



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

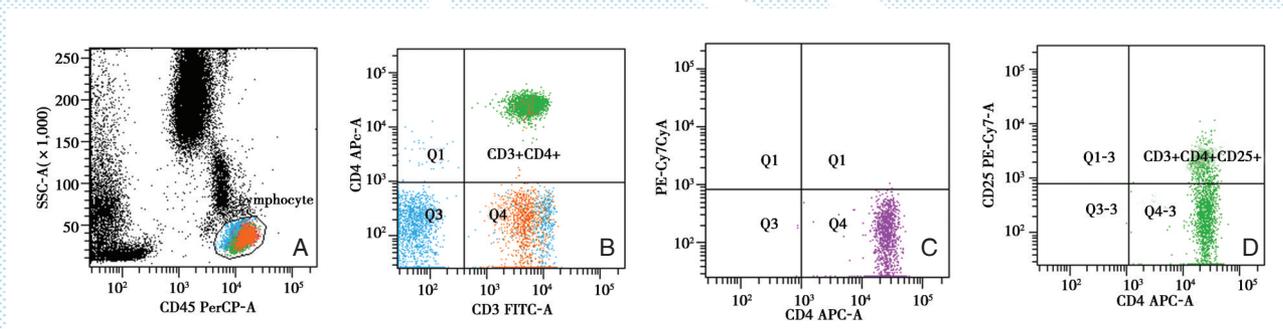
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2017年5月 第9卷 第3期 总第49期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 9 Number 3 May 2017



A. SSC 和 CD45 以淋巴细胞群设门; B. 右上象限表示为淋巴细胞中 CD3⁺CD4⁺细胞的比例; C. CD25⁺的同型对照; D. 右上象限表示为 CD3⁺细胞中 CD4⁺CD25⁺细胞的比例

图(P189) AD 患者外周血 CD3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 的流式结果

Figure(P189) The results of flow cytometry about CD3⁺CD4⁺CD25⁺Treg in peripheral blood of AD patients

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

05>

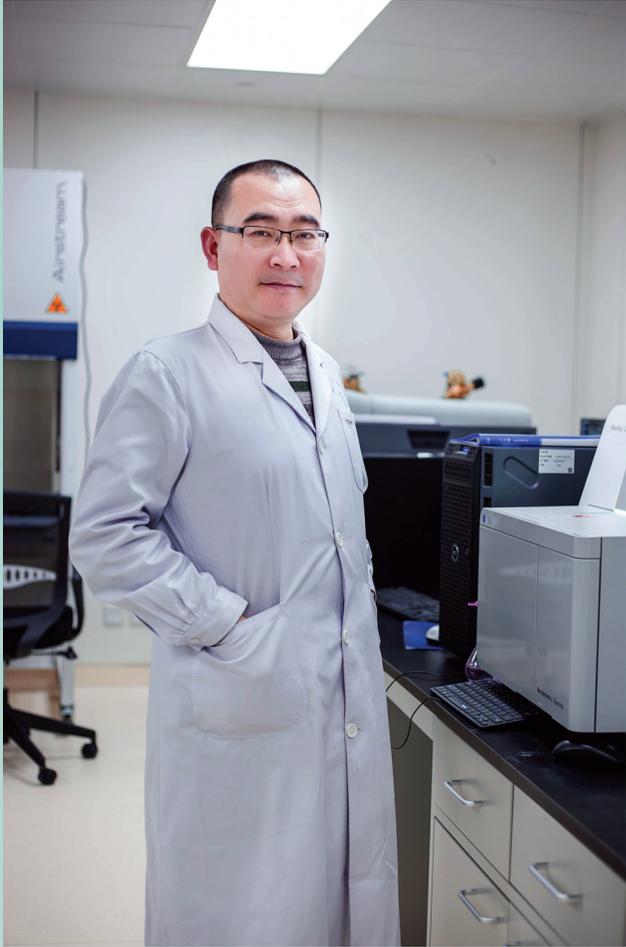
分子诊断与治疗杂志

二〇一七年五月

第九卷 第三期

中山大学

孔祥东



孔祥东，《分子诊断与治疗杂志》编辑委员会编委。

出生于1969年8月，2003年毕业于四川大学（原华西医科大学），获医学遗传学博士学位。

教授，主任医师，硕士生导师。现任郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心主任。现为《中华医学遗传学杂志》编委，中国医师协会医学遗传医师分会委员，中国优生科学协会常务理事，中国优

生科学协会医学遗传学分会副主任委员，海峡两岸医药卫生交流协会遗传与生殖专业委员会委员，河南省遗传学会常务理事，河南省医学会医学遗传学分会副主委，河南省医学会围产医学分会常委，河南省产前诊断技术服务机构评审专家组成员。

孔祥东教授长期从事各种人类遗传病分子诊断和发病机制研究，在神经肌肉病、代谢病、血液病、耳聋、唐氏综合征等遗传病分子诊断技术研发方面形成了一定的优势和特色，在省内率先开展了单基因的高通量测序诊断技术，建立了完整的单基因遗传病分子诊断技术平台，居国内领先水平。近3年主持或参与国家级、省级科研课题8项，荣获河南省医学科学技术进步奖一、二等奖3项。发表相关论文80余篇，其中SCI收录10余篇。培养和招收硕士研究生12人，已毕业3人。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2017年5月 第9卷 第3期 总第49期 Bimonthly Volume 9 Number 3 May 2017

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办 中山大学达安基因股份有限公司

顾问 来茂德 申子瑜
主编 李明
编辑部主任 郝芬
编辑部 《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑 李晓兰 叶萍萍 李彩珍
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 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2017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>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>HAO Fen</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</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>TianYi Yofus Technology Co., Ltd</i>
Publish Date	<i>2017.5.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2017年5月 第9卷 第3期

目次

专家笔谈

单细胞测序技术及其在肿瘤研究和临床诊断中的应用..... 周莹 黄华艺(147)

论 著

- 神经前体细胞表达发育调控样蛋白4基因多态性与广州市居民原发性高血压及其危险因素关联研究 孙敏英 利耀辉 刘览 等(154)
- 基于PCR-RDB法对陕西地区HCV基因型别的研究 杨柳 李金洁 苏明权 等(160)
- 海口地区新生儿G6PD基因突变分析..... 刘秀莲 王洁 黄慈丹 等(165)
- 江西10 269例女性HPV感染情况及分型检测分析 曾选 宇翔 陆瑶(168)
- 人肠道病毒D68型在儿童急性呼吸道感染中的临床特征与分子生物学特征分析
..... 郝金斗 李明珠 刘培辉(173)
- 地中海贫血儿童体内微量元素的探讨 刘冰 饶雪飞 曾赤佳(178)
- 深圳地区493例儿童变应性鼻炎过敏原检测结果分析 孙丽芳 付笑迎 杨方华 等(181)
- 舌下含服粉尘螨滴剂脱敏治疗对特异性皮炎患者中辅助性T细胞作用的研究
..... 曾美 李庆祥 黄文富 等(186)
- 高龄重症肺炎患者血清过氧化物及过氧化水平及其临床意义..... 白驹(191)
- 不同亚型HPV感染与女性宫颈疾病的相关性 梁艳华 毕超 梁景耀 等(196)

综 述

- 肠道病毒71型感染相关遗传易感基因研究现状 黄明元 林绮玲 范颖 等(201)
- 耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展 何宇婷 黄彬(206)
- Th17细胞在儿童肺炎中的研究进展..... 沈茹 李艳君 林丽佳(211)
- 循环游离DNA的定量检测及面临的问题 李铁军 张孝卫(215)

讲 座

新法规下的体外诊断试剂注册变更与延续注册实践分享..... 刁春芳 高旭年(220)

专家风采

孔祥东 (封二)

实验室巡礼

河南省人类遗传疾病基因修饰工程技术研究中心 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 3 May 2017

CONTENTS

NOTES OF EXPERTS

- Single-cell sequencing technology and its application in cancer research and clinical diagnosis
ZHOU Ying, HUANG Huayi (147)

ORIGINAL ARTICLES

- Association of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like gene polymorphisms with essential hypertension and its risk factors among Guangzhou residents
SUN Minying, LI Yaohui, LIU Lan, WU Xueji, PAN Bingying, ZHOU Ying, LIU Huazhang (154)
- Investigation of HCV genotypes with PCR-RDB in Shaanxi
YANG Liu, LI Jinjie, SU Mingquan, CHANG Liang, LI Rui, MA Yueyun, HAO Xiaoke (160)
- Genotyping analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonates of Haikou area
LIU Xiulian, WANG Jie, HUANG Cidan, LIN Wen, YANG Chun (165)
- Analysis of the HPV infection and genotyping distribution in 10 269 women in Jiangxi area
ZENG Xuan, YU Xiang, LU Yao (168)
- The clinical and molecular characterizations of enterovirus D68 among children with acute respiratory infection
HAO Jindou, LI Mingzhou, LIU Peihui (173)
- Study on trace elements in thalassemia children
LIU Bing, RAO Xuefei, ZENG Chijia (178)
- The analysis of 493 cases of children allergic rhinitis allergen test results in Shenzhen area
SUN Lifang, FU Xiaoying, YANG Fanghua, YUAN Yan, LIU Yali, SHI Yufang (181)
- The role on the T helper cells of sublingual immunotherapy for atopic dermatitis
ZENG Mei, LI Qingxiang, HUANG Wenfu, CHEN Junzhao, LIU Jinhua, WANG Cuiyan (186)
- The level and clinical significance of serum peroxidase in elderly patients with severe pneumonia
BAI Ju (191)
- Relationship between different subtypes of HPV infection and cervical disease in female
LIANG Yanhua, BI Chao, LIANG Jingyao, TANG Mingzhu, WANG Huanli, DENG Bin, SONG Weizhong (196)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 3 May 2017

CONTENTS

REVIEWS

- Research status of genetic susceptibility genes of Enterovirus 71 infection
HUANG Mingyuan, LIN Qiling, FAN Ying, ZENG Jincheng (201)
- Genetic research progress of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa*
HE Yuting, HUANG Bin (206)
- Research progress of Th17 cells in children pneumonia
SHEN Ru, LI Yanjun, LIN Lijia (211)
- Quantification of circulating cell free DNA and the existing problems
LI Tiejun, ZHANG Xiaowei (215)

单细胞测序技术及其在肿瘤研究和临床诊断中的应用

周莹¹ 黄华艺^{1,2*}

【摘要】 肿瘤组织的异质性是肿瘤的一个重要特征。肿瘤细胞均一性的缺乏使得肿瘤靶向治疗的难度加大。因此,鉴别肿瘤细胞的异质性是一个重要工作。单细胞测序技术(single-cell sequencing, SCS)是通过下一代测序手段观察单个细胞的基因组序列信息,从而获得细胞间遗传物质和蛋白质信息的差异,因此能够更好地理解单个细胞在其微环境中的功能。通过对单个肿瘤细胞全基因组、转录组以及细胞表观遗传基因进行测序,瘤内异质性的复杂机制可被揭示,从而改善肿瘤诊断、转归预测和治疗效果的监测。本文对单细胞测序技术的发展、检测原理和检测流程、存在的问题及其在肿瘤研究中的应用以及该技术在临床上的潜在价值进行了概述。

【关键词】 单细胞测序;下一代测序;基因组;肿瘤;异质性

Single-cell sequencing technology and its application in cancer research and clinical diagnosis

ZHOU Ying¹, HUANG Huayi^{1,2*}

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

【ABSTRACT】 The heterogeneity of tumors is an important feature of cancer. Tumor cells that lack homogeneity increase the difficulty of targeting therapeutics. Therefore, identifying tumor heterogeneity is an important task. The single-cell sequencing (SCS) technology utilizes next generation sequencing methodology to examine the genomic sequence of a single cell, and obtain the variability of genetic and protein information among tumor cells, allowing for a better understanding of the cellular function and the surrounding micro-environment. By sequencing the whole genome, transcriptome, and epigenetic genes of a single cell, the complex mechanisms of heterogeneity in tumors can be uncovered, thus improving cancer diagnosis and prognosis prediction, as well as monitoring of therapeutic response. Here, we have summarized the advancement of SCS technology, the principle and procedures of its analysis, the shortcomings of the technology, and its usage in cancer research and potential application value in clinical diagnosis.

【KEY WORDS】 Single-cell sequencing; Next generation sequencing; Genome; Tumor; Heterogeneity

肿瘤是机体在各种致癌因素作用下,遗传物质受损导致对特定细胞失去正常生长调控,继而引起其克隆性异常增生。恶性肿瘤细胞通过对自身不断“改良”,可以产生许多基因突变和致病性表型,以适应宿主体内复杂的肿瘤微环境,甚至肿

瘤内的单个细胞组织表现出独特的表型,即瘤内异质性(intratatumoral heterogeneity)^[1]。这代表着不同的肿瘤细胞之间致病潜力存在差异,其中某些细胞可能造成更大的威胁,具有更强的转移或侵袭能力或者更容易产生耐药性。然而,对于肿瘤

作者单位:1. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530021

2. 美国罗斯威尔帕克癌症研究所肿瘤外科,美国,纽约,布法罗 14263

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

细胞亚群分子层面的数据,尤其是对细胞异质性的信息挖掘和认识仍然非常有限。

细胞异质性是肿瘤研究和诊断治疗中亟待解决的关键问题,单细胞测序技术(single cell sequencing, SCS)是一种理想的研究肿瘤复杂性的方法。通过获取特定阶段的单个肿瘤细胞的动态基因组(deoxyribonucleic acid, DNA)、转录组(ribonucleic acid, RNA)数据以及细胞表观遗传信息,可用于构建与肿瘤发生、发展和转移以及产生耐药性等机制相关的遗传图谱,为临床探索有价值的诊断或预后生物标志物以及分子治疗靶标^[2]。在这篇文章中,我们将对SCS技术进行介绍,并对其在单个细胞的肿瘤活检以及液体活检中的应用进行总结。

1 单细胞测序技术简况

测序技术经历了低通量到高通量的时代变革,能够对几十万到几百万条DNA分子同时测序,每个运行可精确读出数以千亿计的碱基,从而实现快速、高效、低成本的基因组测序。受益于测序技术的发展,对细胞的分子研究逐渐由混合细胞群样本发展到单个细胞样本。下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术的发展为实现全基因组单细胞测序(genome-wide single-cell sequencing)提供了新的可能^[3]。2009年研究人员采用mRNA全转录组测序方法(mRNA-Seq whole-transcriptome analysis)对小鼠单个四细胞期胚胎的卵裂球转录组进行单细胞水平分析,其技术革新使全长互补DNA序列(complementary DNA, cDNA)的捕获率提高到64%,同时在cDNA扩增时放宽对片段长度的限制^[4]。2011年由Cold Spring Harbor实验室和MD Anderson癌症中心开发并报道的一种肿瘤研究新方法SCS技术,能够对一个单细胞核中基因拷贝数目进行准确定量^[5]。肿瘤细胞基因组部分被删除或者扩增,可以引起关键基因的缺失或者表达过量,继而干扰正常细胞生长。利用SCS技术能分析基因拷贝数目,从而进一步了解恶性肿瘤的细胞生物学机制。同时该方法解决了传统癌症基因组研究的一系列问题,如混合样品测序无法判断具体突变的来源及发生频率;无法解释肿瘤发生、发展以及演化过程中的细节;难以辨别主动突变或被动突变;目的细胞系测序时无法排除体外培养所导致的新

突变干扰等^[5]。2013年,研究人员首次利用肿瘤病人单个外周血循环肿瘤细胞(circulation tumor cell, CTC)进行全基因组、外显子组测序,为无创肿瘤诊断和监测提供了一种新的技术手段^[6]。

2 单细胞测序技术的原理

单细胞测序主要包括单细胞基因组测序、转录组测序和表观遗传测序,这3种测序类型各具特点和优势,可以从不同角度揭示细胞各个阶段的功能和特性。全基因组测序是对目的细胞的全部基因组序列进行非选择性、均匀扩增,随后利用外显子捕获技术进而使用高通量测序的过程。转录组测序则是获取特定器官或组织在某一状态下的几乎所有转录本,尤其适用于具有高度异质性的干细胞及胚胎发育早期的细胞群体的研究。以NGS为基础的各种表观遗传学测序可揭示基因调控的不同方面,包括DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质结合结构和调节蛋白、染色体的空间结构与空间相互作用形成转录复合物的组分^[7-9]。表观遗传改变是可逆的,并决定基因表达和负责细胞的异质性。

3 单细胞测序技术的流程

细胞测序主要涉及4大步骤,包括单细胞分离、核苷酸序列(DNA或RNA)扩增、基因测序和数据分析。

3.1 单细胞分离

进行单个细胞研究,首先要将目的细胞从生长环境中完整分离。第一类是基于细胞培养的分选法,此类方法无需特殊设备、成本低廉,属于非直观下分离细胞。但存在操作耗时、低通量,易造成分离错误或细胞丢失、不能靶向筛选细胞等弊端。第二类则是基于仪器的分选法,仪器方法可到达更高的精确度和细胞获取率,目前在科研和实际工作中普遍采用此类方法进行细胞分选。

我们对一些比较成熟的和新发展的仪器分离技术进行介绍,并概述其优点和局限性,实际工作中可根据具体的需求来选择适合的方法进行单细胞分离。显微操作法是应用较普遍的直视分选细胞技术,成本较低。但受通量低、人力投入大、容易对目的细胞造成机械性损伤等因素的制约,不利于大规模应用和商品化。另一个直视分离技术是激光捕获显微切割术(laser capture microdissec-

tion, LCM)通过利用激光束使覆盖于组织切片上的透明膜熔化,冷却后目的细胞被固定于黏附膜上,从而实现细胞分离。该方法的优势在于能够在显微镜下准确而快速地获取单一细胞亚群或者单个细胞,解决了组织中细胞异质性的问题。但是存在成本较高、通量低、不能自动化的缺点。此外,LCM的技术缺陷还包括操作过程中细胞核容易被刨切而导致染色体片段丢失;精确度有限,切割过程中可能会掺入相邻细胞的原生质组分或损伤细胞核,而且其RNA多已降解,因此不适用于转录组学分析^[10]。

目前单个肿瘤细胞分离通常是通过磁珠激活细胞分选(magnetic-activated cell sorting, MACS)或荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)技术进行。这两种分离方法的成本较高,但是能满足高通量、自动化的要求。免疫磁珠分离法(immunomagnetic separation, IMS)属于MACS技术,即利用细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合。在外加磁场中,与磁珠相连的带有表面抗原的细胞被吸附而滞留在磁场中,不能与磁珠连接的细胞不在磁场中停留,从而使目的细胞得以快速分离^[11],但操作方法相对复杂。

荧光激活细胞分选技术是目前应用最多的单细胞分离方法,可对单个细胞进行高效和快速分离。FACS平台通过依靠荧光标记信号结合光散射分析参数,对具有异质性的肿瘤组织的单个细胞进行挑选和分析。该法不仅具备高通量的优势,而且可对具有不同表征(如大小、粒度、特异性抗原标记、同位素标记等)的靶细胞进行识别和分离^[12]。其最大的缺陷是分选时需要大量的细胞,因此在制备大量细胞悬液的过程中可能降低低丰度细胞的获取率;同时FACS所检测的荧光信号相对较低,部分低表达的标记可能检测困难,存在特定细胞类型丢失的风险;此外,细胞的高速流动可能造成机械性损伤。

另一个新发展的微流控技术(microfluidics)则是通过人为控制流体流动来实现在微尺度上对目的细胞进行分离,主要利用流控通道具备的多种功能对细胞进行分选,如通道本身具有可调节的直径(10~100 μm)和多种功能性修饰(如捕获分子、抗体、电极等)。同时微流控装置的细胞污染率低,对样本和试剂损耗少,并且在降低单细胞测

序的噪声以及提高基因组扩增一致性方面具有优势,已有相应的商业化平台在推广应用^[13]。

3.2 核苷酸序列(DNA或RNA)扩增

一个正常的二倍体人体细胞的DNA和RNA含量为匹克(picogram, pg)水平^[14],因此SCS技术面临的主要技术挑战是单个细胞的DNA或RNA含量远远低于目前任一可用测序平台的检测阈值。为了克服这种局限性,必须对要检测的单细胞中分离的核酸进行放大。同时在建库时的文库分子仅有少量可在Floecell表面生成簇,并被测序检测到,因此至少要有上万倍到几十万倍的扩增效率,才能保证大部分的片段可被检测到,并且满足覆盖度高和低偏倚的要求。因此在测序之前,需要进行全基因组核苷酸扩增(genome-wide nucleotide amplification),包括全基因组扩增(whole-genome amplification, WGA)和全转录组扩增(whole-transcriptome amplification, WTA)。

3.2.1 全基因组扩增(WGA)

其目标是在没有序列偏向性的前提下大幅增加DNA的总量。一些基于PCR的方法可用于WGA,主要包括:基于热循环以PCR为基础的扩增技术,如退行性寡核苷酸PCR(degenerative-oligonucleotide PCR, DOP-PCR);基于等温反应不以PCR为基础的扩增技术,如多重置换扩增法(multiple-displacement-amplification, MDA)以及基于多重退火环状循环扩增法(multiple annealing- and looping-based amplification cycles, MLBAC)。

DOP-PCR是SCS最初常用的技术,由于会产生非特异扩增且扩增效率不高(15%),因而应用受限^[15]。MDA作为最常用的技术一直沿用至今,能对全基因组进行高保真的均匀扩增,扩增出10~100 kb大小的片段,能提供大量均一完整的全基因组序列。主要依赖于两种类型的DNA聚合酶,包括phi29 DNA聚合酶和Bst大片段DNA聚合酶。不仅可以结合由单引物启动的滚环扩增反应所产生的串联产物,也可以使新合成DNA片段位移替换之前的DNA片段,形成一种反复分支结构,进而引起链位移扩增出大段的DNA。MDA与基于PCR的传统WGA方法相比,其优势包括Phi29 DNA聚合酶具有在较低和恒定的温度条件下催化DNA延伸反应、可加工较长扩增产物和高效率扩增的能力。MDA采用的是指数扩增法,可以实现从单个细胞基因组或外显子组中获得较高

的覆盖度(>90%)。但是MDA也存在一些缺点,特别是显著的非特异性扩增。另外就是全基因组覆盖度不均匀;等位基因丢失率高(可高达65%);污染或干扰;随机引物与模板结合能力差异导致的扩增偏倚^[16-17]。针对MDA潜在的污染问题(包括外源性或交叉污染),目前主要采取的改进措施是将荧光标记(例如SYBR Green)掺入反应体系中,以便对扩增过程进行可视化的荧光监测。该技术已成功应用于肿瘤单细胞测序^[16-18];另一项极具创新性的技术MALBAC是由哈佛大学谢晓亮团队研发^[3,19]。与以前的技术相比,MALBAC的最大优势是采用线性扩增方式。其核心技术在于通过五轮MDA预扩增得到完整扩增产物;增加退火步骤达到链内杂交自我锁定,形成闭合的环状分子,避免指数扩增;再通过常规PCR进行扩增。由于此时的模板更加均一,则可达到低偏倚的目的。MALBAC技术将单细胞全基因组测序的精确度大幅度提高,以至于能够发现个别细胞之间的遗传差异。在25×测序深度下,MALBAC的覆盖度可达93%,而MDA覆盖度为73%,因此其在WGA中显示出扩增一致性好、偏倚少、效率高的特点。另外,MALBAC对单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)等位基因检出率高(可达70%),能精确地检测拷贝数变异(copy number variations, CNVs)、单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNVs)、插入/缺失(insertions and deletions, INDELs)变异等。其缺点则是可能出现较高的假阳性率^[20]。MDA和MALBAC技术各有特点,MDA扩增效率更高,实验方法简单,而MALBAC则扩增均一性更好,但扩增DNA的量相对较少,即扩增效率相对较低。

3.2.2 全转录组扩增(WTA)

多聚腺苷酸化mRNA在WTA初始阶段反转录,以Oligo-dT引物连接到一个接头序列去进行选择性地扩增。通过Oligo-dT锚定法和模板转换法产生cDNA为下一步测序做准备。目前采用的WTA主要基于传统PCR、改良PCR(modified PCR)、体外转录(*in vitro* transcription, IVT)以及Phi29 DNA聚合酶介导的RNA扩增方法^[21-22]。

3.3 基因测序数据的生物信息分析

对高通量数据的精准解读是基因测序和精准医疗的关键。单细胞数据分析的基本流程与传统序列分析相似,数据分析前首先要移除接头序列

(adapter)、连接序列(linker)、标签序列(barcodes)、低质量碱基和污染DNA。然而两者间具有显著差异,传统拼接方法是建立在一定的假设之上,如嵌合序列比例较少,读取深度随基因组呈泊松分布等。而单细胞数据由于表现出不均匀的覆盖度和高比例的嵌合序列,则需要采用不同的分析方法进行数据预处理。一种方法是通过实验方法或计算机算法将核酸文库“标准化”,以降低扩增偏倚性;另外一种方法是将亲缘关系很近的单细胞测序数据进行混合分析。从偏倚性的角度来看,混合分析可以显著地提高样品的平均覆盖度。同时生物信息学分析软件也为数据分析提供了极大的便利,如SmashCell、Velvet-SC和SPAdes软件等都能在一定程度上克服单细胞数据覆盖度不均的问题,高效地完成序列拼接与测序数据分析^[23]。

4 单细胞测序技术在肿瘤研究中的应用

迄今为止使用的测序材料无一例外都是数百万甚至更多细胞的混合DNA样本。因此测序结果通常表现出这些细胞“整体”表征,是一群细胞中信号的平均值,或者只代表其中占优势数量的细胞信息。然而,由于细胞异质性的存在,表型相同的细胞遗传信息可能存在显著差异。很多低丰度的信息,如只存在于少数细胞(如早期癌细胞)中的突变,将会在“整体”表征的平均化过程中稀释或丢失^[24]。与传统的全基因组测序相比,SCS不仅测量基因表达水平更加精确,而且还能检测到微量的基因表达或罕见非编码RNA,其优势是全方位和多层次的。因此利用SCS技术深入地研究恶性肿瘤,可发现导致恶性肿瘤发生和演变的各种基因变异、肿瘤异质性、耐药性等,从而帮助我们在个体水平上认识恶性肿瘤的发生、发展及进化。

5 单细胞测序技术在肿瘤检测中的临床应用

5.1 SCS技术与肿瘤相关基因变异的检测

肿瘤的发生是一个多基因异常表现的疾病过程,最终导致一个正常的细胞表型转变为一种异常的细胞表型,即肿瘤细胞。识别具有不同遗传变异性的肿瘤类型和不同的肿瘤分期(即肿瘤发生、转移、化疗抵抗),有助于我们更好地理解肿瘤的发展和演化的机制以及为肿瘤的预防与治疗提供新策略和分子靶点^[25]。

转录组和表观基因组测序数据对于肿瘤相关畸变的发现也很重要,例如,结直肠癌 CTCs 的转录组分析表明,由于肿瘤相关的转录下调与发挥“stemness”作用的基因(如 *CD166* 和 *CD26*)具有相关性,CTCs 可能代表一种休眠状态。此外,结直肠癌 CTCs 的基因组分析发现,一些在肿瘤细胞中低表达的基因往往在调控细胞间接触(cell-cell contact)和动力方面起作用,而高表达的基因如 *CD47* 可协助肿瘤细胞逃避免疫杀伤^[26]。一些基因组分析还发现在正常细胞功能中发挥重要作用的基因,如 *Septin 9 (SEPT9)*、*POU4F1* 和核仁蛋白 4(nucleolar protein 4, *NOLA*) 等存在肿瘤表观遗传修饰成分,如 CpG 岛甲基化谱的改变^[27-28]。

5.2 SCS 技术与肿瘤细胞谱系树的重建

肿瘤的演化通常涉及遗传变异的积累,可以扰乱正常细胞的功能并促进正常表型向肿瘤表型转化^[29]。获取这些遗传变异信息,包括时间和空间表达方面的数据,将可以重建肿瘤细胞谱系树。以此用于分析肿瘤演化的过程并且为疾病的诊断和治疗提供新的见解。目前通过利用 SCS 平台以及其他测序数据,已经开发了各种模型来构建肿瘤细胞谱系树。但是,这种生物信息学方法受到现有的 SCS 技术精确度的局限,包括现用的测序数据运算方法以及测序过程中产生的高错误率^[30]。

5.3 SCS 技术与肿瘤的诊断和治疗

在肿瘤发生发展过程中积累的遗传变异也可以影响肿瘤细胞对治疗的反应。SCS 技术可以识别肿瘤诊断和个性化治疗相关的标志物^[31-32]。各种肿瘤相关的基因突变已在临床应用,并作为特定类型肿瘤诊断的生物标志物,包括黑色素瘤 *BRAF* 基因突变、结肠癌的 *KRAS* 基因突变、非小细胞肺癌的 *EGFR* 基因突变^[32]。但是,这些生物标志物仅仅用于提示存在发生相关肿瘤的风险,对于明确诊断则需要建立更详细和全面的分析。因为迄今为止尚没有发现某个单一突变与某个特定的肿瘤类型、发展阶段或者预后存在绝对的关联。例如,已在许多宫颈癌患者中观察到 *NOLA* 基因和脂肪瘤 HMGIC 融合伴侣蛋白 4(lipoma HMGIC fusion partner-like protein 4, *LHFPLA*) 基因存在高频甲基化^[33],但是仍有少数患者是没有检测到甲基化修饰的,如果仅依靠这些标记做为诊

断依据就会导致漏诊。

此外,我们除了关注 SCS 技术为精确诊断带来的益处,还关注它在精准治疗中的重要作用。SCS 技术可以为靶向药物的选择提供参考。从理论上说,修复肿瘤相关的遗传变异可以使肿瘤表型重新恢复成正常表型。多数靶向药物可以抑制异常基因的功能,因此可能给个体化肿瘤治疗带来益处。如,治疗恶性血液病的组蛋白去乙酰化酶抑制剂、治疗黑色素瘤的 *BRAF* 抑制剂以及治疗乳腺癌的 *PARP* 抑制剂等^[32]。但由于肿瘤异质性的问题,不同靶向药物针对的肿瘤类型不同,甚至相同的肿瘤类型的靶向药物也不尽相同。而且在治疗中可能产生原靶向位点产生耐药性或出现新变异的问题。因此,基于精准检测下的靶向药物选择可以为患者带来最大益处,体现个性化治疗的价值^[34]。

通过 SCS 技术可以揭开不同的肿瘤类型和阶段的遗传变异的差异,有助于制定个性化治疗方案和及时调整治疗策略。NUC-Seq 是一种可以基本实现对单个细胞完整基因组进行完全测序的新的测序方法^[35]。当细胞准备分裂时,细胞核内 DNA 会进行复制。通过筛选从而仅仅对新生的“双”核进行测序。NUC-Seq 可以利用此类复制,获得比之前大部分的测序技术更低的测序错误率,可以将肿瘤基因组异质性检测出来。研究人员运用 NUC-Seq 技术对乳腺癌患者进行单细胞基因组测序时发现,不同亚型的乳腺癌存在遗传变异的差异。在肿瘤进化中,三阴乳腺癌患者的肿瘤细胞变异率较高,而雌激素受体(ER)阳性患者的变异则相对稳定,因此 ER 阳性患者的治疗效果相对较好^[36]。研究还发现基因重组等结构改变主要出现在乳腺癌早期且保持相对稳定的状态,而点突变则伴随整个肿瘤进化过程并导致大量基因多样性出现^[35,36]。

5.4 SCS 技术与外周血单个 CTC 在预测肿瘤转移和进展中的应用

SCS 技术除了在肿瘤组织的检测上具有优势,还在 CTCs 研究方面显示出重要作用。CTCs 是指由实体瘤病灶(原发灶或转移灶)释放进入外周血循环的肿瘤细胞,在外周血中检测到肿瘤细胞提示肿瘤远处转移的可能性^[36]。但肿瘤患者血液中肿瘤细胞数量很少,传统研究往往需要建立在大量细胞的基础上才能进行。CTCs 的全基因组测

序可作为肿瘤诊断和评估预后的一种非侵入性的方法^[37];WGA及全基因组测序技术可对原发性肿瘤、CTCs、转移性肿瘤细胞进行分离,并揭示细胞之间基因组的联系。与肿瘤组织相比,血液样本易于获取、创伤性小、可反复采集,因此可作为肿瘤“液体活检”样本。

全基因组转录水平的单细胞RNA测序方法(single-cell RNA sequencing, Smart Seq)已应用于单个黑色素瘤细胞的不同的基因表达方式的分析,促进CTCs基因生物标志物的鉴定^[38]。采用靶向DNA测序(targeted DNA sequencing)方法观察到结肠癌的原发性肿瘤细胞和CTCs中存在不少类似的驱动突变,这表明CTCs的基因组分析可以代表肿瘤进化的突变方式^[39]。而运用MABLC技术对肺腺癌和小细胞肺癌患者的单个CTC进行WGA和深度测序,检出特征性的与肿瘤相关的SNVs和INDELs等变异^[6]。同一患者的不同CTCs的全基因组CNV具有高度一致性,且与其转移瘤的CNV一致,提示CNV与肿瘤的转移密切相关;在不同的肺腺癌患者中CTCs的CNV具有高度的相似性,说明特定的CNV与肿瘤的形成与转移有关。此外,小细胞肺癌患者与肺腺癌患者之间的CNV明显不同,提示不同的肿瘤来源是不同的变异造成的。另外,在肺腺癌患者的肝脏转移灶中观察到肿瘤表型转变为小细胞肺癌,以此为依据采用标准化的小细胞肺癌方案疗效显著,这提示治疗方案可基于CTCs中CNV的改变而调整。在治疗过程中,还观察到CTCs中的SNVs/INDELs会改变,而CNV模式保持相对稳定^[6]。因此,SCS技术可以为肿瘤诊断和治疗以及预后观察提供分子层面相对明确的数据信息。

6 小结

单细胞测序技术提供了一个前所未有的肿瘤研究方法,允许对存在异质性的肿瘤细胞群之间的进行单细胞水平分析。单细胞测序数据将提高我们对肿瘤发病机制的认识,并改进诊断和治疗的方法。此外,单细胞测序所需试剂、设备和生物信息学算法等,均在不断完善,使得SCS平台的力量和功能逐渐增强。改进的SCS技术将减少甚至消除这些挑战从而获得更精确的测序数据,测序数据与病理特征之间的关系将更加明确。

目前单细胞测序技术还在发展阶段,而且因为其涉及到NGS技术,故有些技术问题仍需解决:

①目标细胞的提取问题:要能够准确筛选目标细胞,如正常细胞或肿瘤细胞不被周围细胞污染;②扩增失败和等位基因脱扣;③PCR产生的非特异产物问题;④NGS的重复性问题等。此外,虽然基因组测序的成本一直在不断下降,但是单个细胞基因组测序以及由此对复杂生物信息进行分析的成本依然是惊人的。同时,对个体细胞进行分析的新技术不断涌现,但技术缺陷仍然存在。例如,MALBAC等所得到的检测结果的可信度有多高(假阳性率高)。例如,由于染色体数目异常导致很多肿瘤细胞是非整倍体细胞,而NUC-Seq技术可能只局限用于检测不含非整倍体细胞的肿瘤。

在研究肿瘤发生发展的道路上,单个细胞测序技术的出现无疑是一个里程碑。借助这一技术,我们可以对不同患者的肿瘤细胞基因组进行比较,或者对同一患者在解剖学上相互独立的器官、组织的肿瘤细胞进行比较,甚至可以比较同一肿瘤组织内的个体细胞间的差异,不断揭示肿瘤发展过程中的基因变异及其变异率、追溯关键基因的克隆起源、肿瘤各亚型之间的基因序列差异、不同级别或不同类别的肿瘤细胞之间的差异、某种基因在不同肿瘤中的不同地位、对表观遗传学的影响以及长期难以攻破的肿瘤异质性和出现药物抗性问题。随着测序技术的不断发展,测序技术成本的降低,测序人群数量的不断上升,我们可逐步从“单个细胞”全面认识肿瘤“整体”,以完善肿瘤诊疗体系,进而从个体水平实现有效的靶向治疗。

参考文献

- [1] Lipinski KA, Barber LJ, Davies MN, et al. Cancer evolution and the limits of predictability in precision cancer medicine[J]. Trends Cancer, 2016, 2(1):49-63.
- [2] Eberwine J, Sul JY, Bartfai T, et al. The promise of single-cell sequencing[J]. Nat Methods, 2014, 11(1):25-27.
- [3] Zong C, Lu S, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. Science, 2012, 338(6114):1622-1626.

- [4] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA -Seq whole -transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5):377-382.
- [5] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing [J]. *Nature*, 2011, 472(7341):90-94.
- [6] Ni X, Zhuo M, Su Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(52):21083-21088.
- [7] Zhang X, Marjani SL, Hu Z, et al. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6):1305-1312.
- [8] Guo H, Zhu P, Guo F, et al. Profiling DNA methylation landscapes of mammalian cells with single-cell reduced-representation bisulfite sequencing [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(5):645-659.
- [9] Buenrostro JD, Wu B, Litzenburger UM, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation [J]. *Nature*, 2015, 523(7561):486-490.
- [10] Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(9):618-630.
- [11] Sethsmith HM, Harris SR, Scott P, et al. Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(12):2404-2412.
- [12] Galler K, Bräutigam K, Große C, et al. Making a big thing of a small cell-recent advances in single cell analysis [J]. *Analyst*, 2014, 139(6):1237-1273.
- [13] Bose S, Wan Z, Carr A, et al. Scalable microfluidics for single-cell RNA printing and sequencing [J]. *Genome Biol*, 2015, 16:120.
- [14] Yong W, Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4):598-609.
- [15] Huang L, Ma F, Chapman A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015, 16:79-102.
- [16] Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2 -Negative myeloproliferative neoplasm [J]. *Cell*, 2012, 148(5):873-885.
- [17] Xu X, Hou Y, Yin X, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor [J]. *Cell*, 2012, 148(5):886-895.
- [18] Yu C, Yu J, Yao X, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6):701-712.
- [19] Chen M, Song P, Zou D, et al. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping - based amplification cycles (MALBAC) in single-cell sequencing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e114520.
- [20] Lovett M. The applications of single-cell genomics [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(1):22-26.
- [21] Macaulay IC, Voet T. Single Cell genomics: advances and future perspectives [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1):e1004126.
- [22] Kolodziejczyk A, Kim JK, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4):610-620.
- [23] Olson ND, Lund SP, Colman RE, et al. Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics [J]. *Front Genet*, 2015, 6:235.
- [24] Shirai M, Taniguchi T, Kambara H. Emerging applications of single-cell diagnostics [J]. *Top Curr Chem*, 2014, 336:99-116.
- [25] Wang K, Kan J, Yuen ST, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(12):1219-1223.
- [26] Steinert G, Schölch S, Niemi T, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(6):1694-1704.
- [27] Gao F, Ji G, Gao Z, et al. Direct ChIP-bisulfite sequencing reveals a role of H3K27me3 mediating aberrant hypermethylation of promoter CpG islands in cancer cells [J]. *Genomics*, 2014, 103(2-3):204-210.
- [28] Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1):1-11.
- [29] Newburger DE, Kashefhighi D, Weng Z, et al. Genome evolution during progression to breast cancer [J]. *Genome Res*, 2013, 23(7):1097-1108.

(下转第172页)

· 论 著 ·

神经前体细胞表达发育调控样蛋白4基因多态性与广州市居民原发性高血压及其危险因素关联研究

孙敏英^{1,2} 利耀辉¹ 刘览¹ 吴雪霁¹ 潘冰莹¹ 周颖¹ 刘华章^{1*}

[摘要] 目的 分析神经前体细胞表达发育调控样蛋白4 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like, *NEDD4L*) 基因多态性与广州市居民原发性高血压 (essential hypertension, EH) 发病风险及其危险因素的相关性。方法 选取广州市919名EH患者及同期年龄、性别相匹配的934名血压正常居民为研究对象, 对其进行人口学资料收集、体格测量及血液生化指标检测, 通过MassARRAY® IPLEX SNP平台对*NEDD4L*基因rs2288774和rs3865418两个位点进行基因分型, 并进行统计学分析。结果 超重、肥胖、中心性肥胖、高甘油三酯、高血糖为广州市居民EH的危险因素; 病例-对照分析发现, rs3865418位点基因型TT及等位基因T可降低EH发病风险; rs2288774位点基因型TC为EH患者血糖升高的保护因素, 而rs3865418位点CT基因型为EH患者超重的危险因素。结论 *NEDD4L*基因多态性与广州市居民EH发病风险及EH危险因素相关。

[关键词] 原发性高血压; *NEDD4L*; 多态性; 危险因素

Association of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like gene polymorphisms with essential hypertension and its risk factors among Guangzhou residents

SUN Mingying^{1,2}, LI Yaohui¹, LIU Lan¹, WU Xueji¹, PAN Bingying¹, ZHOU Ying¹, LIU Huazhang^{1*}

(1. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, China, 510440; 2. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To investigate the association of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like (*NEDD4L*) gene polymorphisms with essential hypertension (EH) and its risk factors among Guangzhou residents. Methods A total of 919 EH patients and 934 healthy controls matched with age and gender were enrolled. Demographic data as along with results of the physical measurement and blood biochemical detection were collected. Two SNPs of *NEDD4L*, rs2288774 and rs3865418, were genotyped via MassARRAY® IPLEX SNP platform. The software SPSS 20.0 was used for data analysis. Results The risk factors of EH were overweight, obesity, central obesity, hypertriglyceridemia and hyperglycemia. Genotype TT and allele T of rs3865418 could decrease the risk of EH in the case-control study. Patients with genotype TC of rs2288774 showed lower risk of hyperglycemia, however, genotype CT of rs3865418 revealed higher risk of overweight. Conclusion Polymorphisms of *NEDD4L* gene were associated with EH and its risk factors among Guangzhou residents.

[KEY WORDS] Essential hypertension; *NEDD4L*; Polymorphisms; Risk factors

基金项目: 广州市医药卫生科技项目(20141A011052); 广州市医药卫生科技项目(20151A011049); 广东省科技计划项目(2014A020212029)

作者单位: 1. 广州市疾病预防控制中心, 广东, 广州 510440

2. 南方医科大学检验与生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通信作者: 刘华章, E-mail: huazhliu@126.com

原发性高血压(essential hypertension, EH)是最常见的慢性非传染性疾病。2015年国家卫计委疾病预防控制局发布的《中国居民营养与慢性病状况报告(2015年)》指出,2012年我国18岁及以上成人高血压患病率为25.2%,相当于每4名成年人中就有1名高血压患者^[1]。高血压也是导致心脏病、脑血管病、肾脏病发生和死亡的最主要危险因素^[2]。高血压防控是防治心脑血管疾病的关键。

EH的发生是生活习惯、遗传因素和环境因素共同作用的结果。荟萃分析结果表明,超重、肥胖、吸烟、饮酒、嗜盐、家族史等因素是我国居民EH的主要危险因素^[3-4]。机制方面,水盐代谢失衡是EH的主要原因,其中上皮细胞钠通道(epithelial Na channel, ENaC)相关蛋白在调节水盐代谢平衡过程中发挥着重要作用。神经前体细胞表达发育调控样蛋白4(neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like, *NEDD4L*)是ENaC系统调控的关键环节,可介导ENaC的表达和降解,在血压调节中发挥重要作用^[5],*NEDD4L*也是盐敏感性高血压的候选基因之一。掌握本地区EH流行的危险因素及发病机制,是EH防控的关键。为此,本研究通过基线调查、生化指标检测及基因多态性研究,综合分析广州市居民EH相关危险因素并分析*NEDD4L*基因rs2288774和rs3865418位点多态性与EH发病风险及其危险因素的相关性,从而为EH的防控提供一定的参考。

1 对象与方法

1.1 对象

2013年广州市组织开展了慢性病预防控制综合调查,调查对象为全市具有广州市户籍的常住居民,按照当年全市常住人口数进行样本量分配,采用多阶段整群随机抽样方法,在12个行政区中抽取60个社区300个居委/村6677户家庭20030人。社区和居委/村的选取采用系统PPS法,以家庭户为整群单元,家庭户的选取采用随机抽样法,被抽中家庭中所有全部成员均为调查对象。本研究候选对象即为参与该调查的居民,纳入标准:①三代以内均为广州市汉族户籍居民,三代以内无与其他民族通婚史;②无肿瘤史、半年内无输血史;③同意参与本研究并提供静脉血;④病例组为30~80岁EH患者,排除心肌梗死、脑卒中、糖尿

病、肾功能不全病史及继发性高血压患者;⑤选择与病例组在同一居委/村居住,年龄段分布、性别比例与病例组相匹配,血压<140/90 mmHg,自报无心脑血管疾病史、高血压家族史的健康居民为对照组。最终,筛选出满足条件的919名原发性高血压患者及934名健康居民为本研究对象。高血压判别标准为2月内非同日3次血压测量收缩压 ≥ 140 mmHg和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg或正在服用降压药物^[6]。所有入选对象均同意参加本研究并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集

包括研究对象的年龄、性别、户籍、住址、文化程度、患病和用药情况以及吸烟、饮酒、锻炼等情况。

1.2.2 体格检查及血液生化检测

体格检查包括身高、体重、腰围以及血压。所有项目均测量2次取平均值。若2次测量身高相差 ≥ 1 cm、体重相差 ≥ 1 kg、腰围相差 ≥ 0.5 cm、血压相差 ≥ 5 mmHg,需测量3次,以结果最接近的2次计算平均值。采集研究对象空腹外周静脉血3~5 mL检测空腹血糖、总胆固醇和甘油三酯,剩余血样-20℃保存用于基因组DNA提取。根据《中华人民共和国卫生行业标准:成人体重判定(WS/T428-2013)》^[7],自身质量指数(body mass index, BMI)=体质量(kg)/身高(m)², $24.0 \leq \text{BMI} < 28$ 定义为超重;BMI ≥ 28 定义为肥胖,男性腰围 ≥ 90 cm或女性腰围 ≥ 85 cm定义为中心性肥胖;总胆固醇(total cholesterol, TC) ≥ 6.2 mmol/L为高TC,甘油三酯(triglyceride, TG) ≥ 2.3 mmol/L为高TG^[8];空腹血糖 ≥ 6.1 mmol/L为高血糖^[9]。

1.2.3 基因组DNA提取及*NEDD4L*基因多态性检测

采用全血基因组DNA提取试剂盒(E.Z.N.A.™ Blood DNA Kit, OMEGA)提取研究对象基因组DNA。根据位点rs2288774和rs3865418所在区域的DNA序列,设计特异性引物,送上海捷瑞生物工程有限公司进行合成。基因位点多态性通过MassARRAY® IPLEX SNP平台,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱进行检测。随机抽取10%样本进行重复验证,基因型符合率为100%。

1.2.4 统计分析

研究数据采用SPSS 20.0软件进行统计分

析。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料用例数或率表示,采用 χ^2 检验;采用多因素非条件 Logistic 回归分析变量对 EH 发生风险的影响,计算优势比(OR)和 95%可信区间(95%CI), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EH 危险因素

EH 组与正常对照组年龄、性别分布无统计学

差异($P > 0.05$)。EH 组超重、肥胖、中心性肥胖、高 TG、高血糖人数比例显著高于对照组($P < 0.001$),多因素 Logistic 回归分析提示这 5 个指标均为 EH 的危险因素($P < 0.05$)。其他指标差异均无统计学意义,见表 1。

2.2 NEDD4L 基因多态性分布

两位点 rs2288774 和 rs3865418 均有 3 种基因型,其分布见表 2。Hardy-Weinberg 平衡检验显示,两位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P > 0.05$)。

表 1 广州市居民 EH 危险因素分析

Table 1 The risk factors of EH among Guangzhou residents

组别	例数	年龄(岁)	男性[n(%)]	超重[n(%)]	肥胖[n(%)]	中心性肥胖[n(%)]
对照组	934	55.02±14.82	491(52.6)	275(29.4)	46(4.9)	197(21.1)
EH 组	919	55.73±13.20	515(56.0)	459(49.9)	132(14.4)	333(36.2)
t/χ^2 值		-1.084	2.247	81.399	47.522	52.014
*P 值		0.278	0.134	<0.001(<0.001)	<0.001(0.004)	<0.001(0.013)
OR(95%CI)				1.712(1.365~2.148)	1.776(1.205~2.619)	1.359(1.067~1.731)

组别	高 TC[n(%)]	高 TG [n(%)]	高血糖[n(%)]	吸烟[n(%)]	饮酒[n(%)]	锻炼[n(%)]
对照组	193(20.7)	241(25.8)	155(16.6)	217(23.2)	203(21.7)	638(68.3)
EH 组	194(21.1)	331(36.0)	290(31.6)	190(20.7)	202(22.0)	641(69.7)
χ^2 值	0.056	22.647	56.817	1.769	0.016	0.450
*P 值	0.813	<0.001(0.030)	<0.001(<0.001)	0.183	0.898	0.502
OR(95%CI)		1.263(1.023~1.560)	2.065(1.641~2.598)			

*P 值表示为: χ^2 检验 P 值(Logistic 回归分析 P 值)

表 2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果

Table 2 The results of Hardy-Weinberg equilibrium test

组别	rs2288774			χ^2 值	P 值	rs3865418			χ^2 值	P 值
	TT	TC	CC			CC	CT	TT		
对照组	344(338)	435(448)	155(148)	0.772	0.380	388(383)	420(430)	126(121)	0.530	0.466
EH 组	374(363)	407(429)	138(127)	2.458	0.117	426(424)	396(401)	97(95)	0.122	0.727
整体	718(700)	842(878)	293(275)	3.076	0.079	814(806)	816(832)	223(215)	0.707	0.401

基因型结果为:实际例数(理论例数)

2.3 NEDD4L 基因多态性与 EH 相关性

病例-对照分析发现,rs3865418 位点基因型和等位基因分布在两组间差异有统计学意义($P = 0.047$; $P = 0.013$)。校正年龄、性别、BMI、腰围、空腹血糖和 TG 后,基因型 TT 及等位基因 T 均为 EH 的保护因素(OR=0.666, 95% CI=0.486~0.913; $P =$

0.011; OR=0.808, 95% CI=0.700~0.932; $P = 0.004$)。rs2288774 位点多态性与 EH 患病风险无关,见表 3。

2.4 NEDD4L 基因多态性与 EH 危险因素的相关性

为进一步探讨 NEDD4L 基因多态性与 EH 危险因素的相关性,对 rs2288774 和 rs3865418 两位点在 EH 组的分布频率与超重、肥胖、中心性肥胖、

表3 *NEDD4L* 基因多态性与广州市居民EH相关性

Table 3 The association of *NEDD4L* gene polymorphisms with EH among Guangzhou residents

位点	基因型/等位基因	对照组 ^a	EH组 ^a	χ^2 值	<i>P</i> 值 ^b	OR (95% CI)	<i>P</i> 值 ^c	
rs2288774	T/T	344 (36.8%)	374 (40.7%)	3.050	0.218	1	0.153	
	T/C	435 (46.6%)	407 (44.3%)			0.858 (0.696~1.058)		
	C/C	155 (16.6%)	138 (15.0%)			0.789 (0.592~1.052)		0.106
rs3865418	T	1 123 (60.1%)	1 155 (62.8%)	2.899	0.089	1	0.067	
	C	745 (39.9%)	683 (37.2%)			0.878 (0.764~1.009)		
	C/C	388 (41.5%)	426 (46.4%)	6.130	0.047	1	0.029	
	C/T	420 (45.0%)	396 (43.1%)			0.796 (0.648~0.977)		
	T/T	126 (13.5%)	97 (10.6%)			0.666 (0.486~0.913)		0.011
	C	1 196 (64.0%)	1 248 (67.9%)			1		0.013
T	672 (36.0%)	590 (32.1%)	0.808 (0.700~0.932)					

^a例数(百分比); ^b卡方检验 *P*值; ^c非条件 Logistic 回归分析 *P*值

表4 rs2288774 多态性与EH危险因素的相关性

Table 4 The association of rs2288774 polymorphisms with risk factors of EH

危险因素	基因型/ 等位基因	否 ^a	是 ^a	χ^2 值	<i>P</i> 值 ^b	OR (95% CI)	<i>P</i> 值 ^c
超重	TT	197 (42.8%)	177 (38.6%)	2.550	0.279	1	0.349
	TC	201 (43.7%)	206 (44.9%)			1.144 (0.863~1.516)	
	CC	62 (13.5%)	76 (16.6%)			1.355 (0.915~2.006)	
肥胖	T	595 (64.7%)	560 (61.0%)	2.653	0.103	1	0.109
	C	325 (35.3%)	358 (39.0%)			1.168 (0.966~1.412)	
	TT	323 (41.0%)	51 (38.6%)	0.446	0.800	1	0.744
TC	348 (44.2%)	59 (44.7%)	1.070 (0.714~1.603)				
CC	116 (14.7%)	22 (16.7%)	1.194 (0.693~2.056)			0.523	
中心性 肥胖	T	994 (63.2%)	161 (61.0%)	0.454	0.500	1	0.516
	C	580 (36.8%)	103 (39.0%)			1.093 (0.836~1.428)	
	TT	241 (41.1%)	133 (39.9%)	0.357	0.836	1	0.935
TC	260 (44.4%)	147 (44.1%)	0.988 (0.732~1.333)				
CC	85 (14.5%)	53 (15.9%)	1.118 (0.740~1.688)			0.597	
高TG	T	742 (63.3%)	413 (62.0%)	0.307	0.580	1	0.680
	C	430 (36.7%)	253 (38.0%)			1.043 (0.853~1.275)	
	TT	237 (40.3%)	137 (41.4%)	0.452	0.798	1	0.569
TC	265 (45.1%)	142 (42.9%)	0.918 (0.685~1.232)				
CC	86 (14.6%)	52 (15.7%)	1.053 (0.703~1.578)			0.802	
高血糖	T	739 (62.8%)	416 (62.8%)	0.000	1.000	1	0.996
	C	437 (37.2%)	246 (37.2%)			1.00 (0.821~1.219)	
	TT	239 (38.0%)	135 (46.5%)	13.325	0.001	1	0.778
TC	304 (48.3%)	103 (35.5%)	0.598 (0.439~0.814)				
CC	86 (13.7%)	52 (17.9%)	1.060 (0.707~1.589)				
高血糖	T	782 (62.2%)	373 (64.3%)	0.785	0.376	1	0.353
	C	476 (37.8%)	207 (35.7%)			0.908 (0.739~1.114)	

^a例数(百分比); ^b卡方检验 *P*值; ^c非条件 Logistic 回归分析 *P*值

高TG、高血糖5个危险因素进行统计分析。结果表明,rs2288774位点基因型TC为EH患者高血糖的保护因素(OR=0.598; 95% CI=0.439~0.814; P=

0.001),见表4;而rs3865418位点CT基因型为EH患者发生超重的危险因素(OR=1.396; 95% CI=1.060~1.838; P=0.018),见表5。

表5 rs3865418多态性与EH危险因素相关性

Table 5 The association of rs3865418 polymorphisms with risk factors of EH

危险因素	基因型/等位基因	否 ^a	是 ^a	χ^2 值	P值 ^b	OR (95% CI)	P值 ^c	
超重	C/C	230 (50.0%)	196 (42.7%)	6.078	0.048	1	0.018	
	C/T	180 (39.1%)	216 (47.1%)			1.396 (1.060~1.838)		
	T/T	50 (10.9%)	47 (10.2%)			1.084 (0.697~1.688)		0.720
	C	C	640 (69.6%)	608 (66.2%)	2.344	0.126	1	0.152
		T	280 (30.4%)	310 (33.8%)			1.155 (0.949~1.405)	
肥胖	C/C	365 (46.4%)	61 (46.2%)	3.720	0.156	1	0.573	
	C/T	333 (42.3%)	63 (47.7%)			1.117 (0.761~1.638)		
	T/T	89 (11.3%)	8 (6.1%)			0.530 (0.245~1.149)		0.108
	C	C	1063 (67.5%)	185 (70.1%)	0.670	0.413	1	0.377
		T	511 (32.5%)	79 (29.9%)			0.880 (0.662~1.169)	
中心性肥胖	C/C	287 (49.0%)	139 (41.7%)	4.545	0.103	1	0.079	
	C/T	239 (40.8%)	157 (47.1%)			1.299 (0.970~1.740)		
	T/T	60 (10.2%)	37 (11.1%)			1.257 (0.788~2.005)		0.338
	C	C	813 (69.4%)	435 (65.3%)	3.201	0.074	1	0.120
		T	359 (30.6%)	231 (34.7%)			1.179 (0.958~1.450)	
高TG	C/C	282 (48.0%)	144 (43.5%)	2.125	0.346	1	0.140	
	C/T	243 (41.3%)	153 (46.2%)			1.240 (0.932~1.651)		
	T/T	63 (10.7%)	34 (10.3%)			1.078 (0.677~1.715)		0.752
	C	C	807 (68.6%)	441 (66.6%)	0.782	0.376	1	0.337
		T	369 (31.4%)	221 (33.4%)			1.105 (0.901~1.355)	
高血糖	C/C	288 (45.8%)	138 (47.6%)	0.827	0.661	1	0.398	
	C/T	277 (44.0%)	119 (41.0%)			0.880 (0.654~1.184)		
	T/T	64 (10.2%)	33 (11.4%)			1.051 (0.658~1.678)		0.836
	C	C	853 (67.8%)	395 (68.1%)	0.016	0.899	1	0.797
		T	405 (32.2%)	185 (31.9%)			0.973 (0.787~1.202)	

^a例数(百分比); ^b卡方检验P值; ^c非条件Logistic回归分析P值

3 讨论

近年来,随着生活水平的提高、生活方式的改变,超重、肥胖、高血糖、高血脂等现象越来越普遍,加之嗜盐、吸烟、体力活动不足等因素居高不下,我国居民EH的患病率不断上升^[1],给社会、家庭和个人造成沉重负担,也大大降低了患者的生活质量。鉴于不同地区和民族地理环境、生活习惯的差异,掌握本地区EH流行状况及主要危险因素并进行针对性防控,显得尤为重要。

此外,EH的发生也与遗传背景及基因变异密切相关。目前已发现几百个高血压易感基因,如肾素-血管紧张素-醛固酮系统基因、内皮相关因子

基因、 α 内收蛋白基因等^[10-11]。全基因组关联研究发现,染色体18q21-22区域基因变异与EH发病密切相关,该区域也被认为是EH遗传学研究的热点^[12]。*NEDD4L*基因位于18q21.31,其编码产物为ENaC系统调控的关键环节。*NEDD4L*通过与肾集合管ENaC结合,影响其分解代谢速率,从而达到调控钠离子重吸收和稳定血压的作用^[13-14]。大量报道证实,位于*NEDD4L*基因外显子区的非同义突变rs4149601与EH及肥胖显著相关^[15-18],也是盐敏感性高血压的遗传基础之一^[19]。而位于*NEDD4L*基因内含子区的2个重要位点rs2288774和rs3865418在人群中的研究相对较少。

本研究在广州市1 853名居民中进行基线调查、体格测量及血液生化指标检测,并通过MassARRAY® IPLEX SNP平台对位点rs2288774和rs3865418进行基因分型,以描述广州市居民EH危险因素,分析NEDD4L基因多态性与EH发病风险及EH危险因素的相关性。结果显示,广州市居民EH的危险因素有超重、肥胖、中心性肥胖、高TG及高血糖;病例-对照分析发现,rs3865418位点等位基因型TT及等位基因T可降低EH发病风险,与Liang等^[20]的研究结果一致;EH组中,rs2288774位点基因型TC为EH患者血糖升高的保护因素,而rs3865418位点CT基因型为EH患者发生超重的危险因素,提示NEDD4L基因多态性可能通过增加个体EH相关危险因素进而增加EH的发生风险。

由于客观条件限制,本研究的深度和广度不足:研究设计为横断面调查,选取EH患者和目前血压正常人群进行分析,没有进行后期追踪和随访,生活方式相关信息不够全面;仅选取NEDD4L基因的2个SNP位点进行疾病风险分析,未在其他EH经典候选基因进行验证;纳入标准较严格,样本量不够大等,这些会在今后的研究中进一步完善。

参考文献

- [1] 国家卫生计生委疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告(2015年)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [2] 陈涵一, 郝莉鹏, 孙乔, 等. 上海市浦东新区2014年高血压患者死因分析[J]. 上海预防医学, 2016, 28(3):165-168.
- [3] 罗雷, 栾荣生, 袁萍. 中国居民高血压病主要危险因素的Meta分析[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(1):50-53.
- [4] 张靳冬, 付强. 中国农村人群高血压危险因素的meta分析[J]. 中国卫生统计, 2015, 32(2):298-300.
- [5] Ronzaud C, Staub O. Ubiquitylation and control of renal Na⁺ balance and blood pressure [J]. Physiology (Bethesda), 2014, 29(1):16-26.
- [6] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8):701-743.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中华人民共和国卫生行业标准:成人重量判定(WS/T428-2013)[S]. 北京:中国标准出版社, 2013.
- [8] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(10):937-953.
- [9] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(7):447-498.
- [10] 宋卫华. 原发性高血压相关基因研究进展[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2005, 5(2):500-502.
- [11] 李雪峰, 苏秀兰, 王立平, 等. 原发性高血压易感基因多态性研究进展[J]. 疾病监测与控制, 2013, 7(11):669-671.
- [12] Kristjansson K, Manolescu A, Kristinsson A, et al. Linkage of essential hypertension to chromosome 18q [J]. Hypertension, 2002, 39(6):1044-1049.
- [13] Snyder PM. The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension [J]. Endocr Rev, 2002, 23(2):258-275.
- [14] Harvey KF, Dinudom A, Cook DI, et al. The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel [J]. J Biol Chem, 2001, 276(11):8597-8601.
- [15] Luo F, Wang Y, Wang X, et al. A functional variant of NEDD4L is associated with hypertension, antihypertensive response, and orthostatic hypotension [J]. Hypertension, 2009, 54(4):796-801.
- [16] Dahlberg J, Melander O. Genetic variation in NEDD4L, salt sensitivity, and hypertension: human NEDD4L rs4149601 G allele generates evolutionary new isoform I with C2 domain [J]. J Hypertens, 2014, 32(9):1905-1906.
- [17] Araki N, Umemura M, Miyagi Y, et al. Expression, transcription, and possible antagonistic interaction of the human Nedd4L gene variant: implications for essential hypertension [J]. Hypertension, 2008, 51(3):773-777.
- [18] 王红梅, 李南方, 姚晓光, 等. 神经前体细胞表达发育调控样基因rs4149601多态性与新疆哈萨克族人群中心性肥胖的关联研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 30(6):668-671.
- [19] Dahlberg J, Nilsson LO, von Wowern F, et al. Polymorphism in NEDD4L is associated with increased salt sensitivity, reduced levels of P-renin and increased levels of Nt-proANP [J]. PLoS One, 2007, 2(5):e432.
- [20] Liang H, Wu X, Chen X, et al. Gender difference in association of NEDD4L gene variants among southern Han Chinese with essential hypertension - a population-based case-control study [J]. Clin Exp Hypertens, 2014, 36(5):309-314.

基于PCR-RDB法对陕西地区HCV基因型别的研究

杨柳 李金洁 苏明权 常亮 李蕊 马越云 郝晓柯*

[摘要] **目的** 探讨聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)-反向点杂交法(reverse dot blot, RDB)在陕西地区丙型肝炎病毒基因分型中的应用。**方法** 选取陕西地区610例丙型肝炎患者,利用PCR-RDB法进行丙肝病毒基因型检测,并使用SPSS对检测结果进行统计学分析。**结果** 610例丙肝患者检出1b型273例(44.75%),2a型286例(46.89%),3a型30例(4.92%),3b型11例(1.80%),6a型10例(1.64%);各基因型间的患者性别比例的差异具有统计学意义($P<0.05$);与其他基因型别相比,HCV 3a型患者年龄水平最低,差异显著($P<0.05$)。**结论** 陕西地区丙肝病毒以2a、1b型为主,患者性别及年龄与所感染HCV型别有关联性;PCR-RDB技术在丙型肝炎病毒基因分型中的应用有利于HCV分型在临床上的推广。

[关键词] 丙型肝炎病毒;基因分型;PCR-反向点杂交

Investigation of HCV genotypes with PCR-RDB in Shaanxi

YANG Liu, LI Jinjie, SU Mingquan, CHANG Liang, LI Rui, MA Yueyun, HAO Xiaoke*

(Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, China, 710032)

[ABSTRACT] **Objective** To discuss the application of RDB-PCR method in HCV genotyping in Shaanxi Province. **Methods** HCV genotypes were detected in 610 serum samples of chronic hepatitis C patients from Shaanxi province with RDB-PCR. SPSS was used for statistical analysis of the data. **Results** Out of 610 cases, 273 cases (44.75%) were genotype 1b, 286 cases (46.89%) were genotype 2a, 30 cases (4.92%) were genotype 3a, 11 cases (1.80%) were genotype 3b, and 10 cases (1.64%) were genotype 6a. There were significant differences on the gender ratios among different genotypes of HCV ($P<0.05$). Compared with other genotypes, the patients of HCV 3a had the lowest average age ($P<0.05$). **Conclusion** The genotypes 2a and 1b are the main HCV genotypes in Shaanxi Province. It indicated that the HCV genotype was associated with gender and age. The application of PCR-RDB will facilitate the popularization of HCV genotyping in clinical laboratories.

[KEY WORDS] Hepatitis C virus; Genotype; PCR-RDB

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是一种单股线性正链RNA黄病毒。全世界约有1.7亿人受到HCV的感染^[1],我国HCV感染者达3 800万,感染率为1.8%~3.7%,占全球HCV感染的15%~30%^[2]。感染HCV可导致肝脏发生炎症坏死和纤维化,部分丙型肝炎患者可以发展为肝硬化甚至肝癌^[3],对患者健康威胁极大,给其家庭带来沉重

的经济负担和精神压力。

由于HCV RNA复制所依赖的聚合酶缺乏校正功能,HCV基因组呈现高度异质性^[4]。根据Simmonds等人研究^[5],利用核酸测序和进化树分析结果,确定了目前国际通用的HCV基因型命名系统,将HCV分为6种主要的基因型(用数字1~6表示)和100多个基因亚型(用小写英文字母表

作者单位:第四军医大学第一附属医院西京医院检验科,陕西,西安710032

*通讯作者:郝晓柯, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

示)。不同 HCV 基因型感染者的临床表现及抗病毒治疗的效果不同^[6], 1 型 HCV 感染在进行干扰素或口服抗病毒治疗时的敏感性及其预后均较差, 治疗周期也更长^[7]。除此之外, HCV 基因型分布具有明显的地域差异性和人群差异性^[8-9]。我国常见的 HCV 基因型为 1b 和 2a, 3 型主要见于云南、广西及珠三角地区, 6 型主要见于香港和澳门地区^[10]。因此, HCV 基因型别是制定丙肝治疗方案、进行预后判断及流行病学研究的重要指标^[11]。

目前, 进行 HCV 基因分型的方法有很多, 测序法作为金标准, 结果准确可靠, 但其费时费力, 不利于临床开展的普及, 而本研究采用的 PCR-反向点杂交法具有特异性和准确性高, 且简便、高效、经济等特点。本文通过对陕西地区丙型肝炎患者基因型别分布进行分析和研究, 了解本地区最新 HCV 流行病学特点, 以更好地指导丙型肝炎的诊断、治疗及预后判断。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2015 年 1 月至 2016 年 3 月来自西京医院住院及门诊就诊的 HCV 患者 610 例血清标本, 其中男性 265 例, 女性 345 例, 年龄在 16~83 岁间, 平均年龄(48.21±13.65)岁; 上述患者诊断均符合中国肝炎防治基金会、中华医学会肝病学会和感染病学分会联合发布的中国《丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)》中的诊断标准^[12], 且 HCV RNA 定量检测结果高于 5×10^3 IU/mL。

1.2 主要试剂及仪器

丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)(中山大学达安基因股份有限公司); ABI 2720 型 PCR 仪(Applied biosystems, 美国); THZ-82 型电热恒温振荡水槽(中国常州菲普实验仪器厂); Z216 MK 型微量高速冷冻离心机(Hermle, 德国); K20 型干式恒温器(中国杭州奥盛仪器有限公司); 15 mL 及 50 mL 离心管(Corning, 美国)。

1.3 HCV 基因分型

1.3.1 血浆 HCV 总 RNA 提取

用 EDTA 抗凝采血管抽取受检者静脉血 4 mL, 1 500 r/min 离心 2 min, 吸取上层血浆 200 μ L 用于 HCV RNA 提取。按照广州达安丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)中 RNA 提取说明, 进行待测标本及阴阳性质控品 RNA 提取, 得到的 RNA 提取液可直接用于 RT-PCR, 或置

于 -20°C 冻存备用。

1.3.2 RT-PCR 扩增

按照广州达安丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)说明书进行 RT-PCR 扩增。扩增总体系 50 μ L: 酶系、引物、PCR buffer 混合液 20 μ L, 1.3.1 中 RNA 提取液 30 μ L(待测标本及阴阳性质控品), 两者混合后瞬时离心, 将反应管放入 PCR 仪, 按下列条件扩增: 50°C 逆转录 25 min; 95°C 预变性 15 min; 94°C 30 s、 55°C 40 s、 72°C 45 s 共 45 次循环; 72°C 延伸 7 min。PCR 产物可直接进行杂交反应, 或置于 4°C 短期保存, 或置于 -20°C 长期冻存。

1.3.3 杂交反应及结果判读

严格按照广州达安丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)中杂交反应说明书进行。其步骤包括预杂交、杂交、洗膜、显色、结果判读。HCV 基因分型杂交膜条上共 12 个位点, 其中位点 G1~G10 为各型别检测探针, PC 为扩增控制点, CC 为显色控制点, 位点排列如图 1 所示。根据说明书要求, 可将 CC 点、PC 点和各型别位点 cut off 值预设的分析软件中, 分析结束后由软件自动生成各位点信号值、阴阳性和相应的 HCV 型别; 也可参照结果分析表肉眼进行结果判读, HCV 基因型常见结果分析表见表 1。本文患者 HCV 型别均由肉眼判读所得。

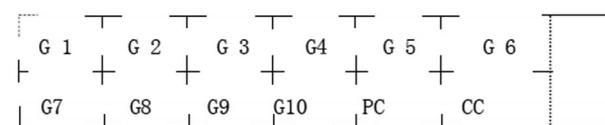


图 1 HCV 基因分型杂交膜条位点排列

Figure 1 Sequencing of hybridization membrane strip sites of HCV genotyping

表 1 HCV 基因分型常见结果分析表
Table 1 Analysis of major HCV genotypes

编号	阳性位点	HCV 分型检测结果
1	G1, G2, PC, CC	1b
2	G5, G6, G7, PC, CC	2a
3	G8, G9, PC, CC	3a
4	G8, G10, PC, CC	3b
5	G1, G3, G4, G5, PC, CC	6a
6	G1, G2, G5, G6, G7, PC, CC	1b, 2a 混合
7	PC, CC	不能确定型别
8	CC	HCV 阴性

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 16.0 进行统计学分析, 计量资料应用 *t* 检验, 计数资料用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 陕西地区 HCV 的流行病学特点

本次研究使用 PCR-RDB 法丙肝分型试剂对

选取样本进行了 5 种基因亚型的检测, 包括 1b 亚型, 2a 亚型, 3a 亚型, 3b 亚型和 6a 亚型。对 610 例陕西地区 HCV 患者的基因型及型别特点进行统计, 见表 2。结果显示, 陕西地区 HCV 型别以 2a 和 1b 型为主, 分别占总比率的 46.89% (286/610) 和 44.75% (273/610), 3a 型占 4.92% (30/610), 3b 型占 1.80% (11/610), 6a 型占 1.64% (10/610), 未见上述型别的混合感染。

表 2 陕西地区 HCV 流行病学概况

Table 2 The epidemiological overview of HCV subtypes in Shanxi Province

	基因亚型					合计
	1b	2a	3a	3b	6a	
患者例数(%)	273(44.75%)	286(46.89%)	30(4.92%)	11(1.80%)	10(1.64%)	610(100.00%)
性别						
男	122(44.69%)	109(38.11%)	20(66.67%)	8(72.73%)	6(60.00%)	265(43.44%)
女	151(55.31%)	177(61.89%)	10(33.33%)	3(27.27%)	4(40.00%)	345(56.56%)
年龄分层						
$\geq 0 \sim \leq 40$ 岁	61(22.34%)	59(20.63%)	18(60.00%)	4(36.36%)	3(30.00%)	145(23.77%)
$\geq 41 \sim \leq 50$ 岁	85(31.34%)	80(27.97%)	9(30.00%)	4(36.36%)	4(40.00%)	182(29.84%)
$\geq 51 \sim \leq 60$ 岁	71(26.01%)	88(30.77%)	3(10.00%)	2(18.18%)	3(30.00%)	167(27.38%)
$\geq 61 \sim \leq 70$ 岁	46(16.8%)	43(15.03%)	0(0)	1(9.09%)	0(0)	90(14.75%)
≥ 71 岁	10(3.66%)	16(5.59%)	0(0)	0(0)	0(0)	26(4.26%)
年龄中位数(岁)	49	51	37.5	48	44.5	48
年龄均值(岁)	48.65 \pm 13.38	49.42 \pm 13.66	36.47 \pm 11.18	44.09 \pm 12.63	41.3 \pm 11.15	48.21 \pm 13.65

2.2 不同 HCV 基因型中男女性别比例

采用卡方检验, 5 组基因亚型间的患者性别比例有显著差异, 其中 HCV 女性患者明显多于男性 ($\chi^2 = 15.047, P < 0.005$), 见表 3。同时, 由表 2 可看出在各个亚组中, 1b 亚型和 2a 亚型中女性患者多于男性, 而 3a 亚型、3b 亚型及 6a 亚型中男性多于女性。

2.3 不同 HCV 基因型中患者年龄水平的分析

对 5 种基因亚型的患者年龄水平进行统计与

分析, 如表 4 所示。结果显示, HCV 2a 型的平均年龄最高, 为 (49.42 \pm 13.66) 岁, 3a 型的平均年龄最小, 为 (36.47 \pm 11.18) 岁。对 5 组年龄进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 发现 5 种基因亚型之间年龄存在显著差异 ($F = 7.367, P < 0.0001$), 再采用 Tukey-test 法进行两两比较 (表 5), 发现 3a 型患者平均年龄水平显著低于 1b 型和 2a 型 ($P < 0.0001$)。

表 3 HCV 各基因型患者性别比例 [n(%)]

Table 3 The gender ratios among different subtypes of HCV [n(%)]

性别	基因亚型					合计	χ^2	P
	1b	2a	3a	3b	6a			
男	122(44.69)	109(38.11)	20(66.67)	8(72.72)	6(60)	265(43.44)	15.047	<0.005
女	151(55.31)	177(61.89)	10(33.33)	3(27.27)	4(40)	345(56.56)		
合计	273(100.00)	286(100.00)	30(100.00)	11(100.00)	10(100.00)	610(100.00)		

表4 HCV不同基因型患者平均年龄($\bar{x} \pm s$)Table 4 Patients' average ages among different genotypes of HCV($\bar{x} \pm s$)

	基因亚型					合计	F	P
	1b	2a	3a	3b	6a			
年龄均值(岁)	48.65±13.38	49.42±13.66	36.47±11.18	44.09±12.63	41.3±11.15	48.21±13.65	7.367	<0.000 1

表5 HCV不同基因型患者年龄水平的两两比较

Table 5 Pairwise comparison of the ages between different genotypes of HCV

基因亚型	P值			
	2a	3a	3b	6a
1b	0.960 6	<0.000 1*	0.802 0	0.430 4
2a		<0.000 1*	0.693 1	0.325 3
3a			0.487 4	0.860 3
3b				0.989 4

表中数值皆为P值,*所示为3a型患者平均年龄最小,其中与1b、2a型别相比较,具有显著性差异($P<0.05$)

3 讨论

根据全球分离毒株,目前丙肝病毒至少包括6种基因型多种基因亚型^[13]。HCV基因型分布具有显著地理差异,其中HCV 1~3型呈世界范围分布^[14],中国大体上以1b和2a型为主。本研究表明陕西地区丙型肝炎患者仍以这两种基因型为主,且2a型患者略多于1b型,这与以往报道的1b型患者比例最高有所不同,可能与标本来源只局限于医院,且与标本量有限有关。本研究中,我们分析了各基因亚型的性别构成发现,各基因亚型中患者性别比例有所不同,HCV 1b和2a亚型中女性比例较大。1b和2a基因亚型感染途径多来自不洁输血^[2],在1993年严格进行HCV血筛之前,输血及血制品导致其大面积传播。女性由于其特殊生理结构,需经历生育等过程,增加了输血概率,从而增加了感染的可能性。研究^[2]表明,3型感染主要来自静脉药瘾人群,东南亚作为全球毒品生产销售基地,是3型HCV的主要流行地区,而云南、贵州、重庆及广西等地作为毒品进入我国的窗口,也使3型HCV逐渐流入我国。本研究检测出了一定比例的3a和3b亚型,且其年龄分布与1b及2a型明显不同,其中3a亚型较1b和2a亚型患者平均年龄明显偏小,3a型患者年龄多小于40岁。这一结果间接证实对献血人群抗HCV筛查后,丙肝传播途径发生转变,并由此引起后续丙肝

病毒感染基因亚型的变化^[15]。

丙肝病毒基因型不仅是流行病学研究的主要指标,在临床治疗中也具有重要指导意义。研究^[16-17]表明,1型HCV感染在使用干扰素治疗中较难获得病毒学持续应答(sustained virologic response, SVR),且治疗时间长,治疗剂量大,联合用药剂量也要加大,预后效果较其他型别欠佳。近几年研发的HCV口服抗病毒药物如Sofosbuvir、Daclatasvir等^[18-19],同样在1型及4型HCV的治疗中也需要处长服药时间。因此,HCV基因型别可以作为抗病毒药物治疗慢性丙型肝炎是否有效的预测因素,检测HCV基因型有助于判断丙肝患者治疗的难易程度,制定个体化抗病毒治疗方案。2015年10月25日,中国肝炎防治基金会、中华医学会肝病学会和感染病学会在北京共同发布的《丙型肝炎防治指南》中指出^[12],丙肝临床治疗中除进行HCV抗体、抗原及病毒载量检测外,还要进行HCV基因分型和HCV耐药相关基因检测,以及患者IL28B基因分型检测。

随着分子生物学技术不断发展,检测HCV基因型的方法出现了很多。其中测序法^[20]是HCV基因分型的“金标准”,它不仅可以检测基因型,还可以发现新的突变。但其操作繁琐,仪器设备复杂,检测周期长、成本高,中小型医院难以实现和开展,不利于HCV基因分型的普及。本文选择的PCR-RDB法是通过将生物素或荧光素标记型特异性探针固相化在尼龙膜上,再与RT-PCR扩增的病毒产物进行杂交后,最终经纸条肉眼判读出HCV基因型的分型方法。此法不需要昂贵复杂的仪器设备,其使用的PCR技术及RDB技术也都是发展成熟、操作简便易于掌握的生物技术,在普通的分子生物学实验室及临床实验室均可开展。结合以往相关研究^[21-22],核酸分子杂交技术具有良好的特异性、准确性及灵敏度,并且实现了高通量、高效率 and 低成本,能够满足临床HCV分型的需求。值得注意的是,PCR-RDB法HCV分型目前尚未包含

所有基因亚型,针对PCR-RDB法无法完成分型的型别如1a型、2b型等,临床上将建议患者进行测序法基因分型检测验证,这也是PCR-RDB法的弊端和需要完善的方面。

参考文献

- [1] Wang LS, D'Souza LS, Jacobson IM. Hepatitis c-a clinical review [J]. *J Med Virol*, 2016, 88(11):1844-1855.
- [2] Rao HY, Wei L, Lopez-Talavera JC, et al. Distribution and clinical correlates of viral and host genotypes in chinese patients with chronic hepatitis c virus infection[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(5):1126.
- [3] Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis c virus infection [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(7):482-496.
- [4] Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis c virus genotypes[J]. *Hepatology*, 2005, 42(4):962-973.
- [5] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis c virus - 15 years on[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 11):3173-3188.
- [6] Zein NN. Clinical significance of hepatitis c virus genotypes [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(2):223-235.
- [7] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis c: An update [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4):1335-1374.
- [8] Janahi EM, Al-Mannai M, Singh H, et al. Distribution of hepatitis c virus genotypes in bahrain [J]. *Hepat Mon*, 2015, 15(12):7.
- [9] Khodabandehloo M, Roshani D. Prevalence of hepatitis c virus genotypes in iranian patients: A systematic review and meta-analysis [J]. *Hepat Mon*, 2014, 14(12):14.
- [10] Fu Y, Wang Y, Xia W, et al. New trends of hcv infection in china revealed by genetic analysis of viral sequences determined from first-time volunteer blood donors [J]. *J Viral Hepatitis*, 2011, 18(1):42-52.
- [11] Cuyppers L, Li GD, Libin P, et al. Genetic diversity and selective pressure in hepatitis c virus genotypes 1-6: Significance for direct-acting antiviral treatment and drug resistance [J]. *Viruses*, 2015, 7(9):5018-5039.
- [12] 中华医学会肝病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12):933-949.
- [13] Hngtyszyn HJ. Chronic hepatitis c and genotyping: the clinical significance of determining hcv genotypes [J]. *Antivir Ther*, 2005, 10(1):1-11.
- [14] Amoroso P, Rapicetta M, Tosti ME, et al. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis c [J]. *J Hepatol*, 1998, 28(6):939-944.
- [15] Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis c virus genotypes [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1):77-87.
- [16] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis c virus infection [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(13):975-982.
- [17] Yuen MF, Lai CL. Response to combined interferon and ribavirin is better in patients infected with hepatitis c virus genotype 6 than genotype 1 in hong kong [J]. *Intervirol*, 2005, 49(1-2):96-98.
- [18] Beinhardt S, Al Zoairy R, Ferenci P, et al. Daa-based antiviral treatment of patients with chronic hepatitis c in the pre- and postkidney transplantation setting [J]. *Transpl Int*, 2016, 29(9):999-1007.
- [19] Abergel A, Metivier S, Samuel D, et al. Ledipasvir plus sofosbuvir for 12 weeks in patients with hepatitis c genotype 4 infection [J]. *Hepatology*, 2016, 64(4):1049-1056.
- [20] Poon KS, Koay ES, Chua CW, et al. Highly accurate hcv genotyping by targeted next generation sequencing [J]. *Hepatology*, 2015, 62(s1):1092A-1092A.
- [21] Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, et al. Evaluation of versant hepatitis c virus genotype assay (lipa) 2.0 [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6):1901-1906.
- [22] 李步荣, 张彤, 李丽华, 等. PCR-RDB 技术在 HCV 基因分型中的应用研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2015, 44(11):1551-1553.

海口地区新生儿G6PD基因突变分析

刘秀莲 王洁* 黄慈丹 林文 杨春

[摘要] 目的 了解海口地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症的发生率及基因突变特点。方法 用荧光斑点法对2016年1月1日至2016年2月24日出生于海口的5 295例新生儿进行G6PD活性筛查,对173例初筛阳性的标本用多色探针荧光PCR熔解曲线法(MMCA)进行基因分型。结果 本次筛查发现海口地区新生儿群体的G6PD缺乏症发生率为3.87%(205/5 295),其中男女发生率分别为4.99%(142/2 848)和2.57%(63/2 447)。173例初筛阳性标本中检出142例(82.08%)有基因突变,基因携带率为3.18%(142/5 295/84.39%)。共检出6种基因突变类型,含74例(52.11%)c.1376 G>T,33例(23.24%)c.1388 G>A,13例(9.15%)c.95 A>G,8例(5.63%)c.1024 C>T,4例(2.82%)c.871 G>A,5例(3.52%)c.392 G>T,并检出3例(2.11%)c.1376 G>T复合c.1388 G>A突变、1例(0.71%)c.392 G>T复合c.517 T>C突变、1例(0.71%)c.95 A>G复合c.1388 G>A突变。结论 海口地区是G6PD缺乏症高发地区,c.1376G>T、c.1388G>A和c.95 A>G是主要的3种基因突变型。

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症;基因突变;多色探针荧光PCR熔解曲线法

Genotyping analysis of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase deficiency in neonates of Haikou area

LIU Xiulian, WANG Jie*, HUANG Cidan, LIN Wen, YANG Chun

(Center of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital of Hainan Province, Haikou, China, 570206)

[ABSTRACT] Objective To investigate the prevalence and genotypic mutant characteristics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in neonates of Haikou area. Methods A total of 5 295 neonates born in the Hospital of Haikou area were screened for G6PD deficiency by inflorescent spot test (FST) from January 1, 2016 to February 24, 2016. Then, 173 positive screening samples were subjected to genotyping through multicolor melting curve analysis (MMCA). Results The prevalence of G6PD deficiency in Haikou was 3.87%(205/5 295), of the 205 infants suspected to be G6PD deficiency based on FST, 142(4.99%, 142/2 848) were males and 63(2.57%, 63/2 447) were females. Among these 173 positive screening samples based on FST, 142 had a gene mutation; 6 kinds of mutation were found including 74 cases of c.1376 G>T(52.11%), 33 cases of c.1388 G>A(23.24%), 13 cases of c.95 A>G(9.15%), 8 cases of c.1024 C>T(5.63%), 4 cases of c.871 G>A (2.82%), 5 cases of c.392 G>T(3.52%); and 3 cases with both c.1376 G>T and c.1388 G>A (2.11%), 1 case with both c.392 G>T and c.517 T>C (0.71%), 1 case with both c.95 A>G and c.1388 G>A(0.71%). Conclusion The incidence of G6PD deficiency is high in Haikou area. The three G6PD mutations at 1376, 1388 and 95 are the most common variants in this area.

[KEY WORDS] Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase deficiency; Genotypic mutation; Multicolor melting curve ana

基金项目:海南省自然科学基金面上项目(20168327)

作者单位:海南省妇幼保健院检验中心,海南,海口570206

*通讯作者:王洁, E-mail: wj59726@sina.com

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症,又称蚕豆病,是一种X连锁不完全显性遗传性溶血性酶缺陷疾病,临床表现差异大,从无症状到新生儿黄疸、药物或感染引起的急性溶血、蚕豆病和慢性非球形细胞溶血性贫血,严重者导致新生儿期核黄疸,引起死亡或永久性神经系统的损伤。该病在我国呈“南高北低”的分布特点,以广东、广西及海南发病率最高^[1]。据统计2007至2010年海南省新生儿G6PD缺乏症发生率为3.17%^[2]。海口市地处海南省北部,总人口222.3万,以汉族人群为主。本文采用多色探针荧光PCR熔解曲线法(multicolor melting curve analysis, MMCA)对新生儿滤纸干血片进行基因检测,以探讨海口地区G6PD基因突变类型及其分布特点。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2016年1月1日至2016年2月24日出生于海口市内各家医院的5 295例新生儿,男性2 848例,女性2 447例,男女比例为1.16:1。出生3 d后采集足跟血,制成滤纸干血斑标本。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器

实验中用到的仪器设备有:赛默飞世尔微孔板孵育振荡器 THERMO-IEMS 1415、芬兰1 420时间分辨免疫分析仪、厦门致善核酸提取仪 Lab-Aid™824 及上海宏石全自动医用PCR分析系统 SLAN-96S。

1.2.2 试剂

红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)活性筛查试剂盒(纯化学反应荧光法)来源于广州市米基医疗器械有限公司,试剂批号 Y150810-08。

Lab-Aid 核酸提取 Micro 试剂盒(试剂批号 160607)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒-荧光PCR熔解曲线法(试剂批号 16070102)均来源于厦门致善生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 G6PD荧光斑点定性试验

采用红细胞G6PD活性筛查试剂盒进行G6PD活性筛查,步骤如下:(1)用打孔器在滤纸干血斑标本上打下1个直径3 mm的小血片置于空白微量板中;加入荧光反应试剂120 μL/孔,于Thermo iEMS微孔板孵育振荡器中37℃恒温900 r/min 振幅振动

30 min后,去纸片再振荡1 min,用芬兰1420时间分辨免疫分析仪读取荧光数值。结果判读:荧光数值>1 600为活性正常,荧光数值≤1 600为活性缺乏。

1.3.2 G6PD突变基因检测

收集G6PD活性缺乏的滤纸干血斑,打下2个直径3 mm的小血片,用核酸提取仪 Lab-Aid824 提取基因组DNA。然后采用带有FAM、HEX、ROX和Cy5检测通道且具有熔解曲线分析功能的PCR仪 SLAN-96,同时进行基因扩增和熔解曲线分析,结果参照试剂盒说明书进行基因型判读:通过比较待检样本与野生型对照的熔解峰之间熔点(T_m值)的差异判断样本是否发生突变及突变的类型。该G6PD基因突变检测试剂盒可检测中国人常见的16种G6PD基因突变类型:c.95A>G、c.383T>C、c.392G>T、c.487G>A、c.517T>C、c.592C>T、c.871G>A、c.1004C>A、c.1024C>T、c.1360C>T、c.1376G>T、c.1388G>A、c.1381G>A、c.1387C>T、c.493A>G、c.519C>T。

1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行数据处理,计数资料用百分率表示。

2 结果

2.1 海口地区新生儿G6PD缺乏症发生率

在5 295例(男2 848例,女2 447例)新生儿中,检出G6PD活性缺乏205例(男142例,女63例),总发生率3.87%(205/5 295);其中,男女发生率分别为4.99%(142/2 848)和2.57%(63/2 447)。男性发生率明显高于女性,符合X连锁不完全显性遗传规律。

2.2 G6PD缺乏症患者基因突变分析

在G6PD活性缺乏的205例样本中,剔除血斑质量差和血斑不足的样本,还有173例(男126例,女47例)进行基因突变检测,基因检测受检率为84.39%(173/205)。经MMCA检测,在173例受检样本中检出142例有G6PD基因突变,其中男105例,女37例,基因突变率82.08%,见表1。据此推算海口地区新生儿群体的G6PD基因携带率为3.18%(142/5 295/84.39%)。

2.3 G6PD基因突变类型和分布特点

142例新生儿G6PD缺乏症患者中共检出6种G6PD基因突变型:c.1024C>T、c.1376G>T、c.1388G>A、c.392G>T、c.871G>A、c.95A>G和3种复合突变,各基因突变类型和分布情况见表2。

表1 海口地区新生儿 G6PD 缺乏症基因突变率
Table 1 Genotypic mutation rate of G6PD deficiency
in neonates of Haikou area

对象	活性缺乏(例)	基因突变(例)	突变率(%)
男	126	105	60.69
女	47	37	21.39
合计	173	142	82.08

表2 142例新生儿 G6PD 缺乏症患者基因突变类型结果
Table 2 Genotype mutant results of 142 neonates
with G6PD deficiency

突变类型	男 (例)	女 (例)	合计 (例)	百分比 (%)
c.1024 C>T	8	0	8	5.63
c.1376 G>T	50	24	74	52.11
c.1388 G>A	30	3	33	23.24
c.392 G>T	3	2	5	3.52
c.871 G>A	4	0	4	2.82
c.95 A>G	10	3	13	9.15
c.1376 G>T 复合 c.1388 G>A	0	3	3	2.11
c.392 G>T 复合 c.517 T>C	0	1	1	0.71
c.95 A>G 复合 c.1388 G>A	0	1	1	0.71
合计	105	37	142	100.00

3 讨论

G6PD 缺乏症在我国呈“南高北低”的分布特点,以广东、广西及海南发病率最高。据北京国家临床实验中心 2013 年 196 个实验室上报的 30 000 万新生儿筛查结果显示,G6PD 的发生率为 1:44^[3]。本研究结果显示,海口地区新生儿 G6PD 缺乏症的发生率为 3.87%,接近于海南省的发生率 3.17%^[2],但低于澄迈县人群的发生率 5.54%^[4],说明 G6PD 缺乏症的发生率具有一定的地域或群体特异性。

G6PD 缺乏症主要是由于基因突变引起的,因编码区内碱基突变导致酶活性改变,形成血管内溶血,临床上常表现为新生儿黄疸、蚕豆病、药物性溶血、感染性溶血等。该病也是新生儿高胆红素血症的重要病因^[5]。迄今,全球已发现近 200 种 G6PD 基因突变^[6],我国已发现的突变类型则超过 30 种^[7-8]。G6PD 缺乏症目前尚无有效的根治方法,所以及早筛查与确诊以及采取积极有效的预防措施、控制诱因,是减少 G6PD 缺乏症发生最有效的措施。

多色探针荧光 PCR 熔解曲线法(MMCA)是检测中国人常见的 16 种 G6PD 基因突变类型的新方法。该法不易造成交叉污染,具有操作简便、高通量和结果易判读的优点^[9]。本研究在 173 例 G6PD

活性缺乏样本中检出 6 种基因突变:c.1376G>T (52.11%)、c.1388G>A (23.24%)、c.95A>G (9.15%)、c.1024 C>T (5.63%)、c.392 G>T (3.52%)和 c.871 G>A (2.82%),这和陈开科等^[4]在 72 例 G6PD 缺乏的澄迈人群样本中检出的 6 种 G6PD 基因点突变类型是一致的,但各种突变类型所占的比例有所不同,说明不同地区人群的 G6PD 基因突变谱不同。中国人最常见的 3 种 G6PD 基因类型^[10],即 c.1376G>T、c.1388G>A 和 c.95A>G,在本组样本中检出的比例共占 84.5%,表明 c.1376G>T、c.1388G>A 和 c.95A>G 是海口地区新生儿主要的基因突变型,这和以往报道相符合^[7, 11-12]。同时本研究还检测到 3 例 c.1376 G>T 复合 c.1388 G>A、1 例 c.392 G>T 复合 c.517 T>C、1 例 c.95 A>G 复合 c.1388 G>A,这 5 例复合突变都发生于 G6PD 活性缺乏的女性,提示复合突变很可能是双杂合子,而不是单倍型,有待进一步追查其双亲的基因型以确定。这些复合突变会引起怎样的临床结果,也有待后续的追踪观察。本研究未检测到 c.383T>C、c.487G>A、c.517T>C、c.592C>T、c.1004C>A、c.1360C>T、c.1381G>A、c.1387C>T、c.493A>G 和 c.519C>T 等突变,可能与基因检测的标本量较小有关。

本研究 173 例 G6PD 活性缺乏者中,有 31 例未检测到基因突变,分析原因可能是:(1)含有 16 个突变位点以外的基因突变类型,有待下一步通过基因测序法进行检测确认;(2)某些疾病或者药物的影响,降低了 G6PD 酶活性;(3)31 例样本中有 29 例是由海口市内其他医院采集后,一周内递送至笔者所在医院,标本采集不规范、运送时间长或处理不当等因素均会使 G6PD 失活,导致其活性降低。

海口地区是 G6PD 缺乏症的高发区,新生儿 G6PD 缺乏症发生率为 3.87%,基因突变以 c.1376G>T、c.1388G>A 和 c.95 A>G 基因型为主,利用滤纸干血斑标本在新生儿群体中开展 G6PD 缺乏症的表型筛查和基因型检测,对高危人群给予干预指导和建议能有效减少溶血性贫血的发生,避免给患者家庭造成更大的经济与精神负担。

参考文献

- [1] Dittrich S, Yordi LM, deMattos AA. The value of serum-ascites albumin in gradient for the determination of portal hypertension in the diagnosis of ascites[J]. Hepato Gastroenterology, 2001, 48(37):166-168.

(下转第 177 页)

江西 10 269 例女性 HPV 感染情况及分型检测分析

曾选* 宇翔 陆瑶

[摘要] **目的** 分析江西地区女性宫颈人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染率和各基因亚型的分布情况,为预防 HPV 感染和降低宫颈癌的发生提供科学依据。 **方法** 采用聚合酶链反应(PCR)体外扩增和反向点杂交技术,对 2015 年 9 月至 2016 年 6 月在我院就诊的 10 269 例女性宫颈脱落细胞标本进行共 28 种 HPV 基因亚型检测。 **结果** 10 269 例宫颈脱落细胞标本 HPV 总阳性率为 29.98%,其中单一亚型感染率 62.68%,多重亚型感染率 37.32%;15 种高危型感染率较高的为 16、52 和 58 型,10 种低危型感染率较高的为 40、44、81 型;HPV 感染的高峰年龄在 50 岁及以上人群,各年龄组间 HPV 感染阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论** 江西女性 HPV 感染阳性率较高,加强 HPV 分型筛查检测,做到早防早治,对降低本地区宫颈癌的发病率有重要的作用。

[关键词] 人乳头瘤病毒; 高危型 HPV; HPV 亚型; 反向点杂交

Analysis of the HPV infection and genotyping distribution in 10 269 women in Jiangxi area

ZENG Xuan*, YU Xiang, LU Yao

(Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Jiangxi, Nanchang, China, 330006)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the prevalence of cervical infection with human papillomavirus (HPV) and distribution of gene subtypes in Jiangxi province, and provide a basis for preventing HPV infection and reducing the accident rate of cervical cancer. **Methods** 10 269 female patients who received cervical testing in our hospital from September 2015 to June 2016 were selected as the research objects. The cervical cytology samples were tested for 28 HPV-DNA subtypes by using PCR and reverse dot blot hybridization techniques. **Results** The HPV infection rate of 10 269 cervix cytology sample was 29.98%, in which the single subtype infection rate was 62.68%, and the multiple subtype infection rate was 37.32%. The highest infection rate of the 15 high-risk-subtype were type 16, type 52 and type 58. The highest infection rate of the 10 low-risk-subtype were type 40, type 44 and type 81. The peak age of HPV infection was 50 and over 50 years old. The difference between different age groups in HPV infection rate was significant ($P < 0.01$). **Conclusion** The positive infection rate of HPV among women in Jiangxi province was high. In order to decrease the morbidity of cervical cancer, we should enhance HPV subtype detection, early prevention and treatment.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; High - risk type HPV; Subtype HPV; Reversed blot hybridization lysis

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)呈球形,无包膜、为最小的 DNA 病毒。随着分子生物学技术的不断发展,根据病毒 DNA 的同源性,目前已确定 HPV 基因亚型超过 100 种,其中 30 多种亚型可感染人类生殖道并引起宫颈病变^[1],特别是高危型

HPV(high-risk type human papillomavirus)持续感染是癌前病变及宫颈癌发生的重要危险因素^[2]。为了解本地区妇女 HPV 感染率及分型情况,本文应用 PCR-反向点杂交技术对 10 269 名女性宫颈拭子进行 HPV-DNA 检测和分型分析,现报告如下。

作者单位:江西省妇幼保健院,江西,南昌 330006

*通讯作者:曾选, E-mail: 1833638052@qq.com

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择2015年9月至2016年6月在江西省妇幼保健医院门诊就诊和住院进行HPV分型检测的女性患者10 269例,年龄范围15~77岁,平均年龄(39.37±10.3)岁。

1.2 标本采集

用扩阴器暴露宫颈,用宫颈刷置于宫颈口,顺时针旋转4~6周以获取足量的上皮细胞,然后取出宫颈刷置于盛有2 mL生理盐水的无菌小试管内密闭送检,若不能及时送检,放置4℃冰箱保存不超过1周。采样前3天排除病人进行阴道冲洗、使用药物及发生性行为等。

1.3 检测方法

基因分型检测采用广州安必平医药科技股份有限公司 HPV 核酸扩增分型检测系统,对标本进行28种 HPV 基因亚型的检测,将采集的标本通过细胞洗脱、离心、PCR 扩增、杂交、显色等过程处理,操作过程严格按照仪器和试剂说明书进行规范操作,设置阴、阳性质控对照,保证结果准确可靠。根据致病力大小和致癌危险程度将 HPV 分为高危型、疑似高危型和低危型^[3]。此检测方法可一次检测样本中高危型 HPV (16、18、31、33、35、39、

45、51、52、56、58、59、68、73、82) 15种、疑似高危型 HPV (26、53、66) 3种及低危型 HPV (6、11、40、42、43、44、54、61、81、83) 10种共计28种亚型,对检测结果进行统计分析。两种或两种以上亚型阳性者为多重感染。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据统计分析,计数资料比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

将待用的探针分别点到硝酸纤维素膜或尼龙膜上,每个探针一个点,并编上号,再将待测样本的 PCR 扩增产物与之杂交,如产物序列与探针匹配,就会与具有同源序列的探针结合,后经洗涤去除未结合的 PCR 产物,再经相应的显色反应便能显出杂交信号,这样一次就可以判断待测样本内所有的基因型别或等位基因,这就是反向点杂交方法,见下图1。

2.1 感染率

基因分型检测10 269例受检者中,HPV-DNA 阳性标本3 079例,阳性率为29.98%(3 079/10 269),HPV-DNA 阴性标本7 190例,阴性率为70.02%(7 190/10 269)。

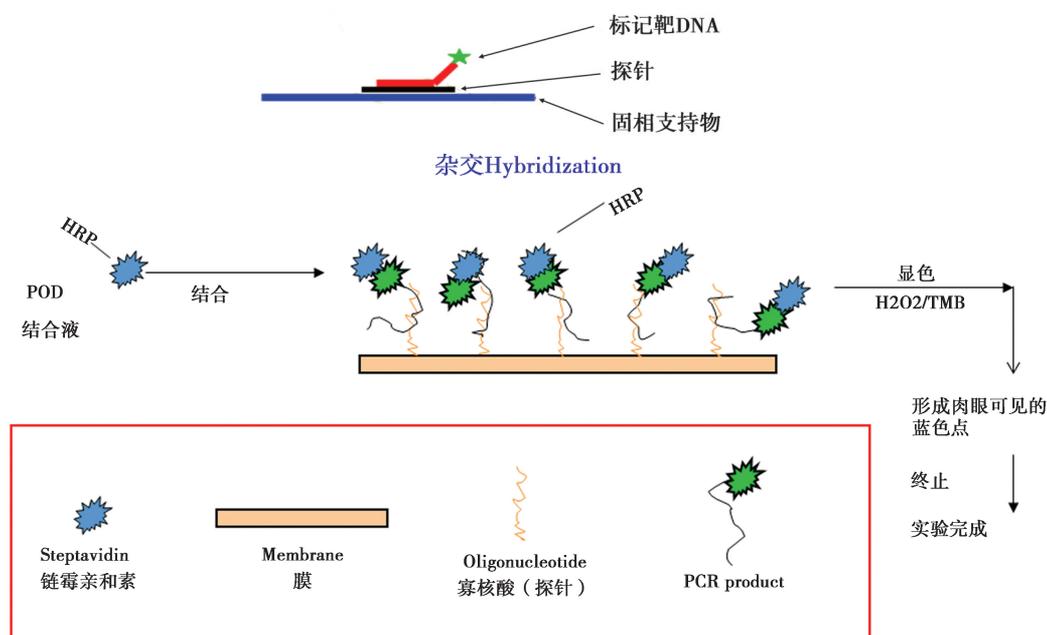


图1 反向点杂交流程

Figure 1 The procedue of Reverse dot blot hybridization

2.2 HPV-DNA 基因分型

该检测试剂盒所能检测的28种基因型均有检出,其中感染率最高的亚型是与宫颈癌关系密切的HPV16型,阳性率达到24%;感染率最低的亚型为HPV26型,占0.42%,各亚型构成比详见表1。

表1 3 079例女性HPV感染者28种亚型构成比

HPV 亚型	HPV 感染例数	构成比 (%)
高危型(15种)		
16	739	24.00
18	140	4.55
31	93	3.02
33	180	5.85
35	55	1.79
39	155	5.03
45	22	0.71
51	156	5.07
52	676	21.96
56	168	5.46
58	405	13.15
59	68	2.21
68	180	5.85
73	14	0.45
82(MM4)	41	1.33
疑似高危型(3种)		
26	13	0.42
53	235	7.63
66	165	5.36
低危型(10种)		
6	114	3.70
11	109	3.54
40	304	9.87
42	156	5.07
43	73	2.37
44	278	9.03
54	108	3.51
61	149	4.84
81(CP8304)	165	5.36
83(MM7)	16	0.52

单一亚型感染患者1 930例,占全部阳性患者的62.68%(1 930/3 079),其中单一型感染以HPV16、52、58型居多;多重(混合)感染患者1 149例,占全部阳性患者的37.32%(1 149/3 079);多型感染以二重感染为主,占多重感染的63.27%(727/

1 149),其次为三重感染21.15%(243/1 149),四重感染为8.36%(96/1 149)。3 079例阳性感染者中,高危型HPV感染占62.13%,疑似高危型HPV感染占8.30%,低危型HPV感染占29.57%,详见表2。

表2 单一亚型感染及多重感染结果分析

Table 2 Analysis the results of single and multiple infection subtypes

	感染例数	构成比 (%)
单一感染	1 930	62.68
双重感染	727	23.61
三重感染	243	7.89
四重感染	96	3.12
五重感染	46	1.49
≥六重感染	37	1.21
总计	3 079	100.00

2.3 感染者年龄分布

从下表3中可看出50岁及以上的人群,是HPV感染的高危人群,50~59岁及≥60岁分别感染率高达38.78%和39.57%,这2组年龄段HPV感染率最高,各年龄组间HPV感染阳性率差异有统计学意义($\chi^2=70.077, P<0.01$)。<20岁的就诊患者人数少,只有71例,同时其来就诊时相关症状明显,检测针对性强,常规体检患者少,故此年龄段感染率高与这些因素有关。

表3 不同年龄段HPV感染情况分布

Table 3 Distribution of HPV infection among different age group

年龄段(岁)	检测例数	感染例数	感染率 (%)
<20	71	22	30.99
20~29	1960	558	28.47
30~39	3164	878	27.75
40~49	3555	1 029	28.95
50~59	1145	444	38.78
≥60	374	148	39.57
总计	10 269	3 079	29.98

3 讨论

人乳头瘤病毒可引起人的皮肤黏膜鳞状上皮增殖,导致人的上皮良性或恶性肿瘤。由于感染组织、感染部位、所引起感染的病毒型别不一,产

生的病变也多样。自上世纪70年代末至80年代初发现HPV与宫颈癌有关以来,一直得到人们的关注。许多的研究表明^[4],HPV感染是引起宫颈细胞异常以及宫颈癌病理学改变的最为重要因素,特别是在1996年,世界卫生组织将HPV确认为引发宫颈癌的根本性致病因子^[4]之后,HPV感染更是得到全世界的广泛关注。

从流行病学资料表明,HPV感染基因型分布存在地域性差异,其致癌性和后果也不同^[5]。可感染生殖道的HPV根据致病力大小或致癌危险性通常分为高危型和低危型2种,也有学者将HPV分为低危型、中间型和高危型3种^[6]。常见的低危型如HPV6、HPV11等能导致生殖道尖锐湿疣;高危型HPV16、HPV18等感染已证实具有潜在的致癌性,与宫颈癌的发生和发展有密切关系,90%~95%宫颈癌的发生与HPV感染有关^[6]。不管将HPV如何分型、分类,其高致病性的亚型一直得到人们的高度重视,因此,快速准确检测HPV病毒,并鉴定出基因型,对治疗和预防这类病毒所引起的疾病有着重要作用。

本研究对江西地区10 269例妇女进行的HPV基因分型检测,总感染率为29.98%,与李世君^[7]、宋艳芳等^[8]所报道的接近,低于深圳地区的56.01%^[9]和龙岩地区的37.09%^[10],高于广东惠州的15.99%^[11]、北京地区的17.485%^[12]。表明各地HPV的感染率存在差异,这与地域、人群分布、受检人群、标本采集方法和采集量、使用仪器试剂等因素相关。Clifford等^[13]早期研究发现在亚洲国家人群HPV感染以52和58亚型为主,本次研究HPV基因分型结果前三的为HPV16、HPV52、HPV58型,阳性率分别24%、21.96%、13.15%,与李翔^[14]、汪欣等^[15]有关HPV感染主要亚型研究结果相同。本地区HPV感染以单一亚型为主,占62.68%,单一亚型感染以高危型HPV16为主,占单一亚型感染的22.95%。多重感染以双重感染为主,占多重感染的63.27%。在多重感染病例中,最多的出现十重感染。过早性行为以及拥有较多的性伴侣,可使HPV感染风险明显增加^[16]。通过分析多重感染病例,一般以年龄较大者发生多重感染的较多,而年轻出现多重感染的以性乱者居多。本次研究多重感染病人病情和症状,病人合并HPV基因亚型数越多,其症状或病情越严重,经脱落细胞学和阴道镜取材病检最终诊断为宫颈

癌、癌前病变、局灶不典型增生、宫颈病变、尖锐湿疣等疾病,与临床诊断高度符合,多重感染及HPV高危亚型感染是临床和病人关注的重点。

在不同年龄段分组调查结果中,HPV感染年龄高峰为≥60岁和50~59岁年龄段,其次是<20岁、40~49岁、20~29岁和30~39岁,感染率分别为39.57%、38.78%、30.99%、28.95%、28.47%和27.75%,各年龄组间HPV感染阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$)。<20岁年龄组由于样本量等多因素使感染率高于20~49岁年龄段外,30岁以后女性随着年龄增长,机体抵抗力逐渐降低,可能会出现HPV反复感染或长期持续感染,引起细胞病理变化,导致机体病变,因此对于30岁的女性应常规进行HPV检查筛查,而到了50岁处于HPV感染高峰年龄的女性更应加强HPV筛查力度,增加体检频次,提高HPV的筛查、诊断、治疗、预防能力。

不治已病治未病,美国疾病控制与预防中心和美国妇产科医师学会推荐对男女孩均应常规接种HPV疫苗。最近我国食品药品监督管理局已通过了HPV疫苗的使用许可,这对中国广大妇女预防HPV感染和降低宫颈癌的发生是个福音。在接种疫苗的同时,妇女应加强HPV的筛查检测力度,特别是到了50岁的妇女更应该重视HPV的筛查,对检测出HPV基因高危型、多重感染者,或有症状、高危因素的妇女,应联合液基细胞学检查(liquid-based thinlayer cytology test, TCT)、阴道镜取材病检等方式,做到早筛查、早诊断、早干预、早治疗,定期复查,把宫颈癌这一严重影响妇女健康的疾病消灭在萌芽状态。

参考文献

- [1] Dell G, Gaston K. Human papillomavirus and their role in cervical cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(12-3):1923.
- [2] zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical count [J]. Virology, 2009, 384(2):260-265.
- [3] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348(6):518-527.
- [4] 申华,冯杏琳. HPV-DNA分型检测在妇科临床中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(3):81-82.

- [5] Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, et al. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears[J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(4):1-6.
- [6] 李金明. 实时荧光PCR技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2014:240-255.
- [7] 李世君, 王芳. 1803例女性人乳头瘤病毒基因分型检测及感染情况分析[J]. *内蒙古医学杂志*, 2016, 48(1):46-48.
- [8] 宋艳芳, 祝先进, 林青, 等. 1256例女性人乳头瘤病毒感染及其亚型分布调查[J]. *福建医科大学学报*, 2011, 45(1):58-60.
- [9] 李春龙, 廖洪, 杨瑛, 等. HPV分型及其高危亚型与宫颈病变的相关性分析[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(8):1109-1111.
- [10] 张满娥, 黄文蓉, 张洪彬. 1456例女性HPV基因分型结果的回顾分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013, 5(1):32-35.
- [11] 李旭艳. 惠州地区人乳头乳病毒(HPV)的亚型分布特点及其与年龄的相关性分析[J]. *医学综合*, 2015, 12(21):102-104.
- [12] 郭晓霞, 田玉旺, 张立英, 等. 41751例女性宫颈细胞中HPV基因分型的回顾性分析[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(2):113-127.
- [13] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papilloma virus type-distribution in the cervix of Chinese women: a meta-analysis [J]. *Int J STD AIDS*, 2003, 19(2):106-111.
- [14] 李翔, 鲁艳明, 张瑶. 沈阳地区妇女HPV感染情况分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(7):1107-1110.
- [15] 汪欣, 赵素萍, 魏建威. 福州地区935例妇女HPV感染情况的分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(1):33-35.
- [16] 吴筱花, 孙丽萍. 宫颈病变与HPV感染的相关关系及危险因素分析[J]. *中国性科学*, 2016, 25(3):51-53.

(上接第153页)

- [30] Kim KI, Simon R. Using single cell sequencing data to model the evolutionary history of a tumor[J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1):1-13.
- [31] Mäbert K, Cojoc M, Peitzsch C, et al. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(8): 659-677.
- [32] Normanno N, Rachiglio AM, Roma C, et al. Molecular diagnostics and personalized medicine in oncology: challenges and opportunities [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(3):514-524.
- [33] Murphy PJ, Cipriany BR, Wallin CB, et al. Single-molecule analysis of combinatorial epigenomic states in normal and tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(19):7772-7777.
- [34] Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR [J]. *Nature*, 2012, 483(7387):100-103.
- [35] Wang Y, Waters J, Leung ML, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing[J]. *Nature*, 2014, 512(7513):155-160.
- [36] Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 298-306.
- [37] Morimoto A, Mogami T, Watanabe M, et al. High-density dielectrophoretic microwell array for detection, capture, and single-cell analysis of rare tumor cells in peripheral blood[J]. *PloS One*, 2014, 10(6): e0130418.
- [38] Ramsköld D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8):777-782.
- [39] Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(10):2965-2975.

· 论 著 ·

人肠道病毒 D68 型在儿童急性呼吸道感染中的临床特征与分子生物学特征分析

郝金斗 李明珠 刘培辉*

[摘要] **目的** 了解人肠道病毒 D68 (EV-D68) 在儿童急性呼吸道感染 (acute respiratory tract infection, ARTI) 中的临床特征及分子流行病学特征。 **方法** 采集 2014 年 3 月至 2016 年 3 月年深圳市妇幼保健院住院及门诊年龄 1 月至 14 岁符合急性呼吸道感染 (ARTI) 患儿共 13 472 份咽拭子分泌物, 使用 EV 通用核酸试剂盒进行肠道病毒检测, EV 病毒通用核酸阳性标本通过 RT-PCR 扩增并测序分型。 **结果** 在 13 472 份鼻咽部拭子标本中, EV 阳性病例 1 222 例, 阳性率为 9.10%, EV-D68 感染患儿 7 例, 阳性率 0.05%, 其 VP1 扩增序列分离的 5 株 D68 均与进化簇 1 病毒序列具有高同源性, 2 例与进化簇 2 有高同源性。 **结论** EV-D68 可能是急性呼吸道感染的一种新的主要病原体, 感染高峰季节可能在秋冬季节, 以急性下呼吸道感染 (acute lower respiratory tract infections, ALRTI) 为主要表现。

[关键词] 肠道病毒; 急性呼吸道感染; 肠道病毒 D68

The clinical and molecular characterizations of enterovirus D68 among children with acute respiratory infection

HAO Jindou, LI Mingzhu, LIU Peihui*

(Shenzhen maternity and children's hospital affiliated Southern medical university, Shenzhen, Guangdong, China, 518028)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical and molecular epidemiological characteristics of children with enterovirus D68 in acute respiratory tract infection (ARTI). **Methods** 13 472 cases which were diagnosed with acute respiratory tract infection in the outpatient and ward from March 2014 to March 2016 were screened for enterovirus (EV). The EV positive cases of enterovirus were collected to identify the types of enterovirus by RT-PCR and sequencing. **Results** 1 222 EV positive cases were found in 13 472 nasopharyngeal swab specimens, the positive rate was 9.10%; and 7 EV-D68 infection were detected, the positive rate was 0.05%. Compared to the Fermon prototype strain of the VP1 sequence, 5 strains of EV-D68 have higher homology with group 1 virus sequence, while 2 with group 2 virus sequence. **Conclusions** EV-D68 may be a new predominant pathogen in acute lower respiratory tract infection (ARTI). The infection peak season may be in autumn and winter season. ALRTI may be a clinical feature of EV-D68 infection.

[KEY WORDS] Enterovirus; Acute respiratory infection; EV - D68

人类肠道病毒 (human enterovirus, HEV) 属小 RNA 病毒科肠道病毒属, 可分为脊髓灰质炎病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒和新型肠道病毒。目前基于对 VP1 基因序列的进化研究, 又可分为 EV-A、

EV-B、EV-C、EV-D4 组^[1]。近年来, 肠道病毒尤其新型肠道病毒引起的急性呼吸道感染越来越引起关注, 有研究表明在病因明确的上呼吸道感染疾病中, 大约 15% 由 HEV 感染造成, 其中肠道病毒

基金项目: 深圳市科创委项目资助 (深圳市新型 HEVs 在小儿 ARTI 中的临床及分子流行病学特征) (JCYJ20140414145619894)

作者单位: 南方医科大学附属深圳妇幼保健院, 广东, 深圳 518028

*通讯作者: 刘培辉, E-mail: lph521521@126.com

D68型(EV-D68)是最主要型别^[2,3]。EV-D68为正向单链RNA病毒,与D70、D94、D111、D120同属于EV-D组。1962年,EV-D68首次被分离发现,2014年在美国的密苏里州和伊利诺伊州引起严重呼吸系统病例,并引发全国范围内的流行^[4]。

在开展新型肠道病毒在急性呼吸道感染的研究中,我们发现了EV-68感染的急性呼吸道感染儿童,总结其临床特点及分子生物学特征如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

选取2014年3月至2016年3月年深圳市妇幼保健院住院及门诊年龄1月至14岁符合急性呼吸道感染(acute respiratory tract infection, ARTI)患儿13472例作为研究对象,性别不限。ARTI包括上呼吸道感染及下呼吸道感染。排除标准:①近3月反复呼吸道感染或免疫缺陷者;②病程≥7 d。急性呼吸道感染诊断标准及疾病谱按照第八版《褚福棠实用儿科学》^[5]。

1.2 标本与病例信息采集

(1)咽拭子标本采集:入院48 h内,常规消毒后通过抽吸器取患儿的鼻咽深部分泌物,采集后

置入-20℃低温冰箱保存备用。(2)在采集符合标准的住院儿童呼吸道标本后,医生或护士使用统一标准问卷,收集病例的基本人口统计学信息、临床症状、体征、血常规、临床生化检查、细菌培养结果、影像学检查、主要诊断、治疗和预后等信息。采用EpiData3.0软件录入相关数据,建立数据库。

1.3 研究方法

使用EV通用核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)(中山大学达安基因股份有限公司)由深圳市妇幼保健院检验科对所采集标本统一检测。EV病毒通用核酸阳性标本统一由广州云诺生物公司进一步测序分型。方法采用传统RT-PCR和测序。RT-PCR采用222:5'-CICCIGGIGGIAYRWACAT-3'和292:5'-MIGCIGYIGARACNGG-3'引物^[7],扩增VP1基因部分片段,长度为358 bp。产物以Sanger法测序后,所得序列以BLAST工具在GenBank数据库中进行序列对比分析得到分型结果。

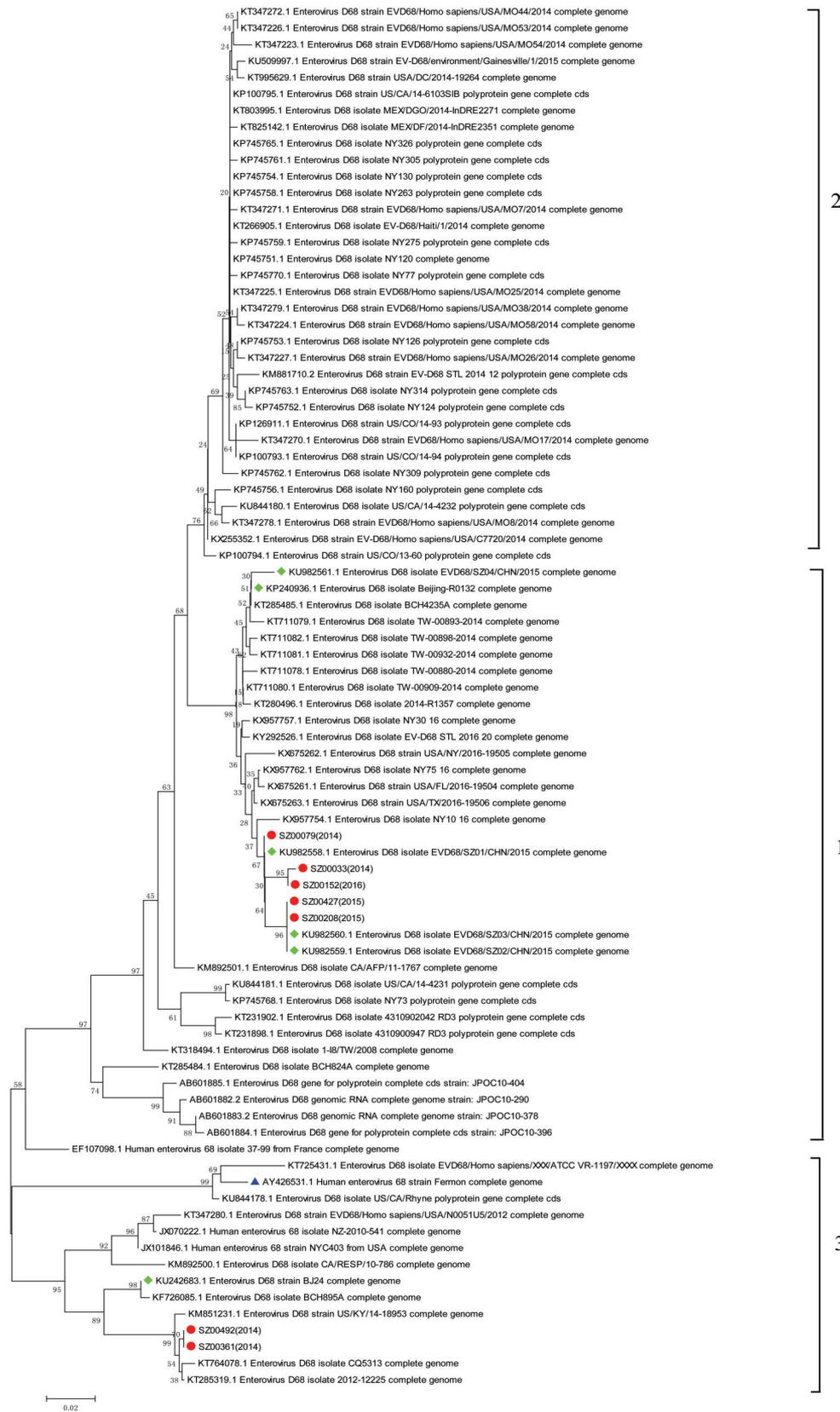
1.4 系统进化分析

测序所得核苷酸VP1部分序列使用BioEdit程序进行比对,系统进化树由MEGA程序(Version6.0)构建。采用neighbor-joining方法,bootstrap值为1000^[8]。



图1 7例EV-D68部分VP1基因序列测序结果与Fermon原型株及国内分离株的的比对

Figure 1 Partial VP1 gene from the seven EV-D68 were compared with EV-D68 isolated from China (Shenzhen and Beijing) and the original Strain Fermon



本次研究中分离到的7例EV-D68以圆形标记,原型Fermon株以三角形标记,其他国内分离株以菱形标记

图2 7例分离株VP1部分基因序列系统进化分析图

Figure 2 Phylogenetic analysis of partial VP1 gene sequence of enterovirus D68 isolated from the seven samples

1.5 统计学方法

采用 EpiData3.0 软件录入相关数据,建立数据库。

2 结果

2.1 EV 检测及 EV-D68 的鉴别

在 13 472 份鼻咽部拭子标本中, EV 阳性病例 1 222 例, 阳性率为 9.10%, 发现 EV-D68 感染患儿 7 例, 阳性率 0.05%, 7 例 EV-D68 病例其 VP1 扩增序列与 Fermon 原型株及国内分离株的比对情况见图 1 所示。本次研究分离到的 VP1 序列基本与 2015 年所报道的深圳分离株序列一致, 与 Fermon 株序列有较大差异。

2.2 EV-D68 的系统进化分析

此前已有研究者对 EV-D68 进行了系统进化树分析, 并分为群 1、2、3 三个进化簇, 如图 2 所示。此次分离的 7 株 D68 中 5 株与进化簇 1 病毒序列具有更高同源性, 2 株与进化簇 3 有更高同源性。

2.3 临床特征及流行病学分析

7 例 EV-D68 感染患者均系住院病人, 男女比例 4:3, 发病年龄 7 月~6 岁 1 月, 中位数年龄 2 岁 6 月, 主要症状包括: 咳嗽伴喘息(3 例)、咳嗽伴腹泻(2 例)、发热伴喘息(1 例)、咳嗽(1 例); 上呼吸道感染 2 例(喘息性支气管炎及急性支气管炎各 1 例), 下呼吸道感染 5 例(肺炎 4 例, 毛细支气管炎 1 例)。2014 年 9 月及 10 月各 1 例, 2014 年 11 月 2 例, 2015 年 10 月及 12 月 2016 年 1 月各发现 1 例。由于感染例数有限, 不足以做临床特征的统计学分析。

3 讨论

EV-D68 是 1962 年在美国加利福尼亚发现的一种肠道病毒, 2014 年在美国及加拿大引起严重呼吸道疾病的爆发, 从而引起人们关注。美国疾病预防控制中心当年共计检测 2 600 个标本, 其中 36% 测试为 EV-D68 阳性, 所有确诊感染病例均为儿童, 共计 14 例死亡病例报告, 但目前仍不确定病毒的致病途径^[9]。此后, 欧洲、亚洲等国家均有 EV-D68 的病例报道^[10-13]。根据病毒流行情况及研究人群不同, 在流行爆发区域收集的呼吸道样本中 EV-D68 阳性率可达 44%^[4]。国内目前报道的 EV-D68 阳性率在 0.2%~1%^[14-15]。有研究^[14]发现在北京 7 945 份咽拭子标本中肠道病毒阳性率 6.99% (555/7 945), EV-D68 阳性率 0.2% (12/7 945)。本研究发现肠道病毒

阳性率 9.1% (1 222/13 472), EV-D68 阳性率 0.05% (7/13 472), EV-D68 阳性率较北京地区的研究结果低, 可能与地区差异气候、研究对象不同及标本来源不同有关。EV-D68 引起的急性呼吸道感染表现不同, 既可以引起轻微的呼吸道感染, 也可以引起严重的呼吸道感染, 甚至死亡。在本研究中 7 例患者均表现为咳嗽、喘息, 以下呼吸道感染多见, 与既往报道一致^[4, 15]。但是由于 EV-D68 阳性病例少, 其感染与临床特征之间的关系还需进一步研究。Xiao 等^[15]研究也发现 2014 年 9~10 月重庆 EV-D68 感染较前增多, 本研究 7 例 EV-D68 患者均在发生秋冬季节, 2014 年美国 EV-68 爆发流行在 9~10 月份^[4], 与本研究结果一致, 提示秋冬季节可能是 EV-D68 感染高峰季节。虽然目前研究 EV-D68 感染率低, 但还需要长时间检测人群中 EV-D68 的流行特征, 以应对其可能流行爆发情况。

本次鉴别出的 5 例 EV-D68 病毒 VP1 区域基因序列与 2015 年度在深圳市疾病预防控制中心分离到的病毒株^[17]具有高度同源性 (94%~96%), 同属于 EV-D68 病毒进化树中的进化簇 1; 2014 年检出 2 例序列同属于病毒进化树种的群 3, 与美国 2014 年分离株大多数属于进化簇 3 在基因组上具有高度同源性, 同源性为 89%~91%, 提示可能与美国 EV-D68 的流行有关。深圳市 EV-D68 目前感染率低, 仍处于散发, 但是该病毒的进化和变异明显, 且在国外曾形成局部爆发流行, 需进一步研究。但本研究由于样本例数和临床信息有限, 不足做回顾性研究。还需进一步收集多中心更多样本的研究, 包括不同年度样本、样本完整临床信息、病例临床症状及严重程度, 以更好地掌握 EV-D68 的感染季节规律, 以及不同基因谱的毒株与疾病严重程度的相关性。

参考文献

- [1] Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases [J]. J Neurovirol, 2005, 11(5):424-433.
- [2] Lu QB, Wo Y, Wang HY, et al. Detection of enterovirus 68 as one of the commonest types of enterovirus found in patients with acute respiratory tract infection in China [J]. J Med Microbiol, 2014, 63(3):408-414.
- [3] Xiang Z, Gonzalez R, Wang Z, et al. Coxsackievirus A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China [J]. Emerging Infectious Disease, 2012, 18(5): 821-824.

- [4] BA Brown, WA Nix, M Sheth, et al. Seven strains of Enterovirus D68 detected in the United States during the 2014 severe respiratory disease outbreak [J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6):1201-1214.
- [5] 江载芳, 申昆玲, 沈颖. 诸福棠实用儿科学 [M]. 8版. 北京:人民卫生出版社, 2015:1247-1287.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010年版)[J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(24):1473-1475.
- [7] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38:1170-1174.
- [8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2011, 28:2731-2739.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus D68 [EB/OL]. <http://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/outbreaks/EV-D68-outbreaks.html>. 2016-07-19/2017-02-08.
- [10] Imamura T, Suzuki A, Lupisan S, et al. Molecular evolution of enterovirus 68 detected in the Philippines [J]. *PloS One*, 2013, 8:74221.
- [11] Lu QB, Wo Y, Wang HY, et al. Detection of enterovirus 68 as one of the commonest types of enterovirus found in patients with acute respiratory tract infection in China [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, 63:408-414.
- [12] Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, et al. Acute respiratory infections due to enterovirus 68 in Yamagata, Japan between 2005 and 2010 [J]. *Microbiol Immunol*, 2012, 56 (2):139-143.
- [13] Piralla A, Girello A, Grignani M, et al. Phylogenetic characterization of enterovirus 68 strains in patients with respiratory syndromes in Italy [J]. *Journal of Medical Virology*, 2014, 86:1590-1593.
- [14] Zhang T, Li A, Chen M, et al. Respiratory infections associated with enterovirus D68 from 2011 to 2015 in Beijing, China [J]. *Journal of Medical Virology*, 2016, 88(9):1529-1534.
- [15] Xiao Q, Ren L, Zheng S, et al. Prevalence and molecular characterizations of enterovirus D68 among children with acute respiratory infection in China between 2012 and 2014 [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:16639.
- [16] Chen L, Shi L, Yang H, et al. Identification and whole-genome sequencing of four Enterovirus D68 strains in southern China in Late 2015 [J]. *Genome Announcements*. 2016, 4(5):1014-1016.

(上接第 167 页)

- [2] 赵振东, 王洁, 温英梅, 等. 2007~2010年海南省新生儿 G6PD 缺乏症筛查结果分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(33):5493-5494.
- [3] Zhong K, Wang W, He F, et al. The status of neonatal screening in China, 2013 [J]. *J Med Screen*, 2015, 23 (2):59-61.
- [4] 陈开科, 符菊秀, 熊先会, 等. 海南省澄迈县人群 G6PD 缺乏症基因突变分析 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(9):1222-1226.
- [5] 李雅丹, 吴琳琳, 夏敏, 等. 新生儿高胆红素血症葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因检测及临床意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(19):3961-3963.
- [6] Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2012, 48(3):154-165.
- [7] 林芬, 杨辉, 杨立业. 我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分布特征和基因突变 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(2):73-77.
- [8] 陈瑶, 苏跃青, 周进福, 等. Mass-array 芯片技术在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变位点检测中的应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(12):822-826.
- [9] 严提珍, 钟青燕, 唐宁, 等. 多色探针荧光 PCR 熔解曲线法在 G6PD 基因突变检测中的临床应用评价 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(2):156-162.
- [10] Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype - phenotype association [J]. *Blood Rev*, 2007, 21(5):267-283.
- [11] 徐芸, 罗建明. 我国 G6PD 缺乏症基因突变的研究现状 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2009, 14(3):143-145.
- [12] 蔡望伟, 周玉英, 周代锋, 等. 海南汉族、黎族人葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的基因突变型分析及一种新的 G6PD 基因突变型的鉴定 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 18(2):105-109.

地中海贫血儿童体内微量元素的探讨

刘冰 饶雪飞 曾赤佳*

【摘要】 目的 探讨地中海贫血儿童全血中钙、铜、铁、镁、锌、镉、铅元素含量,为营养膳食提供依据。方法 选取2015年1~12月在佛山市禅城区中心医院门诊儿童333例,其中疾病组133例,对照组200例。采用广东凯普生物科技股份有限公司 α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒进行诊断,采用北京博晖创新光电技术股份有限公司的BH5100T型与H100T型微量元素分析仪测定微量元素含量。结果 疾病组与对照组微量元素Ca、Fe、Mg、Pb、Zn呈正态分布,而Cd、Cu呈偏态分布。疾病组儿童全血中Ca、Cu、Zn含量明显高于对照组,而Fe、Mg含量则低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Cd、Pb含量无统计学差异($P > 0.05$)。结论 地中海贫血儿童微量元素钙、锌及铜与正常对照相比升高,铁、镁降低,提示地中海贫血儿童体内微量元素分布异常,临床需采取干预措施,避免微量元素异常引发疾病。

【关键词】 儿童;地中海贫血;微量元素

Study on trace elements in thalassemia children

LIU Bing, RAO Xuefei, ZENG Chijia*

(Department of Clinical Laboratory, Chancheng Centre Hospital, The Affiliated of Guangdong Medical University, Foshan, Guangdong, China, 528031)

【ABSTRACT】 Objective To study the contents of calcium, copper, iron, magnesium, zinc, cadmium in whole blood of children with thalassemia, and to provide the basis for a nutritional diet. Methods From January to December in 2015, 333 outpatients in Central Hospital of Foshan Chancheng District were selected, which included 133 cases in the disease group and 200 cases in control group. The α - and β - thalassemia genetic test kit of HybriBio was used for the diagnosis, and trace element content was determined by BH5100T and H100 T trace element analyzer of BoHui. Results The contents of Ca, Fe, Mg, Pb and Zn in 333 subjects were normally distributed, while Cd and Cu were skewed. The levels of Ca, Cu and Zn in the disease group were higher than levels of those in the control group, while the contents of Fe and Mg were lower ($P < 0.05$). There were no significant differences in the contents of Cd and Pb between the two groups ($P > 0.05$). Conclusion The levels of calcium, zinc and copper were increased compared with normal elements in thalassemia children, iron and magnesium levels were decreased. It is suggested that the distribution of trace elements in children with thalassemia is abnormal, and clinical intervention measures should be taken to avoid the disease caused by trace elements.

【KEY WORDS】 Children; Thalassemia; Trace elements

地中海贫血(简称地贫)是危害极大的遗传性溶血性贫血之一,在我国南方特别是广西、广东、海南、云南、贵州等地区高发^[1],区域性流行病学调

查显示,两广地区地中海贫血病例数占全国的40%以上。由于贫血,地贫患儿生长发育迟缓是常见的并发症之一^[2],微量元素虽然在人体内的含

作者单位:广东医科大学附属佛山禅城中心医院检验科,广东,佛山 528031

*通讯作者:曾赤佳, E-mail: zcjiacy@126.com

量不多,但与生存和健康息息相关,摄入过量、不足、不平衡或缺乏都会不同程度地引起人体生理的异常或发生疾病,严重者可导致智力低下或发育异常^[3]。因此,地中海贫血患儿全血微量元素水平的检测可以及时发现其异常,通过采取干预措施,可有效避免微量元素异常引发的各类疾病。

1 资料与方法

1.1 研究对象

疾病组:根据《儿科学》(第7版)关于地中海贫血的诊断标准^[4],选取本院2015年1~12月儿保体检确诊为地中海贫血的儿童133例,年龄4~12个月,所有确诊为地中海贫血的患儿均无输血史。对照组:选取本院2015年1~12月儿保体检年龄介于4~12个月的儿童,按照体检日期,选取每月就诊的前15名儿童,2015年12月选取当月就诊的前35名儿童,共200例,该组儿童血常规、生化常规、小便常规均在正常参考范围,研究对象基本资料见表1。

表1 333例研究对象基本资料

Table 1 The basic data of 333 subjects in the study

分组	例数	男童	女童	平均年龄(月)	P
疾病组	133	72	61	6.2±2.2	>0.05
对照组	200	108	92	5.9±2.0	

1.2 方法

1.2.1 地中海贫血基因检测

采集EDTA抗凝静脉血2 mL,采用广东凯普生物科技股份有限公司的 α 和 β 地中海贫血基因检测试剂盒进行检测。可检测中国人常见的3种缺失型 α 地贫(--^{SEA}、- $\alpha^{3.7}$ 和- $\alpha^{4.2}$),2种突变型 α 地贫(CS、QS)及11种突变型 β 地贫(CD41-42、CD43、IVS-II-654、CD17、CD14-15、-28、-29、CD71-72、 β^E 、IVS I-1、CD27-28)。

1.2.2 微量元素检测

采集肝素钠抗凝静脉血2 mL,全血铁、钙、锌、镁和铜采用BH5100T型北京博晖全血多元素分析仪测定;铅、镉元素采用BH2100T型北京博晖钨舟元素分析仪测定,北京博晖生物有限公司提供配套试剂盒。

1.3 判读标准

此次研究所用的试剂盒采用生物素标记的引

物分别对 α -珠蛋白基因缺失及基因突变区域和 β -珠蛋白基因突变区域进行特异性扩增,将扩增产物与标记不同缺失或突变类型地中海贫血探针的尼龙膜特定位置上,制成检测膜条,然后通过分子杂交反应及显色反应,观察检测膜条上各位点信号的有无(信号为蓝色斑点),判断该探针是否与PCR产物杂交,从而确定待检样品基因型。

1.4 统计学处理

数据分析采用SPSS 17.0统计软件进行分析,微量元素结果以均值±标准差表示,用Kolmogorov-Smirnov法进行正常态性检验,正态分布数据采用 t 检验,偏态分布数据采用Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 地中海贫血基因类型分型

133例地贫有86例为 α 地贫,占64.66%,以东南亚缺失杂合子(--^{SEA}/ α)为主; β 地贫44例,占33.08%,以 β^{41-42} 突变杂合子(β^{41-42} / β)为主; α 合并 β 地贫3例,占2.26%。地中海贫血基因类型及构成比结果见表2。

2.2 地中海贫血儿童全血微量元素含量

对两组儿童的微量元素结果进行正态性检验,显示Ca、Fe、Mg、Pb、Zn呈正态分布,而Cd、Cu呈偏态分布。疾病组儿童Ca、Cu、Pb、Zn高于对照组,而Cd、Fe、Mg则低于对照组,两组比较Ca、Cu、Fe、Mg、Zn,差异有统计学意义($P<0.05$),而Cd、Pb比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

3 讨论

地中海贫血是由于遗传基因缺陷致使血红蛋白中一种或一种以上珠蛋白链合成缺如或不足所导致的贫血或病理状态,除了常见的Hb电泳的检测方法,分子诊断技术对地中海贫血的诊断已十分成熟^[5]。本研究通过基因检测了133例地中海贫血标本,其中 α 地贫有86例,占64.66%; β 地贫有44例,占33.08%; α 合并 β 地贫3例,占2.26%,与林业辉等^[6]研究结论相似。

本研究发现,地中海贫血儿童体内微量元素含量的异常主要表现为钙、铜、锌元素升高,而铁、镁元素降低。其中,铁、钙、镁、铜元素结论与李牡艳等^[7]研究一致;钙、铁、镁元素结论与王毅^[8]、蔡敏敏等^[9]研究一致。

表2 133例地中海贫血基因类型

Table 2 The genotype of 133 patients with thalassemia

地中海贫血分类	基因类型	n	构成比(%)
α 地中海贫血	- ^{SEA} /α α	57	42.86
	-α ^{3.7} /α α	14	10.53
	-α ^{4.2} /α α	6	4.51
	- ^{SEA} /-α ^{3.7}	3	2.26
	α α ^{Qs} /α α	2	1.50
	α α ^{ws} /α α	2	1.50
	α α ^{ES} /α α	1	0.75
	- ^{SEA} /α α ^{ES}	1	0.75
	β 地中海贫血	β ⁴¹⁻⁴² /β	21
β ⁶⁵⁴ /β		8	6.02
β ⁻¹⁷ /β		4	3.01
β ⁻²⁸ /β		4	3.01
β ⁻²⁹ /β		2	1.50
β ⁷¹⁻⁷² /β		2	1.50
β ⁴³ /β		1	0.75
β ^{EM} /β		1	0.75
β ^{IVSI-1} /β		1	0.75
α 合并 β 地中海贫血	-α ^{3.7} /α α, β ⁴¹⁻⁴² /β	1	0.75
	- ^{SEA} /α α, β ⁻¹⁷ /β	1	0.75
	- ^{SEA} /α α, β ²⁷⁻²⁸ /β	1	0.75

铁元素在人体的功能表现有许多方面,铁缺乏可引起儿童心理活动和智力发育的损害及行为改变,甚至可引起儿童不可逆的认知能力损害。本研究中地贫儿童铁元素低于对照组($P<0.05$),可能与红细胞血红蛋白的珠蛋白肽链基因突变有关,导致珠蛋白肽链的合成抑制、失衡,引起无效造血和溶血性贫血,从而使地贫儿童对铁的吸收量增多,由于铁的利用率很低,因此造成贮存铁增多而全血中铁元素含量减少。轻型地贫儿童铁负荷水平已有明显升高,若长期不断摄入铁,必定会累积更高的铁负荷,导致铁在体内的调节失代偿^[10],但地贫患儿可能并发缺铁,地贫并发缺铁时,贫血的发生率会增高,且加重贫血的程度^[11]。因此地贫儿童需密切关注体内铁负荷的状态,选择血清学相关的铁代谢指标进行监测。

钙元素主要以骨盐形式存在于骨骼和牙齿中,是神经传递、肌肉收缩、血液凝结、激素释放和乳汁分泌等所必需的元素,含量不足或过剩都会影响生长发育和健康。地贫儿童全血钙元素含量高于正常对照组($P<0.05$),可能与儿童过量补钙存在一定联系,儿童多钙使铁盐沉淀,妨碍铁的吸收,引起血红蛋白的合成减少,导致全血铁下降,引发贫血^[12]。

表3 地中海贫血儿童全血微量元素含量

Table 3 The level of trace elements in thalassemia children

分组	n	Ca (mmol/L)	Cu (μmol/L)	Fe (mmol/L)	Mg (mmol/L)	Zn (μmol/L)	Cd (μg/L)	Pb (μg/L)
疾病组	133	1.96±0.16	19.31±5.28	7.57±0.89	1.60±0.17	71.15±20.80	0.79±0.71	56.72±24.80
对照组	200	1.92±0.13	16.70±4.74	8.26±0.84	1.64±0.16	58.29±13.59	0.99±0.98	54.72±29.99
t 值	-	2.896	4.690	-7.160	-2.794	6.820	-1.098	-1.009
P 值	-	0.004	0.000	0.000	0.006	0.000	0.272	0.313

本研究显示,地贫儿童铜元素高于对照组($P<0.01$)。分析原因:第一,地贫在合并缺铁状态下,机体内多种依赖铜的活性酶受抑制,反射性地促进其他部位的铜代谢释放入血以维持重要酶的活性,从而导致血铜升高^[12];第二,铜元素参与多种酶及蛋白的合成,在铁离子的氧化、运输、利用及催化血红蛋白合成方面发挥重要作用^[13],而地贫患者铁吸收和血红蛋白合成均是增加的,这导致对铜的吸收增加,最终导致全血铜升高;第三,地贫患者体内存在氧化应激反应,可导致 Cu、Zn、SOD 代偿性升高^[13]。

本研究还显示,地贫儿童锌元素含量高于对

照组($P<0.05$),与以往的研究(无统计学差异)结论^[7-9]不一致,查找支持本结论的文献结论有 Kajana-chumpol S^[14]报道儿童地贫红细胞锌升高;人体内铁和锌存在协同吸收效应,地贫儿童铁吸收增加,促进对锌的吸收增强;地贫患者体内存在氧化应激反应,可导致 Cu、Zn、SOD 代偿性升高^[13]。

地贫儿童镁元素低于对照组($P<0.05$),原因可能为镁元素同铁元素均为二价阳离子,地贫儿童铁元素吸收增加会干扰镁元素的吸收,导致全血镁降低。镉、铅元素均为有毒元素,危害极大,本次结果显示地贫儿童与对照组镉、铅含量无明显差异($P>0.05$)。

(下转第 200 页)

深圳地区493例儿童变应性鼻炎过敏原检测结果分析

孙丽芳* 付笑迎 杨方华 刘亚丽 袁艳 施玉芳

【摘要】 目的 探讨深圳地区儿童变应性鼻炎的过敏原分布情况,以便为该地区儿童变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)的预防、诊断和治疗提供理论依据。 方法 选取2015年1月至2015年12月在本院就诊的过敏性鼻炎患儿493例为研究对象,采用德国Mediwiss过敏原体外检测系统,应用免疫印迹法对其进行过敏原检测并对检测结果进行统计分析。 结果 493例变应性鼻炎患儿中,过敏原检测结果阳性414例(83.9%),吸入性过敏原阳性率为79.3%,其中户尘螨阳性率最高,占65.1%;其次是狗毛(25.5%)、真菌组合(15.8%)、猫毛(13.8%)和屋尘(11.1%);食入性过敏原阳性率为45.2%,主要为牛奶(30.4%)、腰果(14.8%)、鸡蛋白(12.4%)、蟹(8.9%)、虾(7.7%)和牛肉(1.8%);吸入性和食入性均阳性者200例(40.5%);不同年龄组患儿吸入性和食入性过敏原阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。患儿血清总IgE阳性率为76.5%(377/493),总IgE阳性率明显低于特异性IgE阳性率(83.9%),差异有统计学意义($P<0.01$)。 结论 户尘螨是诱发深圳地区儿童变应性鼻炎的主要吸入性过敏原;牛奶是诱发变应性鼻炎主要的食入性过敏原。在患变应性鼻炎的儿童中,以单纯吸入性过敏原阳性(38.7%)和混合吸入和食入性过敏原阳性(40.5%)为主,单纯食入性过敏原阳性(4.7%)的患儿很少。联合检测血清总IgE和过敏原特异性IgE可提高变应性鼻炎诊断的准确性。

【关键词】 变应性鼻炎;吸入性过敏原;食入性过敏原;总IgE;特异性IgE

The analysis of 493 cases of children allergic rhinitis allergen test results in Shenzhen area

SUN Lifang*, FU Xiaoying, YANG Fanghua, LIU Yali, YUAN Yan, SHI Yufang

(Department of clinical laboratory, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518038)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the distribution of allergen antibody in children with allergic rhinitis in Shenzhen, and to provide theoretical evidence for the clinical prevention, diagnosis and treatment of allergic rhinitis in children. Methods Mediwiss allergic system in vitro from Germany was conducted to detect the expression of sIgE and tIgE in the serum of children(493 patients) with allergic rhinitis by immunoblotting, and the test data was analyzed statistically. Results Of the 493 patients with allergic rhinitis, the positive rate of specific IgE was 83.9% (414/493) from inhalant and food allergens. The most prevalent inhalant allergens were dermatophagoides pteronyssinus (65.1%), followed by dog hair (25.5%), fungus combinations (15.8%), cat hair (13.8%) and house dust (11.1%). There were no significant differences between male and female ($P>0.05$). The most common food allergens were milk (30.4%), followed by cashew (14.8%), egg white (12.4%), crab (8.9%), shrimp (7.7%) and beef (1.8%). The positive rate of total IgE in serum was 76.5% (377/493). The percentage of total IgE were significantly lower compared with the level of specific IgE ($P<0.01$). Conclusion Dermatophagoides pteronyssinus in Shenzhen area was the leading inhaled allergen in allergic rhinitis(AR) children; milk was the most common food allergens causing AR. Of the allergic

基金项目:深圳市2015年基础研究知识创新计划项目(JCYJ20150403100317063)

作者单位:深圳市儿童医院检验科,广东,深圳 518038

*通讯作者:孙丽芳, E-mail: 771369652@qq.com

rhinitis patients, the main allergens were pure inhalant (38.7%) and mixed inhalant and food allergens (40.6%), while pure food allergen were rarer (4.7%). Combined detection of serum total IgE and allergen specific IgE can improve the accuracy of the diagnosis of allergic rhinitis.

[KEY WORDS] Allergic rhinitis; Inhalation allergen; Food allergen; Total IgE; Specific IgE

变应性鼻炎是 IgE 介导的 I 型变态反应性疾病,近年来其发病呈明显的上升趋势,至少影响全球 10%~25% 的人口^[1-2]。3 岁以上罹患变应性鼻炎的儿童,80% 的原因都是由于室内过敏环境引发的^[3],变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是发生在鼻黏膜的变态反应性疾病,是目前耳鼻喉科常见的疾病,2007 年的权威调查报告表明 AR 在我国的患病率高达 11%,严重影响 1 亿多患者的生活质量^[4],且近几年呈上升趋势。研究表明食物过敏和呼吸道变应性疾病密切相关,吸入性和食入性过敏原在变应性鼻炎和哮喘发病中发挥着重要的作用^[5-6]。变应性鼻炎防治最有效的方法是明确过敏原并避免与之接触以及采取特异性免疫治疗。因此,检测变应性鼻炎患者食入性过敏原和吸入性过敏原特异性抗体有重要意义,为变应性鼻炎的病因诊断、治疗和预防提供参考依据。

由于各地区地理环境和气候不同,常见过敏原的种类存在较大差异,本研究对 2015 年 1 月至 2015 年 12 月在深圳市儿童医院就诊的变应性鼻炎患儿 493 例的资料进行了回顾性分析,以期在深圳地区变应性鼻炎患儿的诊断和治疗提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 1 月至 2015 年 12 月在本院就诊的变应性鼻炎患儿 493 例作为研究对象,其中男性 332 例,女性 161 例,男女比例 2.06:1;年龄 0~14 岁。将患儿按年龄段分为 3 组:婴幼儿组(≤ 3 岁) 103 例,学龄前组($>3 \sim \leq 6$ 岁) 207 例,学龄期组(>6 岁) 183 例。所有变应性鼻炎患儿诊断符合中华医学会耳鼻咽喉科学分会 2008 重庆会议制定的变应性鼻炎修订标准^[7]。

1.2 检测方法

应用德国 Mediwiss 过敏原检测试剂盒,用免疫印迹法检测患儿血清中过敏原特异性 IgE 抗体(specific IgE, sIgE)和总 IgE(total IgE, tIgE),严格

按照试剂盒的说明书操作。实验完成后用德国 Mediwiss Rapid 信息软件分析相应的试纸条带颜色,计算每条显色带的面积积分,与软件中自带的内标准曲线对比,从而计算出血清 sIgE 含量,试纸条上的颜色深浅与患者血清中的 sIgE 含量成正比。Rapid 分析软件评估条带颜色的深浅并进行 sIgE 量化分析。吸入性过敏原的种类有:户尘螨、屋尘、蟑螂、狗毛皮屑、猫毛皮屑、苜、桑树、豚草组合、柏榆组合以及霉菌组合共 10 种;食入性过敏原有:鸡蛋白、牛奶、牛肉、虾、蟹、贝、腰果、芒果和菠萝共 9 种,加上总 IgE,合计 20 个检测项目。

1.3 结果判断

阳性结果判定标准严格参照试剂盒说明书进行判断。sIgE 阳性诊断标准:当某一种过敏原 sIgE 浓度 >0.35 IU/mL 时,表示该过敏原阳性;至少一种过敏原阳性时,表示过敏原试验阳性;实验结果阳性,支持过敏性疾病的诊断。tIgE 的结果以 <100 kU/L, $100 \sim 200$ kU/L, >200 kU/L 表示。阳性诊断标准:总 IgE >100 kU/L 时,表示血清学总 IgE 阳性^[7]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 变应性鼻炎患儿过敏原阳性结果的总体分布

493 例变应性鼻炎患儿中,414 例过敏原 sIgE 检测呈阳性反应,阳性率占 83.9% (414/493)。吸入性和食入性过敏原阳性率由高到低排序见表 1、表 2,吸入性过敏原中户尘螨阳性率最高,占 65.1%。其次是狗毛 25.5%,真菌组合 15.8%,猫毛 13.8% 和屋尘 11.1%,其它过敏原阳性率均小于 5%。食入性过敏原中以牛奶的阳性率最高(占 30.4%)。其次是腰果 14.8%、鸡蛋白 12.4% 和蟹 8.9%、虾 7.7% 和牛肉 1.8%,芒果和菠萝的阳性率极低。

表1 吸入性过敏原分布表

Table 1 The distribution of inhalant allergens

排序	过敏原	阳性例数	阳性率(%)
1	户尘螨	321	65.1
2	狗毛	126	25.5
3	真菌组合	78	15.8
4	猫毛	68	13.8
5	屋尘	55	11.1
6	蟑螂	21	4.2
7	柏榆组合	17	3.4
8	苜	5	1.0
9	豚草	5	1.0
10	桑树	3	0.6

表2 食入性过敏原分布表

Table 2 The distribution of food allergens

排序	过敏原	阳性例数	阳性率(%)
1	牛奶	150	30.4
2	腰果	73	14.8
3	鸡蛋白	61	12.4
4	蟹	44	8.9
5	虾	38	7.7
6	牛肉	9	1.8
7	芒果	1	0.2
8	贝类	1	0.2
9	菠萝	1	0.2

表4 各年龄组过敏原 sIgE 阳性率比较[n(%)]

Table 4 The comparison of sIgE among different age group[n(%)]

组别	例数	吸入性过敏原	食物性过敏原	吸入与食物性过敏原	sIgE 阳性
≤3岁	103	28(27.2)	8(7.8)	41(39.8)	77(74.7)
>3~≤6岁	207	87(42.0)*	10(4.8)	81(39.1)	178(85.9)*
>6岁	183	76(41.5)*	5(2.7)*	78(42.6)	159(86.8)*
合计		191(38.7)	23(4.7)	200(40.5)	414(83.9)

>3~≤6岁组和>6岁组分别与≤3岁组比较,*P<0.05

3 讨论

目前临床常用的过敏原的检测方法有体内检

2.2 AR患者过敏原种类分布

过敏原致敏个数分析显示,414例过敏原阳性变应性鼻炎患者中单一过敏原 sIgE 阳性率为32.8%,2种或2种以上过敏原 sIgE 呈阳性占67.2%,见表3。

表3 414例AR患者过敏原种类分布

Table 3 The distribution of 414 AR patients' allergens

过敏原种类	阳性例数	阳性率(%)
1种	136	32.8
2种	94	22.7
3种	77	18.6
4种	53	12.8
5种	26	6.3
6种及以上	28	6.7

2.3 不同年龄组过敏原阳性率比较

随着年龄增长,sIgE 阳性率明显升高,学龄组(>6岁)sIgE 阳性率最高,达86.8%,学龄前组(>3~≤6岁)sIgE 阳性率为85.9%,婴幼儿组(≤3岁组)sIgE 阳性率为74.7%,组间阳性率比较,差异有统计学意义(表4)。

2.4 血清 tIgE 与过敏原 sIgE 阳性率比较

493例患者血清中377例 tIgE 呈阳性反应,阳性率76.5%(377/493);过敏原 sIgE 阳性例数为414例,阳性率83.9%(414/493)。tIgE 阳性率明显低于 sIgE 阳性率,两者阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=8.751, P<0.01$)(表5)。

测和体外检测两种方法。体内检测方法主要包括皮肤点刺试验,斑贴试验和激发试验3种,患者会感觉到痛苦,假阳性高并受药物影响,而且有诱发

表5 总IgE和过敏原特异性IgE分析 [n(%)]

Table 5 Analysis of tIgE and sIgE [n(%)]

组别	总IgE阳性	总IgE阴性
特异性IgE阳性	350(71.0)	64(13.0)
特异性IgE阴性	27(5.5)	50(10.1)

全身过敏的危险,不适用于儿童、老人和严重过敏体质的人群^[8]。本研究采用的德国 MediWiss 过敏原检测试剂盒,应用体外免疫印迹技术测定血清中 sIgE 抗体,患者痛苦小,可避免诱发全身变态反应的风险,已逐渐推广用于儿童过敏原的检测。

过敏原是变应性鼻炎发病的关键,过敏原种类繁多,不同国家和地区常见的过敏原分布差异很大,同一地区的过敏原构成相对稳定^[9]。本研究通过对 493 例儿童变应性鼻炎患者进行过敏原 sIgE 的检测,发现变应性鼻炎患儿 tIgE 阳性率为 76.5%,sIgE 阳性率为 83.9%,tIgE 阳性率显著低于 sIgE 阳性率,此结论与万丽平^[10]在大连地区的调查结果不一致。南方与北方地域环境因素和人们生活饮食习惯不同可能是导致差异出现的主要原因。本研究结论与郑佩燕等^[11]的广州地区调查结果相似,也进一步反映了地域差别是常见过敏原的显著影响因素。明确过敏原,避免或减少与其接触,进行有针对性的特异性免疫脱敏治疗,对于变应性鼻炎患儿的预防和治疗有着重要的指导意义。

尽管 tIgE 在诊断疾病中不能像 sIgE 提供大量的信息,但是观察表明 tIgE 同样具备一定的临床意义^[12]。本研究发现 tIgE 和 sIgE 含量同时升高者占 71.0%,提示血清中过敏原 sIgE 与 tIgE 符合率较高。有 18.5% (91/493) 患者 tIgE 与 sIgE 结果不一致,其中 5.5% (27/493) 病例 tIgE 浓度升高而 sIgE 正常,另外,本实验中还有 13.0% (64/493) 患者 sIgE 升高而 tIgE 水平正常,提示 sIgE 升高对变应性鼻炎更有诊断价值。tIgE 升高意味着过敏的概率相对较高,tIgE 正常也不能排除变应性鼻炎;患者过敏与否主要取决于血清中 sIgE 水平的升高与否,tIgE 的升高更能佐证 sIgE 水平的升高,所以同时检测 tIgE 与 sIgE 是十分必要的。此外,本研究还发现有 10.1% (50/493) 患者有变应性鼻炎的症状,但 tIgE 与 sIgE 含量均未升高,可能是属于局部过敏性鼻炎范畴。局部过敏性鼻炎是指在非特异性体质患者中出现的局部变态反应。这类患者

通常具有典型的变应性鼻炎病史,皮肤点刺试验和血清特异性 IgE 检测均阴性,但鼻腔过敏原激发试验阳性和/或局部存在特异性 IgE^[13-14]。

本研究的 10 种常见吸入过敏原中,户尘螨为 sIgE 阳性率最高的过敏原。与杨利桃等^[15]对变应性鼻炎患者过敏原检测结果相近。钟南山院士课题组报道,近十年哮喘患病率的显著上升主要是因为尘螨过敏患者发病率的显著增加^[16]。说明除螨和降低室内空气中尘螨抗原的含量对预防和干预(过敏性鼻炎和哮喘等)儿童过敏性疾病非常重要。深圳地区气候温热潮湿、空调的频繁使用,室内空气的不流通,非常有利于螨虫的滋生和繁殖。因此控制尘螨非常重要,定期清洁和消毒空调过滤网是深圳地区预防和治疗过敏性鼻炎的主要措施。猫毛、狗毛也是深圳地区的主要吸入性过敏原,考虑可能是由于近年来宠物饲养增多,患儿与宠物的接触机会增加,所以减少儿童与宠物的接触,搞好居住环境卫生,对吸入性过敏原的回避有很大的帮助。

本研究的 9 种常见食入过敏原中,以牛奶阳性率最高,其次是腰果、鸡蛋白、蟹、虾和牛肉,这与儿童的生活习惯、深圳地区饮食结构及儿童免疫系统发育不完善密切相关;牛奶和鸡蛋是婴幼儿的主要食物来源,牛肉是孩子们喜爱的食物,丰富的海产品遍布深圳这个海滨城市,虾、蟹被广泛食用。对于食物中腰果阳性率较高,具体原因尚不明确,有待我们做进一步的研究。

一般认为吸入过敏原主要引起呼吸道过敏反应,而食入过敏原则主要诱发消化道、皮肤及全身过敏反应,本研究结果显示:两种及以上吸入或食入过敏原引起的 AR 患儿占了 67.2%,说明深圳地区儿童容易被多种过敏原同时致敏,较多 AR 患儿并非对一种吸入过敏原敏感,而是对多种过敏原的刺激有反应,提示多项联合检测过敏原对了解 AR 患儿过敏情况更具意义,这可能与未成年人免疫系统未发育完善有关。

学龄前组和学龄组儿童吸入性过敏原明显高于婴幼儿组,而婴幼儿组食入性过敏原又高于学龄前组和学龄组,说明食物过敏原阳性率有随着年龄增长而下降的趋势,年龄小的患儿以食入性过敏原为主,年龄大一些的患儿以吸入性过敏原为主。研究不同年龄段过敏性疾病患者过敏原特征,有助于过敏性疾病的早期诊断和早期干预,幼儿时期主要以食物为主要过敏原,随着年龄的增

长,免疫系统的完善,可能有部分患者对食物产生耐受,转变为吸入性过敏原为主,这可能与过敏性疾病的过敏进程有关。单纯食物过敏原阳性率在3个年龄组中有随着年龄增长而下降的趋势,在>3~≤6岁组和>6岁组间有显著性差异,但是sIgE阳性百分率两组间却无显著性差异,是因为这两个年龄组的吸入过敏原和混合吸入食物过敏原sIgE阳性例数远大于单纯食物过敏原所致,本研究发现单纯吸入性过敏原和混合吸入吸入性过敏原是变应性鼻炎的主要因素,单纯食物过敏原引起的AR患儿所占比例很小。所以对变应性鼻炎患儿来说,不要仅仅检测吸入性过敏原,更有必要同时检测吸入性过敏原和吸入性过敏原的sIgE,以提高变应性鼻炎患儿过敏原的阳性检出率,如吸入性过敏原阴性而吸入性过敏原阳性,应尽量去避免食用已经明确的食物过敏原,尽量减少过敏原暴露的剂量和次数,定期复查过敏原以便寻找有无致敏的吸入性过敏原。

参考文献

- [1] Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(3):466-476.
- [2] Cingi C, Kayabasoglu G, Nacar A. Update on the medical treatment of allergic rhinitis [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(2):96-103.
- [3] Keil T, Bockelbrink A, Reich A, et al. The natural history of allergic rhinitis in childhood [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010, 21(6):962-969.
- [4] 韩德民, 张罗, 黄丹, 等. 我国11个城市变应性鼻炎自报患病率调查 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 42(5):378-384.
- [5] Ballmer-Weber BK. Value of allergy tests for the diagnosis of food allergy [J]. *Dig Dis*, 2014, 32(1-2):84-88.
- [6] 黄子真, 张革化, 李鹏, 等. 变应性鼻炎相关因素的 Logistic 回归分析 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(6):991-995.
- [7] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组、小儿学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童变应性鼻炎诊断和治疗指南(2010年重庆) [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(1):7-8.
- [8] Liccardi G, D'Amato G, Canonica GW, et al. Systemic reactions from skin testing: literature review [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2006, 16(2):75-78.
- [9] 李颖, 赵守琴. 儿童分泌性中耳炎与变应性鼻炎相关研究进展 [J]. *中华耳科学杂志*, 2016, 14(2):295-298.
- [10] 万丽平, 王衍晶, 徐萍, 等. 大连地区儿童过敏原检测结果分析 [J]. *中国当代医药*, 2015, 22(24):123-125.
- [11] 郑佩燕, 黄惠敏, 韦妮莉, 等. 广东地区过敏疾病患者常见过敏原sIgE和tIgE分布规律 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(4):562-565.
- [12] Sun BQ, Chen DH, Zheng PY, et al. Allergy-related evidences in relation to serum IgE: data from the China state key laboratory of respiratory disease, 2008-2013 [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27(7):495-505.
- [13] Rondón C, Fernandez J, Canto G, et al. Local allergic rhinitis: concept, clinical manifestations, and diagnostic approach [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2010, 20(5):364-371.
- [14] 刘争, 李华斌, 崔永华. 局部变应性鼻炎 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(11):962-964.
- [15] 杨利桃, 贾小莉, 黄秋花. 变应性鼻炎患者食物性过敏原特异性IgE分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(7):837-839.
- [16] Li J, Wang H, Chen Y, et al. House dust mite sensitization is the main risk factor for the increase in prevalence of wheeze in 13 - to 14-year-old schoolchildren in Guangzhou city, China [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(10):1171-1179.

舌下含服粉尘螨滴剂脱敏治疗对特应性皮炎患者中辅助性T细胞作用的研究

曾美* 李庆祥 黄文富 陈俊钊 刘金花 王翠彦

【摘要】 目的 探讨舌下含服粉尘螨滴剂脱敏治疗对特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)患者辅助性T细胞(T helper cells, Th)的作用。方法 用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)方法检测 AD患者舌下含服粉尘螨滴剂组(sublingual immunotherapy, SLIT组)和对照组治疗前后的外周血Th1(IFN- γ)、Th2(IL-4)、Th17(IL-17)的水平,用流式细胞技术检测两组治疗前后的调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)数量。然后用两独立样本 t 或校正 $t(t')$ 检验对两组患者治疗前和治疗后的组内以及治疗后组间的IFN- γ 、IL-4、IL-17和Treg水平分别进行对比研究。结果 SLIT组治疗后IL-4、IL-17较治疗前明显下降,IFN- γ 和Treg较治疗前明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。且SLIT组治疗后较对照组治疗后IL-4、IL-17下降更明显,IFN- γ 升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SLIT组治疗后Treg细胞数量较对照组治疗后升高更多,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在AD患者中,舌下含服粉尘螨滴剂治疗能降低其外周血IL-4、IL-17,升高IFN- γ 和Treg水平而达到治疗的目的。

【关键词】 特应性皮炎; 辅助性T细胞; 粉尘螨滴剂; 调节性T细胞

The role on the T helper cells of sublingual immunotherapy for atopic dermatitis

ZENG Mei*, LI Qingxiang, HUANG Wenfu, CHEN Junzhao, LIU Jinhua, WANG Cuiyan

(Department of Dermatology, Huizhou municipal central Hospital, Huizhou, Guangdong, China, 516000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the role on the T helper cells(Th) in sublingual immunotherapy (SLIT) with standardized dermatophagoides farinae drops on patients with atopic dermatitis (AD). Methods Between the two AD groups before and after treatment: sublingual immunotherapy with standardized dermatophagoides farinae drops (SLIT group) and control one, serum concentrations of Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17) were evaluated using enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). The levels of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in peripheral blood were assessed by flow cytometry. Then the IFN- γ , IL-4, IL-17 and Treg levels were compared between the two groups before and after treatment, as well as between the groups after treatment with two independent samples t or corrected $t (t')$ test. Results IL-17 and IL-4 in the SLIT group were significantly decreased after treatment versus before treatment, IFN- γ and Treg were significantly higher after treatment than before treatment as well, and the differences were significant ($P < 0.05$). Compared with the SLIT group and the control group after treatment, IL-17 and IL-4 decreased more significantly, IFN- γ increased more significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After treatment, the number of Treg cells in SLIT group was higher than that in the control group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Conclusion SLIT in patients with atopic dermatitis (AD) can reduce the level of IL-4, IL-17 in the peripheral blood and increase the level of IFN- γ and Treg, then finally achieve the purpose of treatment.

【KEY WORDS】 Atopic dermatitis; T helper cells; Dermatophagoides farinae drops; Regulatory T cells

作者单位: 惠州市中心人民医院皮肤科, 广东, 惠州 516000

*通讯作者: 曾美, E-mail: 251872857@qq.com

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种慢性、瘙痒性、复发性的炎症性皮肤病。既往有研究表明辅助性T细胞(T helper cells, Th)参与了AD的发病^[1-3]。辅助性T细胞根据释放细胞因子不同可分为不同的亚型:Th1、Th2、调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)和Th17。

粉尘螨是诱发AD的重要变应原之一,已有学者研究显示在AD同类疾病过敏性鼻炎患者中粉尘螨是最重要过敏原^[4]。舌下含服粉尘螨滴剂在过敏性疾病中的安全性和有效性已被大量学者研究证实^[5-7]。但在特应性皮炎患者中,舌下含服粉尘螨滴剂的免疫学机制尚不明确,其对Th细胞的影响亦未见文献报道^[8]。本文拟通过以下研究以探讨舌下含服粉尘螨滴剂对AD患者辅助性T细胞的影响,从而更好地指导临床治疗。

1 对象和方法

1.1 研究对象

所选病例为2015年2月至2016年4月就诊于我院皮肤科门诊的AD患者52例。其中男24例,女28例。入选标准:①符合Hanifin和Rajka诊断标准^[9];②年龄4岁以上;③患者本人或儿童的监护人同意参加实验(签署知情同意书);④过敏原检测(皮肤点刺试验)显示粉尘螨阳性,粉尘螨点刺(++以上),且为单一粉尘螨阳性或屋尘螨、粉尘螨均阳性。排除标准:①入选前2周内局部外用药物史者;②入选前2周内口服抗阻胺药物史者;③患有系统性疾病者;④有系统使用免疫抑制剂及糖皮质激素史者;⑤孕妇或哺乳期妇女。采用随机双盲对照的方法将52例AD患者分为舌下含服粉尘螨滴剂组(sublingual immunotherapy, SLIT组)和对照组,每组26例。SLIT组:男11例,女15例,年龄4~52岁,平均年龄27.5岁;对照组男13例,女13例,年龄5~55岁,平均年龄29.1岁。两组患者年龄性别差异均无统计学意义。两组患者治疗前均进行SCORAD(Scoring Atopic Dermatitis)^[10]积分,SLIT组(31.34±7.12)分,对照组(33.56±8.69)分,两组治疗前基线差异无统计学意义($P > 0.05$)。本次伦理由惠州市中心人民医院伦理委员会审批通过。

1.2 仪器试剂和试验药物

仪器:全自动酶标仪芬兰产Multiskan MK3

型、全自动洗板机芬兰产wenwash-4 MK2型(芬兰雷勃),流式细胞仪BD FACSCanto™ II(BD公司,美国)。

试剂:人白介素4(interleukin-4, IL-4)、人干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、人白介素17(interleukin-17, IL-17)、ELISA试剂盒均由武汉华美生物工程有限公司进口分装自美国CUSABIO公司。CD3(FITC-A)、CD45(PerCP-A)、CD4(APC-A)、CD25(PE-Cy7-A)以及不同荧光标记的同型对照均购自美国BD公司。

试验药物:粉尘螨滴剂(浙江我武生物科技股份有限公司),盐酸西替利嗪分散片(宜昌长江药业有限公司),糠酸莫米松乳膏(上海先灵葆雅制药有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 治疗方法

对照组仅给予口服盐酸西替利嗪分散片及外用糠酸莫米松乳膏治疗,SLIT组在给予口服盐酸西替利嗪分散片及外用糠酸莫米松乳膏治疗的同时,给予粉尘螨滴剂舌下含服脱敏治疗,治疗时间半年。SLIT组脱敏治疗分为递增期和维持期,治疗疫苗使用粉尘螨滴剂。递增期1~3周,第1~3周分别服用粉尘螨滴剂1号(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、2号(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和3号(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),1~3号从第1天到第7天服用剂量分别为1、2、3、4、6、8、10滴;第4周开始,儿童患者使用4号(333 $\mu\text{g}/\text{mL}$)维持, qd, 每次3滴。14岁及以上患者从第6周开始使用5号(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)维持, qd, 每次2滴,直至疗程结束。服用方法:滴于舌下含1~3 min后吞咽,每天固定时间服用1次。

1.3.2 疗效判定标准

有效率采用SCORAD计分系统^[10],评价患者的病情严重程度。通过计算评分下降指数来评价疗效。评分下降指数=[(治疗前SCORAD积分-治疗后SCORAD积分)/治疗前SCORAD积分]×100%。评分下降指数 $\geq 90\%$ 为痊愈,评分下降指数60%~89%为显效,评分下降指数20%~59%为好转,评分下降指数 $\leq 19\%$ 为无效。总有效率=[(痊愈+显效)/总例数]×100%^[10]。

1.3.3 ELISA方法

每位患者治疗前和治疗后各抽取静脉血5 mL室温下静置2 h,3 000 r/min离心15 min,分离血清

于冻存管中-80℃冰箱保存。IL-4、IFN- γ 、IL-17用ELISA法按说明书步骤检测。

1.3.4 流式细胞技术

外周血CD4⁺CD25⁺Treg的检测:取EDTA抗凝血100 μ L置于FCM测量管中,加入鼠抗人单克隆抗体CD3(FITC-A)、CD45(PerCP-A)、CD4(APC-A)、CD25(PE-Cy7-A)各10 μ L,充分混匀,在4℃冰箱中反应30 min。FACS洗涤液(含0.5% BSA, 0.01%叠氮钠的PBS)洗涤2次,1 000 r/min离心3 min。再加入2 mL红细胞裂解液,充分混匀,4℃冰箱中反应10 min,直至细胞悬液变成真性溶液,1 000 r/min离心3 min。FACS洗涤液洗涤2次。1%多聚甲醛500 μ L重悬固定,FACSAria流式细胞仪检测,BD FACS专用FACSDIVA软件分析。设有mIgG-CD25同型对照。前向散射光(forward scatter, FSC)和CD45以淋巴细胞群设门,测定SLIT组和对照组CD4⁺CD25⁺细胞占CD3⁺细胞的百分率。

1.4 统计学分析

数据用SPSS 13.0进行统计分析,显著性检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本的比较,服从正态分布者用 t 或校正 $t(t')$ 检验。两组间有效率比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 临床疗效结果

治疗半年后,SLIT组有效率为61.54%,对照组有效率为23.07%,SLIT组有效率明显高于对照组,有统计学差异($\chi^2=7.87, P=0.005$),见表1。

表1 SLIT组和对照组疗效的比较

Table 1 The comparison of curative effect between the SLIT group and the control one

组别	例数	痊愈	显效	好转	无效	有效率(%)
SLIT组	26	3	13	7	3	61.54
对照组	26	0	6	13	7	23.07

SLIT组和对照组治疗半年后有效率比较: $\chi^2=7.87, P=0.005$

2.2 IL-4、IFN- γ 、IL-17及Treg的结果

SLIT组及对照组IL-4水平治疗后较治疗前均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。且两组治疗后相比:SLIT组较对照组降低更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。SLIT组及对照组IFN- γ 水平治疗后较治疗前明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),且两组治疗后相比,SLIT组较对照组升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$),详见表2。

表2 SLIT组和对照组治疗前后IL-4、IFN- γ 的比较

Table 2 The comparison of IL-4 and IFN- γ before and after treatment in the SLIT group and the control one

组别	IL-4 (pg/mL)				IFN- γ (pg/mL)			
	治疗前	治疗后	t	P	治疗前	治疗后	t	P
SLIT组	64.61 \pm 7.72	19.61 \pm 6.85	13.781	<0.01*	5.01 \pm 1.04	11.32 \pm 1.53	-10.735	<0.01*
对照组	66.12 \pm 6.21	45.08 \pm 6.56	7.364	<0.01*	5.43 \pm 1.18	9.08 \pm 1.27	-6.66	<0.01*
t		-8.487				-3.542		
P		<0.01*				0.002*		

*表示为 $P < 0.01$,差异有统计学意义

SLIT组IL-17水平治疗后较治疗前明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。SLIT组IL-17水平治疗后较治疗前明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),对照组IL-17水平治疗后较治疗前有所下降,但差异无统计学意义($P=0.299$)。两组治疗后相比,SLIT组IL-17水平较对照组降低更明显,差异有统计学意义($P=0.001$)。CD3⁺CD4⁺CD25⁺Treg细胞:SLIT组治疗

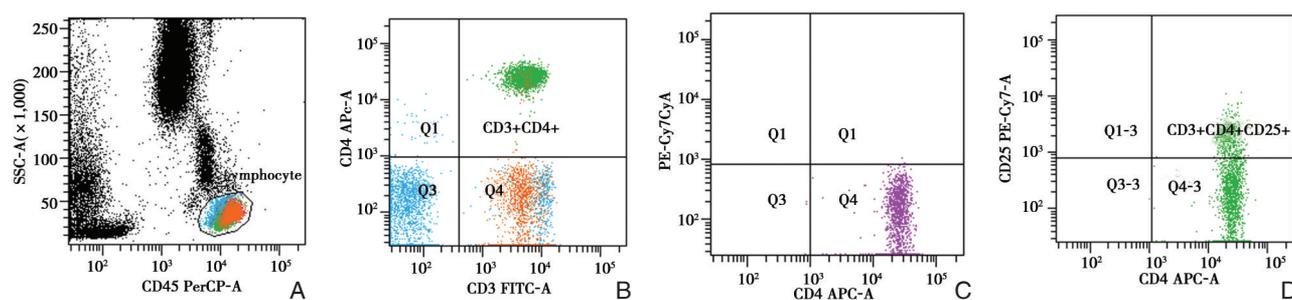
前为(3.51 \pm 1.09)%;治疗后为(5.32 \pm 1.27)%。治疗后较治疗前明显升高,差异有统计学意义($t=-3.94, P < 0.01$)。对照组治疗前为(3.62 \pm 1.49)%;治疗后为(4.78 \pm 1.56)%。治疗后比治疗前有所升高,但差异无统计学意义($t=-1.694, P=0.108$)。两组治疗后相比:SLIT组较对照组升高更明显,但差异无统计学意义($t=0.829, P=0.418$),详见表3、图1。

表3 SLIT组和对照组治疗前后IL-17、Treg的比较

Table 3 The comparison of IL-17 and Treg before and after treatment in the SLIT group and the control one

组别	IL-17(pg/mL)				Treg(%)			
	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
SLIT组	18.81±1.95	15.11±2.26	3.91	< 0.01*	3.51±1.09	5.32±1.27	-3.94	< 0.01*
对照组	19.72±2.13	18.78±1.77	1.071	0.299	3.62±1.49	4.78±1.56	-1.694	0.108
<i>t</i>		-4.037					0.829	
<i>P</i>		0.001*					0.418	

*表示为 $P < 0.01$, 差异有统计学意义



A. SSC 和 CD45 以淋巴细胞群设门; B. 右上象限表示为淋巴细胞中 CD3⁺CD4⁺细胞的比例; C. CD25⁺的同型对照; D. 右上象限表示为 CD3⁺细胞中 CD4⁺CD25⁺细胞的比例

图1 AD患者外周血CD3⁺CD4⁺CD25⁺Treg的流式结果

Figure 1 The results of flow cytometry about CD3⁺CD4⁺CD25⁺Treg in peripheral blood of AD patients

3 讨论

特应性皮炎是一种复发性的以严重瘙痒为主要临床表现的慢性过敏性皮肤病,其病因复杂,涉及多个方面,免疫和变态反应是其中两个重要的方面。既往研究表明,Th细胞参与了特应性皮炎的发病^[11]。Th细胞是根据功能分类的T细胞亚群,对机体的特异性免疫和非特异性免疫均具有重要调节作用。据其分泌细胞因子的不同可分为Th1、Th2、Th17、Treg等亚型。IFN- γ 、IL-4分别是Th1、Th2细胞的特征性细胞因子^[12]。Th17和Treg是Th细胞的两个新亚型,是目前研究的热点。它们在免疫应答、自身免疫性疾病的发生中发挥着重要的意义。既往研究发现,在特应性皮炎患者中,存在Th1/Th2^[3]及Th17/Treg^[13]的失衡。

SLIT是一种安全、有效的免疫治疗方法^[14-15]。在我国,标准化的尘螨变应原疫苗粉尘螨滴剂也于2006年被CFDA批准上市,舌下含服粉尘螨滴剂在特应性皮炎中的安全性和有效性已被大量学者研究证实^[5-7],本研究结果同样显示SLIT

组有效率明显高对于对照组。但是其有效性的免疫学机制尚不完全清楚。本研究中采用舌下含服粉尘螨滴剂,浓度从低到高逐渐增加进行特异性脱敏治疗,即通过抗原反复刺激机体从而增强机体对抗原的适应性,使机体产生免疫耐受,从而达到不发生或发生轻微过敏症状的目的。Allam^[16]认为SLIT的作用机制可能是通过诱导调节性T细胞活化、调节Th1/Th2细胞亚群的平衡、诱导阻断性IgG4抗体产生并抑制IgE的合成来发挥免疫调节作用,从而使患者对特异性变应原产生长期耐受。本文研究发现,SLIT组治疗后IL-4、IL-17较治疗前明显下降,IFN- γ 和Treg较治疗前明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。且SLIT组治疗后较对照组治疗后IL-4、IL-17下降更明显,IFN- γ 升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Potter等^[17]在变应性鼻炎患者中发现,经SLIT治疗后,能引起外周血IL-4水平下降和IFN- γ 水平升高。SLIT治疗可能通过降低外周血Th2水平,升高Th1水平,使Th1/Th2平衡恢复,而达到治疗的目的。近几年国内外大量研究得出,在AD患者皮

损中和外周血单核细胞中能检测到 IL-17, 并发现其水平与 AD 病情严重程度相关^[18-19], 而同时检测 AD 患者血浆中 Th17 细胞的数量明显升高。本研究发现 SLIT 治疗后可使 IL-17 水平下降, 与 Tian 等^[20]在儿童哮喘患者中经 SLIT 治疗后对 IL-17 的影响结果一致。我们的前期研究中发现 AD 患者外周血中 Treg 数量下降参与了 AD 的发病^[21]。本研究中 SLIT 组治疗后 Treg 细胞数量较对照组治疗后升高更多, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可能与样本量较小有关。Stelmaszczyk 等^[22]同样发现在患者特应性皮炎等过敏性疾病的儿童患者中, 经变应原特异性免疫治疗后其 Treg 水平会升高。故在特应性皮炎患者中, 舌下含服粉尘螨滴剂能降低其外周血 IL-4、IL-17 水平, 升高 IFN- γ 和 Treg 水平, 从而促进 Th1/Th2、Treg/Th17 平衡的恢复, 从而达到治疗的目的。

参考文献

- [1] Song HY, Ju SM, Goh AR, et al. Suppression of TNF- α -induced MMP-9 expression by a cell-permeable superoxide dismutase in keratinocytes [J]. *BMB Rep*, 2011, 44(7):462-467.
- [2] Dhingra N, Guttman-Yassky E. A possible role for IL-17A in establishing Th2 inflammation in murine models of atopic dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(8):2071-2074.
- [3] Bin L, Leung DY. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2016, 12(3):52-65.
- [4] 张大威, 丘小汕, 何健荣, 等. 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 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(3):171-175.
- [5] Shao J, Cui YX, Zheng YF, et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy in children aged 3-13 years with allergic rhinitis [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2014, 28(2):131-139.
- [6] Wang DH, Chen L, Cheng L, et al. Fast onset of action of sublingual immunotherapy in house dust mite-induced allergic rhinitis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(6):1334-1340.
- [7] 解方, 周勇, 林碧雯, 等. 标准化粉尘螨滴剂舌下含服治疗特应性皮炎的有效性和安全性 [J]. *中国药物应用与监测*, 2016, 13(1):11-13.
- [8] Qin YE, Mao JR, Sang YC, et al. Clinical efficacy and compliance of sublingual immunotherapy with *Dermatophagoides farinae* drops in patients with atopic dermatitis [J]. *Int J Dermatol*, 2014, 53(5):650-655.
- [9] Hanifin JM. Atopic dermatitis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1982, 6(1):1-13.
- [10] Oranje AP, Glazenburg E J, Wolkerstorfer A, et al. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score [J]. *Br J Dermatol*, 2007, 157(4):645-648.
- [11] Wang AX, Xu LN. New insights into T cells and their signature cytokines in atopic dermatitis [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(8):601-610.
- [12] Magombedze G, Reddy PB, Eda S, et al. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses [J]. *Front Physiol*, 2013, 4(1):206-214.
- [13] Leonardi S, Cuppari C, Manti S, et al. Serum interleukin 17, interleukin 23, and interleukin 10 values in children with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS): association with clinical severity and phenotype [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2015, 36(1):74-81.
- [14] Canonica GW, Bousquet J, Casale T, et al. Sublingual immunotherapy: world allergy organization position paper 2009 [J]. *World Allergy Organ J*, 2009, 2(11):233-281.
- [15] Canonica GW, Cox L, Pawankar R, et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update [J]. *World Allergy Organ J*, 2014, 7(1):6-15.
- [16] Allam JP, Novak N. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2014, 14(6):564-569.
- [17] Potter PC, Baker S, Fenimore B, et al. Clinical and cytokine responses to house dust mite sublingual immunotherapy [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2015, 114(4):327-334.
- [18] Shimizu M, Yamaguchi M, Fujita S, et al. Interleukin-17/T-helper 17 cells in an atopic dermatitis mouse model aggravate orthodontic root resorption in dental pulp [J]. *Eur J Oral Sci*, 2013, 121(2):101-110.
- [19] Hwang JS, Kim JE, Yu YB, et al. Modulation of experimental atopic dermatitis by topical application of Gami-Cheongyeul-Sodok-Eum [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(4):312-317.
- [20] Tian M, Wang Y, Lu Y, et al. Effects of sublingual immunotherapy for *Dermatophagoides farinae* on Th17

(下转第 195 页)

· 论 著 ·

高龄重症肺炎患者血清过氧化物及过氧化水平及其临床意义

白驹*

【摘要】目的 观察高龄重症肺炎患者血清中过氧化物及抗氧化物水平的情况及其与患者病情严重程度及预后的关系。**方法** 选取我院重症监护室重症肺炎患者60例为观察组,另选取呼吸内科40例非重症肺炎患者为对照组。检测两组患者入院时血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平,方差分析比较两组患者的差异。另在观察组中将7天观察时限内死亡的患者作为死亡组,7天内存活的患者为存活组,检测患者入ICU 2 h及第3、5、7天的血清过氧化水平,同时评价急性生理学与慢性健康状况评分II(APACHE II)评分,方差分析比较两组患者MDA、SOD及APACHE-II评分的差异,并对患者APACHE-II评分与MDA、SOD水平进行Spearman相关性分析。**结果** 观察组患者血清MDA显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),观察组患者血清SOD活性显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组中,死亡组MDA含量在第5、7天时显著高于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。死亡组SOD水平在第7天时显著低于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。死亡组APACHE-II评分在第5、7天时显著高于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Spearman相关性分析结果显示:观察组患者MDA水平与APACHE-II评分正相关($r_s = 0.815, P < 0.05$),SOD水平与APACHE-II评分负相关($r_s = -0.762, P < 0.05$)。**结论** 重症肺炎患者血清中过氧化水平显著高于非重症肺炎患者,且患者血清过氧化水平越高患者病情越严重,预后越差,提示重症肺炎中血清过氧化水平能良好地反映病情及预后,对临床工作有良好的指导作用。

【关键词】 重症肺炎;过氧化水平;血清丙二醛;超氧化物歧化酶;APACHE-II评分

The level and clinical significance of serum peroxidase in elderly patients with severe pneumonia

BAI Ju*

(Changde Maternal and Child Health-Care Hospital, Changde, Hunan, China, 415000)

【ABSTRACT】 Objective To observe the levels of serum superoxide and antioxidants in elderly patients with severe pneumonia and their relationship with the severity of the disease and the prognosis. **Methods** 60 cases of severe pneumonia in our hospital were selected as the observation group, and 40 cases of non severe pneumonia were selected as the control group. The levels of serum malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) were detected in the two groups of patients and the differences between the two groups were compared. In the observation group (patients with severe pneumonia), patients who died within 7 days of observation were treated as death group. Survival group was survived within 7 days. Serum levels of peroxidation were measured in ICU at 2 h and 3, 5, 7 days respectively. The APACHE-II score was evaluated. The differences of MDA, SOD and APACHE-II scores were compared between the death and survival groups. Spearman correlation analysis was performed on the APACHE-II score and MDA or SOD levels. **Results**

作者单位:常德市妇幼保健院,湖南,常德 415000

*通讯作者:白驹, E-mail:857775419@qq.com

The serum MDA of the observation group was significantly higher than that of the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The serum SOD activity of the observation group was significantly lower than that of the control group, the difference was also statistically significant ($P < 0.05$). In the observation group, the content of MDA in the death group was significantly higher than that in the survival group at five and seven days, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The SOD level in survival group was significantly higher than that in the death group at seven day, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The death group APACHE-II score was significantly higher than that in the survival group at five and seven days, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that the levels of MDA in patients with APACHE-II score and observed positive correlation ($r_s = 0.815, P < 0.05$), the level of SOD negative correlation with APACHE-II score ($r_s = -0.762, P < 0.05$). **Conclusion** Serum peroxide levels in patients with severe pneumonia were significantly higher than that in patients with non-severe pneumonia, and serum peroxidation the higher the severity is, the worse the prognosis of severe pneumonia, suggesting that serum peroxidation levels can reflect the severity and prognosis, it provides good guidance for clinical work.

[KEY WORDS] Severe pneumonia; Peroxide level; MDA; SOD; APACHE-II score

重症肺炎是ICU常见的病种之一,大多数患者病情危重、进展迅速,可在普通肺炎的基础上短时间内发展至危重状态,常伴有严重的呼吸窘迫症状、血流动力学异常、酸中毒、休克甚至引起多脏器衰竭综合征(multiple organ failure syndrome, MOFS)^[1],治疗难度大,死亡率高。且老年患者临床表现和常用实验室指标往往不敏感,造成临床诊断的延误,导致患者病情恶化及不良预后。因此,如何早期诊断,及早遏制病情的发展,准确评估病情及指导用药就成为临床工作中亟待解决的问题。重症肺炎引起的缺氧、休克、全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)等^[2-3],均可能引起机体氧化-抗氧化平衡破坏^[4],导致患者机体氧化应激的发生,从而推动病情进一步发展。由此,本研究拟通过探讨重症肺炎患者过氧化物及抗氧化物水平与重症肺炎患者病情进展和预后的关系,评价过氧化水平检测对于老年重症肺炎的临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象基本情况

重症肺炎患者为我院2015年2月至2015年10月ICU收治的老年重症肺炎患者60例,非重症肺炎患者为我院2015年3月至2015年9月呼吸内科收治的老年普通肺炎患者40例,重症肺炎患者组为观察组,男性32人,女性28人;年龄在60到74岁之间,平均年龄(67±11)岁;社区获

得性肺炎26例,医院获得性肺炎34例。非重症肺炎为对照组,男性20人,女性20人;年龄在60岁到70岁之间,平均年龄(65±13)岁;社区获得性肺炎24例,医院获得性肺炎16例。两组患者在性别、年龄、肺炎类型等方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察期限7天内观察组死亡的患者24例,为死亡组;其余36例患者为生存组。死亡组患者中男性16人,女性8人;年龄在60到72岁之间,平均年龄(68±15)岁;社区获得性肺炎11例,医院获得性肺炎13例。生存组患者中男性24人,女性12人;年龄在60到76岁之间,平均年龄(66±14)岁;社区获得性肺炎14例,医院获得性肺炎22例。两组患者在性别、年龄、肺炎类型等方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 对象选取条件

依据美国胸科学会(American Thoracic Society, ATS)2011年对重症肺炎的诊断标准^[5],重症肺炎患者诊断符合1条主要标准或2条次要标准:主要诊断标准:①需要机械通气;②入院48h内肺部病变扩大 $\geq 50\%$;③少尿(每日 < 400 mL)或非慢性肾衰患者血肌酐 $> 177 \mu\text{mol/L}$ (2 mg/dL)。次要标准:①呼吸频率 > 30 次/min;② $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$;③病变累及双肺或多肺叶;④收缩压 < 12 kPa(90 mmHg);⑤舒张压 < 8 kPa(60 mmHg)。非重症肺炎患者不符合以上条件。同时重症肺炎患者及非重症肺炎住院患者均排除严重的免疫缺陷和免疫抑制,排除凝血功能障碍以及难以

控制的呼吸衰竭,排除合并其他基础疾病的患者。

1.3 检测方法

取重症肺炎患者入ICU后2 h内以及第3、5、7天的2 mL静脉血,血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测采用硫代巴比妥酸比色法检测,使用上海碧云天生物技术有限公司的脂质氧化检测试剂盒(Lipid Peroxidation MDA Assay Kit),货号:S0131,单位以 $\mu\text{mol/L}$ 表示。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定采用氮蓝四唑法检测,使用上海碧云天生物技术有限公司的总SOD活性检测试剂盒(Total Superoxide Dismutase Assay Kit with NBT),货号:S0107,单位以酶活性表示(U/L)。非重症肺炎患者仅在入院后2 h取2 mL静脉血检测相关指标。

1.4 评分标准

急性生理学与慢性健康状态评分(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, APACHE-II score)评价患者病情严重程度^[6]:APACHE-II评分量表包含生理评分、年龄、慢性病评分3个部分。生理评分包括直肠温度、平均动脉压、心率、呼吸、肺泡-动脉氧分压差(A-ADO₂)或氧分压(PaO₂) (FiO₂≥0.5时用A-ADO₂, FiO₂<0.5时用PaO₂)、动脉血PH值、血清钠、血清钾、血清肌酐、血细胞比容、白细胞计数以及血电解质12个指标,根据各指标不同的异常程度划分等级并评分。年龄划分为5个等级:≤45岁,0分;45~54岁,2分;55~64岁,3分;65~74岁,5分;≥75岁,6分。合并慢性病且非手术或急诊手术患者5分,择期手术者2分。总分71分,评分越高,患者病情越危重,病死率越高。

1.5 统计分析

采用SPSS 19.0统计分析软件,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并使用方差分析比

较两组检查结果差异是否有统计学意义($\alpha=0.05$),相关性分析采用Spearman相关分析($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 观察组与对照组血清MDA、SOD水平的比较

入院时观察组患者血清MDA水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组患者血清SOD水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 观察组与对照组患者血清MDA、SOD水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The comparison of serum levels of MDA and SOD between the observation group and the control group ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(U/L)
观察组	60	19.1±2.1	306.5±61.0
对照组	40	11.4±1.6	473.8±72.1
F值	-	74.7	36.0
P值	-	<0.01	<0.01

2.2 死亡组与存活组血清MDA水平的比较

比较死亡组和存活组血清MDA水平的变化情况,入ICU 2 h及第3天两组MDA水平差异无统计学意义($P>0.05$)。随着病程的进展,两组患者血清MDA水平出现差异,第5、7天死亡组患者血清MDA水平显著高于存活组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

2.3 死亡组与存活组血清SOD水平的比较

比较死亡组和存活组血清SOD水平的变化情况,入ICU 2 h及第3、5天两组SOD水平差异无统计学意义($P>0.05$)。随着病程的进展,两组患者血清SOD水平出现差异,第7天存活组患者血清SOD水平显著高于死亡组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表2 死亡组与存活组血清MDA水平的比较($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

Table 2 The comparison of serum levels of MDA between the death group and survival group ($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	例数	入ICU 2 h	第3天	第5天	第7天
死亡组	24	19.2±2.4	17.7±2.7	18.9±2.9	20.2±3.4
存活组	36	18.7±1.8	15.8±2.1	13.2±2.3 [▲]	12.7±1.6 [▲]
F值	-	1.16	3.20	21.90	87.16
P值	-	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

与死亡组相比,▲ $P<0.05$

表3 死亡组与存活组患者血清SOD水平的比较($\bar{x} \pm s$, U/L)Table 3 The comparison of serum levels of SOD between the death group and survival group($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	例数	入ICU 2 h	第3天	第5天	第7天
死亡组	24	301.7 ± 52.9	354.7 ± 64.5	351.8 ± 59.6	331.5 ± 62.4
存活组	36	309.5 ± 60.2	373.8 ± 57.2	384.2 ± 54.8	414.6 ± 66.2 [▲]
F值	-	0.57	2.72	3.14	24.21
P值	-	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05

与死亡组相比, [▲] $P < 0.05$

2.4 死亡组与存活组 APACHE-II 的比较

对比死亡组和存活组 APACHE-II 评分的变化情况,入ICU 2 h及第3天两组 APACHE-II 评

分差异无统计学意义($P > 0.05$)。随着病程进展,第5、7天死亡组 APACHE-II 评分显著高于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表4 死亡组与存活组 APACHE-II 的评分比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 The comparison of serum levels of APACHE-II score between the death group and survival group($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	入ICU 2 h	第3天	第5天	第7天
死亡组	24	61.3 ± 7.5	64.2 ± 10.6	68.4 ± 9.2	70.3 ± 9.8
存活组	36	58.5 ± 6.8	54.8 ± 7.2	52.5 ± 6.6 [▲]	47.5 ± 5.1 [▲]
F值	-	1.37	2.14	12.73	51.61
P值	-	> 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05

与死亡组相比, [▲] $P < 0.05$

2.5 MDA、SOD与APACHE-II评分的相关性分析

使用 Spearman 相关性分析,重症患者 MDA 水平与 APACHE-II 评分呈正相关($r_s = 0.815, P < 0.05$)。重症患者 SOD 水平与患者 APACHE-II 评分呈负相关($r_s = -0.762, P < 0.05$)。

3 讨论

重症肺炎又称中毒性肺炎或暴发性肺炎,本质是多种致病因素引起的急性肺实质炎症的危重状态。由于不可控制的感染,肺叶大面积受累,中性粒细胞在肺内大量聚集、各炎症因子和纤维蛋白介导血管内皮及肺上皮细胞通透性增加,导致肺水肿的发生及肺毛细血管微血栓的形成,机体发生严重的缺氧及炎症反应。近年来许多研究显示,氧化应激与多种缺氧及炎症损伤相关疾病的发生存在密切联系,如急性脑血管疾病、心肌炎、心肌梗死等^[7-9]。基于此,我们认为重症肺炎患者机体严重的缺氧及炎症反应也可通过多种途径促进机体内过氧化物的产生,影响机体的氧化平衡。可能涉及的途径包括:①缺氧引起线粒体功能障碍:线粒体中含降解过氧化物的酶类,缺氧导

致相关酶类活性下降,如谷胱甘肽过氧化物酶等^[10]。同时缺氧导致线粒体膜钙通道异常开放,内外钙离子平衡失调,导致线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放,多种活性物质进入细胞质,加速细胞内过氧化物的产生^[11-12]。②缺氧通过多种促进途径过氧化物的产生:缺氧还可以通过上调雄激素受体、血管内皮生长因子、白介素-8等的表达促进过氧化物水平增加^[13]。③过度的炎症反应也可导致过氧化物表达上调:机体大量的炎性因子如核因子 Kappa B (nuclear factor Kappa B, NF- κ B)、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)均能上调过氧化物的表达^[14-16]。

本研究中,重症肺炎患者血清 MDA 水平显著高于普通肺炎患者,说明重症肺炎患者体内氧化物明显高于普通肺炎患者,重症肺炎患者 SOD 活性显著低于非重症肺炎患者,表明重症肺炎患者体内抗氧化物活性明显下降,同时,重症肺炎死亡组患者 MDA 水平随着治疗时间的延长并未出现显著的降低, SOD 活性也未出现明显升高;相反,

存活组患者MDA水平呈现出逐渐降低的趋势,SOD活性也有显著改善,提示重症肺炎患者血清过氧化水平与患者预后密切相关。APACHE-II评分与氧化及抗氧化物的相关性分析结果也提示重症肺炎患者血清氧化水平与患者病情进展程度具有一定相关性。综上所述,机体内过氧化水平不仅能够有效地评估老年重症肺炎患者病情的进展及预后情况,其在重症肺炎的进展中可能也发挥着重要作用,笔者希望通过进一步探究过氧化物在重症肺炎进展中的确切机理,指导临床工作通过调节过氧化水平达到纠正患者氧化-抗氧化失调的目的,从而有利于稳定患者的病情,改善患者的预后。

参考文献

- [1] 梁雨. 连续性血液净化在重症肺炎合并多器官功能衰竭中的作用分析[J]. 当代医学, 2014, 22(18): 63-64.
- [2] Frazier SB, Sepanski R, Mangum C, et al. Association of systemic inflammatory response syndrome with clinical outcomes of pediatric patients with pneumonia [J]. *South Med J*, 2015, 108(11):665-669.
- [3] Liu W, Peng L, Hua S. Clinical significance of dynamic monitoring of blood lactic acid, oxygenation index and C-reactive protein levels in patients with severe pneumonia [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(5): 1824-1828.
- [4] Akinosoglou K, Alexopoulos D. Use of antiplatelet agents in sepsis: a glimpse into the future [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(2):131-138.
- [5] 洪群英. 美国胸科学会(ATS)支持33个中国中青年医师参会[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 12(6):410.
- [6] Bahtouee M, Heydari H, Motamed N, et al. Efficacy of care in Fatemeh Zahra hospital's ICU wards according to APACHE II score [J]. *Iranian South Medical Journal*, 2012, 15(4):317-326.
- [7] 崔艳丽, 余杨. 炎症、氧化应激与急性心肌梗死的关系及临床意义[J]. 中国现代医生, 2011, 49(31):157-158.
- [8] 成红芬, 杨现国. 心肌炎患者治疗前后SOD的水平变化及其临床意义[J]. 北京医学, 2012, 34(8): 752.
- [9] 李玉飞. 儿童过敏性紫癜急性期血浆MPO、MDA、SOD及T-AOC水平变化及临床意义[D]. 合肥:安徽医科大学, 2015.
- [10] Song J, Yoon D, Christensen RD, et al. HIF-mediated increased ROS from reduced mitophagy and decreased catalase causes neocytolysis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(8):1-10.
- [11]. Bu HM, Yang CY, Wang ML, et al. K(ATP) channels and MPTP are involved in the cardioprotection bestowed by chronic intermittent hypobaric hypoxia in the developing rat [J]. *J Physiol Sci*, 2015, 65(4):1-10.
- [12] Staff PO. Correction: Erythropoietin Protects Cardiomyocytes from Cell Death during Hypoxia/Reperfusion Injury through Activation of Survival Signaling Pathways [J]. *Plos One*, 2014, 9(12):e115268-e115268.
- [13] Ren H, Li X, Cheng G, et al. The effects of ROS in prostatic stromal cells under hypoxic environment [J]. *Aging Male*, 2015, 18(2):1-5.
- [14] Blaser H, Dostert C, Mak TW, et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(4):249-261.
- [15] Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling [J]. *Cell Res*, 2011, 21(1):103-115.
- [16] Yu J, Lu Y, Li Y, et al. Role of S100A1 in hypoxia-induced inflammatory response in cardiomyocytes via TLR4/ROS/NF- κ B pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(9):1240-1250.
- [22] Stelmaszczyk - Emmel A, Zawadzka - Krajewska A, Glodkowska-Mrowka E, et al. FoxP3 Tregs Response to Sublingual Allergen Specific Immunotherapy in Children Depends on the Manifestation of Allergy [J]. *J Immunol Res*, 2015, 18(4):73-79.

(上接第190页)

cells and CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in peripheral blood of children with allergic asthma [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2014, 4(5):371-375.

- [21] 曾美, 高谦, 何定阳, 等. 特异性皮炎患者外周血CD4+CD25+调节性T细胞的检测[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(9):610-613.

不同亚型 HPV 感染与女性宫颈疾病的相关性

梁艳华¹ 毕超^{1*} 梁景耀¹ 唐明珠² 王焕丽¹ 邓斌¹ 宋卫忠¹

【摘要】 目的 探讨不同亚型 HPV 感染与女性宫颈疾病的相关性。方法 选取本所 2015 年 3 月至 2016 年 4 月的 2 360 例宫颈疾病患者进行 21 种亚型 HPV 检测,其中包括 5 种低危亚型(LR-HPV)和 16 种高危亚型(HR-HPV),同时根据宫颈病理活检结果将宫颈疾病患者分为 3 组,宫颈炎组 217 例,宫颈上皮内瘤变(CIN)组 118 例,宫颈癌组 36 例。比较不同亚型 HPV 感染与女性宫颈疾病发病的关系。结果 本研究中的 2 360 例宫颈疾病患者中检测到 HPV 阳性患者 371 例,阳性率为 15.7%,其中 HPV 单一感染 203 例(54.7%),多重感染 168 例(45.3%)。宫颈炎患者组 HPV 感染以 HPV16(68.7%),HPV52(13.0%),HPV31(5.2%),HPV11(3.5%)亚型为主,CIN 组 HPV 感染以 HPV6(69.2%),HPV33(6.2%),HPV52(6.2%),HPV58(6.2%)亚型为主,宫颈癌组 HPV 感染以 HPV16(65.2%),HPV53(13.0%),HPV58(8.7%),HPV56(8.7%)亚型为主;HPV16 型感染和 HPV11 型感染为导致宫颈炎发生的危险因素($P < 0.01$),HPV6 型感染和 HPV52 型感染为导致 CIN 发生的危险因素($P < 0.01$),HPV16 型感染和 HPV58 型感染为导致宫颈癌发生的危险因素($P < 0.01$)。结论 高危型 HPV 是导致宫颈癌,宫颈炎发生的危险因素,低危型 HPV 是导致 CIN 发生的危险因素,HPV 分型与宫颈疾病的发生具有密切相关性。

【关键词】 亚型; HPV; 宫颈病变; 人乳头瘤病毒

Relationship between different subtypes of HPV infection and cervical disease in female

LIANG Yanhua¹, BI Chao^{1*}, LIANG Jingyao¹, TANG Mingzhu², WANG Huanli¹, DENG Bin¹, SONG Weizhong¹

(1. Guangzhou Institute of Dermatology, Guangzhou, Guangdong, China, 510000; 2. Guangzhou DaAn Clinical Laboratory Center Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510000)

【ABSTRACT】 Objective To study the relationship between infection with the different subtypes of human papillomavirus (HPV) and cervical disease. Methods From March 2015 to April 2016, 2 360 cases of cervical disease were studied. Twenty-one subtypes of HPV were detected, including 5 low-risk subtypes (LR-HPV) and 16 high-risk subtypes (HR-HPV), according to cervical biopsy results HPV positive women were divided into 3 groups, cervicitis group was 217 cases, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) group was 118 cases, cervical cancer group was 36 cases. The relationship between different subtypes of HPV infection and cervical disease was analyzed. Results In the 2 360 cases of cervical disease analyzed, 371 patients were HPV positive, for a positive rate of 15.7%, of which 203 cases (54.7%) were of single-subtype infection, and multiple infection occurred in 168 cases (45.3%). In the patients with cervicitis, infection with HPV16(68.7%), HPV52(13.0%), HPV31(5.2%), and HPV11(3.5%) were detected. In the cervical intraepithelial neoplasia patients, subtypes HPV6(69.2%), HPV33(6.2%), HPV52(6.2%), and HPV58(6.2%) were detected. Among the cervical cancer patients, infection with HPV16(65.2%), HPV53(13.0%), HPV58(8.7%), and HPV56(8.7%) subtypes were found. Subtype HPV6 and HPV52 infection are risk factors for CIN ($P < 0.01$) and type HPV16 infection and type HPV58 infection are risk factors that lead to the occurrence of cervical cancer ($P <$

作者单位:1. 广东省广州市皮肤病防治所, 广东, 广州 510095

2. 广州达安临床检验中心, 广东, 广州 510000

*通讯作者: 毕超, E-mail: biccc916@sina.com

0.01). **Conclusion** The high risk HPV subtypes are risk factors for cervical cancer and cervicitis, while the low risk HPV is a risk factor for CIN. HPV infection is closely related to the occurrence of cervical disease.

[KEY WORDS] Subtype; HPV; Cervicitis; Cervical cancer

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种属于乳头多瘤空泡病毒科的乳头瘤病毒 A 属的双链 DNA 病毒^[1]。这种病毒可侵犯皮肤以及黏膜鳞状上皮,感染 HPV 会导致多种宫颈疾病的发生,包括宫颈炎、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)、宫颈癌等众多危害女性健康的疾病,其中宫颈癌也是妇科最常见的恶性肿瘤之一^[2-4]。HPV 感染是导致这些疾病的重要因素,目前已经发现了多种 HPV 的亚型,根据其危险程度不同可分为高危型和低危型,不同亚型 HPV 感染可导致不同的女性宫颈疾病,且不同亚型 HPV 感染存在地域差异^[5]。不同的亚型对宫颈疾病发病造成的影响不同,而且不同学者研究的结果存在一定的差异,因此有必要进行本次研究,探讨哪种亚型对宫颈疾病的发生占主导因素。本研究针对本所收集的病例进行研究,研究不同亚型 HPV 感染与女性宫颈疾病的关系,为深入的研究提供参考依据。

1 资料与方法

1.1.1 一般资料

随机选取本所 2015 年 3 月至 2016 年 4 月的 2360 例宫颈疾病患者进行研究,经严格病理组织学检测证实,其中 HPV 感染阳性妇女 371 例,将 HPV 检测结果为阳性的样本根据病理结果分为 3 组,其中为宫颈炎组 217 例,年龄 20~70 岁,平均(40.71±8.86)岁;宫颈上皮内瘤变(CIN)组 118 例,年龄 21~65 岁,平均(40.56±7.81)岁;宫颈癌组 36 例,年龄 22~68 岁,平均(40.76±7.90)岁。3 组患者的年龄相比,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。病人纳入标准:无 HPV 感染治疗病史;无其他影响 HPV 检测的病症;未进行过宫颈和盆腔治疗;患者完全知情,并签署知情同意书。排除妊娠期孕妇、正处于月经期的宫颈疾病患者和存在心肝肾等器官严重疾病患者。

1.1.2 试剂

HPV 检测试剂盒购自广东凯普生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 采集标本

HPV 检测前,所有患者在 24 h 内不能进行性

生活,在窥阴镜的观察下将患者的宫颈充分暴露,然后用干棉签将患者宫颈口的分泌物擦干净,用标本毛刷收集宫颈口脱落的细胞,将收集的样本置于 4℃ 的冰箱内备用^[6]。

1.2.2 HPV 分型检测

HPV 分型检测采用导流杂交 HPV DNA 检测法^[7]进行检测,检测 21 种 HPV 亚型,包括 16 种高危亚型: HPV 16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68、HPV52(MM4)亚型,5 种低危亚型: HPV 6、HPV11、HPV42、HPV43、HPV44。

1.2.3 诊断标准^[8]

通过观察芯片薄膜(在芯片薄膜的质控点正常的基础上)HPV 亚型分布的相应着色点获得研究结果,呈现清晰的蓝紫色圆点可判断检测结果为阳性点。判断阳性点为何种 HPV 亚型。一种 HPV 亚型感染的为单一感染,两种及两种以上 HPV 亚型感染的为多重感染。

1.2.4 宫颈疾病病理学活检

由具有经验且专业的妇产科医师负责阴道镜下宫颈疾病的病理学活检,患者需排空膀胱以窥阴器充分暴露宫颈。将阴道内过多分泌物用干棉签拭去,调整好阴道镜的距离、焦距和放大倍数,先肉眼观察宫颈有无糜烂、出血、赘生物等病变。然后用 3%醋酸涂于宫颈行醋酸试验,异常者摄像保存。再用 1%碘溶液涂于宫颈行碘试验,观察发生病变的周围边界及表面形态,对碘试验异常区域行多点可疑处活检。填写患者基本信息,标本置于 10%福尔马林固定后送病理科登记检查。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计学软件进行处理,计数数据结果用 $n\%$ 进行表示,组间比较采用两组独立样本 t 检验,方差齐用方差分析,方差不齐用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,回归分析采用单因素非条件 Logistic 回归检验方法,以 $\alpha=0.05$ 为检验标准, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义, $OR>1$ 为危险因素, $OR<1$ 为保护因素。

2 结果

2.1 宫颈病变严重程度与感染分型比较

2 360 例宫颈疾病患者中检测到 HPV 阳性患者 371 例,阳性率为 15.7%,其中单一感染 203 例(54.7%),多重感染 168 例(45.3%),见表 1。宫颈炎组和宫颈癌组主要为高危型 HPV 感染,CIN 组主要为低危型 HPV 感染,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。具体见表 2。

表 1 各组患者 HPV 感染比较[n(%)]

Table 1 Comparison of HPV infection in each group [n(%)]

分组	n	单一感染	多重感染	χ^2	P
宫颈炎组	217	148*(68.2)	69(31.8)	92.042	<0.05
CIN 组	118	30(25.4)	88*(74.6)	25.000	<0.05
宫颈癌组	36	25*(69.4)	11(30.6)	14.440	<0.05
总数	371	203(54.7)	168(45.3)	23.370	<0.05

*表示 $P < 0.05$

表 2 各组患者 HPV 感染分型比较[n(%)]

Table 2 Comparison of positive rate of HPV infection in each group [n(%)]

分组	n	高危型	低危型	χ^2	P
宫颈炎组	217	145*(66.8)	72(23.5)	21.774	<0.05
CIN 组	118	24(20.3)	94*(79.7)	36.000	<0.05
宫颈癌组	36	27*(75.0)	9(25.0)	25.000	<0.05
总数	371	196(52.8)	175(47.2)	27.435	<0.05

*表示 $P < 0.05$

2.2 HPV 亚型在不同宫颈疾病中的分布状况

HPV 亚型在不同宫颈病变中的分布状况(以单一感染数统计)见表 2,由表 2 可以看出,宫颈炎患者组 HPV 感染以 HPV 16 (65.5%), HPV 52 (12.2%), HPV31(6.8%), HPV11(3.4%)亚型为主, CIN 组 HPV 感染以 HPV 6 (63.3%), HPV33 (6.7%), HPV52(6.7%), HPV58(6.7%)亚型为主,宫颈癌组 HPV 感染以 HPV 16 (64.0%), HPV53 (12.0%), HPV58(8.0%), HPV56(8.0%)亚型为主。

2.3 不同亚型 HPV 感染与宫颈癌的相关性

根据单因素分析中占的比例比较高的 HPV16、HPV53、HPV58、HPV56 亚型得到的结果进行 Logistic 回归模型分析,结果显示 HPV16 型感染和 HPV58 型感染是导致宫颈癌发生的危险因素($P < 0.01$),见表 4。

表 3 HPV 亚型在不同宫颈疾病中的分布状况[n(%)]

Table 3 Ddistribution of HPV subtypes in different cervical diseases [n(%)]

HPV 亚型	宫颈炎	CIN	宫颈癌	χ^2	P
HPV 16	97(65.5)	0(0.0)	16(64.0)	5.327	0.023
HPV 52	18(12.2)	2(6.7)	0(0.0)	4.987	0.024
HPV 11	5(3.4)	1(3.3)	0(0.0)	4.975	0.024
HPV 58	1(0.7)	2(6.7)	2(8.0)	4.768	0.025
HPV 31	10(6.8)	0(0.0)	0(0.0)	5.089	0.024
HPV 33	0(0.0)	2(6.7)	0(0.0)	4.679	0.026
HPV 6	0(0.0)	19(63.3)	0(0.0)	6.023	0.021
HPV 53	0(0.0)	1(3.3)	3(12.0)	4.897	0.025
HPV 66	3(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	1.946	0.121
HPV 68	1(0.7)	0(0.0)	1(4.0)	0.593	0.325
HPV 18	0(0.0)	1(3.3)	0(0.0)	0.593	0.326
HPV 39	3(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.918	0.358
HPV 51	2(1.4)	0(0.0)	0(0.0)	0.897	0.385
HPV 56	3(2.0)	0(0.0)	2(8.0)	1.032	0.241
HPV 35	1(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0.598	0.326
HPV 43	1(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0.597	0.326
HPV MM4	0(0.0)	1(3.3)	0(0.0)	1.376	0.247
HPV 45	0(0.0)	1(3.3)	0(0.0)	0.794	0.358
HPV 59	3(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	1.321	0.248
HPV 42	0(0.0)	0(0.0)	1(4.0)	1.769	0.211
总数	148(100)	30(100)	25(100)		

宫颈炎、CIN 和宫颈癌都是以单一感染进行比较其 HPV 亚型

表 4 HPV 感染与宫颈癌的相关性

Table 4 Correlation between HPV infection and cervical cancer

亚型	OR	95%CI	P 值
HPV16	3.17	1.37~6.94	0.009
HPV58	2.73	0.87~3.16	0.008
HPV53	1.01	0.25~1.56	0.098
HPV56	0.98	0.15~1.21	0.101

2.4 不同亚型 HPV 感染与 CIN 的相关性

根据单因素分析中占的比例比较高的 HPV6、HPV33、HPV52、HPV58 结果进行 Logistic 回归模型分析,结果显示 HPV6 型感染及 HPV52 型感染是导致 CIN 发生的危险因素($P < 0.01$),具体结果见表 5。

2.5 不同亚型 HPV 感染与宫颈炎的相关性

根据单因素分析中占的比例比较高的 HPV16、HPV52、HPV31、HPV11 结果进行 Logistic 回归模型的分析,结果显示, HPV16 型感染及 HPV11 型感染是导致宫颈炎发生的危险因素($P < 0.01$),具体结果见表 5。

表5 HPV感染与CIN的相关性

型别	OR	95%CI	P值
HPV6	5.19	3.16~14.37	0.004
HPV52	4.37	3.08~12.61	0.006
HPV33	1.26	2.15~10.25	0.088
HPV58	1.36	2.36~11.25	0.075

表6 HPV感染与宫颈炎的相关性

型别	OR	95%CI	P值
HPV16	4.98	2.45~11.21	0.005
HPV11	4.59	2.18~10.44	0.006
HPV52	1.28	2.37~8.98	0.089
HPV31	1.45	2.47~9.21	0.077

3 讨论

宫颈疾病是危害女性的重要疾病,其中宫颈炎、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌是常见的几种宫颈疾病^[9],HPV感染能够引起主要的生殖系统疾病,HPV在癌症发展中的作用已被广泛研究^[10]。有研究^[11]报道宫颈癌中不同HPV亚型中的高危型的阳性率比较高,而低危型的阳性率比较低。可见高危型HPV是宫颈癌的发病的主要因素。宫颈疾病中的宫颈炎也与HPV感染有关,研究认为高危型的HPV感染对宫颈炎的发生起到关键作用^[12]。本研究的结果也表明宫颈癌和宫颈炎患者的发病原因主要是因为高危型HPV感染,这也和前人的研究基本吻合^[13]。

宫颈上皮内瘤变是癌前病变的总称,主要包括宫颈不典型增生和宫颈原位癌,是发展到宫颈癌的一系列变化的过程。宫颈上皮内瘤变的发病与HPV感染有关,而有研究^[12]认为低危型HPV感染是导致该病发生的原因,可能的原因是不同的疾病发病程度对不同亚型的HPV感染具有一定影响,而且也与患者的体质有一定的关系。但也有学者^[14]认为高危型HPV感染的影响比较大,本研究结果显示高危型HPV感染的比例为52.8%(196/371)略高于低危型47.2%(175/371),与此研究报道一致。

不同亚型HPV感染的基因型中比较常见的是高危型16个,低危型5个,不同的基因型也会对宫颈疾病的发生有不同的影响。研究^[15]发现高危型中的HPV16对宫颈疾病的发生比较重要,尤其在宫颈癌和宫颈炎的发病中具有重要作用。本研究

显示宫颈炎组感染的主要HPV亚型是高危型HPV16、HPV52、HPV33和低危型HPV11,宫颈癌组感染的主要是高危型HPV16、HPV53、HPV58、HPV56,宫颈上皮内瘤变的发生主要是低危型HPV6和高危型HPV33,HPV52,HPV58。本研究的结果和其他研究^[16]的结果存在一定的差异,可能的原因是生殖道HPV感染有HPV亚型单一感染与HPV亚型多重感染。关于HPV亚型多重感染的比例方面,每个学者得到的结果也存在一定的差异,可能的原因是与研究对象及地域有一定的关系,同时也有可能与不同检测方法的有一定的关系^[17]。本研究的结果显示宫颈癌的发生与不同HPV感染的多因素分析中发现,宫颈上皮内瘤变发生的危险因素是HPV6和HPV52感染,宫颈癌的发生危险因素是HPV16和HPV58感染,导致宫颈炎发生的危险因素是HPV16型感染和HPV11型感染。由此可见,宫颈疾病的发生与多个不同亚型HPV感染有着密切的关系。

参考文献

- [1] Devor EJ, Reyes HD, Gonzalez-Bosquet J, et al. Placenta-Specific Protein 1 Expression in Human Papillomavirus 16/18-Positive Cervical Cancers Is Associated With Tumor Histology [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 3. [Epub ahead of print]
- [2] 马玉花, 阿依古丽, 依布拉音木, 杨杰, 等. HPV分型检测及其在宫颈病变中的意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(6):977-981.
- [3] Huang L, Huang Z, Fan Y, et al. FOXCl promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma through the PI3K-AKT signal pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 15, 9(3): 1297-1306.
- [4] Li H, Sheng Y, Zhang Y, et al. MicroRNA-138 is a potential biomarker and tumor suppressor in human cervical carcinoma by reversely correlated with TCF3 gene [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 3. [Epub ahead of print]
- [5] 张元, 钱小华, 柴莉, 等. 295例宫颈病变患者HPV亚型多重感染与宫颈病变的关系[J]. *中国医药科学*, 2013, 3(18):7-9.
- [6] 王长奇, 王康, 陈燕萍, 等. HPV多重感染与宫颈病变关系的分析[J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(2): 166-168.
- [7] 袁征, 李珍, 孙彦珍, 等. 流杂交基因芯片技术用于人乳头状瘤病毒感染分型的检测效果[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016(3):552-553, 560.

- [8] 李琴, 蔡建平, 陈炳香, 等. 不同年龄段高风险女性 HPV 感染率及感染亚型分布状况分析[J]. 中国性科学, 2015, 24(9):69-71.
- [9] Wu Q, Zhao X, Fu Y, et al. A cross-sectional study on HPV testing with type 16/18 genotyping for cervical cancer screening in 11, 064 Chinese women [J]. *Cancer Med*, 2017, 4. [Epub ahead of print]
- [10] Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers[J]. *New Microbiol*. 2017, 40(2). [Epub ahead of print]
- [11] 李亚军, 杨明珠, 秦文芝. 不同级别宫颈病变中 HPV 感染状态的临床分析[J]. 中国实验断学, 2015, 19(1):71-74.
- [12] 赵海鸣, 冯春宇, 王小敏, 等. 不同亚型 HPV 混合感染与宫颈病变严重程度的关系[J]. 中国热带医学, 2015, 15(12):1493-1495.
- [13] 宋丽君, 陈春丽, 罗淑桂. HPV 基因分型检测与宫颈病变的相关性研究[J]. 检验医学, 2012, 27(3):163-166.
- [14] 李娟, 尹格平, 陈铭, 等. 多种 HPV 亚型检测在宫颈病变诊治中的意义[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(2):195-198.
- [15] 韩东红, 周潘梅, 谢红仙, 等. 妇女宫颈病变与 HPV 亚型感染的相关性分析[J]. 浙江预防医学, 2013, 25(11):66-69.
- [16] 秦文敬, 王娜, 韩松云, 等. 宫颈疾病中 HPV 高危亚型分型定量研究及其临床意义[J]. 临床检验杂志, 2013, 2(1):272-277.
- [17] 姬川俐, 甘霖, 彭霖希, 等. 高危型 HPV 分型检测在宫颈疾病诊治中的应用价值[J]. 中国计划生育和妇产科, 2015, 7(6):29-32.

(上接第 180 页) 综上所述,地贫儿童体内微量元素与正常儿童之间存在明显的差异,临床在纠正贫血的同时还应注意微量元素的情况,做到早期测定、合理指导膳食、持续监测,最大程度提高地贫儿童的生存质量。由于个别地中海贫血基因类型病例数量较少,我们将会在今后的工作积累中继续深入研究地贫患儿不同基因类型分型与微量元素分布情况之间的关系,更加全面地为临床医生提供数据资料。

参考文献

- [1] 林梅双, 许娟. MCV、MCH、MCHC、RDW-SD 和 HbA₂ 在地贫筛查中的意义[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(10):1274-1276.
- [2] M Delvecchio, L Cavallo. Growth and endocrine function in thalassemia or in childhood and adolescence [J]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2010, 33(1):61-68.
- [3] 李冰, 谷强. 微量元素对学龄前儿童身体发育影响研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(20):3287-3288.
- [4] 薛辛东. 儿科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 389-393.
- [5] 徐祥虎, 朱宝生. 珠蛋白生成障碍性贫血的分子诊断研究进展[J]. 分子诊断与治疗志, 2011, 3(4):283-288
- [6] 林业辉, 潘志伟, 周杏, 等. 广东佛山地区儿童地中海贫血基因型分析[J]. 贵州医药, 2015, 39(10):931-932.
- [7] 李壮艳, 陈萍, 廖宁, 等. 地中海贫血儿童全血中 6 种元素的含量分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2008, 16(3):333-334
- [8] 王毅, 陈燕娜, 张力, 等. 对不同基因型地中海贫血儿童全血中 9 种金属元素的研究[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2011, 24(2):68-71.
- [9] 蔡敏敏, 黄钰君, 伍绍国, 等. 不同基因型地中海贫血患儿全血元素的分析[J]. 解剖学研究, 2010, 32(1):25-27.
- [10] 白海波, 陈海, 欧少铨, 等. 健康教育干预对婴幼儿轻度地中海贫血危险因素的预防研究[J]. 临床医药文献杂志, 2014, 1(12):2189-2190.
- [11] 夏威夷, 谭蓉, 覃西. 不同基因型珠蛋白生成障碍性贫血患儿血清铁代谢指标分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(20):2947-2949.
- [12] 刘建雷, 曾赤佳, 赵东, 等. 轻型地中海贫血孕妇全血元素影响因素的研究[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2016, 37(3):267-271, 276.
- [13] Mohammadreza Rashidi, Maryam Aboomardani, Maryam Rafraf, et al. Effects of Vitamin E and Zinc Supplementation on Antioxidants in Beta thalassemia major[J]. *PatientsIran J Pediatr*, 2011, 21(1):8-14.
- [14] Kajanachumpol S, Tatu T, Sasanakul W, et al. Zinc and copper status of thalassemic children[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1997, 8(4):877-880.

肠道病毒71型感染相关遗传易感基因研究现状

黄明元¹ 林绮玲¹ 范颖¹ 曾今诚^{2*}

[摘要] 肠道病毒71型(EV71)是引起婴幼儿手足口病(HFMD)的最常见肠道病毒之一。EV71 侵染取决于病毒、宿主及环境的多重作用,特别是介导 EV71 病毒与宿主固有免疫及适应性免疫反应功能异常相关基因的多态性与 EV71 易感关系密切。在此过程中,越来越多白细胞介素类(IL-4, IL-8, IL-17F 和 IL-18)、趋化因子类(MCP-1, IP-10)及抗病毒蛋白类(OAS, HLA)相关基因被筛选发现与 EV71 易感及病程恶化密切相关。本文就近年来 EV71 感染相关遗传易感基因筛选研究状况作一综述。

[关键词] 肠道病毒71型;基因多态性;手足口病;白细胞介素;趋化因子;抗病毒蛋白

Research status of genetic susceptibility genes of Enterovirus 71 infection

HUANG Mingyuan¹, LIN Qiling¹, FAN Ying¹, ZENG Jincheng^{2*}

(1. Department of Sanitary Inspection, School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523808; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan Scientific Research Center, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523808)

[ABSTRACT] Enterovirus 71 (EV71) is one of the most common intestinal virus that causes hand, foot and mouth disease in infants. EV71 infection depends on multiple factors including virus, host and environment, especially the genes polymorphism mediated host innate immunity and adaptive immunity dysfunction to EV71 virus are closely associated with susceptibility to EV71. In this process, more and more interleukins genes (IL-4, IL-8, IL-17F and IL-18), chemokines (MCP-1, IP-10) and antiviral protein (OAS, HLA) related gene to be screened closely related to the susceptibility and deterioration of EV71 infection. Here, genetic susceptibility genes of Enterovirus 71 infection were reviewed.

[KEY WORDS] Enterovirus type 71; Genetic polymorphism; Hand, foot and mouth disease; Interleukin; Chemokines; Antiviral protein

肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)是引起婴幼儿手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的最常见、具嗜神经性肠道病毒之一。EV71 侵染取决于病毒、宿主及环境的多重作用,特别是介导 EV71 病毒逃逸宿主固有或适应性免疫反应监视相关基因的多态性与 EV71 易感关系

密切^[1]。在这个过程中桥梁机体固有免疫及适应性免疫反应的白细胞介素类,趋化因子类蛋白也就成为了筛选 EV71 感染相关遗传易感基因的靶点,如 *IL-17F* 和 *MCP-1* 基因可能是通过影响其基因表达并调节炎症反应,进而影响 EV71 感染的发生风险及严重程度。此外,基因多态性引起的抗

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81500007);广东医科大学大学生创新创业训练计划项目(XJ105711558, XJ105711559);广东医科大学大学生创新实验项目(2015ZYDG015, 2015ZZDG007)

作者单位:1. 广东医科大学公共卫生学院卫生检验教研室,广东,东莞 523808

2. 广东医科大学东莞科研中心,广东省医学分子诊断重点实验室,广东,东莞 523808

*通讯作者:曾今诚, E-mail: zengjc@gdmc.edu.cn

病毒蛋白类功能异常也成为EV71易感的重要因素,如 *HLA-G 14 bp-/-* 基因型使 HLA-G 的表达增多,使病毒逃避免疫监视,进而导致机体对EV71易感。因此,本文就EV71感染相关遗传易感基因研究进展作一综述。

1 白细胞介素类

1.1 *IL-4* 基因

人白细胞介素4(interleukin-4, *IL-4*)基因定位于染色体5q31,其蛋白作为Th2细胞分泌的主要细胞因子介导机体体液免疫反应。EV71感染患者体内Th2细胞比例和*IL-4*含量均增高,且两者均随着疾病的持续进展、高烧等显著增加^[2]。Zhang等^[3]也发现重组的EV71病毒VP1蛋白诱导高水平的Th2细胞反应。因此,*IL-4*可能是EV71感染患儿病情加重的一项重要指标。尤其是*IL-4*通过调节MHC II类抗原和FcR异常表达影响机体抗EV71感染过程。*IL-4*基因序列分析显示该基因存在多态性位点,特别是*IL-4*基因启动子区,如*IL-4-589 C/T*基因多态性位点。该位点与*IL-4*产生、活性及功能关系密切。研究发现*IL-4-589 CC*基因型、*IL-4-589 CT*基因型和*IL-4-589 C*等位基因与乙型肝炎病毒(hepatitis B viruses, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C viruses, HCV)易感有关^[4]。此外,*IL-4-33 TT*基因型与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)易感有关^[5],*IL-4-590 T*等位基因与呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)易感有关^[6]。最近Li等^[7]发现EV71感染重症HFMD患儿中,*IL-4-589 CC*基因型和*IL-4-589 CT*基因型患儿血清*IL-4*含量显著高于*IL-4-589 TT*基因型患儿,且*IL-4-589 C*等位基因与中国汉族儿童EV71病毒易感及疾病严重程度密切相关,这些研究说明*IL-4*基因多态性对*IL-4*介导的抗病毒感染过程尤为重要。因此,对EV71感染高发区儿童进行*IL-4*基因多态性筛查对预防地区EV71流行可能具有重要的价值。

1.2 *IL-8* 基因

人白细胞介素8(interleukin-8, *IL-8*)由定位于染色体4q13-21的*CXCL8*基因编码,其蛋白作为单核细胞、巨噬细胞、上皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和角化细胞主要分泌的趋化因子,在趋化靶细胞(如T细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞等)到

炎症位点,启动固有免疫细胞和适应性免疫细胞介导的机体抗微生物感染、抗肿瘤等方面具有重要作用。EV71感染可诱导人单核细胞衍生的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDMs)分泌*IL-8*。近年来,众多学者发现EV71感染引起的脑干脑炎患者血清、脑脊液*IL-8*含量显著增加且与重症患者中性粒细胞和单核细胞含量密切相关^[8-10],而Wang等^[11]也发现EV71感染HFMD患者血清*IL-8*含量显著增加且与疾病严重程度呈正相关,表明血清*IL-8*含量是重症EV71感染的危险因素,可作为EV71感染严重程度的辅助诊断指标。最近Li等^[12-13]发现携带*IL-8+781 C*基因汉族婴幼儿易发生EV71感染且易发展成重症患儿,而携带*IL-8-251 T*基因汉族EV71感染HFMD患儿发生脑炎的风险更大。研究还发现*IL-8-251 T*等位基因还与EV71感染HFMD患儿性别、年龄、发烧天数、白细胞含量、CRP和BG浓度、*IL-8*含量密切相关^[14]。此外,*IL-8-251 T*基因型还与汉族幽门螺杆菌相关胃癌、消化性溃疡、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)易感有关^[15-17]。因此,对EV71感染患儿进行*IL-8*基因多态性筛选,尤其对携带*IL-8-251 T*基因型患儿提前进行治疗干预,可能在控制患儿发展成为重症患儿中具有重要的价值。

1.3 *IL-17F* 基因

*IL-17F*基因定位于染色体6p12,其蛋白主要由CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞、LTi-like细胞和上皮细胞分泌产生,在组织炎症部位诱导释放促炎细胞因子和趋化因子中发挥着重要作用。已报道*IL-17F*基因多态性与多种感染性疾病易感相关。*IL-17F-7488 C*和*IL-17G-152A*基因型均与结核易感相关^[18-19]。*IL-17A rs4711998*遗传性变异与HBV相关的肝硬化易感相关^[20]。*IL-17F*在抗EV71感染中起至关重要的作用。研究发现*IL-17F-7488 C*基因型与EV71感染HFMD患者脑炎低发生风险有关,且携带*IL-17F-7488 TT*基因型EV71感染HFMD患者CRP、血细胞含量、中性粒细胞含量均高于*IL-17F-7488 CC+CT*基因型EV71脑炎患者^[21],提示*IL-17F-7488 T*基因可导致严重的组织炎症反应介导患儿病情加重。然而,*IL-17F 7488 G*基因型与中国汉族人群EV71易感及肺炎易感无关,但与突尼斯人肺炎易感密切相关^[22]。因此,携带*IL-17F-7488 TT*

基因型可作为警惕患儿并发脑炎的一项重要指标。

1.4 *IL-18* 基因

IL-18 基因定位于染色体 11q22.2-22.3, 其蛋白作为一种重要的促炎症细胞因子, 能激活单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和内皮细胞, 在自身免疫性疾病及感染性疾病中发挥重要作用。EV71 感染患者血清中 *IL-18* 含量明显高于正常个体^[23], *IL-18-607 C/A* 和 *IL-18-137 G/C* 基因多态性可能与 *IL-18* 的低表达有关^[24]。研究发现 *IL-18-607 AA* 基因型、*IL-18-607A* 等位基因携带儿童更易感染 EV71, 且 *IL-18-607 AA* 基因型 HFMD 患儿更易并发脑炎^[25], 提示 *IL-18* 基因多态性也与 EV71 感染患儿发展成为重症患儿有关。*IL-18-607* 位点 C 变为 A, 阻断了 cAMP 应答元件结合蛋白的结合位点, 继而抑制其调控的基因转录, 影响 *IL-18* 基因表达水平, *IL-18* 基因多态性可能由此参与 EV71 感染的发生发展。

2 抗病毒蛋白类

2.1 *OAS* 基因

2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(2'-5' Oligoadenylates Synthetase, *OAS*)是干扰素(interferon, IFN)诱导产生的抗病毒蛋白, 主要由定位于染色体 12q24 的 *OAS1*、*OAS2* 和 *OAS3* 基因编码。*OAS* 参与机体非特异性免疫和特异性免疫, 在机体的抗病毒、信号转导等过程中起重要作用。研究发现 *OAS1* rs10774671 位点 GG 基因型个体易患 CA16 型 HFMD, 且其 IFN- γ 表达水平较高, 而 AA+AG 基因型 HFMD 患儿易发生脑炎^[26]; *OAS2* rs1293762 位点 G/G 基因型和 G 等位基因与俄罗斯人慢性丙型肝炎(hepatitis C, HC)患者密切相关, 而 T/T 基因型和 T 等位基因与重症森林脑炎(tick-borne encephalitis, TBE)易感有关^[27]。胡聪慧等^[28]采用 PCR-SSP 技术发现 *OAS1* rs1131476(G/A)位点基因型 AA 和等位基因 A 汉族人群携带者在 EV71 感染中易发展为重症。*OAS1* 基因多态性可能通过影响 *OAS1* 的活性, 继而影响其对 EV71 病毒蛋白合成的抑制效果, 从而引起 EV71 感染的发生发展。

2.2 *HLA* 基因

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, *HLA*)基因定位于染色体 6p21.31, 含一系列紧密连

锁的基因座, 其蛋白作为人类的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)与人类免疫系统功能密切相关。*HLA-A33* 基因型常见于亚洲人群, 而在白种人中少见。早期研究发现 *HLA-A33* 基因型与 EV71 易感关系密切, 而 *HLA-A2* 基因型患儿易发生心肺衰竭^[29]。人类白细胞抗原 G(Human leukocyte antigen G, *HLA-G*) 14 bp 插入/缺失多态性是位于 *HLA-G* 的第 3 742 bp 处存在一个长度为 14 bp 的插入或缺失。研究发现 EV71 感染患儿 *HLA-G 14 bp-/-* 基因型及其血浆 s*HLA-G* 水平显著高于正常个体, 且 *HLA-G 14 bp-/-* 基因型与 EV71 易感密切相关^[30], 提示 *HLA-G* 参与了 EV71 感染的发生发展过程, 但 *HLA* 基因多态性在 EV71 感染中的诊疗价值还有待进一步评估。

3 趋化因子类

单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, *MCP-1*)基因位于染色体 17q11.2-12, 其编码的蛋白也称趋化因子配体 2[(chemokine(C-C motif) ligand 2, *CCL2*)], 属于炎症趋化因子 CC 亚族成员, 能趋化 T 淋巴细胞、单核细胞, 诱导内皮细胞、单核细胞释放黏附因子, 使单核/巨噬细胞向病变处聚集, 在炎症反应、血管再生及损伤修复、肿瘤发生发展等方面发挥重要作用。研究发现 *CCL2-2510 G* 基因型与 EV71 型脑炎易感有关^[31], 而 *CCL2-2518 A/G* 基因型和 *CXCL10-201 A/G* 基因型均与 EV71 易感程度及疾病恶化程度相关^[32]。此外, 携带趋化因子 IP-10(inducible protein 10, *IP-10*)基因 1596 C/T 位点 A 等位基因和黏病毒抗性蛋白 A(myxovirus resistance protein A, *MxA*)基因启动子 C-123 A 及 G-88 T 等位基因中国汉族儿童, 感染 EV71 的可能性均较低^[33-34]。

除以上研究外, 近年来研究者还发现内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, *eNOS*) G894T 位点 T 基因携带者与中国汉族人群 EV71 易感有关^[28]。黑色素瘤分化相关基因 5(melanoma differentiation-associated gene 5, *MDA5*) 基因 rs1990760 位点多态性与中国汉族人群重症 EV71 感染有关^[35]。Toll 样受体 7(toll-like Receptor 7, *TLR7*) 3 号外显子 371T>A 位点突变可能为中国汉族人群 EV71 易感基因, 尤其是男性患儿^[36]。然而, 这些基因在 EV71 易感中的地位还有待评估。

4 小结

随着国际人类基因组计划和单体型图谱计划的完成,遗传易感基因研究已成为当前功能基因组学的研究热点和焦点。对疾病易感基因的筛选在指导疾病的预警、预防和治疗等方面具有重要意义。近年来,对EV71感染相关遗传易感基因的研究越来越多,可知人们已经认识到基因多态性在EV71感染发生、发展中的重要作用,尤其是各种与EV71易感相关基因多态性研究及与疾病病程发展相互间的联合分析将会是今后针对EV71感染精准医疗的研究重点。文中,我们通过综述近年来筛选得到的EV71感染相关遗传易感基因发现白细胞介素类(*IL-4*, *IL-8*, *IL-17F*和*IL-18*)、趋化因子类(*MCP-1*, *IP-10*)及抗病毒蛋白类(*OAS*, *HLA*)相关基因与EV71易感密切相关,因此,对EV71易感区进行这些基因的基因多态性分析,对早期预防儿童感染,降低地区EV71感染率具有重要价值。此外,对重度EV71感染易感基因进行筛选也有可能对EV71感染患儿早期预防及治疗中具有重要意义。然而,目前这些EV71感染相关遗传易感基因的研究还处于初级阶段,其临床应用价值还有待进一步深入,尤其是这些EV71感染相关遗传易感基因在同一群体中的发生率如何?不同遗传易感基因之间是否存在某种联系?还有待进一步研究,此外,已有的研究还需要继续增加样本量,仍需在不同区域的人群中进行研究,从而使EV71感染相关遗传易感基因的研究更加深入,为揭示宿主基因多态性在疾病发生、发展中的重要作用提供依据。

参考文献

- [1] Pathinayake PS, Hsu AC, Wark PA. Innate Immunity and Immune Evasion by Enterovirus 71 [J]. *Viruses*, 2015, 7(12):6613-6630.
- [2] Li F, Liu XP, Li JA, et al. Correlation of an interleukin-4 gene polymorphism with susceptibility to severe enterovirus 71 infection in Chinese children [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(4):1035-1042.
- [3] Zhang F, Hao C, Zhang S, et al. Oral immunization with recombinant enterovirus 71 VPI formulated with chitosan protects mice against lethal challenge [J]. *Virology*, 2014, 11:80.
- [4] Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(44):5610-5619.
- [5] Chaudhari DV, Chavan VR, Kerkar SC, et al. Polymorphisms in major cytokine genes: a study among human immunodeficiency Virus-1 serodiscordant couples in Mumbai, India [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2013, 31(2):166-172.
- [6] Hoebee B, Rietveld E, Bont L, et al. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms [J]. *J Infect Dis*, 2003, 187(1):2-11.
- [7] Li F, Liu XP, Li JA, et al. Correlation of an interleukin-4 gene polymorphism with susceptibility to severe enterovirus 71 infection in Chinese children [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(4):1035-1042.
- [8] Wang SM, Lei HY, Yu CK, et al. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis [J]. *J Infect Dis*, 2008, 198(7):1002-1006.
- [9] Zhang Y, Liu H, Wang L, et al. Comparative study of the cytokine/chemokine response in children with differing disease severity in enterovirus 71-induced hand, foot, and mouth disease [J]. *Plos One*, 2013, 8(6):e67430.
- [10] Ye N, Gong X, Pang LL, et al. Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15:225.
- [11] Wang W, Li W, Yang X, et al. Interleukin-8 is elevated in severe hand, foot, and mouth disease [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2014, 8(1):94-100.
- [12] Li JA, Chen ZB, Lv TG, et al. Genetic polymorphism of CCL2-2518, CXCL10-201, IL8+781 and susceptibility to severity of Enterovirus-71 infection in a Chinese population [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(7):549-556.
- [13] Li J, Lin A, Yu C, et al. Association of Enterovirus 71 encephalitis with the interleukin-8 gene region in Chinese children [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2015, 47(6):418-422.
- [14] Xu D, Li J, Huang X, et al. Impact of IL-8-251A/T gene polymorphism on severity of disease caused by enterovirus 71 infection [J]. *Arch Virol*, 2015. Epub ahead of print.
- [15] Wang YM, Li ZX, Tang FB, et al. Association of genetic polymorphisms of interleukins with gastric cancer

- and precancerous gastric lesions in a high-risk Chinese population [J]. *Tumour Biol*, 2015. Epub ahead of print.
- [16] Yin YW, Hu AM, Sun QQ, et al. Association between interleukin-8 gene-251 T/A polymorphism and the risk of peptic ulcer disease: a meta-analysis [J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(1):125-130.
- [17] Lu A, Wang L, Zhang X. Haplotype of IL-8 -251T and 781C is associated with the susceptibility to respiratory syncytial virus [J]. *J Trop Pediatr*, 2010, 56(4):242-246.
- [18] Peng R, Yue J, Han M, et al. The IL-17F sequence variant is associated with susceptibility to tuberculosis [J]. *Gene*, 2013, 515(1):229-232.
- [19] Ocejo-Vinyals JG, de Mateo EP, Hoz MÁ, et al. The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain [J]. *Cytokine*, 2013, 64(1):58-61.
- [20] Wang J, Liu Y, Xie L, et al. Association of IL-17A and IL-17F gene polymorphisms with chronic hepatitis B and hepatitis B virus-related liver cirrhosis in a Chinese population: A case-control study [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015. Epub ahead of print.
- [21] Lv T, Li J, Han Z, et al. Association of interleukin-17F gene polymorphism with enterovirus 71 encephalitis in patients with hand, foot, and mouth disease [J]. *Inflammation*, 2013, 36(4):977-981.
- [22] Kaabachi W, ben Amor A, Kaabachi S, et al. Interleukin-17A and -17F genes polymorphisms in lung cancer [J]. *Cytokine*, 2014, 66(1):23-29.
- [23] Cao HZ, Wang HL, Zhao XM, et al. Significance of change of serum interleukin-18 in children with severe enterovirus 71 infection [J]. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2012, 25:1401-1403.
- [24] Wang SM, Ho TS, Lin HC, et al. Reemerging of enterovirus 71 in Taiwan: the age impact on disease severity [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(6):1219-1224.
- [25] Han WP, Chen ZB, Han ZL, et al. Association of interleukin-18 gene promoter polymorphism with the susceptibility to enterovirus 71 infection in children [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(13):2445-2449.
- [26] Cai Y, Chen Q, Zhou W, et al. Association analysis of polymorphisms in OAS1 with susceptibility and severity of hand, foot and mouth disease [J]. *Int J Immunogenet*, 2014, 41(5):384-392.
- [27] Barkhash AV, Kochneva GV, Chub EV, et al. Association between polymorphisms in OAS2 and CD209 genes and predisposition to chronic hepatitis C in Russian population [J]. *Microbes Infect*, 2014, 16(5):445-449.
- [28] 胡聪慧, 陈宗波, 韩振靓, 等. OAS 基因多态性与肠道病毒 71 感染易感性关系 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2014, 6:484-486.
- [29] Chang LY, Chang IS, Chen WJ, et al. HLA-A33 is associated with susceptibility to enterovirus 71 infection [J]. *Pediatrics*, 2008, 122(6):1271-1276.
- [30] 陈晓晴, 王慧燕, 高艳, 等. HLA-G 14bp 基因多态性及血浆 sHLA-G 水平与儿童 EV71 感染的关系研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2012, 26(6):429-431.
- [31] Han ZL, Li JA, Chen ZB. Genetic polymorphism of CCL2-2510 and susceptibility to enterovirus 71 encephalitis in a Chinese population [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(9):2503-2507.
- [32] Li JA, Chen ZB, Lv TG, et al. Genetic polymorphism of CCL2-2518, CXCL10-201, IL8+781 and susceptibility to severity of Enterovirus-71 infection in a Chinese population [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(7):549-556.
- [33] Yang J, Chen ZZ, Lv TG, et al. Association of IP-10 gene polymorphism with susceptibility to Enterovirus 71 infection [J]. *Biomedical Reports*, 2013, 1(3):410-412.
- [34] Zhang XA, Xu HM, Chen XD, et al. Association of functional polymorphisms in the MxA gene with susceptibility to enterovirus 71 infection [J]. *Hum Genet*, 2014, 133(2):187-197.
- [35] Pang L, Gong X, Liu N, et al. A polymorphism in melanoma differentiation-associated gene 5 may be a risk factor for enterovirus 71 infection [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(10):711-717.
- [36] 陈敏. EV71 感染患儿 TLR7 基因多态性及抗病毒免疫研究 [D]. 遵义:遵义医学院, 2014.

耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展

何宇婷 黄彬*

[摘要] 碳青霉烯类抗生素是治疗铜绿假单胞菌感染的有效药物,但随着此类抗生素的广泛应用,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率呈上升趋势。本文从药物的主动转运系统、抗菌药物渗透障碍、产生药物灭活酶及形成生物被膜这4个方面对耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进行综述,为临床合理应用抗生素和进行感染防控提供理论依据。

[关键词] 铜绿假单胞菌;碳青霉烯类抗生素;耐药机制;耐药基因

Genetic research progress of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

HE Yuting, HUANG Bin*

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

[ABSTRACT] Carbapenems are useful drugs for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection, but, with the wide use of these antibiotics, carbapenem-resistance is increasing in *Pseudomonas aeruginosa*. This review summarizes the advances in genetic research into the carbapenem-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* with respect to the active transport system, antibacterial drug permeation barrier, producing drugs to inactivate enzymes and biofilm formation. The presented study provides a theoretical basis for the clinical rational use of antibiotics and prevention and control of infection.

[KEY WORDS] *Pseudomonas aeruginosa*; Carbapenems; Resistance mechanism; Resistance genes

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是假单胞菌属的代表菌种,广泛分布于自然界、土壤、水和空气中,在人体皮肤、肠道和呼吸道均存在。铜绿假单胞菌为条件致病菌,是医院感染的主要病原菌之一^[1-2]。近年来,社区感染的多重耐药铜绿假单胞菌不断增多,也引起了人们的关注^[3]。美国国家医院感染监测系统的报告指出,铜绿假单胞菌在所有院内感染致病菌中检出率居第5位,在革兰阴性细菌中检出率居第2位^[4]。近年来,铜绿假单胞菌对临床多种常用抗生素呈现明显的多重耐药甚至泛耐药,一旦感染,临床治疗十分棘手。

碳青霉烯类抗生素是抗菌谱广、抗菌活性强

的非典型 β -内酰胺抗生素,主要包括亚胺培南、美罗培南和比阿培南等。目前,碳青霉烯类抗生素已成为临床治疗严重感染类疾病的一线药物,特别是治疗产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)和头孢菌素酶的多重耐药菌引起的感染^[5-6]。临床上,碳青霉烯类抗生素是治疗铜绿假单胞菌感染的有效药物,但随着此类抗生素的广泛应用,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率有上升趋势。充分认识耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制,有助于临床研发更有效的抗感染药物以及采取防止其耐药性产生的一系列措施。本文从药物的主动转运系统、抗菌药物渗透障碍、产生药物灭活酶及形成生物被膜

基金项目:国家自然科学基金(81572058);广东省自然科学基金(2014A030313143);第49批留学回国人员科研启动基金
作者单位:中山大学附属第一医院检验医学部,广东,广州 510080

*通讯作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

这4个方面对耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展综述如下。

1 药物的主动转运系统

主动转运(active drug efflux)又称外排泵系统(efflux pump system),是造成细菌耐药的重要机制之一。根据细菌药物主动转运系统的超分子结构、机制和顺序的同源性等将其分为四类:第一类为主要易化(major facilitator, MF)家族;第二类为耐药小节分裂(resistance - nodulation - division, RND)家族;第三类为链霉素耐药或葡萄球菌多重耐药家族,是由四种跨膜螺旋组成的小转运器;第四类为ABC(ATP-binding cassette, ABC)转运器。外排泵的作用底物广泛,底物多样,是其对多种抗生素产生固有或获得性耐药的重要原因^[9],可引起细菌同时对多种抗生素耐药,在多种临床分离株中,可能会出现多种外排泵同时高表达的现象^[7-8]。

目前在铜绿假单胞菌中已报道 MexAB-OprM、MexGHI-OprD、MexVW-OprM、MexPQ-OprE 和 MexMN-OprM 等9种外排泵系统^[10]。MexAB-OprM 主动外排系统中的 MexA、MexB 和 OprM 蛋白由 *MexO* 编码,并且 *MexO* 基因可受到 *mexR*、*nalC* 和 *nalD* 的负向调节作用。有学者用琼脂稀释法测定亚胺培南和美罗培南对75株铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度^[11],联合外排泵抑制剂 MC207110 进行外排泵表型的筛选,用 PCR 扩增 MexAB-OprM 相对高表达的铜绿假单胞菌外排泵调节基因 *mexR*、*nalC* 和 *nalD*,对扩增产物进行双向测序,并对结果进行 BLAST 比对分析,发现75株铜绿假单胞菌中外排泵表型阳性菌13株,其中10株菌的 MexAB-OprM 相对表达量增高,高表达 MexAB-OprM 菌株的调节基因 *mexR*、*nalC* 及 *nalD* 均阳性。其中9株菌 *nalC* 均发生第71位氨基酸突变(甘氨酸→谷氨酸)、8株菌同时还有第209位氨基酸突变(丝氨酸→精氨酸),仅发现1株菌 *nalD* 第158位氨基酸突变(苏氨酸→异亮氨酸),8株菌 *mexR* 发生突变,表明 *mexR*、*nalC* 和 *nalD* 对 *MexO* 的负向调节作用由于其突变而减弱, MexAB-OprM 的高表达与其调节基因 *mexR*、*nalC*、*nalD* 的突变相关。Aghazadeh 等^[12]在研究耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 和 MexXY-OprA 的基因表达中发现,在囊性纤维化患者中,铜绿假单胞菌 *mexX* 和 *mexA* 过表达是其耐碳青霉烯类抗

生素的主要原因,并且在烧伤患者中,铜绿假单胞菌 *mexA* 基因的过表达也与其耐碳青霉烯类抗生素有关。Zeng 等^[13]对29株临床分离的铜绿假单胞菌进行 RT-PCR 分析发现, MexXY-OprM 与 MexAB-OprM 的过表达与 *OprD* 基因的缺失在铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素中发挥了重要作用。Liu 等^[14]在研究医院感染的铜绿假单胞菌时发现, *mexB* 或者 *mexY* 高表达联合 *OprD* 基因 L710 的改变与美罗培南的耐药密切相关。Aghazadeh 等^[12]发现,在对美罗培南耐药的菌株和对亚胺培南耐药而美罗培南敏感的菌株中均存在 *mexA* 和 *mexX* 高表达的现象,导致 MexAB-OprM 过表达而产生耐药性。因此,铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的原因与 *mexA* 或 *mexX* 高表达有关,从而导致相应的外排泵系统如 MexAB-OprM 高表达,对药物的外排作用增强而产生耐药。同时,外排泵系统调节基因突变可能与铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素有关。

2 抗菌药物渗透障碍

细菌细胞膜是一种具有高度选择性的渗透性屏障,控制着细胞内、外的物质交流,大多数膜的渗透性屏障具有脂质双层结构,允许亲脂性药物通过。在铜绿假单胞菌的脂双层中镶嵌有通道蛋白,是一种非特异性的、跨越细胞膜的水溶性扩散通道,其中,外膜蛋白 OprC、OprD2 及 OprE 均具有孔道活性^[15]。OprD 是在突变前和突变后被调节的蛋白质,其可调节性和突变的特性是铜绿假单胞菌耐药的重要机制^[16]。Wolter 等^[17]采用 RT-PCR 在启动子上游和结构基因下游对铜绿假单胞菌临床分离株的 *oprD* 基因进行扩增和测序,并与野生型 PAO1 菌株的 *oprD* 基因比较后发现,临床分离株 *oprD* 基因下调与某些片段的插入有关。

Ruiz - Martinez 等^[18]在研究临床分离株 PA110514 与 PA116136 时,发现一段新的插入序列 *ISPa133*,并且随着插入序列 *ISPa133* 在染色体上位置的变化,其对 OprD 孔蛋白的表达有不同的影响。在 PA110514 株, *ISPa133* 位于翻译起始密码上游56个核苷酸处,这对 OprD 孔蛋白的表达没有影响,而在 PA116136 株, *ISPa133* 位于696个核苷酸前并且有效地替代了它,这导致 OprD 孔蛋白前232个氨基酸的移除,从而使 OprD 孔蛋白表达

下调,导致 PA116136 对亚胺培南产生耐药。*ISPa133* 的插入为移动性的,它取决于亚胺培南所带来的选择性压力的程度。

有研究发现,*oprD2* 基因缺失铜绿假单胞菌对亚胺培南产生低水平耐药^[19],但如果伴有其他耐药机制时,可对亚胺培南产生高度耐药。Vila 等^[20]认为,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药一方面是由于 *oprD* 基因的缺失,另一方面是由于金属酶 B 类或 D 类基因的获得。Arabestani 等^[21]报道,铜绿假单胞菌在 *oprD* 基因高表达下也会出现对亚胺培南和美罗培南耐药,表明耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌可能存在其他耐药机制,如外排泵高表达和产 AmpC。Castanheira 等^[22]研究欧洲地区与地中海地区铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制,对相关基因进行 PCR 分析发现,*OprD* 基因的下调或缺失是铜绿假单胞菌耐药的主要内在机制(占 94.9%),AmpC 表达与 Mex-AB-OprM 功能亢进也是其部分耐药机制,分别占耐药机制的 44.4%与 20.1%。因此,铜绿假单胞菌 *oprD* 基因中一段新序列的插入或某一片段的缺失都是其对碳青霉烯类抗生素耐药的重要机制,同时可能伴有其他耐药机制的共同产生,如金属酶基因的获得或外排泵调节基因的突变等其他机制,多种机制的共同作用导致产生高水平的耐药性。

3 产生药物灭活酶

细菌产生水解酶(主要指 β -内酰胺酶)引起药物灭活是一种重要的耐药机制,水解酶包括超广谱酶 β -内酰胺酶、金属酶和 AmpC 酶等。铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的药物灭活酶主要是碳青霉烯酶,主要分布在 β -内酰胺酶 A、B、D 类中。根据其水解机制中作用位点的不同,可将碳青霉烯酶分为两大类,一类称为金属碳青霉烯酶,另一类以丝氨酸为酶的作用位点。在世界范围内不断报道产金属酶(Metallo- β -Lactamases, MBLs)的铜绿假单胞菌,尤以近十年来为甚^[23]。目前在铜绿假单胞菌株中主要发现 4 种 MBLs,分别是 IMP、VIM、SPM 和 GIM,其中 VIM-2 型占主导地位^[24]。

刘双全等^[25]对临床分离的 690 株铜绿假单胞菌进行回顾性分析,采用 PCR 法检测 8 种 β -内酰胺酶基因的分布情况,结果显示,IMP 阳性 25 株, VIM 阳性 17 株,IMP 和 VIM 均阳性 7 株, OXA 阳性

3 株,其它 β -内酰胺酶耐药基因(*SPM*, *TEM*, *PER*, *GES*, *SHV*)均阴性,提示铜绿假单胞对碳青霉烯类抗生素耐药可能主要与 β -内酰胺酶基因 *IMP* 和 *VIM* 有关。Rizek 等^[26]研究铜绿假单胞菌碳青霉烯酶基因表达,采用 PCR 对临床分离株 *IMP*、*SPM*、*VIM*、*SIM*、*NDM*、*KPC* 与 *GES* 进行检测并测序发现, *SPM* 阳性率最高(32%),其次是 *KPC* (7.8%)和 *VIM*(3.9%),它们都属于 *SPM-1* 与 *VIM-2*,并且同一个分离株可同时携带 *SPM-1*、*VIM-2* 和 *KPC-2* 这三种耐药基因。Liu 等^[27]通过研究临床各类标本中耐碳青霉烯铜绿假单胞菌株,发现其耐药机制主要是由 *VIM-2* 型 MBL 介导,其次是 *KPC-2* 型;同时 Liu 等^[27]应用肠杆菌基因重复序列 PCR 技术,将大肠埃希菌分为 6 种基因型,其中在临床耐药株中 A 型最为流行;在观察的实验株中出现了耐碳青霉烯基因与质粒介导的喹诺酮类耐药基因(Plasmid mediated quinolone resistant, PMQR)*acc* (6')-*Ib-cr* 和 *qnr* 共携带的现象,这可能与细菌的多重耐药有关。在某些耐碳青霉烯类抗生素的铜绿假单胞菌临床分离株中还可以检测到新德里金属- β -内酰胺酶 1(NDM-1),但 NDM-1 并不是铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的主要机制^[28]。

MBLs 编码基因位于可移动的质粒或 I 类整合子上,整合子具有可识别、捕获外源基因并使之转变为功能性基因的基因重组系统的作用,从而使被捕获的外源基因通过质粒或转座子在细菌间、甚至不同种属细菌间水平传播^[29]。I 类整合子在临床分离的 VIM-2 铜绿假单胞菌中约占 40%,有利于 MBLs 基因转移,表明在 MBLs 耐药基因的水平转移中整合子发挥了一定的作用^[30]。因此,在铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的机制中,主要是携带 VIM-2 型金属酶基因,并且可能出现多种金属酶基因共同表达的情况。在耐药性的获得过程中,整合子起了一定的作用。

4 形成生物被膜

形成生物被膜是造成细菌对抗菌药物耐药的重要原因,其通过阻止和抑制白细胞、抗菌药物等进入生物膜中杀灭细菌从而使得细菌产生耐药性。在铜绿假单胞菌中,生物被膜的形成与 *SagS* 和 *BrlR* 基因的调节作用有关。*BrlR* 是 *MerR* 家族中多药物外排泵的激活因子,并且 *BrlR* 基因的高

表达可以增强铜绿假单胞菌对某些药物的耐药性, *BrlR* 基因的失活会降低生物被膜的保护作用与细菌的运动能力,同时下调 *pslA* 基因的表达,上调 *ndvB* 基因的表达^[31]。Gupta 等^[32]发现 *SagS* 基因通过上调 c-di-GMP 的表达水平,可增强铜绿假单胞菌生物被膜对药物的抵抗性。Oglesby-Sherrouse 等^[33]发现,铜绿假单胞菌周围环境中的离子浓度可以通过不同的机制影响细菌生物被膜的形成,高离子浓度可促进生物被膜的形成,从而促使细菌对不同的药物产生耐药性,不同的离子可以影响其耐药的类型。Marguerettaz 等^[34]在囊性纤维化患者中发现,高 Zn^{2+} 离子浓度可通过独立的 CzcRS 机制刺激铜绿假单胞菌生物被膜形成,包裹在生物被膜中的铜绿假单胞菌表现出对碳青霉烯类药物的高度耐药性。同时,他们证实了 Zn 离子敏感的调节通路,其可调节 *OprD* 基因的表达和改变碳青霉烯类药物的耐药形式。

群体感应(quorum sensing, QS)是细菌细胞间信息传递的普遍机制,细菌通过合成、分泌信号分子(又称自诱导分子)来控制整个细菌群体的行为,当信号分子浓度随着细菌群体密度达到一定阈值时,即可启动某些特定基因的表达,以调节细菌群体适应功能^[35]。铜绿假单胞菌具有群体感应系统的典型特征,主要有 Las 群体感应系统, Las 系统由 *LasR* 和 *LasI* 基因组成, Las 系统与铜绿假单胞菌的感染有关,并且可以增加其对某些抗生素的耐药性,如亚胺培南和环丙沙星等^[36]。在铜绿假单胞菌中,3-oxo-C12-HSL 是群体感应中的重要信号分子, *pvdQ* 基因可通过编码酰基转移酶并将其水解来影响铜绿假单胞菌的群体感应。此外, Wang 等^[37]在研究铜绿假单胞菌的群集效应时,通过构建 PAO1pMEpvdQ 发现,在群集效应中起重要作用的 *pvdQ* 基因通过调节细胞的分化来降低铜绿假单胞菌生物膜的通透性,使其对多种抗生素的耐药性增加,包括碳青霉烯类和喹诺酮类等多种抗生素。

5 小结

耐碳青霉烯铜绿假单胞菌的耐药机制极为复杂,耐药相关基因繁多,不同的耐药基因通过不同的机制从调节药物的主动转运系统、抗菌药物渗透障碍、产生药物灭活酶及形成生物被膜这4个方面调控铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的耐药

性,并且,耐药性的产生往往不是由单一因素造成的,常常是几种机制协同作用的结果。

对耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性进行基因学研究,首先可以在分子生物学层面上为临床诊断细菌耐药提供新的方法,并且为抗菌耐药提供新的作用靶点;其次,有助于临床研发更有效的治疗铜绿假单胞菌感染的抗菌药物以及采取防止其耐药性产生的一系列措施。随着对铜绿假单胞菌认识的不断深入,新的耐药机制及其相关的耐药基因可能会被不断发现,耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究有待进一步探索。

参考文献

- [1] 辛续丽, 杨朵, 王松雪, 等. 铜绿假单胞菌院内感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(1):99-101.
- [2] 沈继录, 方亚平, 徐元宏, 等. 铜绿假单胞菌在碳青霉烯类治疗过程中由敏感株发展为耐药株的机制研究[J]. 安徽医学, 2011, 32(5):624-629.
- [3] Hamouche E, Sarkis DK. Evolution of susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, in a University Hospital Center of Beirut between 2005 and 2009 [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2012, 60(3):e15-e20.
- [4] Martone WJ, Gaynes RP, Horan TC, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) semiannual report, May 1995. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System [J]. *Am J Infect Control*, 1995, 23(6):377-385.
- [5] 曾伟勇. 碳青霉烯类抗生素的药理作用及临床实施效果探析[J]. 北方药学, 2015, 12(8):133.
- [6] 贾天野, 汤一苇, 孙强正, 等. 碳青霉烯类抗生素耐药菌的治疗选择[J]. 传染病信息, 2014, 27(5):315-318.
- [7] Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2):337-418.
- [8] Hricova K, Kolar M. Bacterial efflux pumps - their role in antibiotic resistance and potential inhibitors [J]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 2014, 20(4):116-120.
- [9] Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi MR, et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical

- samples using qRT-PCR [J]. Arch Iran Med, 2015, 18(2):102-108.
- [10] Mima T, Sekiya H, Mizushima T, et al. Gene cloning and properties of the RND - type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(11):999-1002.
- [11] 魏光, 叶英, 郑美娟, 等. 碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌外排泵 Mex AB-OprM 的研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(3):193-198.
- [12] Aghazadeh M, Hojabri Z, Mahdian R, et al. Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY (-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients [J]. Infect Genet Evol, 2014, 24:187-192.
- [13] Zeng ZR, Wang WP, Huang M, et al. Mechanisms of carbapenem resistance in cephalosporin - susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in China [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(3):268-270.
- [14] Liu Y, Li XY, Wan LG, et al. Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem resistance among extended - spectrum beta - lactamase - producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Chinese university hospital [J]. Microb Drug Resist, 2013, 19(6):463-468.
- [15] 沈继录, 朱德妹, 吴卫红, 等. 碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌外膜孔蛋白 OprD-2 的研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(4):281-286.
- [16] Shu JC, Su LH, Chiu CH, et al. Reduced production of OprM may promote oprD mutations and lead to imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* carrying an oprD - group 1A allele [J]. Microb Drug Resist, 2015, 21(2):149-157.
- [17] Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 236(1):137-143.
- [18] Ruiz-Martinez L, Lopez-Jimenez L, D'Ostuni V, et al. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Int Microbiol, 2011, 14(1):51-58.
- [19] Li H, Luo YF, Williams BJ, et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies [J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(2):63-68.
- [20] Vila J, Marco F. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010, 28(10):726-736.
- [21] Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi MR, et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR [J]. Arch Iran Med, 2015, 18(2):102-108.
- [22] Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem - non - susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(7):1804-1814.
- [23] Pereira SG, Reis T, Mendez IP, et al. Prevalence and molecular epidemiology of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo - beta - lactamases from two central hospitals in Portugal [J]. Microb Drug Resist, 2013, 19(5):392-396.
- [24] Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update [J]. Curr Opin Infect Dis, 2008, 21(4):367-371.
- [25] 刘双全, 宁建国, 王秋平, 等. β -内酰胺酶基因与铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物的关系研究 [J]. 实用预防医学, 2015, 22(1):100-103.
- [26] Rizek C, Fu L, Dos SL, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2014, 13:43.
- [27] Liu Y, Deng Q, Yu Y, et al. Analysis of the resistance mechanism and homology of carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2014, 30(1):15-20.
- [28] Shanthi M, Sekar U, Kamalanathan A, et al. Detection of New Delhi metallo beta lactamase-1 (NDM-1) carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* in a single centre in southern India [J]. Indian J Med Res, 2014, 140(4):546-550.
- [29] 冯春颜, 胡琴. 铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶编码基因的研究 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(8):1510-1511.
- [30] Toval F, Guzman-Marte A, Madriz V, et al. Predominance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying blaIMP and blaVIM metallo-beta-lactamases in a major hospital in Costa Rica [J]. J Med Microbiol, 2015, 64(Pt1):37-43.

(下转第 214 页)

Th17细胞在儿童肺炎中的研究进展

沈茹^{1*} 李艳君² 林丽佳³

【摘要】 辅助性T细胞家族新成员Th17细胞亚群及其主要效应因子IL-17在机体炎症反应机制中发挥重要功能,研究其在儿童肺炎中的作用及机制,对儿童肺炎的临床防治具有重大潜在意义。本文对Th17细胞在儿童肺炎中的研究进展进行简要综述,以期加深对Th17细胞在儿童肺炎所起作用及机制的了解,为进一步深入研究拓展视野和思路。

【关键词】 Th17细胞; 儿童肺炎; IL-17

Research progress of Th17 cells in children pneumonia

SHEN Ru^{1*}, LI Yanjun², LIN Lijia³

(1. Clinical laboratory of Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650228; 2. The Center of Prevention and Control Disease in Kunming, Kunming, Yunnan, China, 650011; 3. Division of science and education inn Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650228)

【ABSTRACT】 Th17 cells is the new subgroup of the helper T cells, Th17 cells and its main effect factors IL - 17 play an important function in the body's inflammatory response mechanism. Studying its role and mechanism in pediatric pneumonia provides potential for clinical prevention and treatment. We reviewed the literatures about the research progress of Th17 cells in pediatric pneumonia, in order to deepen the understanding of its role and mechanism, to further expand the research vision and ideas.

【KEY WORDS】 Th17 cells; children pneumonia; IL-17

儿童肺炎(childhood pneumonia)是儿童幼年时期尤其是婴幼儿时期常见和多发性呼吸道疾病,四季均易发生,尤常见于冬春寒冷季节及气候骤变时。新近研究调查表明,全球范围内每年因肺炎而导致夭折的儿童多达200万,占全球范围内5岁以下儿童死亡比例的28%~34%,也是造成国内5岁以下幼童死亡的主因,居威胁我国儿童健康及生命常见四大疾病首位(肺炎,腹泻,贫血,佝偻病)^[1]。近年来,在儿童肺炎病发及抵御机制的研究中,辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)的研究是一新热点。Th17细胞是一个以产生白介素17(interleukin 17, IL-17)为特征的新的

辅助性T细胞亚群^[2]。有研究表明,在感染性疾病中,IL-17可以通过促进趋化因子的表达募集中性粒细胞在感染局部聚集,还可以诱导抗菌肽表达,在免疫防疫中具有重要作用^[3-4]。因此,Th17细胞在儿童肺炎的发生发展过程中起怎样的作用,如何发挥作用,是否能为儿童肺炎的防治指明一新方向是广大研究学者关注的焦点所在,相关研究亦陆续见报。在此,本文对Th17细胞在儿童肺炎中的研究进展做一综述。

1 儿童肺炎

儿童肺炎主要由病原体感染或吸入羊水及油

作者单位:1. 昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650228

2. 昆明市疾病预防控制中心,云南,昆明 650011

3. 昆明市儿童医院科教科,云南,昆明 650034

*通讯作者:沈茹, E-mail: shenru2009@163.com

类和过敏反应等所引起的肺部炎症,由感染引起的病原谱广泛,主要包括细菌、病毒、及其它非典型病原体(支原体、衣原体、军团菌等)。主要表现为发热、咳嗽、呼吸急促、呼吸困难以及肺部啰音等,且临床症轻重不一,变化较快,易反复,易引起哮喘、喘息、气管炎、心肌炎、脑膜炎等并发症,严重危害儿童的健康成长^[5-7]。儿童肺炎占全球范围内5岁以下儿童死亡比例的28%~34%每年近1.55亿5岁以下儿童患肺炎,发展中国家发病率为0.28人次/年,发达国家为0.05人次/年。我国5岁以下儿童每年约有2110万罹患肺炎(平均0.22次/人年),占我国儿科住院患儿的30%~40%,因其所产生的医疗费用也给患儿家庭和社会带来沉重的经济负担。因此从细胞、分子、基因水平更深入地研究其发病机制,促使检测方法发展以提高早期儿童肺炎的病原检出率,探讨肺炎流行病学特点、临床表现、病原转变及治疗转归等,以全面提高临床医生对该病的认知,对儿童肺炎早期明确诊断、指导合理用药、缩短病程、改善预后、减轻并发症等方面具有重大意义^[1,8-9]。

2 辅助性T细胞17(T helper cell 17,Th17)

Th17细胞在2005年作为一个新的CD4⁺细胞亚群被发现确认,由Th0细胞在IL6和IL23的刺激下分化而成,ROR γ 是其重要的转录因子,主要效应因子是IL-17。IL-17家族包括6个成员的配体(IL-17A~IL-17F)和5个受体(IL-17RA~IL-17RD和SEF)。IL-17是一种主要由活化的T细胞产生的致炎细胞因子,可以促进T细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子如IL-6、IL-8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)和化学增殖素及细胞黏附分子1(cellular adhesion molecule 1, CAM-1),从而导致炎症的产生。IL-17是T细胞诱导的炎症反应的早期启动因子,可以通过促进释放前炎性细胞因子来放大炎症反应。IL-17与受体结合后,可通过MAP激酶途径和核转录因子 κ B(nuclearfactor κ B, NF- κ B)途径发挥其生物学作用,有效地介导中性粒细胞动员的兴奋过程,从而有效地介导了组织的炎症反应^[1,5,9-10]。另外,Th17细胞亦能够分泌产生IL-6、IL-22、GM-CSF以及 α -肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)等^[1,10],这些细胞因子可以

集体动员、募集及活化中性粒细胞,对调节机体免疫状态,最终实现控制炎症、防治自身免疫性疾病以及诱导免疫耐受起重要作用^[11]。

3 Th17细胞在儿童肺炎中研究进展

在对Th17细胞的基础生物学功能、作用机制网络不断深化的基础上,学者们对其在临床相关疾病等方面亦进行了探讨研究,并取得了很大进展。以往对T细胞在肺炎的发生发展过程所起作用的研究显示,特别是由肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染引起的肺炎、哮喘等相关疾病中,其机制主要表现为Th1/Th2功能紊乱和Th17/Treg失衡,主要表现为Th2型细胞因子介导的免疫应答处于相对优势,Th1型免疫应答受抑制;Th17细胞百分比、IL-17水平较正常对照组升高,Treg细胞百分比低于正常对照组,引发相关转录因子ROR γ t、IL-17、TGF- β 调控异常^[12-16]。Th17细胞在儿童肺炎中的研究相对较少,主要集中在研究患儿外周血中Th17细胞数量以及其主要转录因子IL-17、IL-6、IL-22水平的变化,而且在肺炎支原体肺炎领域的相关研究较多,在儿童肺炎关系密切的并发症如哮喘、气管炎等亦有研究见报。

3.1 Th17细胞在细菌性儿童肺炎中的研究进展

引起儿童肺炎的细菌主要包括肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)、卡他莫拉菌、克雷伯菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌^[5,12]。尹珊辉等^[17]研究发现克雷伯菌肺炎(*Klebsiella pneumoniae*, KP)患儿外周血Th17细胞占CD4⁺T细胞(8.15 \pm 3.46)%,显著高于健康儿童(5.37 \pm 4.12)%($P < 0.01$)。KP组血清IL-17水平(23.13 \pm 6.27)pg/mL显著高于健康组(12.53 \pm 6.64)pg/mL($P < 0.05$),IL-21和IL-22无明显变化,提示Th17细胞及其产生的细胞因子IL-17在克雷伯菌肺炎免疫失调过程中起着重要作用。

3.2 Th17细胞在非典型病原体儿童肺炎中的研究进展

非典型病原体主要包括支原体、衣原体、军团菌等,肺炎支原体是最重要病原。Wang^[18]等研究发现儿童肺炎支原体肺炎(*Mycoplasmapneumoniae pneumoniae*, MPP)患儿外周血中的Th17细胞显著高于健康儿童的,且感染前期的Th17细胞数最高,提示Th17细胞可能参与清除急性感染肺炎支原体,过度的Th17细胞反应可能有助于在持续感

染期间观察到的免疫病理损伤。朱章华等^[19]研究结果显示处于急性期和恢复期的MPP患儿外周血Th17/Treg细胞百分率分别为 $(3.48 \pm 1.02)\%$ 、 $(2.10 \pm 0.42)\%$,均明显高于健康组 $(1.49 \pm 0.28)\%$;PBMC中ROR γ t mRNA的相对表达量分别为 8.72 ± 0.93 、 5.32 ± 1.24 ,Foxp3 mRNA的相对表达量分别为 0.56 ± 0.04 、 0.70 ± 0.05 ,均明显高于健康组;血浆中Th17细胞分泌因子IL-17表达水平分别为 (16.97 ± 3.73) pg/mL、 (13.93 ± 1.31) pg/mL,明显高于健康组 (9.73 ± 2.65) pg/mL,而Treg细胞分泌因子IL-10表达水平分别 (9.86 ± 0.45) pg/mL、 (11.12 ± 1.84) pg/mL,明显低于健康组 (9.73 ± 2.65) pg/mL。提示Th17/Treg及其转录因子ROR γ t/Foxp3、细胞因子IL-17/IL-10参与了MPP的发生及发展过程,MPP患儿体内存在Th17与Treg细胞亚群失衡,Th17细胞占优势,两者具有相互抑制作用,随着病情的逐渐恢复,达到动态平衡。宋磊等^[20]研究表明MPP患儿组外周血中Th17细胞频率明显高于正常对照组,Treg细胞表达频率明显低于正常对照组;MPP患儿组血清IL-6、IL-17水平明显高于正常对照组。MPP患儿体内存在Treg与Th17细胞频率明显改变,并伴有炎症性细胞因子水平升高,提示Treg与Th17细胞的频率异常在MPP患儿感染的发病机制中起重要作用。张国辉等^[21]研究结果显示,过敏性紫癜(Henoch-Schörlein purpura, HSP)合并肺炎支原体(MP)感染患儿较单纯HSP及单纯MP感染患儿的外周血Th17细胞百分比、IL-17水平更高,而Treg细胞百分比更低,提示HSP并MP感染存在更为严重的Th17/Treg失衡,而更加严重的Th17/Treg失衡可能参与了HSP并MP感染前炎症因子级联反应、血管炎性损害等炎症反应。

3.3 Th17细胞在其它相关疾病中的研究进展

儿童肺炎反复发病,易引起哮喘、喘息、气管炎、心肌炎、脑膜炎等并发症,而Th17细胞在这些方面亦有相关研究见报。许亚茹^[22]研究发现,哮喘组患儿外周血Th17 (1.64 ± 1.01) pg/mL水平明显高于正常组 (0.95 ± 0.45) pg/mL,此外哮喘组Th2、外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg、CD19⁺、CD4⁺/CD8⁺、单核细胞百分比、嗜酸性粒细胞百分比均较正常组偏高,而Th1/Th2、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD16⁺56⁺则较正常组偏低,提示哮喘患儿存在着免疫失衡现象。陈杰华^[23]相关研究从基因水平提示IL-17

与哮喘发病有关。IL-17 G-152A多态性(rs2275913)是中国西南地区儿童变应性哮喘发病的危险因素,AA基因型与哮喘患儿血清总IgE升高以及肺功能FVC、FEV1异常有关;在毛细支气管炎患儿中发现该位点不同基因型间临床表现存在差异,可能与哮喘发生有关。毛静芳^[24]研究28例呼吸道合胞病毒感染阳性的毛细支气管炎患儿发现其外周血CD4⁺、CD25⁻、Treg细胞、IL-10、TGF- β 水平低于肺炎患儿及健康儿童,而Th17、IL-17水平高于肺炎患儿及正常患儿,提示毛细支气管炎的发病可能与CD4⁺、CD25⁻、Treg、Th17细胞在人体内平衡的破坏有关。

4 结束语

Th17细胞作为一种新的T细胞亚型的发现,使我们对CD4⁺T细胞的分化、成熟有了新的认识,并对以往免疫调节的理论作了更新和补充^[10]。其在儿童肺炎这一领域的研究,现今多集中对儿童肺炎患儿外周血中Th17细胞及其分泌因子变化现象的展示以及对其基础信号通路的检测验证,而其研究成果多处于为临床检测诊断提供方法数据参考阶段,还未能很好地在临床普及或产业化,因此其具体作用机制有待进一步深入探讨,推进临床应用及成果转化。以期丰富其基础研究,进一步提高临床医生对该病的认知,并以此为指导探索新的诊治方法,对儿童肺炎的临床防治具有重大潜在意义。

参考文献

- [1] 宋阳. 407例儿童大叶性肺炎临床分析[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [2] 扈煜. Tc17、Th22、Treg/Th17细胞亚群在ITP发病中的意义及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [3] 姜小丽. 儿童增殖体Treg表达水平与肺炎链球菌携带关系研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- [4] Gagliani N, Amezcu Vesely MC, Iseppon A, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation[J]. Nature, 2015, 523(7559): 221-225.
- [5] 李长春. 509例儿童社区获得性肺炎病原体及临床特征分析[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [6] Olliver M, Hiew J, Mellroth P, et al. Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to Streptococcus pneumoniae[J]. Infection and immunity, 2011, 79(10): 4210-4217.

- [7] Pridgeon C, Bugeon L, Donnelly L, et al. Regulation of IL-17 in chronic inflammation in the human lung [J]. *Clinical science*, 2011, 120(12): 515-524.
- [8] Huber S, Gagliani N, Flavell RA. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(9): 2238-2245.
- [9] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1849-1861.
- [10] 梁亮, 王红. Th17 细胞与自身免疫性疾病 [J]. *免疫学杂志*, 2010(3): 264-266, 270.
- [11] 史乾, 范慧敏, 刘中民. Treg/Th17 平衡的分子调节机制 [J]. *现代免疫学*, 2008(6): 510-513.
- [12] Lundgren A, Bhuiyan TR, Novak D, et al. Characterization of Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae* in humans: comparisons between adults and children in a developed and a developing country [J]. *Vaccine*, 2012, 30(26): 3897-3907.
- [13] 牟丹丹, 倪圆圆, 李婷婷, 等. Th17、Treg 细胞及其在肺炎支原体肺炎中的作用研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2016(21): 4601-4603.
- [14] Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, et al. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications [J]. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5(410): 410-412.
- [15] Pridgeon C, Bugeon L, Donnelly L, et al. Regulation of IL-17 in chronic inflammation in the human lung [J]. *Clinical science*, 2011, 120(12): 515-524.
- [16] Lundgren A, Bhuiyan T R, Novak D, et al. Characterization of Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae* in humans: comparisons between adults and children in a developed and a developing country [J]. *Vaccine*, 2012, 30(26): 3897-3907.
- [17] 尹珊辉, 唐振旺. 克雷伯菌肺炎患儿外周血中 Th17 细胞及白细胞介素的变化 [J]. *中南医学科学杂志*, 2013(2): 148-150, 153.
- [18] Wang X, Chen X, Tang H, et al. Increased Frequency of Th17 Cells in Children With *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia [J]. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2016, 30(6): 1214-1219.
- [19] 朱章华, 潘小晶, 王锁英, 等. Th17/Treg 细胞在儿童肺炎支原体肺炎中的作用研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2013(36): 6040-6043.
- [20] 宋磊, 徐明. 儿童肺炎支原体感染者血 Th17/Treg 的变化分析与临床意义 [A]. *中华医学会第十七次全国儿科学术大会论文汇编(下册)*, 2012: 1.
- [21] 张国辉, 吴福玲, 李晓梅, 等. 过敏性紫癜合并肺炎支原体感染儿童血 Th17/Treg 平衡性检测 [J]. *临床儿科杂志*, 2014(1): 8-11.
- [22] 许亚茹. CD4⁺T 细胞及淋巴细胞亚群在小儿哮喘与肺炎中的意义 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [23] 陈杰华. Th17/IL-17 在儿童哮喘发病中的作用研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.
- [24] 毛静芳. RSV 毛细支气管炎患儿外周血 CD4⁺CD(25)⁺调节性 T 细胞与 Th17 细胞功能变化及意义 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(17): 541-542.

(上接第 210 页)

- [31] Liao J, Sauer K. The MerR-Like Transcriptional Regulator BrIR Contributes to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Tolerance [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 4823-4836.
- [32] Gupta K, Liao J, Petrova OE, et al. Elevated levels of the second messenger c-di-GMP contribute to antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Mol Microbiol*, 2014, 92(3): 488-506.
- [33] Oglesby-Sherrouse AG, Djapgne L, Nguyen AT, et al. The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Pathog Dis*, 2014, 70(3): 307-320.
- [34] Marguerettaz M, Diepinois G, Que YA, et al. Sputum containing zinc enhances carbapenem resistance, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microb Pathog*, 2014, 77: 36-41.
- [35] 朱良苗, 杨维青. 群体感应系统对细菌耐药的调控作用 [J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(1): 7-10.
- [36] Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(12): 1770-1775.
- [37] Wang L, Zhang C, Gong F, et al. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* pvdQ gene on altering antibiotic susceptibility under swarming conditions [J]. *Curr Microbiol*, 2013, 66(2): 152-161.

循环游离DNA的定量检测及面临的问题

李铁军* 张孝卫

[摘要] 循环游离DNA(circulating cell free DNA, cfDNA)与人类疾病之间存在着密切联系。近年来,cfDNA作为一种无创检测生物标志物,展现出临床应用前景。人们针对其含量较低的特点,进行了大量研究,开发出了各种较为可靠的定量检测方法。但目前cfDNA的定量检测仍然面临问题及争议,缺乏规范和标准化的流程。本文对cfDNA的来源组成、定量检测及存在的问题进行了归纳整理及分析,希望能对提高cfDNA的定量检测的可靠性提供有益的参考。

[关键词] 循环游离DNA; 标准化; PCR

Quantification of circulating cell free DNA and the existing problems

LI Tiejun*, ZHANG Xiaowei

(Jinan health science exchange and service center, Jinan, Shandong, China, 250013)

[ABSTRACT] Circulating cell free DNA (cfDNA) are closely related to human disease. In recent years, as a noninvasive biomarkers, cfDNA showed great prospect for clinical application. Because of its extremely low content, a large number of studies have been done to develop various methods for quantitative detection. At the moment cfDNA quantitative detection still faces problems such as the lack of specification and standardization in detection processes. In this paper, we reviewed the source of cfDNA, quantitative methods and existing problems of detection, and hope to give a beneficial reference for improving the reliability of the quantitative detection.

[KEY WORD] Circulating cell free DNA; Standardization; PCR

循环游离DNA(circulating cell free DNA, cfDNA)是指循环血中游离于细胞之外的DNA。由于近年来DNA提取、检测、测序等分子生物学技术的飞速发展,使得cfDNA的研究取得了长足进步,与疾病之间的关系逐渐被揭示出来。cfDNA做为生物标志物,在疾病筛查、诊断、治疗监控、预后、疾病复发等方面表现出令人振奋的应用潜力。特别是对突变及甲基化循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的研究,在肿瘤的防控中开始显现重要作用^[1]。

cfDNA检测的可靠性是其后续应用的基本保障,关系到其做为生物标志物的应用前景,然而目前cfDNA的检测仍然存在诸多问题,从采用血清

还是血浆标本的争议,到标本采集流程、检测方法、结果判读、正常值等均缺乏统一标准,各实验室之间的结果没有可比性。对cfDNA检测的规范和标准化,是cfDNA走向实际应用的必然选择。cfDNA,其英文名称也并不统一,有cell-free DNA(cfDNA)、Circulating DNA、Circulating Cell Free DNA(CCFDNA)、Free circulating DNA(fcDNA)、cell-free circulating DNA等。目前cfDNA检测的常用方法有实时荧光定量PCR(qPCR)法、荧光染料法、bDNA技术等。下面本文对cfDNA的来源组成、定量检测(标本选择、DNA提取和多种检测方法)及存在的问题进行了归纳探讨,希望能对提高cfDNA的定量检测的可靠性提供有益帮助。

作者单位:济南市卫生科技交流服务中心,山东,济南 250013

*通讯作者:李铁军, E-mail:ltj6902@sina.com

1 cfDNA的来源、组成大小及代谢

一般认为,细胞凋亡是血清或血浆 cfDNA 的主要来源。其他来源有坏死肿瘤细胞的溶解、白细胞的分解、新合成核酸的自主释放、细菌病毒等病原体的分解等^[1]。cfDNA 在血液与蛋白质或膜结合颗粒形成天然复合物,能抵抗核酸酶的降解。

cfDNA 凝胶电泳分析显示,主要条带在 180 bp 左右,其次分布在 360 bp 附近。与缠绕在单核小体和双核小体的 DNA 长度相符。提示我们 cfDNA 源于细胞凋亡^[2-4],细胞坏死释放出的 DNA 由于被不完全和非特异性消化,其片段大小约 10 000 bp^[5]。小鼠肝细胞凋亡时,血浆 cfDNA 增加的现象也支持了凋亡为 cfDNA 的来源这一说法^[6]。

近年来,不同实验室利用 DNA 测序技术,对血浆 cfDNA 大小进行了更精确的分析,分辨率达 1 个碱基。测序研究显示^[7-8]:cfDNA 大小主要分布在 166 bp。测序分析与电泳结果基本保持一致。cfDNA 的大小是我们利用 PCR 技术检测时需要考虑的因素。

研究表明,癌症患者与健康个体相比有较高的 cfDNA 水平。这些升高的 cfDNA 主要来自癌细胞^[9-11]。正常健康人群的 cfDNA 水平较低,但在某些病理情况下会显著升高。比如恶性肿瘤、手术和创伤、中风、心衰、自身免疫性疾病、胰腺炎、重症监护相关状况、运动员大量训练后等^[12]。

cfDNA 不仅来自于人类细胞,还含有人类微生物组的 DNA。有研究证实细菌 16S rRNA 基因存在于患者与健康对照的人群的血液循环中^[13-14]。虽然细菌或病毒 DNA 属于外源性 DNA,但在研究 cfDNA 的总浓度、组成、与疾病的关系等方面,必须考虑到这一因素。

值得注意的是,cfDNA 的浓度及组成始终是一个动态过程。cfDNA 是蛋白质结合 DNA,其半衰期较短,文献报道的半衰期从几分钟到 2 h 不等^[1,15,19]。在大鼠模型中,cfDNA 的清除主要在肝脏和肾脏,肝脏是主要的摄取部位^[16]。肝脏摄取单链 DNA 比双链 DNA 快。肾脏清除并不是 cfDNA 的主要清除机制^[17],慢性肾病、透析患者的 cfDNA 水平并没变化。但循环突变 KRAS DNA 可通过肾脏排出,并在尿液中检测出^[18]。

2 cfDNA 的定量检测

cfDNA 的检测大致可分为 cfDNA 总浓度的检测和其中一部分 DNA 的检测,比如 ctDNA 的检测。特别是对突变或甲基化 ctDNA 的检测,将极大地提高游离 DNA 作为疾病生物标志物的特异性和敏感性,增加游离 DNA 检测的应用前景。

2.1 标本选择

血浆或血清均可做为 cfDNA 提取及检测的样本,但两者的 cfDNA 浓度存在差异,选择哪一个并没有统一标准。一般认为,由于凝血过程中白细胞溶解,释放 DNA 入血,因此血清 cfDNA 总浓度高于血浆。从避免白细胞基因组 DNA 混入待测标本的角度考虑,采用血浆标本似乎是更加合理的选择。选择血浆为标本的研究也相对较多。

血液存放时间会对 cfDNA 浓度产生影响。有研究显示,血浆 cfDNA 在 8 h 内没有变化,但血清 cfDNA 浓度在 4 h 时增加,并随时间延长持续增加^[4]。因此血浆分离前血液在 4°C 的最大存放时间是 8 h,而血清应立刻分离以避免基因组 DNA 的污染。还有研究认为^[20],肿瘤患者血浆 cfDNA 的浓度经历了一个由高到低,再由低到高的过程。2 h 时血浆中 cfDNA 的浓度较高,放置 6 h 时游离 DNA 的浓度明显下降,30 h 时又有所增加。

EDTA 抗凝全血在加入细胞膜稳定剂的情况下,室温放置 0、3、6 d 后离心取血浆,cfDNA 浓度未见明显变化。在未加细胞稳定剂时,3、6 d 的 cfDNA 水平显著增高。但加入的外源标准 DNA 对照(standard external DNA control, EDC)在加与不加细胞膜稳定剂时未见明显变化,说明 cfDNA 浓度变化与提取方法无关,而与细胞稳定剂相关。细胞膜稳定剂的加入可以有效抑制血细胞溶解,释放 DNA 入血^[21]。

可以看出,血液存放的时间长短确实对 cfDNA 水平产生影响。因此,在条件允许的情况下,采血后最好立刻分离血浆或血清,避免外源 DNA 的混入及浓度波动,最大程度地反映 cfDNA 的原貌。

另外,采血部位对 cfDNA 浓度也可能造成影响。采用直接 qPCR 法测定血浆 cfDNA 的浓度时发现,肘前静脉的血浆 cfDNA 的浓度(17.6 ng/mL)显著高于指尖毛细血管 cfDNA 浓度(8.7 ng/mL)^[22]。可见,采血部位也是 cfDNA 检测标准化需要考虑的因素之一。

2.2 cfDNA 提取

目前,血浆或血清 cfDNA 的提取基本全部采用商业化试剂盒。由于 cfDNA 浓度极低,提取困难,不同方法提取效率差异明显。比较常用的试剂盒为微柱吸附式的 QIAamp[®] DNA blood mini kit (DBM),其次是磁珠式 DNA 纯化试剂盒。但这些试剂盒主要用于从血细胞提取高度完整性的基因组 DNA,而不是用于高度碎片化的 cfDNA,因此可能导致提取效率较低。Devonshire AS 等^[23]将 3 种 cfDNA 专用提取试剂盒与 DBM 试剂盒进行了详细研究比较,认为 QIAamp[®] circulating nucleic acid (CNA) kit 试剂盒在提取率和提取小片段方面均优于 DBM 试剂盒。Repiská G 等^[24]的研究也得出了相似结论,认为 CNA 或 DSP Virus Kit (DSP) 可以取代普遍使用的 DBM 试剂盒。还有研究表明,磁珠法提取效率高于 DBM 法,对质粒 DNA 的提取效率也仅为 69.2%,其余几种方法提取率均未超过 50%^[25]。随着 cfDNA 研究的不断深入,cfDNA 的提取技术也在不断提高,提取率、DNA 片段大小的覆盖范围、提取试剂对后续浓度测定的影响都是需要改进提高的方面。

2.3 cfDNA 定量方法

2.3.1 qPCR

qPCR 是目前 cfDNA 量的主流方法。通过检测 DNA 中看家基因或稳定出现的某些非编码重复序列,达到 cfDNA 量的目的。常用的靶序列有: β -actin、 β -globin、GAPDH、TERT、RPPH1、ERV3、MSTN、ALU、LIPA2 等。

目前,采用 qPCR 量仍然存在不少问题:首先,量时,量的数据是 cfDNA 总浓度还是靶基因的浓度,很多文献在这一点上表述不清,极易造成误导。我们知道,qPCR 实际测量的是靶基因的 Ct 值,然后再用标准曲线计算 cfDNA 的量。一般以 ng/mL 或拷贝数表示。那么,参考基因的量能不能代表 cfDNA 的总量呢?这要看制作标准曲线时采用的标准品是什么,通常有两种不同做法:①采用提纯的靶基因或重组质粒,这样计算出来的实际上就是靶基因的量,而不是 cfDNA 总量。只是以靶基因的量来“代表”cfDNA 的量。②采用人基因组 DNA 为标准品。这样看似计算出的是 cfDNA 总量,但这是以“看家基因在基因组中的含量稳定且分布均匀”这一论断为前提的。而 cfDNA 中是否含有相同比例的看家基因,答案并不明

确。虽然两种方法在表述上都是测的 cfDNA 的量,显然,采用不同标准品测出的数据是没有可比性的。理论上,以人类基因组 DNA 为标准品测得的数值应远高于纯靶基因质粒为标准品的数值。也就是说,测量看家基因只能“大致反映”cfDNA 的水平。基于上述原因,采用单一靶基因检测 cfDNA,虽说可以进行同一研究的横向比较,但在 cfDNA 绝对量的准确性和标准化上仍需探讨。

不同参考基因测定同一标本的 cfDNA 浓度,是否可以得出一致结果呢? Devonshire AS 等^[23]比较了 7 个不同参考基因的 qPCR 定量并用数字 PCR (digital PCR, dPCR) 进行验证,一些参考基因(比如 TERT)测得的 cfDNA 的量平均高于其他内参基因(比如 ERV3)2 倍以上。研究认为使用多内参基因的分析及取平均值可对 cfDNA 总量给出更加可靠的估计。此外,在 cfDNA 量时,在待测血浆中加入所谓外源性标准 DNA 对照(EDC),可评估提取效率、提取产物的线性度、共纯化抑制物的存在以及 cfDNA 片段大小对量的影响^[21]。

qPCR 量 cfDNA 时的另一个问题是,量前是否需要血浆或血清 DNA 的提取。多数 qPCR 的定量研究均为先提取 cfDNA,后 qPCR 量。毫无疑问,这样会造成 cfDNA 的损失。损失的 DNA 量可能比提取量还要大。Umetani 等^[26]尝试不需 DNA 纯化直接量 cfDNA:进行 qPCR 之前,血浆或血清用备好的缓冲液和蛋白酶 K 处理,以去掉蛋白质,通过扩增两种长度的 ALU 序列对 cfDNA 量。Sarah Breitbach 等^[22,27]在反应混合物中加入一种用于困难模板扩增的特殊聚合酶(velocity polymerase),该酶每 10 s 可延伸 1 kb 碱基,血浆 1:40 稀释后,不需其他处理,直接加入反应体系进行 qPCR 测定血浆 cfDNA 浓度。结果显示,未经提纯的血浆中 cfDNA 的浓度是 DBM 试剂盒洗脱液(eluate)中 cfDNA 的 2.79 倍,在弃掉的流出液(flow-through)中,发现了 cfDNA 总量的 36.7%。可见,直接 qPCR 法操作更加简便,避免了 cfDNA 的损失,但其可靠性仍需更多的相似研究和对比研究加以验证。

2.3.2 荧光染料法

采用 PicoGreen^[14,28]、SYBR Green I 等荧光染料法检测血浆 cfDNA,取得了不错的效果。该法灵敏度高(可达 pg 水平),线性范围宽。常用的 PicoGreen 是一种新型荧光染料,广泛用于基因组 DNA、病毒 DNA、PCR 扩增产物等微量双链 DNA

(dsDNA)的检测。可将血浆稀释后直接与 Pico-Green 染料 1:1 混合,在荧光酶标仪、荧光计等设备检测荧光即可。2010 年版中国药典三部提出,荧光染料法检测的线性范围为 1.25~80 ng/mL^[29]。有商业化试剂盒称可检测低至 25 pg/mL 的 dsDNA。由于荧光染料法灵敏度高、操作简便,有学者认为^[30],此法为检测 cfDNA 的最佳方法。

2.3.3 bDNA 技术

近年来,bDNA 信号放大的定量检测技术被用于 cfDNA 的定量检测。bDNA 技术是一种建立在 DNA 杂交基础上的检测技术,类似于 Southern blot 或 ELISA 法,针对选定的靶序列,比如 *ALU* 序列,设计专门的捕获辅助探针(capture extender, CE),CE 两端分别与靶序列和捕获探针结合,靶序列再与一系列标记辅助探针(labeled extender, LE)、信号放大探针、酶标记探针等相连,最后检测酶与底物的反应强弱^[31]。该法的最低检出限可达 0.86 ng/mL^[32]。bDNA 技术不需 DNA 提取步骤,具有灵敏度、特异性较高、操作简便的优点,但该方法目前在国内应用不多。

bDNA 技术与 qPCR 技术在检测 cfDNA 上有相似点,都是对某一靶序列的量进行检测,来定量 cfDNA 总量。可能也会存在 qPCR 上出现的类似问题,比如单靶基因、不同靶基因带来的定量差异,标准品的选择等。而且不同靶序列,需要设计专门的捕获辅助探针。bDNA 技术与 qPCR 法的比较研究显示^[33],两法的血清游离 DNA 水平呈正相关,但 bDNA 技术测得的 cfDNA 浓度中位数(252.2 ng/mL)是 qPCR 法(65.5 ng/mL)的近 4 倍。qPCR 法中 cfDNA 的提取损失应该是其浓度低于 bDNA 法的主要原因之一。

2.4 甲基化 cfDNA 的定量方法

cfDNA 中的甲基化 DNA 的检测主要是指甲基化 ctDNA 的检测。由于 ctDNA 具有含量极低这一不利于检测的特性,因此,甲基化 ctDNA 的检测基本上是基于 PCR 技术和测序技术上的检测。PCR 主要用于 cfDNA 中某特定基因或序列的甲基化检测,而测序可对整个 cfDNA 的甲基化状况进行检测。

甲基化 ctDNA 的定性检测可通过甲基化特异性 PCR(methyl-specific PCR, MSP)来实现。之后,Eads 等^[34]将 MSP 与 qPCR 技术相结合,实现了甲基化 DNA 的定量检测,即经典的 Methy-

light 法,或称 qMSP 法。这种定量是一种相对定量,通过计算 PMR (percentage of methylated reference)值对目的基因甲基化水平进行量化。但问题来了,PMR 的计算方式并不统一。其一: $PMR = 2^{-[(Ct_{\text{样本靶基因}} - Ct_{\text{样本内参}}) - (Ct_{\text{阳性对照靶基因}} - Ct_{\text{阳性对照内参}})]} \times 100\%$ 。该公式实际是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的一种百分化形式,是以全甲基化阳性对照为 100% 计算出的甲基化百分数,PMR 值应在 0~100% 之间,代表甲基化基因占全部靶基因的百分比。阳性对照甲基化不完全,样品与对照拷贝数的差异可能会导致 PMR 值 > 100%。其二: $PMR = 2^{-(Ct_{\text{样本靶基因}} - Ct_{\text{样本内参}})} \times 100\%$ 。这种是以内参基因的量作为对照标准计算出的甲基化靶基因的相对量。PMR 值上限不固定,取决于基因组中靶基因与参考基因之间的相对量。第一种 PMR 计算方法更易于理解和相互比较。不管哪种计算方式,必须考虑靶基因和内参基因扩增效率是否一致的问题。

Methylight 法与最近发展起来的数字 PCR (dPCR)相结合,产生了数字 Methyligh 或称为 Methyligh dPCR。Methyligh dPCR 比 qPCR 具有更高的敏感性^[35]。dPCR 可直接对拷贝数进行绝对定量而不需制作标准曲线。dPCR 由于单链模板进入分区并被扩增,可能产生拷贝数被高估的情况。

另一类定量方法是基于甲基化依赖限制性内切酶(MDRE)或甲基化敏感的限制性内切酶(methylation sensitive restriction endonuclease, MSRE)的 PCR 分析。MSRE 或 MDRE 消化含数个 CpG 位点的靶序列,通过 qPCR 扩增,计算甲基化的相对量。MSRE 或 MDRE 法的局限性在于靶序列中必须含有相应的含 CpG 的酶切位点,且酶切消化能否达到 100%,也是影响结果的重要因素。

重亚硫酸盐转化的 DNA,还可通过测序评估全 cfDNA 的甲基化状态^[5]。测序技术的发展,提供了更大的基因组覆盖和测序深度。测序可通过单分子定量,大范围高通量的识别所有甲基化胞嘧啶。

Redshaw 等^[36]使用系列梯度的甲基化 DNA 标准样本,对 Methylight、Methyligh dPCR、MSRE/MDRE-qPCR 和 -dPCR 以及测序法进行了对比评估。Methylight qPCR 表现出最好线性。测序分析精密度较高,但准确性不如 qPCR 和 dPCR,高估了甲基化含量。当甲基化 < 25% 时,qPCR 和 dPCR 法的精密度降低。

测序并未如我们期待的那样,成为精密度和准确性最高的方法。测序要想成为甲基化定量的

金标准,技术上仍有改进的空间。而且测序设备昂贵,临床普及应用尚有难度。

3 展望

cfDNA 做为新兴的生物标志物,由于各种内、外因素的影响,其组成及浓度变化较大,且含量较低,不易检测。根据检测目的和靶标的不同,每种检测方法各有其优势和局限性。当今主流的检测方法,基本是基于 PCR 技术的各种扩展延伸,荧光染料法等方法由于自身的优势,也逐渐得到认可。尽管存在缺乏检测流程的规范和标准化等诸多问题,但这只是前进道路中必然遇到的问题,相信通过更多的、更大样本量的研究以及检测技术的改良进步,这些问题都将逐步得到解决。

参考文献

- [1] Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, et al. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9):18925-18958.
- [2] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4):1659-1665.
- [3] Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 387(1-2):55-58.
- [4] Warton K, Lin V, Navin T, et al. Methylation-capture and next-generation sequencing of free circulating DNA from human plasma [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):476.
- [5] Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(61):61ra91.
- [6] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4):1659-1665.
- [7] Jiang P, Chan CW, Chan KC, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11):E1317-E1325.
- [8] Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release [J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 313:139-142.
- [9] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. *Nat Med*, 2014, 20(5):548-554.
- [10] Singh N, Gupta S, Pandey RM, et al. High levels of cell-free circulating nucleic acids in pancreatic cancer are associated with vascular encasement, metastasis and poor survival [J]. *Cancer Invest*, 2015, 33(3):78-85.
- [11] Sikora K, Bedin C, Vicentini C, et al. Evaluation of cell-free DNA as a biomarker for pancreatic malignancies [J]. *Int J Biol Markers*, 2015, 30(1):e136-141.
- [12] Vietsch EE, van Eijck CH, Wellstein A. Circulating DNA and micro-RNA in patients with pancreatic cancer [J]. *Pancreat Disord Ther*, 2015, 5(2):156.
- [13] Moriyama K, Ando C, Tashiro K, et al. Polymerase chain reaction detection of bacterial 16S rRNA gene in human blood [J]. *Microbiol Immunol*, 2008, 52(7):375-382.
- [14] Dinakaran V, Rathinavel A, Pushpanathan M, et al. Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation [J]. *Plos One*, 2014, 9(8):e105221.
- [15] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics [J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985-990.
- [16] Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, et al. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(8):1544-1546.
- [17] Kirsch C, Weickmann S, Schmidt B, et al. An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1137:135-139.
- [18] Su YH, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2004, 6(2):101-107.
- [19] Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma [J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(1):218-224.
- [20] 于韶荣, 史美祺, 刘宝瑞, 等. 全血分离时间对肠癌患者血浆游离DNA浓度的影响 [J]. *成都医学院学报*, 2014, 9(5):554-557.

(下转第 222 页)

新法规下的体外诊断试剂注册变更与延续注册实践分享

刁春芳 高旭年*

2014年7月30日,国家食品药品监督管理总局印发关于实施《体外诊断试剂注册管理办法》(以下简称《办法》)有关事项的通知,并于2014年10月1日正式实施。

据达安基因法规事务中心平台统计,自《办法》实施至2015年12月1日,经平台办理的申请共24项三类体外诊断试剂延续注册,6项三类体外诊断试剂许可事项注册变更,12项三类体外诊断试剂登记事项注册变更。目前,申请延续注册已取证的有6项,进入制证状态的有1项,许可事项变更取得变更批件的有1项,登记事项变更取得批件的有12项。

现根据达安基因法规事务中心平台体外诊断试剂注册变更与延续注册的申报情况,进行如下法规解读及经验分享。

1 注册变更

1.1 条款解读

《办法》中第七章第五十八条规定,已注册的第二类、第三类体外诊断试剂,医疗器械注册证及其附件载明的内容发生变化,注册人应当向原注册部门申请注册变更,并按照相关要求提交申报材料。

该条款中“医疗器械注册证及其附件载明的内容”是指医疗器械注册证上含有的内容,比如注册人名称、住所、生产地址、产品名称、包装规格等信息;附件包括产品说明书、产品技术要求等。

“相关要求”则是指国家总局发布的《医疗器械监督管理条例》、《关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告》(2014年第44号)、《关于印发境内第三类医疗器械和进口医疗器械注册审批操作规范的通知》(食药监械管[2014]208号)及《关于印发境内第二类医疗器械注册审批操作规范的通知》(食药监械管[2014]209号)。

1.2 注册变更分类

体外诊断试剂注册变更事项可分为登记事项变更和许可事项变更。

1.2.1 登记事项变更

医疗器械注册证中的注册人名称和住所、代理人名称和住所变更属登记事项变更,可直接向原注册部门申请变更;而境内体外诊断试剂生产地址变更的,企业需要先进行生产许可证生产地址变更后方可向原注册部门申请登记事项变更。

企业向原注册部门递交登记事项变更的资料如齐全、符合形式审查要求,10个工作日即可取得《医疗器械注册变更文件》。

1.2.2 许可事项变更

许可事项变更包含产品名称、包装规格、主要组成成分、预期用途、产品技术要求、产品说明书、产品有效期、适用机型、检测条件等变更,在《办法》第四十七条和第五十八条中均有作详细规定。

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

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

*通讯作者:高旭年, E-mail: gaoxunian@126.com

值得强调的是产品基本反应原理发生改变、产品阳性判断值或者参考区间改变,并具有新的临床意义或其他影响产品性能的重大改变,不属于注册变更的内容,企业须按照注册申请办理。

许可事项变更通常要求对企业产品的变化进行性能有效性再评价,因此涉及变更更复杂的验证过程(比如补充临床试验)。并且许可事项变更的审评审批时间也较长(第二类产品通常为98个工作日,第三类产品通常为128个工作日)。因此许可事项变更很少能在6个月内完成。

1.3 常见问题简析

在实际的变更操作中,某些企业会遭遇拟申请的变更事项不在《办法》规定范围内的情况,此时应直接咨询国家总局受理中心。

如果是简单的产品外包装、内包材的颜色等发生变化,企业可按照其自身质量管理体系的要求做好相关工作,并保证其质量管理体系的持续有效运行即可。

2 延续注册

2.1 条款解读

《办法》中第八章第六十四条规定,医疗器械注册证有效期届满需要延续注册的,注册人应当在医疗器械注册证有效期届满6个月前,向食品药品监督管理部门申请延续注册,并按照相关要求提交申报资料。

除有《办法》第六十五条规定情形外,接到延续注册申请的食品药品监督管理部门应当在医疗器械注册证有效期届满前作出准予延续的决定。逾期未作决定的,视为准予延续。

这要求企业必须在“医疗器械注册证有效期届满6个月前”提交延续注册申请,如逾期递交国家总局受理中心将不予以受理,企业如要保留医疗器械注册证书只能按首次注册进行申请。在《办法》刚实施时,很多企业误认为“逾期未作决定的,视为准予延续”是指逾期没有取得注册证,仍可以继续销售。但在食药监械管[2014]208号文和食药监械管[2014]209号文的其他要求中对延续注册有作相关要求,国家食品药品监督管理总局发出补正资料通知和召开专家会议通知等行为,不属于未作决定的情形。

2.2 体外诊断试剂延续注册进程

境内二、三类体外诊断试剂延续注册与许可事项变更的审评审批时间一样,在不发补的情况下,第二类产品需4个月方可取得批件,第三类产品需6个月方可完成。

依据相关规定,未获得注册证书的医疗器械不得销售、使用。为不影响企业产品的销售,在产品效期前顺利取得延续注册证书,建议提前至有效期满12个月启动延续注册申请。

3 当延续注册遇到注册变更

3.1 法规解读

2014年8月1日,国家总局发布食品药品监管总局关于实施《医疗器械注册管理办法》和《体外诊断试剂注册管理办法》有关事项的通知。其中第五条第二点规定,自2015年4月1日起,延续注册和注册变更应当分别提出申请,注册变更应当按照《办法》相应要求提交相关资料。

从通知可知,2015年4月1日后同一产品的延续注册与变更申请如须同时申请,应分别按要求准备2套资料递交,延续注册按原批准内容递交申请,事项变更按变更后的内容递交申请。两者并不冲突,经审评符合延续注册的产品,企业将获发新的《医疗器械注册证书》。经审评准予变更的,获发变更批件。

3.2 常见问题简析

有企业问“行业标准《核酸扩增检测用试剂(盒)》才刚采用,临床试验正在准备,没有3个月完成不了,眼看医疗器械证书有效期就要届满6个月,怎么办?”,针对这种情况,可以先提交延续注册申请,在延续注册申请表的“其他需要说明的问题”一栏中说明企业实际情况。

又有企业问到“公司某个试剂已经提交注册变更,但还没取得变更批件,眼看证书有效期就要届满6个月,延续注册该怎么准备资料?”,这类情况,可以按照原注册证批准的内容递交申请。

还有企业问“产品增加适用机型,需要做变更,但延续注册申请刚交上去呢,可以吗?”,可以,延续注册与注册变更不冲突,延续注册仍在审评的过程中,也可以递交许可事项变更。

4 申请资料的准备

企业在准备各项申请时,内容上应按照《关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告》(2014年第44号)的要求来准备;申报形式上应根据《关于印发境内第三类医疗器械和进口医疗器械注册审批操作规范的通知》(食药监械管[2014]208号)或《关于印发境内第二类医疗器械注册审批操作规范的通知》(食药监械管[2014]209号)来进行。

只有根据44号、208号或209号的规定来准备

资料,才能保障各项申请从受理到审评顺利进行,并及时取得批件。

5 小结

综上所述,企业应关注、了解体外诊断试剂注册法规,做到懂法、遵法;经常关注强制性标准的实施时间,提前了解企业产品是否满足强制性标准的要求,提前了解企业产品适用机型、产品效期、性能指标等变更需求,进而合理规划延续注册和注册变更的实施时间及资料准备。这样延续注册与注册变更也就能顺利进行,两者的关系也就不复杂了。

(上接第219页)

- [21] Eini M, Behzad-Behbahani A, Takhshid MA, et al. Chimeric external control to quantify cell free DNA in plasma samples by real time PCR [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2016, 8(2):84-90.
- [22] Breitbach S, Sterzing B, Magallanes C, et al. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise [J]. *J Appl Physiol*, 2014, 117(2):119-130.
- [23] Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(26):6499-6512.
- [24] Repiská G, Sedláčková T, Szemes T, et al. Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(6):1185-1189.
- [25] 严子禾, 潘世扬, 陈丹, 等. 4种血浆游离DNA提取方法的比较 [J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(5):363-365.
- [26] Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(6):1062-1069.
- [27] Breitbach S, Tug S, Helmig S. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma [J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e87838.
- [28] 张思功, 王国春, 彭清林, 等. 血浆游离DNA水平升高源于NETosis并与活动性狼疮肾炎相关 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(5):336-340.
- [29] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 3部, 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [30] Szepechinski A, Struniawska R, Zaleska J, et al. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59Suppl 6:675-681.
- [31] 赵丽, 景蓉蓉, 张鲁榕, 等. 分支DNA技术检测血浆游离DNA方法的建立及在急性心肌梗死患者中的初步应用 [J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(2):172-175.
- [32] 杨益梅, 邵雪峰, 张玉泉, 等. 血清游离DNA定量检测对宫颈癌临床诊断的价值 [J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(110):992-996.
- [33] 施维, 戚菁, 申娟娟, 等. 两种游离DNA检测方法的比较研究 [J]. *交通医学*, 2014, 28(6):579-580.
- [34] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(8):E32.
- [35] Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(14):4689-4698.
- [36] Redshaw N, Huggett JF, Taylor MS, et al. Quantification of epigenetic biomarkers: an evaluation of established and emerging methods for DNA methylation analysis [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):1174.

河南省人类遗传疾病基因修饰工程技术研究中心 郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心

河南省人类遗传疾病基因修饰工程技术研究中心位于河南省郑州市建设东路1号，依托郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心，以人类遗传病分子诊断、发病机制和基因修饰治疗为主要研究方向。中心于2016年经河南省科技厅批准成立，以郑州大学第一附属医院医学遗传学、妇产科学、生殖医学、儿科学、神经病学及超声医学为学科支撑，临床医学为一级学科博士、硕士学位授权点，妇产科学、生殖医学、儿科学和神经病学均进入国家临床重点专科建设项目。中心拥有科研人员55人，其中硕士生导师2人，高级职称人员4名，博士23名。中心功能齐全，设有国际标准的细胞遗传学、分子遗传学、免疫治疗、基因治疗4个研究室及染色体全自动收获与分析、Sanger测序、高通量测序、染色体微阵列分析、基因编辑5个技术平台。实验室总面积2000平方米，配备国际一流高通量测序仪5台，ABI 3130测序仪2台、染色体微阵列杂交系统，以色列ASI染色体自动分析系统5套、德国Leica GSL120自动细胞遗传学平台2套、美国HANABI-PIII中期染色体自动收获系统2套等，设备总价值达5000万元。

中心以当今医学研究前沿——人类遗传病精准诊疗为研究核心，研究人类遗传病病因及发病机制，确定新的分子诊断及治疗靶点，建立先进的精准诊断方法，以基因修饰为基础研发新型人类疾病治疗技术。近5年来中心获各类科研基金资助近20项，总经费800万元，其中国家自然科学基金项目6项。中心先后获得河南省医学科学进步一等奖、河南省科技进步二等奖、郑州市科技进步三等奖共6项奖项。近5年以来共发表学术论文60余篇，其中中华系列文章48篇，SCI期刊论文13篇。近3年共培养12名硕士毕业生，在读全日制硕士生9名，进修医师22人。

学术带头人孔祥东是郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心科主任，同时担任河南省遗传疾病基因修饰工程技术研究中心主任及河南省遗传病基因治疗医学重点实验室主任。现为《中华医学遗传学杂志》编委，中国医师协会医学遗传医师分会委员，中国优生科学协会常务理事，中国优生科学协会医学遗传学分会副主任委员，海峡两岸医药卫生交流协会遗传与生殖专业委员会委员，中国医师协会住院医师规范化培训医学遗传科评估专家组成员，河南省遗传学会常务理事，河南省医学会医学遗传学分会副主委，河南省医学会围产医学分会常委，河南省产前诊断技术服务机构评审专家组成员。自1997年以来，孔祥东主任一直从事各类遗传病及胎儿异常的诊疗工作，主要研究方向为人类遗传病的分子诊断及基因治疗。



→ 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