

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-01-004

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

UFC1 经 YAP/CCNA2 调控肝癌细胞增殖的研究^①

黎 青^{1,2②}, 徐 琪^{1,2}, 张 冲^{1,2③}

(1. 桂林医学院附属医院广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, 广西 桂林 541001;
2. 桂林医学院附属医院广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室, 广西 桂林 541001)

摘要 目的:探究 UFC1 在肝癌进展中的作用及机制。方法:通过 TCGA 数据库分析 UFC1 在肝癌组织中的表达及其对肝癌患者预后的影响;使用慢病毒感染 Hepa1-6 小鼠肝癌细胞,构建稳定敲低 UFC1 的细胞株,克隆形成实验检测细胞增殖能力;通过 siRNA 瞬时转染细胞、沉默 UFC1 的表达,实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 与 Western blot 分别检测 YAP 及其下游细胞周期蛋白的 mRNA 和蛋白表达水平。结果:数据库分析结果显示,UFC1 在肝癌组织中高表达且与预后不良相关;敲低 UFC1 后肝癌细胞增殖能力减弱,YAP 蛋白表达下调,细胞周期蛋白 CCNA2 的表达明显降低。结论:UFC1 在肝癌组织中高表达,预示患者预后差;沉默 UFC1 可下调 YAP 及其下游 CCNA2 的表达,抑制小鼠肝癌细胞增殖,提示 UFC1 可能成为肝癌治疗的潜在靶点。

关键词: 肝癌; UFC1; YAP; CCNA2

中图分类号: R735 文献标志码: A 文章编号: 1008-2409(2023)01-0026-06

Study on UFC1 regulating the proliferation of liver cancer cells via YAP/CCNA2^①

LI Qing^{1,2②}, XU Qi^{1,2}, ZHANG Chong^{1,2③}

(1. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in Liver Injury and Repair, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001; 2. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Basic Research in Sphingolipid Metabolism Related Diseases, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

Abstract Objective: To investigate the role and mechanism of UFC1 in liver cancer progression. Methods: TCGA database was used to analyze the expression of UFC1 in liver cancer tissues and to detect the relationship between its expression and the prognosis of HCC patients. Hepa1-6 murine cells were constructed by infection with lentivirus to form a stable knockdown cell line of UFC1. Colony formation

① 基金项目:中央引导地方科技发展资金项目(桂科AD20238031);广西自然科学基金项目(2020GXNSFBA159034);国家自然科学基金青年项目(82003129)。

② 第一作者简介:黎青,硕士,研究方向为肝脏疾病。

③ 通信作者:张冲,E-mail:chongzhang.1003@163.com。

experiment was used to detect the proliferation of cells. Silencing the expression of UFC1 by transiently transfecting cells with siRNA, the mRNA and protein expression levels of YAP and its downstream cyclin were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot, respectively. Results: The database analysis results showed that UFC1 was highly expressed in liver cancer tissues and was associated with poor prognosis. After UFC1 knockdown, the proliferation of hepatoma cells was decreased, the expression of YAP protein was down-regulated, and the expression of CCNA2 was significantly reduced. Conclusion: UFC1 is highly expressed in liver cancer, indicating poor prognosis of patients. UFC1 silencing can down-regulate the expression of YAP and its downstream CCNA2, and inhibit the proliferation of mouse liver cancer cells. It suggests that UFC1 may be a potential target for the treatment of liver cancer.

Keywords: liver cancer; UFC1; YAP; CCNA2

原发性肝癌简称肝癌,是一种在世界范围内常见的、高致死率的恶性肿瘤。我国目前肝癌患者数量占全球肝癌患者总数的 50%^[1-2]。肿瘤细胞恶性生长是癌症的主要特征之一,发掘新的导致肝癌细胞恶性生长的分子机制,对于进一步解释肝癌的发病机理以及研发新的靶向肝癌的治疗方法尤为重要。

UFMylation 是一种独特的类泛素修饰系统,与 DNA 损伤修复、有丝分裂和内质网稳态等多种细胞进程相关^[3]。例如,UFMylation 修饰提高拮抗 p53 泛素化和蛋白酶体降解以提高 p53 的稳定性,从而抑制结肠癌发展^[4];核受体共激活因子 ASC1 的 UFMylation 修饰是 17 β -雌二醇(E₂)反式激活雌激素受体 α (ER α)的关键步骤,可以促进 ER α 介导的乳腺癌发展^[5];MRE11 的 UFMylation 则对维持端粒长度及造血干细胞生存至关重要^[6]。因此,UFMylation 可能通过靶向修饰不同的底物参与机体的生理功能或病理过程,而且在癌症及其他疾病中也发挥着重要作用。UFC1 是 UFMylation 中不可缺少的 E₂ 样结合酶,该修饰过程中 UFC1 通过自身半胱氨酸侧链结合 UBA5 激活的 UFM1,并同 UFL1 一起将 UFM1 转移至底物上。目前,对于 UFC1 的研究主要集中在其类泛素化修饰功能方面,而对于其他功能却少有报道。人们发现 UFC1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤、乳腺癌肿瘤中的异常高表达还与患者预后不良相关^[7-8],但其作用机制尚不清楚;另外,UFC1 在肝癌中的作用目前仍未见报道。因此,本文将探讨 UFC1

对肝癌细胞生长的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6(购自广州赛库生物技术有限公司)。

1.2 生物信息学分析

UFC1 表达及生存分析曲线分别从 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.htm>) 和 KM plot (https://www.kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=pancancer_rnaseq) 数据库获取。

1.3 构建稳定敲低 UFC1 的 Hepa1-6 细胞

将 PCDH-shNC 和 PCDH-shUFC1 质粒分别转染至 293T 人胚肾细胞中获得病毒,感染 Hepa1-6 细胞 48 h 后添加嘌呤霉素,收集细胞检测 UFC1 基因的表达,筛选获得稳定敲低 UFC1 的 Hepa1-6(Hepa1-6-shUFC1)细胞。

1.4 实时荧光定量 PCR 实验

使用 Trizol 法提取 RNA,使用反转录试剂盒,逆转录得到 cDNA。以 2 μ g 的 cDNA 为模板,采用 ABI 7500Fast 荧光定量 PCR 仪分别测定 siRNA 干扰效率和转染 72 h 后 AURKA、AURKB、CCNA2、CCNB1、CDC20、CDC25B 和内参基因 β -actin 的 RNA 表达,获得相对表达量。引物设计,见表 1。

表 1 各基因引物序列

名称	上游引物(5' - 3')	下游引物(5' - 3')
AURKA	CTGGATGCTGCAAACGGATAG	CGAAGGGAACAGTGGTCTTAACA
AURKB	CAGAAGGAGAACGCCTACCC	GAGAGCAAGCGCAGATGTC
CCNA2	GCCTTCACCATTTCATGTGGAT	TTGCTGCGGGTAAAGAGACAG
CCNB1	AAGGTGCCTGTGTGAACC	GTCAGCCCCATCATCTGCCG
CDC20	TTCGTGTTGAGAGCGATTTC	ACCTTGGAACTAGATTGGCCAG
CDC25B	TCCGATCCTTACCAGTGAGG	GGGCAGAGCTGGAATGAGG
β -actin	CCCTGAAGTACCCATTGAA	CTTTTCACGGTTGGCCTTAG

1.5 细胞克隆形成实验

取 Hepa1-6-shUFC1 细胞,按 1×10^3 个细胞/孔分别接种于 6 孔板中,轻晃孔板,使孔中细胞尽可能均匀。1 周后终止培养并弃去培养基,加入甲醇固定细胞,使用结晶紫溶液染色。拍摄图像后通过 Image J 软件进行细胞群落数分析。

1.6 转染 siRNA

将 Hepa1-6 细胞接种于 12 孔板中,随机分为未转

染组(NC)、siRNA 阴性对照组(siNC)和 UFC1 siRNA 组(siUFC1),培养 24 h 后按照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司)说明书步骤分别将 UFC1 和阴性对照 siRNA 转染至细胞中。转染 12 h 后更换培养基继续培养,48 h 后收集细胞检测转染效率或继续培养用于后续实验。两组 siRNA 序列,见表 2。

表 2 siRNA 序列

名称	正义链(5' - 3')	反义链(5' - 3')
siNC	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT	ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT
siUFC1	GGUCCGACUGGAGUCCAAdTdT	UUGGACUCCAGUCGGAACdTdT

1.7 Western blot 检测

按计算量分别上样各蛋白样品,依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,然后分别加入一抗 β -actin(1 : 1 000)、YAP(1 : 1 000)、UFC1(1 : 1 000)于 4 °C 摇床孵育过夜,洗膜后加入相对应的二抗(1 : 1 000)室温孵育 1 h,曝光显影。蛋白条带图像使用 Image J 图像软件进行灰度值分析。

1.8 统计学方法

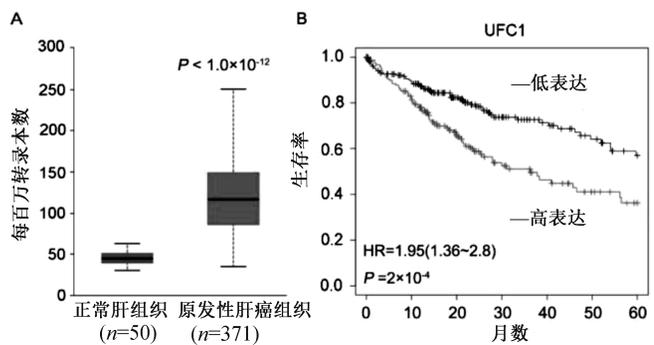
采用 Graph Pad Prism 8.0 软件分析数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验。以 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 和 *** $P < 0.001$ 分别表示不同置信区间的统计学差异。

2 结果

2.1 UFC1 在肝癌中的表达及其与预后的关联

UFC1 与肝癌的相关性分析见图 1。通过 TCGA 数据库分析发现,UFC1 在肝癌组织中表达显著增

强,见图 1A。Kaplan-Meier 分析显示,高表达 UFC1 的肝癌患者生存率明显降低,其中 5 年生存率表现更低,见图 1B。以上提示,UFC1 在肝癌中的高表达预示不良预后。

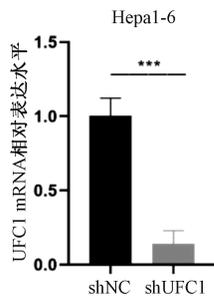


A.UFC1 mRNA 在肝癌中表达显著上调(UALCAN 数据库); B.Kaplan-Meier 分析肝癌患者的 UFC1 表达与预后的关系(KM plot 数据库)

图 1 UFC1 与肝癌的相关性分析

2.2 Hepa1-6-shUFC1 稳定转染细胞的构建

采用 RT-qPCR 法检测 Hepa1-6-shUFC1 细胞中 UFC1 的表达量。结果显示,与 Hepa1-6-shNC 细胞相比,Hepa1-6-shUFC1 细胞中 UFC1 的表达明显降低($P<0.001$),见图 2,提示已获得成功高效转染细胞株。

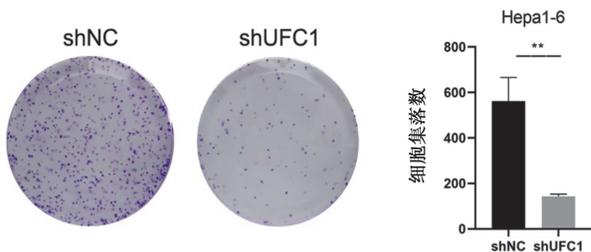


RT-qPCR 分别检测 Hepa1-6-shNC 和 Hepa1-6-shUFC1 细胞 UFC1 的 mRNA 表达水平。与 shNC 组比较,*** $P<0.001$

图 2 Hepa1-6-shUFC1 细胞中 UFC1 的表达降低

2.3 Hepa1-6-shUFC1 细胞的克隆形成能力受抑制

体外培养 Hepa1-6-shNC 和 Hepa1-6-shUFC1 细胞株进行克隆形成实验,检测细胞增殖能力。结果显示,与 Hepa1-6-shNC 细胞相比,Hepa1-6-shUFC1 细胞的集落数减少,表明其增殖能力降低($P<0.01$),见图 3。

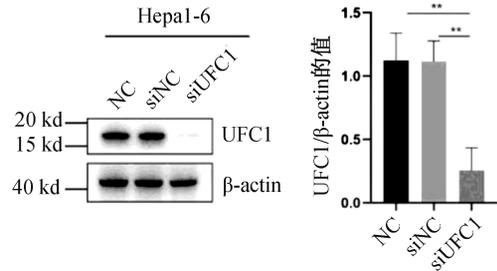


采用克隆形成实验检测细胞增殖能力。与 shNC 组比较, ** $P<0.01$

图 3 敲低 UFC1 抑制肝癌细胞克隆形成能力

2.4 UFC1 siRNA 显著下调 UFC1 的蛋白表达

通过 Western blot 实验检测 3 组 Hepa1-6 细胞中 UFC1 蛋白的表达。结果显示,与 NC 或 siNC 组相比,siUFC1 组 UFC1 蛋白的表达明显降低($P<0.01$),见图 4。

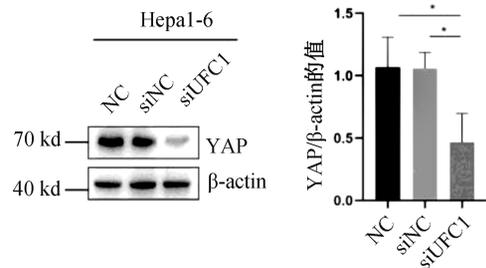


Hepa1-6 细胞转染 siNC 或 siUFC1 48 h 后,Western blot 法检测 UFC1 和 β -actin 的蛋白表达。与 NC 或 siNC 组比较, ** $P<0.01$

图 4 UFC1 siRNA 下调肝癌细胞中 UFC1 的蛋白表达

2.5 UFC1 siRNA 对 YAP 蛋白表达的影响

本研究通过探讨 UFC1 与促细胞增殖重要蛋白 YAP 之间的关系,发现与 NC 和 siNC 组相比,siUFC1 组 YAP 的蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),见图 5。以上提示,UFC1 可能通过 YAP 调控细胞增殖。

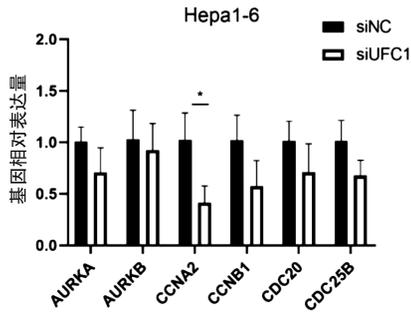


Hepa1-6 细胞转染 siNC 或 siUFC1 的 Hepa1-6 细胞,48 h 后, Western blot 法检测 YAP 和 β -actin 的蛋白水平。与 NC 或 siNC 组比较, * $P<0.05$

图 5 UFC1 siRNA 降低 YAP 的蛋白表达

2.6 UFC1 siRNA 对多种细胞周期蛋白 mRNA 表达的影响

有文献报道^[9],YAP 可能通过调控 AURKA、AURKB、CCNA2、CCNB1、CDC20 或 CDC25B 进而促进细胞增殖。因此,本研究检测了敲低 UFC1 是否会影响这些基因的表达。结果表明,沉默 UFC1 的表达同时引起 YAP 下游的细胞周期蛋白的基因表达水平呈现不同程度降低,其中 CCNA2 mRNA 表达的降低程度最明显($P<0.05$),见图 6,提示 UFC1 极有可能通过 CCNA2 调控细胞增殖。



与 siNC 组比较, * $P < 0.05$

图 6 UFC1 siRNA 下调多种细胞周期蛋白的 mRNA 表达

3 讨论

尽管肝癌治疗有手术切除、药物治疗、免疫治疗、肝脏移植等多重手段,但我国原发性肝癌死亡率仍居癌症相关死亡中的第二位。因此,寻找新的肝癌潜在治疗靶点显得尤为重要。

通过多种途径获得持续增殖信号的能力是癌细胞的主要特性之一。UFC1 是癌症中广泛表达的基因之一,与多种癌症进展相关。本文研究结果显示,UFC1 在肝癌组织中表达显著增加,且这种高表达的患者预后较差;在小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞中敲低 UFC1 的表达能显著抑制细胞克隆形成能力;敲低 UFC1 基因 48 h 后细胞中 YAP 蛋白水平降低,同时 CCNA2 表达量明显降低。YAP 作为 Hippo 信号通路下游的核心效应分子,入核后能有效激活结缔组织生长因子、cyclin D1 及 cyclin E 等下游增殖相关基因的表达,推动细胞进入细胞周期,发挥促增殖、抗凋亡的功能^[10-11]。CCNA2 是一种细胞周期蛋白编码基因,其编码的细胞周期蛋白可结合并激活 CDC2 或 CDK2 激酶,从而促进细胞周期 G1/S 和 G2/M 转换^[12]。本研究结果提示 UFC1 可能通过增加 YAP 蛋白水平进而促进 CCNA2 的转录,加快细胞周期进程、促进肝癌细胞增殖。值得关注的是,在结肠癌中 UFC1 可通过增强 p53 的稳定性,发挥抑癌作用^[4]。然而本研究结果提示 UFC1 在肝癌中发挥促癌作用,这可能是由于 UFC1 在结肠癌和肝癌中的靶点不同所导致的。UFC1 调控 YAP 蛋白水平的具体机制尚不清楚,仍有待后续进一步探讨。

本研究采用 Hepa1-6 小鼠肝癌细胞株探究 UFC1 对肝癌细胞生长的影响,该细胞具有很好的体

内成瘤能力,且能在免疫健全的 C57BL/6J 小鼠中进行成瘤。后续我们将进一步探索 UFC1 对 Hepa1-6 体内成瘤能力的影响以及 UFC1 对人肝癌细胞增殖能力的影响。

综上所述,肝癌中 UFC1 的高表达与肝癌进展、预后密切相关,敲低 UFC1 明显抑制肝癌细胞增殖,可能是与 UFC1 siRNA 通过下调 YAP/CCNA2 表达,抑制相关通路进而导致细胞周期受阻有关。本文的研究结果初步揭示了 UFC1 在促进肝癌进展中的作用和机制,有望为今后肝癌的治疗提供新的参考靶点。

参考文献:

- [1] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10):589-604.
- [2] 赫捷,陈万青,沈洪兵,等.中国人群肝癌筛查指南(2022,北京)[J].*中国肿瘤*,2022,31(8):587-631.
- [3] WITTING K F, MULDER M P C. Highly specialized ubiquitin-like modifications: shedding light into the UFM1 enigma[J]. *Biomolecules*,2021,11(2):255.
- [4] LIU J, GUAN D, DONG M G, et al. UFMylation maintains tumour suppressor p53 stability by antagonizing its ubiquitination[J]. *Nat Cell Biol*,2020,22(9):1056-1063.
- [5] YOO H M, KANG S H, KIM J Y, et al. Modification of ASC1 by UFM1 is crucial for ER α transactivation and breast cancer development[J]. *Mol Cell*,2014,56(2):261-274.
- [6] LEE L, PEREZ OLIVA A B, MARTINEZ-BALSALOBRE E, et al.UFMylation of MRE11 is essential for telomere length maintenance and hematopoietic stem cell survival[J]. *Sci Adv*,2021,7(39):eabc7371.
- [7] 田祖国,高陆,翁春岚,等.UFC1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及意义[J].*检验医学与临床*,2021,18(13):1836-1838,1842.
- [8] 贺爱兰,张波,刘如石.UFC1 基因在乳腺癌和正常乳腺组织中的表达[J].*湖南师范大学自然科学学报*,2011,34(3):69-72.
- [9] VON GISE A, LIN Z Q, SCHLEGELMILCH K, et al. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hy-

- pertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(7): 2394-2399.
- [10] PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond [J]. Physiol Rev, 2014, 94(4), 1287-1312.
- [11] MACHADO-NETO J A, LAZARINI M, FAVARO P, et al. ANKHD1, a novel component of the Hippo signaling pathway, promotes YAP1 activation and cell cycle progression in prostate cancer cells [J]. Exp Cell Res, 2014, 324(2): 137-145.
- [12] JIANG A M, ZHOU Y, GONG W L, et al. CCNA2 as an immunological biomarker encompassing tumor microenvironment and therapeutic response in multiple cancer types[J]. Oxid Med Cell, 2022, 2022: 5910575.

[收稿日期: 2022-09-22]

[责任编辑: 郭海婷 英文编辑: 阳雨君]

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-01-005

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

桂林地区危重患者弓形虫感染情况调查与 DNA 鉴定分析^①

梁 雪^{1②}, 叶桂山², 谭 洁¹, 韩明慧¹, 夏春波¹, 李中原^{1③}

(1. 桂林医学院广西脑与认知神经科学重点实验室, 广西 桂林 541199;
2. 桂林医学院附属医院感控管理科, 广西 桂林 541001)

摘要 目的: 了解广西桂林地区危重患者弓形虫感染情况。方法: 选取 2018 年 11 月至 2019 年 11 月在桂林医学院附属医院住院的危重患者 260 例, 采集患者空腹静脉血, 分离血清, 采用 ELISA 法检测血清弓形虫 IgG 抗体; 分析弓形虫感染与性别、年龄和患病类型间的相关性; 采用 PCR 技术对弓形虫感染阳性患者进行 DNA 鉴定。结果: 260 例危重患者, 弓形虫感染 IgG 阳性男 73 例、女 24 例, 弓形虫 IgG 阳性检出率为 37.31%; 男患者弓形虫 IgG 阳性率 41.01%, 高于女患者 29.27%; 弓形虫感染与危重患者性别、年龄和患病类型无相关性 ($P>0.05$); 弓形虫 IgG 阳性患者血液标本中没有检测到弓形虫特异性 DNA 序列。结论: 桂林地区危重患者弓形虫感染率较高, 年龄、患病类型不是影响弓形虫感染的危险因素。

关键词: 弓形虫感染; 危重患者; 桂林地区; DNA 鉴定

中图分类号: R382.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)01-0032-05

Investigation and DNA identification for *Toxoplasma gondii* infection in critical patients in Guilin region^①

LIANG Xue^{1②}, YE Guishan², TAN Jie¹, HAN Minghui¹, XIA Chunbo¹, LI Zhongyuan^{1③}

(1. Guangxi Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Guilin Medical University, Guilin 541199; 2. Dept. of Hospital-Acquired Infection Control, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

Abstract Objective: To investigate the infection status of *T. gondii* in critical patients in the area of Guilin, Guangxi. Methods: 260 fasting venous blood samples of critical patients admitted in the Affiliated Hospital of Guilin Medical University from Nov. 2018 to Nov. 2019 were collected, then the serum was

① 基金项目: 广西自然科学基金项目(2019GXNSFBA185031); 安徽省自然科学基金项目(1908085QC117); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划第 4 期资助项目(2020-58); 桂林医学院新引进博士科研启动项目(31304018021)。

② 第一作者简介: 梁雪, 硕士研究生在读, 研究方向为公共卫生。

③ 通信作者: 李中原, E-mail: lzy210930@163.com。

separated, and the serum IgG antibody level of *T. gondii* was detected by ELISA method. The correlation between *T. gondii* infection and gender, age and type of disease was analyzed, and all *T. gondii* IgG positive samples were identified through DNA extraction. Results: Our data showed that there were 73 male and 24 female critical patients with *T. gondii* IgG antibodies can be positive infection, with the seroprevalence rate of 37.31%; the seroprevalence rate in male was 41.01%, which is higher than 29.27% in female; and there was no correlation between *T. gondii* infection and gender, age and disease type of critical patients ($P>0.05$) and no *T. gondii*-specific DNA sequences were detected in the serum samples of patients with positive IgG. Conclusion: The infection rate of *T. gondii* is higher in critical patients in Guilin region, but the age and type of disease are not the risk factors for the infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; critical patient; Guilin region; DNA identification

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*)简称弓形虫,是一种严格在有核细胞内寄生的原虫,能够感染包括人类在内的所有温血动物,对孕妇、免疫功能缺陷患者和畜牧业生产危害大^[1-2]。弓形虫分布广泛,血清型众多,感染途径多样,存在速殖子、包囊和卵囊等多种感染形态。研究认为,弓形虫可通过黏膜、受损的皮肤或污染的食物与水而引起感染^[3]。另外,由于速殖子容易进行体外培养,脑包囊便于体内传代,弓形虫虫体已经成为深入探究人兽共患性病原微生物致病机制和感染引发人与动物行为改变的重要模式生物^[4]。

人类社会,伴侣动物比如宠物猫和宠物狗携带弓形虫的现象十分常见,已经成为弓形虫感染人的重要来源^[5]。弓形虫感染有急性和慢性之分,其中急性感染危害较明显,通常伴有持续性高热、关节痛和斑丘疹等症状,除导致弓形虫感染性炎症外^[6],严重时还能造成患者死亡^[7];慢性感染一般症状不明显,但与人和动物的行为改变紧密相关^[8]。有资料显示,弓形虫感染造成的危害与被感染宿主的免疫功能相关^[9]。但弓形虫对危重患者的感染情况,至今未见报道。因此,本研究以广西桂林地区危重患者为观察对象,探讨桂林地区危重患者弓形虫感染情况及其影响因素,为弓形虫病的预防、危重患者的治疗与监护提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Premix Taq™ Version 2.0 plus dye(购自 TaKaRa 公司); DL2000 DNA Marker[购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司];血液、细胞和组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)[购自天根生化科技(北京)有限公司];人用弓形虫 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒(上海谷研实业有限公司产品)。PCR 扩增仪、电泳仪和 iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司产品);凝胶成像系统(上海培清科技有限公司产品);台式高速离心机(美国 Sigma 公司产品);-80℃ 医用低温冰箱(购自日本 Panasonic 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 标准品与引物 弓形虫 RH 株 DNA 标准品为广西脑与认知神经科学重点实验室保存。针对弓形虫 529 bp 重复序列(Toxo-529)^[10]设计 PCR 扩增引物,委托北京六合华大基因科技有限公司合成。Toxo-529 F:5'-CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3', Toxo-529 R:5'-CTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'。

1.2.2 样品采集 收集 2018 年 11 月至 2019 年 11 月因癌症、糖尿病、脑病等病因在桂林医学院附属医院住院的 260 例危重患者的血液样品,其中包括男性血液样品 178 份,女性血液样品 82 份;少年(<18 周岁)、青年(≥18 周岁且<35 周岁)、中年(≥35 周岁且<60 周岁)和老年(≥60 岁)血液样品分别为 17

份、22 份、93 份和 128 份;癌症、糖尿病、脑病和其他疾病患者血液样品分别为 61 份、36 份、47 份和 116 份。本研究经桂林医学院医学伦理委员会审核批准;患者及其家属知情同意,以匿名形式参与研究。

1.2.3 血清制备与抗体检测 采集的血液样品于室温条件下放置 20 min 后,以 5 000 r/min 的速度离心 5 min,分离血清;血清与沉淀物分别置于 -20 ℃、-80 ℃ 冰箱冻存,备用。血清中弓形虫 IgG 特异性抗体的检测依照上海谷研实业有限公司人用弓形虫 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的使用说明进行。从弓形虫 IgG 阳性血液样品的沉淀物中提取 DNA,进行 PCR 扩增与分析。

1.2.4 DNA 提取 弓形虫 IgG 阳性血液样品沉淀物 100 μg,加等量 GA 缓冲液后,充分混匀,其余步骤参照天根生化科技(北京)有限公司血液、细胞和组织基因组 DNA 提取试剂盒的使用说明进行。需要注意的是提取基因组 DNA 时,需滴加 100 μl TE 缓冲液,室温放置 3 min 后,以 12 000 r/min 的速度离心 2 min,对所得 DNA 进行洗脱。

1.2.5 PCR 扩增与凝胶电泳 以提取的 DNA 为模板,Toxo-529 F/R 为引物,对弓形虫 Toxo-529 高度重复序列进行特异性 PCR 扩增,设阳性、阴性和空白对照。PCR 反应体系为:Premix Taq 25.0 μl,Toxo-529 F/R(20 μM)1.0 μl,DNA 2.0 μl,补加 ddH₂O 至 50.0 μl;扩增条件为:94 ℃ 预变性 7 min,94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环,72 ℃ 总延伸 10 min。所得产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件对所得数据进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 弓形虫感染情况

260 例危重患者,弓形虫 IgG 特异性抗体阳性率为 37.31%;女患者阳性率 29.27%,低于男患者阳性率

41.01%;弓形虫感染与危重患者性别($\chi^2 = 3.3098$)和年龄($\chi^2 = 0.2721$)均无相关性($P > 0.05$),见表 1 和表 2。

表 1 弓形虫感染与性别的关系分析(n,%)

组别	n	IgG 抗体 阳性(n)	IgG 抗体 阴性(n)	阳性率(%)
男	178	73	105	41.01
女	82	24	58	29.27

表 2 弓形虫感染与年龄的关系分析(n,%)

组别	n	IgG 抗体 阳性(n)	IgG 抗体 阴性(n)	阳性率(%)
少年	17	7	10	41.18
青年	22	9	13	40.91
中年	93	34	59	36.56
老年	128	47	81	36.72

2.2 弓形虫感染与危重患者患病类型间的相关性

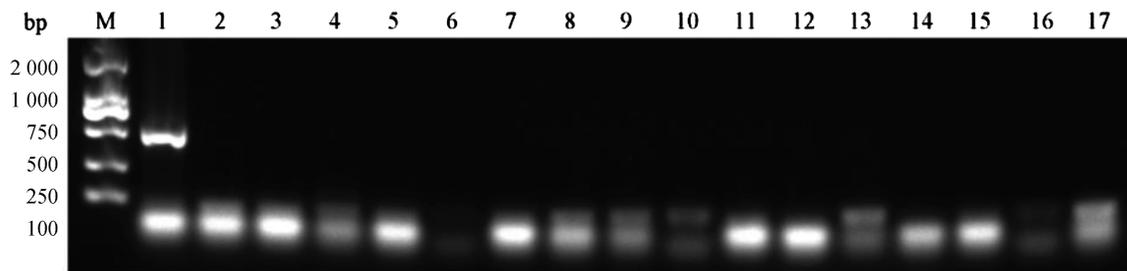
对弓形虫感染与待检危重患者患病类型间的关系进行分析时发现,弓形虫 IgG 抗体检出率与患病类型无相关性($P > 0.05$),见表 3。

表 3 弓形虫感染与危重患者患病类型的关系分析(n,%)

组别	n	IgG 抗体 阳性(n)	IgG 抗体 阴性(n)	阳性率(%)
癌症	61	18	43	29.51
糖尿病	36	17	19	47.22
脑病	47	23	24	48.94

2.3 弓形虫 Toxo-529 重复序列分析

PCR 产物凝胶电泳图谱上只有弓形虫 RH 株 DNA 标准品有 529 bp 的特异性扩增产物条带,弓形虫 IgG 抗体阳性血液样品、阴性对照和空白对照均未检测到特异性扩增产物条带,见图 1。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 弓形虫 RH 株 DNA 标准品 PCR 扩增产物; 2. 阴性对照 PCR 扩增产物; 3. 空白对照 PCR 扩增产物; 4~17. 弓形虫 IgG 抗体阳性血液样品 PCR 扩增产物

图 1 弓形虫基因组 Toxo-529 序列 PCR 扩增的凝胶电泳图谱

3 讨论

弓形虫是一种人兽共患性病原微生物,感染人和动物的现象十分常见。全球约有 1/3 的人群被弓形虫感染^[11],部分国家或地区甚至更高,而我国孕妇的弓形虫感染率则不足 10%^[12]。人类社会的伴侣动物,尤其是宠物猫,已经成为弓形虫感染人的重要来源^[5]。

自然界中弓形虫以猫-鼠的互相感染最为常见^[3]。野猫捕食被感染的野鼠后,虫体经消化道侵入猫的肠道黏膜上皮细胞,产生数以万计的配子,雌、雄配子结合后发育成卵囊,随粪便排出,野鼠一旦摄入即被感染。弓形虫急性感染引起弓形虫性脑炎^[6],严重时可导致感染者死亡^[7]。弓形虫能突破血脑屏障侵入小鼠脑组织,其作用的过程与机制至今尚未完全阐明^[13-15]。

弓形虫基因型多,分布极其广泛,对孕妇、免疫功能缺陷人群和畜牧业生产危害大,不同毒株的毒力差异很大^[1-2,16]。除孕妇等特殊人群外^[17],弓形虫是否对其他人群比如危重患者人群的感染有影响,值得深入探讨。本研究以广西桂林地区危重患者为观察对象,分析其与危重患者年龄、性别和患病类型间的关系,并用特异性 PCR 技术对弓形虫 IgG 检查阳性血液样品进行 DNA 鉴定。

结果显示,260 份危重患者待检血液样品中,73 名男患者和 24 名女患者的血清呈现弓形虫 IgG 抗体阳性,检出率为 37.31%,较世界平均水平明显提高^[11]。此外,男患者的弓形虫检出率较女患者高,弓形虫血清阳性检出率随待检危重患者的年龄增大

变化不明显,也与患者患病类型无相关,与文献报道相符^[18]。

Toxo-529 序列在众多弓形虫基因组中普遍存在且高度重复,是鉴定宿主弓形虫感染的重要参数^[10]。本研究以弓形虫 IgG 抗体阳性血液样品提取的 DNA 为模板,进行特异性 PCR 扩增,发现除弓形虫 RH 株 DNA 标准品外,其余检测样品包括阴性对照和空白对照在内,均未能扩增出目的片段,即大小为 529 bp 的 Toxo-529 序列,这给桂林地区危重患者弓形虫感染的分型带来了困难,这个问题也值得深入研究。本研究为桂林地区弓形虫感染的情况提供了重要实验室数据。

参考文献:

- [1] GARNAUD C, FRICKER-HIDALGO H, EVENGÅRD B, et al. *Toxoplasma gondii*-specific IgG avidity testing in pregnant women[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(9):1155-1160.
- [2] MILNE G, WEBSTER J P, WALKER M. *Toxoplasma gondii*: an underestimated threat? [J]. Trends Parasitol, 2020, 36(12):959-969.
- [3] ATTIAS M, TEIXEIRA D E, BENCHIMOL M, et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations [J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1):588.
- [4] SZABO E K, FINNEY C A M. *Toxoplasma gondii*: one organism, multiple models [J]. Trends Parasitol, 2017, 33(2):113-127.
- [5] MAREZE M, BENITEZ A D N, BRANDÃO A P D, et al. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil [J]. PLoS One, 2019, 14(2):e0212375.

- [6] XIAO J C, BHONDOEKHAN F, SEABERG E C, et al. Serological responses to *Toxoplasma gondii* and matrix antigen 1 predict the risk of subsequent toxoplasmic encephalitis in people living with human immunodeficiency virus (HIV)[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(7): e2270–e2277.
- [7] MUKHOPADHYAY D, ARRANZ-SOLÍS D, SAEIJ J P J. Influence of the host and parasite strain on the immune response during *Toxoplasma* infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 580425.
- [8] POSTOLACHE T T, WADHAWAN A, RUJESCU D, et al. *Toxoplasma gondii*, suicidal behavior, and intermediate phenotypes for suicidal behavior [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 665682.
- [9] SAFARPOUR H, CEVIK M, ZAREAN M, et al. Global status of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in people living with HIV [J]. AIDS, 2020, 34(3): 469–474.
- [10] HOMAN W L, VERCAMMEN M, DE BRAEKELEER J, et al. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR [J]. Int J Parasitol, 2000, 30(1): 69–75.
- [11] SAADATNIA G, GOLKAR M. A review on human toxoplasmosis [J]. Scand J Infect Dis, 2012, 44(11): 805–814.
- [12] GAO X J, ZHAO Z J, HE Z H, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China [J]. Parasitology, 2012, 139(2): 139–147.
- [13] FLEGR J. Does *Toxoplasma* infection increase sexual masochism and submissiveness? Yes and no [J]. Commun Integr Biol, 2017, 10(5–6): e1303590.
- [14] ABDULAI-SAIKU S, TONG W H, VYAS A. Behavioral manipulation by *Toxoplasma gondii*: does brain residence matter? [J]. Trends Parasitol, 2021, 37(5): 381–390.
- [15] ROSS E C, OLIVERA G C, BARRAGAN A. Early passage of *Toxoplasma gondii* across the blood-brain barrier [J]. Trends Parasitol, 2022, 38(6): 450–461.
- [16] MCGOVERN K E, CABRAL C M, MORRISON H W, et al. Aging with *Toxoplasma gondii* results in pathogen clearance, resolution of inflammation, and minimal consequences to learning and memory [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7979.
- [17] 牛丽丽, 刘红丽. 孕产妇弓形虫感染影响因素及对妊娠结局的影响 [J]. 实用预防医学, 2022, 29(7): 869–871.
- [18] MATTA S K, RINKENBERGER N, DUNAY I R, et al. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(7): 467–480.

[收稿日期: 2022-10-09]

[责任编辑: 涂 剑, 向 秋 英文编辑: 阳雨君]