

- [6] 李爱国. 肺功能损害患者对腹腔镜手术耐受性的研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2012.
- [7] Belpomme V, Ricard-Hibon A, Devoir C, et al. Correlation of arterial PaCO<sub>2</sub> and ETCO<sub>2</sub> in prehospital controlled ventilation[J]. Am J Emerg Med, 2005, 23(7): 852-859.
- [8] Yosefy C, Hay E, Nasri Y, et al. End tidal Carbon dioxide as a predictor of the arterial PaCO<sub>2</sub> in the emergency department setting[J]. Emerg Med J, 2004, 21(5): 557-559.
- [9] 梅超明, 莫家全, 唐波, 等. 休克患者术中动脉血和呼气末二氧化碳分压的关系[J]. 中国医药导报, 2008, 5(24): 64-65.
- [10] 招伟贤. Pa-etCO<sub>2</sub> 的变异及其临床意义[J]. 医疗保健器具, 2008, 110(4): 46-48.
- [11] 叶正龙, 蒋小齐, 李士荣, 等. 重型颅脑损伤患者机械通气呼气末与动脉血二氧化碳分压关系的对照研究[J]. 中国厂矿医学, 2007, 20(1): 18-19.
- [12] Warner KJ, Cuschieri J, Garland B, et al. The utility of early end-tidal capnography in monitoring ventilation status after severe injury[J]. J Trauma, 2009, 66(1): 26-31.
- [13] Lee SW, Hong YS, Han C, et al. Concordance of end-tidal carbon dioxide and arterial carbon dioxide in severe traumatic brain injury[J]. J Trauma, 2009, 67(3): 526-530.
- [14] Dyer BA, White WA, Lee D, et al. The relationship between arterial Carbon dioxide tension and end-tidal Carbon dioxide tension in intubated adults with traumatic brain injuries who required emergency craniotomies[J]. Crit Care Nurs Q, 2013, 36(3): 310-315.
- [15] 蔡明, 楚敏, 毛丽洁. 颅脑外伤患者术中呼气末 CO<sub>2</sub> 分压变化与预后的关系[J]. 中国误诊学杂志, 2002, 2(2): 234-235.
- [16] 余丽珍, 钟秀清, 付杭祥. 重症脑外伤患者术中呼气末二氧化碳分压变化与预后的关系[J]. 临床麻醉学杂志, 2001, 17(6): 332.
- [17] Tyburski JG, Carlin AM, Harvey EH, et al. End-tidal CO<sub>2</sub>-arterial CO<sub>2</sub> differences: a useful intraoperative mortality marker in trauma surgery[J]. J Trauma, 2003, 55(5): 892-896.
- [18] Cooper CJ, Kraatz JJ, Kubiak DS, et al. Utility of prehospital quantitative end tidal CO<sub>2</sub>? [J]. Prehosp Disaster Med, 2013, 28(2): 87-93.
- [19] Ali SS, Dubikaitis A, Qattan AR. The relationship between end tidal carbon dioxide and arterial carbon dioxide during controlled hypotensive anaesthesia [J]. Med Princ Pract, 2002, 11: 35-37.
- [20] Dunham CM, Chirichella TJ, Gruber BS, et al. Emergency department noninvasive(NICOM) cardiac outputs are associated with truma activation, patient severity and host conditions and mortality[J]. J Truma Acute Care Surg, 2012, 73(2): 479-485.
- [21] Dunham CM, Chirichella TJ, Gruber BS, et al. In emergently ventilated trauma patients, low end-tidal CO<sub>2</sub> and low cardiac output are associated and correlate with hemodynamic instability, hemorrhage, abnormal pupils, and death[J]. BMC Anesthesiol, 2013, 13(1): 20.
- [22] Akinci E, Ramadan H, Yuzbasioglu Y, et al. Comparison of end-tidal Carbon dioxide levels with cardiopulmonary resuscitation success presented to emergency department with cardiopulmonary arrest[J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(1): 16-21.
- [23] 黄进杰. 呼气末二氧化碳分压监测在脑复苏中的应用[J]. 中国现代医生, 2013, 51(35): 130-131, 134.
- [24] 刘景峰, 段美丽, 苏伟, 等. 呼气末二氧化碳分压评估两种心肺复苏方式的临床效果[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(2): 103-104.

(收稿日期: 2015-05-14 修回日期: 2015-07-25)

• 综述 • doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2015. 34. 043

## TSP-1 与白血病相互关系的研究进展

王晓果 综述, 曾东风, 孔佩艳<sup>△</sup> 审校

(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

[关键词] 甲基化; 白血病; TSP-1

[中图分类号] R55

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)34-4865-04

白血病是一组异质性、克隆性的造血干细胞疾病, 主要表现为造血干细胞不断积累的获得性遗传学异常, 使其发生克隆性的突变, 从而不能进行正常的自我更新、增殖和分化<sup>[1]</sup>。随着治疗手段的发展, 白血病患者的预后明显改善, 但是复发及感染并发症一直是急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)患者发病率和病死率居高不下的主要原因。急性

白血病的发生包括了复杂的基因突变、缺失、癌基因激活及抑癌基因失活等多种分子生物学水平的异常。凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1), 又称血小板反应蛋白-1(THBS1)是一种多功能 ECM 蛋白, 在细胞增殖、凋亡、血管生成、炎症及免疫应答中起重要作用<sup>[2]</sup>。TSP-1 的编码基因位于人类染色体 15q15, 全长约 16 kb, 含有 22 个外显子, 读码框 5.8 kb, 是候选的抑癌基

因。TSP-1 基因启动子区域高甲基化抑制基因转录,与肿瘤及白血病的发生密切相关。TSP-1 基因去甲基化治疗、针对 TSP-1 蛋白相关功能区域的靶向治疗为白血病治疗及感染并发症的预防提供了新的思路。本文对 TSP-1 基因启动子甲基化、TSP-1 蛋白与白血病发生、发展、感染并发症等关系的研究现状进行综述。

## 1 TSP-1 蛋白的结构和功能

TSP-1 是一种首次在活化血小板中发现的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 糖蛋白,是 TSP 家族研究最多的成分。TSP 家族包括 TSP-1、TSP-2、TSP-3、TSP-4、TSP-5。TSP-1 在多种细胞中表达,包括脂肪细胞和巨噬细胞,是存在于 ECM 成分和条件培养基中的一种可溶性分子。TSP-1 蛋白是一个大分子的同源三聚体,相对分子质量约 145 KU,每个单体由 1 152 个氨基酸残基组成富含半胱氨酸的多肽;包括 N-端区域;I 型、II 型、III 型重复序列;C-末端区域。不同的细胞表面受体通过连接 TSP-1 分子特定的区域发挥不同的生物学活性。CD36 是 TSP-1 的一个受体,它连接到 TSP-1 的 I 型重复序列参与信号转导,发挥黏附和抗血管生成作用。此外,还可激活天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3),从而诱导内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。TSP-1 可参与止血、细胞黏附、迁移,ECM 表达,生长因子活性调节等的创伤修复过程<sup>[4]</sup>。CD47 结合 TSP-1 的 C-端区域可参与  $\beta$  淀粉样蛋白炎症反应。并且有研究发现在 T-淋巴细胞和慢性髓细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 细胞中 TSP-1 和 CD47/凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 相互作用诱导 caspase 非依赖性细胞死亡信号通路<sup>[5]</sup>。

## 2 TSP-1 与白血病发生、发展的关系

### 2.1 TSP-1 基因启动子高甲基化与白血病发病的关系

表观遗传学是指基于非基因序列改变所致基因表达水平的变化。DNA 甲基化改变是人类肿瘤中最常见的表观遗传学改变<sup>[6]</sup>。在 DNA 甲基化过程中,甲基化的 CpG 双核苷酸通过募集转录抑制因子、阻碍转录激活因子结合、改变染色质构象等途径抑制基因的表达。DNA 甲基化的改变被认为是细胞恶性转化的早期特征,表现为特殊基因的高甲基化伴随总体低甲基化。低甲基化促进癌基因活化,高甲基化则促使抑癌基因失活导致肿瘤发生。

血液系统恶性肿瘤的 DNA 甲基化多表现为广泛的低甲基化和局部基因启动子 CpG 岛的高甲基化,这种异常甲基化被认为是血液系统肿瘤的触发事件。Li 等<sup>[7]</sup>发现 TSP-1 基因在 CEM、RAJ1 细胞中完全甲基化,在 Jurkat、K562、MOLT3、HL-60 等多种白血病细胞株中发现 TSP-1 基因启动子的部分甲基化。Garcia-Manero 等<sup>[8]</sup>在 80 例初诊的成人 ALL 患者发现 TSP-1 启动子甲基化频率 11.3%。Greco 等<sup>[9]</sup>对 105 例骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS), 208 例初治的 AML, 72 例治疗相关的髓系肿瘤 (therapy-related myeloid neoplasms, t-MN) 基因启动子区域甲基化的研究发现, DAPK、CDH1、TSP-1 基因在 AML、MDS、t-MN 中均发生甲基化。与初诊 MDS、AML 相比, t-MN 患者中 DAPK 基因启动子区域甲基化频率更高,而 TSP-1 基因启动子区域甲基化频率在各组之间无显著差异。基因组甲基化与染色体缺失协同引起抑癌基因的沉默,可能是 MDS 进展为 AML 的主要表观遗传学改变。

### 2.2 TSP-1 抑制骨髓微血管生成

TSP-1 是一种内源性的血管生成抑制因子,肿瘤血管新生在白血病发生和发展中发挥着重要的作用。Kaur 等<sup>[10]</sup>研究发现 TSP-1 通过干扰 VEGFR-2 与 CD47 结合,抑制 VEGFR-2 和 AKT 的磷酸化,阻断 VEGFR-2 的信号转导,从而抑制肿瘤血管生成。Okumura 等<sup>[11]</sup>提出 VEGF 与 VEGF 受体结合激活 PI3K/Akt 信号通路,PI3K/Akt 信号通过影响 VEGF 表达调节血管生成,同时 PI3K/Akt 信号可以抑制 TSP-1。TSP-1 蛋白还可与 CD36 分子、caspase-3、p59fyn 及 p38MAPK 等分子结合,减弱内皮细胞生长和迁移,促进内皮细胞凋亡,从而发挥有力的抗血管生成效应。白血病的特征是白血病原始细胞在骨髓中不断积累的恶性肿瘤。骨髓血管生成对白血病的发生和骨髓微血管密度 (microvessel density, MVD) 增加具有重要作用。骨髓微血管密度在急性白血病 (acute leukemia, AL)、慢性白血病 (chronic leukemia, CL)、MDS 中均有增加<sup>[12]</sup>。高燕<sup>[13]</sup>发现在白血病发病初期, TSP-1 阳性率低,骨髓 MVD 显著升高;治疗缓解后, TSP-1 阳性率升高,骨髓 MVD 降低。表明 TSP-1 表达与 MVD 呈负相关。白血病患者的骨髓和健康对照相比血管密度增加,提示白血病的进展可能会伴随着血管化增加。B 细胞-慢性淋巴细胞白血病 (B-cell chronic lymphoblastic leukemia, B-CLL) 与健康对照相比血浆中 TSP-1 水平明显下降,而骨髓血管增加<sup>[14]</sup>。Shanafelt 等<sup>[15]</sup>研究发现 TSP-1 水平较低的患者疾病进展时间缩短,表明血管生成增加与 B-CLL 临床进展相关。

### 2.3 TSP-1 诱导白血病细胞凋亡

TSP-1 与其受体 CD36 结合,激活 caspase-3,从而诱导内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡。Li 等<sup>[3]</sup>研究发现 TSP-1 诱导 CD36 阳性细胞株 CHRF-288-11、Meg-01 和 HL-60 的凋亡,但是不能诱导 CD36 阴性细胞株 K562 的凋亡。加入抗 CD36 抗体 FA6-152 或血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 可显著抑制 TSP-1 的效应。TSP-1 也显著诱导 B 细胞-急性淋巴细胞白血病 (B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 的细胞凋亡,CD36 阴性的细胞不易受 TSP-1 和 FA6-152 的影响。从而证实了 TSP-1 对白血病细胞表现了直接的诱导凋亡效应。Bruehl 等<sup>[16]</sup>发现全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 促进白血病细胞株 HL-60 和 NB4 分泌 TSP-1, TSP-1 可抑制 2 种细胞的生长,促进分化,诱导凋亡。在 NB4 细胞中 TSP-1 诱导凋亡的作用较 ATRA 强,但是 TSP-1 诱导的 HL-60 和 NB4 细胞的分化和凋亡与 Bcl-2 或 Bax 的表达改变不一致,表明和 ATRA 不同, TSP-1 诱导 HL-60 和 NB4 细胞的分化不依赖于 Bcl-2 调节。同时发现位于 TSP-1 的 NH2 端和 I 型重复序列的 2 种肝素结合肽 (Hep-I 和 GGWSHW) 能促进 HL-60 和 NB4 细胞的凋亡,表明细胞表面肝素分子可能参与 TSP-1 对早幼粒细胞的凋亡效应。ATRA 能成功诱导大部分 APL 患者缓解,但耐 ATRA 复发是仍一个重要的问题。Saumet 等<sup>[17]</sup>发现 TSP-1 除了在 NB4 细胞中表达外,在 ATRA 耐药的细胞株 NB4-LR1 中也有表达,同时 TSP-1 可诱导 NB4-LR1 细胞的凋亡。TSP-1 诱导的 NB4-LR1 白血病细胞凋亡是以 caspase 非依赖性机制为特征, TSP-1 分子的 C-末端结构域由 3 型重复序列和 C-末端球形区域组成,在白血病细胞中连接 CD47 和整合素  $\alpha\beta 3$  诱导 caspase 非依赖的细胞凋亡。TSP-1 与 CD47 结合也可以诱导 B-CLL 中 caspase 非依赖性的细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

### 2.4 TSP-1 与感染并发症的关系

感染并发症一直是 AML

患者发病率和病死率的主要诱因。TSP-1 是多功能蛋白,炎症时分泌到 ECM,调节参与免疫的多种成分。近期多项研究表明感染发生时 TSP-1 与 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)有一定的相关性。Schnetzke 等<sup>[19]</sup>分析 155 例接受诱导化学治疗的 AML 患者 TLR2 和 TLR4 多态性,发现 TLR4 多态现象 Asp299Gly 和 Thr399Ile 是发展为败血症和肺炎的独立危险因素。证明了 Toll 样受体(TLR4 和 TLR2)多态性与 AML 感染并发症的危险性相关。Barcellini 等<sup>[20]</sup>通过对 95 例 B-CLL 患者 TLR4 和 TLR9 基因表达的分析发现,B-CLL 中 TLR4 和 TLR9 表达与感染、自身免疫和疾病恶化相关。TLR4 减少的患者疾病恶化和自身免疫疾病进展的危险性增加。TSP-1 激活巨噬细胞 TLR4 通路。Li 等<sup>[21]</sup>研究发现 TSP-1 敲除小鼠的巨噬细胞可诱导炎症表现,提示 TSP-1 在激活巨噬细胞中发挥重要作用。后期用重组的人血小板 TSP-1 处理,能刺激骨髓诱导的巨噬细胞 TNF- $\alpha$  表达。同时,TSP-1 也可刺激 TLR4 表达和 NF- $\kappa$ B 活化。TSP-1 介导的 TNF- $\alpha$  生成增加在 TLR4 缺乏的巨噬细胞中消失,表明 TSP-1 通过 TLR4 通路激活巨噬细胞。TSP-1 也刺激体内巨噬细胞 TLR4 活性。此外,用抗体阻断 TSP-1 和 CD36 之间的联系后,TSP-1 调节的巨噬细胞活性减弱,表明 TSP-1 刺激的巨噬细胞通路部分上受 TSP-1 与 CD36 相互作用的调节。

### 3 TSP-1 与白血病的诊断及治疗

研究表明 TSP-1 基因启动子区域 CpG 岛高甲基化在儿童肾透明细胞肉瘤(CCSK)<sup>[22]</sup>、类癌等肿瘤具有特异性,可作为此类肿瘤的特异性诊断标志。Fleitais 等<sup>[23]</sup>发现 TSP-1 表达与非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)患者的预后具有相关性。VEGF 和 TSP-1 可作为进展期 NSCLC 预后评估的标志。TSP-1 在白血病诊断及预后判断的研究相对较少。Shanafelt 等<sup>[24]</sup>提出 CLL 细胞可以持续分泌 TSP-1,临床上 VEGF:TSP-1 比例可以预测 CLL 患者对免疫治疗的反应。提示了 TSP-1 在预测白血病治疗反应中有一定的意义。

TSP-1 基因启动子异常甲基化具有可逆性,逆转启动子区域甲基化可以使沉默的基因重新表达。TSP-1 基因 CpG 岛在 RAJI、Jurkat、K562、MOLT3、HL-60 等白血病细胞株存在高甲基化<sup>[8]</sup>,经去甲基化药物地西他滨(5-aza-zdc)处理后其甲基化水平下降,TSP-1 表达上调,细胞表现为生长抑制、分化和凋亡。刘澎等<sup>[25]</sup>将 TSP-1 重组腺病毒(ADV-TSP1)转染入 K562 细胞裸鼠体内,发现移植瘤的生长显著受抑。TSP1f 重组腺病毒(ADV-TSP1f)通过抑制肿瘤细胞所处微环境内血管内皮细胞的增殖,降低血供,减少肿瘤生长刺激因子,从而达到抑癌作用。另外,TSP-1 诱导 CD36 阳性的白血病细胞的凋亡,证实 TSP-1 对白血病细胞表现了直接的诱导凋亡效应,能够作为一种常规治疗的辅助方法被研究,尤其是对表达 CD36 或 TSP-1 其他受体的白血病细胞<sup>[3]</sup>。ATRA 在调节细胞生长、分化和死亡方面有重要功能,TSP-1 能调节生长抑制和死亡应答。TSP-1 有助于提高 APL 对 ATRA 的治疗反应。TSP-1 在 ATRA 耐药的 APL 治疗中具有一定的价值,最适合药物开发的 TSP-1 信号分子靶点的识别有待进一步探索<sup>[19]</sup>。

### 4 展 望

抑癌基因启动子甲基化是细胞癌变过程一个早期、频发事件,TSP-1 基因启动子区域 CpG 岛甲基化与肿瘤及白血病的发生密切相关。TSP-1 是一种多功能糖蛋白,在白血病中主要

起抑制骨髓微血管生成、抑制白血病细胞生长,促进分化和凋亡的作用。近期研究发现 TSP-1 与 TLR4 相互作用与 AML 感染并发症有密切关系。深入研究 TSP-1 基因启动子区域 CpG 岛甲基化、TSP-1 蛋白在白血病发生、发展中的相关机制,对于白血病的早期诊断、治疗及预后评估有着积极的意义。

### 参考文献

- [1] Döhner H, Gaidzik VI. Acute myeloid leukemia in the age of genomics: Impact of genetic features on treatment decisions in AML[J]. *Hematology*, 2011, 2011: 36-42.
- [2] Adams JC, Lawler J. The thrombospondins[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36 (6): 961-968.
- [3] Li K, Yang M, Yuen PM, et al. Thrombospondin-1 induces apoptosis in primary leukemia and cell lines mediated by CD36 and Caspase-3[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 12(6): 995-1001.
- [4] Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2011, 2011(2): 296069.
- [5] Pettersen RD. CD47 and death signaling in the immune system[J]. *Apoptosis*, 2000, 5(4): 299-306.
- [6] Lomberk G. Epigenetics[J]. *Pancreatol*, 2007, 7(5/6): 396-397.
- [7] Li Q, Ahuja N, Burger PC, et al. Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer[J]. *Oncogene*, 1999, 18(21): 3284-3289.
- [8] Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2217-2224.
- [9] Greco M, D'Alò F, Scardocci A, et al. Promoter methylation of DAPK1, E-cadherin and thrombospondin-1 in de novo and therapy-related myeloid neoplasms [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 45(3): 181-185.
- [10] Kaur S, Martin-Manso G, Pendrak ML, et al. Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(50): 38923-38932.
- [11] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, et al. PI3K/AKT/PTEN signaling as a molecular target in leukemia angiogenesis[J]. *Adv Hematol*, 2012, 2012: 843085.
- [12] Aguayo A, Kantarjian H, Manshoury T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. *Blood*, 2000, 96(6): 2240-2245.
- [13] 高燕. 测定 MVD、TSP-1 在白血病中的临床意义[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(30): 12-13.
- [14] Go RS, Jobe DA, Asp KE, et al. Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. *Ann Hematol*, 2008, 87(5): 369-373.
- [15] Shanafelt TD, Ramsay AG, Zent CS, et al. Long-term repair of T-cell synapse activity in a phase II trial of chemimmunotherapy followed by lenalidomide consolidation in previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL)[J]. *Blood*, 2013, 121(20): 4137-4141.

- [16] Bruel A, Touhami-Carrier M, Thomaidis A, et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) and TSP-1-derived heparin-binding peptides induce promyelocytic leukemia cell differentiation and apoptosis[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(2A): 757-764.
- [17] Saumet A, Slimane MB, Lanotte M, et al. Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/ $\alpha$ v $\beta$ 3 in promyelocytic leukemia NB4 cells[J]. *Blood*, 2005, 106(2): 658-667.
- [18] Mateo V, Brown EJ, Biron G, et al. Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: Link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization[J]. *Blood*, 2002, 100(8): 2882-2890.
- [19] Schnetzke U, Spies-Weissart B, Yomade O, et al. Polymorphisms of toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia[J]. *Genes Immun*, 2015, 16(1): 83-88.
- [20] Barcellini W, Imperiali FG, Zaninoni A, et al. Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease progression[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(8): 1768-1773.
- [21] Li Y, Qi X, Tong X, et al. Thrombospondin 1 activates the macrophage Toll-like receptor 4 pathway[J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(6): 506-512.
- [22] Ueno H, Okita H, Akimoto S, et al. DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62233.
- [23] Fleitas T, Martinez-Sales V, Vila V, et al. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(11): 897-902.
- [24] Shanafelt TD, Byrd JC, Laplant B, et al. Pretreatment angiogenic cytokines predict response to chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2009, 146(6): 660-664.
- [25] 刘澎, 王一, 杨仁池, 等. 腺病毒介导的凝血酶敏感蛋白 1 抗血管新生生物基因转移抑制 K562 细胞裸鼠体内生长[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(6): 485-488.
- (收稿日期: 2015-05-11 修回日期: 2015-07-10)
- 综 述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.044

## 基于 PCR 的几种分子检测技术在布鲁氏菌鉴定中的应用

赵 波<sup>1</sup>综述, 崔步云<sup>2△</sup>审校

(1. 重庆市疾病预防控制中心微生物所 400042; 2. 中国疾病预防控制中心传染病所, 北京 102206)

[关键词] 聚合酶链反应; 分子检测; 布鲁氏菌

[中图分类号] R117

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)34-4868-02

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌属的细菌侵入机体引起的人兽共患传染病, 常造成牲畜流产和人类多器官的损害。布鲁氏菌属基于宿主特异性分为 6 个种 19 个型: 马耳他布鲁氏菌(羊型布鲁氏菌)3 个型、流产布鲁氏菌(牛型布鲁氏菌)8 个型、猪布鲁氏菌 5 个型和犬种布鲁氏菌、林鼠布鲁氏菌、绵羊布鲁氏菌各 1 个型<sup>[1]</sup>, 其中, 引起人类疾病的主要有羊、牛、猪和狗布鲁氏菌。布鲁氏菌遍布全球, 是一个在世界范围内发生的流行性疾病, 严重危害流行地区的人们健康和带来巨大的经济损失。全世界 160 多个国家和地区每年向 WHO 报告发病例数 50 万例<sup>[2]</sup>。中国从 2000 年起布鲁氏菌病疫情出现上升趋势, 并且由原来主要局限在几个重要的牧区, 近几年全国几乎所有省(自治区、直辖市)都有病例报道, 人间发病率达到 1.55/10 万<sup>[3]</sup>。由于布鲁氏菌的病原学和致病特点, 大量的活菌操作都被要求在生物安全三级实验室中进行<sup>[4]</sup>, 而关于布鲁氏菌的常规的细菌学鉴定, 比如生化、生物学等鉴定都涉及大量活菌的操作, 但国内的实际是三级实验室只有极少数实验室装备。因此, 近年发展起来的基于聚合酶链反应(PCR)检测与鉴定布鲁氏菌的一些方法引起了大家的重视, 与常规的检测方法比较,

它需要的菌量少, 并且不要求活菌, 极大地降低了实验室感染概率, 在生物安全二级实验室就可以进行。本文就目前基于 PCR 检测和鉴定布鲁氏菌的方法的研究和应用综述如下。

### 1 普通 PCR 检测技术

普通 PCR 根据布鲁氏菌的一段特异性核酸序列来设计引物, PCR 检测布鲁氏菌最早是由 Baily 报道的, 目前使用得较多的目标基因有 16SrRNA、BCSP31、omp2<sup>[4-8]</sup>等。选择不同的目标基因对检测的结果敏感性和特异性都有影响<sup>[9]</sup>, 有研究以 16SrRNA、BCSP31、omp2 作为目标基因进行比较, 研究它们在血中做 PCR 检测布鲁氏菌的灵敏度和特异度差异, 得出 16SrRNA 检测相对灵敏度是最低的, 而 BCSP31 检测是最敏感的<sup>[10]</sup>。

### 2 多重 PCR 检测技术

多重 PCR 在微生物检测中的应用一般是设计多种病原微生物的特异性引物, 在同一 PCR 反应管进行 PCR 扩增, 可用于同时检测多种病原体或鉴定出是哪一型病原体感染。Probert 等<sup>[11]</sup>对多重 PCR 检测布鲁氏菌进行了研究, 但只能区分少数的几种布鲁氏菌。García-Yoldi 等<sup>[12]</sup>根据布鲁氏菌不