



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

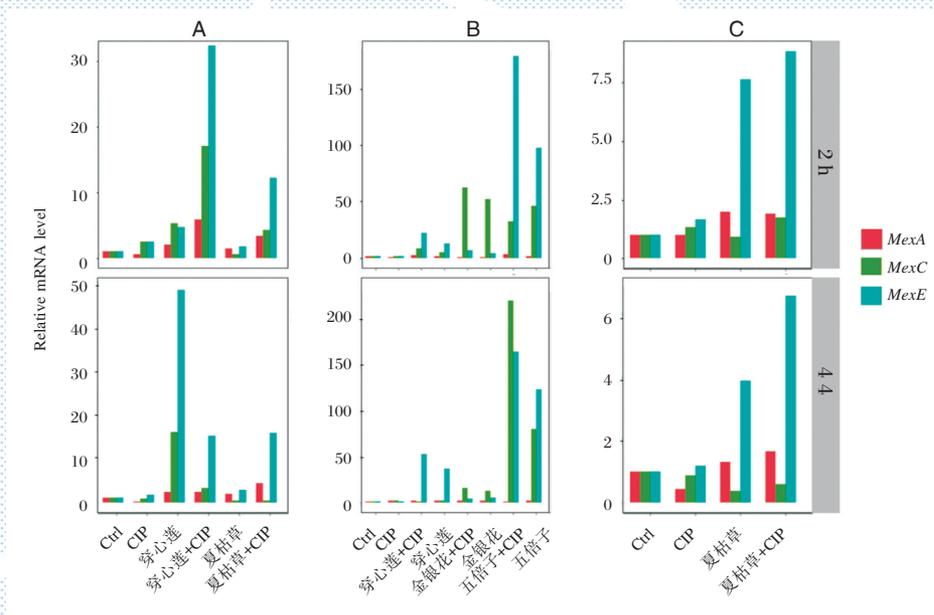
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2017年11月 第9卷 第6期 总第52期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 9 Number 6 November 2017



A: PA8; B: PA11; C: PA36

图(P405) qPCR检测中药对外排泵基因表达的影响

Figure(P405) The effect of traditional Chinese medicine on efflux pump gene expression by qPCR

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

1 1 >

分子诊断与治疗杂志

二〇一七年十一月

第九卷 第六期

中山大学



陈茶

陈茶，1970年5月出生。1994年毕业于重庆医科大学，医学硕士学位。

主任技师，研究员，博士生导师。现任广东省中医院大学城医院检验科主任。目前担任中国合格评定国家认可委员会主任评审员，国家自然科学基金委同行评议专家，中国中西医结合学会检验分会感染学组副主任委员，广东省预防医学会微生物与免疫学专业委员会副主任委员，广东省肝脏病学会检验诊断专业委员会副主任委员、广东省医疗安全协会与检验医学分会副主任委员等社会任职10余项。

陈茶研究员长期从事微生物检验的临床和科研工作，主要研究方向为细菌耐药机制和临床疑难菌鉴定及分类学研究。近年来主持了4项国家自然科学基金面上项目，省部级、厅局级科研项目10余项，获国家发明专利2项，广东省科技进步二等奖2项、三等奖1项，主编、副主编、主译专著和检验规划教材共计5本，参编检验规划教材2本，专著5本，在国内外期刊发表文章100余篇，其中SCI收录10余篇。已招生培养博士生1人，硕士生13人。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2017年11月 第9卷 第6期 总第52期 Bimonthly Volume 9 Number 6 November 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 郝芬
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 黄文珊
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 国内外公开发售
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11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>HAO Fen</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen HUANG Wenshan</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>2017.11.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2017年11月 第9卷 第6期

目次

述 评

人巨细胞病毒核酸标准物质研制与应用 付岳 王瑞霞 邹迎曙 等(367)

论 著

- 系统性红斑狼疮患儿外周血 IL-6、IL-10、IL-17 水平变化及其在单个核细胞中的表达研究
..... 沈茹 李艳君 林丽佳(371)
- 肇庆地区血小板供者库的建立及应用 廖扬勋 陈志忠 余文潮 等(376)
- 上皮性卵巢癌血浆中 microRNA-30a-5p 含量与分级及分期的关系
..... 徐文莉 林燕华 罗艺 等(381)
- 直接快速多色荧光 PCR 技术在高危型 HPV 分型中的应用探讨
..... 刘淑园 肖湘文 丁渭 等(386)
- HCV RNA 水平与 HCV 基因型别的相关性研究 周萍 杨柳 李金洁 等(391)
- 33 例中国型 $\gamma(\delta\beta)^0$ 地中海贫血病例的临床分析 陈剑虹 钟泽艳 官志扬 等(396)
- 中药对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵的作用研究 王淋荆 曾建明 鲁洋 等(401)
- 激素 6 项化学发光试剂盒性能比较 王小艳 李志雄 董志宁 等(408)
- 人乳头状瘤病毒基因分型在宫颈病变中的临床价值 武燕红 吴雪溶 吕伟 等(416)

综 述

- 量子点作为荧光探针的生物应用进展 郭欣欣 尔夏提·图尔荪 韩振玉 等(422)
- 长链非编码 RNA 与乳腺癌耐药研究 王月月 杨清玲 陈昌杰(426)
- 结直肠癌分子分型及其临床意义 周钊 牛洪欣(430)

讲 座

浅谈医用电气设备电磁兼容标准在我国的进展及现状 刁春芳 高旭年(437)

专家风采

陈茶 (封二)

实验室巡礼

广东省中医院大学城医院检验科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 6 November 2017

CONTENTS

COMMENTS

The development and application of reference materials for human cytomegalovirus nucleic acids

FU Yue, WANG Ruixia, ZOU Yingshu, LI Erhua, GAO Xunian, WANG Jun (367)

ORIGINAL ARTICLES

The expression of IL-6, IL-10 and IL-17 in peripheral blood and their mRNA in peripheral blood mononuclear cells from children with systemic lupus erythematosus

SHEN Ru, LI Yanjun, LIN Lijia (371)

Establishment and clinical application of platelet donor registry in Zhaoqing area

LIAO Yangxun, CHEN Zhizhong, YU Wenchao, CHEN Shangliang, LIANG Jiezheng, CHEN Chaohong, LI Jiemin (376)

Relationship between plasma microRNA-30a-5p content and grading and staging in epithelial ovarian cancer

XU Wenli, LIN Yanhua, LUO Yi, LI Kang, ZHANG Hongde (381)

Application of direct and rapid multi-color fluorescence PCR in high risk HPV typing

LIU Shuyuan, XIAO Xiangwen, DING Wei, ZENG Ye, ZHANG Tianhai, WANG Panpan, CHEN Huayun (386)

Study on the correlation between HCV RNA level and HCV genotypes

ZHOU Ping, YANG Liu, LI Jinjie, WANG Xiaoqin (391)

Clinical analysis of 33 cases of deletional Chinese $\gamma(\delta\beta)^0$ -thalassemia in Huizhou Southern China

CHEN Jianhong, ZHONG Zeyan, GUAN Zhiyang, HE Hailin, ZHONG Guoxing, YANG Kunxiang (396)

Study on the effect of traditional Chinese medicine on efflux pump of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

WANG Linjing, ZENG Jianming, LU Yang, LAN Kai, LUO Qiang, LIN Dongling, ZHANG Weizheng, CHEN Cha (401)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 6 November 2017

CONTENTS

Comparison of the performance of the six hormone CLIA kits

WANG Xiaoyan, LI Zhixiong, DONG Zhining, LI Ming, WU Yingsong (408)

The clinical significance of HPV genotyping in cervical lesions

WU Yanhong, WU Xuerong, LV Wei, ZHANG Xin, ZHENG Jie (416)

REVIEWS

Progress in application of quantum dots as fluorescent probes

GUO Xinxin, Erxiati·Tuersun, HAN Zhenyu, LI Jinzhu, YANG Yan, LIU Tiancai (422)

Study on long non-coding RNA and breast cancer drug resistance

WANG Yueyue, YANG Qingling, CHEN Changjie (426)

The molecular classifications of colorectal cancer and its clinical significance

ZHOU Zhao, NIU Hongxin (430)

人巨细胞病毒核酸标准物质研制与应用

付岳¹ 王瑞霞¹ 邹迎曙¹ 李尔华² 高旭年² 王军^{1*}

[摘要] 人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是威胁人类健康的最重要病原之一。随着分子生物学技术的发展, HCMV 核酸水平的检测逐渐得到了广泛的认可,这也就需要研制 HCMV 核酸标准物质来保证检验数据的真实可靠。本文简要介绍了国内外目前存在的 HCMV 核酸标准物质的研制情况,并对这些标准物质在应用中遇到的问题进行了阐述,旨在为人巨细胞病毒核酸检测诊断试剂的标准化,以及为其质量控制提供参考。

[关键词] 人巨细胞病毒;核酸;标准物质

The development and application of reference materials for human cytomegalovirus nucleic acids

FU Yue¹, WANG Ruixia¹, ZOU Yingshu¹, LI Erhua², GAO Xunian², WANG Jun^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Medical Device Testing and Safety Evaluation, Beijing Institute of Medical Device Testing, Beijing, China, 101111; 2. Guangzhou Bangdesheng Biological Technology Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] Human cytomegalovirus (HCMV) is one of the most important pathogens which are threatening people health in the world. With the development of molecular biology techniques, value of HCMV DNA detection has been recognized gradually. The reference materials for HCMV test are critical to guarantee the quality of the test. In this study, the research progress of the reference materials for HCMV nucleic acid amplification testing and the problems in application will be summarized. The aim of this study was to standardize the diagnostic reagents for human cytomegalovirus nucleic acid testing and provide a reference for the quality control.

[KEY WORDS] Human cytomegalovirus; Nucleic acid; Reference materials

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)属于 β 疱疹病毒亚科,病毒基因组大约 235 kb。病毒感染具有严格的宿主特异性,例如人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)只能感染人^[1]。HCMV 感染在人群中很普遍但都无任何感染症状^[2]。孕妇感染 HCMV 可引起新生儿宫内感染,导致胎儿畸形等严重疾患^[3-4]。另外,在免疫功能低下的人群中,例如在艾滋病、器官移植病人中若

感染 HCMV 将引起严重的并发症^[5-6]。目前实验室检测 HCMV 感染的方法有病毒学检测、血清学检测与核酸检测等^[7]。其中血清学的检测是应用最普遍的检测方法,但是由于血清学检测的局限性以及临床应用的需要, HCMV 核酸检测逐步开始受到重视。然而最近有关 HCMV 检测的能力验证报告指出分子诊断缺乏重复性与可比性,究其原因主要是当前缺乏可用的国际标准物质^[8]。在

基金项目:北京市科技计划课题(Z151100002115047)

作者单位:1. 北京市医疗器械检验所, 医疗器械检验与安全性评价北京市重点实验室, 北京 101111

2. 广州邦德盛生物科技有限公司, 广东, 广州 510665

*通讯作者:王军, E-mail: wangjun1@bimt.org.cn

临床实验室检验中,采用可靠的标准物质是得到高质量检测数据的前提和保证,也是作出完整科学结论的基础。无论为体外诊断试剂制造商对产品进行量值溯源,还是实验室间的能力验证(室间质评),都离不开 HCMV 核酸标准物质。目前世界卫生组织(World Health Organization, WHO)、美国国家标准和技术研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST)已经研制完成 HCMV 国际标准物质,国内也开展了相关的工作。本文对 HCMV 核酸标准物质的研制进展做简要概述,旨在为人巨细胞病毒核酸检测诊断试剂的标准化,以及为其质量控制提供参考。

1 HCMV 核酸标准物质研制进展

1.1 WHO 国际标准物质

目前 WHO 所研制的大部分核酸类国际标准物质都是用接近天然的生物材料制备而成。例如有些核酸类国际标准物质是将灭活的野生型病毒或者培养物稀释于人源阴性血清或通用稀释液,冻干后分装,按照 WHO 的固定程序对制备的候选标准物质进行稳定性和均匀性检验、多中心合作联合定值^[9]。WHO 制备的国际标准物质的表述单位通常为 IU(international unit),这种标准物质质量值是 WHO 经多中心联合定值后,确定其可以作为第一个国际标准物质后赋予的一个标准数值,后续标准物质的更替则以第一个标准值为标准继续定值。

2008年6月在英国国家生物制品鉴定所(the National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)举行的基因扩增技术标准化临床诊断会议上讨论了关于 HCMV 标准品制剂的建议,对候选原材料和配方进行了讨论,并且最终确定候选标物是包含完整病毒颗粒的 HCMV Merlin 毒株(NIBSC code 09/162)^[10]。Merlin 毒株为 gB1 基因型,与其它实验室常用 HCMV 毒株相比,该低传代株具有良好的 HCMV 的特征,包含近似于完整的 HCMV 基因组,且已完全测序(Gene bank 登录号: AY446894)^[11]。制备过程主要是将 HCMV Merlin 毒株的培养上清样本在人胚肺成纤维细胞内增殖,收获培养上清液后先低速离心,然后超速离心收获病毒沉淀。考虑到用于 HCMV 检测样本来源的多样性,候选标准品被溶于通用的缓冲液,该缓冲液含有 10 mmol/L 的 Tris-HCl 和 0.5% 的人血清

白蛋白,然后采用各自实验室所用的样本基质来进一步稀释。最后该制剂经过冷冻干燥以确保长期稳定。此标准品是通过来自 14 个国家的 32 个实验室进行联合定值,其中大多数实验室都采用实时荧光定量 PCR 法,最后其量值指定为 5×10^6 IU,并被推荐为首个针对 HCMV 的 WHO 国际标准物质,主要供临床医学实验室和体外诊断试剂制造商用于以核酸扩增技术为基础的二次引用 HCMV 校准试验^[12]。

1.2 NIST 国际标准物质

为了建立成分单一且稳定供应的国际标准物质,早在 2002 年即有专家在 WHO 会议上提出采用人工合成方法生产国际标准物质,随即开展了一系列相关研究^[13]。其中 NIST 在 HCMV 人工合成国际标准物质的研发中取得了很大进展。

不同于 HCMV-WHO 国际标准物质,NIST 研制的 HCMV 国际标准物质是经过提取纯化的 HCMV 基因组 DNA。实验室用毒株在体外培养时常会产生基因序列缺失而导致假阴性检测结果,将目的基因连接于质粒中会保持基因组的稳定^[14]。由于 HCMV 基因组大约 235 kb,一般质粒载体无法连接,所以 NIST 研制的 HCMV 核酸标准物质(SRM2366)是将 HCMV 基因组通过同源重组方式插入到细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)上,以产生稳定基因组的克隆并且具有低传染性^[15]。SRM2366 所用毒株为 Towne 株,包含了除 IRS1、US1-15、和 UL147 以外相对完整的 HCMV 基因组。其制备过程主要是将构建好的 HCMV Towne BAC 转入 EPI300 大肠杆菌中,经过培养后收集菌体,再采用碱性裂解法提取纯化菌体释放的 BAC DNA,最后将 BAC DNA 溶于 Tris-EDTA(10 mmol/L Tris base, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)通用缓冲液中进行分装。此种制备方法可以持续获得稳定基因组的核酸标准品。SRM2366 的定值不同于 WHO 采用实时荧光定量 PCR 的多中心协作定值,而是采用最新的数字 PCR 技术,此方法不需要线性标准品即可计算出待检 DNA 分子的拷贝数,而且实验中的探针和引物可以与荧光定量 PCR 通用。最后,制备的 3 个水平的 HCMV 标准品赋值分别为 420 copies/ μ L, 2 702 copies/ μ L, 19 641 copies/ μ L,并附有置信水平的不确定度^[16]。

1.3 国内人巨细胞病毒标准物质、质控物

随着 HCMV 核酸检测技术在国内临床实验室

的开展以及《临床基因扩增实验室工作规范》的施行,国内相关机构和临床检验实验室也在探索开发 HCMV 标准物质、质控物等。在临床检验中 HCMV-DNA 的定量检测主要通过尿液、血浆、乳汁等样本完成,并且由于尿液容易收集,标本阳性检出率较高,而其它标本阳性检出率较低^[17],所以目前国内一些临床实验室收集 HCMV-DNA 阳性的患者尿液样本再经过过滤制备成室内质控物^[18]。目前国内实验室制备的室内质控物一般不添加任何防腐剂与稳定剂,这样可避免基质效应的不确定影响;并且研究也发现不加入稳定剂与向尿液室内质控物中加入稳定剂(牛血清白蛋白)无明显差别^[19]。但是,此类质控物一般只能作为实验室内质控,无法像 WHO 或者 NIST 制备的 HCMV 核酸标准物质一样方便的进行更替代以及量值溯源,在应用的过程中也就有所限制,对促进 HCMV 核酸检测标准化作用不大,所以国内也有些公司或机构研制了可溯源至 WHO-HCMV 国际标准物质的二级标准物质,主要用于校准仪器和装置、实验室质量控制等,在一定程度上解决了这个问题。

2 HCMV 核酸标准物质的应用

目前,WHO 等多个国际组织正在通过广泛应用国际参考物质,来证明其在核酸检测标准化过程中的实际应用价值。其中 HCMV 核酸国际标准品在其中起到了重要的作用。在实验室间的能力验证中,Rychert 等^[20]应用 WHO-HCMV 核酸标准物质来评价各参与实验室现行的 HCMV 核酸检测方法,结果显示 WHO-HCMV 核酸标准物质促进了 HCMV 检测的标准化并且各实验室数据具有可比性。HCMV 核酸标准物质还应用于产品的溯源、仪器的评价和校准等。目前罗氏、雅培等体外诊断试剂制造厂商的校准品均溯源至 WHO-HCMV 标准物质,并显示了良好的一致性,不过各检测系统的灵敏度仍然具有差异^[21]。Tsai 等^[22]也应用 WHO-HCMV 标准物质来对不同 HCMV 核酸检测系统的性能特征、相关性和工作流程等进行评价。而且随着数字 PCR 技术的应用,为了评价荧光定量 PCR 和数字 PCR 等不同平台在核酸定量检测中的性能,Pavšič 等^[23-24]分别应用 WHO 和 NIST 研制的 2 种核酸标准物质进行试验,结果表明数字 PCR 受到不同组成的 PCR 反应组分所产生的影响

更小,并且在检测临床血浆样本中 HCMV 时,发现当病毒 DNA 载量 $\geq 4 \log_{10}$ 时数字 PCR 的精密度明显高于荧光定量 PCR 的精密度。

在 HCMV 核酸以及其它核酸标准物质的广泛应用的过程中也出现了一些问题,例如,核酸提取效率的问题。例如,WHO 和 NIST 研制的 HCMV 核酸国际标准物质制备方法不同,SRM2366 国际标准物质为人工构建具有基本完整的病毒基因组,并且低传染性,但类似于此类的合成的核酸未参与核酸提取过程,故不能反映病毒核酸的提取效率;同时,国际参考物质在于提供一个准确的数值,而不是关注提取效率,因此在制备国际参考物质的时候是否需要考虑提取过程还有待讨论。另外,HCMV 核酸标准物质的互换性也需要注意。互换性为不同检测系统对某个参考物质和来自健康或疾病个体代表样品的检测所得的结果量值一致,即各个样品或参考物质的检测值可以在不同检测系统间互换^[25]。例如,Hayden 等^[26]在研究 HCMV 核酸标准物质的互换性时发现,通过 8 家实验室采用 10 种不同的荧光定量 PCR 检测 WHO-HCMV 标准物质与 50 份临床样本,通过线性回归和对应分析 WHO-HCMV 标准物质的互换性,发现在此分析方法下 WHO-HCMV 标准物质互换性较差。并且 HCMV 核酸国际标准物质在不同基质中也会有影响,Jones 等^[27]研究表明使用全血稀释 WHO-HCMV 标准物质时会产生基质效应,全血稀释的 WHO-HCMV 标准物质进行 HCMV 全血定量测定校正试验时,样本的测量浓度值会偏高。然而使用血浆或通用缓冲液对标准物质进行稀释时无基质效应出现;而 SRM2366 国际标准物质,虽然不需要对其进行提取,但是在实验中采用血浆或者全血作为稀释液进行稀释后,于临床样本一同进行测量结果显示互通性良好。

小结

随着 HCMV 相关疾病研究的深入,HCMV 的危害越来越受到重视。与其它方法相比,核酸水平的检测更为简便、可靠,并且可以做到早期检测及量化,对判断 HCMV 的活动性和评价抗病毒治疗疗效的动态监测有着重要的意义。而相应国际标准品建立工作也在不断推进,已存在的 WHO 和 NIST 的 HCMV 核酸标准物质在一定程度上促进了 HCMV 检测以及核酸检测的标准化。当然,在

推动 HCMV 核酸检测的标准化中也遇到了很多问题,例如上文中提到的核酸提取效率问题,所以更需要推动核酸检测的全自动化以减少手动提取核酸的误差。并且目前国内市场上存在着大约 10 家 HCMV 核酸诊断试剂生产厂家,由于国内还缺乏可靠的 HCMV 核酸标准物质,所以大部分市售的 HCMV 核酸检测试剂的标准化还存在问题,这就更需要相关机构去努力研制出可靠的 HCMV 核酸标准物质以促进核酸检测的标准化,为临床准确诊断提供合理依据。

参考文献

- [1] Smith AJ, Weidman F. Infection of a stillborn infant by an amoebiform protozoon [J]. *Univ Penn Med Bull*, 1910, 23:285-298.
- [2] 余钟声, 郑季彦, 陈黎勤, 等. 婴儿人巨细胞病毒感染病原学和临床分析[J]. *中华传染病杂志*, 2006, 24(5):333-337.
- [3] 陆念英. 小儿巨细胞病毒感染的临床诊治研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2016, 29(14):1865-1867.
- [4] Emery VC. Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control[J]. *QJM*, 2012, 105(5):401-405.
- [5] 郑丽丽, 杨亚培. 人巨细胞病毒感染及免疫机制研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(11):2114-2117.
- [6] Le Page AK, Jager MM, Kotton CN, et al. International survey of cytomegalovirus management in solid organ transplantation after the publication of consensus guidelines[J]. *Transplantation*, 2013, 95(12):1455-1460.
- [7] 唐华. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断技术研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(3):383-386.
- [8] Pang XL, Fox JD, Preiksaitis JK, et al. Inter-laboratory comparison of cytomegalovirus (CMV) viral load (VL) assays[J]. *Am J Transplant*, 2009, 9(2):258-268.
- [9] World Health Organization. Annex 2: recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004)[J]. *Who Technical Report*, 2005.
- [10] Fryer JF, Minor PD. Standardisation of nucleic acid amplification assays used in clinical diagnostics: a report of the first meeting of the SoGAT Clinical Diagnostics Working Group [J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(2):103-105.
- [11] Wilkinson GW, Davison AJ, Tomasec P, et al. Human cytomegalovirus: taking the strain [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204(3):273-284.
- [12] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, et al. Collaborative study to evaluate the proposed 1st [first] WHO international standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays[J]. *Journal of Staff Development*, 2010, 34(1):36-39.
- [13] 王雪亮, 肖艳群, 王华梁, 等. 分子诊断相关国际标准物质的研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(2):125-129.
- [14] Isa M, Wilkie GS, Davison AJ, et al. Genetic stability of bacterial artificial chromosome-derived human cytomegalovirus during culture in vitro [J]. *J Virol*, 2016, 90(8):3929-3943.
- [15] Paredes AM, Yu D. Human cytomegalovirus: bacterial artificial chromosome (BAC) cloning and genetic manipulation [J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2012, 14:14E.4.
- [16] Haynes RJ, Kline MC, Toman B, et al. Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA [J]. *J Mol Diagn*, 2013, 15(2):177-185.
- [17] 高培杰, 赖惠英, 傅清流. 荧光定量 PCR 检测巨细胞病毒感染的标本选择[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(10):2149-2151.
- [18] 陈克平, 徐玉蓉, 李丽. 人巨细胞病毒核酸定量荧光 PCR 检测的尿液室内质控物制备[J]. *上海交通大学学报医学版*, 2015, 35(11):1766-1769.
- [19] 蔡桂君, 林丽娟, 方艳平, 等. 自制人巨细胞病毒核酸室内质控物的重复性观察[J]. *临床检验杂志*, 2013(9):713-714.
- [20] Rychert J, Danzigerisakov L, Yenlieberman B, et al. Multicenter comparison of laboratory performance in cytomegalovirus and epstein-barr virus viral load testing using international standards [J]. *Clin Transplantation*, 2014, 28(12):1416-1423.
- [21] Schnepf N, Scieux C, Resche-Riggon M, et al. Fully automated quantification of cytomegalovirus (CMV) in whole blood with the new sensitive Abbott real-time CMV assay in the era of the CMV international standard [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7):2096-2102.
- [22] Tsai HP, Tsai YY, Lin IT, et al. Comparison of two commercial automated nucleic acid extraction and integrated quantitation real-time PCR platforms for the detection of cytomegalovirus in plasma [J]. *Plos One*, 2016, 11(8):e0160493.

(下转第 385 页)

· 论 著 ·

系统性红斑狼疮患儿外周血 IL-6、IL-10、IL-17 水平变化及其在单个核细胞中的表达研究

沈茹^{1*} 李艳君² 林丽佳³

[摘要] 目的 研究系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患儿外周血中白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-10(IL-10)、白介素-17(IL-17)水平的变化情况及其在外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中的表达情况。方法 选取46例SLE患儿及20例健康儿童分别为病例组(SLE组)和对照组(Control组),采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测外周血中IL-6、IL-10、IL-17蛋白水平,采用实时荧光定量PCR(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)技术检测PBMCs中IL-6、IL-10、IL-17的mRNA表达水平,分析比较2组的蛋白和mRNA表达量的差异。结果 SLE组IL-6、IL-10、IL-17蛋白及mRNA表达水平均高于Control组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 SLE患儿外周血中IL-6、IL-10、IL-17蛋白及mRNA表达水平升高,提示其可能参与SLE患儿的发病过程。

[关键词] 系统性红斑狼疮; 白介素-6; 白介素-10; 白介素-17; 外周血

The expression of IL-6, IL-10 and IL-17 in peripheral blood and their mRNA in peripheral blood mononuclear cells from children with systemic lupus erythematosus

SHEN Ru^{1*}, LI Yanjun², LIN Lijia³

(1. Laboratory Department, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650228; 2. Kunming City Center for Disease Control and Prevention, Kunming, Yunnan, China, 650011; 3. Science and Education Division, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650228)

[ABSTRACT] Objective To investigate the interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-17 (IL-17) in peripheral blood from children with systemic lupus erythematosus (SLE), and detect the expression of IL-6, IL-10 and IL-17 mRNA in their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Methods The levels of IL-6, IL-10 and IL-17 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 46 children with SLE (SLE group) and 20 healthy children (Control group), and the mRNA levels in PBMCs were detected by quantitative real time polymerase chain reacton (qPCR). Results The protein and mRNA levels of IL-6, IL-10 and IL-17 in SLE group were significantly higher than those in Control group ($P < 0.05$). Conclusion The levels of IL-6, IL-10 and IL-17 proteins and mRNA in peripheral blood of children with SLE increased, suggesting that IL-6, IL-10 and IL-17 may be involved in the pathogenesis of SLE in children.

[KEY WORDS] Systemic lupus erythematosus; IL-6; IL-10; IL-17; Peripheral blood

作者单位: 1. 昆明市儿童医院检验科, 云南, 昆明 650228

2. 昆明市疾病预防控制中心, 云南, 昆明 650011

3. 昆明市儿童医院科教科, 云南, 昆明 650228

*通讯作者: 沈茹, E-mail: shenru2009@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种发病机理复杂的自身免疫性疾病。儿童SLE是一种常见的儿科自身免疫性疾病,与成人相比,儿童SLE临床上的表现更加复杂^[4]。目前SLE的发病机制仍不是十分明了,以往的研究主要集中在T淋巴细胞和B淋巴细胞数量和功能的异常上,已有研究证实炎症因子如白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-17、干扰素- α (interferon- α , IFN- α)等在其发病中起着很重要的作用^[2,4],但目前人们对成人的研究较多而对儿童SLE关注较少,本研究通过检测SLE患儿外周血中IL-6、IL-10、IL-17的蛋白水平变化情况及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中IL-6、IL-10、IL-17的mRNA表达情况,初步探讨其在儿童SLE的发病、发展中的作用,以期为其临床诊疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

SLE组:选取昆明市儿童医院2012年10月至2016年3月收治的SLE儿童患者46例,所有病例采用SLE疾病活动性测量(systemic lupus activity measure, SLAM)监测活动程度,并检测外周血细胞计数、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、抗核抗体、抗双链DNA抗体、补体C3、尿液分析、尿蛋白定量(24 h),经检测所有患儿诊断均符合2009年SLE国际临床合作中心(SLE International Center for clinical cooperation, SLICC)、美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)在费城年会上提出的新诊断标准,入选病例需排除伴有其他自身免疫性疾病、严重感染及其他患病导致功能异常者^[5-7]。男9例,女37例,男女比例1:4.11,患儿年龄6~14岁,平均(11.2 \pm 2.7)岁,病程2周至4年;对照组(Control组):选取无诊断标准中狼疮临床表现及免疫指标正常的健康儿童20例,男5例,女15例,男女比例1:3,年龄6~15岁,平均(12.6 \pm 3.4)岁。两组患儿平均年龄及性别比例差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

入组儿童均抽取外周肘部静脉血5 mL,其中采集3 mL于无添加剂采血管(红盖)中,2 mL于EDTA-K2抗凝管中,无添加剂采血管(红盖)中的

血液于室温下静置2 h后取血清储存于-80℃环境中,待ELISA检测。

1.2.2 细胞因子的测定

利用ELISA方法快速检测血清中IL-6、IL-10、IL-17蛋白含量。ELISA试剂盒购自美国ADL公司。操作步骤如下:①取上述冻存的血清标本,室温冻融后,将试剂盒平衡至室温。②取出试验所需板条。配置标准品:向冻干标准品(IL-6、IL-10、IL-17)中分别加入1.0 mL通用稀释液中,静置15 min后,在常温下轻轻混匀,再根据说明书依次倍比稀释。③加样:每孔加100 μ L稀释好的标准品或稀释后的标本,封板后于37℃孵箱中孵育90 min。④待孵育结束后,用自动洗板机(或手动)洗板4~5次。⑤洗板结束后,加100 μ L生物素化抗体工作液到每个孔中,封板后于37℃孵箱中孵育60 min。⑥洗板4~5次。⑦每孔加100 μ L酶结合物工作液,封板后孵育30 min(于37℃孵箱中,避光)。⑧洗板4~5次。⑨每孔加入100 μ L四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)的显色底物,在37℃孵箱中避光孵育15 min。⑩每孔加100 μ L终止液,3 min中内使用多功能酶标仪(Alisei Quality System, SEAC, 意大利)450 nm处读取数据,测OD值。⑪根据标准品浓度和OD值绘制出标准曲线,根据标本所测的OD值,计算每个标本的浓度。

1.2.3 PBMCs的提取

取收集好的1 mL EDTA-K2抗凝血3 000 r/min室温离心10 min,弃去上清血浆层,将剩余血液与生理盐水1:1混匀后,小心加于2 mL淋巴细胞分离液面上,水平离心机室温离心,3 000 r/min,25 min,最后,用吸管小心吸取云雾层,加入1.5 mL EP管中,水平离心机室温离心,7 000 r/min,10 min,弃上清。

1.2.4 PBMCs中IL-6、IL-10、IL-17 mRNA的检测

TRIzol(Invitrogen, 美国)法提取PBMCs总RNA,检测RNA纯度和浓度。参照反转录PCR试剂盒(TaKaRa, 日本)使用说明书,按照以下组分配制反转录反应体系:2 μ L 5 \times PrimeScript Buffer, 0.5 μ L PrimeScript RT Enzyme Mix, 0.5 μ L Oligo dT Prime(50 μ mol/L), 0.5 μ L Random 6 mers(100 μ mol/L), 1 μ L Total RNA, 5 μ L RNase Free dH₂O。反应条件:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃, 保存。以反转录后的cDNA作为模板,以GAPDH做内参,按

照以下组分配制 real time-PCR 反应体系: 5 μL SsoFast EvaGreen Supermix (2×), 0.5 μL Forward primer (10 μmol/L), 0.5 μL Reverse primer (10 μmol/L), 4 μL cDNA。实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR) 扩增条件: 94℃预变性 5 min, 90℃变性 30 s, 60℃退火

40 s, 72℃延伸 40 s, 40 个循环。通过 Genbank 检索出 *IL-6*、*IL-10* 和 *IL-17* 基因序列, 输入 Primer Premier 5.0 软件设计基因引物, 引物合成公司为上海捷瑞生物工程有限公司。实验数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行处理。检测 *IL-6*、*IL-10*、*IL-17* mRNA 的表达水平, 引物序列见表 1。

表 1 Real time-PCR 引物序列
Table 1 The primer of real time-PCR

基因	引物序列 (5' - 3')
<i>IL-6</i>	上游: 5'-GTGGCTAAGGACCAAGACCA-3'
	下游: 5'-TTCCAAGAAACCATCTGGCTA-3'
<i>IL-10</i>	上游: 5'-GGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCC-3'
	下游: 5'-GCCTTGATGTCTGGGTCTTGGTTCTC-3'
<i>IL-17</i>	上游: 5'-CAAGACTGAACACCGACTAAG-3'
	下游: 5'-TCTCCAAAGGAAGCCTGA-3'
<i>GAPDH</i>	上游: 5'-CCTTCAACACCCAGCCAT-3'
	下游: 5'-TCTTCATTGTGCTGGGTGCCA-3'

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较行 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 组和 Control 组外周血细胞因子含量比较

如表 2 所示, 与 Control 组相比较, SLE 组外周血中的 *IL-6*、*IL-10* 和 *IL-17* 水平明显升高, 分别达

到 (32.64 ± 13.32) pg/mL, (54.82 ± 21.44) pg/mL 和 (51.92 ± 32.33) pg/mL。与 Control 组相比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组 PBMCs 中 *IL-6*、*IL-10*、*IL-17* 的 mRNA 表达水平的比较

如图 1 所示, 与 Control 组相比较, SLE 组 PBMCs 中 *IL-6*、*IL-10* 和 *IL-17* 的 mRNA 表达水平明显升高, 与 Control 组相比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 SLE 组和 Control 组外周血 *IL-6*、*IL-10*、*IL-17* 水平变化比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Table 2 Expression of *IL-6*、*IL-10*、*IL-17* in peripheral blood of SLE group and control group ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

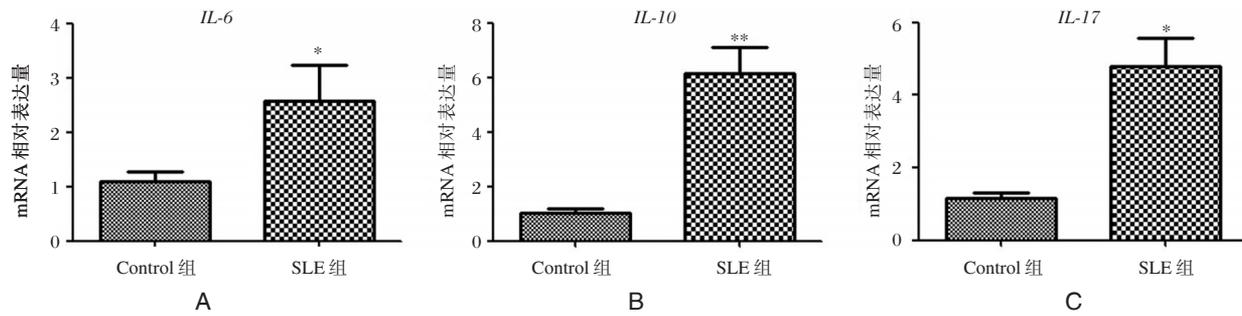
组别	n	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-17</i>
SLE 组	46	$32.64 \pm 13.32^{**}$	$54.82 \pm 21.44^*$	$51.92 \pm 32.33^*$
Control 组	20	6.13 ± 4.78	14.78 ± 3.56	27.26 ± 18.77

SLE 组与 Control 组比较, $^{**}P < 0.01$, $^*P < 0.05$

3 讨论

IL-6 是一种多效性细胞因子, 是机体免疫网络中重要的细胞因子, 主要由单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞合成分泌^[8]。*IL-6* 参与调节免疫应答, 血细胞的生成及急性期反应, 能够促进与炎症应答相关的 B 细胞、

T 细胞、巨噬细胞及中性粒细胞的分化及活化, 有研究表明, *IL-6* 可通过诱导 B 淋巴细胞成熟、增殖分化为产生抗体的浆细胞, 从而增加免疫球蛋白的分泌; 同时促进由 T 细胞分泌的自身抗体产生以及通过降低 CD8⁺ 抑制性 T 细胞的活性而参与 SLE 形成^[9]。Eilertsen 等^[10] 和 Umare 等^[11] 研究发现 SLE 患者外周血中 *IL-6* 的水平高于对照组, 差



A: *IL-6* 的 mRNA 相对表达量; B: *IL-10* 的 mRNA 相对表达量; C: *IL-17* 的 mRNA 相对表达量

图1 SLE组和Control组PBMCs中*IL-6*、*IL-10*、*IL-17*的mRNA表达情况

Figure 1 Expression of *IL-6*、*IL-10*、*IL-17* mRNA in PBMCs of SLE group and Control group

异具有统计学意义。吴实等^[4]研究发现SLE患者组与对照组外周血IL-6浓度分别为(9.636±3.852)pg/mL和(4.433±1.143)pg/mL, SLE组外周血IL-6浓度明显高于对照组。朱静等^[12]亦发现SLE组血清中IL-6水平(6.42±2.08)pg/mL明显高于对照组(2.87±1.33)pg/mL。与朱静等^[12]人的研究结果一致,本实验发现,SLE患儿组的外周血IL-6浓度为(32.64±13.32)pg/mL,高于对照组(6.13±4.78)pg/mL,差异具有统计学意义。检测其RNA水平,同样发现,SLE患儿组IL-6的RNA水平高于对照组RNA的水平,差异具有统计学意义。

Th17细胞是一群新型的CD4⁺T细胞,IL-17为其发挥免疫调节功能的主要效应因子^[13],能够强效促炎。IL-17除了具有其潜在的促炎因子作用,还可诱导髓样细胞、上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞等多种细胞产生不同炎症介质,如IL-6、IL-8、角质细胞诱导物(keratinocyte, KC)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的趋化因子(chemokines, CXC)等^[14],从而引发局部或全身的炎症反应。以往动物实验发现IL-17和Th17细胞在SLE的发病中起着重要作用^[15]。Mok等^[16]和Gigante等^[17]研究发现在SLE患者外周血中,IL-17的表达水平明显升高,这提示了IL-17可能参与SLE的发病过程。董大群^[18]研究发现SLE活动期患者外周血中IL-17浓度为(87.59±23.54)pg/mL,比SLE非活动期患者和正常人外周血IL-17浓度明显升高。而白雪等^[19]研究发现SLE活动期、非活动期患者和对照组外周血IL-17浓度分别为(32.16±20.23)g/mL、(57.45±17.93)pg/

mL和(41.32±13.25)pg/mL, SLE患者体内IL-17水平较对照组有明显升高,且与疾病活动明显相关。本实验中发现,与对照组相比,SLE患儿外周血IL-17蛋白浓度和PBMCs *IL-17* mRNA水平明显升高,这与董大群等人的结果一致。

Th1/Th2比例失衡可导致一系列免疫疾病的产生。系统性红斑狼疮是一种以Th2细胞过度活化为主的Th1/Th2比例失衡产生的免疫性疾病。目前有研究表明, Th2型细胞因子的过度产生可能会造成SLE患者体液免疫功能亢进,多克隆B细胞活化以及产生大量器官非特异性抗体,从而造成SLE患者多个组织器官的损害^[15-16]。IL-10属Th2型因子的一种,在SLE中表达较高,其在SLE中作用主要是促进B细胞的分化,并产生自身抗体,诱导B细胞向浆细胞分化,从而参与控制向IgG1和IgG3亚型的转换^[1]。宫泽琨等^[20]研究发现SLE患者外周血清IL-10浓度为(50.38±5.59)pg/mL,其浓度高于对照组(26.67±6.32)pg/mL,差异具有统计学意义。朱强等^[21]研究发现SLE患者外周血清IL-10浓度为(146.66±18.69)pg/mL,缓解期患者为(118.05±16.95)pg/mL,高于健康人的(85.45±14.95)pg/mL,差异具有统计学意义;且在SLE患者中轻度活动组外周血清IL-10浓度为(135.27±19.24)pg/mL,中度活动组(148.47±14.99)pg/mL,重度活动组(162.06±13.67)pg/mL,与系统性红斑狼疮病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)评分呈正相关,提示IL-10参与SLE的发病过程。与前人研究结果一致^[18],本实验也发现与对照组相比,SLE患儿外周血中IL-17蛋白的浓度和PBMCs *IL-17* mRNA水平上升,差异

具有统计学意义。

综上所述,本研究结果显示 SLE 患儿外周血中 IL-6、IL-10、IL-17 蛋白及 PBMCs 中 IL-6、IL-10、IL-17 的 mRNA 表达水平均明显高于正常儿童,结果与以往成人 SLE 患者的研究结果相似^[3],提示 IL-6、IL-10、IL-17 这 3 种炎症因子的表达异常可能预示着 SLE 患儿的发病。因此,IL-6、IL-10、IL-17 这 3 种炎症因子的表达异常或许可以成为判断 SLE 患儿是否发病的良好指标,但其发病的具体作用机制与成年 SLE 患者是否一致,与 SLE 活动程度是否具有相关性等问题仍需要进行进一步深入研究。了解这些细胞因子的异常有助于我们了解 SLE 患儿的发病,以及发现发展有效靶向治疗。

参考文献

- [1] 刘冰. 红斑狼疮患者炎症细胞因子的表达及临床意义[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [2] 金彩云. 儿童系统性红斑狼疮抗核小体抗体和抗 ds-DNA 抗体的检测和意义[J]. 实用预防医学, 2009 (5): 1585-1587.
- [3] 王菊霞, 郑京. 调节性 T 细胞、TGF- β 、IL-6、IL-10、IL-17 对系统性红斑狼疮的影响及其与中医证型的关系[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(2): 120-122.
- [4] 吴实, 刘赛君, 何咏, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血 IL-6 的表达及临床意义[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2016, 37(2): 164-168.
- [5] 陈瑜, 王宏伟, 周建华. 儿童系统性红斑狼疮国内外诊断标准比较[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(9): 715-717.
- [6] 石连杰. 系统性红斑狼疮最新分类标准诞生[J]. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(10): 713-714.
- [7] 吕良敬, 鲍春德. 系统性红斑狼疮分类标准的变迁与启示[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 4(16): 304-306.
- [8] 李海军, 彭淑牖, 刘颖斌, 等. 甘氨酸对急性坏死性胰腺炎鼠血和胰腺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 IL-10 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(2): 239-243.
- [9] 周末. IL-6 基因单核苷酸多态性及血清水平与系统性红斑狼疮的相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大
- [10] Eilertsen GØ, Nikolaisen C, Beckermerok A, et al. Interleukin-6 promotes arthritis and joint deformation in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2011, 20(6): 607-613.
- [11] Umare V, Pradhan V, Nadkar M, et al. Effect of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and IL-1 β) on clinical manifestations in indian SLE patients [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 385297.
- [12] 朱静, 龙武彬, 程佳, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血 IL-6 与疾病活动性的关系研究[J]. 四川医学, 2013, 34(5): 592-593.
- [13] Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, et al. STAT3 regulates cytokine mediated generation of inflammatory helper T cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(13): 9358-9363.
- [14] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [15] Garrett Sinha LA, John S, Gaffen SL. IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2008, 20(5): 519-525.
- [16] Mok MY, Wu HJ, Lo Y, et al. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2010, 37(10): 2046-2052.
- [17] Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, et al. Cytokines expression in SLE nephritis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15(1): 15-24.
- [18] 董大群. 系统性红斑狼疮患者外周血滤泡辅助性 T 细胞及血清中 IL-21、IL-17 水平的研究[D]. 滨州: 滨州医学院, 2014.
- [19] 白雪, 高美华, 王好玉, 等. TH17 细胞相关细胞因子 IL-17 和 IL-23 在系统性红斑狼疮中的表达及其意义[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(10): 1937-1940.
- [20] 宫泽琨, 张峻岭. 系统性红斑狼疮中医证型与 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 的相关性研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2016, 15(1): 10-12.
- [21] 朱强, 朱明华, 罗俊, 等. IL-10 和 TGF- β_1 在系统性红斑狼疮患者血清中的表达及意义[J]. 军事医学, 2015(4): 276-278.

肇庆地区血小板供者库的建立及应用

廖扬勋* 陈志忠 余文潮 陈尚良 梁洁贞 陈超红 李结敏

[摘要] 目的 建立肇庆地区已知人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)基因分型及人类血小板抗原(human platelet alloantigen, HPA)HPA-1~6、9、15基因型的无偿机采血小板供者库,为临床血小板输注无效(platelet transfusion refractory, PTR)患者提供HLA及HPA相合的血小板。方法 采用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe, PCR-SSO)检测血小板供者的HLA基因分型及聚合酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)检测HPA-1~6、9、15基因型。对杂合度高的HPA-3、15随机抽样20个标本进行测序。对3例患者进行HLA-I分型。结果 成功检测出101名无偿血小板捐献者HLA及HPA-1~6、9、15基因型;HPA-3、15的测序结果与PCR-SSP一致。HLA-A位点等位基因共检出11个;HLA-B位点共检出等位基因20个。3例患者中的1例从已知的HLA血小板库中找到完全一致供者,另外2例也找到三位点吻合的血小板供者。结论 建立基于HLA-I类抗原及HPA基因分型的血小板供者资料库,有助于给PTR患者提供HLA和HPA相合的单采血小板。

[关键词] HLA基因分型; HPA基因分型; 血小板输注无效; 血小板供者资料库; 测序

Establishment and clinical application of platelet donor registry in Zhaoqing area

LIAO Yangxun*, CHEN Zhizhong, YU Wenchao, CHEN Shangliang, LIANG Jiezheng, CHEN Chaohong, LI Jiemin

(Zhaoqing Blood Center, Zhaoqing, Guangdong, China, 526040)

[ABSTRACT] Objective To establish a human leukocyte antigen (HLA) and human platelet alloantigen (HPA)-1~6, 9, 15 genetic and volunteer apheresis platelet donor registry in Zhaoqing; to provide matched HLA and HPA platelets for patients with platelet transfusion refractoriness (PTR). Methods The polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) method was established for HPA-1~6, 9, 15 genotyping. HLA genotyping was performed by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSO). The HPA-3, 15 genotype of a random 20 specimens were analyzed by sequence-based typing (SBT) method. Results The PCR-SSP method for HPA-1~6, 9, 15 genotyping was established and the HLA typing of 101 donors were identified. HPA-3, 15 sequencing results are consistent with the PCR-SSP. HLA-A locus were detected 11 alleles, while 20 allele genes were detected at HLA-B locus. Conclusion A platelet donor database based on HLA-I class antigen and HPA genotyping was established. It is helpful to provide HLA and HPA compatible apheresis platelets for PTR patients.

[KEY WORDS] HLA genotyping; HPA genotyping; Platelet transfusion refractory; Platelet donor registry; Sequencing

基金项目:广东省肇庆市科技计划项目(2014F006)

作者单位:肇庆市中心血站,广东,肇庆 526040

*通讯作者:廖扬勋, E-mail:13929881671@163.com

目前临床上治疗血小板减少患者时,输注血小板是有效的措施,但反复输注有可能产生同种免疫,导致血小板输注无效。约有20%~50%白血病患者,80%的再生障碍性贫血患者长期输注血小板后输注无效^[1]。引起血小板输注无效(platelet transfusion refractory, PTR)的原因众多,其中20%~30%为免疫因素^[2]。由于血小板表面有丰富的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)及人类血小板抗原(human platelet alloantigen, HPA),这些特异性抗原能通过输注血小板产生相应的抗体,将可能导致PTR。建立已知HPA及HLA基因供者资料库,能够为患者提供相配合的血小板,减少PTR的发生。随着分子生物学发展,HPA及HLA基因已阐明,本研究采用分子生物学PCR技术对血小板供者HPA及HLA进行基因分型,为患者提供相配合的血小板,具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究随机选择肇庆地区汉族机采血小板供者库中献血者101名,其中男性87人份,女性14人份,年龄19~55岁(平均年龄34.0岁),用于建立HLA及HPA基因定型的机采血小板供者库。选取了3例白血病患者(来源于肇庆市第一人民医院)进行应用研究。

1.2 主要试剂与仪器

Magcore DNA自动提取仪(RBC Bioscience Crop, 中国台湾), HPA基因分型试剂盒(Innotrain, 德国。批号:S9HX045), HLA基因分型试剂盒(北京曼泰里生物技术有限公司); Taq酶(Promaga, 美国), 高速离心机(Eppendorf, 德国), PCR扩增仪(ABI, 美国), 电泳仪(Bio-rad, 美国), 凝胶成像系统(杭州朗基科学仪器有限公司, 型号:

LG2020D)。

1.3 DNA制备

使用Magcore DNA自动提取仪提取及测定DNA浓度,具体操作步骤按说明书进行。DNA浓度测定范围为20~60 ng/ μ L,纯度测定 A_{260}/A_{280} 比率为1.6~2.0。DNA储存于-20 $^{\circ}$ C备用。

1.4 聚合酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)扩增

PCR-SSP扩增,具体操作步骤按试剂盒说明书进行,每人份用量:取Ready PCR Buffer工作液60 μ L、Taq酶1.6 μ L、DNA标本1 000 ng,其余加水,总反应体积混合液为200 μ L。用振荡器混合后,并瞬时离心,使液体置于管底,分别向PCR反应板每个引物孔各加入上述混合液10 μ L。加封盖后,将反应板放入设置好循环参数的PCR仪内,扩增程序:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 70 $^{\circ}$ C 60 s, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 10个循环; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 61 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 20个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C保存。

1.5 电泳

电泳取扩增产物5 μ L于2%琼脂糖凝胶中, 100 V电泳25 min,在凝胶成像仪下观察,进行结果判断并拍摄成像,保存试验结果。

1.6 血小板的HLA检测

具体操作步骤按北京曼泰里生物技术有限公司的聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe, PCR-SSO)试剂盒说明书进行操作。

1.7 3例患者进行HLA检测

使用北京曼泰里公司PCR-SSO试剂盒进行HLA分型。

1.8 抽样20个标本进行测序

对杂合度高的HPA-3、15随机抽样20个标本进行测序,引物见表1。

表1 HPA-3、15的PCR-SBT引物设计

Table 1 Design of PCR-SBT primers for HPA -3 and 15

HPA	引物	PCR引物序列(5'→3')	测序引物(5'→3')
HPA-3	正向	GCCCTCCGACCTGCTCTACAT	CTCCTCCATGTTCACTTGA
	反向	GGGCTTGCTCACATAGTCC	CCTGCTCTACATCCTGGATATAC
HPA-15	正向	CCTATTCTTTGAAAAGTTGGG	CCTATTCTTTGAAAAGTTGGG
	反向	GGCCTTTGGAGATGGTTAGT	GAGGAGCTGACGCTGTATTAG

1.9 统计学分析

HPA 基因频率=阳性基因数/总基因数, HPA 基因型频率=基因型数/总基因数。所有数据应用 SPSS 18.0 统计处理软件, 按统计学数据处理原则, 进行 χ^2 检验及相关分析。HLA 基因分析应用 pypop 进行分析^[4]。统计数据以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板供者库 HPA-1~6、9、15 基因多态性分布情况

本地区人群 HPA-2、3、5、6、15 基因分型频率

均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律; HPA-3、15 系统中抗原频率接近, HPA-2、5、6 中 aa 基因型为主, HPA-1、9 未检出 b 基因, 结果见表 2。其中 1 例样品 HPA-1~6、9、15 等位基因分型结果见图 1。

2.2 HPA-3、15 基因测序分型

采用我们合成的引物对 20 份随机标本作 HPA-3、15 基因测序分型: 与 PCR-SSP 的结果完全一致。HPA-3 与 HPA-15 的基因多态性测序图分别见图 2、图 3。

2.3 血小板供者库 HLA 等位基因分型及特征

HLA-A 位点共检出等位基因 11 个, 见表 3。

表 2 肇庆地区 HPA-1~6、9、15 基因型和基因频率分布

Table 2 Genotype and gene frequency distribution of HPA-1~6, 9, 15 in Zhaoqing

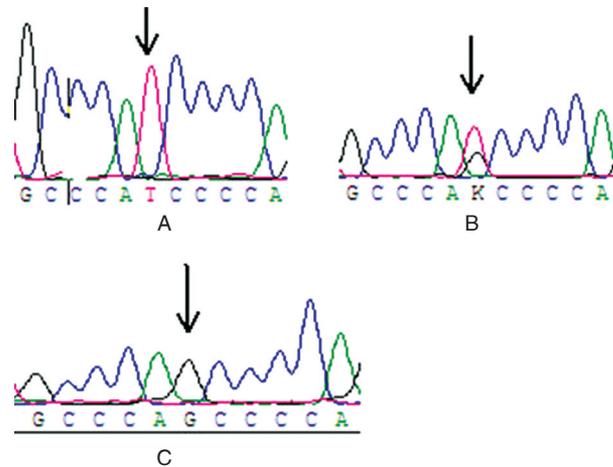
HPA 基因型	aa	aa (%)	ab	ab (%)	bb	bb (%)	χ^2	P
HPA-1	101	100.00	0	0.00	0	0.00	N	/
HPA-2	91	90.10	10	9.90	0	0.00	0.274	0.601
HPA-3	24	56.44	57	23.76	20	19.80	1.720	0.190
HPA-4	101	100.00	0	0.00	0	0.00	N	/
HPA-5	94	93.07	7	6.93	0	0.00	0.130	0.718
HPA-6	96	95.05	5	4.95	0	0.00	0.065	0.799
HPA-9	101	100.00	0	0.00	0	0.00	N	/
HPA-15	29	28.71	50	49.50	22	21.78	0.003	0.959

N 为未比较

M: Marker; 1: HPA-1a; 2: HPA-1b; 3: HPA-2a; 4: HPA-2b; 5: HPA-3a; 6: HPA-3b; 7: HPA-4a; 8: HPA-4b; 9: HPA-5a; 10: HPA-5b; 11: HPA-6a; 12: HPA-6b; 13: HPA-9a; 14: HPA-9b; 15: HPA-15a; 16: HPA-15b; 结果为: HPA-1a(+)b(-), HPA-2a(+)b(-), HPA-3a(+)b(+), HPA-4a(+)b(-), HPA-5a(+)b(-), HPA-6a(+)b(-), HPA-9a(+)b(-), HPA-15a(+)b(-)

图 1 1 例标本的 HPA-1~6、9、15 等位基因分型结果电泳图

Figure 1 One case of HPA-1~6, 9, 15 allelic pattern electrophoresis results

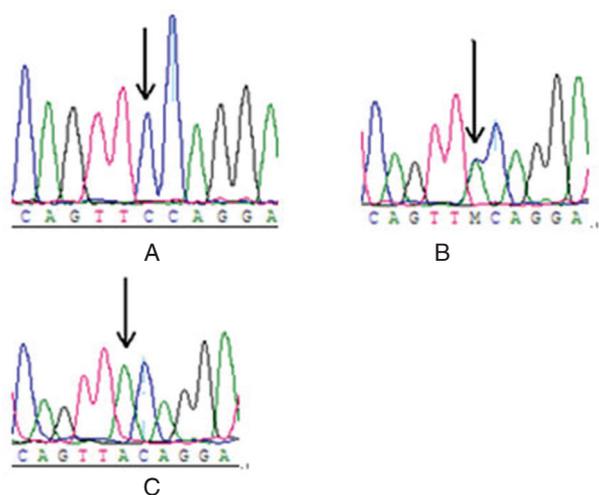


A: HPA-3aa; B: HPA-3ab; C: HPA-3bb

图 2 HPA-3 基因分型测序图

Figure 2 HPA-3 genotyping sequence map

其中频率高于 5% 的等位基因是: A11、A02、A24、A33; HLA-B 位点共检出等位基因 20 个, 见表 3。



A: HPA-15aa; B: HPA-15ab; C: HPA-15bb

图3 HPA-15 基因分型测序图

Figure 3 HPA-15 genotyping sequence map

表3 肇庆地区血小板献血人群 HLA-A、B 等位基因频率 (%)

Table 3 Allele frequencies of HLA-A and B alleles in platelet donors in Zhaoqing (%)

等位基因	n	频率	等位基因	n	频率
HLA-A		HLA-B			
11	73	36.14	13	36	17.822
2	64	31.68	46	30	14.851
24	24	11.88	75	21	10.396
33	19	9.406	60	18	8.911
26	5	2.475	38	16	7.921
30	5	2.475	58	16	7.921
31	3	1.485	51	13	6.436
29	2	0.099	55	7	3.465
3	1	0.049 5	56	6	2.97
68	1	0.049 5	54	5	2.475
74	1	0.049 5	61	5	2.475
			62	5	2.475
			35	4	1.98
			48	4	1.98
			39	2	0.99
			44	2	0.99
			7	1	0.495
			27	1	0.495
			67	1	0.495
			76	1	0.495

其中频率高于5%的等位基因是: B13、B46、B75、B60、B38、B58和B51。

2.4 血小板供者库 HLA-A、B 位点两座位单倍型频率和特征

HLA-A、B 位点两座位单倍型结果, 见表4。

2.5 患者的 HLA 的基因分型

3例患者的 HLA 基因分型结果如下, 见表5。

表4 肇庆地区献血者频率高于0.5%的 HLA-A、B 单倍型 (%)

Table 4 Haplotype frequencies of HLA-A and B alleles in platelet donors in Zhaoqing (%)

单倍型	频率	单倍型	频率
A2-B46	13.801	A24-B13	1.707
A11-B13	12.49	A11-B56	1.685
A33-B58	6.901	A11-B61	1.485
A11-B75	6.707	A24-B51	1.485
A2-B38	5.654	A2-B51	1.214
A11-B60	4.703	A2-B13	1.128
A24-B60	3.218	A2-B58	1.020
A11-B55	2.867	A33-B51	1.020
A2-B51	2.382	A31-B51	1.707
A11-B38	2.267	A26-B60	0.099
A2-B75	2.204	A11-B54	0.099
A24-B62	1.980	A2-B56	0.085
A2-B48	1.980	A11-B46	0.082
A30-B13	1.916	A30-B51	0.061

表5 3例患者的 HLA 的基因分型

Table 5 Genotyping of HLA in 3 patients

患者	HLA-A	HLA-B
NO.1	A2 A33	B13 B58
NO.2	A2 A2	B38 B51
NO.3	A11 A33	B13 B58

3 讨论

引起 PTR 的原因众多, 其中 20%~30% 为免疫因素^[2]。人类血小板表面具有复杂的血型抗原, 与输血相关且抗原性较强的有 2 大类, 其中之一是人类白细胞抗原 (HLA), 血小板表面有 HLA-I 类抗原, 缺少 HLA-II 类抗原^[4-5]。本研究中只针对血小板上的 HLA-I 类抗原即 HLA-A 与 HLA-B 等位基因进行分型。由于本研究采用 PCR-SSO 的方法, 相对于 PCR-SSP 来说, 具有分辨率高、特异高的特点, 最重要的一点是可以进行大批量操作, PCR-SSP 则不能达到相应的要求, 因此利用 PCR-SSO

可以快速便捷把血小板供者 HLA 资料库建立起来。本研究中,HLA-A 位点共检出 11 个不同等位基因,其中频率高于 5% 的等位基因是:A11、A02、A24、A33;HLA-B 位点共检出 20 个不同等位基因,其中频率高于 5% 的等位基因是:B13、B46、B75、B60、B38、B58 和 B51。HLA-A 频率大于 30% 的等位基因有 A2 及 A11,HLA-B 大于频率 10% 的有 B13、B46 及 B75,此结果与文献报道南方人群的 HLA 基因分型大致相同^[4-7]。

建立血小板供者 HLA 资料库,这对于 HLA 抗体引起的 PTR,就可以从血小板库中更容易找到相配合的血小板供者。单倍型分析中发现频率大于 10% 的有 A2-B46 和 A11-B13,表明可选择 HLA 相合供者概率更大。本研究对 3 例患者的 HLA 基因分析中,1 例从已知的 HLA 血小板库中找到完全一致供者,另外 2 例也找到三位点吻合的血小板供者。如果有患者需要,只要对患者进行 HLA 分型,就可以从血小板库里查找相合的供者,而且相合度越高输注效果越好^[8]。

虽然引起 PTR 的主要为 HLA 抗体,但另一大类血小板抗原 HPA 引起的 PTR 也有相当比例。据文献报道,因 HPA 不合导致 PTR 大于 10%^[9-10],因此同时建立血小板供者 HPA 资料库,也尤为重要。HPA 基因分型方法主要有:PCR-SSO、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、PCR-SSP 等。PCR-SSO 方法比较繁琐,判断试验结果不太容易,而且需要昂贵的仪器。RFLP 方法较 PCR-SSO 方法简单,但由于需要限制性内切酶的使用及消化步骤,仍较为繁琐。PCR-SSP 扩增后凝胶电泳,直接获得结果,比前 2 种方法较简单而且快速、经济。本研究应用 PCR-SSP 方法对血小板基因进行分型,检测了肇庆地区 101 名随机固定血小板献血者的 HPA-1~6、9、15 基因分布,其中 HPA-2、3、5、6、15 基因分型频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。发现 HPA-3、15 出现高度多态性,HPA-2、5、6 的基因型以 aa 为主。HPA-1、9 未检出 b 基因,均为 a/a 纯合子。血小板抗原 HPA 不合的血小板输注中,欧洲各国血小板输注无效多数是由于 HPA-1a 基因引起的。亚洲地区人群约 99% 具有 HPA-1a 基因^[12-16],与肇庆地区基本一致。本研究加入了多态性不高的 HPA-9 基因分型,虽然未检出 b 基因,均为 a/a 纯合子,但提示肇庆地区 HPA-9b 基因的确

基本接近无,与山东地区、广西地区一致^[12, 14, 16]。HPA-3、15 为高多态性表达基因,我们的检测结果表明 HPA-3、15 基因多态性中的不配合率较高,在输血上具有重要的免疫学意义。同时笔者对 HPA-3、15 进行基因分析测序,结果与 PCR-SSP 一致。HPA 基因 PCR-SBT 分型技术具有高分辨率,图 2 及图 3 中显示可以从 2 方面来分辨:第一,从颜色来区分,HPA-3a 与 HPA-3b 为多态性位置峰分别为红色与黑色单峰,HPA-15a 与 HPA-15b 为多态性位置峰分别为蓝色与绿色单峰;第二,从峰的多少来分辨,出现双峰的都是杂合基因型分别是 HPA-3ab 及 HPA-15ab。PCR-SBT 分型技术具有高精度度、从峰图能直接发现是否存在新的等位基因等特点,而且可以弥补 PCR-SSP 的不足之处,是一种具有广泛应用前景的检测技术。

参考文献

- [1] Mcfarland JG, Anderson AJ, Slichtern SJ. Factors influencing the transfusion response to HLA - selected apheresis donor platelets in patients refractory to random platelet concentrates[J]. Br J Haematol, 1989, 73 (3):380-386.
- [2] Petz DL, Garratty G, Calhoun L, et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity [J]. Transfusion, 2000, 40 (12):1446-1456.
- [3] 陈语嫣, 龚祖康, 林文珍. 中国地区汉族人类血小板抗原基因多态性研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2017(2):433-444.
- [4] 杜春红, 徐佩琦, 李红学. 血小板输注无效相关因素的研究进展[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(1):86-90.
- [5] 郭志海, 赵江花, 王东红, 等. 血小板输注无效的原因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(22):3172-3174.
- [6] 丁浩强, 叶欣, 梁华钦, 等. 广州地区献血人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因及单体型多态性的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(9):810-813.
- [7] 金士正, 邹红岩, 甄建新, 等. 中国南方汉族人群 HLA-I、II 类八个位点等位基因多态性的研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(1):110-114.
- [8] 陈纯, 薛红漫, 周雪贞, 等. HLA-I 类配型血小板输注治疗 HSCT 和血液病患儿效果[J]. 中国热带医学杂志, 2008, 8(10):1713-1714.

(下转第 385 页)

· 论 著 ·

上皮性卵巢癌血浆中 microRNA-30a-5p 含量与分级及分期的关系

徐文莉 林燕华 罗艺 李康 张洪德*

[摘要] 目的 研究上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 与卵巢癌分级、分期的关系,探讨其在卵巢癌中的诊断价值。方法 选取 111 例上皮性卵巢癌患者,患者病理分级为低级上皮性卵巢癌 52 例,高级上皮性卵巢癌 59 例,根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期标准: I 期 24 例, II 期 27 例, III 期 32 例, IV 期 28 例;同期健康女性体检者 20 例,采用实时荧光定量 PCR 检测血浆中 microRNA-30a-5p 的表达,分析 microRNA-30a-5p 表达与上皮性卵巢癌分级及分期的关系。结果 与正常对照组比较,上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),高级上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量明显低于低级($P<0.05$);随着肿瘤分期恶性度的升高, microRNA-30a-5p 相对表达量下降,但 I 期与 II 期结果差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 microRNA-30a-5p 的表达与上皮性卵巢癌发生、发展以及肿瘤的恶性度有关,为肿瘤的靶向治疗提供了依据。

[关键词] 上皮性卵巢癌; microRNA; 血浆; 实时荧光定量 PCR

Relationship between plasma microRNA-30a-5p content and grading and staging in epithelial ovarian cancer

XU Wenli, LIN Yanhua, LUO Yi, LI Kang, ZHANG Hongde*

(Central Laboratory of Longgang Center Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518116)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between plasma microRNA-30a-5p level and grading and staging of ovarian cancer, and to explore the diagnostic significance for epithelial ovarian cancer. Methods A total of 111 cases of patients with epithelial ovarian cancer were recruited, 52 cases of patients with pathological grading for low-grade epithelial ovarian cancer, 59 case for advanced epithelial ovarian cancer. The patients were divided into 4 groups: stage I (24 cases), II (27 cases), III (32 cases) and IV (28 cases), according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). 20 healthy female subjects were served as controls. The expression of microRNA-30a-5p in plasma was detected by quantitative real-time PCR, and the relationship between the expression of microRNA-30a-5p and the grading and staging of epithelial ovarian cancer was analyzed. Results Compared with the normal control group, microRNA-30a-5p in the plasma of patients with epithelial ovarian cancer was significantly decreased ($P<0.05$). The expression of microRNA-30a-5p in patients with advanced epithelial ovarian cancer was significantly lower than that in low-grade ovarian cancer ($P<0.05$). With the malignant degree of tumor staging increased, the relative expression of microRNA-30a-5p decreased among the other groups ($P<0.05$), except stage I and II ($P>0.05$). Conclusion The expression of microRNA-30a-5p is related to the occurrence, development and malignant degree of epithelial ovarian cancer, which may served as a novel diagnostic marker, and be used as a therapeutic target for the treatment of epithelial ovarian cancer.

[KEY WORDS] Epithelial ovarian cancer; MicroRNA; Plasma; Quantitative real-time PCR

作者单位:深圳市龙岗中心医院中心实验室,广东,深圳 518116

*通讯作者:张洪德, E-mail: labzhd@126.com

上皮性卵巢癌在女性肿瘤中致死率极高,在过去的几十年,卵巢癌患者生存率有了明显升高。卵巢癌早期诊断5年生存率可达90%,但是大部分患者确诊时已是肿瘤晚期,长期生存率低于30%^[1]。临床上常用血清标志物CA125作为对疾病的诊断,但是其灵敏度仅为40%^[2]。从而使得发现一种敏感性及特异性的标志物显得尤为重要。MicroRNA(miRNA)是一类长18~24个核苷酸的非编码小分子单链RNA。miRNA通过完全或部分碱基配对与靶分子3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合,降解或抑制mRNA的翻译,从而抑制靶基因的表达。研究表明miRNA参与生长、发育、细胞增殖、细胞分化细胞周期及凋亡等重要过程^[3]。miRNA在肿瘤形成方面主要通过干扰细胞周期、细胞凋亡、细胞迁移基因的表达发挥关键作用,如引发肿瘤生长、肿瘤发展、分化等。研究显示miRNA在肿瘤的发生发展过程中呈不同程度的表达^[4],扮演着致癌与抑癌不同的角色。研究证实miRNA不仅在肿瘤组织内稳定表达,而且能稳定存在于血清、血浆、全血中^[5],从而表明循环miRNA可作为一种无创的肿瘤诊断标志物。Shapira等^[5]研究发现卵巢癌患者血浆和全血microRNA-30a-5p的表达量明显下降。但是目前的研究仅仅局限于卵巢癌患者与正常健康者间的表达差异,研究不同分级、分期上皮性卵巢癌microRNA-30a-5p表达差异的报道不多。本研究通过检测上皮性卵巢癌血浆中microRNA-30a-5p的水平,分析其与上皮性卵巢癌分级、分期的关系,为临床医生更好地诊治上皮性卵巢癌提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

收集2014年6月到2016年11月在我院住院病理检查证实为上皮性卵巢癌患者111例,年龄38~71岁,平均(52.5±3.5)岁。所有患者术前均未接受化疗、放疗及免疫治疗。病理分级为低级上皮性卵巢癌52例,高级上皮性卵巢癌59例;根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期标准^[6]: I期24例, II期27例, III期32例, IV期28例。另取同期健康女性体检者20例作为对照,年龄36~69岁,平均(50.5±4.5)岁,两组人群年龄差异无统计学

意义。

1.2 试剂与仪器

Roche总RNA提取试剂盒购于上海浩然生物技术有限公司,反转录试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司。microRNA-30a-5p与内参U6上下游引物由广州锐博生物有限公司完成。主要仪器:美国ABI7500实时荧光定量PCR仪,德国Sigma 3K30高速冷冻离心机,美国热电Multiskan go酶标分析仪,日本三洋MDF-382E超低温冰箱。

1.3 方法

1.2.1 标本采集

静脉采血3 mL, EDTA抗凝, 4 000 r/min离心15 min,取血浆放入干净Eppendorf管中,在10℃ 13 000 r/min离心5 min,去除细胞碎片,处理好的血浆于-80℃冰箱中保存,以备RNA提取,该步骤在2 h内完成。

1.2.2 血浆总RNA提取

冻存的血浆标本复温,按照罗氏RNA提取试剂说明书提取血浆总RNA。Multiskan go酶标分析仪检测RNA纯度及浓度,OD₂₆₀与OD₂₈₀比值在1.8~2.0满足要求。

1.2.3 逆转录反应

应用TaKaRa反转录试剂盒中的特异性反转录引物并按照说明书逐步合成cDNA,反转录体系20 μL,反转录条件:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃保存反转录产物。

1.2.4 real-time PCR反应

实时荧光定量PCR反应体系为20 μL,具体包括:SYBR Premix Ex Tap 10 μL, PCR Forward Primer 0.8 μL, PCR Reverse Primer 0.8 μL, ROX Reference Dye 0.4 μL, RT反应液2 μL, dH₂O 6 μL,反应条件:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40个循环。所有样本做3个复孔。以U6为内参照,采用相对定量法计算microRNA-30a-5p的相对表达量,以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示, $\Delta Ct = Ct_{\text{microRNA-30a-5p}} - Ct_{\text{U6}}$, Ct为每个反应管中的荧光信号达到所设定阈值时所经历的循环数。

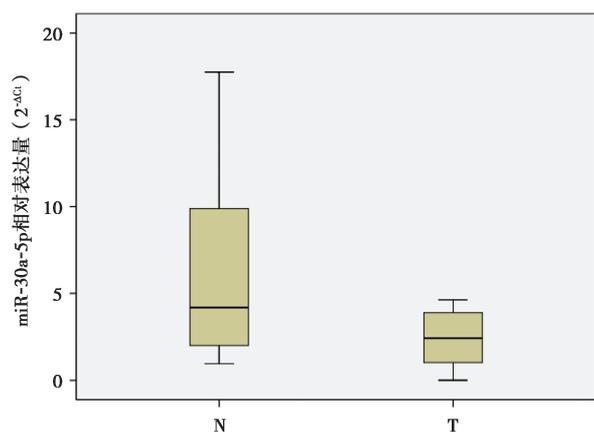
1.3 统计学处理

运用SPSS 19.0软件对数据进行分析,计量数据采用均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量下调

经实时荧光定量 PCR 检测,结果显示上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 明显下降,为 2.42 ± 1.43 , 对照组为 6.33 ± 2.01 , 通过 *t* 检验, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果显示, 详见图 1。



N: 对照组; T: 上皮性卵巢癌患者, 两组比较差异具有统计学意义 $P < 0.05$

图 1 microRNA-30a-5p 在上皮性卵巢癌患者及对照组中的表达

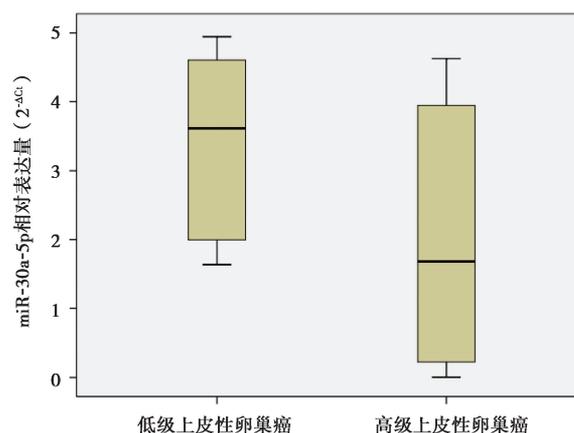
Figure 1 Expression of microRNA-30a-5p in epithelial ovarian cancer patients and control group

2.2 不同分级上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量的比较

低级上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量为 3.13 ± 0.04 , 高级上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量为 1.67 ± 1.41 , 二者结果差异具有统计意义 ($P < 0.05$)。结果显示, 详见图 2。

2.3 上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 与肿瘤分期的关系

不同分期 microRNA-30a-5p 值分别为 T I : 3.98 ± 0.36 , T II : 3.78 ± 0.97 , T III : 1.88 ± 0.21 , T IV : 0.15 ± 0.13 ; 随着肿瘤分期恶性度的增加 microRNA-30a-5p 表达逐渐降低, 各期患者血浆中 microRNA-30a-5p 间比较采用方差分析, T I 与 T II 期上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量没有统计学差异 ($P = 0.804$), T I 与 T III 期间、T I 与 T IV

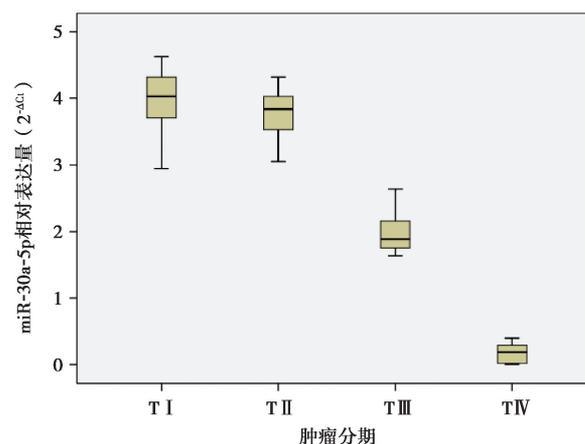


低级上皮性卵巢癌与高级上皮性卵巢癌 microRNA-30a-5p 的表达量比较 $P < 0.05$

图 2 上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 在不同分级的表达

Figure 2 Expression of microRNA-30a-5p in different grading of ovarian cancer patients

期间、T II 与 T III 期间、T II 与 T IV 期间、T III 与 T IV 期间上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 表达量均有统计学差异 (P 值分别为 0.031、0.019、0.038、0.023、0.045)。结果显示, 详见图 3。



T I 与 T II 期比较 $P > 0.05$, 其余各组间比较 $P < 0.05$

图 3 上皮性卵巢癌患者血浆中 microRNA-30a-5p 在不同肿瘤分期的表达

Figure 3 Expression of microRNA-30a-5p in different staging of ovarian cancer patients

3 讨论

在全球, 卵巢癌是女性死亡的第五大原因^[1], 大部分原因在于缺乏对卵巢癌早期诊断有效的检

测手段。目前生存率低的一个重要因素是人们对该疾病的发生及发展机制尚不完全清楚,因此探索肿瘤的发病机制,寻找对肿瘤诊断敏感性及特异性高的标志物显得尤为重要。随着近年 miRNA 在癌症中的研究,有助于对癌症发生发展的进一步理解,为癌症的早期诊断提供新的思路。目前超过 1 000 多种 miRNAs 在人类基因中被发现。研究发现 miRNA 在癌症的发生发展、血管再生及免疫反应方面扮演着重要的角色^[7]。2008 年 Lawrie 首次测定血清中 miRNA 的表达后,越来越多科研者注重循环中 miRNA 在肿瘤中的诊断价值。miRNA 作为新兴标志物受到重视, microRNA-30 作为 miRNA 的一个成员,其也参与多种生物学功能的控制,如上皮间质转化、成骨细胞分化、肿瘤的发生发展等^[8-9]。microRNA-30 位于人类第 1、6 和 8 号染色体上,包括 microRNA-30a、microRNA-30b、microRNA-30c、microRNA-30d、microRNA-30e 等主要成员。microRNA-30a-5p 是由 microRNA-30a 5' 端臂加工修饰而来,在多种恶性肿瘤中表达下降,扮演肿瘤抑制因子的作用,如 microRNA-30a-5p 在肺癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌及上皮性卵巢癌等肿瘤中表达明显下降^[10-13]。Taylor 及 Resniko 等^[14]研究证实卵巢癌患者外周血与癌组织中 miRNA 的表达未见明显差异,以及外周血 miRNA 具有良好的稳定性,从而提示血液中肿瘤来源的 miRNA 可以便捷、可靠地提供卵巢癌病灶中 miRNA 的实际水平。所有上述研究结果表明外周血 microRNA-30a-5p 的出现为上皮性卵巢癌的无创诊断提供了希望。本研究结果显示上皮性卵巢癌患者血浆 microRNA-30a-5p 较正常对照组明显降低,这与文献报道一致^[5],但是目前的研究仅仅局限于卵巢癌患者与正常健康者间的表达差异,未对肿瘤分级与分期中的表达进行研究,本研究进一步深入研究,对上皮性卵巢癌进行精确地分级及分期,具体到肿瘤病理分级以及 I、II、III、IV 期,观察 microRNA-30a-5p 是否与肿瘤病变程度有关。本研究结果表明,不同分级、分期上皮性卵巢癌血浆之间 microRNA-30a-5p 表达有差异,随着肿瘤恶性度的升高, microRNA-30a-5p 表达逐渐降低,尤其在 I、II、III、IV 期间的降低幅度尤为明显。因此血浆中 microRNA-30a-5p 的水平可作为上皮性卵巢癌患者的预后评价指标。

研究证明 miRNA 通过与靶基因的结合共同发挥作用,实现对肿瘤发生发展的调控,文献报道 microRNA-30a-5p 以 MTDH/PTEN/AKT 及 AEG-1、PIK3D、Wnt/ β -Catenin/BCL9 等为作用靶点,调节癌细胞的生长及凋亡、侵袭与转移及耐药^[13,15]。但是 miRNA 与靶基因间的连接也不是一对一的,一个 miRNA 可以与上百种靶基因结合发挥作用,一个 mRNA 可以被其它多种 miRNAs 调节。但本研究只是描述不同分期与分级上皮性卵巢癌血浆中 microRNA-30a-5p 的表达差异,没有涉及 microRNA-30a-5p 作用靶点,因此, microRNA-30a-5p 在上皮性卵巢癌中具体的分子作用机制还有待于进一步研究。

综上所述,血浆 microRNA-30a-5p 表达水平与上皮性卵巢癌分级、分期有关,可能是上皮性卵巢癌分期发生发展的重要因素,可作为一个重要的无创检测指标。但是 miRNA 的作用是众多 miRNA 分子及靶基因共同调控完成的。因此,应同时分析与其它上皮性卵巢癌特异性标志物以及靶基因之间的相互关系,以便进一步深入了解上皮性卵巢癌的发生机制,为疾病的诊治提供理论依据和治疗靶点,从而进一步提高病人的生存率。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29.
- [2] Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer[J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(4):355-366.
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
- [4] Croset M, Kan C, Clézardin P. Tumour-derived miRNAs and bone metastasis[J]. Bonekey Rep, 2015, 4: 688.
- [5] Shapira I, Oswald M, Lovecchio J, et al. Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes[J]. Br J Cancer, 2014, 110(4): 976-983.
- [6] Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2014, 124(1):1-5.
- [7] 方坚鸿,熊玉娟,庄诗美. MicroRNA 与肿瘤血管生成[J]. 中国科学(C辑:生命科学), 2009, 39(1): 58-63.

- [8] Fu J, Xu X, Kang L, et al. miR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting Eya2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(2):314-319.
- [9] Li WF, Dai H, Ou Q, et al. Overexpression of microRNA-30a-5p inhibits liver cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting MTDH/PTEN/AKT pathway [J]. *Tumour Biol*, 2015, 21:1-11.
- [10] He R, Yang L, Lin X, et al. MiR-30a-5p suppresses cell growth and enhances apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via targeting AEG-1 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12):15632-15641.
- [11] Ouzounova M, Vuong T, Ancey PB, et al. MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14:139.
- [12] Shi XB, Tepper CG. MicroRNAs and prostate cancer [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2008(5a):1456-1465.
- [13] Baraniskin A, Birkenkamp-Demroder K, Maghnouj A, et al. MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(4):732-739.
- [14] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67:8699-8707.
- [15] Zhao JJ, Lin J, Zhu D, et al. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/b-Catenin/BCL9 Pathway [J]. *Cancer Res*, 2014, 74:1801-1813.

(上接第 370 页)

- [23] Pavšič J, Žel J, Milavec M. Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(1):107-121.
- [24] Sedlak RH, Cook L, Cheng A, et al. Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(8):2844-2848.
- [25] 冯仁丰. 互换性依然是问题 [J]. *检验医学*, 2013(12):1063-1068.
- [26] Hayden RT, Preiksaitis J, Tong Y, et al. Commutability of the first world health organization international standard for human cytomegalovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(10):3325-3333.
- [27] Jones S, Webb EM, Barry CP, et al. Commutability of cytomegalovirus WHO international standard in different matrices [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(6):1512-1519.

(上接第 380 页)

- [9] 刘蕾, 焦晋山. 血小板输注无效与血小板抗体的研究现状 [J]. *成都医学院学报*, 2013, 8(6):723-725.
- [10] 韩日成, 张家明, 洗观秀, 等. 湛江市血小板输注无效患者血小板抗体检测及影响因素分析 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2016, 37(3):40-42.
- [11] 贾彩虹, 周永安, 姚红. 山西地区血液病患者人类血小板抗原基因分型研究 [J]. *临床医药实践*, 2016, 25(9):680-681.
- [12] 张毅, 于媛, 乔文本, 等. 山东汉族人群 HPA1~16 和 HLA-A、B 的群体遗传学研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(5):690-693.
- [13] 许金华, 李剑平. 邢台地区血小板志愿捐献者 HPA 基因资料库的建立 [J]. *临床输血与检验*, 2017, 19(1):55-58.
- [14] 尹作梅, 耿贵华, 陈晓建. 临沂地区血小板供者 HLA-A、B 和 HPA1-17 分型库的建立 [J]. *山东医学高等专科学校学报*, 2017, 39(2):99-103.
- [15] Phuangtham R, Romphruk A, Puapairoj C, et al. Human platelet antigens in burmese, karen and north-eastern thais [J]. *Transfus Med*, 2017, 27(1):60-65.
- [16] 李丽兰, 卢芳, 申卫东, 等. HPA-1-28w 基因分型检测技术体系的建立和广西瑶族、汉族人群 HPA-1-28w 基因多态性研究 [J]. *中国输血杂志*, 2017, 30(3):289-296.

直接快速多色荧光PCR技术在高危型HPV分型中的应用探讨

刘淑园 肖湘文 丁渭 曾焯 张天海 王盼盼 陈华云*

[摘要] 目的 探讨直接快速多色荧光PCR技术在高危型人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染分型检测中的应用。方法 对2014年3月至2014年10月794例患者宫颈粘液样本,采用直接快速多色荧光PCR技术与传统荧光PCR技术同步进行HPV分型检测,并对比分析。对于检测试剂与对比试剂检测结果不一样的样本,采取测序法复核。选择中国生物制品检定研究院HPV标准品进行18种HPV型别最低检出量和特异性分析。同时测试直接快速多色荧光PCR技术在AB7500FAST、Bio-Rad CFX96、Roche480、AGS9600等多种荧光扩增仪上的扩增效果并比较。结果 794例样本中,检测试剂检出高危型HPV阳性患者600例,阴性样本194例。对比试剂检出HPV阳性患者595例,阴性样本199例。直接快速多色荧光PCR技术检测HPV的18个型别的最低检测量在100~1 000 copies/mL之间;在AB7500FAST、Bio-Rad CFX96、Roche480、AGS9600等仪器的比对分析中,Bio-Rad CFX96检测结果表现最佳。Roche480反应时间最长,本底相对较高。国产安杰思AGS9600仪器检测与AB7500持平居中。结论 直接快速PCR技术无需核酸提取,样本直接进行快速PCR扩增,检测时间短,反应速度快,特异性高,重复性好,试剂本身带有颜色示踪,对于解决我国临床HPV检测的普及具有重要意义。

[关键词] 人乳头状瘤病毒;基因分型;直接快速多色荧光PCR;宫颈上皮内瘤变(CIN)

Application of direct and rapid multi-color fluorescence PCR in high risk HPV typing

LIU Shuyuan, XIAO Xiangwen, DING Wei, ZENG Ye, ZHANG Tianhai, WANG Panpan, CHEN Huayun*
(Guangzhou HEAS BioTech Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong, China, 510700)

[ABSTRACT] Objective To explore the application of direct and rapid multi-color fluorescence PCR in the detection of high risk human papillomavirus (HPV) infection. Methods From March 2014 to October 2014, cervical mucus samples from 794 patients were detected by direct and rapid multi-color fluorescence PCR and traditional fluorescence PCR for HPV typing comparison. If the results are not consistent when compared with detection reagents (multi-color fluorescence PCR) and control reagents (traditional fluorescence PCR), the sequencing method was used for verification. The minimum detectable range and specific analysis of 18 types of HPV from National Institute for Biological products were confirmed. In addition, the amplification efficiency of direct rapid multi-color fluorescence PCR were tested and compared in the instruments of AB7500FAST, Bio-Rad CFX96, Roche480, AGS9600. Results 600 positive samples and 194 negative samples were determined by the multi-color fluorescence PCR (detection reagents) in the sum of 794 samples. 595 positive samples and 199 negative samples were determined by the traditional fluorescence PCR (control reagents). The minimum detection of 18 types of HPV with direct and fast multi-color PCR were located between 100~1 000 copies/mL. Compared with the test results of fluorescence amplification from

作者单位:广州和实生物技术有限公司,广东,广州 510700

*通讯作者:陈华云, E-mail: chy@heasbio.com

AB7500FAST, Roche480 and AGS9600, Bio-Rad CFX96 is the best. The reaction time of Roche480 is the longest and the background is relatively high. AGS9600 and AB7500 are in the middle levels. Conclusion Direct and rapid multi-color fluorescence PCR technology does not require nucleic acid extraction. The detection time is short, rapid reaction, high specificity, good repeatability, and reagent itself with color tracing. It is of great importance to popularize the clinical HPV detection in China.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; HPV genotyping; Direct and rapid multi-color fluorescence PCR; Cervical intraepithelial neoplasias

宫颈癌是女性第二大癌症,主要病因是由高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的持续和反复感染所致。HPV感染同99.7%的宫颈癌相关,约70%的成年女性一生中会被HPV感染,从被感染到宫颈癌发病间期可长达20年,全世界每年新增50万例,死亡27.5万例,亚洲23.5万例,中国估计有近10万新发病例,约占世界新发病例总数的1/5^[1]。致癌性高危HPV基因型的持续感染与宫颈癌发生密切相关^[2-3]。与未感染HPV的女性相比,感染HPV16和感染HPV18后,患宫颈鳞状细胞癌的风险分别要高出约400倍和250倍^[1]。我国城市妇女由于缺乏有组织的筛查计划和医学知识,每年约有3万名妇女死于宫颈癌^[4]。中高危型HPV与宫颈癌及宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN2/3)的发生密切相关^[5]。HPV DNA检测还可以对难以确定的不典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cells, ASCUS)和宫颈脱落细胞轻度病变作进一步的判断^[6]。2015年美国妇科肿瘤学会(Society of Gynecologic Oncology, SGO)/美国阴道镜和宫颈病理学会(American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, ASCCP)在针对宫颈癌初筛的指南中指出,高危型HPV检测可以作为一线宫颈癌初筛方案^[7-9]。现有的运用荧光PCR方法进行高危型人乳头瘤病毒基因分型检测的技术的缺点主要是扩增灵敏度低,耗时长。前期一般都需要经过步骤繁琐的核酸提取,然后运用普通Taqman探针的方法进行多重PCR扩增,而且一般都是FAM和HEX两通道检测,无法具体区分高危HPV型别,难以满足实际使用的需要。直接快速多色荧光PCR技术只需对样本进行简单的处理即可上样,反应时间短,同时可以检测13种常见高风险HPV基因型(31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、82)和3种少见高风险HPV基因型(26、53、73),还能具体分型高风险HPV基因型16型和18型。本研究采用直接快速多色荧光PCR

技术与传统荧光PCR技术同步进行HPV分型检测,并对比分析,探讨直接快速荧光PCR技术在高危型HPV感染分型检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2014年3月至2014年10月来自南方医科大学南方医院、大连医科大学附属第一医院、中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院就诊的经临床确诊为HPV感染的794例患者,对其宫颈脱落细胞、生殖泌尿道分泌物取样后封装保存的宫颈刷、拭子或大于1 mL的细胞保存液进行检测分析。

1.2 试剂与仪器

直接快速多色荧光PCR技术使用的试剂来自于广州和实生物技术有限公司研制的高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),该试剂盒采用的检测方法为多重荧光PCR方法,特异性检测HPV18种高度危险型别(16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82),并可通过分析荧光来区分HPV16型(HEX标记)和HPV18型(TEXRD标记)(剩余16个基因型用FAM标记, *Globin* 基因作为检测内标用CY5标记)。传统荧光PCR技术使用的试剂来源于广州安必平医药科技有限公司的人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒(荧光PCR法),该试剂为两通道检测。18种HPV型别最低检出量的标准品来源于中国生物制品检定研究院HPV标准品。特异型分析样本为4例生殖道病原体阳性样本,分别感染如下病原体:梅毒螺旋体(*Treponema Pallidum*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*),且均经相应的试剂盒确认为相应病原体阳性且无HPV感染,其中梅毒螺旋体、淋球菌、白色念珠菌的浓度为 10^6 CFU/mL,阴道毛滴虫浓度为 10^6 个/mL。PCR扩增仪器为AB7500FAST、Bio-Rad

CFX96、Roche480、AGS9600 荧光扩增仪。

1.3 方法

1.3.1 样本的处理

直接快速多色荧光 PCR 技术样本的处理: 临床样本和另外 4 例生殖道病原体阳性样本用灭菌生理盐水清洗 2 次后离心弃上清, 悬浮细胞沉淀备用; HPV 标准品梯度稀释为 50 copies/mL、100 copies/mL、500 copies/mL、1 000 copies/mL、10 000 copies/mL 后备用。

传统 PCR 技术样本的处理: 将 794 例临床样本用病毒核酸提取试剂提取核酸备用。

1.3.2 检测方法

1.3.2.1 直接快速多色荧光 PCR 技术检测方法

临床样本检测方法: 将离心处理好的 794 例临床样本分别加入直接快速多色荧光 PCR 扩增体系, 设置扩增条件, 在 AB7500 上进行扩增。

最低检出量检测方法: 将梯度稀释好(分别为 50 copies/mL、100 copies/mL、500 copies/mL、1 000 copies/mL、2 000 copies/mL)的 18 个型别的 HPV 标准品, 分别加入直接快速多色荧光 PCR 扩增体系, 设置扩增条件, 在 AB7500 上进行扩增。

特异性检测方法: 选择另外 4 例生殖道病原体阳性样本, 分别加入直接快速多色 PCR 扩增体系, 设置扩增条件, 在 AB7500 上进行扩增, 检测其特异性。

不同机型测试方法: 选择稀释后的中国生物制品检定研究院的 HPV 标准品, 采用直接快速多色荧光 PCR 技术检测其在 AB7500FAST、Bio-Rad CFX96、Roche480、AGS9600 等多种荧光扩增仪上的扩增效果并进行比较。

重复性检测方法: 选择全部 18 种基因型质粒和随机选取 5 个临床样本重复进行 3 次试验, 设置扩增条件, 在 AB7500 上检测其重复性。

1.3.2.2 传统 PCR 技术检测方法

将提取好 794 例患者宫颈粘液样本的核酸分别加入传统 PCR 扩增体系, 设置扩增条件, 在 AB7500 上进行扩增。

1.3.3 反应条件

直接快速多色 PCR 反应条件为: 50℃ 3 min; 95℃ 5 min; 95℃ 5 s 56℃ 16 s(采集荧光), 45 个循环。

传统 PCR 反应条件为: 95℃ 15 min; 94℃ 15 s 55℃ 45 s(采集荧光), 45 个循环。

1.4 结果分析

阳性判断: 荧光曲线与内标(CY5 标定)曲线均成 S 型生长; 阴性判定: 仅内标(CY5 标定)曲线成 S 型生长。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件建立数据库进行统计分析。本次研究采用 Kappa 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

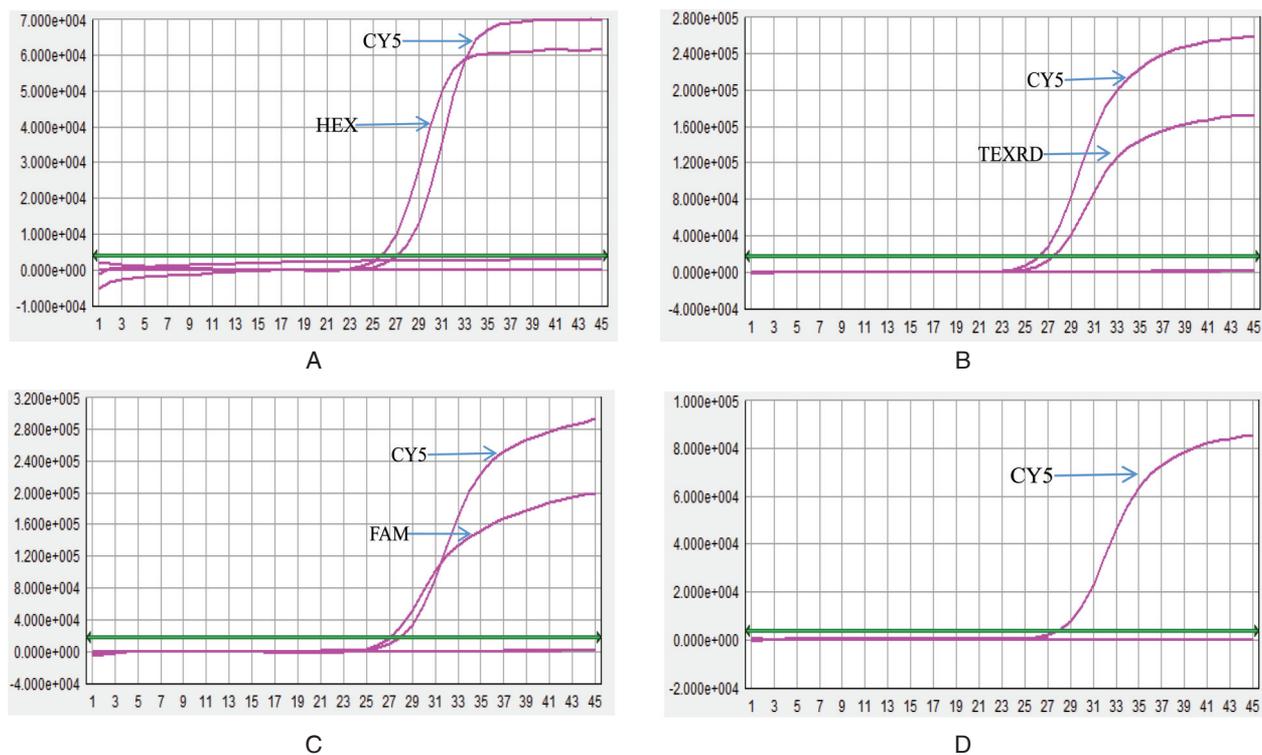
2 结果

2.1 直接快速多色荧光 PCR 技术检测试剂性能参数分析

对中国生物制品检定研究院 HPV 标准品进行梯度稀释后, 同时进行特异性和灵敏度分析。结果 4 例特异性检测样本均为阴性, 试剂特异性良好。针对 18 个基因型的最低检出量分析如表 1 所示, 部分基因型检测示意图如图 1 所示。本研究对试剂的重复性进行了分析, 选择全部 18 种基因型质粒和 5 个临床样本进行试验, 所有结果变异系数低于 5%, 表明试剂具有良好的重复性。

表 1 18 个高危型 HPV 病毒最低检出量
Table 1 The minimum detection volume of 18 types of high risk HPV

型别	最低检出量(copies/mL)
16	100
18	100
26	1 000
31	500
33	500
35	500
39	500
45	100
51	100
52	1 000
53	1 000
56	1 000
58	500
59	500
66	1 000
68	1 000
73	500
82	100



A: HPV16型检测结果; B: HPV18型检测结果; C: HPV26型检测结果; D: 阴性标本

图1 直接快速多色荧光 HPV 检测扩增示意图

Figure 1 The amplification diagram of direct rapid fluorescence HPV detection

2.2 AB7500FAST/Bio-Rad CFX96/Roche480/AGS 9600等机型反应时间和结果表现

通过对不同机型上机开始到实验结束下机时间的总体计算,在AB7500FAST、Bio-Rad CFX96、Roche480、AGS9600等机型上反应时间分别为1 h 10 min、1 h 5 min、1 h 20 min、1 h 10 min,相对于传统荧光PCR检测3.5 h,整个时间缩短了约一半,极大提高了检测的效率。在AB7500FAST、Bio-Rad CFX96、Roche480、AGS9600检测的比对分析中,Bio-Rad CFX96检测结果表现最佳,时间最短,曲线平滑,本底最低。Roche480在进行多色检测时,反应时间最长,由于软件本身需要进行通道选择,导致部分荧光检测信号相对不佳,本底较高。国产安杰思AGS9600仪器检测已经达到进口仪器水平。所有仪器的重复性均满足要求。

2.3 临床样本结果分析

本次研究采用随机、盲法的临床试验设计,共检测样本794例,本研究试剂检测到600例阳性样本,194例阴性样本。对照试剂检测到595例阳性样本,199例阴性样本。与对照试剂相比,本

次研究所用试剂的阳性符合率为100%,阴性符合率为92.82%,总符合率为98.11%, $Kappa$ 值为0.950($P=0.000$),表明待考评试剂盒与对照试剂盒具有很好的一致性。有5例临床样本对照试剂检测阴性,经过GP5/GP6引物扩增并测序验证^[11],对照试剂存在漏检的情况。进一步对全部595例阳性样本的实验结果进行分析,其中16型(含混合感染)占22.6%,18型(含混合感染)占10.8%。

3 讨论

宫颈癌是严重危害妇女健康的恶性肿瘤之一,其具有较长的癌前病变阶段。人乳头状瘤病毒感染是宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的主要病因^[11]。HPV感染率随着宫颈病变进展而升高,高危型HPV基因型是宫颈癌变的早期事件,多重感染是加重宫颈病变的重要因素^[12]。已有国内外研究表明,宫颈癌99%以上是由如下8种高危HPV亚型引起:HPV16、HPV18、HPV45、HPV31、HPV33、HPV52、HPV58、HPV67,其中HPV16、HPV18、HPV45、HPV31是主要高危型,HPV33、

HPV52、HPV58、HPV67是次要高危型^[13-14]。但在国内, HPV16、HPV52、HPV58、HPV45发病率较高。这8种以外的其他高危型,属于伴随感染,不会独立于以上8种型别存在。

随着光电技术的发展和荧光PCR技术的不断进步,已经出现了可不用样本核酸提取的直接PCR技术和基于仪器平台的快速PCR技术,这2种技术代表了目前PCR发展的新方向^[15-16]。本研究采用的直接快速荧光PCR技术属于不提取核酸的直接PCR技术,使用新一代FAST-Taq DNA聚合酶,该酶通过基因工程改造和化学修饰,聚合酶同时具有热启动、快速扩增和耐抑制物特性,热启动保证了反应的敏感度和特异性,快速扩增使得检测时间大大缩短,耐抑制物使得反应体系可以对含血样本进行扩增不影响结果,具有极大的应用前景。

进一步,本研究采用多通道荧光定量PCR技术检测HPV DNA,通过使用多种具有不同激发或发射波长的荧光物质标记不同或通用特异性探针进行示踪,从而实现在同一反应管内对不同基因型别进行检测。本研究针对WHO推荐的全部18种高风险HPV基因型进行筛查分型,同时对最高危的16、18型进行细分,一次检测满足多种需要。同时,本方法在有质粒梯度一起检测的模式下,还可以对检测样本存在的病毒滴度进行定量分析。通过本研究证实,直接快速多色荧光PCR技术检测HPV DNA灵敏度高、重复性好、分型的同时还可以准确定量,结果直观可靠,客观性强,临床应用前景好。

总之,基于直接快速多色荧光PCR技术进行HPV全部高危型检测分析,检测速度快、特异性好、灵敏度高、重复性高、试剂本身带有指示剂,对于临床HPV检测的普及具有重大价值。

参考文献

- [1] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11):1048-1056.
- [2] Walboomers JL, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1):12-19.
- [3] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4):244-265.
- [4] 王春红, 杜娟, 王永霞. 重视宫颈癌的早期症状与高危人群的筛查[J]. *医学信息*, 2015(38):220-220.
- [5] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens - Part B: biological agents [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(4):321-322.
- [6] Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(7):663-672.
- [7] Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: Interim clinical guidance [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 136(2):178-182.
- [8] Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance [J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 125(2):330-337.
- [9] Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, et al. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the Athena study using HPV as the first-line screening test [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 136(2):189-197.
- [10] Qu W, Jiang G, Cruz Y, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(6):1304-1310.
- [11] 代红莹, 张晓静. 重庆永川地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布及多重感染影响的研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(6):619-621.
- [12] 唐忠辉, 黄仲庆, 孟加榕, 等. 24种HPV基因型检测在宫颈病变诊断中的意义 [J]. *中国民康医学*, 2015(9):8-10.
- [13] Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, et al. Impact of improved classification on the association of human papillomavirus with cervical precancer [J]. *Am J Epidemiol*, 2010, 171:155-163.
- [14] 乔友林. 中国妇女人乳头瘤病毒感染和子宫颈癌的流行病学研究现状及其疫苗预防前景 [J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(10):937-940.
- [15] Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq [J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(2):152-161.
- [16] Arezi B, McKinney N, Hansen C, et al. Compartmentalized self-replication under fast PCR cycling conditions yields Taq DNA polymerase mutants with increased DNA-binding affinity and blood resistance [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5:408.

· 论 著 ·

HCV RNA水平与HCV基因型别的相关性研究

周萍^{1*} 杨柳² 李金洁² 王晓琴¹

[摘要] 目的 探讨丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)载量水平与HCV基因型别的相关性。方法 选取255例丙型肝炎患者,采用实时荧光定量逆转录PCR(reverse transcription quantitative real time PCR, RT-qPCR)检测HCV病毒载量水平,采用PCR-反向点杂交法(polymerase chain reaction-reverse dot blot, PCR-RDB)进行HCV基因分型检测。结果 255例样本中,PCR-RDB法成功分型的246例(96.47%),未明确分型的9例(3.53%);其中,1b型121例(47.45%),2a型107例(41.96%),3a型16例(6.27%),3b型6例(2.35%),6a型5例(1.96%);5种HCV基因亚型中3b型和6a型病毒载量较高,显著高于其他3个亚型($P<0.05$)。结论 采用PCR-RDB法进行HCV基因分型时需参考样本定量结果,低病毒载量会影响基因分型成功率;HCV RNA水平与HCV基因型别可能具有相关性。

[关键词] 丙型肝炎病毒; PCR-反向点杂交法; 基因型; 病毒载量

Study on the correlation between HCV RNA level and HCV genotypes

ZHOU Ping^{1*}, YANG Liu², LI Jinjie², WANG Xiaoqin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi, China, 710061; 2. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi, China, 710032)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between the HCV - RNA load and viral genotype. **Methods** 255 serum samples of chronic hepatitis C patients were collected. HCV RNA load were detected by RT-qPCR; HCV genotypes were detected with PCR-RDB. **Results** Of all 255 cases, 96.47% (246/255) was typed successfully by PCR-RDB, but 3.53% (9/255) was not. 121 cases (47.45%) were genotype 1b, 107 cases (41.96%) were genotype 2a, 16 cases (6.27%) were genotype 3a, 6 cases (2.35%) were genotype 3b, 5 cases (1.96%) were genotype 6a. Interestingly, the genotypes of HCV 3b and 6a had higher HCV - RNA load, compared to other genotypes ($P<0.05$). **Conclusion** When the PCR - RDB method was used for HCV genotyping, the quantitative results of the reference sample are required. The low viral load can affect the success rate of genotyping, suggesting the level of HCV RNA may be correlated with HCV genotypes.

[KEY WORDS] Hepatitis C virus; PCR-RDB; Genotypes; Virus load

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染严重危害人类的健康。全世界约有1.7亿人受到HCV的感染^[1],我国更是一个HCV感染大国。丙型肝炎病毒感染可导致肝脏发生炎症坏死和纤维化,部分丙型肝炎患者可以发展为肝硬化甚至肝

癌,给社会和家庭带来沉重负担^[2]。HCV基因型分布具有明显的地域差异性和人群差异性,不同基因型病毒生物学特性不同,对药物的反应敏感性也不同。因此,HCV基因分型对丙型肝炎患者的诊断和治疗至关重要。丙型肝炎病毒基因分型

作者单位:1. 西安交通大学第一附属医院检验科,陕西,西安 710061

2. 空军军医大学西京医院检验科,陕西,西安 710032

*通讯作者:周萍, E-mail: Zhouping_xa@163.com

方法很多,直接测序法是“金标准”,但操作费时费力,检测周期长、成本高,对医院人力、物力和财力要求严格,并不利于临床广泛使用。PCR与反向斑点杂交技术相结合的方法,在以往的HCV基因分型检测中表现出较好的特异性和准确性^[3],且操作简便、高效、经济,中小型医院即可实现检测,利于丙肝分型检测的普及。但其分型结果往往受到HCV RNA水平的限制,本研究基于PCR-反向点杂交法(polymerase chain reaction-reverse dot blot, PCR-RDB)探讨了HCV RNA水平对HCV基因分型效果的影响,并分析了HCV基因型别与HCV核酸水平的相关性,为丙型肝炎的治疗及其疫苗研制提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2015年1月至2016年12月间来自西安交通大学第一附属医院和西京医院住院及门诊就诊的丙型肝炎病毒感染患者255份标本,其中男性105份,女性150份,年龄16~83岁,平均年龄(48.21±13.65)岁。患者诊断均符合中华医学会肝病学分会和感染病学分会联合发布的中国《丙型肝炎防治指南(2015年更新版)》中的诊断标准^[4]。

1.2 试剂及仪器

丙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒(RT-qPCR法)和丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-RDB),由中山大学达安基因股份有限公司生产。仪器包括美国ABI 7500型荧光定量PCR仪,德国Hermle Z216 MK微量高速冷冻型离心机,杭州奥盛仪器有限公司生产的干式恒温器,常州菲普实验仪器厂生产的电热恒温振荡水槽。

1.3 HCV RNA定量与HCV基因分型

1.3.1 血浆HCV总RNA提取

用EDTA抗凝采血管抽取受检者静脉血4 mL,1 500 r/min离心2 min,吸取上层血浆200 μL用于RNA的制备。取灭菌的1.5 mL离心管,加入50 μL蛋白酶K,取200 μL血浆,再加入200 μL病毒裂解液(已含Carrier RNA,主要成分为Triton X-100),振荡混匀,高速离心10 s,72℃放置10 min,最后加洗脱液50 μL(72℃预热),备用。

1.3.2 HCV RNA定量扩增

参照中山大学达安基因股份有限公司生产的

丙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒(RT-qPCR法)说明书操作要求和ISO15189实验室操作程序进行反应体系的操作,体系完成后在ABI 7500型实时荧光定量PCR仪上检测标本中的HCV RNA载量。

1.3.3 反转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)分型扩增

按照中山大学达安基因股份有限公司丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-RDB)的说明书进行RT-PCR扩增。扩增总体积50 μL:酶系、引物、PCR buffer混合液20 μL,1.3.1中RNA提取液30 μL(待测标本及阴、阳性质控品),两者混合后瞬时离心,将反应管放入PCR仪,按下列条件扩增:50℃逆转录25 min;95℃预变性15 min;94℃30 s、55℃40 s、72℃45 s,共45次循环;72℃延伸7 min。PCR产物可直接进行杂交反应,或置于4℃短期保存,或置于-20℃长期冻存。

1.3.4 杂交反应及结果判读

严格按照中山大学达安基因股份有限公司生产的丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒中杂交反应说明书进行。其步骤包括预杂交、杂交、洗膜、显色、结果判读。HCV基因分型杂交膜条上共12个位点,其中位点G1~G10为各型别检测探针,PC为扩增控制点,CC为显色控制点,位点排列如图1所示。根据说明书要求,可将CC点、PC点和各型别位点cut off值预设的分析软件中,分析结束后由软件自动生成各位点信号值、阴阳性和相应的HCV型别;也可参照结果分析表肉眼进行结果判读,HCV基因型常见结果分析表见表1。患者HCV型别均由肉眼判读所得。

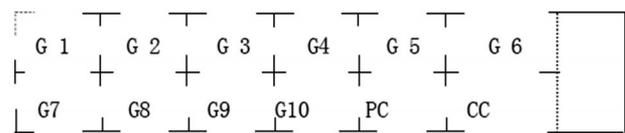


图1 HCV基因分型杂交膜条位点排列

Figure 1 Sequencing of hybridization membrane strip sites of HCV genotyping

1.4 统计学方法

所有数据采用SPSS 16.0进行统计学分析,计量资料应用方差分析,计数资料用χ²检验,以P < 0.05为差异具有统计学意义。

表1 HCV 基因分型常见结果分析表
Table 1 Analysis of major HCV genotypes

编号	阳性位点	HCV 分型检测结果
1	G1, G2, PC, CC	1b
2	G5, G6, G7, PC, CC	2a
3	G8, G9, PC, CC	3a
4	G8, G10, PC, CC	3b
5	G1, G3, G4, G5, PC, CC	6a
6	G1, G2, G5, G6, G7, PC, CC	1b, 2a 混合
7	PC, CC	不能确定型别
8	CC	HCV 阴性

2 结果

2.1 HCV RNA 定量检测

对 255 例所选患者标本进行 HCV RNA 定量检测,病毒载量为 10^3 ~ 10^8 IU/mL。其中 10^3 IU/mL 15 例, 10^4 IU/mL 67 例, 10^5 IU/mL 82 例, 10^6 IU/mL 66 例, 10^7 IU/mL 24 例, $>10^8$ IU/mL 1 例, 定量结果满足 HCV 基因分型要求。

2.2 HCV 基因分型结果

255 例样本中, PCR-RDB 法成功分型 246 例, 分型率为 96.47% (246/255), 9 例不能明确分型的样本经直接测序法明确分型结果。HCV 基因分型结果为: 1b 型 121 份, 占 47.45%; 2a 型 107 份, 占 41.96%; 3a 型 16 份, 占 6.27%; 3b 型 6 份, 占 2.35%; 6a 型 5 份, 占 1.96%。

2.3 HCV 核酸水平与 PCR-RDB 法 HCV 基因分型成功率的相关性

将 255 例样本按不同病毒载量水平进行分组, 观察不同病毒载量时 PCR-RDB 法 HCV 基因分型成功率, 结果见表 2。9 例未成功分型的样本包括: 10^3 IU/mL 2 例, 分别为 1b 型和 6a 型; 10^4 IU/mL 2 例, 均为 3a 型; 10^5 IU/mL 2 例, 均为 2a 型; 10^6 IU/mL 1 例, 均为 2a 型; 10^7 IU/mL 2 例, 分别为 2a 型和 6a 型。核酸水平在 10^3 IU/mL (PCR-RDB 法基因分型载量要求临界值) 时分型成功率最低, 差异具有统计学意义。

2.4 HCV RNA 核酸水平与 HCV 基因型别相关性

对 5 种基因亚型的患者病毒载量水平进行统计与分析, 如表 3 所示。结果显示, HCV 1b 型的平均病毒载量最低, 为 $(5.42 \pm 0.97) \log$ IU/mL, 3b 型的平均病毒载量最高, 为 $(5.76 \pm 0.73) \log$ IU/mL。对 5 组亚型病毒载量进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 发现 5 种基因亚型之间病毒载量存在显著差异 ($F=2.793, P<0.05$)。再采用 Tukey-test 法进行两两比较 (表 4), 发现 3b 型和 6a 型患者病毒载量显著高于其他 3 个亚型。

3 讨论

HCV 是一种单股线性正链 RNA 黄病毒, 最初于 1975 年在一名输血后的患者血清中被发现^[5]。1989 年 Michael 等首次克隆其基因组, 并命名本病

表2 HCV 核酸水平与 PCR-RDB 法分型成功率

Table 2 The success ratios of HCV genotyping by PCR-RDB among different viral loads

组别	HCV RNA 载量 (IU/mL)	总例数	成功分型例数	PCR-RDB 法分型成功率
1	10^3	15	13	86.67% (13/15)
2	10^4	67	65	97.01% (65/67)
3	10^5	82	80	97.56% (80/82)
4	10^6	66	65	98.48% (65/66)
5	10^7	24	22	91.67% (22/24)
6	$\geq 10^8$	1	1	100% (1/1)

表3 HCV 不同基因型患者平均病毒载量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Patients' average viral loads among different genotypes of HCV ($\bar{x} \pm s$)

项目	基因亚型					合计	F	P
	1b	2a	3a	3b	6a			
载量均值	5.42±0.97	5.50±0.99	5.46±0.86	5.76±0.73	5.59±0.83	5.47±1.00	2.793	0.027

表4 HCV不同基因亚型患者平均病毒载量的两两比较

Table 4 Pairwise comparison of the viral loads between different genotypes of HCV

基因亚型	P			
	2a	3a	3b	6a
1b	0.646	0.828	0.010*	0.013*
2a		0.895	0.030*	0.011*
3a			0.049*	0.02*
3b				0.678

表中数值均为P值,*所示为3b型和6a型患者平均病毒载量比1b型、2a型及3a型患者高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)

及其病毒分别为丙型肝炎和丙型肝炎病毒^[6]。HCV感染是一个世界性的健康问题,其致病性强,且较易转为慢性,导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化,并可发展为肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。

HCV基因型具有高度异质性。根据Simmonds^[7]建议,利用核酸测序和进化树分析结果,将HCV分为6种主要的基因型(用数字1~6表示)和100多个基因亚型(用小写英文字母表示)。HCV基因型分布具有明显地域差异,我国常见的丙肝病毒基因型为1b和2a,6a型主要见于香港和澳门地区^[8]。本研究的患者多来自中国北方地区,结果表明仍以1b型和2a型为主,其他型别所占比例很少,这与以往报道基本一致^[9]。以往报道显示,不同基因型别的临床表现和治疗效果也不同^[10-11],深入HCV基因分型的研究,对丙型肝炎严重程度评估以及抗病毒药物敏感性的预测具有重要意义^[12]。1型HCV感染无论在干扰素治疗或口服抗病毒药物治疗中均较难获得病毒学持续应答(sustained virologic response, SVR),且预后效果较其他型别欠佳^[13-14]。蒋玲丽等人^[12]研究发现,患者体内抗HCV水平和HCV的基因型别有关,1b、2a、6a型患者抗体浓度分布均匀,1a型患者的抗体浓度相对较高,3b型的患者的抗HCV水平相对较低。由此猜想可能机体对3b型HCV的中和作用较弱,其病毒核酸水平较高。本文研究发现,HCV基因型别和病毒核酸水平具有相关性,且3b型的患者的病毒核酸水平明显高于1b型、2a型及3a型患者病毒核酸水平,这与蒋玲丽等人^[12]的发现具有一致性。不同病毒基因型在患者体内的核酸水平具有差异,是不同丙肝病毒基

因型别在患者体内的抗体应答机制有差异的另一个体现^[15],抗体中和能力强,其对应型别的病毒增殖受到抑制,因此其核酸水平则较低;排除中和抗体的影响,不同型别的病毒本身的增殖是否有差异还需要进一步研究和探索。由于本研究中部分型别标本量较少,相关性需要更大标本量的研究证实。

目前用于HCV基因分型的方法较多,包括全基因组直接测序分析法、序列特异性引物扩增法(polymerase chain reaction-sequence specific primers, PCR-SSP)、限制性片段长度多态性分析法(restriction fragment length polymorphism, RELP)、序列特异性核酸探针杂交法(PCR sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO)、PCR-反向点杂交法等。全基因组直接测序分析法,是目前HCV基因分型方法中最经典、最准确的方法,分型结果最为可靠,是HCV基因分型的“金标准”。但此法耗时、费力且昂贵,并不适合所有的实验室使用^[16]。PCR-SSP法是较早普遍使用的方法,由于每份样品需同时进行多次检测才能最终确定基因型,因此操作繁琐检测周期长,使其临床应用受到限制^[17]。RELP法是经PCR扩增靶基因后,用多种特定的限制性内切酶对PCR产物进行酶切,不同的基因型或亚型就可以得到长度大小不同的酶切片段,根据酶切后电泳所表现的片段大小及多态性进行HCV基因分型,该方法具有快速、经济等优点,但仅用少数几个内切酶,检测基因型别有限^[18]。PCR-SSO法是利用RT-PCR扩增HCV基因片段,将扩增产物与膜上特异性探针杂交,经显色反应后实现HCV基因分型。该方法操作比较简便,但价格昂贵,不宜在实验室广泛应用^[19]。PCR-RDB法,是通过将生物素或荧光素标记型特异性探针固相化在尼龙膜上,再与RT-PCR扩增的病毒产物进行杂交后,最终经肉眼判读出HCV基因型的分型方法。该方法特异性和准确性高,且不需要昂贵复杂的仪器设备,易于在临床广泛开展^[3, 20]。但PCR-RDB法对HCV核酸水平要求较高,尤其在PCR-RDB法基因分型载量要求临界值时,分型效果和结果均受到影响。本文对255份HCV-RNA检测阳性的患者进行HCV基因分型,PCR-RDB法的分型成功率为96.47%,对9份PCR-RDB法未能明确分型的标本,采用直接测序分析法检测均分型成功,表明测序法为HCV基因分型

金标准。因此,临床上对PCR-RDB法分型效果较差或者不能成功分型的样本,建议进行测序法验证,以确保结果的准确性和可靠性。

参考文献

- [1] Modi AA, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review [J]. *Oral Diseases*, 2008, 14(1):10-14.
- [2] Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection [J]. *Nature reviews Microbiology*, 2013, 11(7):482-496.
- [3] Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, et al. Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0 [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6):1901-1906.
- [4] 中华医学会肝病学会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版) [J]. *肝脏*, 2015, 20(12):933-949.
- [5] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B [J]. *N Engl J Med*, 1975, 292(15):767-770.
- [6] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [J]. *Science*, 1989, 244(4902):359-362.
- [7] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on [J]. *T Gen virol*, 2004, 85 (Pt 11):3173-3188.
- [8] Fu Y, Wang Y, Xia W, et al. New trends of HCV infection in China revealed by genetic analysis of viral sequences determined from first-time volunteer blood donors [J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(1):42-52.
- [9] Chen YD, Liu MY, Yu WL, et al. Hepatitis C virus infections and genotypes in China [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1(2):194-201.
- [10] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. PEG IFN alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(13):975-982.
- [11] Fung J, Lai CL, Hung I, et al. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin [J]. *J Infect Dis*, 2008, 198(6):808-812.
- [12] 蒋玲丽, 王雪亮, 鲍芸, 等. 丙型肝炎患者病毒基因型与抗HCV水平的相关性研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(2):95-98.
- [13] Lai CL, Wong VW, Yuen MF, et al. Sofosbuvir plus ribavirin for the treatment of patients with chronic genotype 1 or 6 hepatitis C virus infection in Hong Kong [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(1):96-101.
- [14] Beinhardt S, Al Zairy R, Ferenci P, et al. DAA-based antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C in the pre- and postkidney transplantation setting [J]. *Transpl Int*, 2016, 29(9):999-1007.
- [15] Imran M, Manzoor S, Ashraf J, et al. Role of viral and host factors in interferon based therapy of hepatitis C virus infection [J]. *Virology*, 2013, 10(1):299.
- [16] Poon KS, Koay ES, Chua CW, et al. Highly accurate HCV genotyping by targeted next generation sequencing [J]. *Hepatology*, 2015, 62(S1):1092A.
- [17] Samimi-Rad K, Sadeghi F, Amirzargar A, et al. Association of HLA class II alleles with hepatitis C virus clearance and persistence in thalassemia patients from Iran [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(9):1565-1572.
- [18] de Paula FK, Carmo RA, de Figueiredo ACM, et al. Hepatitis C, HCV genotypes and hepatic siderosis in patients with chronic renal failure on haemodialysis in Brazil [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22(7):2027-2031.
- [19] Shaker O, Bassiony H, El Raziky M, et al. Human leukocyte antigen class II alleles (DQB1 and DRB1) as predictors for response to interferon therapy in HCV genotype 4 [J]. *Mediator Inflamm*, 2013, 2013:392746.
- [20] 杨柳, 李金洁, 苏明权, 等. 基于PCR-RDB法对陕西地区HCV基因型别的研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2017, 9(3):160-164.

33例中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血病例的临床分析

陈剑虹* 钟泽艳 官志扬 贺海林 钟国兴 杨坤祥

[摘要] **目的** 探讨惠州地区人群中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血的检出率及临床特征,分析其意义及完善地贫防控内容。 **方法** 2015年1月至2016年12月,对参加惠州市孕前和孕期优生健康检查育龄夫妇的24 137例血液样本行血常规及血红蛋白电泳检测,并应用液相芯片、导流杂交技术对检出结果分析为可疑地中海贫血样本及产前363例羊水样本进行地中海贫血基因检测,对于疑为 β 地中海贫血但未检出者加用Gap-PCR技术检测中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血缺失型基因。 **结果** 在290例加测样本中检出中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 杂合子29例,中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地中海贫血复合 α 地中海贫血4例,总检出率为0.14%。血常规结果显示血红蛋白正常为26例,轻度下降为7例;红细胞平均体积(mean corpuscular volume, MCV)及红细胞平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)均降低;血红蛋白电泳结果显示HbA₂正常或轻度降低,HbF升高为(14.56±5.43)%。检出4例为夫妻同型 β 地贫携带者,行产前诊断,一例胎儿基因型为 β^{39} 杂合突变复合中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 杂合缺失,其中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 基因遗传自母方, β^{39} 基因遗传自父方,终止妊娠。 **结论** 惠州地区人群的中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 携带率高,中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 携带者的临床特征为MCV、MCH降低的基础上HbF值明显升高;中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 属缺失型 β 地中海贫血类型,当其有可能与 β 地中海贫血复合存在时,应进行产前诊断,防止中重型地贫患儿出生。

[关键词] 地中海贫血; 中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$; 基因检测; 产前诊断

Clinical analysis of 33 cases of deletional Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia in Huizhou

CHEN Jianhong*, ZHONG Zeyan, GUAN Zhiyang, HE Hailin, ZHONG Guoxing, YANG Kunxiang
(Prenatal Diagnosis Center of Huizhou First Women and Children's Hospital, Huizhou, Guangdong, China, 516007)

[ABSTRACT] **Objective** To Explore the gene frequency and clinical features of Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia in Huizhou, to analyze its significance and improve the prevention and control of thalassemia. **Methods** From January 2015 to December 2016, a total of 24 137 blood samples were collected from couples of childbearing age who participated in the pre - pregnant and prenatal healthy births in Huizhou city and analyzed by using blood routine test and hemoglobin electrophoresis as suspicious thalassemia screening. 363 amniotic fluid samples were detected by the liquid phase chip and diversion hybridization technique for thalassemia simultaneously. Further, the Gap - PCR technique was used to detect the gene of deletional Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia for undetected patients with suspected β -thalassemia. **Results** 29 cases of Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ heterozygotes and 4 cases of Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia accompanied by α -thalassemia were identified in 290 samples with the total detection rate of 0.14%. The blood routine test results showed that there were 26 cases of normal hemoglobin, and 7 cases of slight decrease. The mean corpuscular volume (MCV) and the mean corpuscular hemoglobin (MCH) were decreased. The results of hemoglobin

作者单位:广东省惠州市第一妇幼保健院产前诊断中心,广东,惠州 516007

*通讯作者:陈剑虹, E-mail:1296275774@qq.com

electrophoresis showed that HbA₂ was normal or slight decrease, with the HbF increased to (14.56±5.43)%. 4 cases of couples with the same genotypes of thalassemia were taken by prenatal diagnosis. One Case fetal abnormal genotype was Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia accompanied by β^{-28} . The Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ gene inherited from mother and the β^{-28} gene inherited from father and this pregnancy was terminated. **Conclusion** The incidence of Chinese type $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia in Huizhou area is high. The clinical features of Chinese type $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia carriers have both MCV and MCH decrease and HbF increase. The Chinese type $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ belongs to the deletional β -thalassemia. The prenatal diagnosis should be performed to prevent the birth of children with moderate or severe thalassemia when the Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia is accompanied by α -thalassemia.

[KEY WORDS] Thalassemia; Chinese $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$; Gene detection; Prenatal diagnosis

地中海贫血(地贫),又称珠蛋白生成障碍性贫血,是由于珠蛋白基因缺陷导致珠蛋白链合成障碍而引起的一种遗传性溶血性贫血。地贫具有显著的地域分布性,为我国南方最常见和危害最大的遗传病之一,主要分为 α 、 β 、 δ 、 γ 和 $\delta\beta$ 地贫。 $\delta\beta$ 地贫是一组因基因发育阶段特异性表达失控导致胎儿出生后HbF持续增高的地贫,其大片段缺失型常见型别有中国型、广州型、东南亚型、云南型及中国台湾型,其中我国最常见的 $\delta\beta$ -地中海贫血为中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地贫^[1-3]。广东省大规模人群地贫携带率的基线调查中显示,惠州市的地贫携带率(17.5%)明显高于平均水平(16.83%)^[4]。因此,地贫防控对于提高惠州市人口素质具有重要意义。本研究在国家卫生和计生委实施“国家免费孕前优生健康检查项目”的背景下,在惠州市政府“民生工程”的支持下,以惠州市育龄夫妇人群为对象,对孕前和孕期地贫初筛异常夫妻进行免费血红蛋白电泳分析及常规地贫基因检测,并为同型地贫夫妇提供遗传咨询指导、追踪随访等服务。本课题对惠州地区育龄夫妇中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ 地贫基因携带率及其临床特征等流行病学资料进行分析,补充本地区人群地贫防控内容,更有效地指导预防中重型地贫患儿的出生。

1 对象与方法

1.1 研究对象

于2015年1月至2016年12月,根据知情同意的原则,采集参加惠州市孕前和孕期优生健康检查育龄夫妇的样本共24 137例,年龄范围为20~60岁,平均年龄为26岁,近3个月无输血史。每人均抽取外周静脉血2 mL置于EDTA、ACD抗凝管,用于血常规、血红蛋白电泳分析,和提取外周血基因组DNA用于地贫基因检测。同时,本中心对可能

会分娩中重型地贫患儿的孕妇行羊膜腔穿刺术。采集胎儿羊水样本2管各约10 mL,一管直接法检测(培养前),另一管按照本中心建立的常规方法进行细胞培养后检测。

1.2 研究方法

1.2.1 血液学筛查

采用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司的BC-5380全自动五分类血液细胞分析仪检测红细胞参数,包括血红蛋白(hemoglobin, HGB)、红细胞平均体积(mean corpuscular volume, MCV)及红细胞平均血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)等。初筛阳性标准为: MCV < 82.00 fL 或(和)MCH < 27.00 pg^[1, 4, 17]。采用法国SEBIA公司的Capillarys 2 flex piercing全自动毛细管电泳仪分析血红蛋白A₂(hemoglobin A₂, HbA₂)、血红蛋白F(hemoglobin F, HbF)和异常血红蛋白条带,分别以HbA₂ < 2.50%或(和)出现异常血红蛋白带,例如血红蛋白H(hemoglobin H, HbH)、血红蛋白CS(hemoglobin constant spring, HbCS)等,判定为 α 地贫表型阳性, HbA₂ > 3.50%或(和)HbF > 2.50%判定为 β 地贫表型阳性^[1, 4, 17]。

1.2.2 基因型分析

对血液学筛查为阳性的样本以及产前诊断的胎儿羊水样本,按全血基因组DNA提取试剂盒说明书用Lab-Aid 820核酸提取仪(厦门百维信生物公司)提取基因组DNA。获得的DNA用液相芯片技术[地中海贫血(α/β 型)基因检测试剂盒,中山大学达安基因股份有限公司]和导流杂交技术(α -和 β -地贫基因检测试剂盒,潮州凯普生物化学有限公司)进行基因诊断,检测范围为中国人常见的3种 α 缺失型地贫(-^{SEA}/、- $\alpha^{4.2}$ /、- $\alpha^{3.7}$ /), 3种 α 非缺失型地贫(α^{WS} /、 α^{CS} /、 α^{QS} /), 17种 β 地贫(CD41-42M、CD17M、CD43M、CD71-72M、IVS-I-1M、IVS-I-5M、

IVS-II-654M、-28M、-29M、-30M、-32M、CapM、IntM、CD14-15M、CD27-28M、βEM、CD31M)。按照操作说明书进行操作和结果判断。对疑为β地贫而未检出常见突变基因的样本,进一步采用裂隙聚合酶链反应(gap polymerase chain reaction, Gap-PCR)技术检测中国型 $\gamma(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 缺失型,目的片段长度约300 bp。

2 结果

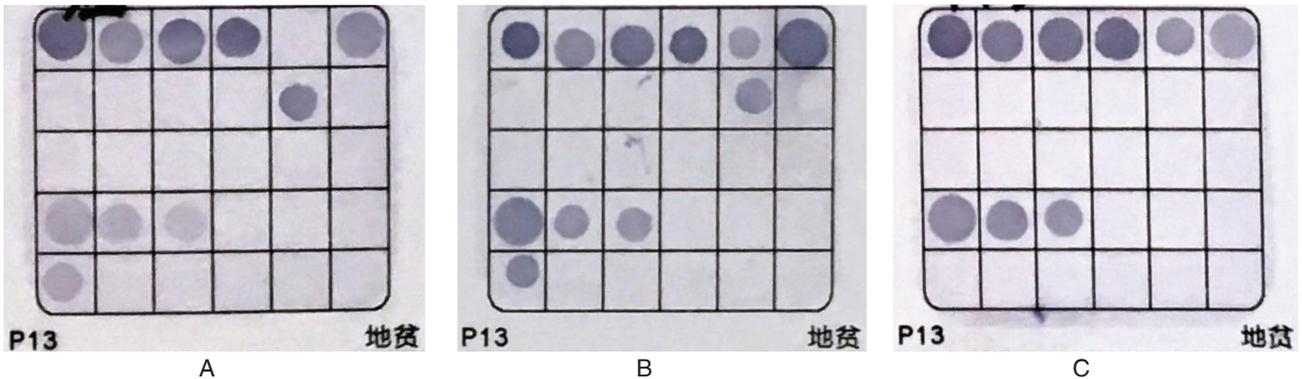
2.1 常规基因型结果

在24 137例血液样本中,根据血液学筛查阳

性样本的纳入标准,判定为β地贫表型阳性而未检出常规基因型的样本有290例,所占比例为1.20%。363例产前羊水样本检出1例异常遗传规律的胎儿基因型为 $\beta^{-28}/\beta^{-28},--^{SEA}/\alpha\alpha$ (图1A),其父亲基因型为 $\beta^{-28}/\beta^N,--^{SEA}/\alpha\alpha$ (图1B),母亲基因型为 $\beta^N/\beta^N,\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (图1C),见图1和表1。

2.2 加测基因型结果

290例加测样本中,检出中国型 $\gamma(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫33例,检出率为0.14%。其中中国型 $\gamma(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫杂合子29例,复合α地贫共4例,分别为2例 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、1例 $--^{SEA}/\alpha\alpha$ 、1例 $\alpha^{QS}/\alpha\alpha$ 。33例中国



A: 胎儿基因型 $\beta^{-28}/\beta^{-28},--^{SEA}/\alpha\alpha$; B: 父亲基因型 $\beta^{-28}/\beta^N,--^{SEA}/\alpha\alpha$; C: 母亲基因型 $\beta^N/\beta^N,\alpha\alpha/\alpha\alpha$

图1 异常遗传规律家系导流杂交结果

Figure 1 The hybri Max results of abnormal genetic rule family

表1 异常遗传规律家系液相芯片结果

Table 1 The liquid chip results of abnormal genetic rule family

序号	样本	β 突变	α 点 突变	α 缺 失型	-29 正常 信号值	-29 突变 信号值	-29 正常/ 突变	-28 正常 信号值	-28 突变 信号值	-28 正常/ 突变	SEA 信号值	a2 信号值	SEA/ a2
1	阴性对照	低信号	低信号	低信号	435	387	1.12	456	474	0.96	468	446	1.05
2	母亲	正常	正常	正常	4 696	1 177	3.99	3 262	581	5.62	415	3 458	0.12
3	父亲	β^{-28}/β^N	正常	SEA/aa	3 241	724	4.48	2 035	1 519	1.34	4 391	3 629	1.21
4	胎儿	低信号	正常	SEA/aa	330	320	1.03	319	661	0.48	3 700	2 434	1.52
5	阳性对照	通过	通过	通过	1 785	420	4.25	1 398	375	3.72	411	2 740	0.15

型 $\gamma(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫杂合子均表现为小细胞低色素, MCV 为(72.47±5.00) fL, MCH 为(24.01±2.45) pg; 血红蛋白正常为26例,轻度下降为7例;HbA₂正常或轻度下降,HbF明显升高为(14.56±5.43)%,见表2。检出4例的配偶同为β-地贫携带者(样本1~4号),属夫妻同型地贫携带者,进行产前诊断。其中检出一例胎儿常规基因型结果显示遗传规律异常,提示为中重型地贫患儿,见图2。

3 讨论

中国型 $\gamma(\text{A}\gamma\delta\beta)^0$ 地贫最初于20世纪70年代由Mann等^[5]首次报道,其缺失长度约为100 kb,累及β珠蛋白基因、Aγ、ψβ、δ和β珠蛋白基因下游较远的具有调控功能的DNA序列^[6-7]。β珠蛋白基因簇中含有2个表达γ-珠蛋白肽链的γ-基因(γ 和 $\text{A}\gamma$),因此这种缺失致使其杂合子除一般β

表2 33例中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地中海贫血标本的血液学参数及基因型Table 2 The hematological parameters and genotypes of 33 Chinese $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ -thalassemia specimens

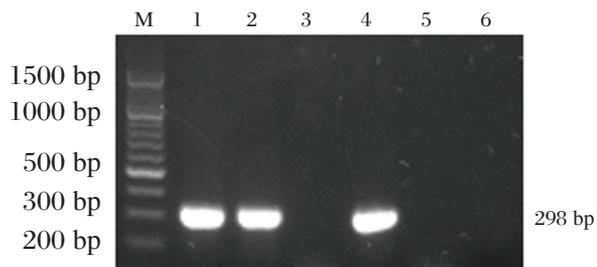
样本	性别	年龄(岁)	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	HbA(%)	HbA ₂ (%)	HbF(%)	基因突变类型
1	女	25	112.00	71.70	34.40	83.20	2.60	14.20	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
2	男	26	149.00	71.60	23.90	79.71	2.50	17.79	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
3	女	25	118.00	76.50	23.30	92.52	2.33	5.15	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
4	女	20	107.00	67.70	23.60	91.92	2.34	5.74	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
5	男	24	130.00	65.70	21.40	83.90	2.80	13.30	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
6	男	28	141.00	67.20	22.20	81.90	2.70	15.40	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
7	男	33	137.00	67.40	22.40	84.20	2.70	13.10	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
8	女	21	103.00	70.80	23.20	81.80	2.50	15.70	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
9	男	25	139.00	78.00	26.00	60.28	3.24	36.48	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
10	女	29	123.00	77.20	25.30	89.83	3.16	7.01	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
11	男	23	136.00	76.90	25.70	83.62	2.61	13.77	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
12	女	26	113.00	81.60	26.00	84.61	2.60	12.79	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
13	男	24	134.00	67.30	22.40	82.70	2.50	14.80	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
14	女	25	125.00	81.04	25.85	83.20	2.30	14.50	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
15	男	35	146.00	64.10	22.00	84.90	2.70	12.40	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
16	女	29	108.00	81.80	25.30	75.61	2.39	22.00	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
17	男	24	147.00	71.00	23.40	89.16	2.42	8.42	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
18	女	24	107.00	75.60	24.70	81.10	2.50	16.40	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
19	男	25	142.00	72.70	23.70	81.35	2.59	16.06	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
20	女	30	118.00	71.40	24.10	83.00	2.70	14.30	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
21	男	31	134.00	76.40	21.90	80.20	2.60	17.20	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
22	女	34	119.00	66.70	21.30	84.00	2.60	13.40	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
23	女	30	129.00	68.60	22.30	81.20	2.60	16.20	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
24	男	34	153.00	71.90	24.20	84.19	2.40	13.41	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
25	男	24	147.00	70.80	20.80	85.80	2.50	11.70	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
26	女	28	124.00	65.80	22.10	86.70	2.56	10.74	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
27	男	26	144.00	70.70	23.20	76.50	3.20	20.30	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
28	女	21	104.00	79.50	22.50	84.05	2.54	13.41	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
29	女	24	115.00	74.40	26.60	82.20	2.60	15.20	$\alpha\alpha/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
30	男	22	148.00	67.50	23.80	84.00	3.50	12.50	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
31	男	30	150.00	78.70	26.60	80.10	2.50	17.40	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
32	女	32	129.00	71.60	24.40	78.68	2.49	18.83	$\alpha^{OS}/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$
33	女	31	124.00	71.70	23.80	86.80	2.40	10.80	$--^{SEA}/\alpha\alpha, \beta^{*}/\beta^N$

β^{*} 为 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0/\beta^N$; 1~4号为与配偶属于夫妻同型 β -地贫携带者

地贫的小细胞低色素性表型外,还伴有 $\alpha\gamma$ 、 $\delta\gamma$ 珠蛋白基因的高表达以及HbF异常升高等特征性表现。HbF是胎儿期表达的血红蛋白,胎儿出生后基因表达关闭,HbA($\alpha_2\beta_2$)成为红细胞中主要的血红蛋白,因此HbF含量比率少于1%^[1-3]。与 β 地贫杂合子或双重杂合子一样,此类缺失突变和 β 地贫点突变的复合型亦可导致中重型地贫^[3,8]。预防中重型地贫患儿出生最有效的方法是产前筛查出地贫基因携带者,对夫妻同型这类高风险家庭进

行产前诊断,从而达到优生优育的目标^[9-10]。

本研究中,惠州地区24 137例样本中检出33例中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫缺失杂合子患者,携带率高达0.14%,比已报道的广西地区携带率0.07%高^[11]。中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫携带者的红细胞参数结果显示患者表现为无贫血或轻度贫血,血红蛋白值为103~153 g/L,但MCV<82.00 fL、MCH<27.00 pg均显示小细胞低色素贫血的特征,提示地贫的可能,这与文献报道的结果相类似^[3,11-13]。在



M: 1000 bp DNA Marker; 1: 胎儿中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 患者; 2: 母亲中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 患者; 3: 父亲正常者; 4: 中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 阳性对照; 5: 阴性对照; 6: 空白对照

图2 异常遗传规律家系中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地中海贫血结果

Table 2 The Chinese $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ -thalassemia results of abnormal genetic rule family

血红蛋白电泳结果中, HbA₂在正常范围(2.5%~3.5%)或轻微降低, 而 HbF 则明显升高(5.15%~36.48%), 与王继成等^[3](10.6%~20.6%)、韦媛等^[11](10.8%~22.3%)及覃丽波^[12](10%~18%)报道的情况相比, 血液学参数范围更大。分析原因, 可能是本研究病例较多导致的, 本中心的标本除了在本院就诊的病人, 还包括采集于下属多个县、区医院, 血液学的检查没有统一的质控, 所用的仪器也非统一。此外, 也可能由于惠州地区有少数民族, 存在个体差异性大, 其中 HbF 较高的样本来自少数民族较多的龙门县区。目前关于惠州地区少数民族的研究数据较少, 以后可有针对性地收集少数民族样本, 总结归纳该群体的基因分布情况和表型特征。虽然中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫缺失杂合子患者的临床症状较轻, 但当复合 β 地贫时, 患者会出现中度至重度贫血, 临床表型类似于中重型 β 地贫^[3, 11-14]。目前国内商业化的地贫基因试剂盒仅检测 17 种最常见的 β 地贫, 不包括中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 在内的缺失型 β 地贫。因此, 进行血液学分析时, 若红细胞指标提示为小细胞低色素性贫血, 且行常规地贫基因检测为阴性结果, 同时 HbF 有一定程度的升高, 特别是当 HbF > 5% 时, 应考虑缺失型 β 地贫的可能^[13-16]。同理, 当一个家系中出现重型 β 地贫患者, 但用常规方法只能找到一个基因突变时, 或夫妻双方基因型与重型地贫患儿基因结果不符合时, 应考虑缺失突变的可能, 需用合适的方法验证, 并行产前诊断。所以在临床遗传咨询中必须警惕夫妻一方已确诊是 β 地贫基因携带者, 当配偶的地贫筛查中出现 HbF 明显增高, 要采用其他方法进一步排除罕见型地贫。总之, 应注意与

重视罕见型地贫的筛查与诊断, 以避免漏诊或误诊, 从而更好地指导临床诊断。

本研究检测出的患者为中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫且其配偶为 β 地贫者 4 例, 均进行产前诊断, 分别检测出 2 例正常胎儿、1 例 β 地贫携带者及 1 例中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫复合 β 地贫双重杂合子胎儿。其中复合 β 地贫的胎儿常规基因型结果显示遗传规律异常, 提示为中重型地贫患儿。经遗传咨询后, 该例患者选择终止妊娠。比较液相芯片和导流杂交 2 种技术检测中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫复合 β 地贫双重杂合子的结果图发现, 图 1 的杂交膜条 A 中的-28 位点无正常对照, 显示为该位点的纯合突变; 表 1 的胎儿样本结果显示-28 和-29 突变点均为低信号值。分析原因为导流杂交技术设置的-28 和-29 位点共用-28 正常对照点, 而液相芯片技术-28 和-29 2 个突变相邻近, 因存在大片段缺失导致分析软件无法正常判读。因此, 目前国内商业化的试剂盒虽无法检出中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫, 但若与 β 地贫复合存在时, 异常结果可提示需对样本进行加测确诊。从本研究检出 4 例中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫复合 α 地贫双重杂合子中, 发现单独的中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地贫缺失杂合子和其复合 α 地贫基因突变时, 血液学表型特征无明显差异性。

惠州地区是地贫高发区^[4, 17], 特别是针对于罕见 β 地贫的正确诊断, 可为遗传咨询和产前诊断提供更好的依据。本研究数据为该地区地贫的流行病学调查提供了新的佐证, 完善了地贫防控内容, 从而能更有效地避免中重型地贫儿的出生, 提高出生人口素质, 为家庭、社会减轻负担, 同时也提高人们的生活质量。

参考文献

- [1] 徐湘民. 见于中国人的 HPFH 和 $\delta\beta$ -地中海贫血的分子基础[J]. 中华医学遗传学杂志, 1998, 15(5): 315-317.
- [2] Carrocini GC, Ondei LS, Zamaro PJ, et al. Evaluation of HPFH and $\delta\beta$ -thalassemia mutations in a Brazilian group with high HbF levels [J]. Genet Mol Res, 2011, 10(4): 3213-3221.
- [3] 王继成, 秦丹卿, 骆明勇, 等. 中国型 $\alpha\gamma(\delta\beta)^0$ 地中海贫血的基因诊断和临床特征分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(4): 227-230.

(下转第 407 页)

中药对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵的作用研究

王淋荆^{1,2} 曾建明¹ 鲁洋¹ 蓝锴¹ 罗强¹ 林冬玲¹ 张伟铮¹ 陈茶^{1*}

[摘要] 目的 研究中药与常用抗生素的相互作用和对多重耐药铜绿假单胞菌(multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDR-PA)外排泵的作用。方法 采用外排泵抑制剂联合纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)筛选外排泵阳性MDR-PA,并用实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)确认外排泵基因高表达菌株。检测10种常用中药对抗生素的作用和对外排泵阳性MDR-PA外排泵基因表达的影响。结果 从34株MDR-PA中筛选到5株外排泵阳性菌,qPCR法检测到这5株菌外排泵基因的表达水平是野生型铜绿假单胞菌PAO1的2倍或2倍以上($P<0.05$)。黄芩、金银花和夏枯草对环丙沙星有较强的拮抗作用,穿心莲和五倍子对庆大霉素的拮抗作用最强,穿心莲和夏枯草对美罗培南的协同作用最强。穿心莲、金银花、夏枯草和五倍子具有促进外排泵基因表达的作用。结论 中药穿心莲、金银花、夏枯草和五倍子可通过促进外排泵基因的表达拮抗抗生素的抗菌作用,临床抗感染治疗时需谨慎使用。

[关键词] 铜绿假单胞菌;多重耐药;外排泵;穿心莲;金银花;夏枯草;五倍子

Study on the effect of traditional Chinese medicine on efflux pump of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

WANG Linjing^{1,2}, ZENG Jianming¹, LU Yang¹, LAN Kai¹, LUO Qiang¹, LIN Dongling¹, ZHANG Weizheng¹, CHEN Cha^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510006; 2. Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510006)

[ABSTRACT] Objective To study the effect of traditional Chinese medicine on efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* with multiple drug resistance (MDR-PA). Methods Kirby-Bauer (K-B) test and real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) were used to screen positive bacteria of efflux pump in MDR-PA. The effect of 10 kinds of traditional Chinese medicine on the role of antibiotics and the expression of efflux pump genes positive MDR - PA were detected. Results 5 strains of efflux pump positive bacteria were screened from 34 strains of MDR - PA, and the expression level of efflux pump gene was 2 times or more than that of wild type *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0.05$). Scutellaria, honeysuckle and prunella have strong antagonism against ciprofloxacin, andrographis paniculata and gallnut have the strongest antagonism against gentamicin, and andrographolide and prunella have the strongest synergistic effect on meropenem. Andrographis paniculata, flos lonicerae, prunella vulgaris and gallnut chinensis have the function of promoting the gene expression of efflux pump. Conclusions Andrographis paniculata, flos lonicerae, prunella vulgaris and gallnut can antagonize the antibiotic effect by promoting the expression of efflux pump gene, and use caution in clinical anti-infection treatment.

[KEY WORDS] *Pseudomonas aeruginosa*; Multiple - drug resistant; Efflux pump; Andrographis paniculata; Honeysuckle; Prunella vulgans; Gallnut

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212281,2016A020215236);广东省中医院拔尖人才专项(2014KT1491)
作者单位:1.广东省中医院检验医学部,广东,广州 510006

2.广州中医药大学第二临床医学院,广东,广州 510006

*通讯作者:陈茶, E-mail:chencha906@163.com

王淋荆和曾建明为并列第一作者

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是非发酵革兰阴性杆菌,为院内感染的主要病原菌之一^[1]。近年来,由于喹诺酮类和碳青霉烯类等抗生素的广泛应用,临床多重耐药铜绿假单胞菌(multiple - drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDR-PA)的分离率逐年增高,给抗感染治疗带来很大困难^[2-3]。PA产生耐药性的机制复杂,包括抗生素靶位改变、灭活酶产生、生物膜形成和主动外排系统过度表达等^[4-5]。外排系统过表达可将进入细菌体内绝大部分的抗生素外排,介导产生高水平的耐药^[6-7]。而外排泵抑制剂苯丙氨酸-精氨酸-β萘酰胺(phe-arg-β-naphthylamide, PAβN, 即MC-207110)能够有效地抑制外排泵活性^[8],可恢复MDR-PA对于环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)和美罗培南(meropenem, MEM)的敏感性^[9]。

中药是我国传统医药的重要组成部分,现代研究已证实多种中药具有抗菌抑菌的作用^[10]。由于中药的种类繁多,单味中药成分复杂,中药与抗生素的相互作用和机制尚不清楚。本研究从34株临床分离的MDR-PA中筛选出外排泵过表达的菌株,确定其耐药表型。选择10种常用的中药制成水煎液,研究其与常用抗生素的相互作用和对MDR-PA外排泵的作用,为临床抗感染治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 菌株

34株MDR-PA分离自2016年2月至7月间广东省中医院大学城医院门诊及住院患者送检的痰液、尿液和胸腔积液等标本,野生型铜绿假单胞菌PAO1由重庆医科大学附属儿童医院邹琳教授惠赠。

1.2 试剂

外排泵抑制剂PAβN购自美国Sigma公司;CIP 10 μg、MEM 15 μg、庆大霉素(gentamicin, CN) 120 μg、红霉素(erythromycin, E) 5 μg,药敏纸片购自赛默飞世尔科技有限公司;抗生素(CIP、MEM)、LB(lysogeny broth, LB)培养基和水解酪蛋白(muller hinton, M-H)平板均购自上海生物工程股份有限公司;荧光染料SYBR Premix Ex Taq II和逆转录试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 药敏实验

微量肉汤倍比稀释法:分别挑单个菌落接种

入3 mL LB液体培养基,37℃ 200 r/min摇至对数生长期,取100 μL加入96孔板,使每孔菌液为 5×10^4 CFU;采用倍比稀释法将抗生素由256 μg/mL稀释至0.25 μg/mL,取100 μL加入96孔板;37℃孵箱培养18 h,根据2016年美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准判断结果^[11]。

1.4 外排泵表型阳性菌株的筛选

制备添加PAβN(终浓度50 μg/mL)的M-H平板^[12],纸片扩散法(kirby-bauer, K-B)检测34株MDR-PA对CIP、MEM、CN和E药敏纸片的抑菌环直径,以未加PAβN的M-H平板做对照,根据CLSI 2016年标准,结果由耐药变为敏感或中介,判断为外排泵表型阳性菌株。

1.5 qPCR检测所筛选菌株外排泵相关基因表达水平

分别取外排泵表型阳性菌株单个菌落至3 mL LB液体培养基,37℃ 200 r/min增菌至对数生长期。收集1.5 mL菌液离心,加入RNAiso Plus提取RNA,逆转录为cDNA,采用SYBR Green染料法定量检测*Mex-AB*、*Mex-CD*、*Mex-EF*基因表达量,以*rpoD*为内参基因,引物序列见表1。qPCR条件:98℃ 8 min;95℃ 15 s,60℃ 45 s,循环40次。

表1 外排泵基因引物序列
Table 1 The primers of efflux pump gene

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
<i>MexAB</i>	F: CCCTGAAGCTGGAGGACG	202
	R: TGCTGCGGAGCGAGGAT	
<i>MexCD</i>	F: ACCGGCGTCATGCAGGGTTC	164
	R: CTGTTGCGGCGCAGGTGACT	
<i>MexEF</i>	F: GGACCAGCACGAACTTCTTGC	137
	R: CAACGCCAAGGGCGAGTTCACC	
<i>rpoD</i>	F: TAGCTGGAACAGTACGATCGTG	205
	R: TTGTCATCATCGGCGCTG	

1.6 中药制备

黄芩、黄连、黄柏、金银花、夏枯草、五倍子、射干、苍术、穿心莲和鱼腥草均购自康美药业股份有限公司。中药饮片各120 g分别用水煎2次,头煎30 min,二煎20 min。根茎类中药饮片头煎加水840 mL,二煎加水720 mL。花、叶、全草类中药饮

片头煎加水 1 200 mL,二煎加水 960 mL。取 2 次水煎液混合后纱布过滤,60℃旋转蒸发浓缩至 120 mL,即得生药 1 000 mg/mL 的中药水煎液,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,-20℃储存备用^[13]。

1.7 中药对抗生素抑菌作用的影响

将 10 种中药水煎液分别加入 M-H 琼脂内,制成含中药的 M-H 平板(射干、穿心莲、黄连、黄柏、黄芩的低、高浓度分别为 2、20 mg/mL;鱼腥草、金银花、苍术、夏枯草的低、高浓度分别为 1、10 mg/mL;五倍子的低、高浓度分别为 0.2、2 mg/mL),采用 K-B 法检测 PAO1 及外排泵阳性菌株对抗生素纸片 CIP、MEM、CN 和 E 的抑菌环直径,以不加中药水煎液的 M-H 平板为对照,观察抑菌环的变化。

1.8 中药对外排泵基因表达水平的影响

挑取外排泵阳性菌株单个菌落至 3 mL LB 液体培养基内,37℃ 200 r/min 过夜增菌,二次增菌至对数生长期,分别设置空白对照组、CIP 干预组[以各菌株的亚 MIC(minimum inhibitory concentration)浓度处理]、中药干预组(金银花、夏枯草的低、高浓度分别为 10、20 mg/mL;五倍子的浓度为 2 mg/mL)、CIP 和中药联合干预组(提前 1 h 加入各菌株的亚 MIC 浓度 CIP 干预),各组细菌 37℃ 静置培养 2、4 h 后分别收取菌液,qPCR 检测外排泵相关基因表达水平(方法同 1.5)。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 34 株 MDR-PA 药敏试验结果

采用微量肉汤稀释法检测临床分离的 34 株 mRPA 的药敏,根据 2016 年 CLSI 判断标准,34 株 PA 均为 CIP、MEM 耐药株,结果见表 2。

表 2 34 株 MDR-PA 对 CIP 和 MEM 的 MIC 分布情况

Table 2 The MIC distribution of CIP and MEM in 34 strains of MDR-PA

抗生素	MIC (μg/mL)										
	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
CIP	1	12	7	9	3	1	1	0	0	0	0
MEM	0	0	4	13	14	2	1	0	0	0	0

2.2 外排泵表型阳性菌株筛选结果

添加 PAβN(50 μg/mL)后,34 株 MDR-PA 对 CIP、MEM、CN 和 E 的抑菌环直径变大,其中 MEM 的抑制环直径变化范围为 0~23 mm,中位数为 11 mm。对 MEM 由耐药变为敏感的 PA 有 24 株;对 CIP 由耐药变为敏感的 PA 有 7 株,两者交集的菌株有 5 株(PA8、PA11、PA14、PA29 和 PA36),确定为外排泵表型阳性菌株。

2.3 qPCR 检测所筛选菌株外排泵相关基因表达

以 PAO1 为对照,5 株 MDR-PA 中每株菌的外排泵基因 *MexA*、*MexC*、*MexE* 中至少有一个的表达水平是 PAO1 的 2 倍或 2 倍以上,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见图 1。

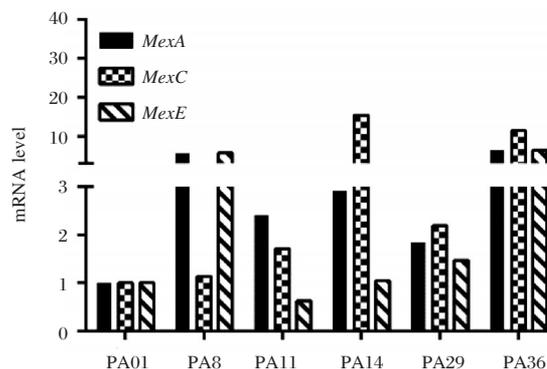


图 1 外排泵阳性菌株外排泵基因表达量

Figure 1 Expression of efflux pump gene in positive strains of efflux pump

2.4 中药对抗生素抑菌作用的影响

通过 K-B 法检测的高浓度中药组(tcm_{high})与低浓度中药组(tcm_{low})所测抑菌环直径差值来判断中药与抗生素的作用关系,如果抑菌环直径差值小于零,提示中药与抗生素的作用为拮抗作用,反之为协同作用。从表 3 中可见,所用的 10 种中药对 CIP 均表现为拮抗作用,其中黄芩、金银花和夏枯草的拮抗作用最强。10 种中药除鱼腥草外均对 CN 表现为拮抗作用,其中穿心莲和五倍子的拮抗作用最强。穿心莲、夏枯草和五倍子对 MEM 具有协同作用,其中穿心莲的协同作用最强。各种中药对 E 几乎没有影响。

进一步分析发现,中药几乎不影响 PA29 的抑菌环直径;五倍子对 PA36、黄芩对 PA11、穿心莲和夏枯草对 PA14、穿心莲和五倍子对 PA8 的抑菌环直径有显著影响,结果见表 4 和图 2。

表3 中药对抗生素抑菌作用的影响(最大值/最小值,mm)

Table 3 Effect of traditional Chinese medicine on bacteriostasis of antibiotics (Maximum/Minimum, mm)

抗生素	苍术	穿心莲	黄柏	黄连	黄芩	金银花	射干	五倍子	夏枯草	鱼腥草
CIP	0/-2	0/-4	0/-4	0/-2	0/-7	0/-5	0/-1	4/-4	1/-5	0/-1
MEM	1/0	5/-2	0/-1	0/-1	1/0	1/-2	1/0	3/-2	4/-1	0/-1
CN	0/-2	0/-6	0/-2	1/-1	0/-2	0/-2	0/-1	3/-6	0/-4	3/0
E	0/0	0/0	1/0	0/0	0/-2	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0

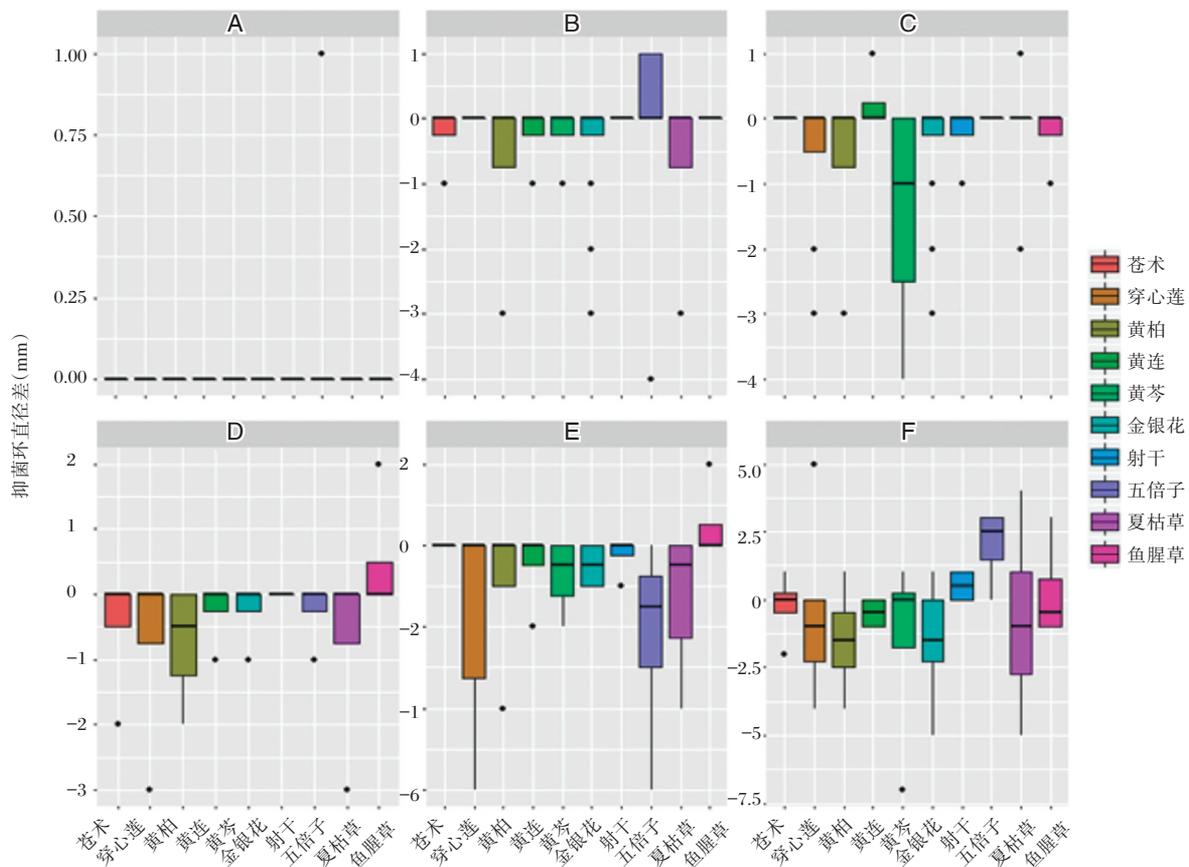
K-B法检测的中药高浓度组(*tcm_{high}*)与中药低浓度组(*tcm_{low}*)所测抑菌环直径差值

表4 MDR-PA对中药与抗生素的反应(最大值/最小值,mm)

Table 4 The reactions of MDR-PA to traditional Chinese medicine and antibiotics (Maximum/Minimum, mm)

菌株	苍术	穿心莲	黄柏	黄连	黄芩	金银花	射干	五倍子	夏枯草	鱼腥草
PA29	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0
PA36	0/-1	0/0	0/-3	0/-1	0/-1	0/-3	0/0	1/-4	0/-3	0/0
PA11	0/0	0/-3	0/-3	1/0	0/-4	0/-3	0/-1	4/0	1/-2	0/-1
PA14	0/-2	0/-3	0/-2	0/-1	NA/NA	0/-1	0/0	0/-1	0/-3	2/0
PA8	0/0	0/-6	0/-4	0/-2	0/-2	0/-1	0/-1	0/-6	0/-4	2/0
PAO1	1/-2	5/-4	1/-4	0/-1	1/-7	1/-5	1/0	3/0	4/-5	3/-1

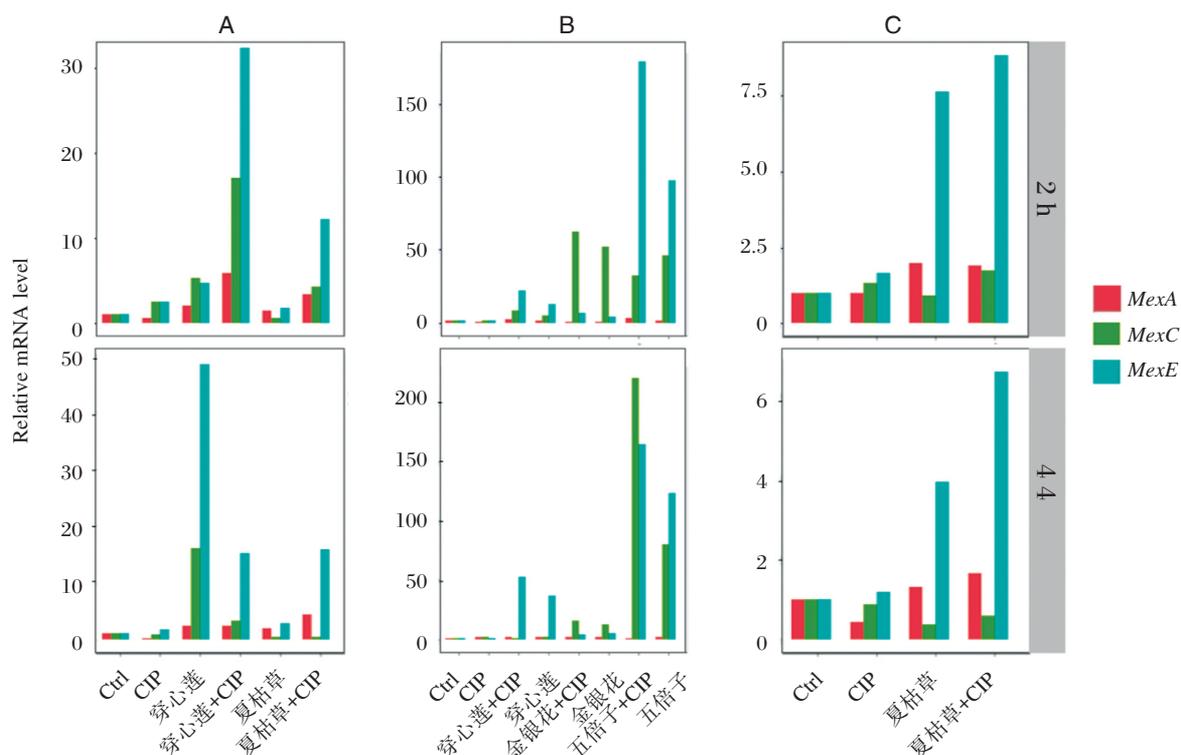
K-B法检测的中药高浓度组(*tcm_{high}*)与中药低浓度组(*tcm_{low}*)所测抑菌环直径差值。NA:未测量



A:PA29; B:PA36; C:PA11; D:PA14; E:PA8; F:PAO1

图2 中药对MDR-PA抑菌环的影响

Figure 2 The inhibition effect of traditional Chinese medicine with antibiotics on MDR-PA strains



A: PA8; B: PA11; C: PA36

图3 qPCR检测中药对外排泵基因表达的影响

Figure 3 The effect of traditional Chinese medicine on efflux pump gene expression by qPCR

2.5 中药对外排泵基因表达的影响

从中药对外排泵阳性菌株抑菌环直径影响较大的处理组中,分别选出中药穿心莲、夏枯草、金银花和五倍子,菌株PA8、PA11和PA36,分组处理后采用qPCR法检测外排泵基因的表达情况。从图3可见,夏枯草、金银花和五倍子均能显著增加MDR-PA外排泵基因的表达。穿心莲处理2 h已能促进PA8的*MexC*和*MexE*的表达,4 h时更明显;在CIP作用下,穿心莲能明显增强*MexC*和*MexE*的表达,4 h时表达水平回落;2 h时,穿心莲主要引起PA11 *MexE*表达增强。夏枯草对PA8的*MexA*、*MexC*和*MexE*表达无明显影响;在CIP作用下,夏枯草处理2 h能显著提高各基因的表达水平,尤其是*MexE* ($P < 0.001$)。对PA36,夏枯草单独或联合CIP的作用相似,主要引起*MexE*表达增高。在干预4 h的情况下五倍子能使PA11外排泵*MexC*、*MexE*基因表达量分别增强123倍和79倍。CIP对各菌株*MexA*、*MexC*和*MexE*的影响不大。空白对照组、CIP处理组、中药处理组、CIP与中药联合处理组间外排泵基因表达量差异有统计

学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

外排泵基因过表达是PA多重耐药的重要机制之一。PA外排泵由3部分组成:①内膜蛋白,如*MexB*、*MexD*、*MexF*、*MexY*,为主要的泵出蛋白,具有识别底物的作用,但不具特异性;②膜融合蛋白或连结蛋白,如*MexA*、*MexC*、*MexE*、*MexX*,连接内、外膜蛋白;③外膜蛋白,如*OprM*、*OprJ*、*OprN*,形成门通道,有利于底物通过外膜。目前研究最多的PA外排泵分子分别是*MexAB-OprM*、*MexCD-OprJ*和*MexEF-OprN*,均属于耐药小结节分裂(resistance-nodulation-division, RND)家族^[5,7]。PAβN是经典的RND型外排泵抑制剂,能够竞争性的与外排泵相应位点结合阻止抗生素外排,使菌株对抗生素的MIC值降低,提高菌株对于抗生素的敏感性。研究发现PAβN能够将多粘菌素敏感的MDR-PA的MIC值降低四倍以上^[15]。根据文献报道的外排泵对应的底物,本实验以CIP筛查*MexEF-oprN*,MEM筛查*MexAB-oprM*,CN筛查

MexXY-OprM, E 筛查 MexCD-oprJ^[14], 采用外排泵抑制剂联合 K-B 法从表型上筛选外排泵阳性 MDR-PA, 用于后续中药对 MDR-PA 外排泵的作用研究。

本研究发现, PA β N 能提高 MDR-PA 对于抗生素的敏感性, 与文献报道一致^[8]。以 CIP 和 MEM 联合 PA β N 从 34 株 MDR-PA 中筛选到 5 株外排泵阳性 MDR-PA。基因水平的研究发现这 5 株菌的 *MexA* 表达均显著高于野生株 PAO1, 并且各菌株还伴有 *MexC* 和/或 *MexE* 基因高表达, 提示外排泵基因高表达是导致 PA 多药耐药的重要机制, 筛选到的 MDR-PA 菌株外排泵基因表型与外排泵表型一致。

中药具有一定的抗菌作用, 但是中药与抗生素的作用和作用机制尚不清楚。本文根据文献^[16-17]和课题组前期结果, 从清热解毒药及收涩药中遴选了 10 味中药, 通过 K-B 法检测的高浓度中药组与低浓度中药组所测抑菌环直径差值来判断中药与抗生素的作用关系, 如果抑菌环直径差值小于零, 提示中药与抗生素的作用为拮抗作用, 反之为协同作用^[18]。实验结果发现中药与抗生素的相互作用主要表现为拮抗作用, 黄芩、金银花和夏枯草对环丙沙星有较强的拮抗作用, 穿心莲和五倍子对庆大霉素的拮抗作用最强(见表 4)。

杨祚明等^[19]发现哌拉西林/他唑巴坦能降低 PA 对 CIP、MEM 等抗生素的 MIC 值, 并能降低 *MexA*、*MexX* 基因的表达水平。而本文发现夏枯草、金银花、五倍子、穿心莲单独或联合 CIP 均能不同程度地促进 MDR-PA 外排泵基因表达, 尤其是 *MexC*、*MexE* 基因表达变化最为显著, 提示中药通过促进外排泵基因表达发挥拮抗抗生素的作用。与抗生素哌拉西林/他唑巴坦降低外排泵基因 *MexA*、*MexX* 表达发挥抗菌作用相比, 中药导致 MDR-PA 外排泵基因表达水平升高, 可能是中药不能抑制 MDR-PA 的原因。

随着中西医结合的深入发展, 中西药联合应用已日趋普遍。一般认为, 中药药性平和, 毒副作用小且不易产生耐药性, 与西药联用可增强疗效。但本实验从表型和基因水平的研究结果表明, 中药穿心莲、金银花、夏枯草和五倍子可通过促进外排泵基因的表达拮抗抗生素的抗菌作用。因此, 盲目联用中药和抗生素, 可能会对抗生素产生拮抗, 降低疗效, 临床抗感染时抗生素与中药的联用需谨慎。

参考文献

- [1] Afolabi OA, Salaudeen AG, Ologe FE, et al. Pattern of bacterial isolates in the middle ear discharge of patients with chronic suppurative otitis media in a tertiary hospital in north central nigeria [J]. Af Health Sci, 2012, 12(3): 362-367.
- [2] Goncalves IR, Dantas RCC, Ferreira ML, et al. Carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa: association with virulence genes and biofilm formation [J]. Braz J Microbiol, 2017, 48(2): 211-217.
- [3] Agnello M, Wong-beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in pseudomonas aeruginosa [J]. Plos One, 2012, 7(8): e42973.
- [4] Heydari S, Eftekhari F. Biofilm formation and β -lactamase production in burn isolates of Pseudomonas aeruginosa [J]. Jundishapur j microbiol, 2015, 8(3): e15514.
- [5] Kiser TH, Obritsch MD, Jung R, et al. Efflux pump contribution to multidrug resistance in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa [J]. Pharmacotherapy, 2010, 30(7): 632-638.
- [6] Tian ZX, Yi XX, Cho A, et al. CpxR activates MexAB-OprM efflux pump expression and enhances antibiotic resistance in both laboratory and clinical nalB-type isolates of pseudomonas aeruginosa [J]. Plos Pathogens, 2016, 12(10): e1005932.
- [7] Aygul A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance [J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2015, 49(2): 278-291.
- [8] Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine - arginine beta - naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria [J]. Plos One, 2013, 8(3): e60666.
- [9] Adabi M, Talebi-taher M, Arbabi L, et al. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in pseudomonas aeruginosa by using an efflux pump inhibitor [J]. Infection & chemotherapy, 2015, 47(2): 98-104.
- [10] Zhou XZ, Jia F, Liu XM, et al. Total alkaloids of sophorea alopecuroides - induced down - regulation of AcrAB - ToLC efflux pump reverses susceptibility to ciprofloxacin in clinical multidrug resistant Escherichia coli isolates [J]. Phytotherapy Research, 2012, 26(11): 1637-1643.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100S. Performance standards for antimicrobial sus-

- ceptibility testing: twenty - sixth edition [M]. CLSI. 2016.
- [12] Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine - arginine beta - naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria[J]. Plos One, 2013, 8(3):e60666.
- [13] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8):1367-1375.
- [14] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, et al. Substrate specificities of MexAB - OprM, MexCD - OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in pseudomonas aeruginosa [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(12):3322-3327.
- [15] Ni WT, Li YJ, Guan J, et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug - resistant Gram - negative bacteria [J]. Antimicrob Agents Ch, 2016, 60(5):3215-3218.
- [16] 蓝锴, 梁文君, 张伟铮, 等. 三种中药对多重耐药铜绿假单胞菌抑菌作用研究[J]. 现代医药卫生, 2014, 23(18):2728-2729
- [17] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2):463-465.
- [18] 林冬玲, 陈茶, 曾建明. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(3):91-95.
- [19] 杨祚明, 谭孟源, 符春花, 等. 哌拉西林他唑巴坦对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(17):1572-1576.

(上接第400页)

- [4] Yin A, Li B, Luo M, et al. The Prevalence and Molecular Spectrum of a-and b-Globin Gene Mutations in 14, 332 Families of Guangdong Province, China [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89855.
- [5] Mann JR, MacNeish AS, Bannister D, et al. Delta-beta-thalassemia in a chinese family[J]. Br J Haematol, 1972, 23(4): 393-402.
- [6] Fornari TA, Lanaro C, Albuquerque DM, et al. Modulation of fetal hemoglobin in hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion type-2, compared to Sicilian δβ-thalassemia, by BCL11A and SOX6-targeting microRNAs[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017, 242(3):267-274.
- [7] Dehury S, Purohit P, Meher S, et al. Compound heterozygous state of β-thalassemia with IVS1-5 (G→C) mutation and Indian deletion - inversion $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ - thalassemia in eastern India[J]. Rev Bras Hematol Hemoter, 2015, 37(3):202-206.
- [8] 朱恒莹, 陈萍. 非缺失型遗传性持续性胎儿血红蛋白综合征复合β地中海贫血的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(19):3268-3270.
- [9] 江帆, 唐盈, 陈桂兰, 等. 广州地区孕前人群地中海贫血基因型分布状况及干预模式探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016(8):7-10.
- [10] 谭建强, 潘莉珍, 陆碧玉, 等. 柳州市中重度地中海贫血患儿出生原因调查[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(1):135-138.
- [11] 韦媛, 林丽, 陈碧艳, 等. 广西地区中国型 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -地中海贫血的发病情况及表型特征[J]. 山东医药, 2016, 56(37):58-60.
- [12] 覃丽波, 陈萍, 陈文强, 等. 广西地区 $\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -珠蛋白生成障碍性贫血的研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(15):1151-1153.
- [13] 杜丽, 秦丹卿, 王继成, 等. 5个家系δβ地中海贫血的家系分析及产前诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(1):27-32.
- [14] Mondal S K, Mandal S. Prevalence of thalassemia and hemoglobinopathy in eastern India: A 10-year high-performance liquid chromatography study of 119, 336 cases [J]. Asian J Transfus Sci, 2016, 10(1): 105-110.
- [15] 林开颜, 张晋, 殷立, 等. 全自动毛细管血红蛋白电泳对育龄夫妇地中海贫血筛查的诊断价值[J]. 中国医药指南, 2016, 14(34):28-29.
- [16] 郑琳, 黄海龙, 范向群, 等. 血细胞和血红蛋白分析在地中海贫血中的应用价值[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(3):547-549.
- [17] 钟泽艳, 陈剑虹, 贺海林, 等. 广东省惠州地区基于医院水平的地中海贫血基因突变谱分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2015, 23(6):371-375.

激素6项化学发光试剂盒性能比较

王小艳¹ 李志雄¹ 董志宁¹ 李明² 吴英松^{2*}

【摘要】目的 对广州市达瑞生物技术股份有限公司与贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司的激素6项化学发光试剂盒进行性能比较,为国产的商品化激素类化学发光法定量测定试剂盒替换进口激素类化学发光法定量测定试剂盒提供依据。**方法** 用国产的和进口的激素6项化学发光试剂盒分别检测最低检测限、精密度、准确度及进行样本比对试验,对样本的检测结果进行相关性和一致性分析。**结果** 国产的促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E2)、孕酮(progesterone, PROG)、催乳素(prolactin, PRL)、睾酮(testosterone, TES)试剂最低检测限均低于或等于进口的相应试剂的最低检测限;国产的激素6项试剂盒的精密度都<8%,进口的激素6项试剂盒精密度都<12%;各项目的线性相关系数 r 均大于或等于0.9,相关性很好。**结论** 国产的激素6项试剂盒与进口的激素6项试剂盒均具有良好相关性 & 较高的一致性,可替代国外昂贵试剂应用于临床检测和基础医学的研究。

【关键词】 化学发光免疫分析; 促卵泡激素; 促黄体生成素; 雌二醇; 孕酮; 催乳素; 睾酮

Comparison of the performance of the 6 hormone CLIA kits

WANG Xiaoyan¹, LI Zhixiong¹, DONG Zhining¹, LI Ming², WU Yingsong^{2*}

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

【ABSTRACT】Objective To compare the performance of the six hormone CLIA kit from Guangzhou Darui Biotechnology Co., Ltd. and Beckman Coulter Commercial Enterprise (China) Co., Ltd, and provide the basis for the domestic commercial hormone chemiluminescence determination reagent kit replacement of the import one. **Methods** The minimum detection limit, precision, accuracy and sample comparison test were detected with domestic and imported hormone CLIA kit, respectively. The correlation and consistency of the test results were analyzed. **Results** The sensitivity of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), progesterone (PROG), prolactin (PRL), and testosterone (TES) reagents of homemade were lower than or equal to the reagents of imported. The precision of the six hormone CLIA kit for the homemade was < 8%, compared to the precision of the six hormone CLIA kit for imported <12%. The linear correlation coefficient r value of each objective were ≥ 0.9 . **Conclusion** The six hormone CLIA kit for homemade has a good correlation and high consistency with the imported kit, can be used to replace the foreign expensive reagents for clinical detection and basic medical research.

【KEY WORDS】 Chemiluminescent immunoassay; Follicle stimulating hormone; Luteinizing hormone; Estradiol; Progesterone; Prolactin; Testosterone

基金项目:广州市科技计划项目(201504291007307)

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, 广东, 广州 510515

*通讯作者:吴英松, E-mail:yingsongwu@hotmail.com

激素的测定对于生殖内分泌功能的诊断具有很高的临床价值^[1-4],可以根据不同生理时期测定的激素值,帮助诊断和指导临床治疗,观察疗效,但人体血液中激素的浓度极低,故准确定量测定人体血液中激素的浓度非常重要。健康人血中促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E2)、孕酮(progesterone, PROG)、催乳素(prolactin, PRL)、睾酮(testosterone, TES)等激素的浓度极低,以往主要采用放射免疫分析或酶联免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定技术。近年来,随着化学发光免疫分析技术(chemiluminescent immunoassay, CLIA)在国内的应用逐渐成熟,已有不少国产的化学发光试剂盒能灵敏、特异、快速和准确地测定血液中各种激素的浓度,无污染,而且还可以做到全自动批量检测^[5-7]。目前,我国大部分医院用进口激素类化学发光法试剂进行定量测定,如罗氏、雅培、西门子、贝克曼等外国公司的试剂盒,价格比较昂贵,患者负担沉重。为了降低国民医疗检测费用,我们需要用国产的商品化激素类化学发光法定量测定试剂盒替换进口激素类化学发光法定量测定试剂盒^[8-10]。因此,本文将国产的激素类化学发光法定量测定试剂与进口激素类化学发光法定量测定试剂进行比较,为国产的商品化激素类化学发光法定量测定试剂盒替换进口激素类化学发光法定量测定试剂盒提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

收集2017年6月5日至2017年6月9日广州达安临床检验中心体检者血清样本125例,其中男性体检者37例,女性体检者88例,年龄范围在19~54岁之间,平均年龄为37.6岁。

1.1.2 试剂盒

广州市达瑞生物技术股份有限公司的促卵泡激素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)、促黄体生成素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)、催乳素定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)、雌二醇定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)、孕酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)、睾酮定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法),以下简称:达瑞生物激素6项试剂盒。

贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司的促卵泡激素测定试剂盒(化学发光法)、促黄体生成素测定试剂盒(化学发光法)、催乳素测定试剂盒(化学发光法)、雌二醇测定试剂盒(化学发光法)、孕酮测定试剂盒(化学发光法)、睾酮测定试剂盒(化学发光法)及其相应试剂盒的校准品,以下简称:贝克曼性激素6项试剂盒。

伯乐质控品:Lyphochek[®] Immunoassay Plus Control(含低、中、高3个不同浓度水平),批号:40320,购自Bio-Rad公司。

激素6项血清质控品:含3个不同浓度水平的血清质控品,批号:201701,购自广州邦德盛生物科技有限公司。

1.1.3 仪器

厦门优迈科医学仪器有限公司的全自动化学发光免疫分析仪;贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司的UniCel Dxi 800 Access免疫分析系统。

1.2 方法

1.2.1 最低检测限试验

参考CLSI EP15-A2^[11]文件,用2个厂家的各项目试剂盒分别对零浓度校准品进行重复测定20次,计算20次检测发光值的平均值(mean, M)和标准差(standard deviation, SD),得出 $M \pm 2SD$ 的结果,根据零浓度校准品及相邻校准品的发光值进行两点回归方程,拟合出一次方程,将 $M \pm 2SD$ 的发光值代入上述方程中,计算各项目的最低检出限。

1.2.2 精密度试验

参考CLSI EP5-A2^[12]文件,用2个厂家的各项目试剂盒分别检测3个不同水平浓度的混合血清质控品,每日3次,连续5天完成评价试验,计算各项目测定结果的M、SD和变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.2.3 准确性试验

参考CLSI EP9-A2^[13]文件,用2个厂家的各项目试剂盒分别检测3个不同水平浓度的企业质控品,每日3次,连续5天完成评价试验,计算各项目测定结果的M与靶值的相对偏差,计算公式为相对偏差=(M-靶值)/靶值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 样本比对试验

每天收集25例新鲜血清样本,用2个厂家的各种试剂盒分别检测,连续5天完成评价试验。以进口试剂盒检测结果为对照测值Y,以国产试剂

盒检测结果为考核测值 X 。对实验数据的初步检查:计算每一样品的两种试剂检测结果的差值以及差值的均值,以差值的均值乘以4为判断限,两种试剂检测样品结果的差值都应在判断限值内。看散点图有无明显离群点,若有应对 X 、 Y 配对值做离群值计算,以4倍的平均差值为判断限,所有差值都不应超出限值,若有超出限值应删除,用新的样本替代。计算线性回归方程,分析国产试剂盒与进口试剂盒的相关性及一致性。

1.2.5 统计处理

利用 SPSS 13.0 统计软件和 Medcalc 软件对样本检测结果分别进行一元直线回归相关性分析及 Bland-Altman 定量分析;用 SPSS 13.0 统计软件对

准确度进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 最低检测限试验结果

根据各项目零浓度校准品和相邻校准品的浓度 RLU 值的结果进行两点回归方程拟合得出一次性方程,将零浓度校准品的 $M \pm 2SD$ 的结果分别代入一次性方程中,得到结果见表1,2个厂家的各试剂盒均在允许范围内,达瑞生物的 FSH、LH、E2、PROG 试剂最低检测限均低于贝克曼的相应试剂的最低检测限,达瑞生物的 PRL、TES 试剂最低检测限均与贝克曼的相应试剂的最低检测限一样。

表1 最低检测限结果

Table 1 The results of lowest detectable limit

项目	达瑞生物				贝克曼			
	M	SD	$M \pm 2SD$ 发光值	最低检测限	M	SD	$M \pm 2SD$ 发光值	最低检测限
FSH(IU/L)	500	316.81	1 133.36	0.009	876	458.2	1 792.4	0.12
LH(IU/L)	562	306.25	1 174.39	0.008	746	522.3	1 790.6	0.17
E2(pg/ml)	2 332 740	89 776.82	2 153 186.66	9.91	1 564 181	98 741.22	1 366 698.56	17.65
PRL(ng/mL)	366	258.41	882.82	0.25	1 145	435.23	2 015.46	0.25
PROG(ng/mL)	1 556 891	78 982.5	1 398 926	0.062	2 004 560	98 758.2	1 807 043.6	0.1
TES(ng/mL)	1 888 974	68 475.5	1 752 023	0.1	1 357 861	68 741.9	1 220 377.2	0.1

2.2 线性范围比较结果

根据达瑞生物及贝克曼激素6项各试剂说明书,得各项目线性范围结果见表2,达瑞生物的 FSH、LH、PRL 试剂线性范围和贝克曼的相应试剂一样,达瑞生物 E2、TES 试剂线性范围小于贝克曼的相应试剂的线性范围。达瑞生物的 PROG 试剂线性范围高于贝克曼的 PROG 试剂。

表2 线性范围

Table 2 The range of linear

项目	线性范围	
	达瑞生物	贝克曼
FSH(IU/L)	0.1~200	0.2~200
LH(IU/L)	0.1~250	0.2~250
PRL(ng/mL)	0.25~200	0.25~200
E2(pg/mL)	20~2000	20~4800
PROG(ng/mL)	0.1~60	0.1~40
TES(ng/mL)	0.1~15	0.1~16

2.3 精密度试验结果

达瑞生物激素6项试剂盒及贝克曼激素6项试剂盒连续5天检测同一份激素6项血清质控品,达瑞生物激素6项试剂盒的精密度都 $<8\%$,贝克曼激素6项试剂盒都 $<12\%$,见表3,均符合各试剂盒说明书要求。

2.4 准确性试验

达瑞生物激素6项试剂盒连续5天平行检测同一份激素混合质控品15次,取其平均值,再与标示值比较,同时进行 t 检验,见表4。达瑞生物试剂及贝克曼试剂对企业质控品检测出来的结果很相近均在允许范围内,且 $P < 0.05$ 。因此2个厂家相对应试剂盒均具有可比性。

2.5 质量控制

经过多次测定伯乐质控品以及反复验证,达瑞生物激素6项得到伯乐质控品范围值见表5,可见达瑞生物激素6项测定得到的伯乐质控品范围值与贝克曼激素6项测定的范围值相近。质量控制

表3 精密度试验的结果($\bar{x}\pm s$)
Table 3 The results of precision ($\bar{x}\pm s$)

	达瑞生物试剂			贝克曼试剂		
	质控品 1	质控品 2	质控品 3	质控品 1	质控品 2	质控品 3
LH 含量(IU/L)	6.99±0.14	30.86±2.37	113.41±49.69	6.79±0.12	31.36±1.67	115.91±6.35
CV(%)	5.33	4.99	6.22	5.08	4.12	6.35
FSH 含量(IU/L)	11.34±0.35	54.55±2.09	91.72±13.06	10.82±0.58	53.71±7.75	94.38±16.54
CV(%)	5.19	2.65	3.94	7.01	5.18	4.31
PRL 含量(ng/mL)	9.94±0.22	28.84±1.12	80.55±14.71	9.74±0.32	30.01±2.16	83.05±17.37
CV(%)	4.68	3.67	4.76	5.82	4.90	5.02
E2 含量(pg/mL)	36.77±8.34	234.64±63.3	683.78±101.7	37.64±6.95	236.31±94.7	688.78±161
CV(%)	7.85	3.39	1.47	7.01	4.11	1.84
TES 含量(ng/mL)	0.89±0.002	4.14±0.03	11.71±0.35	0.89±0.002	4.05±0.08	11.54±0.25
CV(%)	5.23	4.22	5.02	5.18	6.87	4.32
PROG 含量(ng/mL)	1.68±0.008	11.07±0.33	22.31±0.71	1.75±0.03	11.07±0.33	22.39±1.18
CV(%)	5.36	5.20	3.76	8.61	5.21	4.86

表4 准确性试验结果
Table 4 The results of veracity

项目	质控品	标示值	达瑞试剂				
			平均值	相对偏倚(%)	t值	显著性(双尾)	平均差值
LH (IU/L)	质控 1	6.990	6.990	0.00	0.58	0.012	0.072
	质控 2	31.930	30.860	-3.35	3.587	0.013	0.974
	质控 3	123.410	113.410	-8.10	10.561	0.008	6.231
FSH (IU/L)	质控 1	11.340	11.340	0.00	1.524	0.011	0.631
	质控 2	54.210	54.543	0.61	4.231	0.001	6.259
	质控 3	96.960	91.713	-5.41	7.856	0.016	11.964
PRL (ng/mL)	质控 1	9.936	9.936	0.00	0.789	0.021	0.396
	质控 2	29.400	28.843	-1.89	2.871	0.011	2.875
	质控 3	84.798	80.548	-5.01	6.452	0.017	20.466
E2 (pg/mL)	质控 1	38.970	36.772	-5.64	4.867	0.022	1.721
	质控 2	227.240	234.635	3.25	15.478	0.013	10.328
	质控 3	725.530	683.783	-5.75	41.250	0.001	30.095
TES (ng/mL)	质控 1	0.935	0.890	-4.83	0.045	0.031	0.003
	质控 2	4.140	4.138	-0.04	0.347	0.024	0.099
	质控 3	11.755	11.708	-0.40	1.002	0.013	0.208
PROG (ng/mL)	质控 1	1.739	1.682	-3.28	0.124	0.026	0.007
	质控 2	11.094	11.073	-0.19	1.102	0.021	0.322
	质控 3	22.325	22.305	-0.09	2.104	0.016	0.655

符合要求则进行临床性能评价。

2.6 相关性分析

利用 SPSS 13.0 统计软件,以贝克曼试剂盒检

测结果为对照测值,以达瑞生物试剂盒检测结果为考核测值,对 125 例新鲜血清的检测结果进行相关性分析。FSH 相关系数 r 值为 0.990 ($P<0.01$),

表5 伯乐质控品范围

Table 5 The range of quality controls

公司	质控品	LH(IU/L)	FSH(IU/L)	PRL(ng/mL)	E2(pg/mL)	TES(ng/mL)	PROG(ng/mL)
达瑞生物	伯乐质控1	0.781~1.71	7.78~14.4	4.89~7.97	36.3~178.9	0.72~1.21	0.582~0.109
贝克曼		0.827~1.59	8.95~15.1	5.09~8.02	40.1~164	1.02~1.54	0.494~0.866
达瑞生物	伯乐质控2	8.87~17.89	14.5~24.9	12.3~19.4	155~362	3.51~5.22	5.97~9.91
贝克曼		10.9~20.0	15.7~25.7	14.9~21.9	170~359	4.30~6.13	7.18~11.7
达瑞生物	伯乐质控3	37.5~58.9	36.4~59.7	29.4~42.8	337~669	5.24~7.75	22.2~35.6
贝克曼		34.4~55.3	21.9~33.5	32.8~45.1	392~683	6.16~8.86	20.1~32.8

线性回归方程为 $y=1.045x+0.092$; LH 相关系数 r 值为 0.986 ($P<0.01$), 线性回归方程为 $y=0.937x+0.373$; E2 相关系数 r 值为 0.9 ($P<0.01$), 线性回归方程为 $y=0.875x-9.911$; PRL 相关系数 r 值为 0.988 ($P<0.01$), 线性回归方程为 $y=0.910x-0.595$; PROG 相关系数 r 值为 0.904 ($P<0.01$), 线性回归方程为 $y=1.212x+6.428$; TES 相关系数 r 值为 0.918 ($P<0.01$), 线性回归方程为 $y=1.257x-1.10$, 散点图见图 1; 使用双抗体夹心法的 FSH、LH、PRL 试剂盒, 达瑞生物与贝克曼测值相关性很好, 而使用竞争法的 E2、PROG、TES 试剂盒 2 个厂家的相关性略差。

2.7 2 个系统符合性比对

比较 2 系统之间结果偏倚=(进口试剂测值-达瑞生物试剂测值)/进口试剂测值 $\times 100\%$, 计算偏倚在 $\pm 30\%$ 之内的符合率。达瑞生物 FSH、LH、PRL、E2 试剂与贝克曼 FSH、LH、PRL、E2 试剂系统符合率都能达到 80% 以上(表 6), 而 PROG、TES 试剂 2 系统符合率小于 80%, 但比较接近临床比对要求的 80%。

2.8 Bland-Altman 分析

采用 Bland-Altman 统计学方法对各项目 2 组测定结果进行分析, 以达瑞试剂与贝克曼试剂测值的均值为 X 轴, 以两者的差异值为 Y 轴, 结果如图 2。FSH 测定结果 95% 一致性界限 ($X\pm 1.96SD$) 为 $-6.3\sim 10.2$, 94.4% (118/125) 的测值比值在一致性界限内; LH 测定结果 95% 一致性界限 ($X\pm 1.96SD$) 为 $-5.5\sim 6.6$, 94.4% (118/125) 的测值比值在一致性界限内; E2 测定结果 95% 一致性界限 ($X\pm 1.96SD$) 为 $-45.8\sim 28.1$, 96.0% (120/125) 的测值比值在一致性界限内; PRL 测定结果 95% 一致性界限 ($X\pm 1.96SD$) 为 $-8.6\sim 4.5$, 95.2% (119/125) 的测值比

值在一致性界限内; PROG 测定结果 95% 一致性界限 ($X\pm 1.96SD$) 为 $-2.5\sim 1.6$, 97.6% (122/125) 的测值比值在一致性界限内; TES 测定结果 95% 一致性界限 ($X\pm 1.96SD$) 为 $-4.6\sim 2.7$, 95.2% (119/125) 的测值比值在一致性界限内; 2 个厂家的各项目测值结果均具有较高的一致性。

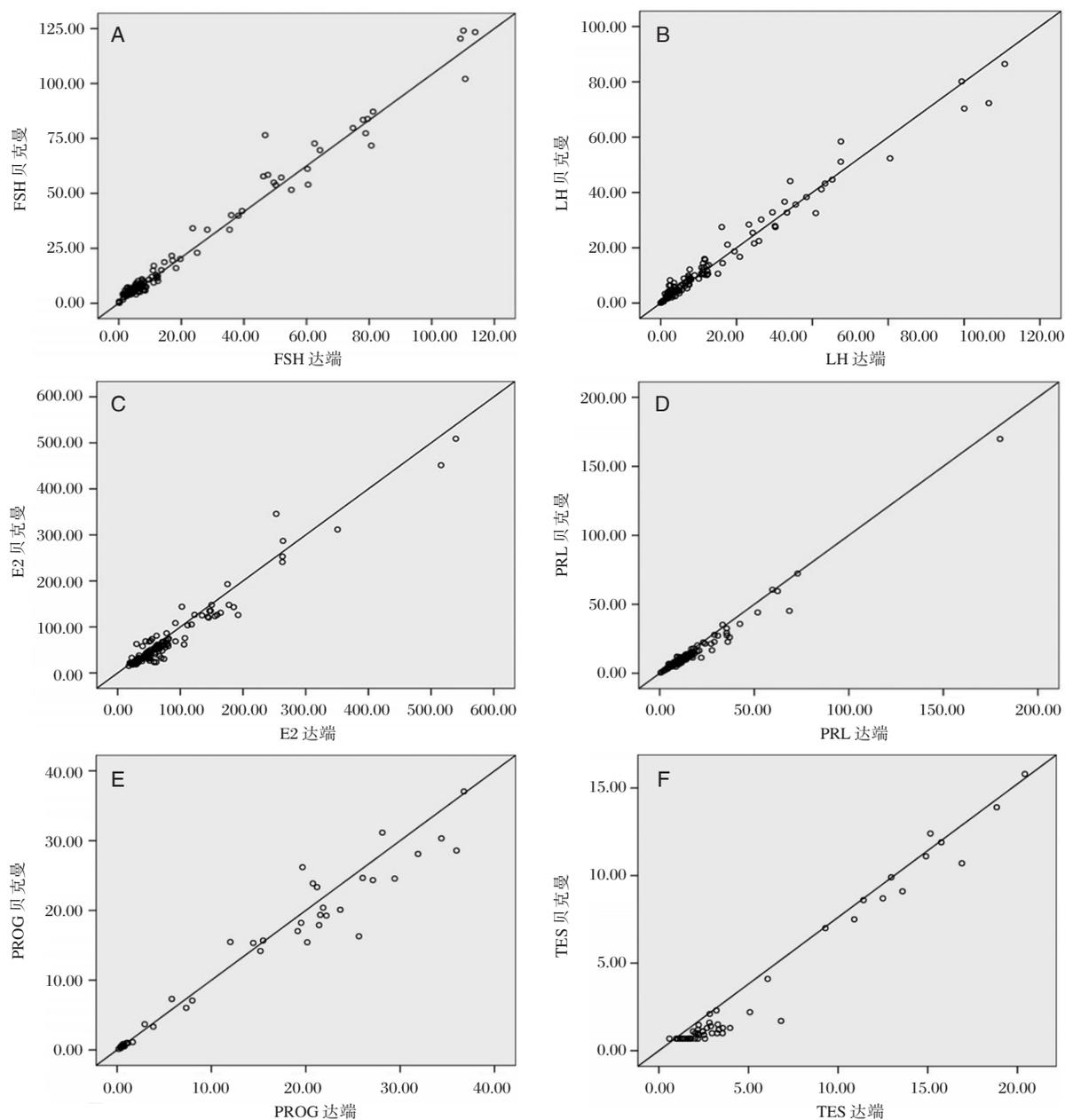
3 讨论

目前国内各大医院认为国产的化学发光仪器及试剂的质量比进口化学发光仪器及试剂差, 因此主要使用进口仪器及试剂, 但进口试剂及仪器价格昂贵, 在基层医疗机构难以普及。故本文对国产试剂达瑞生物激素 6 项与进口试剂贝克曼激素 6 项进行比对。

最低检测限能反映试剂及仪器的检测敏感程度, 精密度体现试剂及仪器重复测定值的一致性^[14-15]。较低的最低检测限和良好的精密度是保证分析系统灵敏性及检测结果准确性的前提。

本研究参考 CLSI EP15-A2 的评价方案检测国产的达瑞生物激素试剂盒和进口贝克曼激素试剂盒的最低检测限, 结果显示国产试剂盒的最低检测限甚至优于进口试剂盒。准确度是大批检测结果的均值与靶值的一致程度, 体现试剂检测结果的准确性, 达瑞生物与贝克曼激素 6 项试剂盒准确性试验结果均符合要求。以上结果表明国产达瑞生物激素试剂盒的性能已达到进口试剂盒水平。

由于激素在人体内自身特性, 现有的市场上各厂家间性激素类体外诊断试剂盒产品差异较大, 包括进口厂家间也是如此。例如根据西门子自身公布的数据^[16], 西门子公司 VDVA Centaur 的两套检测系统 E2、E2-6-III 试剂与罗氏公司 Elec-



A: FSH 血样测值相关性分析散点图; B: LH 血样测值相关性分析散点图; C: E2 血样测值相关性分析散点图; D: PRL 血样测值相关性分析散点图; E: PROG 血样测值相关性分析散点图; F: TES 血样测值相关性分析散点图

图 1 血样测值相关性分析散点图

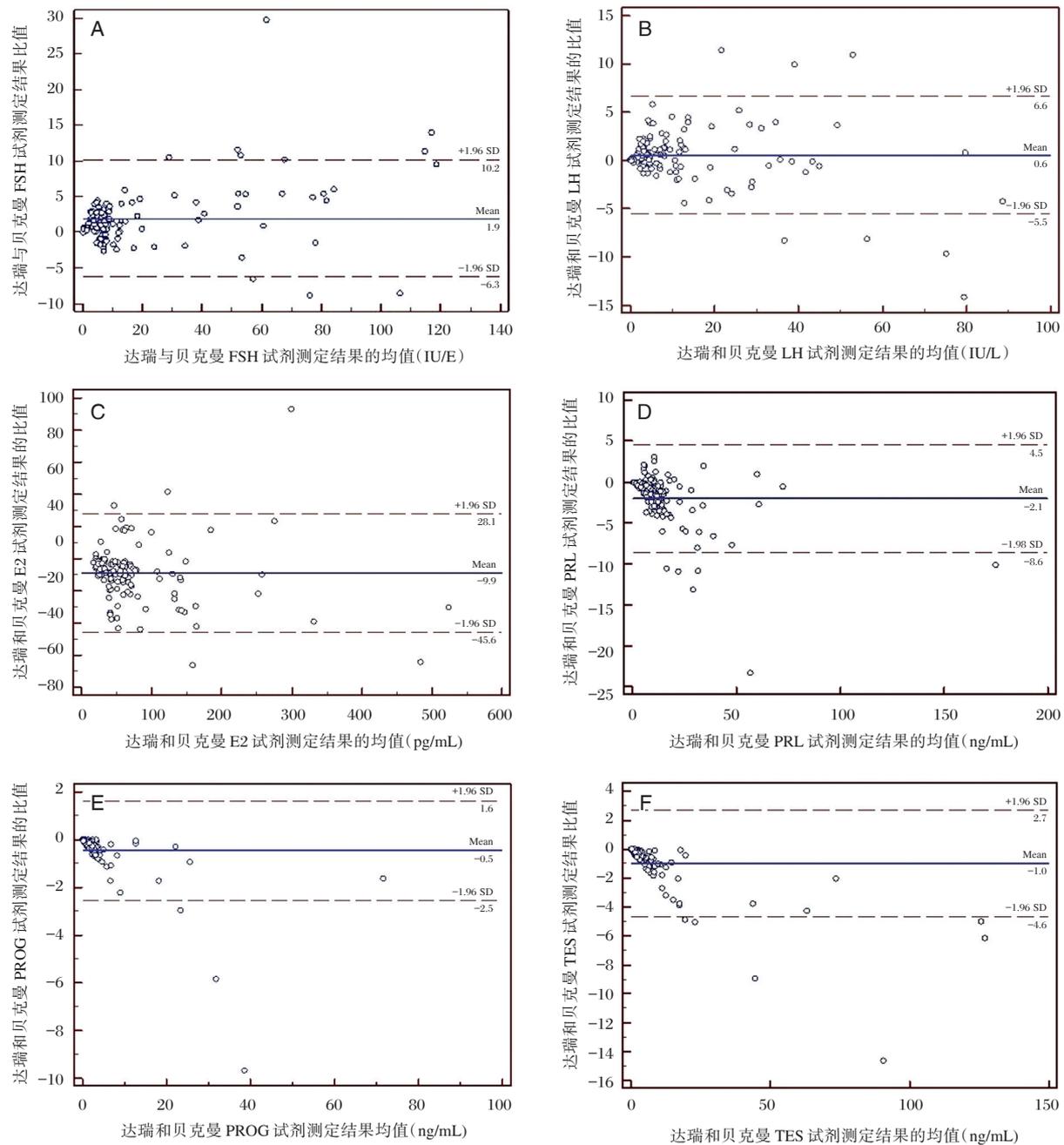
Figure 1 The scatter plot of correlation analysis

表 6 符合率结果

Table 6 The results of agreement rate

项目	检测例数	符合例数	符合率(%)
FSH	125	114	91.2
LH	125	112	89.6
PRL	125	117	93.6
E2	125	108	86.4
PROG	125	99	79.2
TES	125	95	76.0

sys2010 的 E2 试剂相关性比较, E2 和 E2-6-III 与罗氏公司 Elecsys2010 的 E2 的斜率分别为 0.93 和 1.12, 截距分别为 18.85 和 0.72, r 值分别为 0.904 和 0.916, 相对应的 r^2 值分别为 0.817 和 0.839^[16], 但根据另一篇参考文献的报道, 西门子公司 ADVIA Centaur 的 2 套 E2 检测系统以及罗氏公司 Elecsys2010 的 E2 检测系统分别与商业化的 ID-GC/MS 检测系统相比, r 值都能达到 0.99 以上^[17]。况且



A: FSH Bland-Altman 分析图; B: LH Bland-Altman 分析图; C: E2 Bland-Altman 分析图; D: PRL Bland-Altman 分析图; E: PROG Bland-Altman 分析图; F: TES Bland-Altman 分析图

图2 Bland-Altman 分析图

Figure 2 The chart of Bland-Altman analysis

E2、PROG、TES 这些使用竞争法的项目目前无国家甚至国际的标准物质进行溯源,无法达到统一的标准。因此,目前市场上,不同的 E2、PROG、TES 检测系统之间的检测结果普遍存在差异。

虽然不同检测系统之间检测 E2、PROG、TES 结果普遍存在差异,但根据 Yamamoto 等人^[18]用不同检测系统化学发光试剂评价 E2 得到结果为 *r* 值

为 0.831,而本研究中达瑞生物与贝克曼的化学发光试剂检测 E2 的结果为 *r* 值为 0.9,本研究的相关性结果比其还要好,所以达瑞生物 E2 化学发光试剂的性能与贝克曼 E2 化学发光试剂的性能比较接近,达瑞生物 E2 试剂能满足临床检验的要求;同时根据 Schmicke 等人^[19]用 PROG 化学发光试剂盒检测女性不同月经周期 PROG 浓度的评价结

果,本研究中达瑞生物 PROG 试剂盒的灵敏度高、线性范围广、精密度好,这些性能明显能达到要求。

根据 Xiao 和 Wang 等人^[20-21]用 LH 化学发光试剂检测人血清的结果,本研究中达瑞生物 LH 试剂盒可报告范围和贝克曼 LH 试剂盒的报告范围一样,均比其他厂家高,灵敏度及精密度更好。

综上所述,达瑞生物 FSH、LH、PRL 这些采用夹心法的化学发光试剂盒的各方面性能已达到进口产品的性能水平,不同检测系统检测结果普遍存在差异的采用竞争法的 E2、PROG、TES 化学发光试剂盒各方面性能也均能与进口产品的性能接近,均能满足临床检验要求。

参考文献

- [1] 杨志林,徐万华,赵为广. 隐睾患儿血清性激素水平的研究[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(12): 2703-2704.
- [2] 鲍海玲,管敏丽,程鸿. 子宫全切除术对女性生殖激素、性功能及更年期综合症的影响研究[J]. 中国性科学, 2014, 23(3): 24-26.
- [3] 芮燕文,郑彤彤,戴婵娟,等. 女性不孕症患者血清性激素水平的变化及临床意义[J]. 中国性科学, 2015, 24(3): 84-86.
- [4] 黄新海,曾成林,吴华平. 性激素六项检测与优生优育的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(12): 122-123.
- [5] 农天雷. 常用化学发光免疫分析技术及其特点[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(14): 2156-2158.
- [6] 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.
- [7] 王天鹅. 化学发光: 进口替代势不可挡[N]. 健康报, 2017-06-21(7).
- [8] 赵宁,雷勇,贾卫静,等. 小剂量激素治疗对围绝经期女性生活质量和激素水平的影响[J]. 河北医药, 2016, 38(18): 2808-2810.
- [9] 佟文秀,马冬,张艳梅,等. 不同孕期孕妇血清激素水平与妊娠结局的相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(7): 997-1001.
- [10] 邓智标. 血清睾酮/促黄体生成素、促卵泡激素及促黄体生成素水平检测在诊断睾丸生精作用中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(11): 1508-1509, 1512.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 user demonstration of performance for precision and accuracy: approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A2 approved guideline-second edition: evaluation of precision performance of quantitative measurement methods [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP9-A2 approved guideline-second edition: method comparison and bias estimation using patient sample [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [14] 肖倩,张轩,李有强,等. 化学发光分析仪检测激素类项目的测量不确定度评估[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(9): 1532-1535.
- [15] 罗立梅,张彬,陈刚. 化学发光微粒子免疫分析法检测性激素6项的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(9): 1214-1216, 1219.
- [16] Chen Y, Kinney L, Soldin SJ. Performance evaluation of siemens ADVIA centaur enhanced estradiol assay and a split sample comparison with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clinl Biochem, 2012, 45(10-11): 811-815.
- [17] Yang DT, Owen WE, Ramsay CS, et al. Performance characteristics of eight estradiol immunoassays [J]. Am J Clin Pathol, 2004, 122(3): 332-337.
- [18] Yamamoto K, Kohama M, Nakahara F, et al. Cross-reactivity evaluation of improved estradiol (E2) assay reagent based on chemiluminescent enzyme immunoassay [J]. Rinsho Byori, 2014, 62(8): 755-760.
- [19] Schmicke M, Urhausen C, Wolf K, et al. Evaluation of the blood progesterone concentration in the bitch measured by chemiluminescence immunoassay at the day of ovulation [J]. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere, 2016, 44(5): 317-322.
- [20] Xiao Q, Li H, Hu G, et al. Development of a rapid and sensitive magnetic chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of luteinizing hormone in human serum [J]. Clin Biochem, 2009, 42(13-14): 1461-1467.
- [21] Wang C, Liang Z, Guan D, et al. Preliminary establishment of quantitative detection for luteinizing hormone based on superparamagnetic particles labeled immuno chromatography method [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2015, 95(44): 3631-3634.

人乳头状瘤病毒基因分型在宫颈病变中的临床价值

武燕红^{1*} 吴雪溶¹ 吕伟¹ 张欣¹ 郑捷²

【摘要】目的 了解人乳头状瘤病毒(HPV)分型在宫颈病变患者中的分布情况,分析不同型别的HPV感染与宫颈病变的关系。**方法** 回顾2008年7月至2016年5月间,在乌海市妇幼保健院妇科就诊的符合入组条件的1 825例妇女,根据其宫颈活检组织学诊断结果分成3组:正常宫颈组909例;低级别鳞状上皮内病变(LSIL)组668例;高级别鳞状上皮内病变(HSIL)及以上病变组248例。比较3组间HPV感染、亚型分布、多重感染的差异,分析HPV基因分型结果在高级别鳞状上皮内病变及以上病变的作用。**结果** 与正常宫颈组比较,年龄是LSIL、HSIL及以上病变的保护因素,OR值为分别为0.951($P=0.000$)、0.981($P=0.014$)。与LSIL组比较,年龄是HSIL及以上病变患病的危险因素,OR值为1.033($P=0.000$)。HPV感染是HSIL及以上病变患病的危险因素,HSIL及以上病变组与正常宫颈组比较,HPV感染的OR值52.672($P=0.000$),HSIL及以上病变组与LSIL组比较HPV感染的OR值为10.038($P=0.000$)。与正常宫颈组比较,HPV6、HPV11、HPV51是LSIL的危险因素(OR值分别为11.041、7.665、2.590, $P < 0.05$);与LSIL组比较,HPV6、HPV11、HPV51是HSIL及以上病变患病的保护因素(OR值分别为0.083、0.342、0.660, $P < 0.05$)。HPV16、HPV58、HPV31与HSIL及以上病变患病高风险有关(与正常宫颈组比较,OR值分别为26.990、6.135、3.315,与LSIL组比较,OR值分别为7.937、2.264、2.426, $P < 0.05$);除此外,HPV59、HPV33、HPV18也与HSIL及以上病变患病高风险有关(与正常宫颈组比较,OR值分别为3.342、3.178、2.634, $P < 0.05$);此6种亚型除HPV31外均与LSIL的患病高风险有关($P < 0.05$)。**结论** HPV基因分型结果可以预测患HSIL及以上病变的风险,有助于宫颈病变患者的分层管理,具有较高的临床应用价值。

【关键词】 HPV基因分型;宫颈病变;患病风险

The clinical significance of HPV genotyping in cervical lesions

WU Yanhong^{1*}, WU Xuerong¹, LV Wei¹, ZHANG Xin¹, ZHENG Jie²

(1. Department of Laboratory Medicine, Wuhai Maternity and Child Health Care Hospital, Wuhai, Inner Mongolia, China, 016000; 2. Department of Gynecology, Wuhai Maternity and Child Health Care Hospital, Wuhai, Inner Mongolia, China, 016000)

[ABSTRACT] Objective To understand the distribution of HPV subtypes among patients with cervical lesion and investigate the relations between cervical lesion and HPV subtypes involved. **Methods** Patients seeking care in the Wuhai Maternity and Child Health Care Hospital from July 2008 to May 2016 were reviewed. The 1 825 women who met the criteria were grouped by histological diagnosis from cervical biopsy into normal cervix (909 cases); low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) (668 cases); and \geq high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) (248 cases). The three groups were compared on HPV infection, distribution of subtypes and outcome variation among subtypes to describe the clinical significance of HPV genotype in the development of HSIL or above. **Results** The protective effect of age was present in LSIL and \geq HSIL when compared to the normal cervix group, with OR of 0.951 ($P=0.000$) and 0.981 ($P=0.014$),

作者单位:1. 乌海市妇幼保健院检验科,内蒙古,乌海 016000

2. 乌海市妇幼保健院妇科,内蒙古,乌海 016000

*通讯作者:武燕红, E-mail:39947629@qq.com

respectively. But age was a risk factor for the \geq HSIL group when compared to the LSIL group, with OR of 1.033($P=0.000$). HPV infection was a risk factor for \geq HSIL, as the OR was 52.672 ($P=0.000$) between \geq HSIL and the normal cervix group, and 10.038 ($P=0.000$) between \geq HSIL and LSIL group. HPV6, HPV11 and HPV51 were risks factor for LSIL compared to the normal cervix group (OR=11.041, 7.665 and 2.590, respectively, $P<0.05$); but HPV6, HPV11 and HPV51 played protective roles instead for \geq HSIL when \geq HSIL group was compared with LSIL group (OR=0.083, 0.342 and 0.660, $P<0.05$). HPV16, HPV58 and HPV31 were associated with risk of \geq HSIL (OR=26.990, 6.135 and 3.315, respectively, when \geq HSIL was compared with the normal cervix group; and OR=7.937, 2.264 and 2.426 when \geq HSIL was compared with LSIL; $P<0.05$). In addition, HPV59, HPV33 and HPV18 were also associated with risk of \geq HSIL (OR=3.342, 3.178 and 2.634 when \geq HSIL was compared with the normal cervix group, $P<0.05$). All of the six subtypes, except for HPV31, were associated with LSIL ($P<0.05$). **Conclusion** HPV genotyping predicts the risk of \geq HSIL and may benefit clinical care and facilitate risk-based patient management.

[KEY WORDS] HPV genotyping; Cervical lesion; Risk of cervical lesion

宫颈病变系指在宫颈区域发生的各种病变,包括炎症、损伤、肿瘤以及癌前病变、畸形和子宫内膜异位症,是女性最常见的疾患之一。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)(2014)女性生殖系统肿瘤分类,按宫颈病变程度可将其分为:低级别鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL),高级别鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)及子宫颈癌^[1](squamous cervical cancer, SCC)。其中最严重的情况是子宫颈癌。子宫颈癌属于常见的恶性肿瘤,居全球女性发病率的第二位,每年约50万的新发病例^[2]。高危型人乳头状瘤病毒(high-risk human papillomavirus, HR-HPV)持续感染是宫颈癌及癌前病变发生的主要病因^[3-4]。早期诊断便于采取针对性治疗措施,有利于降低宫颈癌的发生率^[5]。国外研究得出结论,基于HPV的筛查方法预防浸润性宫颈癌的效果相当于在细胞学检查方法的基础上提高60%~70%^[6]。本研究回顾性分析1 825例不同级别宫颈病变患者的HPV亚型检测结果,比较各级宫颈病变中HPV感染的差异,探讨HPV亚型在宫颈病变发展中的作用以及意义。

1 资料与方法

1.1 资料来源

选择2008年7月至2016年5月间,在乌海市妇幼保健院妇科就诊乌海及周边的女性患者1 825例。研究对象选择条件:①同时做过HPV分型和宫颈活组织病理检查;②既往无HSIL、子宫颈癌和其他恶性肿瘤史;③无子宫颈手术治疗史,无子宫切除术及盆腔放疗史;④非妊娠期妇女。本

研究经乌海市妇幼保健院伦理委员会审查,符合国家及乌海市妇幼保健院伦理有关规程。

1.2 方法

1.2.1 HPV DNA分型检测

收集子宫颈脱落细胞,采用潮州凯普生物化学有限公司人乳头状瘤病毒(HPV)分型检测试剂盒(PCR+膜杂交法)进行检测,使用博日LITTLE GENIUS基因扩增仪进行PCR扩增,使用凯普快速导流杂交仪进行导流杂交,可检测出世界卫生组织公布的与宫颈癌密切相关的14种高危亚型(HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68)^[7]、还可检测出7种低危亚型(HPV6、HPV11、HPV42、HPV43、HPV44、HPV CP8304、HPV53)。每批实验的阴性及阳性对照质控,并且每个样本的2个质控对照点显色才可报告结果。

1.2.2 活检病理检查

由专职医师使用美国华莱士WALLACH ZOOMSCOPE显微定影式阴道镜全面检查外阴、阴道及子宫颈,取异常部位(包括醋酸白斑区、碘不着色区、异常血管区等)活检组织或多点活检组织,或颈管内膜刮取术(endocervical curettage, ECC)取颈管内膜组织。所有子宫颈活检组织经石蜡包埋、切片,常规HE染色后,由资深病理科医师依据美国阴道镜和子宫颈病理学会推荐标准^[8]做出诊断。组织学诊断分为:正常子宫颈,低级别鳞状上皮内病变(LSIL),高级别鳞状上皮内病变(HSIL)和子宫颈癌(SCC)。

1.3 统计学方法

应用SPSS 19.0统计软件,以组织病理学检查

结果为金标准,将1 825例患者分为3个病理组(等级递增),率的比较采用趋势卡方,组间年龄先进行正态分布检验,服从正态分布则用单因素方差分析比较均值,不服从正态分布可采用非参数检验的K个独立样本秩和检验比较中值。各因素与病理分级相关性分析先采用单因素分析(年龄用spearman相关性分析,计数资料采用非参数的秩和检验),有显著性的,再进行Logistic回归分析(3组等级变量如通过平行性检验用有序Logistic,未通过平行性检验用无序Logistic),以 $P=0.05$ 为检验水准。

2 结果

本研究中符合研究条件的女性共有1 825例,

年龄16~80岁,中值为38岁,99.40%(1 814/1 825)为汉族,居住于乌海市及周边。根据组织学诊断为3组:正常子宫颈组909例;LSIL组668例;HSIL及以上病变组248例(包括219例HSIL及29例子宫颈癌)。

2.1 各病理组HPV感染率及年龄的分布

3个病理组HPV感染率及年龄的分布详见表1。趋势卡方结果表明随着病理级别的增高,HPV感染率有增高的趋势($\chi^2=320.785, P=0.000$)。由于年龄未通过正态性检验($P=0.000$),故使用中值而不使用均值表示年龄的集中趋势。

2.2 各病理组HPV亚型分布

HPV 21种亚型在3个病理组均有检出,其分布详见表2。

表1 年龄、总例数、HPV感染例数及HPV感染率在各病理组的分布

Table 1 Overview of age, case number, HPV-infected case and HPV infection rate among all the groups

组别	年龄范围(岁)	年龄中值(岁)	总例数	HPV感染例数	HPV感染率(%)
正常子宫颈	16~80	41	909	436	47.96
LSIL	16~71	35	668	555	83.08
≥HSIL	18~62	38	248	243	97.98

各组HPV感染率比较用趋势卡方, $\chi^2=320.785, P=0.000$;各组年龄差异比较用K个独立样本秩和检验, $P=0.000$

表2 各病理组HPV基因型的分布[n(%)]

Table 2 Distribution of HPV genotyping among lesion groups [n(%)]

基因型	正常宫颈	LSIL	≥HSIL	合计
HPV16	75(8.25)	138(20.66)	162(65.32)	375(20.55)
HPV58	66(7.26)	101(15.12)	56(22.58)	223(12.22)
HPV52	94(10.34)	90(13.47)	29(11.69)	213(11.67)
HPV31	37(4.07)	34(5.09)	26(10.48)	97(5.32)
HPV33	30(3.30)	42(6.29)	25(10.08)	97(5.32)
HPV18	25(2.75)	51(7.63)	16(6.45)	92(5.04)
HPV39	29(3.19)	37(5.54)	12(4.84)	78(4.27)
HPV66	32(3.52)	39(5.84)	6(2.42)	77(4.22)
HPV68	33(3.63)	33(4.94)	10(4.12)	76(4.16)
HPV56	32(3.52)	33(4.94)	10(4.12)	75(4.11)
HPV51	24(2.64)	40(5.99)	6(2.42)	70(3.84)
HPV59	15(1.65)	31(4.64)	10(4.12)	56(3.07)
HPV35	14(1.54)	9(1.35)	2(0.81)	25(1.37)
HPV45	6(0.66)	10(1.50)	6(2.42)	22(1.21)
HPV6	17(1.87)	100(14.97)	9(3.63)	126(6.90)
HPV11	18(1.98)	74(11.08)	2(0.81)	94(5.15)
CP8304	48(5.28)	53(7.93)	13(5.24)	114(6.25)
HPV53	56(6.16)	46(6.89)	11(4.44)	113(6.19)
HPV42	9(0.99)	18(2.69)	2(0.81)	29(1.59)
HPV44	7(0.77)	13(1.95)	4(1.61)	24(1.32)
HPV43	6(0.66)	3(0.45)	2(0.81)	11(0.60)

有多重感染者,按所感染型别分别计数

2.3 年龄与 HPV 感染及宫颈病变之间的相关性分析

HPV 阳性和 HPV 阴性 2 组年龄未通过正态性检验 ($P < 0.05$), 故 2 组间年龄的差异使用非参数检验中的两独立样本秩和检验, $P=0.001$, 两组间有显著差异。对年龄因素采用二元 Logistic 回归分析, 分析其对 HPV 感染的影响, OR 值为 0.983, $P=0.001$ 。

经单因素分析 3 个病理组间年龄 (spearman 相关性分析)、HPV 感染 (两独立样本秩和检验) 均有显著差异, $P=0.000$ 。对年龄及 HPV 感染 2 个因素采用多项无序 Logistic 回归分析 [病理的 3 个组别虽然是等级变量, 但未通过平行性检验 ($P=0.000$), 所以不能使用有序 Logistic 回归], 分析其对宫颈病变的影响, 结果详见表 3 和表 4。

表 3 年龄因素患 LSIL、HSIL 及以上病变风险分析表
Table 3 Analysis of risks of age in LSIL and \geq HSIL groups

正常宫颈 年龄中值(岁)	LSIL				\geq HSIL						
	中值(岁)	OR 值 ^a	95%CI ^a	P 值 ^a	中值(岁)	OR 值 ^a	95%CI ^a	P 值 ^a	OR 值 ^b	95%CI ^b	P 值 ^b
41	35	0.951	0.940~0.961	0.000	38	0.981	0.967~0.996	0.014	1.033	1.017~1.048	0.000

a 是与正常宫颈组比较, b 是与 LSIL 组比较

2.4 HPV 感染与宫颈病变之间的关系

1 825 例患者 HPV 低危型、HPV 高危与低危型混合、HPV 高危型 3 个组进行非参数检验中的 K 个独立样本秩和检验, $P=0.000$, 组间有显著差异。然后进行多项无序 Logistic 回归分析, 结果详见表 4。

将 HPV 的 21 种亚型分别做两独立样本秩和检验, 有显著性 ($P < 0.05$) 的是以下 9 种: HPV16、HPV58、HPV31、HPV33、HPV18、HPV51、HPV59、HPV11、HPV6。这 9 种分型采用多项无序 Logistic 回归分析, 结果详见表 4。

表 4 HPV 因素患 LSIL、HSIL 及以上病变风险分析表
Table 4 Risk of HPV in LSIL and \geq HSIL groups

危险因素	正常宫颈 [n(%)]	LSIL				\geq HSIL						
		[n(%)]	OR 值 ^a	95%CI ^a	P 值 ^a	[n(%)]	OR 值 ^a	95%CI ^a	P 值 ^a	OR 值 ^b	95%CI ^b	P 值 ^b
HPV 阳性	436(47.96)	555(83.08)	5.247	4.104~6.710	0.000	243(97.98)	52.672	21.518~128.934	0.000	10.038	4.045~24.909	0.000
HPV 低危型	65(7.15)	120(17.96)	7.728	5.365~11.132	0.000	0(0.00)	-	-	-	-	-	-
HPV 高危与低危型混合	87(9.57)	146(21.86)	7.025	5.022~9.825	0.000	36(14.52)	39.145	14.944~102.537	0.000	5.573	2.119~14.658	0.030
HPV 高危型	284(31.24)	289(43.26)	4.260	3.276~5.538	0.000	207(83.47)	68.951	28.057~169.452	0.000	16.188	6.494~40.348	0.000
HPV16	75(8.25)	138(20.66)	3.401	2.472~4.678	0.000	162(65.32)	26.990	18.492~39.392	0.000	7.937	5.602~11.245	0.000
HPV58	66(7.26)	101(15.12)	2.709	1.909~3.846	0.000	56(22.58)	6.135	3.874~9.714	0.000	2.264	1.480~3.465	0.000
HPV31	37(4.07)	34(5.09)	1.367	0.814~2.296	0.238	26(10.48)	3.315	1.754~6.264	0.000	2.426	1.309~4.496	0.005
HPV33	30(3.30)	42(6.29)	1.943	1.149~3.285	0.013	25(10.08)	3.178	1.617~6.247	0.001	1.636	0.883~3.029	0.118
HPV18	25(2.75)	51(7.63)	3.099	1.839~5.221	0.000	16(6.45)	2.634	1.226~5.659	0.013	0.850	0.431~1.675	0.639
HPV51	24(2.64)	40(5.99)	2.590	1.491~4.502	0.001	6(2.42)	0.798	0.291~2.187	0.660	0.308	0.121~0.783	0.013
HPV59	15(1.65)	31(4.64)	3.478	1.800~6.720	0.000	10(4.12)	3.342	1.323~8.446	0.011	0.961	0.425~2.172	0.924
HPV11	18(1.98)	74(11.08)	7.665	4.450~13.203	0.000	2(0.81)	0.477	0.103~2.200	0.342	0.062	0.015~0.266	0.000
HPV6	17(1.87)	100(14.97)	11.041	6.451~18.895	0.000	9(3.63)	2.233	0.900~5.542	0.083	0.202	0.093~0.440	0.000

a 是 LSIL/ \geq HSIL 组与正常宫颈组比较, b 是 \geq HSIL 组与 LSIL 组比较。本表所有统计量均是 HPV 阳性与 HPV 阴性比较的结果

3 讨论

本研究中 HPV 感染的年龄范围为 16~80 (38) 岁, 年龄是 HPV 感染的保护因素 (OR 值为 0.983, $P=0.001$)。与之前的研究^[9]一致, 其研究表明年龄越小 HPV 感染率越高, 随着年龄的增长 HPV 感染率下降。本研究结果表明年轻时易感染 HPV 也易患 LSIL (LSIL 组与正常宫颈组比较, 年龄的 OR 值为 0.951, $P=0.000$)。LSIL 患者随着年龄的增长, 易发展为 HSIL 及以上病变 (HSIL 及以上病变组与 LSIL 组比较, 年龄的 OR 值为 1.033, $P=0.000$)。而未患 LSIL 的人随着年龄的增长, HPV 感染的可能性降低, 患 HSIL 及以上病变可能性也降低 (HSIL 及以上病变组与正常宫颈组比较, OR 值为 0.981, $P=0.014$)。

本研究中 HPV 感染是 LSIL、HSIL 及以上病变的危险因素。HPV 低危型感染只有患 LSIL 的风险 (OR 值为 7.728, $P<0.05$), HSIL 及以上病变组无 HPV 低危型感染。HPV 高危型感染者即可能患 LSIL 也可能患 HSIL 及以上病变 ($P<0.05$), 与正常宫颈组比较, 患 HSIL 及以上病变的风险是未感染者的 68.951 倍 (OR 值为 68.951, $P<0.05$)。与 LSIL 组比较, 高危型感染者患 HSIL 及以上病变的风险是未感染者的 16.188 倍 (OR 值为 16.188, $P<0.05$)。HPV 高危与低危混合感染者患 HSIL 及以上病变的风险值 (OR 值) 均低于高危型感染者。可见只有 HPV 高危型可引起 HSIL 及以上病变, 低危型不仅不会引起 HSIL 及以上病变, 在与高危型混合感染时还会降低高危型致 HSIL 及以上病变的危险性。

本研究中 21 种分型均有检出。其中 HPV16、HPV58、HPV31、HPV33、HPV18、HPV51、HPV59、HPV11、HPV6 这 9 种亚型是 LSIL 及以上病变的影响因素。Discacciati 等^[10]指出子宫颈病变的进展风险与感染的 HPV 型有相关性。本研究中 HPV16、HPV58、HPV31 是 HSIL 及以上病变的危险因素。与正常宫颈组比较, 患 HSIL 及以上病变的 OR 值分别为 26.990、6.135 和 3.315 ($P=0.000$)。与 LSIL 组比较, 患 HSIL 及以上病变的 OR 值分别为 7.937、2.264、2.426 ($P<0.05$)。据此本研究认为 HPV16、HPV58、HPV31 可促进宫颈病变的发展, HPV16 是最危险的亚型。吕秀芳等^[11]也认为 HPV16 与子宫颈病变的进展风险关系更为紧

密。HPV16 和 HPV58 不仅危险性高且在中国分布很广泛, 大部分地区的感染率排在前三位^[9]。本地区 HPV16、HPV58、HPV31 感染率分别为 20.55% (375/1 825)、12.22% (223/1 825)、5.32% (97/1 825), 排第一、第二和第四, 应是本地区需重点防治的 HPV 亚型。

与正常宫颈组比较, HPV59、HPV33、HPV18 是 LSIL 和 HSIL 及以上病变的危险因素 ($P<0.05$); 但与 LSIL 组比较, HPV59、HPV33、HPV18 并不是 HSIL 及以上病变的危险因素 ($P>0.05$)。也就是说感染 HPV59、HPV33、HPV18 患 LSIL 和患 HSIL 及以上病变的可能性差不多, 并没有促进 LSIL 朝 HSIL 及以上病变发展的潜力。本研究中 HPV18 型在 6 种致 HSIL 及以上病变危险亚型中危险性最低。世界卫生组织公布的数据^[7]表明 14 种 HR-HPV 中致癌型 HPV16、HPV18 占 70% 左右。但本研究中 HPV18 的总体感染率较低 (5.04%, 92/1 825), 宫颈癌亚组仅有 2 例 HPV18 型感染, 感染率为 6.90% (2/29)。在王丽^[12]的研究中 HPV18 的整合仅在 CIN I 和宫颈癌组各有 1 例, 整合率很低, 分别为 2.86% 和 2.78%。这可能与地区差异有关。有研究^[13]表明 HPV16、HPV18 和 HPV45 感染在宫颈腺癌中起着关键作用, 其感染率占有所有宫颈腺癌的 90% 以上, 关于 HPV18 的危害性需进一步研究。

与正常宫颈组比较, HPV6、HPV11、HPV51 是 LSIL 的危险因素 ($P<0.05$), HPV6、HPV11 是患 LSIL 风险性最高的亚型, OR 值分别为 11.041、7.665, $P=0.000$ 。与 LSIL 组比较, HPV6、HPV11、HPV51 是 HSIL 及以上病变的保护因素, OR 值分别为 0.202、0.062、0.308, $P<0.05$, 可能因为其可对优势高危型产生竞争性抑制, 从而降低高危型的危险性。HPV51 虽属于高危亚型, 但只能引起 LSIL, 并不能促进病变的发展。

HPV52 在 3 个病理组中虽有较高感染率, 但并不是 LSIL、HSIL 及以上病变的危险因素 ($P>0.05$)。体外实验证实, HPV52 的 E6 和 E7 基因体外转换能力有限, 在宫颈癌中很少能结合到宿主基因而导致无限增值^[14]。本研究中, 29 例宫颈癌患者中仅有 1 例感染了 HPV52, 并且是与 HPV16 混合感染。但在 HSIL 及以上病变组有 6 例单一 HPV52 感染 (CIN II 亚组 4 例, CIN III 亚组 2 例), CIN III 亚组还有 1 例 HPV52 型与 HPV44 混合感

染,可见其危险性依然属于高危型,只是致癌性较弱。

在本研究中 HPV45、HPV56、HPV39、HPV35、HPV68、HPV66、HPV53、HPV CP8304 都不是 LSIL 和 HSIL 及以上病变的影响因素($P > 0.05$)。LSIL、HSIL 及以上病变组 HPV45、HPV56、HPV39 感染率均高于正常宫颈组,差异虽然没有统计学意义,但 HSIL 及以上病变组有 HPV45、HPV56、HPV39 单一感染及其与低危型混合感染,表明这 3 种亚型具有患 HSIL 及以上病变的危险性。HPV68、HPV66 是 WHO 公布的 14 种相关致癌高危 HPV 基因型中的两种^[7],早期的研究认为 CP8304 是高危型,HPV53、HPV66 是中危型,其危险性介于高危型和低危型之间^[15]。2012 年发表的研究认为 HPV53 和 HPV CP8304(81)为低危型^[16],本研究中 HSIL 及以上病变组没有 HPV35、HPV68、HPV66、HPV53、HPV CP8304 单一感染或其与低危型混合感染,HSIL 及以上病变组只检测到这些亚型与本研究中 HSIL 及以上病变的独立危险因素 HPV16、HPV58、HPV31、HPV33、HPV18、HPV59 这 6 种高危亚型混合感染。本研究认为 HPV35、HPV68、HPV66、HPV53、CP8304 不属高危型,并将 HPV53、HPV CP8304 按照低危型统计。

参考文献

- [1] Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, et al. WHO classification of tumours of female reproductive organ[M]. Lyon: IARC Press, 2014:172-6.
- [2] Demir F, kimiloglu E, Igdem AA, et al. High risk HPV in situ hybridization, p16 IN4, and survive in expressions in cervical carcinomas and intraepithelial neoplasms: evaluation of prognostic factors [J]. Eur J Gynecol Oncol, 2014, 35(6): 708-717.
- [3] 许惠惠, 石卫武, 徐玖飞, 等. HPV 基因分型在宫颈癌筛查风险分层管理中的价值[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2016, 30(1):14-18.
- [4] Lee B, Suh DH, Kim K, et al. Utility of human papillomavirus genotyping for triage of patients with atypical squamous cells of undetermined significance by cervical cytology[J]. Anticancer Res, 2015, 35(7): 4197-4202.
- [5] Schmidt D. Precancerous lesions of the cervix. Biomarkers in cytological diagnosis [J]. Pathologie, 2011, 32(6):484-490.
- [6] Ronco G, Dillner J, Elfström KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four european randomised controlled trials [J]. The Lancet, 2014, 383(9916): 524-532.
- [7] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study [J]. Lancet Oncol, 2010, 11: 1048-1056.
- [8] Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of american pathologists and the american society for colposcopy and cervical pathology [J]. Int J Gynecol Pathol, 2013, 32(1): 76-115.
- [9] 武燕红, 吕伟, 郑海燕. 乌海市 3 918 例女性 HPV 基因分型结果的分析[J]. 分子诊断与治疗志, 2016, 8(1):32-36.
- [10] Discacciati MG, da silva ID, Villa LL, et al. Prognostic value of DNA and mRNA E6/E7 of human papillomavirus in the evolution of cervical intraepithelial neoplasia grade 2[J]. Biomark Insights, 2014, 9: 15-22.
- [11] 吕秀芳, 宋晓霞, 贺慧, 等. 常见 HR-HPV 各型在子宫颈组织中致癌能力的评估[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(3):272-277.
- [12] 王丽. 人乳头瘤病毒整合状态与宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的相关性研究[D]. 青岛:青岛大学, 2015.
- [13] Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases[J]. Mod Pathol, 2014, 27(12):1559-1567.
- [14] Ho C M, Chien T Y, Huang S H, et al. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer [J]. Gynecol Oncol, 2006, 102(1):54-60.
- [15] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348(6):518-527.
- [16] Kawana K, Adachi K, Kojima S, et al. Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach [J]. Open virol J, 2012, 6: 264-269.

量子点作为荧光探针的生物应用进展

郭欣欣 尔夏提·图尔荪 韩振玉 李金珠 杨焱 刘天才*

【摘要】 量子点作为一种新型的荧光纳米材料,因其量子效应,宽激发光谱及高摩尔消光系数等优点引起了广泛关注,近年来,随着水溶性量子点制备技术的发展,其生物学应用也愈发广泛。本文简述量子点的结构和特性,及水溶性量子点作为荧光探针在生物成像、体外诊断及其他方面的生物学应用,对磁珠量子点在体外诊断的应用、量子点在快速诊断中的应用、量子点的双标记、量子点在光激化学发光法的初步应用作重点论述。另外本文还对其应用的高通量、自动化、多元化作一展望。

【关键词】 量子点;生物学应用;荧光探针;体外诊断

Progress in application of quantum dots as fluorescent probes

GUO Xinxin, Erxiati·Tuersun, HAN Zhenyu, LI Jinzhu, YANG Yan, LIU Tiancai*

(Institute of Antibody Engineering, School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

【ABSTRACT】 Quantum dots as a new type of fluorescent nano-materials have attracted wide attention because of their quantum effect, wide excitation spectrum and high molar extinction coefficient. In recent years, with the development of the preparative technology of water-soluble quantum dots, quantum dots have been widely used in biomedical researches. Here, the structure features of quantum dots, and biological imaging, vitro diagnostic and other aspects of the biological application in water-soluble quantum dots as the fluorescent probes were reviewed. The application of quantum magnetic beads in vitro diagnostic, quantum dots in the rapid diagnosis, double-tagging and chemiluminescence are also discussed. In addition, the application of high throughput, automation and diversification of quantum dots were evaluated.

【KEY WORDS】 Quantum dots; Biological application; Fluorescent probes; Vitro diagnostic

量子点(quantum dots, QDs)是一种半导体材料,具有独特的荧光发光特性。Chan等^[1]将量子点进行表面功能化应用到细胞成像领域,拉开了量子点在生物学领域应用的序幕。标记免疫学,就是将标记技术和免疫学结合进行分析检测的一门学科,其原理是利用抗原抗体高特异性来检测体内生物活性物质的活性或浓度。随着水溶性量子点制备技术的改进,其作为探针越来越广泛的应用于生物学医学领域特别是免疫学检测。本文就量子点在生物学领域特别是体外诊断方面的应

用作一综述,并对其未来发展趋势进行展望。

1 量子点的结构及特性

半导体量子点是一种由几个原子组成的三维团簇半导体材料,每个维度尺寸均在纳米级,是介于分子和晶体之间的过渡态。目前报道的主要是由 II - VI 族(如 MgS、CdSe、ZnTe、HgSe)和 III - V 族(如 GaAs、InGaAs、InP、InAs)元素组成的均一或核壳结构(如 CdSe/HgS)纳米颗粒。自上世纪 70 年代被首次发现后,就吸引了物理学家、电子工

基金项目:国家自然科学基金(21575058, 81271931);国家高技术研究发展计划("863"计划)(2014AA020904)

作者单位: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:刘天才, E-mail:liutc@smu.edu.cn

程学家以及化学家的注意。随着量子点制备技术的提高,其在生物医学研究中也呈现极大的应用前景^[2-5]。与有机荧光染料相比,量子点具有很多优势,如量子效应、激发光谱宽、发射光谱窄、摩尔消光系数高、抗光漂白性强、不易化学降解、荧光寿命长、发射光的颜色随粒径变化等等,这些光学特性使之可以通过改变激发波长来减少激发光与荧光信号之间的干扰,实现多元分析^[6-8]。量子点所具有的上述优势,在体外诊断、活细胞成像等领域具有广泛的应用价值。

2 生物学领域的应用

2.1 量子点在体外诊断的应用

2.1.1 量子点-磁珠在体外诊断的应用

磁珠,即磁性纳米颗粒,是上世纪50年代研发的一种新型功能材料,主要由铁、钴、镍等过渡金属的氧化物构成,在外加磁场的作用下,磁珠可以快速的与液相分离,具有操作简便、分离效率高、较大的比表面积及良好的物理稳定性等优点^[9-10]。目前,将磁珠高效分离和富集作用与免疫学反应结合,成为近年来发展起来的一项新的免疫学技术-免疫磁珠,并在免疫检测、蛋白纯化等领域得到越来越广泛的应用。

Zhu等^[11]借助磁珠和量子点,以双抗体夹心模式检测人C反应蛋白(C-reactive protein, CRP),磁珠端与抗CRP的单克隆抗体连接,链霉亲和素化的QDs与生物素化的另一配对的单克隆抗体连接,形成免疫复合体,用于捕获血清中游离的CRP。通过检测QDs的荧光信号,来检测血清中CPR浓度。该法CRP最低检测极限为0.5 fmol/L,检出范围在0.01 nmol/L~7 nmol/L。

Sun等^[12]利用磁珠为载体,量子点(QDs)为示踪物,用于检测生物样本中的汞离子残留。利用BSA-DTPA-Hg复合物作为完全抗原免疫BALB/c小鼠得到一株单克隆抗体Hg-mAb。该单克隆抗体与磁珠连接,链霉亲和素化的QDs与生物素化的BSA-IgG结合,构成双抗体模式,来检测生物样品中残留的汞离子。该方法Hg²⁺检出范围在1~1 000 ng/mL,检出时间缩短至30 min,有望用于人体内Hg²⁺的快速检测。

2.1.2 量子点在免疫层析快速诊断中的应用

快速诊断,又称之为即时诊断(point-of-care testing, POCT),是指在病人旁边进行的临床检测,

在采样现场即刻进行分析,省去标本在实验室检验时的复杂程序,快速得到检验结果同时也为患者争取了抢救时间的一类诊断方法^[13-14]。Yang等^[15]的研究中利用免疫层析法(immunochromatography, ICTS)来快速检测人血清中的甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)。该团队基于双抗体夹心模式,用荧光稳定的量子点标记检测抗体,其配对的包被抗体固定在免疫层析试纸条的检测线(T line),用自制的荧光检测仪来检测其荧光强度。该法最低AFP检出量为1 ng/mL,且样品量少,仅需50 μ L,整个过程只需10 min,大大减少其检测时间。这种方法所需样品量少、时间极短,对于其他的肿瘤标志物也具有极好的应用前景。

众所周知,中国是肝炎大国,而乙型肝炎病毒表面抗原是肝硬化、肝癌的主要诱因,低丰度蛋白人乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)等的早期检测具有非常重要的意义。Shen等^[16]利用免疫层析法,将量子点作为信号放大探针,基于夹心模式,检测人血清中的HBsAg。他们用Ren报道的方法制备了量子点QDs并与抗HBsAg的单克隆抗体连接,作为量子点探针QD-mAb^[17]。免疫层析试纸条上检测线(T线)上包被羊抗HBsAg的多克隆抗体G-pAbs,控制线(C线)上包被驴抗鼠的多克隆抗体D-pAbs。人阳性血清样本事先与量子点探针混匀,形成量子点探针-表面抗原复合物即QD-mAb-HBsAg复合物,该复合物可以被试纸条上的T线及C线包被的抗体捕获,2条线均可形成荧光信号;当人血清样本为阴性时,QD探针无法与G-pAbs形成夹心模式,此时仅C线有荧光信号。该法的检测范围在75 pg/mL~75 ng/mL,远比传统的胶体金免疫层析法检测范围宽;所需样本量仅70 μ L,检测时间缩短在15 min以内,这也大大减轻患者创伤;在49名阴性样本中测得假阳性率为0。鉴于以上优势,该法也有望用于其他疾病的蛋白标志物的检测。

2.1.3 量子点的双标记免疫分析

鸟类流感病毒是高致病性的流感病毒,造成国内家禽的严重疾病甚至死亡,引发人类感染甚至死亡。鸟类A型病毒又可分为很多亚型,其中H5、H9亚型为常见的引起人类严重呼吸系统疾病。Wu等^[18]以此为出发点,结合水溶性量子点表面的氨基与相对应亚型鼠源单克隆抗体上的羧基连接作为荧光探针,亚型H5和H9相对应的包被

抗体分别对应检测线1和检测线2,包被的羊抗鼠IgG作为控制线,当样本中存在2种亚型病毒时,则3条带均有荧光;当只存在亚型H5时,则测试线1和控制线有荧光;只存在亚型H9时,测试线2和控制线有荧光;2种都不存在时,只有控制线有荧光。该方法快速简便又灵敏,其H5和H9的检测极限值为0.016 HAU和0.25 HAU (hemagglutinating units)。该法把检测时间控制在15 min以内,且检测极限值低,可以用于病毒的早期诊断,从而有效的预防并阻止病毒的扩散。

2.1.4 量子点在光激化学发光法中的初步应用

光激化学发光法 (luminescent oxygen channeling assay, LOCI) 始于上世纪90年代,是一种均相的免疫分析技术,与传统的非均相免疫分析技术相比,具有灵敏度高、时间分辨能力强、线性范围宽、免洗板、快速简便等优点。该法原理是,反应体系中包括供体微球和受体微球,当2个微球距离小于200 nm时,在680 nm的激发光照射下,供体微球会释放单线态氧,单线态氧将能量传递给受体微球上的酞氰化合物,从而发出荧光^[19]。Zhuang等^[20]利用LOCI这些特性,用溶胀法将量子点包裹在受体微球内,这样接收了能量的酞氰化合物可以再一次将能量传递给量子点,双重的能量传递可以检测到更高的荧光值。这也是首次将LOCI与量子点相结合的报导,这项方法的建立也为未来量子点的应用提供了新的思路。

2.2 量子点的生物成像

2.2.1 量子点的细胞成像

目前,监控生物分子的反应过程的方法很多,其中一种重要的方法是将细胞或组织固定后用荧光探针对靶分子进行标记成像。1998年,Chan等^[1]将用巯基丙酸修饰的水溶性量子点首次用于Hela细胞成像,拉开了量子点在生物成像这一领域应用的序幕。董薇等^[21]用谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 作为稳定剂,在水相中合成了能稳定发射橙色荧光和绿色荧光的2种CdSe/CdS核壳型量子点,并用该量子点与鼠抗人的CD3抗体连接,制备得到CdSe/CdS-CD3复合物。用该复合物作为探针对人血淋巴细胞进行标记和成像,同时以异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的细胞为对照组。结果显示, FITC标记的细胞在20 min后荧光淬灭,而量子点标记的细胞连续激发30 min其荧光信号无衰减。众所周知,量子

点中的镉离子 Cd^{2+} 对细胞或组织会产生不同程度的毒性,因而其临床应用受到较大的限制^[22-23]。Soenen等^[24]为了克服这个问题,制备出无镉离子的量子点, ZnSe/ZnS量子点和InP/ZnS量子点,并探讨其对细胞生存能力、氧化性、细胞形态等的影响。与ZnSe/ZnS量子点相比, InP/ZnS量子点展现了更低的毒性,可以较长时间存在于活细胞中,因此无镉离子的量子点可以相对安全的用于细胞成像。

2.2.2 量子点的活体动物成像

量子点的活体成像的最终目的是进行体内研究及应用,以便未来能够用于临床的诊断及治疗。虽然目前量子点荧光成像应用成熟,但可见光对组织的穿透能力较弱,在实际应用中受到诸多限制。近年来有研究发现,采用红外光可以提高荧光在组织中的穿透能力,并且组织的背景荧光干扰也大大降低^[25]。目前能够用于组织成像的近红外量子点产率都小于10%,但水相合成的CdHgTe/CdS量子点在发射波长790 nm的量子产率可达20%^[26]。Qian等^[26]将该量子点注射到小鼠右腿,通过活体荧光成像系统可以检测到注射的量子点荧光信号,该实验初步证实CdHgTe/CdS量子点作为荧光探针用于活体成像的可行性。

2.3 量子点其他应用

量子点除了上述提到的应用,也可用于刑事侦查的指纹显现等^[27]、检测重金属离子如铅离子和铜离子等^[28]。王玉珍等^[29]制备了含量子点的叶酸靶向诊疗试剂,该试剂可以更好的对宫颈癌细胞进行诊断与治疗,为未来用于临床药物的靶向治疗提供可能。

3 展望

随着制备技术的发展,量子点在生命科学,特别是体外诊断方面的应用愈加广泛。但是如何制备出低毒的、产率高的水溶性量子点也是亟待解决的。前文已经提及量子点具有量子效应,可以制备出不同尺寸的量子点用于多元分析,这也是未来研究的一个重要方向。量子点与其他技术相结合同时检测多种标志物也将推动免疫学检测技术的发展,相信今后量子点的研究方向将更倾向于多元化、自动化、高通量,对各类疾病实现早发现早治疗。

参考文献

- [1] Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. *Science*, 1998, 281(5385):2016-2018.
- [2] 余启钰, 刘春艳. 用于生物标记的半导体量子点研究[J]. *感光科学与光化学*, 2006, 24(5):382-390.
- [3] Wang J, Liu R, Liu B. Cadmium-containing quantum dots: current perspectives on their application as nanomedicine and toxicity concerns [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(11):905-916.
- [4] Andreadou M, Liandris E, Gazouli M, et al. Detection of leishmania-specific DNA and surface antigens using a combination of functionalized magnetic beads and cadmium selenite quantum dots [J]. *J Microbiol Methods*, 2015, 123: 62-67.
- [5] Zhao JY, Chen G, Gu YP, et al. Ultrasmall magnetically engineered Ag₂Se quantum dots for instant efficient labeling and whole-body high-resolution multimodal real-time tracking of cell-derived microvesicles [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(6):1893-1903.
- [6] Shi D, Sadat ME, Dunn AW, et al. Photo-fluorescent and magnetic properties of iron oxide nanoparticles for biomedical applications[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(18): 8209-8232.
- [7] Yang S, Jin X, Zheng J, et al. Study on the synthesis of high performance CdTe/CdS core/shell quantum dots and its application to detect deoxynivalenol in wheat by fluoroimmunoassay [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2011, 69(6):687-692.
- [8] Liu T, Liu B, Zhang H, et al. The fluorescence bioassay platforms on quantum dots nanoparticles[J]. *J Fluoresc*, 2005, 15(5):729-733.
- [9] Ren ZQ, Liu TC, Zhuang SH, et al. Establishment of magnetic microparticles-assisted time-resolved fluoroimmunoassay for determining biomarker models in human serum[J]. *Plos One*, 2015, 10(6):e130481.
- [10] Hou JY, Liu TC, Ren ZQ, et al. Magnetic particle-based time-resolved fluoroimmunoassay for the simultaneous determination of alpha-fetoprotein and the free beta-subunit of human chorionic gonadotropin[J]. *Analyst*, 2013, 138(13):3697-3704.
- [11] Zhu X, Duan D, Publicover NG. Magnetic bead based assay for C-reactive protein using quantum-dot fluorescence labeling and immunoaffinity separation[J]. *Analyst*, 2010, 135(2):381-389.
- [12] Sun H, Wang M, Wang J, et al. Development of magnetic separation and quantum dots labeled immunoassay for the detection of mercury in biological samples [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, 30:37-42.
- [13] Quinn AD, Dixon D, Meenan BJ. Barriers to hospital-based clinical adoption of point-of-care testing (POCT): A systematic narrative review [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 53(1):1-12.
- [14] Buttigieg SC, von Eiff W, Farrugia P, et al. Process optimization in the emergency department by the use of point-of-care-testing (POCT) in life-threatening conditions: comparative best practice examples from Germany and Malta [J]. *Adv Health Care Manag*, 2015, 17:195-219.
- [15] Yang Q, Gong X, Song T, et al. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 30(1):145-150.
- [16] Shen J, Zhou Y, Fu F, et al. Immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen using highly luminescent quantum dot-beads[J]. *Talanta*, 2015, 142:145-149.
- [17] Ren M, Xu H, Huang X, et al. Immunochromatographic assay for ultrasensitive detection of aflatoxin B-1 in maize by highly luminescent quantum dot beads [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(16):14215-14222.
- [18] Wu F, Yuan H, Zhou C, et al. Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 464-470.
- [19] Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(12):5426-5430.
- [20] Zhuang SH, Guo XX, Wu YS, et al. Quantum dot-based luminescent oxygen channeling assay for potential application in homogeneous bioassays [J]. *J Fluoresc*, 2016, 26(1):317-322.
- [21] 董薇. 水溶性 CdSe/ZnS 量子点与丹皮酚、槲皮素的相互作用研究[D]. 开封:河南大学, 2011.
- [22] Qin MY, Yang XQ, Wang K, et al. In vivo cancer targeting and fluorescence-CT dual-mode imaging with nanoprobe based on silver sulfide quantum dots and iodinated oil [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(46):19484-19492.
- [23] Mukherjee A, Shim Y, Myong SJ. Quantum dot as probe for disease diagnosis and monitoring [J]. *Bio-technol J*, 2016, 11(1):31-42.

(下转第 436 页)

长链非编码 RNA 与乳腺癌耐药研究

王月月¹ 杨清玲² 陈昌杰^{2*}

[摘要] 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度超过 200 个核苷酸功能性的 RNA 分子, 本身不具有编码蛋白质的能力, 在表观遗传学水平、转录水平、转录后水平上发挥重要的调控作用。以往研究者们对 lncRNA 与肿瘤发生发展的关系进行了大量的研究。目前, 学者们聚焦于 lncRNA 与肿瘤耐药机制的研究, 本文结合近几年国内外最新报道, 对 lncRNA 诱导乳腺癌耐药机制进行汇总, 旨在为乳腺癌治疗寻找新的靶标和诊疗思路。

[关键词] 长链非编码 RNA; 乳腺癌; 耐药

Study on long non-coding RNA and breast cancer drug resistance

WANG Yueyue¹, YANG Qingling², CHEN Changjie^{2*}

(1. Clinical Testing and Diagnose Experimental Center, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000; 2. Department of Biochemistry & Molecular Biology; Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000)

[ABSTRACT] Long non-coding RNA (lncRNA) is a class of functional RNA molecules with a length of more than 200 nucleotides, which does not have the ability to encode proteins. lncRNA plays an important role in the regulation of epigenetic, transcriptional and post transcriptional levels. Previously, researches have investigated the relationship between lncRNA and tumorigenesis. Recently, most of studies focus on the mechanisms of lncRNA and tumor resistance. In this review, the mechanisms of lncRNA inducing breast cancer resistance were summarized and discussed, in order to find a new target or strategy for the diagnosis and treatment of breast cancer.

[KEY WORDS] Long non-coding RNA; Breast cancer; Drug resistance

癌症是世界范围内导致死亡的最常见原因, 也是我国居民病死率较高的疾病之一。随着医疗水平的不断提升, 人们迫切地希望肿瘤能够被早期发现、早期诊断、早期治疗。但在肿瘤治疗过程当中, 耐药的出现为其医治增添了难度。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 的发现为缓解耐药找到了新的切入点, 它是一类转录本长度超过 200 个核苷酸且自身不具有编码蛋白质功能的 RNA 分子, 在表观遗传学、转录水平与转

录后水平上发挥重要的调控作用^[1]。多种长链非编码 RNA 参与肿瘤生长、浸润、转移、复发和耐药等过程^[2-3]。在本综述中, 我们着重强调长链非编码 RNA 与肿瘤耐药特别是乳腺癌耐药的相关关系及潜在机制, 并讨论其作为诊断、预后标志物和治疗靶标的潜在临床价值。

1 lncRNA 与肿瘤相关研究进展

当今社会肿瘤严重危害着人类的健康, 其发

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重大项目 (KJ2015ZD29, KJ2016SD37); 安徽省自然科学基金 (1508085MH159); 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目 (gxbjZD2016069); 安徽省蚌埠市科技计划项目 (20150309)。

作者单位: 1. 蚌埠医学院临床检验诊断学实验中心, 安徽, 蚌埠 233000

2. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室, 安徽, 蚌埠 233000

*通讯作者: 陈昌杰, E-mail: tochenchangjie@163.com

病率和死亡率逐年上升,人们迫切需要在分子水平上找到肿瘤治疗的新靶点来提高治疗效果,降低发病率和死亡率。lncRNA 由 Okazaki 等人首次在小鼠的 DNA 转录产物中发现,它是一类转录本长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子,其本身不具有开放阅读框架,不能被翻译成相应的蛋白产物,过去被认为是无功能的“转录噪声”^[4-5]。尽管它不是人类转录组件中的重要组成部分,但是其在肿瘤细胞的发生、发展中发挥着重要的调控作用。

Mei 等^[6]研究表明 lncRNA *GAS5* 通过抑制非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 中 miR-23a 的表达而抑制肿瘤的发生。他们注意到 *GAS5* 在 NSCLC 细胞中表达下调且与 miR-23a 的表达呈负相关。荧光素酶报告实验分析表明 *GAS5* 与 miR-23a 直接发生相互作用并反向调控其表达。miR-23a 的过表达明显促进 NSCLC 细胞的增殖和侵袭,而过表达 *GAS5* 则抑制 NSCLC 细胞的增值和侵袭能力并促进肿瘤细胞的凋亡。此外,异体裸鼠成瘤实验进一步证实上调的 *GAS5* 会通过损害裸鼠移植肿瘤细胞的 miR-23a 的表达而抑制其生长。Bao 等人^[7]证明 lncRNA 作为一种潜在的生物标记物可用于预测膀胱移行细胞癌患者的生存期。多因素 COX 回归分析显示 lncRNA 的预后预测能力独立于其他临床变量,提示 *AC005682.5*、*CTD-2231H16.1*、*CTB-92J24.2*、*RP11-727F15.13* 这 4 种 lncRNA 可能参与了膀胱移行细胞癌相关信号通路的调控。Zhao 等人^[8]证明 lncRNA *TUG1* 通过抑制 MCF-7 乳腺癌细胞中的 miR-9 进而促进细胞增殖,下调 *TUG1* 的表达则抑制细胞周期进程,促进细胞凋亡。Zhang 等人^[9]运用基因表达数据分析了 3 种不同时期的神经胶质瘤中 lncRNA *HOTAIR* 在预后和分子亚型方面的作用,以探讨其与肿瘤之间的关系。他们的研究数据阐明 *HOTAIR* 作为一种重要的 lncRNA 分子,参与神经胶质瘤患者的预后,同时也是识别神经胶质瘤亚基的一种生物标记物,在细胞周期进程中发挥着重要的调控作用。此外,*HOTAIR* 过表达也与乳腺癌细胞的转移和侵袭有关^[10],可作为诊断癌症患者生存期的预测因子。这些研究表明 *HOTAIR* 在肿瘤发生的分子机制中占有重要的地位,并且它也可能成为肿瘤治疗的新靶点。目前,尚有许多 lncRNA 可作为新型的生物标记物,

辅助诊断各类癌症,为今后的肿瘤治疗寻找新的靶点提供方向。

此外,沈素朋等人^[11]应用逆转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 甲基化特异性聚合酶链反应等检测 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理前后食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞系以及 ESCC 组织及相应癌旁正常组织中 *XLOC_008370* 的表达情况,结果提示 *XLOC_008370* 基因在 ESCC 组织中的低表达与启动子区甲基化在 ESCC 的发生发展中具有重要作用,且 *XLOC_008370* 启动子区高甲基化可能是导致该基因在 ESCC 组织中表达下降的主要机制之一。梁佳等人^[12]的研究进一步阐明了导致 *XLOC_002319* 基因在 ESCC 中表达下降的表观遗传学机制。*XLOC_002319* 基因在组织中的表达明显低于食管上皮内瘤变及癌旁正常组织,且启动子区甲基化可能是导致该基因在 ESCC 组织中表达下降的重要机制之一。以上研究结果说明 lncRNA *XLOC* 有望在肿瘤的诊断和预后中成为新的分子靶标。

2 lncRNA 与肿瘤耐药相关研究进展

目前,肿瘤治疗的手段主要有外科手术治疗、放疗、化疗、生物疗法等,其中,化学药物治疗一直是肿瘤治疗的重中之重。但是在肿瘤化疗过程中常常产生耐药性。耐药的产生明显降低了化疗的疗效,最终可能导致化疗失败。从非编码基因方向研究肿瘤耐药的形成机制或许将成为攻克肿瘤耐药的一个崭新的突破点。

在胃癌的相关研究中,张哲等^[13-14]通过实时定量聚合酶链式反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT) 法、Western blot 等技术发现 lncRNA *UCA1* 在胃癌耐药细胞表达显著升高,干扰 *UCA1* 表达可明显逆转胃癌耐药,因此 *UCA1* 可作为治疗胃癌耐药的重要分子靶标。随后该课题组筛选了一批在胃癌耐药细胞高表达的 lncRNA 分子,探讨了 *UCA1* 在胃癌细胞中的表达情况及对胃癌多药耐药的影响。通过分析发现 *UCA1* 通过结合 *let-7*,降低了 *let-7* 对耐药相关基因 *HMG2*

的抑制作用,间接导致了 *HMGA2* 表达上升,促进胃癌细胞产生多药耐药的情况。该研究从非编码基因相互作用的角度阐明了 lncRNA 与胃癌耐药的机制,可以此为作用靶点逆转肿瘤耐药。王颖等人^[15]通过高通量 lncRNA 芯片技术首次发现 lncRNA *DMTF1v4* 通过促进细胞膜 P-糖蛋白的表达致使 P-糖蛋白相关化疗药物外排增多从而产生耐药。从转录水平上揭示了胃癌耐药细胞系 P-糖蛋白表达上调的新机制,为逆转胃癌细胞耐药提供了新的靶点。此外在肾癌的相关研究中,曲乐^[16]提出 lncRNA *ARSR* 既可作为治疗肾癌药物舒尼替尼耐药的潜在靶点,也可作为预测肾癌患者对舒尼替尼敏感性的标志物,为肾癌个性化靶向治疗提供了新的思路和视角。在卵巢癌的治疗中,顺铂是其当今主要的化疗药物,杨丽娜等人^[17]研究发现顺铂对细胞的选择压力迫使细胞 lncRNA 表达水平上升,降低了 Bax/bcl-2 的比率,抑制癌细胞凋亡,促进癌细胞存活并诱导顺铂耐药的发生。另一方面,通过 siRNA 降低了 lncRNA 的表达,Bax/bcl-2 比率上调,使得顺铂耐药在一定程度上得到缓解,这种机制为今后逆转顺铂耐药提供了新的解决途径。在神经胶质瘤相关研究中,刘彦廷等人^[18]在裸鼠皮下成瘤动物模型中发现,将 lncRNA *RP11-838N2.4* 过表达的神经胶质瘤细胞接种于裸鼠皮下,其生长速度变缓,瘤体重量变轻。这些结果提示 lncRNA *RP11-838N* 在治疗神经胶质瘤的过程中具有潜在的应用价值。lncRNA *MEG3* 作为一种抑癌基因,在肺腺癌中呈现低表达状态。Liu 等^[19]经过微阵列和 qRT-PCR 等技术分析表明 *MEG3* 过表达启动 P53 和 Bcl-X 诱导的线粒体凋亡途径在体内或体外增强癌细胞对化疗的敏感性,进而抑制癌细胞增值,促进其凋亡。

3 lncRNA 与乳腺癌耐药相关研究进展

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤,发病率和死亡率呈逐年上升的趋势^[20]。获得性耐药是治疗乳腺癌过程中的一大阻碍^[21]。近几年来,长链非编码 RNA 在乳腺癌研究中占据越来越重要的地位,但其与乳腺癌耐药的机制研究尚不完全清楚。以下主要介绍几种与 lncRNA 相关的乳腺癌耐药情况。

3.1 lncRNA 与他莫昔芬耐药

约 70% 雌激素受体阳性的乳腺癌患者对激素疗法敏感,他莫昔芬目前是一种良好的抗雌激素

受体的药物。尽管该药的使用提高了患者的整体生存率,但他莫昔芬耐药的出现使复发率和死亡率逐年上升。Meijer 等人^[22]通过基因功能性筛查发现 lncRNA *BCAR4* 表达上调与雌激素受体阳性乳腺癌发生密切相关。由 *ERBB2/ERBB3* 信号介导^[23]的 lncRNA *BCAR4* 异常表达诱导他莫昔芬耐药,促进乳腺癌细胞生长。Cai 等^[24]人发现下调 lncRNA *CCAT2* 的表达可促进耐他莫昔芬细胞株对他莫昔芬的敏感性,抑制癌细胞增殖,诱导其凋亡,此研究可为临床提供一种新的治疗方法。蔡加琴等人^[25]进一步发现 lncRNA *H19* 在他莫昔芬耐药乳腺癌细胞中高表达,而下调其表达可减弱耐他莫昔芬乳腺癌细胞的侵袭能力,因此 *H19* 将可能成为未来治疗耐他莫昔芬乳腺癌转移的药物靶点。此外,lncRNA *H19* 的高表达与乳腺癌细胞耐紫杉醇密切相关。

3.2 lncRNA 与紫杉醇耐药

紫杉醇是从红豆杉树皮中提取的植物性抗肿瘤药物,通过影响细胞的有丝分裂,导致细胞死亡,对乳腺癌有着较好的治疗效果^[26],是乳腺癌一线化疗药物,但耐药的发生常致使化疗失败。Si 等人^[27]的实验数据表明紫杉醇治疗雌激素受体阳性乳腺癌时,lncRNA *H19* 通过抑制前凋亡基因 *BIK* 和 *NOXA* 的转录而抑制癌细胞凋亡,故 *ER α -H19-BIK* 信号网络在乳腺癌耐药机制中发挥了重要的调控作用。因此,通过改变 *ER α* 而改变 lncRNA *H19* 的水平来调节耐药癌细胞的凋亡这一途径可能作为逆转紫杉醇耐药的切入点。此外,有研究发现^[28]与细胞周期密切相关的 lncRNA *AK124454* 和参与代谢通路的 lncRNA *HIF1A-AS2* 可促进三阴性乳腺癌细胞增殖并可能导致紫杉醇耐药,而 mRNA-lncRNA 调控网络可有望成为治疗三阴性乳腺癌耐药的理想靶点并实现个体化治疗。

3.3 lncRNA 与 5-氟尿嘧啶耐药

5-氟尿嘧啶被广泛用于治疗乳腺癌,但癌细胞通常产生 5-氟尿嘧啶耐药。lncRNA *NEAT1* 作为乳腺癌的不良预后因子,在乳腺癌细胞中通过 miR-129/*ZEB2* 诱发上皮间质转化和 5-氟尿嘧啶耐药^[29]。若下调 lncRNA *NEAT1* 可促进癌细胞对化疗的敏感性,因此它可能成为新型肿瘤诊断标记物和治疗靶点。此外,Redis 等^[30]人研究发现下调 lncRNA *CCAT2* 会降低乳腺癌细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性,但具体的调控机制尚不完全清楚。

4 小结与展望

本文总结了 lncRNA 与肿瘤及肿瘤耐药尤其是乳腺癌耐药发生发展的关系。lncRNA 作为一种潜在的靶标基因,受许多基因表达的调控,影响肿瘤治疗效果引发耐药。随着转录组序列分析技术和生物信息技术的迅速发展,大量 lncRNA 与肿瘤耐药机制相继被发现。当然,lncRNA 的空间结构与功能尚不完全清楚,这就为乳腺癌治疗设计出靶向 lncRNA 分子带来了新的挑战。尽管早期阶段乳腺癌耐药令人束手无策,目前也无大量方法可以彻底解决这一难题,但随着研究者对 lncRNA 调控耐药机制的逐步探索,相信逆转乳腺癌耐药将指日可待。

参考文献

- [1] Wu T, Du Y. LncRNAs: from basic research to medical application [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(3):295-307.
- [2] Zhang E, Yin D, Sun M, et al. P53-regulated long non-coding RNA TUG1 affects cell proliferation in human non-small cell lung cancer, partly through epigenetically regulating HOXB7 expression [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1243.
- [3] Deng H, Zhang J, Shi J, et al. Role of long non-coding RNA in tumor drug resistance [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9):11623-11631.
- [4] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs [J]. *Nature*, 2002, 420(6915):563-573.
- [5] Yarmishyn AA, Kurochkin IV. Long noncoding RNAs: a potential novel class of cancer biomarkers [J]. *Front Genet*, 2015, 6:145.
- [6] Mei Y, Si J, Wang Y, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses tumorigenesis by inhibiting miR-23a expression in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(6):1027-1037.
- [7] Bao Z, Zhang W, Dong D, et al. A potential prognostic lncRNA signature for predicting survival in patients with bladder urothelial carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6):10485-10497.
- [8] Zhao XB, Ren GS. LncRNA Taurine-upregulated gene 1 promotes cell proliferation by inhibiting microRNA-9 in MCF-7 cells [J]. *J Breast Cancer*. 2016, 19(4):349-357.
- [9] Zhang JX, Han L, Bao ZS, et al. HOTAIR, a cell cycle-associated long noncoding RNA and a strong predictor of survival, is preferentially expressed in classical and mesenchymal glioma [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(12):1595-1603.
- [10] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464(7291):1071-1076.
- [11] 沈素朋, 刘胜男, 师雅斌, 等. 长链非编码 RNA XLOC_008370 在食管鳞状细胞癌中的表达和甲基化状态及其与临床病理特征的关系 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(6):754-759.
- [12] 梁佳, 邝钢, 刘胜男, 等. 长链非编码 RNA XLOC_002319 在食管鳞癌中表达及其甲基化状态 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(5):1-7.
- [13] 张哲. 长链非编码 RNA 分子 UCA1 介导胃癌多药耐药的机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [14] 张哲, 郭昊, 董加强, 等. 长链非编码 RNA UCA1 在胃癌多药耐药中的作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2015(15):2811-2814, 2819.
- [15] 王颖. 长链非编码 RNA DMTF1v4(NR_024549)在胃癌多药耐药中的作用及机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- [16] 曲乐. 长链非编码 RNA 在肾癌靶向治疗耐药中的作用及机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [17] 杨丽娜. LncRNA 在卵巢癌耐药细胞株中的筛选及作用机制的初探 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [18] 刘彦廷. 长链非编码 RNA RP11-838N2.4 通过 miR-10a 调控脑胶质瘤替莫唑胺耐药性的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [19] Liu J, Wan L, Lu K, et al. The Long noncoding RNA MEG3 Contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0114586.
- [20] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况 [J]. *中国肿瘤临床*, 2015(13):668-674.
- [21] Ayers D, Vandesompele J. Influence of microRNAs and long non-coding RNAs in cancer Chemoresistance [J]. *Genes*, 2017, 8(3):95.
- [22] Meijer D, van Agthoven T, Bosma PT, et al. Functional screen for genes responsible for tamoxifen resistance in human breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(6):379-386.

(下转第 436 页)

结直肠癌分子分型及其临床意义

周钊¹ 牛洪欣^{2,3,4*}

[摘要] 结直肠癌在临床表现和治疗效果方面存在高度异质性,同样病理类型和临床分期的结直肠癌在疗效和生存期方面存在明显差异。这些特征增加了结直肠癌的治疗难度。但另一方面给结直肠癌的治疗带来希望的是,在分子水平上发现的一些结直肠癌分子亚型使人们能够更深入地了解结直肠癌的异质性,并针对不同分子特征的结直肠癌实施个体化治疗。近年来,微卫星不稳定性已成为评估结直肠癌预后和治疗效果的重要因素。一些分子标记以及 *KRAS* 或 *BRAF* 基因的突变情况(预测抗 EGFR)也已应用于结直肠癌的治疗决策和患者分层。结直肠癌的分子相关研究是结直肠癌研究的重要组成部分,其既可以为结直肠癌的发病机制提供证据,又可以发现和证明新的结直肠癌分子亚型,还可以使研究人员发现影响结直肠癌患者治疗效果和生存期的潜在因素,最重要的是可以发现能应用于临床并指导临床的分子标志物。本文对结直肠癌分子分型研究进展进行综述。

[关键词] 分子异质性;结直肠癌;个体化治疗

The molecular classifications of colorectal cancer and its clinical significance

ZHOU Zhao¹, NIU Hongxin^{2,3,4*}

(1. Teaching and Research Office of Medical Imageology Specialty, Qilu Medical University, Zibo, Shandong, China, 255213; 2. Shandong Medicinal Biotechnology Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong, China, 250001; 3. School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong, China, 250200; 4. Department of Minimally Invasive Surgery, Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong, China, 250031)

[ABSTRACT] Colorectal cancers are highly heterogeneous in clinical manifestation and response to the treatment. Colorectal cancers that share similar pathological style and clinical stage differ in therapeutic effect and survival, which raise the difficulty of the treatment of colorectal cancers. On the other hand, the treatment of colorectal cancer is expected to be found at the molecular level of some of the molecular subtypes of colorectal cancer to enable people to better understand the heterogeneity of colorectal cancer and to carry out individualized treatment for colorectal cancer with different molecular characteristics. In recent years, microsatellite instability has become an important factor in evaluating the prognosis and treatment of colorectal cancer. Certain molecular markers and mutation status such as *KRAS* or *BRAF* (predicting anti-EGFR) has been used in therapeutic strategies and patient classifications. The molecular correlation of colorectal cancer is an important part of colorectal cancer research. It can provide evidence for the pathogenesis of colorectal cancer, discover and prove the new molecular subtypes of colorectal cancer. It can also enable researchers to discover

基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心课题(W2013FZ17)

作者单位:1. 齐鲁医药学院医学影像学专业教研室,淄博,山东 255213

2. 山东省医学科学院山东省医药生物技术研究中心,济南,山东 250001

3. 济南大学、山东省医学科学院医学与生命科学学院,山东,济南 250200

4. 山东省医学科学院附属医院微创外科,山东,济南 250031

*通讯作者:牛洪欣, E-mail: sdblache@126.com

the potential factors affecting the efficacy and survival of colorectal cancer patients. The most important thing is to find molecular markers that can be applied to clinical and guide clinical practice. In this review, the progress of molecular typing of colorectal cancer is discussed.

[KEY WORDS] Molecular heterogeneity; Colorectal cancer; Individualized treatment

肿瘤分子分型是从系统生物学角度,采用现代新型高通量分子分析技术,在DNA、RNA或蛋白质水平根据分子遗传学或分子生物学改变特征对肿瘤进行分类分型。结直肠癌(colorectal cancer, CRC)不是一种疾病,而是一系列高度异质性疾病,即使是临床病理特征相似的结直肠癌,在疗效和生存期方面也会明显不同^[1]。因此有必要用分子诊断为指导的分子分型法取代传统的组织病理分型法。结直肠癌分子分型概念的提出,为探讨结直肠癌的分子异质性和治疗新靶点、评估预后、确定个体化治疗方案提供了新的方向。但目前结直肠癌的分子分型还未形成统一标准,将分子分型概念广泛应用于临床结直肠癌的个体化治疗之中任重道远。本文通过概括结直肠癌的分子分型研究进展,提出研究结直肠癌分子分型对于结直肠癌的个体化治疗具有重要作用:①为结直肠癌的分子异质性提供理论依据;②阐明不同分子亚型结直肠癌的临床和病理特征;③根据结直肠癌不同的临床和病理特征进行个体化治疗;④根据相关分子标记物预测不同分子亚型结直肠癌的疗效和预后。

1 分子分型的概括

1.1 分子分型的发展

目前研究普遍认为,结直肠癌的发生发展主要涉及3条分子通路机制^[2]。70%的结直肠癌为染色体不稳定(chromosomal instability, CIN)型,此型常发生于远端结肠,由染色体的异常聚集和抑癌基因位点杂合性缺失引起,存在原癌基因(如*KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA*)突变。15%的结直肠癌为微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)型,此型常发生于近端结肠,分化差,病理类型为粘液腺癌或髓样癌,由DNA错配修复基因(DNA mismatch repair genes, *DNA MMR*)缺失引起,通常存在瘤内和瘤周淋巴细胞浸润。另外15%~20%为CpG岛表型甲基化(CpG island methylation phenotype, CIMP)型,此型常发生于近端结肠,通常与锯齿状癌前病变和MSI通路相关^[2]。1997年美国国

家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)首次推荐用MSI表达状态将结直肠癌分成3型(MSI-L、MSI-H、MSS)。根据CIMP的状态同样可将结直肠癌分为3型(CIMP-H、CIMP-L、CIMP-0)。在此基础上可根据MSI、CIMP和CIN状态将结直肠癌分为5种类型:MSI、CIMP-only、CIMP+CIN、CIN-only、三阴型^[3]。此方法将MSI、CIMP和CIN状态共同确立为结直肠癌的分子分型依据,具有广泛的应用前景。

结直肠癌是一种多基因病,在结直肠癌的发生、发展过程中,有一系列遗传改变贯穿始终。基因突变状态无疑会对结直肠癌的分子分型产生影响。现已发现对结直肠癌的个体化治疗有明确指导意义的基因有*KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA*、*HER2*^[4]和*APC*^[5]。2007年,Jass^[6]将结直肠癌分为5型:1型(MSI-H、CIMP-H、*BRAF*突变阳性,*KRAS*突变阴性);2型(MSS/MSI-L、CIMP-H、*BRAF*突变阳性,*KRAS*突变阴性);3型(MSS/MSI-L、CIMP-0、*BRAF*突变阴性、*KRAS*突变阳性);4型(MSS/MSI-L、CIMP-0、*BRAF*和*KRAS*突变阴性);5型(MSI-H、CIMP-0、*BRAF*和*KRAS*突变阴性)。此方法将*KRAS*、*BRAF*和*TP53*基因突变状态加入分型方法之中,具有一定的优越性。2013年,一种新方法将结直肠癌分为6种亚型:C1型即CIN免疫下调型;C2型即错配修复基因缺失型;C3型即*KRAS*基因突变型;C4型即肿瘤干细胞型;C5型即CIN Wnt信号上调型;C6型即CIN正常型^[7]。此方法不仅综合考虑了CIN、MSI和CIMP对分型的影响,还将基因表达标记和信号通路状况确立为结直肠癌分型的重要依据。2014年,我国应用聚类算法将结直肠癌分成BCC-I、BCC-II、BCC-III和BCC-IV 4种亚型,各亚型预后不同^[8]。

多项研究提出根据基因表型对结直肠癌进行分子分型的方法。研究发现根据基因表型可将结直肠癌分为5种亚型,即表面隐窝样、低隐窝样、高CIMP样、间质样、混和型^[9]。这5种类型的结直肠癌具有遗传、临床、预后的异质性,有利于判断结直肠癌的生物学特性并指导个体化治疗、预后评

估。根据基因表型和临床病理特征也可将结直肠癌分为3型(表1):CCS1-CIN、CCS2-MSI和CCS3-锯齿状^[10]。Sadanandam等^[11]将结直肠癌分为5型(表2):1型干细胞型、2型移行扩增型,3型杯状细胞型、4型肠上皮细胞型、5型炎症型,移行扩增型根据对西妥昔单抗治疗效果的不同细分为CR-TA和CS-TA 2种类型。因为移行扩增型和肠上皮细胞型是CCS1-CIN的亚型,杯状细胞型和炎症型是CCS2-MSI的亚型,干细胞型是CCS3-锯齿状的亚型,所以此种方法是前一种方法的重要补充^[12]。2015年,一种新的方法根据MSI、KRAS、BRAF的状态和MLHI甲基化状态将Ⅲ期结直肠癌分为5种类型^[13]。3种为MMR健全型(proficient MMR, pMMR):①pMMR, KRAS和BRAF野生型;②pMMR、KRAS突变型, BRAF野生型;③pMMR, BRAF突变型, KRAS野生型。2种为MMR缺失型(deficient MMR, dMMR):①散发型(dMMR、BRAF突变型, MLHI超甲基化);②遗传型(dMMR、BRAF野生型,无MLHI超甲基化)。此方法将MLHI甲基化

状态确立为结直肠癌分型的依据之一,对于区分MMR缺失型具有一定意义。然而,基因表型不一定能完全预测蛋白质的表达状况,因此还可根据蛋白质组学的不同将结直肠癌分为5种亚型^[14]。最近,Guinney等^[15]提出统一分子亚型(consensus molecular subtypes, CMS)分型法为目前为止最好的结直肠癌分型法,此方法根据MSI状态、CIMP状态、基因突变状态、信号通路状态等因素将结直肠癌分为CMS1、CMS2、CMS3、CMS4和混合型5种亚型,每型都有不同的分子生物学特点,预后也不尽相同。以上各种分类方法既有区别又有联系,后人在前人的基础上不断完善和补充,但未形成统一分类标准。

表1 De Sousa E分类法
Table 1 De Sousa E classification

分型	CCS1	CCS2	CCS3
DFS	长	中等	短
Wnt信号	高	低	低

表2 MeloSadanandam分类法
Table 2 MeloSadanandam classification

分型	Stem-like	TA		Goblet-like	Enterocyte	Inflammatory
		CR-TA	CS-TA			
DFS	短	短	长	长	中等	中等
Wnt信号	高	高	低	低	未知	未知

TA:transit-amplifying,移行扩增型;CR-TA:cetuximab-resistant TA,西妥昔单抗抵抗型TA;CS-TA:cetuximab-sensitive TA,西妥昔单抗敏感型TA;DFS:disease-free survival,无进展生存期

1.2 分子分型的基因临床特征

结直肠癌的不同CIMP分型之间具有不同的基因临床特征:CIMP-H型具有高BRAF V600E突变率及低TP53突变率^[16];CIMP-L型KRAS突变阳性;CIMP-0型KRAS和BRAF为野生型^[17-18, 24]。尽管CIMP与TP53突变的反相关关系是恒定的,但CIMP与KRAS突变的关系还不确定,有的研究显示CIMP与KRAS突变呈正相关^[19-20],有的显示呈负相关^[21-22]。所以目前还不能根据CIMP的状态推测KRAS的突变状态。

MSI-H、CIMP-H型通常表现为MLHI甲基化、BRAF突变率高、KRAS突变率低^[23]、CIN阴性、TP53野生型、p21(CDKN1A)表达正常、核p27(CDKN1B)缺失、脂肪酸合酶过度表达;MSI-H、CIMP-L/0型通常表现为KRAS突变、TP53野生型、

CIN阴性、脂肪酸合酶过度表达;MSS/MSI-L、CIMP-H型通常表现为BRAF突变、TP53野生型、CIN阴性;MSI-L、CIMP-L型具有较高的MGMT甲基化率和KRAS突变率;MSS、CIMP-L型通常存在KRAS突变,CIN阴性;MSI-L/MSS、CIMP-0型结直肠癌与CIN有关,KRAS和BRAF为野生型^[25]。

Marisa等^[7]的分型方法显示,C1型表现为MSS、CIMP-0、高频CIN、BRAF野生型、KRAS和TP53突变频率中等;C2型表现为MSI-H、CIMP-H、中频CIN、BRAF、KRAS、TP53突变频率中等,Wnt信号下调;C3型表现为MSS、CIMP-H、中频CIN、BRAF野生型、KRAS突变频率高、TP53突变频率中等;C4型表现为MSS、CIMP-H、中频CIN、BRAF、KRAS、TP53突变频率中等;C5型表现为MSS、CIMP-0、高频CIN、BRAF野生型、KRAS和

TP53 突变频率中等, Wnt 信号激活; C6 型表现为 MSS、CIMP-0、高频 CIN、*BRAF* 野生型、*KRAS* 和 *TP53* 突变频率中等。

另一种分型方法显示, A 型, 即表面腺窝型, 通常存在 *KRAS* 突变; B 型: 即低腺窝型, 通常 MSI 低表达且 *BRAF* 无突变; C 型, 即 CIMP 高表达型, 通常存在 MSI 高表达和 *BRAF* 突变; D 型, 即间叶细胞型, 通常存在 *BRAF* 突变; E 型, 即混合型, 通常存在 *TP53* 突变、MSI 低表达且无 *BRAF* 突变^[9]。

还有研究发现, CCS1 型表现为高度 CIN、*KRAS* 和 *TP53* 突变、Wnt 信号激活; CCS2 型表现为 MSI-H、CIMP-H、*BRAF* 突变、Wnt 信号正常; CCS3 表现为 MSI、CIN、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变、Wnt 信号正常^[26]。

最近 Guinney 等^[15] 研究发现, CMS1 型表现为 *dMMR*、CIMP-H、*BRAF* 突变; CMS2 型存在高度体细胞拷贝数改变 (somatic copy number alterations, SCNA)、*pMMR*、*TP53* 突变、Wnt 和 MYC 信号激活; CMS3 型表现为混合型 MSI、CIMP-L、SCNA-L、*KRAS* 突变、*PIK3CA* 突变和代谢失调; MCS4 型存在高度 SCNA 和转化生长因子 β (transfer growth factor- β , TGF- β) 异常激活。

2 结直肠癌的分子分型及临床病理特征

MSI-H 型结直肠癌具有独特的临床病理特征, 由错配修复基因缺陷、多种遗传和表观遗传学改变导致, 具有好发于近端结肠、肿瘤进展期短、产生细胞外黏蛋白、髓状、分化差、淋巴细胞浸润、Crohn 样淋巴反应、*BRAF V600E* 突变等特点。MSI-L 和 MSS 型结直肠癌是否具有独特的临床病理特征还存在争议。但 MSI-L 与 *MGMT* 基因甲基化和缺失显著相关^[25]。

结直肠癌的不同 CIMP 分型之间也具有不同的临床病理特征。CIMP-H 多发生于老年女性的结肠近端, 分化差, MSI-H, 具有髓样癌及印戒细胞癌成分^[24], 国内研究发现 CIMP-H 分化程度高, 粘液腺癌比例高, 预后较差^[16]。CIMP-L 好发于男性, CIMP-0 的发生无性别差异, 好发于结肠远端。通过进一步研究发现, MSI-H、CIMP-H 型通常分化差, 存在淋巴细胞反应, 病理类型多为粘液腺癌和/或印戒细胞癌, 临床上此类型通常认为是预后好、好发于老年女性、好发于近端结肠的散发型 MSI-H 结直肠癌^[27]。MSI-H、CIMP-L/0 型好发于近端结肠, 分化较好, 存在淋巴细胞反应, 病

理类型为粘液腺癌。MSS/MSI-L、CIMP-H 型通常分化差、病理类型多为印戒细胞癌, 通常预后差, 好发于老年女性和近端结肠。MSS、CIMP-L 型好发于男性, 而 MSI-L/MSS、CIMP-0 型男女患病率相同^[25]。

3 结直肠癌的分子分型及临床意义

3.1 结直肠癌的分子分型与预后

尽管 MSI-H 型结直肠癌对 5-FU 为主的辅助化疗不敏感, 但在 II 期结直肠癌患者中, MSI-H 型的总生存期和无进展生存期较 MSS 型明显延长, 在 *KRAS* 和 *BRAF* 突变型患者中更加明显^[28]。与 MSS 相比, MSI-L 在 C 期结肠癌患者中生存期更短^[29]。有研究显示, 与 4 型 (CIMP-0、MSS-L/MSS、*BRAF* 和 *KRAS* 突变阴性) 相比, 2 型 (CIMP-H、MSI-L/MSS、*BRAF* 突变阳性, *KRAS* 突变阴性) 的疾病特异性死亡率最高, 3 型 (CIMP-0、MSS/MSI-L、*BRAF* 突变阴性, *KRAS* 突变阳性) 也有较高的疾病特异性死亡率, 1 型 (CIMP-0、MSI-H、*BRAF* 突变阳性, *KRAS* 突变阴性) 次之, 5 型 (CIMP-0、MSI-H、*BRAF* 和 *KRAS* 突变阴性) 的疾病特异性死亡率最低, 整体死亡率同样呈现上述特点^[30]。CIMP-H、*BRAF V600E* 突变、MSI-L、MSS 为影响患者死亡率的不利因素^[29, 31]。*BRAF* 基因不同的内含子突变也会影响结直肠癌患者的预后^[32]。这项研究揭示了结直肠癌分子分型与预后的相关性, 对于结直肠癌分子异质性的研究具有重要意义。另一项研究显示, CCS1-CIN 型无进展生存期 (disease-free survival, DFS) 最长, Wnt 信号通路高度激活; CCS2-MSI 型次之, CCS3-serrated 型最短^[10]。这可能与 CCS1-CIN 型 Wnt 信号通路高度激活, CCS2-MSI 型和 CCS3-锯齿状型 Wnt 信号通路高度保守有关。Sadanandam 等^[11] 也发现 CS-TA 和杯状细胞型 DFS 较长, 肠上皮细胞型和炎症型 DFS 中等, 干细胞型和 CR-TA 的 DFS 最短。干细胞型和 CR-TA 存在 Wnt 信号高度激活, CS-TA、杯状细胞型、肠上皮细胞型 Wnt 信号高度保守, 炎症型 Wnt 信号状态未知。由此可以看出, Wnt 信号通路的状态不一定是影响 DFS 的决定性因素。近期 Guinney 等^[15] 研究发现, CMS4 型的无复发生存期 (relapse-free survival, RFS) 和复发后生存期 (survival after relapse, SAR) 最短, CMS1 型的总生存期 (overall survival, OS) 最短而 RFS 最长。趋

化素样因子(chemokine-like factor, CKLF)基因高表达是CMS1型预后较好的因素^[33]。

3.2 结直肠癌的分子分型的临床应用前景及问题

近年来,结直肠癌分子分型的发展取得一定成效,有力补充了结直肠癌的临床病理分类,为预测结直肠癌复发、转移危险度、治疗敏感性和评估预后提供了新的方向。分子诊断指导下的结直肠癌个体化治疗具有良好的研究基础和应用前景。

分子检测为临床结直肠癌的个体化化疗和个体化分子靶向治疗提供了一定依据,对结直肠癌的临床诊治和预后评估做出贡献。目前已经可以根据*ERCC1*、*TS*等基因的表达水平和基因多态性指导结直肠癌的个体化化疗,MSI也已成为影响结直肠癌预后和治疗策略的因素之一^[34-35]。虽然Ⅱ期MSI-H型CRC患者能从5-FU为主的化疗中明显获益,但是Ⅲ期MSI-H型患者却不能从5-FU为主的化疗中明显获益,*BRAF*和*KRAS*基因的突变状况也会影响化疗效果^[28],因此仅根据MSI的状态还不能完全预测5-FU为主的化疗效果。*BRAF*和*KRAS*等基因的突变状态也可以指导患者的个体化分子靶向治疗。但结直肠癌是具有高度分子异质性的肿瘤,在肿瘤的发生、发展过程中有一系列相关基因突变和相关信号通路异常激活,近端和远端结直肠癌的分子、病理、临床特征也存在明显差异^[36]。*NRAS*、*BRAF*和*PIK3CA*外显子20发生突变都会影响西妥昔单抗的治疗效果,只有40%~60%的*KRAS*野生型结直肠癌患者对抗EGFR治疗有效。因此只检测几个基因还不能完全预测肿瘤的生物行为学和预后。根据不同的分子分型对患者进行个体化治疗具有广阔的前景。如对于CMS1型(*dMMR*、*BRAF*突变)结直肠癌,应用免疫检测点抑制剂和MAPK信号通路抑制剂可能会取得较好效果^[37]。虽然分子诊断技术指导下的个体化治疗具有广阔的前景,但我国和西方患者的*KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA*基因突变热点存在差异^[38],因此找到适合本民族结直肠癌的分子分型方法还有很长的路要走。此外由于基因检测、分子靶向治疗价格昂贵,其应用受到一定限制。因此,寻找新的治疗靶点并降低基因检测成本迫在眉睫。

4 展望

目前结直肠癌的分子分型方法还没有统一标

准,分型方法也不尽完善,某些亚型之间存在交叉性。仅根据几种基因检测结果确定个体化治疗方案还不能最大程度使患者受益,多因素综合分析才是未来个体化治疗的发展方向。由于遗传、分型方法和研究背景的不同,不同种族结直肠癌的分子分型方法可能存在差异。综合众多分子分型方法的优点,总结各种亚群结直肠癌的异同,形成统一的分子分型方法是未来的努力方向。相信随着分子诊断技术的不断进步,会使结直肠癌的临床分类诊断、个体化治疗、反应预测、预后评估到达新的高度。

参考文献

- [1] Bae JM, Kim JH, Kang GH. Molecular subtypes of colorectal cancer and their clinicopathologic features, with an emphasis on the serrated neoplasia pathway [J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(5):406-412.
- [2] Mohammed AA, El-Tanni H, El-Khatib HM, et al. Molecular classification of colorectal cancer: current perspectives and controversies [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2016. Epub ahead of print.
- [3] Simons CC, Hughes LA, Smits KM, et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis [J]. Ann Oncol, 2013, 24(8):2048-2056.
- [4] 邓艳红. 结直肠癌的分子分型对临床个体化治疗至关重要 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2015, 18(10):994-997.
- [5] Schell MJ, Yang M, Teer JK, et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC [J]. Nat Commun, 2016, 7(1):11743.
- [6] Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features [J]. Histopathology, 2007, 50(1):113-130.
- [7] Marisa L, de Reynies A, Duval A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value [J]. Plos Med, 2013, 10(5):e1001453.
- [8] 苗华, 曹付傲, 李旭, 等. 联合应用基因表达谱和拷贝数变异信息探索结直肠癌分子亚型 [J]. 浙江大学学报医学版, 2014, 43(4):420-426.
- [9] Budinska E, Popovici V, Tejpar S, et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer [J]. J Pathol, 2013, 231

- (1):63-76.
- [10] De Sousa EMF, Wang X, Jansen M, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5):614-618.
- [11] Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5):619-625.
- [12] Sadanandam A, Wang X, de Sousa EMF, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(3):353-357.
- [13] Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1):88-99.
- [14] Zhang B, Wang J, Wang XJ, et al. Ptoeogenomic characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2014, 513(7518):382-387.
- [15] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11):1350-1356.
- [16] 红勇刚, 颜宏利, 田兆峰, 等. 利用微滴数字PCR进行CpG岛甲基化表型结直肠癌分子分型[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(4):465-471.
- [17] Wu C, Bekaii-Saab T. CpG island methylation, microsatellite instability, and BRAF mutations and their clinical application in the treatment of colon cancer [J]. *Chemother Res Pract*, 2012, 2012:359041.
- [18] Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer [J]. *Cancers*, 2011, 3(2):2767-2810.
- [19] Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylation phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2):710-715.
- [20] Samowitz W, Albertsen H, Herrick J, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(3):837-845.
- [21] van Rijnsoever M, Grieu F, H Elsaleh, et al. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands [J]. *Gut*, 2002, 51(6):797-802.
- [22] Lacopetta B, Grieu F, Li W, et al. APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(10):2272-2278.
- [23] Sanchez JA, Krumroy L, Plummer S, et al. Genetic and epigenetic classifications define clinical phenotypes and determine patient outcomes in colorectal cancer [J]. *Br J Surg*, 2009, 96(10):1196-1204.
- [24] Weisenberger DJ, Levine AJ, Long TI, et al. Association of the colorectal CpG island methylator phenotype with molecular features, risk factors and family history [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(3):512-519.
- [25] Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer [J]. *J of Mol Diagn*, 2008, 10(1):13-27.
- [26] Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: A case for molecular disease subtypes [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2):245-249.
- [27] Bae JM, Kim MJ, Kim JH, et al. Differential clinicopathological features in microsatellite instability-positive colorectal cancers depending on CIMP status [J]. *Virchows Arch*, 2011, 459(1):55-63.
- [28] Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, et al. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(1):126-132.
- [29] Whitehall VH, Wynter CV, Walsh MD, et al. Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability=high colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23):6011-6014.
- [30] Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1):77-87.
- [31] Neumann JH, Jung A, Kirchner T. Molecular pathology of colorectal cancer [J]. *Pathologe*, 2015, 36(2):137-144.
- [32] Cremolini C, di Bartolomeo M, Amatu A, et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(10):2092-2097.
- [33] Dunne PD, O'Reilly PG, Coleman HG, et al. Stratified analysis reveals chemokine-like factor (CKLF) as a potential prognostic marker in the MSI-immunecon-

- sensus molecular subtype CMS1 of colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24):36632-36644.
- [34] Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, et al. Micosatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the pazzle [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(11):841-844.
- [35] Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6):1506-1512.
- [36] Mssiaglia E, Jacobs B, D'ario G, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular pathological and clinical features [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(10):1995-2001.
- [37] Cohen R, Svrcek M, Dreyer C, et al. New therapeutic opportunities based on DNA mismatch repair and BRAF status in metastatic colorectal cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2016, 18(3):18.
- [38] Zhang J, Zheng JM, Yang YH, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in chinese colorectal cancer patients: analysis of 1110 cases [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(12):18678.

(上接第 425 页)

- [24] Soenen SJ, Manshian BB, Aubert T, et al. Cytotoxicity of cadmium-free quantum dots and their use in cell bioimaging [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(6):1050-1059.
- [25] 李众, 祝欣, 董朝青, 等. 荧光量子点的水相合成及其在化学和生物分析中的应用 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(10):1905-1915.
- [26] Qian H, Dong C, Peng J. High-quality and water-soluble near-infrared photoluminescent CdHgTe/CdS quantum dots prepared by adjusting size and composition [J]. *J Phys chem*, 2007, 111(45):16852-16857.
- [27] 伊魁宇, 欧志东, 许尊炼, 等. 荧光量子点的水相合成及其在潜指纹显现中的应用 [J]. *应用化工*, 2013, 42(10):1893-1895.
- [28] 陈国珍, 严峰, 党露. 土壤重金属污染及检测方法的研究进展 [J]. *广东化工*, 2016, 43(2):77-78.
- [29] 王玉珍, 赵外欧, 李亚鹏, 等. 基于 QDs 和 DOX 的靶向诊疗体系的制备与表征 [J]. *高分子学报*, 2016, 2:211-218.

(上接第 429 页)

- [23] Godinho MF, Sieuwerts AM, Look MP, et al. Relevance of BCAR4 in tamoxifen resistance and tumour aggressiveness of human breast cancer [J]. *Br J cancer*, 2010, 103(8):1284-1291.
- [24] Cai Y, He J. Suppression of long non-coding RNA CCAT2 improves tamoxifen-resistant breast cancer cells' response to tamoxifen [J]. *Mol Biol (MOSK)*, 2016, 50(5):821-827.
- [25] 蔡加琴, 孙红, 魏晓霞, 等. 下调长链非编码 RNA H19 对他莫昔芬耐药乳腺癌侵袭能力的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2016(11):880-883.
- [26] Loong HH, Chan AC, Wong AC. Wong. Evolving Evidence of the Efficacy and Safety of nab-Paclitaxel in the Treatment of Cancers with Squamous Histologies [J]. *J Cancer*, 2016, 7(3):268-275.
- [27] Si X, Zang R, Zhang E, et al. LncRNA H19 confers chemoresistance in ER α -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49):81452-81462.
- [28] Jiang YZ, Liu YR, Xu XE, et al. Transcriptome analysis of triple-negative breast cancer reveals an integrated mRNA-lncRNA signature with predictive and prognostic value [J]. *Cancer research*, 2016, 76(8):2105-2114.
- [29] Li X, Wang S, Li Z, et al. NEAT1 induces epithelial-mesenchymal transition and 5-FU resistance through the miR-129/ZEB2 axis in breast cancer [J]. *FEBS letters*, 2017, 591(3):570-577.
- [30] Redis RS, Sieuwerts AM, Look MP, et al. CCAT2, a novel long non-coding RNA in breast cancer: expression study and clinical correlations [J]. *Oncotarget*, 2013, 4(10):1748-1762.

浅谈医用电气设备电磁兼容标准在我国的进展及现状

刁春芳 高旭年*

2012年12月17日,国家食品药品监督管理总局发布了YY 0505-2012《医用电气设备 第1-2部分:安全通用要求并列标准:电磁兼容 要求和试验》(代替YY 0505-2005)医疗器械行业标准的公告,并于2014年1月1日实施。

该标准是继GB9706.1《医用电气设备第1部分:安全通用要求》又一强制实施的基础通用安全标准。

1 电磁兼容的定义

电磁兼容(electromagnetic compatibility, EMC)是指设备或系统在其电磁环境中能正常工作且不对该环境中任何事物构成不能承受的电磁骚扰的能力^[1]。

2 电磁兼容检测的必要性

随着科技的不断发展,电子技术在医用电气设备中得到了广泛的应用,当多个电子或电气设备共处一个使用环境的时候,其电磁兼容性就变得尤为重要。特别是在医院当中使用的医用电气设备,如EMC性能设计不当,这不仅会影响到医用设备的正常使用,甚至危害患者以及医护人员的生命安全或健康。例如在手术室,高频电刀对患者的组织切割时,会对控温毯温度产生电磁干扰,使患者背部烫伤。

为解决医用电气设备的电磁兼容性问题,提高医用电气设备的安全性和有效性,在医用电气设备上市之前,应该进行电磁兼容检测。

3 我国医用电气设备电磁兼容检测的发展与现状

3.1 电磁兼容检测在我国的发展

国际上,欧盟于1996年1月已经率先强制执行欧盟《89/336/EEC 电磁兼容指令》。适用于医疗器械的国际标准IEC 60601-1-2《医用电气设备第1-2部分电磁兼容性技术要求和测试》于2004年9月发布,并在国际上推荐实施。

在我国,最早拥有电磁兼容测试实验室为商业机构,如国外的SGS、TUV,国内的深圳NTEK。深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司作为国内高端的医疗器械生产企业,产品销往全球,在2005年已拥有自己的EMC实验室。

国家药监部门强制要求医疗器械电磁兼容检测起步较晚。2005年4月5日,国家食品药品监督管理总局发布了医疗器械强制性行业标准YY0505-2005《医用电气设备 第1-2部分:安全通用要求-并列标准:电磁兼容-要求和试验》,并于2007年4月1日起实施。由于当时大部分的检测中心不具备承检电磁兼容测试的能力,以及不少生产企业对电气产品的电磁兼容重视程度不高,如强制执行YY0505-2005,会对企业的产品上市造成冲击。2006年9月18日,国家食品药品监督管理总局发布了决定延期实施该行业标准的通知。

2011年,推荐性标准GB/T18268.1-2010《测量、控制和实验室用的电设备 电磁兼容性要求 第一部分通用要求》、GB/T18268.26-2010《测量、控制

基金项目:“863”计划重点项目(2011AA02A101);广州市科技计划(2014Y2-00220)

作者单位:中山大学达安基因股份有限公司产品注册与知识产权部,广东,广州 510065

*通讯作者:高旭年, E-mail: gaoxunian@126.com

和实验室用的电设备电磁兼容性要求第26部分:特殊要求 体外诊断(IVD)医疗设备》发布并实施。这两份标准等同采用国际标准 IEC 61326-1:2005 及 IEC 61326-2-6:2005。由于国家总局延期实施 YY0505, 检验诊断类设备在进行注册检验时,可不进行电磁兼容测试。

2012年12月,国家食品药品监督管理总局发布了 YY 0505-2012《医用电气设备 第1-2部分:安全通用要求并列标准:电磁兼容 要求和试验》要求在2014年1月1日实施的公告及关于 YY 0505-2012 医疗器械行业标准实施有关工作要求的通知。YY0505-2012 等同采用了国际标准 IEC 60601-1-2:2004。据通知内容可知,2014年之后三类首次注册医疗电气设备提交首次注册申请的,应当提交合格的 EMC 检测报告;2015年之后二类及一类首次注册医疗电气设备提交首次注册的,应当提交合格的 EMC 检测报告。

2013年,国家药监部门认可的检测中心北京市医疗器械检验所、广东省医疗器械质量监督检验所、湖北医疗器械检测中心等 EMC 实验室相继建成投入使用。

国内检测机构电磁兼容实验室的建立,一方面确保了在2014年强制性标准 YY 0505-2012 能够顺利实施,另一方面,有利于我国医用电气设备突破电磁兼容性能技术壁垒,推动我国医疗器械产业的发展。

3.2 电磁兼容检测现状

产品 EMC 测试出现问题,企业应根据测试的结果及出现的问题,分析原因,验证产生原因的正确性,在确定问题后,根据产品的实际情况出具整改方案,在保证整改方案可行的前提下变更产品的设计,完成产品的整改。

根据上述整改流程可能会延长检验周期,加重企业注册成本。因此不管是新研发产品还是延续注册产品在进入注册检验时,如 EMC 检测不合格,国内部分企业不会根据实际情况从源头上解决电磁兼容问题,一般都是直接找到问题点,采用相应的补救方法,例如在产生问题的元器件或区域上添加磁环、铜箔等以此来屏蔽干扰源。

据广东省医疗器械质量监督检验所电磁兼容检验室介绍,自 YY 0505-2012 实施至2017年,能一次通过 EMC 测试的国产医用电气设备为30%,而70%的设备需要进行整改,有些甚至需要多次整改。目前国内产品最常见的整改问题是 RE(辐射)、ESD(静电)、EFT(防雷要求)。

有些不是自主研发的企业,技术人员不懂产品设计,在面临 EMC 测试不通过时,没办法提出可行性的整改方案,整改多次仍不合格。这些不合格产品在检验机构占用实验室场地及检测人员的时间,不但造成后面送检的企业没办法及时完成电磁兼容检测,延长注册检验周期,还加重了检测中心的任务量。

为解决上述问题,2017年4月开始,广东省医疗器械质量监督检验所提出 EMC 测试不通过的企业,只提供一次整改机会,如一次整改后仍不通过,将出具不合格检测报告。

另,国内经国家食品药品监督管理总局认可承检 EMC 资质的第三方检测机构不到15家,而我国随着经济全球化的发展,国内不少企业通过国际交流和技术创新,不断研发出符合市场需求的医疗器械产品。第三方检测机构的检测效率无法满足日益增长的医疗器械注册检测需求,导致产品不能及时上市。

4 总结

YY0505-2012 的强制实施,是药监部门为突破国内医用电器设备电磁兼容性能技术壁垒的又一重要举措,必将促进淘汰落后产品,提高企业的自主开发能力,提升产品质量,推动我医疗器械产业的健康发展,与国际市场接轨。

而我国医疗器械生产、研发企业作为产品质量的第一负责人,应贯彻实施电磁兼容标准,在产品研发设计、生产阶段应充分考虑产品的电磁兼容性,确保产品符合电磁兼容标准,保证产品的安全性和有效性。

参考文献

- [1] GB/T4365-2003, 电工术语 电磁兼容[S].

广东省中医院大学城医院检验科

广东省中医院大学城医院检验科位于广州市大学城内环西路55号,通过了ISO 15189实验室认可。现有技术人员28名,其中高级职称7名、中级职称11名、初级职称10名,获博士学位以上学位者5名。科室实验用地1000余平方米,有临床基础检验、生化检验、免疫检验、微生物检验等4个专业组。科室配有全自动血细胞分析仪、全自动凝血仪、血型仪、全自动生化分析仪、血气分析仪、化学发光免疫分析仪、电化学发光分析仪、血培养仪和全自动微生物分析系统等大型仪器设备,可为临床提供准确、及时的检验报告。

科室在感染性疾病病原学检测的临床和科研方面独树一帜:具备较为完善的从表型到遗传学检测细菌、真菌的技术平台。作为卫生部和广东省耐药监测网的成员,科室已建立临床病原菌的分子分型方法,搭建了相应的一些基础技术平台,能为院内感染的流行病学溯源提供依据;利用耐药监测的技术平台,深入研究细菌耐药变迁,开展与院感相关的临床研究工作,在预防院感暴发方面发挥了积极作用。目前团队已在细菌耐药机制和致病机制以及细菌分类学研究方面累计获得包括7项国家自然科学基金在内的共计30余项科研立项课题,发表论著100余篇,其中SCI收录10余篇。获国家发明专利2项,广东省科技进步二等奖2项、三等奖1项。主编、副主编、主译专著和检验规划教材共计5本,参编检验规划教材2本,专著5本。培养博士研究生1名,硕士研究生13名。

学科带头人陈茶长期从事病原微生物的耐药机制和临床疑难菌鉴定及分类学研究,是国家自然科学基金委同行评议专家,中国中西医结合学会检验分会感染学组副主任委员,广东省预防医学会微生物与免疫学专业委员会副主任委员,广东省肝脏病学会检验诊断专业委员会副主任委员,广东省医疗安全协会与检验医学分会副主任委员。



→ 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