

量子点荧光免疫技术定量检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2) S1 抗原试剂盒的研制及性能评价

李捷^{1,2}, 刘浩¹, 韩建勋^{1,2}, 侯卫静¹, 孙兆增¹, 富玉¹, 杨柏崇¹, 施祖灏³

(1. 谱尼测试集团股份有限公司, 北京 100095; 2. 谱尼测试集团北京检验认证科学研究院有限公司, 北京 100095; 3. 谱尼测试集团江苏有限公司, 江苏苏州 215002)

摘要: **目的** 建立一种基于量子点荧光免疫技术定量检测新型冠状病毒抗原的方法, 并进行方法的性能验证。**方法** 利用新型冠状病毒的 S1 抗原对新型冠状病毒抗原量子点荧光免疫检测试剂盒的线性范围、精密度、准确度、最低检出限及对抗原的包容性等性能进行初步评价, 判断试剂盒是否能够满足要求。**结果** 对实验数据进行统计分析, 方法线性范围为 24 ~ 25 000 pg/ml (相关系数 $r > 0.99$); 最低检出限为 16.96 pg/ml; 高、低浓度样本的批内精密度最大为 9.65%, 批间精密度为 9.24%; 根据相对偏差数值验证方法的准确度, 结果均小于 5%; 通过测试不同来源的抗原, 发现方法具有较高的包容性。**结论** 建立的快速检测新型冠状病毒抗原的方法灵敏度高、精密度好、线性范围广, 在临床上具有应用前景。

关键词: 新型冠状病毒; 量子点荧光免疫层析; 性能验证

中图分类号: R373.19; R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 02-148-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.02.030

Preparation and Performance Evaluation on Novel Corona Virus (SARS-CoV-2) S1 Antigen Quantum Dots Fluorescence Immunoassay Reagent

LI Jie^{1,2}, LIU Hao¹, HAN Jian-xun^{1,2}, HOU Wei-jing¹, SUN Zhao-zeng¹, FU Yu¹, YANG Bai-chong¹, SHI Zu-hao³

(1. Pony Testing International Group Co. Ltd, Beijing 100095, China; 2. Pony Testing International Group Beijing Academy of Inspection and Certification Co. Ltd, Beijing 100095, China; 3. Pony Testing International Group Jiangsu Co. Ltd, Jiangsu Suzhou 215002, China)

Abstract: Objective To detect novel corona virus (SARS-CoV-2) antigen, a method based on quantum dots fluorescence immunoassay was developed. **Methods** For determining the performance of the method, it was evaluated the characteristics of the linear range, precision, accuracy, minimum detection limit and tolerance to antigens by using S1 antigen. **Results** The linear range of the method was 24~25 000 pg/ml (the correlation coefficient $r > 0.99$). The minimum detection limit was 16.96 pg/ml. For high and low concentration samples, the precision of maximum intra-assay was 9.65%, and the inter-assay precision was 9.24%. The accuracy was verified by relative deviation, and the results were less than 5%. Furthermore, the product had high tolerance to antigens from different sources. **Conclusion** A method was provided in this study to detect the SARS-CoV-2 antigen, which have a high sensitivity, good precision and wide linear range. It is suitable for clinical application.

Keywords: novel corona virus; quantum dots fluorescence immunoassay; performance evaluation

2019年12月以来,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)导致的新型冠状病毒肺炎(简称新冠肺炎)疫情在我国武汉暴发,并迅速扩散到全国乃至全球多个国家。新冠肺炎传染性强、传播速度快,寻求快速、高效的检测方法,仍是全球关注的重点^[1-4]。

量子点是一种新型的纳米荧光材料,经过特定的表面处理具有良好的生物相容性和独特的光学性质^[5]。由于其优良的光谱特征和光化学稳定性,

如发射光谱窄、激发光谱宽、发光效率高、发光颜色可调等特征,适用于荧光物质的标记。目前,在细胞示踪、生物分子检测方面、食品检测等方面具有重要的应用价值^[6]。

针对病毒,目前主要方法为检测病毒本身(病毒RNA或抗原)或检测人类对感染的免疫反应(抗体或其他生物标记物)^[7]。抗原检测实现了病毒的快速、廉价、及时检出,在可用性和易用性上更优,

基金项目: 2020年苏州市新型冠状病毒感染应急防治专项,项目批号: XG56; “科技助力经济2020”重点专项,项目批号: SQ2020YFF0414333。

作者简介: 李捷(1986-),男,硕士,研究方向: 体外诊断试剂开发, E-mail: louislijie@qq.com。

通讯作者: 韩建勋,男,博士,副研究员,研究方向: 药品质量与安全控制, E-mail: yfb@ponytest.com。

适用于实验室外的放大试验,在流感病毒、合胞病毒、副流感病毒等呼吸道病毒的检测中都有应用^[8-9]。因此,本研究采用量子点免疫荧光技术研制 SARS-CoV-2 的抗原检测试剂盒,通过分析试剂盒的精密度、准确度、最低检出限等性能,为 SARS-CoV-2 的快速准确检测提供新的方法手段。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京索莱宝科技有限公司;重组质粒 PVAX1-2019-nCoV-S1 购自北京擎科新业生物技术有限公司;S1 蛋白的两株单克隆抗体来源于南京诺唯赞医疗科技有限公司;羊抗鼠 IgG 购自洛阳佰奥通实验材料中心;S1 抗原 1#、S1 抗原 2# 分别购自北京两家生物公司;样本稀释液由磷酸缓冲液、Triton X-100 和牛血清清蛋白配制而成,所用试剂均购自国药集团化学试剂有限公司;水溶性羧基 CdSe/ZnS 量子点、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 [N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]、2-吗啉乙磺酸 (MES) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;封闭液中的三(羟甲基)氨基甲烷醋酸盐 [Tris(hydroxymethyl)aminomethane acetate salt] 购自北京索莱宝科技有限公司;试剂样品垫、结合垫、吸水纸、PVC 底板购自北京昊佳生物工程技术有限公司;荧光定量分析仪购自南京微测生物科技有限公司;凝胶电泳系统购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 SARS-CoV-2S1 蛋白的表达与纯化:将重组质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中,阳性表达菌体接种于含有氨苄青霉素的培养液中进行蛋白诱导表达,诱导温度为 37℃,时间为 3h,离心收集菌体^[10]。超声后收集上清,利用层析柱进行纯化,得到纯化的 S1 蛋白;取未纯化的 S1 蛋白和纯化后的 S1 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,观察蛋白的纯化结果。

1.2.2 SARS-CoV-2 抗原检测试剂盒的制备及检测:
①包被抗体:用磷酸缓冲液稀释 S1 蛋白的单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体至 1.0 mg/ml,在硝酸纤维素膜上对应的检测线和质控线进行包被,完成后 37℃ 烘干 3h。
②标记抗体:将微球溶于 2-吗啉乙磺酸,加入适量的 N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和碳化二亚胺 (EDC) 进行活化,离心去除上清后,使用硼酸缓冲液溶解微球。活化后的微球加入 S1 蛋白的单克隆抗体进行孵化,孵化完成后封闭、离心,沉淀使用 Tris 缓冲液复溶,4℃ 保存备用。
③制备微球结合垫:将标记好的微球按一定比例稀释

后,喷到结合垫上,37℃ 烘干 3h,即得到含有微球的结合垫。
④制备检测卡:在底板上依次粘贴上样品垫、结合垫、包被膜及吸水纸,组装成检测卡,4℃ ~ 30℃ 干燥保存^[11]。

试纸条组装完成后,检测过程中需要将待检样本稀释 10 倍后加入加样孔,反应 15 min 后于荧光定量分析仪上检测质控线 (C) 和检测线 (T) 的荧光值,并记录其 T/C 值。

1.2.3 性能验证

1.2.3.1 试剂盒校准曲线的建立:每批次的检测试剂盒均需单独建立校准曲线。将 S1 蛋白配制成 0, 50, 500, 2 500, 5 000, 30 000 pg/ml 6 个浓度,分别进行两次平行测定,测得本验证所用批次校准曲线各点的 T/C 值的平均值和浓度值建立校准曲线,并通过四参数方法进行拟合。

1.2.3.2 线性范围:根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) EP6-A 做线性范围评价,使用 S1 蛋白配制浓度为 25 000 pg/ml 的高浓度样本 (H),以样本稀释液 (0 pg/ml) 作为低浓度样本 (L),按照 H, 1H+3L, 1H+15L, 1H+63L, 1H+255L, 1H+1 023L 比例混合,得到 25 000, 6 250, 1 563, 391, 98 和 24 pg/ml 6 个浓度点。分别对 6 个浓度点进行三次重复测定,通过校准曲线计算得到平均值,将平均值和各点的理论值进行线性拟合,计算相关系数 r ,应不小于 0.99。

1.2.3.3 准确度:对 S1 蛋白的抗原配制 150 和 2 000 pg/ml 两个高低浓度的样本进行检测,每个样品重复测定 3 次,通过校准曲线计算浓度值,并计算测试结果与理论值的相对偏差,相对偏差应不超过 $\pm 15\%$ 。相对偏差 = (测定值 - 理论值) / 理论值 $\times 100\%$ 。

1.2.3.4 最低检出限:根据 CLSI EP17-A2 文件,对最低检出限 (灵敏度) 的评价,使用样本稀释液作为样本进行检测,重复测定 20 次,测出 T/C 值后求其平均值 (\bar{x}) 和标准差 (s),根据校准曲线计算 $\bar{x}+2s$ 对应的浓度值,即为最低检出限。

1.2.3.5 精密度:配制 1 500 和 150 pg/ml 高低两个浓度水平样本,每天做 2 个批次的测试,每个批次重复测定样本 8 次,共测试 5 天。评估结束时每个浓度的样本有 80 个测试结果。根据每个批次的 8 次测试结果计算批内精密度 (S_r)。从所有 80 个结果计算批间精密度 (S_{rr})。批内精密度应不大于 15%,批间精密度应不大于 20%。精密度用变异系数 (CV) 计算, $CV = (s / \bar{x}) \times 100\%$ 。

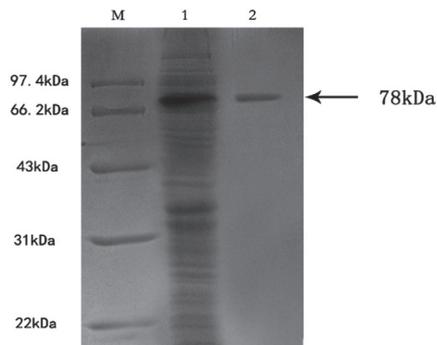
1.2.3.6 对不同抗原的包容性验证:分别使用不同厂家的 S1 抗原 (1# 和 2#),验证试剂盒对抗原反应的包容性。不同抗原检测结果与试剂盒使用抗原的

测试结果进行线性拟合, 相关系数 r 应不小于 0.95。

1.3 统计学分析 数据计算结果使用 ELISA Calc 数据处理软件进行拟合。

2 结果

2.1 重组 S1 蛋白表达鉴定 见图 1。经过 SDS-PAGE 分析, 重组 S1 蛋白的分子量约为 78 kDa。



M: 低分子量蛋白 Marker; Line 1: 未纯化的 S1 蛋白; Line 2: 纯化的 S1 蛋白

图 1 S1 蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

2.2 S1 蛋白检测试剂盒的校准曲线建立 见图

2。将得到的 T/C 值平均值作为 Y 轴, 对应的浓度值作为 X 轴, 使用四参数方法进行曲线拟合建立校准曲线, 曲线方程为 $Y=(37.296+0.014)/[1+(X/55\ 211.003)^{-0.902}]-0.014$, r^2 为 0.9998。

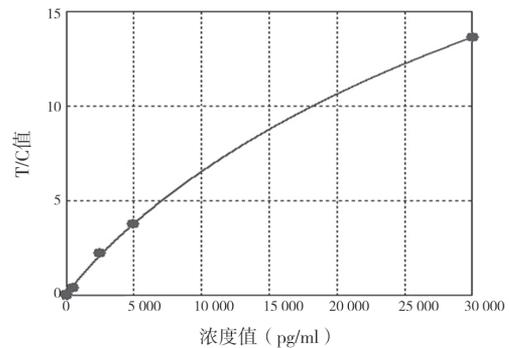


图 2 S1 蛋白检测试剂盒校准曲线

2.3 线性范围分析结果 见表 1。测定预期线性范围内的 6 个浓度值 (25 000, 6 250, 1 563, 391, 98, 24 pg/ml) 三次, 对理论值和测定值进行线性拟合, 得到线性方程: $Y=0.959\ 8X+16.613$, r 为 0.999, 因此试剂盒的线性范围为 24~25 000 pg/ml。

表 1 线性范围分析

理论浓度 (pg/ml)	测定值 1 (pg/ml)	测定值 2 (pg/ml)	测定值 3 (pg/ml)	平均值 (pg/ml)	s	RSD (%)
25 000	23 959	24 779	23 418	24 052	685.38	2.8
6 250	5 579	6 105	5 737	5 807	269.91	4.6
1 563	1 622	1 809	1 713	1 715	93.49	5.5
391	367	423	378	389	30.14	7.7
98	91	96	94	94	2.22	2.4
24	27	33	30	30	3.15	10.5

2.4 准确度分析 见表 2。采用 2.2 中校准曲线计算样品浓度测定值, 以及与理论值的相对偏差绝对值。结果显示, 所有相对偏差均 $< 5\%$, 符合标准规定的 15% , 说明试剂盒的准确度较高。

表 2 准确度分析

浓度理论值 (pg/ml)	T/C 值	浓度测定值 (pg/ml)	相对偏差绝对值 (%)
150	0.173	156.9	4.61
	0.16	144.8	3.45
	0.158	143.0	4.68
2 000	1.693	1 904.3	4.78
	1.837	2 092.5	4.63
	1.727	1 948.5	2.58

2.5 最低检出限 结果使用样本稀释液作为样本进行检测, 重复测定 20 次, 计算得到试剂盒的最低检出限为 16.96 pg/ml。

2.6 精密度分析 见表 3。高、低浓度样本在 10 个批次中批内精密度最大为 9.65%, 批间精密度为 9.24%, 均小于 15%, 说明试剂盒的精密度较高。

2.7 对不同抗原的包容性验证 为验证试剂盒的检测结果是否受抗原表达系统的影响, 使用不同来源的 S1 抗原 (1#)、S1 抗原 (2#) 和提纯的 S1 蛋白进行检测, 以验证试剂盒对抗原的包容性, 其中 S1 抗原 (1#) 和 S1 蛋白为原核系统表达获得, S1 抗原 (2#) 为真核系统表达获得。对三种抗原分别配制 0, 50, 500 和 5 000 pg/ml 四个浓度进行检测, 通过荧光定量分析仪获得 T/C 值, 计算 S1 抗原 (1#) 和 S1 抗原 (2#) 与提纯的 S1 蛋白 T/C 值的相关性, 结果见表 4。

对于不同来源的抗原, 结果显示 S1 抗原 (1#) 和 S1 抗原 (2#) 与提纯的 S1 蛋白的相关性均在 0.99 以上, 说明试剂盒对不同来源的抗原具有包容性。

表 3 精密度验证结果

批次	低浓度样本			高浓度样本		
	T/C 平均值	标准差 <i>s</i>	Sr (%)	T/C 平均值	标准差 <i>s</i>	Sr (%)
1	0.157	0.012	7.90	1.515	0.114	7.52
2	0.150	0.012	8.17	1.399	0.086	6.13
3	0.150	0.012	7.82	1.451	0.098	6.74
4	0.138	0.010	6.95	1.563	0.118	7.53
5	0.163	0.010	6.22	1.512	0.118	7.83
6	0.160	0.012	7.22	1.538	0.125	8.15
7	0.140	0.009	6.45	1.496	0.12	8.05
8	0.137	0.011	8.13	1.485	0.143	9.65
9	0.154	0.013	8.29	1.477	0.138	9.36
10	0.158	0.012	7.84	1.503	0.123	8.17
<i>S_{rr}</i> (%)		9.24			8.08	

表 4 不同来源抗原的包容性

浓度 (pg/ml)	T/C 值		
	S1 蛋白	S1 抗原 (1#)	S1 抗原 (2#)
0	0.003	0.007	0.005
50	0.061	0.069	0.073
500	0.586	0.671	0.694
5000	3.319	4.118	3.985
<i>r</i>	—	0.999 9	1.000 0

3 讨论

目前 SARS-CoV-2 的检测方法主要为核酸检测和特异性抗体 IgM 和 IgG 的检测^[12]。根据中国发布的 COVID-19 诊疗方案和 WHO 的诊断标准,只要符合临床表现,即可认定为疑似病例,而确诊则需要核酸检测或特异性抗体 IgG 和 IgM 检测。核酸检测能够检测到处于窗口期的患者,及早发现感染者,是 SARS-CoV-2 检测的“金标准”,但是对检测设备或平台要求较高,高灵敏度的 RT-PCR 仪价格昂贵,对实验室的洁净度或操作人员要求也较高,检测耗时较长,且咽拭子采样有采集不到的风险,易出现假阴性;而相对于核酸检测,抗体的血清学检测的标本更易获得且有质量保证,操作简单快捷,更易于实验室开展筛查工作,但是检测窗口期长,是核酸检测的补充。而抗原检测是直接检测样本中的病毒蛋白,相对抗体检测窗口期短、检测方便、快速和低价。国内 SARS-CoV-2 的抗原检测主要采用胶体金免疫层析技术进行定性检测,结果靠肉眼判断,主观性较大。

本研究通过量子点荧光免疫技术制备了检测 SARS-CoV-2 的试剂盒,可对病毒抗原进行定量检测。结果显示,本试剂盒具有较高的灵敏度,最低检出限可达 16.96 pg/ml;高、低浓度样本的检测精

密度良好,批内精密度和批间精密度均小于 15%;准确度较高,相对偏差均小于 5%,符合胶体金免疫层析检测试剂的国家标准要求 (< 20%);在 24~25 000 pg/ml 之间有良好的线性;对抗原的包容性良好,能够在 15min 内完成对 SARS-CoV-2 的检测。因此,本方法适用于医院等医疗机构对 SARS-CoV-2 进行快速检测,可作为疫情防控的重要辅助检测手段。本试剂盒用于对 SARS-CoV-2 抗原的定量检测,能够更加准确地了解病毒在体内的载量,对评价抗病毒治疗的疗效和判断预后具有重要的意义。但是鉴于临床阳性样本来源困难,本检测试剂盒仍存在一定的不足,无法验证试剂盒的诊断灵敏度,仍需进一步对试剂盒进行临床应用的验证。

参考文献:

[1] 陈海霞,陈志华,沈华浩. 新型冠状病毒的结构基础与新型冠状病毒肺炎的临床药物治疗 [J]. 生理学报, 2020, 72(5):617-630.
CHEN Haixia, CHEN Zhihua, SHEN Huahao. Structure of SARS-CoV-2 and treatment of COVID-19 [J]. Acta Physiologica Sinica, 2020, 72(5):617-630.

[2] ZHOU Peng, YANG Xinglou, WANG Xianguang, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798): 270-273.

[3] LU Roujuan, ZHAO Xiang, LI Juan, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. Lancet, 2020, 395(1224): 565-574.

[4] ZUMLA A, CHAN J F, AZHAR E I, et al. Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2016, 15(5): 327-347.

[5] 田雨,王周利,蔡瑞,等. CdTe/CdS 量子点荧光检测探针的制备及性能表征 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(1):251-259.
TIAN Yu, WANG Zhouli, CAI Rui, et al. Preparation and characterization of CdTe/CdS quantum dots

- fluorescent detection probe [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2021, 37(1):251-259.
- [6] 钟阳青, 陈锐, 张伟龙, 等. 降钙素原量子点荧光免疫层析检测法的方法学评价 [J]. *实验与检验医学*, 2018, 36(3):330-332, 390.
ZHONG Yangqing, CHEN Rui, ZHANG Weilong, et al. Evaluation on the analytical performance of quantum dots fluorescence immunochromatographic for the determination of procalcitonin [J]. *Experimental and Laboratory Medicine*, 2018, 36(3):330-332, 390.
- [7] DANKOVA Z, NOVAKOVA E, SKERENOVA M, et al. Comparison of SARS-CoV-2 detection by rapid antigen and by three commercial RT-qPCR tests: A study from Martin University Hospital in Slovakia [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(13):7037.
- [8] LARKIN P M K, MANUEL V, HERNANDEZ N, et al. Novel use of rapid antigen influenza testing in the outpatient setting to provide an early warning sign of influenza activity in the emergency departments of an integrated health system [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(12): e01560-20.
- [9] ALLEN A J, GONZALEZ-CISCAR A, LENDREM C, et al. Diagnostic and economic evaluation of a point-of-care test for respiratory syncytial virus [J]. *ERJ Open Research*, 2020, 6(3): 00018-2020.
- [10] 冯春燕, 王彩霞, 杜方原, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 抗原 C 端的原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40(6):1-5.
FENG Chunyan, WANG Caixia, DU Fangyuan, et al. Prokaryotic expression of C-terminus of p54 antigen of african swine fever virus and characterization of its polyclonal antibodies [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(6):1-5.
- [11] 伍钢, 张玉雪, 韦佳塔, 等. 一种基于量子点免疫层析技术的轮状病毒检测方法 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(11):1367-1373.
WU Gang, ZHANG Yuxue, WEI Jiata, et al. A rotavirus detection method based on quantum dot immunochromatographic assay [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 36(11): 1367-1373.
- [12] ANTONELLI G, STEFANI S, PISTELLO M. SARS-CoV-2 diagnostics: Some reflections on current assays [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2021, 99(2): 115237.
- 收稿日期: 2021-05-08
修回日期: 2021-07-29

(上接第 136 页)

- [9] LEE C T, LEE Y T, TAIN Y L, et al. Circulating microRNAs and vascular calcification in hemodialysis patients [J]. *The Journal of International Medical Research*, 2019, 47(7): 2929-2939.
- [10] HENZE L A, LUONG T T D, BOEHME B, et al. Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *Aging*, 2019, 11(15): 5445-5462.
- [11] LEE S J, LEE I K, JEON J H. Vascular calcification-new insights into its mechanism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2685.
- [12] NAPOLETANO F, BARON O, VANDENABEELE P, et al. Intersections between regulated cell death and autophagy [J]. *Trends in Cell Biology*, 2019, 29(4): 323-338.
- [13] LEE H Y, OH S H. Autophagy-mediated cytoplasmic accumulation of p53 leads to apoptosis through DRAM-BAX in cadmium-exposed human proximal tubular cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 534(1): 128-133.
- [14] HE Huqiang, LAW B Y K, ZHANG Ni, et al. Bavachin protects human aortic smooth muscle cells against β -glycerophosphate-mediated vascular calcification and apoptosis via activation of mTOR-dependent autophagy and suppression of β -catenin signaling [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10(7): 1427.
- [15] 邱小波, 盛子桐, 韩怡然, 等. 虫草菌液通过增强自噬改善 β -甘油磷酸诱导的血管平滑肌细胞钙化 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2019, 35(2):119-126.
QIU Xiaobo, SHENG Zitong, HAN Yiran, et al. Cordyceps sinensis alleviates β -glycerophosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification through promoting autophagy [J]. *Chinese Journal of Nephrology*, 2019, 35(2):119-126.
- [16] WONG M, GANAPATHY A S, SUCHANEC E, et al. Intestinal epithelial tight junction barrier regulation by autophagy-related protein ATG6/beclin 1 [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2019, 316(5): C753-C765.
- [17] ARAI A, KIM S, GOLDSHTEYN V, et al. Beclin1 modulates bone homeostasis by regulating osteoclast and chondrocyte differentiation [J]. *Journal of Bone and Mineral Research* 2019, 34(9): 1753-1766.
- [18] BANSAL M, MOHARIR S C, SWARUP G. Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation [J]. *Communicative & Integrative Biology*, 2018, 11(2): 1-4.
- [19] CHEN Weiren, YANG Jiaqi, LIU Fang, et al. Melatonin attenuates vascular calcification by activating autophagy via an AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 389(1): 111883.
- [20] 刘成, 许雅倩, 邹琪. 脓毒症患者外周血淋巴细胞自噬相关基因 Beclin-1 和 LC3 的变化研究 [J]. *中华全科医学*, 2020, 18(6):913-916.
LIU Cheng, XU Yaqian, ZOU Qi. Study on the changes of Beclin-1 and LC3 related to autophagy in peripheral blood lymphocytes of patients with sepsis [J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2020, 18(6):913-916.
- [21] FRAUSCHER B, KIRSCH A H, SCHABHÜTTL C, et al. Autophagy protects from uremic vascular media calcification [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9(6): 1866.
- 收稿日期: 2021-05-21
修回日期: 2021-09-24