

参考文献

- [1] 王凌, 刘建宏, 崔欣, 等. 西安市体检人群 2 型糖尿病流行病学调查及相关因素分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 35(4): 483-485.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国动态血糖监测临床应用指南(2012 年版)[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013, 4(1): 51-60.
- [3] 洪忠新, 华鑫. 两种处方饮食对 2 型糖尿病患者血糖及胰岛素抵抗的影响[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(1): 142-145.
- [4] KIRAN R P, TURINA M, HAMMEL J, et al. The clinical significance of an elevated postoperative glucose value in nondiabetic patients after colorectal surgery: evidence for the need for tight glucose control? [J]. Ann Surg, 2013, 258(4): 599-604.
- [5] 张瑞. 影响静脉血标本采集质量的因素及分析[J]. 中国卫生产业, 2014, 11(10): 195-196.
- [6] 何盛. 临床送检合格标本不同保存时间对肾功能指标及血糖检测结果的影响[J]. 临床医学工程, 2017, 24(8): 1133-1134.
- [7] 李方伟, 蒋勇. 静脉血标本采集后不同放置时间离心对血糖测定结果的影响[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(14): 1771-1772.
- [8] 张勇, 李小鸣, 邓发乾. 血糖检验结果受血液标本的放置时间的影响[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2017, 6(3): 606-607.
- [9] 权国波, 吕翠翠, 刘敏霞, 等. 人红细胞对糖类摄取的规律性研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(3): 592-596.
- [10] HOLLAND C, GIVENS V, SMOLLER B R. Expression of the human erythrocyte glucose transporter glut-1 in areas of sclerotic collagen in necrobiosis lipoidica[J]. J Cutan Pathol, 2001, 28(6): 287-290.
- [11] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社出版, 2016: 203.
- [12] NING H C, LIN C N, CHIU D T, et al. Reduction in Hospital-Wide clinical laboratory specimen identification errors following process interventions: a 10-Year retrospective observational study[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160821.
- [13] 傅瑜, 李东升, 刘江虹, 等. 检验分析前的质量控制及管理[J]. 解放军医院管理杂志, 2000, 7(4): 300-301.
- [14] 任爱英. 血液标本放置时间对血糖测定结果的影响[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(1): 59-60.
- [15] 李宝军, 关小宏, 盛薇, 等. 老年糖尿病患者低血糖原因分析及预防性护理[J]. 空军总医院学报, 2010, 26(2): 107-108.
- [16] GARG M, THAMOTHARAN M, BECKER D J, et al. Adolescents with clinical type 1 diabetes display reduced red blood cell glucose transporter isoform 1 (GLUT1) [J]. Pediatr Diabetes, 2014, 15(7): 511-518.

(收稿日期: 2018-12-16 修回日期: 2019-02-21)

• 短篇论著 •

与 α -烯醇化酶相关的 ELISA 方法的建立及在肝纤维化检测中的应用探索*

王 波, 杨婷婷, 李 志

(大连市中心医院检验科, 辽宁大连 116033)

摘要:目的 探索肝纤维化期诊断的潜在标志物, 建立与 α -烯醇化酶(ENO1)相关的酶联免疫吸附试验(ELISA)模型, 并应用于肝纤维化期的抗 α -烯醇化酶自身抗体的检测。**方法** 人工合成获得 ENO1 基因序列设计特异性引物, 采用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 ENO1 基因序列, 构建该基因的克隆载体及表达载体, 通过 IPTG 诱导表达重组蛋白 ENO1。以纯化的重组蛋白为包被抗原建立 ELISA 模型, 用建立的模型检测肝纤维化期和肝硬化期患者血清中 ENO1 抗体的表达。**结果** 获得 47×10^3 ENO1 蛋白, 成功建立 ENO1-ELISA 模型, 检测肝纤维化期患者血清 ENO1 抗体阳性率为 25.7%, 高于肝硬化期患者的 10.4%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 人源 α -烯醇化酶可以通过原核表达技术获取, 建立的 ENO1-ELISA 模型可以用于 α -烯醇化酶抗体的检测, α -烯醇化酶对肝纤维化的早期诊断具有重要意义。

关键词: α -烯醇化酶; 原核表达; 酶联免疫吸附试验; 肝纤维化**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.12.024**中图法分类号:** R-331; R575**文章编号:** 1673-4130(2019)12-1509-04**文献标识码:** B

肝纤维化是由各种致病因子所致肝内结缔组织 异常增生按严重程度, 分为早期阶段(肝纤维化期阶

* 基金项目: 大连市医学科学研究计划项目(1511015)。

段)和晚期阶段(肝硬化期),肝硬化是由各种因素导致慢性肝损害的一类晚期肝纤维化疾病^[1]。肝纤维化期是可逆阶段,如果能早期诊断并给予抗纤维化治疗,肝脏功能可能恢复到正常或接近正常状态,可预防肝硬化的发生^[2]。 α -烯醇化酶是一种可以在肝纤维化患者体内诱发自身免疫应答的自身抗原,通过原癌基因 c-myc 的抑制作用来调整细胞生长和分化^[3]。国外有研究证实抗 α -烯醇化酶的自身抗体在肝纤维化期阶段患者的血清中出现频率相当高,可以作为一种潜在的预测因子^[4]。本研究通过原核表达技术获取人 α -烯醇化酶,建立酶联免疫吸附试验(ELISA)反应模式检测肝纤维化期和肝硬化患者及健康者血清中抗 α -烯醇化酶的自身抗体,评价 α -烯醇化酶对肝纤维化的早期诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集处于肝纤维化期阶段(0~3 期)的患者 35 例,肝硬化患者 48 例,肝纤维化的组织病理学分期采用 METAVIR 评分系统;另选取本院体检健康者 60 例作为健康对照组,无免疫性及明显的肝炎疾病证据。对照组与患者组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 菌株与试剂 克隆载体 pEASY-T1 Simple Cloning Vector,表达感受态菌 BL21(DE3) 等购于北京全式金生物公司;ENO1 cDNA,ENO1 抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;2×Taq PCR Mastermix 购于北京天根生化科技有限公司;凝胶成像仪为 UVPINC 公司产品;包被液、酶标抗人 Ig-G 为惠民生物技术公司产品;酶标仪为 Thermo Fisher 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 ENO1 基因的克隆及表达 根据 GenBank 中 ENO1 的 cDNA 基因序列,设计其中的 ENO1 基因特异性引物,上、下游引物分别为 P1: 5'-CGG ATC CAT GTC TAT TCT CAA GAT CCA TGC C-3', P2: 5'-CAA GCT TTT ACT TGG CCA AGG GG-3';PCR 扩增目的基因 ENO1;目的片段回收后与克隆载体 pEASY-T1 连接,转化至 Trans-T1 感受态细胞后,涂布于 Amp/LB 平板上,筛选阳性克隆提取质粒。将测序正确的克隆质粒和 pET32a(+)表达质粒分别经 BamHI/HindIII 双酶切,切胶回收目的片段, T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接后转化至 Trans-T1 感受态细胞,于 Amp/LB 平板上挑取单个克隆培养后提取质粒进行双酶切鉴定;将鉴定正确的重组表达质粒分别转化到感受态菌株 BL21(DE3)中,经筛选和增菌后用微生物总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,SDS-PAGE 电泳分析表达产物,回收纯化重组蛋白并定量分析,保存于 -20℃ 冰箱备用。

1.3.2 ELISA 方法的建立 利用方阵滴定法确定抗原包被浓度、血清稀释度和作用时间等反应参数,阳

性反应的 cut-off 值是健康混合血清加 3 个标准差的平均光密度值,最终确定包被抗原浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,血清稀释度为 1 : 50 时,P/N 相差较大为最佳稀释浓度。

1.3.3 用所建立的 ELISA 方法进行标本的检测

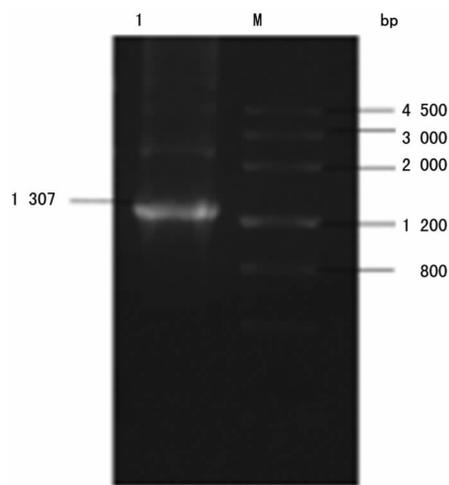
(1)包被抗原:用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释 ENO1 抗原(原浓度为 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$)浓度至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,100 微升/孔,4℃ 过夜,洗液(PBS+0.05%吐温 20)冲洗 3 次;(2)封闭:封闭液(PBS+1%BSA+0.1%吐温 20)室温封闭 2 h,洗板 3 次;(3)加待测抗体:将肝纤维化早期患者、肝硬化期患者及健康对照组血清分别稀释后加入封闭后的酶标板 100 微升/孔,每孔设置平行对照;(4)加二抗:每孔加辣根过氧化物酶标记抗人 Ig-G 100 μL ,水浴 40 min;(5)每孔加终止液 TMB 100 μL 终止反应,水浴显色 15 min 后测定 OD 值。

1.4 应用免疫印迹法分析验证 ELISA 对肝纤维化期血清标本的抗 α -烯醇化酶的自身抗体进行免疫印迹分析,对免疫印迹结果和 ELISA 结果进行分析,验证 2 种方法阳性检出率是否相等。

1.5 统计学处理 数据分析应用 SPSS19.0 系统,阳性率比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

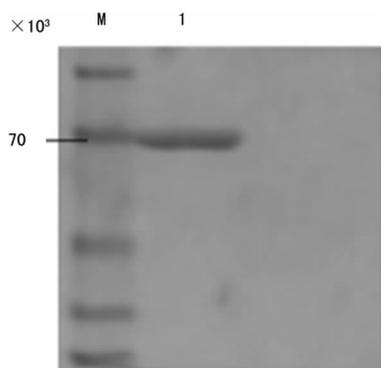
2 结果

2.1 ENO1 基因的克隆及表达 通过 PCR 扩增目的基因 ENO1,扩增产物大小约为 1 300 bp,与预期结果相符(见图 1)。重组表达质粒 pET-32a(+)/ENO1 经 IPTG 诱导后,蛋白主要以可溶性上清形式存在,纯化后电泳显示为单一蛋白条带:蛋白 ENO1 理论值 47×10^3 (连接 pET-32a 载体包含硫氧还蛋白 Trx 和 HIS-tag 标签约 20×10^3 ,故重组蛋白 67×10^3 左右),见图 2。



注:M 为 DNA marker,1 为 ENO1 基因扩增片段

图 1 ENO1 基因 PCR 产物电泳图



注: M 为蛋白质标准, 1 为纯化后 ENO1

图 2 纯化蛋白 SDS 电泳图

2.2 临床标本的检测 用所建立的 ELISA 方法检测肝纤维化期患者、肝硬化期患者及健康对照组血清中抗 α -烯醇化酶自身抗体, 结果显示在肝纤维化期和肝硬化期患者中, 抗 α -烯醇化酶自身抗体的阳性率高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.74, P < 0.05$), 且在肝纤维化期患者中也显著高于肝硬化期患者, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.27, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组外周血中抗 α -烯醇化酶自身抗体结果

组别	阳性(n)	阴性(n)	合计(n)	阳性率(%)
健康对照组	2	58	60	3.3
肝硬化期	5	43	48	10.4*
肝纤维化期	9	26	35	25.7*▲

注: 与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与肝硬化组比较, ▲ $P < 0.05$

2.3 免疫印迹法分析验证 ELISA 结果 对 35 例肝纤维化期患者血清 α -烯醇化酶进行免疫印迹分析, 证实了酶联免疫法和免疫印迹法 2 种检测方法检出率的一致性 ($\chi^2 = 0.33, P > 0.05$), 在酶联免疫方法中抗 α -烯醇化酶阳性的血清在免疫印迹法中也可得到证实, 见表 2。

表 2 ELISA 和免疫印迹法阳性率验证结果(n)

ELISA	免疫印迹		合计
	+	-	
+	7	2	9
-	1	25	26
合计	8	27	35

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的共同病理学过程, 普遍认为肝纤维化的过程是可逆的, 适当有效的治疗不仅可减缓其向硬化的发展, 甚至可减轻已有的肝纤维化程度^[5]。因此阻止病情进展到肝硬化期, 这有赖于对肝纤维化期阶段的预测和诊断^[6-7]。

α -烯醇化酶是一种可以在肝纤维化患者体内诱发自身免疫应答的自身抗原, 也是肝纤维化诊断的一种

潜在的预测因素^[4]。本研究表明可以通过原核表达技术获取人源化的 α -烯醇化酶, 该蛋白是一种稳定的亲水性蛋白质, 以此作为抗原, 建立血清学诊断模式, 用所建立的 ELISA 方法检测肝纤维化期患者、肝硬化期患者及健康对照组血清中抗 α -烯醇化酶自身抗体, 结果显示在肝纤维化期和肝硬化期患者血清中, 抗 α -烯醇化酶自身抗体的阳性率高于健康对照组 ($P < 0.05$), 且在纤维化期患者中也显著高于肝硬化期患者 ($P < 0.05$)。有研究表明, 在自身免疫性肝炎的患者血清中抗 α -烯醇化酶抗体的阳性率 (50%~60%), 高于原发性胆汁性肝硬化 (30%) 和肝癌 (14.3%)^[4,8]。可以看出, 随着肝脏疾病的进展, 抗 α -烯醇化酶抗体水平呈降低的趋势, 尽管现在缺少这种抗 α -烯醇化酶抗体从良性肝脏疾病到末期疾病过程中水平变化的全面研究, 但是检测抗 α -烯醇化酶抗体水平从肝纤维前期到肝硬化再到肝癌的变化表明抗 α -烯醇化酶抗体的出现或许是肝脏疾病诊断的预示性标志物, 也可以作为肝纤维化期的生物标志物。

尽管抗 α -烯醇化酶抗体在肝纤维化形成过程中的发挥机制还不清楚, 但有研究报道这种酶可以使纤维蛋白溶酶原结合在细胞表面, 也可促使单核细胞在急性肺损伤时移向炎症区域^[9]。此外, 据报道 α -烯醇化酶可以被 JNK 信号 (在纤维化中起积极作用) 途径调控^[7]。因此 α -烯醇化酶在促进免疫细胞趋向炎症反应区域的作用证明 α -烯醇化酶也可能参与肝纤维化早期的炎症反应。然而随着疾病进展到不可逆的纤维化晚期, 很多因素参与到发病机制里, 肝硬化期细胞外基质比正常肝脏高 6 倍, 因此推测 α -烯醇化酶在肝纤维化早期作为一种促炎因子可起到重要作用, 随着疾病发展, 细胞外基质发挥主要作用, α -烯醇化酶的作用会逐渐减退, 同时导致宿主对 α -烯醇化酶的免疫应答减少。

肝纤维化的早发现、早治疗可在一定程度上阻止疾病的发展, 因此诊断早期纤维化的血清标志物非常重要, 本研究证实了 α -烯醇化酶作为一种潜在的预测因子对肝纤维化的早期诊断价值, 其对早期干预治疗、防止进展到肝硬化期、提高患者的生存率具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] 张静雯, 时永全, 韩英. 肝硬化的治疗进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(3): 465-468.
- [2] 金博. 肝硬化是可以逆转的吗? [J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 8(10): 1764-1769.
- [3] CAPPELLO P, PRINCIPE M, BULFAMANTE S, et al. Alpha-Enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies[J]. Front Biosci, 2017, 22(5): 944-959.
- [4] PENG B, HUANG X E, NAKAYASU E S, et al. Using immunoproteomics to identify alpha-enolase as an autoantigen in liver fibrosis[J]. J Proteome Res, 2013, 12(4):

1789-1796.

[5] 夏璐,杨长青.肝纤维化治疗的研究进展[J].中华肝脏病杂志,2017,24(8):566-570.

[6] XU R, ZHANG Z, WANG F S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury[J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(4):296-301.

[7] KLUWE J, PRADERE J P, GWAK G Y, et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition[J]. Gastroenterology, 2010, 138 (1):347-359.

[8] TERRIER B, DEGAND N, GUILPAIN P A, et al. Alpha-enolase: A target of antibodies in infectious and autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2007, 6(3):176-182.

[9] WYGRECKA M, MARSH L M, MORTY R E, et al. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung[J]. Blood, 2009, 113(22):5588-5598.

(收稿日期:2018-12-24 修回日期:2019-02-15)

• 短篇论著 •

孕妇血清 HCY、FA、VitB₁₂ 水平变化及其临床意义研究*

汪靖园¹, 王海燕², 袁鹏丽³, 魏 炜^{4△}

(西安交通大学医学院第一附属医院检验科, 陕西西安 710061; 2. 西安交通大学医学院第一附属医院生殖医学科, 陕西西安 710061; 3. 扶风县人民医院放免室, 陕西宝鸡 722200; 4. 西安交通大学医学院第一附属医院超声影像科, 陕西西安 710061)

摘要:目的 研究孕妇血清同型半胱氨酸(HCY)、叶酸(FA)及维生素 B₁₂(VitB₁₂)的变化情况及其与妊娠期高血压疾病及胎儿生长受限的关系,为母婴孕产期保健提供临床指导。**方法** 137 例妊娠高血压疾病孕妇设为妊娠期高血压疾病组,119 例胎儿生长受限孕妇设为胎儿生长受限组,并以同期 144 例健康孕妇为对照组,比较各组血清 HCY、FA 及 VitB₁₂ 血清水平。**结果** 胎儿生长受限组、妊娠期高血压疾病组、对照组中血清 HCY、FA 及 VitB₁₂ 水平在任意两组之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),胎儿生长受限组、妊娠期高血压疾病组、对照组血清 HCY 水平依次降低,FA 及 VitB₁₂ 水平依次升高;胎儿生长受限组孕妇血清 HCY 水平与新生儿出生体质量、出生身长均呈负相关,相关系数分别为 -0.424、-0.315,差异均有统计学意义($P < 0.05$);妊娠期高血压疾病组孕妇血清 HCY 水平与孕期舒张压、收缩压均呈正相关,相关系数分别为 0.398、0.421,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 妊娠晚期对孕妇血清 HCY、FA、VitB₁₂ 水平监测有利于防范妊娠高血压及胎儿生长受限的发生,对于妊娠期妇女的孕产期保健及人口素质的提高具有重要的临床意义。

关键词:同型半胱氨酸; 叶酸; 维生素 B₁₂; 妊娠期高血压疾病; 胎儿生长受限

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.12.025

中图法分类号:R446.11

文章编号:1673-4130(2019)12-1512-03

文献标识码:B

作为组织细胞 DNA 合成的重要辅酶,叶酸(FA)及维生素 B₁₂(VitB₁₂)与胎儿的生长发育密切相关,有研究发现 FA 摄入不足可导致胎儿生长受限,甚者可造成胎儿畸形、死胎等严重后果^[1]。同型半胱氨酸(HCY)为甲硫氨酸代谢产物,FA 及 VitB₁₂ 不足可造成 HCY 去路受阻,而高同型半胱氨酸血症与各类血管性疾病关系密切^[2],本研究回顾性分析了本院 2015 年 1 月至 2018 年 1 月 400 例孕妇 HCY、FA 及 VitB₁₂ 的情况,旨在研究孕妇血清 HCY、FA 及 VitB₁₂ 的水平变化情况及其与胎儿生长受限及妊娠期高血压的关系,为孕产期母婴保健提供临床指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2015 年 1 月至 2018 年 1

月间本院 400 例孕妇为研究对象,137 例临床确诊妊娠期高血压疾病的孕产妇设为妊娠期高血压疾病组,平均年龄(27.7±4.5)岁,平均孕周(36.2±2.3)周;119 例胎儿生长受限孕产妇设为胎儿生长受限组,平均年龄(27.1±4.8)岁,平均孕周(36.9±2.7)周;并以同期 144 例健康孕产妇为对照组,平均年龄(26.2±5.6)岁,平均孕周(36.9±2.5)周。纳入标准:所有研究对象均为单胎活产,排除原发性高血压、糖尿病、心脏病及严重肝肾功能异常的孕妇,研究对象除正常饮食外均未接受 FA 及 VitB₁₂ 治疗。3 组研究对象在平均年龄、孕周上差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 诊断标准 妊娠期高血压疾病诊断标准参考谢

* 基金项目:陕西省基金自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8121)。

△ 通信作者, E-mail:1976weiwei@163.com。

本文引用格式:汪靖园,王海燕,袁鹏丽,等.孕妇血清 HCY、FA、VitB₁₂ 水平变化及其临床意义研究[J].国际检验医学杂志,2019,40