

## 慢性阻塞性肺疾病患者血清胞浆型磷脂酶A2 $\alpha$ 基因和表达水平检测的临床意义\*

徐岩<sup>1</sup>, 阿依吐兰·买买提<sup>2</sup>, 丁剑冰<sup>1</sup> (1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆和田地区于田县医院检验科, 新疆和田 848400)

**摘要:**目的 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者检测胞浆型磷脂酶 cPLA2 $\alpha$ (cPLA2 $\alpha$ )基因表达水平的临床意义。方法 选取收治的 COPD 患者 90 例,按照 COPD 严重程度分级标准分为轻度组 30 例,中度组 35 例和重度组 25 例,以同期 90 例肺功能正常的健康体检者为对照组。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测受试者血清中 cPLA2 $\alpha$  含量,同时用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测同组患者 cPLA2 $\alpha$  基因表达水平。结果 COPD 轻度组 cPLA2 $\alpha$  的含量为(0.039 2 $\pm$ 0.005 1)pg/ml,表达为(0.68 $\pm$ 0.01);中度组含量为(0.049 8 $\pm$ 0.007 4)pg/ml,表达为(0.92 $\pm$ 0.02);重度组含量为(0.055 4 $\pm$ 0.008 1)pg/ml,表达为(1.35 $\pm$ 0.02);而对照组含量为(0.010 2 $\pm$ 0.006 6)pg/ml,表达为(0.11 $\pm$ 0.01)。无论是 cPLA2 $\alpha$  血清学水平还是基因表达水平,四组之间差异均有统计学意义( $F=8.643, 12.415, P<0.05$ )。且 COPD 各组随着病变程度加重 cPLA2 $\alpha$  的水平逐渐增加,且三组彼此比较差异有统计学意义( $t=3.013\sim 5.817, 5.039\sim 11.667, P$  均 $<0.05$ )。结论 血 cPLA2 $\alpha$  水平可预示 COPD 严重程度,cPLA2 $\alpha$  是诊疗 COPD 及分级的新靶标。

**关键词:**胞浆型磷脂酶 A2 $\alpha$ ;逆转录聚合酶链式反应;慢性阻塞性肺疾病

中图分类号:R563;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)02-097-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.030

## Clinical Significant of Detecting the Cytoplasm of Phospholipase A2 $\alpha$ Expression in Patints with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

XU Yan<sup>1</sup>, AYITULAN · Maimaiti<sup>2</sup>, DING Jian-bing<sup>1</sup>

(1. Primary Medicine Courtyard Affiliated Xinjiang University, Urumqi 830011, China; 2. Laboratory Department of Yutian Hospital, Xinjiang Hetian 848400, China)

**Abstract:**Objective To discuss the clinical significant of detecting cytoplasm phospholipase A2 alpha (cPLA2 $\alpha$ ) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Selected treated 90 cases of patients with COPD. According to the COPD severity classification standard, they were divided into mild group of 30 cases, moderate group of 25 cases and severe group of 35 cases. In the same period of physical examination, 90 cases of normal lung function healthy were control group. Used Enzyme linked immunosorbent test (ELISA) to detect cPLA2 $\alpha$  level of these groups. At the same time, detected cPLA2 $\alpha$  expression of these groups by RT-PCR. **Results** cPLA2 $\alpha$  level in serum of mild group was (0.039 2 $\pm$ 0.005 1)pg/ml, gene expression was (0.68 $\pm$ 0.01), in moderate group (0.049 8 $\pm$ 0.007 4)pg/ml and (0.92 $\pm$ 0.02), in severe group (0.055 4 $\pm$ 0.008 1) and (1.35 $\pm$ 0.02), and in Healthy controls group (0.010 2 $\pm$ 0.006 6)pg/ml and (0.11 $\pm$ 0.01). There were significant differences among four groups ( $t=3.013\sim 5.817, 5.039\sim 11.667, P<0.05$ ). **Conclusion** Detection of blood cPLA2 $\alpha$  can indicate COPD severity, and cPLA2 $\alpha$  is the new molecular targets of diagnosis, treatment and classification COPD.

**Keywords:** cytoplasm of phospholipase A2 $\alpha$ ; reverse transcription polymerase chain reaction; chronic obstructive pulmonary disease

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是以肺泡巨噬细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞增加为主,激活各种炎性介质导致肺结构改变而造成的一种慢性和难治性疾病。由于其致病机制复杂,临床敏感性抗菌药物的使用非常棘手,临床诊疗急需敏感度高、特异度强的指标<sup>[1]</sup>。近年来胞浆型磷脂酶 A2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ )作为一种促进脂质介质产生的关键酶,当细胞受刺激时,它会首先水解磷脂,释放花生四

烯酸,继而产生前列腺素 E2(PGE2)等介质。众所周知 PGE2 与 COPD 发病密切相关<sup>[2]</sup>。故本研究探讨 COPD 与 cPLA2 $\alpha$  之间存在的一定必然联系,试图为尽早检测 COPD 的发生寻求新的作用靶标。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 2013 年 3 月~2014 年 5 月来于田县医院就诊的患者。所有患者均符合 2010 年中

\* 作者简介:徐岩(1987-),女,硕士研究生在读,研究方向:感染免疫。

通讯作者:丁剑冰,博士,教授, E-mail: djbing002@163.com。

华医学会制定的 COPD 诊治标准<sup>[3]</sup>。同时根据 COPD 病情严重程度分为轻度、中度和重度<sup>[4]</sup>。所有 COPD 患者共 90 例,其中男性 47 例,女性 43 例,年龄 51~83 岁,平均年龄  $70.2 \pm 7.5$  岁。COPD 轻度组 30 例,其中男性 16 例,女性 14 例,年龄 50~84 岁,平均年龄  $70.1 \pm 8.5$  岁。COPD 中度组 35 例,其中男性 18 例,女性 17 例,年龄 51~86 岁,平均年龄  $74.8 \pm 5.2$  岁。COPD 重度组 25 例,其中男性 13 例,女性 12 例,年龄 55~79 岁,平均年龄  $65.7 \pm 6.1$  岁。同期选取肺功能正常 90 例体检者作为对照组,其中男性 46 例,女性 44 例,年龄 55~88 岁,平均年龄  $71.8 \pm 8.8$  岁。COPD 各分级组及健康对照组性别和年龄差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

1.2 主要仪器和试剂 KODAK 凝胶成像系统(美国 Kodak 公司),PE-480 型热循环仪(美国 Perkin Elmer Cetus 公司),酶标仪(雷杜公司),cPLA2 $\alpha$  酶联免疫试剂盒(Cayman 公司),RNA 提取试剂盒(sigma 公司),cPLA2 $\alpha$  引物(上海生工生物公司),逆转录试剂盒和 PCR 反应试剂盒(大连宝生物)。

### 1.3 方法

1.3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 cPLA2 $\alpha$  含量:首先使用不同的吸头吸取缓冲液、标准品、样品、偶联物,每孔加入 100  $\mu$ l 的样品。每个样品应在至少两个稀释度下测定。每个稀释度两份检测。乙酰胆碱酯酶 Fab 段偶联物除空白(BLK)孔,每孔加入 100  $\mu$ l;所有受试者抽取外周静脉血 5 ml,3 500 r/min 离心 10 min,血清 100  $\mu$ l 加入各孔;用塑料薄膜覆盖每块板并在 4℃ 孵育过夜;最后在  $A_{405\text{ nm}} \sim A_{420\text{ nm}}$  之间的波长读板。

1.3.2 聚合酶链式反应(PCR)检测 cPLA2 $\alpha$  的表达:①按照 RNA 提取试剂盒操作说明从患者血中提取总 RNA;②cDNA 的合成:随机引物 2  $\mu$ l,总 RNA 4  $\mu$ l,再加入逆转录反应其它试剂共 40  $\mu$ l 体系 37℃ 1 h,95℃ 5 min;③PCR 反应:按照试剂盒操作说明书加样,cPLA2 $\alpha$  引物序列,上游 5'-CCGGTTGACCTGACTGACTAC-3',下游 5'-CCGGCCAGACAGCACTGTGTT-3';PCR 反应条件:95℃ 5 min 预变性,94℃ 15 s,55℃ 60 s,45 个循环;④PCR 产物电泳及鉴定: $\beta$ -actin 产物为内参照,测定所有条带的 A 值。用 A 值的相对比表示其表达水平。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,两样本均数比较采用  $t$  检验,多个样本均数比较采用方差分析。

## 2 结果

2.1 COPD 各组 cPLA2 $\alpha$  的含量 COPD 轻度组 cPLA2 $\alpha$  的含量为  $(0.039 2 \pm 0.005 1)$  pg/ml,中度组为  $(0.049 8 \pm 0.007 4)$  pg/ml,重度组为  $(0.055 4 \pm 0.008 1)$  pg/ml,而对照组为  $(0.010 2 \pm 0.006 6)$  pg/ml。四组之间差异有统计学意义( $F=8.643, P < 0.05$ )。其中 COPD 各组随着病变程度加重 cPLA2 $\alpha$  的含量逐渐增加,且三组彼此比较差异有统计学意义( $t=3.013 \sim 5.817, P$  均  $< 0.05$ )。三组 cPLA2 $\alpha$  的含量均明显低于对照组。

2.2 COPD 各组 cPLA2 $\alpha$  基因表达水平 以  $\beta$ -actin 为内参照,COPD 各组 cPLA2 $\alpha$  基因表达与之相对比(cPLA2 $\alpha$ / $\beta$ -actin),可见 COPD 轻度组 cPLA2 $\alpha$  的表达为  $(0.68 \pm 0.01)$ ,中度组为  $(0.92 \pm 0.02)$ ,重度组为  $(1.35 \pm 0.02)$ 。对照组为  $(0.11 \pm 0.01)$ 。很显然四组之间差异有统计学意义( $F=12.415, P < 0.05$ )。COPD 各组随着病变程度加重 cPLA2 $\alpha$  基因表达水平也呈上升趋势,且三组彼此比较差异有统计学意义( $t=5.039 \sim 11.667, P$  均  $< 0.05$ )。三组 cPLA2 $\alpha$  基因表达水平均明显低于对照组。

3 讨论 近年来大气污染特别是雾霾的状况严重,使患呼吸系统疾病者呈上升趋势。炎性介质诱发过敏性哮喘及气道高反应,久治不愈即变成迁延性 COPD。其主要以不完全的气流受限为特征,病变呈持续发展。现阶段临床诊断此类疾病主要依靠肺功能实验,将患者分级后进行针对性治疗。有时依靠一些生物学标志物如 C-反应蛋白(CRP),白细胞介素-6,肺趋化因子和纤溶酶原激活物抑制剂等来划分 COPD 的严重程度<sup>[4]</sup>。但这些指标不足以明确界定该病群。故临床实验室急需新的检测指标。

COPD 主要表现为肺黏膜通透性改变。有报道 cPLA2 $\alpha$  在体内表达的提高可促进肺内表面活性剂的水解,从而发生慢性阻塞性肺炎、甚至呼吸窘迫综合征<sup>[5]</sup>。cPLA2 $\alpha$  在氧自由基产生中发挥重要的作用。最新的研究发现,活化的 cPLA2 $\alpha$  可以增加溶血磷脂的生成,提高环氧合酶-2(COX-2)和脂氧合酶(LOX)活性,并大量产生甘碳烷酸类,同时促使炎性细胞因子、氧自由基及其它生物活性物质的释放<sup>[6]</sup>。从理论上讲,作为炎性介质通路中关键的酶类-cPLA2 $\alpha$ ,针对 COPD 炎性病变的治疗对策中抑制 cPLA2 $\alpha$  活性将是一种很有实效且前途光明的方法。

本研究的结果也充分表明 COPD 患者无论是血清中 cPLA2 $\alpha$  的含量还是其基因表达水平均一致性地随患者病变程度的加重而急剧升高。故临床实验室应加大开展 cPLA2 $\alpha$  的检测,COPD 发病

的潜在新机制可能就蕴藏在其中。本研究结果应值得临床医生及实验室检测人员高度关注。

#### 参考文献:

- [1] Gorska K, Krenke R, Domagala-Kulawik J, et al. Comparison of cellular and biochemical markers of airway inflammation in patients with mild-to-moderate asthma and chronic obstructive pulmonary disease: an induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid study[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(Suppl 6): 271-283.
- [2] 阿不都苏甫尔·米吉提, 海热萨·阿布力米提, 田刚. 尿酸和一氧化氮联合检测在慢性阻塞性肺疾病中的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 106-108.
- [3] Nishio K, Suzuki K, Ito Y, et al. Possible interactions of the endothelial constitutive nitric oxide synthase genotype with alcohol drinking and walking time for high serum uric acid levels among Japanese[J]. Metabolism, 2009, 54(10): 1302-1308.
- [4] 周明华. 慢性阻塞性肺疾病治疗进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(2): 124-125.
- [5] 蒋萍. COPD 急发期患者血清尿酸水平的相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(12): 1565-1567.
- [6] Caiazza F, Harvey BJ, Thomas W. Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen dependent breast cancer cell growth[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(5): 953-968.

收稿日期: 2015-01-19

修回日期: 2015-02-04

## 泛素结合结构域与泛素化信号的识别\*

王京伟 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**摘要:** 泛素化(Ubiquitylation, UB)是目前最为复杂最为多元的翻译后修饰,几乎参与胞内所有的生物学过程。其通过改变底物的分子景观(landscape)、三维结构、位置、活性、影响底物蛋白与其他蛋白的相互作用等方法,从时间和空间上调节底物所参与的生物学过程。而泛素化底物功能的发挥依赖于特异性的泛素结合结构域(Ubiquitin binding domains, UBDs)。UBDs的表面功能基团特异性识别具有不同修饰类型的泛素化底物,并决定其功能的特异性。已知的20多种UBDs超家族对泛素化信号网络的有序调节是人们开启泛素化网络的一把钥匙,同时了解UBD-ubiquitin的特异性识别是认识泛素化蛋白质组学“ubiquitome”的基础。

**关键词:** 泛素; 泛素结合结构域; 识别; 调节机制

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)02-099-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.031

## Recognition of Ubiquitination Signal with Ubiquitin-binding Domains

WANG Jing-wei (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** Ubiquitylation is a highly versatile post-translation modification that controls virtually all types of cellular events by changing the molecular landscape, the three-dimensional structure, the location or activity of the substrate, influencing the interactions of substrate with other proteins. Many cellular activities of ubiquitin and its functions are deciphered by specific ubiquitin binding domains (UBDs). UBD interacts with the different type of Ubiquitylation with a variety of lengths and linkage patterns based on the specific functional surfaces. So far over twenty distinct UBD families have been identified, and the known members of this group have expanded rapidly. The UBD families, the decoder of ubiquitylation network, are building a foundation for in-depth understanding the ubiquitination proteomics “ubiquitome”.

**Keywords:** ubiquitin; ubiquitin binding domain; recognition; regulatory mechanism

泛素化修饰已成为一个几乎涉及所有重要细胞生物过程的翻译后修饰类型,其可以改变底物蛋白的分子景观

(landscape)、三维结构、位置、活性、影响底物蛋白与其他蛋白的相互作用,从时间和空间上调节底物所参与的生物学

\* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目: 低密度脂蛋白主动氧化的识别机制及其氧化环境的建立, 编号: 81170273。

作者简介: 王京伟(1986-), 女, 博士, 医师, 主要从事分子生物和泛素化蛋白质组学研究, E-mail: sophia\_\_wang03@hotmail.com。