

- 综合征危险分层中的诊断价值[J]. 国际心血管病杂志, 2010, 37(4): 246-249.
- [17] Reddy C, Cyriac C, Desle HB. Role of "ischemia modified albumin" (IMA) in acute coronary syndromes[J]. Indian Heart J, 2015, 66(6): 656-662.
- [18] 蒋晓钦, 王利, 陈招进. IMA 与血清 cTnI 在急性冠状动脉综合征患者发病早期的诊断价值[J]. 重庆医学, 2014, 43(34): 4682-4683.
- [19] 余平安, 潘峰. IMA 及 cTnI 在早期诊断 ACS 病情评估中的价值[J]. 检验医学, 2015, 30(3): 234-237.
- [20] Bali L, Cuisset T, Giorgi R, et al. Prognostic value of ischemia-modified albumin in patients with non-st-segment elevation acute coronary syndromes[J]. Arch Cardiovasc Dis, 2008, 101(10): 645-651.
- [21] Aparci M, Kardesoglu E, Ozmen N, et al. Prognostic significance of ischemia-modified albumin in patients with acute coronary syndrome[J]. Coron Artery Dis, 2007, 18(5): 367-373.
- [22] 严山, 张学锋, 温绍君, 等. 缺血修饰清蛋白与急性冠状动脉综合征预后的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(8): 1278-1280.
- [23] Dumlu EG, Toka M, Bozkurt B, et al. Correlation between the serum and tissue levels of oxidative stress markers and the extent of inflammation in acute appendicitis[J]. Clin Sci, 2014, 69(10): 677-682.
- [24] Li J, Wang JS, Xie ZX, et al. Correlations among copeptin ischemia-modified albumin and the extent of myocardial injury with acute Carbon monoxide poisoning[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3): 10384-10389.
- [25] Gothe PR, Jose MV, Pai VR, et al. Investigation of the possibility of using serum ischemia modified albumin as a novel and early marker of the extent of oxidative stress induced by various tobacco products[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(11): ZC33-ZC35.
- [26] Kirboga K, Ozec AV, Kosker M, et al. The association between diabetic retinopathy and levels of Ischemia-Modified albumin, total thiol, total antioxidant capacity, and total oxidative stress in serum and aqueous humor[J]. J Ophthalmol, 2014, 21(16): 820-823.

(收稿日期:2016-02-17 修回日期:2016-06-12)

· 综 述 ·

端粒酶分析方法的研究进展^{*}

董雪梅, 贺 锐, 章国平, 蒲巍林 综述, 杜晓钟[△] 审校
(甘肃省妇幼保健院, 兰州 730050)

关键词: 端粒; 端粒酶; 端粒酶活性; 测定方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2738-03

端粒和端粒酶是近年来生命科学研究的热点之一, 其在肿瘤临床检测与治疗中已得到广泛研究, 但在生殖领域尚属起步阶段。人端粒酶活性(TA)是精子发生高度敏感性和特异性的标志物, 生殖细胞中端粒酶的检测特别是对原发性无精子症患者睾丸灶性精子发生的诊断具有重要的临床意义^[1]。

1 TA 检测的研究进展

TA 的早期检测是 Morin^[2] 建立的端粒重复序列延伸法, 即利用端粒酶自身反转录合成端粒末端片断的特性进行端粒合成, 然后通过加入 RNase 破坏端粒模板, 采用 12% 聚丙烯酰胺电泳分离, 放射显影可见阳性条带。该方法稳定性较好, 但所需标本量大, 敏感性差, 实验复杂, 所需时间长。

Kim 等^[3] 建立端粒重复扩增法(TRAP), 该法将端粒酶的反应产物应用聚合酶链反应(PCR)大量扩增, 使测定的敏感性提高了约 10 000 倍, 是近年来被全世界普遍采用的方法, 但该法需将扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行放射显影, 因使用放射性同位素标记, 易有放射性污染且价格昂贵, 方法十分繁杂, 临床推广应用受到一定限制。

1996 年德国 Boehringer 公司用标记地高辛探针检测端粒酶扩增产物, 推出端粒酶-ELISA 检测试剂盒, 该法极大简化了 PCR 产物检测操作步骤, 4 h 内即可得到检测结果, 但试剂盒不同批号间常出现较大差异, 且试剂价格极为昂贵, 临床无法常规应用。虽现有公司提供地高辛标记的引物, 但该试剂是否稳定, 尚待进一步探讨。

2 TA 的改进检测技术

目前研究 TA 定量检测方法是为了减少繁琐费时的 PCR 检测步骤, 改进循环条件, 提高敏感性和线性。端粒酶表达常见方法有电泳法和酶免法。

2.1 改良端粒重复序列扩增(TRAP)-银染法 利用端粒酶在体外的 RNA 模板区为模板, 在适宜的寡核苷酸链的末端添加 6 个碱基的重复序列特性, 采用 PCR 方法扩增此重复序列, 并进而用聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 6 个碱基差异的梯带。根据 Kim 等^[3] 的端粒重复片段扩增方法, 首先合成 1 个 18 nt 的 TS 做上游引物, 端粒酶结合 TS 末端的 GTT 并合成 AGGGTAG, 然后每经过 1 次转位合成 1 个 GGTTAG 的 6 核碱基重

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(ZS031-A25-065-E)。

△ 通讯作者, E-mail: dxzh5678@163.com。

复序列,端粒酶灭活后,加入 CX 做下游引物,经过多次变性—退火—延伸,扩增端粒酶延伸产物。阳性结果在凝胶电泳上显示相隔 6 bp 的梯状条带,条带的多、寡、深或浅表示 TA 大小。采用银染方法用于 TRAP-PCR 标记染色,既解决了同位素的放射性污染问题,又简便、安全、省时,敏感性较溴化乙锭染色高 5~10 倍^[4]。另外,硝酸银染色仅在可见光下即可观察,实验结果还可经凝胶干燥后长期保存。因此,该方法有望成为生殖细胞 TA 检测及恶性实体瘤早期诊断、高危患者筛选及微转移癌灶的追踪等新的分子生物学方法。

2.2 聚合酶链反应-酶免法(PCR-ELISA) 检测原理为端粒酶自带模板将端粒重复片段(TTAGGG)加到生物素标记、人工合成的 P1-TS 引物的 3' 端,经 PCR 反复扩增 P1-TS 和 P2 引物间的特异产物,产生含有端粒酶特异的 6 核苷酸重复序列的 PCR 产物。将 PCR 产物变性后,与地高辛标记,并对端粒重复片段特异的探针杂交,杂交产物通过生物素标记的引物固定在抗菌药物蛋白包被的微孔板上。然后采用与过氧化物酶结合的抗地高辛抗体(Anti-DIG-POD)检测经固定的 PCR 产物。最后加入过氧化物酶的反应底物 TMB,便可产生一着色反应产物,测定 450 nm 和 690 nm 的吸光度(A)值。根据公式 A=A450-A690。

端粒酶 PCR-ELISA 方法简单、方便、敏感,PCR 扩增以后,通过特异性探针与 PCR 变性产物杂交而检测,特异性强,可以避免 PCR 反应后的假阳性和假阴性,且易于定量,是检测 TA 较理想的方法,将有更广泛的临床应用前景。

2.3 荧光素-抗荧光素系统检测法 由于荧光素标记引物较为简便、稳定,用荧光素-抗荧光素系统代替地高辛-抗地高辛耦联法,效果良好。该法有较好的敏感性与重复性,较银染法更为简便快速,无同位素污染,检测成本低,有较好的推广应用价值。

2.4 端粒酶相关功能蛋白的检测 目前研究发现 TA 至少受端粒酶 RNA(hTR)、端粒酶相关蛋白(TP1/TLP1)及端粒酶催化亚单位(hTERT)的影响。hTR 是合成端粒 DNA 的模板,提供模板合成端粒重复序列。端粒酶在其 3' 端生成 451 个核苷酸的转录产物。反转录是在 5' 末端 46~53 个核苷酸处发生,该反应靠近端粒 DNA 序列。分析 hTR 的 2 级结构,可预测 TA。目前用以预测 hTR 的 2 级结构的方法是研究 hTR 的 4 个构成组件,包括 CR2/CR3 结构域,aCR4/CR5 结构域, H/ACA (CR6/CR8) 盒,CR7 结构域^[5]。TP1/TLP1 的功能尚未阐明,可能不仅是结构蛋白,还是一种调节端粒酶与其他分子相互作用的调节亚单位。hTERT 是 TA 调节的主要部分,对 TA 表达及维持端粒长度起决定性作用。有学者使用 TaqMan 荧光检测系统建立了实时定量 RT-PCR 检测 hTERT 相关基因表达。

2.5 TA 相关调节因子检测 TA 在人体细胞受到严格的调控,这个调控过程涉及一些蛋白激酶,如 hTERT 基因在体外磷酸化的蛋白激酶 AKT,被确定为 TA 负调节的蛋白激酶 c-ABL。蛋白激酶 C 家族的成员是端粒酶反转录酶在体外磷酸化,导致 TA,刺激 hTERT 启动子活性的关键酶。激酶 SRC 作为 TA 的负调节,负责 hTERT 在氧化应激反应过程中的磷酸化反应。其他几个激酶(如 ERK1/2 和 JNK)也被认为负责 TA 调控,但其作用机制尚不清楚^[6-9]。

3 结语

近年来,有关端粒酶的研究异常活跃,绝大多数生物细胞 DNA 的端粒随着细胞分裂而缩短,当缩短到一定长度,即达到危机点时,细胞不再分裂而衰老、死亡,少数细胞逃逸危机点,激活端粒酶,从而永生或恶变^[10]。正常机体细胞中 TA 不表达,而在干细胞、生殖细胞和 90% 的恶性肿瘤细胞中却特异地表达^[11-13]。随着对端粒酶结构、功能及调控的深入研究,其在细胞永生化及癌变中的作用也有了新的认识,生殖细胞中可检测到 TA,端粒酶在人类生殖发育中发挥着重要作用,可通过端粒酶的研究来探索影响人类生殖能力的相关因素及机制,以期对人类生殖功能、胚胎质量进行监控。有研究表明,端粒酶 RNA 基因在男性不育症患者睾丸组织中的表达与生殖细胞的分布定位一致,在精细胞不发育患者睾丸组织中无端粒酶 RNA 基因的表达,提示 TA 的缺乏可能是生殖细胞发育停滞的原因之一^[14]。

目前,端粒酶分析方法尚缺乏标准化,随着端粒酶检测技术的进一步发展,可制订 TA 定性及定量的标准化检测方法,从而研究端粒酶的表达在相关疾病监测、疗效和预后判断中的作用。深入研究端粒酶在男性生殖生理及病理学意义,探讨激素及其他药物治疗的端粒酶机制,使端粒酶技术成为诊断及治疗男性生殖疾病的重要手段之一。

参考文献

- [1] 杜晓钟,陕文生,郑雷.少弱精子症患者精浆中精子及睾丸组织端粒酶活性实验研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1277-1278.
- [2] Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats[J]. Cell, 1989, 59(3):521-529.
- [3] Kim N, Piatyszek M, Prowse K, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193):2011-2015.
- [4] Spagnolo DV, Turbett GR, Dix B, et al. Polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis(PCR-SSCP): a novel means of detecting DNA mutation[J]. Adv Anat Pathol, 1994, 1(2):61-65.
- [5] Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, et al. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene [J]. Cancer Res, 1991, 59(20):6087-6090.
- [6] Breitschopf K, Zeiher AM, Dommeler S. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism[J]. FEBS Lett, 2001, 493(1):21-25.
- [7] Chang JT, Yc L, Chen YJ, et al. hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells[J]. Br J Cancer, 2006, 86(94):870-878.
- [8] Haendeler J, Hoffmann J, Brandes RP, et al. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphoryl-

ation of tyrosine 707 [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(13): 4598-4610.

[9] Bermudez Y, Yang H, Cheng JQ, et al. Pyk2/ERK 1/2 mediate Spl- and c-Myc-dependent induction of telomerase activity by epidermal growth factor [J]. Growth Factors, 2008, 26(1): 1-11.

[10] Wiener HG, Mian C, Haitel A, et al. Can urine bound diagnostic tests replace Cytoscopy in the management of bladder cancer [J]. Urol, 1997, 159(6): 1876-1880.

[11] Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, et al. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele [J]. Fertil Steril, 1988, 50(5): 795-

800.

[12] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787-791.

[13] Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors [J]. Natl Cancer Inst, 1996, 88(2): 116-122.

[14] 叶哲伟,陈晓春,范民,等.男性不育症患者睾丸组织中端粒酶RNA表达状况的研究[J].华中科技大学学报(医学版),2003,32(1):58-61.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-06-13)

· 综述 ·

中药过敏反应中细胞因子的表达

顾 敏^{1,2} 综述, 谢雁鸣^{1△} 审校

(1. 中国中医科学院中医临床基础研究所, 北京 100700; 2. 河北省石家庄市中医院 050000)

关键词: 人类T辅助细胞1/人类T辅助细胞2; 白细胞介素-4; 中药注射剂; 过敏反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.033

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2016)19-2740-03

人类T辅助细胞(Th)亚群的特征是其产生的细胞因子种类不同^[1]。其中以分泌白细胞介素-2(IL-2)和干扰素-γ(IFN-γ)为主的称为Th1, 主要介导细胞免疫等; 分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等称为Th2, 主要介导体液免疫和过敏反应^[2]。Th1和Th2分别介导2类应答不仅在宿主防御机制中发挥不同作用, 也参与不同免疫病理过程。持续Th1细胞强烈应答可能与自身免疫病等有关。过度Th2细胞应答, 则可能在遗传易感的个体引发过敏特应性。

传统认为过敏反应的主要机制是Th1/Th2免疫功能失衡所致气道炎性变化、多种细胞浸润、气道组织结构改变^[3]。上市后中药注射剂作为注入性(可溶性)抗原, 引起的过敏反应属于I型超敏反应(I型变态反应), 故I型超敏反应是上市后中药注射剂免疫毒性监测的重点内容。多种原因导致的Th1/Th2偏移贯穿于过敏反应各个阶段^[4]。

1 上市后中药注射剂过敏反应监测背景

全世界每年约有千种以上的新化合物作为商品进入人类的环境, 在现有上市药用化合物中, 有相当数量未进行免疫毒理学评价。中药注射剂作为我国特有的中药创新剂型, 与传统中药剂型相比有生物利用度高、起效迅速、作用可靠等优点, 主要应用在心脑血管疾病、肿瘤、感染性疾病、呼吸系统疾病, 以及一些危急重症的抢救和治疗中。中药注射剂发挥临床疗效的同时其安全性也被广泛关注, 并成为制约其进一步现代化和国际化的瓶颈之一。国际组织免疫毒性研究指南提示体液免疫超敏反应、免疫刺激的关键指标为研究上市后中药注射剂免疫毒理学作用监测提供了一定的依据。

上市后中药注射剂多成分复杂且有效成分尚不完全清楚, 研究表明, 与中药注射剂有关的药品不良反应(ADR)中, 92% 属于变态反应(AR), 解决中药注射剂引起的变态反应是中药

注射剂研制的一项重要工作^[5]。

2 上市后中药注射剂过敏反应的监测依据

美国国立变态反应和感染性疾病研究所(NIAID)与食物过敏及急性全身过敏反应联盟(FAAN)制订的急性全身过敏反应的诊断标准包括:皮肤过敏反应、呼吸道过敏反应、消化道过敏反应等^[6]。可对95%的患者作出急性全身过敏反应的诊断。

上市后中药注射剂相关ADR主要是速发型, 其中发生率最高的是以I型变态反应为主的急性变态反应, 一般认为与遗传、免疫及对生理、药理介质反应异常有关^[7]。有统计显示, 374例中药注射剂ADR的发生时间, 在用药后数秒至60 min之内者256例, 占70%^[5]。

3 Th1/Th2 监测

3.1 Th1/Th2 监测对过敏反应特异性诊断的意义 有研究发现, T淋巴细胞的免疫调节作用失常(CD4⁺Th1细胞功能不足, CD4⁺Th2细胞功能亢进, Th1/Th2比值低于正常), 与I型过敏反应发生密切相关。Th1/Th2失衡是哮喘发病的关键机制^[8]。IL-4、IL-2、IFN-γ的相互作用是维持Th1/Th2平衡的关键。Th1/Th2失衡尤其是Th2应答增强并分泌IL-5等诱导嗜酸性粒细胞浸润是哮喘发病的重要因素。

3.2 Th1/Th2 的监测方法 (1)酶联免疫吸附法测定可溶性细胞因子反映总细胞因子分泌量, 但不能确定分泌特定细胞因子的细胞亚群。(2)流式细胞术能实现单细胞水平的细胞因子检测, 逐渐成为鉴别Th1和Th2细胞亚群的重要手段。一般认为, Th1的表型为CD4⁺IFN-γ⁺, 而Th2的表型为CD4⁺IL-4⁺^[9]。

4 Th1/Th2型相关细胞因子作为过敏反应特异性诊断

4.1 IL-4 免疫球蛋白E(IgE)抗体在速发型过敏反应机制