式为: $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$,不考虑扩增效率的影响,即认为目的 miRNAs 与内参基因的扩增效率都为 100%,所以无法准确估计目的 miRNAs 的初始含量。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法则在 ΔCt 法的基础上,将每一组样本每一个目的基因的 ΔCt 减去对

照组样本的 ΔCt ,并同时对所有结果取相反数(即加一个负运算,正数变为负数,负数变为正数),该步运算得到的结果即为 $-\Delta\Delta Ct$ 。最后,对 $-\Delta\Delta Ct$ 进行 2 的幂运算,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出倍数变化值(fold change)。fold change 值具有放大效应,可体现两组样本的差异趋势,但容易出现目的 miRNAs 含量被高估的情况。美国应用生物系统公司(applied biosystems,ABI)提供的一个分析方法是计算 $\log_2 R$,即 $\log_2$ 为底对 R 求对数,R 就是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。综合以上分析,事实上,计算出 $-\Delta\Delta Ct$ 这一步即可,得到的正值表示较对照组 miRNAs 上调,负值表示较对照组 miRNAs 下调,数据图非常直观,也没有放大效应,显著性分析较为准确。这种运算方法关键在于 $\Delta\Delta Ct$ 取相反数,以及实验组和对照组划分清晰,才能得到正确的结果。当然,也可根据目的 miRNAs (含量低) 定量的目标,在实验设计严谨,将误差控制在最小范围的情况下,选择相应的计算方法,如可放大效应的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。数据分析应该高度客观,不合理的分析会得到错误结果,因此需要通过 RT-qPCR 的每一组分进行质量评价以达到最小化变异性和最大化可重复性,而且还需要沿用通用的数据分析方法以达到临床诊断需要的基因表达分析标准化。

1.3 分析后

临床标本血清/血浆 miRNAs 在 RT-qPCR 检测后,通常涉及检验样本的保存,以备复查。未提取 miRNAs 的原始血清/血浆可根据临床的需要,如监测疾病的始末以及后续对疾病的研究等,通过分装保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或液氮的方式长期保存。而提取得到的 miRNAs,因其失去基团的保护而变得容易降解,保存条件极为苛刻,因此需要及时选择合适的方式保存。目前的方式有将 miRNAs 置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的无水乙醇里长期保存,使用时离心沉淀;或者是现今普遍为大家接受的,将 miRNAs 逆转录为 cDNA 后,再 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存,其中要注意 miRNAs 水解酶的去除,如加入 DEPC;另外,还有一个高成本的保存模式,即利用 RNA 稳定剂(RNA stable)^[35-36]与提取得到的 miRNAs 混合,经过干燥后,可长期保存达 12 年之久。以上各保存方法用于临床时,仍然需要通过实验验证,以保证血清/血浆 miRNAs 在不同时间检测结果的重复性。

2 总结

miRNAs 与疾病相关^[37], 现已利用 RT-qPCR 技术检测出非常多与疾病的诊断与治疗相关的 miRNAs 标志物。如 miRNA-143 在结直肠癌血浆样本中低表达, 研究推测其可能与提高结直肠癌患者对奥沙利铂的敏感性以及阻止 TLR2 通路有关^[38-39]。但是要将 miRNAs RT-qPCR 用于临床存在很多需要解决的问题。其一, 血清/血浆中 miRNAs 含量极少, 1 mL 血的抽提总量可能只在 ng 或 pg 等级, 这意味着在实施定量检测时, 血清/血浆 miRNAs 须从标本采集开始标准化, 拟定最佳的 miRNAs 提取方案以及最优的实验设计, 包括最大化避免 miRNAs 降解, 设计特异性茎环引物, 以及扩增效率不被抑制的 qPCR 等; 其二, 需进行大规模的健康人群筛查, 包括不同性别和年龄的血清/血浆表达谱信息, 完善相关标志物的肿瘤特异性, 以及肿瘤患者个体间的异质性, 甚至是 miRNAs 表达的时空特异性; 最后, 标准化血清/血浆 miRNAs RT-qPCR 检测的每一个细节, 使其成为疾病诊断与预后判断的有力工具。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, et al. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993,75(5):843-854.
- [2] Raihant BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates development timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000,403(6772):901-905.
- [3] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNA as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105(30):10513-10518.
- [4] Ge Q, Zhou Y, Lu J, et al. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions[J]. Molecules, 2014,19(2):1568-1575.
- [5] Calin GA, Croce CM. microRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006,6(11):857-866.
- [6] Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010,42(8):1273-1281.
- [7] Roberts TC, Coenen-Stass AM, Wood MJ, et al. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accu-

- rate quantification of extracellular microRNAs in murine serum[J]. Plos One, 2014,9(2):e89237.
- [8] Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available[J]. Methods, 2010, 50(4):244-249.
- [9] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res, 2009,15(17):5473-5477.
- [10] Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer[J]. Urol Oncol, 2010, 28(6):655-661.
- [11] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, et al. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk [J]. Silence, 2010, 1(1):1-7.
- [12] Roberts TC, Coenen-Stass AM, Betts CA, et al. Detection and quantification of extracellular microRNAs in murine biofluids[J]. Biol Proced Online. 2014, 16(1):5.
- [13] Kaudewitz D, Lee R, Willeit P, et al. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. Thromb Haemost, 2013,110(3):609-615.
- [14] Krischner MB, Kao SC, Edelman JJ, et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma[J]. Plos One, 2011,6(9):e24145.
- [15] Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies[J]. Cancer Prev Res(Phila), 2012,5(3):492-497.
- [16] Kirschner MB, Edelman JJ, Kao SC, et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers [J]. Front Genet, 2013,4:94.
- [17] Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, et al. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood [J]. J Extracell Vesicles, 2014, doi:10.3402/jev.v3.23743.
- [18] Wang Z, Luo H, Pan X, et al. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification[J]. Forensic Sci Int Genet, 2012,6(3):419-423.
- [19] Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures[J]. Plos One, 2011,6(6):e20769.
- [20] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

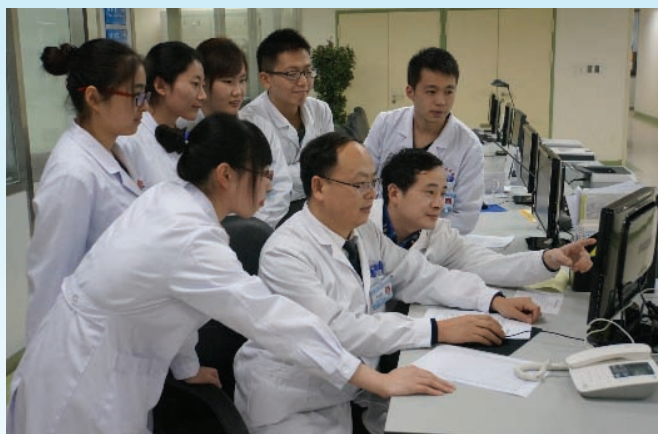
- [J]. *Methods*, 2010,50(4):298–301.
- [21] Rekker K, Saare M, Roost AM, et al. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling[J]. *Clin Biochem*, 2014,47(1–2):135–138.
- [22] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33(20):e179.
- [23] Ho AS, Huang X, Cao H, et al. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer[J]. *Transl Oncol*, 2010,3(2):109–113.
- [24] Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer[J]. *Int J Cancer*, 2011,128(3):608–616.
- [25] Arroyo JD, Chevillat JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011,108(12):5003–5008.
- [26] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010,127(10):118–126.
- [27] Ding X, Ding J, Ning J, et al. Circulating microRNA-122 as a potential biomarker for liver injury[J]. *Mol Med Rep*, 2012,5(6):1428–1432.
- [28] Wang K, Yuan Y, Cho JH, et al. Comparing the microRNA spectrum between serum and plasma[J]. *Plos One*, 2012,7(7):e41561.
- [29] Chen X, Liang H, Guan D, et al. A combination of let-7d, let-7g and let-7i serves as a stable reference for normalization of serum microRNAs[J]. *Plos One*, 2013,8(11):e79652.
- [30] Lardizábal MN, Nocito AL, Daniele SM, et al. Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity[J]. *Plos One*, 2012,7(5):e36323.
- [31] Etheridge A, Lee I, Hood L, et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers[J]. *Mutat Res*, 2011, 717(1–2):85–90.
- [32] Han HS, Jo YN, Lee JY, et al. Identification of suitable reference genes for the relative quantification of microRNAs in pleural effusion[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4):1889–1895.
- [33] Fritz HK, Lindgren D, Ljungberg B, et al. The miR(21/10b) ratio as a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 2014,50(10):1758–1765.
- [34] Albonico F, Mortarino M, Avallone G, et al. The expression ratio of miR-17-5p and miR-155 correlates with grading in canine splenic lymphoma[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013,155(1–2):117–123.
- [35] Johnson BJ, Melde BJ, Dinderman MA, et al. Stabilization of RNA through absorption by functionalized mesoporous silicate nanospheres[J]. *Plos One*, 2012,7(11):e50356.
- [36] Begolo S, Shen F, Ismagilov RF. A microfluidic device for dry sample preservation in remote settings[J]. *Lab Chip*, 2013,13(22):4331–4342.
- [37] Blondal T, Jensby NS, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids[J]. *Methods*, 2013,59(1):S1–S6.
- [38] Qian X, Yu J, Yin Y, et al. MicroRNA-143 inhibits tumor growth and angiogenesis and sensitizes chemosensitivity to oxaliplatin in colorectal cancers[J]. *Cell Cycle*, 2013,12(9):1385–1394.
- [39] Piepoli A, Tavano F, Copetti M, et al. Mima expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers[J]. *Plos One*, 2012,7(3):e33663.

中国人民解放军海军总医院分子诊断实验室

中国人民解放军海军总医院分子诊断实验室位于北京市海淀区阜成路6号，以中国人民解放军海军总医院检验科为主体，按照ISO 15189要求建立了分子诊断全面质量管理体系，2011年通过卫生部临床检验中心和北京市卫生局临床基因扩增检验实验室验收。现有技术人员6名，其中高级职称2名、中级职称2名、初级职称2名，获博士以上学历者3名，全部具有北京市临床检验中心颁发的临床基因扩增实验室上岗证。具备完备的教学管理体系，是北京市检验技师培训基地、南方医科大学和军事医学科学院硕士研究生培养点。有试剂配制实验室，样品准备实验室，基因扩增实验室，测序及结果分析实验室等4个功能实验室。实验室拥有ABI PCR扩增仪、ABI实时荧光定量PCR扩增仪、ABI 3500 DX基因测序仪，高速及高速低温离心机、生物安全柜、核酸电泳仪等分子生物实验设备，设备总值约250万元。

该实验室可对临床样本中的乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、沙眼衣原体、人乳头瘤病毒、肺炎支原体、EB病毒、淋病奈瑟菌、解脲支原体、弓形虫、风疹病毒、人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、科萨奇病毒、人细小病毒B19等多种病原体进行准确的核酸定量；可对低危及高危人乳头瘤病毒进行准确的基因分型；可进行白血病融合基因检测、化疗药物敏感性及毒副作用预测；可进行抗凝药物如华法林剂量预测、氯比格雷抵抗预测。连续多年参加卫生部临检中心室间质评，成绩优秀。是目前国内开展分子诊断项目最全、技术力量雄厚的实验室之一。承担中国博士后基金，军队医药卫生基金，国家自然科学基金，军队“十一五”、“十二五”专项，海后卫生部重点项目，北京市科委课题等多项研究。研究成果获军队科技进步二等奖2项，三等奖2项。获国家发明专利5项。在国内外重要期刊发表研究论文100余篇，参编海外科学专著1部。培养硕士研究生4名。

学科带头人郭建巍长期从事病原微生物的分子诊断及基于抗体的免疫学诊断研究，是全军防生物危害专业委员会委员、国家药监局医疗器械和总后卫生部医疗物资采购评审专家。



个体化分子诊断报告的审核



认真示教

分享成长价值

To share is to enjoy



→ 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