

# 结核潜伏感染和活动性结核病患者血浆外泌体 mRNA 表达谱分析

高锦<sup>1</sup>, 杜孝康<sup>1</sup>, 项海燕<sup>2</sup>, 范超明<sup>1</sup>, 蔡成松<sup>1</sup>, 潘峰<sup>1</sup>

1. 杭州师范大学附属医院检验科, 浙江 杭州 310015; 2. 杭州师范大学附属医院, 浙江 杭州 310015

**摘要:** **目的** 了解结核潜伏感染 (LTBI) 和活动性结核病 (ATB) 患者血浆外泌体差异 mRNA 表达, 为鉴别诊断 LTBI 与 ATB 提供参考。**方法** 选择杭州师范大学附属医院确诊的 ATB 患者 21 例和 LTBI 患者 16 例, 使用外泌体提取纯化试剂盒分离血浆外泌体, 通过透射电镜观察其大小形态, 采用免疫印迹法鉴定; 提取血浆外泌体总 RNA 进行高通量测序; 鉴定差异表达 mRNA, 并进行基因本体论 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析; 筛选差异表达倍数最大的 mRNA, 另选取 ATB 患者 5 例和 LTBI 患者 3 例, 采用实时荧光定量 PCR 法进行临床样本验证。**结果** 高通量测序结果显示, 与 ATB 患者比较, LTBI 患者血浆外泌体有 2 875 个差异表达 mRNA, 其中 1 873 个表达下调, 以 M6PR 的差异表达倍数最大; 表达上调 1 002 个, 以 RGP5 的差异表达倍数最大。GO 富集分析和 KEGG 通路分析结果显示, 差异表达 mRNA 主要富集于丝氨酸蛋白激酶激活、rRNA 结合等分子功能, 以及人巨细胞病毒感染、胰腺癌、子宫内膜癌、胰岛素信号通路和 FoxO 信号通路等。临床样本验证结果显示, LTBI 患者血浆外泌体 M6PR 相对表达量 ( $0.954 \pm 0.212$ ) 较 ATB 患者 ( $2.168 \pm 0.226$ ) 下调, RGP5 相对表达量 ( $2.126 \pm 0.200$ ) 较 ATB 患者上调 ( $0.588 \pm 0.129$ ) (均  $P < 0.05$ )。**结论** LTBI 患者和 ATB 患者血浆外泌体中 mRNA 表达存在差异, M6PR 和 RGP5 可考虑作为区分 LTBI 与 ATB 的潜在生物标志物。

**关键词:** 结核潜伏感染; 活动性结核病; 外泌体; mRNA; 高通量测序

**中图分类号:** R521 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2024) 01-0070-05

## Expression profile of mRNA sequencing for plasma exosomes among patients with latent tuberculosis infection and active tuberculosis

GAO Jin<sup>1</sup>, DU Xiaokang<sup>1</sup>, XIANG Haiyan<sup>2</sup>, FAN Chaoming<sup>1</sup>, CAI Chengsong<sup>1</sup>, PAN Feng<sup>1</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310015, China; 2. The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310015, China

**Abstract: Objective** To analyse the expression of differential mRNA in the plasma exosomes in patients with latent tuberculosis infection (LTBI) and active tuberculosis (ATB) using high-throughput sequencing, so as to provide insights into differential diagnosis of LTBI and ATB. **Methods** The plasma samples were collected from the patients treated at The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, including 16 cases of LTBI and 21 cases of ATB. The exosomes were extracted by Invitrogen extracellular extracts purification kit, and the size and morphology of exosomes were observed by transmission electron microscope (TEM). The exosomes were identified by Western blotting. Total RNA was extracted from plasma exosomes using high-throughput sequencing, differential expression mRNA was identified, and gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were performed. Two differential mRNAs with the highest differential expression fold were selected, and five patients with ATB and three patients with LTBI were recruited for verification using real-time quantitative PCR. **Results** The sequencing re-

**DOI:** 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.01.018

**基金项目:** 浙江省医药卫生科技计划项目 (2021KY888, 2019KY500)

**作者简介:** 高锦, 硕士, 副主任技师, 主要从事临床免疫学及分子生物学检验工作

**通信作者:** 潘峰, E-mail: 2359506302@qq.com

sults of plasma exosomes showed that compared with ATB patients, 2 875 differentially expressed mRNAs were detected in exosomes of LTBI patients, of which 1 002 mRNAs were up-regulated and 1 873 mRNAs were down-regulated. The most significant differentially expressed downregulated and upregulated mRNA were M6PR and RGP5, respectively. GO analysis and KEGG pathway analysis showed that differential mRNAs were enriched in protein serine kinase activity, rRNA binding molecular function, human cytomegalovirus infection, pancreatic cancer, endometrial cancer, insulin signaling pathway and FoxO signaling pathway. The real-time quantitative PCR showed that the expression of differential mRNA was consistent with sequencing. Compared with ATB patients, the relative expression level of M6PR in plasma exosomes in LTBI patients ( $0.954\pm 0.212$ ) was downregulated compared with that of ATB patients ( $2.168\pm 0.226$ ), while the relative expression level of RGP5 ( $2.126\pm 0.200$ ) was upregulated compared with that of ATB patients ( $0.588\pm 0.129$ ) (both  $P<0.05$ ). **Conclusions** There is a difference in mRNA expression of plasma exosomes between patients with LTBI and ATB. M6PR and RGP5 may become markers for distinguishing plasma exosomes between LTBI and ATB.

**Keywords:** latent tuberculosis infection; active tuberculosis; exosome; mRNA; high-throughput sequencing

结核潜伏感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染的亚临床疾病, 因无典型临床表现, 容易漏诊, 但其具有进展为活动性结核病 (active tuberculosis, ATB) 风险<sup>[1-2]</sup>。及早识别高风险 LTBI 患者并提供预防性药物是全球消除结核病和阻断传播链的关键策略<sup>[3]</sup>。目前世界卫生组织 (WHO) 认可的两种 LTBI 检测方法是结核菌素皮肤试验 (tuberculin skin test, TST) 和  $\gamma$  干扰素释放试验 (interferon- $\gamma$  release assay, IGRA), 但均无法区分 ATB 与 LTBI。

外泌体是直径 30~100 nm、具有脂质双分子层膜结构的细胞囊泡, 大多数细胞可分泌, 分布于血液、尿液、唾液和乳汁等体液中<sup>[4]</sup>。外泌体中包含 RNA, RNA 具有完整的序列结构和生物活性, 可以作为疾病早期分子诊断标志物, 成为近年研究的热点<sup>[5]</sup>。人体感染 MTB 后, 基因转录会发生动态变化, 本研究应用高通量测序技术检测 LTBI 患者和 ATB 患者血浆外泌体 mRNA, 并进行生物学信息分析, 以期发现可用于鉴别 LTBI 与 ATB 的差异血浆外泌体 mRNA。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选择 2021 年 1 月—2022 年 7 月杭州师范大学附属医院确诊的 ATB 患者 21 例和 LTBI 患者 16 例。ATB 诊断依据 WS 288—2017《肺结核诊断标准》<sup>[6]</sup>。LTBI 诊断依据美国疾病预防控制中心推荐标准<sup>[7]</sup>。本研究通过杭州师范大学附属医院伦理委员会审查, 审批号: 2021 (E2) -HS-007。研究对象均签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括外泌体提取纯化试剂盒 (Invitro-

gen, Thermo Fisher Scientific, 批号: 00955374)、CD9 (Abclonal, 货号: A1703)、肿瘤易感基因 101 蛋白 (tumor susceptibility gene 101 protein, TSG101; Abcam, 货号: ab125011)、Calnexin (SAB, 货号: 12186)、Small RNA Library Prep Kit (KT-Bio, 批号: AT4208)、20 bp Marker (Takara, 批号: 3420A)、核酸染料 (TIANGEN, 批号: RT210)、RT-PCR 扩增试剂盒 (Takara, 批号: RR086A)。主要仪器包括透射电镜 (Hitachi, HT-7700)、化学发光凝胶成像系统 (ChemiScope 3000mini, CLINX)、超微量紫外分光光度计 NanoDrop 2000 (美国 Thermo Fisher Scientific)、荧光定量仪 (Invitrogen Qubit 3.0, 美国 Fluorometer Thermo Fisher Scientific)、安捷伦生物分析仪 Agilent 2100 bioanalyzer (美国 Agilent Technologies)、Illumina novaseq 6000 测序平台 (美国 Illumina) 和荧光定量 PCR 分析仪 (ABI 7500, 美国 Applied Biosystems)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 血浆外泌体分离与鉴定

收集 EDTA-K<sub>2</sub> (乙二胺四乙酸二钾) 抗凝血, 于 4 °C、1 175 ×g 离心 10 min 获取血浆, 取 400  $\mu$ L 血浆转移至新离心管, 加入 200  $\mu$ L 的 1×磷酸盐缓冲液, 用旋涡混匀器充分混匀。加入 20  $\mu$ L 蛋白酶 K, 混匀后于 37 °C 干式恒温器中孵育 10 min。向样品中加入 120  $\mu$ L 外泌体沉淀剂, 上下颠倒充分混合, 管中呈现白色云雾状浑浊。将样品在 4 °C 冰箱孵育 30 min 后, 室温下 10 000×g 离心 5 min, 弃上清液, 底部沉淀物为外泌体颗粒。通过透射电镜观察外泌体形态, 采用免疫印迹法检测阳性标记蛋白 CD9 鉴定外泌体<sup>[8-9]</sup>。

#### 1.3.2 外泌体 RNA 提取及测序

按照 Trizol 总 RNA 提取试剂说明书提取外泌体

总 RNA, 并使用 NanoDrop 2000 检测光密度 (optical density, OD) 值, 通过 A260/280 和 A260/230 确定 RNA 纯度; 使用 Invitrogen Qubit 3.0 精确定量 RNA 浓度和总量; 通过琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 完整值 (RNA integrity number, RIN)。RNA 样品质量检测合格后, 去除 rRNA, 进行小 RNA 文库构建, 步骤如下: 3' ADT 接头连接, RT 引物结合, 5' ADT 接头连接, 反转录合成 cDNA, PCR 扩增, 文库制备后经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 分离纯化。构建好的文库采用 Agilent 2100 Bioanalyzer 确定文库片段大小分布, 采用 Invitrogen Qubit 3.0 进行文库定量, 采用 Illumina Novaseq 6000 测序平台, 2×150 bp 双端测序策略进行测序。

### 1.3.3 差异表达 mRNA 筛选与生物学信息分析

采用 edgeR 法检测差异表达 mRNA, 统计样本 mRNA 表达量后, 筛选差异表达 mRNA, 筛选标准: (1) 计算表达倍数变化 (fold change, FC), 满足  $\log_2 FC > 1$ ; (2)  $P \leq 0.05$ 。采用 R 4.3 软件包对差异表达的 mRNA 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分析、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析, 计算其 mRNA 功能的显著性水平 ( $P$  值) 和误判率 (false discovery rate, FDR), 推算出差异有统计学意义的基因功能和生物学途径富集度。

### 1.3.4 临床样本验证差异表达 mRNA

选择 2022 年 8 月后就诊的 ATB 患者 5 例和 LTBI 患者 3 例, 对差异表达 mRNA 进行临床验证。基于测序结果中 reads 读数, 选择差异表达倍数最大的 2 个 mRNA 采用实时荧光定量 PCR 进行临床样本验证。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成, 以 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Table 1 Target gene primer sequences

目的基因	引物序列 (5' -3')
M6PR	F: CACCTCAGTGTGGTTCATCT R: ATCCTGCCAGAAGGCTAAGTGG
RGPD5	F: CTCGAAGGCTTGAAACAAATGCCG R: GATAGGAGCTATGGTGAGAATTAC
GAPDH	F: CATCACCATCTTCCAGGAGC R: CTGACCTTGCCACAGCCTT

### 1.4 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布的采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 组间比较采用  $t$  检验; 定性资料采用相对数描述, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基本情况

ATB 患者 21 例, 男 13 例, 女 8 例, 年龄 (47±12) 岁; LTBI 患者 16 例, 男 10 例, 女 6 例, 年龄 (39±9) 岁。两组患者性别 ( $\chi^2=0.001$ ,  $P=0.970$ ) 和年龄 ( $t=2.058$ ,  $P=0.052$ ) 比较, 差异均无统计学意义。

### 2.2 血浆外泌体提取鉴定结果

两组患者提取的血浆外泌体在透射电镜下可见典型的双层膜结构的圆形囊泡; 免疫印迹试验显示典型的外泌体标记分子 CD9 蛋白条带, 位置符合外泌体特性, 提示血浆外泌体提取成功。OD 值 A260/280 处于 1.8~2.2 之间, A260/230  $\geq 2.0$ ; RNA 样品浓度  $\geq 100$  ng/ $\mu$ L, 总量  $> 2$   $\mu$ g; RIN  $\geq 7$ , 表明 RNA 样品质检合格。ATB 和 LTBI 患者血浆样品的文库浓度分别为 1.86 和 1.84 ng/ $\mu$ L, 均  $> 1.8$  ng/ $\mu$ L, 符合上机测序要求。

### 2.3 差异表达 mRNA 筛选结果

与 ATB 患者相比, LTBI 患者血浆外泌体共有 2 875 个差异表达 mRNA, 其中 1 873 个 mRNA 表达下调, 1 002 个 mRNA 表达上调, 以 M6PR 表达下调、RGPD5 表达上调的差异倍数最大, log<sub>2</sub>FC 值分别为 -8.87、5.82 (均  $P < 0.001$ )。

### 2.4 差异表达 mRNA 的生物信息学分析

GO 富集分析结果显示, LTBI 和 ATB 患者的差异表达 mRNA 在生物学功能方面主要富集于染色质、细胞成分大小调节和凋亡信号通路的调控; 在细胞组分方面主要富集于细胞-基质结合、黏着斑和核糖体等; 在分子功能方面主要富集于丝氨酸蛋白激酶激活、rRNA 结合、肌动蛋白结合与钙黏蛋白结合等。KEGG 信号通路分析结果显示, LTBI 和 ATB 患者的差异表达 mRNA 主要富集于人巨细胞病毒感染、胰腺癌、子宫内膜癌、胰岛素信号通路和 FoxO 信号通路。

### 2.5 临床样本验证结果

ATB 患者 M6PR 相对表达量为  $2.168 \pm 0.226$ , LTBI 患者为  $0.954 \pm 0.212$ ; ATB 患者 RGPD5 相对表达量为  $0.588 \pm 0.129$ , LTBI 患者为  $2.126 \pm 0.200$ ; 与 ATB 患者比较, LTBI 患者 M6PR 表达下调, RGPD5

表达上调, 差异有统计学意义 ( $t=8.761$ 、 $14.443$ , 均  $P<0.001$ )。

### 3 讨论

随着高通量测序技术的应用及各种生物学信息分析平台功能的完善, 转录组学研究使人们更好地了解宿主对疾病的反应, 识别潜在生物标志物用于疾病的诊断、预后、治疗和监测。外泌体作为一种信息传递媒介, 在 MTB 感染过程中既可转运 MTB 自身分子, 也可携带 RNA 在细胞之间穿梭, 并通过细胞通信影响受体细胞<sup>[10]</sup>。LYU 等<sup>[11]</sup>发现 4 个血浆外泌体来源的 miRNA 在 LTBI 患者中特异性表达, 可能是诊断 LTBI 的潜在生物标志物。ESTEVEZ 等<sup>[12]</sup>发现通过 RNA-seq 筛选出的差异表达基因建立的诊断模型可用于鉴别 ATB 与 LTBI。因此, 利用高通量测序技术对 MTB 感染不同状态下患者的血浆外泌体 mRNA 表达谱进行差异分析, 将有助于鉴别 ATB 与 LTBI 患者。

本研究对 LTBI 和 ATB 患者血浆外泌体 mRNA 进行高通量测序分析, 结果显示, 两组患者血浆外泌体存在 2 875 个差异表达 mRNA, 提示在 MTB 感染不同状态下, 宿主细胞内免疫应答状态有较大差异。与 ATB 患者相比, LTBI 患者下调 mRNA 中差异表达倍数最大的是 M6PR。有报道称 M6PR 存在于肿瘤(如慢性 B 细胞白血病<sup>[13]</sup>和卵巢癌<sup>[14]</sup>)细胞外泌体中, 但尚无结核病患者血浆外泌体存在 M6PR 的报道, 本研究证明结核病患者血浆外泌体中存在 M6PR, 且在不同 MTB 感染状态下差异表达显著。与 ATB 患者相比, LTBI 患者上调 mRNA 中差异表达倍数最大的是 RGP5。研究表明, RGP5 可能参与细胞增殖和分化的信号传导, 尤其在胚胎发育、神经系统发育和免疫反应中扮演重要角色<sup>[15]</sup>, 提示 RGP5 对 MTB 感染宿主可能发挥不同的免疫调节作用。实际临床样本实时荧光定量 PCR 验证结果与测序结果一致。

经 GO 功能富集分析, 本研究筛选出的差异表达 mRNA 包括 M6PR 和 RGP5, 在分子功能方面主要富集于丝氨酸蛋白激酶的激活, 丝氨酸蛋白激酶是一类真核细胞样的蛋白激酶<sup>[16]</sup>, 是生长和代谢的重要调节因子, 参与分枝杆菌多种细胞活动的调节如吞噬体溶酶体降解等。KEGG 通路分析结果显示, 差异表达基因主要富集于人巨细胞病毒感染、胰腺癌、子宫内膜癌等疾病、胰岛素信号通路和 FoxO 信号通路等。丝氨酸蛋白激酶是 FoxO 信号通路激活因子之

一, 调节目标基因转录活性, 参与细胞增殖、凋亡、代谢和应激响应等多种生物学过程。因此推测丝氨酸蛋白激酶活化激活 FoxO 信号通路, 调控 FoxO 转录因子活性, 引起 M6PR 和 RGP5 的表达和功能改变, 进而影响 MTB 感染者巨噬细胞溶酶体的降解能力和免疫反应。

综上所述, LTBI 患者血浆外泌体中存在较 ATB 患者差异表达的 mRNA, 多富集于恶性肿瘤、胰岛素信号通路和 FoxO 信号通路等相关通路, 具有激活丝氨酸蛋白激酶等分子功能。下调的 M6PR 和上调的 RGP5 有望作为 LTBI 患者血浆外泌体转录组学的潜在生物标志物, 其应用前景需扩大样本量后进一步研究。

### 参考文献

- [1] CHEE C B E, REVES R, ZHANG Y, et al. Latent tuberculosis infection: opportunities and challenges [J]. *Respirology*, 2018, 23 (10): 893-900.
- [2] 雷蓉蓉, 张婷, 吴成果, 等. 南川区居民结核潜伏感染调查 [J]. *预防医学*, 2022, 34 (4): 371-374.
- [3] DJAHARUDDIN I, AMIR M, QANITHA A. Exploring the link between cardiovascular risk factors and manifestations in latent tuberculosis infection: a comprehensive literature review [J]. *Egypt Heart J*, 2023, 75 (1): 43-51.
- [4] XU K H, ZHANG C P, DU T T, et al. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 1-12.
- [5] LI Y, ZHENG Q P, BAO C Y, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis [J]. *Cell Res*, 2015, 25 (8): 981-984.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准: WS 288-2017 [J]. *新发传染病电子杂志*, 2018, 3 (1): 65-67.
- [7] STERLING T R, NJIE G, ZENNER D, et al. Guidelines for the treatment of latent tuberculosis infection: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2020, 69 (1): 1-11.
- [8] ZHANG C, ZHU Z L, GAO J X, et al. Plasma exosomal miR-375-3p regulates mitochondria-dependent keratinocyte apoptosis by targeting XIAP in severe drug-induced skin reactions [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2020, 12 [2023-11-13]. <http://10.1126/scitranslmed.aaw6142>.
- [9] GURUNATHAN S, KANG M H, JEYARAJ M, et al. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes [J]. *Cells*, 2019, 8 (4): 307-342.
- [10] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21 (1): 9-17.

(下转第 77 页)

血性脑卒中患者的诊断与治疗方法,有效提高了早发现 and 早诊断水平<sup>[20]</sup>。

综上所述,2015—2022年永康市脑卒中发病率呈上升趋势,男性、老年人是主要发病人群,发病类型以缺血性脑卒中为主。建议根据脑卒中发病特点,加大健康教育力度,推广健康生活方式,加强高危人群筛查。

#### 参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] 王亚楠,吴思缈,刘鸣,等.中国脑卒中15年变化趋势和特点[J].华西医学,2021,36(6):803-807.
- [3] 王诚,王小红,徐则林.2015—2020年金华市居民脑卒中发病趋势分析[J].预防医学,2022,34(6):606-610.
- [4] 刘冰,张艳,徐珏,等.2014—2020年杭州市居民脑卒中发病及死亡变化趋势分析[J].中国预防医学杂志,2023,24(7):726-731.
- [5] 柴文杰,乔冬菊,王良友.2014—2019年台州市户籍居民脑卒中死亡趋势及潜在减寿分析[J].中国慢性病预防与控制,2020,28(12):941-944.
- [6] 马林,巢宝华,曹雷,等.2007—2017年中国脑卒中流行趋势及特征分析[J].中华脑血管病杂志(电子版),2020,14(5):253-258.
- [7] STEVEN P H, KEITH M D, STEVEN N B, et al. Association of accelerometer-measured sedentary time and physical activity with risk of stroke among US adults [J/OL]. JAMA Network Open, 2022, 5(6) [2023-11-29]. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30073-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30073-4).
- [8] 王亚楠,吴思缈,刘鸣.中国脑卒中15年变化趋势和特点[J].华西医学,2021,36(6):803-807.
- [9] MANWANI B, MCCULLOUGH L D. On the basis of sex [J]. Stroke, 2019, 50(9):2285-2287.
- [10] 丁梦珂,徐文超.2016—2020年常州市脑卒中发病流行特征及趋势分析[J].现代预防医学,2022,49(12):2131-2134,2148.
- [11] 陈晓明,王杨凤,王琪,等.2015—2019年重庆市涪陵区脑卒中发病和死亡趋势分析[J].职业卫生与病伤,2021,36(5):320-324.
- [12] 王洁,汪宁,刘宁杰,等.中青年缺血性脑卒中患者与健康人群生活行为习惯及基因多态性比较研究[J].华南预防医学,2022,48(10):1196-1200.
- [13] 孙晓东,贺瑛福.雌激素的脑保护作用及研究进展[J].中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(34):35,43.
- [14] 郑颖,陈述,钱桢梅,等.2016—2022年金东区脑卒中发病趋势分析[J].预防医学,2023,35(7):611-614.
- [15] 李静,孙培芳,夏洪刚,等.河北省脑卒中老年人健康管理现状及影响因素分析[J].中国公共卫生,2015,31(2):140-143.
- [16] 张瑞洁,纪威,韩丽媛,等.2012—2021年宁波市脑卒中发病和死亡趋势分析[J].预防医学,2023,35(3):224-228.
- [17] 徐秋霞,沈怡,熊建菁,等.2012—2019年上海市静安区监测人群脑卒中流行病学特征分析[J].预防医学情报杂志,2021,37(10):1340-1344.
- [18] FEIGIN V L, ROTH G A, NAGHAVI M, et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet Neurol, 2016, 15(9):913-924.
- [19] 叶春梅,陈青华,胡永勤,等.2010—2019年余杭区脑卒中发病和死亡趋势分析[J].预防医学,2021,33(9):916-918.
- [20] 钟迪,张舒婷,吴波.《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》解读[J].中国现代神经疾病杂志,2019,19(11):897-901.

收稿日期:2023-10-20 修回日期:2023-11-29 本文编辑:刘婧出

#### (上接第73页)

- [11] LYU L N, ZHANG X L, LI C D, et al. Small RNA profiles of serum exosomes derived from individuals with latent and active tuberculosis [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1174-1183.
- [12] ESTEVEZ O, ANIBARRO L, GARET E, et al. An RNA-seq based machine learning approach identifies latent tuberculosis patients with an active tuberculosis profile [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1470-1481.
- [13] PAGGETTI J, HADERK F, SEIFFERT M, et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts [J]. Blood, 2015, 126: 1106-1117.
- [14] LIANG B, PENG P, CHEN S, et al. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes [J]. J Proteomics, 2013, 80: 171-182.
- [15] JAISWAL S K, KUMAR A, ALI A, et al. Co-occurrence of mosaic supernumerary isochromosome 18p and intermittent 2q13 deletions in a child with multiple congenital anomalies [J]. Gene, 2015, 559(1): 94-98.
- [16] REFAYA A K, SHARMA D, KUMAR V, et al. A serine/threonine kinase PknL, is involved in the adaptive response of Mycobacterium tuberculosis [J]. Microbiol Res, 2016, 190: 1-11.

收稿日期:2023-09-11 修回日期:2023-11-13 本文编辑:徐文璐