



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

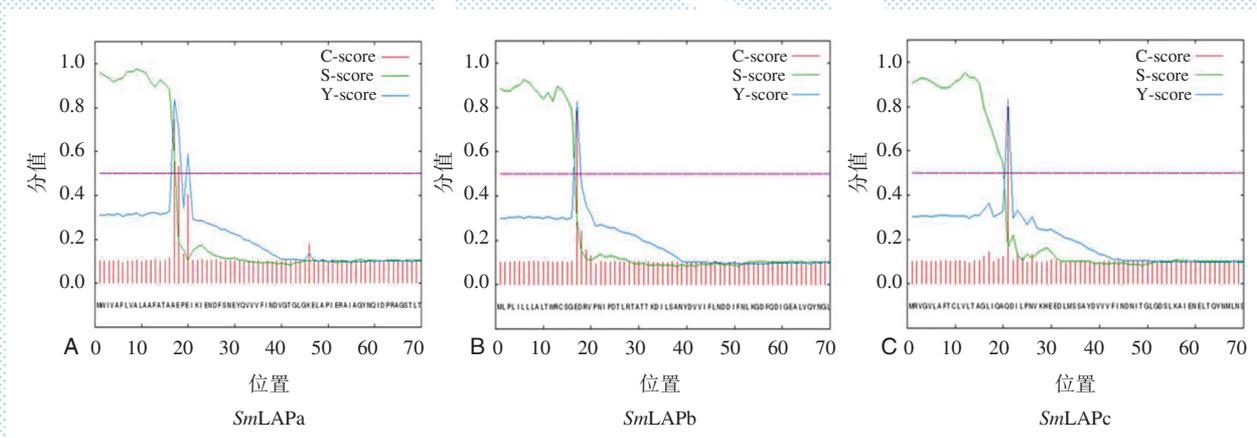
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2017年7月 第9卷 第4期 总第50期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 9 Number 4 July 2017



A: SmLAPa氨基酸序列的信号肽预测; B: SmLAPb氨基酸序列的信号肽预测; C: SmLAPc氨基酸序列的信号肽预测

图(P244) 信号肽预测

Figure (P244) Signal peptide prediction of SmLAPs sequences

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 CMCJ 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

07>

分子诊断与治疗杂志

二〇一七年七月

第九卷 第四期

中山大学

杨智聪



杨智聪，《华南预防医学》杂志副主编，《中华预防医学杂志》、《热带医学》、《广东药科大学学报》杂志编委。

1962年7月出生，1984年毕业于广东医药学院（现广东药科大学），获学士学位。流行病学二级主任医师，博士生导师，广州市第十三届政协委员，广州市医学重点人才。现任广州市疾病预防控制中心主任，广州市预防医学会会长，广州市医学重点学科带头人。

杨智聪主任长期从事急性传染病防控与突发公共卫生事件处置工作与研究，主持或参与多项国外、国家、省市重大项目，如美国国立卫生研究院（National Institutes of Health, NIH）项目、国家自然科学基金项目、国家公益性行业科研专项项目、广东省科技公益研究与能力建设项目、广东省和广州市科技重大攻关项目、广州市医疗健康协同创新重大专项项目、广州市医药卫生科技重大项目等。

杨智聪主任在公共卫生，尤其在新发传染病防控和病原快速检测领域取得创新性成果。2011年，“广州市登革热/登革出血热预防控制体系及策略研究”获得广州市科学技术进步二等奖；2013年，“《广州市突发公共卫生事件监测与预警系统》开发与应用研究”获得广州市科学技术进步三等奖。在长期的专业实践和学术积累的基础上，杨智聪主任及其团队以严谨的科学精神、创新的研究思路攻克了传染病监测、预警、控制和病原体高效采样、精准检测的难关，应用恒温扩增PCR技术、多重荧光定量PCR技术、基于时间分辨免疫荧光技术、脉冲场凝胶电泳分型等技术在快速检测病原和生物毒素方面取得突破，获得了公共卫生相关危险因素、不明原因食物中毒、不明原因传染病监测及分析系统等软件版权，发明了空气微粒收集及其支架装置、布氏杆菌检测试剂盒、地沟油检测试纸、快速鉴别胎儿弯曲菌和性病亚种方法等，其系列成果分别获得广东省科技进步二等奖和广州市科技进步一等奖、二等奖、三等奖。杨智聪主任在担任广州市医学重点学科带头人的近4年期间，领导学科研发团队研发各种公共卫生适用技术，授权发明和实用新型专利各3项，获批科研课题35项，获得广东省科技进步二等奖、广州市科技进步二等奖、广州市科技进步三等奖各2项，大大提升了广州市应对新发突发传染病的水平。个人获得2011年度广州医师奖、2012年广州市卫生局优秀科技人才、2015年和2016年广州市医学重点人才，以第一（通讯）作者发表SCI论文34篇、中文论文58篇，主编学术专著4部，培养博士研究生3名、硕士研究生6名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2017年7月 第9卷 第4期 总第50期 Bimonthly Volume 9 Number 4 July 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 |
| 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7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</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 CN 44-1656/R</i> |
| Printing | <i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd</i> |
| Publish Date | <i>2017.7.18</i> |
| Price | <i>RMB 15.00</i> |

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2017年7月 第9卷 第4期

目次

述 评

地中海贫血产前基因诊断技术的临床应用..... 秦丹卿 何天文 尹爱华(223)

论 著

致死性侏儒症p.R248C突变热点的快速检测和三例TD- I型高危胎儿的快速产前诊断
..... 姜煜 潘敬新 郭东炜 等(228)

DA8600测序平台对EGFR基因检测最低DNA用量的探讨
..... 曹治家 张家彬 李翠云 等(234)

曼氏迭宫绦虫中亮氨酸氨基肽酶基因的生物信息学分析和转录水平检测
..... 李奕基 符瑞佳 周晓君 等(241)

广东江门地区汉族人群23个STR基因座遗传多态性 张洁 冯冬亮(247)

广东潮汕地区地中海贫血基因突变谱分析 林芬 杨立业 邢少宜 等(252)

佛山市南海区地中海贫血基因类型分析 谢煜楠 杨发达 黄广强 等(257)

乳腺浸润性筛状癌与筛状结构导管原位癌的临床病理及免疫组化对比分析
..... 曾玉梅 曹晓珊 杜娟 等(261)

海南省低收入女性人乳头瘤病毒感染状况及亚型研究 钟威达 欧武英 陈元花 等(267)

基于三种检测方法的17 α 羟孕酮临床检测对比 渠海 吕萌萌 朱宇皇 等(272)

综 述

致死性侏儒症I型高发突变发生机制浅析 姜煜 郭东炜 郭奕斌(278)

MiRNA-3p/5p在肿瘤中的研究进展 张凌宇 陈昌杰 杨清玲(284)

蛋白质组学在肺癌相关标志物挖掘中的应用 梁委军 覃世逆 袁天柱 等(289)

讲 座

如何开展医疗器械注册检验 刁春芳 高旭年(293)

专家风采

杨智聪 (封二)

实验室巡礼

广州市疾病预防控制中心(广州市卫生检验中心)实验室..... (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 4 July 2017

CONTENTS

COMMENTS

The clinical applications of prenatal genetic diagnosis for thalassemia

QIN Danqing, HE Tianwen, YIN Aihua (223)

ORIGINAL ARTICLES

Fast detection of thanatophoric dysplasia type I p.R248C mutation hot spots and rapid prenatal diagnosis of three TD type I high-risk fetuses

JIANG Yu, PAN Jingxin, GUO Dongwei, AI Yang, LI Rong, JIANG Weiyong, FANG Qun, GUO Yibin (228)

The lowest amount of DNA in *EGFR* gene sequencing by DA8600 sequencing platform

CAO Zhijia, ZHANG Jiabin, LI Cuiyun, WU Yingsong (234)

Bioinformatics analysis, transcriptional level detection of leucine aminopeptidases from *Spirometra mansoni*

LI Yiji, FU Ruijia, ZHOU Xiaojun, YIN Feifei, LIANG Peng, LV Gang, LIANG Pei (241)

Genetic polymorphism of 23 STR Loci in Jiangmen Han population of Guangdong

ZHANG Jie, FENG Dongliang (247)

The analysis of gene spectrum of thalassemia in Chaoshan area, Guangdong Province

LIN Fen, YANG Liye, XING Shaoyi, ZHANG Lin (252)

Analysis on genotypes with thalassemia in Nanhai of Foshan

XIE Yunan, YANG Fada, HUANG Guangqiang, HUANG Yong (257)

Comparative analysis based on clinicopathology and immunohistochemistry of invasive cribriform carcinoma of the breast and cribriform structure of ductal carcinoma in situ

ZENG Yumei, CAO Xiaoshan, DU Juan, CHEN Yingzhi, CHU Bin (261)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 4 July 2017

CONTENTS

Study on the prevalence and subtype distributions of human papillomavirus in low-income women in Hainan

ZHONG Weida, OU Wuying, CHEN Yuanhua, GUO Hong (267)

The clinical comparison of three methods for 17 α -OH- progesterone assay kit

QU Hai, LV Mengmeng, ZHU Yuhuang, FU Guangyu (272)

REVIEWS

Analysis of the mechanism of high incidence of thanatophoric dysplasia type I

JIANG Yu, GUO Dongwei, GUO Yibin (278)

MiRNA-3p/5p in tumor development

ZHANG Lingyu, CHEN Changjie, YANG Qingling..... (284)

The application of proteomics in lung cancer related biomarkers in data mining

LIANG Weijun, QIN Shini, YUAN Tianzhu, DAI Shengming..... (289)

地中海贫血产前基因诊断技术的临床应用

秦丹卿^{1,2} 何天文^{1,2} 尹爱华^{1,2*}

[摘要] 地中海贫血是全球广为流行的遗传性溶血性疾病,是最常见的单基因遗传病之一。因缺乏理想的治疗手段,在高发地区通过对高风险夫妇进行产前基因诊断以避免重症地中海贫血患儿的出生,是国际上公认的首选预防措施。目前,临床广泛应用侵入性手术取得胎儿DNA并采用多种分子检测技术进行基因诊断,但有一定胎儿流产和宫内感染的风险。以胎儿游离DNA为检测标靶的无创产前诊断技术的迅速发展,为建立一种安全快速、简便准确的早期地中海贫血产前基因诊断方法带来可能。本文就目前应用于地中海贫血产前基因诊断的多种技术作一述评。

[关键词] 地中海贫血; 产前基因诊断; 分子检测; 无创产前诊断

The clinical applications of prenatal genetic diagnosis for thalassemia

QIN Danqing^{1,2}, HE Tianwen^{1,2}, YIN Aihua^{1,2*}

(1. Medical Genetics Center of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442; 2. Maternal and Children Metabolic - Genetic Key Laboratory of Guangdong, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] Thalassemia is one of the most common monogenic inherited diseases, with the highest prevalence in the world. Due to the lack of an ideal treatment, currently the first-choice method is the prevention of births of children with severe cases as detected by prenatal genetic diagnosis for high-risk couples in high-prevalence areas. Currently, the widely used invasive operation used to obtain fetal genetic material for genetic diagnosis has the risk of miscarriage or intrauterine infection. Since the cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal diagnosis technology has been rapidly developed, it is likely to establish a safe, rapid, simple and accurate method for early prenatal diagnosis of thalassemia in future. In this review, the applications of the molecular tests currently used for prenatal genetic diagnosis of thalassemia are briefly reviewed.

[KEY WORDS] Thalassemia; Prenatal genetic diagnosis; Molecular test; Non-invasive prenatal diagnosis

地中海贫血(地贫)是我国南方地区高发的遗传性血液病,由于其严重的致残、致死后果对家庭及社会带来的沉重负担,在包括我国南方在内的东南亚地区、地中海地区、印度、中东、北非等该病的高发地区,地贫已经成为这些地区的公共卫生问题。我中心此前对随机抽取的14 332个广东省户籍家庭的40 808个血样进行的大样本分子流行

病学调查提示,广东省人口地贫基因致病突变携带率约为16.83%,相当于平均每6个人里就有一个携带地贫基因致病突变^[1]。

因为缺少经济、有效的治疗手段,通过产前诊断避免重型地贫患儿的出生是目前国际上公认的首选预防措施^[2-3]。地贫病因主要是由于珠蛋白基因发生缺陷导致相应的珠蛋白肽链合成减少或缺

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1000703)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511442

2. 广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室,广东,广州 511442

*通讯作者:尹爱华, E-mail: yinaiwa@126.com

失,从而造成 α 和 β 珠蛋白肽链比例失衡而引起溶血性贫血^[4]。根据珠蛋白肽链合成受到抑制的类型,主要可以分为 α -地中海贫血(α -地贫)和 β -地中海贫血(β -地贫)2类。地贫产前基因诊断的目的就是防止重型 α -地贫又称Hb Bart's胎儿水肿综合征以及 β 珠蛋白基因突变纯合子或双重杂合子引起的重型 β -地贫患儿的出生。进行产前基因诊断需要获得足量的胎儿DNA样本,目前临床上广泛应用的是侵入性(有创性)取材,根据不同孕周分别于11~14周行绒毛穿刺活检、16周之后行羊水穿刺或24周之后行脐带血穿刺。本文主要针对目前地贫产前基因诊断技术进行评述。

1 地中海贫血产前基因诊断技术

地贫基因诊断经过多年不断地研究,已有多成熟成熟的分子检测技术手段可应用于临床检测。目前临床上通过侵入性取材方式获得胎儿样本并进行DNA提取,应用多种基于PCR方法的分子检测技术对胎儿DNA进行 α -或 β -等珠蛋白基因突变的检测以明确胎儿的基因型,防止重型 β -地贫患儿的出生、给予地贫高风险妊娠夫妇更多生下健康下一代的机会。

1.1 跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-polymerase chain reaction, Gap-PCR)

Gap-PCR是一种简便、快速、经济的检测基因大片段缺失的方法。其原理是:于缺失序列的两端设计一对引物,在正常序列中这对上下游引物间相距过远,以至超出有效扩增范围而不能生成扩增产物。大片段缺失的存在会使断端连接,上下游引物靠近,可以生成特定长度的扩增产物。PCR产物可通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。Gap-PCR方法的优势是可以建立多重检测体系同时检测多种大片段缺失类型,在多种缺失类型的共同区域可以设计一对内对照引物以区分检测到的缺失类型是杂合子、纯合子或双重杂合子。我国南方地区应用这种多重Gap-PCR同时检测多种缺失型 α -地贫包括- $\alpha^{3.7}$ /- $\alpha^{4.2}$ /- α^{SEA} /- α^{THAI} 等^[5-6],以及2种中国人群中常见的以高Hb F为表型的大片段 β -珠蛋白基因簇缺失突变包括中国型 $G\gamma^+(\Lambda\gamma\delta\beta)^0$ 缺失和东南亚型HPFH缺失^[7-8]。但是此种方法仅限于断裂点已知的大片段缺失突变。

1.2 聚合酶链式反应-反向斑点杂交(polymerase chain reaction-reverse dot blot, PCR-RDB)

RDB技术是将待测突变位点的等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)探针(包括野生型和突变型)固定在杂交膜上,根据野生型探针还是突变型探针与PCR扩增靶序列DNA结合,以确定此样本中该位点是否突变以及确定是纯和还是杂合突变^[9]。

该技术是当前临床所采用的常规检测方法,在临床实践中已应用20多年,可以在一个样本中同时检测多种突变类型,结果可靠、准确性高。在我国南方常用于检测南方人群常见的 β -珠蛋白基因17种点突变类型以及 α -珠蛋白基因3种点突变类型^[10]。缺点是杂交操作过程繁复,耗时长,大批量检测时保证检测质量有难度。

1.3 多重连接依赖性探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

当怀疑样本可能存在罕见大片段缺失突变,而缺失序列的断裂点未知,不能应用Gap-PCR方法检测时,可以应用MLPA技术。MLPA技术是设计多组专一的与目的序列互补的探针组,探针组范围覆盖整个目的序列。此技术的关键点是只有每对探针与目的序列完全互补杂交时,此对探针才可在连接酶作用下连接成为一条完整的核酸单链,之后再以连接完好的探针而不是目的序列为模板进行PCR扩增^[11]。因每组探针长度不同,故其扩增产物片段长度也不同,PCR扩增产物通过毛细管电泳进行分离,通过相关软件分析目的序列与正常对照序列的产物峰高,并计算比值。

MLPA技术是单管一次性的进行连接和PCR反应,可以一次完成50个核苷酸序列的检测。该方法可以对 α 、 β 珠蛋白基因簇进行相对定量分析,虽然不能判断确切的缺失类型,但能准确反映整个 α 、 β 珠蛋白基因簇及其上下游调控序列的重复、缺失突变,以及 α 、 β 珠蛋白基因拷贝数的变化。此方法技术平台建立要求略高,需自动测序仪进行片段分析,并且对DNA质量要求较高。近年来,多篇文献报道应用此技术确诊了多例罕见 α 或 β 珠蛋白基因簇的缺失、重复或重排等突变类型的病例^[12-14],此技术作为传统基因诊断技术的补充,可以提高产前基因诊断的准确率。

1.4 珠蛋白基因测序(globin gene sequencing)

对于临床表型和筛查结果提示疑为地贫基因

突变携带者而已经排除常见突变类型的样本,提示此样本可能存在罕见基因突变类型或尚未发现的新发突变类型,可以考虑对 α -或 β -珠蛋白基因进行测序分析。目前临床基因测序诊断主要是 Sanger 双脱氧链终止法。对 PCR 产物进行测序除可检测到常见类型的点突变外,还可检测出不常见或者罕见类型的点突变、微缺失或者插入突变。当血红蛋白电泳分析提示有异常血红蛋白区带时,也可通过此方法进行异常血红蛋白的基因型精确诊断。珠蛋白基因测序既可以确定突变位点又可以确定突变类型,是突变验证、确认以及新基因突变鉴定的金标准。但此技术仪器成本昂贵,操作步骤繁琐,需专业人员判读结果,这些不足极大地限制了其在临床诊断中的大范围应用。

1.5 扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)

点突变类型的检测除了可以采用 RDB 等方法外,也可以采用 ARMS 法,也称为等位基因特异性 PCR (allele specific PCR, AS-PCR)。这是一种通过设计 3'-端碱基特异性引物来检测 DNA 序列已知点突变的方法。针对已知突变,同时设计野生和突变序列的 2 条引物,它们分别与一条共同引物配对。这 2 条引物的 3'-端碱基是分别与野生和突变序列特异性互补,因 PCR 对引物 3'-端与模板的互补性要求较高,所以野生序列引物与野生序列模板互补,突变序列引物与突变序列模板互补^[15]。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分析。若只有野生引物扩增,则提示无相应突变;若野生和突变引物均扩增,则提示为突变杂合子;若只有突变引物扩增,则提示为突变纯合子。

此技术因快速简便、经济等优点,已在一些国家或地区在多种遗传病及多态分析中推广应用^[16-17]。其缺点是不能一次性同时检测过多突变位点,所以仍不能代替 RDB 方法在临床 α -或 β -珠蛋白基因点突变类型的检测。

1.6 高分辨率熔解曲线(high-resolution melting analysis, HRMA)

HRMA 技术是近年来兴起的一种用于突变筛查和基因分型的新型遗传学分析技术。该技术是在实时荧光 PCR 反应前将饱和荧光染料加入反应体系中,PCR 反应结束后产物直接运行高分辨率熔解,根据荧光信号变化绘制出不同形状的温度

熔解曲线,以此区分不同基因型^[18]。HRMA 技术高特异性、高灵敏度、高通量、高重复性和低成本的特点,使该技术已广泛用于基因分析、突变筛查、人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)配型以及甲基化分析等。

近年来国内外多项研究将 HRMA 技术应用于 β -地贫的基因诊断及产前基因诊断^[19-21],与传统的 RDB 方法相比较,HRMA 技术具有操作简便快捷大大缩短产前诊断时间、真正的闭管操作避免污染以及结果判读简易等突出优势^[21]。

1.7 液相芯片技术(suspension array)

液相芯片技术也称悬浮阵列技术(suspension array),本中心自主发明设计了一种基于液相芯片系统诊断地贫的试剂盒并已应用于临床^[22]。此发明针对常见的 23 种 α -和 β -珠蛋白基因突变类型设计探针并分别与不同颜色的荧光编码微粒交联混合后,制备成用于检测的液相芯片系统。将利用特异性引物扩增后得到的 PCR 产物与液相芯片进行杂交,用藻红蛋白进行荧光标记,通过液相芯片检测仪读取结果。此技术极大地缩短了地贫的检测时间,具有高通量、自动化、高灵敏度和灵活等特点,尤其适用于大样本量的实验室检测。

1.8 母体细胞污染(maternal cell contamination, MCC)分析技术

应用分子检测技术手段对侵入性取材获得的胎儿标本进行检测时,因取材过程中可能附带的母亲外周血或蜕膜组织等会造成不同程度的 MCC,对产前基因诊断的结果有误诊的风险。随着高敏感性 PCR 扩增技术的发展和运用,微量的 MCC 即可导致假阳性或假阴性结果而造成误诊。因此,常规建议对进行单基因遗传病基因诊断的同一份胎儿样本要进行 MCC 分析,并且母亲标本(一般为外周血)需平行分析以确保检测结果的准确性^[23]。

在选择 MCC 检测方法时,可以通过混合母体和胎儿 DNA 建立多种浓度 MCC 梯度模型。原则上建议所选用的 MCC 分析方法可以检测到最低 10%浓度 MCC^[24]。目前,临床主要检测 MCC 的方法是选取人类不同染色体上的多个短串联重复序列(short tandem repeats, STR),对这些多态位点进行荧光定量 PCR (quantitative fluorescent PCR, QF-PCR) 扩增,PCR 产物通过毛细管电泳分离,此方

法可以检测到最低 5% MCC^[25]。理想的 MCC 分析方法对于产前基因诊断方法应该具有相等或者更高的敏感性,在地贫的产前基因诊断中,常规的 RDB 技术敏感性高于 QF-PCR 技术,当 RDB 结果提示某些胎儿样本有极微量 MCC 而 QF-PCR 结果未提示时,这种情况下建议更换另外的基因诊断方法以确认基因型结果^[23]。针对这个问题,本中心最近的一项研究^[26]通过建立 MCC 程度梯度模型,初步建立了微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, DD-PCR) 技术鉴定产前诊断样本 MCC 的方法。研究结果显示,在反应条件一致的情况下, DD-PCR 技术可检测到低至 1.562 5% 的 MCC,而 QF-PCR 可检测到最低 6.25% MCC,说明与传统技术比较,检测极微量 MCC 样本, DD-PCR 技术具有更高的敏感性。此外,因 MLPA 技术可对靶序列的扩增产物进行相对定量分析,因此在一定程度上可以甄别微量外源污染。陈亚军等^[27]利用 MLPA 检测出样本的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 基因的相对定量值判断出拷贝数,可以解决一些 GAP-PCR 法检测结果矛盾或无法确诊的病例确诊基因型。说明 GAP-PCR 法联合 α -珠蛋白基因 MLPA 法检测 α -地贫基因缺失,在一定程度上可以有效排除产前诊断胎儿标本的外源或母源污染影响,防止误诊。

2 展望

除母体细胞污染导致的基因型误诊风险,侵入性手术取材方式还有一定的流产和宫内感染风险,所以寻找安全、无创、准确、简便的早期基因诊断方法一直是地贫产前基因研究的热门研究方向。近年,通过分离孕妇外周血浆中胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA) 而实现的 NIPT 成为国内外研究的热点领域,为地贫的无创产前诊断提供了新的思路。该技术已在检测性别决定基因 (sex-determining region Y, SRY) 以排除 X 连锁遗传病、RH 血型分析和染色体非整倍体的诊断等领域被广泛应用^[28]。目前, NIPT 在地贫产前诊断的研究方向主要包括排除性诊断和确定性诊断。

2.1 排除性诊断

排除性诊断都是通过检测父源性突变位点,如父母双方携带不同突变,则通过父源性突变位点阴性结果就可以排除胎儿纯合子的可能,其基

因型只有母源性突变位点杂合子或野生纯合子 2 种可能。此种方法诊断相对简单, Chiu 等^[29]和 Li 等^[30]报道的 β -地贫无创产前基因诊断采用了此种方法。如父母双方携带同型突变,则需要借助区分父母的与致病突变连锁的 STR/SNP 位点,以此排除父源性突变^[31]。利用东南亚型 α -地贫 ($--^{SEA}$) 缺失范围内 STR 或 SNPs 位点排除父源性水肿胎的多个研究证实了此种方法诊断率受 STR 或 SNPs 位点位置和数量的影响较大^[32-33]。Chan 等^[34]也将这种方法应用于中国南方人群 β -地贫的产前诊断。但这类研究方向需要建立一组与致病突变连锁的有诊断价值的 SNPs 数据库,且未对母源性突变位点进行分析,所以临床应用受到很大限制。

2.2 确定性诊断

确定性诊断指的是基于 SNP 位点或单体型相对含量计算。应用数字 PCR (digital PCR, D-PCR) 技术对母体血浆总游离 DNA 进行含 SNP 位点目的序列的定量扩增,再应用相对突变剂量 (relative mutation dosage, RMD) 方法进行分析^[35]。此方法尤其适用于父母双方携带同型突变的常染色体隐性遗传病,在 β -地贫的无创产前基因诊断方面也有相关研究报道^[36]。随着二代测序技术的发展,采用二代测序技术进行全基因组水平的高通量测序,可以一次性完成所需序列信息的采集,然后用相对单体型剂量 (relative haplotype dosage, RHDO) 分析法对孕妇血浆中单体型的相对含量进行计算^[36]。这些后续研究极大地推动了 NIPT 在地贫产前基因诊断方面的应用。但二代测序技术成本昂贵、cffDNA 含量较低导致扩增效率低、数据分析方法复杂等问题使 NIPT 在地贫产前诊断方面还无法付诸临床实践。

理想的产前诊断方法需要诊断精确,保证母胎安全以及具备广泛的应用性。目前地贫产前基因诊断仍然要依赖基于侵入性取材的基因技术手段进行检测。因地贫基因突变类型的多样性和复杂性,在保证排除母体细胞污染的前提下,应该采用多种检测方法相辅相成,以确保诊断的精确性。无创产前诊断的安全性和早期诊断的特点,使其成为地贫产前诊断未来的重要发展方向。随着技术的不断创新和完善,希望地贫无创产前基因诊断能尽早地应用于临床。

参考文献

- [1] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14, 332 families of Guangdong Province, China [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e89855.
- [2] Abi Saad M, Haddad AG, Alam ES, et al. Preventing thalassemia in Lebanon: successes and challenges in a developing country [J]. Hemoglobin, 2014, 38 (5): 308-311.
- [3] Rund D. Thalassemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease [J]. Am J Hematol, 2016, 91(1): 15-21.
- [4] Sankaran VG, Nathan DG. Thalassemia: an overview of 50 years of clinical research [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2010, 24 (6): 1005-1020.
- [5] de Mare A, Groeneger AH, Schuurman S, et al. A rapid single-tube multiplex polymerase chain reaction assay for the seven most prevalent alpha-thalassemia deletions and alphaalphaalpha (anti 3.7) alpha-globin gene triplication [J]. Hemoglobin, 2010, 34 (2): 184-190.
- [6] Eng B, Patterson M, Borys S, et al. PCR-based diagnosis of the Filipino (--(FIL)) and Thai (--(THAI)) alpha - thalassemia - 1 deletions [J]. Am J Hematol, 2000, 63 (1): 54-56.
- [7] Cai WJ, Li J, Xie XM, et al. Screening for common β -globin gene cluster deletions in Chinese individuals with increased hemoglobin F [J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37 (6): 752-757.
- [8] Bhardwaj U, McCabe ER. Multiplex-PCR assay for the deletions causing hereditary persistence of fetal hemoglobin [J]. Mol Diagn, 2005, 9 (3): 151-156.
- [9] Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, et al. Prenatal diagnosis of beta - thalassaemia by reverse dot-blot hybridization [J]. Prenat Diagn, 1999, 19 (5): 428-435.
- [10] Lin M, Zhu JJ, Wang Q, et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of common alpha and beta thalassemia in Chinese [J]. Blood Cells Mol Dis, 2012, 48 (2): 86-90.
- [11] Shin GW, Chung B, Jung GY, et al. Multiplex ligase-based genotyping methods combined with CE [J]. Electrophoresis, 2014, 35 (7): 1004-1016.
- [12] Wang XY, Lin MX, Lin M. A novel 6.3 kb deletion and the Rare 27.6 kb Deletion Causing α + -Thalassemia in two Chinese Patients [J]. Hemoglobin, 2016, 40 (5): 365-368.
- [13] 郝颖, 徐晓昕, 徐志勇, 等. 多重连接依赖性探针扩增技术在 α 地中海贫血产前诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32 (5): 683-686.
- [14] Colosimo A, Gatta V, Guida V, et al. Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements [J]. Blood Cells Mol Dis, 2011, 46 (2): 139-144.
- [15] Hanafi S, Hassan R, Bahar R, et al. Multiplex amplification refractory mutation system (MARMS) for the detection of β -globin gene mutations among the transfusion-dependent β -thalassemia Malay patients in Kelantan, Northeast of Peninsular Malaysia [J]. Am J Blood Res, 2014, 4 (1): 33-40.
- [16] Salehi R, Fisher CA, Bignell PA, et al. Identification of three novel mutations [-41 (A>C), codon 24 (-G), and IVS-I-109 (-T)], in a study of beta-thalassemia alleles in the Isfahan region of Iran [J]. Hemoglobin, 2010, 34 (1): 115-120.
- [17] Baig SM. Molecular diagnosis of beta - thalassemia by multiplex ARMS-PCR: a cost effective method for developing countries like Pakistan [J]. Prenat Diagn, 2007, 27 (6): 580-581.
- [18] Tindall EA, Petersen DC, Woodbridge P, et al. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments [J]. Hum Mutat, 2009, 30 (6): 876-883.
- [19] Ramezanzadeh M, Salehi M, Salehi R. Assessment of high resolution melt analysis feasibility for evaluation of beta-globin gene mutations as a reproducible, cost-efficient and fast alternative to the present conventional method [J]. Adv Biomed Res, 2016, 5: 71.
- [20] 余玲玲, 田可港, 冯晶晶, 等. HRM 技术检测 β -地中海贫血 IVS-2-654 (C>T) 与 -28 (A>G) 突变方法的建立及初步应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35 (8): 730-735.
- [21] 廖灿, 李茹, 魏明, 等. 高分辨率溶解曲线分析技术在快速产前诊断 β 地中海贫血中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47 (9): 692-694.
- [22] 张小庄, 尹爱华, 张亮, 等. 基于液相芯片系统诊断地中海贫血的方法及试剂盒与应用: 中国, 102277419 A [P]. 2011-12-14.
- [23] Li DZ, Yang YD. Invasive prenatal diagnosis of fetal thalassemia [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 39:41-52.
- [24] Nagan N, Faulkner NE, Curtis C, et al. Laboratory guidelines for detection, interpretation, and reporting of maternal cell contamination in prenatal analyses a report of the association for molecular pathology [J]. J Mol Diagn, 2011, 13 (1): 7-11.

致死性侏儒症 p.R248C 突变热点的快速检测和三例 TD-I 型高危胎儿的快速产前诊断

姜煜¹ 潘敬新² 郭东炜³ 艾阳¹ 李荣¹ 蒋玮莹¹ 方群⁴ 郭奕斌^{1*}

[摘要] 目的 针对致死性侏儒症 I 型(thanatophoric dysplasia type I, TD-I) *FGFR3* 基因的突变热点“p.R248C”, 建立快速特异的酶切鉴定法(restriction endonuclease testing, RE)和扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)/RE 法, 并应用于后续 3 例疑似 TD-I 高危胎儿的快速产前诊断, 以及时防止患胎出生, 同时为今后的胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)打下良好基础。方法 首先, 针对突变热点 p.R248C 突变前后的序列特点, 选择合适的内切酶“Afe I”, 建立酶切鉴定法。其次, 设计双错配碱基特异引物结合 *Apa* LI 酶切, 建立 ARMS/RE 双重特异鉴定法。对阴性和阳性结果均再用普通引物扩、测的结果进行验证。结果 用 *Afe* I 酶切 *FGFR3* 基因 exons(6-7) 普通引物的 PCR 产物(535 bp), 正常对照及非 p.R248C 突变的 TD 病例均能被切成 255 bp 和 280 bp 2 个片段, 而胎 1~胎 3 均切出 255 bp、280 bp 和 535 bp 3 个片段。用特异引物 E7(p.R248C) 扩增, 正常对照和非 p.R248C 突变的 TD 病例均扩增阴性, 无法进一步做酶切鉴定; 而 p.R248C 突变均扩增阳性, 当再用 *Apa* LI 酶切 PCR 产物(365 bp) 时, 胎 1~胎 3 均切出 22 bp 和 343 bp 2 个片段。通过引物扩、测结果显示: 胎 1~胎 3 均是 p.R248C 杂合突变。结论 该法快速特异、准确可靠, 可用于 p.R248C 突变热点的快速检测及含该突变高危胎儿的快速产前诊断。该法还可用于含 p.R248C 突变 TD-I 型家系的 PGD。胎 1~胎 3 都是 TD-I 患胎, 建议尽早终止妊娠。

[关键词] 致死性侏儒症 I 型; *FGFR3* 基因; p.R248C 突变; ARMS/RE 法; 快速检测; 产前基因诊断

Fast detection of thanatophoric dysplasia type I p.R248C mutation hot spots and rapid prenatal diagnosis of three TD type I high-risk fetuses

JIANG Yu¹, PAN Jingxin², GUO Dongwei³, AI Yang¹, LI Rong¹, JIANG Weiyang¹, FANG Qun⁴, GUO Yibin^{1*}

(1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Medical Science, Quanzhou, Fujian, China, 362000; 3. Clinical Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361102; 4. Fetal Medicine Center, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] Objective To build up the specific rapid methods of RE and ARMS/RE for mutation hotspot “p.R248C” in the *FGFR3* gene of thanatophoric dysplasia type I (TD-I), then use the method for rapid

基金项目: 闽粤合作科研基金(71010025)

作者单位: 1. 中山大学中山医学院医学遗传室, 广东, 广州 510080

2. 福建医科大学附属第二医院内科, 福建, 泉州 362000

3. 厦门大学医学院临床医学专业, 福建, 厦门 361102

4. 中山大学附属一院胎儿医学中心, 广东, 广州 510080

*通讯作者: 郭奕斌, E-mail: aguoabin@qq.com

注: 姜煜和潘敬新为并列第一作者

prenatal diagnosis of 3 follow-up high-risk fetuses of TD-I to stop the birth of suffering fetuses, at the same time, lay a good foundation of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for the future. **Methods** First, according to the characteristics of the sequence of the mutation hot spot p.R248C before and after mutation, the appropriate enzyme "Afe I" was selected to establish the identification method of enzyme digestion. After that, specific primers of double mismatch bases were devised, combining the method of digestion of *Apa* LI (ARMS/RE) to achieve the double identification. In the end, the sequences obtained by common primers were used to verify the negative and positive results through DNA sequencing. **Results** For the normal control and the patient without p.R248C mutation of TD-I, PCR products (535 bp) of exons (6-7) of *FGFR3* gene, amplified by common primers, could be digested into 2 fragments (255 bp and 280 bp) by *Afe* I. However, for fetuses 1-3, the PCR products could be digested into 3 fragments (255 bp, 280 bp and 535 bp). The normal control and the patient without p.R248C mutation of TD-I were negative using the specific primers E7(p.R248C), which could not be further identified by enzyme digestion. For the fetuses with p.R248C mutation of TD-I, PCR products (365 bp) of exon 7 of *FGFR3* gene, amplified by specific primers, could be digested by *Apa* LI and all the digested products were 22 bp and 343 bp. Sequencing results of common primers' products indicated: fetuses 1-3 were p.R248C heterozygous mutation. **Conclusions** The method is fast, accurate and reliable, which can be available for the fast detection of mutation hot spot p.R248C and the rapid prenatal diagnosis of high-risk fetus with p.R248C mutation. This method can also be applied to PGD of high-risk fetus of TD-I with the mutation "p.R248C". For the 3 high risk fetuses have been diagnosed with TD-I, the clinic suggested termination of pregnancy as soon as possible.

[KEY WORDS] Thanatophoric dysplasia type I; *FGFR3* gene; p.R248C mutation; ARMS/RE; Fast detection; Prenatal gene diagnosis

致死性侏儒症 (thanatophoric dysplasia, TD, MIM187600) 又称致死性骨发育不良, 是一种先天性、致死性的新生儿骨发育不良病, 为常染色体显性 (autosomal dominant, AD) 遗传, 该病主要表现为四肢显著短小, 肋骨极短, 胸廓极度狭窄, 四肢外旋或外展, 呈蛙式体态, 腹部膨胀, 巨颅, 前额隆凸, 脑部畸形等^[1-4]。新生儿发生率国内报道约为 1/40 000^[3], 国外报道为 1/20 000~1/50 000^[5]。患胎多半胎死腹中或于出生后不足 24 h 即因重症急性呼吸衰竭而夭折。TD 分 TD-I 和 TD-II 2 型, 其中, TD-I 型约占 85%, 主要表现为股骨短而弯曲, 无三叶草状颅骨^[6]; TD-II 型约占 15%, 长骨短、弯曲及椎骨扁平均较 I 型为轻, 患儿股骨较直, 颅骨为典型三叶草状^[7]。不同类型或同一类型的不同患者, 其病程进展是不同的^[8-9], 但一年存活率几乎为 0^[10]。

TD 是由成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, *FGFR3*) 基因发生病理突变所致, 目前已报道的 *FGFR3* 基因的突变类型有 12 种^[6-7]。其中 p.R248C 错义突变为 TD-I 最高发的致死突变, 突变率高达 55% 以上^[11]。因此针对该突变热点, 建立快速特异检测方法具有重要的实用价值。本文对高发突变的 TD 病例进行

了详细的方法学研究, 并应用所建立的快速特异检测法对 3 例疑似 TD-I 型的高危患胎进行了快速产前诊断, 均获得成功。

1 材料与方法

1.1 研究对象

近年来, 我室先后接诊疑似 TD-I 的高危胎儿多例, 这些病例、家系分别来自广东、甘肃、黑龙江、河南等地, 由各附属医院转诊而来, 本文重点介绍其中 3 例。其中, 家系 3 曾引产多次。各病例产前超声检查资料如下所述。

【病例 1】孕妇 23 岁, 妊娠 22 周, 2011 年超声检查发现: 胎儿双顶径 55 mm, 头围 195 mm, 胸围 120 mm, 腹围 171 mm, 胸围/腹围=0.7, 股骨长 16 mm, 羊水最大深度 42 mm。胎儿双顶径、头围与孕周相符, 但胸廓狭小, 股骨短而弯曲, 拟诊 TD。

【病例 2】孕妇 24 岁, 妊娠 23⁺³ 周, 2014 年 5 月超声测值: 胎儿双顶径 63 mm, 头围 227 mm, 腹围 233 mm, 股骨长径 17 mm, 肱骨长径 16 mm, 羊水最大前后径 62 mm。胎儿超声结构描述: 胎儿四肢可见, 双侧股骨、胫腓骨、肱骨、尺桡骨均缩短。省级医院二维+彩超+三维复查结果: 胎儿发育相当于 22 孕周。胎儿多发异常: (1) 软指标异常: 鼻骨缺

失,枕后皮层增厚。(2)骨骼系统异常:四肢极短小,弯曲(相当于15周);头型异常——苜蓿草状;胸廓狭小;脊柱向右侧侧弯;双手、双足小。拟诊TD。

【病例3】孕妇前后共孕育3次患胎,本次实验样品取自第三胎。第一胎于2011年行超声检查:中孕期胎儿彩超,Ⅲ级产前超声检查:双顶径70 mm(28周),头围245 mm,胸围132 mm,腹围200 mm(24周),股骨长径23 mm(17周),肱骨长径20 mm(16周),足长40 mm,羊水指数211 mm。超声结构描述:头颅增大,前额前凸;胸腔狭窄,胸围缩小,心胸比值增大(>0.6),腹部相对膨隆,胸围/腹围比值缩小(<0.89);胎儿四肢各长骨均可见,但双手呈握拳状,长骨明显缩短、弯曲,所有长骨长度均低于正常值的4倍标准差;羊水偏多。提示致死性骨发育不全改变。第二胎于2013年行超声检查:中孕期胎儿彩超,Ⅲ级产前超声检查:双顶径55 mm,头围200 mm,腹围180 mm,股骨长径40 mm,肱骨长径39 mm,羊水指数150 mm。超声估计平均胎龄:22周4天,胎儿体重(532±135)g。胎儿四肢各长骨均可见,但双手呈握拳状。第三胎于2014年行超声检查:中孕期胎儿彩超,Ⅲ级产前超声检查:双顶径62 mm,头围215 mm,腹围187 mm,股骨长径22 mm,肱骨长径19 mm,羊水指数218 mm。超声结构描述:头颅增大,胸腔狭窄,胸围缩小,双肺隐约可见,肋骨明显缩短,腹部相对膨隆。胎儿四

肢各长骨均可见,但双手呈握拳状,长骨明显缩短、弯曲,所有长骨长度均低于正常值的4倍标准差;羊水位于该孕周第96百分位数。拟诊TD。

本论文研究已得到中山大学伦理委员会的批准,所有受检者均完全知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA模板的制备

胎儿标本(羊水或脐血)和正常对照标本DNA的提取,按试剂盒说明书的步骤操作或采用本室已建立的方法进行^[12-13]。

1.2.2 普通引物和特异引物的设计及PCR扩增

以NM_000142作为*FGFR3*基因的参考序列,用Primer Premier 5.0软件自行设计引物。普通引物的名称、序列及扩增条件见表1。特异引物的设计思路:根据扩增受阻突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)^[13]原理,针对c.742C>T/p.R248C突变后的序列为“……GTGCTCCCCGCACCGGCCCATCC……”,我们人为增加一个错配碱基,把下游引物设计成能被“Apa LI”内切酶识别的特异引物“GTGCACCCCCGCACCGGCCCATCC”,其中“GTGCAC”正好能被Apa LI(G↓TGCAC)酶解。特异引物的名称、序列及扩增条件见表1。引物由北京六合华大基因科技有限公司广州分公司合成,聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)纯化。

表1 *FGFR3*基因 exon 7 的普通引物和特异引物及PCR条件

Table 1 Common primer and specific primer of exon 7 in *FGFR3* gene and PCR condition

| 名称 | 序列(5'-3') | 退火温度(℃) | 循环数 | 片段大小(bp) |
|-------------------|---|---------|-----|----------|
| FGFR3 E(6-7) | F:TGCCTCCGCTCACTCACCCG R:CCCAAATCCTCACGCAACCC | 64 | 38 | 535 |
| FGFR3 E7(p.R248C) | F:CGGCAGGGAGTTCCGCGGCGAG R:GGATGGGCCGGTGCAGGGGTGCA | 65 | 38 | 365 |

1.2.3 酶切鉴定(restriction endonuclease testing, RE)

1.2.3.1 普通引物PCR产物的Afe I酶切鉴定

取正常对照、非p.R248C突变的TD病例、胎1~胎3共5个样品的普通引物的PCR产物各7 μL,然后在每一管中依次加入Buffer(10×)2 μL、Afe I(10 U/μL)1 μL,补充三蒸水至20 μL,于37℃酶切30~60 min,然后65℃20 min终止反应,

所得酶切产物用1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3.2 特异引物PCR产物的Apa LI酶切鉴定(ARMS/RE法)

取扩增阳性(胎1~胎3)的PCR产物各7 μL,然后依次加入Buffer(10×)2 μL、Apa LI(10 U/μL)1 μL、补充三蒸水至20 μL,于37℃酶切2~3 h,然后于65℃20 min终止酶切,所得酶切产物用1.8%~2%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 测序鉴定

将普通引物及特异引物的扩增产物交北京六合华大基因科技有限公司广州分公司用 ABI PRISM 3730 型测序仪完成双向测序。

2 结果

2.1 普通引物的PCR产物的Afe I酶切结果

如图1所示,泳道lane简写成L, L1: 100 bp Marker, L2、L4、L6、L8、L10分别是N(正常标本)、M(非 p.R248C 突变)、胎1(F1)、胎2(F2)、胎3(F3)用普通引物扩增的产物(535 bp), L3、L5、L7、L9、L11 分别是 N、M、F1、F2、F3 用 Afe I 酶切的结果。正常和非 p.R248C 突变序列能被酶解,均切成 255 bp 和 280 bp 2 个片段(L3 和 L5), 而 p.R248C 的突变序列无法被酶解,所以杂合子经 Afe I 酶切后,均产生 255 bp、280 bp 和 535 bp 3 个片段(L7、L9 和 L11)。

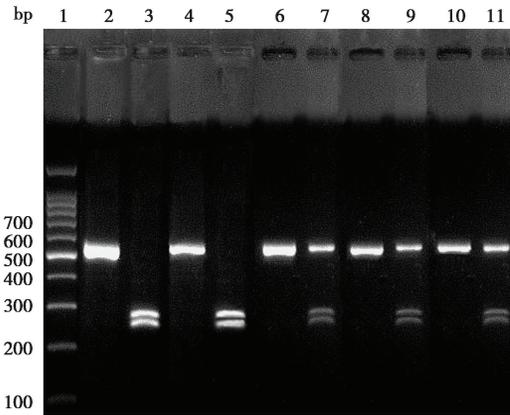


图1 Afe I 酶切鉴定 p.R248C 突变
Figure 1 Enzyme identification of p.R248C mutation with Afe I

2.2 特异引物的PCR产物的Apa LI酶切结果

如图2所示, M: 100 bp Marker; L1: 正常对照(扩增阴性); L2、L4、L6: 胎1、2、3(杂合子, 未切); L3、L5、L7: 胎1、2、3(杂合子, 已切); L8: 非 p.R248C 突变的病例(扩增阴性)。特异引物的扩增产物为 365 bp, 3 例患胎酶切后均产生 22 bp 和 343 bp 2 个片段。

2.3 测序结果

2.3.1 普通引物的测序结果

见图3, ①~④依次是: 正常对照、胎1、胎2、胎3的 FGFR3 E(6-7)部分序列比对图。①的正常对

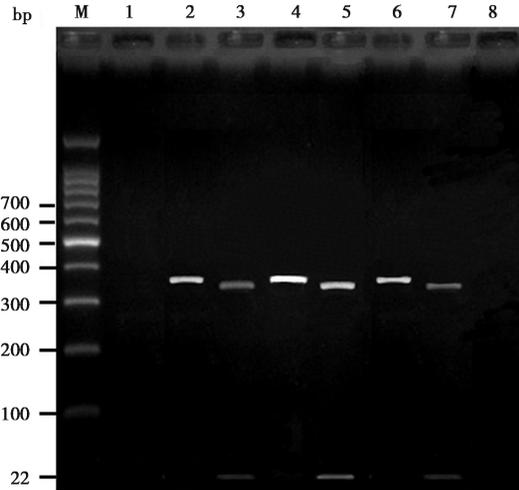
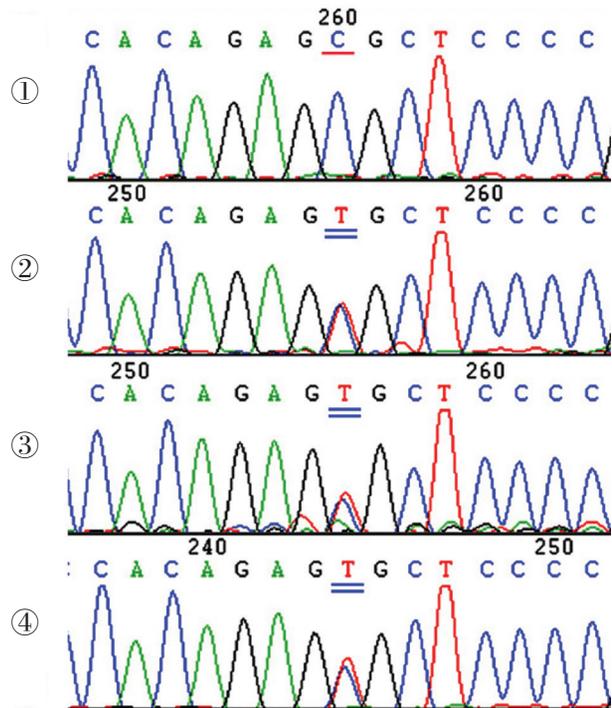


图2 Apa LI 酶切鉴定 p.R248C 突变
Figure 2 Enzyme identification of p.R248C mutation with Apa LI



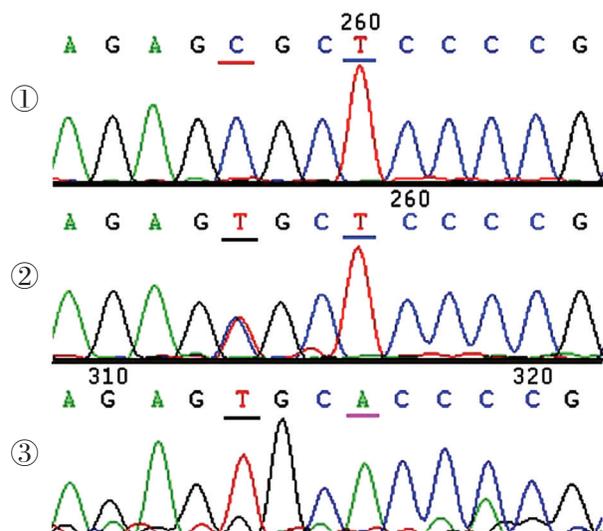
①~④: 分别是正常对照、胎1、胎2、胎3的 FGFR3 E(6-7)的测序结果

图3 普通引物扩增产物的部分正向序列比对图
Figure 3 The partial forward sequence alignment figure of the products amplified by using common primers

照为纯合序列 C/C, ②~④的胎1~胎3均为杂合序列 C/T。经分析证实, 患胎1~3的 FGFR3 基因均存在 c.742C>T/p.R248C 杂合突变, 为已报道的 TD-I 型的致病性突变。

2.3.2 特异引物的测序结果

如图4所示,图4的①~③分别代表:普通引物的正常纯合序列(为C,T)、普通引物的杂合突变序列(为C/T,T)、特异引物的双错配序列(为T,A)。第③排PCR产物的第312~317 bp含有我们设计的 *Apa* LI 单切点 G↓TGCAC。“T”是突变的碱基,“A”是我们人为错配的。从上述结果来看,经过特异引物扩增后,单错配的突变序列就会转变成含有 *Apa* LI 酶切位点的新序列,从而为随后的酶切鉴定奠定了基础。



①~③:分别代表普通引物扩增的正常序列和杂合突变序列以及特异引物扩增的双错配序列;下划线标出的2个碱基分别对应下游特异引物3'端的第1位和第4位的碱基

图4 普通引物和特异引物的扩增产物的测序结果

Figure 4 The sequencing results of the products amplified by using the common primer and specific primer respectively

3 讨论

TD-I型是一种先天性、致死性的AD遗传的短肢畸形病,通常胎死腹中或出生后不久即夭折。本病具有较典型的临床、影像学 and 病理学特征。超声检查是目前产前诊断本病的主要方法,但容易把TD与成骨不全II型(osteogenesis imperfecta type II, OI-II)、VIII型(osteogenesis imperfecta type VIII, OI-VIII)、软骨不发育I型和II型(achondrogenesis type I and type II, ACG-I和ACG-II)、窒息性胸廓发育不良(asphyxiating thoracic dysplasia, ATD)等相混淆,故需产前基因检测方能确诊。TD-I型危害严重,至今尚无有效的

治疗措施,快速检出突变、阐明病因进而对高危胎儿实施产前基因诊断是目前确诊及防治该病的最佳应对策略,也是开展早期产前诊断和胚胎植入前诊断的必要前提条件。

虽然本病多为散发病例,但近年来我室发现不少有遗传背景的家系,如家系3父母曾连续数胎孕育致死性侏儒症患胎,推测与父或母的生殖腺存在杂合突变嵌合体有关。对于有遗传背景的家系来说,自然受孕生出TD-I患胎的风险非常大,因此,最好采用胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)方法辅助生育。而进行PGD对检测时间有严格要求,需在24 h内完成遗传病的诊断,否则会影响植入和胚胎的存活,虽然目前已有新技术可采取囊胚期取卵裂球进行检测,延长了胚胎体外检测的时间,然而对于那些要求或需要在卵裂期植入胚胎的诊断来说则仍需严格控制时间,RE鉴定以及ARMS/RE双重特异鉴定全程只需3~4 h即可作出确诊,大大节省了检测时间,故特别适用于PGD。此外,由于TD-I是致死性的侏儒症,通常都要引产,故若能越早确诊,就越能减轻引产对孕妇的身心伤害。

建立RE法,是根据R248C突变前后序列的改变导致了酶切点的改变而设计的。对于E(6-7)普通引物来说,扩增产物为535 bp,突变前的正常序列是“CACAGAGCGCTCCCCG”(含有一个 *Afe* I “AGCGCT”酶切位点,能被 *Afe* I 切开),而发生c.742C>T突变后,序列变为“AGTGCT”,该 *Afe* I 酶切位点消失,故正常序列可被切出255 bp和280 bp 2个片段,而纯合突变无法被酶解,仍是535 bp;杂合子可切出255 bp、280 bp、535 bp 3个片段。因此实验结果中杂合患胎会显示3个片段。因此,用此酶即可鉴定有无p.R248C突变以及突变是杂合突变还是纯合突变。此处正常样品是作为阳性对照,而纯合突变作为阴性对照。

建立ARMS法,是因为它特异、快速、廉价,一次PCR即可鉴定。特异引物的扩增产物为365 bp,该引物对于突变序列来说,仅有1个碱基(即T>A)是错配的,而对于正常序列来说,则有2个碱基的错配(即C>T和T>A)。因此在控制好扩增条件时,就能让单错配的突变序列扩增阳性,而双错配的正常序列扩增阴性。阳性产物由于含有能被 *Apa* LI 识别的酶切位点(G↓TGCAC),因此扩增后可进一步用 *Apa* LI 作酶切鉴定,以提高其准确

性和可靠性。又由于杂合子突变其中一条是正常序列,无扩增产物,故杂合突变和纯合突变一样,酶切后均是产生 22 bp 和 343 bp 2 个片段。若要鉴定杂合突变和纯合突变,则可用普通引物鉴定,结果如上所述。

对于酶切鉴定,现有快切酶,5~10 min 即可完成鉴定,故只要试剂质量保证,用上述二法均可在半天内完成高危胎儿的快速产前诊断,尤其对于没有测序仪的基层单位特别适用,因此本法具有推广应用价值。

本文关于 RE 及 ARMS/RE 法成功建立和产前诊断的成功实施为今后继续开展本病以及其他相关遗传性骨病的快速产前基因诊断积累了宝贵的经验,奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision [J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A (5): 943-968.
- [2] Lemyre E, Azouz EM, Teebi AS, et al. Bone dysplasia series. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: review and update [J]. *Can Assoc Radiol J*, 1999, 50(3):185-197.
- [3] 刘权章. 临床遗传学彩色图谱[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006:319-320.
- [4] Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, et al. Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I [J]. *Neuropathology*, 2013, 33 (6):663-666.
- [5] Del Piccolo N, Placone J, Hristova K. Effect of thanatophoric dysplasia type I mutations on FGFR3 dimerization [J]. *Biophys J*, 2015, 108(2):272-278.
- [6] Sahinoglu Z, Uludogan M, Gurbuz A. Prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia in the second trimester: ultrasonography and other diagnostic modalities [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2003, 269(1):57-61.
- [7] Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, et al. Thanatophoric dysplasia (type I and II) caused by distinct mutations in FGFR3 [J]. *Nat Genet*, 1995, 9(3): 321-328.
- [8] Chih-Ping Chen, Schu-Rern Chern, Jin-Chung Shih. Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia [J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21: 89-95.
- [9] de Souza Cambraia VD, Rezende MA, Roquette Gomes KM. Severe acute respiratory failure caused by thanatophoric dysplasia. The report of two cases with different clinical developments [J]. *Pediatric Pulmonology*, 2016, 51(SI):S60-S61, Suppl: 42.
- [10] Monti E, Mottes M, Frascini P, et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2010, 6: 367-381.
- [11] Passos-Buena MR, Wilcox WR, Jabs EW, et al. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations [J]. *Human Mutat*, 1999, 14(2):115-125.
- [12] 郭奕斌, 潘宏达, 孟亚仙, 等. 突变特异性扩增系统和变性高效液相色谱分析法结合 DNA 测序法快速产前诊断黏多糖贮积症 II 型高危胎儿 [J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4(5):552-556.
- [13] 郭奕斌, 潘宏达, 郭春苗, 等. 双错配碱基 ARMS 结合 RE 法快速检测 FGFR3 基因的突变超热点 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2 (1):5-8.

DA8600 测序平台对 *EGFR* 基因检测最低 DNA 用量的探讨

曹治家¹ 张家彬¹ 李翠云¹ 吴英松^{2*}

[摘要] 目的 基于 DA8600 测序平台,探讨 AmpliSeq 建库方法检测 *EGFR* 基因突变所需最低样本 DNA 用量,以评估下一代测序(next generation sequencing, NGS)检测技术的性能。方法 本研究选择 10 例 *EGFR* 突变的石蜡包埋组织样本,分别取 1 ng、5 ng、10 ng、20 ng 样本 DNA 进行文库构建,使用 DA8600 半导体测序仪进行检测,并比较检测结果。结果 10 ng 和 20 ng DNA 用量均可全部准确检出 *EGFR* 基因突变;5 ng DNA 用量准确检出 7 例 *EGFR* 基因突变,1 例文库质量不合格无法进行测序,1 例无法检出 *EGFR* 突变,1 例测序数据量不足检测失败;1 ng DNA 用量构建文库全部质量不合格,无法进行测序。结论 通过对 10 例样本不同 DNA 用量构建文库的检测分析,说明 10 ng DNA 即可采用 AmpliSeq 建库方法在 DA8600 半导体测序仪进行 *EGFR* 基因突变检测。

[关键词] DA8600; *EGFR* 基因突变; DNA 测序用量

The lowest amount of DNA in *EGFR* gene sequencing by DA8600 sequencing platform

CAO Zhijia¹, ZHANG Jiabin¹, LI Cuiyun¹, WU Yingsong^{2*}

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

[ABSTRACT] Objective To discuss the minimum dosage of DNA in *EGFR* mutations detection by Ampliseq library construct method on DA8600 sequencing platform, and assess its feasibility in clinical molecular diagnostic applications. Methods 10 cases of paraffin - embedded tissue samples of *EGFR* mutations were selected, and 1 ng, 5 ng, 10 ng and 20 ng DNA were taken to construct libraries and then sequenced by DA8600, respectively. Results All the *EGFR* mutations in 10 samples could be detected while the libraries were constructed by 10 ng and 20 ng DNA; 7 *EGFR* mutations could be detected while the libraries were constructed by 5 ng DNA; 1 *EGFR* mutation couldn't be sequenced because of substandard library; 1 *EGFR* mutation couldn't be detected; and 1 *EGFR* mutation had too less sequencing data to analyze. And all the samples couldn't be sequenced because of the substandard libraries which were constructed by 1 ng DNA. Conclusion Using AmpliSeq library construct method, 10 ng DNA is enough for *EGFR* mutation detection in DA8600 sequencing platform.

[KEY WORDS] DA8600; *EGFR* mutations; DNA sequencing dosage

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

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:吴英松, E-mail:wg@smu.edu.cn

DA8600型基因测序仪是新一代的高通量测序产品,基于半导体技术,通过实时检测DNA聚合反应时自然产生的H⁺离子流pH值变化获得碱基序列信息,无需激发光源和光学检测设备,无需焦磷酸酶化学级联,无需标记荧光染料和化学发光的配套试剂,具有检测速度快、运行成本低、操作自动化程度高、实验灵活性好等特点^[1-3],在妇婴生育保健领域,尤其是无创产前筛查、新生儿遗传病筛查、胚胎移植前染色体异常/遗传病检测等方面带来了新的机遇^[4-5]。

*EGFR*基因位于7p12,编码酪氨酸激酶型受体。*EGFR*的酪氨酸激酶功能区由外显子18~24编码。*EGFR*与配体结合形成二聚体激活细胞内的激酶通路,进一步诱导下游通路的磷酸化,诱导细胞增殖。腺癌*EGFR*基因突变的发生率在亚洲人群达到50%,在不吸烟者、女性以及非粘液性肿瘤中发生率更高^[6-7]。迄今为止发现的*EGFR*基因突变主要位于外显子18~21,尤其是G719S和L858R,与肿瘤细胞对酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinases inhibitors, TKI)的敏感度密切相关^[8-9]。*EGFR*酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)能特异性地抑制具有*EGFR*基因突变的非小细胞肺癌的生长,改善预后^[10]。因此,《非小细胞肺癌临床实践指南(中国版)》^[11]推荐,在使用酪氨酸激酶抑制剂治疗前,肺癌患者进行*EGFR*基因的突变检测。

目前,应用二代测序技术检测*EGFR*基因突变的方法有多种。但在采用二代测序技术对肿瘤样本进行检测过程中,经常面临着样本量少、数据量大等挑战。本研究针对临床检测过程中组织样本

获取困难、样本量少的问题,通过DA8600测序平台,采用AmpliSeq方法,分别对10例*EGFR*突变石蜡包埋组织样本进行DNA建库用量的梯度检测,旨在探讨二代测序检测方法所需最小样本DNA用量,为临床上检测*EGFR*基因突变提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本采集

选取10例*EGFR*基因突变石蜡包埋组织样本[采用Sanger测序法和下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术验证其突变类型及频率],具体突变型别见表1。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂

环保脱蜡剂(广州和实生物技术有限公司); QIAamp DNA FFPE Tissue KIT(50)(Qiagen公司,德国); Qubit dsDNA HS Assay Kit, Nuclease-Free Water, Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0, Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit, Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit(Thermo Fisher Scientific公司,美国);氢氧化钠溶液(Sigma公司,美国);无水乙醇(分析纯)(广州化学试剂厂)。

1.2.2 主要仪器

K30B恒温金属浴(杭州奥盛仪器有限公司); 5430小型高速离心机(Eppendorf公司,德国); Qubit® 3.0荧光定量仪, ABI7500荧光定量PCR仪, Ion One Touch™ 2.0 System(Thermo Fisher Scientific公司,美国); DA8600测序仪(中山大学达安基因股份有限公司)。

表1 样本*EGFR*基因突变型别

Table 1 The *EGFR* gene mutants of samples

| 样本名称 | 基因名称 | COSMIC ID | 突变名称 | 碱基变化 | 突变频率(%) |
|-------|-------------|-----------|----------------------|------------------|---------|
| FL-1 | <i>EGFR</i> | COSM6255 | p.L747_S752delLREATS | c.2239_2256del18 | 18.0 |
| FL-2 | <i>EGFR</i> | COSM6239 | p.G719A | c.2156G>C | 23.2 |
| FL-3 | <i>EGFR</i> | COSM6224 | p.L858R | c.2573T>G | 48.5 |
| FL-4 | <i>EGFR</i> | COSM12370 | p.L747_P753>S | c.2240_2257del18 | 61.0 |
| FL-5 | <i>EGFR</i> | COSM6224 | p.L858R | c.2573T>G | 8.3 |
| FL-6 | <i>EGFR</i> | COSM6223 | p.E746_A750delELREA | c.2235_2249del15 | 22.2 |
| FL-7 | <i>EGFR</i> | COSM6224 | p.L858R | c.2573T>G | 14.9 |
| FL-8 | <i>EGFR</i> | COSM6224 | p.L858R | c.2573T>G | 37.7 |
| FL-9 | <i>EGFR</i> | COSM6225 | p.E746_A750delELREA | c.2236_2250del15 | 23.4 |
| FL-10 | <i>EGFR</i> | COSM6224 | p.L858R | c.2573T>G | 58.3 |

1.3 方法

1.3.1 样本 DNA 提取

采用环保脱蜡剂对石蜡包埋组织样本进行脱蜡处理,按照 QIAamp DNA FFPE Tissue KIT 说明书提取样本 DNA,并采用 Qubit® 3.0 荧光定量仪进行定量,然后每个样本稀释到 5 ng/μL。

1.3.2 文库构建

每个样本分别取 1 ng、5 ng、10 ng、20 ng,按照 Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 试剂盒说明书进行文库构建。经过磁珠纯化后采用 50 μL 洗脱液进行洗脱,得到文库样本。

1.3.3 文库定量

取 2 μL 文库样本,采用 Qubit® 3.0 荧光定量仪进行定量,定量浓度为 Too Low 的文库质量不合格。根据定量浓度把合格文库等质量混合,混合采用 Qubit® 3.0 荧光定量仪进行定量,并稀释到 100 pmol/L,然后进行模板制备。

1.3.4 模板制备与富集

取 8 μL 混合文库和 200 μL ISP 磁珠,按照 Ion PI™ Hi-Q™ OT2 Reagents 200 kit 说明书进行模板制备;然后离心回收制备好的模板,通过 Ion One Touch™ ES 的磁珠技术分离富集得到阳性模板。

1.3.5 上机测序

在富集的阳性模板中,加入质控模板,按照 Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit 说明书进行上机测序。

1.3.6 结果分析

利用测序仪配套服务器和软件进行序列比对和分析。

运行 Coverage Analysis 插件,得到各样本“数据量”、“平均深度”等信息。

运行 Variant Caller 插件,得到样本的分析结果。在“Allele Name”列中筛选出样本对应的 COSMIC ID,该行信息即为对应位点的测序结果。

表3 构建文库的 DNA 样本用量

Table 3 The amount of samples DNA in library construction

| 样本名称 | 浓度(ng/μL) | 体积(μL) | DNA量(ng) |
|----------|-----------|--------|----------|
| FL-1-1 | 5.68 | 0.18 | 1.00 |
| FL-2-1 | 5.12 | 0.20 | 1.00 |
| FL-3-1 | 4.97 | 0.20 | 1.00 |
| FL-4-1 | 5.23 | 0.19 | 1.00 |
| FL-5-1 | 4.95 | 0.20 | 1.00 |
| FL-6-1 | 5.34 | 0.19 | 1.00 |
| FL-7-1 | 5.41 | 0.18 | 1.00 |
| FL-8-1 | 5.05 | 0.20 | 1.00 |
| FL-9-1 | 5.18 | 0.19 | 1.00 |
| FL-10-1 | 6.03 | 0.17 | 1.00 |
| FL-1-5 | 5.68 | 0.88 | 5.00 |
| FL-2-5 | 5.12 | 0.98 | 5.00 |
| FL-3-5 | 4.97 | 1.01 | 5.00 |
| FL-4-5 | 5.23 | 0.96 | 5.00 |
| FL-5-5 | 4.95 | 1.01 | 5.00 |
| FL-6-5 | 5.34 | 0.94 | 5.00 |
| FL-7-5 | 5.41 | 0.92 | 5.00 |
| FL-8-5 | 5.05 | 0.99 | 5.00 |
| FL-9-5 | 5.18 | 0.97 | 5.00 |
| FL-10-5 | 6.03 | 0.83 | 5.00 |
| FL-1-10 | 5.68 | 1.76 | 10.00 |
| FL-2-10 | 5.12 | 1.95 | 10.00 |
| FL-3-10 | 4.97 | 2.01 | 10.00 |
| FL-4-10 | 5.23 | 1.91 | 10.00 |
| FL-5-10 | 4.95 | 2.02 | 10.00 |
| FL-6-10 | 5.34 | 1.87 | 10.00 |
| FL-7-10 | 5.41 | 1.85 | 10.00 |
| FL-8-10 | 5.05 | 1.98 | 10.00 |
| FL-9-10 | 5.18 | 1.93 | 10.00 |
| FL-10-10 | 6.03 | 1.66 | 10.00 |
| FL-1-20 | 5.68 | 3.52 | 20.00 |
| FL-2-20 | 5.12 | 3.91 | 20.00 |
| FL-3-20 | 4.97 | 4.02 | 20.00 |
| FL-4-20 | 5.23 | 3.82 | 20.00 |
| FL-5-20 | 4.95 | 4.04 | 20.00 |
| FL-6-20 | 5.34 | 3.75 | 20.00 |
| FL-7-20 | 5.41 | 3.70 | 20.00 |
| FL-8-20 | 5.05 | 3.96 | 20.00 |
| FL-9-20 | 5.18 | 3.86 | 20.00 |
| FL-10-20 | 6.03 | 3.32 | 20.00 |

表2 样本 DNA 提取浓度

Table 2 The concentration of extracted samples DNA

| 样本名称 | 洗脱体积(μL) | 原液浓度(ng/μL) | 稀释后浓度(ng/μL) |
|-------|----------|-------------|--------------|
| FL-1 | 100 | 43.7 | 5.68 |
| FL-2 | 100 | 19.9 | 5.12 |
| FL-3 | 100 | 31.5 | 4.97 |
| FL-4 | 100 | 32.9 | 5.23 |
| FL-5 | 100 | 17.0 | 4.95 |
| FL-6 | 100 | 17.9 | 5.34 |
| FL-7 | 100 | 27.8 | 5.41 |
| FL-8 | 100 | 14.2 | 5.05 |
| FL-9 | 100 | 25.5 | 5.18 |
| FL-10 | 100 | 40.7 | 6.03 |

2 结果

2.1 样本 DNA 提取结果

采用 QIAamp DNA FFPE Tissue KIT 试剂盒对 10 例石蜡包埋组织样本进行 DNA 提取, 100 μL 洗脱液进行洗脱, Qubit[®]3.0 荧光定量仪定量结果如表 2。

2.2 文库构建样本用量

按照 Ion AmpliSeq[™] Library Kit 2.0 试剂盒说明书, 分别取 1 ng、5 ng、10 ng、20 ng 的样本进行文库构建, 各样本用量如表 3。

2.3 文库定量结果

文库构建完成后, 采用 Qubit[®] 3.0 荧光定量仪定量, 结果如表 4, 1 ng DNA 构建的文库浓度均为 Too Low; 5 ng DNA 构建的文库有 1 例为 Too Low, 其他在 0.084~0.783 ng/ μL ; 10 ng DNA 构建的文库浓度在 0.367~1.14 ng/ μL ; 20 ng DNA 构建的文库浓度在 0.707~1.31 ng/ μL 。文库浓度为 Too Low 的不合格, 不能进行进一步测序。把合格的文库进行混样, 混样体积如表 4, 混合后样本浓度为 0.402 ng/ μL 。

2.4 测序结果

按照试剂盒说明书运行分析插件 Variant Caller 和 Coverage Analysis, 检测结果如表 5, 5 ng DNA 构建的文库上机检测 9 例, 2 例检测结果不符合: FL-5-5 样本 COSM6224 位点的“Frequency”为 2.2% (< 5%), 判定为野生型; FL-7-5 样本“数据量”小于 0.2M, “平均深度”小于 1000, 样本数据量不足, 检测失败; 10 ng DNA 构建的文库上机检测 10 例, “数据量”均大于 0.2M, “平均深度”均大于 1000, “突变频率”均大于 5%, “覆盖度”均大于 2500, 检测结果全部符合要求; 20 ng DNA 构建的文库上机检测 10 例, “数据量”均大于 0.2M, “平均深度”均大于 1000, “突变频率”均大于 5%, “覆盖度”均大于 2500, 检测结果全部符合要求。

2.5 检测结果汇总

根据文库构建及上机检测结果, 比较不同 DNA 建库用量的检出率, 如表 6, 1 ng DNA 量建库合格率为 0, 无法进行上机测序; 5 ng DNA 建库合格率为 90%, 测序结果符合率为 77.78%; 10 ng DNA 建库合格率为 100%, 测序结果符合率为 100.00%; 20 ng DNA 建库合格率为 100%, 测序结果符合率为 100.00%。

表 4 文库定量及混样

Table 4 Quantitative and mixed the library

| 样本名称 | 浓度 (ng/ μL) | 是否合格 | 混样体积 (μL) |
|----------|----------------------------|------|---------------------------|
| FL-1-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-2-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-3-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-4-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-5-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-6-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-7-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-8-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-9-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-10-1 | Too Low | 否 | - |
| FL-1-5 | 0.599 | 是 | 4.17 |
| FL-2-5 | 0.350 | 是 | 7.14 |
| FL-3-5 | 0.084 | 是 | 29.76 |
| FL-4-5 | 0.553 | 是 | 4.52 |
| FL-5-5 | 0.783 | 是 | 3.19 |
| FL-6-5 | 0.156 | 是 | 16.03 |
| FL-7-5 | 0.208 | 是 | 12.02 |
| FL-8-5 | Too Low | 否 | - |
| FL-9-5 | 0.269 | 是 | 9.29 |
| FL-10-5 | 0.151 | 是 | 16.56 |
| FL-1-10 | 0.367 | 是 | 6.81 |
| FL-2-10 | 1.120 | 是 | 2.23 |
| FL-3-10 | 0.513 | 是 | 4.87 |
| FL-4-10 | 0.768 | 是 | 3.26 |
| FL-5-10 | 0.852 | 是 | 2.93 |
| FL-6-10 | 1.140 | 是 | 2.19 |
| FL-7-10 | 0.491 | 是 | 5.09 |
| FL-8-10 | 1.020 | 是 | 2.45 |
| FL-9-10 | 0.464 | 是 | 5.39 |
| FL-10-10 | 0.599 | 是 | 4.17 |
| FL-1-20 | 1.250 | 是 | 2.00 |
| FL-2-20 | 0.707 | 是 | 3.54 |
| FL-3-20 | 1.310 | 是 | 1.91 |
| FL-4-20 | 0.939 | 是 | 2.66 |
| FL-5-20 | 1.010 | 是 | 2.48 |
| FL-6-20 | 1.110 | 是 | 2.25 |
| FL-7-20 | 0.747 | 是 | 3.35 |
| FL-8-20 | 0.806 | 是 | 3.10 |
| FL-9-20 | 0.689 | 是 | 3.63 |
| FL-10-20 | 1.100 | 是 | 2.27 |

“-”表示该样本没有进行混样

表5 样本测序结果

Table 5 The sequencing results of samples

| 样本名称 | 数据量 | 平均深度 | 位点信息 | | |
|----------|---------|-------|-----------|---------|------|
| | | | COSMIC 编号 | 突变频率(%) | 覆盖度 |
| FL-1-5 | 2526102 | 22601 | COSM6255 | 17.9 | 4000 |
| FL-1-10 | 2172807 | 21683 | COSM6255 | 18.8 | 3996 |
| FL-1-20 | 2545793 | 25392 | COSM6255 | 19.1 | 3997 |
| FL-2-5 | 2518503 | 23092 | COSM6239 | 22.7 | 4000 |
| FL-2-10 | 2679229 | 24305 | COSM6239 | 24.3 | 4000 |
| FL-2-20 | 2350350 | 20624 | COSM6239 | 24.2 | 3997 |
| FL-3-5 | 2130246 | 17740 | COSM6224 | 46.9 | 3996 |
| FL-3-10 | 2791743 | 28194 | COSM6224 | 51.4 | 4000 |
| FL-3-20 | 3205310 | 30556 | COSM6224 | 48.8 | 4000 |
| FL-4-5 | 3354610 | 33638 | COSM12370 | 60.0 | 4000 |
| FL-4-10 | 2614800 | 21068 | COSM12370 | 63.1 | 3998 |
| FL-4-20 | 2307334 | 19956 | COSM12370 | 62.0 | 3997 |
| FL-5-5 | 2841840 | 28385 | COSM6224 | 2.2 | 4000 |
| FL-5-10 | 2529252 | 18974 | COSM6224 | 8.3 | 4000 |
| FL-5-20 | 3009146 | 28333 | COSM6224 | 7.9 | 4000 |
| FL-6-5 | 2615715 | 25545 | COSM6223 | 21.6 | 3999 |
| FL-6-10 | 2235256 | 19862 | COSM6223 | 21.2 | 3997 |
| FL-6-20 | 2441195 | 19266 | COSM6223 | 22.1 | 3997 |
| FL-7-5 | 126705 | 368.6 | COSM6224 | 14.1 | 44 |
| FL-7-10 | 2749885 | 27869 | COSM6224 | 15.6 | 4000 |
| FL-7-20 | 2564003 | 24224 | COSM6224 | 14.9 | 3997 |
| FL-8-10 | 2297427 | 14156 | COSM6224 | 38.8 | 3997 |
| FL-8-20 | 3145417 | 26353 | COSM6224 | 37.2 | 4000 |
| FL-9-5 | 2071940 | 20541 | COSM6225 | 22.1 | 3994 |
| FL-9-10 | 3847114 | 39376 | COSM6225 | 23.3 | 4000 |
| FL-9-20 | 2459503 | 21030 | COSM6225 | 24.7 | 3999 |
| FL-10-5 | 2448494 | 19251 | COSM6224 | 59.4 | 3998 |
| FL-10-10 | 2417268 | 11989 | COSM6224 | 58.9 | 3997 |
| FL-10-20 | 3620911 | 36003 | COSM6224 | 55.8 | 4000 |

“数据量”和“平均深度”是指样本整体检测数据;“突变频率”和“覆盖度”是对应样本“COSMIC 编号”位点的相关信息

表6 不同DNA用量检出率

Table 6 The detection rate of different amount of DNA samples

| DNA 用量(ng) | 文库构建 | | | 检测结果 | | |
|------------|------|-----|--------|------|-----|--------|
| | 文库合格 | 样本数 | 合格率(%) | 结果符合 | 样本数 | 符合率(%) |
| 1 | 0 | 10 | 0 | - | - | - |
| 5 | 9 | 10 | 90 | 7 | 9 | 77.78 |
| 10 | 10 | 10 | 100 | 10 | 10 | 100.00 |
| 20 | 10 | 10 | 100 | 10 | 10 | 100.00 |

“-”表示样本未检测

3 讨论

2015年美国奥巴马颁布“精准医学计划”(precision medicine initiative, PMI),“精准医学计划”被《Nature》杂志列为2015年度十大科学事件之一^[12]。基因测序技术作为“精准医学计划”的核心飞速发展,NGS作为基因组学领域中增长最快的子行业,成为测序市场的主流。半导体测序技术是目前市场上主流的测序技术之一,DA8600测序仪是中山大学达安基因股份有限公司与Life Technologies公司合作开发的半导体测序系统,该系统采用天然核苷酸和聚合酶,无需激发光源、荧光标记、焦磷酸酶化学级联以及照相系统,而是通过直接实时检测测序时产生的氢离子浓度,有效提高碱基判读准确性^[13-15]。测序反应开始5 min后即开始得到测序数据,测序芯片反应微孔大于160M,产出数据量可达10G。相比一代测序具有检测快速,通量高,能同时检测出多种不同的突变型别等优势^[1-2,16]。本研究旨在探讨二代测序检测方法所需样本DNA用量,为临床上检测EGFR基因突变提供参考。

有文献显示,来源于肿瘤FFPE样本的10 ng DNA即可采用Ampliseq建库方法进行基因突变检测^[17]。本研究中对10例EGFR基因突变的肺癌石蜡包埋组织样本分别取1 ng、5 ng、10 ng、20 ng进行文库构建并对文库合格样本进行测序^[18-20]:采用1 ng DNA进行文库构建的10例样本,全部文库质量不合格,无法进行正常测序;采用5 ng DNA进行文库构建10例样本,1例样本文库质量不合格,1例样本数据量不足,1例检测结果判定为野生型;采用10 ng DNA进行文库构建的10例样本,检测结果均与原检测结果相符合;采用20 ng DNA进行文库构建的10例样本,检测结果均与原检测结果相符合。上述研究结果与文献报道结果相符合,说明来源于肿瘤FFPE样本的10 ng DNA即可采用Ampliseq建库方法在DA8600测序平台上进行EGFR基因突变检测。这对于临床上组织样本获取困难、样本量少的问题具有重要现实意义,即可实现样本基因突变检测的准确性,又可有效提高样本利用率,为患者的诊断和治疗提供更多的参考信息。

NGS测序技术相较一代测序和荧光PCR法具有通量高、灵敏度高、数据量大、样本用量少等优势,是未来临床基因检测的主力。但NGS技术作

为新兴行业,技术标准还不完善,临床应用还不广泛。因此,本研究组下一步将对DA8600测序平台检测EGFR基因突变的频率检测范围进行研究,以期进一步了解NGS技术的检测性能,为临床中肿瘤靶向基因的检测提供参考,提高肿瘤的分子诊断以及个体化诊疗水平。

参考文献

- [1] Life. Ion Chef System [EB/OL]. <http://www.thermo-fisher.com/cn/zh/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/prepare-template/ion-torrent-next-generation-sequencing-ion-chef-system.html>. 2015-07-28/2016-09-07.
- [2] 中山大学达安基因股份有限公司. 测序仪 [EB/OL]. <http://www.daangene.com.cn/product/info.aspx?MID=02060206>. 2014-12-17/2016-09-07.
- [3] Salto-Tellez M, de Castro DG. Next generation sequencing: a change of paradigm in molecular diagnostic validation [J]. J Pathol, 2014, 234(1):5-10.
- [4] 李晟,程福东,孙啸. 高通量DNA测序技术与基本诊断及预防 [J]. 生物医学工程与临床, 2016, 20(2):210-215.
- [5] 鲍芸,肖艳群,王华梁. 高通量测序技术在无创产前筛查中的临床应用及研究进展 [J]. 检验医学, 2016, 31(6):541-545.
- [6] Wu K, Huang RS, House L, et al. Next-generation sequencing for lung cancer [J]. Future Oncol, 2013, 9(9):1323-1336.
- [7] Joseph Schlessinger. Cell signaling by receptor tyrosine kinases [J]. Cell, 2000, 103:211-225.
- [8] Arcila ME, Nafa K, Chaft JE, et al. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(2):220-229.
- [9] Su KY, Chen HY, Li KC, et al. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(4):433-440.
- [10] Yu JY, Yu SF, Wang SH, et al. Clinical outcomes of EGFR-TKI treatment and genetic heterogeneity in lung adenocarcinoma patients with EGFR mutations on exons 19 and 21 [J]. Chin J Cancer, 2016, 35(30):1-10.
- [11] NCCN. 非小细胞肺癌临床实践指南(中国版) [EB/OL]. <http://www.nccn.org>. 2016-01-25/2016-09-07.

- [12] 生物探索. Nature: 2015 年度十大科学事件出炉 [EB/OL]. <http://www.biodiscover.com/news/research/124778.html>. 2015-12-13/2016-09-07.
- [13] Golan D, Medvedev P. Using state machines to model the ion torrent sequencing process and to improve read error rates [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29 (13): 344-351.
- [14] Parson W, Strobl C, Huber G, et al. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, 7(5):543-549.
- [15] 刘宇轩, 张文琼, 黄代新. 测序新技术 Ion Torrent PGM 及其法医学应用 [J]. *中国法医学杂志*, 2015, 30(1):52-55.
- [16] 广州市达瑞生物技术股份有限公司. 产品中心 [EB/OL]. <http://www.daruibiotech.com/products/pro.aspx?typename=%E9%AB%98%E9%80%9A%E9%87%8F%E6%B5%8B%E5%BA%8F%E5%B9%B3%E5%8F%B0>. 2015-05-18/2016-09-07.
- [17] Peng Fang, Zhenyu Yan, Paul Labrousse, et al. Onco-mine focus assay: Simultaneous detection of clinically relevant hotspot mutations, CNVs, and gene fusions in 52 oncogenes relevant to solid tumors [J]. *Cancer Research*, 2016, 76(14):1397.
- [18] Pop LA, Puscas E, Pileczki V, et al. Quality control of ion torrent sequencing library [J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14(2):93-101.
- [19] Caboche S, Audebert C, Lemoine Y, et al. Comparison of mapping algorithms used in high-throughput sequencing: application to ion torrent data [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):264.
- [20] Lin MT, Mosier SL, Thiess M, et al. Clinical validation of KRAS, BRAF, and EGFR mutation detection using next - generation sequencing [J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 141(6):856-866.

(上接第 227 页)

- [25] Schrijver I, Cherny SC, Zehnder JL. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples: a comprehensive survey of current diagnostic practices in 35 molecular diagnostic laboratories [J]. *J Mol Diagn*, 2007, 9 (3): 394-400.
- [26] 耿娟, 刘畅, 周香城, 等. 微滴式数字 PCR 技术用于检测产前诊断标本母体细胞污染的初步研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52 (2): 93-97.
- [27] 陈亚军, 杨学煌, 曾宪琪, 等. 多重连接依赖式探针扩增技术在 α 地中海贫血基因诊断与产前诊断中的应用 [J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34 (7): 591-594.
- [28] Minear MA, Lewis C, Pradhan S, et al. Global perspectives on clinical adoption of NIPT [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35 (10): 959-967.
- [29] Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma [J]. *Lancet*, 2002, 360 (9338): 998-1000.
- [30] Li Y, Di Naro E, Vitucci A, et al. Size fractionation of cell-free DNA in maternal plasma improves the detection of a paternally inherited beta-thalassemia point mutation by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2009, 25 (2): 246-249.
- [31] 王逾男. 基于孕妇外周血浆游离胎儿 DNA 的地中海贫血无创产前基因诊断研究进展 [J]. *中国产前诊断杂志*, 2016, 8 (1): 48-53.
- [32] Ho SS, Chong SS, Koay ES, et al. Microsatellite markers within --SEA breakpoints for prenatal diagnosis of HbBarts hydrops fetalis [J]. *Clin Chem*, 2007, 53 (2): 173-179.
- [33] Yan TZ, Mo QH, Cai R, et al. Reliable detection of paternal SNPs within deletion breakpoints for non-invasive prenatal exclusion of homozygous α -thalassemia in maternal plasma [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e24779.
- [34] Chan K, Yam I, Leung KY, et al. Detection of paternal alleles in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis of beta - thalassemia: a feasibility study in southern Chinese [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010, 150 (1): 28-33.
- [35] Hudecova I, Chiu RW. Non-invasive prenatal diagnosis of thalassemias using maternal plasma cell free DNA [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 39: 63-73.
- [36] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19920-19925.

曼氏迭宫绦虫中亮氨酸氨基肽酶基因的生物信息学分析和转录水平检测

李奕基¹ 符瑞佳¹ 周晓君² 尹飞飞¹ 梁鹏¹ 吕刚¹ 梁培^{1*}

[摘要] 目的 检测曼氏迭宫绦虫的3个亮氨酸氨基肽酶亚类(leucine aminopeptidases of *Spirometra mansoni*, SmLAPs)基因在虫体不同发育阶段的转录水平,为进一步病原诊断研究奠定基础。方法 运用生物信息学相关软件对3个亮氨酸氨基肽酶亚类编码蛋白的氨基酸序列的功能区域、免疫学特征、信号肽和跨膜区预测分析。应用 Real time PCR 方法检测 SmLAPs 在曼氏迭宫绦虫的成节、孕节和裂头蚴阶段的转录水平。结果 对 SmLAPs 编码氨基酸序列的保守区域进行比对,SmLAPa 与 SmLAPb、SmLAPc 的氨基酸序列一致性均为 38%,SmLAPb 和 SmLAPc 的一致性也只有 44%。多功能位点分析发现,SmLAPs 均含有底物结合位点、锌离子结合位点和多肽结合位点。在 B 细胞线性表位预测结果显示,SmLAPa 有 13 个、SmLAPb 有 14 个、SmLAPc 有 13 个。T 细胞表位预测中,SmLAPa 有 12 个、SmLAPb 有 13 个、SmLAPc 有 14 个。3 个 SmLAPs 亚类序列中均含有一个强烈的信号肽,并且均没有跨膜区域。在虫体各个发育阶段的转录水平检测中,在成节阶段,SmLAPb 的转录水平是 SmLAPa 的 1.34 倍,SmLAPc 的转录水平是 SmLAPa 的 46.53 倍。在孕节阶段,SmLAPb 的转录水平是 SmLAPa 的 1.96 倍,SmLAPc 的转录水平是 SmLAPa 的 56.89 倍。在裂头蚴阶段,只有 SmLAPc 有转录,没有检测到 SmLAPa 和 SmLAPb 的转录。结论 在 3 个 SmLAPs 亚类基因中,SmLAPc 是裂头蚴病更有价值的免疫诊断分子。

[关键词] 曼氏迭宫绦虫;亮氨酸氨基肽酶亚类;生物信息特征;转录水平;免疫诊断分子

Bioinformatics analysis, transcriptional level detection of leucine aminopeptidases from *Spirometra mansoni*

LI Yiji¹, FU Ruijia¹, ZHOU Xiaojun², YIN Feifei¹, LIANG Peng¹, LV Gang¹, LIANG Pei^{1*}

(1. School of Tropical Medicine and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China, 571199; 2. Clinical Laboratory, Hainan Province People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570311)

[ABSTRACT] Objective To detect transcription levels of 3 leucine aminopeptidases from *Spirometra mansoni* in different developmental stages of the parasite, which lays a foundation for pathogenic diagnosis of further study. Methods Using bioinformatics software, the functional region, immunological characteristics, signal peptide and transmembrane domain of SmLAPs were analyzed. The transcriptional levels of SmLAPs at mature proglottid, gravid proglottid and sparganum stages were detected. Results In the alignment of conserved domains of SmLAPs, the amino acid sequence identities of SmLAPa were 38% compared with SmLAPb and SmLAPc. The identity between SmLAPb and SmLAPc was 44%. Multi-functional sites analysis found that SmLAPs contained substrate binding sites, zinc ion binding sites and peptide binding sites. In the prediction of B cell epitopes, SmLAPa and SmLAPc had 13 B cell epitopes, while SmLAPb had 14

基金项目:国家自然科学基金课题(81560332);海南省自然科学基金课题(814298)

作者单位:1. 海南医学院热带医学与检验医学院,海南,海口 571199

2. 海南省人民医院检验科,海南,海口 570311

*通讯作者:梁培, E-mail: liangpeilp2012@163.com

B cell epitopes. The T cell epitope prediction showed that *SmLAPa*, *SmLAPb* and *SmLAPc* contained 12, 13 and 14 T cell epitopes, respectively. 3 *SmLAPs* had strong signal peptides. In addition, there were no transmembrane regions in the amino acid sequences. The transcriptional level of *SmLAPb* was 1.34 times and that of *SmLAPc* was about 46.53 times compared with that of *SmLAPa* at the mature proglottid. In the gravid proglottid stages, the results of *SmLAPb* and *SmLAPc* were 1.96 times and 46.53 times respectively, while *SmLAPa* was at the background value. Interestingly, at the sparganum stage, *SmLAPc* transcription expression was detected, whereas the transcriptional levels of *SmLAPa* and *SmLAPb* were low. **Conclusions** *SmLAPc* might be a valuable diagnostic molecule for *Spirometra mansoni* infection.

[KEY WORDS] *Spirometra mansoni*; *SmLAPs*; Bioinformatics characteristics; Transcriptional level; Diagnostic molecule

曼氏迭宫绦虫属于影响人体中枢神经系统的寄生虫^[1],也是一种重要的食源性人畜共患病寄生虫。曼氏迭宫绦虫(*Spirometra mansoni*, *Sm*)成虫主要寄生在猫科动物,偶然寄生于人体肠道,但中期裂头蚴也可寄生于人体,寄生部位多,引起曼氏裂头蚴病更为严重,危害远大于成虫。感染裂头蚴最主要的途径是食用含有裂头蚴的生的或是半生的青蛙肉或蛇肉和饮用含有原尾蚴的剑水蚤的水。裂头蚴病流行区域非常广泛,在亚洲、非洲、美洲及欧洲都有发现^[2]。据不完全统计,全球有1 400多例病例报道,我国占了上千例^[3]。虽然全球病例不多,但是发病率呈逐年上升的趋势,并且裂头蚴寄生部位多数在脑部和眼部^[4]。裂头蚴寄生于脑部能够导致抽搐昏迷甚至死亡;眼裂头蚴则能够影响视力甚至导致失明。此外,裂头蚴还可以寄生于内脏组织和皮下组织,且能够在体内移行。目前临床上针对裂头蚴病的诊断方法是手术取活组织进行确诊,但是手术不仅风险大,而且适用范围有限,不适用于内脏和深部脑组织的裂头蚴的诊断。目前,临床中使用最为广泛的方法是免疫诊断,不仅便于操作,且价格实惠。免疫诊断的特异性和灵敏度主要是依靠特异性的诊断分子。

亮氨酸氨基肽酶(leucine aminopeptidase, LAP)是一类具有HEXXH(X)(18)E锌离子结合的活性中心的M17金属蛋白酶,其能够定位在细胞胞液、微粒体内和细胞膜上^[5]。LAP是一种细胞表面的亮氨酸氨基肽酶,能够催化蛋白或是肽类底物的末端亮氨酸残基的水解。疟原虫的LAP可调节细胞内氨基酸代谢,从而对寄生虫的生长和发育发挥重要作用,是一个抗疟疾药物的潜在靶标分子^[6]。在曼氏迭宫绦虫的研究中,对一个亮氨

酸氨基肽酶亚类(leucine aminopeptidase C of *Spirometra mansoni*, *SmLAPc*)进行了相关的生物信息学分析、原核表达和蛋白纯化,证实了其可能是一个潜在的免疫诊断分子^[7]。本研究对来源于曼氏迭宫绦虫的3个LAP [*SmLAPa*(leucine aminopeptidase A of *Spirometra mansoni*)、*SmLAPb*(leucine aminopeptidase B of *Spirometra mansoni*)、*SmLAPc*]进行生物信息学比对分析,并检测在虫体各个发育阶段的转录水平,为进一步开展曼氏裂头蚴病免疫诊断研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

亮氨酸氨基肽酶核苷酸序列从吕刚等^[8]构建的曼氏迭宫绦虫成虫基因组文库中获取。动物组织总RNA提取试剂盒(DP431)、FastQuant cDNA第一链合成试剂盒(KR103)购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Premix Ex Taq™ II kit购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR八连管购自Ax-ygen公司;电动组织破碎仪(型号:9001272, QIAGEN Hilden公司,德国);Real time PCR仪器(型号:stratagene Mx3005P instrument, Agilent Technologies公司,美国);NanoDrop 2000c (Thermo Scientific,美国)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

将从基因组文库调取的3个*SmLAPs*亚类序列利用在线软件<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>进行BLASTx比对分析、保守功能域预测(CD-Search)和多序列比对(multiple alignment)。利用蛋白专家分析工具<http://www.expasy.org/>中相关在线软件进行信号肽分析、跨膜结构预测;利用

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>进行 B 细胞线性表位和 T 细胞表位预测分析。

1.2.2 曼氏迭宫绦虫成节、孕节和裂头蚴总 RNA 的提取

① 将枪头、EP 管、电动组织破碎仪的转头等浸泡于 0.1% DEPC 处理的去离子水中,浸泡过夜, 121℃, 30 min 高压灭活, 烘干备用。

② 已加入样品保护剂的组织, 分别置于冰上利用组织破碎仪裂解 15~30 min 左右, 超声破碎 1 min 停 2 min, 次数视样品而定, 超声结束后室温放置 5 min, 使其充分裂解。

③ 按照动物组织总蛋白 RNA 提取试剂盒说明进行操作。

④ 将得到的总 RNA 利用 NanoDrop 2000c 进行浓度测定和琼脂糖电泳验证质量。

1.2.3 曼氏迭宫绦虫各个发育阶段 cDNA 的合成

① 将上述提取的绦虫的成节、孕节和裂头蚴的总 RNA 中的基因组 DNA 去除, 按照(5×gDNA Buffer 2 μL; Total RNA 0.5 μg; RNAase-Free ddH₂O 补足到 10 μL) 配制混合液 A, 彻底混匀。瞬时离心, 并置于 42℃ 孵育 3 min, 然后置于冰上。

② 反转录反应体系配制混合液按照(10×Fast RT Buffer 2 μL; RT Enzyme Mix 1 μL; FQ-RT Primer Mix 2 μL; RNase-Free ddH₂O 补足到 10 μL) 进行配制, 将配制好的 Mix 加到 gDNA 去除步骤的反应液 A 中, 充分混匀。

③ 42℃ 孵育 15 min; 95℃ 孵育 3 min 处理之后放于冰上, 得到的 cDNA 可用于后续实验, -80℃ 保存。

1.2.4 定量 PCR 引物

SmLAPs 定量 PCR 检测引物如表 1 所示, 引物

是通过 DNA club、Primer Premier 相关软件针对 3 个亚类序列中的差异区域进行设计。

1.2.5 Real-time PCR 检测

将得到的成节、孕节和裂头蚴阶段的 cDNA 作为模板, 以相应基因的引物进行扩增。同时以不加 cDNA 模板作为空白对照。反应体系如下: SYBR Premix Ex Taq (2×) 10.0 μL; Forward primer 0.2 μL (10 pmol/L); Reverse primer 0.2 μL (10 pmol/L); cDNA 2.0 μL; ddH₂O 7.6 μL;

将反应混合物在 Agilent Technologies strata-gene Mx3005P 仪器上自动运行。每个反应均设 3 个复孔, 并重复 3 次取平均值。记录各个阶段的 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *SmLAPa*、*SmLAPb*、*SmLAPc* 在成节、孕节和裂头蚴发育阶段的转录水平的差异^[9]。

2 结果

2.1 *SmLAPs* 亚类的序列比对和免疫特征分析

通过对 *SmLAPs* 编码的氨基酸序列保守区域进行比对, *SmLAPa* 与 *SmLAPb*、*SmLAPc* 的氨基酸序列一致性均为 38%, *SmLAPb* 与 *SmLAPc* 的一致性也只有 44%。此外, 进行多功能位点分析发现, 3 种 *SmLAPb* 亚类均含有底物结合位点、锌离子结合位点和多肽结合位点。在 B 细胞线性表位预测中, *SmLAPa* 和 *SmLAPc* 有 13 个 B 细胞线性表位, 而 *SmLAPb* 有 14 个 B 细胞线性表位。*SmLAPa* 与 *SmLAPb* 有 8 个 B 细胞线性表位重合, 与 *SmLAPc* 有 9 个 B 细胞线性表位重合; *SmLAPb* 与 *SmLAPc* 有 13 个 B 细胞线性表位重合。T 细胞表位预测中, *SmLAPa* 有 12 个 T 细胞表位, *SmLAPb* 有 13 个 T 细胞表位, *SmLAPc* 有 14 个 T 细胞表位, 然而 3 个 *SmLAPs*

表 1 *SmLAPs* 的定量检测引物序列

Table 1 Primer sequences of *SmLAPs* for real time PCR

| 基因名称 | 引物序列 |
|------------------|---------------------------------------|
| <i>SmLAPa</i> | 正向引物: 5'-TAGCGTTAGCTGCGTTTGCC-3' |
| | 反向引物: 5'-GAGCCCAGTTCACATCGT-3' |
| <i>SmLAPb</i> | 正向引物: 5'-AGTACGATGTTCTCGGAATTGTTG-3' |
| | 反向引物: 5'-CAGTTTATGGTAGTATGCCTTGACC-3' |
| <i>SmLAPc</i> | 正向引物: 5'-ACGGACGAGGAGCGAATGAC-3' |
| | 反向引物: 5'-ACAGCACGGTTGACGGAAGC-3' |
| <i>Smβ-actin</i> | 正向引物: 5'-CATCTACGAGGGTTACGCACTG-3' |
| | 反向引物: 5'-GCTCATCTCCTGCTCAAAGTCC-3' |

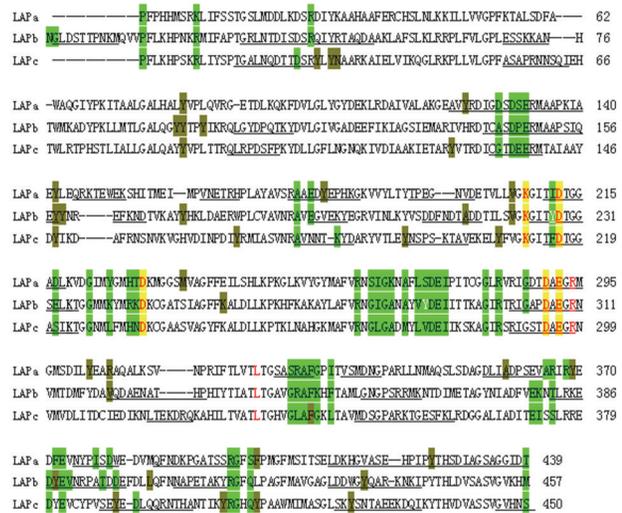
的功能区域中只有2个完全重叠的T细胞表位,这2个表位也正好是 *SmLAPa* 和 *SmLAPc* 的2个重合表位区域,而 *SmLAPa* 和 *SmLAPb* 只有4个表位重合。

2.2 *SmLAPs* 亚类进行信号肽预测和跨膜结构分析

3个 *SmLAPs* 亚类均具有一个强烈的信号肽, *SmLAPa* 位于第18 amino acid (aa)、*SmLAPb* 位于第17aa的位置、*SmLAPc* 位于第21 aa的位置(图2)。这提示了这3个基因在真核系统中表达均是需后期蛋白的修饰之后才能发挥作用的。如后续开展研究需要进行原核表达,则需要人为去除信号肽方可进行基因的克隆。通过图3结果可以得知,这3个亚类均没有跨膜区域。

2.3 不同在虫体发育阶段的转录水平检测

转录水平检测结果显示(图4),在孕节阶段, *SmLAPb* 的转录水平是 *SmLAPa* 转录水平的1.96倍, *SmLAPc* 转录水平是 *SmLAPa* 转录水平的56.89倍。成节阶段的 *SmLAPb* 的转录水平是 *SmLAPa* 转录水平的1.34倍, *SmLAPc* 的转录水平是 *SmLAPa* 转录水平的46.53倍。在孕节和成节中, *SmLAPc* 均有转录,并且转录水平均高于 *SmLAPa*

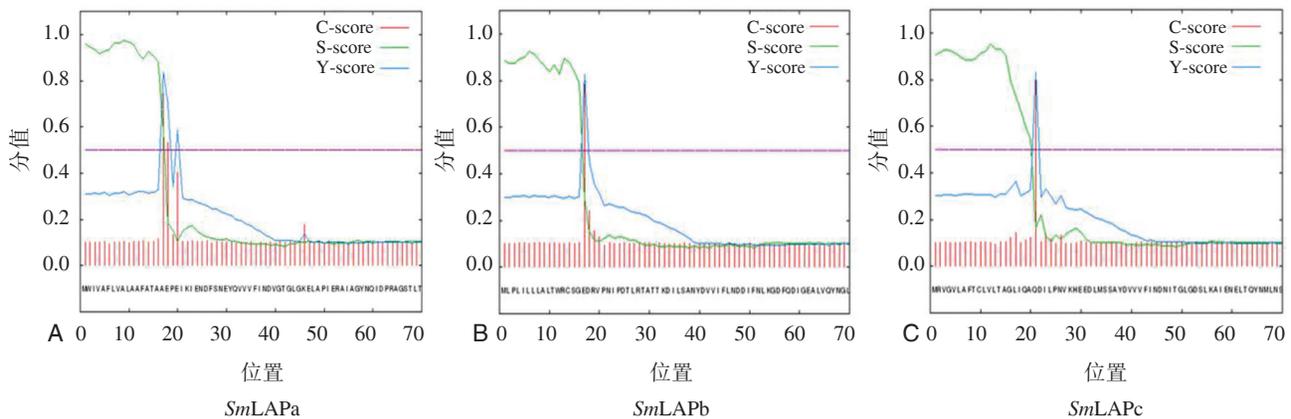


绿色标示多肽结合位点;黄色标示离子结合位点;红色标示底物结合位点;下划线标示B细胞线性表位;灰色标示T细胞表位

图1 曼氏迭宫绦虫 *SmLAP* 亚类氨基酸序列比对

Figure 1 Alignment of *SmLAPs* amino acid sequences

和 *SmLAPb* 的转录水平。在裂头蚴阶段,只有 *SmLAPc* 有转录,却没有检测到 *SmLAPa* 和 *SmLAPb* 的转录。



A: *SmLAPa* 氨基酸序列的信号肽预测; B: *SmLAPb* 氨基酸序列的信号肽预测; C: *SmLAPc* 氨基酸序列的信号肽预测

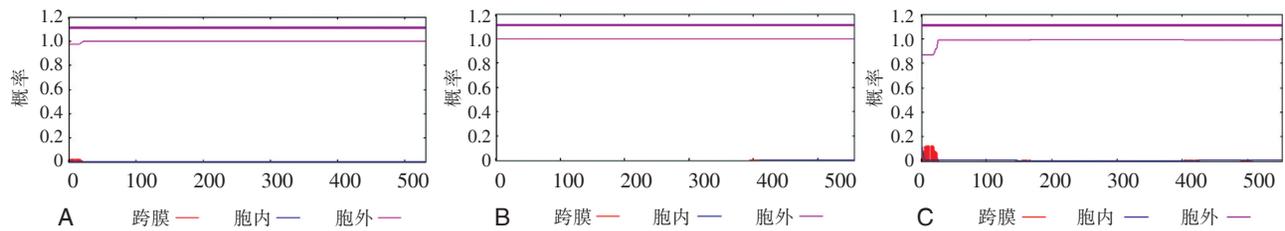
图2 信号肽预测

Figure 2 Signal peptide prediction of *SmLAPs* sequences

3 讨论

LAP 是一类金属肽酶,在调节细胞分解代谢和合成代谢平衡中发挥非常重要的作用^[10]。我们从曼氏迭宫绦虫成虫文库中成功获取了3个 *SmLAPs* 的亚类,通过多序列比对,显示3个基因编码的氨基酸序列一致性比较低,仅有38%和

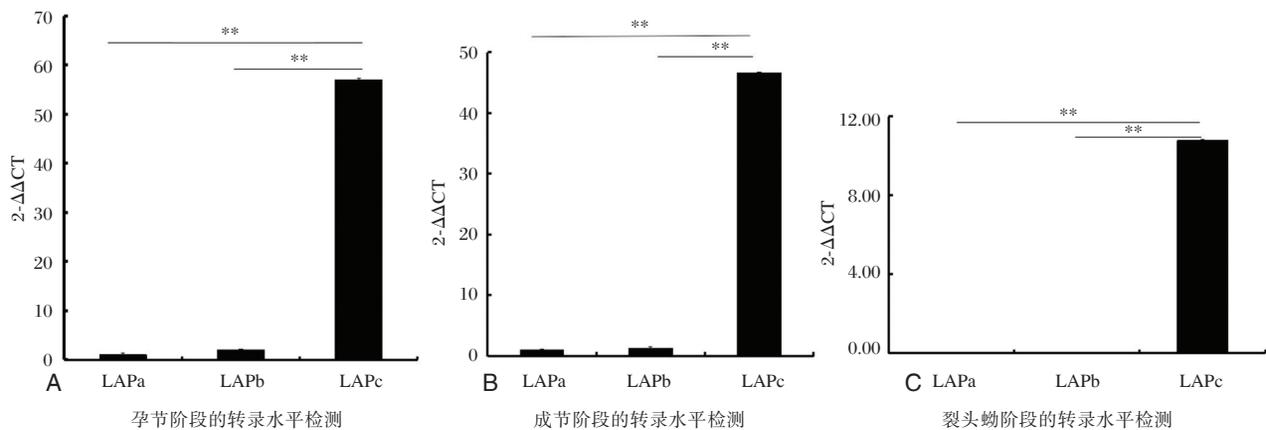
44%。但是根据编码蛋白的氨基酸序列中保守位点分析,可以得知功能位点高度保守,尤其是底物结合位点和锌离子结合位点,只有在多肽结合位点存在少数氨基酸差异。虽然在B细胞表位分析中,3个基因的氨基酸序列中的B细胞表位数量相差较小,并且基本都重合,但是T细胞表位分布存在着较大的差异。杨祖婷等^[7]研究发现, *SmLAPc*



A: SmLAPa 氨基酸序列的跨膜区预测; B: SmLAPb 氨基酸序列的跨膜区预测; C: SmLAPc 氨基酸序列的跨膜区预测

图3 跨膜螺旋预测

Figure 3 Transmembrane helical prediction of *SmLAPs* sequences



A: 3个SmLAPs在孕节阶段的转录水平检测; B: 3个SmLAPs在成节阶段的转录水平检测; C: 3个SmLAPs在裂头蚴阶段的转录水平检测

图4 *SmLAPs* 转录水平检测

Figure 4 Transcriptional level detection of *SmLAPs*

与人类的同源性基因相比较, B 细胞表位的氨基酸存在较大的差异。此外, 通过信号肽预测分析, 得知 3 个基因均有强烈的信号肽。在真核生物中, 信号肽具有蛋白质定向转运功能, 能使蛋白分泌到胞外, 提高其分泌率。这一预测结果提示这 3 个蛋白均具有胞外分泌的可能。分泌蛋白作为免疫诊断抗原, 其特异性和敏感性均优于粗抗原^[11]。通过酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测研究, 发现日本血吸虫的亮氨酸氨基肽酶具有较好的敏感性和特异性, 在血吸虫诊断中具有潜在的免疫诊断价值^[12]。综上所述, *SmLAPs* 在诊断方面有一定的研究价值。此外, 根据 Real time PCR 定量检测结果, 3 个基因在成节和孕节阶段均有表达, 且 *SmLAPc* 亚类的转录水平最高。在裂头蚴阶段, 没有检测到 *SmLAPa* 和 *SmLAPb* 亚类的转录, 只检测到 *SmLAPc* 的转录表达。通过这个结果更充分的说明, *SmLAPc* 更有可能开发成检测靶标分子。

此外, 许多研究发现病原生物主要是依赖肽酶完成许多生理过程^[13]。在华支睾吸虫的研究中, 发现亮氨酸氨基肽酶主要在虫体的肠道表皮细胞表达, 揭示其可能参与了寄生虫的营养吸收和蛋白质代谢过程^[14]。在锥虫的研究中发现, 亮氨酸氨基肽酶是一个 330 kDa 的同源四聚体的金属氨基肽酶, 在虫体营养供应中发挥重要作用^[15]。那么, *SmLAPs* 在曼氏迭宫绦虫不同发育阶段的表达存在差异, 这可能是由于 *SmLAPs* 在不同的发育时期, 发挥的作用不同, 这进一步提示了 *SmLAPc* 可能还是一个有效防控裂头蚴病的药物靶点。

参考文献

- [1] 侯智, 李维, 安宁, 等. 神经系统曼氏迭宫绦虫裂头蚴病 2 例[J]. 中国临床神经外科杂志, 2017, 22 (2): 122.
- [2] Anantaphruti MT, Nawa Y, Vanvanitchai Y. Human sparganosis in Thailand: an overview[J]. Acta Trop,

- 2011, 118(3):171-176.
- [3] Cui J, Li N, Wang ZQ, et al. Serodiagnosis of experimental sparganum infections of mice and human sparganosis by ELISA using ES antigens of *Spirometra mansoni* spargana [J]. *Parasitol Res*, 2011, 108(6): 1551-1556.
- [4] Lo Presti A, Aguirre DT, De Andrés P, et al. Cerebral sparganosis: case report and review of the European cases [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2015, 157(8): 1339-1343.
- [5] 纪晓霞, 陈林. 亮氨酸氨基肽酶的基础研究及临床应用 [J]. *海峡药学*, 2011, 23(12):175-177.
- [6] Chaudhary M, Singh V, Anvikar AR, et al. Screening and in vitro evaluation of potential *Plasmodium falciparum* leucyl aminopeptidase inhibitors [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2016, 12(4):282-293.
- [7] 杨祖婷, 陈立强, 符瑞佳, 等. 曼氏迭宫绦虫亮氨酸氨基肽酶 (*SmLAP*) 的生物信息学分析、克隆及表达 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(11):1004-1009.
- [8] 李奕基, 陈新新, 符瑞佳, 等. 曼氏迭宫绦虫钙/钙调素依赖蛋白激酶 I (*SmCaMK I*) 基因的生物信息学分析与表达鉴定 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(12):1044-1050, 1057.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [10] Ziemska J, Solecka J. Tyrosine kinase, aurora kinase and leucine aminopeptidase as attractive drug targets in anticancer therapy - characterisation of their inhibitors [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2016, 67(4):329-342.
- [11] Liang P, He L, Xu Y, et al. Identification, immunolocalization, and characterization analyses of an exopeptidase of papain superfamily, (cathepsin C) from *Clonorchis sinensis* [J]. *Parasitol Res*, 2014, 113(10): 3621-3629.
- [12] Faustina HL, Luo QL, Zhong ZR, et al. Evaluation of recombinant SjLAP and SjFBPA in detecting antibodies to *Schistosoma japonicum* [J]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 2011, 29(5):339-347.
- [13] Helgren TR, Chen C, Wangtrakuldee P, et al. *Rickettsia prowazekii* methionine aminopeptidase as a promising target for the development of antibacterial agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(3):813-824.
- [14] Kang JM, Ju HL, Ju JW, et al. Comparative biochemical and functional properties of two leucine aminopeptidases of *Clonorchis sinensis* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2012, 182(1-2):17-26.
- [15] Cadavid-Restrepo G, Gastardelo TS, Faudry E, et al. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases [J]. *BMC Biochem*, 2011, 12:46.

广东江门地区汉族人群 23 个 STR 基因座遗传多态性

张洁^{1*} 冯冬亮²

[摘要] **目的** 调查研究广东江门地区汉族人群 23 个 STR 基因座遗传多态性,为法医学个体识别、亲权鉴定等提供基础研究数据。 **方法** 采集 475 个无关个体的血液样本,采用 Huaxia™ Platinum PCR 试剂盒对 DNA 进行复合扩增,统计 23 个基因座的遗传多态性参数。 **结果** 研究显示,23 个常染色体 STR 基因座的基因频率介于 0.001 1~0.586 3 之间。各基因座的杂合度(H)介于 0.534 7~0.884 2 之间,匹配概率(MP)值分布在 0.015 8~0.233 7 之间,个体识别能力(DP)值介于 0.984 2~0.766 3 之间,非父排除率(PE)在 0.219 7~0.763 3 之间。经计算累积无关个体偶和概率(CMP)为 $3.158 4 \times 10^{-28}$,累积个体识别能力(TDP)为 $1-3.158 4 \times 10^{-28}$,累积非父排除率(CPE)为 $1-3.143 9 \times 10^{-10}$ 。 **结论** 本文涉及的 23 个常染色体 STR 基因座在广东江门汉族人群中均具有高度多态性,研究所得数据可为江门地区汉族人群法医学个体识别和亲权鉴定提供结果评估依据,并为完善 STR 基因库数据和为研究人类群体遗传学提供基础数据。

[关键词] STR 基因座;遗传多态性;个体识别;亲权鉴定

Genetic polymorphism of 23 STR Loci in Jiangmen Han population of Guangdong

ZHANG Jie^{1*}, FENG Dongliang²

(1. Forensic Science Centre of WASTON Guangdong, Guangzhou, Guangdong, China, 510635; 2. Forensic Science Centre of FaZheng, Shaoguan, Guangdong, China, 512000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the genetic polymorphism and frequencies of 23 STR loci in Jiangmen Han population of Guangdong, in order to support basic data for individual identification and paternity testing. **Methods** By using Huaxia™ Platinum PCR Amplification Kit, allele frequencies of 23 STR loci were obtained from 475 unrelated individuals of the Jiangmen Han population. The genetic polymorphism and frequencies were statistically calculated. **Results** Allele frequencies ranged from 0.001 1 to 0.586 3. The heterozygosity ranged from 0.534 7 to 0.884 2. The match probability (MP) ranged from 0.015 8 to 0.233 7. The discrimination power (DP) ranged from 0.984 2 to 0.766 3. The probability of exclusion (PE) ranged from 0.219 7 to 0.763 3. The CMP was $3.158 4 \times 10^{-28}$. The total probability of discrimination power (TDP) was $1-3.158 4 \times 10^{-28}$. The cumulative probability of exclusion (CPE) was $1-3.143 9 \times 10^{-10}$. **Conclusion** The 23 autosomal STR loci have relatively high polymorphism in Jiangmen Han population of Guangdong, these studies could provide the evaluation basis for individual identification and paternity testing Jiangmen Han population, and could also be used for improving STR database and population genetic data studies.

[KEY WORDS] STR loci; Genetic polymorphism; Individual identification; Paternity testing

作者单位:1. 广东华生司法鉴定中心,广东,广州 510635

2. 广东法正司法鉴定所,广东,韶关 512000

*通讯作者:张洁, E-mail: dssan-0331@163.com

| D12S391 | | | D13S317 | | | D16S539 | | | D18S51 | | | D19S433 | | |
|---------|-----|---------|---------|-----|---------|---------|-----|---------|--------|-----|---------|---------|-----|---------|
| A | n | F | A | n | F | A | n | F | A | n | F | A | n | F |
| 15 | 19 | 0.020 0 | 5 | 2 | 0.002 1 | 8 | 1 | 0.001 1 | 11 | 4 | 0.004 2 | 11 | 5 | 0.005 3 |
| 16 | 4 | 0.004 2 | 6 | 2 | 0.002 1 | 9 | 219 | 0.230 5 | 12 | 43 | 0.045 3 | 12 | 39 | 0.041 1 |
| 17 | 62 | 0.065 3 | 8 | 304 | 0.320 0 | 10 | 130 | 0.136 8 | 13 | 166 | 0.174 7 | 12.2 | 1 | 0.001 1 |
| 18 | 206 | 0.216 8 | 9 | 126 | 0.132 6 | 11 | 286 | 0.301 1 | 14 | 180 | 0.189 5 | 13 | 269 | 0.283 2 |
| 19 | 178 | 0.187 4 | 10 | 148 | 0.155 8 | 12 | 217 | 0.228 4 | 15 | 193 | 0.203 2 | 13.2 | 38 | 0.040 0 |
| 19.3 | 1 | 0.001 1 | 11 | 219 | 0.230 5 | 13 | 82 | 0.086 3 | 16 | 138 | 0.145 3 | 14 | 248 | 0.261 1 |
| 20 | 160 | 0.168 4 | 12 | 120 | 0.126 3 | 14 | 13 | 0.013 7 | 17 | 87 | 0.091 6 | 14.2 | 102 | 0.107 4 |
| 21 | 102 | 0.107 4 | 13 | 24 | 0.025 3 | 15 | 2 | 0.002 1 | 18 | 55 | 0.057 9 | 15 | 59 | 0.062 1 |
| 22 | 118 | 0.124 2 | 14 | 4 | 0.004 2 | | | | 19 | 24 | 0.025 3 | 15.2 | 126 | 0.132 6 |
| 23 | 50 | 0.052 6 | 15 | 1 | 0.001 1 | | | | 20 | 19 | 0.020 0 | 16 | 14 | 0.014 7 |
| 24 | 35 | 0.036 8 | | | | | | | 21 | 16 | 0.016 8 | 16.2 | 43 | 0.045 3 |
| 25 | 13 | 0.013 7 | | | | | | | 22 | 14 | 0.014 7 | 17 | 1 | 0.001 1 |
| 26 | 2 | 0.002 1 | | | | | | | 23 | 7 | 0.007 4 | 17.2 | 5 | 0.005 3 |
| | | | | | | | | | 24 | 4 | 0.004 2 | | | |

| D21S11 | | | D22S1045 | | | FGA | | | Penta D | | | Penta E | | |
|--------|-----|---------|----------|-----|---------|------|-----|---------|---------|-----|---------|---------|-----|---------|
| A | n | F | A | n | F | A | n | F | A | n | F | A | n | F |
| 26 | 2 | 0.002 1 | 11 | 193 | 0.203 2 | 13 | 6 | 0.006 3 | 6 | 2 | 0.002 1 | 5 | 56 | 0.058 9 |
| 27 | 1 | 0.001 1 | 12 | 1 | 0.001 1 | 16 | 1 | 0.001 1 | 7 | 12 | 0.012 6 | 8 | 1 | 0.001 1 |
| 28 | 45 | 0.047 4 | 13 | 5 | 0.005 3 | 18 | 31 | 0.032 6 | 8 | 64 | 0.067 4 | 9 | 8 | 0.008 4 |
| 28.2 | 1 | 0.001 1 | 14 | 42 | 0.044 2 | 19 | 78 | 0.082 1 | 9 | 371 | 0.390 5 | 10 | 54 | 0.056 8 |
| 29 | 256 | 0.269 5 | 15 | 292 | 0.307 4 | 20 | 44 | 0.046 3 | 10 | 118 | 0.124 2 | 11 | 182 | 0.191 6 |
| 29.2 | 2 | 0.002 1 | 16 | 188 | 0.197 9 | 20.2 | 1 | 0.001 1 | 11 | 110 | 0.115 8 | 12 | 112 | 0.117 9 |
| 30 | 262 | 0.275 8 | 17 | 201 | 0.211 6 | 21 | 114 | 0.120 0 | 12 | 130 | 0.136 8 | 13 | 57 | 0.060 0 |
| 30.2 | 7 | 0.007 4 | 18 | 27 | 0.028 4 | 21.2 | 3 | 0.003 2 | 13 | 94 | 0.098 9 | 14 | 75 | 0.078 9 |
| 30.3 | 4 | 0.004 2 | 19 | 1 | 0.001 1 | 22 | 176 | 0.185 3 | 14 | 45 | 0.047 4 | 15 | 74 | 0.077 9 |
| 31 | 72 | 0.075 8 | | | | 22.2 | 4 | 0.004 2 | 15 | 4 | 0.004 2 | 16 | 46 | 0.048 4 |
| 31.2 | 65 | 0.068 4 | | | | 23 | 165 | 0.173 7 | | | | 17 | 63 | 0.066 3 |
| 32 | 26 | 0.027 4 | | | | 23.1 | 1 | 0.001 1 | | | | 18 | 58 | 0.061 1 |
| 32.2 | 153 | 0.161 1 | | | | 23.2 | 15 | 0.015 8 | | | | 19 | 53 | 0.055 8 |
| 33 | 5 | 0.005 3 | | | | 24 | 153 | 0.161 1 | | | | 19.4 | 1 | 0.001 1 |
| 33.2 | 47 | 0.049 5 | | | | 24.2 | 6 | 0.006 3 | | | | 20 | 45 | 0.047 4 |
| 34 | 1 | 0.001 1 | | | | 24.3 | 1 | 0.001 1 | | | | 21 | 27 | 0.028 4 |
| 34.2 | 1 | 0.001 1 | | | | 25 | 93 | 0.097 9 | | | | 22 | 17 | 0.017 9 |
| | | | | | | 25.2 | 2 | 0.002 1 | | | | 23 | 12 | 0.012 6 |
| | | | | | | 26 | 39 | 0.041 1 | | | | 24 | 3 | 0.003 2 |
| | | | | | | 26.2 | 3 | 0.003 2 | | | | 25 | 3 | 0.003 2 |
| | | | | | | 27 | 9 | 0.009 5 | | | | 26 | 3 | 0.003 2 |
| | | | | | | 27.2 | 2 | 0.002 1 | | | | | | |
| | | | | | | 28 | 3 | 0.003 2 | | | | | | |

| TH01 | | | TPOX | | | Vwa | | |
|------|-----|---------|------|-----|---------|-----|-----|---------|
| A | n | F | A | n | F | A | n | F |
| 6 | 132 | 0.138 9 | 7 | 1 | 0.001 1 | 14 | 261 | 0.274 7 |
| 7 | 272 | 0.286 3 | 8 | 557 | 0.586 3 | 15 | 34 | 0.035 8 |
| 8 | 40 | 0.042 1 | 9 | 72 | 0.075 8 | 16 | 135 | 0.142 1 |
| 9 | 428 | 0.450 5 | 10 | 36 | 0.037 9 | 17 | 230 | 0.242 1 |
| 9.3 | 26 | 0.027 4 | 11 | 257 | 0.270 5 | 18 | 193 | 0.203 2 |
| 10 | 52 | 0.054 7 | 12 | 27 | 0.028 4 | 19 | 81 | 0.085 3 |
| | | | | | | 20 | 14 | 0.014 7 |
| | | | | | | 21 | 2 | 0.002 1 |

A: 等位基因; F: 等位基因频率; n: 样本数

D5S818、D6S1043、D7S820、D8S1179、D10S1248、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D22S1045、CSF1PO、FGA、Penta D、Penta E、TH01、TPOX 和 vWA 及 2 个性别位点 Amelogenin、Yindel。扩增体系为 10 μ L (Master Mix 4 μ L、Primer Mix 4 μ L、PNG 2 μ L)。PCR 产物使用 Applied Biosystems 3500 型遗传分析仪 (Thermo Scientific 公司, 美国) 进行毛细管电泳, 由 GeneMapper[®] ID-X 1.4 软件进行 STR 基因型分析。

1.3 统计学分析

上述 475 个样品的基因型结果经 Power stats v1.2 软件^[5]计算各基因座的基因频率, 同时获得各基因座的杂合度(H)、匹配概率(MP)、个体识别能力(DP)、非父排除率(PE)、多态信息含量(PIC)、

累积无关个体偶和概率(cumulative match probability, CMP)、累积个体识别率(total probability of discrimination power, TDP)及累积非父排除率(cumulative probability of exclusion, CPE)等参数, 使用 Cervus3.0 软件对 23 个基因座进行 Hardy-Weinberg 平衡检验^[6]。

2 结果

475 个江门无关个体血样, 使用 Huaxia[™] Platinum PCR 试剂盒进行复核扩增后, 除 2 个性染色体基因座 Amelogenin、Yindel 外, 统计得其余 23 个常染色体基因座共检出 267 个等位基因, 其等位基因及其分布频率见表 1, 经 Hardy-Weinberg 平衡检验, 显示均达到 $P > 0.05$, 未发现偏离。各基因座的群体遗传学参数见表 2。

表 2 23 个 STR 基因座的统计学分析($n=475$)

Table 2 Statistic analysis of 23 STR loci ($n=475$)

| 基因座 | H | DP | PE | PIC | MP |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| CSF1PO | 0.705 3 | 0.880 4 | 0.436 4 | 0.677 1 | 0.119 6 |
| D1S1656 | 0.852 6 | 0.955 2 | 0.700 1 | 0.820 4 | 0.044 8 |
| D2S441 | 0.812 6 | 0.922 2 | 0.622 7 | 0.763 5 | 0.077 8 |
| D2S1338 | 0.875 8 | 0.966 3 | 0.746 3 | 0.853 5 | 0.033 7 |
| D3S1358 | 0.688 4 | 0.882 6 | 0.410 6 | 0.677 8 | 0.117 4 |
| D5S818 | 0.757 9 | 0.926 2 | 0.523 4 | 0.761 6 | 0.073 8 |
| D6S1043 | 0.896 8 | 0.969 7 | 0.789 0 | 0.862 8 | 0.030 3 |
| D7S820 | 0.785 3 | 0.915 7 | 0.572 0 | 0.744 6 | 0.084 3 |
| D8S1179 | 0.842 1 | 0.960 2 | 0.679 4 | 0.837 3 | 0.039 8 |
| D10S1248 | 0.749 5 | 0.906 2 | 0.508 9 | 0.725 6 | 0.093 8 |
| D12S391 | 0.812 6 | 0.960 6 | 0.622 7 | 0.836 8 | 0.039 4 |
| D13S317 | 0.821 1 | 0.919 1 | 0.638 7 | 0.754 6 | 0.080 9 |
| D16S539 | 0.785 3 | 0.915 7 | 0.572 0 | 0.742 4 | 0.084 3 |
| D18S51 | 0.884 2 | 0.959 4 | 0.763 3 | 0.839 4 | 0.040 6 |
| D19S433 | 0.827 4 | 0.941 9 | 0.650 8 | 0.789 7 | 0.058 1 |
| D21S11 | 0.781 1 | 0.939 3 | 0.564 4 | 0.784 9 | 0.060 7 |
| D22S1045 | 0.755 8 | 0.916 3 | 0.519 7 | 0.742 2 | 0.083 7 |
| FGA | 0.888 4 | 0.969 0 | 0.771 8 | 0.860 6 | 0.031 0 |
| PentaD | 0.762 1 | 0.930 2 | 0.530 7 | 0.760 3 | 0.069 8 |
| PentaE | 0.884 2 | 0.984 2 | 0.763 3 | 0.903 1 | 0.015 8 |
| TH01 | 0.658 9 | 0.859 4 | 0.367 6 | 0.642 6 | 0.140 6 |
| TPOX | 0.534 7 | 0.766 3 | 0.219 7 | 0.518 1 | 0.233 7 |
| vWA | 0.808 4 | 0.924 9 | 0.614 8 | 0.765 2 | 0.075 1 |

本文调查的 475 个无关个体样本 MP 值范围: 0.015 8 (Penta E) ~0.233 7 (TPOX) 之间; 经计算 CMP 值为 $3.158 4 \times 10^{-28}$; DP 值范围 0.766 3 (TPOX) ~0.984 2 (Penta E); TDP 值为 $1-3.158 4 \times 10^{-28}$ 。23 个 STR 基因座 PIC 值, 除 D3S1358 (0.677 8)、CSF1PO

(0.677 1)、TPOX (0.518 1)、TH01 (0.642 6) 外, 其余基因座均高于 0.7, 以 Penta E (0.903 1) 为最高; PE 值范围: 0.219 7 (TPOX) ~0.789 0 (D6S1043), 经计算 CPE 值为 $1-3.143 9 \times 10^{-10}$ 。H 值在 0.534 7 (TPOX) ~0.896 8 (D6S1043) 之间。

3 讨论

STR 基因座由于广泛的存在于人类基因组中,并具有片段短、遗传稳定、突变率低、扩增效率高、分型判定准确等特点使其普遍的应用于法医学个体识别和亲权鉴定等领域^[1]。本文使用的美国 Thermo Scientific 公司推出的 Huaxia™ Platinum PCR 试剂盒包含 25 个基因座,其中有 23 个常染色体 STR 基因座,Amelogenin 基因和一个 Yindel 二等位基因座。在本文研究的 23 个基因座中,除 D3S1358、CSF1PO、TPOX、TH01 基因座外,其它 19 个基因座均属于高个体识别能力(DP > 0.9、高杂合度(H > 0.7)、高多态信息量(PIC > 0.7)的高鉴别力基因座^[7-8]。根据实验结果,D3S1358、CSF1PO、TPOX、TH01 这 4 个基因座的多态性相对不高,这与文献^[9-12]相符。D6S1043、FGA、Penta E 3 个基因座相较其它基因座来说多态性尤为高,其中 D6S1043 基因座:H(0.896 8),DP(0.969 7),PIC(0.862 8);Penta E 基因座:H(0.884 2),DP(0.984 2),PIC(0.903 1),从研究数据看出 D6S1043 和 Penta E 基因座的多态性参数不相上下,属于最高的 2 个,证明这 2 个基因座在广东江门地区汉族人群中的多态性最高,法医学应用价值最好。这点与上述文献^[9-13]所报道的 Penta E 多态性最高,D6S1043 属于较高但是跟 Penta E 有一定差距的结果有区别,今后会对江门地区汉族人群的上述 STR 基因座扩充数据量进行进一步的深入研究以证明该结论。

随着复合扩增系统的逐步完善,包含更多基因座的扩增试剂盒被研发出来,增加更多的 STR 基因座可以提高系统的鉴别能力,除了更加强大的个体识别能力,对突变家系案例的判断尤其是二联体亲权鉴定计算累积亲权指数(combined paternity index,CPI)以达到相关行业标准的要求起到了很大的作用。Huaxia™ Platinum PCR 试剂盒相较于 PowerPlex®16、Identifiler® Plus 等试剂盒,属于目前国内有报道的含基因座较多的试剂盒。本文研究的累积非父排除率 CPE 值为 $1-3.143\ 9 \times 10^{-10}$,明显较于海龙等^[9]和穆豪放等^[10]研究基因座为 19 个和 21 个的 CPE 值都高,系统效能更大,对亲权指数的计算值达到鉴定行业标准更加有帮助。综上所述,该复合扩增系统所含 23 个常染色体基因座对江门地区汉族人群的法医学个体识别、亲权鉴定及失踪人员的身源鉴定具有较高的应用价值。

参考文献

- [1] 侯一平. 法医物证学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社. 2009:84-89.
- [2] Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, et al. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62 (6):1408-1415.
- [3] Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2005:140-160.
- [4] Johnsson C, Sällsten G, Schütz A, et al. Hair mercury levels versus freshwater fish consumption in household members of Swedish angling societies [J]. Environ Res, 2004, 96(3):257-263.
- [5] Tereba A. Tools for analysis of population statistics [J]. Profiles DNA, 1999(3): 14-16.
- [6] Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. Molecular Ecology, 2007, 16 (5): 1099-1106.
- [7] Gill P, Urquhart A, Millican E, et al. A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database [J]. Int J Legal Med, 1996, 109(1):14-22.
- [8] Li X, Wang Z. Determination of mercury by intermittent flow electrochemical cold vapor generation coupled to atomic fluorescence spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2007, 588(2):179-183.
- [9] 于海龙, 储国栋, 刘建世, 等. 北方汉族人群 19 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 法医学杂志, 2012, 28 (1):56-58.
- [10] 穆豪放, 张盾, 殷才湧, 等. 北方汉族 21 个常染色体 STR 基因座和 1 个 Y 染色体 STR 基因座的群体遗传学调查[J]. 中国司法鉴定, 2015, 79(2):67-71.
- [11] 沈红缨, 郭飞, 金萍, 等. 辽宁汉族人群 23 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 中国法医学杂志, 2014, 29 (3):259-261.
- [12] 唐振亚, 李海燕, 陈红英, 等. 广东地区人群 41 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 刑事技术, 2016, 41 (3):244-246.
- [13] 尚杰, 胡盛平. 潮汕汉族人群短串联重复序列基因座的遗传多态性研究[J]. 汕头大学医学院学报, 2013, 26(4):193-202.

广东潮汕地区地中海贫血基因突变谱分析

林芬 杨立业* 邢少宜 张琳

[摘要] 目的 了解潮汕地区地中海贫血的基因突变类型及构成比,为更准确地进行地贫诊断提供理论依据。方法 应用跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-polymerase chain reaction, Gap-PCR)、反向斑点杂交(reverse dot blot, RDB)技术和PCR+导流杂交法,分析潮汕4个地理区域(汕头、潮州、揭阳、汕尾)的地贫基因突变类型。结果 2 057例地贫样本中,检出14种 α -地贫突变基因和19种 β -地贫突变基因,同时检出 α 和 β 复合型地贫13种。 α -地贫中最常见的基因型为东南亚缺失型(--^{SEA}), β -地贫以IVS- II -654M位点突变最为常见,其次是41/42M。结论 潮汕地区地中海贫血的基因突变类型呈多样化,本研究的数据可为本地区开展地贫诊断和研究提供参考资料。

[关键词] 地中海贫血;基因类型;潮汕地区

The analysis of gene spectrum of thalassemia in Chaoshan area, Guangdong Province

LIN Fen, YANG Liye*, XING Shaoyi, ZHANG Lin

(Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521021)

[ABSTRACT] Objective To investigate the type of gene mutation of thalassemia and constituent ratio in the Chaoshan region, and provide the theoretical basis for gene diagnosis of thalassemia. Methods Thalassemia genotypes of Chaoshan area (including Shantou, Chaozhou, Jieyang, Shanwei) were identified by Gap-PCR, reverse dot blot (RDB), PCR and flow-through hybridization. Results Among the 2 057 samples which were confirmed for thalassemia, 14 types of α -thalassemia (α -thal) alleles and 19 types of β -thalassemia (β -thal) alleles were identified. Moreover, 13 kinds of compound α -thal and β -thal were found. The most common α -thal was --^{SEA} and the most common β -thalassemia was IVS- II -654M, followed by 41/42M. Conclusion The gene types for thalassemia were diversely distributed in the Chaoshan region. The results would provide reference data for diagnosis and research of thalassemia in this area.

[KEY WORDS] Thalassemia; genotype; Chaoshan region

地中海贫血(地贫)是由于珠蛋白基因发生缺陷,致使珠蛋白链合成减少或缺如而导致的一组遗传性溶血性疾病,轻者可无临床表现,重者以进行性溶血性贫血为主要特征。地贫遍布世界各地,高发于地中海沿岸的意大利、希腊、马耳他、塞

浦路斯、中非洲、亚洲、南太平洋地区到东南亚各国的广大地区^[1-2],它给流行区人们造成巨大的公共卫生问题和社会负担。我国长江以南的广大地域为地中海贫血高发区,尤以广西、广东和海南三省为甚。据流行病学数据统计分析估算,广东每

基金项目:广东省“扬帆计划”人才培养项目资助

作者单位:南方医科大学附属潮州中心医院中心实验室,广东,潮州 521021

*通讯作者:杨立业, E-mail: yangleeyee@sina.com

年约有 11 万新生儿为地中海贫血基因携带者,每年出生重症地中海贫血超过 1 000 人^[3]。

潮汕地处广东沿海区域,拥有 10 918.5 平方公里的面积和 1 500 万的人口,潮汕居民为中原南下福建而后迁入粤东地区的早期汉人后裔。以往文献报导,地贫在潮汕地区有较高的发生率^[4,5]。本文对该地 4 个区域(潮州、汕头、揭阳和汕尾)确诊的 2 057 例地贫样本进行基因突变类型分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

地贫基因检测样本收集自潮汕 4 个地理区域,分别为汕头市(汕头大学附属第一医院,70 例)、潮州市(潮州市中心医院,1 441 例)、揭阳市(普宁妇幼保健院,154 例;榕城妇幼保健院,89 例)、汕尾(陆丰妇幼保健院,303 例)。受测者年龄在 5~80 岁之间,平均年龄(37.5±0.8)岁,超过 98% 为潮汕本地人,均签署了地贫基因检测知情同意书。所有受测者抽取 2 mL 外周血,在 4℃ 环境下送至分子实验室进行地贫基因分析。

1.2 方法

1.2.1 试剂

潮州和汕头地区的标本采用深圳亚能生物科技有限公司的地中海贫血基因检测试剂盒检测,汕尾和揭阳的标本采用广东凯普生物化学有限公司的地中海贫血基因检测试剂盒检测。

1.2.2 标本制备

取受测者 EDTA-K₂ 抗凝血各 100 μL,严格按照试剂盒说明提取样本 DNA。

1.2.3 潮州和汕头 α/β 地贫的分子诊断

缺失型 α-地贫基因诊断使用深圳亚能的 α-地贫基因检测试剂盒(Gap-PCR 法)进行检测,左侧缺失为-α^{3.7},右侧缺失为-α^{4.2},东南亚型缺失为--^{SEA},双重缺失杂合子为-α^{3.7}/--^{SEA}和-α^{4.2}/--^{SEA}。突变型 α-地贫基因诊断应用深圳亚能的非缺失型 α-地贫基因突变检测试剂盒(PCR-反向点杂交)检测中国人常见的 3 种突变,分别为 Hb Constant Spring (α^{CS}α)、Hb Quong Sze (α^{QS}α) 和 Hb West Mead (α^{WS}α)。β-地贫基因诊断应用深圳亚能的 β-地贫基因检测试剂盒(PCR-反向点杂交法),检测中国人常见的 β-珠蛋白基因 17 种突

变,分别为:-29M(A>G), -28M(A>G), -30M(T>C), -32(C>A), CapM(-AAAC), IntM(T>G), 14/15M(+G), 17M(A>T), βEM(G>A), 27/28M(+C), 31M(-C), IVS-I-1M(G>T), IVS-I-5M(G>C), 41/42M(-TTCT), 43M(G>T), 71/72M(+A), IVS-II-654M(C>T)。PCR 反应条件见以往的报道^[5],所有实验流程严格按照试剂说明书进行。

1.2.4 汕尾和揭阳 α/β 地贫的分子诊断

采用广东凯普生物的地贫基因检测试剂盒检测 3 种缺失型 α 地贫(--^{SEA}、-α^{3.7}、-α^{4.2})、3 种突变型 α 地贫(α^{CS}α、α^{QS}α、α^{WS}α)和 19 种中国人最常见的 β 地贫,分别为:-29M(A>G), -28M(A>G), -30M(T>C), -32(C>A), CapM(-AAAC, A>C), IntM(T>G), 14/15M(+G), 17M(A>T), βEM(G>A), 27/28M(+C), 31M(-C), IVS-I-1M(G>A, G>T), IVS-I-5M(G>C), 41/42M(-TTCT), 43M(G>T), 71/72M(+A), IVS-II-654M(C>T)。引物及探针见以往的报道^[6],所有实验流程严格按照试剂说明书进行。

2 结果

2.1 地贫基因类型分布

2 057 例确诊为地中海贫血的样本中,α-地贫 1 462 例,β-地贫 561 例,各占 71.07% 和 27.27%,另有 α 和 β 复合型地贫 34 例,占 1.65%。检出 14 种 α-地贫基因突变类型,--^{SEA} 占 74.62%,其次是 -α^{3.7} 和 -α^{4.2},以上 3 种基因型占 α-地贫的 90% 以上。共发现 19 种 β-地贫基因型,其中含杂合子 12 种,双重杂合子 6 种,纯合子仅见 IVS-II-654M/IVS-II-654M。β-地贫前 3 位基因型依次是 IVS-II-654M、41/42M、-28M,共占 81.1%。常规试剂盒检测范围内的 14/15M、31M、IVS-I-1M、-32M 和 -30M 未被检出。潮汕 4 个地理区域地贫基因突变类型见表 1。

2.2 潮汕地区地贫基因频率分布

潮汕 4 个地理区域中 α-地贫基因突变频率最高为--^{SEA},其次是 -α^{3.7} 和 -α^{4.2},以上 3 种基因型占 α-地贫的 90% 以上。IVS-II-654M、41/42M、-28M、17M 这 4 种突变位点为基因频率最高的 β-地贫基因型。潮汕地区地贫基因频率分布见表 2。

表1 潮汕地区地贫基因突变类型及构成比

Table 1 The genotype and composition ratio of thalassemia in Chaoshan region

| 基因类型 | 汕头 | | 潮州 | | 揭阳 | | 陆丰 | | 总数 | |
|--|----|--------|------|--------|-----|--------|-----|--------|------|--------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| α-地贫 | 55 | 78.58 | 1031 | 71.55 | 177 | 72.83 | 199 | 65.68 | 1462 | 71.07 |
| -- _{SEA} | 29 | 41.43 | 789 | 54.75 | 111 | 45.68 | 162 | 53.47 | 1091 | 53.04 |
| -α ^{3.7} | 17 | 24.29 | 107 | 7.42 | 46 | 18.93 | 14 | 4.62 | 184 | 8.95 |
| -α ^{4.2} | 5 | 7.14 | 69 | 4.79 | 12 | 4.94 | 9 | 2.97 | 95 | 4.62 |
| α ^{CS} α | 2 | 2.86 | 8 | 0.56 | - | - | 2 | 0.66 | 12 | 0.58 |
| α ^{QS} α | 2 | 2.86 | 3 | 0.21 | 3 | 1.23 | 4 | 1.32 | 12 | 0.58 |
| α ^{WS} α | - | - | - | - | 2 | 0.82 | - | - | 2 | 0.09 |
| -α ^{3.7} /-α ^{3.7} | - | - | - | - | 1 | 0.41 | 3 | 0.99 | 4 | 0.19 |
| -α ^{3.7} /-α ^{4.2} | - | - | - | - | 1 | 0.41 | 1 | 0.33 | 2 | 0.09 |
| -α ^{4.2} /-- _{SEA} | - | - | 13 | 0.90 | 1 | 0.41 | - | - | 14 | 0.68 |
| -α ^{3.7} /-- _{SEA} | - | - | 38 | 2.64 | - | - | 2 | 0.66 | 40 | 1.95 |
| α ^{QS} α/-- _{SEA} | - | - | 3 | 0.21 | - | - | - | - | 3 | 0.15 |
| α ^{QS} α/-- _{SEA} | - | - | 1 | 0.07 | - | - | - | - | 1 | 0.05 |
| α ^{WS} α/-- _{SEA} | - | - | - | - | - | - | 1 | 0.33 | 1 | 0.05 |
| -α ^{3.7} /α ^{QS} α | - | - | - | - | - | - | 1 | 0.33 | 1 | 0.05 |
| β-地贫 | 15 | 21.42 | 385 | 26.72 | 62 | 25.41 | 99 | 32.67 | 561 | 27.27 |
| 17M | 2 | 2.86 | 41 | 2.84 | 6 | 2.37 | 8 | 2.64 | 57 | 2.77 |
| -28M | 2 | 2.86 | 41 | 2.84 | 9 | 3.70 | 9 | 2.97 | 61 | 2.97 |
| 41/42M | 3 | 4.28 | 117 | 8.12 | 26 | 10.70 | 31 | 10.23 | 177 | 8.60 |
| IVS-II-654M | 7 | 10.00 | 155 | 10.75 | 12 | 4.94 | 43 | 14.19 | 217 | 10.55 |
| CAPM | 1 | 1.42 | - | - | 1 | 0.41 | - | - | 2 | 0.09 |
| -29M | - | - | 1 | 0.07 | 2 | 0.82 | 3 | 0.99 | 6 | 0.29 |
| 71/72M | - | - | 6 | 0.42 | 2 | 0.82 | 1 | 0.33 | 9 | 0.44 |
| 27-28M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | 1 | 0.33 | 2 | 0.09 |
| β ^{EM} | - | - | 3 | 0.21 | 4 | 1.65 | 3 | 0.99 | 10 | 0.49 |
| IntM | - | - | 2 | 0.14 | - | - | - | - | 2 | 0.09 |
| IVS-I-5M | - | - | 3 | 0.21 | - | - | - | - | 3 | 0.15 |
| 43M | - | - | 4 | 0.28 | - | - | - | - | 4 | 0.19 |
| 41-41M/17M | - | - | 2 | 0.14 | - | - | - | - | 2 | 0.09 |
| 41-42M/ IVS-II-654M | - | - | 3 | 0.21 | - | - | - | - | 3 | 0.15 |
| 41-42M/-28M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | - | - | 1 | 0.05 |
| 41-42M/β ^{EM} | - | - | 1 | 0.07 | - | - | - | - | 1 | 0.05 |
| IVS-II-654M /17M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | - | - | 1 | 0.05 |
| IVS-II-654M /-28M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | - | - | 1 | 0.05 |
| IVS-II-654M/IVS-II-654M | - | - | 2 | 0.14 | - | - | - | - | 2 | 0.09 |
| α-thal /β-thal | - | - | 25 | 1.73 | 4 | 1.64 | 5 | 1.65 | 34 | 1.65 |
| -α ^{3.7} /-- _{SEA} IVS-II-654M | - | - | - | - | 1 | 0.41 | - | - | 1 | 0.05 |
| -α ^{3.7} IVS-II-654M | - | - | 5 | 0.34 | 1 | 0.41 | - | - | 6 | 0.29 |
| -α ^{3.7} 41-42M | - | - | 2 | 0.14 | - | - | - | - | 2 | 0.09 |
| -α ^{3.7} 17M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | - | - | 1 | 0.05 |
| -α ^{3.7} β ^{EM} | - | - | 3 | 0.21 | - | - | - | - | 3 | 0.15 |
| -α ^{4.2} IVS-II-654M | - | - | - | - | 1 | 0.41 | - | - | 1 | 0.05 |
| -α ^{4.2} -28M | - | - | - | - | - | - | 1 | 0.33 | 1 | 0.05 |
| -α ^{4.2} 41-42M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | 1 | 0.33 | 2 | 0.09 |
| -- _{SEA} -28M | - | - | 3 | 0.21 | 1 | 0.41 | - | - | 4 | 0.19 |
| -- _{SEA} 17M | - | - | 2 | 0.14 | - | - | - | - | 2 | 0.09 |
| -- _{SEA} -29M | - | - | - | - | - | - | 1 | 0.33 | 1 | 0.05 |
| -- _{SEA} 41-42M | - | - | 1 | 0.07 | - | - | 1 | 0.33 | 2 | 0.09 |
| -- _{SEA} IVS-II-654M | - | - | 7 | 0.48 | - | - | 1 | 0.33 | 8 | 0.39 |
| 合计 | 70 | 100.00 | 1441 | 100.00 | 243 | 100.00 | 303 | 100.00 | 2057 | 100.00 |

“-”表示该基因型例数为0及所占比例为0

表2 潮汕地区地贫基因频率分布(%)

Table 2 The gene frequency distributio of thalassemia in Chaoshan region(%)

| 地区 | α地贫 | | | | | | | β地贫 | | | | | | | |
|----|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-------|-------|--------|-------------|------|--------|-----------------|------|
| | --SEA | -α ^{3.7} | -α ^{4.2} | α ^{CS} α | α ^{QS} α | α ^{WS} α | 其它 | 17M | -28M | 41/42M | IVS-II-654M | -29M | 71/72M | β ^{EM} | 其它 |
| 汕头 | 52.73 | 30.91 | 9.09 | 3.64 | 3.64 | - | - | 13.33 | 13.33 | 20.00 | 46.67 | - | - | - | 6.67 |
| 潮州 | 76.53 | 10.38 | 6.69 | 0.78 | 0.29 | - | 5.33 | 10.65 | 10.65 | 30.39 | 40.26 | 0.26 | 1.56 | 0.78 | 5.45 |
| 揭阳 | 62.71 | 25.99 | 6.78 | - | 1.69 | 1.13 | 1.70 | 9.68 | 14.52 | 41.94 | 19.35 | 3.23 | 3.23 | 6.45 | 1.60 |
| 陆丰 | 81.41 | 7.04 | 4.52 | 1.01 | 2.01 | - | 4.01 | 8.08 | 9.09 | 31.31 | 43.43 | 3.03 | 1.01 | 3.03 | 1.02 |

“-”表示该基因型频率分布为0

3 讨论

地中海贫血基因突变表现为明显的地域性或群体特异性,不同种族人群拥有自己独特的基因突变谱。潮汕地区为广东省三大汉族群落之一,它东邻福建漳州,西接惠州,南面和北面分别与南海、梅州相连。

与以往检测结果相似^[5],--SEA是潮汕地区最主要的地贫基因型,--SEA纯合突变表现为Hb Bart's胎儿水肿综合征,导致胎儿的死亡或出生后马上死亡,并且在母亲分娩时造成大出血,危及母体^[3],因此重型α-地贫新生儿出生缺陷是本地区地贫的重要防控目标。本次我们还在潮州地区发现11例重型β-地贫样本,共检出7种基因型组合形式,患者均表现为小细胞中、重度贫血,其中组合类型β⁰/β⁰(41-41M/17M)的患者比β⁺/β⁺(IVS-II-654M/-28M、IVS-II-654M/IVS-II-654M)和β⁰/β⁺(41-41M/IVS-II-654M、41-41M/-28M、IVS-II-654M/17M)患者贫血症状更重。重型β-地贫患者目前只能依赖长期输血维持生命,只有少数病人有机会接受骨髓移植,此类患者给社会和家庭带来沉重的负担,因此对孕产妇的产前地贫筛查是防止重型地贫婴儿出生的最重要的预防措施。

本研究的数据也显示了潮汕地区与我国南方其他地区的人群有着一样的地贫突变组合,但基因突变位点的频率各不相同。潮汕地区α-地贫以--SEA最为常见,海南却以-α^{3.7}所占比例最多^[7]。β-地贫方面,潮汕地区最为常见的基因类型是IVS-II-654M,其次为41/42M。海南省则以41/42M为首位,-28M次之^[7],广西β-地贫按频率高

低依次是41/42M、17M、IVS-II-654M,惠州地区频率最高是41/42M,而后是IVS-II-654M^[8-9]。据历史记载,中原汉人从西晋末年开,历经数次大规模南迁,而后定居于赣、闽、粤、琼、台诸省。人群的交融同化,带来生物学遗传变异,因而这些地区的地贫基因型存在一定的相似性,但又有各自的特点。

我们知道,β-地贫基因的突变可以作为人群迁移的遗传标记,从而揭示人群之间的亲缘关系^[10-11]。以往的研究指出,我国南方地区β-地贫基因突变以41/42M发生频率最高^[12],海南黎族人中β-地贫基因突变几乎全为41/42M^[13-14],在广西地区,41/42M占42.47%^[8]。我们发现,潮汕与福建、广东梅州和台湾地区最常见的β-地贫突变基因均为IVS-II-654M^[10-12],与之前Lin等^[6]报道的IVS-II-654M发生率高于CD41/42M这一现象仅在客家人居住区及其周边潮汕地区的发现一致,这也说明地贫基因突变类型与人群分布密切相关。

基于我们的研究数据,潮汕地区地贫的基因类型非常丰富,尤其是潮州的地贫突变组合多样化,相比之下,汕头的基因类型较为简单,可能与我们在该地区收集的样本量较少有关。

地贫的预防控制是南方十省医疗卫生系统的重点工作,随着经济、交通高度发达,南北人群交流日益频繁,加上地理、气候等影响因素的共同作用,地贫的基因情况变得更为复杂,开展基因诊断和研究具有重要意义。本研究的分析数据,可为本地区地贫检测和遗传咨询提供参考资料。

参考文献

- [1] Muncie HL Jr, Campbell J. Alpha and beta thalassemia [J]. *Am Fam Physician*, 2009, 80(4):339-344.
- [2] Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem [J]. *Bull World Health Organ*, 2001, 79(80):704-712.
- [3] 徐湘民, 张新华, 陈荔丽. 地中海贫血预防控制操作指南 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 20.
- [4] 卢建沛, 温怡仙, 郑颀, 等. 汕头市户籍人群 α 和 β 地中海贫血的分子流行病学调查 [J]. *热带医学杂志*, 2008, 8(2):139-141.
- [5] 林芬, 林春萍, 翁妙珊, 等. 潮州地区人群血红蛋白病基因型分布调查 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(2):107-110.
- [6] Lin M, Zhu JJ, Wang Q, et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of common alpha and beta thalassemia in Chinese [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2012, 48(2):86-90.
- [7] 陈运春, 王海波, 吴智明, 等. 海南省1620例地中海贫血基因突变检测分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2014(2):18-19.
- [8] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China [J]. *Clin Genet*, 2010, 78(2):139-148.
- [9] 刘宇鹏, 李雪莲, 刘瑞玉. 惠州地区5500例珠蛋白生成障碍性贫血的基因检测分析 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(19):2635-2637.
- [10] Giambona A, Vinciguerra M, Cannata M, et al. The genetic heterogeneity of β -globin gene defects in Sicily reflects the historic population migrations of the island [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2011, 46(4):282-287.
- [11] Das SK, Talukder GA review on the origin and spread of deleterious mutants of the beta-globin gene in Indian populations [J]. *Homo*, 2001, 52(2):93-109.
- [12] Lin M, Wen YF, Wu JR, et al. Hemoglobinopathy: Molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka people in the Meizhou region, southern China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e55024.
- [13] 周代锋, 王政, 王小英, 等. 海南省汉、黎族人群中6种 β -地中海贫血基因突变的研究 [J]. *海南医学院学报*, 2007, 13(1):5-7.
- [14] 周代锋, 蔡望伟, 蔡兰洁, 等. 海南省黎族人4种 β 地中海贫血基因突变的研究 [J]. *海南医学院学报*, 2001, 7(1):4-7.
- [15] 徐两蒲, 黄海龙, 王燕, 等. 福建省籍各地市人群地中海贫血的分子流行病学研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(4):403-406.
- [16] Liu SC, Peng CT, Lin TH, et al. Molecular lesion frequency of hemoglobin gene disorders in Taiwan [J]. *Hemoglobin*, 2011, 35(3):228-236.

佛山市南海区地中海贫血基因类型分析

谢煜楠* 杨发达 黄广强 黄勇

【摘要】 目的 通过调查佛山市南海区地中海贫血基因的基因类型和构成比,了解本地区的地中海贫血基因型的分布,为防控本地区重型地贫的出现提供依据。方法 采用 gap-PCR 法检测 $-^{SEA}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 3 种常见缺失型 α 地贫;采用反向斑点杂交法,可以检测 $\alpha^{OS}\alpha$, $\alpha^{CS}\alpha$, $\alpha^{WS}\alpha$ 3 种常见突变型 α 地贫;采用反向点杂交法检测 β -地贫常见的 17 种点突变,包括 -29、-28、17、 βE 、41-42、43、71-72、654、Int、14-15、27/28、I -1、I -5、31、-30、CAP、-32。结果 检测 α -地中海贫血缺失型 1 359 例标本,检出阳性标本 490 例,阳性率为 36.06% (490/1359)。主要缺失类型是 $-^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$;进行 α -地中海贫血突变型检测的有 1 210 例,阳性率为 2.8% (35/1 210)。进行 β -地中海贫血突变型检测的有 1 073 例,阳性率为 24.98% (268/1 073),主要类型是 CD41-42、IVS- II -654、CD17、-28;共检出 41 例复合型地贫,其中 α 缺失合并 α 突变的有 4 例, α -地贫合并 β -地贫有 37 例。结论 本研究为佛山市南海区的遗传咨询和制定该地区人群筛查的地贫预防计划提供了有价值的基础资料。

【关键词】 地中海贫血;基因型;构成比

Analysis on genotypes with thalassemia in Nanhai of Foshan

XIE Yunan*, YANG Fada, HUANG Guangqiang, HUANG Yong

(Department of Clinical Laboratory, Nanhai District Maternal and Child Health Hospital of Foshan City, Guangdong, China, 528200)

【ABSTRACT】 Objective The study aimed to investigate the genotypic distribution of thalassemia by examining the genotype and composition ratio of the thalassemia gene in the Nanhai district of Foshan city, providing a basis for prevention and control of the emergence of severe thalassemia in the region. Methods gap-PCR method was utilized to detect $-^{SEA}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 3 common gene deletions in α gene mutations. Reverse dot blot techniques were applied to detect $\alpha^{OS}\alpha$, $\alpha^{CS}\alpha$, $\alpha^{WS}\alpha$ 3 common mutation sites in non-missing type α -thalassaemia. The reverse dot blot method was applied to detect 17 common mutation sites in β -thalassaemia, including -29, -28, 17, βE , 41-42, 43, 71-72, 654, Int, 14-15, 27/28, I -1, I -5, 31, -30, CAP, and -32. Results 1 359 persons with α -thalassaemia were examined, and the positive rate was 36.0% (490/1 359). The main missing types were $-^{SEA}/\alpha\alpha$, $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, and $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$. 1 210 persons with α -thalassaemia non-missing type were examined, with a corresponding positive rate of 2.8% (35/1 210). The main types were $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha^{OS}\alpha/\alpha\alpha$, and $\alpha^{WS}\alpha/\alpha\alpha$. 1 073 persons with β -thalassaemia mutants were examined. The positive rate was 24.98% (268/1 073) and the main types were CD41-42, IVS- II -654, CD17, and -28. 41 cases of complex gene deletion type were detected, including 4 cases of α deletion combined α mutation and 37 subjects with α -thalassaemia combined β -thalassaemia. Conclusion This study provides valuable basic data for genetic counseling in the Nanhai district of Foshan and to formulate programs for population-based screening for thalassemia prevention.

【KEY WORDS】 Thalassemia; Genotype; Composition ratio

基金项目:佛山市医学类科技攻关项目(2015AB000532)

作者单位:佛山市南海区妇幼保健院检验科,广东,佛山 528200

*通讯作者:谢煜楠, E-mail:xynan718@163.com

地中海贫血(以下简称地贫)又被称为海洋性贫血或珠蛋白生成障碍性贫血,是一组严重威胁人类健康的致死,致残的遗传性血液病,是最常见及发病率最高的单基因遗传病^[1]。我国南方地区各地报道的地中海贫血基因缺陷率为2.5%~20%,而广东及广西两省地中海贫血基因缺陷发生率高达15.20%^[2]及21.09%^[3],两省地中海贫血的病例数占全国总数的2/5以上,因此,地中海贫血已经成为广东等高发地区社会性公共卫生问题^[4]。目前本病尚无有效治疗方法,携带者检查及产前基因诊断是唯一防止新的患儿出生,提高人口素质的有效措施。本文通过回顾2015年在我院进行的地中海贫血基因检测资料,探讨南海地区各种地中海贫血基因突变的类型及构成比,对于贯彻优生优育,提高人口素质具有重大意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取2015年1月~2015年12月来我院进行地中海贫血基因检查的患者(包括婚检、产检、体检人群)。其中婚检和产检夫妇单方或(和)双方中有地贫筛查阳性。平均红细胞体积(mean corpuscular volum, MCV)<82 fL或(和)平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)<27 pg。

1.2 标本的采集与处理

采集待检者的静脉血标本2 mL于EDTA-K2真空抗凝采血管中,充分摇匀抗凝。如当天检验则按试剂盒说明书进行DNA提取的前处理,如不能当日检验则放置4℃冰箱中保存,保存期限为7 d。

1.3 检测试剂来源及方法学

我室使用的是亚能生物技术(深圳)有限公司提供的全套地中海贫血基因检测试剂盒,包括以下检测内容。

α -地中海贫血缺失型检测试剂盒,采用gap-PCR法,可检测--^{SEA}/ $\alpha\alpha$, - $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$, - $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$ 3种常见缺失型类型。 α -地中海贫血突变型检测试剂盒,采用反向斑点杂交法,可以检测 $\alpha^{CS}\alpha$, $\alpha^{OS}\alpha$, $\alpha^{WS}\alpha$ 3种常见突变型。 β -地中海贫血突变型检测试剂盒,采用反向点杂交法,可以检测 β -地贫常见的17种点突变,包括-29、-28、17、 βE 、41-42、43、71-72、654、Int、14-15、27/28、I -1、I -5、31、-30、CAP、-32。

1.4 检测方法

按试剂盒提供的试剂使用说明书进行操作。

1.5 检测结果的判断

1.5.1 α -地中海贫血缺失型检测结果判断

①正常:检测样品只有一条1 826 bp的正常条带。②缺失杂合子:检测样品有2个条带,若其一为1 826 bp的正常条带,其二为某一缺失型的条带,则结果为此相应缺失型的杂合子;若无正常条带,结果为这种缺失型的双重杂合子。③缺失合纯子:检测样品只有一条缺失型条带,无正常条带,结果为此相应缺失型的纯杂合子。

1.5.2 α -地中海贫血突变型检测结果判断

膜条设3个正常对照点(QSN、CSN、WSN),根据膜条上蓝色斑点显现的位置,读取相应位置上标注的基因型信息。

1.5.3 β -地中海贫血突变型检测结果判断

膜条设7个正常对照点(41-42N、654N、-28N、71-72N、17N、 βEN 、31N),根据膜条上蓝色斑点显现的位置,读取相应位置上标注的基因型信息。

1.5.4 α -地贫- β -地贫复合型检测结果判断

同时检出有 α -缺失型/或 α -突变型与 β -地中海贫血的患者判断为复合型地贫。

2 结果

2.1 α -缺失型地贫、 α -突变型地贫和 β -突变型地贫的检出结果

进行 α -地贫缺失型检测的有1 359例,进行 α -地贫突变型检测的有1 210例,进行 β -地贫突变型检测的有1 073例,其各型地贫检出的结果见表1。

2.2 缺失型 α -地贫基因型检出情况

对490例 α -缺失型地贫进行了--^{SEA}/ $\alpha\alpha$, - $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$, - $\alpha^{4.2}$ / $\alpha\alpha$, HK $\alpha\alpha$ 4种基因型检测,检测结果见表2。

2.3 突变型 α -地贫基因型检出情况

在35例确诊为 α -非缺失型地贫中,进行了 $\alpha^{CS}\alpha$, $\alpha^{OS}\alpha$, $\alpha^{WS}\alpha$ 3种常见的突变基因型检测,其结果见表3。

2.4 β -地贫基因型检测结果

在268例确诊为 β -地贫标本中,进行了 β -地贫常见的17种点突变检测,共检出11种基因型,其中 β 突变合并 α 缺失/突变的有37例。其检出结果见表4。

3 讨论

地中海贫血是由于珠蛋白基因发生缺陷,致使珠蛋白链合成减少或缺如,使形成血红蛋白的

表1 α-缺失型地贫,α-突变型地贫,β-突变型地贫的检出结果

Table 1 The detection of α-thalassemia, α-thalassemia non-missing, β-thalassemia

| 地中海贫血类型 | 检测例数 | 阳性检出例数 | 阳性率(%) | 构成比 |
|---------|-------|--------|--------|-----------------|
| α-缺失型地贫 | 1 359 | 490 | 36.06 | 61.79%(490/793) |
| α-突变型地贫 | 1 210 | 35 | 2.89 | 4.41%(35/793) |
| β-突变型地贫 | 1 073 | 268 | 24.98 | 33.80%(268/793) |
| 合计 | 3 642 | 793 | 63.93 | 100.00% |

表2 490例α-缺失型地贫基因型检测结果

Table 2 The detection of 490 cases of α-thalassemia gene deletion type

| 基因型 | 例数 | 构成比(%) |
|--------------------------------------|-----|--------|
| -- ^{SEA} /αα | 333 | 67.96 |
| -α ^{3.7} /αα | 84 | 17.15 |
| -α ^{4.2} /αα | 45 | 9.19 |
| -- ^{SEA} /-α ^{3.7} | 16 | 3.27 |
| -- ^{SEA} /-α ^{4.2} | 6 | 1.22 |
| -α ^{3.7} /-α ^{4.2} | 1 | 0.20 |
| -α ^{3.7} /-α ^{3.7} | 2 | 0.41 |
| -α ^{4.2} /-α ^{4.2} | 1 | 0.20 |
| -- ^{SEA} /-- ^{SEA} | 1 | 0.20 |
| HKαα | 1 | 0.20 |
| 合计 | 490 | 100.00 |

其中α缺失合并α突变的有4例,α缺失合并β突变的有35例

表3 35例α-突变型地贫基因型检测结果

Table 3 The detection of 35 cases of α-thalassemia non-missing gene deletion type

| 基因型 | 例数 | 构成比(%) |
|-------------------------------------|----|--------|
| α ^{OS} α/αα | 12 | 34.29 |
| α ^{CS} α/αα | 10 | 28.57 |
| α ^{WS} α/αα | 12 | 34.29 |
| α ^{WS} α/α ^{WS} α | 1 | 2.85 |
| 合计 | 35 | 100.00 |

其中α缺失合并α突变的有4例,α突变合并β突变的有2例

α链/非α链比例失衡,而导致的一组遗传性溶血性疾病^[5]。根据珠蛋白肽链合成受到抑制的类型,地中海贫血可以分为α-、β-、δβ-和δ-型地贫等类型,其中α-和β-地贫较为常见。

α地贫是由于α珠蛋白基因突变引起的,它可分为缺失型和非缺失型2种类型,我国人群中最常见的3种缺失型α-地中海贫血,分别是--^{SEA}/αα、-α^{3.7}/αα、-α^{4.2}/αα,最常见的3种突变型α-地贫分别

表4 268例β-突变型地贫基因检测结果

Table 4 The detection of 268 cases of β-thalassemia gene deletion type

| 基因型 | 例数 | 构成比(%) |
|--------------------------------------|-----|--------|
| β ⁴¹⁻⁴² /β ^N | 119 | 44.40 |
| β ⁶⁵⁴ /β ^N | 51 | 19.03 |
| β ¹⁷ /β ^N | 34 | 12.69 |
| β ⁻²⁸ /β ^N | 30 | 11.19 |
| β ^{BE} /β ^N | 12 | 4.48 |
| β ⁷¹⁻⁷² /β ^N | 7 | 2.61 |
| β ⁴³ /β ^N | 7 | 2.61 |
| β ⁻²⁹ /β ^N | 3 | 1.12 |
| β ^{IVS-1-1} /β ^N | 2 | 0.75 |
| β ^{14/15} /β ^N | 2 | 0.75 |
| β ^{27/28} /β ^N | 1 | 0.37 |
| 合计 | 268 | 100.00 |

其中β突变合并α缺失/突变的有37例

是α^{CS}α、α^{OS}α、α^{WS}α。本次检出α-地贫525例(包括缺失490例和突变35例)。南海地区人群中最常见的α缺失类型是--^{SEA}/αα(67.96%),其次为-α^{3.7}/αα(17.14%)和-α^{4.2}/αα(9.18%),前3种占的比例为94.28%,与既往有关佛山地区的报道相似^[6-7]。最常见的α突变类型是α^{OS}α/αα(34.29%),α^{WS}α/αα(28.57%),α^{CS}α/αα(34.29%),3种突变频率比较接近,这与陈淑芬等^[8]的报道有点出入,可能与检测例数还不够多有关。另外我们发现一例携带有HKαα基因的样本,丰富了南海区的临床材料。HKαα基因是-α^{3.7}和αα^{ami4.2}不等位交换形成,基因型HKαα/αα易被诊断为-α^{3.7}/αα^[9],判断时应加以区别。

β地贫是由β珠蛋白基因突变引起,目前发现的β地贫基因突变超过200种,在中国已报道有48种,其中中国南方报道有46种^[5]。本次研究共发现β基因型11种,最常见的β突变类型是β⁴¹⁻⁴²/

β^N (44.40%), β^{654}/β^N (19.03%), β^{17}/β^N (12.69%), β^{26}/β^N (11.19%), 南海地区前4种 β 突变占总例数的87.31%, 广东省和省内的研究资料数据^[9-12]接近, 但后2个突变类型的构成比又有些差别; 与罗娟莉^[13]的福建省 β 地中海贫血主要类型为 β^{654}/β^N (41.13%)、 β^{41-42}/β^N (29.00%)、 β^{17}/β^N (13.42%)和刘富华^[3]的广西地区 β 地中海贫血主要类型 β^{41-42}/β^N (46.89%)、 β^{17}/β^N (20.20%)、 β^{654}/β^N (14.97%)有所不同。研究表明, 南海区的 β 地中海贫血的突变类型与广东省内的相符, 但同时又与其他地区有着一定的区域性差别, 这符合了它具有明显的地域性和异质性的特点^[1]。另外, 发现一例罕见型的 β 地中海贫血基因突变(CD17), 丰富了临床研究资料。

本次研究没把MCV作为全部受检人群的首筛指标, 原因是MCV虽然对地贫初筛的灵敏度较高, 但对 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 基因型存在一部分漏诊, 对静止型 α /轻型 β 地贫漏诊极大部分^[14], 影响了地贫的检出率。何云英等^[15]在佛山地区1514例地中海贫血基因型分析中报道 α 地贫的漏诊率达3.04%, 其中以3.7型、4.2型、WS型3种类型最易漏诊。潘干华等^[16]在1392例血液学筛查指标阴性人群中检出地中海贫血基因携带者漏诊率为5.39%, 且均为静止型 α 地中海贫血。

佛山是地中海贫血的高发地区之一, 佛山市政府从2007年开始, 对佛山市户籍人员实行免费婚前地贫筛查和产前地贫筛查, 南海区从2016年1月开始, 对于孕前优生的血常规检查出MCV<82 fL和(或)MCH<27 pg的人员进行免费的地中海贫血基因诊断, 对于夫妻双方基因诊断确诊为都携带有 α 地贫或都携带有 β 地贫的孕妇进行抽取羊水或脐血进行产前基因诊断。我院作为南海地中海贫血筛查中心, 承担了大部分的地贫基因检测任务, 可以大大地减少重型地贫患儿的出生, 有效地提高出生人口素质^[6]。以往对地中海贫血基因型研究的文献大多都只做 α -缺失和 β -突变, 本研究对 α -突变也做了统计, 数据更全面, 本研究通过大量的临床数据阐明了南海区的地贫基因类型和频率, 结合本地区基因型分布特点, 制订符合当地的地贫防控策略和技术流程, 对于本地区地中海贫血的遗传咨询, 携带者筛查, 优化产前诊断, 提高人口素质有一定的参考价值。

参考文献

[1] 吴艳丽. 梅州地区育龄人群地中海贫血基因的检测

与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(4):442-443.

- [2] 王逾男, 林建昌, 张亮, 等. 悬浮阵列技术在地中海贫血基因诊断中的应用[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2015, 7(4):16-23.
- [3] 刘富华, 贾艺聪, 陈洁晶, 等. 广西地区13589例地中海贫血筛查结果及基因突变类型分析[J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(11):966-969.
- [4] 王燕燕, 李晓辉, 徐西华. 地中海贫血诊治进展与我国现状[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6):473-476.
- [5] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011:12.
- [6] 宋春林, 陈淑芬, 范菊花, 等. 佛山地区地中海贫血的产前筛查和产前基因诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(5):16-17, 24.
- [7] 范联, 林业辉, 周杏, 等. 佛山地区地中海贫血基因型的调查研究[J]. 中华全科医学, 2013, 11(4):593, 620.
- [8] 陈淑芬, 嵒淑莉, 宋春林, 等. 佛山地区非缺失型 α 地中海贫血基因突变分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(3):17, 22.
- [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, 24(8):7-10.
- [10] 崔金环, 区丽群, 郑雪联, 等. 广东佛山地区 β 地中海贫血基因突变类型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(4):16-17.
- [11] 黄晓佳, 李成德, 梅敏, 等. 肇庆地区人群地中海贫血基因型的分布及其特点[J]. 黑龙江医学, 2016, 40(8):688-690.
- [12] 周冰焱, 赵文忠, 李铭臻, 等. 广东地区16336例地中海贫血初筛阳性样本基因型分析[J]. 中国医学导报, 2016, 13(32):73-77.
- [13] 罗娟莉, 陈小犍. 中国福建省闽北地区470例地中海贫血基因类型分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2):540-545.
- [14] 蔡晓晖. 佛山市南海地区育龄人群 α 和 β 地中海贫血的分子流行病学调查[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(8):24-26.
- [15] 何云英, 郭晓玲. 佛山地区1514例地中海贫血基因型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(7):17-19, 23.
- [16] 潘干华, 申茺子, 黄勇, 等. 1392例血液学筛查指标阴性个体的地中海贫血基因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(3):351-352.

乳腺浸润性筛状癌与筛状结构导管原位癌的临床病理及免疫组化对比分析

曾玉梅 曹晓珊 杜娟 陈应智 储兵*

[摘要] **目的** 探讨乳腺浸润性筛状癌(invasive cribriform carcinoma, ICC)与筛状结构导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)的临床病理及免疫表型特点。**方法** 收集12例浸润性筛状癌及12例筛状结构导管原位癌的临床资料,对它们进行形态学观察,免疫组化检测,并进行比较。选用的抗体包括CK5/6、CK(34 β E12)、P63、Calponin、ER、PR、HER2、E-cad、Ki67。**结果** 临床资料显示 ICC 患者的平均发病年龄较筛状结构 DCIS 的大,临床可触及肿物,而 ICC 腋窝淋巴结转移少见,预后均良好。镜下两者具有极相似的筛状结构,免疫组化结果显示,ICC 导管周围肌上皮标记均为阴性,而筛状结构 DCIS 周围肌上皮标记阳性。**结论** ICC 与筛状结构 DCIS 有相似的组织学特征,免疫组化对鉴别诊断有重要意义。

[关键词] 乳腺;病理;浸润性筛状癌;筛状结构;导管原位癌;免疫组化

Comparative analysis based on clinicopathology and immunohistochemistry of invasive cribriform carcinoma of the breast and cribriform structure of ductal carcinoma in situ

ZENG Yumei, CAO Xiaoshan, DU Juan, CHEN Yingzhi, CHU Bin*

(Department Pathology of Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528400)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the clinicopathologic characteristics and the immunophenotypic markers of invasive cribriform carcinoma (ICC) in comparison to cribriform structure of ductal carcinoma in situ(DCIS). **Methods** 12 cases of ICC and 12 cases of cribriform structure of ductal carcinoma in situ were collected for this analysis, in which the morphologic features and immunohistochemical expressions were measured and compared. The antibody CK5/6, CK(34 β E12), P63, Calponin, ER, PR, HER2, E-cad, and Ki67 were included in this analysis. **Results** The median age of onset of ICC was much older referring to the data of the involved cases. The ICC patients were found with palpable tumors, whereas axillary lymph node metastases were rare and the prognoses were satisfied. All cases showed similar cribriform structure in microscopic examinations, the immunostaining for myoepithelial cells clear expressed negative to 12 ICC patients, but showed positive in 12 cases of cribriform structure of ductal carcinoma in situ. **Conclusions** The histological features of ICC were similar to those found in cribriform structure of ductal carcinoma in situ, the immunohistochemistry was of great significance in diagnosing ICC from the other.

[KEY WORDS] Breast; Pathology; Invasive cribriform carcinoma of the breast; Cribriform structure; Ductal carcinoma in situ; Immunohistochemistry

作者单位:广东省中山市人民医院病理科,广东,中山 528400

*通讯作者:储兵, E-mail:dechubing@aliyun.com

浸润性乳腺癌是女性最常见的癌症,并且是引起女性死亡的主要原因^[1]。其中乳腺浸润性筛状癌(invasive cribriform carcinoma, ICC)是一种具有筛状结构的浸润性癌,结构与筛状结构导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)相似,近年来逐渐增多且预后极好,一般分为单纯型和混合型^[2]。单纯型是指具有明显的筛状结构,同时伴有小于50%小管癌成分,混合型 ICC是指伴有10%~49%的其它形态成分(小管癌除外)。但 ICC与筛状结构 DCIS 两者病理分类、手术方式及治疗方案均不同。为了在实际工作中更好区分两者,我们对12例乳腺筛状癌与12例筛状结构导管原位癌进行临床资料、组织学及免疫组化对比分析,以探讨乳腺筛状癌特殊的临床病理特点。

1 资料与方法

1.1 资料

对2005年1月至2015年1月中山市人民医院病理科乳腺癌档案切片进行复查,选取出乳腺浸润性筛状癌12例。根据苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)形态,12例浸润性筛状癌中单纯型和混合型各6例,均为女性患者,术前均未作过化疗、放疗和内分泌治疗,无其他合并恶性肿瘤和家族、遗传性疾病病史,患者年龄27~74岁,中位年龄54岁。同时选取筛状结构导管原位癌12例为对照组。

1.2 方法

所有标本经10%福尔马林固定,常规石蜡包埋。全部蜡块重新3 μm切片,HE及免疫组化染色。免疫组化染色采用罗氏全自动免疫组化机,选用的抗体有:CK5/6、CK(34βE12)、P63、Calponin、ER、PR、HER2、Ki67、E-cad。ICC再进一步用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术检测HER2基因扩增情况。以标记物在肿瘤细胞相应部位(胞膜、胞膜-胞质、胞质、胞核)引起黄棕色颗粒沉着为阳性,相应部位无黄棕色颗粒沉着则为阴性。FISH法HER2基因扩增检测试剂盒购自北京金菩嘉医疗科技有限公司。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,非正态分布资料用中位数表示,组间比较用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

患者均为女性。实验组 ICC 组中位年龄[54(27~74)]岁,临床上均发现乳腺肿物,肿物最大径1.1~3.5 cm,均未发现腋窝淋巴结癌转移。对照组筛状结构 DCIS 中位年龄[36(24~62)]岁,3例发现乳腺肿物,2例因乳头溢液就诊,7例为体检发现,肿物最大径0.6~3 cm。其余临床资料见表1、2。ICC组年龄与对照组比较有统计学差异

表1 ICC的临床资料
Table 1 Clinical data of ICC

| 病例 | 年龄(岁) | 部位 | 病程(月) | 肿物最大径(cm) | 钼靶 | 病理分级 | 腋窝淋巴结转移 | 手术方式 |
|--------|-------|--------|-------|-----------|----|------|---------|---------|
| ICC-1 | 45 | 左乳外上象限 | 6 | 2.5 | 3a | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-2 | 57 | 左乳 | 3 | 2.5 | 3b | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-3 | 52 | 右乳外上象限 | 8 | 1.8 | 3b | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-4 | 72 | 右乳 | 12 | 2.0 | 4a | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-5 | 56 | 右乳 | 18 | 3.0 | 4b | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-6 | 66 | 右乳 | 8 | 3.0 | 4a | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-7 | 46 | 右乳外上象限 | 9 | 1.1 | 4a | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-8 | 46 | 右乳 | 12 | 1.1 | 3b | II | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-9 | 48 | 右乳 | 18 | 1.2 | 3b | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-10 | 74 | 右乳 | 12 | 1.5 | 4b | II | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-11 | 62 | 左乳 | 18 | 1.5 | 4b | I | 无 | 乳腺改良根治术 |
| ICC-12 | 27 | 右乳 | 18 | 1.8 | 4a | II | 无 | 乳腺改良根治术 |

表2 筛状结构DCIS的临床资料

Table 2 Clinical data of cribriform structure of ductal carcinoma in situ

| 病例 | 年龄 (岁) | 部位 | 病程 (月) | 肿物最大径 (cm) | 钼靶 | 病理分级 | 腋窝淋巴结 转移 | 手术方式 |
|-----|-----------|--------|-----------|---------------|----|------|-------------|-------|
| *1 | 30 | 左乳内上象限 | 1/4 | 0.8 | 3a | I | 无 | 局部切除术 |
| *2 | 28 | 左乳 | 1 | 2.2 | 3a | I | 无 | 保乳根治术 |
| *3 | 36 | 左乳 | 1/2 | 3.0 | 4a | I | 无 | 保乳根治术 |
| *4 | 62 | 右乳 | 6 | 1.5 | 4a | I | 无 | 保乳根治术 |
| *5 | 44 | 右乳外上象限 | 14 | 1.0 | 3b | I | 无 | 保乳根治术 |
| *6 | 43 | 左乳 | 24 | 2.0 | 3b | I | 无 | 保乳根治术 |
| *7 | 32 | 左乳内上象限 | 1/4 | 0.6 | 3a | I | 无 | 局部切除术 |
| *8 | 41 | 右乳外上象限 | 1 | 2.0 | 3a | I | 无 | 保乳根治术 |
| *9 | 26 | 左乳 | 1/2 | 1.2 | 3a | I | 无 | 保乳根治术 |
| *10 | 24 | 右乳 | 6 | 1.5 | 3b | I | 无 | 保乳根治术 |
| *11 | 36 | 右乳外上象限 | 14 | 1.0 | 3b | I | 无 | 局部切除术 |
| *12 | 43 | 左乳 | 24 | 2.0 | 3a | I | 无 | 保乳根治术 |

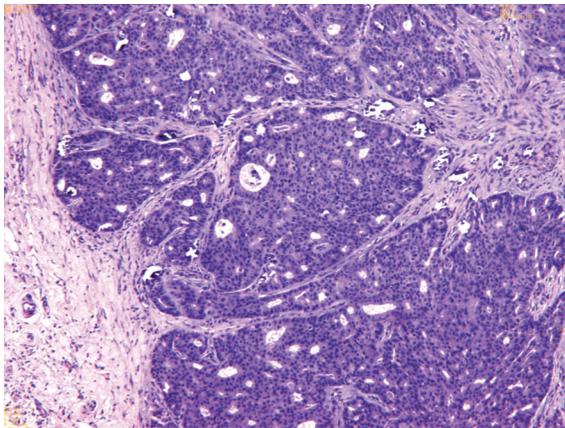


图1 ICC的镜下形态(HE, ×200)

Figure 1 Microscopic morphology of ICC(HE, ×200)

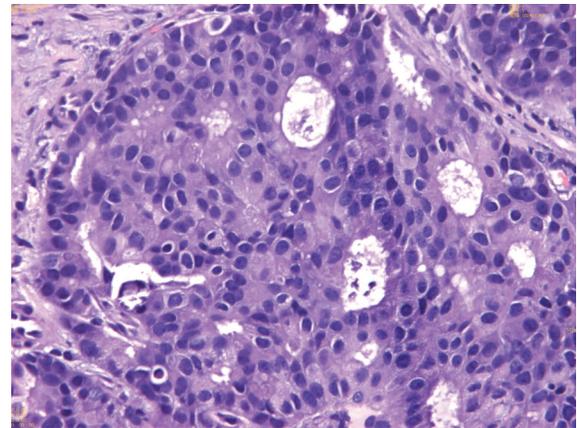


图2 ICC的镜下形态(HE, ×400)

Figure 2 Microscopic morphology of ICC(HE, ×400)

($P=0.028$), 肿物大小两组无统计学差异($P=0.127$)。

2.2 病理特点

2.2.1 肉眼所见

浸润性筛状癌肿块切面灰白,一般边界清楚,质硬,有时可见散在灰黄色。筛状结构原位癌切面灰黄灰白,可见边界不清的实性区,部分切面可见黄色的坏死物。

2.2.2 镜下所见

浸润性筛状癌肿瘤细胞呈不规则浸润性岛状分布,常成角状,形成界限清楚的筛孔圆-卵圆形

(图1)。筛孔腔可见胞浆突起,腔内有粘液样分泌物,部分可见到微钙化,肿瘤无明显坏死,局部癌巢呈条索状或实性团状,细胞形态单一,小至中等大,细胞质少,核级别低,核分裂象罕见(图2)。周围可见胶原化,或有反应性的成纤维母细胞和成肌纤维细胞增生,按浸润性乳腺癌分级标准,6例单纯型ICC组均为I级,而6例混合型均伴有浸润性导管癌,其中3例为II级。而筛状结构导管内癌的筛孔略有不同,圆而光滑且腔缘平滑,仿似冲凿一样。细胞也呈单形性,低核级别,核分裂少见,病理分级均为I级。

2.2.3 免疫组化结果

从表3、4中可以看到,实验组 ICC 肌上皮标记无论在单纯型或混合型 CK5/6、P63(图3)、Calponin 在癌巢周均表达阴性,上皮标记 CK(34βE12)阳性率为83%,ER阳性率为100%(图4)、PR为91%,HER2均在0~2+之间,做FISH检测HER2无1例扩增,而Ki67保持在较低水平。而对照组筛状结构 DCIS 在癌巢周均有 CK5/6、P63、Calponin 的肌上皮表达。CK(34βE12)阳性

率100%,Ki67也在较低水平,平均约20%,ER、PR阳性率为100%,HER2原位均为3+,没有进行FISH检测。

3 讨论

ICC是一种具有明显筛状结构的少见的浸润癌,由Page等^[3]在1983年提出并进行了描述。但ICC仅占乳腺癌的0.3%~0.8%,也有研究报告占4%,平均年龄53~58岁^[4],少有男性患者报道^[5]。肿

表3 ICC免疫组化表达

Table 3 Immunohistochemical characteristics of ICC

| 病例 | CK5/6 | CK(34βE12) | P63 | Calponin | ER | PR | HER2 | Ki67 | E-cad |
|--------|-------|------------|-----|----------|----|----|------|------|-------|
| ICC-1 | - | + | - | - | + | + | 0 | 5% | + |
| ICC-2 | - | + | - | - | + | - | 1+ | 5% | + |
| ICC-3 | - | + | - | - | + | + | 1+ | 8% | + |
| ICC-4 | - | - | - | - | + | + | 1+ | 8% | + |
| ICC-5 | - | + | - | - | + | + | 1+ | 10% | + |
| ICC-6 | - | + | - | - | + | + | 2+ | 10% | + |
| ICC-7 | - | - | - | - | + | + | 1+ | 5% | + |
| ICC-8 | - | + | - | - | + | + | 0 | 10% | + |
| ICC-9 | - | + | - | - | + | + | 1+ | 15% | + |
| ICC-10 | - | + | - | - | + | + | 1+ | 8% | + |
| ICC-11 | - | + | - | - | + | + | 2+ | 15% | + |
| ICC-12 | - | + | - | - | + | + | 1+ | 10% | + |

病例1~6为单纯型,7~12为混合型;“-”为阴性表达,“+”为阳性表达

表4 DCIS免疫组化表达

Table 4 Immunohistochemical characteristics of DCIS

| 病例 | CK5/6 | CK(34βE12) | P63 | Calponin | ER | PR | HER2 | Ki67 | E-cad |
|-----|-------|------------|-----|----------|----|----|------|------|-------|
| *1 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 20% | + |
| *2 | + | + | + | + | + | - | 3+ | 25% | + |
| *3 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 15% | + |
| *4 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 10% | + |
| *5 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 30% | + |
| *6 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 20% | + |
| *7 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 20% | + |
| *8 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 25% | + |
| *9 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 15% | + |
| *10 | + | + | + | + | + | + | 3+ | 15% | + |
| *11 | + | + | - | - | + | + | 3+ | 25% | + |
| *12 | + | + | - | - | + | + | 3+ | 20% | + |

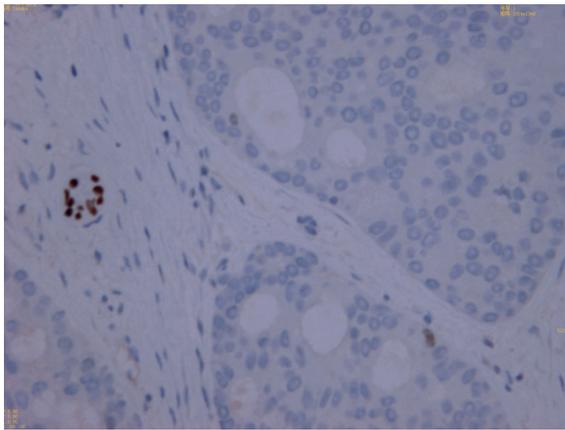


图3 肌上皮 P63 表达缺失 (Elivision, ×400)
Figure 3 The negative expression of myoepithelial P63 (Elivision, ×400)

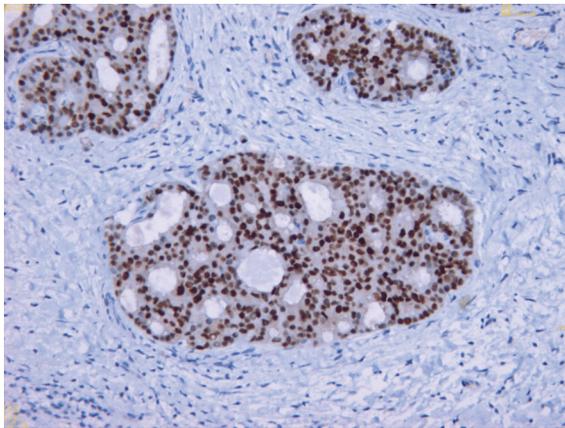


图4 ER 阳性表达 (Elivision, ×200)
Figure 4 The positive expression of ER (Elivision, ×200)

瘤生长较缓慢且不易发现肿物^[6],影像学检查常有囊实性或微钙化^[7],盛洁等^[8]认为钙化可能是组织坏死后钙盐析出沉积在坏死组织中形成,钙化越明显,其恶性程度越高。肿瘤常单发,部分病例可为多发性病灶。大体检查肿物平均直径约2~3.5 cm,质较硬,切面呈灰白色,界清。

本实验组中 ICC 中位发现年龄为 54 岁,肿物最大径平均约 1.91 cm,未见有淋巴结转移;对照组中的中位发现年龄为 36 岁,肿物最大径平均 1.57 cm(具体临床资料见表 1、表 2)。显示 ICC 平均发病年龄较筛状结构 DCIS 大。肉眼观 ICC 切面可见不明显的实性或颗粒状区,部分可见管腔内淡黄色的坏死,边界不清,与 DCIS 相似。光镜所见 ICC 的癌巢呈不规则及分布杂乱的岛状,或典型的筛孔状,筛孔多为不规则圆形,大小不尽相同,可

见顶浆分泌及微钙化。腔内可有多少不等的分泌物。粘液染色腔内分泌物阳性,有人认为是癌细胞自身产生的黏液可阻碍代谢,减轻了其侵袭性生物学行为^[9]。Grimelius 染色癌细胞内不含有嗜银颗粒。细胞形态一般较小且多为低级别核,核分裂象不易见;间质有反应性增生的纤维母细胞和肌纤维母细胞。筛状结构 DCIS 光镜下其扩大的导管通常缺乏棱角,筛孔形状圆形较整齐,腔缘也可见顶突,有的腔呈几何形,有些筛状结构形成栅栏或罗马桥状,并保持细胞核与桥长轴及腔缘垂直的特征。间质胶原可有瘢痕化,使导管变形呈不规则,而类似于 ICC。

免疫表型中,ICC 癌巢中无 1 例表达肌上皮标记。而具有筛状结构的 DCIS 癌巢周均有肌上皮的不同程度表达。值得注意的是乳腺肌上皮指标最好采用 2 种以上,虽然 P63 被公认为敏感性和特异性较高的肌上皮指标,但免疫组化受影响的因素较多,包括标本固定、抗原修复、商品化的抗体的稳定性等。因此我们认为采用 2 种以上的肌上皮指标是比较稳妥的。有研究表明在浸润性筛状癌激素受体阳性表达率高,无论是单纯型或混合型 ER、PR 阳性表达率达 86.7%~100%,而 HER2 均为阴性,Ki67 一般低表达(<14%)^[10],在混合型 ICC 中 Ki67 指数高于单纯型 ICC^[11],与本实验组中结果大致相同。筛状型 DCIS 的免疫表型会因级别不同而有差异,几乎所有表达于浸润性乳腺癌的标记物均表达于 DCIS,只是表达的普遍性有差别,HER2 过表达常见于高级别的 DCIS。目前评估 ER、PR 的方法多数是沿用以前发表的针对浸润性乳腺癌的免疫组化法,约 75%~80%的 DCIS 表达,PR 的阳性率略低。研究表明,筛状型 DCIS 有 89%的 ER 表达^[2]。但实际工作中,两者只要是大于或等于 1%均为阳性。对于 CK(34βE12)两者均有较高的阳性表达,因此 ICC 与 DCIS 起源上可能有密切相关。但根据肌上皮表达,ICC 其本质为浸润性癌,目前乳腺 ICC 治疗方案与非特殊类型浸润性癌无区别,多采用改良根治术加术后化疗^[12],但有机会接受赫赛汀靶向治疗的病例太少,还需进一步累积 HER2 阳性的病例统计。而筛状结构 DCIS 临床多采用保守治疗加术后化疗,无需进行 HER2 的检测及靶向治疗。

电镜下筛状癌与小管癌的细胞核、细胞质的特点及细胞间连接复合体都相似,显示有类似的

管腔结构及管腔缘微绒毛的存在。国内有学者认为,ICC直接起源导管内癌,导管内癌也可同时或单独演变为小管癌^[13]。但两者在起源上是否为同一类型,或者是否为浸润性癌的不同发展阶级有待进一步研究。

ICC的预后非常好,有研究中报道单纯型ICC和浸润性筛状结构>50%的混合型ICC患者的5年生存率都可以达到100%,而低于50%的混合型ICC为88%^[2],ICC淋巴结转移率较低(14.13%),腋下淋巴结转移很少超过3个^[14]。与细胞间连接有关的E-cad标记均为阳性,这可能与其良好的预后相关^[15]。Saleh等^[16]对单纯型浸润性筛状癌进行研究,发现预后标志物CD44vB和v6亚型强表达,而缺乏v4亚型的表达。

鉴于实际工作中,乳腺肿瘤出现筛状结构的病变可以是ICC或DCIS,甚至是腺样囊性癌。但腺样囊性癌有腺上皮和肌上皮2种细胞形成真假腺腔,有基底细胞样、鳞状细胞及皮脂腺细胞分化,免疫组化表达肌上皮和基膜成分,ER、PR为阴性。在没有免疫组化尤其是在冰冻时,或者在穿刺活检肿瘤组织较小时难以区分,因其临床治疗方案有不同,为了避免对患者作出过度治疗,是否报告方式可以倾向于保守,例如:有筛状结构的乳腺癌,是否为浸润性筛状癌或筛状结构的导管原位癌待免疫组化进一步明确。

综上所述,ICC与筛状结构DCIS有相似的组学特征,鉴别需免疫组化技术协助。

参考文献

- [1] Torrt LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 龚西榆,丁华野. 乳腺病理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:328-330.
- [3] Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, et al. Invasive cribriform carcinoma of the breast[J]. Histopathology, 1983, 7: 525-36.
- [4] Rakha E, Pinder SE, Shin SJ, et al. Tubular carcinoma and cribriform carcinoma. In WHO Classification of Tumours of the Breast[M]. 4th edition. Lyon: IARC Press, 2012:43-45.
- [5] 袁修学,袁静萍,杨月红,等. 男性乳腺浸润性筛状癌1例[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(5): 580-581.
- [6] Zhang W, Lin Z, Zhang T, et al. A pure invasive cribriform carcinoma of the breast with bone metastasis if untreated for thirteen years: a case report and literature review[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10:251.
- [7] Nishimura R, Ohsumi S, Teramoto N, et al. Invasive cribriform carcinoma with extensive microcalcifications in the male breast[J]. Breast Cancer, 2005, 12(2):145-148.
- [8] 盛洁,高洁,钱朋飞. X线钼靶与高频彩超对早期乳腺癌诊断的对比研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 2012, 23(3):206-208.
- [9] 李婷婷,张丽丽,赵丽荣. 乳腺巨大浸润性筛状癌超声表现1例[J]. 中国医学影像技术, 2015, 31(3): 482.
- [10] Zhang W, Zhang T, Lin Z, et al. Invasive cribriform carcinoma in a Chinese population: comparison with low - grade invasive ductal carcinoma - not otherwise specified[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(3): 445-457.
- [11] Cong Y, AI E. Invasive cribriform carcinoma of the breast: a report of nine cases and a review of the literature[J]. Oncol Lett, 2015, 9(4):1753-1758.
- [12] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2013版)[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8):637-693.
- [13] 魏莉,李志高. 乳腺浸润性筛状癌相关研究[J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2015, 9(6):398-402.
- [14] 朱鸿,步宏. 乳腺浸润性筛状癌1例[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(2):244-245.
- [15] 李莉,闻祥红. 乳腺浸润性筛状癌的临床病理及免疫表型[J]. 临床与实验病理学杂志, 2005, 21(5): 555658.
- [16] Saleh F, Reno W. Invnsive cribriform breast carcinomas in patients with grade I and stage IIA (T2 NO MO)breast cancer strongly express the v3 and v6.but not the v4 isoforms of the metastafic marker CD44[J]. Neoplasm, 2008, 55(3):246.

海南省低收入女性人乳头瘤病毒感染状况及亚型研究

钟威达¹ 欧武英^{2*} 陈元花¹ 郭红¹

【摘要】 目的 了解海南低收入女性宫颈人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染的现状及亚型分布情况。方法 于2016年1月至2016年12月,由海南省总工会及各市县工会组织本省15个市县的1 373名低收入困难女职工进行健康体检,其中汉族935人、非汉族438人。采用基因芯片导流杂交技术对妇女宫颈脱落细胞进行21种HPV基因分型检测。结果 在所研究的1 373例妇女中,HPV感染者为192例,总感染率为13.98%(192/1 373)。共检测出19种HPV亚型,HPV感染率排在前5位的亚型从高到低依次为HPV52(3.35%, 46/1 373)、HPV51(1.97%, 27/1 373)、HPV58(1.97%, 27/1 373)、HPVcp8304(1.75%, 24/1 373)和HPV53(1.60%, 22/1 373)。不同市县人群的HPV感染率有所不同,差异有统计学意义($P < 0.05$),HPV感染率最高的市县为海口市(32.35%, 11/34),其次是昌江县(24.63%, 33/134),不同市县人群HPV感染的优势型别也有所不同。汉族和非汉族人群的HPV感染率分别为14.12%(132/803)和13.70%(60/378),二组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 海南省低收入女性宫颈HPV感染率相对国内普通人群较低,不同市县人群的HPV感染率及感染型别有所不同,应加强在HPV高感染率地区进行宫颈癌的防控工作。

【关键词】 低收入人群; 基因分型; 乳头状瘤病毒; 宫颈肿瘤

Study on the prevalence and subtype distributions of human papillomavirus in low-income women in Hainan

ZHONG Weida¹, OU Wuying^{2*}, CHEN Yuanhua¹, GUO Hong¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Hainan Maternity Hospital, Haikou, Hainan, China, 570105;

2. Department of Clinical Laboratory, Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 570208)

【ABSTRACT】 Objective To evaluate the prevalence and subtype distributions of human papillomavirus (HPV) in low-income women in Hainan. Methods 1 373 low-income women from 15 cities of Hainan were organized to conduct a physical examination by the Hainan Provincial Federation of trade unions and the city and county trade unions from January 2016 to December 2016. Among them, 935 people were of Han nationality and 438 were of non-Han nationality. The prevalence of 21 subtypes of HPV in the cervical cells of these women was detected using flow-through hybridization and gene chip technology. Results Among the 1 373 women studied, HPV infection was found in 192 cases, with a total infection rate of 13.98% (192 / 1 373). 19 subtypes of HPV were found in these samples, and the top 5 subtypes of HPV infection from high to low were HPV 52 (3.35%, 46/1 373), HPV 51 (1.97%, 27/1 373), HPV 58 (1.97%, 27/1 373), HPV cp8304 (1.75%, 24/1 373) and HPV 53 (1.60%, 22/1 373). There is a significant difference in the infection rate of HPV in different cities and counties ($P < 0.05$). The highest rate of HPV infection was found in Haikou with an infection rate of 32.35% (11/34), followed by Changjiang with an infection rate of 24.63% (33/134). The dominant subtype of HPV infection was also different among different cities and counties. No significant

基金项目:海南省总工会医疗救助女职工关爱行动帮扶项目资助(201505)

作者单位:1. 海南妇产科医院检验科,海南,海口 570105

2. 海口市人民医院检验科,海南,海口 570208

*通讯作者:欧武英, E-mail:395039212@qq.com

difference was found in the infection rate between women of Han nationality 14.12% (132/803) and non-Han nationality 13.70% (60/378) ($P > 0.05$). **Conclusion** Compared to the domestic general population, the prevalence of HPV infection in low-income women in Hainan province is relatively low, and the infection rate of HPV and the distribution of infected subtypes vary in different cities and counties. So the goal will be to strengthen the prevention and control of cervical cancer in the area with high HPV prevalence.

[KEY WORDS] Low-income women; Subtype; Papillomavirus; Cervical tumor

宫颈癌是妇科临床最常见的恶性肿瘤之一,其病死率位于全球妇女癌症死亡率的第2位,且有发病率增加和年轻化趋势,其发病随地域和经济状况不同而异,约80%的病例发生在发展中国家^[1-2]。大量流行病学和分子生物学研究资料表明,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)与宫颈癌及癌前病变密切相关,90%以上的宫颈癌发生是由于HPV特别是高危型HPV病毒持续感染引起的^[3-4]。国内外大量的研究认为受教育程度和经济收入水平低的人群对HPV及HPV疫苗知识的认知程度低,是HPV感染的高危人群^[5-6],针对该群体的HPV感染情况国外有相关研究但国内鲜有报导。为了解海南省低收入家庭已婚妇女HPV感染的现状及亚型分布情况,本研究对2016年1月至2016年12月由海南省总工会及各市县工会组织的1373名低收入困难女职工HPV的感染情况进行分析,为宫颈癌高危人群制定有效的筛查措施提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究对象为2016年1月至2016年12月由海南省总工会及各市县工会组织的本省15个市县工会帮扶中心建档的1373名困难女职工,收集自愿进行健康体检者的样本。研究人群除了三亚市、临高县及白沙县外基本覆盖了海南省的所有市县,每个市县约100人,每位符合条件的妇女均持身份证或户口本登记,年龄23~60岁。其中汉族935人、非汉族438人,所有研究对象均有性生活史。

1.2 标本采集

所有样本由本院的体检团队到每个市县负责采集,采用香港凯普生物科技有限公司生产的专用宫颈脱落细胞取材器取宫颈脱落细胞并置于专用保存液中,于3天内集中送到海南妇产科医院基因诊断室进行HPV-DNA分型检测。

1.3 检测方法

采用HPV核酸扩增分型检测试剂盒(香港凯普生物科技有限公司),通过快速导流杂交基因芯片技术(HybriMax),对所有样本严格按照说明书进行检测,高危型包括:16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66和68型;低危型包括:6、11、42、43、44、53和81(CP8304)型共21种HPV基因型。结果判断:其中任何一种HPV亚型阳性即视为HPV感染,2种或以上HPV亚型阳性即视为HPV复合感染,高危型HPV阳性或高危型和低危型HPV同时阳性者均视为高危型HPV感染,仅低危型HPV阳性者视为低危型HPV感染。

1.4 统计学分析

使用SPSS 21.0软件对数据进行统计学分析,以百分率作为HPV感染评价指标,各组HPV感染率差异采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,对多型感染者,各亚型的阳性率重复计算。

2 结果

2.1 HPV感染率及亚型分布

在15个不同市县的1373例妇女中,HPV检测阳性者192例,总感染率为13.98%(192/1373),感染者中单一感染144例(75%),多重感染48例(25%);共检测出19种HPV亚型,HPV感染率排在前5位的亚型从高到低依次为HPV52(3.35%)、HPV51(1.97%)、HPV58(1.97%)、HPV cp8304(1.75%)和HPV53(1.60%)。高危型HPV感染最常见的亚型为HPV52(3.35%),其次为HPV51(1.97%)、HPV58(1.97%)、HPV18(1.53%)和HPV39(1.46%)。而HPV16(1.38%)、HPV68(1.02%)、HPV66(0.80%)、HPV33(0.44%)、31(0.29%)、HPV45(0.15%)、HPV56(0.15%)、HPV59(0.07%)较少见,没有检测到HPV43和HPV35亚型;低危型HPV感染最常见的亚型为HPVcp8304(1.75%)其次为HPV53(1.60%)、HPV44(0.36%)、HPV11(0.29%)、HPV6(0.15%)、HPV42(0.07%)(图1)。

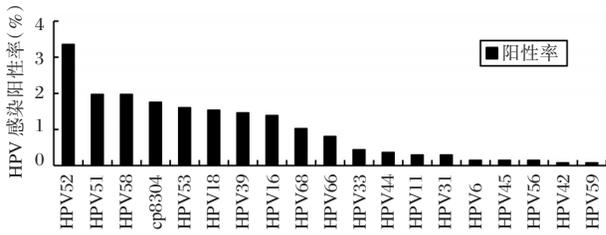


图1 海南低收入妇女 HPV 亚型分布情况图

Figure 1 The prevalence of HPV subtype in low-income women in Hainan

2.2 不同市县人群的 HPV 亚型分布

不同市县人群的 HPV 感染率及亚型分布不

同,海口市人群的 HPV 感染率最高(32.35%, 11/34),其次为昌江县(24.63%, 33/134),各市县人群的 HPV 感染率差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而汉族人群的 HPV 感染率为 14.12% (132/935),非汉族的感染率为 13.70% (60/438),二者的感染率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。各市县人群的前 4 位感染亚型如表 1 所示,HPV52 是大部分市县感染者中最优势的亚型,而保亭县和琼海市感染的最常见亚型是低危型 HPVcp8304,与其他市县人群感染的型别有所不同。

表 1 不同市县及民族人群的 HPV 感染优势亚型

Table 1 The dominant subtypes of HPV in women from different cities and ethnic populations

| 市县/民族 | 总例数 | HPV 感染 [n(%)] | P 值 | HPV 亚型 | | | |
|-------|-----|------------------|-------|--------------|----------|--------------|--------------|
| | | | | 第一位(%) | 第二位(%) | 第三位(%) | 第四位(%) |
| 汉族 | 935 | 132(14.12) | 0.835 | 52(3.42) | 51(2.14) | 58(1.71) | 53(1.60) |
| 非汉族 | 438 | 60(13.7) | | 52(3.20) | 58(2.51) | cp8304(2.05) | 53(1.60) |
| 保亭 | 94 | 10(10.64) | 0.003 | cp8304(3.19) | 16(2.13) | 66(1.06) | 11(1.06) |
| 昌江 | 134 | 33(24.63) | | 52(4.69) | 58(4.69) | 18(2.34) | 53(2.34) |
| 澄迈 | 59 | 5(8.47) | | 52(3.39) | 68(1.69) | 33(1.69) | cp8304(1.69) |
| 儋州 | 70 | 7(10.00) | | 52(5.71) | 58(1.43) | 16(1.43) | 51(1.43) |
| 定安 | 49 | 5(10.20) | | 52(2.04) | 58(2.04) | 18(2.04) | 51(2.04) |
| 东方 | 151 | 24(15.89) | | 18(4.64) | 51(3.97) | 58(2.65) | cp8304(2.65) |
| 海口 | 34 | 11(32.35) | | 52(8.82) | 39(8.82) | 68(5.88) | 53(5.88) |
| 乐东 | 131 | 20(15.27) | | 51(4.58) | 39(3.05) | 16(2.29) | 53(2.29) |
| 陵水 | 72 | 6(8.33) | | 52(1.39) | 53(1.39) | 66(1.39) | 11(1.39) |
| 琼海 | 25 | 3(12.00) | | cp8304(8.0) | 56(4.0) | 68(4.0) | 53(4.0) |
| 琼中 | 191 | 26(13.61) | | 52(5.76) | 51(2.09) | 16(1.57) | 53(1.57) |
| 屯昌 | 87 | 10(11.49) | | 53(3.45) | 51(2.30) | 39(2.30) | cp8304(2.30) |
| 万宁 | 76 | 11(14.47) | | 52(3.95) | 16(2.63) | 53(2.63) | 39(2.63) |
| 文昌 | 54 | 7(12.96) | | 52(7.41) | 51(3.70) | 18(3.70) | 39(3.70) |
| 五指山 | 146 | 14(9.59) | | 58(3.42) | 52(2.74) | 18(2.05) | 53(1.73) |

2.3 HPV 感染年龄分析

在所研究的 1 373 例妇女中,年龄中位数为 44 岁(23~60 岁),感染率较高的年龄段为 30~39 岁,小于 30 岁的年龄段感染率最低(9.09%)。以 <30 岁的感染率作为对照,与其他各年龄段人群比较,各年龄段的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

各年龄段均以感染高危型 HPV 为主,见表 2。

3 讨论

本研究报道了海南省 15 个市县低收入妇女宫颈 HPV 感染的流行情况,结果显示,HPV 总感染率为 13.98% (192/1 373),HPV 感染的主要型别为

表2 不同年龄女性 HPV 阳性分布

Table 2 The age distribution of HPV-positive women

| 年龄(岁) | 人数(n) | 感染例数(n) | 感染率(%) | χ^2 值 | P值 | 高危型(%) | 低危型(%) | 复合型(%) |
|-------|-------|---------|--------|------------|-------|--------|--------|--------|
| < 30 | 20 | 2 | 9.09 | - | - | 9.09 | 0 | 0 |
| 30~39 | 262 | 46 | 14.94 | 0.564 | 0.453 | 12.01 | 2.60 | 1.30 |
| 40~49 | 801 | 128 | 13.78 | 0.400 | 0.527 | 11.19 | 2.58 | 1.61 |
| > 49 | 98 | 16 | 14.04 | 0.393 | 0.531 | 11.40 | 2.63 | 1.75 |

HPV52、HPV51、HPV58、HPVcp8304、HPV53, 大多数为单一型别感染。感染率与周晓花等^[7]报导的公务员女性人群基本相近, 明显低于李霓等^[8]报导的中国普通女性宫颈 HPV 感染率 16.1%, 感染的基因型别基本相似, 排序稍有些差异, 也符合 HPV52 和 HPV58 在亚洲妇女中检出率较高的特点^[9-11]。我国李肖甫等^[12]的研究认为经济收入情况也是 HPV 感染的独立危险因素, 认为低收入人群文化程度相对较低、结婚及性生活早、流产次数多及被动吸烟情况多是感染 HPV 的独立因素。国外大量的研究也认为受教育程度和经济收入水平低的人群对 HPV 及 HPV 疫苗知识的认知程度低, 是 HPV 感染的高危人群^[5]。本研究与既往报道结果不同的可能原因在于调查对象不同, 本次调查人群都是基层事业单位困难女职工, 都接受过一定的文化教育, 工作单位较固定, 工作环境较单一可能是感染率低的原因。也可能是该人群有较强的传统观念约束, 行为较规范, 从而也减少了 HPV 感染的机会。

本研究 15 个市县低收入人群的 HPV 感染率及感染型别也不尽相同, 感染率最高的是海口市人群(32.35%), 最低为陵水县(8.33%), 各市县低收入人群的 HPV 感染率差异非常明显($P=0.003$)。大部分市县 HPV 感染的第一型别基本上是 HPV52 型, 但有 2 个市县的最常见亚型是低危型 HPVcp8304, 与其它市县人群感染的型别有所不同, 国内外亦鲜有报道。海口市为海南省的省会城市, 是海南省的政治经济文化中心, 居民的营养状况、居住环境、生活方式、健康意识等均与县乡的人群不同, 可能是造成 HPV 高感染率的原因之一, 与梁凌等^[13]的研究认为城市人群 HPV 感染率高于农村人群的观点基本相同。本研究汉族人群和非汉族人群的 HPV 感染率比较差异无统计学意义, 与 Lin 等^[14]的报导基本一致。HPV 感染率

除了与种族有关外, 还与地域地理环境、出生地、家庭文化背景、生活方式和调查的特定人群的不同有很大的关系。本次研究人群各年龄组 HPV 感染率差异无统计学意义, 小于 30 岁年龄组感染率最低, 以单一高危型感染为主, 与 Li 等^[15]报导大致相同。不同于相关文献报导的发展中国家 HPV 感染的年龄呈 u 形曲线分布, 亦不同于发达国家在 25 岁以下出现 HPV 感染高峰并随着年龄的增长而逐步下降的报导^[16-19]。以上结果可能与本次调查人群为困难职工的特殊人群有关, 也可能与本次调查人群的年龄主要集中在 40~49 岁的年龄段, 小于 30 岁和大于 49 岁年龄段的人数较少有关, 有待大数据大样本进一步研究。

总之, 本研究对海南省低收入的女职工宫颈 HPV 感染亚型的分布情况进行了调查, 发现海南省低收入女职工中总 HPV 感染率相对国内普通人群较低。HPV 感染最常见的亚型为 HPV52, 其次是 HPV51、HPV58、HPVcp8304 和 HPV53。不同市县人群的 HPV 感染率及感染型别有所不同, 应加强在 HPV 高感染率地区进行宫颈癌的防控工作。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108.
- [2] Li J, Kang LN, Qiao YL. Review of the cervical cancer disease burden in mainland China. Asian Pac [J]. Cancer Prey, 2011, 12: 1149-1153.
- [3] Torres M, Fraile L, Echevarria J, et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping automation and application in routine laboratory testing [J]. Open Virol, 2012 (6): 144-150.
- [4] Dodd RH, McCaffery KJ, Marlow LA, et al. Knowledge of human papillomavirus (HPV) testing in the

- USA, the UK and Australia: an international survey [J]. *Infections Sexually Transmitted*, 2014, 90(3): 201-207.
- [5] Davlin SL, Berenson AB, Rahman M. Correlates of HPV knowledge among low-income, minority mothers with a child 9-17 years of age[J]. *Pediatr Adolesc Gynecol*, 2015, 28(1):19-23.
- [6] 孟利平, 李建梅, 刘苑文, 等. 深圳市宝安区妇女人乳头瘤病毒感染现状及影响因素分析[J]. *广西医科大学学报*, 2016, 33(6):1055-1059.
- [7] 周晓花, 罗家有, 朱琳, 等. 长沙市9471名女性公务员人乳头瘤病毒感染状况及亚型分布[J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(11):1157-1158.
- [8] 李霓, 代敏. 中国妇女人乳头瘤病毒感染的多中心横断面研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2008, 12(5): 411-415.
- [9] Bhatla N, Dar L, Rajkumar Patro A, et al. Human papillomavirus - type distribution in women with and without cervical neoplasia in North India [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2008, 27:426-430.
- [10] Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, et al. Human papillomavirus type distribution in 30848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128:927-935
- [11] Eun HL, Tae HU, Hyun-sookc, et al. Prevalence and distribution of human papilloma- virus infection in Korean women as determined by restriction fragment mass poly-Morphism assay [J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27(9):1091-1097
- [12] 李肖甫, 李雁青, 智艳芳, 等. 高危型人乳头瘤病毒感染相关危险因素分析[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(7):1655-1657, 1667.
- [13] 梁凌云, 杜辉, 张薇, 等. 深圳市城乡女性人乳头瘤病毒感染相关因素调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(8):796-799.
- [14] Lin L, Benard VB, Greek A, et al. Racial and ethnic differences in human papillomavirus positivity and risk factors among low-income women in Federally Qualified Health Centers in the United States [J]. *Prev Med*, 2015, 81: 258-261.
- [15] Li J, Wang YY, Tian XF, et al. HPV genotype analysis for women in Shaanxi Province of China[J]. *Genet Mol Res*. 2016, 15(4).
- [16] Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, et al. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 285(3):771-777.
- [17] Johnson AM, Mercer CH, Beddows S, et al. Epidemiology of, and behavioural risk factors for, sexually transmitted human papillomavirus infection in men and women in Britain [J]. *Sex Transm Infect*, 2012, 88(3):212-217.
- [18] Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. Variations in the agespecific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(11):2677-2684.
- [19] Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica[J]. *J Infect Dis*, 2005, 191:1808-1816.

基于三种检测方法的 17α 羟孕酮临床检测比对

渠海¹ 吕萌萌² 朱宇皇¹ 付光宇^{1*}

[摘要] 目的 评价具有不同检测原理的3个 17α 羟孕酮试剂盒,分析其临床检测结果的相关性和一致性。方法 收集2015年2月至10月临床确诊为先天性肾上腺皮质增生症患者的血清120例,设为试验组;收集同期体检健康者血清120例,设为对照组。分别采用3个产品的 17α 羟孕酮试剂盒进行定量检测,对检测结果进行统计分析。结果 3个产品的相关性 R^2 分别为0.82、0.76和0.77,临床的阳性符合率为100%、100%和99.2%,阴性符合率为97.5%、98.3%和98.3%,总符合率为98.8%、99.2%和98.8%。3个产品的临床符合率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 不同检测原理的3个产品的 17α 羟孕酮试剂盒的临床检测结果具有等效性,符合临床应用要求。

[关键词] 17α 羟孕酮;放射免疫法;酶联免疫法;磁微粒化学发光法

The clinical comparison of three methods for 17α -OH- progesterone assay kit

QU Hai¹, LV Mengmeng², ZHU Yuhuang¹, FU Guangyu^{1*}

(1. Autobio Diagnostics CO., Ltd, Zhengzhou, Henan, China, 450016; 2. Department of Clinical Laboratory, the Sixth People's Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou, Henan, China, 450015)

[ABSTRACT] Objective To compare the correlation and consistency of results of 17α -OH-progesterone assay kits from 3 different manufactures. Methods From February to October 2015, 17α -OH-progesterone in serum samples collected from 120 patients with congenital adrenal hyperplasia and 120 healthy subjects were detected by 3 different manufactures. The results of 17α -OH-progesterone were statistically analyzed. Results The R^2 of results detected by the 3 kits were 0.82, 0.76 and 0.77. The positive coincident rate were 100%, 100% and 99.2%. The negative coincident rate were 97.5%, 98.3% and 98.3%. The total coincident rate were 98.8%, 99.2% and 98.8%. The value of 3 kits were without statistical difference ($P>0.05$). Conclusion The performance of the 3 kinds of 17α -OH-progesterone assay kit might be equivalent, all of which could meet the requirements of clinical application.

[KEY WORDS] 17α -OH-progesterone; Immuno-radiometric assay(RIA); Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA)

先天性肾上腺皮质增生症(congenital adrenal hyperplasia, CAH)是一种由于肾上腺皮质激素合成途径中酶的缺陷引起的疾病,属常染色体隐性遗传病^[1]。常见的缺陷酶包括21-羟化酶、17-羟化酶、3-羟脱氢酶和11-羟化酶等,其中21-羟化酶缺陷症(21-hydroxylase deficiency, 21-OHD)约占

CAH的90%~95%^[2]。临床上通常把CAH分为经典型和非经典型,其中非经典型又称做迟发型(nonclassic 21-hydroxylase deficiency, NCCAH)。经典型多发于新生儿,发病率约为10/10万;迟发型多发于非新生儿,发病率约为前者的10倍,女性多于男性^[3]。

基金项目:河南省重大科技专项(121100510200)

作者单位:1. 郑州安图生物工程股份有限公司,河南,郑州 450016

2. 郑州市第六人民医院检验科,河南,郑州 450015

*通讯作者:付光宇, E-mail: fuguangyu@autobio.com.cn

由于21-羟化酶在类固醇激素的代谢过程中起着至关重要的作用,所以其在体内的缺失会导致17 α -羟孕酮(17 α -OH-progesterone, 17 α -OHP)含量逐渐的升高。17 α -OHP被认为是CAH特别是NCCAH诊断中的最显著的指标^[4]。目前市场上针对非新生儿检测的试剂盒多种多样,检测方法也各异。主要有放射免疫、酶联免疫以及化学发光等检测方法。经查询国家食品药品监督管理局网站,郑州安图生物工程股份有限公司的17 α -OHP检测试剂盒是针对非新生儿CAH的首个全自动磁微粒化学发光产品。而且在国际上,该厂家的17 α -OHP检测试剂也是首次成功应用到全自动磁微粒化学发光的检测系统中的产品。

本文选择3种方法学的商业试剂盒进行研究,以临床诊断结果作为金标准,进行临床样本比对工作。研究目前医院应用较为广泛的17 α -OHP商业试剂盒之间的差异及与临床结果的符合率,为临床使用单位选择适宜试剂产品提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 样本

2015年2月至10月从郑州市第六人民医院收集临床确诊为先天性肾上腺皮质增生症的患者血清120例,设为试验组。收集同期体检健康者血清120例设为对照组。健康样本来源人群,无现病史及近期手术史,排除孕妇和产妇。每例样本均记录性别、年龄、临床诊断,女性样本应当确认其生理周期。样本使用无添加剂采血管(红盖)收集,37 $^{\circ}$ C静置30 min,离心15 min,-20 $^{\circ}$ C保存备用。严重溶血、脂血或浑浊的样本不能用于检测,需重新采集。

1.2 试剂和主要仪器

主要仪器:PHO mo 酶标仪和 Auto Lumo A2000全自动化学发光测定仪(郑州安图生物工程股份有限公司),GC-911 γ 放射免疫计数器(中佳光电仪器)。试剂:美国DSL公司(产品A)放射免疫17 α -OHP检测试剂盒,货号ACTIVE 17 α -OHP PROGESTERONE DSL-5000;郑州安图生物工程股份有限公司(产品B)生产的磁微粒化学发光17 α -OHP检测试剂盒,批号20150728;德国DRG公司(产品C)生产的酶联免疫17 α -OHP检测试剂盒,货号EIA-1292。商业第三方控制品(Lypho-chek[®] Immunassay Plus Control 40271-40273, 5 mL/

瓶, Bio-Rad Laboratories, Inc)。

1.3 方法学比对

分析3个试剂盒的线性范围以及正常值参考范围,使用商业第三方控制品确认3个试剂盒在重复性和准确度之间的差异,保证检测结果的合理有效性。

重复性与准确度的考察参照美国临床和实验室标准化协会颁布的EP系列文件,主要步骤如下:

重复性:试剂盒检测高、中、低值3支质控品,要求重复测定5天,每天重复4次。根据拟合标准曲线计算测量结果,再计算每个浓度水平至少20次测量结果的平均值M和标准差SD,根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数CV。

准确度:试剂盒检测高、中、低值3支质控品,按照1:9的比例分别加入到相同的基质样本中,制成回收样本,加入高值样本的体积不得超过总体积的10%。每个回收样本重复检测3次求均值,计算回收率。

通过对相同人群样本的临床检测,对3家同类产品进行比较,结合240份临床诊断结果,分析商业试剂盒与诊断结果之间的符合率。排除线性范围外的40份样本后,通过对线性范围内的200份样本进行两两比对,对检测结果的相关性作图,得出相应的 R^2 ,分析测定结果差异的原因。

1.4 判断标准

临床符合率根据各个厂家提供的产品说明书中的正常人参考值范围进行判定,参考值范围内为阴性,参考值范围外为阳性。

1.5 操作人员要求

经专业上岗培训并且取得相应上岗证的医学检验专业人员。

1.6 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行相关回归分析,分别计算3个厂家产品检测结果的阳性符合率和阴性符合率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,相关系数 $R^2 > 0.9$ 表示测定结果相关性好。

2 结果

2.1 3个厂家试剂盒的操作过程分析

根据厂家说明书,比较3个厂家试剂盒的操作过程,产品B整个过程优于产品A和产品C,见表1。

表1 3个厂家试剂盒的操作过程
Table 1 The test procedure of 3 kits

| 试剂盒名称 | 加样模式 | 系统开放性 | 反应时间 (min) | 计算模式 |
|-------|------|-------|------------|------|
| 产品A | 手工 | 开放 | 60 | 手工 |
| 产品B | 全自动 | 封闭 | 30 | 全自动 |
| 产品C | 手工 | 开放 | 100 | 手工 |

表2 3个厂家试剂盒的线性范围
Table 2 The assay dynamic range of 3 kits

| 试剂盒名称 | 线性范围(ng/mL) |
|-------|-------------|
| 产品A | 0.01 ~ 20 |
| 产品B | 0.05 ~ 30 |
| 产品C | 0.034 ~ 20 |

2.2 3个厂家试剂盒的线性范围分析

根据厂家说明书,比较3个厂家试剂盒的线性范围,厂家B具有最宽的线性范围,厂家A具有最低的检测能力,见表2。

2.3 3个厂家试剂盒的正常值参考范围

根据厂家说明书,比较3个厂家试剂盒的正常

值参考范围,3个厂家试剂盒的正常值参考相差较小,可以进行临床平行比对,见表3。

2.4 3个厂家试剂盒的重复性和准确度比较

采用商业第三方质控比较3个厂家试剂盒的重复性和准确度,3个厂家试剂盒在重复性和准确度方面均无显著的差异,见表4、5。

表3 3个厂家试剂盒的正常值参考范围
Table 3 The expected normal values of 3 kits

| 人群分类 | 产品A(ng/mL) | 产品B(ng/mL) | 产品C(ng/mL) |
|-----------|--------------|--------------|-------------|
| 正常男性 | 0.61 ~ 3.34 | 0.31 ~ 2.01 | 0.5 ~ 2.1 |
| 正常月经女性 | 卵泡期 | 0.40 ~ 1.02 | 0.1 ~ 0.8 |
| | 黄体期 | 1.26 ~ 4.28 | 0.6 ~ 2.3 |
| | 排卵期 | 0.14 ~ 1.11 | 0.1 ~ 1.4 |
| | Post ACTH | | <3.2 |
| 女性 | 绝经期 | <0.93 | 0.13 ~ 0.51 |
| | 孕后期 | 2.28 ~ 9.24 | 2.0 ~ 12 |
| 1 ~ 13岁儿童 | 0.07 ~ 1.53 | <2.32 | 0.01 ~ 1.7 |
| 1月 ~ 1岁幼儿 | 1.06 ~ 40.41 | 0.82 ~ 16.63 | 0 ~ 16.8 |

表4 3个厂家试剂盒的重复性
Table 4 The reproducibility of 3 kits

| 性能 | 产品A | 产品B | 产品C |
|--------------|--------------|-----|-----|
| 0.83 (ng/mL) | 9.3 | 6.6 | 5.4 |
| 重复性(%) | 1.96 (ng/mL) | 8.1 | 6.5 |
| | 7.59 (ng/mL) | 9.5 | 5.7 |
| P值 | >0.05 | | |

表5 3个厂家试剂盒的准确度
Table 5 The accuracy of 3 kits

| 性能 | 产品A | 产品B | 产品C |
|-------------|-------------|-----|-----|
| 0.83(ng/mL) | 115 | 113 | 86 |
| 准确度(%) | 1.96(ng/mL) | 108 | 96 |
| | 7.59(ng/mL) | 95 | 94 |
| P值 | >0.05 | | |

2.5 3个厂家试剂盒的阳性率、阴性率及总符合率比较

以临床诊断作为实验检测的金标准,试验组120例血清经3个厂家试剂盒检测后的结果与金

标准的阳性符合率见表6。对照组120例血清经3个厂家试剂盒检测后的结果与金标准的阴性符合率见表7。3个厂家试剂盒检测后的结果与金标准的总符合率见表8。3个厂家产品的检测结果差异

表6 3个厂家试剂盒的试验组与金标准阳性符合率统计

Table 6 The positive coincidence rate of 3 kits and gold standard in experimental group

| 试验组 | 产品 A | | 产品 B | | 产品 C | | |
|-------|-------|-----|------|-----|-------|-----|---|
| | + | - | + | - | + | - | |
| 金标准 | + | 120 | 0 | 120 | 0 | 119 | 1 |
| | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 阳性符合率 | 100% | | 100% | | 99.2% | | |
| P 值 | >0.05 | | | | | | |

表7 3个厂家试剂盒的对照组与临床诊断阴性符合率统计

Table 7 The negative coincidence rate of 3 kits and gold standard in control group

| 对照组 | 产品 A | | 产品 B | | 产品 C | |
|-------|-------|---|-------|---|-------|---|
| | + | - | + | - | + | - |
| 金标准 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - | 3 | 117 | 2 | 118 | 2 |
| 阴性符合率 | 97.5% | | 98.3% | | 98.3% | |
| P 值 | >0.05 | | | | | |

表8 3个厂家试剂盒的对照组与临床诊断符合率统计

Table 8 The total coincidence rate of 3 kits and gold standard in control group

| 对照组 | 产品 A | | 产品 B | | 产品 C | | |
|------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|
| | + | - | + | - | + | - | |
| 金标准 | + | 120 | 0 | 120 | 0 | 119 | 1 |
| | - | 3 | 117 | 2 | 118 | 2 | 118 |
| 总符合率 | 98.8% | | 99.2% | | 98.8% | | |
| P 值 | >0.05 | | | | | | |

在试验组及对照组中均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 3个厂家试剂盒间的相关性分析

从2.2的结果可以看出,产品B的线性范围与产品A和C相比,增加了20~30 ng/mL的检测区间,为了验证该区段之间的相关性,以产品B的线性范围0~30 ng/mL为参考,分别对范围内的3个厂家试剂盒的200份临床样本的定量检测结果进行两两比对,产品A与B、A与C以及B与C的斜率为1.09、0.94和0.79,其 R^2 值分别为0.82、0.76和0.77,见图1~3。

2.7 3个厂家试剂盒的异常样本分析

由2.4和2.6结果可以观察到,3个厂家试剂盒变异在10%以内,产品两两比对的斜率在25%以内,所以选出厂家间数值差异在1.5倍以上的样本进行分析,根据各个厂家试剂盒的正常值参考范围,确定与金标准之间的差异,结果表明数值异常样本对临床诊断结果影响较小,见表9。

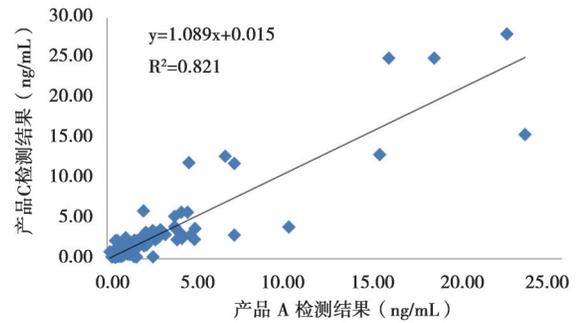


图1 产品A和B相关性分析

Figure 1 The clinical correlation of A and B

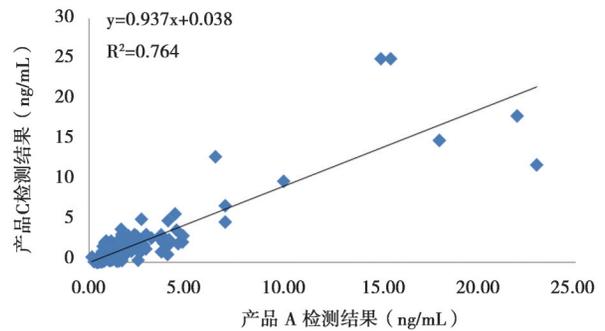


图2 产品A和C相关性分析

Figure 2 The clinical correlation of A and C

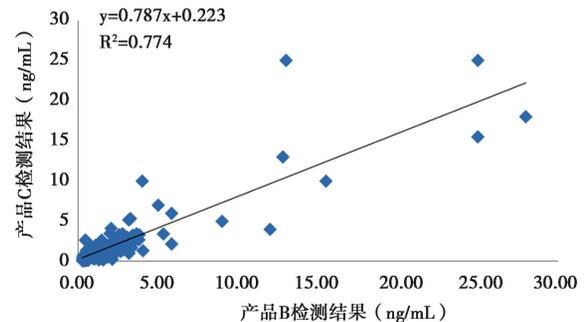


图3 产品B和C相关性分析

Figure 3 The clinical correlation of B and C

表9 3个厂家试剂盒实质异常样本的结果分析

Table 9 The result of variation sample in 3 kits

| 产品 A | | 产品 B | | 产品 C | | 金标准 |
|------------|------|------------|------|------------|------|------|
| 浓度值(ng/mL) | 判断结果 | 浓度值(ng/mL) | 判断结果 | 浓度值(ng/mL) | 判断结果 | 判断结果 |
| 15.88 | + | 24.72 | + | 24.54 | + | + |
| 3.80 | + | 10.21 | + | 7.50 | + | + |
| 14.71 | + | 12.78 | + | 26.45 | + | + |
| 22.86 | + | 12.08 | + | 13.42 | + | + |
| 3.69 | + | 6.77 | + | 4.28 | + | + |
| 2.66 | - | 2.65 | - | 0.31 | - | - |
| 0.13 | - | 0.29 | - | 3.35 | + | - |
| 7.12 | + | 12.03 | + | 4.20 | + | + |
| 4.85 | + | 7.57 | + | 5.60 | + | + |
| 6.73 | + | 13.08 | + | 7.69 | + | + |
| 17.92 | + | 25.69 | + | 17.65 | + | + |
| 21.24 | + | 28.43 | + | 18.33 | + | + |
| 1.50 | - | 5.40 | + | 9.42 | + | - |

3 讨论

由于CAH属于染色体隐形遗传病的一种,所以对于CAH的关注,早期主要集中在对新生儿的筛查。1977年 17α -OHP的测定方法出世,使非新生儿21-羟化酶缺陷症筛查成为可能^[5]。随着发达国家对该疾病研究的深入,以及近年来因NCCAH所造成的临床误诊引起了国内一些学者及医学工作者关注,除了对新生儿筛查的研究^[6-7]外,对 17α -OHP在NCCAH检测中的意义也得到了广大共识,逐渐兴起了研究的热潮^[8-9]。

17α -OHP是由肾上腺皮质及性腺产生,其活性很低,经21-羟化酶作用下生成皮质醇的前体化合物^[10-11]。 17α -OHP在体内具有与肾上腺皮质醇一致的昼夜节律变化。目前市场上存在有放射免疫、酶联免疫以及化学发光等不同原理的 17α -OHP检测试剂盒。放射免疫分析法灵敏度高,几乎可测定生物体内任何物质,但检测操作相对繁琐,同时存在放射性污染的问题。酶联免疫试剂具备试剂稳定、无危害污染、操作简便等优点,得以迅速推广应用。至今酶联免疫仍是免疫分析方法中较常用的方法。化学发光免疫分析是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合的检测分析技术。免疫磁珠是免疫学和磁微粒技术结合而发展起来的一类新型材料,

此固相材料有较多的优点,既可提高混匀速度和分离效率,又达到扩大抗原抗体反应接触面积的目的,并且可以同时在场的作用下,快速使抗原抗体复合物和游离蛋白得到分离,以达到缩短反应时间和简化操作步骤的目的。磁微粒化学发光免疫分析系统是免疫磁珠、化学发光与免疫反应3个体系相结合而建立的检测体系,是用于检测微量抗原或抗体的一种标记免疫测定技术。该体系既具有放射免疫分析的高灵敏度,又避免放射性污染;即具有酶联免疫的操作简便性,又具有使用自动化设备实现单个反应标准化管理的特点,降低手工操作或板式产品批量管理造成的检验结果误差;试剂稳定,保质期长,成为最有前途的免疫分析方法之一。

通过线性范围、正常值参考范围及分析性能的比对,3个厂家的试剂盒具备临床比对的特征。结果显示3种方法与金标准的符合率较优(阴阳性符合率>98%)。但是3个厂家试剂盒之间临床浓度值有较大差异,低值区个别样本可能由于各厂家方法学间的差异会出现假阳性,两两比对相关性 R^2 均未达到0.9以上。这也与国际上之前的研究结果相一致^[12],针对该类样本需继续跟踪,进行数据积累统一分析。此情况可能是由于各个厂家使用的抗体不同,不同抗体与体内小分子类似物的交叉反应程度不同,从而不能达到量值上的一

致性。3个厂家试剂盒没有明显的差异性,都存在假阳性的问题,这也是与色谱质谱联用的金标准比较存在不足的地方^[13]。高效液相色谱串联检测17 α -OHP,在国外已经得到了广泛的应用,相应的基础研究也有很多,均表现出了与临床诊断结果有良好的一致性^[14-15]。许多国外的临床诊断机构都已经应用到实际工作中,如美国的QUEST和Labcorp。色谱方法虽然检测结果准确可靠,被视为小分子检测的金标准,但因为设备昂贵,操作繁琐,不符合国情。而免疫诊断方法具有费用低、检测快捷等优点被市场广泛应用,但解决假阳性的问题仍需要各方积极努力。

综上所述,经本研究组的临床比对,虽然3个厂家不同检测原理的17 α -OHP检测试剂盒在临床相关性不能达成一致,但与临床诊断的符合率较高,具有等效性,在现有金标准不能广泛应用开展的前提下,能够满足临床检测要求。临床使用单位可根据操作繁杂度及其他性价比等选择适宜本单位的优质试剂产品。

参考文献

- [1] 吕萌萌,朱宇皇,张跃峰,等.先天性肾上腺皮质增生症筛查的相关进展[J].分子诊断与治疗杂志,2015,7(5):351-356.
- [2] 胡亚美,江载芳.诸福棠实用儿科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2002:2022-2027.
- [3] Kashimada K, Ishii T, Nagasaki K, et al. Clinical, biochemical, and genetic features of non-classical 21-hydroxylase deficiency in Japanese children [J]. *Endocr J*, 2015, 62(3):277-282.
- [4] Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(11):5137.
- [5] Falhammar H, Frisén L, Norrby C, et al. Increased mortality in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(12):E2715- E2721.
- [6] 毛维玉,郭辉,闵娟,等.早产新生儿体重对CAH筛查中17-羟孕酮结果的影响分析[J].国际医药卫生导报,2008,14(7):11-14.
- [7] Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, et al. New-born screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994 - 2013 [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(3):1002-1008.
- [8] Cavarzere P, Samara -Boustani D, Flechtner I, et al. Transient hyper - 17 - hydroxyprogesteronemia: clinical subgroup of patients diagnosed at neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia [J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 161(2):285-292.
- [9] Nascimento ML, Cristiano AN, Campos TD, et al. Ten - year evaluation of a neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014, 58(7):765-771.
- [10] Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults [J]. *Ann Clin Biochem*, 2014, 51(Pt 4):424-440.
- [11] Li XM, Ji H, Li CJ, et al. Chemerin expression in Chinese pregnant women with and without gestational diabetes mellitus [J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2015, 76(1):19-24.
- [12] Bello R, Lebenthal Y, Lazar L, et al. Basal 17-hydroxyprogesterone cannot accurately predict non-classical congenital adrenal hyperplasia in children and adolescents [J]. *Acta Paediatr*, 2016, 106(1):155-160.
- [13] Meier U, Schnabel C, Kunz D, et al. Comparison of three commercial assays for the measurement of 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP): limitations of the quality control system [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(4):450-454.
- [14] Ceglarek U, Kortz L, Leichtle A, et al. Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 401:114-118.
- [15] Fanelli F, Belluomo L, Cuomo G, et al. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: Comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults [J]. *Steroids*, 2011, 76:244-253.

致死性侏儒症 I 型高发突变发生机制浅析

姜煜¹ 郭东炜² 郭奕斌^{1*}

[摘要] 致死性侏儒症(thanatophoric dysplasia, TD)是重型短肢畸形病中相对常见的致死性遗传性骨病,分为TD-I和TD-II 2型,它们都是由于*FGFR3*基因发生致死突变所致。TD-I型存在多种致病性突变,其中以c.742C>T/p.R248C突变最为常见。本病为常染色体显性遗传(autosomal dominant, AD),杂合突变即可致死,但为何表型、基因型正常的父母会生出带有p.R248C突变的患胎并且是纯合突变的死胎?如果是新生突变,又为何会接连数胎生出同样的患胎? p.R248C高发突变的机制是什么?本文重点围绕这些问题,从“*FGFR3*(Fibroblast growth factor receptor 3)基因和FGFR3受体(Fibroblast growth factor receptor 3)的结构和功能,TD-I型p.R248C高发突变的发生机制,正常父母生出纯合致死突变的可能机制”几方面进行剖析,指出:①*FGFR3*基因及其受体蛋白结构和功能的特殊性是高发突变发生的物质基础;②位于Ig II和Ig III结构域连接区的氨基酸是极性很强的亲水氨基酸,很容易与带电离子结合而影响 α 螺旋结构,故易受外来理化因素的攻击、诱变而发生改变;③正常父母生出纯合致死突变,推测有两种可能:一种是夫妇一方的生殖腺已带有该高发突变,当胎儿从亲代遗传了一次突变后,只需在另一位点上再发生一次新生突变即可产生;另一种是夫妇双方的生殖腺都是该突变的嵌合体,当两者结合在一起,就有可能产生纯合突变。此外,还对未来发展趋势进行了展望。本文旨在探讨c.742C>T/p.R248C高发突变和纯合突变发生的机制,进而为其今后的诊断和防治工作提供理论依据。

[关键词] 致死性侏儒症I型(TD-I); *FGFR3*基因; p.R248C; 高发突变; 发生机制

Analysis of the mechanism of high incidence of thanatophoric dysplasia type I

JIANG Yu¹, GUO Dongwei², GUO Yibin^{1*}

(1.Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Clinical Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China 361102)

[ABSTRACT] Thanatophoric dysplasia (TD), divided into TD type I and TD type II, is a genetic bone disease caused by the fatal mutation of *FGFR3* gene. It is relatively common lethal hereditary osteopathy among severe short limb malformations. TD-I type has many kinds of pathogenic mutations, of which c.742C>T/p.R248C mutation is the most common. This disease is an autosomal dominant (AD) genetic disease which means heterozygous mutations can be lethal. However, why some parents with normal genotypes and phenotypes can give birth to a stillbirth who carried the homozygous mutation p.R248C? If it is a novel mutation, why the successive fetuses with the same mutation were born? What is the high incidence mechanism of p.R248C mutation? This paper focus mainly around these problems, from “The structure and function of *FGFR3* gene and FGFR3 receptor; The pathogenetic mechanism of high incidence of p.R248C in TD type I; The possible mechanisms of normal parents producing homozygous lethal mutation”, several aspects are analyzed and pointed out: ① *FGFR3* gene and the structure and function of its receptor protein is the material base of high frequent

基金项目: 闽粤合作科研基金(71010025)

作者单位: 1. 中山大学中山医学院医学遗传室, 广东, 广州 510080

2. 厦门大学医学院临床医学专业, 福建, 厦门 361102

*通讯作者: 郭奕斌, E-mail: aguoabin@qq.com

mutation; ② Some amino acids, located in the connected region of Ig II and Ig III domain, are strong polar hydrophilic amino acids, which tend to bind charged ions to influence the alpha helical structure, therefore, it is easy to be affected by external physical and chemical factors; ③ Normal parents give birth to fetus with homozygous lethal mutation, there are 2 possibilities: one is the reproductive gonad of one of the parents has carried the hot mutation, and the fetus inherited the hot mutation, under these circumstances, as long as a same mutation happen in its allele, which will lead to the generation of homozygous mutation; another is the reproductive glands of couples are the mutant chimeras, when the two are combined together, it is possible to generate homozygous mutation. In addition, the future development trend is prospected. The purpose of this paper is to explore the high-risk mutation and homozygous mutation mechanism of c.742C>T/p.R248C, and to provide theoretical basis for the diagnosis and prevention and control work in future.

[KEY WORDS] Thanatophoric dysplasia type I (TD - I); *FGFR3* gene; p.R248C; High mutation; Pathogenetic mechanism

致死性侏儒症 (thanatophoric dysplasia, TD, MIM187600) 又称致死性骨发育不良, 是新生儿致死性骨发育不良病中相对常见的一种, 主要表现为肢体显著短小, 巨颅, 前额隆凸, 脑部畸形, 脊柱异常, 肋骨极短, 胸廓极度狭窄, 四肢外旋或外展, 呈蛙式体态^[1-4], 见图1、图2。本病为AD遗传, 新生儿发生率国内报道约为1/40 000^[3], 国外报道为1/20 000~1/50 000^[5]。患胎多半胎死腹中或于出生后不足24 h即因重症急性呼吸衰竭而夭折, 但不同病例其病程进展会有差异^[6-7], 但一年存活率几乎为0^[8]。



图1 TD-I型

Figure 1 TD type I^[2]



图2 TD-II型^[2]

Figure 2 TD type II^[2]

TD是由成纤维细胞生长因子受体3 (Fibroblast growth factor receptor 3, *FGFR3*) 基因发生不同突变所致, 其中p.R248C错义突变为TD-I最高发的致死突变, 而TD-II型多由p.K650E错义突变所引起。

TD-I为AD遗传, 杂合突变即可致死, 但临床实践中, 我们发现不少表型、基因型正常的父母会生出TD-I患胎特别是p.R248C突变的患胎, 如近几年, 我们在10例TD-I患胎中, 就发现有6例是由p.R248C突变所致的死胎, 其中纯合突变占了一半(3例), 比例相当高。为何表型、基因型正常的父母会生出p.R248C的患胎特别是纯合突变的患胎? 如果是新生突变, 又为何会接二连三孕育出同样的患胎? 是什么原因导致*FGFR3*受体蛋白的第248位的精氨酸(R)如此容易受到攻击? 患胎的纯合突变又来自哪里? 本文重点围绕这些问题, 从“*FGFR3*基因和*FGFR3*受体的结构和功能, TD-I型p.R248C高发突变的发生机制, 正常父母生出纯合致死突变的可能机制”几方面进行剖析, 以期为其今后的诊断和防治工作提供理论依据。

1 *FGFR3*基因和*FGFR3*受体的结构和功能

人*FGFR3*基因(OMIM:134934)定位于4p16.3, gDNA全长15 561 bp, 有18个外显子和17个内含子。其中, 第1外显子的全部和第2外显子的前半部分均不参与编码蛋白质, *FGFR3*跨膜区由第9外显子编码。*FGFR3*基因的序列在不同物种之间具有高度同源性。其开放阅读框(open reading frame, ORF)长13 328 bp, cDNA 2 421 bp, 编码806个氨基酸(from RefSeq NM_000142), 分子量为110 kDa~135 kDa。分子量的不同可能与其mRNA的剪接方式有关, 功能上有重要意义的剪接主要发生在Ig III(图3)。作为发育调节跨膜受体之一的*FGFR3*, 它能够通过诱导骨成型蛋白质(bone morphogenetic protein, BMP) I型受体的降解来调控骨骼的发育^[9]。*FGFR3*属于免疫球蛋白

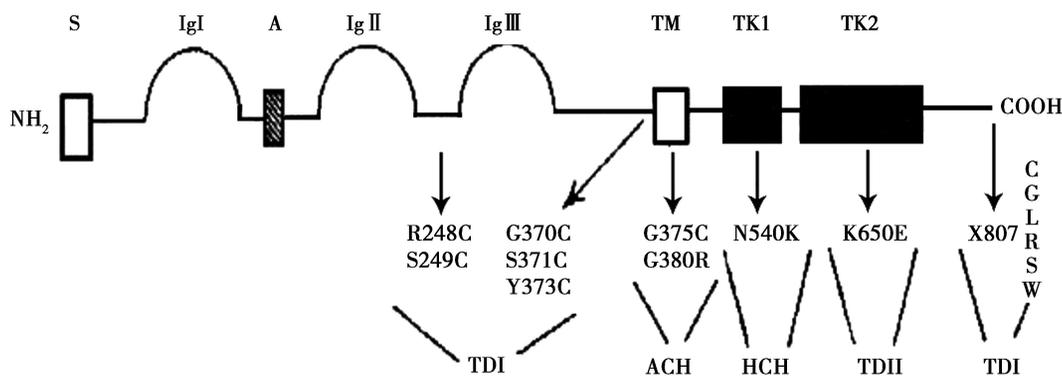
样受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 家族, 该家族还包括 FGFR 1、2、4。成纤维细胞生长因子 (fibroblast-growth factors, FGFs) 的靶细胞的表面广泛分布这些跨膜受体, 并且能够介导 FGFs 的生物学活性。同族的跨膜受体的结构相似, 均为跨膜受体^[10-11]。FGFR3 受体蛋白由胞内区、跨膜区和胞外区 3 部分组成, 其中胞外区包含 3 个免疫球蛋白样功能域 (Ig I, Ig II 和 Ig III) 和一个肝素结合功能域 (heparin-binding domain), Ig I 和 Ig II 之间有一酸性区 (acidic region, A)^[12]。FGFRs 只跨膜一次。膜内部分由一个内在激酶功能域 (interkinase domain)、2 个保守的酪氨酸激酶功能域 (TK₁, TK₂)、近膜区和可发生自身磷酸化的 C 末端构成。FGFR3 由 18 个外显子编码, 7、8、9 号外显子编码 Ig III, 其中 7、8 号外显子编码 Ig III b, 7、9 号外显子编码 Ig III c, 多种 FGFs 可与之结合。FGFs 是肝素结合生长因子 (heparin binding growth factor, HBGF) 家族的一员, 在硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) 协同下 FGFs 与受体 (FGFRs) 的 Ig II 及 Ig III 区结合之后, 受体自身的酪氨酸残基磷酸化, 受体二聚化而活化, 酪氨酸残基磷酸化后和 SH2 信号分子相互结合, 导致胞浆内的 SH2 结构域蛋白与含丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (MAPK, MAPKK 和 MAPKKK) 产生磷酸化, 从而激活核内的转录因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 和调控信号向细胞内传导^[13-14], 通过 PLC- γ 、Ras- MAPK、PI3K 等途径传递信号^[15]。FGFRs 家族有多个成员, 它们均参与调控长骨的生长, 包括软骨基质的

钙化, 血管的入侵, 软骨细胞的增生和成骨的形成等多个阶段^[16]。最近, 研究人员采用定量成像福斯特共振能量转移 (quantitative imaging förster resonance energy transfer, QI-FRET) 法对衍生自囊泡的血浆膜 (plasma membrane) 的膜蛋白的相互作用特性进行深入研究, 发现 RTKs 在骨骼发育过程中起着极为重要的作用, 从而影响了 FGFR3 的二聚化^[17]。突变引起的 FGFR3 激活程度会极大影响软骨疾病表型的严重程度, 其中引起 TD 的突变的激活程度最强。TD- I 型患者已发现 12 种不同突变 (见 HGMD 数据库, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), 都会导致突变后的 FGFR3 功能持续地激活, 导致 FGFR3 对骨骼生长的负向调节作用剧增, 进而会导致患者骨骼生长发育的障碍。图 3 为已知人 FGFR3 突变分布及受体结构的图。

2 TD- I 型 p.R248C 高发突变的发生机制

临床上发现好多基因型和表型均正常的父母却生出了带有 p.R248C 突变的患胎。是什么原因导致 *FGFR3* 基因发生该致死突变? 为何第 248 位的精氨酸 (R) 如此容易受到攻击?

虽然目前发现有 12 种突变 (多数为单个氨基酸突变成 Cys) 都可以引起 TD- I, 比如集中在 FGFR3 蛋白胞外区 Ig II 和 Ig III 结合域连接区的第 248 位精氨酸 (R)、第 249 位丝氨酸 (S), 近膜区的第 370 位甘氨酸 (G)、371 位丝氨酸 (S)、373 位酪氨酸 (Y) 都是被半胱氨酸 (C) 取代即 R248C、S249C、G370C、S371C、Y373C, 此外, 还有 K650M 以及终止密码子 (TGA) 发生的突变 (X807R、



S: 信号肽; Ig: 免疫球蛋白样区 (I、II 和 III); A: 酸性区; TM: 跨膜区; TK: 酪氨酸激酶区 (1 和 2)

图 3 人 FGFR3 受体结构及已知突变的分布^[12,18]

Figure 3 The structure of human FGFR3 receptor and the distribution of known mutations^[12,18]

X807C、X807G、X807L、X807S、X807W, 突变使羧基端延长 141 个氨基酸) 均可导致 TD- I 型的发生^[19]。但最常见的仍是发生在第 248 位的 p.R248C 错义突变, 已报道的由此突变引起的 TD- I 病例已超过 100 例, 约占所有突变的 55%^[20]。

从 FGFR3 的分子结构可知跨膜区 (E9) 为保守的疏水性区段 (AGSVYAGILSYGVGFLL-FILVVAAVTLC), 2 个酪氨酸激酶活性区位于细胞的内段 (即胞内区)。此两者之间有一插入序列 (GPLYVLVEYAAKGNLRE) 将其分开, 是 FGFR3 受体的高度保守部分^[21]。当配体和胞外区结合后, 受体就会形成同源或异源的二聚体 (dimer)^[5], 导致酪氨酸激酶在细胞内段的活化, 催化细胞的酪氨酸残基发生磷酸化, 也致使酪氨酸残基在受体靶蛋白上磷酸化, 使得级联反应在细胞内发生, 使 DNA 最终合成导致细胞分裂^[22]。

在小鼠模型研究中, 加入酪氨酸激酶抑制剂可改善与 FGFR3 受体相关的侏儒症的症状^[23]。高度疏水的跨膜区被该跨膜区的突变氨基酸所影响, 在缺乏 FGFs 配体 (ligand) 时, 此突变导致一个 α 螺旋形成, 可以激活受体 (receptor)。功能获得性 FGFR3 基因突变常导致骨骼发育不良类的疾病, 增高了受体酪氨酸磷酸化的水平, 导致了非配体 (unligand) 的依赖性 & 组成性的激活 (constitutive activation)。由于 FGFR3 基因突变的类型和位置不同, 所以产生异常的氢键、二硫键, 使 FGFR3 单体异常聚合成二聚体, 或者激酶区构象改变形成激活环, 这些可能都是受体激活的原因^[24]。位于 Ig II 和 Ig III 结构域的连接区, 前后几个氨基酸 (E, R, P, H, R, P) 都是极性很强的亲水氨基酸或亚氨基酸, 很容易与带电离子结合而影响原来的 α 螺旋结构, 故易受外来理化因素 (电离射线和多种多样的化学药物) 的攻击而发生改变。一旦突变成 Cys, 就有可能形成二硫键, 从而导致 Ig II 和 Ig III 结构的改变, 致使稳定性较跨膜区和胞内区 (羧基端侧) 差。

研究发现, TD- I 的 FGFR3 基因的 c.742C>T/p.R248C 突变可以引起 *c-fos* 基因 (为一种即刻早期基因, 其表达产物 Fos 蛋白与靶基因的特异序列结合, 调节其转录水平发挥信使作用) 的转录活性比野生型增加 4 倍^[25]。而对照组 p.R248A 突变体与野生型则无明显差别。*c-fos* 基因高度保守, 是编码核蛋白的基因, Fos 内磷酸化蛋白是 *c-fos* 基因的表达产物, 此产物的结构特点: DNA 结合区域由

碱性氨基酸构成。附近的亮氨酸残基是由 7 个氨基酸组成的, 亦称之为亮氨酸拉链 (LZ), 它与另一端的并列的亮氨酸形成第一个 α 螺旋, 含有该结构的其他蛋白和亮氨酸残基并列形成二聚体, 然后与靶基因的碱性激活因子-1 (AP-1) 结合, 调节靶基因的表达^[17]。

研究还发现 p.R248C 突变的 FGFR3 嵌合受体可以引起 NIH3T3 细胞 (小鼠胚胎成纤维细胞, 是疏松结缔组织的主要细胞成分) 的转化, 而 NIH3T3 细胞的转化不受 p.R248A 突变的嵌合受体影响, 可以说明功能获得性方式引起 TD- I 型。引入 Cys 可以导致通过二硫键在受体之间形成二聚体, 影响此区域的 α 螺旋结构, 导致受体非配体依赖性的组成性活化^[23]。当孕妇在孕期由于患病而用药时或在孕早期接触了一些电离射线, 由于带电离子容易与 p.248 的精氨酸 (R) 等极性氨基酸结合而发生突变, 故当接触或服用了含有带电离子的药物等理化诱变因子时就容易导致 p.248 位的 R 的基因发生改变而引起致死突变, 这一点与同是 AD 遗传的成骨不全症 I 型 (或 II 型) 的 COL1A1/ COL1A2 基因的突变机制类似^[26]。这也许可以部分解释为何表型和基因型正常的父母会生出带有 p.R248C 新生致死突变的患胎。

3 正常父母生出纯合致死突变的可能机制

如果只引起一个位点 (特别是突变热点) 的新生突变, 并不难理解。令人费解的是基因型 (来自外周血组织) 和表型均正常的父母为何会那么凑巧在同一位点发生相同突变而生出纯合突变的患胎? Takagi 等^[27]2012 年报道: 一些非典型软骨发育不全 (achondroplasia, ACH) 症状的患儿存在着 p.R248C 突变的体细胞嵌合体。因此, 我们推测生出纯合突变的患胎有 2 种可能: 一种是夫妇一方的生殖腺 (如父亲的精巢或母亲的卵巢) 已经带有该高发突变, 当胎儿从父或母遗传了一次突变后, 只需在另一个高发等位基因位点上再发生一次新生突变即可产生纯合突变 (类似于肿瘤发生的二次突变学说); 另一种情况可能是夫妇双方的生殖腺 (精巢和卵巢) 都是该突变的嵌合体, 因此都有可能产生带有这一突变的生殖细胞 (精子和卵子)。当两者结合在一起, 就有可能产生纯合突变。在这种情况下, 正常的父母连续数胎生出 TD- I 患胎就不难理解了。这种情况与成骨不全患胎的父母的生殖

腺存在 COL1A1/COL1A2 突变嵌合体类似。对于成骨不全 II 型(胎儿致死型)来说,一般是见不到家族史的,因此再次生育成骨不全型 II 型(osteogenesis imperfecta type II, OI- II)型患胎的可能性很小。但有文献报道,有些家系却多次孕育致死的 OI- II 型患胎,经研究,原来是与夫妇的生殖腺存在突变嵌合体有关^[28]。

此外,正常表型的父母产生的 TD- I 型患胎可能与父亲的年龄及精液中存在突变的嵌合体的关系更为密切。据文献报道,大多数 AD 遗传的新突变基因都发生在父亲的等位基因^[29],这可能是由于随着父亲年龄增长,精子细胞的不断产生,其发生突变的机会也在不断增加。有研究表明突变是通过异常的侵袭过程完成的^[18-19, 30-31]。当然也不能排除患胎的突变是来自高龄母亲的嵌合体卵巢。

4 展望

致死性侏儒症胎儿多自发流产或人工引产^[32],少数出生的患胎也多于出生后 24 h 内死亡。虽然有个别 TD- I 型病例(带有 p.R248C 突变)可以存活下来,症状有点类似于 ACH,但研究表明该病例的体细胞存在着嵌合体,而且正常细胞的比例比较大^[27]。该病至今仍无行之有效的根治疗法,但 Yamashita 等^[33]2014 年报道,他们用“他汀类”(statin)治疗剂在 TD- I 的软骨分化和 ACH 多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)的诱导过程中能矫正初级软骨(degraded cartilage)的形成。用“他汀类”治疗的 ACH 老鼠模型能明显促进骨的生长恢复。这些结果提示,“他汀类”能代替 TD- I 和 ACH 婴幼儿的医学治疗^[33]。但这些研究仍只停留在动物模型阶段,因此目前应对该病的最好方法就是预防突变的发生以及对高危妊娠进行产前诊断以防止患儿出生,或采取胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)的手段预防患胎的孕育。而揭示 TD 的发病机制尤其是高发突变的发生机制将有助于进行有效的防患。

然而,对于 TD- I 型 p.R248C 高发突变的机制至今仍未被完全阐明。对于正常父母接连生出患胎的可能原因——源自生殖腺嵌合体,目前也只是处于理论推测阶段。因此科研人员今后可朝这方面进行深入研究以获得更有说服力的实验证据。

而要彻底揭示其发生机制,还有必要对患胎父母的多种组织进行深入研究以及对他们进行详细随访,了解其家族史及孕前、孕期的生活、工作环境

和生活习惯等,或许患胎的自发突变并非遗传自父母的一方或双方,而是由于后天接触某类化学或生物或物理因素而诱发生殖细胞发生基因突变,关于这一点,前面已有阐述,但理、化、生诱变因素具体是哪些?它们的原子、电子结构如何?诱变机制又是怎样?动物模型又该如何建立?则有待科研人员今后花费大量的精力、人力和财力去探究。

另外,随着各种罕见病例的增多和研究的不断深入,已经逐步阐明同是 *FGFR3* 基因突变引起的骨骼发育异常病,只要突变部位、突变类型以及作用于 *FGFR3* 受体蛋白的结构域存在不同,就可导致患者(或患胎)的临床表型存在很大差异,从生长发育、身高体重、智力水平、寿命基本正常如季肋发育不全(Hypochondroplasia, HCH)到个头矮小、骨骼畸形、O 型腿、头颅异常、寿命较短如软骨发育不全(ACH),再到胎死腹中或产下即死如致死性侏儒症(TD- I 或 TD- II)。此外,还阐明即使带有相同突变,只要突变等位基因的杂合或纯合状态不同,或患者体细胞或生殖腺细胞有无存在嵌合体,也会产生差别明显的临床症状,比如杂合的 p.G380R 突变仅仅引起 ACH,但纯合的 p.G380R 突变却会导致胎儿围产期死亡或产后不久即夭折,类似于 TD 病;而体细胞存在 p.R248C 杂合致死突变的嵌合体患者,却能像 ACH 患者一样正常存活,甚至生儿育女。可见 *FGFR3* 基因的突变存在着明显的剂量效应。那么,多大剂量、多大比例的 p.G380R 突变才会导致类似于 TD 的症状出现?又是多大剂量、多大比例的 p.R248C 突变才会表现类似 ACH 呢?这些发生机制都有待于今后采用更先进、更精确的技术以及联合采用各种组学的方法进行深入的研究。

参考文献

- [1] Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision [J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A (5):943-968.
- [2] Kenneth Lyons Jones. SMITH 人类先天性畸形图谱——分类、判定标准与遗传咨询[M]. 傅松滨,译. 北京:人民卫生出版社,2007:377-378.
- [3] 刘权章. 临床遗传学彩色图谱[M]. 2 版,北京:人民卫生出版社,2006:319-320.
- [4] Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, et al. Brain malformation with loss of normal *FGFR3* expression in thanatophoric dysplasia type I [J]. *Neuropathology*, 2013, 33

- (6):663-666.
- [5] Del Piccolo N, Placone J, Hristova K. Effect of thanatophoric dysplasia type I mutations on FGFR3 dimerization[J]. *Biophys J*, 2015, 108(2):272-278.
- [6] Chen CP, Chern SR, Shih JC, et al. Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia[J]. *Prenat Diagn*, 2001, 21(2): 89-95.
- [7] de Souza Cambraia VD, Rezende MA, Roquette Gomes KM. Severe acute respiratory failure caused by thanatophoric dysplasia. The report of two cases with different clinical developments[J]. *Pediatric Pulmonology*, 2016, 51(SI):S60-S61, Suppl: 42.
- [8] Monti E, Mottes M, Fraschini P, et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2010, 6: 367-381.
- [9] Qi H, Jin M, Duan Y, et al. FGFR3 induces degradation of BMP type I receptor to regulate skeletal development [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(7): 1237-1247.
- [10] Sarabipour S, Hristova K. Mechanism of FGF receptor dimerization and activation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10262.
- [11] Moldrich EX, Mezzera C, Holmes WM, et al. Fgfr3 regulates development of the caudal telencephalon [J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(6): 1586-1599.
- [12] Foldynova-Trantirkova S, Wilcox WR, Krejci P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(1): 29-41.
- [13] Krejci P, Salazar L, Kashiwada TA, et al. Analysis of STAT1 activation by six FGFR3 mutants associated with skeletal dysplasia undermines dominant role of STAT1 in FGFR3 signaling in cartilage [J]. *Plos One*, 2008, 3(12): e3961.
- [14] Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, et al. Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature Of genetic dwarfism and induces apoptosis in the AT-DC5 chondrogenic cell line via PLC γ -activated STAT1 [J]. *Bone*, 2007, 41(2): 273-281.
- [15] Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling [J]. *Endoc Relat Cancer*, 2000, 7(3): 165-197.
- [16] Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, et al. Proline to arginine mutations in FGF receptors 1 and 3 result in Pfeiffer and Muenke craniosynostosis syndromes through Enhancement of FGF binding affinity [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(1):69-78.
- [17] Sarabipour S, Del Piccolo N, Hristova K. Characterization of membrane protein interactions in plasma membrane derived vesicles with quantitative imaging forster resonance energy transfer [J]. *Acc Chem Res*, 2015, 48(8):2262-2269.
- [18] 张晔. 与 FGFR3 基因有关的遗传性侏儒研究进展 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2000, 8(1):1-3.
- [19] Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(12):1446-1465.
- [20] Passos-Buena MR, Wilcox WR, Jabs EW, et al. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations [J]. *Hum Mutat*, 1999, 14(2):115-125.
- [21] Jantip J, Tanthanuch M, Kanngurn S, et al. Mutations of fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) in transitional cell carcinoma of urinary bladder in Thai patients [Revision-2a] [J]. *J Med Assoc Thai*, 2013, 96(8):976-983.
- [22] Kwabi-addo B, Ropiquet F, Giri D, et al. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptors in human prostate cancer [J]. *Prostate*, 2001, 46(2): 163-172.
- [23] Komla-Ebri D, Dambroise E, Kramer I, et al. Tyrosine kinase inhibitor NVP - BGJ398 functionally improves FGFR3 - related dwarfism in mouse model [J]. *Journal of clinical investigation*, 2016, 126(5): 1871-1884.
- [24] Ikegami D, Iwai T, Ryo S, et al. Identification of small molecular compounds and fabrication of its aqueous solution by laser - ablation, expanding primordial cartilage [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, 19(2): 233-241.
- [25] d'Avis PY, Roberson SC, Meyer AN, et al. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type 1 [J]. *Cell Growth & Diff*, 1998, 9(1):71-78.
- [26] 李荣, 郭源平, 潘敬新, 等. 成骨不全 I 型家系的基因检测和 COL1A2 基因新突变的致病性鉴定 [J]. *遗传*, 2015, 37(1):41-47.
- [27] Takagi M, Kaneko - Schmitt S, Suzumori N, et al. Atypical achondroplasia due to somatic mosaicism for the common thanatophoric dysplasia mutation R248C [J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(1):247-250.

MiRNA-3p/5p 在肿瘤中的研究进展

张凌宇¹ 陈昌杰² 杨清玲^{2*}

[摘要] Pre-miRNA 经 Dicer 酶剪切产生 2 个产物, 分别是 miRNA-3p 和 miRNA-5p, 以往的研究多数都是以单一的 miRNA-3p 或者 miRNA-5p 为主, 而 miRNA-3p/5p 成对调控肿瘤的发生发展却少有报道。本文就近年来 miRNA-3p/5p 与肿瘤的研究进展做一综述。

[关键词] miRNA-3p; miRNA-5p; 肿瘤; 作用机制

MiRNA-3p/5p in tumor development

ZHANG Lingyu¹, CHEN Changjie², YANG Qingling^{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] Pre-miRNA by the Dicer enzyme cuts produced 2 products, miRNA-3p and miRNA-5p, respectively, most of previous studies are dominated by a single miRNA-3p or miRNA-5p, and miRNA-3p/5p into the regulation of tumor development in pairs is rarely reported. In this paper, recent development of miRNA-3p/5p and cancer will be summarized.

[KEY WORDS] MiRNA-3p; MiRNA-5p; Cancer; Mechanism

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类短的单链内源性非编码 RNA, 可与靶 mRNA 的 3' 非编码区部分序列不完全或完全互补配对, 引起靶向 mRNA 的翻译抑制或特异性降解, 调控基因表达, 从而调节细胞增殖、分化, 凋亡等生命过程。前体 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA) 具有典型的茎环结构, 靠近 5' 端茎部的 miRNA 加工成熟即为 miRNA-5p, 从 3' 端茎部加工成熟即为 miRNA-3p, 而两者之中表达丰度较低的通常被命名为 miRNA*, 其稳定性较差, 容易被 Dicer 酶降解。因此, 以往的研究多数都是以单一的 3p 或者 5p 作为研究对象^[1-6], 所以很少有文献提及 miRNA 的 2 个

臂同时参与细胞活动的相关功能事件, 而近年来越来越多的研究表明 miRNA 的 3p、5p 2 个臂都可以参与调控生物体的相关功能^[3, 7-8], 丰富了 miRNA 参与的调控网络。

1 miRNAs 概述

miRNA 是一类具有调控功能的内源性非编码小分子单链 RNA, 其长度约 17~25 个核苷酸, 广泛表达于动物、植物等真核细胞生物内。miRNA 通过缺失、过表达、基因沉默、突变、作用于不同转录因子等多样的机制在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用。

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重大项目 (NO: KJ2015ZD29, KJ2016SD37); 安徽省自然科学基金 (NO: 1508085MH159); 安徽省高校学科 (专业) 拔尖人才学术资助重点项目 (NO: gxbjZD2016069); 安徽省蚌埠市科技计划项目 (NO: 20150309); 蚌埠医学院研究生创新计划 (NO: Byycx1615)

作者单位: 1. 蚌埠医学院临床检验与诊断实验中心, 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: 杨清玲, E-mail: yqlmimi@163.com

2 miRNAs的成熟过程和命名规则

2.1 miRNAs的生物合成过程

成熟的miRNA的生成首先是通过细胞核内的RNA聚合酶II(RNA polymerase II)或者RNA聚合酶III(RNA polymerase III)生成初始miRNA(pri-miRNA), Pri-miRNA会在核内切酶Drosha/Rnase III的作用下,剪切去3'端多聚腺苷尾结构和5'端7-甲基鸟苷帽式结构,形成只含有发夹结构的pre-miRNA, pre-miRNA从核内转运到胞质中,经过Dicer酶降解形成成熟的miRNA^[9-11], Pre-miRNA在Dicer酶作用下剪切形成22个核苷酸左右长度的双链RNA,该双链RNA是由成熟的miRNA和与其碱基不完全互补的miRNA*组成的二聚体结构,最后在RNA解螺旋酶的作用下,形成成熟的miRNA和miRNA*^[12]。在哺乳动物和果蝇中,Dicer酶会分别从3'和5'端与pre-miRNA结合。根据3'数量法则,Dicer酶会从3'端的第21~25个核苷酸进行剪切,形成miRNA-3p,而根据5'数量法则,Dicer酶从5'端第22个核苷酸位置进行剪切,形成22 bp的miRNA-5p^[13]。这是经典的miRNA生物合成途径。此外,Ruby等^[14]发现了一种不同于经典miRNA合成途径的Mirtron途径,该途径不依赖于Drosha酶剪切生成miRNA前体(pre-miRNA),该途径的发现为进一步解释miRNA的产生机制提供了重要资料以及新的研究思路。

2.2 miRNAs的命名规则

miRNA的命名一般按照如下规则:①早期研究发现的miRNA,如lin-4和let-7等,仍然保留原来名字不变。②miRNA的成熟体简写成miR,其前体则用mir表示,再按照其物种名称,以及被发现的先后顺序,例如mmu代表小鼠,hsa代表人,rno代表大鼠,如hsa-miR-155和mmu-miR-155。③高度同源的miRNA在数字后加上英文小写字母(a、b、c……),如hsa-miR-125a、hsa-miR-125b。④通常一个pre-miRNA长度约为70~80 nt,很可能双臂都会产生miRNA。这种情况以前的做法是在表达丰度比较低的miRNA后面加上*号,而表达丰度较高的miRNA后面不添加任何符号。以往的研究认为miRNA*是没有功能的^[1, 3-5],但是最近有文章报道这些miRNA*其实是有功能的,甚至在某些组织里miRNA*的表达量高于miR-

NA^[6, 8, 15-16]。因此取消了以前的命名模式,如今的命名规则是:如果一个miRNA前体的双臂都能产生miRNA,则以“-5p”和“-3p”分别命名,分别表示从前体的5'端臂和3'端臂加工而来,如hsa-miR-155-3p和hsa-miR-155-5p。⑤由不同染色体上的DNA序列转录加工而成的具有相同成熟体序列的miRNA,则在后面加上阿拉伯数字以区别,如hsa-miR-521-1和hsa-miR-521-2^[3]。

3 miRNA*的研究新进展

miRNA*是在miRNA成熟过程中产生的与其不完全互补的大约22个核苷酸长度单链RNA。由于在细胞中,大多数miRNA*的表达丰度远低于其相应的miRNA,并且有实验证明,在miRNA与AGO1蛋白形成RISC复合体(RNA诱导的沉默复合体)后,与之相对应的miRNA*则不会形成RISC复合体,容易被相关的酶降解^[13, 17-18]。因此,miRNA*都被认为是在miRNA合成过程中产生的没有作用的产物^[1, 19]。而也有一些实验证明,miRNA*与miRNA相比较而言,其3'端和5'端的保守性都不及miRNA^[2, 3]。此外,与miRNA的3'端相比,miRNA*的5'端稳定性更好,这种热力学上的不对称性,使得miRNA*更容易被选中参与形成RISC,与之互补的miRNA*则被降解^[4-5, 20-21]。因此,在以往的许多研究中,都认为miRNA*是没有作用的^[1-6]。随着miRNA研究的深入,越来越多的研究发现,miRNA*可以和miRNA一样,参与基因转录后的调控网络^[6, 8, 15-16, 22-24]。而最近的研究表明,在某些生物特定的组织中,miRNA*的表达丰度并不比miRNA低,甚至远高于miRNA的表达丰度^[7, 25]。miRNAs的序列是高度保守的,而大部分的miRNA*s的序列也是高度保守的,有时候,miRNA和与其相对应的miRNA*在同一组织中高表达,如hsa-miR-590-5p和hsa-miR-590-3p(hsa-miR-590*)在肝癌HepG2、Hep3B、Huh7 3株细胞系中高表达,都具有促进肿瘤发生的生物学功能^[22]。有的miRNA和其miRNA*在同一组织中低表达,如hsa-miR-139-5p和hsa-miR-139-3p(hsa-miR-139*)在膀胱癌组织中表达下降,下调了hsa-miR-139-5p和hsa-miR-139-3p后,可以明显促进膀胱癌细胞的增殖迁移能力,而上调了hsa-miR-139-5p和hsa-miR-139-3p以后可以抑制膀胱癌细胞的增殖迁移能力^[6]。有的miRNA与其miRNA*在同一物

种不同的组织中分别高表达,比如在小鼠中,miR-142-3p在胚胎和新生胎儿中高表达,而其互补的miR-142-5p却在卵巢、睾丸和脑等组织高表达^[26]。有些miRNA与其miRNA*在同一肿瘤中都发挥着抑癌或者原癌基因的作用^[3, 6-8, 22, 26],而有些miRNA与其miRNA*在同一肿瘤中作用则相反,比如在人结肠癌细胞系中,hsa-miR-28-5p的过度表达可以抑制结肠癌细胞的增殖迁移和体外侵袭能力,而hsa-miR-28-3p表达增加可以促进结肠癌细胞增殖迁移和体外侵袭^[27]。此外,miR-96-5p在肝硬化、发育不良结节发展为肝癌的过程中表达量逐渐上调,而miR-96-3p在此过程中表达量却是逐渐下调的^[28]。

4 miRNA与miRNA*的作用方式

随着对miRNA*s研究的深入,对miRNA*在生物体内的作用机制也逐渐清晰,miRNA与miRNA*的作用方式极为相似,都可以特异性切割靶基因或者在mRNA水平抑制靶基因翻译过程^[15, 29]。因此,miRNA*和miRNA一样,在真核生物基因表达过程中作为一类负性调控因子,参与生命个体的成长发育、机体代谢、疾病发生发展的诸多重要过程。由于miRNA和miRNA*在序列上互补,它们作用的靶基可能相同也有可能不完全相同,有一小部分研究显示,如miR199a-3p/5p、miR-297b-3p/5p靶向同样的mRNA,在同样的病理生理过程中发挥相同的作用^[23-24]。因此,在生物体的调节过程中,miRNA与其miRNA*可能发挥着相同或者不同的功能^[6, 16, 30]。近年来有新研究表明,miRNA和其miRNA*可以通过两者浓度的比值的改变来发挥功能。Kuchenbauer等人^[31]在研究miR-223对骨髓祖细胞的调节作用时发现,miR-223与miR-223*都具有抑制活性,两者均靶向胰岛素样生长因子1受体/磷脂酰肌醇3-激酶轴,并且高水平的miR-223*与急性髓系白血病的总生存率呈正相关。进一步研究发现miR-223与miR-223*还可以通过两者比值的变化参与骨髓细胞的分化。

5 miRNA-3p/5p与肿瘤

5.1 miR-590-5p/3p与肝癌

YANG等人^[22]利用miRNA芯片以及qRT-PCR技术,对肝癌标本以及各细胞株HepG2、

Hep3B、Huh7、L-O2(正常肝细胞株)进行分析,qRT-PCR验证了临床肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织相对于癌旁组织,miR-590-3p、miR-590-5p表达均同步上调,qRT-PCR结果进一步发现,HepG2、Hep3B、Huh7 3株HCC细胞株相比于正常肝细胞株L-O2,miR-590-3p、miR-590-5p同样表达上调。通过双荧光素酶和Western Blot验证,miR-590-3p和miR-590-5p分别直接靶向PTEN(第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因)和程序性细胞死亡因子(programmed cell death 4, PDCD4),从而激活PI3K-AKT信号通路,促进AKT1-S473的磷酸化水平,具有促进HCC的发生。由此可见,miR-590的2个臂的miRNA在HCC恶变中发挥着至关重要的作用,而2个臂同时发挥类似协同的生物学功能,在以往报道中是很少见的。

5.2 miR-582-3p/5p与膀胱癌

Keita等人^[32]分析UM-UC-3、5637、J82、TCC-SUP、T24、HT1376和RT4多株膀胱癌细胞株以及来自29例临床膀胱癌患者的53例癌组织与28例与之相匹配的癌旁组织,通过qRT-PCR法检测,结果发现miR-582-3p/5p在膀胱癌细胞系以及在膀胱癌组织中表达强烈下降,通过分别对miR-582-3p和miR-582-5p过表达可以显著降低膀胱癌细胞的增殖和侵袭能力,而通过动物模型尿道注射合成的miR-582-3p/5p类似物以后,肿瘤的生长被显著抑制,进一步的研究发现,PGGT1B、LRRK2、DIX-DC1同时作为miR-582-3p/5p共同的靶基因,使用siRNA技术敲除这些基因以后,与过表达miR-582-3p/5p得到了相同的结果^[32]。由此可见,miR-582-3p/5p之间相互的协同作用,在膀胱癌的发展过程中发挥着重要作用,也为膀胱癌的临床治疗提供了新的治疗方案。

5.3 miR-96-3p/5p与肝癌

Zhang等人^[23]对28例肝硬化发育不良结节、34例分化良好的肝细胞癌组织、16例晚期肝癌以及对应的肝硬化组织进行实时荧光定量发现,miR-96-5p从肝硬化到发育不良结节再到HCC的过程中显著上调,HCC中miR-96-5p的中位表达水平比高级别发育不良结节(high-grade dysplastic nodule, HGDN)高2.83倍,而在分化良好HCC和晚期HCC之间miR-96-5p的表达没有显著差异。相反的,miR-96-3p在肝硬化到发育不良结节的过程

中,表达量逐步降低,而在HCC中则完全不可检出。进一步的研究发现^[23],miR-96-5p表达对HCC检测的灵敏度和特异性分别为47.1%和79%,因此miR-96-5p的在诊断HCC方面价值有限。然而,miR-96-3p阴性表达对于HCC检测的敏感性和特异性为88.2%和84.2%,表明miR-96-3p表达水平是HGDN和HCC鉴别诊断的良好标志物。而当与GPC3免疫染色结合时,用于HCC检测的灵敏度和特异性分别为67.7%和100%。对miR-96的研究,在HCC的诊断方面提供了进一步的帮助。

5.4 miR-409-3p/5p与前列腺癌

Sajni等人^[24]在研究前列腺癌的过程中发现,前列腺癌较良性前列腺增生组织相比,miR-409-3p与miR-409-5p表达量上升,在具有高Gleason评分的前列腺癌患者的肿瘤组织中,相对于较低Gleason评分,miR-409-3p和miR-409-5p都升高。进一步通过小鼠前列腺癌模型也发现,过表达miR-409-3p/5p可以诱导肿瘤的生长,而且在使用miR-409-5p抑制剂以后可以明显减少前列腺癌的骨髓转移,通过研究证实,miR-409-3p/5p可以靶向抑制共同靶基因*RSU1*,以前的研究表明,在前列腺癌中*RSU1*蛋白可以阻断致癌性的Ras/MAPK途径和整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)途径^[33-35]。而miR-409-5p可以靶向*STAG2*和*NPRL2*,降低两者在前列腺癌组织中的表达。因此,miR-409-3p/5p在前列腺癌组织中的过度表达,以及在小鼠正常前列腺上皮中显示出的致瘤性以及促进前列腺癌骨转移方面,使得miR-409成为一个新的癌症检测的生物标志物,为肿瘤的治疗提供了新的研究方向。

6 小结及展望

综上所述,随着miRNA作用机理的深入研究,以及高通量技术如miRNA芯片的技术创新,miRNA*同miRNA一样可以参与真核基因表达的负调控,具有调控生长发育分化以及疾病发生发展的能力,从进化的角度看,miRNA*不可能仅仅是miRNA加工过程中产生的无作用的副产品,本着生物体节约的原则,miRNA*可能有着特殊的使命。这丰富了miRNAs的种类,拓宽了miRNAs参与的基因调控网络。尤其miRNA-3p/5p在肿瘤中的差异化表达,对于全面理解复杂精细的基因调控网络提供新的帮助。

参考文献

- [1] Meng Y, Shao C, Gou L, et al. Construction of MicroRNA - and MicroRNA* - mediated regulatory networks in plants [J]. RNA Biol, 2011, 8(6): 1124-1148.
- [2] Yang HF, Zheng WH, Zhao WT, et al. Roles of miR-590-5p and miR-590-3p in the development of hepatocellular carcinoma [J]. South Med Univ, 2013, 33(6):804-811.
- [3] Jian L, Li DD. Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in decidual natural killer cells with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. Med Sci Monit, 2016, 22:922-929.
- [4] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, 294(5543): 858-862.
- [5] Griffiths J, Grocock S, Van Dongen RJ, et al. MiR-Base: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:140-144.
- [6] Yonemori A, Naohiko S, Hirofumi Y, et al. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer [J]. Cancer Sci, 2016, 107:1233-1242.
- [7] Meng Y, Shao C, Gou L, et al. Construction of microRNA and microRNA* - mediated regulatory networks in plants [J]. RNA Biol, 2011, 8(6): 1124-1148.
- [8] Kong BC, Yuen LS, Phan NN, et al. MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells [J]. Journal of Biomedical Science, 2014, 21:95.
- [9] Chang S, Johnston RJ, Frøkjærjensen C, et al. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode [J]. Nature, 2004, 430(7001):785-789.
- [10] Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, et al. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha [J]. Mol Cell, 2014, 39(3):373-384.
- [11] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase Drosha initiates microRNA processing [J]. Nature, 2012, 425(6956):415-419.
- [12] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. Nature, 2011, 409(6818):295-296.

- [13] Blahna MT, Hata A. Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2):233-240.
- [14] Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing [J]. *Nature*, 2007, 448(7149):83-86.
- [15] Devers EA, Branscheid A, May P, et al. Stars and symbiosis: microRNA and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(4):1990-2010.
- [16] Liu Y, Wang X, Jiang J, et al. Modulation of T cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis [J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(9-10):1084-1090.
- [17] Berezikov E, Robine N, Samsonova A, et al. Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence[J]. *Genome Res*, 2011, 21(2):203-215.
- [18] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors [J]. *Science*, 2004, 303(5654):95-98.
- [19] Berezikov E, Robine N, Samsonova A, et al. Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence[J]. *Genome Res*, 2011, 21(2):203-215.
- [20] Ruby JG, Stark A, Johnston WK, et al. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs [J]. *Genome Res*, 2007, 17(12):1850-1864.
- [21] Baumberg N, Baulcombe DC. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 102(33):11928-11933.
- [22] Yang HF, Zheng WH, Zhao WT, et al. Roles of miR-590-5p and miR-590-3p in the development of hepatocellular carcinoma [J]. *South Med Univ*, 2013, 33(6):804-811.
- [23] Zhang H, Xing AY, Ma RR, et al. Diagnostic value of miRNA-96-5p/3p in dysplastic nodules and well-differentiated small hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology Research*, 2016, 46(8):784-793.
- [24] Sajni J, Murali G, Peizhen H, et al. miR-409-3p/-5p promotes tumorigenesis, epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of human prostate cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2014, 20(17):4636-4646.
- [25] Devers EA, Branscheid A, May P, et al. Stars and symbiosis: microRNA and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(4):1990-2010.
- [26] Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(10):992-1009.
- [27] Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, et al. Strand-Specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142:886-896.
- [28] Zhang H, Xing AY, Ma RR, et al. Diagnostic value of miRNA-96-5p/3p in dysplastic nodules and well-differentiated small hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology Research*, 2016, 46(8):784-793.
- [29] Zhang XM, Zhao HW, Gao S, et al. Arabidopsis Argonaute2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12 [J]. *Mol Cell*, 2011, 42(3):356-366.
- [30] Meng Y, Shao C, Gou L, et al. Construction of MicroRNA and MicroRNA*-mediated regulatory networks in plants [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(6):1124-1148.
- [31] Kuchenbauer F, Berg T, Mah SM, et al. Mir-223 is dispensable for the onset of acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia Research*, 2012, 36(7):905-911.
- [32] Uchino K, Takeshita F, Takahashi R, et al. Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression [J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(3):610-619.
- [33] Gonzalez-Nieves R, Desantis AI, Cutler ML. Rsu1 contributes to regulation of cell adhesion and spreading by PINCH1-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Cell Commun Signal*, 2013, 7(11):279-293.
- [34] Dougherty GW, Jose C, Gimona M, et al. The Rsu1-PINCH1-ILK complex is regulated by Ras activation in tumor cells [J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 87(3):721-734.
- [35] Becker-Santos DD, Guo Y, Ghaffari, et al. Integ, rln-linked kinase as a target for ERG-mediated invasive properties in prostate cancer models [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 33(16):2558-2567.

蛋白质组学在肺癌相关标志物挖掘中的应用

梁委军 覃世逆 袁天柱 戴盛明*

[摘要] 肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其5年生存率仅为15%,但早期诊断出的肺癌患者5年生存率可达52%。缺乏早期诊断及有效治疗手段使得肺癌的死亡率很高。因此,寻找新的早期诊断和预后标志物为治疗打开新途径迫在眉睫。蛋白质组学技术具有足够的灵敏度,特异性和可重复性,它正成为肺癌生物标志物和治疗靶点研究的一个重要工具。本文就近年来肺癌的蛋白质组学研究进展包括肺癌的预防、早期诊断和治疗方法等进行综述。

[关键词] 肺癌;蛋白质组学;肿瘤标志物

The application of proteomics in lung cancer related biomarkers in data mining

LIANG Weijun, QIN Shini, YUAN Tianzhu, DAI Shengming*

(Liuzhou Key Laboratory of Tumor Diseases and Prevention, Clinical Laboratory, Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi, China, 545005)

[ABSTRACT] Lung cancer is the most common cause of cancer death over the world, with a 5-year survival rate of 15%, and with a 5-year survival rate of 85% by early diagnosis. The high mortality from lung cancer is due not only to the lack of early diagnosis but also to the lack of effective treatments. Therefore, there is an urgent need to find new markers for early diagnosis and prognosis that could serve to open novel therapeutic avenues. Having adequate sensitivity, specificity, and reproducibility, proteomics is becoming an important tool for the identification of biomarkers and therapeutic targets for lung cancer. In this article, the latest reports in proteomic studies of lung cancer will briefly introduced. It contains the identification of new diagnostic, prognostic, and predictive markers for lung cancer, using proteomics technologies.

[KEY WORDS] Lung cancer; Proteomics; Tumor markers

中国的最新数据显示肺癌的发病率和死亡率高居各种癌症首位,2015年中国肺癌预估发病例数和死亡例数分别高达73.33万和61.02万^[1]。肺癌起病隐匿,目前缺乏有效的筛查和早期诊断手段,当患者出现症状时入院诊断多为晚期,其预后较差,其总的5年生存率小于15%。如果较早的发现肺癌和及时手术的治疗,5年生存率能提高到52%^[2]。因此,肺癌早期诊断标志物的发现有利于肺癌的诊断和治疗。

蛋白质组的研究内容为某细胞、组织或基因组特定时间段内所表达的全部蛋白质,蛋白质组学技术通常用于研究生物系统内特定时间或一定条件下蛋白质表达情况^[3]。通过比较肺癌细胞组和正常细胞组的蛋白质表达的差异、分析差异蛋白的功能,能够间接揭示肺癌发病机制,有利于发现肺癌标志物,对肺癌的诊断、治疗及预后评价有重大作用。因此,本文对蛋白质组学在肺癌的发病机制、转移、早期诊断、治疗及预后评价等方面

基金项目:广西柳州市科技局科技创新能力与条件建设资助项目(2014G020403)

作者单位:广西医科大学第四附属医院医学检验科,柳州市肿瘤疾病与防治重点实验室,广西,柳州 545005

*通讯作者:戴盛明, E-mail: daishm@sina.com

的研究进展作综述。

1 肺癌蛋白质组学

当抑癌基因功能减弱甚至消失或致癌基因功能增强时,肿瘤细胞得以繁殖。基因功能最终由蛋白功能表现。蛋白质组学通过研究差异蛋白的功能进而揭示肿瘤的发生发展机制。蛋白质组学尤其有利于寻找与肿瘤相关的癌蛋白、细胞周期调节因子和信号传导分子。蛋白质组学运用于以下肺癌研究中。

1.1 肺癌的发生发展

Zhang 等^[4]通过膜蛋白质组学研究肺腺癌和正常组织的蛋白之间的差异,对所得 568 个差异蛋白进行鉴定,其中 257 个蛋白表达上调和 311 个下调。生物信息学分析,这些蛋白质中有 48% 为膜蛋白或与膜功能相关。这为膜蛋白对肺癌发生发展的调控机制提供线索。该研究发现 S100A14 在低分化肺癌表达量低于其他分化程度的肺癌。S100A14 是 S100 家族中的新成员,研究发现其与肝癌、胃癌等密切相关。

1.2 肺癌细胞转移

肺癌发生转移是肺癌患者治疗失败和死亡的主要原因。运用蛋白质组学寻找肺癌转移标志物,对阻断转移、寻找药物靶标有重大意义。众所周知,线粒体功能障碍与癌症进展相关。在一项研究中,通过对不同侵袭能力肺癌细胞系的线粒体进行蛋白质组学研究发现表皮生长受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在高侵袭性非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞线粒体高度表达^[5]。线粒体高表达表皮生长因子受体可调节线粒体动态增强肿瘤的侵袭和转移。研究发现线粒体表皮生长因子受体的表达量与肺癌患者的生存期呈负相关。斯钙素 2(stanniocalcin-2, STC2)能参与调节钙、磷在肾运输,并在一些癌症中扮演多重角色。然而,其在肺癌中的作用和临床意义尚不清楚。Na 等^[6]研究 STC2 在肺癌细胞生长、转移和进展的作用,发现可作其为肺癌的生物标志物。这为肺癌转移的病理机制和相关的分子标志物研究提供线索。

1.3 肺癌早期诊断

由于肺癌早期比较隐匿,使得肺癌很难在早期的时候就能检出,当务之急为寻找肺癌早期诊断的生物标志物。蛋白质组学应运而生,通过比

较正常细胞与癌细胞内蛋白质的表达,对有差异表达的蛋白质进行定性定量分析,筛选与肿瘤相关的生物标志物,再研究肺癌早期诊断试剂,这会极大提高肺癌 5 年生存率^[7]。

Rostila 等^[8]对石棉导致的肺癌组织、石棉照射的正常组织、肺癌患者和吸烟的健康人的肺组织进行蛋白质组学研究,发现 peroxiredoxin 1 (PRX1)是一种新型的肺癌标记物。PRX1 是一种过氧化物,主要分布于细胞质和细胞核中,广泛地参与细胞信号传导,尤其对癌症的发生具有重要的调节作用。血清中原肌球蛋白的过表达与石棉辐射相关,PRX1 和 PRX2 的表达量和吸烟量成负相关,高表达的 PRX1 可能导致基因损伤。这个发现为肺癌和与石棉相关疾病的鉴定提供了新的方向。

Diamandis 等^[9]通过蛋白质组学得出 3 个肺癌潜在标志物: pentraxin-3 (PTX3)、激肽释放酶 11 (KLK11)和颗粒蛋白前体蛋白(progranulin)。通过 203 名肺癌患者、180 例重度吸烟的高风险诱发肺癌者和 43 例非肺癌癌症患者的血清检测验证,PTX3 的敏感性和特异性等指标已达到现已应用于临床的肺癌生物标志物水平。

Yu 等^[10]用鸟枪法蛋白质组学检测 6 例早期肺癌患者和 5 个健康人痰上清液中蛋白质表达情况,并通过 Western 印迹法和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)初步验证,烯醇化酶 1(ENO1)可能是一个肺癌早期的肿瘤标志物。

Jin 等^[11]通过对小鼠肺癌模型内皮细胞和正常内皮细胞的蛋白质组学分析发现 transgelin-2 为肺癌的潜在标志物。transgelin-2 是一个分子量为 22kDa-25kDa 的细胞骨架蛋白,研究发现其与临床肿瘤的发展、转移和神经浸润有关。外泌体(exosomes)为圆形单层膜结构,可由机体众多类型细胞释放到唾液、血浆、乳汁、尿液等体液当中。外泌体可携带多种蛋白质、mRNA、miRNA,参与细胞通讯、细胞迁移、血管新生和肿瘤细胞生长等过程。Clark 等^[12]的蛋白质组学研究数据显示 exosomes 参与非小细胞肺癌的进程,可以作为非小细胞肺癌的早期诊断标志物。

通过蛋白质组学研究的这些差异蛋白将可能作为肺癌早期诊断的靶向标记物,为肺癌的早期诊断提供借鉴和依据。

1.4 肺癌治疗

近20年来,肿瘤的药物疗法模式从单纯以细胞毒药物杀伤肿瘤逐步向靶向治疗发展,分子靶向药物日益成为肿瘤治疗的重要利器。蛋白质组学也为肺癌蛋白靶标的研究提供有利线索。

Wu等^[13]通过同位素标记相对和绝对定量蛋白质组(iTRAQ)分析对黄绿青霉素治疗肺癌进行研究。在高重复性定量之后,对2 659个差异蛋白进行鉴定。生物信息学分析发现其中141种差异蛋白与葡萄糖代谢相关。实验结果提示黄绿青霉素可以减少糖酵解中间产物高分子的合成并抑制细胞增殖。通过应用蛋白质组学,了解药物体内代谢过程,这能进一步解释肺癌黄绿青霉素抑瘤效应。Liang等^[14]通过蛋白质组学的分类,预测表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂治疗肺癌患者的效果,准确率达93%。

肿瘤细胞的放射敏感性是放疗失败的主要原因,因此找出是否含抗辐射基因对选择放疗与否至关重要。Yun等^[15]分离了抗辐射H460细胞和辐射敏感H460肺癌细胞,使之暴露于辐射后,利用蛋白质组学分析,确定了8个蛋白质可能参与抗辐射相关的生物过程。值得注意的是,其中4个基因:*these-pai-2*, *nomo2*, *klc4*和*plod3*还未有与辐射相关的报道。该研究结果表明,耐辐射基因的发现,为解决肺癌的耐放疗提供依据。

肿瘤细胞在治疗过程中获得的耐药性限制了放疗的临床疗效。抗辐射的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞比辐射敏感的细胞存活率明显增加。通过比较蛋白质组学分析结果显示血浆纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)为抗辐射的关键分子^[16],它可作为细胞外信号触发细胞增强抗辐射能力。其过程为在辐射诱导的转录因子,包括p53, HIF-1 α ,和Smad3等的诱导下,癌细胞过量分泌PAI-1,抑制caspase-3的活性,从而获得抗辐射能力。该研究提示抑制PAI-1的分泌可以阻止敏感细胞获得抗辐射而达到治疗效果。

由此可见,蛋白质组学可在癌症治疗中提供更多的信息和线索。

1.5 肺癌预后评价

在一项研究中,研究者使用一个基于iTRAQ定量蛋白质组学分析并获取了6个候选蛋白,包括

ERO1L, PABPC4, RCC1, RPS25, NARS和TARS,然后应用免疫组化和免疫印迹分析法进一步验证这6种蛋白的表达。与癌旁正常组织相比,这6个候选蛋白在癌组织中表达水平较高,且ERO1L和NARS水平与淋巴结转移呈正相关。另外,早期肺腺癌患者ERO1L过度表达与预后差呈正相关,它的过度表达提示肿瘤转移的风险更高预后更差。此研究提供了一个潜在的肺腺癌生物标志物的诊断及预后指标^[17]。

据报道,血清C-反应蛋白水平升高,对肺癌患者有预后意义^[18]。通过差异蛋白质组学分析法,分析肺癌患者或健康对照者血清中的C-反应蛋白的结合成分,进一步确定C-反应蛋白的结合组分为肺癌的预后标志物,并验证其预后价值^[19]。研究组发现crp-saa升高水平与肺癌严重的临床特征显著相关。值得注意的是,在I-II期患者,只有crp-saa与生存率显著相关,而不是总SAA或C-反应蛋白。此外,单变量和多变量Cox分析也表明,只有crp-saa可作为早期肺癌患者的一个独立的预后标志物。crp-saa可能成为肺癌比总SAA或C-反应蛋白更好的预后指标,尤其是在早期患者。

2 总结

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,攻克肺癌一直是临床研究的热点与难点研究课题,近年在肿瘤的研究中,先有基因组学大放光彩,随后蛋白质组学应运而生,已日益成为肺癌研究的重要手段。本文对近年来蛋白质组学在肺癌临床研究中的进展进行综述,总结大量与肺癌的发病机制、转移、早期诊断及治疗相关的蛋白,如S100A14、STC2、PRX1、PTX3、ENO1、transgelin-2等。这些研究为肺癌的临床研究提供更多的依据。后基因组时代,蛋白质组学倍受人们的青睐,它不断的给我们指明研究道路,但在发展中也遇到一些问题,比如在蛋白质的分离纯化方面,尤其是低含量或难于用常规方法溶解分离的蛋白;另外蛋白质组学技术未有国际标准,出现各实验室结果不一。相信随着蛋白组技术的进一步发展及普及,它将继续在探索肺癌发病机制、转移、肺癌早期诊断、寻找有效的肺癌治疗靶点和研发治疗肺癌药物及预后评价等方面发挥巨大作用,蛋白质组学必将在后基因组时代为肺癌的防治中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Conrad DH, Goyette J, Thomas PS. Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening[J]. *J Gen Intern Med*, 2008, 23 Suppl 1: 78-84.
- [3] 彭征, 戴盛明. 蛋白质组学在肝细胞癌诊断研究中的进展与展望[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015(3): 145-150.
- [4] Zhang X, Li W, Hou Y, et al. Comparative membrane proteomic analysis between lung adenocarcinoma and normal tissue by iTRAQ labeling mass spectrometry[J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(3): 267-280.
- [5] Che TF, Lin CW, Wu YY, et al. Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37349-37366.
- [6] Na SS, Aldonza MB, Sung HJ, et al. Stanniocalcin-2 (STC2): A potential lung cancer biomarker promotes lung cancer metastasis and progression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854(6): 668-676.
- [7] Bisgnin A, Yalcin AD, Gumuslu S, et al. Correlation of serum proteomics patterns of sCD200 (OX-2), sApo-2L (sTRAIL), vitamin-D and homocysteine to quantitative FDG-PET/CT findings in newly diagnosed non-small cell lung cancer [J]. *J BUON*, 2013, 18(4): 1099-1100.
- [8] Rostila A, Puustinen A, Toljamo T, et al. Peroxiredoxins and tropomyosins as plasma biomarkers for lung cancer and asbestos exposure [J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(2): 450-459.
- [9] Diamandis EP, Goodglick L, Planque C, et al. Pentraxin-3 is a novel biomarker of lung carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(8): 2395-2399.
- [10] Yu L, Shen J, Mannoor K, et al. Identification of ENO1 as a potential sputum biomarker for early-stage lung cancer by shotgun proteomics [J]. *Clin Lung Cancer*, 2014, 15(5): 372-378.
- [11] Jin H, Cheng X, Pei Y, et al. Identification and verification of transgelin-2 as a potential biomarker of tumor-derived lung-cancer endothelial cells by comparative proteomics [J]. *J Proteomics*, 2016, 136: 77-88.
- [12] Clark DJ, Fondrie WE, Yang A, et al. Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes [J]. *J Proteomics*, 2016, 133: 161-169.
- [13] Wu YH, Hu CW, Chien CW, et al. Quantitative proteomic analysis of human lung tumor xenografts treated with the ectopic ATP synthase inhibitor citreoviridin [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70642.
- [14] Wu X, Liang W, Hou X, et al. Serum proteomic study on EGFR-TKIs target treatment for patients with NSCLC [J]. *Oncotargets Ther*, 2013, 6: 1481-1491.
- [15] Yun HS, Baek JH, Yim JH, et al. Radiotherapy diagnostic biomarkers in radioresistant human H460 lung cancer stem-like cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(2): 208-218.
- [16] Kang J, Kim W, Kwon T, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 enhances radioresistance and aggressiveness of non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 23961-23974.
- [17] Hsu CH, Hsu CW, Hsueh C, et al. Identification and characterization of potential biomarkers by quantitative tissue proteomics of primary lung adenocarcinoma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(7): 2396-2410.
- [18] Xu M, Zhu M, Du Y, et al. Serum C-reactive protein and risk of lung cancer: a case-control study [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 319.
- [19] Zhang XY, Zhang G, Jiang Y, et al. The prognostic value of serum C-reactive protein-bound serum amyloid A in early-stage lung cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2015, 34(8): 335-349.

如何开展医疗器械注册检验

刁春芳 高旭年*

“注册证是进入市场的入场券”。在我国,第二、三类医疗器械要投入销售、使用,须先按照《医疗器械注册管理办法》或《体外诊断试剂注册管理办法》的相关规定向食药监部门申请产品注册,取得医疗器械注册批件,从而获得进入市场的资格。

而第二、三类医疗器械产品的注册申请,需生产企业向食药监部门提交系列技术资料,包括注册检验报告、临床评价报告等。其中,注册检验是产品上市前评价的第一个主要环节。《医疗器械注册管理办法》第三章第十六条规定:“注册检验样品的生产应当符合医疗器械质量管理体系的相关要求,注册检验合格的方可进行临床试验或者申请注册。”可见,不管是医疗器械产品,还是体外诊断试剂,都应先进行注册检验,取得合格的检测报告,下一步工作才能得以开展。那么,医疗器械注册检验工作该如何开展呢?下面将就此一一探讨。

1 什么是医疗器械注册检验

注册检验为产品的全性能试验,也称为型式检验,第二、三类医疗器械经国家总局认可的医疗器械检测机构进行注册检验,通过试验所得到的数据或结论验证被测产品是安全、有效的,确认被测产品检测合格后方可临床试验或申请注册。

2 申请注册检验的前提条件

2.1 产品技术要求

生产企业已完成拟申报产品的研发,经前期研究审评确认产品的技术指标,编制产品技术要求,制定的性能指标应能客观判定被测产品的功能性与安全性。产品技术要求性能指标的制定可

参考相关国家标准/行业标准并结合具体产品的设计特性、预期用途和质量控制水平且不应低于产品适用的强制性国家标准/行业标准。《医疗器械产品技术要求编写指导原则》对此也有作相应规定。

2.2 送检样品

生产企业须完成送检样品的生产,生产的样品量应符合法规及送检样品检测的需求。例如,第三类体外诊断试剂应根据《体外诊断试剂注册管理办法》第二十三条规定,送检样品为连续3个生产批次样品。

3 医疗检测机构如何选择

第二、三类医疗器械的注册检验需由有承检资质的医疗检测机构进行检测,检测机构对被测产品的技术要求进行审查,并提出预评价意见。

目前,经食药监部门认可的医疗器械检测机构有20多家,包括中国食品药品检定研究院、北京医疗器械检验所、广州医疗器械质量监督检验中心等。生产企业在申请注册检测前,应选择具有医疗器械检验资质、在其承检范围内的医疗器械检测机构。如果由没有承检能力的检测机构出具的检测报告,经注册审评后将被判定检测报告不合格,企业将须对产品进行补充检测,甚至可能面临注册产品退审。为避免这一情况,生产企业可以根据产品名称在国家食品药品监督管理局数据库的医疗器械检测中心受检目录中查询,境内哪家检测机构对自己的产品有检测能力。

如果拟注册检测产品没有一家检测机构可以承检时,企业可向国家食品药品监督管理局医疗器械注册管理司申请指定检测。医疗器械注册

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

管理司根据企业提交的资料和指定检测机构的产
品检测能力证明材料进行研究后,给予企业回复。

4 注册检测产品如何送检

4.1 体外诊断试剂

第二、三类体外诊断试剂由食药监部门负责
抽样,封样后3日内由注册申请人送检有承检资格
的检测机构安排检测。抽样规则由各省、自治区、
直辖市食药监部门制定,并无统一要求。

例如,广州市的诊断试剂生产企业如要申请
二类产品抽样,须先向广州市食品药品监督管理局
递交抽样申请书,市食药监部门会安排2名相关
负责人到企业现场抽样,并查看生产、原材料采
购、保存检测等记录。经检查被抽产品符合要求
后,完成抽样,并签字贴好封条。

4.2 医疗器械

医疗器械申请注册检验时,可根据医疗器械
检测机构的办事指南准备样品与资料,自行安排
送检。送检量须满足检测要求,生产企业如担心
送检量不够,可在送检前咨询委托的检测机构。

5 医疗器械注册检验项目

医疗器械检测机构除依据生产企业申报使用
的产品技术要求(适用的国家标准、行业标准或生
产企业制定的产品技术要求)进行的检测,还要按
照国家法规或公告文件等对不同类型的医疗器械
进行除技术要求以外的检测。例如,根据《医疗器
械说明书和标签管理规定》对被测产品的说明书

和标签(铭牌)进行审查。

与人体直接接触的产品除按照企业制定的性
能指标检测,还须完成生物相容性评价。例如,
6 864敷料类产品,至少要完成细胞毒性、致敏性、
皮肤刺激等生物相容性试验。生物相容性评价原
则上不在产品技术要求中制定,生产企业在送检时
可提供生物相容性评价方案给检测机构完成检测。

有源医疗器械设备须完成电磁兼容、电气安
全及环境试验检测。检测机构一般情况下会出具
两份检验报告,一份为电磁兼容检测报告,另一份
为性能检测报告,只有2份检测报告的结论均为合
格才能判定被测产品注册检验为合格。

如被测产品可能存在安全隐患,按照医疗器
械国家标准、行业标准规定的检验项目和检验方
法无法检验的,检测机构还可补充检验项目和检
验方法进行检验,得出检验结论。

6 总结

医疗器械注册检验是十分严谨的一个环节,
其对于注册审查的工作甚至产品上市后续都有着
非常重要的作用。因此,生产或研发企业应秉持
科学的态度对待注册检验,从产品实际出发,不增
加或夸大产品的作用,这样产品上市后也可避免
市场监管抽查出现产品不合格的现象。

需要注意的是,医疗器械注册检验报告仅证
明被测样品符合要求,检测结果仅对被测样品负
责。产品在上市后,企业唯有坚持有效的质量体
系来保证产品的安全、有效。

(上接第283页)

- [28] Morgan JA, Marcus PS. Prenatal diagnosis and man-
agement of intrauterine fracture[J]. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 2010, 65(4):249-259.
- [29] Gibbs L, Legeai-Mallet L. FGFR3 intracellular muta-
tions induce tyrosine phosphorylation in the Golgi and
defective glycosylation [J]. *Biochim Biophys Acta*,
2007, 1773(4):502-512.
- [30] Su N, Jin M, Chen L. Role of FGF/FGFR signaling in
skeletal development and homeostasis: learning from
mouse models[J]. *Bone Res*, 2014, 2:14003.
- [31] Monson E, Ornan E, Adar R, Feferman T, et al. The

transmembrane mutation G380R in fibroblast growth
factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor
activation from down-regulation [J]. *Mol Cell Biol*,
2000, 20(2):516-522.

- [32] Dias AT, Zanardo EA, Dutra RL, et al. Post-mortem
cytogenomic investigations in patients with congenital
malformations [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(1):
116-123.
- [33] Yamashita A, Morioka M, Kishi H, et al. Statin treat-
ment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes [J].
Nature, 2014, 513(7519):507-511.

广州市疾病预防控制中心(广州市卫生检验中心)实验室

广州市疾病预防控制中心(广州市卫生检验中心)实验室成立于1953年,现有人员128名,其中高级职称53名、中级职称34名;博士7名,硕士51名。实验室由产品检测楼、生物检测楼、动物实验楼等3栋大楼组成,总面积约2万平方米,配备有生物安全实验室、洁净实验室、动物房等专业实验设施,拥有电感耦合等离子体-质谱联用仪、气质联用仪、液质联用仪、三重串联四极杆LC/MS及LP-MS、全自动细菌基因指纹图谱鉴定系统、全自动微生物系统、Quant Studio7实时荧光定量PCR仪、Beckman遗传分析仪、液态芯片分析系统、流式细胞仪、高纯锗 γ 能谱仪等仪器设备,总值近1.3亿元。

该实验室以传染性疾病、健康相关产品、食品风险评估、公共场所检测为主要发展方向,设立了微生物、病毒免疫、毒理、理化、质控等11个部门;配置了基因诊断/工程实验室、分子生物学实验室、细胞培养和病毒分离实验室、免疫及血清学诊断实验室、致病性微生物实验室、艾滋病确认实验室、常规与精密仪器化学实验室等;主要开展微生物(免疫学、血清学、分子生物学)诊断鉴定、基因及蛋白研究、产品及环境卫生指标实验室检测;涉及突发公共卫生事件、应急反恐、传染性疾病、医院感染、重大活动卫生保障、食品风险评估、学校、公共场所、饮用水及其产品、消毒产品、医疗器械、卫生用品等。实验室重视质量管理,先后获得国家实验室认可、广东省计量认证、国家食品药品监督管理总局食品复检机构、广东省放射诊疗机构等资质。2012年以来,实验室承担及参与科研项目30余项,包括国家及广东省自然科学基金8项,广东省、广州市科技计划项目20余项,荣获广东省科技进步二等奖、广州市科技进步一等奖、二等奖和三等奖共9项;发表科技论文664篇,其中SCI文章122篇。实验室高度重视对外合作交流,先后与中国疾控中心、军事科学院微生物流行病学研究所、美国加州大学戴维斯分校、中山大学分别共建传染病预防控制国家重点实验室热带病研究基地、媒介传染病和人畜共患病研究基地、食源性疾病及人畜共患病研究中心和热带病防治研究教育部重点实验室急性传染病疾控研究基地。近3年培养硕博士21人。

学术带头人杨智聪是广州市疾病预防控制中心二级主任医师,广州市第十三届政协委员。现任中心主任,广州市预防医学会会长,病原快速检测实验室重点学科带头人,广东省和广州市政府重大传染病防控专家,长期从事公共卫生、急性传染病、病原快速检测技术的研究与开发并取得系列创新性成果。



→ 公司简介

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



→ 公司优势

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

→ 多元化产品系列



→ 企业使命

达生命之源, 安健康之本

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



公司总部

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

营销中心

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