



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

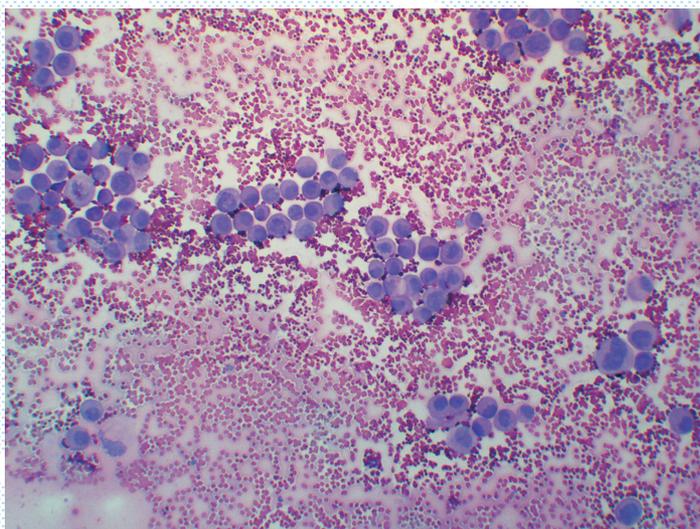
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2017年1月 第9卷 第1期 总第47期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 9 Number 1 January 2017



图(P35) 恶性腹腔积液患者液基细胞学检测阳性结果(HE, ×200)

Figure(P35) The positive results of TCT in patients with malignant peritoneal effusion(HE, ×200)

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库CMCC收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库CMCI收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

分子诊断与治疗杂志

二〇一七年一月

第九卷 第一期

中山大学

何蕴韶



何蕴韶，《分子诊断与治疗杂志》第一届、第二届、第三届、第四届编辑委员会名誉主编。

1953年2月出生，1991年毕业于中山医科大学（现中山大学中山医学院），获博士学位。

中山大学教授，博士生导师，广州市第十二届人大代表，享受国务院政府特殊津贴专家（1993年起）。现任临床医学分子诊断国家地方联合共建工程实验室主任，卫生部医药生物工程技术研究中心主任，中山大学达安基因股份有限公司董事长，广州市健康医疗协同创新重大专项首席科学家。

何蕴韶教授长期从事分子诊断技术的研究与开发，主持多项国家、省级以及市级重大项目，如国家“863”计划项目、“九五”国家重点科技攻关项目、国家重点科技项目、国家技术创新项目、卫生部重点项目基金、卫生部攻关计划项目、国家发改委高技术产业化专项、国家级高新区或国家火炬特色产业基地项目、国家科技部重大传染病防治专项、广东省发展计划、广东省产学研结合项目、广东省战略新兴产业核心技术攻关项目、广东省卫生厅医学科研基金项目、广州市重大科技项目、广州市科技局科技攻关计划项目等。

何蕴韶教授在分子生物学，尤其在分子诊断领域取得创新性成果。1995年，“衰老脑的可塑性研究”获得国家教委科技进步二等奖；1998年，“神经生长因子治疗老年性痴呆的实验研究”获得国家教委科技进步三等奖。在长期学术积累的基础上，何蕴韶教授以严谨的科学精神、创新的研究思路重点攻克了荧光探针设计、合成、标记和纯化技术，发明了既可实时荧光检测又可终点荧光检测的定量PCR技术，解决了传统PCR技术假阳性和不能定量等问题。这一研究成果在国际上首次将荧光定量PCR技术应用于病原体检测试剂盒研发，系列产品至今共计获得医疗器械证书50多个，新药证书10多个，其系列成果分别获得2000年度广州市科技进步一等奖、2003年度广东省科学技术一等奖、2004年度国家科技进步二等奖、2004年度广州市科技进步二等奖等奖项；何蕴韶教授在担任中山大学达安基因股份有限公司董事长期间，领导达安基因研发团队开发检测诊断试剂和仪器近200种并获得医疗器械证书，授权专利79项，其中发明专利64项，实用新型专利10项；何蕴韶教授作为发明人共授权发明专利29项，实用新型专利1项，极大地改善了我国诊断试剂市场大部分依赖国外进口的现状。个人获得第八届广东省丁颖科技奖和2005年度广州市科技技术突出贡献奖，在国内外核心学术期刊发表论文共计50余篇，编写专著3部，培养研究生41名，其中博士18名，硕士23名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2017年1月 第9卷 第1期 总第47期 Bimonthly Volume 9 Number 1 January 2017

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办 中山大学达安基因股份有限公司

顾问 来茂德 申子瑜
主编 李明
编辑部主任 徐伟文
编辑部 《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑 李晓兰 叶萍萍 李彩珍
出版 《中国家庭医生》杂志社有限公司

地址 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话 (020) 32290177 32290789-206
传真 (020) 32290177
电子邮箱 jmdt@vip.163.com

刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R

邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发行
广告经营许可证 粤工商广字第01139号
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2017年1月18日
定价 RMB 15.00元

Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>XU Weiwen</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929</i> <i>CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd</i>
Publish Date	<i>2017.1.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

版权归《分子诊断与治疗杂志》所有,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点,除非特别声明。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2017年1月 第9卷 第1期

目次

述 评

6种常见的循环肿瘤细胞的分离与富集技术 蒋能 崔咏梅 李淑华 等 (1)

论 著

MTHFR 基因 C677T 多态性与心血管疾病相关性的 Meta 分析 秦韶阳 黄山 张春阳 (6)

embB 基因突变与乙胺丁醇药敏表型及耐多药关系的研究 刘厚明 曾敏 李全 等 (16)

肺癌患者 EGFR 及 BRAF 基因突变检测方法的建立和临床应用 张洁明 杨学习 (23)

NGS 检测乙型肝炎病毒耐药基因突变情况及其临床意义 王创俊 王庆 曹治家 等 (28)

DNA 定量分析与液基细胞学检查对恶性腹腔积液的诊断价值 黄柳炎 刘崇梅 毛敏 等 (33)

肝病患者 AFP、TP、ALB、SOD 检测的临床价值 陆兴热 陈凤羽 刘孝文 等 (37)

促黄体生成素定量测定试剂盒 (化学发光免疫分析法) 的临床性能评价
..... 周颖 方婉仙 吴英松 (41)

北京市 3 221 例门诊患者 HPV13 个高危型别分型的实验研究
..... 张静 郭建巍 陈昌国 等 (46)

综 述

数字 PCR 在几种常见人类传染病研究中的应用 蒋析文 朱小亚 高秀洁 等 (50)

丙型肝炎免疫诊断的前景与优势 王秋实 郝文波 罗树红 (55)

土拨鼠肝炎病毒动物模型在肝细胞癌研究中的应用 朱松山 殷君 黄华艺 (61)

原发灶不明转移瘤的临床诊断 陈金影 蔡虎 徐清华 (67)

专家风采

何蕴韶 (封二)

实验室巡礼

临床医学分子诊断国家地方联合共建工程实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 1 January 2017

CONTENTS

COMMENTS

6 kinds of common technologies of separating and enriching circulating tumor cells

JIANG Neng, CUI Yongmei, LI Shuhua, ZHENG Xiaoke, YANG Zheng, WANG Liantang, KE Zunfu (1)

ORIGINAL ARTICLES

A Meta-analysis about the association between *MTHFR* C677T polymorphism and cardiovascular disease

QIN Shaoyang, HUANG Shan, ZHANG Chunyang..... (6)

Association between *embB* mutation and drug resistance and MDR in *Mycobacterium tuberculosis* for ethambutol

LIU Houming, ZENG Min, LI Quan, ZHAO Yanmin, ZOU Jing, LIN Mu, ZHAO Dan, XIAO Yanyu, DENG Qunyi, SHAN Wanshui (16)

A new method of gene mutation status detection on *EGFR* and *KRAS* of lung cancer patients and the assessment of clinical application

ZHANG Jieming, YANG Xuexi (23)

Next generation Sequencing in study of drug-resistance genes and the clinical significance of hepatitis B virus

WANG Chuangjun, WANG Qing, CAO Zhijia, YANG Xuexi (28)

The diagnostic value of DNA image cytometer and thinprep cytologic test for malignant peritoneal effusion

HUANG Liuyan, LIU Chongmei, MAO Min, ZOU Ya, YANG Juan (33)

Clinical significance of detection of AFP, TP, ALB and SOD in hepatopathy patients

LU Xingre, CHEN Fengyu, LIU Xiaowen, ZI Yunju, FAN Xiaodong, YUAN Diao, HE Xiang, ZHU Deyong, LU Yu..... (37)

Clinical research of luteinizing hormone (LH) quantitative diagnostic kit by chemiluminescent immunoassay (CLIA)

ZHOU Ying, FANG Wanxian, WU Yingsong..... (41)

Experiment research of HPV 13 high-risk types in 3 221 outpatients of Beijing

ZHANG Jing, GUO Jianwei, CHENG Changguo, LI Wenjun, MA Zhijia (46)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 1 January 2017

CONTENTS

REVIEWS

The applications of digital PCR on the researches of several common human infections

JIANG Xiwen, ZHU Xiaoya, GAO Xiujie, ZHOU Qiwei (50)

The prospect and advantages of immunological diagnosis of hepatitis C

WANG Qiushi, HAO Wenbo, LUO Shuhong (55)

Application of woodchuck hepatitis virus animal model in the study of hepatocellular carcinoma

ZHU Songshan, YIN Jun, HUANG Huayi (61)

Clinical diagnostic approaches for carcinoma of unknown primary

CHEN Jinying, XU Qinghua (67)

6种常见的循环肿瘤细胞的分离与富集技术

蒋能 崔咏梅 李淑华 郑晓克 杨峥 王连唐 柯尊富*

[摘要] 在过去的几十年,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)因其在肿瘤的早期诊断、预后判断、疗效评价、靶向药物的开发、个体化治疗中的潜在作用已经受到了广泛的关注和研究。在转移的肿瘤患者中,循环肿瘤细胞被视为一种微创的极具前景的诊断标志和判断预后的重要标志。许多敏感的筛选方法和设备已经应用于血液中循环肿瘤细胞的分离和富集。本文总结了6种CTCs的分离和富集技术以及他们的优缺点,以期为后续更加优化的新技术、新设备的开发提供更多的参考依据,同时也为后续肿瘤的精准医疗带来一些参考。

[关键词] 循环肿瘤细胞(CTCs);精准医疗;分离与富集

6 kinds of common technologies of separating and enriching circulating tumor cells

JIANG Neng, CUI Yongmei, LI Shuhua, ZHENG Xiaoke, YANG Zheng, WANG Liantang, KE Zunfu*

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] During the past ten years, circulating tumor cells (CTCs) have received enormous attention as potential research direction, because of the potential value in the early diagnosis of cancer, prediction of clinical prognosis, evaluation of therapeutic efficiency, development of targeted drugs, and personalized medicine of malignant cancer. Circulating tumor cells (CTCs) have been regarded as minimally invasive and promising diagnostic and prognostic biomarkers for patients with metastatic tumors. Multiple highly sensitive approaches and devices have been developed to separate and enrich CTCs in the blood. We have summarized 6 kinds of separation and enrichment technologies of CTCs with the opportunities and challenges faced during the development of these systems, this article also provides reference frame for an optimized separation and enrichment technology and highlight some directions for the precision medicine of cancer treatment.

[KEY WORDS] Circulating tumor cells (CTCs); Precision medicine; Separation and enrichment

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指脱离了肿瘤原发部位和转移部位而进入血液循环中的各类肿瘤细胞的统称。根据中国最近的一份肿瘤统计学数据,肿瘤已成为国民死亡的主要原因,同时也是威胁公众健康的主要原因^[1]。随

着“精准医疗”概念的提出,恶性肿瘤的诊断与治疗也逐步向个体化、精细化方向深入发展,CTCs的研究是精准医疗的重要方向之一,而如何从恶性肿瘤患者血液中分离的CTCs中得到更多的诊断信息和治疗信息将是精准医疗的重要方面,若

基金项目:国家自然科学基金(30900650/H1615, 81372501/H1615, 81572260/H1615, 81172232/H1615, 81172564/H162);广东省自然科学基金(2011B031800025, S2012010008378, S2012010008270, S2013010015327, 2013B021800126, 20090171120070, 9451008901002146, 2013B021800126 2015A020214010 and 2013B021800259);高校基本业务青年重点培育(2015ykzd07)

作者单位:中山大学附属第一医院病理科,广东,广州 510080

*通讯作者:柯尊富, E-mail: kezunfu@126.com

能应用于医学领域,将有效地帮助发现肿瘤的早期转移、评估肿瘤患者预后以及帮助判断肿瘤个体化治疗的疗效,实时动态地分析肿瘤患者 CTCs 的特性将为肿瘤患者真正的个体化治疗提供新的依据^[2-4]。目前的研究表明,CTCs 的分离和富集是一种极具前景的恶性肿瘤监测手段^[5-6],与传统肿瘤组织活检相比,检测循环血液中的 CTCs 被视为一种简单无创的“液体活检”手段^[2,7,8]。而如何敏感、准确、快速、高效地分离和富集循环血液中少量的肿瘤细胞是摆在我们面前的难题^[9-11],CTCs 检测技术的不断改进和发展,将有助于我们更深入地了解肿瘤的发生发展过程和其相关生物学特性。本文归纳总结了常见的 6 种 CTCs 分离富集技术,包括 NanoVelcro cell-affinity substrates CTC 芯片技术、核酸适配体(Aptamer)技术、微流控芯片技术(microfluidics chip technology)、基于形态学的膜微孔过滤技术(Micro filter technology)、基于形态学的密度梯度离心法等^[2,12]。

1 CTCs 常见的分离与富集技术

1.1 NanoVelcro cell-affinity substrates CTC 芯片技术

NanoVelcro CTC 芯片能够牢固高效地捕获 CTCs,硅纳米结构基质(Silicon nanowire substrate, SiNS)可以模拟细胞外基质的生物学特性和功能,利用纳米基板的生物学特性可以有效地黏附 CTCs^[2]。此外,可在 SiNS 上结合上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体,通过 CTCs 细胞表面表达的 EpCAM 抗原与基板上黏附的 EpCAM 抗体亲和性来有效地捕获血液中的 CTCs。通过一系列的改进和创新,NanoVelcro CTC 芯片已经经历了 3 代。第 1 代是由 SiNS 和聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)微流体混合器组成,工作部分主要由含有螺旋形(鱼骨型)微通道的 NanoVelcro 基板和高分子 PDMS 微通道构成^[13],分离的 CTCs 通过荧光染色观察,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核阳性与 CD45 染色阳性的细胞为有核白细胞,而 DAPI 染色阳性与细胞角蛋白(cytokeratin, CK)染色同时阳性者为需要分离富集的 CTCs^[2]。临床血液样本对比分析发现 NanoVelcro CTC 芯片比美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的 CellSearch 更加

敏感、效率越高、花费更少^[14-16]。同时,分离的 CTCs 可用于基因测序等后续研究,是精准医疗不可或缺的重要一环^[2]。第 2 代 NanoVelcro-LMD 技术是在纳米基板聚合物基础上通过聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米纤维与二甲基二硫代氨基甲酸铅薄膜(Lead dimethyl dithiocarbamate, LMD)偶联来筛选 CTCs^[17-18]。分离的肿瘤细胞可用于监测肿瘤的进展情况和肿瘤的治疗效果,而分离的单个肿瘤细胞可以用来做下游的基因分型和测序,相比于其他类型的肿瘤活检方式,这种肿瘤的液体活检方式更方便简洁。第 3 代是温度敏感性的 SiNS 芯片,可以在 37℃ 条件下捕获 CTCs,而在 4℃ 条件下可以释放出捕获的 CTCs,这种利用不同温度下 SiNS 构象的改变来捕获和分离 CTCs 的特性更加有效地保持肿瘤细胞的完整性和生物学特性^[6,16,19]。除了硅纳米结构基质 NanoVelcro 芯片,后续的其他很多研究也发现了许多其他的材料,诸如聚(3,4-乙烯二氧噻吩)[Poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT]来源的 NanoVelcro 芯片、四氧化三铁纳米芯片等,可能具有更好地分离 CTCs 的性能^[2,20]。纳米的磁性材料或是非磁性的纳米免疫富集方法均可增加分离 CTCs 时的接触面积,从而增加捕获 CTCs 的效率。

1.2 核酸适配体(Aptamer)技术

Aptamer 技术本质上是一种改进的 NanoVelcro cell-affinity substrates CTC 芯片,传统 SiNS 基板上结合的 EpCAM 抗体能够帮助更好地捕获 CTCs,新的核酸适配体(Aptamer)技术则是在 SiNS 基板上连接链霉亲和素及其生物素化的配体,这种基板上的适配体可以有效地识别 CTCs 细胞膜外表面上的配体,从而达到固定和富集血液中 CTCs 的目的,而固定的 CTCs 可在酶的作用下与适配体解离释放,从而达到可控性分离和富集 CTCs 的作用。这种方法可以减少昂贵的 EpCAM 抗体的使用,同时也是一种高效的富集 CTCs 的手段^[2,16]。

1.3 CellSearch 系统

该系统是目前唯一被 FDA 批准用于转移性乳腺癌、结直肠癌和前列腺 CTCs 检测的技术,该系统可集免疫磁珠富集技术和免疫荧光技术于一体,主要依靠外面包被了特异 EpCAM 抗体的免疫纳米磁珠与血液中表达 EpCAM 的 CTCs 结合来分

选 CTCs,并进一步通过荧光反应识别 CTCs,分选效率高,研究表明利用免疫磁珠分离方法可明显增加外周血肿瘤细胞的检出率^[21-25]。CellSearch 系统能够实现 CTCs 的半自动化检测并且具有较高的敏感性、特异性、准确性和可重复性。但 CellSearch 每次检测需要 7.5 mL 血液,所消耗的 EpCAM 抗体昂贵,且无法捕获不表达 EpCAM 的细胞或因发生上皮间质转换导致细胞 EpCAM 表位丢失的细胞,分离后的细胞可能会因为磁珠无法与细胞完全分离干净而导致细胞完整性和活性受到破坏,导致捕获细胞的再利用受到一定影响。同时,新的研究发现 MagSweeper, IsoFlux, VeriFAST 系统可能具有更高的富集 CTCs 的效果^[26-28],麻省总医院(Massachusetts General Hospital, MGH)的研究团队也发现负向的间接分选机制也有不错的分离效果^[29]。

1.4 微流控芯片技术

微流控芯片技术是指根据实际需求,在一些高分子聚合材料上(如 PDMS)制作出各种结构尺寸的微米量级管道,血液流体在微流控的微通道中的行为与其在宏观尺度通道中不同,微流控通道可以实现一系列常规方法所难以完成的微加工和微操作。微流控芯片管道可依据细胞大小来设计,微流控芯片分选和富集 CTCs 也会利用循环肿瘤细胞表达的 EpCAM 与 EpCAM 抗体特异性结合来分选 CTCs,通过抗原抗体结合抓捕到的 CTCs 可使用胰蛋白酶使其释放,也可利用细胞的大小、免疫磁珠连同抗体的特异性结合来分离 CTCs,微流控芯片是一种高效的分离循环细胞的装置,分离血液中的 CTCs 效率常常大于 90%。微流控被认为在生物医学研究中具有巨大的发展潜力和广泛的应用前景,与常规分选方法相比,微流控芯片具有对细胞破坏小及微型化、低成本、灵敏度高的特点^[8, 30-32]。

1.5 基于形态学的膜微孔过滤技术

Micro filter 技术是一种基于肿瘤细胞大小的分离法(Isolation by size of epithelial tumor cells, IS-ET)^[33],依据细胞大小设计高分子过滤膜孔径来达到分离富集 CTCs 的目的^[34-35]。CTCs 与大部分血液细胞在细胞尺寸和变形能力方面存在明显的差别,依据这个原理设计的微过滤膜可以选择性滤过体积较小的血细胞而截留体积相对较大的肿瘤细胞,捕获后的 CTCs 可通过免疫细胞化学技术、

逆转录聚合酶链反应和经典的病理学诊断方法加以识别, Clearbridge 和 RareCell 等平台已应用于实践^[2, 36],目前,已发展成 3D 版膜微孔过滤技术^[37]。该方法可以更大程度地保留细胞结构的完整性,而不破坏细胞的生物学特性,为后续的进一步检测提供可能,此方法对技术的要求较低,易于操作,价格低廉,分离后细胞活性较好。该系统一般只依据细胞大小来分离 CTCs,与细胞表达的 EpCAM、细胞角蛋白等无关,故可以识别所有的 CTC 类型,避免错误的阳性和阴性结果,但也存在灵敏性不够、细胞易于损失等不足。

1.6 基于形态学的密度梯度离心法

密度梯度离心法也是目前常见的一种基于细胞形态学特点来富集 CTCs 的方法,可以从外周血中分离富集 CTCs,常用的有 OncoQuick 分离法、传统的聚蔗糖(Ficoll)分离法。传统的 Ficoll 分离法设备简单,主要设计的是一种特殊的 50 mL 离心管,离心管下面 15 mL 用一种特殊的多孔屏障分开,下面 15 mL 装的是 Ficoll,上面装 10 mL 血液样品,室温下 1 000 rpm 离心 10 min,离心后将上隔间液体倒入一个新的 50 mL 离心管,下面沉淀的细胞用磷酸盐缓冲液清洗,4℃离心 15 min,分离的有核细胞即可用于其它的后续检测。研究同时表明 OncoQuick 分离法与传统的 Ficoll 分离法比较, OncoQuick 分离法对肿瘤细胞的富集效果更好^[12, 38, 39]。

2 小结与展望

本文总结了几种常见分离 CTCs 技术的特点,各有优劣。物理的分离方法诸如膜微孔过滤技术和基于形态学的梯度密度离心法操作简单,可分选出发生了上皮间质转化的肿瘤细胞、可更大程度地保持肿瘤细胞的完整性和分子表位,且无需消耗昂贵的 EpCAM 抗体,但也存在特异性较低和假阳性率较高的缺点。而微流控技术又分了物理的和生物化学的富集方法,物理的方法拥有操作简单、最大程度地保持细胞完整性、无需消耗抗体等优点,生物化学的方法也会利用常见的 EpCAM 抗体来筛选,在提高富集特异性的同时,其操作成本相应地增加,且因其无法分选出发生上皮间质转化的肿瘤细胞而造成其假阴性率较高。对比其他系统, CellSearch 系统同样存在许多优缺点,因其使用了 EpCAM 抗体,故其具有类似其他的使用

EpCAM 抗体方法的优缺点, 虽其存在耗血量大等缺点, 但目前为止, CellSearch 系统仍然是 FDA 唯一批准的用于 CTCs 检测的系统, 故其他物理和化学的分离方法仍然不能完全取代已经标准化了的 CellSearch 系统。目前 CTCs 分离技术的研究重点主要集中在纳米材料领域, 如本文介绍的纳米 NanoVelcro CTC 芯片因其具有更大的表面积而增加 CTCs 的接触面积来达到提高分选效率的目的, 且可很大程度地保持分离后 CTCs 形态和功能的完整性, 因许多纳米材料目前仍然使用 EpCAM 抗体分选, 故也存在抗体消耗过多等问题, 而改进的核酸适配体 (Aptamer) 技术无需消耗抗体, 这种改进的无需消耗抗体的技术与非磁性纳米材料的结合具有很大的研究潜力。事实上各类技术均有一定的交叉, 新的思路可根据实验设计或临床目的先物理筛选后利用抗原表位二次筛选, 如何提高分离设备的敏感性、特异性、高效性及如何保持分离后细胞的完整性和活性将是未来 CTCs 分离富集技术的研究重点。在 CTCs 分离技术中大量的研究者做了大量的工作, 如何标准化 CTCs 的分离技术也亟待解决, 要使 CTCs 检测技术更加广泛应用于临床, 还需完善诸多相关研究。

类似于其他医学技术的发展, CTCs 分离技术的发展也是为了更好地应用于临床。我们知道远处转移往往是影响肿瘤患者预后最重要的因素, 而血液中的 CTCs 就是肿瘤远处转移的途径, 如何从分子学和精准医疗的角度找到肿瘤治疗的钥匙将是未来肿瘤治疗的重点方向, 作为一种非侵袭性的血液检测手段, 分离纯化后的 CTCs 可用来培养细胞系做相关研究, 可用于基因测序分析突变位点, 可用于制作动物模型, CTCs 的相关研究将为肿瘤的早期诊断、疗效评价、预后判断、靶向药物的开发和药效评估以及个体化治疗提供可靠的依据。正是因为 CTCs 广阔的应用前景, 优化的 CTCs 分离和富集技术的开发显得尤为重要。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Lin M, Chen JF, Lu YT, et al. Nanostructure embedded microchips for detection, isolation, and characterization of circulating tumor cells[J]. Acc Chem Res, 2014, 47(10):2941-2950.
- [3] Pantel K, Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(9):398-406.
- [4] Kim DJ, Lee WY, Park NW, et al. Drug response of captured BT20 cells and evaluation of circulating tumor cells on a silicon nanowire platform [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 67:370-378.
- [5] Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy [J]. Cancer Discov, 2016, 6(5):479-491.
- [6] Ke Z, Lin M, Chen JF, et al. Programming thermoresponsiveness of NanoVelcro substrates enables effective purification of circulating tumor cells in lung cancer patients[J]. ACS Nano, 2015, 9(1):62-70.
- [7] Marchetti A, Del GM, Felicioni L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment [J]. Plos One, 2014, 9(8):e103883.
- [8] Tang M, Wen CY, Wu LL, et al. A chip assisted immunomagnetic separation system for the efficient capture and in situ identification of circulating tumor cells [J]. Lab Chip, 2016, 16(7):1214-1223.
- [9] Fischer AH. Circulating tumor cells: seeing is believing [J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(9):1367-1369.
- [10] Dharmasiri U, Witek MA, Adams AA, et al. Microsystems for the capture of low-abundance cells [J]. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2010, 3:409-431.
- [11] Paterlini - Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions [J]. Cancer Lett, 2007, 253(2):180-204.
- [12] Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood [J]. Cytometry, 2002, 49(4):150-158.
- [13] Stroock AD, Dertinger SK, Ajdari A, et al. Chaotic mixer for microchannels [J]. Science, 2002, 295(5555):647-651.
- [14] Wang S, Liu K, Liu J, et al. Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, 50(13):3084-3088.
- [15] Lu YT, Zhao L, Shen Q, et al. NanoVelcro Chip for CTC enumeration in prostate cancer patients [J]. Methods, 2013, 64(2):144-152.

- [16] Shen Q, Xu L, Zhao L, et al. Specific capture and release of circulating tumor cells using aptamer-modified nanosubstrates [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(16):2368-2373.
- [17] Hou S, Zhao L, Shen Q, et al. Polymer nanofiber-embedded microchips for detection, isolation, and molecular analysis of single circulating melanoma cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(12):3379-3383.
- [18] Zhao L, Lu YT, Li F, et al. High-purity prostate circulating tumor cell isolation by a polymer nanofiber-embedded microchip for whole exome sequencing [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(21):2897-2902.
- [19] Hou S, Zhao H, Zhao L, et al. Capture and stimulated release of circulating tumor cells on polymer-grafted silicon nanostructures [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(11):1547-1551.
- [20] Hsiao YS, Luo SC, Hou S, et al. 3D bioelectronic interface: capturing circulating tumor cells onto conducting polymer-based micro/nanorod arrays with chemical and topographical control [J]. *Small*, 2014, 10(15):3012-3017.
- [21] Hillig T, Horn P, Nygaard AB, et al. In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6):4597-4601.
- [22] Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(3):395-407.
- [23] Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch[®] CTC test [J]. *Cytometry A*, 2015, 87(2):137-144.
- [24] Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, et al. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry in vitro [J]. *J Urol*, 2000, 164(5):1834-1837.
- [25] Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(3):395-407.
- [26] Talasz AH, Powell AA, Huber DE, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(10):3970-3975.
- [27] Harb W, Fan A, Tran T, et al. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay [J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(5):528-538.
- [28] Casavant BP, Guckenberger DJ, Berry SM, et al. The VerIFAST: an integrated method for cell isolation and extracellular/intracellular staining [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(3):391-396.
- [29] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179):179ra47.
- [30] Lee SW, Hyun KA, Kim SI, et al. Continuous enrichment of circulating tumor cells using a microfluidic lateral flow filtration chip [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1377:100-105.
- [31] Autebert J, Coudert B, Champ J, et al. High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: towards routine mutation detection [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(9):2090-2101.
- [32] 杜晶辉, 刘旭, 徐小平. 微流控芯片分选富集循环肿瘤细胞的研究进展 [J]. *色谱*, 2014, 32(1):7-12.
- [33] Ma YC, Wang L, Yu FL. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, 12(4):295-309.
- [34] Salvianti F, Orlando C, Massi D, et al. Tumor-related methylated cell-free DNA and circulating tumor cells in melanoma [J]. *Front Mol Biosci*, 2015, 2:76.
- [35] Adams DL, Zhu P, Makarova OV, et al. The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters [J]. *RSC Adv*, 2014, 9:4334-4342.
- [36] Tan SJ, Yobas L, Lee GY, et al. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood [J]. *Biomed Microdevices*, 2009, 11(4):883-892.
- [37] Zheng S, Lin HK, Lu B, et al. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood [J]. *Biomed Microdevices*, 2011, 13(1):203-213.
- [38] Kaifi JT, Kunkel M, Das A, et al. Circulating tumor cell isolation during resection of colorectal cancer lung and liver metastases: a prospective trial with different detection techniques [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(5):699-708.
- [39] Nastaly P, Ruf C, Becker P, et al. Circulating tumor cells in patients with testicular germ cell tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(14):3830-3841.

MTHFR 基因 C677T 多态性与心血管疾病相关性的 Meta 分析

秦韶阳¹ 黄山^{2*} 张春阳¹

[摘要] 目的 系统评价 N5, N10-亚甲四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) 基因 677 位点单核苷酸多态性 (C677T) 与心血管疾病易感性的相关性。方法 计算机检索 PubMed、EMbase、Medline、The Cochrane Library、CNKI、VIP 及 WanFang Data, 收集相关人群 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病风险的病例-对照研究, 检索时限从各数据库建库至 2015 年 7 月。按照纳入与排除标准筛选文献、提取资料并评价纳入研究的质量后, 用 RevMan 5.2 软件采用随机效应模型进行 Meta 分析; Stata 12.0 进行敏感性分析和发表偏倚评估。结果 纳入 23 个病例-对照研究, 合计病例 5 835 例, 对照 4 251 例。Meta 分析结果显示在以下 5 个遗传模型中合并分析时, 均提示 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病发病风险的相关性具有统计学意义。等位基因模型 (T vs C) [OR=1.39, 95% CI (1.17, 1.65), $P=0.000\ 2$]; 纯合子模型 (TT vs CC) [OR=1.57, 95% CI (1.16, 2.12), $P=0.003$]; 杂合子模型 (TC vs CC) [OR=1.69, 95% CI (1.26, 2.27), $P=0.000\ 4$]; 显性遗传模型 (TT+TC vs CC) [OR=1.53, 95% CI (1.21, 1.94), $P=0.000\ 5$]; 隐性遗传模型 (TT vs TC+CC) [OR=1.37, 95% CI (1.08, 1.73), $P=0.01$]。进行亚组分析时, 在以下亚组中显示出更高的发病风险。冠心病组, 隐性遗传模型 (TT vs TC+CC) [OR=1.38, 95% CI (1.17, 1.62), $P=0.000\ 1$]; 心肌梗死组, 等位基因模型 (T vs C) [OR=1.71, 95% CI (1.37, 2.13), $P<0.000\ 01$]; 年龄 < 50 岁组, 纯合子模型 (TT vs CC) [OR=2.23, 95% CI (1.58, 3.17), $P<0.000\ 01$]。结论 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病的发病具有显著相关性; 与等位基因 C 相比, 等位基因 T 可增加心血管疾病风险。

[关键词] *MTHFR*; 单核苷酸多态性; 心血管疾病; Meta 分析; 病例-对照研究

A Meta-analysis about the association between *MTHFR* C677T polymorphism and cardiovascular disease

QIN Shaoyang¹, HUANG Shan^{2*}, ZHANG Chunyang¹

(1. Clinical Laboratory Medicine Department, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China, 550002;

2. The clinical laboratory center of Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou, China, 550002)

[ABSTRACT] Objective This meta-analysis was conducted to evaluate the correlations of a common polymorphism (677C > T) in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene with the risk of cardiovascular disease (CVD). Methods The following electronic databases were searched without language restrictions: PubMed, EMbase, Medline, The Cochrane Library, CNKI, VIP, and WanFang Data. Collect related crowd *MTHFR* C677T polymorphism and the risk of CVD in the case-control study. Meta-analysis was performed using RevMan statistical software with the random effects model, while sensitivity analysis and publication bias were performed using Stata statistical software. Results A total of 23 studies

基金项目: 贵州省省长资金临床应用课题专项研究项目 [黔省专合字 (2012) 117 号]

作者单位: 1. 贵州省贵州医科大学医学检验学院, 贵州, 贵阳 550002

2. 贵州省人民医院检验中心, 贵州, 贵阳 550002

*通讯作者: 黄山, E-mail: huangshan263@sina.com

met all inclusion criteria and were included in this meta-analysis. Our results revealed that the *MTHFR* 677C > T polymorphism might increase the risk of CVD (Allele T vs C: OR=1.39, 95%CI=1.17, 1.65, $P=0.000$ 2; TT vs CC: OR=1.57, 95%CI=1.16, 2.12, $P=0.003$; TC vs CC: OR=1.69, 95%CI=1.26, 2.27, $P=0.000$ 4; TT+TC vs CC: OR=1.53, 95% CI=1.21, 1.94, $P=0.000$ 5; TT vs TC + CC: OR=1.37, 95% CI=1.08, 1.73, $P=0.01$; respectively). Further subgroup analysis by variety of disease and age range suggested that the *MTHFR* 677C > T polymorphism was associated with an elevated risk for CVD among coronary heart disease (TT vs TC+CC: OR=1.38, 95%CI=1.17, 1.62, $P=0.000$ 1), myocardial infarction (Allele T vs C: OR=1.71, 95%CI=1.37, 2.13, $P < 0.000$ 01), with age range of less than 50 years (TT vs CC: OR=2.23, 95% CI=1.58, 3.17, $P < 0.000$ 01). **Conclusion** Our findings indicate that the *MTHFR* 677C > T polymorphism may be associated with an elevated risk for CVD, compared with the allele C, allele T can increase the risk of cardiovascular disease.

[KEY WORDS] *MTHFR*; Single nucleotide polymorphism; Cardiovascular disease; Meta-analysis; Cases-controls

随着老年人口不断增加,心血管疾病也呈现出逐年增长的趋势。而心血管疾病是老年病死率最高的疾病,以往认为年龄为心血管病高危因子^[1],近年来越来越多的研究着重于基因对于心血管疾病易感性的个体差异^[2]。心血管疾病包括冠心病、先心病、高血压、动脉硬化等,它是由遗传和环境因素共同作用所致的复杂疾病,其发病过程与多基因之间和基因-环境之间的相互作用有关。研究表明,遗传因素在所有已知的风险因素中约占30%~50%^[3-4]。

研究显示,血清内同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)的高水平是心血管疾病及中风的风险因素,是这类疾病的标记,而Hcy在体内代谢依赖于相关的酶作用^[5]。基因的突变导致酶活性下降,进而升高血清Hcy水平。其中N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)是其甲基化途径中的关键酶。*MTHFR*基因C677T位点是常见的不耐热错义突变,由于第677位核苷酸胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)置换,导致酶的第222位氨基酸由一个高度保守的丙氨酸(alanine)变成缬氨酸(valine),并且降低了*MTHFR*酶的活性^[6],由此推测这种改变可能会增加心血管疾病的易感性。*MTHFR*基因C677T位点有3种基因型,分别是野生型(CC)、杂合型(TC)、纯合型(TT),研究显示,TC和TT基因型的*MTHFR*活性较CC基因型酶活性低,分别是CC基因型*MTHFR*活性的65%和30%,其中TT基因型*MTHFR*活性最低,最易导致Hcy的形成^[7]。查阅国内外文献发现,关于*MTHFR*基因C677T多态性与心血管疾病的相关性结论并不一致。因此本文制定计划,收集资料并综合分析相关数据,应用病例-对照研究

方法对*MTHFR*基因C677T多态性与心血管疾病的相关性进行Meta分析,对心血管疾病开展有针对性的人群预防和个体化治疗,以及预防或延缓心血管疾病的发生、发展具有重要的理论和实际意义。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略

计算机检索EMbase、The Cochrane Library、PubMed、Medline、CNKI、VIP及WanFang Data,检索时限均为从各数据库建库至2015年7月,检索语种包括中文与英文。收集相关人群*MTHFR*基因C677T多态性与心血管疾病风险的病例-对照研究。文献检索策略采用Mesh主题词和关键词相结合的方式进行搜索;并手工检索纳入文献的参考文献以发现潜在符合纳入标准的研究。英文检索词包括:cardiovascular disease、Methylenetetrahydrofolate Reductase、*MTHFR*、Single Nucleotide Polymorphism、SNP等;中文检索词包括*MTHFR*、亚甲基四氢叶酸还原酶、单核苷酸多态性、SNP、心血管疾病等。

英文检索式:((((((((((Nucleotide Polymorphism, Single[Text Word]) OR Polymorphism, Single Nucleotide[Text Word]) OR Nucleotide Polymorphisms, Single[Text Word]) OR Polymorphisms, Single Nucleotide[Text Word]) OR Single Nucleotide Polymorphisms[Text Word]) OR SNPs[Text Word]) OR Single Nucleotide Polymorphism[Text Word])) OR ((polymorphism[Text Word]) OR SNP[Text Word])) AND (((Cardiovascular Disease[Text Word]) OR Disease, Cardiovascular[Text Word]) OR

Diseases, Cardiovascular[Text Word]) OR Cardiovascular Diseases[Text Word]) AND (((((((Methylene-tetrahydrofolate Reductase[Text Word]) OR Methylene-THF Reductase[Text Word]) OR 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase[Text Word]) OR Methylene Tetrahydrofolate Reductase[Text Word]) OR Tetrahydrofolate Reductase, Methylene[Text Word]) OR MTHFR[Text Word]) OR NADPH[Text Word])

中文检索式:题名或关键词:(亚甲基四氢叶酸还原酶)+题名或关键词:(*MTHFR*)*题名或关键词:(多态性)+题名或关键词:(SNP)*题名或关键词:(心血管疾病)。

1.2 文献纳入与排除标准

1.2.1 文献纳入标准

(1)原始研究是公开发表的纸质版或电子版文献;(2)研究类型的试验方法选择病例-对照研究,并且有完整可靠的数据,恰当的统计方法,严谨的对照组;(3)研究对象关于 *MTHFR* 基因 677C>T 多态性与心血管疾病发病风险关联的临床研究;病例组为心血管疾病患者,对照组为相应年龄段的健康人群;(4)患者(病例组)均有典型心血管疾病的临床诊断;(5)心血管疾病定义为有冠心病、心肌梗死、原发性高血压,并且有明确的诊断和临床特征。例如:动态血压监测、冠状动脉造影技术,并结合检验报告其血脂、生化、血压或心室心功能状态异常等;(6)纳入文献提供完整可靠的 *MTHFR* C677T 基因型和等位基因频率的数据。

1.2.2 文献排除标准

(1)原始研究的实验设计不严谨,或试验方法不符合病例-对照研究;(2)综述类或会议汇编文献;(3)数据不全并与作者沟通仍无法获取数据的文献。

1.3 文献筛选、数据提取

每篇文献都由两位研究者根据纳入与排除标准独立筛选文献、提取资料并进行交叉核对,如遇分歧讨论解决,并把提取出的数据填入文献特征表中。提取内容包括:(1)纳入研究的基本信息,包括第一作者、国家和人种、题目、研究发表的时间和杂志;(2)病例组和对照组的例数、年龄范围、疾病类型及实验方法;(3)病例组和对照组的等位基因和基因型频率。(4)研究设计类型及质量评价

的关键要素。

1.4 纳入文献质量评分

每篇文献都由两位研究者根据纽卡斯尔-渥太华量表(Newcastle-Ottawa Scale, NOS)^[8]独立进行质量评价,如有争议则相互讨论再做评价。NOS 评分量表适用于评价病例-对照研究和队列研究。它通过三大块共8个条目的方法进行评价,具体包括研究人群选择(0~4分)、可比性(0~2分)、暴露因素的确定(0~3分)。NOS对文献质量的评价采用了星级系统的半量化原则,满分为9颗星。得分 ≤ 3 分为低质量文献,4~6分为中等质量文献, ≥ 7 分为高质量文献。

1.5 统计分析

采用 RevMan 软件进行 Meta 分析, Stata 软件进行敏感性分析和发表偏倚评估。先对文献进行异质性检验,确定异质性采用卡方检验(Q test, chi-square test)进行分析,若 $P < 0.10$ 则提示存在统计学异质性^[9];在此基础上借助 I^2 检验定量估计异质性大小, I^2 介于 0~100%, I^2 越大、异质性越大。如异质性检验 $P \leq 0.05$ 或 $I^2 > 50\%$ 则提示各研究间存在较大异质性,故采用随机效应模型(random effects model, REM)进行 Meta 分析;反之,采用固定效应模型(fixed effects model, FEM)进行 Meta 分析。接着根据异质性大小采用 REM 或 FEM 进行 Meta 分析,计算优势比(OR)及其 95% 可信区间(95% CI)评价 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病的发病风险,并对合并效应值进行 Z 检验,来计算 OR 值的显著性、作为评价风险关联强弱的标准。当 $P < 0.05$ 定义为有统计学意义。对纳入研究的对照组进行哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg, HWE)平衡检验,当 $P > 0.05$ 时,说明群体基因遗传平衡数据来自同一孟德尔群体。最后根据不同疾病、不同年龄段进一步行亚组和 Meta 回归分析以探究各文献间异质性来源。采用逐一排除研究的方法进行敏感性分析,重新估计合并效应量,并与排除前的合并效应量进行比较。使用 Begg's test 评估文献是否存在发表偏倚。

2 结果

2.1 文献检索结果

初筛出相关文献 872 篇,经逐层筛选后,最终纳入 23 个病例-对照研究,合计病例 5 835 例,对照 4 251 例。文献筛选流程及结果见图 1。

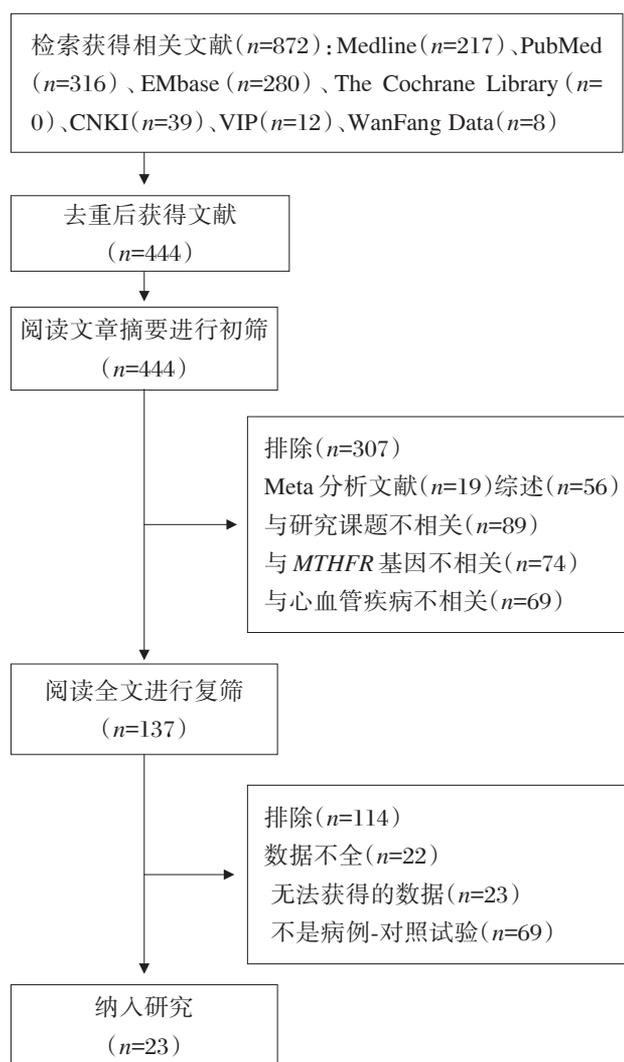


图1 文献筛选流程图和被排除在Meta分析外的具体原因

Figure 1 Flow chart of the study selection process and specific reasons for exclusion from the meta-analysis

2.2 纳入研究的基本特征与质量评价

纳入的23个研究均有等位基因数据,其中20个研究的对照组符合Hardy-Weinberg平衡,3个研究的对照组不符合Hardy-Weinberg平衡。其中有3个研究没有具体的年龄信息,<50岁的研究有6篇,50~60岁的研究有8篇,60~70岁的研究有4篇,>70岁的研究有2篇。质量评价结果显示,纳入研究的NOS评分均 ≥ 7 分,认为质量可靠。纳入研究的基本特征及质量评价见表1。

2.3 Meta分析结果

纳入的23篇关于MTHFR基因C677T位点多态性与心血管疾病发病风险关系的研究文献中,共累

计病例组5835例,对照组4251例。研究分别从基因型频率和等位基因频率两方面对其相关性进行合并统计分析。首先采用Q检验和I²统计量对纳入的研究进行异质性检验,P值与I²值的结果显示,在所有遗传模型下,各个研究间均有显著异质性($P < 0.05$),因此采用随机效应模型进行数据合并。当23个研究在以下5个遗传模型中合并分析时,显示MTHFR基因C677T多态性与心血管疾病发病风险的相关性具有统计学意义,说明MTHFR基因C677T位点多态性与增加心血管疾病的易感性相关。

2.3.1 等位基因模型(T vs C)

共纳入23个研究,包括病例组5835例,对照组4251例。以突变基因T为暴露因素,基因C为非暴露因素,随机效应模型Meta分析结果显示,心血管疾病组等位基因T/C频率比值高于健康对照组[OR=1.39,95%CI(1.17, 1.65), $P=0.0002$](图2)。

2.3.2 纯合子模型(TT vs CC)

共纳入23个研究,包括病例组5835例,对照组4251例。以TT为暴露因素,基因CC为非暴露因素,随机效应模型Meta分析结果显示,心血管疾病组TT/CC频率比值高于健康对照组[OR=1.57,95%CI(1.16, 2.12), $P=0.003$]。

2.3.3 杂合子模型(TC vs CC)

共纳入23个研究,包括病例组5835例,对照组4251例。以TC为暴露因素,基因CC为非暴露因素,随机效应模型Meta分析结果显示,心血管疾病组TC/CC频率比值高于健康对照组[OR=1.69,95%CI(1.26, 2.27), $P=0.0004$]。

2.3.4 显性遗传模型(TT+TC vs CC)

共纳入23个研究,包括病例组5835例,对照组4251例。以基因型TT+TC为暴露因素,基因型CC为非暴露因素,随机效应模型Meta分析结果显示,心血管疾病组TT+TC/CC频率比值高于健康对照组[OR=1.53,95%CI(1.21, 1.94), $P=0.0005$]。

2.3.5 隐性遗传模型(TT vs TC+CC)

共纳入23个研究,包括病例组5835例,对照组4251例。以TT为暴露因素,TC+CC为非暴露因素,固定效应模型Meta分析结果显示,心血管疾病组TT/TC+CC频率比值高于健康对照组[OR=1.37,95%CI(1.08, 1.73), $P=0.01$]。

为了探索异质性的来源,分别根据疾病类型和不同年龄段进行亚组分析。疾病类型亚组分析在等位基因T与C、基因型TT与CC、TC与CC、

TT+TC 与 CC、TT 与 TC+CC 5 种基因模型下展开。基于不同疾病类型的亚组分析显示,疾病类型为冠心病的亚组中,*MTHFR* 基因 C677T 多态性显示出更高的发病风险 [隐形遗传模型 TT vs TC+CC; OR=1.38, 95%CI(1.17, 1.62), $P=0.000 1$]。疾病类型为心肌梗死的亚组中,*MTHFR* 基因 C677T 多态性显示出更高的发病风险 [等位基因模型 T vs C; OR=1.71, 95%CI(1.37, 2.13), $P < 0.000 01$]; [纯合子模型 TT vs CC; OR=2.05, 95%CI(1.05, 4.04), $P=0.04$]。年龄段亚组分析在 TT 与 CC 和 TT+ TC 与 CC 两种基因模型下展开。基于不同年龄段的亚组分析显示,年龄段为 50~60 岁和 > 60 岁的亚组中,*MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病的相关性无统计学意义。年龄段

为 < 50 岁的亚组中,*MTHFR* 基因 C677T 多态性显示出更高的发病风险 [纯合子模型 TT vs CC; OR=2.23, 95%CI(1.58, 3.17), $P < 0.000 01$]。各种遗传学模型与心血管疾病相关性的 Meta 分析结果见表 2。

2.4 敏感性分析

本研究根据所收集资料的特点,采用逐一删除纳入文献的方法进行敏感性分析,以评价单一文献对总体结果的影响。将剩下的研究重新进行 Meta 分析,观察 Q 统计量和 P 值以及合并效应量 OR 值变化情况,并与排除前的合并效应量进行比较。本文对 5 个基因模型总的合并效应量以及所有亚组分析结果都进行了敏感性分析。结果表明无单一文献可显著影响原始分析和亚组分析统计

表 1 纳入研究的基本特征

Table 1 The basic characteristics of all included studies

纳入研究	国家	例数(病例/对照)	年龄范围(病例/对照)	疾病类型	检测方法
Juan 2015 ^[10]	墨西哥	373/391	58/53	原发性高血压	TaqMan 探针法
Javed 2012 ^[11]	澳大利亚	377/393	63.1±10.9/61.0±10.5	原发性高血压	PCR-RFLP
Alexandre 2007 ^[12]	巴西	91/36	60.3±12/60.4±12	冠心病	PCR
Soujatya 2010 ^[13]	印度东部	217/255	42.60/40.53	冠心病	PCR-RFLP
Angeline 2009 ^[14]	印度南部	120/100	-	心肌梗死	SEQUENCE
Nevin 2008 ^[15]	-	78/100	57.2±10.0/57.5±11.1	原发性高血压	real-time PCR
Nevin 2008 ^[15]	-	100/100	58.3±9.9/57.5±11.1	冠心病	real-time PCR
Jones 2005 ^[16]	奥塔戈	271/282	64.0±9.5/69.5±7.6	冠心病	PCR
Angeline 2004 ^[17]	印度南部	52/20	-	心肌梗死	PCR-RFLP
Klaus 2004 ^[18]	白种人	2121/617	66.8±12.8/60.8±12.4	冠心病	TaqMan 探针法
Irena 2003 ^[19]	克罗地亚	247/298	-	冠心病	PCR-RFLP
Lakhdar 2009 ^[20]	突尼斯	352/390	58.0±11.5/57.3±7.6	冠心病	PCR-RFLP
Vasisht 2002 ^[21]	印度北部	141/55	52±10/50±11	冠心病	PCR
Anne 2001 ^[22]	非裔美国人	110/185	56/55	心肌梗死	AFLP
Sadi 2001 ^[23]	土耳其	96/100	38±7/37±5	心肌梗死	PCR
S.Friso 2002 ^[24]	意大利	302/168	60.6±9.3/58.2±12.8	冠心病	PCR
Hamdia 2014 ^[25]	埃及	30/15	45.5±4.8/43.2±4.3	心肌梗死	RT PCR
Prithiksha 2015 ^[26]	南非印度人	106/100	37.6/37.5	冠心病	PCR-RFLP
Dhouha 2014 ^[27]	突尼斯	100/200	46.92±7.62/31±9.6	心肌梗死	RT PCR
Andrzej 2001 ^[28]	-	161/211	43.6±4.7/43.7±5.6	冠心病	PCR-RFLP
肖雁 2007 ^[29]	中国	87/73	71.9±13.2/67.8±13.6	冠心病	PCR-RFLP
李晓波 2010 ^[30]	中国	114/31	77.4±5.68/75.9±4.26	冠心病	PCR-RFLP
陈玉岚 2007 ^[31]	中国新疆	189/131	56±10/54±11	冠心病	PCR-RFLP

-代表原文数据缺失; PCR-RFLP: 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法; real-time PCR: 实时荧光定量聚合酶链式反应; RT PCR: 逆转录聚合酶链反应; AFLP: 扩增片段长度多态性

续表1 纳入研究的基本特征

Continued table 1 The basic characteristics of all included studies

纳入研究	基因型频率(病例/对照)			HWE 对照组 (<i>P</i> 值)	NOS		
	TT	TC	CC		研究对象选择	组间可比性	暴露因素测量
Juan 2015 ^[10]	87/101	174/200	112/90	0.64	3	2	3
Javed 2012 ^[11]	33/35	174/183	170/175	0.19	4	2	3
Alexandre 2007 ^[12]	6/2	59/20	26/14	0.13	4	2	3
Soujatya 2010 ^[13]	58/33	47/36	112/186	0.00	3	2	3
Angeline 2009 ^[14]	0/0	32/20	88/80	0.27	3	1	3
Nevin 2008 ^[15]	10/2	32/26	36/72	0.84	4	2	3
Nevin 2008 ^[15]	4/2	44/26	52/72	0.84	4	2	3
Jones 2005 ^[16]	30/26	104/122	137/134	0.81	3	2	3
Angeline 2004 ^[17]	1/0	10/3	41/17	0.72	4	1	3
Klaus 2004 ^[18]	251/68	955/283	915/266	0.57	4	2	3
Irena 2003 ^[19]	22/18	111/146	114/134	0.001	4	1	3
Lakhdar 2009 ^[20]	46/20	149/123	157/247	0.36	3	2	3
Vasisht 2002 ^[21]	11/2	32/14	98/39	0.60	3	2	3
Anne 2001 ^[22]	2/4	17/28	91/153	0.06	4	2	3
Sadi 2001 ^[23]	15/5	39/35	42/60	0.97	4	2	3
S.Friso 2002 ^[24]	46/30	156/90	100/48	0.28	3	2	3
Hamdia 2014 ^[25]	2/0	16/2	12/13	0.78	4	2	3
Prithiksha 2015 ^[26]	2/0	25/14	79/86	0.45	4	2	3
Dhouha 2014 ^[27]	2/17	82/79	16/104	0.72	4	2	3
Andrzej 2001 ^[28]	17/18	39/75	105/118	0.23	3	2	3
肖雁 2007 ^[29]	4/1	54/25	29/47	0.25	3	2	3
李晓波 2010 ^[30]	27/6	51/15	36/10	0.93	4	2	3
陈玉岚 2007 ^[31]	37/23	108/47	44/61	0.01	4	2	3

HWE: 哈迪-温伯格平衡定律; NOS: Newcastle-Ottawa Scale 评分量表; 研究对象选择(0~4分): 病例确定是否恰当(1分)、病例的代表性(1分)、对照的选择(1分)、对照的确定(1分); 组间可比性(0~2分): 设计和统计分析时考虑病例和对照的可比性(2分); 暴露因素测量(0~3分): 暴露因素的确定(1分)、采用相同的方法确定病例和对照组暴露因素(1分)、无应答率(1分)

学结果。说明所剔除的结果对结论敏感度低, 结论较为可信。

2.5 发表偏倚评估

MTHFR 基因 C677T 多态性与心血管疾病易感性 Meta 分析发表偏倚分析, 各基因模型的 Begg's 漏斗形见图 3。由图可看出 5 个基因模型的图形都呈对称的倒漏斗状, 说明无明显发表偏倚。

3 讨论

我们在心血管疾病的总体 Meta 分析中发现, 无论是在等位基因 T 频率的易感性方面, 还是在纯合子模型、杂合子模型、显性遗传模型和隐性遗传模型方面, 均存在 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病发病的显著相关性, 并且在携带等位基因 T 的人群中, 心血管疾病发病更显著。该结论与高显会等^[32]的结果类似, 认为 *MTHFR* 基因

677C > T 多态性会增加心血管疾病的发病风险, TT vs CC: OR=2.75, 95% CI (1.35, 5.59), *P*=0.005; TT vs CC+CT: OR=2.52, 95% CI (1.25, 5.09), *P*=0.010。与之相比本文对不同疾病类型也进行了亚组分析, 显示在冠心病组中隐性遗传模型具有更高的发病风险; 在心肌梗死组中等位基因模型和纯合子模型具有更高的发病风险。Bozok 等^[33]研究, 发现在心肌梗死组中纯合子模型 TT vs CC: OR=2.34, 95% CI (1.40, 3.93), *P*=0.001 具有高发病风险, 与本文相似。但该研究只涉及了土耳其人, 没有考虑人种的因素。

McCully^[34]在 1969 年首次发现了 Hcy 与动脉粥样硬化性疾病具有相关性, 自此, 国内外研究者开始了 Hcy 与心血管疾病相关性的大量研究。现今 Hcy 已被普遍认为是动脉粥样硬化的独立危险因素, 其中 *MTHFR* 等同型半胱氨酸代谢关键酶的基因缺陷, 可以造成蛋氨酸的循环障碍, 导致血清

表2 亚组和 Meta 回归分析结果汇总

Table 2 Summary of subgroup and meta-regression analysis results

亚组	基因型	研究数	异质性检验		效应模型	Meta 分析结果	
			P 值	I ² 值 (%)		OR 值(95CI)	P 值
整体	T vs C	23	<0.000 01	82	随机	1.39 (1.17,1.65)	0.000 2
	TT vs CC	23	<0.000 1	65	随机	1.57 (1.16,2.12)	0.003
	TC vs CC	23	<0.000 01	88	随机	1.69 (1.26,2.27)	0.000 4
	TT+TC vs CC	23	<0.000 01	84	随机	1.53 (1.21,1.94)	0.000 5
	TT vs TC+CC	23	0.004	50	随机	1.37 (1.08,1.73)	0.01
冠心病	T vs C	14	<0.000 01	83	随机	1.36 (1.10,1.68)	0.004
	TT vs CC	14	0.001	61	随机	1.64 (1.18,2.28)	0.004
	TC vs CC	14	<0.000 01	89	随机	1.69 (1.15,2.48)	0.007
	TT+TC vs CC	14	<0.000 01	84	随机	1.44 (1.09,1.91)	0.01
	TT vs TC+CC	14	0.07	39	固定	1.38 (1.17,1.62)	0.000 1
心肌梗死	T vs C	6	0.15	39	固定	1.71 (1.37,2.13)	<0.000 01
	TT vs CC	6	0.31	17	固定	2.05 (1.05,4.04)	0.04
	TC vs CC	6	0.000 2	79	随机	2.23 (1.10,4.52)	0.03
	TT+TC vs CC	6	0.000 8	76	随机	2.25 (1.18,4.29)	0.01
	TT vs TC+CC	6	0.05	58	随机	1.10 (0.31,3.94)	0.88
原发性高血压	T vs C	3	<0.000 1	90	随机	1.23 (0.76,2.00)	0.4
	TT vs CC	3	0.004	82	随机	1.30 (0.54,3.13)	0.56
	TC vs CC	3	0.004	82	随机	1.11 (0.64,1.91)	0.72
	TT+TC vs CC	3	0.000 2	88	随机	1.19 (0.63,2.24)	0.59
	TT vs TC+CC	3	0.03	71	随机	1.21 (0.63,2.30)	0.57
< 50 岁	TT vs CC	6	0.1	46	固定	2.23 (1.58,3.17)	<0.000 01
	TT+TC vs CC	6	<0.000 01	88	随机	2.38 (1.20,4.74)	0.01
50~60 岁	TT vs CC	8	<0.000 01	81	随机	1.77 (0.91,3.44)	0.09
	TT+TC vs CC	8	<0.000 01	87	随机	1.49 (0.96,2.33)	0.08
> 60 岁	TT vs CC	6	0.71	0	固定	1.10 (0.88,1.39)	0.4
	TT+TC vs CC	6	0.006	69	随机	1.18 (0.88,1.60)	0.27

中 Hcy 的聚积,从而引起高同型半胱氨酸血症^[35]。迄今为止发现的 *MTHFR* 基因突变中, *MTHFR* C677T 突变位点是最常见的不耐热错义突变。有研究证明,心血管疾病的危险因素之一就是热不稳定性 *MTHFR*,在已有心血管病变的高同型半胱氨酸患者中发生率为 28%^[36]。C→T 的突变导致了 *MTHFR* 酶的活性和耐热性降低,从而引起血中 Hcy 含量升高,Hcy 是一种兴奋性神经递质,高浓度 Hcy 使超氧化物产生增加,引起氧化应激反应的发生,最终损伤血管内皮。而内皮细胞结构和功能的改变是多种心血管疾病的共同病理基础。已证实,高血压、冠心病等患者内皮结构和功能严重受损。同时,高 Hcy 还会使血管平滑肌细胞的增殖增加,导致了血管壁的弹性和顺应性

降低。因此 Hcy 在血浆中的高水平参与了心血管疾病的病理生理过程^[37],由此影响人群中心血管疾病易感性。但对于此位点与心血管疾病的相关性国内外报道不一,仍具有争议性。因此,本文收集了相关文献进行综合,分析 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病的相关性。

在进行亚组分析时,对 3 种疾病亚组进行了多个遗传模型的 Meta 分析,发现亚组中均存在不同程度的异质性,不排除假阴性结果存在的可能;但在冠心病隐性遗传模型、心肌梗死等位基因和纯合子模型中,异质性小,Meta 分析发现差异结果具有可信性。纳入研究间的异质性通常来自研究方法的不同、研究对象遗传背景的差异、基因连锁不平衡、非遗传因素的干扰等。本文的分析结果也

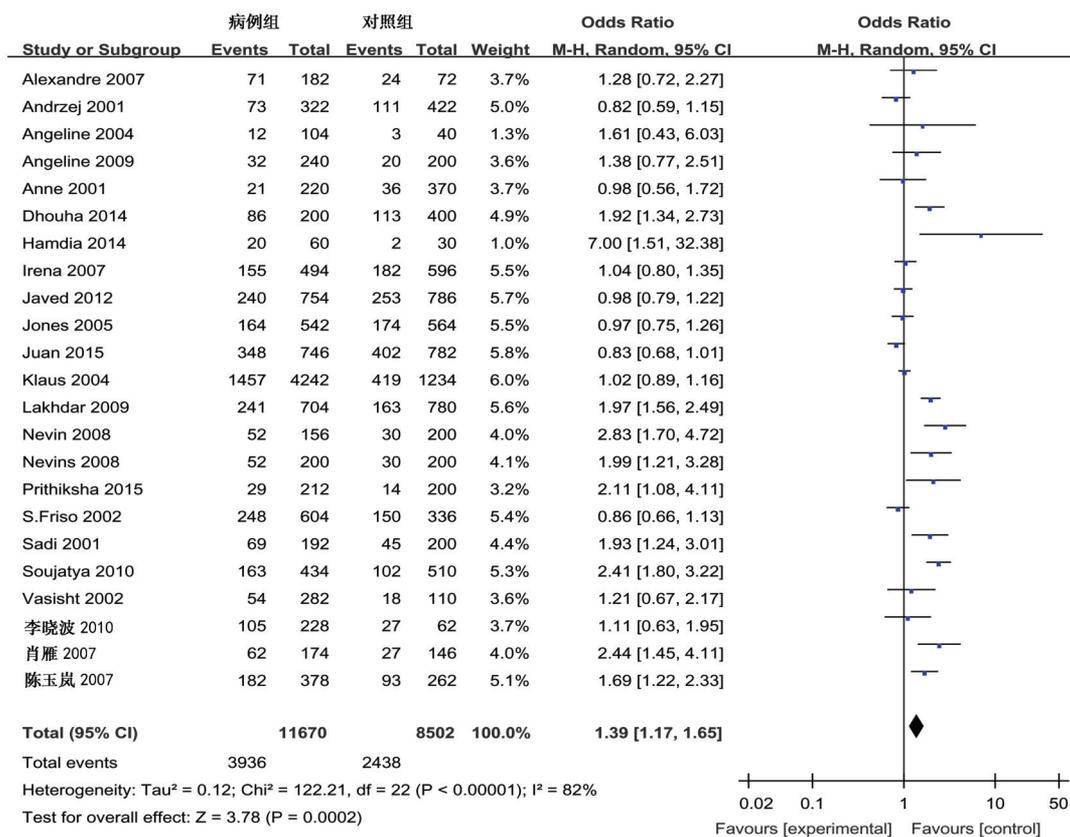
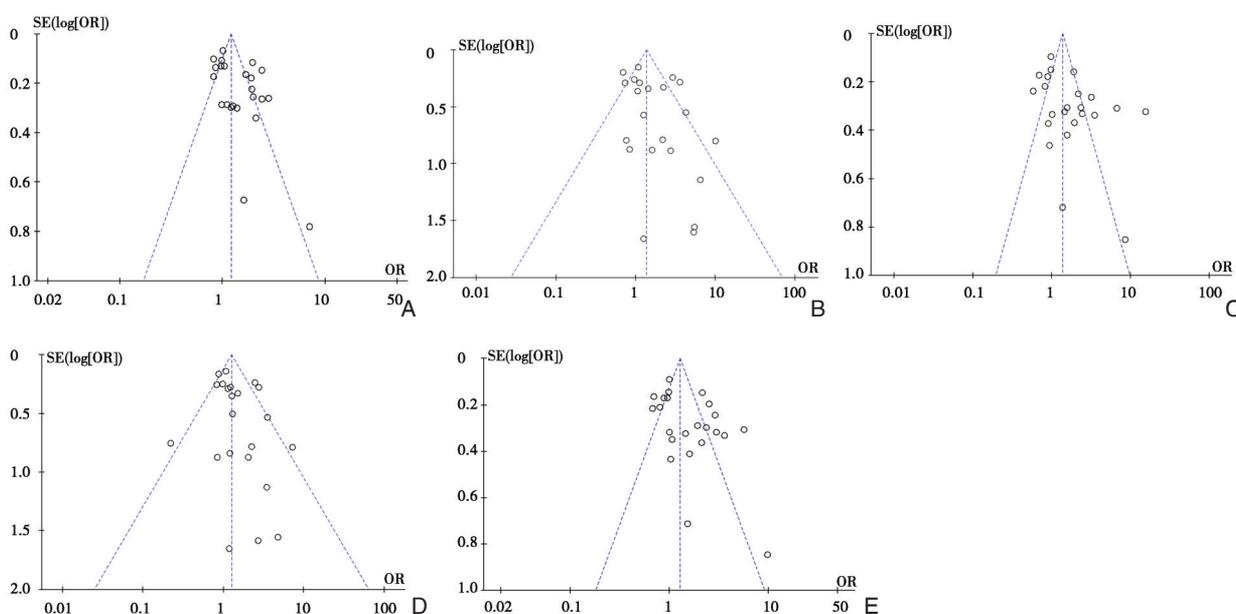


图2 *MTHFR* 基因 C677T 多态性与心血管疾病相关性的 Meta 分析 (等位基因模型)

Figure 2 The meta analysis of the association between the *MTHFR* gene polymorphism C677T and cardiovascular disease (allele model)



A: 等位基因模型 (T vs C); B: 纯合子模型 (TT vs CC); C: 杂合子模型 (TC vs CC); D: 显性遗传模型 (TT vs TC+CC); E: 隐性遗传模型 (TT+TC vs CC)

图3 各种遗传模型发表偏倚的 Begg's 漏斗图

Figure 3 Begg's Funnel plot of publication biases on various genetic model

存在一定的局限性:(1)由于检索的部分研究无详细的基因数据,故无法纳入此篇Meta分析。(2)虽然纳入研究数达23个,但普遍样本量偏小,存在假阳性的可能。(3)一般发表的文章为具有相关性的文章,大部分无相关性的文章不被发表,因此可能存在夸大结果的可能。为了尽可能的降低发表偏倚,本文在检索文献时,对检索式和关键词进行了详尽的编写,并尽可能全面地检索相关文献,并进行了严格的质量分析,确保每篇纳入的文献数据结果可靠。综上所述,本文发现MTHFR基因C677T多态性与心血管疾病易感性相关,等位基因T可能是心血管疾病易感的危险因素。

参考文献

- [1] 李闯兵,朱集兰,徐娟,等. MTHFR C677T 基因多态性与老年心血管病研究进展[J]. 现代临床医学, 2014, 40(6):409-410.
- [2] Ordovás JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease [J]. Nature Reviews Cardiology, 2010, 7(9):510-519.
- [3] McQuillan BM, Beilby JP, Nidorf M, et al. Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS) [J]. Circulation, 1999, 99(18):2383-2388.
- [4] Pallaud C, Sass C, Zannad F, et al. APOC3, CETP, fibrinogen, and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the stanislav cohort) [J]. Clinical Genetics, 2001, 59(5):316-324.
- [5] 刘君,万云高,孙志媛,等. 同型半胱氨酸与心脑血管疾病相关性研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(1):116-120.
- [6] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [J]. Nature Genetics, 1995, 10(1):111-113.
- [7] Qian X, Lu Z, Tan M, et al. A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension [J]. European Journal of Human Genetics, 2007, 15(12):1239-1245.
- [8] Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses [J]. European Journal of Epidemiology, 2010, 25(9):603-605.
- [9] Zintzaras E, Ioannidis JP. HEGESMA: genome search meta-analysis and heterogeneity testing [J]. Bioinformatics, 2005, 21(18):3672-3673.
- [10] Pérez-Razo JC, Cano-Martínez LJ, Vargas Alarcón G, et al. Functional polymorphism rs13306560 of the MTHFR gene is associated with essential hypertension in a Mexican-Mestizo population [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2015, 8(4):603-609.
- [11] Fowdar JY, Lason MV, Szvetko AL, et al. Investigation of homocysteine-pathway-related variants in essential hypertension [J]. International Journal of Hypertension, 2012, 2012:190923.
- [12] Guerzoni AR, Pavarino-Bertelli EC, Godoy MF, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and its association with coronary artery disease [J]. Sao Paulo Med, 2007, 125(1):4-8.
- [13] Dhar S, Chatterjee S, Ray S, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene as the genetic predispositions of coronary artery diseases in eastern India [J]. Journal of Cardiovascular Disease Research, 2010, 1(3):152-157.
- [14] Angeline T, Thiruvavutselvi G, Isabel W, et al. MTHFR (Ala 222 Val) polymorphism and AMI in patients with type II diabetes mellitus [J]. Indian J Clin Biochem, 2009, 24(2):137-141.
- [15] Ilhan N, Kucukusu M, Kaman D, et al. The 677 C/T MTHFR polymorphism is associated with essential hypertension, coronary artery disease, and higher homocysteine levels [J]. Arch Med Res, 2008, 39(1):125-130.
- [16] Jones GT, Harris EL, Phillips LV, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not associate with susceptibility to abdominal aortic aneurysm [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2005, 30(2):137-142.
- [17] Angeline T, Jeyaraj N, Granito S, et al. Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians [J]. Experimental and Molecular Pathology, 2004, 15(7):85-88.
- [18] Kölling K, Ndrepepa G, Koch W, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease [J]. Am J Cardiol, 2004, 93(10):1201-1206.
- [19] Zuntar I, Topić E, Vukosavić D, et al. Croatian population data for the C677T polymorphism in methylene-

- tetrahydrofolate reductase: frequencies in healthy and atherosclerotic study groups [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 335(1-2):95-100.
- [20] Ghazouani L, Abboud N, Mtiraoui N, et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms in Tunisian patients with severe coronary artery disease [J]. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2009, 27(2):191-197.
- [21] Vasisht S, Gulati R, Narang R, et al. Polymorphism (C677T) in the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: A preliminary study on north Indian men [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2002, 17(1):99-107.
- [22] Dilley A, Hooper WC, El-Jamil M, et al. Mutations in the genes regulating methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) and cystathione β -Synthase (CBS G919A, CBS T833C) are not associated with myocardial infarction in African Americans [J]. *Thrombosis Research*, 2001, 103(2):109-115.
- [23] Gülec S, Aras O, Akar E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction [J]. *Clin Cardiol*, 2001, 24(4):281-284.
- [24] Friso S, Girelli D, Trabetti E, et al. A1298C methylenetetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism [J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2002, 2(1):7-12.
- [25] Hamdia E, Fatma AA, Amal M, et al. Prevalence of thrombophilic gene polymorphisms (FVL G1691A and MTHFR C677T) in patients with myocardial infarction [J]. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2014, 15(2):113-123.
- [26] Ramkaran P, Phulukdaree A, Khan S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indians [J]. *Gene*, 2015, 571(1):28-32.
- [27] Slama DBB, Mrissa NF, Haggui A, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms with myocardial infarction in Tunisian young patients [J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2013, 23(5):1633-1638.
- [28] Szczeklik A, Sanak M, Jankowski M, et al. Mutation A1298C of Methylenetetrahydrofolate Reductase: Risk for Early Coronary Disease Not Associated With Hyperhomocysteinemia [J]. *American Journal of Medical Genetics*, 2001, 101(1):36-39.
- [29] 肖雁, 胡志恒, 单可人, 等. 冠心病患者亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性 87 例研究 [J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27(4):293-295.
- [30] 李晓波, 李燕, 李亚平, 等. 老年冠心病患者 MTHFR 基因多态性研究 [J]. *中国实用医药*, 2010, 5(12):24-25.
- [31] 陈玉岚, 张向阳, 徐新娟, 等. 新疆维汉民族亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性及血浆同型半胱氨酸与冠状动脉粥样硬化性心脏病的关系 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 17(11):3206-3209.
- [32] 高显会, 张国毅, 王莹, 等. MTHFR 基因 677C > T 多态性与慢性肾衰竭血液透析患者心血管疾病易感性关联的 Meta 分析 [J]. *中国全科医学*, 2014, 32(17):3855-3859.
- [33] Bozok ÇV, Gündüz C. Association between polymorphism of MTHFR c.677C>T and risk of cardiovascular disease in Turkish population: a meta-analysis for 2.780 cases and 3.022 controls [J]. *Molecular biology reports*, 2014, 41(1):397-409.
- [34] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis [J]. *American Journal Of Pathology*, 1969, 56(1):111-128.
- [35] Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, et al. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis [J]. *Circulation*, 1998, 98(23):2520-2526.
- [36] Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1997, 17(10):2074-2081.
- [37] 彭红艳, 常青. 血管内皮细胞骨架及其与心血管疾病的关联 [J]. *中国循环杂志*, 2007, 22(5):394-396.

embB 基因突变与乙胺丁醇药敏表型及耐多药关系的研究

刘厚明¹ 曾敏² 李全² 赵艳敏² 邹婧² 林牧¹ 赵丹³ 肖颜玉¹ 邓群益⁴ 单万水^{1*}

[摘要] 目的 研究结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) *embB*306 位点及其他突变位点与乙胺丁醇(ethambutol, EMB)的耐药表型及耐多药(multidrug resistant, MDR)的关系;分析 *embB* 基因突变与 EMB 药敏表型及 MDR 的关系。方法 对临床分离的 MTB 采用 BD MGIT 960 SIRE 试剂比例法进行药敏试验,取 48 株 EMB 耐药、46 株 EMB 敏感但耐其他药及 7 株四药均敏感 MTB 提取核酸并扩增 *embB* 基因全序列,对扩增产物进行测序分析 *embB* 基因序列,与 H37Rv 标准株序列比对,分析 *embB* 基因各突变位点、形式及频率。结果 101 株 MTB 发现 *embB* 基因序列上有 17 个不同位点突变形式。53 株 MTB 在 *embB* 基因序列上发生突变,其中 46 株为 EMB 耐药,7 株为 EMB 敏感;*embB* 基因野生型的 MTB 有 48 株,其中 2 株为 EMB 耐药,46 株为 EMB 敏感;*embB* 突变型与 *embB* 野生型的 MTB 之间 EMB 耐药率有显著性差异($\chi^2=68.95, P<0.01$)。101 株 MTB 中 MDR 有 51 株,其中有 42 株发生 *embB* 突变,9 株为 *embB* 基因野生型,*embB* 基因突变率在 MDR 和非 MDR 之间有显著性差异($\chi^2=36.9, P<0.01$)。结论 *embB*306 位点与 EMB 耐药及 MDR 中度相关,*embB* 基因突变与 EMB 耐药及耐多药结核菌(multidrug resistant-*Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB)高度相关,*embB* 基因突变可作为 MDR-TB 的检测分子标记物,指导临床用药。

[关键词] 结核分枝杆菌; *embB* 基因; 突变; 乙胺丁醇; 耐多药

Association between *embB* mutation and drug resistance and MDR in *Mycobacterium tuberculosis* for ethambutol

LIU Houming¹, ZENG Min², LI Quan², ZHAO Yanmin², ZOU Jing², LIN Mu¹, ZHAO Dan³, XIAO Yanyu¹, DENG Qunyi⁴, SHAN Wanshui^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong, China, 518112; 2. Beijing Genomics Institute-Shenzhen, Shenzhen, Guangdong, China, 518083; 3. Department of Clinical Laboratory, Luohu Chronic Disease Prevention and Cure Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518029; 4. Department of Tuberculosis, the Third People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong, China, 518112)

[ABSTRACT] Objective To determine *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) *embB*306 and other loci molecular mutations and their association with ethambutol (EMB) resistance phenotype and multidrug resistant (MDR); to determine molecular mutation in *embB* gene and its association with EMB resistance phenotype and MDR. Methods The drug sensitivity test was carried out using ratio method by BD 960 MGIT SIRE

基金项目:深圳市科技创新委员会基金(JCYJ2013040116479996, JCYJ20140411113637598);深圳市三名工程专项基金;深圳市科技研发资金(ZDSYS201504301534057)

作者单位:1. 深圳市第三人民医院检验科, 广东, 深圳 518112

2. 深圳华大基因研究院, 广东, 深圳 518083

3. 深圳市罗湖区慢性病防治院检验科, 广东, 深圳 518029

4. 深圳市第三人民医院肺病科, 广东, 深圳 518112

*通讯作者:单万水, E-mail:shanwanshui152@aliyun.com

reagent for clinical isolates of MTB, the DNA of 48 EMB resistance, 46 EMB sensitive but resistance to other drugs and 7 sensitive to four drugs of MTB were extracted and amplified *embB* gene sequence. The amplified products were then sequenced and analyzed the *embB* gene sequence of each MTB, compared with H37Rv standard strain in Genbank, the mutation sites, the form and the frequency of *embB* gene were analyzed.

Results 17 different mutant forms were found in 101 strains of MTB *embB* gene. 53 strains of MTB mutated in the *embB* gene, 46 strains of which were EMB resistant, 7 were EMB sensitive; 48 strains of MTB were wild type in the *embB* gene, 2 strains of which were EMB resistant, 46 were EMB sensitive. There were significant differences in the drug resistance positive rates of EMB between *embB* mutation and *embB* wild type ($\chi^2=68.95$, $P<0.01$). There were 51 strains MDR in 101 MTB, including 42 strains of *embB* mutation, and 9 strains of *embB* wildtype, the mutation rate of *embB* gene was significantly different between MDR and non-MDR ($\chi^2=36.9$, $P<0.01$). **Conclusion** *embB* 306 mutation is moderately related to EMB resistance in MTB, mutation of *embB* gene is highly associated with EMB resistance and MDR-TB, the *embB* gene can be used as a marker for the detection of MDR-TB, which could be used guideline for clinical drug use.

[KEY WORDS] *Mycobacterium tuberculosis*; *embB* gene; Mutation; Ethambutol; MDR

据世界卫生组织2013年调查数据显示,中国的结核病患者约为85.5万人,其中耐多药(multi-drug resistant, MDR)结核病患者约为5.4万人,我国的结核病和MDR结核病患病严重程度仅次于印度^[1],为世界第二大结核病和MDR结核病负担大国,控制耐药和MDR结核病的流行已经成为中国结防工作的迫切任务。

乙胺丁醇(ethambutol, EMB)是治疗结核病的一线用药之一,EMB作用于靶分子阿拉伯糖基转移酶,抑制了阿拉伯糖基聚合入阿拉伯半乳糖,从而影响MTB的细胞壁分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物的形成,发挥抑菌作用,使靶分子在细胞内的药物更容易进入细胞,使联合用药发挥协同作用^[2]。

目前大部分研究认为MTB耐EMB与阿拉伯糖基转移酶的编码基因*embABC*操纵子表达增高或突变有关,其中*embB*基因突变改变了阿拉伯糖基转移酶结构,从而引起耐药^[3]。Morkrouslv等^[4]对*embB306*与临床结核病的EMB耐药关系之间研究显示*embB*序列中306位点突变最常见(约48.3%的EMB耐药和32.5%的EMB敏感但耐其他一线药的MTB发生306位点突变),但是306位点以外的*embB*基因突变也可引起EMB耐药,如在耐EMB分离株中,还可以检测到如下基因位点突变:285Phe→Leu、330Phe→Val、630Thr→Ile等^[4-6],说明除306位点外还存在其他耐EMB MTB的基因突变位点。本研究对深圳市结核病患者分离的MTB *embB*基因全序列(3 297 bp)进行测序分析,期许发现更多与耐EMB相关的*embB*突变位点,

提高MTB的EMB药敏鉴定的准确性,可有效控制耐EMB结核病和MDR的流行。

1 材料与方法

1.1 研究对象

对2013年1月至2014年5月来院就诊结核病患者9 038份标本进行MTB的分离、培养和鉴定,共分离出MTB 2 243株,对其中865株进行BD MGIT 960 SIRE液体药敏试验,选取所有EMB耐药48株,占5.55%(48/865),取EMB敏感但耐其他药46株,4种药物全敏感7株,共计101株进行研究。

1.2 药物敏感性测定

使用在国际上作为MTB药物敏感性检测的“金标准”——比例法,严格按照BD MGIT 960 SIRE液体药敏试验操作说明书进行,利福平(rifampin, RFP)、异烟肼(isoniazide, INH)、EMB和链霉素(streptomycin, SM)药敏判读折点浓度分别为1 mg/L、0.1 mg/L、5 mg/L和1 mg/L,结果判读为耐药(R)或敏感(S)。本文MDR是指至少同时耐利福平和异烟肼,多耐药是指不同时耐利福平和异烟肼,但至少耐2种药。

1.3 核酸提取

取MTB培养阳性菌悬液1 mL,80℃灭活60 min,13 300 rpm离心10 min,弃上清;沉淀用1 mL生理盐水悬浮,13 300 rpm离心10 min,弃上清;重复上述步骤一次。沉淀加入50 μL去离子水,涡旋震荡混匀,干浴锅100℃×10 min,13 300 rpm离心10 min,离心后的上清即可作为PCR扩增模板。

1.4 目的基因扩增、测序及测序数据分析

将核酸提取物送至深圳华大基因研究院进行目的基因扩增测序及测序数据分析,根据 *M.tuberculosis* H37Rv 菌株的标准参考序列(GenBank accession no. NC_000962)设计 *embB* 基因全序列(3 297 bp)的 PCR 扩增引物,上游引物(5'-3')序列为 AATCAGGCTCCAGACGC,下游引物(5'-3')为 TACCGAGCAGCATAGGAG。PCR 反应条件:(1) 94℃, 1 min 预变性;(2) 94℃, 30 s 变性;(3) 58℃, 30 s 退火;(4) 72℃, 210 s 延伸;(5) 步骤(2)~(4)循环 30 次;(6) 72℃, 7 min;(7) 12℃, 保持。采用 Sanger 测序法对 *embB* 基因全序列进行测序,利用软件 DNASTar Lasergene 进行序列拼接和与 *embB* 基因标准序列的比对,分析突变位点。本研究对 *embB* 基因的核苷酸或氨基酸位点均采用大肠杆菌的编号系统进行描述。

1.5 统计学分析

统计学软件为 SPSS 19.0 分析数据,两组间的差异分析采用完全随机设计的两样本率比较(卡方检验), $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比例法液体药敏试验结果

入选的 101 株 MTB 标本比例法药敏试验,48 例 EMB 耐药和 53 例 EMB 敏感,其中 MDR 51 株,多重耐药 20 株,结果见表 1。

表 1 101 株 MTB 比例法药敏结果

Table 1 Results of drug sensitivity of 101 strains of MTB by ratio method

名称	EMB 耐药($n=48$)		EMB 敏感($n=53$)	
	R	S	R	S
利福平(RFP)	40	8	19	34
异烟肼(INH)	47	1	19	34
链霉素(SM)	40	8	38	15

2.2 基因测序及突变结果

本次研究发现 *embB* 序列上出现的基因突变位点一共有 17 个,已被录入 tbdreamdb 结核分枝杆菌基因数据库^[7]的突变位点有 306、406、534、328、497(Q→K, Q→R)和 1 024 位点。未被记录入 tbdreamdb MTB 基因数据库的突变位点有 113、201、246、319、330、354、405、573、521、609 和 679 位点以及 Q497P、Q497H 这 2 个碱基替换类型。

306 位点突变有 27 株菌,26 株 306 位点突变样本的药敏表型为 EMB 耐药,1 株 306 位点突变的 MTB 药敏为 EMB 敏感。497(Q→K, Q→H, Q→P)、406、328、354、330、319、405、1 024 和 521 位点突变的 MTB 药敏为 EMB 耐药。246、679、113 和 534 突变位点的 MTB 药敏为 EMB 敏感。201 和 306 位点在一个 MTB 上联合突变,其药敏为 EMB 耐药;609 和 330 位点在一个 MTB 上联合突变,其药敏为 EMB 敏感;246、497(Q→R)和 573 位点在一个 MTB 上联合突变,其药敏为 EMB 敏感。具体结果如表 2 所示。

2.3 基因突变与 EMB 药敏相关性分析

101 个检测样本中 53 株 MTB 发生 *embB* 基因突变,其中 46 株 *embB* 基因突变为 EMB 耐药,占 86.8%(46/53),7 株 *embB* 基因突变为 EMB 敏感,占 13.2%(7/53);48 株 *embB* 基因野生型 MTB 中耐 EMB 的只有 2 株,*embB* 基因野生型 MTB 的 EMB 耐药率为 4.2%(2/48),46 株 *embB* 基因野生型 MTB 为 EMB 敏感菌株。*embB* 基因突变型与 *embB* 基因野生型 MTB 的 EMB 耐药率进行比较,有统计学意义,二者有显著性差异,*embB* 突变型 MTB 的 EMB 耐药率明显比 *embB* 野生型 MTB 的 EMB 耐药率高。详细结果见表 3。

2.4 基因突变与 MDR-TB 相关性分析

根据表 4,101 个样本中 MDR-TB 一共有 51 株,其中 *embB* 基因突变型的 MDR-TB 有 42 株,占 82.3%(42/51);*embB* 基因野生型的 MDR-TB 有 9 株,占 17.6%(9/51)。MDR-TB 在 *embB* 基因突变型和 *embB* 基因野生型之间进行比较,有统计学意义,二者有显著性差异,*embB* 基因突变率 MDR-TB 较非 MDR-TB 更高。详细结果见表 5。

3 讨论

embB 基因突变与 MTB 的 EMB 药敏表型及 MDR 的关系:吴雪琼等^[2,5]相关研究发现 36%~69%的 MTB 耐 EMB 分离株有 *embB* 基因突变,本次研究深圳市 MTB 基因检测结果显示耐 EMB 的 MTB 分离株中 *embB* 基因突变检出率为 95.8%(46/48),深圳市 MTB 耐 EMB 的 *embB* 基因突变率更高。*embB* 基因突变型与野生型 EMB 耐药率有统计学意义,*embB* 基因突变型比野生型 EMB 耐药率明显增高,提示 *embB* 基因突变与 EMB 耐药密切相关,与大多数研究文献的结论一

表2 *embB* 各突变位点的氨基酸改变与 MTB 药敏结果分析

Table 2 Analysis of amino acid change and MTB drug sensitivity of *embB* in different mutation sites

基因位点	碱基替换	氨基酸改变	样本数	TB 数据库	EMB 药敏结果	MDR/一种以上耐药/全敏感
embB306	ATG->GTG	M306V	13	Y	R(其中一个药敏S)	9MDR、4一种以上耐药
	ATG->ATC	M306I	2	Y	R	2MDR
	ATG->ATA	M306I	7	Y	R	6MDR、1一种以上耐药
	ATG->CTG	M306L	1	Y	R	1MDR
[embB306、	ATG->GTG	M306V		Y		
embB534、	GAC->GAT	D534D	2	同义突变	R	2MDR
embB497]	CAG->CCG	Q497P		N		
[embB306、	ATG->GTG	M306V		Y		
embB201]	GCG->TCG	A201S	1	N	R	1MDR
[embB306、	ATG->ATA	M306I		Y		
embB406]	GGC->GCC	G406A	1	Y	R	1MDR
embB406	GGC->GAC	G406D	1	Y	R	1MDR
	GGC->GCC	G406A	2	Y	R	1MDR、1一种以上耐药
embB246	GGC->CGC	G246R	1	N	S	1全敏感
embB521	GAG->GCG	E521A	2	N	R	2一种以上耐药
embB534	GAC->GAT	D534D	2	同义突变	S	1一种以上耐药、1全敏感
embB354	GAC->GCC	D354A	1	N	R	1MDR
[embB354、	GAC->GCC	D354A		N		
embB534]	GAC->GAT	D534D	1	同义突变	R	1MDR
embB328	GAT->TAT	D328Y	2	Y	R	2MDR
	GAT->GGT	D328G	1	Y	R	1MDR
[embB328、	GAT->GGT	D328G		Y		
embB406]	GGC->GCC	G406A	1	Y	R	1MDR
embB113	GCG->GTG	A113V	1	N	S	MDR
embB679	GCC->ACC	A679T	1	N	S	MDR
embB1024	GAC->AAC	D1024N	1	Y	R	1MDR
embB497	CAG->AAG	Q497K	1	Y	R	1MDR
	CAG->CGG	Q497R	1	Y	R	1MDR
[embB534、	GAC->GAT	D534D		同义突变		
embB497]	GAC->GAT	Q497H	1	N	R	1MDR
embB405	GAG->GAC	E405D	1	N	R	1MDR
embB330	TTC->TCC	F330S	1	N	R	1MDR
[embB330、	TTC->ATC	F330I		N		
embB609]	CTG->CGG	L609R	1	N	R	1MDR
embB319	TAT->CAT	Y319H	1	N	R	1MDR
	TAT->TCT	Y319S	1	N	R	1MDR
[embB246、	GGC->CGC	G246R		N		
embB497、	CAG->CGG	Q497R	1	Y	S	1一种以上耐药
embB573]	CGG->TGG	R573W		N		

氨基酸使用一字母缩写;TB 数据库为 tbdreamdb 数据库^[7],Y 代表数据库中已报道位点,N 代表数据库中未报道位点(查询日期为 2015 年 10 月 9 日);EMB 药敏结果 R 为耐药,S 为敏感;MDR 为耐多药结核分枝杆菌(至少对 RFP 和 INH 耐药),一种以上耐药为对 1 种以上的抗结核药物耐药(但不包括同时耐异烟肼、利福平),全敏感为结核杆菌对 4 种一线抗痨药(RFP、INH、EMB 和 SM)敏感

致^[5, 8-12]。因此笔者认为 MTB 发生 *embB* 基因突变与深圳地区的 MTB 耐 EMB 高度相关。

Ramaswamy 等^[12]和 Shi 等^[13]文献指出 *embB* 基因突变可能是 MDR 流行的原因之一。本研究中,MDR-TB 在 *embB* 基因突变型与野生型之间比较有统计学意义,*embB* 基因突变型 MTB MDR 率明显

比野生型的 MTB MDR 率要高,提示 *embB* 基因突变与 MDR 之间高度相关。Shi 等^[13]在研究河南的结核病 *embB* 基因突变特征中发现 138 株 MDR 中 119 株 MDR 检测到 *embB* 突变,突变率为 86.2% (119/138),与本研究结果相似,因此,我们认为 *embB* 基因突变可能是深圳市 MDR-TB 流行的主要

表3 *embB* 基因突变型与 *embB* 基因野生型的 MTB 的 EMB 耐药对比分析(株)Table 3 Analysis of drug resistance of EMB between *embB* gene mutation and wild type in MTB(strains)

	EMB 耐药	EMB 敏感	合计	χ^2	df	P 值
<i>embB</i> 基因突变型	46	7	53	68.95	1	<0.01
<i>embB</i> 基因野生型	2	46	48			
合计	48	53	101			

采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,两组间的差异分析采用完全随机设计的两样本率比较(卡方检验), $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义,df 为自由度

表4 MDR-TB 药敏情况统计

Table 4 Results of MDR-TB drug sensitivity

基因突变位点	EMB 耐药的 <i>embB</i> 基因突变型 MDR-TB			EMB 敏感的 <i>embB</i> 基因突变型 MDR-TB			<i>embB</i> 基因野生型的 MDR-TB			
	RFP、INH	RFP、INH、 EMB、SM	合计	RFP、INH	RFP、INH、 SM	合计	RFP、 INH	RFP、INH、 SM	RFP、INH、 EMB、SM	合计
<i>embB306</i>	3	18	21		1	1				
<i>embB497</i>	1	2	3							
<i>embB406</i>		3	3							
<i>embB405</i>		1	1							
<i>embB328</i>		3	3							
<i>embB330</i>		2	2							
<i>embB319</i>		2	2							
<i>embB246</i>										
<i>embB534</i>					1	1				
<i>embB573</i>										
<i>embB679</i>				1		1				
<i>embB113</i>				1		1				
<i>embB201</i>										
<i>embB354</i>	1	1	2							
<i>embB1024</i>	1		1							
<i>embB521</i>										
<i>embB609</i>										
none							3	5	1	9
合计	6	32	38	2	2	4	3	5	1	9

与 *embB306* 位点共同突变的 MDR-TB 都统计到 *embB306* 的数据中; *embB328* 与 *embB406* 共同突变的 MDR-TB 统计到 *embB406* 的数据中; *embB330* 与 *embB609* 共同突变的 MDR 统计到 *embB330* 的数据中

原因之一, *embB* 基因突变的检出可以有效预测深圳市结核病的 MDR 情况。在尚未发现明确的 MDR 检测分子标记物之前,笔者认为 *embB* 基因突变可作为诊断 MDR-TB 的检测分子标记物。

embB306 位点突变与 MTB 的 EMB 药敏表型及 MDR 的关系:近年来有大量的文献和研究表明发生 *embB* 突变的 EMB 耐药 MTB 中约有 27%~87% 的突变发生在 306 位点上^[8-9, 14-15], 本研究中, 306 位点突变菌株为 27 株, 占 *embB* 基因突变位点样本的 49.3% (27/53), 证实了 *embB306* 突变确实与 MTB 耐 EMB 有关, 但并不能认为 *embB306* 位点突变直接导致 MTB 耐 EMB^[13, 15-17]。本研究单独检测 *embB306* 突变诊断 MTB 对 EMB 耐药灵敏

度 54.2% (26/48), 通过检测 *embB* 基因所有突变位点, 可以提高灵敏度至 95.8% (46/48), 这提示 *embB* 基因多个位点均可能参与了 MTB 的 EMB 耐药发生, 与 Shi 等^[13] 的研究结论一致。306 位点突变检测 EMB 耐药性在临床应用上有一定的局限性, 但该位点是目前 MTB 耐 EMB 的最高频突变位点。本研究被检测到 *embB306* 位点突变的 MTB 的 EMB 耐药率 96.3% (26/27), 特异度 98.1% (52/53), 306 位点的检出提示该菌株对 EMB 耐药中度相关。*embB* 基因突变检测和 306 位点检测都可用于临床 MTB 的 EMB 耐药的预测, *embB* 基因检测与 306 位点检测联合应用可提高诊断的灵敏度和特异度, 可使 MTB 的 EMB 药敏结果更准确

表5 *embB* 基因突变型与 *embB* 基因野生型的 MDR-TB 情况对比分析(单位:株)Table 5 Analysis of MDR-TB between *embB* gene mutation and wild type(strains)

	MDR-TB	非 MDR-TB	合计	χ^2	df	P 值
<i>embB</i> 基因突变型	42	11	53	36.9	1	<0.01
<i>embB</i> 基因野生型	9	39	48			
合计	51	50	101			

采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,两组间的差异分析采用完全随机设计的两样本率比较(卡方检验), $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义,df 为自由度

可靠。

Safi 等^[18]的研究以及在笔者^[19]以前研究的 *embB306* 位点与 MDR 相关性结论认为 *embB306* 不仅与 EMB 耐药相关,与其他 3 种一线药物 RFP、INH 和 SM 也有相关,本研究 *embB306* 位点突变 MTB 的 MDR 率为 81.5%(22/27),*embB306* 位点与 MDR 相关。张楠等^[20]研究认为 306 位点可以作为 MDR-TB 的检测分子标志物,本研究结果显示 MTB 发生 *embB306* 位点突变的 MDR 率为 43.1%(22/51),306 位点诊断 MDR-TB 的灵敏度较低,因此,我们认为 306 位点作为 MDR-TB 的检测分子标志物可靠性一般;发生 *embB* 基因突变的 MDR 率为 82.3%(42/51),306 位点与其他突变位点联合应用可提高 MDR 检测方法的灵敏度,306 位点是 *embB* 基因上与 MDR-TB 相关的一个重要的突变位点在实验室诊断 EMB 耐药和 MDR-TB 中有较高的参考价值。

embB406 和 497 位点突变与 MTB 的 EMB 药敏表型及 MDR 的关系:有相关研究表明 406 和 497 位点是除 306 位点以外在 *embB* 基因上被发现最多的 2 个突变位点^[15],本研究结果与上述研究一致。本研究 *embB406* 位点突变株 EMB 耐药率为 100%(5/5),MDR 率为 80%(4/5);*embB497* 突变株 EMB 耐药率为 83.3%(5/6),MDR 率为 83.3%(5/6)。406 和 497 位点的 EMB 耐药率和 MDR 率相当高,近年来越来越多的研究显示 406 和 497 位点与 EMB 耐药相关^[13, 15, 21-25],406 位点或 497 位点发生突变会导致 MTB 对 EMB 低浓度耐药^[23],因此笔者认为 406 位点和 497 位点突变与 EMB 耐药高度相关,406 位点、497 位点和 306 位点都是诊断 MTB 耐 EMB 的重要检测突变位点。

Xu 等^[15]研究认为 EMB 耐药的 MTB 突变发生在 406 或 497 位点上的均为 MDR-TB,本研究结果与上述结论不完全相符,但多个研究显示在 MDR-TB 中检测到 406 或 497 位点突变的频率在 5%~

15%之间^[13, 15, 22, 24],我们的结果与之相符。笔者认为 *emb406* 和 *embB497* 突变位点与 MDR-TB 耐一线药相关,是除了 306 位点以外的另外 2 个与 MDR-TB 相关的重要 *embB* 突变位点,可应用于临床诊断 MTB 的 EMB 耐药和 MDR 相关性的预测。

embB328、354 和 1024 位点突变与 MTB 的 EMB 药敏表型及 MDR 的关系:*embB328*、354 这 4 个突变位点都被记录入 tbdreamdb 数据库,4 个位点突变的 MTB 药敏结果都是 EMB 耐药,相关的研究显示 *embB328*^[13, 15, 21, 24, 26]、354^[13, 15, 21, 26] 和 1024^[13, 21] 位点都是在耐 EMB 的 MTB 被检测到。本研究中,*embB328* 位点突变的 MTB 有 4 个,*embB354* 位点突变的 MTB 有 2 个,*embB1024* 位点突变的 MTB 只有 1 个,这些突变的样本都是 MDR-TB,且都是耐 EMB 的 MTB,笔者认为他们与 MTB 对 EMB 耐药及 MDR-TB 相关。单独检测一个 *embB306* 基因位点耐 EMB 的灵敏度为 54.2%(26/48),联合 306、406、497、328、354 和 1024 位点可提高灵敏度至 81.3%(39/48),*embB328*、354 和 1024 位点可应用于预测 MTB 耐 EMB 和 MDR 相关性,为实验室建立 EMB 耐药检测方法提供了理论依据。

embB405、521、330、319、534、246、113、679、201、609 和 573 位点突变与 MTB 的 EMB 药敏表型及 MDR 的关系:以上突变位点突变株较少,突变位点未被记录入 tbdreamdb 数据库,或虽有记录入 tbdreamdb 数据库,但相关文献^[13-15, 21-24, 27]研究没有指出其突变与 EMB 药敏表型及 MDR 的关系,结合本研究,尚不能确定以上突变位点与 MTB 的 EMB 耐药及 MDR 之间的关系。

综上所述,*embB306* 位点与 EMB 耐药及 MDR 中度相关,306 位点突变检测 EMB 耐药和 MDR 在临床应用上有一定的局限性,与其它位点如 *embB406*、497 联合应用可提高检测方法的灵敏度,在实验室诊断 EMB 耐药和 MDR-TB 中有较高的参

考价值。*embB* 基因突变与 EMB 耐药及 MDR 高度相关, *embB* 基因突变可作为 MDR-TB 的检测分子标记物。*embB* 基因 *embB306*、497、406、328、354、1024、319、330、405 和 521 位点突变与 EMB 耐药相关, 认为 *embB* 基因序列上 900~1500 位点之间是高频突变区, 与 Shi 等^[13] 的研究一致, 该序列区域发生突变与 EMB 耐药高度相关, 我们将其命名为 EMB 耐药决定区域 (ethambutol resistance determining region, ERDR), 为实验室建立快速诊断 MTB 的 EMB 耐药性和 MDR 的检测方法提供了理论依据, 为临床对 EMB 耐药 MTB 感染的治疗具有指导意义。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report [R]. 2013.
- [2] 吴雪琼, 张钟德, 乐军. 分枝杆菌分子生物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:131-132.
- [3] 熊礼宽. 结核病实验室诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:65.
- [4] Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, et al. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolate of *mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3810-3813.
- [5] 吴雪琼, 梁建琴, 李洪敏, 等. 结核杆菌耐乙胺丁醇分离株 *embB* 基因突变的研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(4):214-216.
- [6] Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, et al. Mutations at *embB* codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(3):1061-1066.
- [7] Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, et al. Tuberculosis drug resistance mutation database [J]. Plos Med, 2009, 6(2):132-136.
- [8] Zofia B, Agnieszka N, Jacek B, et al. Mutations in the *embB* gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant *mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland [J]. BioMed Research International, 2013, 2013:167954.
- [9] Sreenatsan S, Stockbauer KE, Pan X, et al. Ethambutol resistance in *mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(8):1677-1681.
- [10] Lee AS, Othman SN, Ho YM, et al. Novel mutations within the *embB* gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(11):4447-4449.
- [11] Zhang N, Torrelles JB, McNeil MR, et al. The Emb proteins of *mycobacteria* direct arabinosylation of lipopolysaccharide and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region [J]. Mol Microbiol, 2003, 50(1):69-76.
- [12] Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2):326-336.
- [13] Shi D, Li L, Zhao Y, et al. Characteristics of *embB* mutations in multidrug-resistant *mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(10):2240-2247.
- [14] Cheng S, Cui ZL, Li YY, et al. Diagnostic accuracy of a molecular drug susceptibility testing method for the antituberculosis drug ethambutol: a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 2913-2924.
- [15] Xu YH, Jia HY, Huang HR, et al. Mutations found in *embCAB*, *embR*, and *ubiA* Genes of ethambutol-sensitive and -resistant *mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China [J]. BioMed Research International, 2015, 2015:951706.
- [16] 丁海榕, 秦川, 占玲俊. 部分抗结核分枝杆菌药物的耐药机理研究进展 [J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(8): 615-620.
- [17] 丁冰冰, 马骏, 陈高瞻, 等. 武汉地区结核分枝杆菌临床分离株乙胺丁醇耐药分子特征研究 [J]. 武汉工业学院学报, 2013, 32(2):13-17.
- [18] Safi H, Sayers B, Hazbon MH, et al. Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(6): 2027-2034.
- [19] 刘厚明, 肖颜玉, 李天品, 等. 结核分枝杆菌 *embB* 基因 306 位点与乙胺丁醇药敏表型与耐多药关系的研 [J]. 热带医学杂志, 2015, 15(6):731-734.
- [20] 张楠, 胡继红, 万康林. 乙胺丁醇耐药表型与耐药基因 *embB* 突变的关系 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3):490-492, 571.
- [21] Ali A, Hasan Z, McNerney R, et al. Whole genome sequencing based characterization of extensively drug-resistant *mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan [J]. Plos One, 2015, 10(2):e0117771.
- [22] Elba G, Dihadenys L, Sergio Y, et al. Association between *embB* mutations and ethambutol resistance in *mycobacterium tuberculosis* isolates from Cuba and the Dominican Republic: reproducible patterns and problems [J]. Revista Argentina de Microbiología, 2013, 45(1):21-26.

(下转第 32 页)

· 论 著 ·

肺癌患者 *EGFR* 及 *KRAS* 基因突变检测方法的建立和临床应用

张洁明¹ 杨学习^{2*}

[摘要] 目的 本研究拟在评估二代测序(next generation sequencing, NGS)技术在肺癌临床分子诊断中应用的可行性。方法 本研究选取108例肺癌石蜡包埋样本(formalin fixed paraffin embedded, FFPE), 同时进行一代测序(sanger sequencing)和NGS检测样本中*EGFR*和*KRAS*基因的突变情况。结果 在108例肺癌样本中, 一代测序检出突变在二代测序中均检出, 另外NGS还检测出目标区域外其他突变。结论 NGS的检测准确性可达到100%。NGS可以应用于肺癌临床分子诊断, 同时NGS能给临床提供更详细的基因突变信息, 为分子靶向治疗提供依据, 更具有市场潜力及应用前景。

[关键词] 二代测序; 肺癌; *EGFR*; *KRAS*

A new method of gene mutation status detection on *EGFR* and *KRAS* of lung cancer patients and the assessment of clinical application

ZHANG Jieming¹, YANG Xuexi^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., LTD., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. Institute of Antibody Engineering, School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective The feasibility of application of next generation sequencing (NGS) technology in clinical molecular diagnosis of lung cancer was evaluated in this study. Methods In this study, the variants of the *EGFR* and *KRAS* genes from 108 paraffin-embedded tissues of lung cancer were detected by both Sanger sequencing and NGS. The variants detected by Sanger sequencing were as also detected by NGS. Results In 108 cases, NGS detected all the mutations which sanger sequencing detected. In addition, NGS also detected other gene mutation status that Sanger sequencing missed. Conclusion The detection accuracy of NGS could reach 100%. NGS could be used in clinical diagnosis of lung cancer, and NGS can provide more detailed gene mutation information for clinical diagnosis, which provides the basis for molecular targeted therapy. Moreover NGS also has the market potential and application prospects.

[KEY WORDS] Next generation sequencing; Lung cancer; *EGFR*; *KRAS*

肺癌是世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1-2], 同时其也是我国发病率及致死率最高的癌症。近年来, 分子靶向药物因其特异、高效、副作用小的特点而得到了广泛推广和临床应用。但由于肿瘤异质性产生药物敏感性差异, 在给予靶

向治疗前, 需确认特定靶点基因的状态, 从而评估每位患者对特定药物的敏感性和毒副反应的大小, 有针对性地使用抗癌药物^[3]。

肺癌靶向药物治疗的相关基因包括*EGFR*和*KRAS*^[4-5], 其突变状态的检查在临床治疗中的意义

基金项目: 广东省科技计划项目应用型专项资金(2015B020233009)

作者单位: 1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院抗体工程研究所, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 杨学习, E-mail: yxxzb@sohu.com

日益凸显。目前常规分子病理检测方法是采用实时荧光定量核酸扩增检测(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)技术或一代测序技术。qPCR技术对单个基因已知突变进行定性和定量检测,一代测序可以测定单个基因指定突变位点的附近序列(限于单个外显子)。但以上方法仅限于已知突变,且通量低(一般一个反应只能检测一个突变或一个外显子)、灵敏度低,难以检出样本中低丰度突变及未知突变。

第二代测序具有高通量、自动化、低成本的特征,它能在很短的时间内完成对上百亿碱基的测序,满足极短时间内对基因组进行高分辨率的检测的要求^[6],它能够一次检测多个基因的多个突变热点附近的序列,从而同时鉴别出已知和未知的突变类型,节省肿瘤样本DNA用量,检测性价比高^[7-8]。本研究采用Ion Torrent测序法测定肺癌患者石蜡包埋组织样本EGFR和KRAS基因突变情况。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit 购自德国 Qia-gen 公司; Ion Ampliseq™ library kit 2.0, Ion PI™ Template OT2 Kit v3, Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit 均购自美国 Life Technology 公司; Nuclease-Free Water 购自美国 Life Technologies 公司; 无水乙醇(分析纯)购自广州化学试剂厂; 基因测序仪(DA8600)由中山大学达安基因股份有限公司提供; ABI 3500 由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.2 研究对象

随机选取2013年至2015年间宁波市第二医院在病理学上确诊为非小细胞肺癌的石蜡包埋组织样本108例。男性患者58例,女性患者50例,年龄在35岁到88岁之间。研究经医院医学伦理会审核批准,患者签署知情同意书。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA提取

使用QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit提取石蜡包埋组织样本DNA。通过脱蜡,溶解细胞,吸附DNA,除杂等步骤获取DNA。

1.3.2 二代测序

二代测序有4个步骤,分别是基因组DNA提取,文库构建,上机测序和生物信息学分析,具体内容见图1。根据测序需要,使用Ion Ampliseq™ li-

brary kit 2.0将提取的DNA构建成文库DNA。PCR特异性扩增目的片段,在DNA片段两端加上通用测序接头,PCR扩增文库DNA,磁珠纯化去除杂质。建库后使用核酸定量仪测定文库DNA的浓度。PI芯片一次上机测序能得到的数据在10 G左右,根据每个样本测序数据需求量和测序深度确定混样个数,混合样本,再测定混样后DNA浓度,稀释到200 pmol/μL,取800 pmolDNA做模板制备。稀释倍数公式如下。使用Ion PI™ Template OT2 Kit v3制备测序模板。在PCR反应体系中加入文库DNA和模板载体,油包水PCR,富集测序模板去除杂质及扩增失败的测序模板。使用Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit在基因测序仪(DA8600)上测序。初始化测序仪,测序模板loading入测序芯片,上机测序。

稀释倍数 = Qubit 浓度 (ng/μL) × 10⁷ / (200 × 660 × 2)。

1.3.3 二代测序数据分析

上机测序数据通过Torrent source进行后续信息分析。运行Variant Caller和Coverage Analysis插件,得到样本的分析结果。点击“筛选”,在“检测结果”选项中,筛选保留“杂合突变”和“纯合突变”,当“突变频率”值≥5%时,检测结果为相应基因突变型别;“突变频率”值<5%时,检测结果为相应基因位点野生型。在“突变热点”选项中显示“Hotspot”的

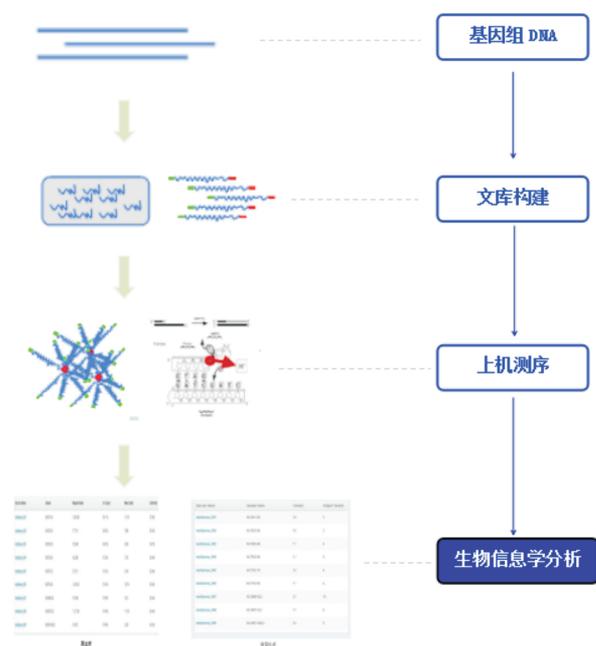


图1 二代测序流程图

Figure 1 Progress of NGS

基因突变为常见突变,其指示的 COSMIC ID 可以在 COSM 网站获取相应的基因突变信息;在“突变热点”选项中显示“Novel”的基因突变为罕见突变或新突变。Coverage Analysis 可显示“测序深度”及“覆盖度”,评估测序质量。按照上述方法,对收集的石蜡包埋组织样本进行 *EGFR* 和 *KRAS* 基因测序。

1.3.4 一代测序

108 例 FFPE 样本使用一代测序方法进行检测(本实验室自行检测),结果作为对照。使用步骤 1.3.1 提取的 DNA,进行 PCR 对目的片段扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增效果,对扩增产物纯化,测序反应体系配置,测序反应前扩增,使用达瑞生物购置的 ABI 3500 一代测序仪进行测序。

1.3.5 一代测序数据分析

搜索待测突变区域前序列,比对基因序列,若同时具有突变碱基峰,则为杂合突变;若只出现野生碱基峰,则为野生型;若只出现突变碱基峰,则为纯合突变。

2 结果

2.1 测序结果

本次研究收集 108 例肺癌组织样本,二代测序结果显示 *EGFR* 基因野生型 87 例,*EGFR* 基因突变型共 21 例,其中 L858R 突变有 15 例, E746_A750del/ELREA 突变有 3 例, L747-T751del、V769_D770insASV 均只有 1 例,双突变 G719S 及 S768I 有 1 例。*KRAS* 基因突变情况,*KRAS* 基因野生型 75 例,*KRAS* 基因突变型共 33 例,其中 Gly12Asp 突变有 15 例, Gly12Cys 突变有 5 例,

Gly12Val 突变有 4 例, Gly13Asp 突变有 4 例, Gly12Ala 突变有 2 例, Gly12Ser、Gly12Arg 均有 1 例,双突变 Gly12Asp 及 Gly12Cys 有 1 例。

针对 *EGFR* 第 18~21 号外显子、*KRAS* 第 2 号外显子进行一代测序。结果显示 *EGFR* 基因野生型 87 例,*EGFR* 基因突变型共 21 例,其中 L858R 突变有 15 例, E746_A750del/ELREA 突变有 3 例, L747-T751del、V769_D770insASV 均只有 1 例,双突变 G719S 及 S768I 有 1 例。*KRAS* 基因野生型 75 例,*KRAS* 基因突变型共 33 例,其中 Gly12Asp 突变有 15 例, Gly12Cys 突变有 5 例, Gly12Val 突变有 4 例, Gly13Asp 突变有 4 例, Gly12Ala 突变有 2 例, Gly12Ser、Gly12Arg 均有 1 例,双突变 Gly12Asp 及 Gly12Cys 有 1 例。检测结果见表 1,文章篇幅有限仅展现 10 例样本。

2.2 2 种测序方法结果对比

比对一代测序结果,一代测序检出突变二代测序均有检出。*EGFR* 基因检测 2 种方法均为阳性共 21 例,两种方法均为阴性 87 例,一代测序阳性二代测序阴性共 0 例,一代测序阴性二代测序阳性共 0 例。敏感性即二代测序检出突变病例占对照组检出突变病例的比例,又称真阳性率。特异性指二代测序检出无突变病例占对照组未检出突变总数的比例,又称真阴性率。准确性指真阳性和真阴性占总样本数的比例。二者检测结果一致,灵敏性、特异性、准确性均为 100%。*KRAS* 基因检测两种方法均为阳性共 33 例,2 种方法均为阴性 75 例,一代测序阳性二代测序阴性共 0 例,一代测序阴性二代测序阳性共 0 例。二者检测结果一致,灵敏性、特异性、准确性均为 100%。

表 1 测序检测结果

Table 1 Sequencing results in detail

样本名	二代测序突变	二代测序突变类型	COSMIC ID	一代测序突变	一代测序突变类型
NBE1	野生型	野生型	-	野生型	野生型
NBE2	野生型	野生型	-	野生型	野生型
NBE3	L858R	2573 T > G	COSM6224	L858R	2573 T > G
NBE4	Gly12Ala	35G > C	COSM522	Gly12Ala	35G > C
NBE6	野生型	野生型	-	野生型	野生型
NBE7	野生型	野生型	-	野生型	野生型
NBE9	E746-A750del(1)	2235-2249 del 15	COSM6223	E746-A750del(1)	2235-2249 del 15
NBE10	Gly13Asp	38G > A	COSM532	Gly13Asp	38G > A
NBE12	野生型	野生型	-	野生型	野生型
NBE15	野生型	野生型	-	L858R	野生型

表2 二代测序检测结果

Table 2 NGS results in detail

	染色体	位置	参考碱基	突变碱基	突变类型	频率	突变热点	COSMIC号	基因
NBE1	chr1	162741794	C	T	Heterozygous	55.6	Novel	-	ON_DDR2_5
	chr4	1807894	G	A	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_FGFR3_3
	chr7	55228053	A	T	Homozygous	100	Novel	-	ON_EGFR_2A
	chr17	7577548	C	T	Heterozygous	49.9	Hotspot	COSM6932	CHP2_TP53_6
NBE2	chr1	162741794	C	T	Heterozygous	48.1	Novel	-	ON_DDR2_5
	chr2	212812097	T	C	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_ERBB4_1
	chr4	1807894	G	A	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_FGFR3_3
	chr7	55228053	A	T	Homozygous	100	Novel	-	ON_EGFR_2A
	chr17	7577547	C	A	Heterozygous	44.6	Hotspot	COSM11196	CHP2_TP53_6
	chr17	7579472	G	C	Heterozygous	67.3	Novel	-	CHP2_TP53_2
NBE3	chr2	212812097	T	C	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_ERBB4_1
	chr4	1807894	G	A	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_FGFR3_3
	chr7	55228053	A	T	Homozygous	100	Novel	-	ON_EGFR_2A
	chr7	55259515	T	G	Heterozygous	46.3	Hotspot	COSM6224	CHP2_EGFR_8
	chr17	7578190	T	C	Heterozygous	36.2	Hotspot	COSM10758	CHP2_TP53_5
	chr17	7579472	G	C	Heterozygous	95.2	Novel	-	CHP2_TP53_2
NBE4	chr4	1807894	G	A	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_FGFR3_3
	chr7	55228053	A	T	Homozygous	100	Novel	-	ON_EGFR_2A
	chr7	140481402	C	T	Heterozygous	1.9	Hotspot	COSM461	CHP2_BRAF_1
	chr10	89624218	C	G	Heterozygous	48.7	Hotspot	COSM5915	CHP2_PTEN_1
	chr12	25398284	C	G	Heterozygous	36.9	Hotspot	COSM522	CHP2_KRAS_1
	chr17	7577538	C	T	Heterozygous	2.3	Hotspot	COSM10662	CHP2_TP53_6
	chr17	7579472	G	C	Heterozygous	95.8	Novel	-	CHP2_TP53_2
	chr17	7579472	G	C	Heterozygous	95.8	Novel	-	CHP2_TP53_2
NBE6	chr1	162741794	C	T	Heterozygous	49.9	Novel	-	ON_DDR2_5
	chr2	212812097	T	C	Heterozygous	64.5	Novel	-	CHP2_ERBB4_1
	chr3	41266137	C	T	Heterozygous	58	Hotspot	COSM5667	CHP2_CTNNB1_1
	chr3	178952085	A	G	Heterozygous	30.8	Hotspot	COSM775	CHP2_PIK3CA_10
	chr4	1807894	G	A	Homozygous	100	Novel	-	CHP2_FGFR3_3
	chr7	55228053	A	T	Homozygous	100	Novel	-	ON_EGFR_2A
	chr7	140453155	C	T	Heterozygous	26.4	Hotspot	COSM27639	CHP2_BRAF_2
	chr17	7578401	G	T	Heterozygous	6.8	Novel	-	CHP2_TP53_4
	chr17	7579472	G	C	Heterozygous	95	Novel	-	CHP2_TP53_2
	chr17	7579473	G	C	Heterozygous	3.7	Novel	-	CHP2_TP53_2
	chr17	7579473	G	C	Heterozygous	3.7	Novel	-	CHP2_TP53_2

2.3 二代测序灵敏性

二代测序还检测出其他突变,这些都是在二代测序检测位点外或突变频率较低的突变。表2为其中5例样本的检测结果。

3 讨论

本次实验检测2个基因6个外显子上的突变情况,其中EGFR基因第18~21号外显子、KRAS基因第2,3号外显子。实验中108例样本二代测序结果与一代测序目标检测区域结果相符。另外,二代测序还检测出样本存在其他基因突变,如TP53、PTEN、CTNNB1、PIK3CA、BRAF。二代测序技术具有高通量的特点,能一次检测多个基因的多个位点,节省样

本DNA用量,仅需少量样本即可检测大部分基因突变情况,减少采集样本的难度及降低患者痛苦。一代测序可检测单个基因突变位点附近的全部序列,但通量低(一般单个测序反应只能检测单个外显子),只能对突变位点进行定性检测而不能定量检测,且其检测灵敏度不及二代测序,难以检出样本中低丰度突变,当某一外显子存在多种突变时,一代测序的峰图易受干扰,难以判断突变类型,所以一代测序难以将复杂突变样本准确检出其突变型。二代测序可以节省大量检测时间,特别是需要同时检测多个基因的情况下,更快得到检测结果,及时进行治疗。另外,二代测序还可以发现其他基因上的突变,可以为临床医生提供更多的信息,更利于治疗药物

的选择;还可以发现新的肺癌相关基因。二代测序与一代测序检测结果高度一致,二代测序在检测时间和检测通量上比一代测序更有优势,更能满足目前临床检测及科研实验的需求。

研究发现,在非小细胞肿瘤个体化用药指导治疗中,及时了解癌变组织基因突变状态至关重要。根据自身情况使用相应的治疗药物可以有效地控制病情的发展^[9-10]。根据2014年美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)的《非小细胞肺癌临床实践指南(中国版)》, *KRAS*突变和*EGFR*-TKI内源性耐药有关,*KRAS*野生型患者建议接受*EGFR*-TKI治疗^[10]。目前化疗药物对癌症细胞针对性弱,部分患者本身基因存在突变对药物产生耐性,并且化疗药物副作用大,疗程长,治疗效果不明显。靶向治疗药物针对性强,副作用低,通过测序检测患者基因突变状态有利于医生选择治疗药物,及时控制病情,降低患者痛苦和负担。本次检测出*EGFR*突变型21例,*KRAS*野生型75例,这些患者对TKI敏感,建议使用吉非替尼、厄洛替尼、尼洛替尼等药物治疗。基因检测可以及时了解患者基因突变情况,为临床用药提供指导,实现个性化用药。本次检测仅针对肺癌相关基因*EGFR*和*KRAS*,但二代测序可以同时检测多个基因,如*NRAS*、*BRAF*、*TP53*等。*NRAS*突变存在于造血系统的恶性肿瘤^[11],在急性粒细胞白血病及骨髓异常增生综合征中*NRAS*突变率为25%。*BRAF*突变存在于结直肠癌和黑色素瘤^[12]。*KRAS*突变也发生在胰腺癌和结直肠癌中^[13-14]。大部分甲状腺癌存在3种癌基因(*KRAS*、*HRAS*、*NRAS*)的突变^[15]。*TP53*突变存在于多种癌症当中。癌症发生并不局限于单个基因,而某个基因突变也可能存在于多种癌症^[16]。二代测序不局限于肺癌临床检测,也可以应用于其他癌症当中,二代测序具有强大的发展潜力和市场前景。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [3] Bennett EA, Massilani D, Lizzo G, et al. Library construction for ancient genomics: Single strand or double strand? [J]. *Biotechniques*, 2014, 56(6):289-290.
- [4] Maus MK, Grimminger PP, Mack PC, et al. *KRAS* mutations in non-small-cell lung cancer and colorectal cancer: Implications for *EGFR*-targeted therapies [J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(2):163-167.
- [5] Cuneo KC, Mukesh KN, Dipankar R, et al. *EGFR* targeted therapies and radiation: Optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015, 154:67-77.
- [6] 赵馨,何天文,尹爱华. 第二代测序技术与无创产前诊断[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(3):198-203.
- [7] 杨旭,焦睿,杨琳,等. 基于新一代高通量技术的人类疾病组学研究策略[J]. *遗传*, 2011, 33(8):829-846.
- [8] Samuel AY, Sanja D, Yuri EN, et al. Pulmonary langerhans cell histiocytosis: profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of *BRAF* V600E mutations [J]. *Chest*, 2013, 143(6):1679-1684.
- [9] van Zandwijk N, Mathy A, Boerrigter L, et al. *EGFR* and *KRAS* mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(1):99-103.
- [10] NCCN. 2014年非小细胞肺癌临床实践指南(中国版) [EB/OL]. www.nccn.org. 2014-03-31/2016-09-21.
- [11] Tenedini E, Bernardis I, Artusi V, et al. Targeted cancer exome sequencing reveals recurrent mutations in myeloproliferative neoplasms [J]. *Leuk*, 2014, 28(5):1052-1059.
- [12] Sclafani F, Gullo G, Sheahan K, et al. *BRAF* mutations in melanoma and colorectal cancer: A single oncogenic mutation with different tumour phenotypes and clinical implications [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 87(1):55-68.
- [13] Martin J, Zongli Z, Jessica W, et al. FImpact of next-generation sequencing on the clinical diagnosis of pancreatic cysts [J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2016, 83(1):140-148.
- [14] Marta HV, Chen CC, Shyng-Shiou FY, et al. *KRAS* mutations: Analytical considerations [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2014, 431:211-220.
- [15] Chang YS, Lin IL, Yeh KT, et al. Rapid detection of *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, and *BRAF* hotspot mutations in thyroid cancer using the multiplex primer extension [J]. *Clinical Biochemistry*, 2013, 46(15):1572-1577.
- [16] William MK, Wang PY, Hwang PM. *TP53* mutation, mitochondria and cancer [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2016, 38:16-22.

NGS 检测乙型肝炎病毒耐药基因突变情况及其临床意义

王创俊¹ 王庆¹ 曹治家¹ 杨学习^{2*}

[摘要] **目的** 检测乙型肝炎患者的HBV YMDD突变情况,探究下一代测序技术(next generation sequencing,NGS)检测HBV耐药基因突变的可行性及患者性别与其YMDD突变的相关性,并为临床用药提供参考。**方法** 运用NGS测序技术对收集的100例临床样本进行HBV YMDD突变的检测,并与临床检测金标准Sanger测序法的测序结果进行比对。**结果** 运用NGS检测100例HBV样本,其中YMDD野生型88例,HBV YMDD耐药基因突变12例,与Sanger测序法的测序结果完全相符。**结论** 本研究结果显示,NGS技术可用于HBV耐药基因突变检测,患者性别与HBV耐药突变无明显相关性。

[关键词] NGS; HBV; 耐药基因突变

Next generation Sequencing in study of drug-resistance genes and the clinical significance of hepatitis B virus

WANG Chuangjun¹, WANG Qing¹, CAO Zhijia¹, YANG Xuexi^{2*}

(1. Guangzhou Darui Biotechnology Co., LTD., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. Institute of Antibody Engineering, School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the feasibility of HBV resistance mutation detection by next generation sequencing (NGS) technology as well as to examine the correlation of the patient's gender with his or her YMDD mutation. Thus, it can provide a reference for clinical diagnostic agents. **Methods** NGS technology was used in this study to detect the HBV YMDD mutation from 100 collected cases of clinical samples. These results were compared with the Sanger sequencing results, which is the gold standard for clinical detection. **Results** In these 100 cases of HBV samples, 88 cases of HBV YMDD wild type and 12 cases YMDD resistant mutation were detected. The sequencing results were the same as the Sanger sequencing results. **Conclusions** The results of this study showed NGS technology can be used to detect HBV resistance mutations. Furthermore, the patient's gender has no significant correlation with the HBV resistance mutations.

[KEY WORD] NGS; HBV; Resistance gene mutations

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性分布,据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的数据显示,全球约有2.4亿感染者,每年约有80万人死于与HBV相关的肝脏疾

病^[1]。根据中国疾病预防控制中心的统计数字,截止至2015年7月份,中国乙肝病毒感染者达到9 000万^[2]。目前临床上对乙型肝炎主要的治疗方法是抗病毒治疗,国内外普遍使用的药物有干扰

基金项目:广东省科技计划项目应用型专项资金(2015B020233009)

作者单位:1.广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2.南方医科大学检验与生物技术学院抗体工程研究所,广东,广州 510515

*通讯作者:杨学习, E-mail: yxxzb@sohu.com

素和核苷(酸)类。其中拉米夫定(Lamivudine, LAM)别称3TC,作为第一个被批准使用的核苷类治疗药物,因其抑制病毒复制能力强及使用方便且疗效确切,适用于不同阶段的肝病患者,是长期治疗的合理选择。但因其无法清除肝细胞内病毒的超螺旋cDNA,患者长期用药时,易发生耐受的情况^[3-4]。另外,HBV复制过程中存在逆转录过程,逆转录酶缺乏校正活性且病毒复制速率又保持在较高水平,因此产生了大量的核苷酸错配,使HBV在宿主体内表现为大量的基因序列有差别^[5]。HBV酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)变异对拉米夫定用药产生影响,基因组变异为rt180、rt204和rt207^[6]。

本研究运用Ion Torrent Proton™测序系统^[4]对收集的100例临床样本进行HBV耐药基因变异的检测,并与临床检测金标准的Sanger测序结果进

行比对,验证NGS检测技术检测乙肝患者的HBV YMDD突变的可行性,探究患者性别与HBV耐药基因变异的相关性,为临床治疗方案的调整提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本

选取福建协和医院经临床确诊为HBV耐药的血清样本100例,其中男性68例,女性32例,年龄22~65岁,平均年龄(37.02±12.07)岁;阴阳性质控品各1例。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

本实验主要仪器信息见表1。

1.2.2 试剂

本实验主要试剂信息见表2。

表1 仪器信息

Table 1 The information of instruments

仪器名称	厂家	货号
Veriti PCR 仪	Life Technologies 公司(美国)	4375786
Ion One Touch™ 2.0 System	Life Technologies 公司(美国)	4474779
Ion Proton™ System	Life Technologies 公司(美国)	4476610
ABI 3500 DX 基因分析仪	Life Technologies 公司(美国)	4406019

表2 试剂信息

Table 2 The information of reagents

试剂名称	厂家	货号
核酸提取试剂盒(离心柱法)	中山大学达安基因股份有限公司	#DA-Z146 48
SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒	上海生工生物工程公司	B518141-0100
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Life Technologies 公司(美国)	4480441
Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit	Life Technologies 公司(美国)	A26434
Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit	Life Technologies 公司(美国)	4488315
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies 公司(美国)	Q32854

1.3 方法

1.3.1 样本DNA提取

使用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒(离心柱法),严格按照试剂盒说明书进行操作,使用Qubit® 3.0荧光计或同类仪器对提取后的核酸进行定量。提取后的DNA保存于-20℃。

1.3.2 DNA文库构建

提取得到的DNA样本经过定性PCR方法扩

增后采用生工 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化,使用 Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies 公司,美国)进行HBV样本文库构建。具体建库流程如:末端补平→产物纯化→连接接头→产物纯化→扩增产物→产物纯化→文库定量→完成建库。

文库构建完毕存放于4℃冰箱,留待后续模板制备、模板富集实验用。

1.3.3 上机测序

1.3.3.1 混合文库

将 1.3.2 中得到的 DNA 文库浓度稀释到 200 pmol/L,等体积混合后,留待下一步实验操作。

1.3.3.2 模板制备和模板富集

使用 Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit (Life Technologies 公司,美国)试剂盒,在 Ion One Touch™ 2.0 System 仪器(Life Technologies 公司,美国)上严格按照说明书操作^[7],对上一步实验得到的样本文库进行模板制备和模板富集。

1.3.3.3 DA8600 测序仪测序

使用 Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit (Life Technologies 公司,美国)试剂盒,严格按照说明书操作对上一步实验模板制备和模板富集所收集到的混合文库样本进行基因测序。

测序质控标准:1) 阳性质控品:以 6 μL 阳性质控品作为待检品,按照试剂盒说明书进行检测,检测结果应为相应型别的阳性。2) 阴性质控品:以 6 μL 阴性质控品作为待检品,按照试剂盒说明书进行检测,检测结果应为相应型别的阴性。3)

以上 1)、2)需要同时满足,否则需要重新实验。

1.3.4 对照实验

使用中山大学达安基因股份有限公司生产的乙型肝炎病毒耐药基因突变检测试剂盒(PCR-测序法)(国食药监械(准)字 2014 第 3401444 号)对 100 例样本进行对照实验,验证 NGS 测序技术测序结果。

2 结果

2.1 HBV YMDD 突变检测结果

NGS 测序技术检测得到的结果为,100 例 HBV 样本中,共检出 HBV YMDD 野生型 88 例,HBV YMDD 突变型 12 例(其中 YIDD 变异 8 例, YVDD 变异 4 例),且与对照方法 Sanger 测序结果比对正确率 100%,如表 3。

2.2 HBV YMDD 突变与年龄的相关性

HBV 耐药基因野生型(YMDD)样本中,男性 59 例,女性 29 例;HBV 耐药基因突变样本中,男性 8 例,女性 4 例,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 4)。

表 3 HBV 耐药基因突变 NGS 检测结果

Table 3 The results of HBV drug-resistance gene sequencing

样本编号	二代测序结果	Allele Call	碱基变化	一代测序结果	碱基变化
11	YVDD	Homozygous	739A > G	YVDD	GTG
17	YIDD	Homozygous	741G > T	YIDD	ATT
21	YVDD	Homozygous	739A > G	YVDD	GTG
25	YIDD	Homozygous	741G > T	YIDD	ATT
28	YIDD	Homozygous	741G > T	YIDD	ATT
44	YIDD	Homozygous	741G > T	YIDD	ATT
48	YIDD	Homozygous	741G > T	YIDD	ATT
51	YIDD	Homozygous	741G > T	YIDD	ATT
54	YVDD	Homozygous	739A > G	YVDD	GTG
73	YIDD	Heterozygous	741G > T	YIDD	ATT
89	YIDD	Heterozygous	741G > T	YIDD	ATT
90	YVDD	Heterozygous	739A > G	YVDD	GTG

Absent 的判断依据:在设定 Hot Spot 的条件下,序列无突变或者 coverage(覆盖度) < 6 判为“Absent”。

对表 4 数据做卡方检验,假设 H_0 =患者性别与 HBV 耐药基因突变不相关, H_1 =患者性别与 HBV 耐药基因相关。由卡方检验公式,得 $\chi^2=1.950 <$

$\chi^2_{(0.05,1)}=3.84$,即 $P>0.05$,拒绝 H_1 ,接受 H_0 。结论:患者性别与 HBV 耐药基因突变不相关。

表4 HBV 耐药基因突变与性别的相关性

Table 4 The correlation between patients' gender and HBV YMDD mutation

突变类型	性别	
	男	女
YMDD	59	29
YIDD	8	4
YVDD		

2.3 2种检测方法相关性分析

100例样本中,经对照方法 Sanger 测序法检测,HBV 耐药基因野生型有 88 例;HBV 耐药基因突变型有 12 例,其中 YIDD 突变有 8 例,YVDD 突变有 4 例。则 HBV 耐药基因检测率为 12.0%^[7]。经 NGS 测序技术检测,乙肝耐药基因突变型有 12 例,其中 YIDD 突变有 8 例,YVDD 突变有 4 例;野生型(YMDD)有 88 例。Sanger 测序法和 NGS 测序法两者检测结果均一致,灵敏性、特异性、准确性均为 100%,见表 5。

表5 2种测序技术测序结果比较

Table 5 The results comparison of NGS and Sanger Sequencing

测序技术		对照方法(Sanger 测序法)		
		阳性	阴性	合计
NGS	阳性	12(a)	0(c)	12
	阴性	0(b)	88(d)	88
	总数	12	88	100

由表 5 中数据可得,本次实验的灵敏性=100%× $[a/(a+c)]$,特异性=100%× $[d/(b+d)]$,总符合率=100%× $[(a+d)/(b+c)]$ 。灵敏性即待考评试剂检出突变病例占病例组总数的比例,又称真阳性率。即灵敏性=12/(12+0)×100%=100%。特异性指待考评试剂检出无突变病例占对照组总数的比例,又称真阴性率。即特异性=88/(0+88)×100%=100%。准确性指真阳性和真阴性占总样本数的比例。即准确性=(12+88)/100×100%=100%。

3 讨论

本实验主要运用 NGS 测序技术对 100 例样本进行检测,NGS 是基于半导体技术,基因测序芯片

的每个微孔里的微球表面含有样品 DNA 序列的分子拷贝。本次检测结果为 100 例样本中,HBV 耐药基因野生型 88 例,突变型 12 例。此外,本实验设置目前临床检测基因突变的“金标准”测序法——Sanger 测序法测序结果作为对照,比对发现 NGS 测序技术与“金标准”测序法的测序结果完全相符,灵敏性、特异性、准确性均为 100%。

在 HBV 病毒的耐药机制中 DNA 多聚酶扮演着极其重要的角色。HBV 基因组正股(短链)在 DNA 多聚酶作用下延伸合成闭合环状 DNA(cccDNA),以此为模板在宿主肝细胞酶的作用下转录成复制中间体——前基因组 RNA,再以此为模板在病毒 RNA 指导的 DNA 多聚酶(逆转录酶)作用下逆转录成第一股子代 DNA。在 DNA 多聚酶作用下以第一股子代 DNA 为模板合成第二股子代 DNA。该双股 DNA 部分环化,完成 HBV 基因组的复制。拉米夫定通过与 HBV DNA 多聚酶结构域 P 区序列发生特异性结合,竞争抑制酶活性,从而有效抑制 HBV DNA 的复制^[9]。在长期服用拉米夫定过程中,患者容易产生耐受,主要是 DNA 多聚酶 P 基因区的酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)序列发生变异^[10],甲硫氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)替代,使人体对拉米夫定产生耐受,造成病情加重甚至死亡的严重后果^[11-12]。

本次研究提示,YIDD 和 YVDD 变异株的检出率并不一致,YIDD 变异株检出率比 YVDD 变异株检出率高,与方莉等^[12]及郑瑞英等^[13]的结果相符,后续可设计实验验证是否突变类型与治疗方案相关。普冬等^[14]提示,临床上应用拉米夫定治疗的患者,YMDD 变异株检测率会随着治疗时间延长而增加。分析其原因,本研究认为 HBV 位点突变情况及检出情况提示 HBV 病毒群的演变符合达尔文进化论的规律。部分位点的变异对其复制能力没有显著影响,部分位点的变异可能会使子代病毒的复制能力增强或降低。对于 HBV 病毒群,临床上应用拉米夫定对其有一个压力选择的影响,因此在临床上体现为 YMDD 变异株检出率的差别。研究后续或可深入探究验证其耐药突变位点变异对病毒复制能力的影响。

由于 YMDD 变异直接影响临床使用拉米夫定的疗效和预后判定,因此,临床上应用拉米夫定的乙型肝炎患者检测了解 HBV 耐药基因变异情况,

有利于及时调整制定治疗方案,对改善乙肝患者病情和有效治疗疾病有着相当重要的意义。

本研究中对 NGS 检测 HBV 耐药基因 YMDD 突变的可行性进行了探讨,发现采用 NGS 测序技术可准确检测出 HBV 耐药基因突变,对临床中乙肝患者 HBV 耐药基因检测及用药具有重要意义。但对于 NGS 测序技术检测 HBV 耐药基因突变所需样本 DNA 用量及可检出的最低突变频率并没有进行深入研究,后续我们将对此进行进一步的探讨,为临床上乙肝耐药基因的检测提供参考依据。

参考文献

- [1] Science Daily, Université de Genève. Counterattack of the hepatitis B virus [EB/OL]. <https://www.sciencedaily.com/releases/2016/03/160316151110.htm>, 2016-03-16/2016-09-20.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 2015 年全国法定传染病疫情概况 [EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/jkj/s3578/201602/b9217ba14e17452aad9e45a5bccc6b65.shtml>, 2016-02-18/2016-09-20.
- [3] 许瑞元, 王尔莉, 曹霜, 等. 乙型肝炎病毒耐药突变基因检测在临床中的应用 [J]. 实验与检验医学, 2014, 32(2): 179-180.
- [4] Locarnini S. Hepatitis B viral resistance, mechanism and diagnosis [J]. J Hepatol, 2003, 39: s124-s132.
- [5] 张欣欣, 王铭杰. 新一代测序技术在 HBV 变异研究中的应用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(4): 514-519.
- [6] 杨瑞峰, 魏来. 乙型肝炎病毒耐药变异及其检测的临床意义 [J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(7): 697-700.
- [7] 马达, 王惠民, 邵可可. 乳化液 PCR 的研究进展及应用 [J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 857-860.
- [8] Kabayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif in some Lamivudine - untreated asymptomatic hepatitis B virus carrier [J]. J Hepatol, 2001, 34(4): 584-586.
- [9] Glinoe D. The importance of iodine nutrition during pregnancy [J]. Public Health Nutr, 2007, 10(12A): 1542-1546.
- [10] Blumenthal N, Byth K, Eastman CJ. Iodine intake and thyroid function in pregnant women in a private clinical practice in northwestern sydney before mandatory fortification of bread with iodised salt [J]. J Thyroid Res, 2012, 798(963): 1-6.
- [11] Vermiglio F, Lo Presti VP, Moleti M, et al. Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency; a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(12): 6054-6060.
- [12] 方莉, 赵维皎, 陈莹, 等. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异株的检测及其临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(15): 2197-2199.
- [13] 郑瑞英, 万谟彬, 孝成忠, 等. 拉米夫定耐药患者乙型肝炎病毒的基因突变 [J]. 中华传染病杂志, 2007, 25(7): 412-415.
- [14] 普冬, 吴芳华, 刘红伟. 乙型肝炎患者 YMDD 变异的检测及意义 [J]. 检验医学与临床, 2008, 5(24): 1506-1507.
- [23] Safi H, Fleischmann RD, Peterson SN, et al. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 103-108.
- [24] Zhang ZJ, Wang YF, Pang Y, et al. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 638-641.
- [25] Plinke C, Cox HS, Zarkua N, et al. *embCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *embB306* mutation [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(4): 1359-1367.
- [26] 刘志广, 孙庆, 刘海灿, 等. 耐多药结核分枝杆菌中 *embB* 基因突变与乙胺丁醇耐药的相关性研究 [J]. 疾病监测, 2015, 30(4): 321-324.
- [27] 陈庆海, 刘星, 黄君富, 等. 结核分枝杆菌 *embB330* codon 分子信标杂交及荧光显微观测 [J]. 中华医药感染学杂志, 2009, 19(14): 1908-1910.

(上接第 22 页)

· 论 著 ·

DNA 定量分析联合液基细胞学检测对恶性腹腔积液的诊断价值

黄柳炎¹ 刘崇梅^{2*} 毛敏² 邹亚² 阳娟¹ 张雪纯¹

[摘要] **目的** 探讨DNA定量分析和液基细胞学检测对恶性腹腔积液诊断的应用价值。**方法** 选取我院2013年8月至2015年8月间145名腹腔积液患者作DNA定量分析检查(DNA image cytometer, DNA-ICM)和液基细胞学检测(thinprep cytologic test, TCT),比较其二者间诊断的敏感性和特异性。应用Logistic回归模型,绘制ROC曲线并计算曲线下面积(area under curve, AUC)来评价各指标的诊断价值。**结果** DNA-ICM检测的阳性率明显高于TCT检测。TCT检测和DNA-ICM检测敏感性分别为84.21%(32/38)和94.74%(36/38),特异性分别为65%(13/20)和85%(17/20)。2种方法联合诊断恶性腹腔积液的ROC曲线下面积AUC为0.94,高于2种单项检测的AUC,分别为0.90、0.75。**结论** 两者相比较,DNA-ICM的敏感性和特异性明显高于TCT检测,而将2种方法相结合,可以极大地提高对恶性腹腔积液的诊断准确性。

[关键词] DNA定量分析;液基细胞学;腹腔积液

The diagnostic value of DNA image cytometer and thinprep cytologic test for malignant peritoneal effusion

HUANG Liuyan¹, LIU Chongmei^{2*}, MAO Min², ZOU Ya², YANG Juan¹, ZHANG Xuechun¹

(1. Graduate School of University of South China, Hengyang, Hunan, China, 421001; 2. Department of Pathology, Yueyang Second People's Hospital, Yueyang, Hunan, China, 414000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the application of DNA image cytometer (DNA-ICM) and thinprep cytologic test (TCT) for the diagnosis of malignant peritoneal effusion. **Methods** We collected the ascites of 145 patients in the second people's hospital of Yueyang from August 2013 to August 2015. All ascites sample were detected by DNA-ICM and TCT, their sensitivity and specificity were then compared. Utilizing applied logistic regression, receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted and the area under ROC curve (AUC) was calculated to assess the diagnostic value of each index. **Results** The positive detection rate of malignant cells in ascites by DNA-ICM was higher than by TCT, the difference between the two methods was significant ($P < 0.05$). The sensitivity of TCT diagnosis of malignant ascites was 84.21%, specificity was 65% ($P < 0.05$). The sensitivity of DNA-ICM diagnosis of malignant ascites was 94.74%, specificity was 85% ($P < 0.05$). The AUC of the combined examination of DNA-ICM and TCT for malignant peritoneal effusion was 0.94, higher than the AUC of DNA-ICM and TCT single index examinations, which was 0.90 and 0.75 respectively. **Conclusions** Compared with thinprep cytologic test, DNA quantitative analysis has a higher sensitivity and specificity. We can greatly improve the accuracy of diagnosis of malignant ascites with a combination of the two methods.

[KEY WORDS] DNA image cytometer; Thinprep cytologic test; Peritoneal effusion

基金项目:湖南省科技厅科技资助项目(2014SK3144);南华大学研究生创新科研项目(2014XCX35)

作者单位:1. 南华大学研究生院,湖南,衡阳 421001

2. 岳阳市第二人民医院病理科,湖南,岳阳 414000

*通讯作者:刘崇梅, E-mail: 2279700843@qq.com

腹腔积液是临床常见症状之一,能够准确的判断腹腔积液的良恶性,对于疾病的诊疗有着重要的意义。液基细胞学检测(thinprep cytologic test, TCT)是鉴别良恶性腹腔积液的重要方法,但恶性腹腔积液细胞学诊断的阳性率仅为40%左右^[1]。相关研究报道细胞DNA定量分析(DNA image cytometer, DNA-ICM)检测腹腔积液中肿瘤细胞敏感性为88.3%,特异性为100%,TCT检测对恶性腹水诊断的敏感度为81.4%,特异性为90.4%^[2-3]。本研究将对145例腹腔积液患者采用TCT检测和DNA-ICM检测,对腹水中的细胞核进行DNA倍体定量分析,并对比两者在恶性腹腔积液的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集岳阳市二人民医院2013年8月至2015年8月间腹水样本145例,其中男性65例,女性80例,年龄22~85岁,平均55岁,常规采用TCT检测和DNA-ICM检测。

1.2 仪器和试剂

LBP液基沉降式染色机及浆膜腔积液专用耗材(广州安必平医疗科技有限公司),全自动细胞DNA图像定量分析系统、细胞保存液以及相关制片试剂(厦门麦克奥迪医疗诊断有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 TCT检测方法

将腹腔积液标本置于离心管中,加枸橼酸钠抗凝,以3 000 rpm/min的转速离心5 min,弃上清液,置混合器上震荡30 s,往离心管中加入12 mL细胞保存液,静置5 min,弃置上清液:用吸管吸取细胞清洗液至5 mL,将标本混匀后,置漩涡混合器上震荡30 s,涂4张片,95%乙醇固定10 min,2张常规苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,封片,行细胞镜检,由我科2位资深病理医师阅片,镜下见炎性细胞判读为阴性,镜下见核异型细胞或肿瘤细胞判读为阳性。

1.3.2 DNA-ICM检测方法

将剩余2张薄层细胞片进行Feulgen染色,然后在全自动细胞DNA图像定量分析系统,进行扫描处理,该系统由MoticBA6.0全自动数码显微镜、

DELL370工作站、MoticamPro205C摄像头及自动显微镜控制盒等组成,系统对全片所有细胞核进行扫描测定,标本染色质量控制采用标准片作对照。根据系统诊断软件所做的细胞DNA倍体分析,结果和建议有如下3种情况:正常细胞的DNA指数(DNA Index, DI)为1,即为二倍体细胞(2C),无异倍体细胞和异常细胞峰。4C细胞数大于被检测细胞总数的5%,但无异倍体细胞诊断为增生。有3个以上DI>2.5的细胞或有异倍体细胞峰诊断为阳性^[4-5]。

1.4 统计学分析

以活检病理组织诊断为标准,分别计算出TCT检测和DNA-ICM检测的敏感性和特异性。然后采用SPSS 17.0软件进行数据处理,用Logistic回归分析筛选变量并建立回归方程,对新变量及单项指标进行ROC曲线分析。

2 结果

2.1 TCT检测与DNA-ICM检测对比

145例腹腔积液标本中TCT检测37例阳性, DNA-ICM检测48例阳性,其中48例出现3个或3个以上DI≥2.5的异倍体细胞或异倍体细胞峰, 12例出现1~2个DI≥2.5的异倍体细胞。TCT检测查见癌或疑癌细胞37例患者标本中,检测有37例均出现DI≥2.5的异倍体细胞。TCT检查见少数异型细胞的10例标本中, DNA-ICM检测有8例出DI≥2.5的异倍体细胞。2例TCT检查为阳性而DNA-ICM检测为阴性。93例良性腹水中, TCT检测有8例出现假阳性,而DNA-ICM检测全部阴性。2种检查方法结果比较, DNA-ICM检测的阳性检出率明显高于TCT检测方法,见表1、图1~3。

表1 145例良恶性腹腔积液DNA-ICM检测与TCT检测诊断结果(n)

Table 1 145 cases of benign and malignant ascites by DNA-ICM and TCT diagnosis (n)

项目	n	TCT检测			DNA-ICM检测		
		癌	疑癌	异型	正常	阳性	阴性
恶性腹腔积液	52	28	9	10	5	48	4
良性腹腔积液	93	0	8	16	69	0	93

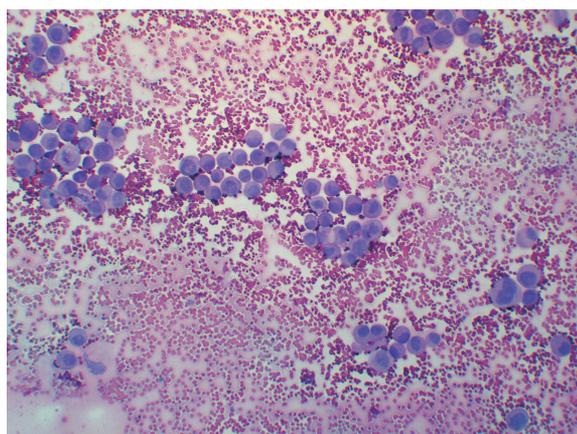


图1 恶性腹腔积液患者液基细胞学检测阳性结果 (HE, ×200)

Figure 1 The positive results of TCT in patients with malignant peritoneal effusion(HE, ×200)

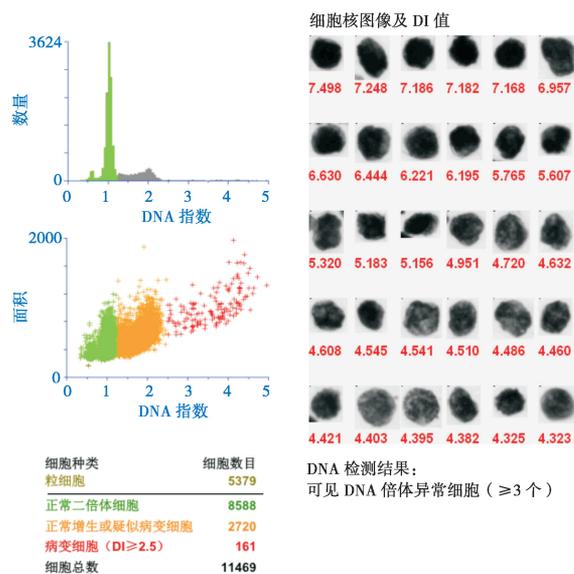


图3 恶性腹腔积液患者细胞DNA 倍体检查

Figure 3 Malignant peritoneal effusion in patients with DNA times physical examination

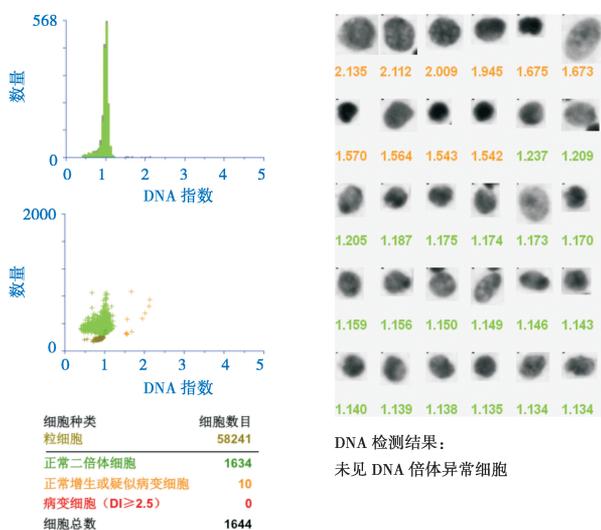


图2 良性腹腔积液患者细胞DNA 倍体检查

Figure 2 Benign peritoneal effusion in patients with cell DNA times physical examination

表2 TCT 检测、DNA-ICM 与组织病理诊断比较

Table 2 Comparison of TCT, DNA-ICM and histopathology

组织病理 诊断	TCT 检测		DNA-ICM 检测	
	+	-	+	-
+	32	7	36	3
-	6	13	2	17
合计	38	20	38	20

2.2 TCT 和 DNA-ICM 检测与组织病理学比较

58 例患者获得活检组织病理诊断结果,其中为恶性肿瘤患者 39 例,14 例为卵巢癌,18 例为胃肠道恶性肿瘤,4 例为肝癌,3 例为其他肿瘤。良性患者为 19 例,TCT 检测、DNA-ICM 检测与组织病理诊断比较,TCT 检测和 DNA-ICM 检测敏感性分别为 84.21% (32/38) 和 94.74% (36/38),特异性分别为 65% (13/20) 和 85% (17/20) 结果见表 2。二者两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。与此同时,对 TCT 检测、DNA-ICM 检测及 2 种方法联合检测用 Logistic 回归生成的新变量(即预测概率)

作 ROC 曲线分析,2 种方法联合诊断恶性腹腔积液的 ROC 曲线并计算曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.94,高于 2 种单项检测的 AUC,分别为 0.90、0.75。即对恶性腹腔积液诊断能力评价 ROC 曲线下面积 2 种方法联合 $> \text{DNA-ICM} > \text{TCT}$,AUC 越大,诊断能力则越强,见图 4。

3 讨论

恶性腹腔积液是临床的常见症状,对于它的诊断也一直是临床面临的难题,目前有很多的检验方法及指标判断其良恶性,但各有利弊,如:脱落细胞学、肿瘤标志物、微小 RNA 含量检测、DNA-ICM 检测、流式细胞术等^[6-8]。但临床上我们常以细胞学检测为主。由于受细胞变异、蜕变以及主观因素的影响,临床的诊断率不高。因此提高恶性腹腔积液检测的敏感性和特异性一直是临床上

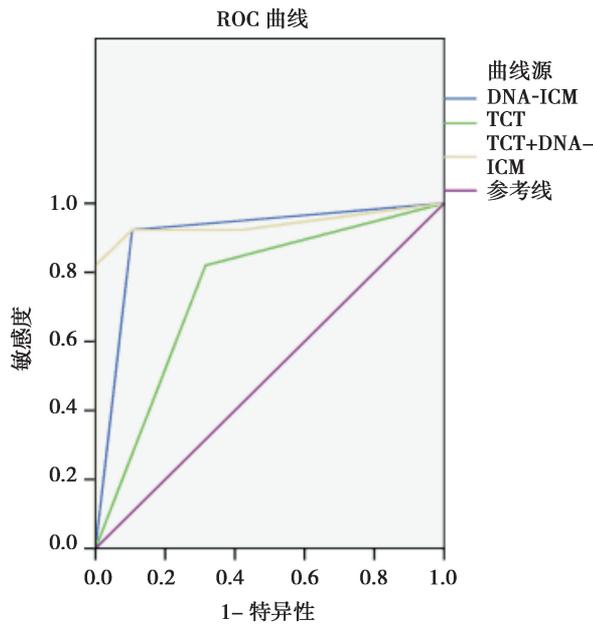


图4 TCT检测、DNA-ICM检测及2种方法联合检测的ROC曲线分析

Figure 4 ROC curve analysis TCT, DNA-ICM and two kinds of methods combination for detection

迫切解决的问题。恶性腹腔积液主要可分为2类：一类是中央性腹水，系静脉或淋巴管堵塞所致，常见于卵巢癌、肝癌等；一类是周围性腹水，由散布于腹膜表面的肿瘤结节分泌某些介素，导致腹膜毛细血管通透性增加所致，是晚期肿瘤患者产生腹水的主要原因。在临床上常规抽取腹水送细胞学检查，往往由于腹水恶性肿瘤细胞量少等原因检测阳性率不高，且由于间皮细胞和巨噬细胞的干扰，有时会出现假阳性。

TCT检测是一项制片技术，它发展于20世纪90年代。最初用于宫颈细胞学检查，随着病理学的不断发展，其在胸腹腔积液等非妇科领域也得到了运用。它具有简捷方便、快速经济、特异性高的特点，但是由于技术操作及涂片受主观影响较大，使其存在敏感性低、假阴性率高的缺点。与传统的普通制片方法相比较，TCT检测改善了样本的收集方法，除去了红细胞、粘液及炎性渗出物，能使细胞均匀完整地分布在载玻片上，同时也保全了细胞的抗原生物特性，有利于肿瘤细胞的鉴别诊断。细胞DNA-ICM检测是我国近几年迅速发展起来的一项新型技术，在诊断细胞学良恶性方面它有着不可替代的优越性，它是从细胞DNA的水平方面进行分析，并以点阵

分布图和直方图形式描绘细胞中非整倍体细胞的个数。

对于恶性腹腔积液的诊断率，国内外相关文献报道显示，TCT检查对恶性腹水诊断的敏感度为81.4%，特异性为90.4%，DNA-ICM检测恶性腹腔积液敏感性为88.3%，特异性为100%^[2-3]。本文也对此2种方法进行比较分析，并加以单项检测与联合检测作ROC曲线作对比分析。145例腹腔积液标本中TCT检测和DNA-ICM检测敏感性分别为84.21% (32/38)和94.74% (36/38)，特异性分别为65% (13/20)和85% (17/20)。对TCT检测、DNA-ICM检测及2种方法联合检测用Logistic回归生成的新变量(即预测概率)作ROC曲线分析，对恶性腹腔积液诊断能力评价ROC曲线下面积2种方法联合>DNA-ICM>TCT，ROC曲线下面积越大，诊断能力则越强。与相关研究对比，本文2种方法对恶性腹腔积液诊断的敏感性与特异性稍有降低，其一可能受病理医师阅片主观所影响，其二与制片的操作技术有关，其三对是否为恶性腹腔积液的评定标准有关。因此，由以上可得出DNA-ICM检测的敏感性和特异性明显高于TCT检测。而将2种方法相结合，可以很大程度地降低恶性腹腔积液的误诊率和漏诊率，即可极大地提高对恶性腹腔积液的诊断准确性。同时研究显示恶性腹腔积液中，TCT检测阳性的37例标本中，DNA-ICM检测2例为阴性，可能因为DNA-ICM只能对DNA倍体已经发生改变的肿瘤细胞做出诊断，对DNA倍体未发生改变的二倍体肿瘤细胞检测呈假阴性。这可能是由于细胞在发生癌变的过程中，细胞核DNA的含量和结构的变化先于细胞形态的改变。本研究发现DNA-ICM检测的敏感度、特异度高于TCT的敏感度、特异度，检测效果优于TCT检测。DNA-ICM通过全自动数码显微镜进行阅片，仔细扫描每一个视野，降低了漏检的可能，提高了检测的敏感度。通过图像分析系统自主分析，测出每一个细胞DNA含量的具体数值，客观准确，提高了检测的特异度和准确度^[6-7]。

由此可见，单纯的依靠DNA-ICM检测或TCT检测的测定，很难对腹腔积液进行精确诊断。将二者联合起来检测，能最大程度上提高恶性腹腔积液诊断的灵敏性及特异性，是目前值得推广的诊断腹腔积液的方法。

(下转第60页)

肝病患者 AFP、TP、ALB、SOD 检测的临床价值

陆兴热* 陈凤羽 刘孝文 资云菊 樊晓东 袁雕 何祥 朱德永 陆昱

[摘要] 目的 探讨甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)、血清总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在肝病患者中的变化及其临床意义。方法 对200例符合纳入标准的肝病患者及50例正常对照组样本同时进行AFP、TP、ALB以及SOD的检测,对检测结果采用 t 检验和 χ^2 检验进行统计分析,比较4个指标在肝病患者与正常对照组间、肝病患者与肝癌患者间的差异以及其对肝病的检测敏感度。结果 正常对照组与肝癌组及肝硬化组的AFP、TP、ALB、SOD检测结果相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而正常对照组与肝炎组的AFP、ALB、SOD检测结果对比显示差异有统计学意义($P < 0.05$),TP检测结果显示差异无统计学意义($P > 0.05$);对比分析肝癌组与肝硬化组检测结果显示,AFP、SOD差异有统计学意义($P < 0.05$),TP、ALB检测结果显示差异无统计学意义($P > 0.05$);对比分析肝癌组与肝炎组检测结果显示,AFP、ALB、SOD差异有统计学意义($P < 0.05$),TP检测结果显示差异无统计学意义($P > 0.05$); χ^2 检验分析样本异常检出率可见3组中AFP、ALB、SOD异常检出率差异有统计学意义($P < 0.05$);而TP阳性检出率3组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 肝病患者血清AFP、TP、ALB、SOD与健康者存在显著性差异,且随着病情的加重其异常检出率也随之增加,可作为指示肝病患者病情的检测指标。

[关键词] 肝病患者;甲胎蛋白;总蛋白;白蛋白;超氧化物歧化酶

Clinical significance of detection of AFP, TP, ALB and SOD in hepatopathy patients

LU Xingre*, CHEN Fengyu, LIU Xiaowen, ZI Yunju, FAN Xiaodong, YUAN Diao, HE Xiang, ZHU Deyong, LU Yu

(Laboratory of Wenshan Prefecture People's Hospital, Wenshan state, Yunnan, China, 663000)

[ABSTRACT] Objective To observe the change and clinical significance of AFP, TP, ALB, and SOD in hepatopathy patients. Methods AFP, TP, ALB, and SOD in 200 cases of hepatopathy patients who complied with experiment standards and 50 cases of healthy controls were detected simultaneously, T-test and the Chi-square test were used to compare the difference and detection sensitivities between cases and control group, respectively. Results The results showed that the difference of the plasma levels of AFP, TP, ALB and SOD in liver cancer and liver cirrhosis was statistically significant when compared with control group ($P < 0.05$); Significant differences existed in AFP, ALB and SOD in hepatitis compared with the control group ($P < 0.05$) while TP was no statistically significant difference between these two groups ($P > 0.05$); The statistical values revealed that there were significant correlation between liver cancer and liver cirrhosis with the plasma levels of AFP, and SOD ($P < 0.05$) while TP and ALB was not significantly different between these two groups ($P > 0.05$); Meanwhile, statistical significance was found in groups of liver cancer and hepatitis patients with the plasma levels of AFP, ALB and SOD ($P < 0.05$), instead, TP levels were not significantly different between

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2014AA022304)

作者单位:文山州人民医院检验科,云南,文山州 663000

*通讯作者:陆兴热, E-mail: luxingre@126.com

these two groups ($P>0.05$); The abnormal detection rate of AFP, ALB and SOD was analyzed by χ^2 test and the result showed that there were statistically significant differences among the three groups ($P<0.05$) and TP was the exact contrary ($P>0.05$). **Conclusion** Compared hepatopathy patients groups with healthy controls, the plasma levels of AFP, TP, ALB and SOD have significant differences ($P<0.05$); and the exception rate increased as the symptom became more serious, which can be used as an index that can respond to the condition of patients with liver disease.

[KEY WORDS] Hepatopathy patients; Alpha fetal protein; Total protein; Albumin; Superoxide dismutase

我国是一个肝病大国,有超过3亿的人群罹患各种肝脏疾病,包括急慢性肝炎、肝硬化、肝癌等^[1]。而且我国是肝炎病毒流行高发区,而肝癌的发生与肝炎病毒感染密切相关^[2]。在所有癌症中,肝癌发病率位居世界第五位,并在最常见的肿瘤致死原因中位列第二^[3]。近年来,国家和政府投入了大量资金用于肝脏相关疾病的研究^[4]。对于肝病患者,主要是通过肝功能的各种指标进行诊断、治疗及判断预后。血液中蛋白的含量可以反映肝脏功能,如果蛋白质降低就表示肝脏合成功能受损害,是病情比较严重的表现。甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)由肝脏合成,正常成人体内含量甚微,不超过 $25 \mu\text{g/L}$ ^[5],当出现肝脏疾病时血清AFP水平急剧上升,因此AFP在肝病患者血清中的变化是否能够反映肝脏疾病的变化程度值得探讨。血清总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)的含量可作为肝脏合成反应功能的重要指标之一,对肝脏疾病的诊断、监测及治疗均有着重要的意义^[6]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)又名肝蛋白,是体内清除氧自由基的特异酶,可以与肝病患者机体产生的氧自由基造成的损害相对抗而发挥作用^[7]。通过检测血清中AFP、TP、ALB、SOD含量的变化,探讨这些血清标志物的变化在肝脏疾病中的临床意义进而辅助临床诊断,为临床治疗提供方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料

将2014年3月至2016年10月期间来我院就诊的患者血样标本250例作为研究对象,其中有男性131例,年龄在35~75周岁,平均年龄(53.8 ± 3.6)岁;女性119例,年龄在32~70周岁,平均为(48.9 ± 3.9)岁。其中肝癌患者(肝癌组)100例,此组患者均经病理学检查诊断确认,且全部排除循环、呼吸、生殖系统及泌尿系统的疾病;慢性肝炎患者

(慢性肝炎组)50例,此组患者诊断标准参照2000年中华医学会传染病学与寄生虫学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》;肝硬化患者(肝硬化组)50例,肝硬化纳入者均经超声或CT诊断,在留取患者血清标本后跟踪观察3~10个月(中值为6个月),期间均未发展成肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC),且全部排除循环、呼吸、生殖系统及泌尿系统的疾病;健康人组50例,全部排除循环、呼吸、消化及生殖系统等方面的疾病。所有受试者的血清标本均用低温离心机离心后存放于 -20°C 冰箱内,统一行AFP、TP、ALB、SOD 4项检查。对比3组研究对象基线资料,未见明显差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 血清标本采集

抽取患者晨起空腹静脉血样3 mL,全血标本采集后,标本置于室温下2 h令其自行凝集,用低温高速离心机3 000 rpm/min离心20 min,收集上清,标记后放置于 -20°C 冰箱。

1.2.2 检测方法

血清AFP采用瑞士罗氏公司的Cobas e 602全自动电化学发光分析仪及配套试剂进行检测,实验操作按说明书进行,参考范围为 $0\sim 25 \mu\text{g/L}$;TP采用瑞士罗氏公司的P800全自动生化分析仪进行检测,检测试剂为总蛋白(TP)测定试剂盒(双缩脲法),参考范围为 $60\sim 80 \text{ g/L}$,实验操作遵循试剂盒使用说明书;ALB采用瑞士罗氏公司的P800全自动生化分析仪进行检测,检测试剂为白蛋白(ALB)测定试剂盒(溴甲酚绿法),参考范围为 $38\sim 51 \text{ g/L}$,实验操作遵循试剂盒使用说明书;SOD采用北京九强生物技术有限公司检测,参考范围为 $129\sim 216 \text{ U/mL}$;检测质控遵循实验室质控标准,所有样本检测质量在控。

1.3 统计学分析

研究相关数据采用IBM SPSS Statistics v19.0

统计学软件进行处理,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,患病组与对照组间差异检验方法为 t 检验,各组阳性检出率采用 χ^2 检验;可信区间取值 95%,检验水准取值 0.05,在检验 $P < 0.05$ 情况下认为组间对比差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同肝病患者 AFP、TP、ALB、SOD 检测结果

正常对照组与肝癌组及肝硬化组的 AFP、TP、ALB、SOD 检测结果相比差异具有统计学意义

($P < 0.05$);而正常对照组与肝炎组的 AFP、ALB、SOD 检测结果对比显示差异有统计学意义($P < 0.05$),TP 检测结果显示差异无统计学意义($P > 0.05$);对比分析肝癌组与肝硬化组检测结果显示,AFP、SOD 差异有统计学意义($P < 0.05$),TP、ALB 检测结果显示差异无统计学意义($P > 0.05$);对比分析肝癌组与肝炎组检测结果显示,AFP、ALB、SOD 差异有统计学意义($P < 0.05$),TP 检测结果显示差异无统计学意义($P > 0.05$),详细结果见表 1。

表 1 4 组 AFP、TP、ALB 以及 SOD 水平比较

Table 1 Compared concentrations of AFP、TP、ALB and SOD among the 4 groups

组别	<i>n</i>	AFP(ng/mL)	TP(g/L)	ALB(g/L)	SOD(U/mL)
肝癌组	100	185.66±43.25*	65.21±7.07*	23.12±2.15*	53.46±15.68*
肝硬化组	50	105.73±38.79*#	67.38±8.65*	29.33±5.41*	115.62±37.42*#
肝炎组	50	47.06±95.29*#	72.31±3.98	35.95±2.77*#	117.82±19.85*#
对照组	50	8.51±2.72	73.15±3.95	41.13±2.71	130.55±22.97

与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与肝癌组比较,# $P < 0.05$

2.2 各组肝病患者 AFP、TP、ALB、SOD 异常检出率

参照本实验室参考值范围进行 AFP、TP、ALB、SOD 检测结果正常与异常判定,统计 3 个组中异常样本检出率,对比分析结果如表 2 所示。从表中可见样本异常检出率随着病情加重而增加,其中 3 个组中 AFP、ALB、SOD 异常检出率差异有统计学意义($P < 0.05$);而 TP 阳性检出率 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组肝病患者 AFP、TP、ALB、SOD 异常检出率比较
[*n*(%)]

Table 2 The abnormal rate of AFP/TP/ALB/SOD in each group of hepatopathy patients [*n*(%)]

组别	<i>n</i>	AFP	TP	ALB	SOD
肝癌组	100	100(100)	36(36)	90(90)	93(93)
肝硬化组	50	47(94)	13(26)	43(86)	18(36)
肝炎组	50	39(78)	9(18)	16(32)	11(22)
χ^2	—	24.88	4.95	63.66	88.14
<i>P</i>	—	0.000	0.084	0.000	0.000

3 讨论

人体蛋白质的合成和分解主要器官是肝脏,不同程度的肝功能受损会引起血清中蛋白质水平

不同程度的变化,当肝脏出现病变时能影响各类蛋白质的合成过程^[8]。AFP 是一种糖蛋白,属于白蛋白家族。当患者肝细胞发生病变时,AFP 的蛋白质功能便会因此而恢复,还会随着疾病严重程度而急剧增加,因此 AFP 联合超声检测也被我国肝癌专家共识中推荐为 35~40 岁高危人群筛查肝细胞癌的指标^[9]。本研究中肝病患者 3 组中的 AFP 值均高于正常对照组,且随着病情的进展检测值偏离正常值越严重;经统计分析显示对照组与肝病患者组的 AFP 检测结果相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),异常检出率也随病情加重而增加,这也充分说明了 AFP 在肝病的发现与进展过程中检测的重要意义;除此之外,Llovet 等^[10]在索拉非尼的 III 期临床试验的后续研究中表明基础水平的 AFP 水平与患者的预后相关,AFP 既可以作为预后标志,还可以作为索拉非尼治疗敏感性标志。作为一个血清学标志,AFP 不仅可以在筛查方面给临床诊断起到辅助作用,其动态变化还有助于预测患者对索拉非尼治疗的反应,这些都表明了血清 AFP 对肝病患者监测的重要意义。

TP 是血清中所有蛋白质的总和,其中包括了 ALB^[11]。TP 中 ALB 含量最高,约占总蛋白含量的 57%~68%,血清 TP 和 ALB 主要由肝脏合成^[12],

TP、ALB的测定也是反映肝功能的重要指标,多种情况都可引起血清中TP、ALB浓度的改变^[13]。本次研究实验数据显示,在病情较重的肝硬化组、肝癌组与正常对照组比较血清TP水平以及异常检出率有显著性差异($P < 0.05$);而在病情较轻的肝炎组与正常对照组比较,血清TP检测结果以及异常检出率差异无统计学意义($P > 0.05$);这可能是由于肝脏的强代偿能力的作用,只有当肝脏损伤达到一定程度或一定病程后才能出现血清TP变化,因而急性或局灶性肝损伤时,血清TP多为正常;肝受损时,ALB合成减少,但由于免疫刺激作用,球蛋白产生增加,故血清TP不会出现明显变化。而肝病组与对照组之间ALB检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$),表明ALB相比TP能更敏感地反应肝脏功能的变化以及疾病进展。

SOD是一种重要的抗氧化酶,具有很强的清除氧自由基的作用,是人体内重要的抗氧化活性物质,在治疗氧化应激肝损伤中具有异常重要的作用。SOD几乎用于所有类型的肝损伤模型,并在许多保肝药物研究中广泛应用^[14]。已有报道称检测血清中SOD可为疾病引发的继发性过氧化损伤及相关自由基清除药物疗效检测提供参考,并用于预后的判断和评估^[15]。本研究结果显示,肝癌组SOD水平显著低于肝硬化组、肝炎组和对照组,且随着病情的加重发展,其降低得越快,检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$);此外,异常检出率也随着病情加速而增加,各肝病组间异常检出率有显著差异($P < 0.05$),可见检测血清中SOD水平用于监测肝病进程具有一定的可行性。

虽然临床上对于AFP是否适合作为肝癌筛查指标尚有争论,且TP、ALB的降低对于肝癌诊断的特异性及敏感性均不高,然而在没有特异性及敏感性更优的血清标志物出现时,联合检测这些肝癌血清标志物仍具有一定的临床意义。结合本研究数据分析结果认为,在临床上对一时无肝癌证据而高度怀疑肝癌的患者,定期随访并复查血清AFP、TP、ALB和SOD水平,这对肝病的辅助诊断、病情进展监测以及监测肝癌远处转移或是否复发等方面仍不失为行之有效的方法之一。

参考文献

[1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepa-

tology, 2014, 60(6):2099-2108.

- [2] Fan JG. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China[J]. Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2013, 28(Supplement S1):11-17.
- [3] Fact sheets by cancer[Z]. 2016:2016.
- [4] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1):2-12.
- [5] Shastri A, Msaouel P, Montagna C, et al. Primary hepatic small cell carcinoma: two case reports, molecular characterization and pooled analysis of known clinical data[J]. Anticancer Res, 2016, 36(1):271-277.
- [6] 潘祥林, 陈文彬. 诊断学(第6版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:358.
- [7] 陆兴热, 骆葱, 陈凤羽, 等. AFP、GP73、SOD联合检测在原发性肝癌患者诊断中应用价值[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(7):1076-1079, 1080.
- [8] Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their interpretation[J]. Indian Journal of Pediatrics, 2007, 74(7):663-671.
- [9] Chinese Society of Liver Cancer, Chinese Anti-Cancer Association. Expert consensus on the norms of local ablation therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Chinese journal of hepatology, 2011, 19(4):257-259.
- [10] Llovet JM, Pena CE, Lathia CD, et al. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(8):2290-2300.
- [11] Fernandez FJ, Rivas G, Salgado J, et al. Comparative evaluation of serum protein analysis by capillary zone electrophoresis and agarose gel electrophoresis [J]. American Clinical Laboratory, 2002, 21(4):26-29.
- [12] Rigato I, Ostrow JD, Tiribelli C. Biochemical investigations in the management of liver disease [M]. 2007, 451-467.
- [13] 邱辅佑, 冯学冠, 黄慈花. 肝病患者血清前白蛋白与白蛋白检测的临床价值[J]. 中国热带医学, 2008, 8(11):1927-1928.
- [14] Liu SL, Lin X, Shi DY, et al. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 406(2):173-182.
- [15] Abogresha NM, Greish SM, Abdelaziz EZ, et al. Remote effect of kidney ischemia-reperfusion injury on pancreas: role of oxidative stress and mitochondrial apoptosis[J]. Arch Med Sci, 2016, 12(2):252-262.

促黄体生成素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的临床性能评价

周颖¹ 方婉仙² 吴英松^{3*}

[摘要] 目的 对广州市达瑞生物技术股份有限公司的促黄体生成素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行临床应用研究及临床性能评价。方法 采用平行、盲法、对照试验设计,用达瑞生物公司试剂盒检测335例样本,以雅培公司的促黄体生成素测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)作为对照试剂盒,罗氏公司的促黄体生成素检测试剂盒(电化学发光法)作为复核试剂盒。操作按各试剂盒说明书进行,对达瑞生物公司试剂盒的符合率和相关性进行计算分析。结果 同雅培公司试剂盒比较,达瑞生物公司试剂盒检测血清样品异常符合率为95.8%,正常符合率为95.2%,总符合率为95.4%,*Kappa*值为0.898($P<0.01$)。线性回归方程为 $Y=0.358+0.961X$,两者测定值接近,相关系数为0.988($P<0.01$),相关性良好。同血清检测结果相比,血浆检测结果*Kappa*值为1.000($P<0.01$),线性回归方程为 $Y=0.120+0.966X$,相关系数*r*值为0.999($P<0.01$),相关性良好。特异性样本检测结果均为正常。结论 本试剂盒检测性能可以满足临床应用的需要。

[关键词] 促黄体生成素(LH);化学发光免疫分析法(CLIA);试剂盒

Clinical research of luteinizing hormone (LH) quantitative diagnostic kit by chemiluminescent immunoassay (CLIA)

ZHOU Ying¹, FANG Wanxian², WU Yingsong^{3*}

(1. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong, China, 510440; 2. Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510663; 3. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To investigate the clinical value of the new Luteinizing Hormone Quantitative Diagnostic Kit by Chemiluminescent Immunoassay (LH-CLIA kit) produced by Darui Biotechnology Co., Ltd. for detection of LH by CLIA. Methods In a double blind controlled trial, the Darui LH-CLIA kit was compared against the Abbot LH-CLIA kit by measuring the LH levels of 335 serum samples. With LH-CLIA kit produced by Abbott (Chemiluminescence particles immunoassays) as a control, and with LH-CLIA kit produced by Roche (electrochemical luminescence method) as an inspection test. According to the kit instructions to operate, to calculate and analysis the coincidence rate and correlation of LH-CLIA kit produced by Darui Biotechnology Co., Ltd. Results Compared with the Abbott LH-CMIA kit, the abnormal coincidence rate was 95.8%, and the normal coincidence rate was 95.2%, the total coincidence rate was 95.4%, the *Kappa* value was 0.898 ($P<0.01$). The analysis of quantitative determination indicated that measured serum sample value by Darui LH-CLIA kit is close to Abbott LH-CMIA kit. The linear regression equation was $Y=0.358+0.961X$, the correlation coefficient was 0.988 ($P<0.01$), which showed good correlation. Compared with the serums, the *Kappa* value of the plasmas was 1.000 ($P<0.01$), the correlation coefficient was 0.999 ($P<0.01$), the linear

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:1.广州市疾病预防控制中心,广东,广州510440

2.广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州510663

3.南方医科大学,广东,广州510515

*通讯作者:吴英松, E-mail:wg@smu.edu.cn

regression equation was $Y=0.120+0.966X$. The specificity samples test result was normal. **Conclusion**
Darui LH-CLIA Kit is a valuable diagnostic kit for clinic application.

[KEY WORDS] Luteinizing hormone (LH); Chemiluminescent immunoassay (CLIA); Kit

近年来,不孕症的发病率持续增高,给育龄人群带来很大的困扰。在美国,大约16.6%年龄介于15岁至44岁的女性患有不孕不育症,11.9%(730万)女性需要生育治疗^[1-3]。国内不孕症的发病率增高至7%~10%^[4-7]。内源性黄体生成素的缺乏是导致自然周期排卵障碍的主要原因^[8],其分泌主要受促黄体生成素的调节。促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)是一种糖蛋白激素,由腺垂体嗜碱粒细胞分泌,能够协同促卵泡激素共同作用维持卵巢的月经周期,导致排卵与黄体形成。异常的促黄体生成素水平以及由此导致的促卵泡激素、雌激素、孕酮、睾酮等水平的增高或者降低与许多疾病有关联。促黄体生成素水平增高在女性中会引起绝经、原发性卵巢功能低减以及多囊卵巢疾病,在男性中则会引起原发性性腺功能减退。而促黄体生成素水平降低在女性中会引起原发性卵巢功能亢进,在男性中会引起原发性性腺功能亢进。目前,市面上以雅培公司的促黄体生成素测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)和罗氏公司的促黄体生成素检测试剂盒(电化学发光法)较为常用。但进口试剂盒存在价钱昂贵、检测系统封闭等不足之处。近年来,发光免疫分析方法因其具有灵敏度高、线性范围宽、操作简单及容易实现自动化等特点^[9-10],受到广大科研工作者和临床分析工作者的注意,该技术将在现在及未来的免疫分析检测领域显示极其重要的作用。因此,开发操作简单、经济和性能较优的国产促黄体生成素化学发光法测定试剂盒具有巨大的社会价值和经济效益。

本文对广州市达瑞生物技术股份有限公司自行研制的促黄体生成素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行了临床性能评价,与现行使用的进口试剂盒在样本检测中的符合率和相关性等指标进行比较分析,为LH体外诊断试剂盒的国产化开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

广州市达瑞生物技术股份公司的促黄体生成

素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法);促黄体生成素测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)(雅培公司,美国);促黄体生成素检测试剂盒(电化学发光法)(罗氏公司,德国)。

1.1.2 LH质控品

C1预期浓度范围为4~6 IU/L, C2为32~48 IU/L, C3为72~96 IU/L,广州市达瑞生物技术股份有限公司自配。

1.1.3 样本

随机选取年龄段为18岁至50岁人群血液样本。①血清样本:男性64例,绝经期女性28例,卵泡期女性63例,月经中期女性64例,黄体期女性64例,共283例;②血浆样本:,男性15例,女性37例,共52例,血浆样本随机来源个体相应的血清样本包含在上述283例血清样本中;③特异性样本:含促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)样本10例、含促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)样本10例、含人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)样本10例、含类风湿因子(rheumatoid factor, RF)样本10例、含抗核抗体(anti nuclear antibodies, ANA)样本10例、含人抗鼠抗体(human anti mouse antibody, HAMA)样本10例、溶血样本10例、脂血样本10例、黄疸样本10例。以上样本分别由南方医科大学附属南方医院和厦门大学附属第一医院共2家医院提供,均用雅培公司的促黄体生成素测定试剂盒作为对照进行血清LH测定。

1.1.4 实验仪器

全自动化学发光免疫分析仪(型号:Caris200),厦门优迈科医学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

将采集的样本病例编码,采用盲法、对照试验设计,按各试剂盒说明书进行实验操作,用达瑞生物公司的试剂盒检测样本,美国雅培公司的促黄体生成素化学发光法测定试剂盒作为对照实验,差异样本用德国罗氏公司的促黄体生成素电化学发光法检测试剂盒作为复核实验。

1.2.2 样本正常参考值

达瑞生物公司试剂盒正常范围值:黄体期样

本:0.78~13.2 IU/L;卵泡期样本:2.0~12.45 IU/L;月经中期样本:9.24~93.77 IU/L;男性样本:0.54~13.10 IU/L;绝经期样本:7.7~58.5 IU/L。

雅培试剂盒正常值范围:黄体期样本:0.56~14.00 IU/L;卵泡期样本:1.80~11.78 IU/L;月经中期样本:7.59~89.08 IU/L;男性:0.57~12.07 IU/L;绝经期样本:5.16~61.99 IU/L。

罗氏试剂盒正常值范围:黄体期样本:1.0~11.4 IU/L,卵泡期样本:2.4~12.6 IU/L;月经中期样本:14.0~95.6 IU/L;男性样本:1.7~8.6 IU/L;绝经期样本:7.7~58.5 IU/L。

1.2.2 统计处理

利用SPSS 13.0统计软件进行一致性及相关性分析,用Medcalc软件进行Bland-Altman定量分析。

2 结果

2.1 血清样本的检测结果分析

2.1.1 一致性分析

与雅培公司试剂盒比较,达瑞生物公司试剂盒检测283例血清样本的异常符合率为95.8%,正常符合率为95.2%,总符合率为95.4%,*Kappa*值为0.898($P<0.01$)(表1)。

表1 临床检测血清统计归纳表

Table 1 Statistical table of clinical detection of serum

试验	对照试剂盒		合计
	异常	正常	
达瑞生物公司试剂盒	异常	91	100
	正常	4	183
合计	95	188	283
符合率(%)	95.8	95.2	95.4

2.1.2 相关性分析

对达瑞生物公司试剂盒和对照试剂盒的临床检测结果相关性分析,其线性回归方程为 $Y=0.358+0.961X$,相关系数*r*值为0.988($P<0.01$)(图1)。

2.1.3 Bland-Altman分析

达瑞生物公司试剂盒与对照试剂盒测值的95%一致性界限为(-5.4, 5.8), 4.24%(12/283)的点在95%一致性界限以外,可见达瑞生物公司试剂盒与对照试剂盒具有较高的一致性。

2.1.4 差异样本分析

按照各医院设定的正常参考值及达瑞生物公

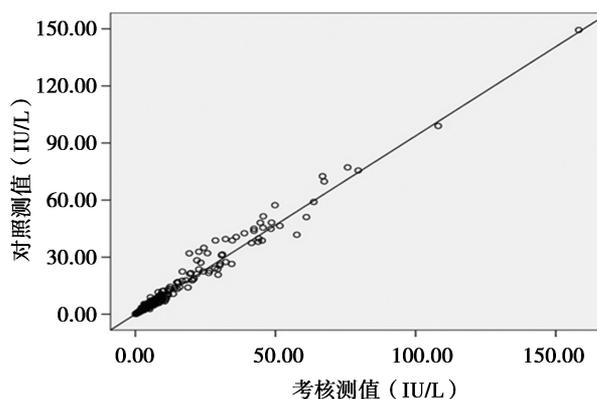


图1 血样测值相关性分析散点图

Figure 1 Scatterplot of correlation analysis of blood measurements

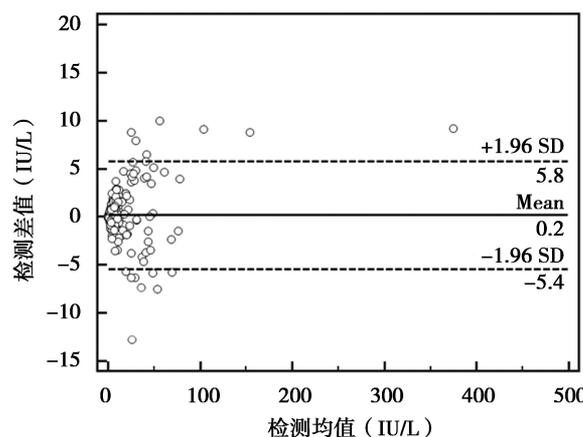


图2 2种试剂盒检测促黄体生成素的Bland-Altman分析

Figure 2 Bland-Altman analysis of 2 kit which detect LH

司试剂盒推荐的正常参考值,283例考核样本中,达瑞生物公司试剂盒和对照试剂盒对13例样本检测结果判断不一致,故对这13例差异样本用罗氏复核试剂盒进行检测。13例差异样本均在cut-off值附近,复核结果是有10例复核结果与考核结果一致,有3例复核结果与对照结果一致。

2.2 血清与血浆样本的测值对比

本次临床试验对52例同一个体的血清和血浆样本用达瑞生物公司核试剂盒进行检测,结果52例样本判定结果一致(表3)。与血清检测结果相比,血浆的检测结果*Kappa*值为1.00($P<0.01$),线性回归方程为 $Y=0.120+0.966X$,相关系数*r*值为0.999($P<0.01$)(图3)。

2.3 特异性样本试验分析

本次临床试验共纳入了90例特异性样本,分

表2 差异样本复核实验结果

Table 2 Results of re-experiment in differences samples

医院	样本 ID 号	生理期	对照试剂盒		考核试剂盒		复核试剂盒	
			检测值(IU/L)	结果	检测值(IU/L)	结果	检测值(IU/L)	结果
厦门大学 附属第一医院	21	月经中期	9.435	正常	8.61	异常	10.01	异常
	33	卵泡期	14.46	异常	12.42	正常	13.47	异常
	52	月经中期	7.946	正常	6.74	异常	7.606	异常
	66	月经中期	10.52	正常	9.5	异常	9.355	异常
	105	卵泡期	1.792	异常	2.19	正常	3.44	正常
	138	黄体期	13.75	正常	14.05	异常	10.11	正常
	155	绝经期	7.259	正常	5.88	异常	6.321	异常
	20	黄体期	0.585	正常	0.64	异常	0.435	异常
南方医科大学 南方医院	25	男	13.48	异常	11.98	正常	15.25	异常
	36	卵泡期	1.859	正常	1.93	异常	1.888	异常
	53	男	0.677	正常	0.45	异常	0.624	异常
	62	月经中期	8.921	正常	5.4	异常	8.24	异常
	64	卵泡期	12.25	异常	11.63	正常	11.04	正常

表3 同一病例血清血浆对比表

Table 3 Comparison of serum and plasma level of the same case

		血浆		合计
		异常	正常	
血清	异常	20	0	20
	正常	0	32	32
总数		20	32	52
符合率(%)		100	100	100

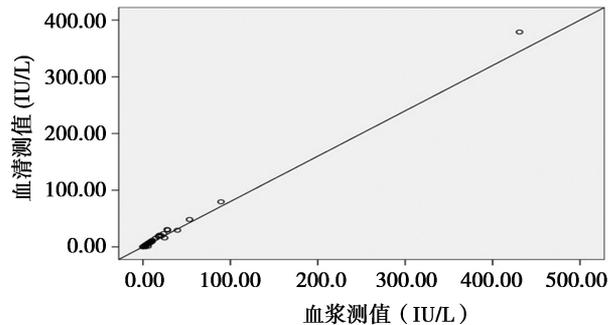


图3 血浆与对应血清测值相关性分析散点图

Figure 3 Correlation scatter plot of plasma and the corresponding measuring serum value

别为促卵泡生成激素(FSH)10例、促甲状腺激素(TSH)10例、人绒毛膜促性腺激素(HCG)10例、类风湿因子(RF)10例、抗核抗体(ANA)10例、人抗鼠抗体(HAMA)10例、溶血10例、脂血10例、黄疸10例,均使用达瑞生物公司试剂盒与对照试剂盒进行检测,两者检测结果均正常。

2.4 可靠性分析

本实验在对质控验证后方进行测试,质控结果表明标准差及浓度测值均符合质控标准要求,实验准确可靠。

3 讨论

在男性和女性体内,由正、负反馈机制对促黄

体生成素稳态进行调节,调节过程涉及到下丘脑、垂体、生殖器官、以及垂体和类固醇激素。促黄体生成素和其他垂体促性腺激素,卵泡刺激素在维护男性和女性的生殖系统的正常功能方面都发挥着非常重要的作用。一旦稳态失衡可导致各种疾病的发生,因此,检测促黄体生成素体内含量,对疾病诊断、预防及治疗都有重要的意义^[11-12]。

化学发光免疫分析法是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与化学发光作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术^[13-14],其具有灵敏度高、线性范围宽、操作简单及容易实现自动化

等特点,受到广大科研工作者和临床分析工作者的注意,显示了该技术将在现在及未来的免疫分析检测领域极其重要的作用。本研究中达瑞生物公司的促黄体生成素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)是采用双抗体夹心免疫分析方法,利用化学发光磁微球免疫技术,定量测定人血清或血浆中的LH含量,试剂盒采用吡啶盐化合物作为标记物,无放射性污染,不会造成对环境的危害^[15]。

本研究以美国雅培公司的促黄体生成素测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)作为对照试剂盒,对自行研发的试剂盒进行临床检测性能评价。一致性分析结果和Bland-Altman分析结果表明达瑞生物公司试剂盒与美国雅培试剂盒两种测量方法结果具有较好的一致性,两种方法在临床上可以互相代替使用。但可能由于差异样本的LH测值在正常参考值的临界值附近,导致了有些样品不同试剂盒判断结果的不一致,故需要多次重复测定或进行第三方检测并作临床追踪检测,才可明确真实的实验结果和临床意义,用达瑞生物公司试剂盒和复核试剂盒进行差异样本分析,由于样本数较少,故与美国雅培试剂盒检测比较,达瑞生物公司试剂盒检测结果是否更为准确可靠还需进一步深入研究。本实验发现达瑞生物公司试剂盒对血清和血浆的检测结果一致性好,可适用于血清及血浆样本的检测,而且特异性样品实验分析结果表明达瑞生物公司试剂盒检测血样时不受促卵泡生成激素、促甲状腺激素、人绒毛膜促性腺激素、类风湿因子、抗核抗体、人抗鼠抗体、溶血、脂血、黄疸的干扰,特异性较好。综上所述,达瑞生物公司试剂盒与目前临床广为应用的进口试剂盒在指标检测性能上具有很好的等效性,可替代国外昂贵试剂应用于临床检测和基础医学的研究。

参考文献

- [1] 李蓉, 乔杰. 助孕技术在输卵管性不孕的应用和评价[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(8):570-572.
- [2] Stefano P, Susanna S, Karen G, et al. Pregnancy complications in spontaneous and assisted conceptions of women with infertility and subfertility factors. A comprehensive review[J]. Reproductive BioMedicine Online, 2016, 8(7):1472-1483.
- [3] Rachel T, Gisele C, Lilian A, et al. Socioeconomic profile of couples seeking the public healthcare system (SUS) for infertility treatment[J]. JBRA Assisted Reproduction, 2016, 20(3):112-117.
- [4] Chandra A, Martinez GM, Mosher WD, et al. Fertility, family planning, and reproductive health: Data from the 2002 National Survey of Family Growth[J]. Vital Health Statistics, 2005, 23(25):1-160.
- [5] Mascarenhas NM, Flaxman SR, Boerma T, et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health survey [J]. Ophthalmology, 2012, 120(12):2377-2384.
- [6] Chachamovich JR, Chachamovich E, Ezer H, et al. Investigating quality of life and health-related quality of life in infertility: a systematic review[J]. J Psychosom Obstet Gynaecol, 2010, 31(2):101-110.
- [7] Sunderam S, Kissin DM, Crawford SB, et al. Assisted reproductive technology surveillance-united states, 2013[J]. MMWR Surveill Summ, 2015, 64(11):1-25.
- [8] 方玉, 陈洁瑛, 陈红. 不孕症妇女自然周期过早内源性黄体生成素峰的发生与排卵障碍的相关性研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(2):162-165.
- [9] 陈海斌. 化学发光免疫分析技术及其进展[J]. 中国医学装备, 2011, 8(5):56-59.
- [10] Gao Y, Liu X, Qi W, et al. Highly efficient quenching of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(ii) electrochemiluminescence by ozone using formaldehyde, methylglyoxal, and glyoxalate as co-reactants and its application to ozone sensing[J]. Analyst, 2015, 140(12):3996-4000.
- [11] Begum N, Anwary SA, Alfazzaman M, et al. Role of serum follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone and prolactin levels in azoospermic male partner of subfertile couple [J]. Mymensingh Med J, 2016, 25(2):303-307.
- [12] Anwary SA, Fatima P, Alfazzaman M, et al. Serum prolactin level of subfertile women [J]. Mymensingh Med J, 2016, 25(1):91-95.
- [13] 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1):3-10.
- [14] 金茂俊, 邵华, 金芬, 等. 化学发光免疫分析方法的研究及应用[J]. 农产品质量与安全, 2012, 2:42-46.
- [15] 陆龙飞, 葛胜祥, 张军. 化学发光免疫分析法研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(5):289-295.

北京市3 221例门诊患者HPV 13个高危型别分型的实验研究

张静 郭建巍* 陈昌国 李文军 马志家

[摘要] **目的** 了解北京市门诊患者人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)13个高危型别的感染情况及在不同年龄、宫颈疾病中的分布情况。 **方法** 收集2012年4月到2014年2月门诊就诊患者的宫颈分泌物或泌尿生殖道分泌物标本,利用荧光定量PCR方法进行检测,用SPSS 16.0软件进行统计分析。 **结果** 在3 221例门诊患者中,HPV 13个高危型别的检出率为33.7%,其中男性患者650例,检出率为22.8%;女性患者2 571例,检出率为36.5%。年龄18~22岁、23~44岁和45~80岁组男性HPV 13个高危型别的检出率分别为14.7%、21.2%和37.9%,女性检出率分别为41.2%、33.4%和44.4%。 **结论** 北京市3 221例门诊患者,HPV高危型总体阳性率较高的型别为HPV16型、HPV52型和HPV58型,女性感染HPV13个高危型别总阳性率高于男性;HPV高危型在男性与女性各个年龄组中的分布有差异,但HPV16型和HPV58型在两组中阳性率都较高;在男性门诊患者中,随着年龄的增加阳性率逐渐增加。对男性13个高危型别阳性者进行早期干预,在降低其女性伴侣宫颈疾病的发病率中具有重要意义。

[关键词] 人乳头瘤病毒; 分子分型; 宫颈疾病

Experiment research of HPV 13 high-risk types in 3 221 outpatients of Beijing

ZHANG Jing, GUO Jianwei*, CHENG Changguo, LI Wenjun, MA Zhijia

(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing, China, 100048)

[ABSTRACT] **Objective** To study high-risk HPV typing and its distribution in 3 221 outpatients of Beijing. **Methods** Samples from the outpatient department from April 2012 to February 2014 were collected according to sample collection guide. Detection and typing were performed with fluorescence quantitative PCR method. Data were analyzed with statistically soft SPSS 16.0. **Results** Of all the 3 221 cases, the positive rate is 33.7%. 650 cases were male patients with the positive rate of 22.8%, 2 571 cases were female with the positive rate of 36.5%. According to age, all patients were divided into 3 groups. 18~22 years old, 23~44 years old and 45~80 years old. The positive rates of each group of male patients were 14.7%, 21.2% and 37.9% respectively, and the positive rates of female patients of each group were 41.2%, 33.4% and 44.4% respectively. **Conclusion** The main types of high-risk HPV in 3 221 outpatients of Beijing were HPV16, HPV52 and HPV58. The positive rate of female patients were higher than that of male patients. Although different groups of males and females have different distribution in typing, they are still in accordance with main types of HPV16 and HPV58. The infection rate of male patients increased along with the increasing age. Treatments with male positive patients have impairment significance for decrease cervical diseases.

[KEY WORDS] Human papilloma virus; Molecular typing; Cervical disease

宫颈癌是中国女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率仅次于乳腺癌,并有明显增高及年轻化的趋势^[1]。据研究报道宫颈癌的发生与高危型人

乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的持续性感染有关^[2-3]。HPV的型别分布随不同地理位置和不同种族而存在一定差异^[4]。本研究拟通过对

作者单位:中国人民解放军海军总医院检验科,北京 100048

*通讯作者:郭建巍, E-mail: jwkuo@sohu.com

北京市 3 221 例不同性别、年龄的门诊患者感染 HPV 的情况进行分子生物学检测,以期获得 HPV 13 个高危型别在北京市不同年龄、宫颈类疾病中分布情况,为北京市宫颈癌等相关疾病的有效防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2012 年 4 月到 2014 年 2 月不同性别和年龄门诊患者的宫颈分泌物或泌尿生殖道分泌物标本,保存于含有保存液的转运瓶中,及时送检,当日不能检测的保存于 -20°C 冰箱,一周内完成检测。

1.2 仪器及试剂

本次实验使用上海宏石生物技术有限公司提供的 SLAN-9P 荧光定量 PCR 仪和由上海之江生物科技股份有限公司提供的 HPV 分型试剂。

1.3 核酸提取

用涡涡振荡器充分混匀采集的样本,取 1 mL 加入 1.5 mL 离心管中 13 000 rpm 离心 5 min,弃上清留沉淀,再加入 1 mL 标本与沉淀充分混匀后同上操作。沉淀用 1 mL 无菌生理盐水洗涤后离心 13 000 rpm 离心 5 min 弃上清。沉淀直接加入 100 μL 核酸提取液充分混匀,沸水浴 10 min, 13 000 rpm 5 min,取上清做 PCR 反应模板,阴、阳性对照同上操作。

1.4 PCR 扩增

循环参数:适宜变性的条件为 94°C 2 min;退火的温度为 93°C ,反应时间为 2 min;最后在 62°C 延伸 31 s,循环 40 次,在 60°C 单点荧光检测。

1.5 结果判断

若待检样本混合液 1 (16、56、31 型+IC) 的 CY5 通道的 Ct 值 ≤ 32 ,且在混合液 1 的其余通道以及其余混合液各通道循环阈值栏显示 No Ct,检测样本判定为阴性;如果待检样本 Ct 值在 38~40 之间,需重复测定,如仍在 38~40 之间,且扩增曲线呈典型的 S 型,则结果判定为阳性;若非典型的 S 型曲线,则结果判定为阴性。

1.6 分析方法

数据处理采用统计学软件 SPSS 17.0 软件包,用卡方检验, $P < 0.05$ 差别有统计学意义, $P > 0.05$ 差别无统计学意义。

2 结果

2.1 3 221 例临床标本中 HPV13 个高危型别的分布情况

本文共收集门诊标本 3 221 例,从结果中可看出 HPV13 个高危型别阳性率由高到低依次为 HPV16, 52, 58, 56, 39, 51, 31, 18, 35, 36, 33, 68, 16 型。阳性率较高的型别为 HPV16, 52, 58 型,均大于 5%,其它型别阳性率均在 3% 以下。将 HPV13 个高危型别进行卡方检验, HPV16, 52 和 58 型与其它型别间差别具有统计学意义,而这 3 种型别差别无统计学意义(图 1)。

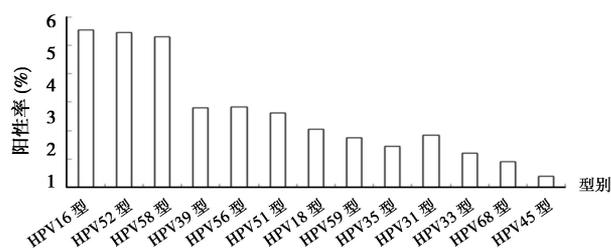


图 1 3 221 例门诊患者中 HPV 各个型别的阳性分布情况
Figure 1 The types of HPV positive distribution in 3 221 outpatients

2.2 HPV13 个高危型别在不同性别中的分布情况

本次研究共收集临床病例 3 221 例,出现至少一项阳性患者 1 086 例,阳性率为 33.7%,其中男性患者 650 例,阳性人数 148 例,阳性率 22.8%;女性患者 2 571 例,阳性人数 938 例,阳性率 36.5% (表 1)。女性患者的阳性率明显高于男性,对其进行卡方检验, $P < 0.05$,差别具有统计学意义。女性患者中阳性率较高的型别为 HPV16, 52 和 58 型,均大于 5%,与其它型别相比差别有统计学差异,而这三者间无统计学差异,与总体分布情况一致。而对于男性患者,型别间无统计学差异。但男性 HPV 型别的阳性分布情况与总体不同,所以男性感染 HPV 仍不能忽视。

2.3 HPV13 个高危型别在不同年龄组中的分布

本研究中按年龄分为 3 组,分别为婚前期 (18~22 岁)、婚育期 (23~44 岁) 和中老年 (45~80 岁) (表中分别用 A、B、C 表示)。在女性患者 HPV13 个高危型别在 3 个年龄组中的阳性率分别为 41.2%、33.4% 和 44.4% (表 2),婚前期组与婚育期组用卡

表1 HPV13个高危型别在不同性别中的分布情况(%)
Table 1 The distribution of 13 high-risk types in different sex(%)

性别	16型	18型	31型	33型	35型	39型	45型	51型	52型	56型	58型	59型	68型
男	0.99	0.37	0.56	0.22	0.06	0.28	0.12	0.31	0.25	0.28	0.71	0.4	0.03
女	5.7	2.1	1.63	1.24	1.71	3.19	0.17	2.88	6.53	3.19	5.21	1.67	1.09

方检验, $P>0.05$ 差别无统计学意义; 婚育期组与中老年组比较, $P<0.05$ 差别有统计学意义; 婚育期组与中老年组比较, $P>0.05$ 差别无统计学意义。而男性患者 HPV13 个高危型别在 3 个年龄组中的阳性率分别为 14.7%、21.2% 和 37.9% (表 3), 男性有

随着年龄增加感染率逐渐升高的趋势。婚前期组与婚育期组用卡方检验, $P>0.05$ 差别无统计学意义; 婚育期组与中老年组比较, $P<0.05$ 差别有统计学意义。

表2 HPV13个高危型别在女性不同年龄组的分布情况(%)
Table 2 The distribution of 13 high-risk types in different age groups in female(%)

型别	16型	18型	31型	33型	35型	39型	45型	51型	52型	56型	58型	59型	68型
A组	5.88	2.94	2.94	0	0	0	0	8.82	11.7	0	5.88	2.94	0
B组	5.88	2.45	1.25	1.08	1.31	3.19	0.51	2.85	5.47	3.08	4.16	1.42	1.03
C组	6.27	5.50	2.17	1.66	2.69	3.58	0	2.81	8.70	3.84	7.42	2.3	1.28

表3 HPV13个高危型别在男性不同年龄组的分布情况(%)
Table 3 The distribution of 13 high-risk types in different age groups in male(%)

型别	16型	18型	31型	33型	35型	39型	45型	51型	52型	56型	58型	59型	68型
A组	1.64	0	3.28	0	0	0	1.64	3.28	3.28	0	1.64	0	0
B组	4.59	1.72	2.49	1.15	0.26	1.15	0.57	0.96	0.96	1.34	3.63	2.1	0.19
C组	10.6	4.55	4.55	1.52	0	3.03	0	4.55	1.52	1.52	3.03	3.03	0

2.4 HPV13个高危型别在宫颈疾病中的分布

3 221 例门诊患者中有 2 426 是宫颈疾病患者, 其中感染 HPV 的人数为 885 例, 阳性率为 36.5% (图 2)。HPV13 个高危型别阳性率较高的型别为 HPV52、HPV16 和 HPV58 型, 阳性率均大于 5%, 其它型别阳性率均在 3% 以下。与总体比较, 阳性率较高的型别较一致。

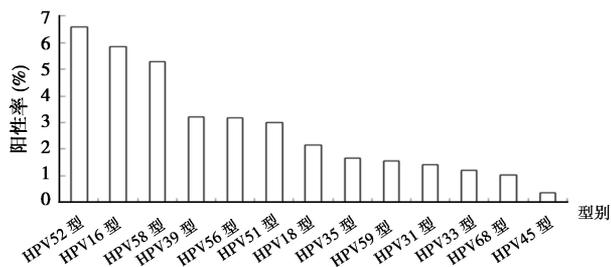


图2 HPV13个高危型别在宫颈疾病中的分布
Figure 2 The distribution of 13 high-risk types in Cervical disease

3 讨论

HPV 是一种嗜粘膜和皮肤的双链 DNA 病毒, 具有宿主及组织特异性, 能引起人类皮肤多种疣状瘤或疣及粘膜生殖道上皮增生性损伤, 和人类多种肿瘤的发生关系较为密切。根据致癌能力的大小, HPV 可分为高危型、中危型及低危型, 高危型 HPV 主要引起宫颈不典型增生和原位癌如宫颈癌。

人是 HPV 的唯一宿主, 在普通人群中 HPV 感染非常普遍, 据文献报道感染率 20%~46%^[5]。本研究调查的北京市 3 221 例门诊患者标本中, 阳性人数 1 086 例, 总阳性率为 33.7%, 与文献报道相符^[5]。北京市 3 221 例门诊患者中, HPV13 个高危型别阳性率由高到低依次为 HPV16 型、HPV52 型、HPV58 型、HPV56 型、HPV39 型等, 以 HPV16 型、HPV52 型、HPV58 型为主, 阳性率均大于 5%,

其它型别阳性率均在3%以下。

虽然目前世界范围内 HPV 基因分型结果存在明显的地域差异^[6],但 HPV16 型阳性率依然最高。本实验室结果与世界范围内的研究结果一致^[7],也与广东潮州地区农村妇女宫颈癌筛查主要型别一致^[8]。有研究发现 HPV16 型是最难清除的基因型,女性感染 HPV16 型后,在随后的6年发展成为 CIN II 级的风险比未感染者高 210 倍^[9]。此外 HPV52 型和 58 型仅次于 HPV16 型,符合亚洲人群的研究结果,也与卢建明等^[10]对中国地区人群的研究结果相一致。

在 3 221 例门诊患者中,女性感染 HPV13 个高危型别的总体阳性率高于男性,男女不同年龄组比较女性阳性率也较高,可能与女性的生理结构更易于 HPV 感染有关。虽然男性 HPV 感染的阳性率较低,但 HPV16 型和 HPV58 型阳性率依然较高,型别分布与女性也有所不同,所以男性感染者也不容忽视^[11]。HPV13 个高危型别感染率在各个年龄组之间有明显的差异,特别是男性,有随着年龄增加阳性率逐渐增加的趋势。在女性 HPV 的感染中,HPV 的感染率呈两头增高的现象,与韩品等^[12]的报道一致,这种情况可能与婚前期组性行为较活跃有关,缺乏保护。近年来育龄期女性体检意识增强,政府优生优育的提倡以及孕前保健的普及,婚育期女性备孕前及时进行了筛查与治疗,在减少 HPV 感染率上有一定的作用。男性感染 HPV 后,可分为临床、亚临床和潜伏感染,亚临床感染可能经过几月会自行消退或消失,也可能转变为显性湿疣,或者持续存在甚至伴其一生,是尖锐湿疣复发的危险因素。在男性 HPV 感染中,中老年组的感染率最高,一方面由于男性 HPV 的亚临床感染和潜伏感染,另一方面可能与性行为混乱有关。男、女中老年组的感染率均高于同性别的婚育组,可能是随着年龄增长体内原有的免疫力逐渐消失或激素水平变化而导致潜伏期病毒复活有关^[13]。一方面与免疫力下降相关,导致清除病毒的能力下降,另一方面可能与本文纳入例数较少有关。

目前已被鉴定 HPV 的亚型多达 100 多种,其中有 40 余种与人类生殖器皮肤黏膜病变相关^[14],也和人类多种肿瘤的发生关系较为密切^[15-16]。1995 年,国际癌症研究机构专题讨论会通过 HPV 感染是宫颈癌的主要原因。在本研究中,2 571 例

女性门诊患者中确诊为宫颈疾病的 2 426 人,占总人数的 94.4%,宫颈疾病中 HPV 的感染率为 38.7%。致癌能力最强的 HPV16 型在宫颈疾病的发展中有极大的促进作用,具有很强的致癌性,在临床中应引起高度的重视。HPV 感染宫颈后,从早期的损害到宫颈癌的整个发生过程约 10 年,HPV 感染后如果及时进行 HPV 的基因分型,阳性者进行早期干预,可对宫颈疾病的早发现、早预防、早治疗提供帮助,同时男性 HPV 感染对女性宫颈癌的发生中也起着非常重要的作用,对男性感染者的性伴侣进行检测,阳性者进行早期干预对降低宫颈疾病的发病率也具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] Lalya L, Maqhous A, Marnouche E, et al. Rapidarc for centrally recurrent cervical cancer in the vaginal cuff following primary surgical therapy [J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 22(3):21-27.
- [2] Gok M, Heideman DAM, van Kemenade FJ, et al. HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not Attend cervical screening: cohort study [J]. *BMJ*, 2010, 3(40):1040-1045.
- [3] Szarewski A, Cadman L, Mesher D, et al. HPV self-sampling as an alternative Strategy in non-attenders for cervical screening - a randomised controlled Trial [J]. *Br J cancer*, 2011, 104(6):915-920.
- [4] Kitchener HC, Gilham C, Sargent A, et al. A comparison of HPV-DNA testing and liquid based cytology over three rounds of primary cervical screening: extended follow up in the ARTISTIC trial [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(6):864-871.
- [5] Meisels A, Fovtin R, Rcy M. Condylomatons lesions of the cerix II Heytologic, colposcopic and hiostpa-theologic study [J]. *Acat Cloty*, 1997, 21(3):387-390.
- [6] 张丽娜,周蓓蓓,陈昕华,等.区域性人乳头瘤病毒基因型别检测临床研究[J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(16):1147-1149.
- [7] Abdullah A, Qasim M, Shafiq M, et al. Molecular diagnosis and phylogenetic analysis of human papillomavirus type-16 from suspected patients in Pakistan [J]. *Infections Agents and Cancer*, 2016, 11(1):1-7.
- [8] 朱岩,廖旭东,段纯,等.深圳地区 5019 例女性 HPV 感染基因分型情况调查 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(6):690-691. (下转第 72 页)

数字PCR在几种常见人类传染病研究中的应用

蒋析文* 朱小亚 高秀洁 周其伟

[摘要] 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是现代分子生物学的基础,被广泛应用于核酸的定性及定量分析,是人类传染病病毒核酸分析的核心技术。数字PCR(digital polymerase chain reaction, dPCR)作为一种新兴的核酸定量分析技术,具有高精度、高精密度等优点。它打破了传统实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术的局限,不依赖于标准曲线,直接检测样本中靶片段的拷贝数,是一种更为简单且实用的核酸绝对定量分析技术。本文就近几年该技术在人类传染病病毒核酸定量分析方面的研究进行概述。

[关键词] 数字PCR(dPCR); 病毒; 核酸

The applications of digital PCR on the researches of several common human infections

JIANG Xiwen*, ZHU Xiaoya, GAO Xiujie, ZHOU Qiwei

(DaAn Gene CO., Ltd. of SunYat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] Polymerase chain reaction (PCR) is the foundation of molecular biology and the core technology for virus nucleic acid detection of human infectious, which can be used for qualitative and quantitative analysis of nucleic acid. Digital PCR is a new technology to quantify nucleic acid, with so many attractive advantages such as high accuracy, precision, and so on. It could give the copy numbers of the sample target fragment directly. Digital PCR is a simpler and more practical method for quantitative analysis of nucleic acid than traditional qPCR. The new technology broke through the limitations of traditional qPCR, working without standard curve. In this paper, the researches of digital PCR on nucleic acid detection of human infectious diseases in recent years are reviewed briefly.

[KEY WORDS] Quantitative real-time PCR (dPCR); Virus; Nucleic acid

数字PCR(digital polymerase chain reaction, dPCR)诞生于上个世纪90年代末,该技术将反应体系分散到许多独立的反应单元,使得每个反应单元中只包含1分子的靶片段或者不包含靶片段,经热循环反应,直接或通过泊松分布分析阳性反应单元的数目,计算样本中靶片段的起始拷贝数。该技术使用与实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)相同的引物以及探针,无需绘制标准曲线且不依赖于Ct值,对样品中靶片段进行绝对定量,已广泛用于基因差异表达、下一

代测序、微生物检测及临床诊断等领域^[1-6]。

病毒载量是病毒感染诊断和治疗的一个关键指标,一方面用于评价高效抗逆转录病毒治疗的疗效,另一方面用于筛查血清学检验中由窗口期造成的漏检^[7-8]。qPCR被广泛应用于病毒载量的分析,该方法虽然简易、快速且成本较低,但在靶片段含量较低或抑制物存在等情况下精密度和灵敏度低,且依赖于标准曲线和Ct值^[9]。核酸检测方法的精密度对于传染病的诊断治疗极为重要,即使病毒载量处于低拷贝水平,其少量增加也

作者单位:中山大学达安基因股份有限公司,广东,广州 510665

*通讯作者:蒋析文, E-mail: yuanyecat@vip.sina.com

注:蒋析文,朱小亚和高秀洁为并列第一作者

具有重要临床意义。据研究报道,当人类巨细胞病毒感染患者体内该病毒的载量从低于 200 copies/mL 增加到高于 200 copies/mL 时会表现出明显的临床症状,而 qPCR 由于精密度不够高,无法检测出这一变化^[10-13]。dPCR 作为一种新型的核酸分子定量检测技术,具有高精密度的特点,完全可以弥补传统 qPCR 在精密度方面的缺陷^[14-16]。临床样本如血液、粪便、石蜡包埋样本等通常比较复杂,常含有大量的 PCR 抑制剂,研究发现 dPCR 具有对抑制物的耐受能力强的优点,其扩增效率受抑制物影响小,更适合用于检测复杂的临床样本如粪便、组织样品等^[17]。此外一些研究表明 dPCR 还具有灵敏度高的优点,在检测稀有突变时灵敏度达 0.005%,约为 qPCR 的 200 倍^[18]。因此,该技术逐渐被用于病毒载量分析相关研究,本文就近几年 dPCR 在几种常见传染病研究上的应用进行介绍,以期为该技术的发展及在传染病方面的应用提供参考。

1 dPCR 平台简介

数字 PCR 的概念于上个世纪末由 Vogelstein 等^[19]提出,具有独特的优势和广阔的应用前景,已飞速地商业化发展。目前基于数字 PCR 技术的商业化平台主要有 2 种,一种是芯片式的 dPCR (chip digital PCR, cdPCR),该平台以美国 Fluidigm BioMark™HD 和 Life Technologies QuantStudio™3D 系统为代表,采用微流控技术将混合均匀的 PCR 反应体系分成若干个独立的反应单元,并将这些反应单元传送到芯片反应室中进行 PCR 反应,利用类似基因芯片方法分析每个反应室的荧光信号,计算靶片段的数目。另一种是由美国 Bio-Rad 和 RainDance 先后引进的一个微滴式 dPCR 系统 (droplet digital PCR, ddPCR),该平台将反应液均匀地分散到许多由乳液包裹的微型液滴中 (Bio-Rad QX200 为 2 万个, RainDance 为 100~1 000 万个),每个液滴都是一个独立的反应单元,通过分析带有荧光信号的液滴数,计算荧光信号的液滴与总液滴的比例,最终计算出靶片段的拷贝数,这种系统与 cdPCR 相比,原理和操作都更为简单,也更为经济,目前已得到广泛的应用。

2 dPCR 在几种常见传染病中的应用

2.1 dPCR 在人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 分析中的研究应用

自 1981 年获得性免疫缺乏综合征 (acquired im-

mune deficiency syndrome, AIDS) 被发现以来,全球已经有 2 000 多万人死于此病,我国于 1985 年发现了首例 HIV 感染者,至 2014 年底累计报告的病例有 49.7 万例,其中接受治疗的患者约有 34.4 万^[20]。对于 AIDS 的治疗,目前公认的效果最好的方法为高效抗逆转录病毒治疗 (highly active anti-retroviral therapy, HAART),该方法使 AIDS 从致死性传染病转变成一种可以被治疗的慢性疾病。2013 年, Deborah 等^[21]报道了首例被功能性治愈的 HIV 感染案例,这名被治愈的 HIV 感染者是一个刚出生的婴儿,在出生 30 h 后被确诊感染了该病毒,在经过 18 个月的抗逆转录病毒治疗后发现其体内 HIV DNA 和 HIV RNA 的拷贝数及 HIV 特异性抗体低于检测限,最后利用 ddPCR 技术确认该婴儿被功能性治愈。病毒载量是评价 HAART 疗效的重要指标之一, HIV DNA 被广泛地用于衡量患者 HIV 病毒储存库的状态,而 2-LTR (HIV 前病毒核酸在宿主细胞中存在的一种形式) 常反映患者 HIV 病毒动力学特征。据报道, ddPCR 在分析 HIV DNA 和 2-LTR 拷贝数时均具有较高精密度,检测 HIV DNA 的精密度为 qPCR 的 5 倍,检测 2-LTR 的精密度更高,为 qPCR 的 20 倍^[22]。但也有研究指出 ddPCR 检测低水平 2-LTR (HIV 前病毒核酸在宿主细胞中存在的一种形式) 时变异度较大^[23],由于该研究检测的样本数较少,并没能解释其变异度大的原因。由此可见, ddPCR 确实具有精密度高的优点,但在检测低水平核酸时,其检测性能还需进一步的研究来验证。细胞关联的 HIV-1 RNA (CA HIV-1 RNA) 被认为是评估病毒量及抗逆病毒疗效的一个潜在的标志。Kiselinova 等^[24]对 44 个 HIV 患者的外周单核细胞样本中的 CA HIV-1 RNA 拷贝数进行检测,发现 ddPCR 在检测过程中容易产生假阳性,进而导致其线性关系、精确度和敏感性等方面不及半巢式定量 PCR。导致 PCR 出现假阳性原因有很多,如样品间的交叉污染、气溶胶污染等, dPCR 灵敏度较高,即使反应体系中存在极少量的污染也会产生假阳性,因此使用 dPCR 时应更加规范实验操作和实验室设计,以避免假阳性的产生。

2.2 dPCR 在乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 核酸检测中的应用

HBV 呈世界性流行,全世界各地区均有不同程度的 HBV 感染。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报道,全球曾经感染过

HBV 的人约有 20 亿,每年大约有 100 万人死于 HBV 引起的肝硬化、肝衰竭及原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 等急性和慢性肝病^[25-26]。Huang 等^[27]通过 ddPCR 技术分析感染 HBV 的 HCC 患者石蜡包埋的肝脏组织中 HBV DNA 拷贝数与肿瘤转移、肝癌疾病历程及血清中甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)含量变化的相关性,同时对该技术的检测性能进行评价,结果表明 HBV 感染是诱导 HCC 发生与发展的关键因子, ddPCR 灵敏度高且特异性强。qPCR 为 HBV DNA 含量分析的常用方法,但用于检测复杂的临床样本时,如石蜡包埋的组织样本,常因量化循环数接近 PCR 扩增反应的终点而难以精确定量, ddPCR 技术在检测中不依赖于 Ct 值,不受量化循环数的影响,因而更适合用于检测复杂的临床样本。cccDNA 是 HBV 病毒在侵入人体肝细胞后,其部分双链环状的 DNA 分子以负链为模板延长修补正链的缺口形成的完整共价闭合环状 DNA 分子。它在细胞中作为 HBV 病毒转录和复制的模板,在病毒持续感染、抗逆转录病毒治疗后病毒再活化及病毒耐药性方面发挥重要作用。研究发现 ddPCR 在检测细胞中 cccDNA 方面具有明显的优势。对 HepG2.215 细胞 DNA 中 cccDNA 含量进行分析,发现在 cccDNA 含量较低时 qPCR 精密度急剧下降,且 qPCR 检测的灵敏度较低,最低检出限为 10 ng/ μ L,而 ddPCR 的最低检出限为 1 ng/ μ L^[28]。

2.3 dPCR 在检测丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 研究中的应用

HCV 是一种单链 RNA 病毒,其基因极易发生变异,可分为 6 个基因型及多个亚型。HCV 感染性极强,在全球普遍流行,据 WHO 统计分析,全球大约有 1.85 亿人感染该病毒,每年约有 35 万人死于丙型肝炎及其并发症^[29]。持续病毒学应答 (sustained virological response, SVR) 是评价丙型肝炎治疗药物疗效的重要指标,而快速病毒学应答 (rapid virological response, RVR) 和早期病毒学应答 (early virological response, EVR) 的精确判定对 SVR 的预测尤为重要,因此高灵敏度的 HCV 载量检测方法对辅助 HCV 的治疗极为关键。目前我国已有批准生产的 HCV RNA 定量检测试剂盒,但灵敏度较低,与我国食品药品监督管理局制定的标准 (最低检出限 < 50 IU/mL) 相差甚远^[30],根本不能满足临床的需求。Roche TaqMan HCV 检测试剂盒在国际

上被公认为是 HCV RNA 定量检测性能较好的试剂盒之一,其灵敏度较高,检测下限为 15 IU/mL。比较分析 dPCR 和 Roche TaqMan 检测 HCV RNA 的性能,发现 dPCR 在其可检测的范围内保持良好线性关系和精密度,但在检测低水平 HCV RNA 时,与 Roche TaqMan HCV 存在较大差异,在 18 个 HCV RNA 水平低于 15 IU/mL 的样本中, dPCR 检测出 22.2% 的样本中 HCV RNA 高于 15 IU/mL^[31]。目前, dPCR 在 HCV 病毒载量检测方面的研究报道相对较少,还未见有研究对该技术检测 HCV 载量的灵敏度进行评价。HCV 基因组容易发生突变,其编码的核心氨基酸区发生突变会导致肝病的恶化,是演变为 HCC 的重要因素。ddPCR 检测突变灵敏度较高, Mukaide 等^[16]采用 ddPCR 的方法对 HCV 编码的核心氨基酸区的突变进行了分析,同时也将方法与 TaqMan HCV 检测方法进行了比较,发现 ddPCR 在 2.5~10⁵ 拷贝数的检测范围内线性关系良好且灵敏度较高,最低检出限达 0.005%, 该结果预示着 ddPCR 在定量分析基因突变方面具有显著优势,有望作为新一代基因突变定量分析工具应用于病毒基因组多态性分析领域。

2.4 dPCR 在其他传染病方面的应用

人类巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 为疱疹病毒科 (herpesviruses) 双螺旋 DNA 病毒,因其感染细胞后,导致细胞肿大而且细胞核内具有巨大的包涵体,所以被称为巨细胞病毒。该病毒在我国广泛流行,研究表明,当机体处于免疫缺陷或免疫系统处于抑制状态时极易感染 HCMV,如胎儿、新生儿及孕妇等,除此之外,接受器官或骨髓移植的患者也极易感染此病毒^[32]。目前,基于实时荧光定量 PCR 技术检测 HCMV DNA 的试剂盒已经广泛应用于临床检验,但其检测的灵敏度和精密度有时并不能满足临床的实际需求。采用 qPCR 和 ddPCR 对 50 个 HCMV 血浆样本、梯度稀释的 HCMV 标准品 (WHO/NIST) 进行定量分析,发现 dPCR 检测 HCMV 的精密度较好,但其灵敏度却不及 qPCR,还需进一步的优化才能更好的用于 HCMV DNA 定量分析^[33]。另一项研究也利用 qPCR 和 ddPCR 技术分析了 HCMV 血浆样本^[34],但该研究发现 ddPCR 灵敏度与 qPCR 并无差异,且其精密度显著高于 qPCR。这 2 项研究表明, ddPCR 在检测 HCMV 时精密度确实较好,但其灵敏度却没有表现出明显的优势,还需要进一

步的优化,以提高其灵敏度。单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是一种双链线性 DNA 病毒,具有囊膜结构,它能引起人类皮肤性疾病。人类是 HSV 病毒的唯一宿主,它主要通过感染人类面部和生殖器部位的皮肤和黏膜,引起口角膜炎、唇疱疹、口腔黏膜炎、生殖器疱疹等疾病,HSV 感染还与多种疾病关系密切,如流产、胎儿畸形、宫颈癌及阿尔茨海默症等^[35]。Azizi 等^[36]利用 dPCR 的方法通过检测 HSV-1 转基因细胞系 AV529-19 中 HSV 编码区 UL5 和 UL29 的的拷贝数评价 HSV-1 转基因细胞系 AV529-19 的稳定性,同时对 dPCR 的检测性能进行评价,结果表明 dPCR 的稳定性、精确度以及精密度良好。dPCR 在传染病方面的应用起步较晚,目前仅在几种常见传染病领域的研究中有应用。尽管如此,dPCR 已表现出其显著的优势和特点,随着该技术的不断创新与发展,在传染病领域的应用前景将会越来越广阔。

3 展望

传染病病毒载量的检测对于传染病的早期诊断、治疗效果评价、病情预测及监测极为重要。而检测方法的灵敏度、精密度和变异度等对检测结果的影响不容忽视,高性能的检测方法有助于对人类传染病的预测及监管,以缩短检测的窗口期并及时的予以治疗。数字 PCR 不依赖于标准曲线和质控品,直接对核酸进行绝对定量,该技术目前已经逐步的被用于多个领域的研究,且表现出巨大的优势,大量的研究发现与传统 qPCR 相比,dPCR 在检测稀有突变、拷贝数变异及肿瘤相关的 mi-RNA 定量分析方面性能显著提高。dPCR 技术发展十分迅速,第一款数字 PCR 由 Fluidigm 公司于 2006 年推出,可同时检测 3.7 万个独立的反应。随后,QuantaLife 推出了微滴数字 PCR,被 Bio-Rad 收购并推出新一代的微滴数字 PCR QX100 可生成 2 万个液滴进行高通量分析。而 Rain Dance Technology 于 2012 年推出的 RainDrop™ 系统通量更大,可生成 100 万个皮升级液滴。目前这 3 种 dPCR 产品中,Bio-Rad QX100 应用较为普遍,主要运用于科学研究领域,且已有的研究报道也暴露该技术还存在一些缺陷,就传染病方面主要包括线性范围比较局限、检测过程中容易产生假阳性、灵敏度也没有显著的优势等。尽管如此,dPCR 凭借其现有的优势,已逐步的被运用于

临床疾病的诊断,去年我国将该技术列入肿瘤个体化治疗检测技术之一,今年 Bio-Rad 公司推出的微滴式数字 PCR 技术的第二代产品 QX200 成功获得欧盟体外诊断产品 CE 认证,这将极大地促进该技术在临床上的应用。随着该技术的不断发展与完善,相信在不久的将来该技术的缺陷得以弥补,并在感染性疾病诊断、疾病超早期诊断、产前诊断及肿瘤早期诊断等领域发挥不可或缺的作用,成为新一代分子诊断的标准工具。

参考文献

- [1] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.
- [2] Toshikatsu M, Satoshi N, Mikako I, et al. Comprehensive next-generation sequencing analyses of hypoparathyroidism: identification of novel GCM2 mutations [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 99(11):2421-2428.
- [3] Nejc R, Dany M, Ion GA, et al. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(3):661-667.
- [4] Sakorn P, Watcharee P. Detection of alpha(0)-thalassaemia South-East Asian-type deletion by droplet digital PCR [J]. *European Journal of Haematology*, 2013, 92(3):244-248.
- [5] Baker M. Digital PCR hits its stride [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6):541-544.
- [6] Morley AA. Digital PCR: a brief history [J]. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2014, 1(1):1-2.
- [7] Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients [J]. *Transplantation*, 1999, 68(9): 1305-1311.
- [8] Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel [J]. *JAMA*, 2012, 308(4):387-402.
- [9] Caliendo AM, Shahbazian MC. A commutable cytomegalovirus calibrator is required to improve the agreement of viral load values between laboratories [J]. *Clinical chemistry*, 2009, 55(9):1701-1710.
- [10] Doyle T, Smith C, Vitiello P, et al. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54

- (5):724-732.
- [11] Jesse W, Ho DY, Paolo L, et al. Clinical significance of low cytomegalovirus DNA levels in human plasma [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(7): 2378-2383.
- [12] Tomas D, Anna MG. Low-level viraemia on HAART: significance and management [J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2012, 25(1):17-25.
- [13] John W, Brendan P, Manjul M, et al. The significance of very low-level viraemia detected by sensitive viral load assays in HIV infected patients on HAART [J]. *Journal of Infection*, 2011, 62(1):87-92.
- [14] Phillip B, Tanner SC, Regan JF, et al. Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue [J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(6):1155-1156.
- [15] Madej RM, Davis J, Holden MJ, et al. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12(2):133-143.
- [16] Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, et al. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 207:169-177.
- [17] Dingle TC, Ruth HS, Linda C, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(11):1670-1672.
- [18] Reid AL, Freeman JB, Millward M, et al. Detection of BRAF-V600E and V600K in melanoma circulating tumour cells by droplet digital PCR [J]. *Clinical Biochemistry*, 2014, 48(15):999-1002.
- [19] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16):9236-9241.
- [20] 徐鹏, 韩琳, 陈婉莹, 等. 我国艾滋病医疗保障制度的现状与变革 [J]. *卫生经济研究*, 2015(12):40-43.
- [21] Deborah P, Hannah G, Carrie Z, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant [J]. *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(19):1828-1835.
- [22] Matthew CS, Steven ML, Tiffany L, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J]. *Plos One*, 2013, 8(4):e55943.
- [23] Henrich TJ, Gallien S, Li JZ, et al. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 186(1):68-72.
- [24] Kiselinova M, Pasternak AO, De Spiegelaere WD, et al. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA [J]. *Plos One*, 2014, 9(1):e85999.
- [25] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection [J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359(14):1486-1500.
- [26] Don G, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences [J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, 350(11):1118-1129.
- [27] Huang JT, Liu YJ, Wang J, et al. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue [J]. *Clinical Chemistry*, 2015, 61(1):290-296.
- [28] Mu D, Yan L, Tang H, et al. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system [J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(10):2063-2073.
- [29] Murphy EL. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the united states between 1999 and 2007 [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2012, 156(4):271-278.
- [30] 王剑, 金茜, 饶慧瑛, 等. 国产试剂与 Roche COBAS TaqMan 试剂对慢性丙型肝炎快速和早期病毒学应答的比较研究 [J]. *传染病信息*, 2012, 25(3):177-179.
- [31] Wei F, Guo X, Yin J, et al. Performance of picodroplet digital PCR for quantitative detection of HCV RNA [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2015, 69:226-227.
- [32] Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases* [M]. McGraw-Hill, 2004.
- [33] Hayden R, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(2):540-546.
- [34] Ruth HS, Linda C, Anqi C, et al. Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(8):2844-2848.
- [35] Whitley RJ. Herpes simplex virus infections of the central nervous system [J]. *American Journal of Medicine*, 2015, 85(14):61-67.
- [36] Azizi A, Aidoo F, Gisonni-Lex L, et al. Determination of HSV-1 UL5 and UL29 gene copy numbers in an HSV complementing Vero cell line [J]. *Journal of biotechnology*, 2013, 168(4):382-387.

丙型肝炎免疫诊断的前景与优势

王秋实¹ 郝文波² 罗树红^{2*}

[摘要] 丙型肝炎(hepatitis C,下称丙肝或HC)缺乏特异性的临床表现,其筛查与确诊依赖实验室诊断。近些年,随着基因技术与免疫技术的发展,以及其在临床诊断中的应用实践,对于丙型肝炎的诊断,有了许多新方法。本文从免疫、基因和临床3方面介绍这些新型诊断方法,阐明免疫学诊断在临床应用上的前景与优势。

[关键词] 丙型肝炎病毒;诊断;免疫;基因

The prospect and advantages of immunological diagnosis of hepatitis C

WANG Qiushi¹, HAO Wenbo², LUO Shuhong^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515;

2. Institute of Antibody Engineering, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Hepatitis C is difficult to differentiate from other types of infectious hepatitis, as there are no clinical manifestations specific to hepatitis C. The screening and diagnosis of hepatitis C normally depend on laboratory diagnoses. In recent years, with the advancements in gene and immunological technologies, many new ideas have been proffered into the diagnosis of hepatitis C. In this review, new methods for the diagnosis of hepatitis C are discussed from 3 main aspects: immunological diagnosis, gene diagnosis and clinical diagnosis. The prospects and advantages of immunological diagnostics in clinical applications will be explored further.

[KEY WORDS] Hepatitis C virus; Diagnosis; Immunological; Gene

世界卫生组织公布,世界范围内有1.7亿丙肝患者,主要经血液或血制品传播^[1]。未根治的丙肝会对肝脏造成慢性损害,有可能进一步恶化为肝纤维化及肝硬化,加剧肝细胞的恶变导致肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。由于缺少疫苗,药物疗效差以及诊断时无特异性症状,丙肝成为了一种亟待解决的传染性疾病^[2]。丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的患者只有部分有明显的临床表现,有相当一部分患者表现为隐性感染或成为携带者,对该病的诊断和预防造成了困难^[3]。HCV基因组为单正链RNA,长约9.5 kb,由

5'端非编码区、编码区及3'端的非编码区构成。HCV的编码区占基因组全长的95%。仅含有单一的开放读码框,编码大小为3 010~3 033个氨基酸的多聚蛋白前体,该前体蛋白在病毒蛋白酶及宿主信号肽酶的作用下,切割为至少10个蛋白,其中3个为结构蛋白,分别是核心衣壳蛋白(core proteins, C),包膜蛋白1(envelope protein 1, E1)及包膜蛋白2(envelope protein 2, E2),6个非结构蛋白(non-structural protein 2~5B, NS2~NS5B)。随着生命科学和生物技术的进步,以检测HCV的特异基因和蛋白为基础,出现了许多不同于传统HCV诊

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81271931);广东省部产学研结合项目(2012B091100158)

作者单位:1. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

2. 南方医科大学生物技术学院抗体工程研究所,广东,广州 510515

*通讯作者:罗树红, E-mail: sluo815@gmail.com

断方法的新技术。本文意在从免疫诊断、基因诊断、临床诊断3个方面介绍国内外对于丙肝诊断的新方法、新思路。

1 免疫诊断

HCV从感染到特异抗体产生一般需要50~70天,相较于实时荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)定量检测HCV RNA等基因诊断方法,现有的免疫学检测在HCV早期诊断中存在一定缺陷,对预后的判断也不如基因诊断准确^[4]。但其检验成本远低于基因诊断等方法,有着广泛的应用前景。

1.1 检测HCV核心抗原

HCV核心抗原水平与慢性丙肝患者HCV RNA感染水平相互对应,常被用来作为HCV复制的间接标志^[5-8]。核心抗原是在所有HCV基因型中都很保守的结构基因。量化HCV核心抗原检验成本低,可以与HCV RNA检测相互补充,并在诸多人群中得到验证^[8-11]。该方法成本仅是PCR检测RNA的1/10,适用于需反复检测、长期监测HCV感染的患者^[12]。其中The Architect HCV Ag测定法(德国威斯巴登,雅培诊断)具有商业价值。该方法结合化学发光免疫与HCV定性测定,其动态量化范围在3~20 000 fmol/L,对HCV分型有一定帮助。该方法在欧洲已被许可使用,但尚未通过美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)的审核,只能应用于科研领域。利用该方法检测慢性丙肝与直接检测HCV RNA相比,成本更加低廉、操作更加便捷。利用酶联免疫法的HCV核心抗原检测试剂盒已在我国获得专利并应用于临床。但HCV抗原检测法的最低检出限(lowest limit of detection, LLOD)对应于HCV RNA为500~3 000 IU/mL,具体数值取决于病毒的基因型^[13]。当前丙肝的标准治疗方法是应答指导治疗(response-guided therapy, RGT),需要对丙肝病毒基因型进行检测,不同基因型的用药量不同^[14]。所以,检测核心抗原的方法忽视了病毒基因型特异性,尚不适用于当前的丙肝诊断与治疗。我们正在进行的研究,就是在检测HCV核心抗原基础上,同时检测NS3、NS4抗原,由于NS3、NS4抗原在不同HCV基因型中存在特异性,故对HCV基因分型有一定的辅助作用,可对丙型肝炎进行综合诊断^[15]。

1.2 检测HCV抗体

HCV抗体是临床常见的针对HCV感染的检测指标。美国疾病预防控制中心(the center for disease control and prevention, CDC)2013年发布的针对诊断HCV临床医生及实验室工作人员指南中,将HCV抗体检验列为对危险人群的初筛手段,抗体检验阳性的样本将继续进行HCV RNA定性分析以明确诊断并做基因型鉴别^[16-17]。常规方法是通过酶联免疫吸附实验(enzyme linked immune sorbent assay, ELISA)进行筛查。其原理是用包被在介质上的重组或合成的抗原来捕获样品中的丙肝免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG),被捕获的丙肝抗体与酶标记的二抗结合,随后酶催化底物产生颜色反应,通过颜色变化可判断丙肝抗体检测结果。该方法联合重组免疫印迹试验(recombinant immunoblot assay, RIBA),可有效提高检出率,在临床与科研中,常作为确认HCV感染的标准。RIBA技术是首先在硝酸纤维膜条上包被HCV合成抗原(C, NS4-1, NS4-2, NS5)以及重组抗原NS3及对照蛋白,进而将硝酸纤维膜条浸泡在稀释的血清或血浆样品中反应后,加入酶标记的抗人IgG抗体温育,如样品中含有HCV特异性抗体,则会形成“包被抗原-抗体-酶标二抗”复合物,利用显色液显色,最终根据出现的不同条带情况判断结果。优点是检验过程全程自动化,可重复性高,成本较低。其缺点是HCV感染患者出现HCV抗体较晚,检测窗口期长,对处在窗口期内的样本漏检率高,灵敏度低。化学发光酶免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)弥补了ELISA方法的不足,其灵敏度高,检测速度也较快,能缩短检测窗口期,且较基因检测成本低,技术要求也较低,易于普及,主要用于血源筛查及血制品安全性检测。检测HCV抗体的试剂盒已经获国家批准并上市,不同种类试剂盒分别应用胶体金法、酶联免疫法、时间分辨荧光免疫分析法等不同技术。

1.3 床边自测系统(point-of-care tests, POCT)

床边自测系统是出于对患者的照顾而进行的实验室外检测。它包含基于凝集反应、免疫层析以及免疫过滤的一系列免疫学检测。其基本原理是对患者体液内的HCV抗体进行检测,解决了样品保存的问题,做到了现场取样现场检测。该方法适用于HCV大规模筛查,并提高了没有分子生

物学实验室地区的 HCV 筛查能力。为了替代生物学检查,需要获得全血样本,静脉穿刺取血正在被改进。可以通过诸如唾液收集或指尖取血获得样本。血样还可以通过滤纸收集称为干血点法(dry blood method, DBS),这使得样品可以无污染的存储、运输以及邮寄。HCV RNA 可以利用 DBS 法,结合经典 PCR 或 real-time PCR 进行量化分析,不过灵敏度会有所降低。欧洲最近批准了以体液和唾液为样本的床边自测检查, FDA 还批准了指尖取血和静脉穿刺法。其中口腔样本和血液样本有着更高的灵敏度和特异度^[18]。应用该方法检测 HCV,对 HCV 病毒载量最低要求是 1 000 IU/mL^[19]。目前 FDA 许可或批准了 16 种抗丙肝病毒筛查测试套件。这些方法只用于筛查,确诊 HCV 还需要补充其他基因、免疫检查法^[20]。雅培诊断生产的床旁血液监护系统(Abbott i-STAT System)是一种便携式临床分析仪,已通过 FDA 认证,通过血液样本能对患者人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、HCV 等疾病进行筛查,可应用于急诊科与社区医院^[21]。

1.4 电化学技术

电化学技术是一种特殊的检测手段,其实验流程是将待检样本与生物学传感器结合,产生生物化学信号,利用电化学原理,如电流滴定法、电导测定法、阻抗及光谱学技术将生化信号转化为电信号,最后利用微电子学收集、分析信号,得出结论。其中的“生物学传感器”可以是依据免疫学原理设计的免疫学传感器,也可以是利用依据 DNA 的化学结构特点设计的基因传感器^[22]。故该技术是一种跨学科、跨专业的综合检验手段,其设计难点是将生物化学信号转化为电信号的过程,目前随着纳米材料的应用,该技术正取得快速的突破,未来将应用于慢性丙肝患者的家庭检测及医院的快速诊断。

2 基因诊断

基因诊断较传统的检测手段可以更直接、更客观的检测病原体或病因,该手段可为疾病防治提供更准确的信息,是医学诊断领域发展的方向。其窗口期短,灵敏度高,易于早期诊断。以 real-time PCR 为代表的基因诊断技术,是目前临床应用最为广泛的 HCV 感染实验室诊断方法和确

诊手段。

2.1 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)

其试验原理为:反转录丙肝病毒 RNA,合成互补 DNA,并以它为模板做 PCR 检测。不同于传统 PCR 的是,real-time PCR 通过记录反应中扩增子的数量,推导出反应起始阶段临床样本中病毒基因组的数量。为了实现这一目标,在 PCR 扩增时加入一对引物以及一个特异性荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,释放荧光信号,被检测装置收集。每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。用软件来计算每个反应的临界周期,从而绘制与反应起始基因组量的线性关系图。从而检测出样本中 HCV 的病毒载量^[23]。目前,已有 2 种 HCV RNA 检测方法应用于临床,分别是雅培实时 HCV 检测法(abbott real-time HCV test, ART)和罗氏 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 检测法(Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test, CAP/CTM)。ART 检测法拥有更高的准确度,而 CAP/CTM 检测法的预测值更高,故其 HCV 早期筛查的临床实用性更高^[24]。两种方法的最低检出限度基本都维持在 12 IU/mL,远高于传统 PCR 方法(50~100 IU/mL)^[25]。real-time PCR 是目前公认的判断丙肝感染最可靠的方法,临床上被认为是开始干扰素及病毒唑治疗的直接依据。与抗原筛查相比,real-time PCR 技术存在的不足是 RNA 不易保存,对实验条件要求高,诊断成本较高,不适用于长期动态监测 HCV 感染的患者。

2.2 实时转录介导扩增技术(real-time transcription mediated amplification, real-time TMA)

转录介导扩增技术检测在等温条件下使用两种酶,一种逆转录酶和一种 T7 RNA 聚合酶。这种扩增包含单链 RNA。病毒包膜溶解后,HCV 基因组被寡核苷酸探针捕获并绑定到磁性微粒上。扩增涉及两种酶的等温自动催化。每个新合成的 RNA 作为模板重新进入 TMA 过程。与 real-time PCR 原理类似,加入特异性荧光探针,通过记录荧光信号计算出样品中最初的 HCV 含量^[23]。该方法可以看做高灵敏度的 real-time PCR 方法,其最低检出限度的病毒量为 5~10 IU/mL,与 real-time

PCR 均可以用来检测 1 型、3 型 HCV 病毒血症的最小残留值(2、4 型 HCV 尚不能利用 real-time TMA 方法检测),可用作预后判断。但在病毒血症的长期监测方面的应用有待证实^[24]。该方法灵敏度高,但假阳性率随之升高,检验价格昂贵。

2.3 基因芯片技术

新近发展起来的基因芯片技术在基因诊断领域有着重要地位,它可以将生物学中许多不连续的分析过程,移植到固相的介质芯片上,并使其连续化和微型化。其基本原理是通过分子杂交的方法直接对已知核酸序列的病原体基因片段(传染病)和已知突变位点(遗传病、肿瘤等)的基因片段进行检测。目前,诊断病毒性肝炎要依次对甲、乙、丙、丁、戊等肝炎进行筛查,过程繁琐且费时费力。基因芯片技术基于碱基互补的原理,对病原体核酸进行直接检测,将来的诊断芯片有可能同时对所有肝炎病毒进行检测,具有非常大的发展前景^[25]。感染性病原体诊断基因芯片就是将待测病原体的特征基因片段(靶基因)固定于玻片上制成检测芯片,将从患者血清中抽提出病原体的 RNA 经扩增、标记荧光后与芯片进行杂交,杂交信号由扫描仪扫描,再经计算机的分析进行确诊^[26-28]。目前常用的基因芯片以 HCV 各基因亚型 5' 段非编码区(non-coding region, NCR)设计特异性探针,与逆转录-巢式 PCR 扩增产物杂交,具有较高的灵敏度和较强的特异性^[29]。多种基因芯片已在我国申请专利,由于该方法简便快捷,主要应用于 HCV 的实验室分型。

2.4 基因测序技术

利用基因测序技术,最经典、最准确的诊断方法为直接测序法,该方法对 HCV 进行全基因组测序,直接确定病毒基因型,其他分型方法都将该方法视为参考标准,但该方法操作繁琐、工作量大,不适宜在临床上广泛使用。型特异性引物 PCR 法,结合了基因测序技术与 real-time PCR 技术。该技术基于 HCV 病毒某部分基因序列在不同亚型间存在较高差异度,如 NS5B 区基因序列,首先设计引物,进而通过 real-time PCR 技术对特定区段进行定量扩增,最后通过高通量基因测序技术,对扩增产物进行分析,并与各型病毒标准株进行对比,明确病毒基因型。在此技术的基础上,根据不同引物的退火温度不同而设计出型特异性探针退火法。该方法在同一反应体系中加入不同种引

物,利用其退火温度不同,对不同区段基因序列进行定量扩增,是目前对 HCV 变异株进行筛查的常用手段。以干扰素与病毒唑为基础的丙型肝炎抗病毒治疗,其疗程与用药量依赖于病毒的基因分型,故基因测序技术对临床用药及患者预后有着重要意义,是目前临床最常用的病毒分型方法。与免疫诊断相比,其缺点是仅适用于 HCV RNA 阳性样本,对血清中的病毒量要求高,同时结合了 real-time PCR 及基因测序技术,其检验成本高,不适用于偏远地区及社区医院。

3 临床诊断

丙型肝炎的患者缺乏典型症状,急性丙型肝炎的临床表现一般较轻,类似感冒,少数患者以头痛、发热、四肢酸痛等症状为主,伴或不伴有全身乏力,食欲减退,恶心、呕吐、厌油、腹胀、肝区痛、尿色加深等症状。轻度慢性丙肝病情较轻,可反复出现乏力,头晕,食欲有所减退,厌油、尿黄、肝区不适、睡眠不佳等症状,肝稍大有轻触痛,可伴有轻度脾大。重度慢性丙肝患者有明显或持续的肝炎症状,如乏力、纳差、腹胀、尿黄等,伴肝病面容,肝掌,脾大。重型丙肝患者在 2 周内出现极度乏力,严重消化道症状、出现神经、精神症状、表现为嗜睡、性格改变、烦躁不安,昏迷肝性脑病等。由于各型病毒性肝炎的临床表现极为相似,当出现上述症状后,主要依靠实验室诊断对各型肝炎加以鉴别,详细询问患者的既往病史、生活工作环境,明确患者有无输血史、器官移植史、静脉吸毒史对确诊有一定的辅助意义。

4 展望

HCV 最大的特点为基因组的高度特异性,不同 HCV 分离株的核苷酸及氨基酸同源性有较大差异,这种基因变异与丙型肝炎易发展成慢性肝炎、HCV 易形成免疫逃逸株以及疫苗研制困难有密切的关系。对 HCV 的诊断需要结合临床诊断与实验室检测结果。近期发布的欧洲肝病学会临床实践指南提出,以 HCV 抗体作为 HCV 感染的一线诊断指标。对于急性丙肝患者及免疫力低下人群,将 HCV RNA 列入初始评估标准。对于 HCV 抗体阳性的患者应加做敏感的基因检测。对 HCV 抗体阳性但基因检测阴性的患者应于 3 个月后复查。指南推荐对抗病毒治疗的患者,应用 real-

time PCR 进行疗效监控^[30]。受制于较高的成本,该技术在偏远地区、社区医院以及慢性肝炎的家庭中较难开展。相比之下,免疫诊断速度快、成本低,有着很好的临床应用前景。我们正在研制以核心蛋白、NS3、NS4 蛋白为抗原的检验试剂盒。该试剂盒利用抗原筛查技术,对患者血清中的几种病毒抗原进行定量筛查。该试剂盒中的 NS3、NS4 抗原在不同基因型中的变异较大,相较于传统方法中单独检测 HCV 核心抗原,既提高了检测的灵敏度,也对病毒的分型、对症治疗给予一定帮助。与针对 HCV 特异性抗体的免疫学诊断相比,其检验窗口期更短,对 HCV 感染的早期诊断有积极意义。该试剂盒具有较高的灵敏度,预计检出率在 90% 以上。该试剂盒虽不能代替基因诊断技术在 HCV 诊断与分型中的核心地位,但其检验成本低、操作简便、对实验人员要求不高,特别适用于不发达地区及慢性丙型肝炎的长期疗效监测,也适用于门急诊患者的早期快速诊断。不足之处在于该技术的最低检出限受制于免疫检测的先天劣势,仍高于基因诊断技术。由 NS3、NS4 抗原制备的单克隆抗体,在不同基因型的病毒检测中效价不同,易漏诊某些特殊变异的基因型。

参考文献

- [1] Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(9):553-562.
- [2] Swiatek BJ. Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection?[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23(1-2):47-59.
- [3] Aspinall EJ, Hutchinson SJ, Janjua NZ, et al. Trends in mortality after diagnosis of hepatitis C virus infection: An international comparison and implications for monitoring the population impact of treatment [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(2):269-277.
- [4] Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes [J]. *J Hepatol*, 1999, 31 (Suppl 1):65-70.
- [5] Park Y, Lee JH, Kim BS, et al. New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(6):2253-2256.
- [6] Hosseini Moghaddam SM, Iran-Pour E, Rotstein C, et al. Hepatitis C core Ag and its clinical applicability: potential advantages and disadvantages for diagnosis and follow-up?[J]. *Rev Med Virol*, 2012, 22(3):156-165.
- [7] Descamps V, Op de Beeck A, Plassart C, et al. Strong correlation between liver and serum levels of hepatitis C virus core antigen and RNA in chronically infected patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2):465-468.
- [8] Moscato GA, Giannelli G, Grandi B, et al. Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C [J]. *Intervirology*, 2011, 54(2):61-65.
- [9] Mederacke I, Pothhoff A, Meyer-Olson D, et al. HCV core antigen testing in HIV- and HBV-coinfected patients, and in HCV-infected patients on hemodialysis [J]. *J Clin Virol*, 2012, 53(2):110-115.
- [10] Miedouge M, Saune K, Kamar N, et al. Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(1):18-21.
- [11] Kadkhoda K, Smart G. HCV antigen testing for the diagnosis of hepatitis C infection: a cost-efficient algorithm[J]. *Clin Lab*, 2014, 60(4):677-680.
- [12] Tillmann HL. Hepatitis C virus core antigen testing: role in diagnosis, disease monitoring and treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(22):6701-6706.
- [13] Ross RS, Viazov S, Salloum S, et al. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(4):1161-1168.
- [14] 成军. 重视慢性丙型肝炎的应答指导治疗[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2008, 1(2):1-3.
- [15] Aherfi S, Solas C, Motte A, et al. Hepatitis C virus NS3 protease genotyping and drug concentration determination during triple therapy with telaprevir or boceprevir for chronic infection with genotype 1 viruses, southeastern France [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(11):1868-1876.
- [16] Centers for disease control and prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease [J]. *MMWR Recomm Rep*, 1998, 47(RR-19):1-39.
- [17] Centers for disease control and prevention. Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013, 62(18):362-365.
- [18] Tucker JD, Bien CH, Peeling RW. Point-of-care testing for sexually transmitted infections: recent advances

- and implications for disease control [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2013, 26(1): 73-79.
- [19] Tuailon E, Mondain AM, Meroueh F, et al. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing [J]. *Hepatology*, 2010, 51(3): 752-758.
- [20] Liapakis A, Lim JK. Impact of rapid point-of-care screening tests for the identification of chronic hepatitis C infection [J]. *Hepatology*, 2013, 58(2): 822-826.
- [21] Kisner HJ. i-STAT point-of-care blood analyzing system [J]. *Clin Lab Manage Rev*, 1993, 7(5): 454-457.
- [22] Uliana CV, Riccardi CS, Yamanaka H. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(42): 15476-15491.
- [23] Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky JM. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1303-1313.
- [24] Ogawa E, Furusyo N, Murata M, et al. Early phase viral kinetics of chronic hepatitis C patients receiving telaprevir-based triple therapy: a comparison of two real-time PCR assays [J]. *Antiviral Res*, 2013, 99(2): 119-124.
- [25] Bortoletto G, Campagnolo D, Mirandola S, et al. Comparable performance of TMA and real-time PCR in detecting minimal residual hepatitis C viraemia at the end of antiviral therapy [J]. *J Clin Virol*, 2011, 50(3): 217-220.
- [26] Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, 21 (Suppl 1): 42-47.
- [27] Falus A, Varadi A, Rasko I. The DNA-chip, a new tool for medical genetics [J]. *Orv Hetil*, 1998, 139 (16): 957-960.
- [28] Heller RA, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2150-2155.
- [29] 常静霞, 张怡青, 王洁, 等. 慢性丙型肝炎患者病毒基因分型与血清 HCV RNA 水平的关系探讨 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2012, 15(4): 321-323.
- [30] American association for the study of liver diseases. European association for the study of the liver. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European association for the study of the liver and the American association for the study of liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(3): 642-659.

(上接第 36 页)

参考文献

- [1] Cao F, Zhang H. Molecular biological diagnosis of serous cavity fluid [J]. *Foreign Med Sci Oncol Sect*, 2005, 32(3): 199-201.
- [2] Meng Z, Shi J, Zhu C, et al. Automated quantification of DNA aneuploidy by image cytometry as an adjunct for the cytologic diagnosis of malignant effusion [J]. *Cytological Cellular Pathology*, 2013, 36(3-4): 107-115.
- [3] 郭晓东, 孙婷, 景明. 液基细胞学结合端粒酶活性检测诊断胸腹水良恶性细胞的应用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(10): 1051-1052.
- [4] 孟芝兰, 高亮, 顾建刚, 等. 全自动 DNA 定量分析系统在胸腔积液细胞病理诊断中的应用 [J]. *协和医学杂志*, 2012, 3(3): 35-40.
- [5] 陶伟, 李俊. 细胞 DNA 定量分析在鉴别良恶性胸腹水中的应用价值 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(7): 1016-1019.
- [6] 陈凤, 刘崇梅, 王彩霞. 良恶性胸腹水病理检测中的研究进展 [J]. *中国医药指杂志*, 2014, 12(25): 78-82.
- [7] Xie L, Wang T, Yu S, et al. Cell-free miR-24 and miR-30d, potential diagnostic biomarkers in malignant effusions [J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(2-3): 216-220.
- [8] Bisht B, Handa U, Mohan H, et al. Complementary value of DNA flow cytometry and image morphometry in detection of malignant cells in effusion fluids [J]. *Malays J Pathol*, 2014, 36(2): 83-90.
- [9] Dmirel D, Akyürek N, Rmzy I. Diagnostic and prognostic significance of image cytometric DNA ploidy measurement in cytological samples of cervical squamous intraepithelial lesion [J]. *Cytopathology*, 2013, 24(2): 105-112.
- [10] 李德昌, 任力, 李炜, 等. 全自动细胞图像分析系统在鉴别良恶性胸腹水中的应用 [J]. *诊断病理学杂志*, 2011, 18(2): 134-136.

土拨鼠肝炎病毒动物模型在肝细胞癌研究中的应用

朱松山¹ 殷君² 黄华艺^{1,3*}

[摘要] 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种广泛存在的人类病原体,可引起肝炎、肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。HBV感染严重威胁人类的健康,尤其以我国和东南亚国家为甚。慢性乙型肝炎和因慢性HBV感染而导致的HCC的发病机制、诊断和治疗仍是一个很具挑战性的课题。目前研究病毒性肝炎以及肝炎后肝硬化和HCC的发病机制和诊治很大程度上依赖于动物模型,而良好的动物模型的选择是决定研究结论是否可靠的基础。土拨鼠是一种主要生活在北美大平原的动物,其个体和肝脏大小特征、携带的土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)的致病机制、疾病进展与人HBV相似性等因素很利于研究乙型肝炎病毒和HCC的发生和发病机制、诊断与治疗。因此,通过土拨鼠肝炎动物模型能更好地了解HBV与HCC的复杂关系并将促进更好的预防和治疗新策略的制定。本文就土拨鼠动物模型在乙型肝炎病毒以及HCC研究中的应用进展做一概述。

[关键词] 土拨鼠;乙型肝炎病毒;动物模型;肝细胞癌

Application of woodchuck hepatitis virus animal model in the study of hepatocellular carcinoma

ZHU Songshan¹, YIN Jun², HUANG Huayi^{1,3*}

(1. Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China, 530021; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China, 530023; 3. Department of Surgical Oncology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA, 14263)

[ABSTRACT] Hepatitis B virus (HBV) is a widespread human pathogen that can cause hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). HBV infection has been a serious threat to human health, especially in China and Southeast Asian countries. The pathogenesis, diagnosis and treatment of chronic hepatitis B and HBV caused HCC are still very challenging. Currently, understanding of the pathogenesis and diagnosis of viral hepatitis, liver cirrhosis post hepatitis, and HCC are largely dependent on the animal model system, and the choice of a well-established animal model is the basis in accomplishment of the study. The features of woodchuck body weight, the size of its liver, the pathogenesis of the hepatitis B virus it carries, and the progress of the disease course are very similar to those of human hepatitis B virus, thus, the woodchuck is a very useful animal model in hepatitis B virus infection and in the study of the development, pathogenesis, diagnosis, and treatment of hepatitis B and HCC. Therefore, the woodchuck hepatitis B virus animal model enables us to have a better understanding of the complex relationship between HBV infection and HCC. It will also promote a better prevention and treatment strategy for hepatitis B infection. In this paper, recent reports in the application of the woodchuck animal model in the field of hepatitis B and HCC will be summarized.

[KEY WORDS] Woodchuck; Hepatitis B virus; Animal model; Hepatocellular carcinoma

作者单位:1. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530021

2. 广西中医药大学第一附属医院检验科,广西,南宁 530023

3. 美国罗斯威尔帕克癌症研究所肿瘤外科,美国,纽约,布法罗 14263

*通讯作者:黄华艺, E-mail: Huayi.Huang@Roswellpark.org

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种广泛存在的人类病原体,可引起肝炎、肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。现在约有2亿4000万例慢性乙肝病毒携带者,每年约有620000例死于乙肝相关的肝脏疾病,其中,HBV引起HCC的诊断和治疗仍存在很大的挑战^[1]。动物模型是研究乙型病毒性肝炎和HCC常用的有效方法。土拨鼠携带的土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)与人HBV相似,因此,土拨鼠肝炎病毒动物模型得到了广泛的使用,通过研究土拨鼠肝炎病毒动物模型能更好地了解HBV感染导致HCC发生的复杂机制并将促进更好的预防和治疗新策略的制定。本文就近年来,土拨鼠肝炎病毒动物模型在HCC中的应用进展做一概述。

1 人乙型肝炎病毒性肝细胞癌动物模型概况

HBV对宿主有严格的选择性,除人类和大猩猩外,难以感染其他动物。黑猩猩是最理想的实验动物模型,曾广泛被用于HBV感染的研究。但是受动物来源和伦理因素的影响,其使用越来越受限制。

HBV转基因小鼠可使小鼠直接感染HBV,允许异体移植细胞在体内存活,这是一种评价和比较抗乙肝病毒药物较理想的动物模型^[2],其缺点是造模难度大,繁殖率低,死亡率高。

树鼩与灵长类动物的一些神经受体蛋白基因之间的同源性程度高,因此树鼩也被用于肝癌动物模型,尤其是在地域性的毒理学和病毒学研究中。但是,HBV在树鼩体内感染属一过性且缺乏稳定性,不利于感染后的评价。

鸭乙型肝炎病毒也属嗜肝DNA病毒,其来源广,成本低,可在一定程度上了解HBV的感染复制周期及宿主免疫系统。但是鸭子与人类的遗传差异较大,使鸭乙型肝炎病毒模型的使用受到了限制。

土拨鼠动物模型携带WHV的DNA病毒结构和复制的生命周期与HBV相似,在核心蛋白的装配结构域序列(分别为wcp149和hcp149)有高达65%的一致性^[3],可引起急性和慢性肝炎。此外,慢性感染WHV的土拨鼠通常在感染后2~4年会导致HCC的发生。在土拨鼠模型上长期使用抗病毒核苷疗法已可以对HCC进行预防,同时也展示

了治疗HCC的创新性的分子生物学方法。

2 土拨鼠和WHV

土拨鼠属啮齿类动物,平均体重为4.5 kg,最大可成长至6.5 kg,身长约为56 cm。土拨鼠主要分布于北美大草原,新生土拨鼠约3个月后即达到成熟期,其寿命可以长达10年之久,每天以素食为主,一天最多可以吃上5 kg的绿色蔬果,其价格相对低廉,一只约1500元人民币左右。使用土拨鼠的研究始于1978年,当时发现土拨鼠对WHV有着很高的感染率,并有很高的慢性肝炎和HCC患病率。后来研究发现,WHV携带有相关的HBV基因,并且其基因组具有复制能力,可用来感染土拨鼠^[4]。

3 土拨鼠肝炎病毒动物模型

在基因组多样性的肝癌细胞中,HBV相关的肝癌基因组显示有较高的不稳定性,可能是由于HBV DNA整合到宿主细胞基因组,引起染色体改变和癌基因的插入突变。土拨鼠模型是研究HBV感染的信息模型,包括宿主的免疫反应和慢性HBV感染的免疫疗法^[5]。WHV在靶向器官、形态学、分子生物学、基因的遗传结构、流行病学、致病机制、疾病的进展等方面与HBV有着高度的相似性。在研究HBV感染人类的发病机制方面,土拨鼠感染WHV已被公认为是对HBV感染和HBV引起的肝脏疾病研究最合适的模型,其用途超越其他现有的天然和转基因动物模型^[6]。通过土拨鼠动物模型能更好地了解HBV感染导致HCC发生的复杂机制并将促进更好的预防和治疗策略的制定^[7]。

4 土拨鼠肝炎病毒动物模型的应用

4.1 WHV感染的自然史

大多数慢性HBV的感染发生于新生儿期,因此,利用新生土拨鼠接种WHV后发现,几乎所有的土拨鼠发展成HCC的潜伏生存期为24个月,并且平均预期寿命为30~32个月。目前,大多数模型所用的WHV是WHV7或WHV8毒株,其序列具有很高的相似性。同时,WHV野生型毒株(WHVNY)和WHV7毒株表现出类似的复制水平和引起成年土拨鼠急性感染的能力^[8]。新生土拨鼠感染WHV7P1通常有60%~75%成为慢性携带

者,2年慢性携带者50%转为HCC,4年慢性携带者接近100%转为HCC,很好地模拟了人慢性HBV携带者的病程^[9]。与慢性肝炎相似,慢性WHV感染及终身病毒复制活跃的土拨鼠均不可避免的进展为慢性肝炎和HCC。在慢性感染的土拨鼠,e抗原不会刺激机体产生e抗体来抑制病毒的复制,而这种现象在慢性HBV感染是常见的。慢性WHV感染的土拨鼠,当发生病毒活跃复制伴随表面抗原和e抗原表达升高时,反映了机体产生对病毒的免疫耐受,这种过程与HCC的进展有密切联系。

4.2 土拨鼠肝炎病毒动物模型在人肝细胞癌发病机制研究上的应用

4.2.1 土拨鼠肝炎病毒动物模型免疫学的研究

在HBV感染过程中,HBV进入肝细胞如何导致疾病的发生,其机制尚不清楚。WHV和HBV均有明显的抗原交叉反应,抗原、抗体在肝脏和血液循环中出现的时间相似,并且病毒诱导的特异性体液免疫和细胞免疫应答和急性肝炎向慢性肝炎和肝癌的进展机制也有较相似的过程^[10]。土拨鼠最常见的感染方式是单独感染WHV。感染后土拨鼠的肝细胞嗜碱性增加,这种在形态上改变的病灶,可能是癌前性质的病灶。但是,多数不能检测出WHV表达的蛋白质和核酸,因此可以假设肝细胞失去表达WHV的能力,使这些肝细胞逃避免疫介导的细胞死亡,并进行克隆扩增,从而形成明显的病灶^[11]。土拨鼠在非常低剂量肝炎病毒感染时毫无症状,血清学也检测不出,但是在分子水平上表现为持续感染。它的主要表现是原发性隐匿感染(primary occult infection, POI),通过激活免疫系统,引发病毒特异性T细胞反应,病毒特异性T细胞反应是持续隐匿性肝炎的一个非常敏感指标,但是缺少了抗病毒抗体的诱导^[12]。Mulrooney-Cousins等人^[13]的研究发现,给10只新生土拨鼠注射含10或100病毒颗粒的WHV诱导POI的发生,所有动物均可在血清中检测出感染病毒的DNA(<100~200 copies/mL)和循环淋巴细胞,但血清中WHV表面抗原和抗WHV核心抗原仍然终生检测不到,这一点与人感染HBV后检测不到核心抗原相似。引起POI阳性的病毒属于野生型序列,可感染健康的土拨鼠并引起肝炎和HCC。其原因是病毒核酸整合到宿主的肝脏和免疫系统的基因组,保留致癌的效力,并能够引起在肝脏中的致病性传播。

4.2.2 土拨鼠肝炎病毒动物模型分子病毒学的研究

WHV的生命周期也与HBV相似,病毒DNA需整合到宿主基因组中,从DNA逆转录为RNA。当WHV整合到宿主细胞的DNA时,它通常是可以针对任意数量细胞的DNA位点进行截断和重排,这成为导致HCC发生的重要因素^[14]。在感染的肝细胞中游离的cccDNA被认为是持续稳定的,因此消除感染的肝细胞是非常困难的。对于如何维持慢性肝炎病毒感染的决定因素尚未得到充分的认识。过去普遍认为,慢性肝炎病毒感染仅能通过已感染的肝细胞的分裂来维持,而不能通过病毒的传播。但是有研究表明^[15]已经被WHV诱导成HCC的土拨鼠,再同时感染另一毒株WHVNY时,在土拨鼠的血清样本中发现WHVNY松弛的环状DNA,肝脏和肝癌组织中检测出了WHVNY RNA的复制衍生物和WHVNY RNA复制中间体,这表明肝炎病毒感染和细胞之间的传播可能会持续发生,肝炎病毒持续、重叠感染和传播局限性对于维持慢性感染状态具有意义。WHV感染成年土拨鼠会导致急性肝炎,而感染新生土拨鼠会引起慢性肝炎,慢性肝炎可发展成HCC。利用这一点,土拨鼠模型可作为研究慢性乙型肝炎发病机制及向中晚期肝病发展的理想动物模型。

在研究来源于*X/c-myc*双基因的小鼠和WHV感染的土拨鼠时发现,*Suz12/PRC2*目的基因亚单位在乙型肝炎病毒复制及HBV X蛋白相关HCC的发生过程中激活,而且*Plk1*和*Suz12/Znf198*在肝脏肿瘤中有相同的作用。在HBV复制的肝癌细胞中*Suz12*抑癌基因和细胞增殖基因被诱导,它们在*X/c-myc*双基因的HCC进展期间表现出独特的表达谱。具体来说,在*X/c-myc*双基因的肝脏增生和癌前阶段,*CCND2*、*EpCAM*和*IGFII*的表达升高,而在*X/c-myc*双基因的小鼠和WHV感染的土拨鼠其BAMBI和PLK1过度表达^[16]。利用逆转录PCR的结果证实了土拨鼠基因(*SAT*、*IDH3B*和*SCD*)具有差异性表达。差异表达的基因参与了转录、剪接、翻译、细胞周期代谢、蛋白质折叠、降解、细胞凋亡、免疫反应和金属结合等过程^[17]。

土拨鼠肝癌模型与人肝癌细胞中肝蛋白的糖基化模式相似,利用二维凝胶蛋白质组学耦合的方法已经证实了一种像高尔基体蛋白73的糖蛋白,在土拨鼠肝癌模型中升高和超岩藻糖基化,这

可以成为识别癌症的标志^[18]。载脂蛋白 A-I (apolipoprotein A-I, ApoA-I) 是血清中高密度脂蛋白颗粒的主要蛋白成分, 血浆中 ApoA-I 亚型的改变是土拨鼠、人类慢性肝炎和 HCC 的标志^[19]。

在观察雄性土拨鼠和雌性土拨鼠时发现, 雄性土拨鼠中病毒具有更高水平复制活性, 表明雄激素可以调节 WHV 的复制, 这一现象与人 HBV 感染相一致^[20]。因此, 在相同条件下, 性别或许也是 HCC 形成的重要因素。肝癌细胞中酶活性的改变也是临床观察的一个指标。目前新开发了一种利用定量分光光度法对乙酰辅酶 A 合成酶含量的测定, 通过观察比较土拨鼠肝癌组织与周边邻近区域的组织发现, 癌组织中乙酰辅酶 A 合成酶活性显著增加, 并且肝癌组织的亚细胞组分中的乙酰辅酶 A 合成酶活性也明显高于周围组织^[21]。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在人 HCC 的侵袭和转移中发挥核心作用, 主要表现为肝癌组织中的 MMPs 表达增加。同样, 这一现象也在 WHV 感染土拨鼠的肝组织中观察到, MMP-1、MMP-2、MMP-7、金属基质蛋白酶组织抑制剂-1 和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白水平升高。MMP-9 在 HCC 的表达明显高于没有感染 WHV 动物的肝脏, 而土拨鼠 MMPs 的活性可被金属蛋白酶抑制剂抑制, 这是一种常见的哺乳动物 MMPs 抑制剂。这些结果表明 MMP 抑制剂可以作为一个潜在的 HCC 的治疗策略^[22]。

许多基因在人类 HCC 有差异表达。进一步探讨在土拨鼠肝癌组织中部分差异表达基因及相关蛋白的表达能进一步研究人类乙肝病毒性肝癌的发病机制和治疗策略。

4.3 土拨鼠肝炎病毒动物模型在人肝细胞癌的诊断和治疗上的应用

4.3.1 在新型影像学技术诊断中的作用

慢性 HBV 感染与大部分的 HCC 密切相关。但是诊断为 HCC 时往往已在疾病的晚期, 此时可实施的治疗方案很有限而且预后差。因此我们需要一种易检测、特异性高的方法, 有助于 HBV 诱发 HCC 的早期检测和治疗。肿瘤的生长用磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 检测, 肝脏的损伤程度用肝功酶谱检测。丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶的升高表示随着肿瘤的生长导致肝功能损伤加剧。在 MRI 中, 正常的肝脏界限清晰, 因大量血管聚集, HCC 区域表现为高

信号。在肿瘤结节区, 肝脏形状显示不规则, 无限增殖的细胞会有混杂信号。此外, 肝细胞癌土拨鼠模型 2-脱氧-2-[F-18] 氟-D 葡萄糖正电子发射断层扫描成像与组织学也有一定的相关性, 利用影像学技术, HCC 的进展可用 MRI 进行可视化分析, 同时对照血清检测结果, 两者结合可以增强对 HCC 进展的了解, 做到早发现, 早治疗^[23-24]。

4.3.2 土拨鼠肝癌药物治疗

对于 HBV 感染的治疗, 主要是针对慢性 HBV 感染者肝内及血清中病毒 DNA 复制的抑制而减少病毒载量的手段, 结合适当的免疫调节药物达到联合治疗的目的。尽可能减少 cccDNA 的稳定性, 直到可以减缓或消除细胞中病毒的复制。因此, 使用抗病毒药物治疗是目前常规的方法, 常见的如接受克来夫定、恩替卡韦治疗时, 它对土拨鼠具有特别强有力及持续有效的抗病毒活性, 其弊端是常常导致耐药突变株的出现^[25]。因此, 现在多联合药物和疫苗共同治疗, 其益处如下: (1) 降低病毒血症、抗原血症以及降低 HBV DNA 和 RNA 水平; (2) 对慢性肝炎进展的抑制作用; (3) 降低慢性肝损伤的频率和延迟 HCC 的发病, 而这些手段的试验往往依赖于土拨鼠肝炎病毒动物模型的帮助^[26]。

4.3.3 土拨鼠肝癌免疫治疗

免疫疗法是通过免疫调节慢性乙肝病毒携带者的体液免疫和细胞免疫应答, 从而提高治疗的准确性, 减少了治疗的副作用。Huang 等人^[27]在土拨鼠肝癌模型上采用含有两个细胞因子和血管生成抑制因子混合类型的策略对 HCC 进行治疗, 与抗血管生成或细胞因子基因的单一样本相比, 前者在大块肿瘤的治疗上有更好的效果。在浸润型肿瘤中, 混合免疫治疗显著提高了 CD3(+) T 细胞的水平, 并能显著减少肿瘤血管的发生。此外, 它诱导高水平的自然杀伤细胞的生成和细胞凋亡的发生, 减少在肿瘤区域的免疫抑制效应物水平。因此, 抗血管生成治疗可能提供的优点是减少大块肿瘤的免疫耐受, 使它们更容易接受到免疫效应。这种联合治疗将来有可能有效地治疗晚期肝癌患者。

干扰素是一种多效性细胞因子, 能诱导干扰素刺激基因的表达, 具有直接的抗病毒和免疫调节性能^[28, 29]。Semliki 森林病毒 (semliki forest virus, SFV) 可诱导表达白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12), 可以对 WHV 和 HCC 产生免疫反应。

瘤内注射相关的 SFV 载体可以表达荧光素酶和 IL-12, 导致肝癌细胞内和血清中分泌一种高活性因子, 促使表达相关的 γ -干扰素、 α -肿瘤坏死因子和外周血单个核细胞的产生, 从而引起癌细胞的坏死, 这两种物质分别表明 SFV 载体对土拨鼠肿瘤细胞有效^[30]。但是, 慢性 WHV 感染的肝脏中, IL-12 免疫刺激诱导强烈的免疫反应, 却抵消了治疗的抗病毒效果, 这可能是调节性 T 细胞在慢性病毒性肝炎相关的免疫应答中起冲突作用^[31]。但是, Nowrouzi 等人^[32]利用胎鼠模型也揭示了逆转录病毒基因治疗载体的潜在遗传毒性。因此, 近年来, 直接利用 Toll 样受体激动剂可以诱导 I 型干扰素信号通路活化, 发挥抗病毒作用, 并且可避免全身不良的免疫反应^[33]。由此来看, 土拨鼠肝癌模型在 HCC 的联合治疗包括免疫治疗给人们提供了一个可靠有效的模型。

5 总结与展望

用 WHV 感染土拨鼠是目前最具代表性的制备慢性 HBV 感染的动物模型。其为人们阐明了 HBV 的复制方式、生命周期、cDNA 信息导向机制、宿主的免疫反应与致癌机制等^[34]。病毒性诱发肝癌的土拨鼠模型已被有效地用于开发抗病毒药物、免疫调节治疗方法以及超声与磁共振成像增强肝肿瘤的新显像剂的研发。随着在土拨鼠动物模型上对 WHV 致病机制不断深入的研究以及新治疗方法不断探索所获得的经验, 我们相信, 在不久的将来, 人类将显著提高对慢性 HBV 感染及其后遗症根除性治疗的成功机率。

参考文献

- [1] Kosinska AD, Liu J, Lu M, et al. Therapeutic vaccination and immunomodulation in the treatment of chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204(1): 103-114.
- [2] Dandri M, Petersen J. Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 493-495.
- [3] Kukreja AA, Wang JC, Pierson E, et al. Structurally similar woodchuck and human hepadnavirus core proteins have distinctly different temperature dependences of assembly [J]. *J Virol*, 2014, 88(24): 14105-14115.
- [4] Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(9):4533-4537.
- [5] Pan D, Lin Y, Wu W, et al. Persistence of the recombinant genomes of woodchuck hepatitis virus in the mouse model [J]. *Plos One*, 2015, 10(5):e0125658.
- [6] Roggendorf M, Yang D, Lu M. The woodchuck: a model for therapeutic vaccination against hepaDNA viral infection [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(4): 308-314.
- [7] Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(2): a021444.
- [8] Freitas N, Lukash T, Dudek M, et al. Capacity of a natural strain of woodchuck hepatitis virus, WHVNY, to induce acute infection in naive adult woodchucks [J]. *Virus Res*, 2015, 2(205):12-21.
- [9] 王亮, 肖冲, 沈邵伟, 等. 一月龄土拨鼠肝炎病毒感染模型的建立 [J]. *中国病毒病杂志*, 2014, 4(3):198-202.
- [10] Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. New aspects of natural history and pathogenicity of hepaDNA viral infection and hepatocyte function revealed by the woodchuck model of hepatitis B [M]. *Liver Biopsy in Medicine*, 2011:355-378.
- [11] Xu C, Yamamoto T, Zhou T, et al. The liver of woodchucks chronically infected with the woodchuck hepatitis virus contains foci of virus core antigen-negative hepatocytes with both altered and normal morphology [J]. *Virology*, 2007, 359(2):283-294.
- [12] Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Asymptomatic hepaDNA viral persistence and its consequences in the woodchuck model of occult hepatitis B virus infection [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2015, 3(3):211-219.
- [13] Mulrooney-Cousins PM, Chauhan R, Churchill ND, et al. Primary seronegative but molecularly evident hepaDNA viral infection engages liver and induces hepatocarcinoma in the woodchuck model of hepatitis B [J]. *Plos Pathogens*, 2014, 10(8):e1004332.
- [14] Mason WS, Jilbert AR, Summers J. Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4):1139-1144.
- [15] Rodrigues L, Freitas N, Kallakury BV, et al. Superinfection with woodchuck hepatitis virus strain WHVNY of livers chronically infected with strain WHV7 [J]. *J*

- Viol, 2015, 89(1):384-405.
- [16] Studach LL, Menne S, Cairo S, et al. Subset of Suz12/PRC2 target genes is activated during hepatitis B virus replication and liver carcinogenesis associated with HBV X protein[J]. *Hepatology*, 2012, 56(4): 1240-1251.
- [17] Wang F, Anderson PW, Salem N, et al. Gene expression studies of hepatitis virus-induced woodchuck hepatocellular carcinoma in correlation with human results [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(1):33-44.
- [18] Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3):779-784.
- [19] Fioravanti J, Gomar C, Medina-Echeverez J, et al. Characterization of woodchuck apolipoprotein A-I: a new tool for drug delivery and identification of altered isoforms in the woodchuck chronic hepatitis model[J]. *J Med Virol*, 2011, 83(7):1221-1229.
- [20] Meng Z, Ma Z, Zhang E, et al. Novel woodchuck hepatitis virus (WHV) transgene mouse models show sex-dependent WHV replicative activity and development of spontaneous immune responses to WHV proteins[J]. *J Virol*, 2014, 88(3):1573-1581.
- [21] Kuang Y, Salem N, Wang F, et al. A colorimetric assay method to measure acetyl-CoA synthetase activity: application to woodchuck model of hepatitis virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(4):649-655.
- [22] Ochoa-Callejero L, Toshkov I, Menne S, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the woodchuck model of hepatocellular carcinoma[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(7):1127-1138.
- [23] Salem N, MacLennan GT, Kuang Y, et al. Quantitative evaluation of 2-deoxy-2-[F-18] fluoro-D-glucose-positron emission tomography imaging on the woodchuck model of hepatocellular carcinoma with histological correlation[J]. *Mol Imaging Biol*, 2007, 9(3): 135-143.
- [24] McKenzie EJ, Jackson M, Turner A, et al. Chronic care and monitoring of woodchucks (*Marmota monax*) during repeated magnetic resonance imaging of the liver[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2006, 45(2):26-30.
- [25] Tatti KM, Korba BE, Stang HL, et al. Mutations in the conserved woodchuck hepatitis virus polymerase FLLA and YMDD regions conferring resistance to lamivudine[J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(1):141-150.
- [26] Kosinska AD, Zhang E, Johrden L, et al. Combination of DNA prime-adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model [J]. *Plos Pathog*, 2013, 9(6):e1003391.
- [27] Huang KW, Wu HL, Lin HL, et al. Combining anti-angiogenic therapy with immunotherapy exerts better therapeutical effects on large tumors in a woodchuck hepatoma model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33):14769-14774.
- [28] Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions[J]. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(6):519-525.
- [29] Swiecki M, Colonna M. Type I interferons: diversity of sources, production pathways and effects on immune responses [J]. *Curr Opin Virol*, 2011, 1(6): 463-475.
- [30] Rodriguez-Madoz JR, Liu KH, Quetglas JJ, et al. Semliki forest virus expressing interleukin-12 induces antiviral and antitumoral responses in woodchucks with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *J Virol*, 2009, 83(23):12266-12278.
- [31] Otano I, Suarez L, Dotor J, et al. Modulation of regulatory T-cell activity in combination with interleukin-12 increases hepatic tolerogenicity in woodchucks with chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 474-483.
- [32] Nowrouzi A, Cheung WT, Li T, et al. The fetal mouse is a sensitive genotoxicity model that exposes lentiviral-associated mutagenesis resulting in liver oncogenesis[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2):324-37.
- [33] 孟忠吉, 张永红, 李文兵, 等. Toll样受体激动剂抑制土拨鼠肝炎病毒作用研究[J]. *肝脏*, 2013, 18(6):378-381.
- [34] D'Ugo E, Argentini C, Giuseppetti R, et al. The woodchuck hepatitis B virus infection model for the evaluation of HBV therapies and vaccine therapies[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2010, 5(12):1153-1162.

原发灶不明转移癌的临床诊断

陈金影 蔡虎 徐清华*

[摘要] 原发灶不明转移癌是一类经病理学诊断确诊为转移性,但是无法明确原发位点的恶性肿瘤。在全球范围内,原发灶不明转移癌是最常见的十大恶性肿瘤之一,死亡率位列第4。原发灶不明转移癌的治疗以经验性化疗为主,患者预后普遍较差。明确肿瘤的原发部位,有助于临床医生制定针对性的治疗方案,缓解患者焦虑情绪,从而提高生存率和改善生存质量。目前临床用于原发灶不明转移癌的方法主要有临床评估、影像学检查和组织病理学检查。近年来,随着分子生物学和生物信息学技术的飞速发展,基因分子检测显示出巨大的潜力,并已逐渐应用于原发灶不明转移癌的临床诊断。本文就原发灶不明转移癌的临床诊断方法相关进展作一综述。

[关键词] 原发灶不明转移癌; 分子诊断; 基因检测

Clinical diagnostic approaches for carcinoma of unknown primary

CHEN Jinying, CAI Hu, XU Qinghua*

(Canhelp Genomics Co., Ltd., Company Limited, Hangzhou, Zhejiang, China, 311188)

[ABSTRACT] Carcinoma of unknown primary (CUP) is a heterogeneous group of patients whose primary sites cannot be found when the cancer has metastasized. It is one of the ten most common malignancies and the fourth most common cause of cancer-related death worldwide. The prognosis of patients with CUP is usually poor for those receiving empiric treatments. Identification of the primary site can ease the patient's anxiety and improve long-term survival with the help of more specific therapies. The current diagnostic approaches constitute clinical evaluation, medical imaging and histopathological examination. With the rapid evolution of the molecular biology and bioinformatics technology, genomic testing has shown great potential and has been gradually used for CUP diagnosis in clinic. In this article, a general description of the diagnostic approaches for CUP will be presented.

[KEY WORDS] Carcinoma of unknown primary (CUP); Molecular diagnostics; Genomic testing

原发灶不明转移癌 (carcinomas of unknown primary, CUP) 是指一类经病理学检查证实为转移性,但是经过详细检查和评估仍不能确定原发位点的恶性肿瘤。大约有 15% 的癌症是由于转移灶的症状而被发现。通过临床、影像和病理诊断可以明确大部分的原发位点,但仍有 1/3 的转移癌原发位点不明,即真正意义上的 CUP^[1]。世界范围内,CUP 大约占有所有新发癌症的 3%~5%,位列最常见的十大癌症之一,死亡率排名第 4 位。CUP

中位诊断年龄约为 60 岁,男性发病率略高于女性^[2-4]。瑞典的一项研究发现 2.8% 的 CUP 患者存在家族遗传性^[5]。CUP 具有病史短,非特异性全身症状;80% 的患者有腺上皮分化;约 30% 的患者出现 3~4 个器官累及;预后差等临床特征^[6-7]。

大部分的 CUP 在肿瘤发生转移后,原发灶仍然很小,无法通过现有技术被检测,有时尸检也未能发现原发灶;或者转移后,自身免疫系统消除了原发灶;或者因为之前的手术无意中切除了原发

作者单位:杭州可帮基因科技有限公司,浙江,杭州 311188

*通讯作者:徐清华, E-mail: qinghuaxu10@fudan.edu.cn

灶(如因感染而行子宫切除术切除了子宫癌,或因各种原因“黑痣”被切除),未进行组织学检查^[8-9]。原发灶通常较小(<2 cm),通过尸检,大概55%~85%可以找到原发灶^[10-11]。最常见原发位点有肺、胰腺、肝胆、肾脏、肠、生殖系统和胃,一般转移至肺、淋巴结、骨头、大脑及一些不常见位点^[12-13]。CUP可转移至身体任何部位,因此无法通过转移模式来确定原发灶。根据组织病理学特征,CUP可分为分化较好的腺癌(50%)、分化不良或未分化的腺癌(30%)、鳞癌(15%)、肉瘤、黑素瘤和神经内分泌肿瘤等^[10, 14]。儿童患者若出现CUP,大部分为胚胎性恶性肿瘤^[2]。本文对CUP原发位点诊断的临床意义、检测方法及研究进展等方面综述如下。

1 明确肿瘤原发位点的临床意义

在现有癌症诊疗体系中,明确原发位点仍是进行标准化治疗的基础。目前对于CUP患者的治疗,通常采用广谱化疗药物,如紫杉醇联合铂类或者吉西他滨联合铂类。由于经验性化疗缺乏针对性,化疗效果欠佳,预后差,并且副作用较大,患者生存质量明显下降^[15-16]。一项荟萃研究显示CUP患者接受化疗后中位生存时间为4.5个月,一年生存率为20%,五年生存率仅4.7%^[17]。

研究数据表明,能够通过临床诊断明确原发灶的患者,往往预后较好^[18-19]。在最近的一项前瞻性临床试验中,研究人员采用逆转录多聚酶链式反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)检测CUP患者肿瘤组织中92个特异性基因的表达水平,判别原发位点,并根据判别结果选择有针对性的治疗方案。研究结果显示,接受经验性化疗的396例患者,与根据基因分型结果采取针对性化疗的194例患者的中位生存时间分别为9.1个月和12.5个月^[16]。因此提示,明确肿瘤的原发位点,选择有针对性的治疗方案,有助于提高疗效,延长患者生存时间,具有重要的临床意义。同时,找出肿瘤原发灶并采取有针对性的治疗方案,还有助于缓解患者的心理压力,改善恐惧、焦虑、抑郁等不良情绪,增强患者对治疗的信心^[17, 20]。

2 现有临床诊断方法

2.1 全面评估

根据美国国家综合癌症网络(National Com-

prehensive Cancer Network, NCCN)CUP临床实践指南,出现原发灶不明的肿瘤,患者需要接受全面评估。评估包括详细的病史询问:家族遗传病史(如遗传性非息肉病性结直肠癌,乳腺癌等);完善的体格检查,包括乳腺、淋巴结、皮肤、生殖器、直肠和盆腔检查;实验室检查如全血细胞计数,尿液分析,血肌酐和电解质分析,肝功能测试,大便隐血试验,血清化学检查;电子计算机X射线断层成像(computed tomography, CT)和正电子发射型计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET)检查。女性患者需行乳腺钼靶检查和阴道超声检查,男性患者需接受前列腺超声检查。如有特殊的症状或体征要进行内镜检查(喉镜、支气管镜、胃镜、肠镜或者膀胱镜),有腹股沟淋巴结转移性癌的患者要进行肠镜检查以排除直肠癌^[21]。

2.2 影像学分析

影像学检查具有快速、无创等特点,对于探寻转移癌患者的原发位点具有重要临床价值。CT和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)作为常规开展的影像学检查手段,可在术前或针对难以获得肿瘤组织样本的部位进行检测。但CT和MRI可能忽略正常体积的组织内微小损害和病理改变,而此类改变往往是CUP的初始表现。大多数恶性肿瘤细胞具有高代谢的特点,对葡萄糖的需求高,18F标记的氟代脱氧葡萄糖(2-[fluorine 18]fluoro-2-deoxy-d-glucose, 18F-FDG)是葡萄糖类似物,因此会在肿瘤细胞中大量聚集。基于这一生物代谢基础,采用PET技术可以观测恶性病灶的位点、大小、形态等特征。然而对于部分细胞中18F-FDG累积较少的肿瘤,PET的应用受到限制。针对此类情况,将PET和CT有机结合,实现功能代谢和解剖位点的一体化成像,18F-FDG PET/CT可以提供较详细的病灶信息,达到更精确的诊断^[22]。目前,18F-FDG PET/CT是最有效的影像学定位CUP原发位点的工具,诊出率可达24%~53%^[23]。18F-FDG PET/CT的优势还在于可进行全身扫描,对临床分期、治疗方案的制定和疗效的评估具有重要的临床价值。荟萃分析11项研究结果显示18F-FDG PET/CT的诊出率,敏感度和特异性分别为37%、84%和84%^[24]。尽管PET/CT扫描与常规影像技术相比能探查出更多的转移部位,但是其诊出率仍有待进一步提高,目前主要应用于头颈部淋巴结转移癌。

2.3 组织病理学检查

组织病理学检查是当前 CUP 临床诊断的基础。组织病理学检查按照以下流程:(1)确定组织样本中是否包含肿瘤细胞。(2)确定肿瘤的大类,是来源于上皮组织的恶性肿瘤,还是来自于结缔组织的肉瘤,或是淋巴瘤,抑或是黑素瘤。大部分 CUP 来源于上皮组织。(3)进一步缩小范围,确定肿瘤的亚型,是属于腺癌、鳞癌、实体瘤(甲状腺、肝脏、肾脏或者肾上腺)、神经内分泌肿瘤、生殖细胞肿瘤或者间皮瘤。(4)最终通过形态检查和免疫组化标志物,确认原发位点。不同类型的细胞表达不同的蛋白标志物,并且表达强度不同,利用过氧化物酶标

记的特异性肿瘤抗体可以判断特异性蛋白的表达量,进而缩小范围或者确定原发位点。例如 GCD-FP15 和乳腺球蛋白(mammaglobin)提示乳腺癌, TTF1 和 CK7+CK20-提示肺癌, HEPAR1 提示肝癌, RCC 提示肾癌, 甲状腺球蛋白(thyroglobulin, TG)/TTF1 提示甲状腺肿瘤, PLAP/OCT4 提示生殖细胞肿瘤, CDX2 加上 CK7-CK20+提示结直肠癌, WT1/PAX8 提示卵巢癌, 嗜铬颗粒蛋白 A(chromogranin A, CgA)和突触素(synaptophysin)提示神经内分泌肿瘤, 白细胞共同抗原(leukocyte common antigen, LCA)提示淋巴瘤或者白血病。如表 1 所示,已有多种抗体可用于 CUP 的鉴别诊断^[1,15,21]。

表 1 免疫组化标志物用于原发灶不明转移癌鉴别诊断

Table 1 Immunohistochemical markers for the diagnosis of carcinoma of unknown primary

肿瘤类型	免疫组化标志物
黑素瘤	S100, Melan-A, HMB45
肉瘤	肌动蛋白(actin), 波形蛋白(vimentin), S100, 结蛋白(desmin)
淋巴瘤	LCA
鳞癌	CK5/6, p63
间皮瘤	钙结合蛋白(calretinin), 间皮素(mesothelin), WT1, D2-40
结直肠癌	CK20, CK7, CDX2
胃肠道肿瘤	绒毛蛋白(villin), CK7
肝癌	HEPAR1, CD10
肺:腺癌	CK7, CK20, TTF1
肺:鳞癌	CK7, CK20, P63, CK5/6
肺:神经内分泌(小细胞,大细胞)	TTF1, CgA, 突触素(synaptophysin)
乳腺癌	CK7, ER/PR, GCD-FP15, 乳腺球蛋白, CEA
卵巢癌	CK7, ER, WT1, 间皮素(mesothelin)
子宫内膜癌	ER, PR, CEA, 波形蛋白(vimentin)
宫颈癌	CEA, 波形蛋白(vimentin), p16, ER/PR
膀胱癌(膀胱移行细胞癌)	CK20, CK5/6, p63, 血栓调节蛋白(thrombomodulin)
前列腺癌	PSA, CK7, CK20, PAP
胰腺癌	CK7, CK20, CA19-9, MUC5-AC, 间皮素(mesothelin), DPC4
肾癌	RCC, CD10, 波形蛋白(vimentin), CEA
肾上腺皮质癌	α 抑制素(alpha-Inhibin), Melan-A, CK7, CK20, 钙结合蛋白(calretinin)
生殖细胞肿瘤	PLAP, OCT4
甲状腺/滤泡/乳头状癌	TG, TTF1

综合 4 项大型研究的荟萃分析结果显示,在不告知原发位点和临床信息的情况下,采用免疫组化标志物能够准确识别已知原发灶的转移性癌的比例为 65.6%^[25]。较单一标志物,使用免疫组化标志物组合可以进一步提高原发位点的诊出率。Dennis 等^[13]采用包含 10 个免疫组化标志物的组合鉴别腺癌的原发位点,诊断准确率达到 88%。尽管这一结果来源于已知位点的肿瘤,但仍具有一定的参考价值。

组织病理学检查是诊断的金标准和临床基础治疗的依据。利用免疫组化可以明确一部分 CUP 患者的原发位点,但是诊出率还有待提高。目前国际上缺乏统一的标准,各实验室所采用的试剂和方法存在差异,操作步骤繁琐,可能需要一线抗体、二线抗体和三线抗体的联合使用;对于实验结果的解读主要依赖于病理医生的经验。一些部位的免疫组化标志物出现重叠,例如在部分肺腺癌和结肠腺癌中都有 TTF1 或者 CDX2 表达。而另一些部位则

缺乏高灵敏度和特异度的标志物,例如上消化道癌症,胰胆管癌和胃食道癌。CUP中有相当一部分为分化较差或未分化的肿瘤,由于缺少肿瘤细胞的起源特征,通过组织学检查无法进行分类。随着特异性抗体的开发应用、对已有标志物的深入研究,检测方法的创新和规范,免疫组化检测将继续在CUP的临床诊断中发挥重要作用。

2.4 基因分子检测

近年来,随着分子生物学和生物信息学技术的飞速发展,研究人员能够在很短时间内分析大量的生物成分,从而全面准确地获取样品中的生物信息。研究人员采用生物芯片和高通量测序技术,检测肿瘤组织样品中成千上万个基因的表达水平,从中发现与肿瘤类型相关的基因及特定的表达模式。研究发现,转移灶肿瘤基因表达谱与转移部位组织的基因表达谱存在差异,而与其原发部位组织的基因表达谱更相似,因此提示肿瘤在其发生、发展、转移的过程中,始终保留其组织起源的基因表达特征。根据这一原理,研究者开发了一系列基于核酸表达的分子标志物用于识别肿瘤的组织起源。Talantov等通过RT-PCR测定10个组织特异性基因的表达,用于判断原发位点是否来源于肺、乳腺、结肠、卵巢、胰腺和前列腺。在260个已知原发位点的转移性癌中进行检测,准确率为78%^[26]。Varadhachary等在104个CUP样本中对此进行验证,找出61%的原发灶,这一结果与病理学诊断结果相一致,证实了利用10个基因的表达模式来判别肿瘤原发位点的可行性^[27]。Ma等通过RT-PCR检测肿瘤组织中92个基因的表达水平,并将92个基因的表达模式与数据库中32种癌症的基因表型进行比对,从而判别

肿瘤原发部位。该方法判别原发位点的准确率为87%^[28]。Wang等通过构建涵盖22种肿瘤类型、5800例样本的基因表达谱数据库,对基因表达模式进行分析归纳,从中筛选出一组与肿瘤组织起源密切相关的基因,建立96基因分类模型;并首次在中国人群中大规模验证,分类准确率达到88.4%^[29-30]。Ramaswamy等采用生物芯片对218个肿瘤组织和90个正常组织样品进行分析,找出16063个目标基因用于CUP的鉴别诊断;随后在54例独立样本中进行验证,判别的准确率为78%,其中8例转移性肿瘤中有6例正确识别原发位点^[31]。另一类肿瘤标志物基于特异性的microRNA的表达谱。microRNA是一类在动植物基因组中广泛存在的、长度大约为20~25个核苷酸的内源性RNA。microRNA不仅在控制个体发育中对基因的表达调控起着非常精确的“开-关作用”,而且在疾病发生中也扮演着重要的角色。Rosenfeld等通过分析一组48个microRNA的表达水平,可以识别22种肿瘤的组织起源,准确率为89%^[32]。

相比于影像学和组织病理诊断方法,分子诊断具有灵敏度和特异度高、结果判读客观等优势,在欧美一些发达国家已作为辅助手段应用于CUP原发位点的诊断。表2中列举了3款在欧美发达国家上市的相关基因检测产品^[28, 32-33]。其中,Tissue of Origin Test[®]检测试剂盒已经通过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的认证,可用于检测包括膀胱癌、乳腺癌等15类癌症,58种亚型,准确率达到89%^[34]。CancerTYPE ID[®]92基因检测采用RT-PCR技术平台,因此具有更好的临床适用性。目前该项检测主要以实验室自主开发诊断试剂模式提供检测服务^[28]。

表2 基因分子检测用于原发灶不明转移癌鉴别诊断

Table 2 Genomic testings for the diagnosis of carcinoma of unknown primary

检验产品	技术平台	组织类型	可检测肿瘤类型	基因数目	准确率	服务模式
Cancer Origin ^[34]	生物芯片	石蜡包埋组织	49	64	85%	实验室自主开发诊断试剂
CancerTYPE ID [®] [28]	RT-PCR	石蜡包埋组织	50	92	87%	实验室自主开发诊断试剂
Tissue of Origin test [®] [33]	生物芯片	石蜡包埋组织	58	2 000	89%	美国FDA注册诊断试剂

基因分子检测面临的主要挑战包括:(1)一个大样本量、涵盖多种肿瘤类型的基因表达谱数据库是决定基因分子检测性能的核心和基础。如果某些肿瘤类型没有包括在初始的基因表达谱数据

库中,则基因分子检测将无法应用于这类肿瘤的判别;(2)在肿瘤基因表达谱数据库构建和开发过程中,需要肿瘤学、病理学、分子生物学、以及统计学和生物信息学等多个领域不同知识结构的相互

结合,基因分子检测产品的临床应用需建立在临床医生对于该项检测的方法和原理充分了解的基础之上;(3)最后能否将核酸检测稳定地应用于临床上比较容易获取的石蜡包埋组织,克服RNA降解对检测结果的影响;选择操作简便、快速,普及程度更高的技术平台都将决定基因分子检测的临床应用前景。

3 结语

CUP的发病率占有所有新发恶性肿瘤的3%~5%。明确肿瘤的原发部位,有助于临床医生制定针对性的治疗方案,同时缓解患者消极情绪,对提高患者生存时间和生存质量具有重要的意义。在CUP临床诊断中,应注重影像学、组织病理和分子诊断等多种检测方法的相互指导和印证。例如,影像学的观测结果,可为后续肿瘤组织的获取、免疫组化标志物的选择提供线索和依据;通过将临床数据、影像学和组织病理检测结果纳入统计分析模型,又有助于进一步提升基因检测的敏感度和特异度。最终,随着影像学、组织病理和分子诊断技术的进步,不同检测手段有机结合、相互补充,将推动CUP临床诊断的不断发展,帮助更多的患者明确原发部位,从而实现癌症的精准治疗。

参考文献

- [1] Oien KA, Dennis JL. Diagnostic work-up of carcinoma of unknown primary: from immunohistochemistry to molecular profiling [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23 (suppl 10):x271-x277.
- [2] Pavlidis N, Fizazi K. Cancer of unknown primary (CUP)[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2005, 54(3):243-250.
- [3] Stella GM, Senetta R, Cassenti A, et al. Cancers of unknown primary origin: current perspectives and future therapeutic strategies[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 12.
- [4] Kamposioras K, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Exploring the biology of cancer of unknown primary: breakthroughs and drawbacks[J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(5):491-500.
- [5] Hemminki K, Ji J, Sundquist J, et al. Familial risks in cancer of unknown primary: tracking the primary sites [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(4):435-440.
- [6] 余英豪. 不明原发部位肿瘤的研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2005, 20(5):454-457.
- [7] 杨原, 宋福林. 原发部位不明癌症的分子生物学研究进展[J]. *沈阳部队医药*, 2008, 21(3):208-209.
- [8] 张骏, 刘尚廉. 不明来源转移癌及其原发灶的寻找[J]. *肿瘤防治研究*, 1993, 20(1):65-67.
- [9] 姜达, 董倩, 张增叶. 原发部位不明转移癌的诊疗进展[J]. *疑难病杂志*, 2003, 2(1):52-54.
- [10] Tothill RW, Shi F, Paiman L, et al. Development and validation of a gene expression tumour classifier for cancer of unknown primary[J]. *Pathology*, 2015, 47(1): 7-12.
- [11] Hainsworth JD, Greco FA. Gene expression profiling in patients with carcinoma of unknown primary site: from translational research to standard of care[J]. *Virchows Arch*, 2014, 464(4):393-402.
- [12] Briasoulis E, Pavlidis N. Cancer of unknown primary origin[J]. *The Oncologist*, 1997, 2:142-152.
- [13] Dennis JL, Hvidsten TR, Wit EC, et al. Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10):3766-3772.
- [14] Horlings HM, van Laar RK, Kerst JM, et al. Gene expression profiling to identify the histogenetic origin of metastatic adenocarcinomas of unknown primary [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(27):4435-4441.
- [15] Greco FA. Cancer of unknown primary site: evolving understanding and management of patients [J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2012, 10(8):518-524.
- [16] Hainsworth JD, Rubin MS, Spigel DR, et al. Molecular gene expression profiling to predict the tissue of origin and direct site-specific therapy in patients with carcinoma of unknown primary site: a prospective trial of the sarah cannon research institute [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(2):217-223.
- [17] Richardson A, Wagland R, Foster R, et al. Uncertainty and anxiety in the cancer of unknown primary patient journey: a multiperspective qualitative study [J]. *BMJ Support Palliat Care*, 2015, 5(4):366-372.
- [18] Varadhachary GR, Raber MN, Matamoros A, et al. Carcinoma of unknown primary with a colon - cancer profile-changing paradigm and emerging definitions[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(6):596-599.
- [19] Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Lenzi R, et al. Analysis of a diagnostic strategy for patients with suspected tumors of unknown origin[J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13 (8):2094-2103.

- [20] Hyphantis T, Papadimitriou I, Petrakis D, et al. Psychiatric manifestations, personality traits and health-related quality of life in cancer of unknown primary site [J]. *Psycho-Oncology*, 2013, 22(9):2009-2015.
- [21] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: occult primary (cancer of unknown primary[CUP])[S]. 2013.
- [22] 贺小婷,刘超英,李江. 原发灶不明转移癌的诊断与治疗进展[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(11):1291-1294.
- [23] Reske SN, Kotzerke J. FDG-PET for clinical use. Results of the 3rd German Interdisciplinary Consensus Conference, "Onko-PET III", 21 July and 19 September 2000 [J]. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28(11):1707-1723.
- [24] Kwee TC, Kwee RM. Combined FDG-PET/CT for the detection of unknown primary tumors: systematic review and meta-analysis [J]. *Eur Radiol*, 2009, 19(3):731-744.
- [25] Anderson GG, Weiss LM. Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010, 18(1):3-8.
- [26] Talantov D, Baden J, Jatke T, et al. A quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to identify metastatic carcinoma tissue of origin [J]. *J Mol Diagn*, 2006, 8(3):320-329.
- [27] Varadhachary GR, Talantov D, Raber MN, et al. Molecular profiling of carcinoma of unknown primary and correlation with clinical evaluation [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(27):4442-4448.
- [28] Ma XJ, Patel R, Wang X, et al. Molecular classification of human cancers using a 92-gene real-time quantitative polymerase chain reaction assay [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130(4):465-473.
- [29] Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26):15149-15154.
- [30] Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. microRNAs accurately identify cancer tissue origin [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(4):462-469.
- [31] Pillai R, Deeter R, Rigl CT, et al. Validation and reproducibility of a microarray-based gene expression test for tumor identification in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens [J]. *J Mol Diagn*, 2011, 13(1):48-56.
- [32] Meiri E, Mueller WC, Rosenwald S, et al. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin [J]. *Oncologist*, 2012, 17(6):801-812.

(上接第49页)

- [9] 胡兴文. 武汉地区宫颈感染人乳头瘤基因病毒分析 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 14(14):1831-1833.
- [10] 卢建明,杨晓菊,肖长义,等. 湖北省宜昌地区1038例妇女宫颈人乳头瘤病毒感染情况调查 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 29(28):4845-4849.
- [11] Cuzick J, Cadman L, Mesher D, et al. Comparing the performance six human papillomavirus tests in a screening population [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(1):908-913.
- [12] 韩品,王培昌,张蕴秀,等. 北京地区妊娠女性HPV感染调查及基因型分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(20):2763-2765.
- [13] 赵芹,李忠信. 东莞地区女性宫颈人乳头瘤病毒感染及基因型分布情况分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(22):2029-2030.
- [14] 聂双双,丁显平,陈祖翼,等. 成都地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布、多重感染及相关趋势研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(22):3026-3028.
- [15] 胡慧仙. 高危型HPV在健康人群中感染状况的分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2013, 7(20):60-61.
- [16] Bonde J, Rebolj M, Ejegod DM, et al. HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using clart HPV2 Papillomavirus genotype microarray system [J]. *BM C Infect Dis*, 2014, 14(1):413-415.

临床医学分子诊断国家地方联合共建工程实验室

临床医学分子诊断国家地方联合共建工程实验室位于广州高新技术产业开发区科学城香山路19号中山大学达安基因股份有限公司产业基地,是由中山大学达安基因股份有限公司牵头,中山大学热带病防治教育部重点实验室、中山大学华南肿瘤生物学重点实验室共同参与组建,2011年经广东省发展和改革委员会批准成立,旨在深化产学研合作,充分发挥各组建单位在分子诊断技术不同细分领域的优势,实现基础研究、应用基础研究、产业化开发、临床应用研究以及标准物质研究和相关标准制定等的紧密衔接,不断提升分子诊断产业核心竞争力,促进分子诊断高技术产业可持续性和跨越式发展。实验室有科研人员147名,其中高级职称18名,中级职称35名;博士17名,硕士57名。实验室总面积约3600平方米,功能齐全,建设有分子诊断关键技术研究部、分子诊断临床应用技术研究部、分子诊断核心原料研究部、临床检验中心、分子诊断仪器研究部、科技信息管理中心6大部门和基因诊断技术实验室、免疫诊断技术实验室、肿瘤临床分子分型检测实验室、传染病分子诊断技术实验室、基因诊断核心原料实验室、免疫诊断核心原料实验室、仪器研发实验室、仪器应用开发实验室、仪器测试实验室9个研究室及研发平台。拥有高通量基因测序系统、3500xL DX遗传分析仪、串联质谱仪、全自动荧光定量PCR仪、实时荧光定量PCR仪、全自动核酸提取仪、全自动时间分辨仪、高效液相色谱仪、荧光显微镜、核酸蛋白质含量测定仪等仪器,仪器总值近5000万元。

该实验室以基因和蛋白质研究为主要研究方向,全面开展包括血源性、食源性以及人畜共患病病原体、心血管疾病、肿瘤、遗传疾病等方面的快速检测技术研究及其配套检测试剂盒的开发,加快具有重要临床意义的新型检测靶标的产业化;构建以基因或蛋白的定量(或定性)分析技术为主的临床医学分子诊断技术体系;重点解决临床医学分子诊断领域共性的关键技术,如新型染料的合成标记和纯化技术、顺磁偶联技术、发光物标记技术、检测体系的标准化技术、各类封闭液/反应缓冲液/标记物保存液配方优化、产品质量控制技术和产品标准等方面存在的关键技术问题;重点开展传染病检测鉴别技术和肿瘤临床分子分型检测技术及产品开发。2012年以来,承担及参与科研项目38项,获得政府科研经费约6000万元。其中主持国家“863”计划2项,“十二五”国家科技重大专项1项及子课题1项,省市级科研项目9项;获授权国家专利42项,其中发明专利29项,实用新型专利13项。人才培养方面,组建单位间建立联合培养人才机制,建设大学生实习基地,近3年培养博士后2人,硕博士10余人。

学术带头人何蕴韶是中山大学教授,广州市第十二届人大代表,享受国务院政府特殊津贴专家(1993年起)。现任临床医学分子诊断国家地方联合共建工程实验室主任,卫生部医药生物工程技术创新中心主任,中山大学达安基因股份有限公司董事长,广州市健康医疗协同创新重大专项首席科学家,长期从事分子诊断技术的研究与开发并取得系列创新性成果。



→ 公司简介

中山大学达安基因股份有限公司依托中山大学雄厚的科研平台,以分子诊断技术为主导,集临床检验试剂和仪器的研发、生产、销售以及全国连锁医学独立实验室临床检验服务为一体的生物医药高科技集团公司,拥有7家研究机构、50多家全资或合资的下属企业。由公司自主研发的荧光定量PCR检测(FQ-PCR)系列产品在国内的市场覆盖率稳居行业第一。



→ 公司优势

- ★ 自主品牌的通道空间
- ★ 完善的售前和售后服务
- ★ 中山大学雄厚的科研平台
- ★ 自主知识产权的临床诊断试剂
- ★ 国内专业诊断产品供应商的首选之一

→ 多元化产品系列



→ 企业使命

达生命之源, 安健康之本

- ★ 不断完善创新机制,以全面的技术创新、管理创新、经营模式创新,探索生命的奥秘,以一流的产品和服务推动公司的不断成长。
- ★ 关爱社会、回馈社会,推动健康产业的发展。



公司总部

地址: 广州市高新技术开发区科学城香山路19号(510665)
电话: 020-32290789 传真: 020-32290158

营销中心

电话: 020-32068328 传真: 020-32068820
Http: //www.daangene.com