

• 经验交流 •

不同海拔地区人群环氧化酶-2 表达的检测及分析

袁 汶¹, 周晶萍²

(青海省人民医院:1. 输血科;2. 检验科, 青海西宁 810007)

摘 要:目的 探讨高原人群血清 COX-2 mRNA 水平的变化。方法 选取海拔 4 750 m 雁石坪地区 80 例男性汉族筑路工人, 年龄 18~45 岁, 平均 33.5 岁, 另选取西宁地区海拔 2 260 m 健康体检人群男性 86 例, 年龄 18~45 岁, 平均 32.6 岁。采用基因扩增法对上述人群进行血清 COX-2 mRNA 水平的检测。结果 高原人群的 COX-2 mRNA 表达与西宁较低海拔人群比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 高原缺氧环境血液中 COX-2 mRNA 处于高水平状态。

关键词:环氧化酶 2; 高原; 基因扩增

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.059

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)17-2395-02

环氧化酶-2(COX-2)是一种可诱导性酶,在正常生理状态下多数组织内检测不到,缺氧后能检测到 COX-2 的表达,与高原心脏病有相关。雁石坪地区海拔 4 750m,笔者通过对 80 例筑路工人进行血清 COX-2 mRNA 检测,并与西宁地区的健康人群进行比较,探讨高海拔地区人群血液 COX-2 mRNA 水平的变化,以期为保障高原地区工作者的健康提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取来自雁石坪汉族筑路工人,年龄 18~50 岁,平均 33.5 岁,80 例,均为男性;对照组为西宁地区健康体检人群,均为男性 86 例,年龄 18~45 岁,平均 32.6 岁。

1.2 仪器与试剂 主要试剂包括总 RNA 提取试剂盒为德国 Boehringer mannheim 公司产品;Oligo(dt)15、rRNAsin 为美国 Promega 公司产品;Taq DNA 聚合酶为 Sangon 公司产品;PCR 扩增仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 对雁石坪汉族筑路工人抽取静脉血并分离血清,于-70℃保存,10 d 内完成检测。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 COX-2 mRNA 使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。COX-2 引物序列设计如下,上游引物:5'-CTG TAT CCC GCC CTG CTG GTG-3';下游引物:5'-ACT TGC GTT GAT GGT GGC TGT CTT-3'。经 PCR 扩增后,目的片段长度为 279 bp。 β -actin 的引物序列如下,上游引物:5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3',下游引物:5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3'。经 PCR 扩增后,目的片段长度为 587 bp。本实验中,使用 0.5 μ g 总 RNA 进行检测。COX-2 和 β -actin PCR 的具体循环参数如下。COX-2:94℃ 2 min;94℃ 1 min,72℃ 5 min,共 30 个循环;72℃ 7 min。 β -actin:94℃ 2 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃ 10 min。循环完成后,取 10 μ L 在 2%琼脂糖凝胶上电泳、照相、扫描,用 Tiger 图像分析软件进行分析,结果以 COX-2/ β -actin 的吸光度(A 值)比值表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

海拔 4 750 m 的高海拔地区人群血清 COX-2 mRNA 的水平[(2.48 $\pm$ 1.26) ng/mL],与 2 260 m 西宁地区人群血清 COX-2 mRNA 水平[(0.12 $\pm$ 0.06) ng/mL]比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 高海拔地区与西宁地区人群血清 COX-2 mRNA 水平 (ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

所处地区	<i>n</i>	COX-2 mRNA 水平
高海拔地区	80	2.48 $\pm$ 1.26
西宁地区	86	0.12 $\pm$ 0.06

3 讨 论

环氧化酶(COX)是花生四烯酸代谢中 COX 途径的限速酶,存在两种同工酶^[1]:结构性 COX-1 和诱导性 COX-2。前者在人体多种组织和细胞中均有表达,主要调节生理前列腺素的合成,后者在正常组织中水平很低,其表达受细胞内外许多刺激因素的影响,在病理生理反应过程中,诱导产生^[2]。自从 COX-2 被发现以来,引起了广泛关注。对缺氧性损伤的研究提示,缺氧后 COX-2 的表达与高原心脏病有相关。青海地处青藏高原,平均海拔在 3 000 m 以上,低氧、低气压、寒冷、多风沙、紫外线辐射强,环境气候恶劣,高原缺氧环境对机体生理功能有损伤,对反映心、肺、肾等脏器功能指标都有影响,这在以往研究中已被证实^[3-5]。高原缺氧使肺细动脉发生痉挛,加之高原地区继发红细胞增多,血液黏稠度增大形成细小血栓,致肺循环阻力升高,进而发展为肺动脉高压,导致发生高原心脏病。本文结果显示,海拔 4 750 m 地区人群,COX-2 mRNA 均处于高表达状态,与海拔 2 260 m 的健康人群比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。多数研究发现 COX-2 表达可被缺氧、药物、内毒素等各种刺激因素所诱导^[6],文献[7-8]研究,大鼠脑缺血后,灶性缺血区 COX-2 mRNA 和蛋白水平有大量的增加。心力衰竭患者心肌的纤维瘢痕部位均有丰富的 COX-2 mRNA 和蛋白的表达^[9-10]。本研究中,高海拔地区 COX-2 mRNA 处于高表达状态,符合上述报道,可能是低氧、低气压刺激诱导所致。因此,在高原 COX-2 mRNA 处于高表达状态时,可以提示高原缺氧环境对人体器官可能造成器质性改变,同时也提示在高原工作的人群要关注身体健康,定期体检,合理膳食,尽可能将高原心脏病的发生风险降到最低。

参考文献

[1] Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, et al. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene[J]. Biochem J, 1994, 302(Pt 3):723-727.
[2] Marnett LJ, Dubois RN. COX2: A target for Cancer prevention [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002, 42(1):55-80.
[3] 张彦博, 汪源, 刘学良, 等. 人与高原[M]. 西宁:青海人民出版社,

1996;320.

[4] 周晶苹,彭海,顾松琴,等.海拔 4 750 米地区青藏铁路工人尿微量蛋白水平研究[J].临床荟萃,2008,3(1):42.

[5] 国际高原医学会慢性高原病专家小组.第六届国际高原医学和低氧生理学术大会颁布慢性高原病青海诊断标准[J].青海医学院学报,2005,26(1):3-5.

[6] 尹明,魏丽,李银平,等.环氧化酶在心血管疾病中的研究现状[J].中国危重病急救医学,2000,12(11):698-701.

[7] Yokota C,Kaji T,Kuge Y,et al. In process citation[J].Neurosci Lett,2004,357(3):219-222.

[8] Sasaki T,Kitagawa K,Yamagata K,et al. Amelioration of hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase 2 deficient mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004,24(1):107-113.

[9] 蒋跃绒,殷惠军,陈可冀.环氧化酶与心血管疾病[J].心血管病学进展,2006,27(5):627-630.

[10] 朱明慧,刘旭华,王留意,等.环氧化酶-2 与亚临床动脉粥样硬化关系的临床研究[J].中国当代医药,2010,17(27):42-44.

(收稿日期:2014-05-02)

• 经验交流 •

120 例高危 HPV E6/E7 mRNA 检测结果分析

张凤芹,张清泉,侯素平,冀雪霞,张宪军,杜素果
(哈励逊国际和平医院病理科,河北衡水 053000)

摘要:目的 分析高危人乳头瘤病毒(HPV) E6/E7mRNA 检测结果在宫颈病变的不同情况时的意义。方法 应用支链 DNA 技术检测宫颈脱落细胞和宫颈组织中的 HPV E6/E7 mRNA。结果 细胞学异常组阳性率显著高于细胞学正常组($P<0.05$);宫颈癌前病变和宫颈癌之间阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 宫颈上皮的异常与高危 HPV E6/E7 mRNA 的转录有关,在宫颈癌筛查中检测高危 HPV E6/E7 mRNA 的转录具有临床应用价值。

关键词:人乳头瘤病毒; E6/E7 mRNA; 宫颈病变; 支链 DNA 技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.060 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)17-2396-02

宫颈癌是女性生殖道发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,属于感染性疾病,但可以预防、治疗甚至治愈。高危型人乳头瘤病毒(HPV)的癌基因 E6/E7 的表达必须通过 E6/E7 mRNA。它们的表达会导致宿主细胞恶性转化。本研究旨在探讨 HPV E6/E7 mRNA 在宫颈病变中检测的意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2011 年 10 月至 2014 年 3 月在哈励逊国际和平医院、衡水市第二人民医院、衡水市第四人民医院就诊的患者,年龄 21~65 岁,有性生活的妇女,共 120 例。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括电热恒温鼓风干燥箱、冷光仪。高危 HPV E6/E7 mRNA 检测试剂盒为科蒂亚生物有限公司产品。

1.3 方法 标本的采集与保存:(1)细胞标本的采集用细胞采样器的中央刷毛部分轻轻的深插入子宫颈管内,按同一个时针方向转动采样器 5~8 周后,将收集的细胞放入细胞保存液中。(2)宫颈组织用蜡块包埋的组织,切片,脱蜡至水,用刀片刮下。操作严格按试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 未确诊宫颈癌人群的检测结果分析 79 例未确诊宫颈癌者的标本按细胞学检查结果分为细胞学结果正常组和细胞学结果异常两组,两组间进行 HPV E6/E7 mRNA 阳性率的比较。53 例细胞学结果正常者的 E6/E7 mRNA 阳性率为 51%(27/53),26 例细胞学结果异常者 E6/E7 mRNA(HPV)的阳性率为 85%(22/26),两组阳性率进行比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 对宫颈癌术人群检测结果的分析 7 例细胞学结果正常者 HPV E6/E7 mRNA 阳性者 5 例,阳性率为 71%(5/7),1 例细胞学结果异常者 E6/E7 mRNA 为阳性。由于例数太少无法进行统计学分析。阳性拷贝值范围为 121.750~31 545 copies/mL,应注意密切随访。

2.3 组织学标本的检测 一共对 34 例组织学标本进行了检

测,根据组织学类型将标本分为两组:宫颈鳞状细胞癌组(12 例)和癌前病变组(22 例)。22 例癌前病变组标本的 HPV E6/E7 mRNA 检测的阳性率为 91%(20/22),宫颈鳞状细胞癌组标本的 HPV E6/E7 mRNA 检测阳性率为 100%(12/12),两组间的阳性率进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。宫颈癌前病变组 HPV E6/E7 mRNA 检测值的范围为 32.870~11 274.460 copies/mL,宫颈鳞状细胞癌组 HPV E6/E7 mRNA 检测值的范围为 15 516.400~246 410.890 copies/mL。宫颈鳞状细胞癌组标本的阳性拷贝值均值高于宫颈癌前病变组标本。

3 讨论

99.7%的宫颈癌合并 HPV 感染^[1],行 HPV E6/E7 mRNA 检测更能反映 HPV 感染的危害程度^[2]。HPV 感染后,其 DNA 能够整合到宿主细胞 DNA 中,HPV E6、E7 蛋白表达,使抑癌蛋白 P53、Rb 失活,最终会导致宫颈上皮细胞的恶性增生^[3-5]。

通过对 120 例 HPV E6/E7 mRNA 检测结果分析发现高危 HPV E6/E7 mRNA 的阳性率随细胞的异常而上升;CIN 者的 HPV E6/E7 mRNA 阳性表达高达 91%;宫颈癌术后仍有 71%的患者高危 HPV E6/E7 mRNA 为阳性。宫颈鳞状细胞癌患者 HPV E6/E7 mRNA 阳性表达高达 100%且宫颈鳞状细胞癌阳性拷贝值范围为 15 516~24 641 copies/mL,远高于无鳞状上皮细胞内病变者的 HPV E6/E7 mRNA 阳性拷贝值范围 40~2 069 copies/mL。

宫颈上皮的异常与高危 HPV E6/E7mRNA 的转录有关,在宫颈癌筛查中检测高危 HPV E6/E7 mRNA 的转录具有临床应用价值。

参考文献

[1] Muñoz N,Castellsagué X,de González AB,et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer[J]. Vaccine,2006,24 Suppl 3:S3-