

儿童更容易发生复发性 ARTI、GE 和缺铁性贫血, 儿童复发感染风险与缺铁性贫血显著相关, 一旦铁缺乏得到纠正, ARTI 和 GE 的复发率可降低。更有研究报道, 反复感染患儿普遍存在不同程度的体液或细胞免疫功能低下, 而微量元素缺乏和营养不足是引起患儿免疫力低下的重要原因<sup>[15]</sup>。对于反复上呼吸道感染患儿而言, 血清微量元素锌、铁缺乏较明显, 并且缺乏程度与患儿感染复发频率及病情严重程度密切相关, 临床进行间断补锌、铁后能显著改善患儿血清微量元素及免疫功能指标水平, 具有良好的防治效果<sup>[16]</sup>。

综上所述, 铁不但参与血红蛋白的合成, 对于免疫细胞的增殖和成熟也很重要, 特别是淋巴细胞, 对于产生对感染的特异性反应<sup>[17]</sup>。也可能是由于血红蛋白降低使肺血管和肺实质携氧能力降低, 导致对侵袭性病原体的保护能力下降。由于胃上皮细胞具有较高的生物活性, 需要良好的营养状态来维持黏膜完整性吸收能力。在随访期间复发性 ARTI 和 GE 明显减少, 表明补充铁对儿童复发性 ARTI 和 GE 具有明显的保护作用, 因此在一级基层医疗单位补充铁治疗, 或可作为儿童感染一级预防策略。

#### 参考文献

- 1 Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future [J]. Philos T Roy Soc B, 2014, 369(1645):1–9
- 2 李鸿斌. 基于《世界卫生统计 2015》资料全球 5 岁以下儿童死亡率的现状分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2017, 17(3):27–33
- 3 胡冉, 穆薇薇, 孙鑫, 等. 中国儿童人类免疫缺陷病毒感染者营养不良发生率及相关影响因素分析 [J]. 中华传染病杂志, 2016, 34(6):321–326
- 4 Umlawska W, Lipowicz A. Growth, nutritional status, and pulmonary

function in children with chronic recurrent bronchitis [J]. Oxygen Transp Tissue, 2016, 885:1–9

- 5 佐日汗·艾依萨, 李树芬. 阿勒泰市哈萨克族小儿贫血与饮食习惯的关系研究 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(15):3128–3131
- 6 佐日汗·艾萨, 阿依古丽, 徐顺霖. 阿勒泰市哈萨克族学龄前儿童贫血流行病学调查 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(25):4351–4353
- 7 诸福棠. 实用儿科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011
- 8 Kassebaum N, Jasrasaria R, Naghavi M, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010 [J]. Blood, 2014, 123(5):615–624
- 9 何春承, 赵恒燕. 3005 例学龄前儿童体检血红蛋白调查分析 [J]. 医学检验与临床, 2017, 28(8):31–33
- 10 Bager P. Fatigue and acute/chronic anaemia [J]. Danish Med J, 2014, 61(4):B4824
- 11 金定好, 卓乐琴, 胡莉蔓, 等. 缺铁性贫血对 6~36 月龄婴幼儿智力发育的影响 [J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(3):26–28
- 12 Kao J, Mutuku F, Martin S, et al. Early childhood anemia in a birth cohort in coastal Kenya: links to infection and nutrition [J]. Am J Trop Med Hyg, 2019, 101(1):242–252
- 13 谭忠友, 余超, 周平. 儿童缺铁性贫血危险因素及影响贫血程度的相关因素分析 [J]. 检验医学与临床, 2016, 17:2444–2446
- 14 吕楠, 尚清, 马彩云, 等. 反复呼吸道感染的运动障碍患儿免疫功能相关因素的研究 [J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25(6):604–606
- 15 杨小红, 顾瑞娟. 小儿反复呼吸道感染和微量元素缺乏相关性分析 [J]. 中国处方药, 2018, 16(11):165–166
- 16 刘菁. 儿童反复上呼吸道感染血清微量元素的缺乏情况及间断补锌、铁的防治效果分析 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 28(8):31–33
- 17 蓝余炼, 唐亮, 崔日林. 铁代谢在复发性口腔溃疡患者中的变化及其与细胞免疫功能的关系 [J]. 上海口腔医学, 2017, 26(3):302–304

(收稿日期: 2019-11-07)

(修回日期: 2019-12-05)

## 溃疡性结肠炎患者中诱骗受体和护骨素基因多态性及其结肠组织表达水平分析

邵晓晓 金颖莉 林芊如 闵全佳 朱浩奇 蒋 益

**摘要 目的** 拟在浙江省汉族人群中探讨结肠组织中诱骗受体和护骨素基因多态性及其结肠组织表达水平与 UC 的关系。**方法** 收集 56 例 UC 患者和 62 例性别、年龄相匹配的良性结肠息肉患者作为对照组, 采集空腹外周静脉血和结肠组织标本。采用 SNaPshot 技术检测 DcR1(rs12549481)、DcR2(rs1133782) 及 OPG(rs3102735) 的基因多态性。采用反转录实时定量 PCR

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H030018, LY16H160055, Y17H030011, Y18H030009); 浙江省温州市科技局基金资助项目 (Y20180637)

作者单位: 325000 温州医科大学附属第二医院消化内科

通讯作者: 蒋益, 电子信箱: wzjiangyi@yeah.net

(RT - qPCR)法和免疫组织化学法检测结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 及蛋白表达水平。在 UC 组和对照组之间,以及携带不同基因型的 UC 患者之间比较结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 和蛋白表达水平差异。**结果** UC 组中突变基因型(GA + AA)及突变等位基因(A)频率均显著高于正常对照组(15.18% vs 6.45%, OR = 2.595, 95% CI: 1.073 ~ 6.274, P = 0.030; 28.57% vs 12.90%, OR = 2.700, 95% CI: 1.053 ~ 6.926, P = 0.035)。UC 患者结肠组织中 DcR2mRNA 和蛋白表达水平平均显著低于对照组( $4.49 \pm 2.29$  vs  $9.49 \pm 4.06$ ,  $t = 8.134$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.180 \pm 0.052$  vs  $0.273 \pm 0.069$ ,  $t = 8.322$ ,  $P < 0.01$ )。携带 DcR2(rs1133782)突变基因型(GA + AA)的患者结肠组织中 DcR2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于携带野生纯合子(GG)基因型者( $3.64 \pm 1.63$  vs  $6.62 \pm 2.35$ ,  $t = 5.43$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.129 \pm 0.028$  vs  $0.198 \pm 0.047$ ,  $t = 7.147$ ,  $P < 0.01$ )。然而,UC 组和对照组之间,以及携带 DcR1、OPG 不同基因型的 UC 患者之间,DcR1 和 OPG mRNA 和蛋白表达水平差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

**结论** DcR2(rs1133782)基因突变可能降低 UC 的发病风险,其机制可能通过降低 DcR2 mRNA 和蛋白表达水平发挥作用,DcR1(rs12549481)和 OPG(rs3102735)基因多态性及其结肠组织表达水平与 UC 的发病风险无显著关联。

**关键词** 诱骗受体 护骨素 溃疡性结肠炎 基因多态性 结肠组织表达

**中图分类号** R5      **文献标识码** A      **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.06.024

#### Analysis the Association of Ulcerative Colitis with Decoy Receptors and Osteoprotegerin Gene Polymorphisms and Their Colonic Expressions.

Shao Xiaoxiao, Jin Yingli, Lin Qianru, et al. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To explore the association of ulcerative colitis with decoy receptors and osteoprotegerin gene polymorphisms and their colonic expressions in the Han nationality from Zhejiang province. **Methods** A total of 56 UC patients and 62 sex - and age - matched controls with benign colonic polyps were randomly recruited. The peripheral fasting venous blood and colonic tissue samples were collected. The polymorphisms of DcR1 (rs12549481), DcR2 (rs1133782) and OPG (rs3102735) were examined using a SNaPshot method. The mRNA and protein expression levels of DcR1, DcR2 and OPG in colonic tissues were detected by reverse real - time quantitative polymerase chain reaction(RT - qPCR) and immunohistochemistry technique, respectively. In addition, the mRNA and protein expression levels of DcR1, DcR2 and OPG were compared between UC patients with different genotypes. **Results** The frequencies of mutant allele (A) and genotypes (GA + AA) of DcR2 (rs1133782) were significantly higher in UC patients than in the controls (15.18% vs 6.45%, OR = 2.595, 95% CI: 1.073 ~ 6.274, P = 0.030; 28.57% vs 12.90%, OR = 2.700, 95% CI: 1.053 ~ 6.926, P = 0.035). The expression levels of both DcR2 mRNA and protein were significantly decreased in colonic tissues of UC patients in contrast with the controls ( $4.49 \pm 2.29$  vs  $9.49 \pm 4.06$ ,  $t = 8.134$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.180 \pm 0.052$  vs  $0.273 \pm 0.069$ ,  $t = 8.322$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the patients carrying (GG) genotype of DcR2 (rs1133782), the expression levels of both DcR2 (rs1133782) mRNA and protein were also significantly reduced in those carrying (GA + AA) genotypes ( $3.64 \pm 1.63$  vs  $6.62 \pm 2.35$ ,  $t = 5.43$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.129 \pm 0.028$  vs  $0.198 \pm 0.047$ ,  $t = 7.147$ ,  $P < 0.01$ ). However, no significant difference in the mRNA and protein expression levels of DcR1 and OPG were observed between the patients with UC and the controls as well as the patients with UC carrying different genotypes (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** DcR2 (rs1133782) gene mutation may reduce the risk of UC by reducing the mRNA and protein expression levels of DcR2. However, DcR1 (rs12549481) and OPG (rs3102735) gene polymorphism and their intestinal tissue expression levels are not significantly correlated with the risk of UC.

**Key words** Decoy receptor; Osteoprotegerin; Ulcerative colitis; Genetic polymorphism; Colonic tissue expression

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性肠道炎症,主要累及结肠黏膜和黏膜下层,范围多自远端结肠开始,可逆行向近端发展,甚至累及全结肠及末端回肠,病灶多呈连续性分布。流行病学数据显示,UC 的全球发生率不断升高,我国亦是逐年增加<sup>[1]</sup>。UC 的确切病因和发生机制至今尚未阐明,而且由于缺少特异性的治疗手段和药物,UC 患者的病情常迁延、反复,不仅严重影响患者的生活质量,也给家庭和社会带来沉重的负担。

细胞凋亡(apoptosis)是调控机体正常发育、维护

内环境稳定的重要生理过程,研究证实细胞凋亡失调在 UC 的发病中占有十分重要的地位,肠黏膜上皮细胞凋亡过度,黏膜固有层淋巴细胞(LPT)凋亡抵抗和凋亡迟滞,是导致肠组织炎性反应发生和持续的重要原因<sup>[2]</sup>。研究发现在 UC 炎症局部及其邻近区域,整个结肠隐窝上皮细胞均有凋亡现象。用多种凋亡标志物检测 UC 和正常结肠上皮细胞凋亡的程度和范围,发现活动性 UC 病变区域上皮细胞凋亡发生的程度和范围都高于正常组织<sup>[3]</sup>。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis

factor related apoptosis – inducing ligand, TRAIL) 能激活外源性凋亡途径, 促进细胞凋亡。研究证实 TRAIL 与类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT) 等疾病相关<sup>[4~7]</sup>。TRAIL 主要通过与死亡受体 (death receptor, DR) 4 或 DR5 结合, 产生促细胞凋亡信号, 诱导靶细胞凋亡。除 DR4、DR5 外, TRAIL 受体家族还包括诱骗受体 (decoy receptor, DcR) 1、DcR2 及护骨素 (osteoprotegerin, OPG)。TRAIL 与死亡受体结合, 通过天冬氨酸蛋白水解酶 -8 (cysteinyl aspartate specific proteinase -8, caspase -8) 和 Fas 相关死亡结构域 (Fas – associated death domain, FADD) 途径转导凋亡信号, 但 DcR1 缺乏跨膜区及胞内域, DcR2 仅含有截断的死亡结构域, OPG 缺乏功能性的死亡结构域, 因此这 3 种受体与 TRAIL 结合后不仅不产生细胞凋亡信号, 还与 DR4 或 DR5 竞争性结合 TRAIL, 抑制靶细胞凋亡。

本研究组前期初步探讨了 TRAIL 基因 3' 非翻译端 (G1525A、G1588A、C1595T) 3 个 SNPs 和血浆 sTRAIL 水平以及死亡受体 DR4、DR5 基因多态性与中国汉族人群 UC 易感性的关系, 结果发现 UC 患者中 TRAIL (G1525A、G1588A、C1595T) 位点的突变率明显高于对照组, 提示这 3 个 SNP 的突变对 UC 具有保护作用, 可能是影响 UC 易感性的潜在功能性位点<sup>[8]</sup>。进一步研究发现 DcR2 (rs1133782 位点) 基因多态性可能影响 UC 的易感性, OPG (rs3102735) 基因突变不仅会增加 UC 的患病风险, 还可能影响 UC 的疾病严重程度<sup>[9]</sup>。但由于 TRAIL 的生物学效应受多种因素的影响, 尤其是与 TRAIL 受体家族的表达或功能密不可分, 因此本研究将进一步探讨结肠组织中 DcR1、DcR2 和 OPG 的表达水平与 UC 的关系, 旨在为揭示 UC 的遗传免疫学机制提供线索。

## 对象与方法

1. 研究对象: 收集 2018 年 3 月 ~ 2019 年 4 月温州医科大学附属第二医院消化住院和门诊确诊的 UC 患者 56 例, 其中男性 26 例, 女性 30 例, 患者平均年龄  $38.42 \pm 15.24$  岁。同期于温州医科大学附属第二医院消化内科收集的性别、年龄相匹配的良性结肠息肉患者 62 例 (男性 30 例, 女性 32 例), 患者平均年龄  $37.56 \pm 16.36$  岁。依据中华医学会消化病分会制定

的“炎症性肠病诊断与治疗的共识意见”<sup>[10]</sup>, 经临床、实验室、胃镜、结肠镜、小肠镜或胶囊内镜、放射影像学及病理组织学等检查综合确立 UC 诊断, 所有纳入研究的病例均为初发型 UC。依据结肠镜表现将 UC 疾病部位分为远端结肠炎 (E1 + E2, 31 例) 和广泛结肠炎 (E3, 25 例)。依据“改良的 Truelove & Witts 评分”将 UC 疾病严重程度分为轻度 (23 例)、中度 (28 例) 和重度 (5 例)<sup>[11]</sup>。所有 UC 病例纳入前经各项检查排除感染性腹泻、缺血性肠病、放射性肠炎、消化道肿瘤、糖尿病、系统性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎等疾病。以上研究对象均来自无血缘关系的浙江汉族人群, 所有入选者均签署知情同意书, 本研究获得温州医科大学附属第二医院医学伦理学委员会批准。

2. RT – qPCR 检测结肠组织中 DcR1、DcR2 和 OPG 的表达水平: (1) 标本采集: 56 例 UC 患者和 62 例性别、年龄相匹配的良性结肠息肉患者均采用结肠镜活检钳留取乙状结肠部位 (距肛缘 30cm) 的黏膜组织, 大小约  $2\text{mm} \times 2\text{mm} \times 2$  块, 一部分置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存备用, 另一部分用 4% 多聚甲醛固定保存, 石蜡包埋后以  $4 \sim 5\mu\text{m}$  厚度连续病理切片。(2) RT – qPCR 检测: 采用 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 按照试剂盒说明书, 在严格无菌条件下提取结肠组织总 RNA。NanoDrop – 2000 分光光度计 (美国 Thermo 公司) 检测 RNA 纯度和浓度。使用反转录试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司) 合成 cDNA, 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 序列如下:  $\beta$  – actin 上游引物: 5' – CACCCAGCACAAATGAAGATCAAGAT – 3', 下游引物: 5' – CCAGTTTTAACCTGAGTCAGC – 3'; DcR1 上游引物: 5' – GTGGTTCGTTTGATTGCCCC – 3', 下游引物: 5' – CGTGTGATTGACTCGTGG – 3'; DcR2 上游引物: 5' – AACATGGCCTGCTCACTG-GACG – 3', 下游引物: 5' – ATCTGCCGTCTCACTG-GTCTG – 3'; OPG 上游引物: 5' – CCTGGATTG-GAGTGGTGCAA – 3', 下游引物: 5' – AATGCCTCCT-CACACAGGGTA – 3'; 以 cDNA 为模板, 严格按照 RT – qPCR 试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司) 说明书进行实验操作,  $25\mu\text{l}$  反应体系中含 cDNA  $2.5\mu\text{l}$ , 上下游引物各  $1.0\mu\text{l}$ ,  $2 \times$  real time RT – PCR Mix  $12.5\mu\text{l}$  和适量去离子水。反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10min,  $95^{\circ}\text{C}$  15s,  $60^{\circ}\text{C}$  1min, 共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 相对表达量。

3. 免疫组织化学法检测结肠组织中 DcR1、DcR2

和 OPG 蛋白表达水平: 主要试剂包括鼠抗人 DcR1、DcR2、OPG 抗体(英国 Abcam 公司), 抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒(丹麦 Dako Denmark A/S 公司)。石蜡切片置于 65℃ 烘箱中烘片 2 h, 然后二甲苯脱蜡, 经梯度乙醇水化, 切片 PBS 浸泡后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。切片置于 pH 6.0 柠檬酸缓冲液中微波修复, 微波炉中火至沸后断电, 间隔 10 min 低火至沸。自然冷却后用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。切片放入 3% 过氧化氢溶液, 室温下孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 甩干后用 5% 牛血清白蛋白(BSA)(瑞士罗氏公司)室温 20 min 封闭非特异性反应位点。每张切片加入 50 μl 200 倍稀释的鼠抗人 DcR1、DcR2、OPG 抗体(英国 Abcam 公司)覆盖组织, 4℃ 过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。去除 PBS 液, 每张切片加 50~100 μl 的抗兔/鼠通用型免疫组化二抗(丹麦 Dako Denmark A/S 公司), 4℃ 孵育 50 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。去除 PBS, 每张切片加 50~100 μl 新鲜配制二氨基联苯胺(DAB) 溶液, 显微镜下控制显色时间。显色完全后, 蒸馏水冲洗, 苏木精复染, 1% 盐酸乙醇分化(1 s), 蒸馏水冲洗, 1% 氨水(NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)返蓝, 自来水冲洗。最后切片经过梯度乙醇(70%~90%~95%~100%)各 10 min, 脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 显微镜下观察。免疫组化结果判定以细胞质或细胞核中出现棕黄色为阳性。在 200 倍镜下每张切片随机选取 5 个视野, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)分析每张图片中阳性染色部分的平均光密度(IOD/Area)值, 取均值表示 DcR1、DcR2、OPG 蛋白表达水平。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。采用  $\chi^2$  检验分析 DcR1(rs12549481)、DcR2(rs1133782) 和 OPG(rs3102735) 基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。性别和平均年龄比较分别采用  $\chi^2$  检验和两独立样本 t 检验。采用非条件 Logistic 回归分析 DcR1、DcR2、OPG 基因多态性分布差异及其对 UC 患者临床病理特征的影响。采用 Haplovie 4.2 软件进行连锁不平衡分析。DcR1、DcR2、OPG mRNA 和蛋白表达水平用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, UC 组和对照组之间采用单因素方差分析比较结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 和蛋白表达水平差异。进一步依据基因型将 UC 患者分组, 携带正常野生基因型的患者

为一组, 携带杂合子突变基因型或纯合子突变基因型的患者归为另一组, 两组之间采用两独立样本 t 检验比较结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 和蛋白表达水平差异, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. DcR1、DcR2、OPG 基因多态性与 UC 易感性的关系: UC 组和对照组中, DcR1(rs12549481)、DcR2(rs1133782) 和 OPG(rs3102735) 的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(UC 组:  $P = 0.543, 0.763, 0.845$ ; 对照组:  $P = 0.666, 0.587, 0.582$ )。非条件 Logistic 回归分析发现, 与对照组比较, UC 组中 DcR2(rs1133782) 的突变等位基因(A)和基因型(GA+AA)频率均显著增高(15.18% vs 6.45%, OR = 2.595, 95% CI: 1.073~6.274,  $P = 0.030$ ; 28.57% vs 12.90%, OR = 2.700, 95% CI: 1.053~6.926,  $P = 0.035$ , 表 1)。而其他两个 SNP 的突变等位基因和基因型频率在 UC 组和对照组之间比较, 差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

2. UC 组和对照组的结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 表达水平比较: UC 患者结肠组织中 DcR2 mRNA 表达水平显著低于对照组( $4.49 \pm 2.29$  vs  $9.49 \pm 4.06$ ,  $t = 8.134$ ,  $P < 0.01$ )。56 例 UC 患者中, 携带 DcR2(rs1133782)(GG) 基因型 40 例, (GA) 基因型 15 例, (AA) 基因型 1 例。与携带 DcR2(rs1133782) 基因型(GG) 的 UC 患者比较, 携带 DcR2(rs1133782)(GA+AA) 基因型的患者结肠组织中 DcR2 mRNA 表达水平显著降低( $3.64 \pm 1.63$  vs  $6.62 \pm 2.35$ ,  $t = 5.43$ ,  $P < 0.01$ )。而 UC 组中, DcR1(rs12549481) 和 OPG(rs3102735) 不同基因型携带者之间 DcR1、OPG mRNA 表达水平比较, 差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

3. UC 组和对照组的结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG 蛋白表达水平比较: UC 组结肠组织中 DcR2 蛋白表达水平显著低于对照组( $0.180 \pm 0.052$  vs  $0.273 \pm 0.069$ ,  $t = 8.322$ ,  $P < 0.01$ , 图 1)。UC 患者中, 与携带 DcR2(rs1133782)(GG) 基因型的患者比较, 携带 DcR2(rs1133782)(GA+AA) 基因型的患者结肠组织中 DcR2 蛋白表达水平也显著降低( $0.129 \pm 0.028$  vs  $0.198 \pm 0.047$ ,  $t = 7.147$ ,  $P < 0.01$ , 图 2)。而 UC 组中, DcR1 和 OPG 的不同基因型携带者之间蛋白表达水平比较, 差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

表 1 溃疡性结肠炎(UC)组和对照组 DcR1、DcR2、OPG 基因多态性分布差异[n(%)]

基因	对照组(n=62)	UC 组(n=56)	P	OR(95% CI)
DcR1 (rs12549481)				
TT	37(59.68)	33(58.93)		
TC	21(33.87)	21(37.50)		
CC	4(6.45)	2(3.57)	0.934	1.032(0.494~2.152)
TC + CC	25(40.32)	23(41.07)		
等位基因 T	95(76.61)	87(77.68)		
等位基因 C	29(23.39)	25(22.32)	0.846	0.941(0.512~1.731)
DcR2 (rs1133782)				
GG	54(87.10)	40(71.43)		
GA	8(12.90)	15(26.79)		
AA	0(0)	1(1.78)	0.035	2.700(1.053~6.926)
GA + AA	8(12.90)	14(28.57)		
等位基因 G	116(93.55)	95(84.82)		
等位基因 A	8(6.45)	17(15.18)	0.030	2.595(1.073~6.274)
OPG (rs3102735)				
CC	3(4.84)	2(3.57)		
CT	18(29.03)	16(28.57)		
TT	41(66.13)	38(67.86)	0.842	0.925(0.429~1.995)
CC + CT	21(33.87)	18(32.14)		
等位基因 C	24(19.35)	20(17.86)		
等位基因 T	100(80.65)	92(82.14)	0.768	1.104(0.572~2.131)

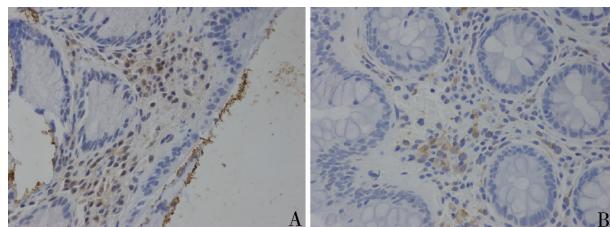


图 1 两组结肠组织中 DcR2 蛋白的染色结果(HE, ×400)

A. 对照组; B. UC 患者

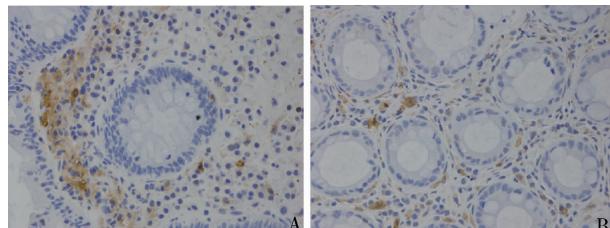


图 2 UC 患者结肠组织中 DcR2 蛋白的

染色结果(HE, ×400)

A. 基因型 GG; B. 基因型 GA + AA

## 讨 论

人类 DcR1、DcR2 基因均定位于 8 号染色体短臂 2 区 1~2 带。DcR1 (rs12549481) 位于启动子上游第 376 个碱基位点, 当该位点野生型等位基因(T)突变为(C)后可能在转录水平影响 DcR1 蛋白表达水平<sup>[11,12]</sup>。DcR2 (rs1133782) 位于第 7 外显子, 此 SNP

的等位基因(G)突变为(A)时, 可以使正常的亮氨酸突变为丝氨酸, 从而导致 DcR2 蛋白空间构象和生理功能发生异常<sup>[13]</sup>。OPG 基因位于染色体 8 号染色体长臂 2 区 4 带, OPG (rs3102735) 位于启动子上游第 759 个碱基位点, 此等位基因(C)突变为(T)时可能影响 OPG 的蛋白质表达水平<sup>[14]</sup>。理论上, TRAIL 凋亡信号主要受 TRAIL 及其受体的影响。

笔者前期研究发现, DcR2 (rs1133782) 基因多态性可能影响 UC 的易感性, OPG (rs3102735) 基因突变不仅会增加 UC 的患病风险, 还可能影响 UC 的疾病严重程度。本研究也证实 DcR2 (rs1133782) 突变可能增加 UC 的发病风险, 但因为样本量所限, 故未进行进一步分层分析。近年来, DcR1、DcR2 和 OPG 基因多态性及其表达水平与多种肿瘤及自身免疫性疾病的相关性研究备受研究者的关注。Ricciioni 等<sup>[11]</sup> 发现急性髓性白血病中 DcR1、DcR2 的表达水平增高, 并与该病病程显著相关。有研究报道, DcR1 (rs12549481) 基因多态性与韩国人群早期非小细胞肺癌的发病无显著相关性<sup>[15]</sup>。另有研究显示, DcR1 (rs12549481) 基因多态性与中国汉族人群 T 细胞淋巴瘤发病风险亦无显著关联<sup>[16]</sup>。Ulybina 等<sup>[17]</sup> 研究报道, DcR2 (rs1133782) 基因多态性与俄罗斯人群肺癌的发病风险无明显关联。还有研究显示 DcR2 (rs1133782) 基因多态性与中国汉族人群的 T 细胞淋

巴瘤的发病风险无显著相关性<sup>[16]</sup>。此外,有研究者对法国前列腺患者的研究显示 DcR2 水平下调能提高前列腺癌中 LNCaP 细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡的敏感度,提示 DcR2 可能与前列腺癌的发病有关<sup>[12]</sup>。

Büneker 等<sup>[13]</sup>研究认为 DR4/(DcR1 + DcR2) 之比可作为预测肿瘤细胞是否对 TRAIL 诱导的凋亡反应敏感的指标。Liu 等<sup>[14]</sup>研究发现 DcR2 是 p53 的靶基因之一,受内源性 p53 结合位点的调控,并且 DcR2 还能调节患者对化疗药物的敏感度。另有研究报道 DcR1、DcR2 对死亡受体的影响存在差异,DcR2 优先抑制 DR5 诱导的凋亡反应,提示在诱骗受体中,DcR2 可能较 DcR1 的作用更为重要<sup>[18]</sup>。Christoph 等<sup>[19]</sup>研究发现,OPG mRNA 表达水平与前列腺癌患者癌细胞扩散相关。另有研究发现 CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 DcR1 和 DcR2 的表达水平与 RA 的严重程度相关。Ney 等<sup>[20]</sup>在高加索人群中发现携带 OPG (rs3102735) 等位基因(C)发生乳腺癌的风险性将增加 1.5 倍。对自身免疫性甲状腺的研究显示,OPG (rs3102735) 基因多态性与患者的骨密度相关,该位点等位基因(C)的携带者,其远端胫骨发生骨密度降低的风险性可能增加。Assmann 等<sup>[21]</sup>研究报道 OPG(rs3102735) 基因多态性与德国人群 RA 的易感性无关。另有研究显示,OPG(rs3102735) 基因多态性可能不影响银屑病的易感性。

本研究采用 RT - qPCR 和免疫组化法检测结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 和蛋白水平,结果发现与良性结肠息肉对照组比较,UC 患者结肠组织中 DcR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低。本研究还在携带不同基因型的 UC 患者之间,进一步分析比较结肠组织中 DcR1、DcR2、OPG mRNA 和蛋白表达水平是否存在差异。结果发现与携带 DcR2 (rs1133782) (GG)基因型的 UC 患者比较,携带(GA + AA)基因型的 UC 患者结肠组织中 DcR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,但对照组和 UC 患者之间以及携带不同基因型的 UC 患者之间 DcR1、OPG mRNA 及蛋白表达水平比较差异均无统计学意义。上述研究结果提示,DcR2 (rs1133782) 基因突变可能降低 UC 的发病风险,机制可能通过降低 DcR2 mRNA 和蛋白表达水平发挥作用,DcR1 (rs12549481) 和 OPG (rs3102735) 基因多态性及其肠组织表达水平与 UC 的发病风险无显著关联。而 DcR1 和 DcR2 抑制 TRAIL 凋亡机制的差异充分表明 TRAIL 凋亡信号的调节机制及影响

因素相当复杂。综合上述研究结果,笔者推测在 UC 病程中 DcR2 对 TRAIL 凋亡信号的抑制作用可能比 DcR1 更为重要,DcR2 (rs1133782) 可能是影响 UC 易感性的潜在功能性位点,突变后可能造成 DcR2 蛋白的空间结构和功能发生异常,使 DcR2 对 TRAIL 凋亡信号的抑制效应降低,进而影响 UC 的发病风险。OPG 属分泌型糖蛋白,是一种可溶性游离受体,在体内主要发挥抑制破骨细胞发生和增加骨密度的作用。在正常生理状态下,与 TRAIL 的其他受体比较,OPG 与 TRAIL 的亲和力最弱,所诱导的凋亡抑制作用也显著弱于 DcR1 和 DcR2<sup>[22]</sup>。

综上所述,本研究发现 DcR2 (rs1133782) 基因突变可能降低 UC 的发病风险,机制可能通过降低 DcR2 mRNA 和蛋白表达水平发挥作用,DcR1 (rs12549481) 和 OPG (rs3102735) 基因多态性及其结肠组织表达水平与 UC 的发病风险无显著关联。但由于 TRAIL 诱导凋亡的机制纷繁复杂,本研究尚无法阐明 DcR2 (rs1133782) 影响 UC 发病的具体机制,有待于后续研究进一步探讨和论证。

## 参考文献

- 1 Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease [J]. Scand J Gastroenterol, 2015, 50(8): 942–951
- 2 Qiu W, Wu B, Wang X, et al. PUMA – mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in humans and mice [J]. J Clin Investigat, 2011, 121(5): 1722–1732
- 3 Kokkonen TS, Karttunen TJ. Endothelial fas – ligand in inflammatory bowel diseases and in acute appendicitis [J]. J Histochem Cytochem, 2015, 63(12): 931–942
- 4 Remuzgo – Martínez S, Genre F, López – Mejías R, et al. Expression of osteoprotegerin and its ligands, RANKL and TRAIL, in rheumatoid arthritis [J]. Sci Rep, 2016, 12(6): 29713
- 5 Taheri M, Nemati S, Movafagh A, et al. TRAIL gene expression analysis in multiple sclerosis patients [J]. Hum Antibodies, 2016, 24(1–2): 33–38
- 6 Liphaus BL, Kiss MHB, Carrasco S, et al. Increased serum sFas, sTRAIL, and reduced sFasL in juvenile – onset systemic lupus erythematosus [J]. Clin Rheumatol, 2017, 36(12): 2847–2852
- 7 Biktagirova EM, Sattarova LI, Vagapova GR, et al. Biochemical and immunological markers of autoimmune thyroiditis [J]. Biomed Khim, 2016, 62(4): 458–465
- 8 蒋益,裴继华,林李森,等. 溃疡性结肠炎患者中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因多态性及单倍型分析 [J]. 中华消化杂志, 2011, 31: 812–816
- 9 郑香云,蒋平,吴昊,等. 诱骗受体及护骨素基因多态性与溃疡性结肠炎的关系 [J]. 中华内科杂志, 2014, 7(53): 521–526
- 10 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2018 年, 北京) [J]. 中华消化杂志, 2018, 38

- (5):292-311
- 11 Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, et al. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL [J]. Haematologica, 2005, 90(5): 612-624
- 12 Vindrieux D, Réveiller M, Chantepie J, et al. Down-regulation of DcR2 sensitizes androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. Cancer Cell Int, 2011, 11: 42
- 13 Büneker C, Mohr A, Zwacka RM. The TRAIL-receptor-1;TRAIL-receptor-3 and -4 ratio is a predictor for TRAIL sensitivity of cancer cells [J]. Oncol Rep, 2009, 21(5): 1289-1295
- 14 Liu X, Yue P, Khuri FR, et al. Decoy receptor 2 (DcR2) is a p53 target gene and regulates chemosensitivity [J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9169-9175
- 15 Lee EB, Jeon HS, Yoo SS, et al. Polymorphisms in apoptosis-related genes and survival of patients with early-stage non-small-cell lung cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(10): 2608-2618
- 16 Zhai K, Chang J, Wu C, et al. Association between genetic variations in tumor necrosis factor receptor genes and survival of patients with T-cell lymphoma [J]. Chin J Cancer, 2012, 31(7): 335-341
- 17 Ulybina YM, Kuligina ESh, Mitiushkina NV, et al. Coding polymorphisms in Casp5, Casp8 and DR4 genes may play a role in predisposition to lung cancer [J]. Cancer Lett, 2009, 278(2): 183-191
- 18 Merino D, Lalaoui N, Morizot A, et al. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2 [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(19): 7046-7055
- 19 Christoph F, König F, Lebentrau S, et al. RANKL/RANK/OPG cytokine receptor system: mRNA expression pattern in BPH, primary and metastatic prostate cancer disease [J]. World J Urol, 2018, 36(2): 187-192
- 20 Ney JT, Juhasz-Boess I, Gruenhage F, et al. Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 40
- 21 Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, et al. Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study [J]. J Rheumatol, 2010, 37(5): 900-904
- 22 Zhong HH, Wang HY, Li J, et al. TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(11): 1373-1385

(收稿日期:2019-10-10)

(修回日期:2020-01-02)

## PSMB8 在人绒毛膜滋养层细胞中对细胞凋亡和自噬的影响

栾晓瑾 颜一丹 陈霞 王敏 陈万银 郑倩雯 谢冰 于骏 方杰

**摘要 目的** 初步探讨蛋白酶体亚基 PSMB8 (proteasome subunit beta 8) 对人绒毛膜滋养层细胞 (HTR-8/Svneo) 凋亡及自噬的影响。**方法** 将 HTR-8 细胞分为转染组和对照组, 采用瞬时转染的方法分别将 PSMB8 siRNA-1、PSMB8 siRNA-2 转入转染组中, 将 NC siRNA 转入对照组中。转染 48 h 后用 qRT-PCR 进行干涉效率验证, CCK-8 检测细胞增殖情况, TUNEL 和流式细胞术分析细胞凋亡情况, 免疫荧光染色检测细胞内 caspase-3 (cleaved) 和 LC3 蛋白的表达, qRT-PCR 检测细胞中自噬相关基因 mRNA 表达水平。**结果** qRT-PCR 结果显示, PSMB8 siRNA-1 组干扰效果较好。与对照组比较, PSMB8 siRNA-1 组细胞增殖能力减弱, HTR-8 细胞中 TUNEL ( $15.05 \pm 2.62$  vs  $33.40 \pm 2.44$ ,  $P = 0.000$ ) 和 caspase-3 (cleaved) ( $21.70 \pm 5.87$  vs  $53.29 \pm 10.29$ ,  $P < 0.01$ ) 阳性率增加。流式结果显示, 与对照组比较, PSMB8 siRNA-1 组存活细胞比例减少 ( $89.10 \pm 0.78$  vs  $77.00 \pm 1.68$ ,  $P = 0.000$ ), 早期凋亡和晚期凋亡细胞比例增加 ( $9.09 \pm 0.65$  vs  $10.71 \pm 0.61$ ,  $P < 0.05$ ), 坏死细胞比例也增加 ( $2.49 \pm 0.73$  vs  $12.49 \pm 2.02$ ,  $P < 0.01$ )。与对照组比较, PSMB8 siRNA-1 组 LC3 蛋白阳性细胞率增加 ( $19.02 \pm 3.78$  vs  $31.90 \pm 4.87$ ,  $P < 0.05$ ), 各自噬相关基因 mRNA 相对表达水平均上调。**结论** 在 HTR-8 细胞中沉默 PSMB8 基因表达可以诱导细胞凋亡并且激活自噬。

**关键词** 留流产 绒毛膜滋养层细胞 蛋白酶体亚基 PSMB8 凋亡 自噬**中图分类号** R714.21      **文献标识码** A      **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.06.025

**Effect of PSMB8 on Apoptosis and Autophagy in Human Chorionic Trophoblast Cells.** Luan Xiaojin, Yan Yidan, Chen Xia, et al. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Jiangsu 212001, China

基金项目:江苏省镇江市社会发展项目(SH2018065, SH2017013);江苏大学“青年英才培育计划”项目

作者单位:212001 镇江, 江苏大学附属医院妇科

通讯作者:方杰, 电子信箱: fangjie070@163.com