

## · 论 著 ·

## Trib3基因在大鼠睾丸组织不同发育时期的表达研究

王丽佳<sup>1,2</sup>, 李 妍<sup>1</sup>, 蔡 昊<sup>1</sup>, 杨 铮<sup>1</sup>, 云 霞<sup>1</sup>, 张 岩<sup>1</sup>, 刘陶迪<sup>1</sup>, 张信来<sup>3\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学 医学神经生物学实验室, 内蒙古 呼和浩特 010059;

2. 柳州市中医医院 检验科, 广西 柳州 545001; 3. 内蒙古医科大学附属医院 甲乳外科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

**【摘要】目的** 研究Trib3基因在大鼠睾丸组织不同发育时期的表达。**方法** 用RT-PCR、Western Blot、免疫组化等方法分别观察Trib3基因在大鼠精子生成过程中的表达情况。**结果** mRNA表达量在野生型大鼠出生后2~12 d较高, 4 d达到高峰; 14~16日龄与2~12日龄间差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 20~35日龄与14~16日龄比较, 表达量显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 40~65日龄与20~35日龄比较, 表达量显著升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Trib3蛋白在2~12日龄呈现较高表达; 14~16日龄与2~12日龄比较, 表达量显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 20~35日龄与14~16日龄间Trib3表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 40~65日龄与20~35日龄比较, 表达量显著升高( $P<0.05$ )。免疫组化结果可见Trib3主要表达于睾丸精原干细胞胞质部分及部分睾丸间质。**结论** Trib3基因可能参与了大鼠精原干细胞的增殖过程。

**【关键词】** Trib3基因; 精子发生; 大鼠

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)03-0225-06

## STUDY ON THE EXPRESSION OF TRIB3 GENE IN RAT TESTICULAR TISSUE AT DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES

WANG Lijia<sup>1,2</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, CAI Hao<sup>1</sup>, YANG Zheng<sup>1</sup>, YUN Xia<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, LIU Taodi<sup>1</sup>, ZHANG Xinlai<sup>3\*</sup>

(1. Laboratory of Medical Neurobiology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Liuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou 545001, China; 3. Department of Nail and Breast Surgery, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

**【Abstract】Objective** To study the expression of Trib3 gene in rat testis at different periods. **Methods** The expression of Trib3 gene in rat spermatogenesis was observed by RT-PCR, Western Blot and immunohistochemistry. **Results** mRNA expression in wild type rats was higher from 2 to 12 days after birth, and reached its peak on 4 days. There was no significant difference between 14~16 days of age and 2~12 days of age ( $P>0.05$ ); The expression was significantly decreased at 20~35 days of age compared with 14~16 days of age ( $P<0.05$ ); The expression level was significantly increased at 40~65 days of age compared with 20~35 days of age ( $P<0.05$ ). Trib3 protein was highly expressed at 2~12 days of age. The expression level was significantly decreased at 14~16 days of age compared with 2~12 days of age ( $P<0.05$ ); There was no significant difference in Trib3 expression between 20~35 days of age and 14~16 days of age ( $P>0.05$ ); The expression level was significantly increased at 40~65 days of age compared with 20~35 days of age ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical results showed that Trib3 was mainly expressed in the cytoplasmic part of spermatogonial stem cells and some interstitium of testis. **Conclusions** Trib3 gene may be involved in the proliferation of spermatogonial stem cells.

**【Keywords】** Trib3 gene; Spermatogenesis; Rat

收稿日期: 2022-03-08; 修回日期: 2023-02-14

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2022LHMS03002); 内蒙古医科大学重点项目(YKD2022ZD012)

第一作者: 王丽佳(1995—), 女, 硕士, 技师。研究方向: 生殖医学。E-mail: 876717174@qq.com

\*通信作者: 张信来, 男, 硕士, 主任医师。研究方向: 普通外科甲状腺乳腺疾病诊治。E-mail: sdxinlaizhang@163.com

不孕不育给人们带来了极大的精神困扰。全球有10%~15%的夫妇患有不孕症,精子活动率在40岁时明显下降,据统计男性不育的发病率约占所有不孕夫妇的50%<sup>[1,2]</sup>。

本实验室研究发现大鼠出生后的第8日是精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)发育的关键时期,通过全基因组表达谱芯片技术发现Trib3基因在10日龄大鼠睾丸组织中的转录水平比8日龄上调20.3倍,经Real Time-qPCR验证,两者结果基本一致。这提示我们Trib3是增殖与生长期表达差异比较显著的基因之一。免疫荧光染色共表达分析结果显示Trib3是通过CDH1阳性的精原干细胞表达于大鼠睾丸组织中的。我们推测该基因的表达可能与SSCs的功能相关<sup>[3]</sup>。

Trib3是哺乳动物伪激酶Tribbles家族的成员。在全身多种器官中Trib3均有表达,与肿瘤疾病的发生及预后关系密切,可作为肿瘤疾病预后的标志物,并可参与调控糖尿病及其并发症诱发的器质性病变,在未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)<sup>[5]</sup>中,Trib3作为一个重要的应激相关基因起关键作用,在细胞增殖、黏附及凋亡等生物学过程中发挥着广泛的性能<sup>[4-6]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及样本采集

将育龄Wistar雌雄大鼠按自然交配的原则同笼,记录幼鼠出生具体的时间。出生当日为1日龄(第1天),编号饲养。将出生后2、4、6、8、10、12、14、15、16、20、25、29、30、31、35、40、45、50、55、60、65日龄的野生型雄性大鼠用颈椎脱臼法处死,每个日龄取3只窝别不同的野生大鼠睾丸组织作为实验材料。Wistar大鼠均购于内蒙古大学动物中心。以上实验动物均于SPF级环境中饲养。

### 1.2 主要试剂

SYBR Preenix Ex Taq™试剂盒购于大连宝生物公司;蛋白提取及定量试剂盒分别购于凯基生物公司和博士德生物公司;Western Blot实验使用碧云天试剂盒(P0012A);引物由上海生物工程公司合成;兔抗Trib3多克隆抗体购于美国Proteintech公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 Real-time qPCR检测睾丸组织Trib3及各标记基因mRNA的表达** 取不同时间点睾丸组织,加入约1 mL裂解液处理样品,后按说明书操作提取大

鼠21个时间点睾丸组织的总RNA。根据测得RNA样本浓度进行计算,将样本用ddH<sub>2</sub>O统一稀释成总体积50 μL、浓度0.15 μg/μL的稀释液。反转录体系20 μL, A液:RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 2.33 μL, 10 μm oligo-dt 1 μL, RNA sample 6.67 μL; B液:RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 2.5 μL, dNTPs(10 mM) 2 μL, RT-M-Mlv 0.5 μL, RRI(10 μ/μL) 1 μL, 5 × RT-M-Mlv Buffer 4 μL。A液65 ℃水浴5 min,冷却后与B液进行混合,42 ℃水浴1 h,70 ℃水浴10 min。在-80 ℃冰箱保存逆转录出的cDNA样本。

Real-time qPCR检测Trib3基因的mRNA的表达水平。以cDNA为模板分别扩增Trib3部分片段(见表1)。根据引物的反应条件及SYBR Preenix Ex Taq™试剂盒说明,在qPCR八联管孔中添加试剂,设定RT-PCR的反应程序:预变性95 ℃ 10 min,进入循环,95 ℃,30 s; 95 ℃, 5 s→55 ℃,30 s→72 ℃,34 s,扩增40个循环。分别以21个时间点cDNA样品作为模板,各时间点均重复两个副孔。内参孔为GAPDH,阴性对照孔为无酶ddH<sub>2</sub>O。放置于ABI7500荧光实时定量PCR仪中开始反应。采用Ct方法分析Trib3基因mRNA的表达量,结果中的相对表达倍数部分用2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行计算,图表数据均用Microsoft Excel录入分析。

表1 Trib3的引物序列  
Tab. 1 Primer Sequences of Trib3

靶基因	序列(5' → 3')
Trib3	F: GTCGATTTGCTCTTCAGCAACTG
	R: CTGAGTATCTCTGCTCCACAT
GAPDH	F: GGTTGTCTCCTGTGACTTCAAC
	R: AGCCATATTCATTGTCATACCAG

**1.3.2 Western Blot检测睾丸组织Trib3蛋白的表达** 测定并计算出已提取的21个时间点大鼠睾丸组织总蛋白的样品浓度。每个时间点取自3个不同窝别,蛋白上样体积15 μL,上样量50 μg。配制10%的分离胶,5%的浓缩胶。电压条件为浓缩胶60 V,分离胶90 V,时间大约2 h。半干转印电流0.1 A,时间2 h 15 min。室温封闭1 h。一抗孵育,Trib3抗体(1:1000稀释),GAPDH抗体(1:2500稀释),4 ℃慢摇孵育过夜。二抗孵育,稀释液比例为驴抗兔IgG(1:10000稀释),羊抗鼠IgG(1:20000稀释),避光室温孵育慢摇1 h。ECL检测,将膜放入UVP凝胶成像仪内,曝光,所得数据计算灰度值。

**1.3.3 HE染色及免疫组织化学染色** 取5、12、18、29、40日龄大鼠睾丸各一个,用4%中性甲醛液分别

固定至少一周。标本修整后脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片、烤片。HE染色:脱蜡水化,浸苏木素,1%盐酸乙醇稍分化,伊红浸染后过70%、80%、95%乙醇,无水乙醇(Ⅰ)3 min,无水乙醇(Ⅱ)3 min,二甲苯(Ⅰ)5 min,二甲苯(Ⅱ)5 min,封片用中性树胶。免疫组化:烤片,脱蜡水化,PBS冲洗5 min共3次,微波修复15 min。过氧化酶抑制剂室温处理10 min,PBS冲洗3 min共3次。滴加一抗,Trib3抗体,浓度为1:100,4℃孵育过夜。PBS冲洗3 min共3次。滴加二抗,生物素标记的羊抗鼠/兔IgG,室温孵育10 min。PBS冲洗待检标本后,滴加DAB显色液。复染,脱水,透明,封片。PBS代替一抗作阴性对照。在显微镜下观察,拍照。

#### 1.4 统计学方法

统计学分析用SPSS 19.0软件。均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示计量资料,样本进行正态性检验,当其服从正态分布( $\text{sig} > 0.05$ )时,组间比较采用单因素方差分析,当不服从正态分布( $\text{sig} < 0.05$ )时选择独立样本Kruskal-Wallis检验。根据大鼠睾丸组织发育情况将所取时间点分成四组,即2~12日龄、14~16日龄、20~35日龄、40~65日龄,分别对应精子发生的有丝分裂、减数分裂、精子变形及精子成熟4个阶段。检验水准为 $\alpha = 0.05$ ,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 Real-time qPCR 检测 Trib3 基因在大鼠精子生成过程中 mRNA 水平的表达

实时荧光定量反应检出 Trib3 基因在三组不同窝别野生型大鼠出生后第2~65日龄21个时间点睾丸组织中的表达模式(见图1),数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,\*表示 $P < 0.05$ 。Trib3 mRNA在大鼠出生后第2~65日龄均见表达。2~12日龄较高,4日龄达到高峰;14~16日龄与2~12日龄比较,Trib3 mRNA的表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ );20~35日龄与14~16日龄比较,Trib3 mRNA的表达量显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );40~65日龄与20~35日龄比较,Trib3 mRNA的表达量显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Western Blot 检测三组不同窝别大鼠睾丸组织中 Trib3 的表达

应用Western Blot反应检测 Trib3 在三组不同窝别的大鼠出生后第2~65日龄21个时间点睾丸组织中蛋白的表达(见图2),将条带放置于UVP凝胶成

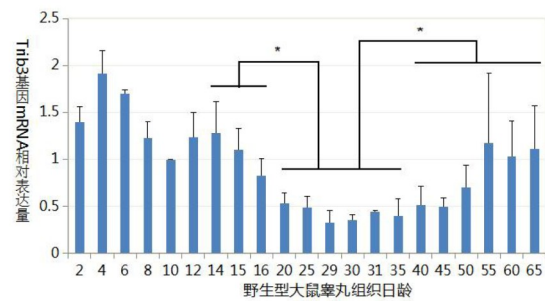


图1 Trib3基因在2~65日龄的大鼠睾丸组织中蛋白表达的RF PCR结果

Fig.1 RF PCR of Trib3 gene protein expression in testicular tissue of rats from 2 to 65 days of age

像仪中拍照测出灰度值,使用Microsoft Excel软件分析得到图3,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,\*表示 $P < 0.05$ 。Trib3表达趋势在三组不同窝别的大鼠睾丸组织中基本一致,2~65日龄 Trib3 蛋白均见表达,2~12日龄 Trib3 呈现较高表达;14~16日龄与2~12日龄比较,Trib3表达显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );20~35日龄与14~16日龄间 Trib3 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ );40~65日龄与20~35日龄比较,Trib3的表达显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

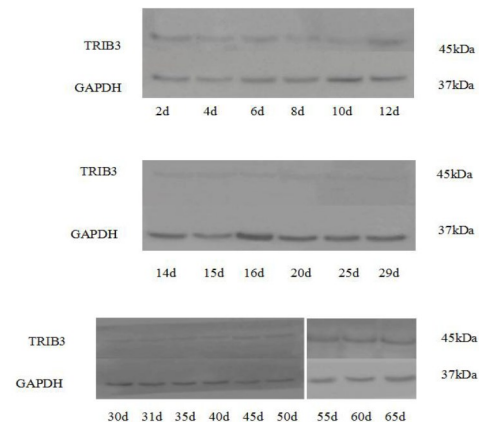


图2 Trib3基因在2~65日龄的大鼠睾丸组织中蛋白表达的Western Blot结果

Fig.2 Western Blot results of Trib3 gene protein expression in testicular tissue of 2~65 days rats

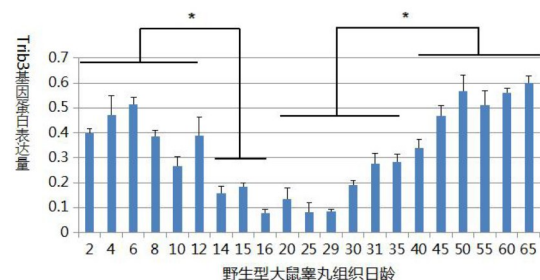


图3 在2~65日龄大鼠睾丸组织中 Trib3 蛋白的表达量  
Fig.3 Trib3 protein expression in testicular tissue of rats from 2 to 65 days

### 2.3 免疫组织化学染色和HE染色观察野生大鼠睾丸Trib3表达定位情况

固定取出的5、12、18、29及40日龄的大鼠睾丸组织,进行HE及免疫组织化学两种染色。5日龄睾丸处于精原干细胞增殖与生长期之间。12日龄时已完成有丝分裂,将进入减数分裂。18日龄完成减数分裂,将进入精子变形。29日龄为圆形精子向长形精子变形后,精子成熟前的时期。40日龄位于成熟精子出现到大鼠性成熟之前的阶段。

HE染色(见图4)镜下可见5、12、18、29及40日

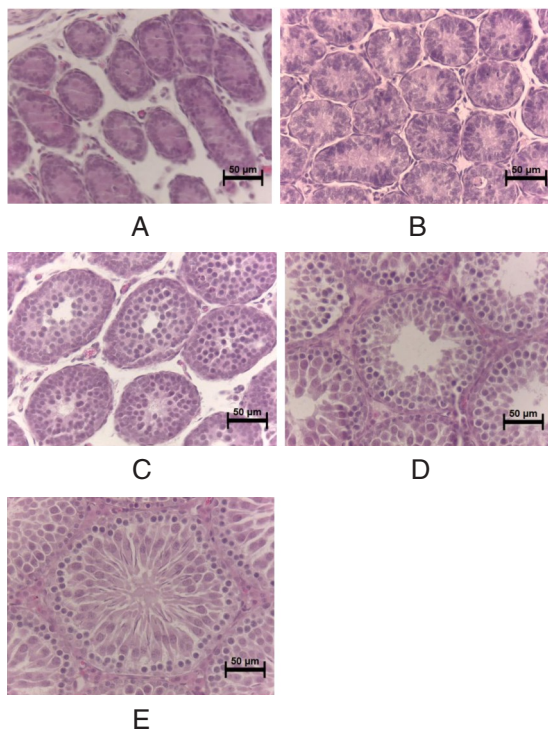


图4 5日龄、12日龄、18日龄、29日龄、40日龄大鼠睾丸组织HE染色

Fig.4 HE staining of testicular tissue from rats aged days of 5, 12, 18, 29, and 40

A: 5日龄大鼠睾丸组织HE染色(10×40)各生精小管管腔切面较不规则,可见精原干细胞;B: 12日龄大鼠睾丸组织HE染色(10×40)管腔排列逐渐紧密,间质细胞增多;C: 18日龄大鼠睾丸组织HE染色(10×40)精母细胞较为明显;D: 29日龄大鼠睾丸组织HE染色(10×40)变形前,可见大量圆形精子细胞;E: 40日龄大鼠睾丸组织HE染色(10×40)长形精子产生,精子成熟前阶段

A: HE staining (10×40) of the testicular tissue of 5-day-old rats showed irregular luminal sections of each seminiferous tubule and visible spermatogonial stem cells. B: HE staining (10×40) of the testis tissue of 12-day-old rats showed that the lumen became closely arranged and the Leydig cells increased. C: HE staining (10×40) of the testis tissue of 18-day-old rats was more obvious in spermatocytes. D: On day 29, a large number of round spermatids were observed before HE staining (10×40). E: HE staining (10×40) of testicular tissue from 40-day-old rats for the production of long-shaped sperm, premature stage of sperm

龄睾丸组织的结构。位于曲细精管外侧的肌样细胞围绕着基膜,内侧管壁由包含生精细胞及支持细胞的生精上皮构成,各级生精细胞随大鼠睾丸的生长发育逐渐显现,其中心为管腔,曲细精管之间可见睾丸间质。

免疫组织化学染色及阴性对照(见图5),400倍镜下可见5日龄的睾丸组织精原干细胞胞质部分及部分睾丸间质呈现阳性结果,支持细胞、肌样细胞及睾丸间质细胞未见阳性结果。12、18、29及40日龄中睾丸间质的结缔组织纤维部分呈棕色阳性表达,曲细精管内各细胞及睾丸间质细胞均未见阳性结果。实验用PBS缓冲液作为阴性对照(见图5F),阴性对照图为40日龄的睾丸组织,对照组未见阳性表达。

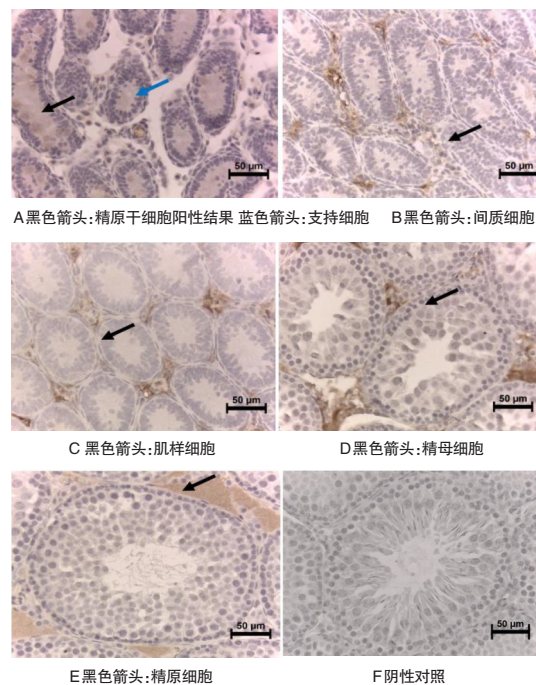


图5 5日龄、12日龄、18日龄、29日龄、40日龄大鼠睾丸组织免疫组化染色及阴性对照

Fig.5 Immunohistochemical staining of testicular tissue and negative control of rats aged days of 5, 12, 18, 29, and 40

A: 5日龄大鼠睾丸组织免疫组化染色(10×40);B: 12日龄大鼠睾丸组织免疫组化染色(10×40);C: 18日龄大鼠睾丸组织免疫组化染色(10×40);D: 29日龄大鼠睾丸组织免疫组化染色(10×40);E: 40日龄大鼠睾丸组织免疫组化染色(10×40);F:野生型大鼠睾丸组织阴性对照染色40日龄(10×40)

A: Immunohistochemical staining of testicular tissue from 5-day-old rats (10×40); B: immunohistochemical staining of testicular tissue of 12-day-old rats (10×40); C: immunohistochemical staining of testicular tissue of 18-day-old rats (10×40); D: Immunohistochemical staining of testicular tissue of 29-day-old rats (10×40); E: immunohistochemical staining of testicular tissue from 40-day-old rats (10×40); F: negative control staining of wild-type rat testis tissue at 40 days of age (10×40)

### 3 讨论

大鼠的生长发育日龄对应着精子发生的三个阶段。大鼠出生至8日龄精原干细胞自我增殖<sup>[7]</sup>, 15日龄左右完成减数分裂, 20日龄圆形精子产生, 35日龄后变形, 55日龄左右大鼠性成熟, 达到成年状态<sup>[8-12]</sup>。

基因可通过上调和下调表达参与生物学功能<sup>[13]</sup>。通过对不同时期野生型大鼠睾丸组织的研究发现, 有丝分裂及减数分裂时期Trib3基因的mRNA呈现高表达, 精子变形阶段表达显著下降( $P<0.05$ ), 至精子成熟期表达升高( $P<0.05$ )。该基因蛋白在有丝分裂期呈现高表达, 减数分裂及精子变形阶段表达降低( $P<0.05$ ), 精子成熟阶段表达升高( $P<0.05$ )。Trib3基因mRNA与蛋白水平的表达均呈现出先低表达再高表达的趋势, 但两者表达趋势并非完全统一。生物体内普遍存在这种转录和翻译层面的差异, 例如, 在乳腺癌细胞系及人乳腺癌中, Trib3 mRNA的表达与蛋白表达就没有相关性<sup>[14]</sup>。当mRNA表达量下降, 生物体会通过增长polyA, 稳定mRNA减少自身降解, 达到延长其半衰期的目的, 从而使蛋白量表达升高<sup>[15, 16]</sup>; 或使蛋白降解水平下降, 以此延长其半衰期, 这时蛋白表达量也会增高<sup>[17, 18]</sup>。当mRNA表达量高但不稳定, 或翻译出的蛋白加速降解, 都是导致蛋白量减少的因素。睾丸间质为疏松结缔组织, 具有支持、连接、营养等作用。免疫组化结果显示Trib3表达于出生后第5日龄大鼠睾丸的精原干细胞胞质及部分睾丸间质; 第12、18、29、40日龄及成年大鼠睾丸组织中, Trib3仅表达于间质的蜂窝状结缔组织纤维部分, 间质细胞、支持细胞及各级生精细胞中均未见阳性表达。5日龄位于有丝分裂期间, 提示该基因与精原干细胞的功能及睾丸间质内的纤维结构存在一定关系。

综上所述, 免疫组织化学染色显示有丝分裂时期Trib3在精原干细胞呈阳性。与其他阶段相比, 该时期Trib3基因mRNA及蛋白水平均呈现高表达。这提示Trib3基因可能参与了大鼠精原干细胞的增殖过程。大鼠睾丸组织中, 12、18、29、40日龄大鼠Trib3表达于睾丸间质的结缔组织纤维部分, 提示该基因与睾丸间质结构存在一定关系。我们根据大鼠睾丸不同时间点发育规律及该基因在本实验中产生的实验结果进行分析研究, 认为Trib3基因参与了大鼠睾丸的发育过程。

### 4 结论

综上所述, 得出结论: (1) Trib3基因可能参与了大鼠精原干细胞的增殖过程。(2) Trib3基因在睾丸间质中发挥一定作用。

研究与精子发生过程有关的基因的分子机制, 可以为探究男性不育的发病机理提供参考, 为男性不育的诊治奠定基础。

### 参考文献

- [1] 孙祺, 董昱辛, 赵星科, 等. 内蒙古地区男性患者年龄、体质量指数与精液常规参数及DNA完整性的关系研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2023, 45(S1): 14-17
- [2] Hu CY, Lu DL, Wu T, et al. Glutathione-S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and male infertility risk in Chinese populations: a meta-analysis[J]. Medicine, 2019, 98(6): e14166
- [3] Zhang Y, Luo F, Wu S, et al. Tribbles homolog 3 expression in spermatogonial stem cells of rat testes[J]. Cell Biol Int, 2014, 38(12): 1403-1407
- [4] Eysers PA, Keeshan K, Kannan N. Tribbles in the 21st century: the evolving roles of tribbles pseudokinases in biology and disease[J]. Trends Cell Biol, 2016, 27(4): 284-298
- [5] Marañón AS, Lorente M, Elena GAT, et al. TRIB3 suppresses tumorigenesis by controlling mTORC2/AKT/FOXO signaling[J]. Mol Cell Oncol, 2015, 2(3): e980134
- [6] Cunard R. Mammalian tribbles homologs at the crossroads of endoplasmic reticulum stress and mammalian target of rapamycin pathways[J]. Scientifica, 2013, 2013: 750871
- [7] Liu TD, Yu BY, Luo FH, et al. Gene Expression Profiling of Rat Testis Development During the Early Post-Natal Stages[J]. Reprod Domest Anim, 2012, 47(5): 724-731
- [8] Wrobel G, Primig M. Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction[J]. Reproduction, 2005, 129(1): 1-7
- [9] Lee J, Kanatsu SM, Inoue K, et al. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells[J]. Development, 2007, 134(10): 1853-1859
- [10] 夏小雨, 陈学进. 哺乳动物精子发生中转录调控机制的特点[J]. 医学分子生物学杂志, 2008, 5(1): 65-68
- [11] Wojaszi, Danielk, Roigi, et al. Mouse Hormad1 and Hormad2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of trip13 AAA-ATPase[J]. PLoS genet, 2009, 5(10): e1000702
- [12] 李善如, 王冬平. Wistar大鼠生长性能测定[J]. 上海实验动物科学, 1994(2): 93-94
- [13] Thera AV, Hooiveld GJ, Hans K, et al. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver[J]. Hepatology, 1998, 28(6): 1637-1644

(下转第234页)

和含药血浆于-20℃冷冻放置7 d、14 d、21 d、28 d的稳定性。根据“2.5”实验方法和HPLC-MS条件下进行分析,计算测得各峰面积的相对标准偏差,RSD均小于15%。实验结果表明系列混合标准曲线工作液和含药血浆于-20℃冷冻放置一个月的稳定性良好。

## 2.7 临床应用

采用上述建立的HPLC-MS/MS对我院45例抑郁患者连续监测3个月血药浓度,共取188份血样,其中男性18例,平均年龄34岁;女性27例,平均年龄32岁。所有患者按病情规律服药,在达到稳态血药浓度后,晨起服药前空腹采集静脉血4 mL,测其血药浓度。结果显示,166份血样监测结果均在有效血药浓度范围内,8份血样结果高于有效血药浓度(帕罗西汀4例、米氮平3例、艾司西酞普兰1例),占监测血样的4.26%;14份血样结果低于有效血药浓度(劳拉西泮用于辅助睡眠,根据病情给予不同剂量),占监测血样的7.45%,无监测结果达中毒血药浓度。

## 3 结语

HPLC-MS/MS是将色谱的高效分离能力和质谱的特异、灵敏、多组分检测能力有机结合的定量分析方法。本研究建立了同时测定米氮平、舍曲林、帕罗西汀、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林、艾司西酞普兰及劳拉西泮8种抗抑郁药物浓度的方法,参考《中华人民共和国药典》<sup>[13]</sup>(2020年版)四部中“生物样品定量分析方法验证指导原则”对方法进行了验证,该方法操作简便,分析时间短,可以实现大量临床样本的快速分析。

实验结果显示8个样品保留时间在1.91~2.81 min,区分度好、专属性强;基质效应RSD小于15%;在最低有效浓度和警戒浓度范围内,准确度高、精密度好、线性关系良好;样品处理方法简单,且混合样品分析时间均不超过4 min,可以满足临床大样本快速处理分析的要求。采用本方法对临床患者血药浓度进行监测,根据患者血药浓度偏离有效浓度范

围的实际情况,为医师用药的剂量调整提供了依据,有助于实现个体化给药。

## 参考文献

- [1]王子惠,刘丽宏. 医院门诊抗抑郁药处方点评与应用情况分析[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(11):1583-1585
- [2]于莹,黄海量,张功,等. 常用抗抑郁药的疗效与安全性的网状Meta分析[J]. 中华中医药学刊,2020,38(10):183-189+295
- [3]陈自悦,肖玲,王惠玲,等. 新型抗抑郁药氯胺酮的研究进展[J]. 临床精神医学杂志,2019,29(6):426-428
- [4]王金亮,杨陈晨,杨琪,等. 住院抑郁症患者抗抑郁药联合治疗的影响因素分析[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(20):2081-2085
- [5]Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology [J]. Pharmacopsychiatry,2018,51(1-2): e1
- [6]贾晓妮,张燕,张晓红,等. 204例精神分裂症患者服用利培酮分散片的血药浓度监测及其影响因素分析[J]. 中国药房,2018,29(17):2407-2411
- [7]郭庆合,任方龙. 高效液相色谱-串联质谱方法测定血清中氨磺必利、舒必利、米那普仑、西酞普兰、文拉法辛及O-去甲文拉法辛浓度[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(13):1347-1352
- [8]李好,陈连国,尤玮玮. UPLC-MS/MS同时测定大鼠血浆中美沙酮、文拉法辛及其代谢物浓度与药动学研究[J]. 中国药房,2018,29(11):1505-1509
- [9]王建欣,杨继章,张娜娜,等. HPLC-MS/MS法同时测定精神分裂症患者血浆中奥氮平和阿立哌唑的浓度与应用[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(14):2131-2135
- [10]王伟,丁仁奎,李清艳,等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中卡马西平、文拉法辛、罗格列酮和硝苯地平的浓度[J]. 中国药房,2018,29(2):194-198
- [11]邓晓晴,齐海娟,崔浩亮,等. 在线固相萃取液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱法同时测定人血浆中4种抗抑郁药的含量[J]. 药物分析杂志,2020,40(5):821-829
- [12]佟志强,吴东媛,张娟,等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中5-FU及其代谢产物5-FUH-2的浓度及应用[J]. 中国药房,2021,32(4):480-484
- [13]国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020,321

(上接第229页)

- [14]Wennemers M, Bussink J, Grebenchtchikov N, et al. TRIB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity[J]. Radiother Oncol, 2011, 101(1):198-202.
- [15]Preiss T, Hentze MW. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast[J]. Nature, 1998, 392(6675):516-520
- [16]Lackner DH, Beilharz TH, Marguerat S, et al. A network of

multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast[J]. Mol Cell,2007,26(1):145-155

- [17]Spencer ML, Theodosiou M, Noonan DJ. NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif[J]. J Biol Chem, 2004, 279(35):37069-37078
- [18]Rechsteiner M. PEST sequences and regulation by proteolysis[J]. Trends Biochem Sci,1996, 21(7):267-271