

2016,23(6):627-629.

[6] 徐金霞,刘福忠,吴兆晴,等. 双侧髂内动脉球囊临时阻断术在凶险性前置胎盘剖宫产术中的应用[J]. 东南大学学报(医学版),2017,36(6):1019-1023.

[7] 常丽花,闫飞艳,张美. 剖宫产术后再次妊娠孕妇阴道分娩成功影响因素回顾性分析[J]. 空军医学杂志,2017,33(3):184-186.

[8] 郭瑶,杨金娜,于跃辉. 选择性剖宫产新生儿呼吸窘迫综合征临床特征研究[J]. 临床军医杂志,2017,45(7):725-728.

[9] 胡小黎,徐鑫芬,马冬梅. 延迟结扎脐带对新生儿和产妇的影响[J]. 中华护理杂志,2014,49(7):862-866.

[10] 邵肖梅,叶鸿瑁,丘小汕. 实用新生儿学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:222-225.

[11] 谢琴,姜艳华,黄红丽. Toll 样受体 4 在妊娠期糖尿病患者外周血和胎盘组织中的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(14):1901-1903.

[12] 张展,王媛媛,李爱萍,等. 子痫前期患者胎盘组织中 miR-155 及 CXCR4 的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(9):1167-1171.

[13] RABE H,DIAZ-ROSSELLO J L,DULEY L,et al. Effect of timing of umbilical cord clamping and other strategies

to influence placental transfusion at preterm birth on maternal and infant outcomes[J]. Cochrane Database Syst Rev,2012,15(8):CD003248.

[14] 万俊,王向烨,包志丹,等. 延迟结扎脐带对新生儿缺血性贫血及铁储备的影响[J]. 安徽医药,2015,19(4):728-729.

[15] 胡小黎. 不同时间延迟结扎脐带对阴道分娩早产儿的影响[D]. 杭州:浙江大学,2015.

[16] 高燕,王静竹,彭峰,等. 延迟结扎脐带对新生儿黄疸及红细胞增多症的影响[J]. 中国妇幼保健杂志,2016,7(1):59-62.

[17] MASCOLA M,PORTER T F,CHAO T. Committee opinion no. 684:delayed umbilical cord clamping after birth[J]. Obstet Gynecol,2017,129(1):e5-10.

[18] 罗茜,康玲,尹国武,等. 延迟结扎脐带对母儿围产期结局的影响[J]. 现代生物医学进展,2017,17(31):6061-6065.

[19] LONA REYES J C,PÉREZ RAMÍREZ R O,LLAMAS RAMOS L,et al. Neonatal mortality and associated factors in newborn infants admitted to a Neonatal Care Unit[J]. Arch Argent Pediatr,2018,116(1):42-48.

(收稿日期:2018-08-10 修回日期:2018-11-28)

• 短篇论著 •

高原地区血细胞 VHL 基因变化与红细胞增多症的相关性分析

马晓燕,刘淑敏

(青海红十字医院检验科,青海西宁 810000)

摘要:目的 探讨高原地区血细胞 VHL 基因变化与红细胞增多症的相关性。方法 选择 2016 年 5 月至 2017 年 5 月该院收治的红细胞增多症患者 30 例作为研究组,选择同期健康体检人员 30 例作为对照组。对比两组研究对象 VHL 基因变化及与相关因素之间的联系。结果 研究组患者 VHL 基因拷贝数显著低于对照组,年龄、促红细胞生成素(EPO)均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);两组研究对性别分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$);研究组白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白和血细胞比容等均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);研究组 VHL 基因拷贝数、EPO、红细胞计数和血红蛋白与红细胞增多症呈显著正相关($P<0.05$);VHL 基因拷贝数和 EPO 是红细胞增多症的重要危险因素($P<0.05$)。结论 高原地区红细胞增多症患者普遍存在 VHL 基因拷贝数下降的问题,与病情的发展存在密切联系。

关键词:高海拔; 血细胞; 基因; 红细胞增多症; 危险因素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.033

中图法分类号:R555+.1;R446.61

文章编号:1673-4130(2019)02-0253-04

文献标识码:B

红细胞增多症的发生、发展具有显著的个体差异及种族差异,有研究表明,高原低氧导致促红细胞生成素(EPO)水平上升,从而引起骨髓造血能力升高,是疾病发生的重要因素^[1]。EPO 受各方面因素的影响,在供氧不足的情况下会造成缺氧诱导因子-1(HIF-1)水平升高,HIF-1 能结合缺氧反应元件,从而

刺激 EPO 的表达,最终诱发红细胞增多症。VHL 基因指导合成的 VHL 蛋白能借助于泛素化从而控制 HIF-1 水平,所以,在红细胞增多症患者的发病过程中具有重要影响。同时,最新研究表明,部分疾病易感性与 VHL 基因拷贝数存在重要的联系^[2]。本研究主要分析了高原红细胞增多症患者 VHL 基因拷贝数

的变化情况及二者的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 5 月至 2017 年 5 月本院收治的红细胞增多症患者 30 例作为研究组,其中男 19 例,女 11 例;年龄 26~59 岁,平均(48.19±2.21)岁;所有患者均世居高原,海拔为 4 500 m。纳入标准:(1)男性患者血红蛋白(Hb)超过 180 g/L,女性患者 Hb 超过 160 g/L,合并发绀、呼吸困难、头晕和毛细血管充血等;(2)高原地区持续居住时间超过 10 年。排除标准:(1)其他疾病导致的红细胞增多;(2)合并严重肝、肾功能障碍;(3)妊娠哺乳期女性。选取同期健康体检人员 30 例作为对照组,其中男 16 例,女 14 例;年龄 22~58 岁,平均(42.34±1.85)岁,在海拔超过 4 000 m 的高原持续生活超过 1 年。两组研究对象性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),有可比性。两组研究对象均对本研究知情同意。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 检测方法 采集两组研究对象空腹静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸抗凝后,-30℃条件下保存检测。DNA 提取应用全血基因组试剂盒(美国,OMEGA),提取研究对象血液样本中的总 DNA,应用分光光度仪(美国,Nanodrop)定量检测 DNA。 β -actin 作为本研究的看家基因,实时荧光定量 PCR 标准品为本实验室保存的人 β -actin 质粒。实时荧光定量 PCR 反应体系为 SYRB(含 dNTP、 Mg^{2+} 、Taq 酶、PCR buffer 等)12.5 μ L,灭菌水 10.5 μ L,模板 DNA 1 μ L,10 pmol/L 的上、下游引物共 1 μ L。PCR 扩增条件:95℃条件下持续加热 10 s,95℃ 5 s,60℃ 20 s 读板,40 个循环。温度从 50℃上升到 95℃,每上升 0.2℃读板 1 s,分析熔解曲线,计算 VHL 基因及 β -actin 的比值,从而得到 VHL 基因拷贝数。

1.3 观察指标 对比两组研究对象 VHL 基因拷贝数、一般资料及外周血常规指标,分析基因拷贝数变化与红细胞增多症的相关性^[3]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行分析,对计量资料进行正态检验,再分别描述正态分布资料、非正态分布资料组间比较应采用的统计学方法,结果部分先描述计量资料正态检验结果(提供相应的参考值),证实是正态或非正态分布后再采用正确的方法进行后续的组间比较。采用 logistic 回归模型进行相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组研究对象 VHL 基因拷贝数和一般资料比较 研究组 VHL 基因拷贝数显著低于对照组,研究组年龄、EPO 均显著高于对照组,差异均有统计学意

义($P<0.05$);两组研究对象性别构成比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 两组研究对象 VHL 基因拷贝数和一般资料比较					
组别	<i>n</i>	VHL 基因拷贝数 ($\bar{x}\pm s$)	性别(<i>n</i>)		EPO ($\bar{x}\pm s$,U/L)
			男	女	
对照组	30	0.093±0.021	19	11	42.34±1.85
研究组	30	0.072±0.025	16	14	48.19±2.21
<i>t</i> / χ^2		12.843	2.039		1.854
<i>P</i>		<0.05	>0.05		>0.05

2.2 两组研究对象外周血常规指标比较 研究组白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、Hb 和血细胞比容(Hct)均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组研究对象外周血常规指标比较($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	WBC ($\times 10^9$ L)	RBC ($\times 10^{12}$ L)	Hb(g/L)	Hct(%)
对照组	30	10.4±1.8	6.9±0.6	136.4±9.1	38.3±2.6
研究组	30	11.4±0.6	8.6±0.8	139.4±8.5	45.2±2.6
<i>t</i>		11.684	12.039	11.243	13.119
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 红细胞增多症与临床因子的相关性 研究组 VHL 基因拷贝数、EPO、RBC 和 Hb 与红细胞增多症呈显著正相关($P<0.05$)。见表 3。

表 3 红细胞增多症与临床因子的相关性						
项目	VHL 基因拷贝数	EPO	RBC	Hb	WBC	Hct
<i>r</i>	0.83	0.29	0.16	0.12	0.13	0.11
<i>P</i>	0.01	0.03	0.02	0.04	0.24	0.93

2.4 红细胞增多症风险因素的 logistic 回归模型分析 VHL 基因拷贝数和 EPO 是红细胞增多症的重要风险因素($P<0.05$)。见表 4。

表 4 红细胞增多症风险因素的 logistic 回归模型分析				
项目	χ^2	OR	95%CI	<i>P</i>
RBC	0.26	1.84	1.01~2.64	0.06
EPO	1.11	1.34	1.22~1.69	0.03
VHL 基因拷贝数	0.27	1.16	1.01~1.64	0.02
Hb	2.89	2.13	1.13~7.52	0.59

3 讨 论

红细胞增多症是人类生活在高原低压缺氧环境时红细胞出现代偿性过度增生的问题,从而使血液黏滞度显著上升,并引起血流阻力的升高,进而导致患者出现一系列症状、体征的临床综合征^[4]。

高原红细胞增多症可以说是临床较常见的一种

慢性高原病。随着海拔的上升(尤其是海拔高度超过 3 000 m 后),临床发病率呈显著上升的趋势,这是因为人体长期生活在高原慢性缺氧条件下,会出现一系列相应变化,如 RBC、Hb 和 Hct 水平显著上升^[5]。这是人体对高海拔缺氧状态的代偿保护机制。不过人体的自适应保护机制突破自身耐受程度时就会出现高原病,也就是高原适应衰退,从而给心脏、肺、肝、脾等器官带来一定程度的不良影响。

红细胞增多症的病理作用机制十分复杂,简言之就是高原居民机体中的动脉血氧分压水平和动脉血氧饱和度水平下降,动脉二氧化碳分压水平上升,导致细胞内部出现超微病理改变,进一步刺激炎症细胞因子、低氧诱导因子和 EPO 的表达,使造血干细胞持续分化,血液中 Hb、RBC 和 Hct 水平上升,通过这一途径来满足人体器官耗氧,适应低压、低氧的恶劣环境^[6]。如果低氧环境长期无法得到有效改善,就会影响人体内部的代偿平衡,导致器官、组织发生生理病理变化,进一步损伤人体器官、组织。因此,分析红细胞增多症的发病机制是预防、治疗红细胞增多症的主要途径,寻找该病的标志因子则是早期诊断的关键技术^[7]。尤其是随着近年来我国高原地区的持续深入开发及移居高原居民数量的上升,慢性高原病特别是红细胞增多症的预防及治疗成为高原地区卫生服务的主要内容之一。

人类 VHL 基因位于染色体 3p25,包括 2 个内含子及 3 个外显子,编码长度为 5 kb,参与构成多种复合蛋白体,同时,可调节人体中低氧诱导表达^[8]。本研究结果显示,红细胞增多症患者 VHL 基因拷贝数显著低于健康个体,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示该病患者 VHL 基因合成蛋白质水平下降,进一步影响 HIF-1 α 的降解功能,使 HIF-1 α 水平持续上升。HIF-1 α 水平持续升高会影响到 EPO 表达,增加 EPO 的生成及分泌。在这一背景下,人体中的红细胞就会出现继续增殖的问题。因此,红细胞增多症是 EPO 基因影响低氧诱导区的位点,从而诱发 T-G 突变及 T/G 杂合等错序排列,同时,低氧诱导区的 GG 区与 TT 区比较,表达频率上升^[9]。提示红细胞增多症患者的易感基因位点往往合并基因突变,同时,也为分子遗传层面分析该病提供了新的思路。此外,有研究分析了高原肺水肿患者,结果显示,这些患者普遍存在 HLA-DR6 及 DQ4 基因易感性,提示移居高原的红细胞增多症患者同样存在 HLA-DR6、DQ4 的易感性^[10]。

随着基因组工程的进展,有研究表明,高原健康个体之所以可以适应极端气候,主要是受 VEGFA 基因、AKT3 基因和 NOS3 基因影响的 VEGF 信号通路及血管生长因子协同发挥作用的结果。有研究还发现

了可适应极端气候基因的单核苷酸多态性(SNP)位点,如红细胞的位点 rs4590656、Hb 位点 rs100731 和藏族居民红细胞增多症患者的红细胞的位点 rs1570360^[11]。有研究在红细胞增多症易感基因的 SNP 位点检测过程中发现,移居的汉族居民及世居的藏族居民在发病率方面存在一定的区别,ANGPTL4SNP 的遗传距离为 0.061,VEGFASNP 的遗传距离为 0.043 8, NOS3T 基因的遗传距离为 0.08^[12]。这是长期居住高原人群红细胞增多症发病的易感性标示之一。

VHL 基因能借助于泛素化调控 HIF-1 α 表达水平,从而间接影响各种因子的转录功能。这一途径也就是“VHL/HIF 通路”。红细胞增多症患者中,因为 VHL 基因拷贝数下降,根据中心法则计算会使患者 VHL 基因中的蛋白质水平下降,从而影响到对 HIF-1 α 的降解。这样一来,患者 HIF-1 α 水平就会持续上升。HIF-1 α 水平的持续上升会导致 EPO 表达的上升,从而导致红细胞增多症的发生、发展^[13]。

本研究结果显示,研究组 WBC、RBC、Hb 和 Hct 等均显著低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);同时,研究组 VHL 基因拷贝数、EPO、RBC 和 Hb 与红细胞增多症呈显著正相关($P < 0.05$)。这是因为长期生活在高海拔地区者经数千年的自然选择后,形成了独特同时复杂的低氧耐受机制,使其 Hb 水平不会因为低氧而持续上升,甚至低于平原地区汉族人群的平均 Hb 水平。有研究表明,长期居住在我国西藏和青海地区的藏族居民 Hb 水平略低于移居的汉族居民,但女性 Hb 水平略高于移居的汉族居民,不同性别的居民在 Hb 水平方面存在显著差异。同时,有研究表明,与居住在海拔高度类似的安第斯山居民比较,藏族居民平均 Hb 水平要低 10% 左右^[14]。

藏族居民独特的适应能力推测与其基因存在联系。缺氧可显著提高细胞中 EPAS1 蛋白质水平,从而强化糖酵解酶及 EPO 的表达,维持人体内部的氧平衡及 Hb 水平稳定。高原地区居民 VHL 基因表达的上调与 Hb 水平的下降存在着不容忽视的重要联系。

VHL 基因变化已成为诊断红细胞增多症的重要分子学标准。红细胞增多症患者中,VHL 基因下降的阳性率超过 90%。这是因为 VHL 基因拷贝数下降会激活 JAK2-STAT 途径,使红细胞过度增殖。不过高原地区红细胞增多症患者 VHL 基因变化状况及发生频率高低方面的研究较少。有研究表明,红细胞增多症患者往往合并心、脑器官严重损害,主要是心、脑血管异常及栓塞,同时,部分患者合并肝、肾功能及胃肠功能障碍。表明在红细胞增多症恶化的过程中,容易导致患者内脏器官受损,给患者造成致命性病理

学损伤。因此,需引起医务人员对红细胞增多症的高度重视,从而及时诊治,防止红细胞增多症患者出现并发症^[15]。

本研究进行的红细胞增多症临床因素的 logistic 回归模型分析结果显示,VHL 基因拷贝数和 EPO 是红细胞增多症的重要危险因素($P < 0.05$),提示基因领域的相关研究对分析红细胞增多症的病因具有不容忽视的重要价值。不过需注意的是,截至目前,研究人员的相关数据对探索不同低压、低氧环境条件下人体的基因变化尚无严格规范的标准,推测是因为能影响基因改变的因素较少。此外,基因与基因之间的作用及基因与环境之间的作用也需要纳入高海拔疾病基因研究中。因此,在后续的研究过程中应该应用多态性基因数据及单体型图,从而改善潜在易感位点的检测质量。与此同时,已有的基因领域研究结果存在的可变性,提示受种群遗传背景等方面的影响,人体的基因表达水平也存在一定程度的不同。红细胞增多症患者可能存在其他的潜在影响因素。因此,综合应用多种方法进行研究,有利于确定在不同高海拔地区种群缺氧耐受情况的遗传基础,从而帮助人们更加有效地预防红细胞增多症的发生。

综上所述,高原地区红细胞增多症患者普遍存在 VHL 基因拷贝数下降的问题,这与病情的发展密切相关。

参考文献

- [1] 白玛康卓,巴桑次仁,次仁央宗,等. 不同海拔地区世居藏族人群高原红细胞增多症患病率的流行病学调查[J]. 第三军医大学学报,2016,38(3):220-225.
- [2] 杜亚利,郭馨云,俞平,等. 造血相关因子在高原红细胞增多症中的作用[J]. 医学综述,2015,21(15):2703-2706.
- [3] 潘湘涛,陆晔,夏学鸣. 真性红细胞增多症诊断指标的评价[J]. 医学综述,2007,13(8):597-599.
- [4] OIKONOMIDOU P R, CASU C, YANG Z, et al. Polycythemia is associated with bone loss and reduced osteoblast activity in mice[J]. Osteoporos Int, 2016, 27(4): 1559-

1568.

- [5] 马婕,崔森,冀林华,等. 高原红细胞增多症发病基因的研究进展[J]. 山东医药,2017,57(10):112-114.
- [6] 吴金春,常荣. 促红细胞生成素在高原红细胞增多症发生中的作用及机制研究进展[J]. 微循环学杂志,2016,26(1):61-63.
- [7] SEGURA T, SERENA J, TERUEL J, et al. Cerebral embolism in a patient with polycythemia rubra vera[J]. Eur J Neurol, 2015, 7(1): 87-90.
- [8] PATHAK R, GIRI S, KARMACHARYA P, et al. Obstructive sleep apnea syndrome and secondary polycythemia: analysis of the nationwide inpatient sample[J]. Sleep Med, 2015, 16(1): 205-206.
- [9] 杜亚利,白海. 高原红细胞增多症及发病机制[J]. 西北国防医学杂志,2015,36(6):388-390.
- [10] 杨柯,白海. 高原红细胞增多症的发病和防治[J]. 西北国防医学杂志,2015,36(1):44-48.
- [11] KOENNECKE H C, BERNARDING J. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in two patients with polycythemia rubra vera and early ischemic stroke[J]. Eur J Neurol, 2015, 8(3): 273-277.
- [12] 陈郁,蒋春华,罗勇军,等. 基因交互作用预测高原红细胞增多症的遗传易感性研究[J]. 中国病理生理杂志,2015,31(10):1791.
- [13] SLAGHEKKE F, VAN DEN WIJNGAARD J P, AKKERMANS J, et al. Intrauterine transfusion combined with partial exchange transfusion for twin anemia polycythemia sequence: modeling a novel technique[J]. Placenta, 2015, 36(5): 599-602.
- [14] 胥瑾,杨应忠,王展,等. 青藏高原藏族高原红细胞增多症与 EDNRA 基因遗传多态性的关系[J]. 中华医学杂志,2015,95(18):1382-1385.
- [15] 王瑛,张玉华,赵敬湘,等. 高海拔地区献血者红细胞增多症患病比例及其影响因素的调查分析[J]. 中国输血杂志,2017,30(3):296-299.

(收稿日期:2018-08-10 修回日期:2018-10-16)

更正声明

北京积水潭医院许朗医生在本刊 2018 年 39 卷 14 期发表文章《北京地区老年口腔颌面部肿瘤术后感染患者的厌氧菌分布及药敏分析》中,由于作者本人疏忽,在本刊发出校对稿的情况下仍未更改,导致出现以下两处错误。(1)摘要方法中:选取北京积水潭医院于 2013 年 7 月至 2017 年 11 月收治的口腔颌面部肿瘤术后感染患者 370 例。应改为:选取北京地区于 2013 年 7 月至 2017 年 11 月收治的口腔颌面部肿瘤术后感染患者 370 例。(2)正文资料与方法中:选取北京积水潭医院于 2013 年 7 月至 2017 年 11 月收治的口腔颌面部肿瘤术后感染患者 370 例。应改为:选取北京地区于 2013 年 7 月至 2017 年 11 月收治的口腔颌面部肿瘤术后感染患者 370 例。

患者选取范围为应更改为北京地区,而非仅限于北京积水潭医院。

特此更正!

《国际检验医学杂志》编辑部

2019 年 1 月 8 日