



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

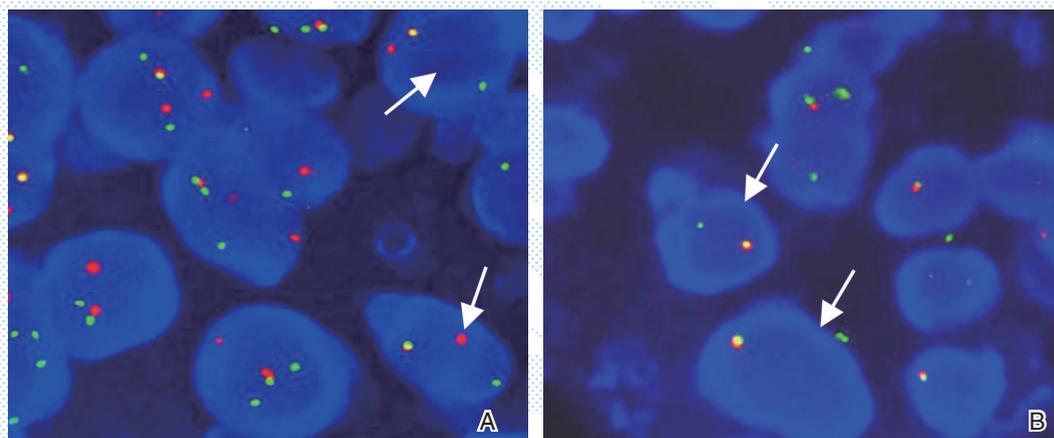
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2017年3月 第9卷 第2期 总第48期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 9 Number 2 March 2017



A: 经典型红绿信号分离, 箭头示红绿信号分离阳性细胞; B: 孤立绿色信号模式, 箭头示1黄1绿阳性细胞

图(P91) 荧光原位杂交检测 *ROS1* 易位信号模式($\times 1\ 000$ 倍)

Figure(P91) The *ROS1* translocation signals by FISH($\times 1\ 000$)

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

03>

分子诊断与治疗杂志

二〇一七年三月

第九卷 第二期

中山大学

徐邦牢



1968年4月出生，1994年毕业于湖南医科大学医学检验系，1998年至2001年就读重庆医科大学临床检验诊断学专业硕士研究生，2005年至2008年就读中山大学病原生物学专业博士研究生，2009年至2010年赴澳大利亚新南威尔士大学做访问学者。

广州市医学重点人才，医学博士，主任技师、教授，博士研究生导师，澳大利亚新南威尔士大学博士

后，现任广州市第一人民医院检验科主任，广州市医师协会检验医师分会主任委员、中国医师协会消化道肿瘤专业委员会委员、中国医学实验室质量认可技术评审员、全国卫生产业企业管理协会医学检验产业分会专家委员会委员、广东省肝脏病学会检验分会副主任委员、广东省中西医结合学会检验分会副主任委员、广东省预防医学会微生物与免疫学专业委员会副主任委员、广东省医疗行业协会医学检验管理分会副主任委员、广东省医疗安全协会医学检验分会副主任委员、广东省医疗器械鉴定专家、广州市科技项目评审专家、广东省等级医院评审专家、《实用医学杂志》编委、审稿专家。

徐邦牢教授从事医学检验工作23年，主要研究方向为肿瘤以及感染性疾病的分子诊断。

在国内外杂志上发表学术论文60余篇，其中SCI论文16篇；主持和参与国家级、省市级科研课题15项，申请发明专利1项，培养研究生6名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2017年3月 第9卷 第2期 总第48期 Bimonthly Volume 9 Number 2 March 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 何玮璇
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3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 HE Weixuan</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929</i> <i>CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd</i>
Publish Date	<i>2017.3.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2017年3月 第9卷 第2期

目次

述 评

体外诊断试剂质量评价与标准物质溯源 付岳 高旭年 黄杰 (73)

论 著

Tip30基因过表达对人胃癌细胞生长的影响及分子机制 程智勇 杨雁鸿 杨丽莉 等 (78)

冬凌草甲素抑制胃癌SGC-7901细胞增殖诱导DNA损伤相关蛋白表达的实验研究
..... 余韬 魏凤香 温丽娟 (83)

荧光原位杂交技术检测肺癌*ROS1*易位病例临床病理特点 陈敏 刘晓羽 吕丽霞 等 (88)

原发性肝癌表皮生长因子受体突变的研究 于森 邱李辉 熊伟 等 (94)

脑卒中患者血清可溶性CD14、同型半胱氨酸和7项血脂结果分析
..... 张韶斌 陈斯亮 罗莞超 等 (100)

肾移植术后受者EB病毒感染回顾性分析 邵剑春 周贤冉 宋永琳 等 (104)

基因芯片技术对结核分枝杆菌耐药性检测的临床应用 陈瑶 吴英松 (108)

白蛋白结合型紫杉醇单药作为三线及以上方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究
..... 蒋侃 黄诚 吴标 等 (112)

未治和经治慢性乙型肝炎患者的病毒基因型分析及其核苷酸类似物耐药突变的模式特征
..... 谭亚峰 欧阳耀灵 (117)

综 述

表皮生长因子受体与鼻咽癌的关系 潘莉莉 黄华艺 (121)

肠道病毒EV71手足口病病原学及免疫功能改变研究现状 王宇婧 程邦宁 (127)

血浆甲基化*Septin9*基因: 一个有潜力的结直肠癌早期筛查标志物 陈纪飞 戴盛明 (132)

三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2基因单核苷酸多态性与痛风发病的相关性
..... 闻海丰 宋春蒙 石豪妍 等 (137)

HIV-1耐药基因检测的研究进展 陈瑶 吴英松 (142)

专家风采

徐邦牢 (封二)

实验室巡礼

广州市第一人民医院检验科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 2 March 2017

CONTENTS

COMMENTS

Quality evaluation of *in vitro* diagnostic reagents and traceability of reference materials

FU Yue, GAO Xunian, HUANG Jie (73)

ORIGINAL ARTICLES

The effect and molecular mechanism of Tip30 gene overexpression on cell growth in human gastric cancer cells

CHENG Zhiyong, YANG Yanhong, YANG Lili, LI Gaoyan, MEN Xiaoyan (78)

The effect of oridonin on proliferation and expression of DNA damage-related proteins in gastric cancer cells

YU Tao, WEI Fengxiang, WEN Lijuan (83)

Detection of *ROS1* gene rearrangement by FISH in lung cancer and analysis of its clinicopathological features

CHEN Min, LIU Xiaoyu, LV Lixia, YANG Jieliang, WANG Weiya (88)

Analysis of *EGFR* mutation status in primary hepatocarcinoma patients

YU Miao, QIU Lihui, XIONG Wei, SU Huijuan, YE Lv (94)

Analysis of serum soluble CD14, homocysteine and 7 blood lipids in patients with stroke

ZHANG Shaobin, CHEN Siliang, LUO Guanchao, WEI Qingwen, LUO Dan (100)

A retrospective analysis of EBV infection after renal transplantation

SHAO Jianchun, ZHOU Xianran, SONG Yonglin, CHEN Jun, SHI Qionghua (104)

Clinical application of gene chip technology in the detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*

CHEN Yao, WU Yingsong (108)

Clinical study of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (single-agent regimen) as third- and further- line therapy in advanced non-small cell lung cancer patients

JIANG Kan, HUANG Cheng, WU Biao, LIN Gen, ZHANG Jing (112)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 9 Number 2 March 2017

CONTENTS

Detection of hepatitis B virus genotyping in untreated or treated patients of chronic hepatitis B and its mutation patterns of the nucleotide analogues-resistant mutants

TAN Yafeng, OUYANG Yaoling (117)

REVIEWS

Epidermal growth factor receptor and nasopharyngeal carcinoma

PAN Lili, HUANG Huayi (121)

Research into the etiology and alterations in immunological function of hand, foot and mouth disease caused by Enterovirus 71

WANG Yujing, CHENG Bangning (127)

Methylated plasma *Septin9* gene: a potential marker in colorectal cancer screening

CHEN Jifei, DAI Shengming (132)

The correlation of ATP-binding cassette transporter G2 gene single nucleotide polymorphism and gout

WEN Haijeng, SONG Chunmeng, SHI Haoyan, WEN Chan, QIN Jin, FENG Zhongjun (137)

Advances in the drug resistance genotype detection of HIV-1

CHEN Yao, WU Yingsong (142)

体外诊断试剂质量评价与标准物质溯源

付岳¹ 高旭年² 黄杰^{3*}

【摘要】 体外诊断试剂标准物质是实现量值溯源、保证检测数据和结果准确一致的重要材料。自上世纪80年代以来,国内实验室在体外诊断试剂标准物质的研制方面做了大量的工作。本文简要介绍了目前国内研制的体外诊断标准物质及其研制中所采用的主要形式:以参考方法、参考系统和标准物质为基础的计量学溯源体系;以多中心合作标定、一致化或类似一致化的溯源体系,并针对两种溯源体系的差别进行了阐述。

【关键词】 体外诊断试剂; 标准物质; 量值溯源

Quality evaluation of *in vitro* diagnostic reagents and traceability of reference materials

FU Yue¹, GAO Xunian², HUANG Jie^{3*}

(1. Beijing Institute of Medical Device Testing, Beijing, China, 101111; 2. Guangzhou Bangdesheng Biological Technology Co., Ltd, Guangdong, Guangzhou, China, 510665; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

【ABSTRACT】 Reference materials for *in vitro* diagnostic reagents are important in achieving the traceability of measurements and guaranteeing the quality of the test data as well as the result. Since the 1980s, domestic laboratories have done much work in the preparation of reference materials for *in vitro* diagnostic reagents. This article aims to introduce the reference materials of *in vitro* diagnostic reagents and its traceability systems: the metrological traceability system, which is based on reference procedures, reference materials, and reference systems; and the homogenization traceability system based on collaborative study to determine the assignment of value to reference materials.

【KEY WORDS】 *In vitro* diagnostic reagents; Reference materials; Traceability of measurements

近年来,我国体外诊断试剂(*in vitro* diagnostics, IVD)市场规模增长迅速。针对纷杂的产品市场,为保证疾病的有效预防、诊断和治疗监测,相应IVD产品的质量评价和监管也日趋重要。而体外诊断试剂检验结果的准确性、不同厂家同类产品检验结果的一致性为IVD产品质量的重要议题。IVD产品的质量评价一般还需要考虑与产品性能密切相关的准确度、特异性、重复性、检测限

等指标。

实现检验结果准确性和可比性的重要手段是保证检验检测的标准化和一致化,标准化的基础是建立参考系统,包括参考方法、标准物质和参考实验室等;一致化的基础是在充分评估技术的原理、影响因素,分析不同技术检测同一靶标的差异,达成检测结果可比的共识。标准化和一致化主要差别体现在量值溯源的方式。标准化的量值

作者单位:1. 北京市医疗器械检验所,北京 101111

2. 广州邦德盛生物科技有限公司,广东,广州 510665

3. 中国食品药品检定研究院,北京 100050

*通讯作者:黄杰, E-mail: jhuang5522@126.com

溯源方式是追求量值溯源至国际单位、参考方法、标准物质等,一致化的溯源方式则是溯源至经过认可的方法、参考物质。在完整的溯源、量值传递和校正过程中,体外诊断试剂标准物质是实现检验数据和结果准确一致的主要工具,也是保证量值有效传递的计量实物标准^[1]。同样,在检测结果一致化过程中,经过认可的方法和/或参考物质也发挥了重要的传导作用。通过标准物质建立IVD产品的标准化和一致化,可实现临床检验结果的准确、可比和可溯源。

目前国际上研制标准物质的组织主要有英国国家生物制品检定所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC),美国国家标准和技术研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST),位于比利时的标准物质和计量研究所(Institute of Reference Materials and Metrology, IRMM)等。这些组织研制了大量的涉及无机成分、有机小分子、蛋白、抗体、激素、核酸等作为溯源的国际通用标准物质^[2]。我国标准物质的研制工作起步稍晚,自上世纪80年代也开始研制临床检验标准物质,前期研制的标准物质以无机成分、微量元素为主,后期开始研制有机分子的标准物质,2005年前后开始研制核酸、蛋白等生物大分子的标准物质^[3]。已有多家参考实验室通过了中国实验室合格评定委员会的认可,建立的参考方法涵盖了酶学、小分子化合物、血脂、代谢物、离子以及甾体类激素等^[4]。并且为保证标准物质质量溯源体系的建设及标准物质的质量,相关实验室正在积极申请标准物质生产者能力认可。目前基本相应的建立了包含生物化学检测,免疫学检测,核酸检测,血液体液检测等几大类参考物质,这些参考物质为我国体外诊断试剂的量值溯源和检测结果一致化做出了重要贡献。但是针对标准物质的研制和溯源体系在不同的机构有部分理解的不一致和差别,主要体现在标准物质的实际用途和组成形式上。有些机构认为标准物质的主要用途是为测量程序或校准品赋值,也有机构认为标准物质的作用还应该包含对产品的质量评价,不同的用途造成了标准物质组成形式的差别,也对标准物质的溯源体系造成了不一样的理解。本文拟就目前我国体外诊断试剂标准物质及其研制中所采用的主要形式进行简要介绍,并针对两

种溯源体系的差别进行了阐述。

1 以参考方法或决定性方法和标准物质为主要溯源体系的标准物质

在计量学溯源途径中,生物化学检测标准物质一般都是应用已建立的参考方法进行定值,并附有给定置信水平的不确定度,多用于临床检验项目中的量值传递、准确度质量控制等。该类标准物质主要为定义明确的小分子化合物和蛋白质分子,前者主要包括代谢产物/底物类、离子类、非肽激素类、维生素与微量营养素等,后者包括酶和其他蛋白。

1.1 小分子化合物类标准物质

有机小分子临检项目的参考方法一般基于仪器分析原理,主要有同位素稀释质谱法(isotope dilution mass spectrometry, IDMS)、分光光度法及拉曼光谱法等。其中,同位素稀释质谱法是国际物质的量咨询委员会认定的基准测量方法,是目前国际公认的可准确测定小分子化合物的最可靠的分析原理之一。临床化学领域中,同位素稀释质谱法与色谱结合使用在建立代谢产物/底物类检测的参考方法中应用较广,国内现已建立针对肌酐、尿素、尿酸、葡萄糖、同型半胱氨酸、25-羟基维生素D、叶酸、游离甘油、甘油三酯、胆固醇的同位素稀释质谱参考方法,并且相应的已研制完成多项国家一级、二级标准物质^[5,6]。考虑到互通性,这些标准物质一般采用公认无基质效应的新鲜冰冻人血清。例如血清总胆固醇、总甘油等标准物质的制备,首先要采集健康志愿者的血清,再将血清按照性别及胆固醇水平制备不同浓度的混合血清池,经过滤后分装完成样品制备;按照《标准物质/标准样品定值的一般原则和统计方法》(GB/T 15000.3-2008/ISO Guide35:2006)和国家一级标准物质技术规范(JJG 1006-1994)的要求进行均匀性和稳定性检验的设计和实验;对于候选标准物质的定值则采用已建立的同位素稀释液相色谱串联质谱和高效液相色谱法等参考方法,测定结果均可溯源至国际单位;最后再评价该标准物质的互通性及适用性^[7]。通过此类方法制备的还包括冰冻人血清尿酸、肌酐成分分析标准物质,冰冻人血清中葡萄糖和冰冻人血清中尿素标准物质等。非肽类激素和离子类标准物质的参考测量方

法主要也是同位素稀释质谱法,其制备原料的选择和制备过程也与代谢物/底物类相似,目前国内已经研制的标准物质包括雌二醇、 17α -羟孕酮、孕酮和人血清钾、镁、钙等^[8]。此外,在测定血清钙等离子类项目时,通常需要用多接收电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)先测定浓缩同位素的丰度比值,并计算浓缩同位素的浓度,不过国内已有实验室在英国政府化学家实验室同位素稀释法原理基础上建立了反应池-两步同位素稀释质谱法测定血清总钙的参考方法,大幅降低了实验对仪器性能的要求^[9]。

1.2 酶学、血液学标准物质

酶催化浓度测量是临床检验的特殊情况,由于是活性测量,其测定结果依赖于测量过程。目前国际临床化学和实验室医学联盟(International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine, IFCC)共颁布8个技术文件,分别讲述 37°C 下测定肌酸激酶(creatine kinase, CK)等7种酶的催化浓度的参考方法。目前我国已有多家实验室建立了酶学参考方法并通过了酶学参考实验室的认证。酶学标准物质也采用了人源血清标本,相应的人血清中乳酸脱氢酶活性浓度标准物质,冰冻人血清中丙氨酸氨基转移酶等复合酶类催化活性浓度一级、二级标准物质也已制备完毕^[10,11]。同时,国内多家实验室也参加了由IFCC组织的参考实验室间比对,各种酶室间变异及小组均值与国外实验室网络相比没有明显差别^[12]。

在血液体液检测领域,国内实验室在国际血液学标准化委员会委员的指导下,也相应建立了血细胞分析的参考方法,并与国外参考实验室长期进行高频率的结果比对。国内首家通过ISO 17025-2005和ISO 15195-2003认可的血细胞分析参考测量实验室也成功获批。此外,为解决血细胞分析检测结果的溯源问题,国内也以国际血液学标准化委员会(international council for standardization in haematology, ICSH)发布的参考方法为溯源标准研制出血细胞分析国家一级、二级标准物质,包括白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白测定和血小板计数,氰化高铁血红蛋白国家一级、二级标准物质等^[13-14]。这些标准物质的研制和应用,对于推动我国血细胞分析标准化工作的发展具有

重要意义。

由此可知,对于胆固醇、肌酐、葡萄糖、激素等被测量定义明确的小分子化合物,参考方法和标准物质的建立具有成熟的基础。但对于大多数蛋白分子建立参考方法仍然任重道远。建立的标准物质在IVD产品质量评价中可以用于准确度、线性、检测限等项目的样本(或样本之一),对于特异性等指标的评价则需要采用其他的样本进行。

2 采用多中心合作标定、一致化或类似一致化溯源体系的标准物质

多中心合作标定是通过多中心采用规定的方法或不同原理的方法进行特性值的赋值,通过统计学方式对多中心的赋值进行处理后给出靶值的方式,一致化简单的来说就是通过认可的方法,该方法并不是参考方法,依靠或不依靠参考物质对候选参考物质的特性量值进行赋值。在目前的临床检验项目中,存在参考方法的仅为少数,因此大多数检验项目、国内的大多数免疫和核酸标准物质都采用了一致化或类似一致化的溯源体系进行溯源。

2.1 免疫学标准物质

在蛋白质大分子的检测中主要使用免疫学检测技术,包含化学发光免疫检测方法、时间分辨免疫荧光法、酶联免疫吸附法、免疫比浊法等。由于没有绝对权威的参考方法,目前世界卫生组织以及国内的实验室采用多中心合作研究的方式进行标准物质的定值。激素及肾上腺皮质激素等甾体激素的常规检验方法一般有免疫荧光分析和时间分辨荧光免疫分析等,国际检验医学溯源联合委员会也列举了部分非肽类激素的参考测量方法,但大部分激素现阶段无法通过参考方法的形式进行标准化。例如人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)标准物质,因为在妊娠和滋养叶细胞疾病的妇女血清中,发现有多种具有免疫活性的HCG分子形式,他们包括完整HCG、脱 β -羧基末端的HCG、 β -HCG核心片段、缺刻HCG(Nicked HCG)、HCG糖变形体、游离 β -HCG和游离 α -HCG,对于参考方法溯源体系来说HCG分子则是定义不明确的分子。所以HCG标准物质就是采用多中心合作标定或者说类似一致化的溯源体系进行溯源。在建立HCG国家标准品过程中,

首先精确量取来源于妊娠妇女尿液的高纯 HCG 原料、人血白蛋白和海藻糖,加入至磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH=7.4)内,无菌过滤后分装,再冻干制备成 HCG 国家标准品候选品。以 HCG 第五次国际标准品(07/364)为对照品,采用9个厂家10种 HCG 检测试剂盒(包括化学发光微粒子免疫法、化学发光法、电化学发光法、磁微粒分离酶联免疫法、酶联免疫法、时间分辨免疫荧光分析法等)进行协作标定,同时对候选品的瓶间精密度、稳定性进行分析。制备的候选品与国际标准品同质,满足用于 HCG 免疫分析及相应试剂盒的性能评价^[15]。此外,类似于 HCG,中国食品药品检定研究院还研制了胰岛素、三碘甲腺原氨酸、四碘甲腺原氨酸(即甲状腺素)、人胰岛素 C-肽、促甲状腺激素、反三碘甲状腺原氨酸、促黄体生成素、促卵泡生成素、泌乳素、生长激素、人胎盘泌乳素等。

对于肿瘤标志物类以及感染性疾病抗原抗体的标准物质,现阶段国内也主要采用纯品或血清样本联合定值,并且大多溯源到 NIBSC 研制的国际标准物质。例如甲胎蛋白等就是使用高纯原料通过酶联免疫法、化学发光法等不同方法进行联合定值,溯源到国际标准品,其目的主要为试剂盒注册检验及市场流通监管,也有助于生产企业对其产品进行量值溯源^[16]。乙型肝炎表面抗原、梅毒螺旋体抗体等是采用血清标准物质与国际标准品比对进行定值^[17]。根据实际应用,标准物质也可以有不同组成,传染病体外诊断试剂标准物质一般由阳性参考品、阴性参考品、最低检出量参考品、精密性参考品及定量参考品等组成^[18]。国内目前已经研制的风疹病毒 IgM 抗体,丙型肝炎抗体,巨细胞病毒 IgG、IgM 抗体等多种标准品和参考盘等,大多是通过试剂盒筛选出阳性和阴性血清,再根据预设的性能指标制备参考盘,用于全面控制诊断试剂的质量,主要控制试剂的特异性、灵敏度、精密度及定量试剂的准确性等^[19-20]。

需要注意的是,由于在三碘甲腺原氨酸、四碘甲腺原氨酸(即甲状腺素)、人胰岛素 C-肽、反三碘甲腺原氨酸等激素方面也发展了参考方法,对于此类同时存在两种溯源体系的情况,不同溯源体系的标准物质之间的相关性以及对检测试剂质

量评价的影响也需要进行充分评估。

2.2 核酸标准物质

随着生物技术的进步,核酸检测在医学诊断领域得到广泛应用。但核酸检测易受到不同检测原理、样本基质、检测病毒基因变异、人群中基因多态性以及不同基因突变类型等多种因素的影响,导致不同实验室的检测结果,在准确性、量值、灵敏度和特异性方面也出现较大的差异。为使不同实验室,不同方法间检测的结果具有可比性,就必须使检测标准化。但由于缺乏一级参考测量程序,所以大部分核酸类标准物质也都是经过多中心合作联合定值,其制备过程已经程序化。在定值方法上,主要有紫外分光光度法、荧光染料法、实时荧光定量 PCR 法、磷元素同位素定量方法、脱氧单磷酸核苷定量的同位素稀释质谱法、数字 PCR 方法等。其中数字 PCR 方法是比较新的一种 DNA 定量技术,此方法不需要线性标准品即可计算出待检 DNA 分子的拷贝数,目前 NIST 等国际机构已有核酸标准物质采用数字 PCR 方法进行定值。但是现有的技术还很难从绝对意义上对核酸的量值进行确定。

一般 WHO 为病毒核酸扩增技术制定的国际参考物质来源于稀释后冻干分装的且含灭活野生型病毒的人混合阳性血浆,表述单位通常为 IU (international unit)。这种标准物质质量值为 WHO 经多中心研究确定其可以作为第一个国际标准物质或参考制剂后,通过主观方式赋予的一个标准数值,后来的替代标准则以第一个标准值为标准继续通过国际多中心合作来定值。规定 IU 可以使某种物质的生物活性在国际上使用同一种计量单位表示,而使不同于国际单位的单位体系具有互通性。

近年来国内在核酸标准物质的研制方面也做了大量的工作,早期研制的乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸血清标准物质、丙型肝炎病毒核糖核酸血清标准物质被国家质检总局批准为国家二级标准物质,其量值可溯源到第一代国际标准品^[21]。人腺原体核酸检测国家参考品,人乳头瘤病毒全基因组基因分型国家参考品等的建立也对相应检测项目进行了规范^[22-23]。此外,国内已发布的核酸标准物质还包括乙型肝炎分型、丙型肝炎分型、人免疫缺陷病毒-1、人免疫缺陷病毒-1分型、人免疫缺

陷病毒-2、沙眼衣原体、禽流感 H7N9、结核分枝杆菌, EB 病毒等。以上介绍的核酸标准物质大部分是用接近天然基体的生物材料制备而成。目前国内也有实验室采用人工合成的方法, 基于 MS2 噬菌体衣壳蛋白包装外源 RNA 的病毒样颗粒, 研制无生物传染危险性且稳定的 RNA 病毒核酸质控品和标准物质^[24]。

同时, 随着测序技术的大规模应用, 为建立能对高通量测序技术平台及相关试剂产品进行有效性评估, 中国食品药品检定研究院采用多中心合作标定的方式研制了测序仪性能评价用 DNA 参考品和高通量测序检测外周血胎儿染色体非整倍体参考品。针对高通量测序检测外周血胎儿染色体非整倍体检测试剂盒的影响因素, 如母亲外周血中胎儿游离 DNA 的含量、胎儿三体的不同类型(如标准三体、嵌合体以及平衡易位突变等)对结果的影响、DNA 序列差异对结果的影响特别是高 GC 含量序列对结果的影响、小片段 DNA 分子在分离纯化中的片段筛选、文库构建中的偏移、测序文库的库容和量、在软件分析中采用的算法主要基于的统计学原理、在结果分析中原始数据是否符合统计学要求、参考数据库的建立等, 高通量测序检测外周血胎儿染色体非整倍体参考品中针对性的设计了数据量控制参考品、阳性参考品、微缺失微重复参考品、嵌合体参考品、检测限参考品、阴性参考品等参考品组成了参考盘, 可以合理地进行产品质量评价。

3 展望

综上所述, 自上世纪 80 年代以来, 从无机元素、有机小分子逐渐发展到核酸、蛋白质等生物大分子的标准物质, 从纯物质标准物质逐渐发展到基体标准物质, 国内体外诊断试剂标准物质的研制工作有了长足的进步。随着精准医学大幕的拉开, 相关的诊断技术将迎来快速发展的春天。为了保证临床检测的检测质量, 需要及时建立新的可靠的标准物质, 这也就对我国体外诊断试剂量值溯源工作提出了更高的要求。相信在不久的将来, 经认可的适用于临床检验的标准物质将会越来越多, 它们将对临床检验的标准化、一致化检测起到积极作用, 为临床正确诊断和合理用药提供重要依据。

参考文献

- [1] 高尚先, 黄杰. 体外诊断试剂标准物质国内外现状[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7):1207-1213.
- [2] 武利庆. 体外诊断试剂有证标准物质研究现状和趋势[J]. 中国科技成果, 2012(20):50-52.
- [3] 原霖, 韩焘, 翟新验. 核酸标准物质研究现状[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(11):89-92.
- [4] 陈文祥, 申子瑜, 杨振华. 临床生化检验参考方法的主要作用[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(3):245-249.
- [5] 陈文祥, 杨振华. 临床生化检验参考方法发展历史与现状以及国内研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(5):489-493.
- [6] 徐凤仙, 于嘉屏. 液相色谱串联质谱法测定血清中 25-羟基维生素 D2 及 25-羟基维生素 D3 含量[J]. 检验医学, 2015(8):821-824.
- [7] 周伟燕, 张传宝, 董军, 等. 血清总胆固醇、总甘油、高密度脂蛋白胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇标准物质的研制[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(11):1013-1017.
- [8] 彭絮, 徐蓓, 江红, 等. 血清雌二醇标准物质的研制[J]. 化学分析计量, 2015(4):1-4.
- [9] 李胜民, 王军. 反应池-两步同位素稀释质谱法测定血清总钙[J]. 化学分析计量, 2015(5):12-15.
- [10] 马怀安, 徐国宾, 王清涛. 冰冻混合人血清酶学标准物质研制进展[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(5):726-727.
- [11] 徐静, 张建平, 王清涛. 探讨 γ -谷氨酰基转移酶冰冻混合人血清候选标准物质的制备和稳定性[J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(2):165-168.
- [12] 颜清, 穆润清, 康辉, 等. 国际酶学参考实验室室间比对四种酶学项目结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2014(5):347-351.
- [13] 彭明婷, 艾承锦, 李臣宾, 等. 氰化高铁血红蛋白国家一级标准物质的研制[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(1):97-101.
- [14] 彭明婷, 谷小林, 李臣宾, 等. 血细胞分析国家一级标准物质的研制[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(1):1-5.
- [15] 于婷, 黄杰, 曲守方, 等. 人绒毛膜促性腺激素第三次免疫测定用国家标准品候选品的建立[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(11):1144-1148.
- [16] 王玉梅, 刘艳, 孙楠, 等. 免疫测定用甲胎蛋白国家标准品的制备与定值[J]. 中国药事, 2014, 28(8):843-846.

(下转第 87 页)

Tip30基因过表达对人胃癌细胞生长的影响及分子机制

程智勇¹ 杨雁鸿² 杨丽莉³ 李高岩¹ 门晓彦^{4*}

[摘要] 目的 探讨Tip30基因过表达对人胃癌 AGS 细胞增殖、凋亡的影响及相关分子机制。
方法 人胃癌 AGS 细胞中 Tip30 基因过表达采用腺病毒转染法,使用实时定量 PCR 和 Western blotting 验证 Tip30 过表达的效果,分别采用 MTT 法、划痕试验检测细胞增殖、迁移情况,流式细胞术分析细胞凋亡,Western blotting 分析 p53、Bax、Bcl-2 蛋白表达。
结果 过表达组 AGS 细胞 Tip30 基因 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于对照组 ($P<0.05$)。与对照组比较,Tip30 过表达后,细胞增殖、体外迁移能力均显著减弱 ($P<0.05$);Tip30 过表达后 AGS 细胞凋亡率相比对照组显著增大,Tip30 过表达促进 AGS 细胞凋亡与上调 p53、Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达水平相关。
结论 Tip30 基因过表达可抑制人胃癌 AGS 细胞增殖活性、体外迁移能力,且促进胃癌细胞凋亡。

[关键词] 人胃癌细胞; Tip30 基因; 细胞增殖; 凋亡; 迁移

The effect and molecular mechanism of Tip30 gene overexpression on cell growth in human gastric cancer cells

CHENG Zhiyong¹, YANG Yanhong², YANG Lili³, LI Gaoyan¹, MEN Xiaoyan^{4*}

(1. The first department of general surgery, the first hospital of Qinhuangdao city, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000; 2. The second department of tumor, the first hospital of Qinhuangdao city, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000; 3. Information section, the first hospital of Qinhuangdao city, Qinhuangdao, Hebei, China, 066000; 4. The endocrinology department, Haigang hospital of Qinhuangdao city, Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei, China 066000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect and underlying molecular mechanism of Tip30 gene overexpression on cell proliferation and apoptosis in human gastric cancer AGS cells. **Methods** Adenovirus transfection was used to overexpress the Tip30 gene in human gastric cancer AGS cells. Tip30 overexpression was verified by real-time PCR and western blot. Cell proliferation was analyzed with the MTT method, a wound scratch assay was used to monitor cell migration activity, and the cell apoptosis rate was detected with flow cytometry. The expression level of p53, Bax and Bcl-2 was detected with western blot. **Results** The mRNA and protein levels of Tip30 in human gastric cancer AGS cells were significantly higher in the overexpression group compared with the control group ($P<0.05$). The proliferation and migratory ability of AGS cells *in vitro* were decreased when Tip30 was overexpressed ($P<0.05$). The cell apoptosis rate was significantly increased in Tip30 overexpressing cells, and a corresponding up-regulation of p53 and Bax and

基金项目:秦皇岛市科学技术研究与发展计划项目(2012023A130)

作者单位:1. 河北省秦皇岛市第一医院普外一科,河北,秦皇岛 066000

2. 河北省秦皇岛市第一医院肿瘤二科,河北,秦皇岛 066000

3. 河北省秦皇岛市第一医院信息科,河北,秦皇岛 066000

4. 秦皇岛市海港医院内分泌科,河北,秦皇岛 066000

*通讯作者:门晓彦, E-mail: mfcx55@163.com

down-regulation of Bcl-2 was also observed. **Conclusion** Overexpression of Tip30 in human gastric cancer AGS cells inhibits both cell proliferation and migration *in vitro*, and enhances the AGS cell apoptosis.

[Key words] Human gastric cancer; Tip30 gene; Cell proliferation; Apoptosis; Migration

胃癌是常见的恶性肿瘤,发病机理尚未明确。Tip30是近年来新发现的抑癌基因,与多种肿瘤的发生发展及转移相关^[1-3]。研究证实,肿瘤组织中 Tip30 基因表达处于较低或缺失的状态^[4-5]。我们前期研究也表明,胃癌组织中 Tip30 的表达明显低于癌旁正常组织,并与胃癌临床分期、分化程度、浸润程度等有关^[6],但 Tip30 基因在胃癌发生发展中的确切作用还有待进一步深入研究。本研究通过 Tip30 过表达腺病毒转染人胃癌细胞 AGS,考察 Tip30 基因表达对胃癌细胞增殖、凋亡及迁移的影响及部分相关分子机制,为临床胃癌防治与药物研发提供新的干预靶点。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂与amp;仪器

人胃癌细胞株 AGS 购自中国科学院上海细胞库;反转录试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、预染蛋白标准购自美国 Thermo Fisher Scientific; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,real-time PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;新生胎牛血清、RPMI-1640 培养基购自美国 Gibico 公司;MTT、DMSO、EDTA 购自美国 Sigma 公司;Tip30 基因过表达腺病毒购自汉恒生物科技(上海)公司;鼠抗人 Tip30 抗体为美国 Imgenex 公司;p53、Bax、Bcl-2 抗体购自美国 Abcam 公司;PBS 溶液、胰蛋白酶、细胞裂解液、青霉素、链霉素购自江苏凯基生物技术公司;GAPDH 抗体、羊抗鼠或羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术公司;Annexin V-FITC、碘化丙啶(PI)购自美国 BD 公司;引物合成委托 Invitrogen 公司。流式细胞仪(BD, US),荧光显微镜(Olympus, 日本),凝胶成像分析系统、Real-time PCR 检测仪(Bio-Rad, US),酶标仪(Bio-Tek, 美国)。

1.2 细胞培养

AGS 细胞复苏后,采用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃、20% CO₂ 细胞培养箱中恒温培养,每天观察细胞生长状态并及时更换新鲜培养液,当细胞生长密度达到 80%左右时,用胰蛋白酶消化后传代,分成 3~4 个细胞培养瓶继续

培养,取生长状态良好的对数生长期细胞用于后续转染及分析检测实验。

1.3 细胞转染

过表达组为转染 Tip30 过表达腺病毒的 AGS 细胞,对照组为 AGS 细胞,不做其它处理。取对数生长期人胃癌 AGS 细胞于转染前 12 h 种植 6 孔板,当细胞汇合度达到 40%左右时,更换不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基饥饿培养 3 h,之后按照感染复数 MOI 等于 100 的浓度添加 Tip30 过表达腺病毒,转染时长为 4 h,转染完成后更换含 10%胎牛血清的新鲜培养基,继续培养至后续各项指标检测所需的时长。

1.4 Real-time PCR 检测 mRNA 水平

Tip30 过表达腺病毒转染后 48 h 收集两组细胞,每孔添加适量 Trizol 和氯仿,移液器吹打裂解细胞,提取总 RNA,去基因组后检测 RNA 纯度,纯度合格且无蛋白质污染,进行逆转录。据 Tip30 基因片段设计引物,上游引物为 5'-GTCTTTATTTT-GGGCGCCAG-3',下游引物为 5'-CCCAGC TTTCCCTCTGGTGG-3'。内参 β -actin 上游引物为 5'-GCCTCCGGCAGGACCACCGG-3',下游引物为 5'-CGGTGAGATCGCGGCCCGCC-3'。按照逆转录试剂盒说明书具体步骤进行逆转录操作。逆转录成 cDNA 后,进行定量分析,以每个样本中的 β -actin 作为内参,反应条件为 95℃预变性 2 min,然后 94℃变性 30 s,目的基因 Tip30 60℃退火 30 s,内参 β -actin 55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,总共 40 个循环。PCR 产物进行琼脂糖浓度为 1.5%的凝胶电泳,凝胶成像系统中使用紫外灯观察 DNA 条带,拍照并保存。每个样品实验重复 3 次,基因相对表达量计算分析使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法。

1.5 MTT 法检测细胞增殖

MTT 法检测细胞增殖使用 96 孔板,分别在过表达腺病毒转染后继续培养 12、24、36、48、60、72 h,每个时间点均设置 4 个复孔,培养结束后每孔添加 20 μ L MTT 溶液继续培养 4 h,用移液器移弃 MTT,加 DMSO 后用酶标仪测定波长在 490 nm 处的吸光度值(OD_{490 nm}),未接种细胞的孔加入

RPMI-1640 培养基作为调零孔。细胞相对生长率等于每组细胞各个时间点的吸光值与第 12 h 吸光值的比值。

1.6 流式细胞术分析细胞凋亡

细胞转染后 48 h 收集包括上清及贴壁的全部细胞, PBS 悬浮漂洗 2 次, 每个样品加入 5 μL Annexin V-FITC 按照试剂盒说明书操作进行染色, 避光反应 0.5 h, 加入 10 μL PI 后 1 h 内完成流式细胞仪上机检测。

1.7 Western blotting 分析蛋白表达

Tip30 基因过表达腺病毒转染后 48 h 收集每组 AGS 细胞, 加细胞裂解液裂解完全, 收集上清, 测定样品蛋白浓度, 加上样缓冲液后高温变性, 样品行 SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h 后孵育一抗, 4℃ 摇床孵育过夜, 其中 Tip30、Bax、Bcl-2 抗体稀释比例为 1:1 000, GAPDH 稀释比例为 1:2 000, 一抗孵育完成后进行二抗常温孵育 2 h, 二抗稀释比例为 1:4 000; 二抗孵育完成后暗房显影、定影, 胶片扫描后蛋白条带用 Image J 软件进行灰度检测与半定量分析。

1.8 划痕试验考察癌细胞迁移能力

人胃癌细胞 AGS 过表达腺病毒转染后 12 h, 移弃 RPMI-1640 培养基, 用无菌移液器枪头在细胞培养 6 孔板底部划出 1 条痕迹, 用 PBS 清洗 2 次, 去除漂浮细胞后添加含 10% 血清的 RPMI-1640 培养基, 在 CO₂ 细胞孵育箱中继续培养 24 h, 显微镜下计数同一视野中裂痕上的细胞个数, 每个视野计数 3 次, 求平均值。

1.9 统计分析

统计分析采用 SPSS 20.0 软件, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 检验水准为 0.05。

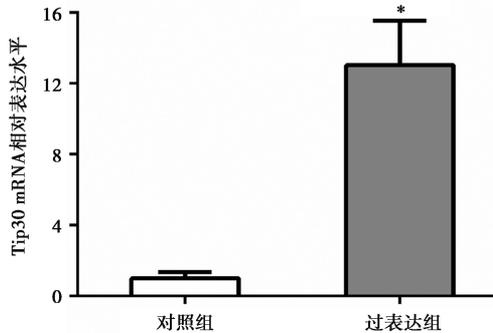
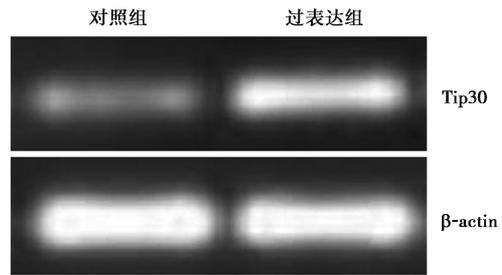
2 结果

2.1 Tip30 过表达效果

与对照组比较, 过表达组 AGS 细胞转染后 48 h, Tip30 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$) (图 1), 过表达组 Tip30 蛋白表达也相应明显增多, 见图 2。

2.2 Tip30 基因表达对细胞增殖的影响

结果如图 3 所示, 与对照组比较, 过表达组 AGS 细胞转染 60 h、72 h 后, 细胞数目显著减少 ($P < 0.05$), 其它时间点两组间细胞数量比较差异不具有统计学意义。



* $P < 0.05$ 表示与对照组比较差异具有统计学意义

图 1 RT-PCR 分析 AGS 细胞中 Tip30 mRNA 的表达水平
Figure 1 The analysis of Tip30 mRNA expression level in AGS cells by RT-PCR

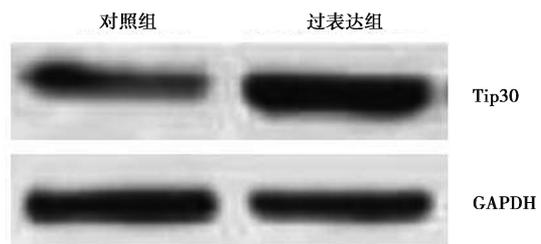
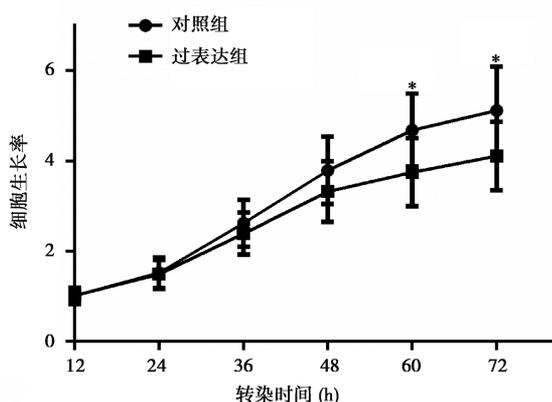


图 2 Western blotting 检测 AGS 细胞中 Tip30 蛋白表达
Figure 2 The protein expression level of Tip30 in AGS cells was examined by western blotting

2.3 Tip30 基因表达对胃癌细胞 AGS 凋亡的作用及相关分子机制

过表达组 AGS 细胞转染后 48 h 细胞凋亡率为 $(14.28 \pm 3.16)\%$, 明显大于对照组细胞凋亡率 $(2.04 \pm 0.37)\%$, 组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

Western blotting 检测凋亡相关蛋白结果显示, 与对照组比较, 过表达组 AGS 细胞中促进细胞凋亡分子 p53、Bax 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.05$), 抗凋亡分子 Bcl-2 蛋白表达水平则明显下降 ($P < 0.05$), 见图 5。



*P<0.05 表示与对照组比较差异具有统计学意义

图3 Tip30 过表达对 AGS 细胞生长的影响

Figure 3 The influence of Tip30 overexpression on cell growth of AGS

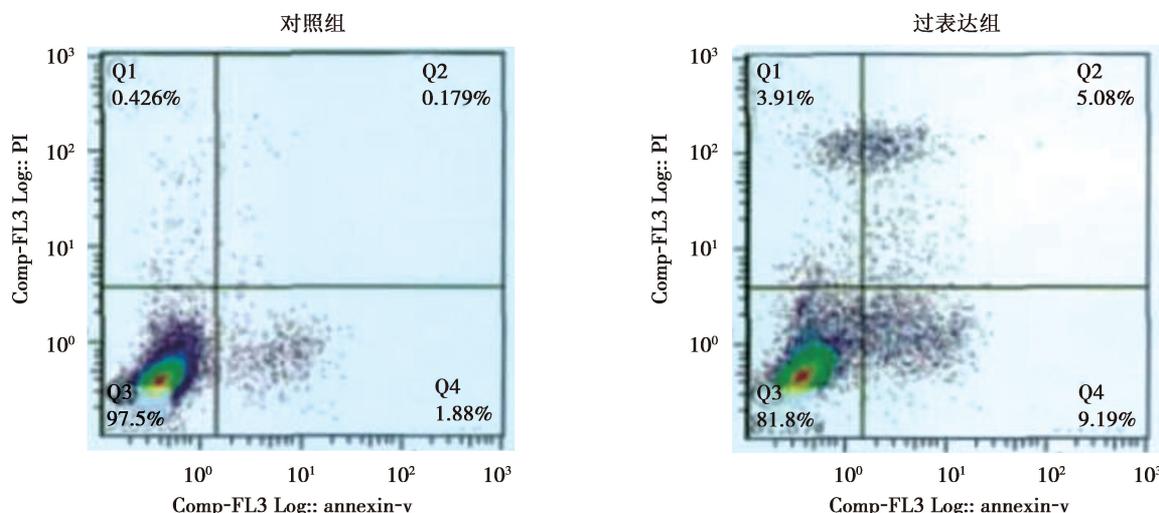


图4 Tip30 基因过表达对胃癌 AGS 细胞凋亡率的影响

Figure 4 The effects of Tip30 gene overexpression on cell apoptosis rate in gastric cancer AGS cells

2.4 Tip30 基因表达对胃癌细胞 AGS 迁移性能的影响

过表达组在 24 h 裂痕上迁移的细胞数目为 (91±13) 个,对照组迁移的细胞数目为 (178±29) 个,两组间比较差异具有统计学意义 (P<0.05),说明过表达组细胞迁移能力弱于对照组。

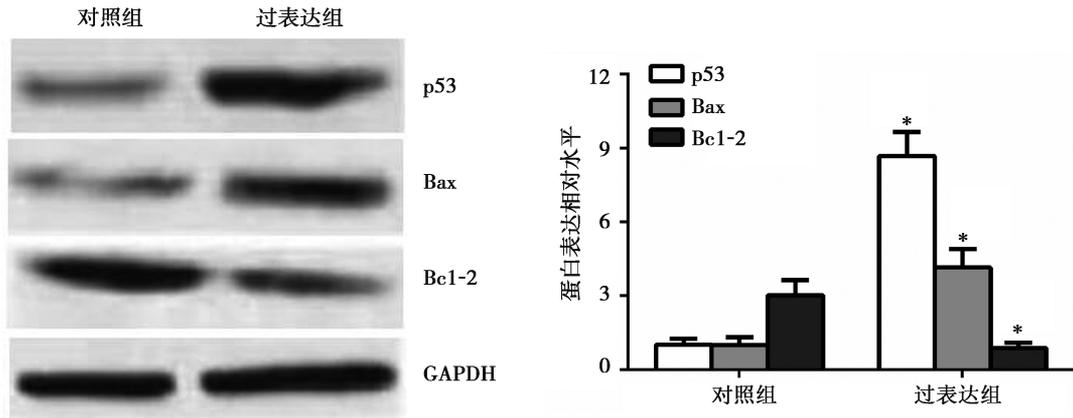
3 讨论

肿瘤抑制基因 Tip30 与多种肿瘤的发生及转移具有一定的关系,如肝癌、食管鳞状上皮癌、肺癌及喉鳞状细胞癌等^[2-3, 7]。Tip30 在胰腺导管腺癌组织中表达缺失率为 49.1%,正常组织中的缺失率为 0%^[4]。血清 Tip30 水平可作为卵巢癌、胆囊癌预后和诊断的分子标记^[8-9]。Tip30 低水平表

达与胰腺癌患者不良预后关系密切^[5]。Tip30 基因缺失可通过激活胞质和胞核内 EGFR 信号通路促进动物体内肺腺癌的生长^[10]。此外,Tip30 还与化疗药物敏感性增强有关^[11],如二甲双胍通过上调肝癌细胞 Tip30 基因表达抑制索拉非尼的促肝癌细胞转移的作用^[12]。

本研究结果显示,人胃癌细胞 AGS 中 Tip30 基因过表达可显著抑制细胞增殖,转染后 60 h 细胞数目明显减少,Tip30 基因过表达促进胃癌细胞凋亡,还使体外迁移的细胞数目明显减少,抑制肿瘤细胞的迁移能力。多项研究报道 Tip30 基因表达与肿瘤细胞增殖、转移等关系密切。Tip30 基因过表

达可抑制胶质瘤细胞的生长和体外侵袭能力^[13]。microRNA-10b 通过抑制非小细胞肺癌和胰腺癌细胞 Tip30 基因表达增强肿瘤细胞的增殖和侵袭性能^[14-15]。TGF-β1 可通过沉默食管癌细胞 Tip30 基因表达促进肿瘤细胞的转移^[16]。过表达 Tip30 基因的 HepG2 肝癌细胞明显降低了基质金属蛋白酶-2/9mRNA 表达和蛋白的翻译,肝癌细胞的增殖、锚定非依赖性生长及肝癌细胞迁移能力均明显受到抑制^[17]。抑制胰腺癌细胞系 Capan-2 细胞内源性 Tip30 表达可增强肿瘤细胞增殖克隆形成和成瘤能力,使另一胰腺癌细胞系 PANC-1 细胞中 Tip30 过表达,则抑制肿瘤细胞增殖克隆形成和成瘤能



*P<0.05 表示与对照组比较差异具有统计学意义

图5 Tip30 基因过表达对胃癌 AGS 细胞中相关凋亡蛋白表达的作用

Figure 5 The effects of Tip30 gene overexpression on relevant apoptotic protein expression levels in gastric cancer AGS cells

力^[4]。上述结果为本研究结论提供一定支持。

Tip30 基因表达可促进肿瘤细胞凋亡、延迟肿瘤细胞周期进展及抑制细胞转移能力^[18]。研究表明, Tip30 可通过诱导抑癌基因 p53、促凋亡因子 Bax 表达, 抑制 Bcl-x1 表达促进肿瘤细胞的凋亡^[19]。若 Tip30 发生基因缺失或突变, 将下调 p53 基因的表达, 抑癌效应减弱, 肿瘤细胞增殖活性相应增强, 生长速度加快^[18]。本研究结果表明, Tip30 过表达抑制胃癌细胞生长, 促进其凋亡, 与上调 p53、Bax 表达, 下调 Bcl-2 蛋白表达相关, 与以上文献报道结果一致。腺病毒载体表达 Tip30 基因可通过 p53 基因依赖性或非依赖性途径抑制胃癌细胞株和骨肉瘤细胞株的增殖生长, 是一种潜在的肿瘤生物治疗手段^[20]。综上所述, 人胃癌细胞 AGS 中 Tip30 基因过表达可显著抑制肿瘤细胞的增殖活性及体外迁移能力, 并促进凋亡, 作用机制与上调 p53 基因表达有关。

参考文献

[1] Yu X, Li Z, Wu WK. TIP30: A Novel Tumor-Suppressor Gene[J]. *Oncol Res*, 2015, 22(5-6): 339-348.

[2] Zhu M, Yin F, Fan X, et al. Decreased TIP30 promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition and tumor-initiating properties in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2015, 34(11): 1420-1431.

[3] Chen J, Zhu C, Zhu M, et al. Clinicopathologic significance and survival of TIP30 expression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Med*,

2015, 8(4): 6024-6031.

[4] 郭世伟, 李先鹏, 吴义峰, 等. TIP30 在胰腺中的表达及对胰腺癌细胞生物学特性的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(9): 1705-1709.

[5] Guo S, Jing W, Hu X, et al. Decreased TIP30 expression predicts poor prognosis in pancreatic cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(6): 1369-1378.

[6] 程智勇, 杨雁鸿, 李桃, 等. Tip30 和 p53 蛋白在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *疑难病杂志*, 2016, 15(8): 813-816.

[7] Dong W, Shen R, Cheng S. Reduction of TIP30 in esophageal squamous cell carcinoma cells involves promoter methylation and microRNA-10b [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453(4): 772-777.

[8] Kumtepe Y, Halici Z, Sengul O, et al. High serum HTATIP2/TIP30 level in serous ovarian cancer as prognostic or diagnostic marker [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18: 18.

[9] Liu Z, Yang Z, Jiang S, et al. MCM2 and TIP30 are prognostic markers in squamous cell/adenosquamous carcinoma and adenocarcinoma of the gallbladder [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4581-4592.

[10] Li A, Zhang C, Gao S, et al. TIP30 loss enhances cytoplasmic and nuclear EGFR signaling and promotes lung adenocarcinogenesis in mice [J]. *Oncogene*, 2013, 32(18): 2273-2281.

[11] Zhu M, Yin F, Yang L, et al. Contribution of TIP30 to chemoresistance in laryngeal carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1468.

(下转第 93 页)

· 论 著 ·

冬凌草甲素抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖诱导 DNA 损伤相关蛋白表达的实验研究

余韬¹ 魏凤香^{1,2*} 温丽娟¹

[摘要] **目的** 探索冬凌草甲素对胃癌细胞增殖及 DNA 损伤相关蛋白表达的影响。**方法** MTT 法检测冬凌草甲素对胃癌细胞的增殖活性的影响; Western blot 检测 H2AX、 γ H2AX、ATM、phospho-ATM、phospho-P53、P53、phospho-CHK2 等 DNA 损伤相关蛋白表达的变化; 免疫荧光检测冬凌草甲素对 phospho-ATM 和 γ -H2AX 焦点形成的影响。**结果** MTT 结果显示冬凌草甲素能够抑制胃癌细胞增殖, 具有剂量依赖关系; Western blot 结果显示 γ H2AX、phospho-ATM、phospho-P53、P53、phospho-CHK2 蛋白水平呈剂量依赖性增高; 免疫荧光结果发现 phospho-ATM、 γ H2AX 焦点随着药物浓度增大而增多。**结论** 冬凌草甲素可以抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖, 诱导 DNA 损伤及相关蛋白表达, 且具有剂量依赖性, 但 DNA 损伤信号通路详细机制有待进一步研究。

[关键词] 冬凌草甲素; DNA 损伤; γ H2AX; phospho-ATM

The effect of oridonin on proliferation and expression of DNA damage-related proteins in gastric cancer cells

YU Tao¹, WEI Fengxiang^{1,2*}, WEN Lijuan¹

(1. Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, China, 563000; 2. Central Laboratory, Maternal and child health care hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong, China, 518172)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of oridonin on proliferation and DNA damage-related protein expression in gastric cancer cells. **Methods** The effect of oridonin on the proliferative activity of SGC-7901 gastric cancer cells was assessed with the MTT assay. The expressions of γ H2AX, H2AX, ATM, phospho-ATM, phospho-P53, P53 and phospho-CHK2 were detected using western blot. The effect of oridonin on the phosphorylation of ATM and the formation of γ H2AX foci was examined with immunofluorescence. **Results** The MTT assay revealed that oridonin can inhibit SGC-7901 cell proliferation in a dose-dependent manner. Exposure of SGC-7901 cells to oridonin in varying concentrations results in a significant dose-dependent increase in the SGC-7901 cell inhibition rate. Western blot analysis showed that SGC-7901 cells exposed to oridonin exhibited a dose-dependent increase in the level of γ H2AX, phospho-ATM, phospho-CHK2, phospho-P53 and P53 proteins. Additionally, the higher doses of oridonin increase γ H2AX and phospho-ATM foci formation. **Conclusion** Oridonin can inhibit the proliferation of SGC-7901 gastric cancer cells and induce DNA damage and the expression of related proteins in a dose-dependent manner. Higher concentrations of oridonin lead to the increase in expression of several DNA damage-related proteins and their phosphorylation. Further investigation of the underlying molecular mechanisms of the DNA damage signaling is necessary.

[KEY WORDS] Oridonin; DNA damage; γ H2AX; phospho-ATM

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2014A030313749)

作者单位: 1. 遵义医学院, 贵州, 遵义 563000

2. 深圳市龙岗区妇幼保健院中心实验室, 广东, 深圳 518172

*通讯作者: 魏凤香, E-mail: haowei727499@163.com

胃癌是我国常见恶性肿瘤之一,在我国各种消化道恶性肿瘤中发病率居首位^[1],且进展快、生存期短、预后较差。然而,目前治疗效果仍然不理想,几乎没有取得整体生存效率的提高。因此,寻求最有效的治疗方法是非常必要的。冬凌草甲素是一种二萜类化合物,能够抑制多种细胞增殖和诱导细胞凋亡,研究表明冬凌草甲素能对乳腺癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌、肝癌、宫颈癌细胞等多种肿瘤^[2-8]细胞有抑制或杀伤作用,但冬凌草甲素对细胞的生长抑制作用方式尚不清楚。DNA损伤修复受共济失调毛细血管突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)调控,ATM还能磷酸化其底物 p53 和细胞周期检测点激酶 2 (Checkpoint kinase 2, CHK2)诱导细胞周期发生阻滞^[9-10]。在本项研究中,以胃癌 SGC-7901 细胞为研究对象,对冬凌草甲素在胃癌 SGC-7901 细胞中 DNA 损伤的影响和可能的机制进行了分析。

1 材料与方法

1.1 试剂

胃癌细胞 SGC-7901 由佳木斯大学基础医学院提供;冬凌草甲素(纯度为 98%)、四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 sigma 公司;RPMI-1640 培养基来自美国 Thermo 公司;胎牛血清购自中国杭州四季青公司;兔抗人 H2AX 和 γ H2AX、鼠抗人 ATM 和 phospho-ATM(S1981)均购于美国 Cell Signaling 公司;RNase 和碘化丙啶(propidine iodide, PI)溶液均购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 四氮唑蓝(MTT)法分析细胞增殖

常规胰酶消化细胞,取对数期胃癌 SGC-7901 细胞接种于 96 孔板中,混匀后于 5%二氧化碳、37°C 培养箱中培养,24 h 后,用不同浓度冬凌草甲素(10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,同时设置对照组(细胞、培养基、0.05% DMSO,不加药物),空白组(没有细胞,加培养基、DMSO),每组设 6 个复孔,常规培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 100 μL ,4 h 后,吸弃各孔液体,每孔加入 DMSO 140 μL ,于微孔板快速振荡器震荡 10 min。于酶标仪 570 nm 检测细胞吸光度(OD 值),确定药物对细胞生长的抑制率。细胞抑制率(%)=(A 对照组-A 实验组)/(A 对照组-A 空白组) \times 100%。

1.2.2 Western blot 检测相关蛋白

不同浓度的冬凌草甲素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 24 h 后,取出 6 孔板置于冰上,吸弃培养液,冰 PBS 处理 2 次,加入细胞裂解液,在冰上裂解 30 min 后,收集蛋白于 EP 管后,利用考马斯亮蓝法(波长 595 nm)测定蛋白浓度,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶电泳后,进行免疫印迹,将蛋白转移醋酸纤维素膜(NC)上,浸没于 5%牛血清白蛋白液封闭 1 h,然后用一抗,4°C 孵育过夜。一抗孵育完成后, TBST 洗膜 4 次,每次 10 min;二抗室温下孵育 1 h,孵育完后用 PBST 洗膜 4 次,每次 10 min。然后用 ECL 发光液显色曝光, β -actin 作为内参蛋白。

1.2.3 免疫荧光检测 γ -H2AX、phospho-ATM 焦点

调整细胞浓度 $1\times 10^5/\text{mL}$,接种于 6 孔板中,不同浓度冬凌草甲素(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,孵育 24 h 后,冰 PBS 洗 3 次,4%聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次、5 min/次;室温下用 0.3% Triton X-100 对胃癌 SGC-7901 细胞通透处理 30 min, PBS 轻轻漂洗 3 次;Blocking buffer 200 μL 室温封闭 1 h;1:50 一抗 4°C 孵育过夜;荧光二抗孵育 1 h 后,0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 室温避光孵育 10 min 后,冷风吹干,加入抗淬灭剂,用荧光显微镜计数,每张玻片至少 100 个细胞,然后观察荧光焦点,采集图像,每组实验重复 3 次。

1.3 统计分析

应用 SPSS 10.0 软件进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析、线性回归和相关分析的方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖变化

不同浓度冬凌草甲素(10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$)均可抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长,且随时间延长及药物浓度的增加,作用逐渐增强,呈时间剂量依赖性,见表 1,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Western Blot 印迹检测 DNA 损伤相关蛋白表达

不同浓度的冬凌草甲素(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, phospho-ATM、 γ H2AX、phospho-P53、P53、phospho-CHK2 蛋白水平随着药物浓度的增加而增加,见图 1。

表1 不同浓度冬凌草甲素对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Oridonin's inhibition rate against SGC-7901 gastric cancer cells by MTT assays ($\bar{x} \pm s, \%$)

时间(h)/浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	30	40	50
12	0	13.6 \pm 2.15	23.4 \pm 2.07	67.9 \pm 2.19	93.2 \pm 2.04	94.5 \pm 2.09
24	0	15.9 \pm 2.12	26.1 \pm 2.01	69.1 \pm 2.20	93.8 \pm 2.03	95 \pm 2.02

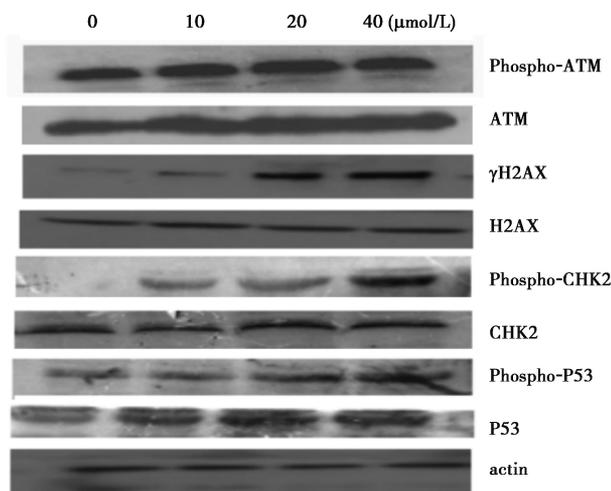


图1 Western Blot 印迹检测 DNA 损伤相关蛋白表达
Figure 1 Expression of DNA damage related proteins by Western Blot

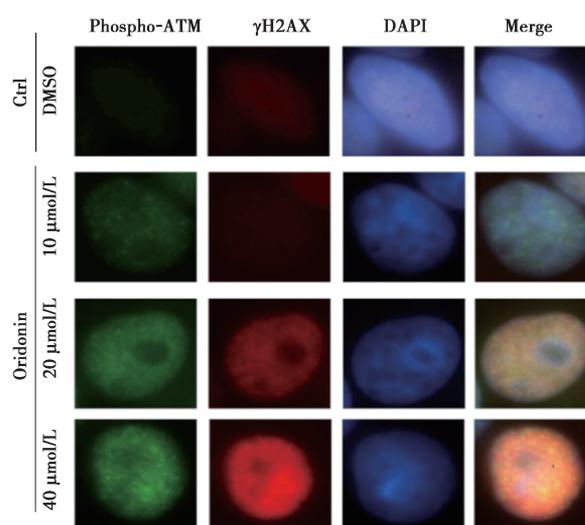


图2 冬凌草甲素对胃癌 SGC-7901 细胞 phospho-ATM 和 γ -H2AX 焦点形成的影响
Figure 2 Oridonin's effects on ATM phosphorylation and γ -H2AX foci formation

2.3 冬凌草甲素对 phospho-ATM 和 γ -H2AX 焦点形成的影响

DNA 双链断裂时, ATM 在断裂处活化为 phospho-ATM, 然后使 H2AX 磷酸化形成 γ H2AX 并结合到断裂点处, 本实验采用特异性荧光抗体(二抗), 抗体结合到断裂点后在荧光显微镜下显示为荧光焦点, 一个焦点代表一处 DNA 损伤, 焦点越多说明 DNA 断裂点越多, DNA 损伤越严重。本实验对照组没有荧光焦点的形成, 而实验组 phospho-ATM(绿色)和 γ -H2AX(红色)焦点随着冬凌草甲素浓度的增加而增加, 见图 2。

3 讨论

冬凌草甲素是一种二萜类化合物, 具有治疗咽喉肿痛、毒蛇咬伤、昆虫叮咬的作用, 还用于扁桃腺炎症, 在 20 世纪 70 年代早期被证明具有抗癌活性^[11], 研究证明冬凌草甲素能够直接抑制多种肿瘤细胞的增殖^[12], 其抗癌作用机制有以下几点: 1) 抑制肿瘤增殖; 2) 诱导肿瘤凋亡、自噬及坏

死^[13]。研究表明, 冬凌草甲素可抑制 SGC-7901 细胞增殖和诱导细胞凋亡, 并且阻滞于 G2/M 期, 其凋亡机制可能与降低 bcl-2 蛋白表达以及激活 Caspase-3 激活相关^[14-15], 邱冰等^[9]研究证明冬凌草甲素可以诱导胰腺癌 SW1900 细胞 DNA 损伤, 并且使 H2AX 蛋白发生磷酸化。

外部环境和生物体自身因素都会导致 DNA 分子的损伤, 受损的 DNA 可以激活细胞周期检查点, 并诱导细胞在细胞进入有丝分裂期之前修复受损的 DNA, 从而保持基因组的完整性^[16]。如果 DNA 的损伤或遗传信息的变化不能修正, 会导致细胞增殖失控, 最终导致癌变, 所以在进化过程中生物细胞所获得的修复 DNA 损伤的能力就显得十分重要, 也是生物能保持遗传稳定性之所在^[17]。DNA 损伤可诱导 H2AX 磷酸化和激活 ATM, 它们可以检测 DNA 的损伤, 并将信号传向下游目标蛋白并促进细胞周期阻滞, 完成 DNA 损伤修复或诱导细胞凋亡^[18-20]。

DNA 损伤可以诱导 H2AX(γ -H2AX 形式)的磷酸化,其已被认为是检测 DNA 损伤的金标准^[26]。在本研究中,免疫荧光及 Western Blot 结果显示 phospho-ATM、 γ -H2AX 表达量增加,证实冬凌草甲素能够诱导 DNA 损伤,并且随着药物浓度逐渐增加,DNA 损伤逐渐加重。Western Blot 显示 phospho-ATM、 γ -H2AX、phospho-CHEK2、phospho-P53、P53 蛋白水平呈增加趋势,表明冬凌草甲素通过激活“ATM-p53-CHEK2”通路诱导 G2/M 期阻滞,损伤后的 DNA 诱导 H2AX 蛋白的磷酸化,随后通过 ATM 的自磷酸化(S1981)激活 ATM^[22-26],在相关调节蛋白的参与下,将 DNA 损伤信号传递到下游蛋白并作用于效应蛋白,这导致细胞周期停滞,DNA 修复或者细胞凋亡。虽然本实验验证了 DNA 损伤相关蛋白水平变化,但本实验还存在一些限制,下游相关效应蛋白的表达没有完全通过 Western 印迹评估,这使得冬凌草甲素诱导的胃癌 SGC-7901 细胞 DNA 损伤的详细机制受到限制,需要进一步的实验来解决这些问题。总之,数据表明,冬凌草甲素可以通过激活 ATM 及 H2AX,使得 phospho-ATM 及 γ -H2AX 蛋白水平及荧光焦点随着药物浓度的增加而增加,DNA 损伤程度随着药物浓度的增加而加重。

参考文献

- [1] 郭蕾,白玉贤,魏孝礼,等. 局域进展期胃癌新辅助化疗研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(4):343-346.
- [2] Abdolmaleky SH, skandari M E, Li L, et al. Abstract A60: Epigenetic modifications of huntingtin related genes by dietary components for the prevention and treatment of breast cancer [J]. Cancer Prev Res, 2010, 3(1):A60.
- [3] Xiao X, He Z, Cao W, et al. Oridonin inhibits gefitinib-resistant lung cancer cells by suppressing EGFR/ERK/MMP-12 and CIP2A/Akt signaling pathways[J]. Int J Oncol, 2016, 48(6):2608-2618.
- [4] Ming M, Sun FY, Zhang W, et al. Therapeutic effect of oridonin on mice with prostate cancer [J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(2):184-187.
- [5] Gui Z, Li S, Liu X, et al. Oridonin alters the expression profiles of MicroRNAs in BxPC-3 human pancreatic cancer cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1):1-10.
- [6] Wang C, Jiang L, Wang S, et al. The antitumor activity of the novel compound jesridonin on human esophageal carcinoma cells [J]. Plos One, 2015, 10 (6) : e0130284.
- [7] Bohanon FJ, Wang X, Ding C, et al. Oridonin inhibits hepatic stellate cell proliferation and fibrogenesis [J]. J Surg Res, 2014, 190(1):55-63.
- [8] Zhang YH, Wu YL, Tashiro S, et al. Reactive oxygen species contribute to oridonin-induced apoptosis and autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(10):1266-1275.
- [9] Gerić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V. γ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2014, 105(10):13-21.
- [10] Wang H, Zhang X, Teng L, et al. DNA damage checkpoint recovery and cancer development [J]. Exp Cell Res, 2015, 334(2): 350-358.
- [11] Zhang W, Huang Q, Hua Z, et al. Oridonin: A promising anticancer drug from China [J]. Front Biol, 2010, 5(6):540-545.
- [12] 冯耀荣, 陈红淑. 冬凌草甲素抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(1):125-126.
- [13] Liu QQ, Chen K, Ye Q, et al. Oridonin inhibits pancreatic cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Cancer Cell Int, 2016, 16(1):1-8.
- [14] 刘家云, 顾琴龙, 杨忠印, 等. 冬凌草甲素诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(4):447-449.
- [15] 高成伟, 李文强. 冬凌草甲素通过抑制 COX-2 表达及 PGE2 合成降低人胃癌 HGC-27 细胞侵袭能力的研究 [J]. 临床急诊杂志, 2016, 17(8): 625-627.
- [16] 罗兰, 侯杰. 冬凌草甲素诱导人胰腺癌 SW1900 细胞 DNA 损伤及对 H2AX 蛋白表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(16):3881-3883.
- [17] Liu Y, Liu JH, Chai K, et al. Inhibition of c-Met promoted apoptosis, autophagy and loss of the mitochondrial transmembrane potential in oridonin-induced A549 lung cancer cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65(11):1622-1642.
- [18] Cao LL, Shen CC, Zhu WG. Histone modifications in DNA damage response [J]. Sci China Life Sci, 2016, 59(3):257-270.
- [19] Raza MU, Tufan T, Wang Y, et al. DNA Damage in Major Psychiatric Diseases [J]. Neurotox Res, 2016, 30(2):251-267.

- [20] de Boer HR, Llobet SG, van Vugt MA. Controlling the response to DNA damage by the APC/C-Cdh1 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(15):2985-2998.
- [21] 张博, 龚建平, 张伟, 等. 管电压对CT辐射致人外周血淋巴细胞DNA双链断裂的影响[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2016, 36(5):466-467.
- [22] Geyik S, Altunisik E, Neyal AM, et al. Oxidative stress and DNA damage in patients with migraine [J]. *J Headache Pain*, 2016, 17(1):10.
- [23] Douglas P, Zhong J, Ye R, et al. Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(6):1368-1381.
- [24] Wang J, Yin L, Zhang J, et al. The profiles of gamma-H2AX along with ATM/DNA-PKcs activation in the lymphocytes and granulocytes of rat and human blood exposed to gamma rays [J]. *Radiat Environ Biophys*, 2016, 55(3):359-370.
- [25] Hartlerode AJ, Morgan MJ, Wu Y, et al. Recruitment and activation of the ATM kinase in the absence of DNA - damage sensors [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(9):736-743.
- [26] Lilia E, Maria A, Ermolaeva, et al. DNA damage as a critical factor of stem cell aging and organ homeostasis [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 2(3):290-298.

(上接第77页)

- [17] 王露楠, 邓巍, 张瑞, 等. 乙型肝炎表面抗原血清标准物质的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(8):858-862.
- [18] 曹丽梅, 辛晓芳, 周诚, 等. 传染病体外诊断试剂标准物质研制技术要求的介绍[J]. *药物分析杂志*, 2011(11):2196-2197.
- [19] 孙楠, 黄杰, 曲守方, 等. 风疹病毒(RV)IgM抗体质控盘的建立[J]. *药物分析杂志*, 2013(1):1-6.
- [20] 徐超, 黄杰, 曲守方, 等. 人巨细胞病毒IgG抗体质控盘的建立[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 4(5):308-313.
- [21] 叶子弘, 赵煦泓, 邹克琴, 等. 生物标准物质研究简析[J]. *中国计量*, 2009(4):67-69.
- [22] 王玉梅, 李尔华, 曾灵凤, 等. 人腺原体核酸检测试剂盒国家参考品的制备[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(8):1042-1047.
- [23] 黄杰, 王菲菲, 徐超, 等. 人乳头瘤病毒全基因组基因分型国家参考品在评价人乳头瘤病毒核酸检测试剂中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2013(12):2043-2046.
- [24] Zhan S, Li J, Xu R, et al. Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(8):2571-2576.

荧光原位杂交技术检测肺癌 *ROS1* 易位病例临床病理特点

陈敏 刘晓羽 吕丽霞 杨洁亮 王威亚*

[摘要] 目的 总结 *ROS1* (*c-ros oncogene1*) 易位病例分子病理特点及治疗情况;探讨荧光原位杂交 (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) 技术在肺癌 *ROS1* 基因检测中的价值。方法 采用荧光原位杂交方法检测 613 例肺癌患者 *ROS1* 基因。*ROS1* 易位样本行手工 *ROS1* 免疫组化 (IHC)、ALK Ventana 全自动免疫组化及 *EGFR* 突变检测。结果 采用 *ROS1* FISH 法检出 19 例阳性病例,检出率为 3.1% (19/613)。阳性细胞平均比例为 60%,范围 35% ~ 78%。阳性病例显示两种信号模式,其中 63.2% (12/19) 为经典红绿分离,36.8% (7/19) 为单独绿色。19 例阳性病例 *ROS1* 蛋白表达为:1 例 (5%) 0+, 2 例 (11%) 1+, 7 例 (37%) 2+, 9 例 (47%) 3+。阳性病例均无 *ALK* 基因易位,除 1 例同时具 *EGFR* 19 外显子突变外,其余病例均为 *EGFR* 野生型。*ROS1* 易位患者年龄略小;女性、非吸烟患者比例较高;大多为晚期病人。组织学类型以实体、腺泡及乳头型腺癌为主。易位病例中,3 例患者死亡,7 例患者接受克唑替尼治疗。结论 *ROS1* 易位更易发生在年轻、女性、不吸烟的腺癌患者中。FISH 方法可有效地检测肺癌 *ROS1* 基因易位,对确诊 *ROS1* 阳性肺癌具有重要意义。

[关键词] 非小细胞肺癌 (NSCLC); *ROS1* 易位; 荧光原位杂交 (FISH)

Detection of *ROS1* gene rearrangement by FISH in lung cancer and analysis of its clinicopathological features

CHEN Min, LIU Xiaoyu, LV Lixia, YANG Jieliang, WANG Weiya*

(Department of Pathology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China, 610041)

[ABSTRACT] Objective To analyze the molecular, pathological, and therapeutic features of *ROS1*-translocation positive lung cancer cases, and to investigate the value of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in screening for and confirming the *ROS1* translocation. Methods In this study, *ROS1*-translocation detection was performed in 613 cases with FISH. For *ROS1*-FISH positive samples, manual *ROS1* immunohistochemistry (IHC), ALK IHC using a Ventana auto-stainer and *EGFR* mutation status were analyzed. Results 19 *ROS1*-translocation positive cases were detected by FISH and with a positive incidence of 3.1%. The average percentage of positive tumor cells was 60%, ranging from 35% to 78%. Among these positive cases, 63.2% (12/19) cases displayed classical break apart signals, whereas 36.8% (7/19) showed isolated green signals. In the *ROS1*-translocation group, the expression of *ROS1* protein are as follows: 1 case was not stained 0+ (5%); 2 cases had weak expression 1+ (11%); 7 cases had moderate expression 2+ (37%) and 9 cases had strong expression 3+ (47%). With the exception of one patient with an *EGFR* deletion mutation in exon19, *ROS1*-translocation positive adenocarcinomas in all patients revealed no alterations in *ALK* or *EGFR* genes. The *ROS1*-translocation positive patients were slightly younger than the negative patients, and were predominantly female, non-smokers. Most of the *ROS1*-translocation tumors showed solid, acinar and papillary patterns with a more

基金项目:国家自然科学基金(81302027)

作者单位:四川大学华西医院病理科,四川,成都 610041

*通讯作者:王威亚, E-mail: 151422303@qq.com

advanced clinical stage. Furthermore, the positive cases all survived except 3 patients, and 7 patients were treated with crizotinib. **Conclusion** *ROS1* rearrangement tends to occur in younger, female, non-smoking lung adenocarcinoma patients. To make a definite positive diagnosis of *ROS1*-translocation in lung cancer, FISH is a relevant detection method.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer (NSCLC); *ROS1* translocation; Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

肺癌是目前发病率和死亡率居首位的恶性肿瘤,是癌症死亡的主要原因之一,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占全部肺癌的85%,在NSCLC中,主要的类型为腺癌(adenocarcinoma, AC)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SqCC)。晚期NSCLC患者的预后极差,5年生存率<15%^[1]。近年来肺癌分子驱动基因的检测越来越受到关注,尤其是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶结构域突变、间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)易位以及*KRAS*突变等基因的检测。而*ROS1*基因易位是新近发现的NSCLC另一驱动基因^[2],*ROS1*易位是NSCLC中独立的分子亚型,在NSCLC中的发生率约为1%~2%^[3],在EGFR与ALK双阴性肺腺癌患者中的阳性比例更高^[4]。前期临床研究显示,ALK酪氨酸激酶抑制剂克唑替尼(Crizotinib)对*ROS1*易位的NSCLC有较好的活性^[5]。检测*ROS1*基因易位的方法有免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)和二代测序技术(next generation sequencing, NGS)。

目前国内对*ROS1*研究的报道中,综述较多,大宗的临床病例及靶向治疗方面的报道较少。因此,本研究采用FISH技术检测613例肺癌*ROS1*基因易位,总结易位阳性病例临床病理特点并探讨FISH技术在*ROS1*基因易位检测中的价值。

1 材料与方法

1.1 病例收集

2014年1月至2016年1月间四川大学华西医院病理科完成*ROS1*基因FISH检测的613例石蜡组织标本。记录所有患者的临床资料包括:性别、年龄、吸烟史、临床分期、治疗及随访情况。组织

病理分型和临床分期参考2015版世界卫生组织的肺癌组织学分类^[6]。

1.2 实验方法

1.2.1 IHC检测及评分标准

所有标本均为10%中性缓冲福尔马林溶液固定,石蜡包埋,切片厚度4 μm。*ROS1* IHC采用手工方法。*ROS1*抗体(D4D6)购自Cell Signaling Technology (Danvers, MA, 美国),并按1:100稀释。用pH=9.0的EDTA抗原修复液,修复条件为97℃,40 min。一抗孵育过夜,于一抗之后使用增强剂(Dako, 美国),室温孵育10 min,并用增强显色试剂盒检测。*ALK* IHC采用Ventana Benchmark XT全自动染色。

ROS1 IHC结果判读标准:0+(阴性):肿瘤细胞无明确着色;1+:>5%肿瘤细胞呈现微弱或模糊的胞浆着色;2+:>5%肿瘤细胞中等强度胞浆着色;3+:>5%肿瘤细胞胞浆强阳性着色^[6]。*ALK* IHC结果判读采用试剂盒推荐的二元化标准,即:在空白对照及阳性对照均正常的情况下,检测样本评价为阳性或者阴性。

1.2.2 FISH检测及判读标准

采用*ROS1*双色分离探针(Vysis LSI *ROS1* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular),将613例肺癌患者病理组织样本石蜡切片按照常规FISH实验步骤进行处理。杂交过程严格按照*ROS1*探针试剂盒说明书操作。

FISH结果判定:在荧光显微镜下观察结果,正常*ROS1*基因呈现红绿重合的黄色信号,当红绿信号分开且两信号之间距离大于2个信号点大小或出现单独的绿色信号时判定为该细胞*ROS1*易位基因阳性^[8]。选择染色明亮、细胞核完整且杂交信号强的肿瘤细胞进行计数,至少计数50个肿瘤细胞,阈值设定为15%。

1.2.3 EGFR突变PCR检测

采用DNeasy试剂盒(Qiagen, 德国)提取石蜡包埋组织中DNA。*EGFR*突变采用ARMS法检测

29位点突变(AmoyDx,艾德,中国厦门)。

1.3 统计学分析

研究数据采用SPSS 19.0进行分析处理。组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROS1易位患者临床病理特征

613例肺癌患者平均发病年龄为58.47岁,中位年龄59岁(20~94岁)。男:女=1.30:1。613例肺癌患者中共检出19例ROS1基因易位,阳性率

为3.1%,均为肺腺癌。阳性患者年龄略轻(平均56.1岁),与阴性组差异无统计学意义($P > 0.05$)。阳性患者中男性8例,女性11例,男:女=0.73:1,女性患者更多见($P > 0.05$)。19例中6人有吸烟史,13例无吸烟史($P > 0.05$)。阳性病例临床分期多为晚期,其中Ⅲ期8例、Ⅳ期9例,组织学亚型以实体与腺泡型为主(图1)。其分化程度为:低分化13例(68%)、低~中分化5例(26%)、中分化1例(5%),无高分化病例。ROS1易位患者临床病理特征见表1。

表1 ROS1阳性患者临床病理特征(n=19)

Table 1 The major clinicopathological features for ROS1 positive cases (n=19)

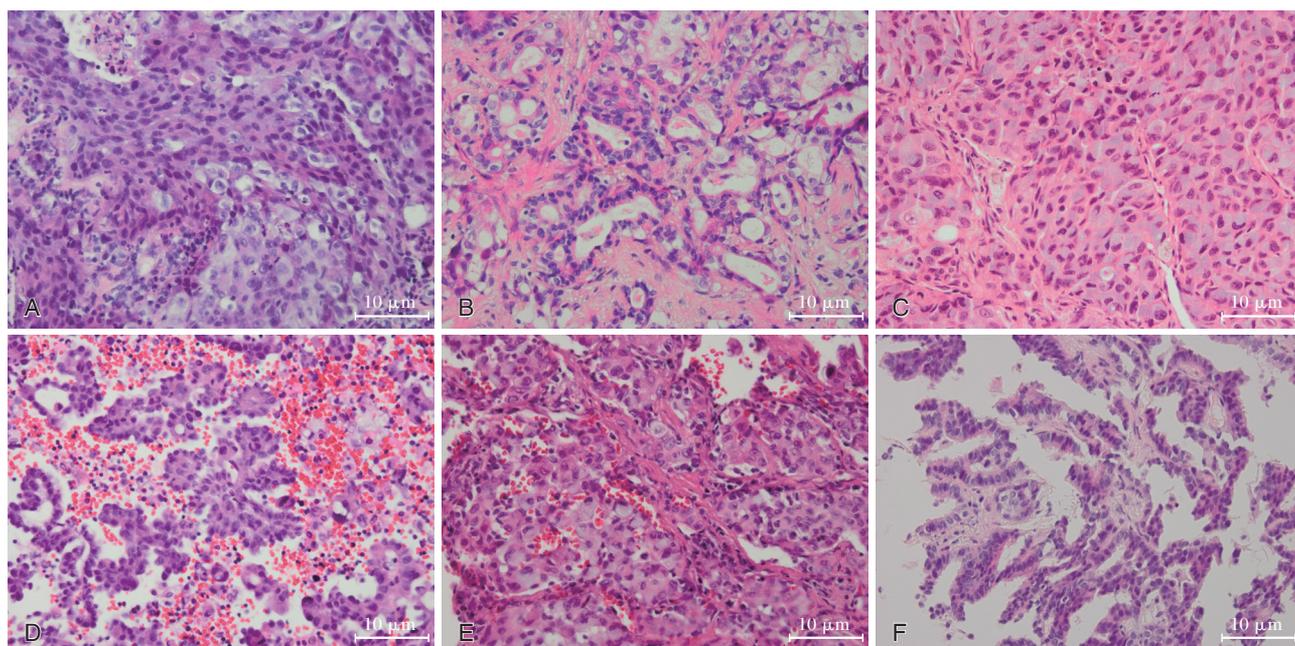
编号	性别	年龄	吸烟史	分期	病理类型	分化程度	转移情况	生存状况	ROS1 IHC	ROS1 FISH	ALK IHC	EGFR 突变
1	女	44	否	Ⅲ	微乳头	低	淋巴结	死亡	3+	+	阴性	野生
2	女	75	否	Ⅳ	实体+腺泡	低~中	骨	存活	2+	+	阴性	野生
3	男	79	是	Ⅱ	实体+印戒	低	否	存活	3+	+	阴性	野生
4	女	25	否	Ⅳ	实体+腺泡	低~中	脑	死亡	3+	+	阴性	野生
5	女	36	否	Ⅲ	实体	低	淋巴结	存活	3+	+	阴性	野生
6	女	52	否	Ⅳ	实体+腺泡	低~中	脑	存活	1+	+	阴性	野生
7	女	66	否	Ⅲ	实体+腺泡	低~中	淋巴结	存活	2+	+	阴性	野生
8	男	50	否	Ⅳ	腺泡	中	骨	存活	2+	+	阴性	野生
9	男	20	是	Ⅳ	实体	低	全身	死亡	2+	+	阴性	野生
10	男	68	是	Ⅲ	实体	低	双肺	存活	2+	+	阴性	野生
11	男	78	是	Ⅲ	微乳头	低	胸膜	存活	0+	+	阴性	野生
12	女	53	否	Ⅳ	实体	低	骨	存活	3+	+	阴性	野生
13	男	64	是	Ⅲ	腺泡	低	淋巴结	存活	3+	+	阴性	野生
14	男	75	否	Ⅲ	微乳头	低	胸膜	存活	1+	+	阴性	野生
15	女	56	否	Ⅲ	实体+腺泡	低~中	淋巴结	存活	2+	+	阴性	19突变
16	男	51	是	Ⅳ	实体	低	全身	存活	3+	+	阴性	野生
17	女	45	否	Ⅳ	腺泡	低	骨	存活	3+	+	阴性	野生
18	女	70	否	Ⅳ	实体	低	骨	存活	3+	+	阴性	野生
19	女	60	否	I B	实体+粘液	低	否	存活	2+	+	阴性	野生

2.2 ROS1易位患者IHC及分子检测结果

19例阳性病例ROS1蛋白表达为:1例(5%) 0+,2例(11%) 1+,7例(37%) 2+,9例(47%) 3+。ROS1易位病例阳性细胞平均比例为60%,范围为35%~78%。其中12例(63.16%)为经典红绿分离,7例(36.84%)为单独绿色(图2)。ROS1易位病例ALK Ventana染色均为阴性,1例同时具EGFR 19外显子突变,余18例均为EGFR野生型。

2.3 治疗情况

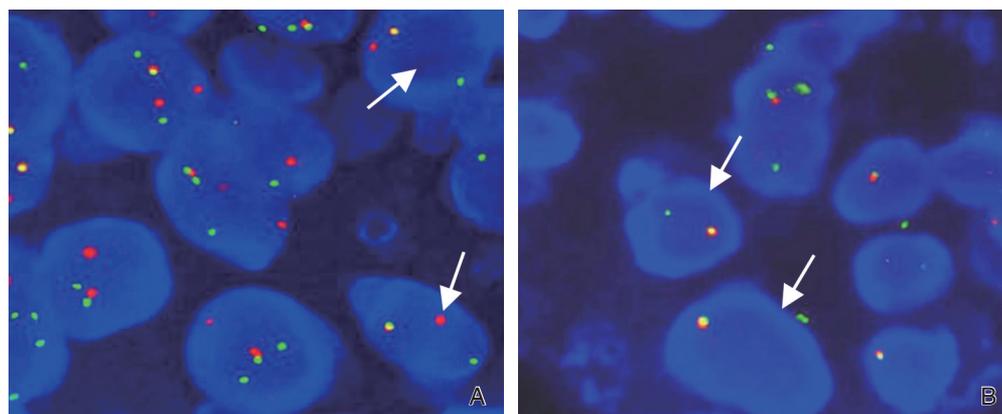
19例易位病例全部获得随访,截止到2016年6月,有3例病人死亡。1例为44岁女性患者(生存时间17个月),形态为微乳头状;1例为25岁女性患者(生存时间1个月),形态为实体和腺泡结构为主;另1例为20岁男性患者(生存时间3个月),形态为实体性。此3位病人平均生存时间为7个月。有7例患者行克唑替尼靶向治疗,一日两次,



A: 实体结构(HE染色, ×100倍); B: 腺泡结构(HE染色, ×100倍); C: 印戒细胞结构(HE染色, ×100倍); D: 微乳头结构(HE染色, ×100倍); E: 粘液结构(HE染色, ×100倍); F: 微乳头状结构(HE染色, ×100倍) 标尺代表 10 μm。

图1 ROS1 阳性病例形态学特点

Figure 1 Histologic features of ROS1 positive cases



A: 经典型红绿信号分离, 箭头示红绿信号分离阳性细胞; B: 孤立绿色信号模式, 箭头示 1 黄 1 绿阳性细胞

图2 荧光原位杂交检测 ROS1 易位信号模式(×1 000倍)

Figure 2 The ROS1 translocation signals by FISH(×1 000)

每次口服剂量 250 mg。治疗时间为 1~14 个月, 平均治疗时间为 8.3 个月。7 例患者均无疾病进展。1 例生物治疗; 1 例未行治疗。其中部分病人同时行放化疗。

3 讨论

肺癌因其高发病率及死亡率成为研究的热点, 其分子靶向治疗也引起极大的关注。ROS1 易位 NSCLC 为 NSCLC 中一个独特的分子亚型。

ROS1 基因定位于 6 号染色体, 属于受体酪氨酸激酶家族, 迄今已发现至少 9 种 ROS1 易位基因。本研究采用 FISH 法检测 613 例肺癌患者 ROS1 基因, 共检出 19 例阳性病例, 阳性率 3.1%, 比文献报道 NSCLC 中 ROS1 易位整体 1%~2% 的阳性率略高^[8], 可能与本研究的部分病例为 EGFR 和 ALK 基因双阴性有关, 从而间接提高了 ROS1 的检出率。本研究与武莎菲等^[9]报道的 EGRF/KRAS/ALK 三阴肺癌患者中 ROS1 易位 3.7% 的阳性率接近。

ROS1 易位阳性患者与阴性患者相比,年龄较小、女性非吸烟患者稍多、分化程度低、临床分期高,与文献报道相符^[10-11]。组织学类型集中在实体、腺泡和乳头状亚型,并伴有印戒细胞、粘液、筛状、贴壁等成分。同一病例各不同组织学亚型之间 *ROS1* 基因结果无差异,*ROS1* 基因表达无异质性。国内程弘夏^[12]与刘尽国^[13]分别报道了 53 例和 16 例 *ROS1* 易位病例,均发现 *ROS1* 易位在青年、非吸烟患者中较为多见。

研究认为 NSCLC 中驱动基因改变是相互排斥的。本研究检测到 1 例无吸烟史的女性患者存在 *ROS1* 易位与 *EGFR* 19 外显子突变。此病例 *ROS1* IHC 1+, *ROS1* FISH 检测为经典红绿分离信号。组织学类型以实体和腺泡为主,未行克唑替尼靶向治疗,截止随访,仍存活。目前有一些文献陆续报道 *ROS1* 易位与 *EGFR* 突变共存的现象。Rimkunas 等^[1]报道 9 例 *ROS1* 重排患者中,有 2 例患者同时存在 *EGFR* 不同位点突变。刘尽国等^[13]通过 PCR 方法从 369 例肺腺癌组织中检测到 3 例 *ROS1* 易位与 *EGFR* 突变共存病例。说明 *ROS1* 易位可与 *EGFR* 突变共存,但 *ROS1* 易位本身阳性率低,*ROS1* 易位与 *EGFR* 突变共存的病例更少。目前关于这类双阳性病例的临床病理及治疗情况有限,有待进一步研究。

ROS1 与 *ALK* 受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 结构域有 49% 的氨基酸同源序列。多种 *ALK* 抑制剂在体外均可抑制 *ROS1* 的活性。*ALK* 抑制剂克唑替尼通过抑制 *ROS1* 的磷酸化从而抑制 *ROS1* 的激酶活性。在本组 *ROS1* 阳性病例中,采用 IHC 检测 *ALK* 蛋白的表达,19 例病例全部为阴性,未检测到 *ROS1* 与 *ALK* 双阳病例。*ALK* 基因易位发生率在 3%~7%。在我国间变性淋巴瘤激酶 (*ALK*) 阳性非小细胞肺癌诊断专家共识中^[14],*ALK*-Ventana、*ALK*-FISH 和 *ALK*-PCR 3 种检测 *ALK* 易位的方法都得到了认可。全自动 *ALK* 免疫组织化学 (Ventana IHC) 与 Vysis *ALK* 双色分离探针检测间的符合率在 97%, Ventana IHC 的特异性能达到 100%,敏感性也在 95% 以上^[15]。

本研究中 7 例 *ROS1* 易位患者行克唑替尼靶向治疗,治疗时间为 1~14 个月,平均治疗时间为 8.3 个月,均无疾病进展。2014 年新英格兰杂

志报道 50 例 *ROS1* 阳性 NSCLC 患者行克唑替尼靶向治疗,其疗效优于 *ALK* 易位患者^[16]。因此如何准确有效地筛选出 *ROS1* 易位肺腺癌患者,让更多的患者从靶向治疗中获益就显得尤为重要。

检测 *ROS1* 基因易位有多种方法^[17],包括 FISH、PCR、IHC 和二代测序技术。PCR 技术对样本 RNA 质量要求较高,且不能检测未知的断裂点。有研究认为 IHC 快速、简便且价格低廉,可用于初步筛查 *ROS1* 基因易位^[18]。但在 *ROS1* 易位基因的 IHC 检测中,暂无统一的实验流程及判读标准,也未实行自动化操作。本研究中,1 例 *ROS1* 易位 FISH 阳性病例其 *ROS1* IHC 结果为阴性。此病例为胸水细胞块,可能与肿瘤细胞在保存、运输过程中样本质量或抗原丢失有关,提示 IHC 染色可能会出现少数病例漏诊的现象。近年 NGS 研究较多,而临床应用较少。本研究中 FISH 检测在各种类型的石蜡包埋组织样本中均取得成功,易位信号明确,易于判读。

本研究通过 FISH 技术检测 613 例肺癌石蜡包埋组织中 *ROS1* 基因易位,检出 19 例阳性病例,阳性率为 3.1%。*ROS1* 易位作为 NSCLC 中独立的分子亚型,其更易发生在年轻、女性、不吸烟的腺癌患者中。组织学类型以实体和腺泡状成分为主。*ROS1* 易位可与 *EGFR* 突变共存,本研究未检测到 *ROS1* 易位与 *ALK* 易位共存病例。FISH 方法可有效的检测肺癌 *ROS1* 基因易位。与 IHC 相比,FISH 检测 *ROS1* 基因易位特异性更高,从而为患者靶向治疗提供可靠的依据。

参考文献

- [1] Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer[J]. Cell, 2007, 131(6):1190-1203.
- [2] Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. *ROS1* rearrangements define a unique molecular class of lung cancers[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(8):863-870.
- [3] Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: *ROS1* and *RET* fusions[J]. Oncologist, 2013, 18(5):865-875.
- [4] Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: *ROS1* fusion proteins in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19: 4040-4045.

- [5] Xu LT, Zhao RJ, Zhu TN, et al. Clinical significance of ROS1 rearrangements in non-small cell lung cancer [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2013, 16(12):663-670.
- [6] Travis WD, Brambilla E, Burke, et al. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart[M]. Lyon: iarcpress, 2015:183-299.
- [7] Mescam-Mancini L, Lantuéjoul S, Moro-Sibilot D, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas [J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(2):168-173.
- [8] Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features [J]. *Lung Cancer*, 2014, 84(2):121-126.
- [9] Wu SF, Wang JJ, Zeng X, et al. Clinicopathological characteristics and outcomes of ROS1-rearranged patients with lung adenocarcinoma with out EGFR, KRAS mutations and ALK rearrangements [J]. *Thoracic Cancer*, 2015, 6(4):413-420.
- [10] Go H, Kim DW, Kim D, et al. Clinicopathologic analysis of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer and proposal of a diagnostic algorithm [J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(11):1445-1450.
- [11] Warth A, Muley T, Dienemann H, et al. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases [J]. *Histopathology*, 2014, 65(2): 187-194.
- [12] 程弘夏, 叶伦, 薛力泉. 荧光原位杂交法检测非小细胞肺癌患者 ROS1 基因易位及其与临床病理特征的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2014, 36(10): 751-754.
- [13] 刘尽国, 赵瑞英, 滕昊骅, 等. 肺腺癌 ROS1 融合基因的检测及临床病理特征 [J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(6): 390-394.
- [14] 张绪超, 陆舜, 张力, 等. 中国间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 阳性非小细胞肺癌诊断专家共识 (2013 版) [J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(6): 402-406.
- [15] Ying J, Guo L, Qiu T, et al. Diagnostic value of a novel fully automated immunohistochemistry assay for detection of ALK rearrangement in primary lung adenocarcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24 (10) : 2589-2593.
- [16] Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(21):1963-1971.
- [17] Shan L, Lian F, Guo L, et al. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR [J]. *Plos One*, 2015, 10(5):1-8.
- [18] Go H, Kim DW, Kim D, et al. Clinicopathologic analysis of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer and proposal of a diagnostic algorithm [J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(11): 1445-1450.

(上接第 82 页)

- [12] Guo Z, Cao M, You A, et al. Metformin inhibits the prometastatic effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma by upregulating the expression of TIP30 [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(4): 507-513.
- [13] Hu Y, Chen F, Liu F, et al. Overexpression of TIP30 inhibits the growth and invasion of glioma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 605-612.
- [14] Liu Y, Li M, Zhang G, et al. MicroRNA-10b overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18: 41.
- [15] Ouyang H, Gore J, Deitz S, et al. microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- β actions [J]. *Oncogene*, 2014, 33(38): 4664-4674.
- [16] Bu F, Liu X, Li J, et al. TGF-beta1 induces epigenetic silence of TIP30 to promote tumor metastasis in esophageal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2120-2133.
- [17] 李浩, 吴金术, 蒋波, 等. Tip30 基因表达对肝癌细胞侵袭转移能力的影响 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2014, 39(8): 775-783.
- [18] 陈锦章, 黄维, 阮健, 等. TIP30 基因表达对吉非替尼体外抑瘤作用的影响研究 [J]. *河北医学*, 2014, 20(3): 358-361.
- [19] 朱逸彪. 骨桥蛋白和 TIP30 与胃癌关系研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2013, 27(5): 423-425.
- [20] 张霞, 赵健, 李晓冬, 等. TIP30 基因腺病毒载体的构建及体内抑瘤作用 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(2): 85-88.

原发性肝癌表皮生长因子受体突变的研究

于森¹ 邱李辉¹ 熊伟¹ 苏慧娟¹ 叶绿^{2*}

【摘要】目的 对原发性肝癌患者 *EGFR* 基因进行检测,分析 *EGFR* 基因突变与原发性肝癌及患者年龄组成的关系。**方法** 对 2 507 例确诊原发性肝癌的石蜡包埋组织样本用 PCR 扩增法和双向测序法检测 *EGFR* 基因突变状态。**结果** 2 507 例患者仅检测出 620 例(24.74%)*EGFR* 基因 20 外显子同义突变 Q787Q(2361G>A)和 263 例(10.49%)19 内含子点突变(2284-60T>C);*EGFR* 基因突变与患者性别、病理类型无关($P>0.05$),与患者的年龄段组成明显相关($P<0.05$),且基于年龄段的分布,20 外显子突变与 19 内含子突变呈显著正相关($P<0.05$)。**结论** 本研究中未发现 *EGFR* 基因热点突变。同义突变位点 Q787Q 尚存在进一步需要被证实的功能。20 外显子突变和 19 内含子突变与患者年龄分布有明显相关性,可为原发性肝癌患者提供更具体的个体化治疗方案。

【关键词】 原发性肝癌;表皮生长因子受体;基因突变

Analysis of *EGFR* mutation status in primary hepatocarcinoma patients

YU Miao¹, QIU Lihui¹, XIONG Wei¹, SU Huijuan¹, YE Lv^{2*}

(1. Shanghai DaAn Center for Medical Laboratory, Shanghai, China, 200120; 2. GuangZhou DaAn Clinical Laboratory Center Pathology Department, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] Objective To detect the *EGFR* mutations (exon18, 19, 20, 21) in primary hepatocarcinoma (PHC) tissue, and to study the correlation between the *EGFR* mutations and the ages and clinical features of the patients with the aim of supporting the development of new molecular targeting therapy for PHC patients. **Methods** Paraffin embedded tissues from 2 507 cases were collected, and *EGFR* mutations were detected using PCR and bidirectional sequencing. **Results** Out of the 2 507 cases of PHC, there were 620 PHC patients carrying a silent mutation, which showed a G-to-A transition at nucleotide 2361 in exon 20 of the gene. Furthermore, 263 PHC patients (10.49%) were found to be carrying the mutation 2284-60T>C in intron 19. The *EGFR* mutations 2361G>C and 2284-60T>C were not related to sex or pathology ($P>0.05$), but were related to the age of the PHC patients ($P<0.05$). In addition, a significant positive correlation was found between the mutation rate of exon 20 and intron 19 ($P<0.05$) based on the ages of the PHC patients. **Conclusion** There were no hot mutations found in the *EGFR* gene. The features of the *EGFR* 2361G>C mutation need to be analyzed further. Investigation into the characteristics of exon 20 and intron 19 may provide avenues for more individualized therapy in PHC.

[KEY WORDS] Primary hepatocarcinoma (PHC); Epidermal growth factor receptor (*EGFR*); Gene mutation

作者单位:1. 上海达安医学检验所有限公司,上海 200120

2. 广州达安临床检验中心病理事业部,广东,广州 510080

*通讯作者:叶绿, E-mail: yelv@yunkanghealth.com

原发性肝癌(primary hepatocarcinoma, PHC)是指源于肝细胞和肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,包括胆管囊腺癌、肝细胞-胆管细胞混合癌及一些少见类型,其中常见类型为肝细胞癌和肝内胆管癌,是我国最常见的恶性肿瘤之一。最新统计结果显示,我国肝癌新增病例占全世界总数的50.5%,死亡病例占全世界总数的51.3%^[1]。原发性肝癌是一种多条染色体上多个基因变化的复合基因病,基因改变的累加效应直接促成了肝癌的发生^[2]。其中许多关键基因(*ras*、*p53*、*BRCA2*等)的突变、缺失或过表达均与肝癌的发生高度相关^[3]。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种受体型酪氨酸激酶,是相对分子质量为 170×10^3 的跨膜糖蛋白^[4]。研究表明,在多种恶性肿瘤中均检测到EGFR过度表达或突变,如非小型细胞肺癌、头颈部癌、卵巢癌、宫颈癌、食管癌等^[5-8]。近年来研究表明,肝癌中EGF及EGFR也存在过度表达或突变,这可能与肝癌的形成、侵袭性生长、临床特征有密切关联,并且在低分化的肝癌患者中,EGFR过表达影响到患者预后的恢复^[9-11]。我国有学者认为EGFR和EGFRvIII高表达可能是肝细胞癌变的重要因素,可以作为评价肝癌转移、复发的参考指标^[12-14];但是有关EGFR与我国原发性肝癌人群关系的研究国内鲜有报道,且不全面。本研究拟对2 507例原发性肝癌患者EGFR基因的突变情况进行检测,初步分析EGFR基因突变情况与患者临床特征之间的关系,并探讨EGFR基因突变与患者年龄组成的关系,为原发性肝癌的分子靶向治疗提供基础性参考依据和临床指导,希望找到一条原发性肝癌分子靶向治疗的新途径。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2013年3月至2014年7月来自全国各医院病理科经手术切除的原发性肝癌石蜡包埋组织样本2 507例,显微镜下证实肿瘤细胞完整。其中男性2 153例,女性354例;年龄19~87岁,中位年龄52岁;病理类型:2 307例肝细胞癌,179例肝内胆管癌,21例肝胆混合癌。病理学分类按照WHO标准^[1]。所有患者手术前均未接受过放疗化疗及靶向药物治疗。样本均在RNAlater(QIAGEN,德

国)的冻存管中4℃保存,并于2个工作日内送达实验室进行检测。

1.2 提取基因组DNA

应用石蜡切片DNA提取试剂盒(FFPE gDNA miniPREP KIT, BIOMIGA, 美国)进行DNA提取。用琼脂糖凝胶电泳检测质量,经紫外分光光度法测定浓度与纯度并稀释,要求A₂₆₀/A₂₈₀大于1.8且小于2.0,原液浓度为200 ng/μL,置于-20℃冰箱中保存。基因组DNA工作液稀释至浓度60 ng/μL,置于4℃保存。

1.3 聚合酶链反应PCR扩增和基因测序

采用PCR扩增法和测序法分析原发性肝癌患者石蜡包埋组织中EGFR基因突变情况。根据NCBI发布的EGFR全基因组序列(NM-005228)和mRNA序列,用Oligo软件在EGFR第18、19、20、21外显子两侧各设计1对PCR引物。序列如下:

第18外显子:上游引物:5'-CAGGTGATTCGTG-GAGCCC-3',

下游引物:5'-TAGGATGTGGAGATGAGCAG-3'。

第19外显子:上游引物:5'-ACTTCACAGCCCT-GCGTAAAC-3',

下游引物:5'-ATGGGACAGGCACTGATTTGT-3'。

第20外显子:上游引物:5'-CAGCAGCGGGTTA-CATCTTC-3',

下游引物:5'-GCAGCCTGCTCCCTGGTGTC-3'。

第21外显子:上游引物:5'-GCTTGGTGACCCG-GACCTG-3',

下游引物:5'-CGCACCCAGCAGTTTGGCGA-3'。

PCR反应体系组成为:水33 μL, 10×PCR buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTPs 4 μL, 5 U/μL Taq DNA聚合酶0.2 μL, 60 ng/μL DNA模板4 μL,反应总体积为50 μL。反应条件均为94℃预变性5 min; 94℃变性15 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共50个循环;72℃延伸5 min, 4℃保温。所有产物经1.5%琼脂糖电泳检测,纯化后的产物从正反双链测序分析EGFR基因突变情况。测序仪器为ABI PRISM3730(USA),测序结果用Chromas软件进行分析。

1.4 统计分析

采用SPSS 21.0和ORIGION 8.0软件进行数据处理和分析,应用列联表卡方检验分析EGFR基因

突变与患者性别、年龄和病理类型之间的关系,必要时用 Fisher's 精确概率法分析,当 $P < 0.05$ 认为差异显著;根据不同年龄组成与 *EGFR* 基因突变率的分布散点图,应用回归分析求出其拟合曲线,并建立回归方程。

2 结果

2.1 *EGFR* 基因突变情况

EGFR 基因的突变特点及类型见表 1。2 507 例患者 *EGFR* 基因 18、19、21 外显子未检测到任何突变或缺失;检测出 620 例(24.74%)20 外显子突变,突变类型为同义突变 Q787Q(2361G>A);263 例(10.49%)检测到 19 内含子点突变(2284-60T>C);发生 19 内含子突变的患者同时发生 20 外显子的突变,即双突变(10.49%)。测序结果见图 1。

2.2 *EGFR* 基因突变与患者临床特征之间的关系

EGFR 基因突变与患者临床特征之间的关系见表 2。由表 2 可见,在 2 507 例病例中,男性患者 2 153 例,*EGFR* 基因突变率为 24.66%,女性患者 254 例,*EGFR* 基因突变率为 25.14%;576 例(24.97%)肝细胞癌、42 例(23.46%)肝内胆管癌和 2 例(9.52%)肝胆混合癌发生 *EGFR* 基因突变。*EGFR* 基因的突变与性别、病理类型均不具有统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 *EGFR* 基因突变例数与肝细胞癌患者年龄组成的关系

EGFR 基因的突变例数与肝细胞癌患者年龄组成之间的关系如图 2 示。*EGFR* 基因突变例数与肝细胞癌患者年龄段呈抛物线关系,年龄 50~59 岁的患者突变数量最多,方差检验有显著相关。回归分析显示:回归系数 $R=0.958$,决定系数 $R^2=$

表 1 *EGFR* 基因突变的分布特点及类型

Table 1 The type and distribution of *EGFR* gene mutation

	例数	核苷酸	密码子	突变类型	dbSNP	百分比(%)
野生型	1 624	2361G/G 2284-60T/T	CAG /	Q787Q /	/ /	64.78(1 624/2 507)
突变型						
Exon 18	/	/	/	/	/	/
Exon 19	/	/	/	/	/	/
Exon 20	620	2361G>A	CAG → CAA	Q787Q	rs1050171	24.74(620/2 507)
Exon 21	/	/	/	/	/	/
Intron 19	263	2284-60T>C 2361G>A	/	/	rs10241451	10.49(263/2 507)
双突变	263	2284-60T>C	CAG→CAA	Q787Q	/	10.49(263/2 507)

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)

表 2 *EGFR* 基因突变与临床特征的关系

Table 2 Correlation of *EGFR* mutation to clinical characteristics of PHC

临床病理参数	例数	突变例数	突变率(%)	20 外显子 n (%)	19 内含子 n (%)	P 值
性别						
男	2 153	531	24.66	531(24.66)	224(10.40)	>0.05
女	354	89	25.14	89(25.14)	39(11.02)	
病理类型						
肝细胞癌	2 307	576	24.97	576(24.97)	246(10.66)	>0.05
肝内胆管癌	179	42	23.46	42(23.46)	17(9.50)	
肝胆混合癌	21	2	9.52	2(9.52)	0	

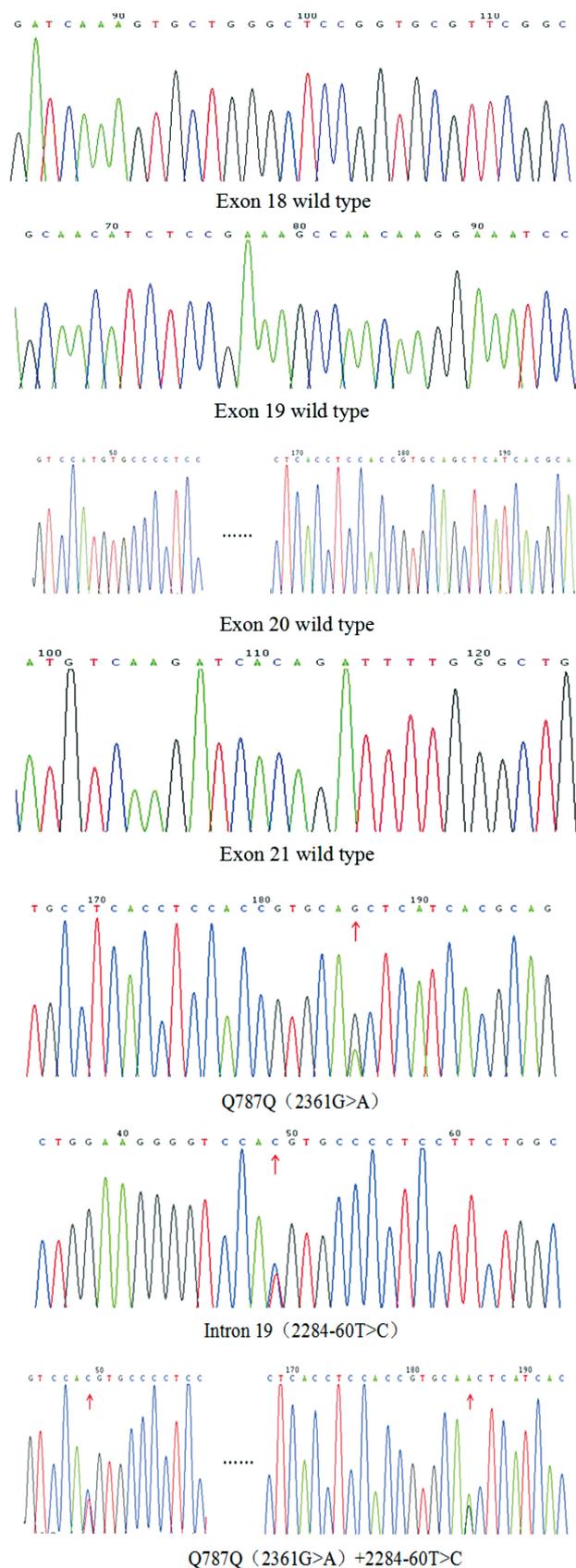


图1 EGFR基因突变的测序结果

Figure 1 Sequencing results of mutations in the EGFR gene

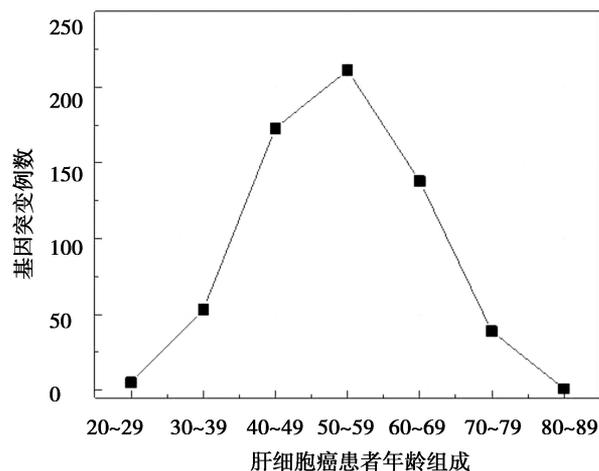


图2 EGFR基因突变例数与肝细胞癌患者年龄之间的关系

Figure 2 Correlation of number of EGFR mutation to age groups of patients of PHC

0.918, 校正决定系数 $R^2=0.917$, 显著性检验 $P<0.0001$, 回归方程: $y=-840.413+38.883x-0.363x^2$ (y为20外显子突变率, x为肝细胞癌患者平均年龄)。

2.4 EGFR基因20外显子和19内含子突变率与肝细胞癌患者年龄组成之间的关系

EGFR基因的突变情况与肝细胞癌患者年龄组成之间的关系如图3和表3示。第20外显子突变率与突变患者年龄段呈抛物线关系, 年龄50~59岁的突变患者比例最高, 方差检验有显著相关。回归分析显示: 回归系数 $R=0.958$, 决定系数

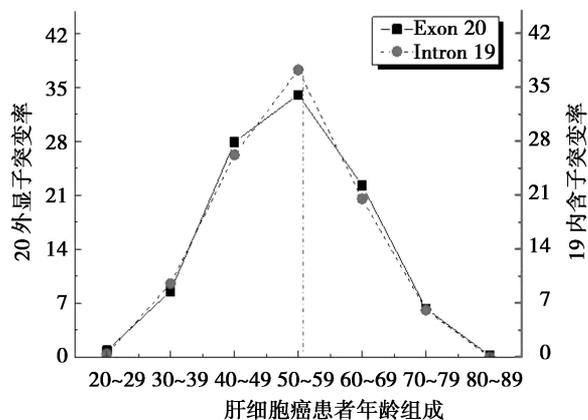


图3 EGFR基因的突变情况与肝细胞癌患者年龄组成之间的关系

Figure 3 Correlation of EGFR mutation to age groups of patients of PHC

表3 *EGFR* 基因 20 外显子突变与 19 内含子突变的相关系数

Table 3 Correlation coefficient between mutants of exon 20 and intron 19 of *EGFR*

相关系数	
19 内含子突变(2284-60T>C)	
20 外显子突变(2361G>A)	0.98**

**显著相关($P<0.01$)

$R^2=0.918$, 校正决定系数 $R^2=0.916$, 显著性检验 $P<0.0001$, 回归方程: $y=-135.507+6.27x-0.059x^2$ (y 为 20 外显子突变率, x 为突变患者平均年龄); 19 内含子突变率与突变患者年龄段也呈抛物线关系, 年龄 50~59 岁的突变患者比例同样也最高, 方差检验有显著相关。回归分析显示: 回归系数 $R=$

0.917, 决定系数 $R^2=0.841$, 校正决定系数 $R^2=0.838$, 显著性检验 $P<0.0001$, 回归方程: $y=-147.435+6.75x-0.063x^2$ (y 为 19 内含子突变率, x 为突变患者平均年龄)。进一步分析显示, 基于突变患者年龄段分布, *EGFR* 基因 20 外显子突变率与 19 内含子突变率呈显著正相关($P<0.01$)。

2.5 *EGFR* 基因突变与患者病理类型的关系

EGFR 基因突变与病理类型的关系见表 4。由表 4 可见, 在 2 307 例肝细胞癌病例中, 男性为 500 例(24.95%), 女性为 76 例(25.08%); 在 179 例肝内胆管癌和 21 例肝胆混合癌病例中, 男性分别为 32 例(23.70%)、2 例(9.52%), 女性分别为 10 例(22.73%)、0 例发生发生 *EGFR* 基因突变。*EGFR* 基因的突变与不同的病理类型均不具有统计学意义($P>0.05$)。

表4 *EGFR* 基因突变与病理类型的关系

Table 4 Correlation of *EGFR* mutation to clinical characteristics of PHC

病理类型	临床特征	例数	突变例数	突变率(%)	20 外显子[n(%)]	19 内含子[n(%)]	P 值
肝细胞癌	男	2 004	500	24.95	500(24.95)	216(10.78)	>0.05
	女	303	76	25.08	76(25.08)	30(9.90)	
肝内胆管癌	男	135	32	23.70	32(23.70)	13(9.63)	>0.05
	女	44	10	22.73	10(22.73)	4(9.09)	
肝胆混合癌	男	21	2	9.52	2(9.52)	0	>0.05
	女	0	0	0	0	0	

3 讨论

伴随着慢性肝炎、肝硬化、肥胖发生率及饮食习惯不科学等现象的发生日趋常态, 近年来原发性肝癌的发病率逐年升高。由于其分子发病机制具有复杂性、异质性、累积性等特点^[2], 并且不同的致癌机制在 PHC 中均发生不同程度的改变, 这为 PHC 分子靶向治疗提出了严峻的考验^[15]。目前应用在临床上的肝癌分子靶向治疗中较为成熟有效的也仅限于针对 *VEGFR2* 等靶标使用的索拉非尼药物, 并没有像其他癌症(肺癌、乳腺癌等)那样出现跨越式的进步。关于 *EGFR* 基因突变情况在肝癌中的分子作用机制尚不明确, 且与原发肝癌关系的报道也极其有限, 更多的研究聚焦在肝癌中 *EGFR* 基因的表达水平。可见, 进一步探究肝癌发生的分子机制, 为肝癌的分子靶向治疗

及个体化用药方案制定建立临床基础。

EGFR 基因共 28 个外显子, 其中第 18~21 外显子是编码酪氨酸激酶的区域, *EGFR* 基因发生最常见的突变是第 19 外显子的缺失和第 21 外显子的 L858R 点突变, 被认为是激活突变^[5]。以往大量的临床研究表明, 选用 *EGFR* 酪氨酸激酶抑制剂治疗发生该活化突变的患者敏感性增强, 生存率显著提高, 而未发生突变的患者多数不会从 *EGFR* 靶向治疗药物中获益。本研究结果表明, 2 507 例患者中未出现 *EGFR* 基因的热点突变, 仅检测到 620 例(24.74%)第 20 外显子发生同义突变 Q787Q(2361G>A), 国外学者在原发性肝癌 *EGFR* 基因突变的研究中也得出相似的结果^[16-17]。

本研究虽未发现 *EGFR* 基因上存在热点突变, 但我们发现高比例的 20 外显子同义突变 Q787Q

(rs1050171)。关于 Q787Q 位点突变的报道屡见不鲜,大量的临床实验结果表明,56% 宫颈腺癌中 *EGFR* 基因外显子 20 存在同义突变(Q787Q)^[18],在头颈鳞状细胞癌中 Q787Q 突变率为 56.3%^[19]。尽管同义突变并未引起氨基酸的改变,但“沉默突变”仍可能通过改变 *EGFR* 基因的拼接、mRNA 的稳定性,一定程度地影响蛋白质的最终表达。已有研究显示,*EGFR* 基因 2073 位点的同义突变导致了 *EGFR* 基因转录的 mRNA 缩短,致使 *EGFR* 三维结构发生改变^[20];Q508Q 同义突变引起 *TGFBR2* 基因异常拼接,导致蛋白编码提前终止^[21]。Tagauchi 等^[19] 研究结果表明,含有 Q787Q 突变型头颈部癌细胞系较野生型癌细胞系对吉非替尼更为敏感 ($P < 0.05$),预示该位点可能是头颈部鳞状细胞癌分子靶向治疗的一个潜在靶点。在非小细胞肺癌的研究发现,针对 Q787Q 突变的患者进行吉非替尼治疗后,13% 的患者病情获得明显缓解^[22]。由此可见,同义突变位点 Q787Q 尚存在进一步需要被证实的功能,这种功能可能会丰富原发性肝癌的靶向治疗及发生机制的研究。

值得一提的是,我们通过回归分析发现,*EGFR* 基因突变率与肝细胞癌患者的年龄段组成明显相关 ($P < 0.05$)。50~59 岁年龄段的患者 *EGFR* 基因 20 外显子和 19 内含子突变率均最高。肝内胆管癌和肝胆混合癌病例因数量少,无法按照年龄段组成进行统计学分析。鉴于此,依据 *EGFR* 基因突变规律为原发性肝癌患者提供更具体的个体化治疗方案。进一步分析发现,携带 2284-60T>C 突变的患者 100% 发生 2361G>A 突变,而携带 2361G>A 突变的患者中仅有约 50% 发生 2284-60T>C 突变。2284-60T>C 与 2361G>A 的关联及原发性肝癌 *EGFR* 基因发生双突变后相关的生物学事件,将是我们今后深入研究的新方向。

参考文献

- [1] Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumours of the digestive system [M]. International Agency for Research on Cancer, 2010.
- [2] Moeini A, Cornella H, Villanueva A. Emerging signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Liver Cancer, 2012, 1(2):83-93.
- [3] Huang J, Zheng DL, Qin FS, et al. Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling [J]. Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(1): 223-241.
- [4] Oliveira-Cunha M, Newman WG, Siriwardena AK. Epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer [J]. Cancers, 2011, 3(2):1513-1526.
- [5] Rothschild SI. Targeted therapies in non-small cell lung cancer - beyond EGFR and ALK [J]. Cancers, 2015, 7(2):930-949.
- [6] Tepper SR, Zuo Z, Khattri A, et al. Growth factor expression mediates resistance to EGFR inhibitors in head and neck squamous cell carcinomas [J]. Oral Oncology, 2016, 56:62-70.
- [7] Alanazi IO, Khan Z. Understanding EGFR signaling in breast cancer and breast cancer stem cells: overexpression and therapeutic implications [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2016, 17(2): 445-453.
- [8] Schrevel M, Gorter A, Kolkman-Uljee SM, et al. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer [J]. Mod Pathol, 2011, 24(5):720-728.
- [9] Panvichian R, Tantiwetrueangdet A, Sornmayura P, et al. Missense mutations in exons 18-24 of EGFR in hepatocellular carcinoma tissues [J]. Biomed Research International, 2015, 2015:171845.
- [10] Komposch K, Sibilica M. EGFR signaling in liver diseases [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 17(1).
- [11] Daveau M, Scotte M, François A, et al. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2003, 36(3):130-141.
- [12] 徐立, 张昌卿, 冯凯涛, 等. 肝细胞癌及癌旁肝组织 EGFR 和 EGFR v III 的表达及其临床意义 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(4):467-471.
- [13] 欧超, 吴飞翔, 罗元, 等. 表皮生长因子受体 III 型突变体在肝细胞癌中的表达及意义 [J]. 癌症, 2005, 24(2):166-169.
- [14] 王嘉毅. 原发性肝癌组织 EGFR 和 MMP9 表达与术后复发或转移的关系 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(5):885-886. (下转第 131 页)

脑卒中患者血清可溶性CD14、同型半胱氨酸和7项血脂结果分析

张韶斌* 陈斯亮 罗莞超 韦庆文 罗丹

[摘要] 目的 探讨血清中可溶性CD14(sCD14)、同型半胱氨酸(HCY)和7项血脂指标与脑卒中的相关性。方法 采用ELISA法检测195例脑卒中患者及120例健康对照组血清sCD14;使用罗氏C702全自动生化分析仪检测195例脑卒中患者及120例健康对照组血清HCY和7项血脂,并对检测结果进行分析。结果 脑卒中患者中sCD14、HCY、TG、CHOL、HDL、LDL-C、Apo A、Apo B、LP(a)含量分别为(79.98±36.67)μg/mL、(20.78±17.98)μmol/L、(1.48±0.78)mmol/L、(5.19±0.93)mmol/L、(1.15±0.31)mmol/L、(2.62±0.83)mmol/L、(1.34±0.26)g/L、(0.97±0.76)g/L、(188.07±167.68)mg/L;脑卒中患者血清sCD14、HCY、TG、CHOL、LDL-C含量明显升高,与健康对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而脑卒中患者HDL、Apo A、Apo B、LP(a)含量与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 脑卒中患者血清sCD14、HCY和TG、CHOL、LDL-C明显相关,对了解患者的发病和辅助诊断具有重要的临床意义。

[关键词] 可溶性CD14; 同型半胱氨酸; 脑卒中

Analysis of serum soluble CD14, homocysteine and 7 blood lipids in patients with stroke

ZHANG Shaobin*, CHEN Siliang, LUO Guanchao, WEI Qingwen, LUO Dan

(Department of Clinical laboratory, Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong, China, 518116)

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between serum soluble CD14 (sCD14), homocysteine(HCY), blood lipids and cerebral stroke. Methods ELISA was used to detect the serum levels of sCD14 in 195 patients with stroke and 120 healthy controls. The Roche C702 automatic biochemical analyzer was used to detect the serum levels of HCY and serum lipids in 195 patients with stroke and 120 healthy controls, and the test results were analyzed. Results The expression levels of sCD14, HCY, TG, CHOL, HDL, LDL-C, Apo A, Apo B, and LP(a) in the serum of stroke patients were (79.98±36.67) μg/mL, (20.78±17.98) μmol/L, (1.48±0.78) mmol/L, (5.19±0.93) mmol/L, (1.15±0.31) mmol/L, (2.62±0.83) mmol/L, (1.34±0.26) g/L, (0.97±0.76) g/L, and (188.07±167.68) mg/L, respectively. The expression levels of serum sCD14, HCY, TG, CHOL and LDL-C in the stroke patients were significantly increased compared with the levels in the healthy control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the levels of HDL, Apo A, Apo B, and LP (a) between the healthy control group and the stroke patients ($P > 0.05$). Conclusion The serum levels of sCD14, HCY, TG, CHOL and LDL-C were significantly related to stroke patients, providing important clinical information in understanding the pathogenesis and diagnosis of these patients.

[KEY WORDS] Soluble CD14; Homocysteine; Stroke

基金项目:深圳市卫计委科研课题(201303209)

作者单位:深圳市龙岗中心医院检验科,广东,深圳 518116

*通讯作者:张韶斌, E-mail: 13923856280@139.com

脑卒中是一种由脑部血液循环障碍而引起的疾病,是由各种诱因引发脑内血管狭窄、堵塞或者破裂导致的^[1]。近年来脑卒中的发病率呈增加趋势,其较高的致残率给社会和家庭造成了巨大负担^[2]。CD14是位于单核-巨噬细胞表面的一种白细胞分化抗原,是细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)的重要受体,有两种存在形式:一种是位于细胞膜上的膜结合型CD14(mCD14);另一种是游离于血清和尿液中的可溶性的CD14(sCD14)^[3-4]。在正常情况下, mCD14主要分布在单核细胞、巨噬细胞和树突细胞的细胞膜上, sCD14则主要存在于血清中。近年来的研究表明, sCD14与一些疾病有较高的相关性,如败血症、白血病、冠心病等^[5-7],但有关sCD14与脑卒中的相关性研究较少。血液同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)水平升高是缺血性脑血管病的一个重要的独立危险因素,且血液HCY浓度与发生脑梗死的危险度呈量效关系,血浆HCY水平轻度增高即可致脑梗发病危险性增加2倍^[8-9]。本文通过对血清可溶性CD14(sCD14)、HCY及7项血脂指标进行检测,探讨血清sCD14、HCY和7项血脂指标与脑卒中的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

病例选取自深圳市龙岗中心医院2014年11月至2016年10月之间,采取随机卡片的方法,从符合1995年第4届全国脑血管病学术会议制定的脑卒中诊断标准^[10]的脑卒中患者病例中随机选取195例,设为实验组。所有患者均在发病后24 h内入院,并经CT、MRI等影像学诊断确诊。排除标准:合并心肌梗死、心房颤动或冠心病者;有严重的肝、肾衰竭者;有严重创伤或在入院前3个月内有重大手术史患者;恶性肿瘤患者;血小板计数 $<100\times 10^9/L$ 或 $>400\times 10^9/L$ 。其中男性100例,女性95例,年龄41~80岁,平均年龄(56.3±5.6)岁;健康对照组选取自2015年5月至2016年10月之间来我院进行健康体检的健康体检者120例,其中男性70例,女性50例,年龄30至60岁之间,平均年龄(54.3±4.6)岁。实验组和健康对照组在性别、年龄等方面差异无统计学意义,具有

可比性。

1.2 检测方法

所有受检者在空腹12 h的情况下于清晨7点采集静脉血3 mL。采用ELISA法测定血清sCD14, sCD14试剂盒批号为MEXN-H0032,由美国ADL公司提供,主要仪器为安途生物PHOMO型酶标仪,操作严格按照说明书进行。同时采用罗氏C702全自动生化分析仪检测TG、CHOL、HDL、LDL-C、Apo A、Apo B和HCY水平,其中TG、CHOL、HDL、LDL-C、Apo A、Apo B、LP(a)检测的试剂、质控和定标物由德国罗氏公司提供;HCY检测的试剂、质控和定标物由广州科方生物技术有限公司提供,试剂批号:150901,严格按照仪器操作和试剂使用说明进行检测,确保结果的准确性。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计软件处理数据。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑卒中患者与健康对照组血清sCD14、HCY和7项血脂指标比较

脑卒中患者血清sCD14、HCY、TG、CHOL、LDL-C含量明显升高,与健康对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),而脑卒中患者HDL、Apo A、Apo B、LP(a)含量与和健康对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 脑卒中患者与健康对照组不同性别间血清sCD14、HCY水平比较

脑卒中实验组和健康对照组不同性别间血清sCD14、HCY水平进行比较。脑卒中男性sCD14水平和HCY水平与健康对照组男性相比,差异有统计学意义($P<0.05$);脑卒中女性sCD14水平与对照组女性sCD14相比,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。实验组和健康对照组两组的男性血清HCY与女性的相比,差异也有统计学意义($P<0.05$)。实验组的男性血清的sCD14与女性的相比,差异也有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表1 脑卒中患者与健康对照组血清 sCD14、HCY 和 7 项血脂水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of serum levels of sCD14, HCY and serum seven blood lipid indexes with stroke and healthy controls ($\bar{x} \pm s$)

项目	实验组(n=195)	对照组(n=120)	t	P 值
sCD14($\mu\text{g/mL}$)	72.98 \pm 36.67	57.13 \pm 21.67	4.29	0.00
HCY($\mu\text{mol/L}$)	20.78 \pm 17.98	14.45 \pm 7.28	3.67	0.00
TG(mmol/L)	1.48 \pm 0.78	0.88 \pm 0.75	6.72	0.00
CHOL(mmol/L)	5.19 \pm 0.93	4.39 \pm 1.21	6.60	0.00
LDL-C(mmol/L)	2.62 \pm 0.83	2.26 \pm 0.43	4.40	0.00
Apo A(g/L)	1.34 \pm 0.26	1.36 \pm 0.29	0.63	0.53
HDL(mmol/L)	1.15 \pm 0.31	1.29 \pm 0.22	4.32	0.06
Apo B(g/L)	0.97 \pm 0.76	0.85 \pm 0.57	1.49	0.14
LP(a)(mg/L)	188.07 \pm 167.68	151.43 \pm 177.45	1.84	0.07

表2 不同性别中脑卒中实验组与健康对照组血清 sCD14、HCY 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of serum levels of sCD14 and HCY in stroke group and healthy control group with different gender($\bar{x} \pm s$)

性别	组别	n	sCD14($\mu\text{g/mL}$)	HCY($\mu\text{mol/L}$)
男	实验组	100	81.35 \pm 12.23	22.3 \pm 8.62
	对照组	70	59.62 \pm 20.48	15.3 \pm 7.69
	t		8.64	5.44
	P 值		< 0.01	< 0.01
女	实验组	95	60.21 \pm 9.53	18.49 \pm 6.67
	对照组	50	53.33 \pm 23.53	11.65 \pm 2.31
	t		2.49	7.02
	P 值		0.014	< 0.01

3 讨论

CD14 是 LPS 受体复合物的主要成分,主要由单核细胞和巨噬细胞产生,具有膜结合性(mCD14)和可溶性(sCD14)两种形式^[11]。大量研究发现 sCD14 在人类多种疾病发生发展过程中都具有重要的病理生理意义,sCD14 是一种糖蛋白,其蛋白质多肽链结构较 mCD14 少 8 个氨基酸,同时不含磷酸酰肌醇,分子量为 48 KDa,较 mCD14 小。sCD14 存在于人和动物的血液与尿液中,约占机体全部 CD14 含量的 99% 左右,其正常血清中的浓度为 2 ~ 6 $\mu\text{g/mL}$ ^[12]。

目前研究发现,sCD14 在动脉粥样硬化形成过程中起重要作用,在其病理生理变化中,sCD14 促

表3 脑卒中实验组与健康对照组不同性别间血清 sCD14、HCY 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of serum sCD14 and HCY levels between different genders of stroke patients and healthy controls ($\bar{x} \pm s$)

指标	实验组				对照组			
	男(n=100)	女(n=95)	t	P 值	男(n=70)	女(n=50)	t	P 值
sCD14($\mu\text{g/mL}$)	81.35 \pm 12.23	60.21 \pm 9.53	13.42	0.00	59.62 \pm 20.48	53.33 \pm 23.53	1.56	0.12
HCY($\mu\text{mol/L}$)	22.3 \pm 8.62	18.49 \pm 6.67	3.44	0.00	15.3 \pm 7.69	11.65 \pm 2.31	3.25	0.00

使内皮细胞活化,加速动脉粥样硬化斑块的形成^[13]。Griga T 等^[14]研究发现 CD14 基因的多态性可以影响单核细胞表面以及分泌入血 CD14 的密度,且其与心肌梗死的发生具有一定的相关性。血管壁病变、血液和血液成份的流体动力学变化等是脑梗死的主要病因,有研究表明,产生动脉粥样硬化斑块,随后发生破裂和形成的血栓,这些是脑梗死发

生的病理基础,斑块局部炎症和免疫反应是易损斑块形成的关键因素,CD14 对于单核-巨噬细胞系统和动脉粥样硬化斑块的发生发展至关重要^[15]。本研究发现脑卒中患者血清 sCD14 水平明显高于对照组,提示 sCD14 的水平与脑卒中的发生密切相关,有必要开展大样本的临床研究来进一步确认脑梗死患者 sCD14 与患者发病和进展的关系,而对于脑梗死

后患者复发情况也可能与CD14单核细胞亚型相关,建立脑梗死患者和健康受试者的队列研究意义重大,以探讨CD14和其它单核细胞亚型在脑梗死患者和健康人群中的差异,通过这一途径,可以为脑梗死患者提供一种新的治疗策略。

研究认为,高HCY导致脑卒中的可能机制为促使氧自由基生成,引起血管内皮细胞损伤和促进动脉平滑肌细胞增生,加速低密度脂蛋白氧化,增加泡沫细胞形成,而后者是粥样斑块的主要成分;HCY参与了血管内皮毒性作用,使平滑肌细胞增殖,最终阻塞血流通路;HCY还可改变凝血因子功能,增加血栓的形成倾向,导致凝血机制的改变,最终诱发心脑血管疾病,在临床上其病死率,病残率均比较高^[16]。正常人体每日产生15~20 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸,大部分在细胞内分解代谢,仅有1.5 $\mu\text{mol/L}$ 或更少被释放到血液中。有研究表明,血清HCY浓度每增加5 $\mu\text{mol/L}$,脑卒中发生的危险性则增大了1.65倍;血清HCY浓度每降低3 $\mu\text{mol/L}$,脑卒中发生的危险性则降低15%~30%^[16]。补充叶酸降低HCY可以显著降低脑卒中风险,目前已知降低HCY最安全有效的方法是补充叶酸,可以合并或不合并使用维生素B12或维生素B6。本研究发现脑卒中患者血清HCY水平明显高于对照组,提示HCY的水平与脑卒中的发生密切相关。另外高脂血导致脂质在血管内皮沉积所引起的动脉硬化,本研究发现脑卒中患者血清TG、CHOL、LDL-C含量明显升高,与健康对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示血清TG、CHOL、LDL-C的水平与脑卒中的发生密切相关。

参考文献

- [1] 柴伟,张春明. 2型糖尿病并发冠心病患者血清同型半胱氨酸、氧化低密度脂蛋白及血小板参数的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 826-827.
- [2] 吴竹青,群森,吴君仓. 侧支循环与缺血性脑卒中研究进展[J]. 安徽医学, 2015, 36(12):1549-1551.
- [3] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [J]. Science, 1990, 249(4975):1431.
- [4] 张化民,刘庆林. 降低血同型半胱氨酸在脑血管病治疗中的应用[J]. 医学伦理与实践, 2005, 18(1): 9-11.
- [5] 刘波,李薇,殷勤,等. 可溶性亚型CD14对脓毒症患者弥漫性血管内凝血的预测研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(23):5284-5289.
- [6] 贾雪芹,陈海滨,邱清华. 血清可溶性CD14和肌酐在冠心病评估中的价值[J]. 江苏医药, 2015, 41(15):1780-1782.
- [7] 贾雪芹,杜秀丽,张海峰. 血清可溶性CD14水平与冠脉病变的相关性研究[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(12):1404-1406.
- [8] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心血管病预防指南[J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(1):3-22.
- [9] 雷小平. 血清同型半胱氨酸水平与冠状动脉病变的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 619-620.
- [10] 中华神经科学会,中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.
- [11] Takai N, Kataoka M, Higuchi Y, et al. Primary structure of rat CD14 and characteristics of rat CD14, cytokine, and NO synthase mRNA expression in mononuclear phagocyte system cells in response to LPS [J]. J Leukoc Biol, 1997, 61(6): 736.
- [12] Frey EA, Miller DS, Jahr TG, et al. Soluble CD14 participate in the response of cells to lipopolysaccharide[J]. J Exp Med, 1992, 176(6):1665.
- [13] Palusinski R P, Vaisman D, Pasceri V. Synergy between CD14 and C-reactive protein(CRP) in endothelial cell activation [J]. Circulation, 2002, 106:533-534.
- [14] Griga T, Klein W, Epplen JT, et al. CD14 expression on monocytes and soluble CD14 plasma levels in correlation to the promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene in patients with inactive Crohn's disease [J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(63):808-811.
- [15] Hallenbeck J, Del Zoppo G, Jacobs T, et al. Immunomodulation strategies for preventing vascular disease of the brain and heart workshop summary J[J]. Stroke, 2006, 37(12):3035-3042.
- [16] 刘国峰,徐文俭,孙顺成. 不同年龄组急性脑梗死与血浆同型半胱氨酸水平的关系[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(7):659.

肾移植术后受者 EB 病毒感染回顾性分析

邵剑春^{1*} 周贤冉¹ 宋永琳² 陈俊¹ 史琼华¹

[摘要] **目的** 探讨肾移植受者术后 EB 病毒(EBV)的感染情况和对预后的影响。 **方法** 回顾性分析 2012 年 11 月至 2016 年 4 月进行肾移植手术受者共 127 例资料,根据术后外周血 EBV DNA(实时荧光定量 PCR 方法)的结果,分析受者 EBV 感染的特点。 **结果** 127 例肾移植病例中,EBV DNA 阳性 23 例,阳性率 18.11%;定量对数平均值(3.48±0.42)IU/mL;EBV 最早检出时间为术后第 2 周,最晚检出时间为术后第 11 周,其中第 5 周检出率最高;使用更昔洛韦抗病毒治疗,73.91%阳性受者在 1~3 周转阴。EBV 阳性组与阴性组术后 3 个月血清尿素、肌酐平均水平分别为(11.2±2.1)mmol/L、(152.8±15.8)μmol/L 和(8.4±1.7)mmol/L、(108.6±35.7)μmol/L,两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。 **结论** EBV 感染是肾移植术后的并发症并且感染发生率较高,临床医生应该引起足够的重视,积极采取有效预防措施和治疗方案,将有助于改善患者的预后。

[关键词] 肾移植;感染;病毒;EB 病毒;实时荧光定量 PCR

A retrospective analysis of EBV infection after renal transplantation

SHAO Jianchun^{1*}, ZHOU Xianran¹, SONG Yonglin², CHEN Jun¹, SHI Qionghua¹

(1. The Clinical Laboratory of first people's Hospital of Kunming, Yunnan, Kunming, China, 650011;

2. The Urology Surgery of first people's Hospital of Kunming, Yunnan, Kunming, China, 650011)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the infection of EBV in renal transplant recipients and its effects on prognosis. **Methods** A total of 127 renal transplant recipients from November 2012 to April 2016 were retrospectively analyzed. The EBV infection characteristics were analyzed using peripheral blood EBV DNA (real-time PCR). **Results** Out of the 127 renal transplant cases, 23 positive cases of EBV were found, which accounts for 18.11% of all the cases. The average value of EBV was (3.48±0.42) IU/mL. The earliest EBV could be detected was 2 weeks and the latest was detected 11 weeks after renal transplantation. The highest detection rate was in the 5th week. The EBV DNA of 73.91% positive recipients was negative 1 to 3 weeks after ganciclovir antiviral therapy. After 3 months, the average levels of serum urea and creatinine in EBV positive recipients were (11.2±2.1) mmol/L and (152.8±15.8) μmol/L, respectively, and the average levels in negative recipients were (8.4±1.7) mmol/L and (108.6±35.7) μmol/L, respectively. The serum urea and creatinine levels were not significantly different between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Recipients have a high incidence of EBV infection, which is a common complication after renal transplantation. EBV infection has an effect on the functional recovery and long-term survival of transplanted kidney recipients. Therefore, clinicians should pay attention and take effective preventive measures and use treatment programs, in order to improve the prognosis of these patients.

[KEY WORDS] Renal transplantation; Infection; Virus; EBV; Real time fluorescence quantitative PCR

作者单位:1. 昆明市第一人民医院检验科,云南,昆明 650011

2. 昆明市第一人民医院泌尿外科,云南,昆明 650011

*通讯作者:邵剑春, E-mail: shaojchua@163.com

肾移植术后感染是威胁移植肾功能丧失的重要因素之一。在西方国家肾移植术后第1年有70%的患者发生严重的感染,其中26%的患者死于感染。在国内肾移植术后有30%~70%的患者发生感染。最常见的是病毒感染,多见于EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)等^[1]。随着术后免疫抑制剂的使用,增加了病毒感染和并发症风险,如继发感染、移植肾排斥反应的发生、移植后淋巴细胞增殖性疾病(post-transplant lymphoproliferative disorder, PLTD)等不良后果,最终导致移植肾的功能丧失甚至威胁患者生命。为了解受者术后EBV的感染情况及找出感染的高危因素,本文总结了肾移植术后受者EBV感染情况及治疗,报告如下。

1 材料和方法

1.1 对象

2012年11月至2016年4月进行肾移植手术受者共127例(男84例,女43例),年龄17~58岁,平均年龄(39±15)岁。所有受者均进行术前评估,包括排除病毒感染(EBV DNA、CMV DNA)、抗HLA抗体阳性,术前3个月内否认输血史、妊娠史等。

1.2 术前人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)配型、群体反应性抗体(population reactive antibody, PRA)、淋病毒情况

HLA配型标准采用国际通用HLA六抗原无错配标准(Zero HLA-A、B、DR Antigen Mismatch, 0 Ag MM)。其中1MM:2例,2MM:18例,3MM:86例,4MM:18例,5MM:3例,6MM:0例。PRA阴性121例,阳性<10% 6例。术前淋病毒试验全部为阴性。

1.3 术后监测指标及其频数

术后住院期间每周检测EBV一次,出院后定期复检(前3个月每周复检,后3个月每两周复检,半年后每月复检)所有监测指标,其中EBV DNA每月复检1次。血清尿素以小于7.1 mmol/L,血清肌酐以小于133 μmol/L为正常范围。

1.4 治疗方案

受者术后均接受免疫抑制剂抗胸腺球蛋白(anti thymus globulin, ATG),他克莫司(Tacrolimus)又名FK506,霉酚酸酯(Mycophenolate mofetil,

MMF),甲泼尼龙琥珀酸钠(methylprednisolone)联合用药。

方案:FK506(阿斯泰来公司),MMF(上海罗氏制药公司)术前诱导剂量分别为2 mg,0.75 g;ATG(阿斯泰来公司)术中100 mg泵入,术后应用3~5 d,剂量100 mg;根据术后肌酐等调整,术中、术后第1天、第2天甲泼尼龙琥珀酸钠0.5 g静滴,第3天0.25 g静滴,第4天开始口服甲泼尼龙片30 mg,每周减1片。

EBV阳性病例使用更昔洛韦(F.Hoffmann-La公司,瑞士)每天静脉滴注,剂量0.5 g,连续两周。

1.5 EBV检测方法

EDTA抗凝血200 μL,加入0.9% NH₄CL 800 μL混匀,室温静置5 min,离心5 min(12 000 rpm/min)弃除上清液,留下白色沉淀,加入20 μL DNA提取液,充分混匀,100℃温浴10 min。4℃冰箱放置1 h,离心10 min(12 000 rpm/min),所得上清即为模板DNA。实时荧光定量PCR方法检测EBV,阴性质控、定量质控跟随样本相同检验程序检测并在控。EBV DNA>500 IU/mL为阳性结果,反之为阴性结果。

1.6 仪器与试剂

ABI7500型扩增仪(ABI公司,美国),DNA提取试剂(中山大学达安基因股份有限公司);EBV荧光PCR检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行两个独立样本均数间的比较,计数资料采用概率法进行统计。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾移植术后受者EBV感染情况

127例肾移植受者术后,检出EBV DNA阳性23例,阳性率18.11%,定量对数平均值(3.48±0.42) IU/mL。肾移植术后发生EBV感染集中于2015年和2016年。感染情况见表1。

2.2 病毒检出时间

术后第2周开始检出,第5周检出率最高,为26.10%,最早检出时间为术后第2周,最晚检出时间为术后第11周,见表2。

表1 2012-2016年肾移植术后EBV感染状况

Table 1 EBV infection after renal transplantation from 2012 to 2016

时间	2012	2013	2014	2015	2016
总例数	5	15	28	49	30
EBV 阳性例数	0	0	0	10	13
感染率(%)	0	0	0	20.41	43.33

表2 肾移植术后检出EBV的时间分布

Table 2 The temporal distribution of EBV was detected after renal transplantation

周数	1	2	3	4	5	6	7	8	9~12
EBV 阳性例数	0	1	2	5	6	3	3	0	3
百分比(%)	0	4.34	8.69	21.75	26.10	13.04	13.04	0	13.04

2.3 抗病毒治疗

经抗病毒治疗后 17 例(73.91%)在治疗 1~3 周转阴;4 例 3 个月后转阴;1 例反复阳性;持续阳性的 1 例。

2.4 EBV 感染对移植肾功能的影响

比较了 EBV 阴性组与阳性组在术后 3 个月时的移植肾功能情况,两组间差异无统计学意义,见表 3。

表3 两组术后3个月移植肾功能水平比较

Table 3 Comparison of renal function in 2 groups after 3 months of operation

组别	n	血清尿素氮(mmol/L)	肌酐(μ mol/L)
阳性组	23	11.2 \pm 2.1	152.8 \pm 15.8
阴性组	104	8.4 \pm 1.7	108.6 \pm 35.7
P		0.119	0.273

3 讨论

EBV 属于 4 型疱疹病毒。EBV 感染人 B 淋巴细胞和口咽部上皮细胞,可导致被感染的 B 细胞增殖^[2]。肾移植受者由于术后接受免疫抑制治疗,体内细胞免疫处于较强的抑制状态,因此成为病毒感染的高危人群。移植术后 EBV 感染可导致移植后淋巴组织增生性疾病(PTLD)和重症肺炎。PTLD 虽然发生率低,但疾病进展快,死亡率高^[3]。

EBV 传播途径主要是通过飞沫传播,但也会通过移植物或血制品传播。本文 127 例移植受者术后 EBV 感染率为 18.11%,术前虽排除 EBV 感

染,但术后仍然有较高的感染率,并集中在 2015 年和 2016 年。除了受者服用免疫抑制剂,使体内细胞免疫处于较强抑制,导致原本处于潜伏状态的病毒激活的原因外,可能还与供体存在 EBV 感染有关,在 2015 年之前,供体主要来自尸肾,供体健康良好,因此受者几乎未发生 EBV 感染。而 2015 年后供体全部来自患者,大部分心脏死亡器官捐献供体(donation after cardiac death, DCD)来自医疗条件相对简单的基层医院,术前没有排除是否存在 EBV 感染,因此可以推断,受体 EBV 感染率突然升高很大程度上与供者有关。Shigeta 等^[4]研究认为,术前 EBV 血清抗体阳性的供者器官移植给 EBV 血清抗体阴性的受者,是受者术后发生 EBV 感染的另一个重要危险因素。因此,术前明确供体是否存在 EBV 感染,对采取预防病毒感染措施具有重要意义。术后规律监测受者细胞免疫状态及免疫抑制药物浓度,对防止免疫功能过度抑制,减少受者对病毒感染的机会尤为重要。

大量的临床资料显示,移植术后病毒感染是较严重的并发症,其中巨细胞病毒和 EBV 是最为常见的病毒,并且感染多发生在术后 3 个月内。本文 23 例 EBV 阳性检出时间均在 3 个月内,与国内外文献报道^[5]检出时间相似。从检出时间来看,EBV 最早检出时间为术后第 2 周,最晚检出时间为术后第 11 周;EBV 首次检出时间早于造血干细胞移植患者的首次检出时间第 28~159 天^[5]。对于 EBV DNA 定量阳性的受者,临床积极采取抗病毒治疗,17 例在治疗 3 周后转阴,有效率达

73.91%，略高于宋铁梅等人^[5]对干细胞移植后EBV DNA阳性患者的治疗效果，这可能与早发现和病毒低水平有关。但有1例反复EBV DNA阳性，1例持续阳性，这是否与患者免疫过度抑制或者产生耐药不得而知，还需进一步研究。Ozeay F等^[6]认为，对于EBV感染的移植受者，逐渐减量或者停止使用免疫抑制剂是重要的治疗手段。许多文献报道^[7-8]也证实了这个治疗手段的有效性。近年来，研究人员采用细胞免疫疗法治疗EBV感染也取得了一定的疗效^[9]。

本文EBV定量对数均值为 (3.48 ± 0.42) IU/mL，Volfova等^[10]采用定量PCR监测EBV的拷贝数值，其认为当DNA定量对数均值大于3.00 IU/mL时，可预测PTLD的发生。也有学者^[4, 11-12]提出，对接受供体EBV阳性或术后EBV阳性的受者，持续监测EBV可降低PTLD发生的风险。

本文比较了EBV阳性组与阴性组在术后3个月时的移植肾功能情况，两组间差异无统计学意义，这可能与阳性组病例数较少有关，但是否表明病毒感染对移植肾的功能恢复存在一定影响，还有待于进一步深入研究与探索。

病毒感染是肾移植术后的并发症并且感染发生率较高，因此早期诊断并积极采取有效治疗方案和预防措施，对移植肾的功能恢复和提高受者存活率有着积极的意义。但对于术后EBV感染的发生机制、高效抗病毒治疗和预防方案有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ramaprasad C, Pursell KJ. Infectious complications of stem cell transplantation[J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 161:351-370.
- [2] 姚孟薇, 谢莹. EB病毒感染上皮细胞机制的研究进展[J]. *广东医学*, 2015, 36(3):472-474.
- [3] 赵奇. 肾移植术后巨细胞病毒感染的诊断与防治进展[J]. *器官移植*, 2014, 5(6):393-395.
- [4] Shigeta T, Imadome K, Sakamoto S, et al. Epstein-Barr virus infection after pediatric living related liver transplantation - management and risk factors [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(10):4178-4180.
- [5] 宋铁梅, 陈广华, 张翔, 等. 异基因造血干细胞移植后CMV与EBV共激活患者临床预后分析[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(40):3135-3139.
- [6] Ozeay F, Arslan H, Bilezikci B, et al. The role of valgancyclovir on Epstein-Barr virus viral loads in pediatric liver transplantation patients [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(7):2878-2880.
- [7] 缪晓娟, 杨慧, 孙浩平, 等. EBV-CTL治疗异基因造血干细胞移植后难治性EB病毒感染的分析[J]. *重庆医学*, 2015, 44(29):4051-4053.
- [8] 张钦, 张斌, 陈虎, 等. 造血干细胞移植后EB病毒感染的细胞免疫治疗[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(6):1763-1768.
- [9] Ramirez N, Olavarria E. Viral-specific adoptive immunotherapy after allo-SCT: the role of multimer-based selection strategies [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48(10):1265-1270.
- [10] Volfova P, Lengerova M, Winterova J, et al. Monitoring of Epstein-Barr virus load in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Infection*, 2012, 40(9):583-587.
- [11] Hosseini-Moghaddam SM, Alhomayeed B, Soliman N, et al. Primary Epstein-Barr virus infection, seroconversion, and post-transplant lymphoproliferative disorder in seronegative renal allograft recipients: a prospective cohort study [J]. *Transpl Infect Dis*, 2016, 18(3):423-430.
- [12] Jamalidoust M, Geramizadeh B, Pouladfar G, et al. Epstein-Barr virus DNAemia in Iranian liver transplant recipients and assessment of its variation in posttransplant lymphoproliferative disorder patients by quantitative polymerase chain reaction assay [J]. *Exp Clin Transplant*, 2015, 13 Suppl 1:306-311.

基因芯片技术对结核分枝杆菌耐药性检测的临床应用

陈瑶 吴英松*

[摘要] **目的** 评价基因芯片技术对结核分枝杆菌耐药性检测的效果。 **方法** 选取我院结核科2014年3月至2016年3月收治的涂片阳性的肺结核住院患者238例,取其痰标本,分别用基因芯片、传统的罗氏培养和药敏试验3种方法进行结核分枝杆菌的异烟肼耐药性检测和利福平耐药性检测;把罗氏培养和药敏试验的结果作为金标准,评价基因芯片技术的临床应用价值。 **结果** 基因芯片技术检测涂片阳性患者痰标本异烟肼耐药的情况与金标准无显著差异($P>0.05$);利福平耐药的情况与金标准相比也无明显差异($P>0.05$)。 **结论** 基因芯片能够快速、准确地检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼的耐药情况,是一种值得推广的临床实验室检测方法。

[关键词] 基因芯片技术;结核分枝杆菌;耐药性;检测

Clinical application of gene chip technology in the detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*

CHEN Yao, WU Yingsong*

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

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the effect of gene chip technology on the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** 238 patients with smear positive pulmonary tuberculosis admitted to our hospital from March 2014 to March 2016 were selected as the subjects. Three methods were used to detect isoniazid resistance and rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples: gene chip, traditional Roche culture and a drug sensitivity test. The results of Roche culture and drug sensitivity test were used as the gold standard to evaluate the value of gene chip technology. **Results** There was no significant difference in the resistance rate of smear positive patients with isoniazid detected with gene chip and the gold standard ($P>0.05$). Similarly, there was no significant difference between the rifampin resistance rate determined by gene chip and the gold standard ($P>0.05$). **Conclusion** Gene chip technology can rapidly and accurately detect the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid, and it is a valuable clinical laboratory diagnostic method.

[KEY WORDS] Gene chip technology; Tuberculosis; Drug resistance; Detection

结核作为一种慢性传染病,在我国每年因结核病死亡的患者多达13万^[1]。由于耐药的结核分枝杆菌增加^[2],预计将来结核病的流行态势可能会以耐药菌为主;因此,耐药结核病的防治将会成为一项重要课题。临床上,传统的实验室检测方

法有细菌培养、抗酸染色等,但是这些方法存在耗时较长、假阳性高和灵敏度低等问题^[3]。基因芯片技术是近年来开展的分子生物学检测技术,时效性较传统方法要高^[4]。目前,对结核分枝杆菌的检测,多以分离菌株为检测对象;以痰标本为检

基金项目:重大传染病创新检测试剂的研制和应用研究(广州市协同创新重大专项,201400000004-1)

作者单位: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

测对象的报道少见。从结核防治的实际出发,本研究以痰标本为检测对象,以传统的罗氏培养和药敏试验作为诊断的金标准,评估基因芯片技术对结核分枝杆菌的异烟肼和利福平耐药性的检测效果;为评价这项技术在临床上的应用提供实验依据。

1 研究对象和方法

1.1 一般资料

选择我院结核科2014年3月至2016年3月收治的涂片阳性肺结核住院患者238例作为研究对象。其中男128例,女110例,年龄21~65岁,平均年龄 45.6 ± 6.7 岁。

1.2 采集患者的痰标本

每例患者留取清晨第一口痰标本,每人3份,每份5 mL;经检测后,留取涂片阳性级别较高(2+以上)的2份,各取1 mL混匀,进行基因芯片检测;剩下的痰标本做罗氏培养。

涂片阳性级别的判断方法:①阴性:连续观察300个不同视野,未发现抗酸杆菌;②可疑阳性:1~8条抗酸杆菌/300视野;③1+:3~9条抗酸杆菌/100视野;④2+:1~9条抗酸杆菌/10视野;⑤3+:1~9条抗酸杆菌/每视野;⑥4+: ≥ 10 条抗酸杆菌/每视野。

1.3 基因芯片技术

整个检测过程大约24 h,具体流程如下:

1.3.1 样品制备

向盛有痰液的无菌盒加入4%氢氧化钠10 mL,对收集到的痰标本进行预处理;随后进行细菌核酸提取;进行基因扩增。PCR扩增仪由博奥生物有限公司提供。

每管PCR反应体系总体积为20 μ L,其中Mtb分离株DNA模板为2 μ L,PCR扩增试剂1、PCR扩增试剂2和PCR扩增试剂3各18 μ L。PCR产物1为对照产物,与两种微阵列都进行杂交。PCR产物2为*rpoB*基因的扩增产物,与利福平微阵列相对应;PCR产物3为*katG*基因及*inhA*基因启动子的扩增产物,与异烟肼微阵列相对应。PCR扩增程序为:37 $^{\circ}$ C 600 s,94 $^{\circ}$ C 600 s;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,35个循环;然后94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,10个循环;最后置72 $^{\circ}$ C 420 s。

1.3.2 芯片反应

PCR扩增完毕,完成变性后,将产物加入Mtb耐药性检测试剂盒(北京百奥瑞生物技术有限公

司提供)的芯片点阵中,完成芯片杂交反应,并洗去非特异性杂交的核酸片段。

取杂交缓冲液9 μ L,分别加入同一样品的PCR产物1和PCR产物2各3 μ L,或者加入PCR产物1和PCR产物3各3 μ L。置于PCR扩增仪中于95 $^{\circ}$ C变性5 min,然后冰浴3 min;将13.5 μ L杂交反应混合物经盖片的加样孔加入,迅速盖上杂交盒并密封;放入50 $^{\circ}$ C预热的恒温水浴锅中120 min;水平取出杂交盒,拆开取出芯片,洗涤后离心甩干。

1.3.3 结果判读

甩干后,将芯片载入LuxScan 10KB微阵列芯片扫描仪(博奥生物有限公司提供),判读检测结果。

1.4 传统罗氏培养和药敏试验

以传统的罗氏培养和药敏试验作为金标准,对238例患者的痰标本进行罗氏培养,阳性的痰标本做药物敏感性试验。整个过程大约2~3个月。

1.4.1 罗氏培养

在预处理之前,将痰标本接种到酸性改良的罗氏培养基上,观察菌落的生物学特点。罗氏培养基由珠海贝索生物技术有限公司生产,规格为7 mL/支。

1.4.2 药敏试验

观察结核杆菌的菌落,取菌落接种,配制菌悬液(1 mg/mL),稀释浓度至 10^{-2} mg/mL和 10^{-4} mg/mL,分别接种到含异烟肼(0.2 μ g/mL)和利福平(40 μ g/mL)的药敏培养基上,37 $^{\circ}$ C培养6周,观察培养结果。

1.5 数据统计

所有的数据采用SPSS 19.0处理。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;真实性采用灵敏度和特异度评估;可靠性用Kappa值评估,Kappa值为0.41~0.6为中度一致性,0.61~0.8为高度一致性,0.8~1.0为最强一致性。

2 结果

2.1 检测的一般情况

238例患者的痰标本中,培养结果阴性15例,剩余的痰标本中,非结核分枝杆菌感染5例,耐药检测结果不完整者14例,最终纳入分析的患者为204例。初治涂片阳性155例,复治涂片阳性49例。

2.2 异烟肼耐药性检测结果

2.2.1 初治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对异烟肼耐药性的结果

检测结果,异烟肼耐药 24 例,17 例为 *katG* 基因突变,7 例为 *inhA* 基因突变。结果显示,与金标准相比无显著差异($P>0.05$);对于初治涂片阳性的患者,采用基因芯片技术,灵敏度是 86.67%,特异度是 92.14%; $kappa$ 值为 0.81,一致性为高度(表 1)。

表 1 初治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对异烟肼耐药性的结果

Table 1 The Results of *Mycobacterium tuberculosis* sputum stain detection of isoniazid resistance in patients with smear positive at the first treatment

		金标准检测			χ^2	P
		耐药	敏感	合计		
基因芯片技术检测	耐药	13	11	24	1.077	>0.05
	敏感	2	129	131		
合计		15	140	155		

基因芯片检测的灵敏度=13/(13+2),特异度=129/(129+11),分别为 86.67%和 92.14%。

2.2.2 复治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对异烟肼耐药性的结果

检测结果,异烟肼耐药 13 例,9 例为 *katG* 基因突变,4 例为 *inhA* 基因突变。结果显示,与金标准无显著差异($P>0.05$);对于复治涂片阳性的患者,采用基因芯片,灵敏度是 90.91%,特异度是 92.11%; $kappa$ 值为 0.83,一致性为最强(表 2)。

表 2 复治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对异烟肼耐药性的结果

Table 2 The results of *Mycobacterium tuberculosis* sputum stain detection of Isoniazid resistance in patients with smear positive in the second treatment

		金标准检测			χ^2	P
		耐药	敏感	合计		
基因芯片技术检测	耐药	10	3	13	0.458	>0.05
	敏感	1	35	36		
合计		11	38	49		

基因芯片检测的灵敏度=10/(10+1),特异度=35/(35+3),分别为 90.91%和 92.11%。

2.3 利福平耐药性检测结果

2.3.1 初治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对利福平耐药性的结果

检测结果,利福平耐药 32 例,均为 *rpoB* 基因突变。结果显示,与金标准无显著差异($P>0.05$);对于初治涂片阳性的患者,采用基因芯片技术,灵敏度是 90.48%,特异度是 91.44%; $kappa$ 值为 0.85,一致性为最强(表 3)。

表 3 初治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对利福平耐药性的结果

Table 3 The results of *Mycobacterium tuberculosis* sputum stain detection of rifampicin resistance in patients with smear positive at the first treatment

		金标准检测			χ^2	P
		耐药	敏感	合计		
基因芯片技术检测	耐药	19	13	32	1.208	>0.05
	敏感	2	123	123		
合计		21	136	155		

基因芯片检测的灵敏度=19/(19+2),特异度=123/(123+13),分别为 90.48%和 91.44%。

2.3.2 复治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对利福平耐药性的结果

检测结果,利福平耐药 15 例,均为 *rpoB* 基因突变。结果显示,与金标准无显著差异($P>0.05$);对于复治涂片阳性的患者,采用基因芯片技术,灵敏度是 81.82%,特异度是 84.21%; $kappa$ 值为 0.790,一致性为高度(表 4)。

表 4 复治涂片阳性患者痰液结核分枝杆菌基因芯片检测对利福平耐药性的结果

Table 4 The results of *Mycobacterium tuberculosis* sputum stain detection of rifampicin resistance in patients with smear positive in the second treatment

		金标准检测			χ^2	P
		耐药	敏感	合计		
基因芯片技术检测	耐药	9	6	15	0.171	>0.05
	敏感	2	32	34		
合计		11	38	49		

基因芯片检测的灵敏度=9/(9+2),特异度=32/(32+6),分别为 81.82%和 84.21%。

3 讨论

基因是染色体上具有遗传效应的 DNA 片段^[5]。基因芯片技术是一项新兴的现代分子生物学技术,其原理是待测的 DNA 用另一个已知核酸序列的 DNA 按碱基互补配对的原则杂交,然后

通过计算机处理,得到待测 DNA 的序列^[6]。基因芯片技术的灵敏性和特异性都比较高,因此这项技术也逐步成为诊断疾病的尖端技术,对于指导临床合理、及时、准确地用药提供了很大的方便。

异烟肼和利福平是最主要的一线抗结核药^[7],快速检测结核分枝杆菌对这两种药物的敏感性在抗结核治疗的过程中十分重要。目前,国内外已经开始运用基因芯片技术对结核分枝杆菌的耐药性进行检测^[8],检测的对象主要是结核分枝杆菌的分离菌株。然而,临床结核防治过程中,检测的主要对象是以患者的痰为标本。考虑到这一点,本次研究收集所有患者的痰液后,对结核分枝杆菌的主要突变基因位点进行检测,如 *katG*、*inhA* 和 *rpoB* 等^[9],评价基因芯片技术对异烟肼和利福平耐药性检测的真实性与可靠性。

国外研究发现,与 DNA 测序相比,采用基因芯片技术,检测结核分枝杆菌对异烟肼的耐药性,灵敏度达到 84.1%,特异度达到 100%;对利福平的耐药性分别是 100%和 95.3%^[10]。另外,相对于药敏试验,检测对异烟肼耐药性的灵敏度是 88.59%,特异度是 91.53%,对利福平耐药性分别是 85.39%和 88.45%^[11]。本研究的检测结果显示:采用基因芯片技术,与药敏试验相比,检测对异烟肼耐药性的灵敏度和特异度分别为 86.67%~90.91%和 92.11%~92.14%;检测对利福平耐药性的灵敏度和特异度分别为 81.82%~90.48%和 84.21%~91.44%。与国外的研究结果比较接近,表明在结核防治工作中,采用基因芯片检测技术,以痰标本作为检测对象,检测结核分枝杆菌的耐药性,结果是可靠的。

Guo Y 等^[12]以痰标本为检测对象,用基因芯片技术检测异烟肼和利福平耐药性,同药敏试验比较,其一致性分别是 80.3%和 84.2%。本文的结果显示,相对于药敏试验,基因芯片技术对于异烟肼耐药检测结果的 *Kappa* 值为 0.81~0.83,其一致性为最强;对于利福平耐药检测结果的 *Kappa* 值为 0.79~0.85;其一致性也为最强。这同 Guo Y 等^[12]的研究结果基本一致。上述检测结果表明,在结核临床防治工作中,采用基因芯片检测技术,以痰标本作为检测对象,检测结核分枝杆菌的耐药性,结果可靠。

综上所述,应用基因芯片技术检验结核分枝杆菌对异烟肼和利福平的耐药性,真实性和可靠性都得到了实验数据的验证,在结核病的临床快速诊疗领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] World Health Organization. Tuberculosis [J]. Saudi Medical Journal, 2013, 34(11): 1205-1207.
- [2] 陈诚,李仁忠,陈明亭,等. 全国结核病流行病学抽样调查及各省耐药监测中耐药结核病疫情资料分析[J]. 疾病监测, 2013 (4): 265-268.
- [3] Fan L, Zhang Q, Cheng L, et al. Clinical diagnostic performance of the simultaneous amplification and testing methods for detection of the Mycobacterium tuberculosis complex for smear-negative or sputum-scarce pulmonary tuberculosis in China [J]. Chinese medical journal, 2013, 127(10): 1863-1867.
- [4] 汤桂丽. 基因芯片技术在临床微生物检验中的应用和优势[J]. 中国药业, 2015, 24(5): 92-94.
- [5] Brown T A, Brown T. Gene cloning and DNA analysis: an introduction [M]. John Wiley & Sons, 2016.
- [6] 云云,汪长中,吴璇. 病原微生物检测技术进展 [J]. 安徽医药, 2013, 17(3): 501-503.
- [7] Mishra S, Nandwani S, Saluja M, et al. Prevalence of primary resistance against Isoniazid and Rifampicin in newly diagnosed sputum positive cases of pulmonary Koch's using line probe assay [J]. International Journal of Contemporary Medicine, 2014, 2(2): 33-36.
- [8] Cabibbe A M, Miotto P, Moure R, et al. Lab-on-chip-based platform for fast molecular diagnosis of multi-drug-resistant tuberculosis [J]. Journal of clinical microbiology, 2015, 53(12): 3876-3880.
- [9] Rodwell TC, Valafar F, Douglas J, et al. Predicting extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis phenotypes with genetic mutations [J]. Journal of clinical microbiology, 2014, 52(3): 781-789.
- [10] Kim SY, Park YJ, Song E, et al. Evaluation of the CombiChip Mycobacteria™ drug-resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in Mycobacterium tuberculosis [J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2006, 54(3): 203-210.
- [11] Park H, Song EJ, Song ES, et al. Comparison of a conventional antimicrobial susceptibility assay to an oligonucleotide chip system for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates [J]. Journal of clinical microbiology, 2006, 44(5): 1619-1624.
- [12] Guo Y, Zhou Y, Wang C, et al. Rapid, accurate determination of multidrug resistance in M. tuberculosis isolates and sputum using a biochip system [J]. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2009, 13(7): 914-920.

白蛋白结合型紫杉醇单药作为三线及以上方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究

蒋侃 黄诚* 吴标 林根 张晶

[摘要] **目的** 观察白蛋白结合型紫杉醇单药三线及以上治疗晚期非小细胞肺癌的近期疗效及不良反应。**方法** 选取2013年10月至2015年3月在福建省肿瘤医院已接受过二线治疗的晚期非小细胞肺癌患者46例,予以白蛋白结合型紫杉醇 $260\text{ mg/m}^2\text{ D1}$,每21天为一周期,每个周期复查CT评价疗效,观察其疗效及不良反应。**结果** 完全缓解(CR)0例,部分缓解(PR)6例,疾病稳定(SD)26例,疾病进展(PD)14例,客观缓解率(ORR)13%,疾病控制率(DCR)70%,中位无进展生存期(PFS)4.7月,主要不良反应为血液学毒性、肝功能损害,外周神经毒性,无毒性相关死亡病例。**结论** 白蛋白结合型紫杉醇用于三线及以上治疗晚期非小细胞肺癌,ORR及DCR高,不良反应可以耐受。

[关键词] 白蛋白结合型紫杉醇;多线化疗;非小细胞肺癌

Clinical study of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (single-agent regimen) as third- and further-line therapy in advanced non-small cell lung cancer patients

JIANG Kan, HUANG Cheng*, WU Biao, LIN Gen, ZHANG Jing

(Department of Medical Oncology, Fujian Provincial Cancer Hospital, Fujian Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, China, 350014)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the efficacy and toxicity of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (Nab-P) as third- and further-line chemotherapeutic approach for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **Methods** A total of 46 advanced NSCLC patients that have received second-line therapy were recruited from Fujian Province Cancer Hospital from October 2013 to March 2015. Nab-P $260\text{ mg/m}^2\text{ D1}$ was applied as a single-agent regimen for third- and further-line chemotherapy by intravenous administration for a 21 day cycle. Efficacy was estimated by imaging every cycle. **Results** Out of the 46 total patients, 6 patients was achieved partial relief (PR), 26 patients were disease stable (SD), and 14 patients had disease progression (PD). The objective response rate (ORR) was 13%. The disease control rate (DCR) was 70%. The median progression free survival (PFS) was 4.7 months. The most commonly seen adverse events (AEs) were myelosuppression, liver dysfunction, and peripheral neurotoxicity. There were no treatment-related deaths. **Conclusion** Using Nab-P as a single-agent regimen for third- and further-line chemotherapy in advanced NSCLC patients was both effective and safe. The adverse events were well tolerated.

[KEY WORDS] Nanoparticle albumin-bound paclitaxel (Nab-P); Multi-line chemotherapy; Non-small cell lung cancer (NSCLC)

基金项目:福建省青年课题基金(2015-1-14)

作者单位:福建医科大学教学医院福建省肿瘤医院内科,福建,福州 350014

*通讯作者:黄诚, E-mail:cheng671@sina.com

目前肺癌的死亡率已占恶性肿瘤的第一位,严重威胁人类的健康。其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占75%~80%^[1]。大部分的患者在确诊肺癌时已属晚期,错失手术机会。化疗在NSCLC治疗中占据重要的地位。白蛋白结合型紫杉醇(nanoparticle albumin-bound paclitaxel, Nab-P)是一种新型的以白蛋白为溶剂的紫杉醇,紫杉醇是活性成分,人血白蛋白作为辅料起分散、稳定颗粒及运载主药的作用^[2-3]。其高效低毒的优势使其2004年在美国上市,2009年在中国上市。Nab-P已广泛应用于头颈部鳞癌、转移性乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、黑色素瘤等肿瘤^[4-5],显示出肯定的疗效。2012年10月美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准Nab-P一线治疗局部进展或转移性的无手术及放疗指征的NSCLC^[6]。美国国立综合癌症网(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南中晚期NSCLC只有一线及二线的化疗方案。而部分患者在二线治疗以后仍要求继续治疗。但经过多程治疗后的患者通常无法耐受不良反应较大的药物。因此选择高效、低不良反应的化疗药物成为三线及以上患者的选择。而Nab-P就属于此类药物。国内已有数家医院进行了Nab-P单药/和化疗药物联用三线及以上治疗晚期NSCLC的研究,显现出较好的近期疗效。但此方面的探索较少。为弥补这方面的不足,本研究经伦理委员会批准,收集了46例在我院住院的予以Nab-P单药作为三线及以上方案治疗晚期NSCLC患者的资料,观察其疗效及不良反应。

1 资料与方法

1.1 一般资料

(1)2013年10月至2015年3月在我院住院的晚期NSCLC患者46例:男性34例,女性12例;(2)年龄范围40~75岁,中位年龄58岁;(3)美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)^[7]评分:0分5例,1分36例,2分5例;(4)临床分期:Ⅲb期8例,Ⅳ期38例;(5)经组织学确认的病理类型:鳞癌30例,非鳞癌16例;(6)三线及三线以上治疗:3线方案化疗的32例,4线方案化疗的6例,5线以上方案化疗的8例;其中表皮生长因子受体(epidermal growth factor re-

ceptor, EGFR)基因突变10例已接受过靶向药物及一种化疗方案后进展,未突变的36例接受二种化疗方案后进展;(7)至少有一处影像学电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)或磁共振成像(magnetic resonance image, MRI)可测量或可评估病灶;(8)预计生存期 ≥ 3 月;(9)符合化疗的指征:外周血象基本正常,心、肝、肾功能无明显异常,心电图基本正常;(10)获得患者知情同意,签署知情同意书。

1.2 治疗方法

所有患者均接受Nab-P(美国阿斯利公司生产,100g/瓶)260 mg/m²化疗。化疗第1天30 min内静滴完成。每21天为1个周期。至少完成2个周期的化疗。

1.3 疗效评价

治疗前患者进行影像学基线评估。每周期结束后下一周期开始前复查CT评价疗效。按照美国国立癌症研究所实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumours, RECIST)^[8]对患者进行疗效评价,分为:完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、疾病稳定(stable disease, SD)和疾病进展(progression disease, PD)。客观缓解率(objective response rate, ORR)是指CR+PR患者占全组患者的百分率。疾病控制率(disease control rate, DCR)是指CR+PR+SD患者占全组患者的百分率。无进展生存期(progression free survival, PFS)是指患者从首次用药到疾病进展或任何原因死亡的时间(以发生在先的事件计算)。

1.4 不良反应

化疗期间每周查2次血常规、一次肝肾功能。按照美国国立癌症研究所不良反应评价标准(common toxicity criteria, CTC)^[9]第4版进行分级。

1.5 统计方法

采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。组间比较采用 χ^2 检验。PFS采用Kaplan-Meier法计算。以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效

46例NSCLC患者均可评价疗效,共化疗148个周期,中位周期数为3个周期(2~5周期)。其中:CR 0例(0%),PR 6例(13%),SD 26例

(57%), PD 14例(30%), ORR 13%(6/4), DCR 70%(32/46)。EGFR突变患者1例为PR, 1例PD, 其余均为SD。近期疗效和各临床病理特征均无关(表1)。

2.2 远期疗效

从治疗开始进行随访,随访截止至2016年1月30日,12例存活,34例死亡。中位PFS为4.7个月(1.4个月至22.7个月)(图1)。

表1 Nab-P疗效与临床病理特征的关系

Table 1 Relations of Nab-P efficacy and clinical pathological features

临床病理参数	n	ORR	P	DCR	P
性别			0.665		0.8
男	34	4(11.8%)		24(70.6%)	
女	12	2(16.7%)		8(66.7%)	
ECOG			0.625		0.128
0~1	41	5(12.2%)		30(73.2%)	
2	5	1(20%)		2(40%)	
病理类型			0.936		0.447
鳞癌	30	4(13.3%)		22(73.3%)	
非鳞癌	16	2(12.5%)		10(62.5%)	
EGFR			0.747		0.112
突变	10	1(10%)		9(90.0%)	
未突变	36	5(13.9%)		23(63.9%)	

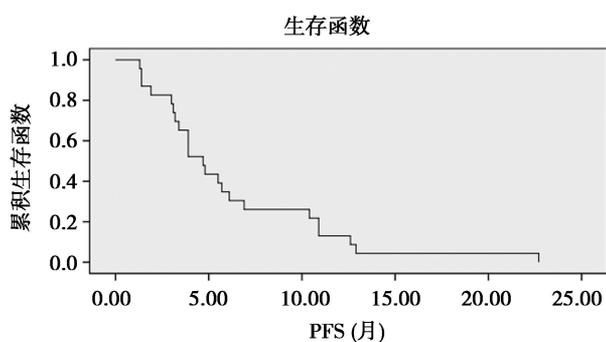


图1 46例患者的生存曲线

Figure 1 Survival curve of 46 patients

2.3 不良反应

本组患者治疗后均出现不同程度的不良反应,最常见为骨髓抑制、肝功能损害、周围神经毒性、关节及肌肉酸痛。骨髓抑制主要表现为白细胞及中性粒细胞下降,未观察到贫血及血小板减少。I度骨髓抑制2例,II度骨髓抑制18例,III度骨髓抑制5例,IV度骨髓抑制0例,经粒细胞集落刺激因子治疗后好转。肝功能损害表现为谷丙转氨酶及谷草转氨酶的升高。仅为I~II度, I度5例, II度5例,予以保肝治疗后好转。周围神经毒性主要表现为手足末端麻木。骨关节疼痛、肌肉

酸痛和疲乏多为I~II级不良反应;恶心、呕吐等不良反应少见,经治疗后均好转(表2)。

表2 Nab-P治疗晚期非小细胞肺癌的不良反应

Table 2 Adverse events of Nab-P treatment for advanced NSCLC

不良反应	分级			
	I	II	III	IV
白细胞及中性粒细胞减低	2	18	5	0
贫血	0	0	0	0
血小板减低	0	0	0	0
肝功能异常	5	5	0	0
周围神经毒性	5	5	0	0
关节肌肉酸痛	6	2	0	0
疲乏	4	3	0	0
恶心、呕吐	2	2	0	0

3 讨论

近几年来,针对NSCLC的靶向治疗已获得巨大的进步,其中针对EGFR基因突变及间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)基因重排的药物,已被NCCN指南推荐用于一

线治疗 NSCLC。但化疗仍是 NSCLC 治疗的一个重要手段。特别是基因检测阴性的患者,化疗为治疗的首选。NCCN 指南推荐:一线标准化疗方案是含铂双药方案,二线方案为培美曲塞、多西他赛或分子靶向治疗。三线以后就无标准治疗方案。但在临床工作中,相当一部分患者在接受一线、二线治疗失败后仍有较好的状态,渴望继续治疗。但是,这部分患者的体力状态又不如一线二线化疗的时候。因此,为这一部分患者选择高效、低毒的治疗方案成为临床医师面临的难题。

紫杉醇是重要的化疗药物,能促进微管蛋白聚合,抑制微管蛋白解聚,使细胞生长停滞于 G2/M 后期,有效抑制癌细胞分裂与增殖。但其水溶性极差,选用聚氧乙烯蓖麻油/乙醇作为溶剂,容易产生严重的过敏反应。并且聚氧乙烯蓖麻油/乙醇在血液中易形成胶束,阻碍紫杉醇的释放,影响疗效。Nab-P 作用机制与紫杉醇相似。制备过程中将紫杉醇和人血白蛋白经高压振动技术制成平均直径为 130 nm 的颗粒^[10]。白蛋白通过受体介导的胞转作用、高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)通过内皮细胞到达肿瘤组织^[11]。研究显示 Nab-P 血清中的游离紫杉醇是普通紫杉醇的 10 倍,瘤内 Nab-P 紫杉醇浓度较同剂量普通紫杉醇高 33%^[2]。由于不存在聚氧乙烯蓖麻油类的助溶剂,Nab-P 在给药前无需用类固醇或抗组织胺预防过敏反应^[12],输注时间短,仅需 30 min,故便于在临床使用。

Socinski 等^[6]的 Nab-P 联合铂类一线治疗 NSCLC 的 II 期临床研究显示出其高效性和良好的耐受性。III 期临床试验(VA031)中^[6]:Nab-P 组的 ORR、PFS、OS 均高于普通紫杉醇组。在鳞癌患者中,ORR 提高了 71%。其 3 级以上的周围神经炎,中性粒细胞减低、关节肌肉酸痛明显低于紫杉醇组。非鳞癌患者中两组相当^[13]。日本学者^[14]进行了周剂量 Nab-P 联合卡铂与普通紫杉醇联合卡铂比较治疗晚期 NSCLC 的研究,进一步证明了 Nab-P 对亚洲人疗效佳,安全性可。二线治疗方面:日本学者 Sakata 进行的 II 期临床研究^[15]:ORR 为 31.7%,PFS 为 4.9 个月,OS 为 13.0 个月。Weill Cornell 医学院^[16]收集了该学院 31 例复发或铂类耐药后予以 Nab-P 治疗的患者的资料,ORR 为 16.1%,DCR 为 64.5%,PFS 为 3.5 个月,1 位患者予

以 Nab-P 维持治疗了 3 年。Nab-P 与培美曲塞二线比较的 II 期临床研究中^[17],Nab-P 疗效与不良反应与培美曲塞相当。国内相关的 II 期临床研究也显示:ORR 为 16.1%,PFS 为 3.5 个月,OS 为 6.8 个月^[18]。故 Nab-P 可考虑作为晚期 NSCLC 的二线治疗的选择。在多线治疗晚期 NSCLC 方面,国内学者开展的研究较多。陈秀等^[19]的 Nab-P 单药多线治疗晚期 NSCLC 的研究:ORR 为 18.75%,DCR 为 50%,TTP 为 2.15 个月,对既往使用过紫杉醇类药物化疗的患者,Nab-P 仍然有效。方瑛等^[20]将 Nab-P 与替吉奥联合三线以上治疗晚期 NSCLC,ORR 为 22.2%,DCR 为 72.2%,PFS 达 3 个月,副反应可耐受。Ho 等^[21]将 Nab-P 与培美曲塞联合,也显示出了较好的疗效。Zheng 等^[22]研究显示了 Nab-P 对老年患者的高效性,可作为紫杉类药物或 TKI 耐药的患者的解救治疗。本研究中,ORR 及 DCR 与国内学者所得数据相似,PFS 较国内学者所得数据稍长。个别患者的 PFS 达到 22.7 个月。说明 Nab-P 对个别患者的特异性。不良反应方面:仅血液学毒性方面显示出了 III 度的白细胞减低,其余均为 I~II 度的不良反应,患者耐受性较好。本研究也充分证明了 Nab-P 可用于多线治疗晚期 NSCLC,且不良反应可以耐受。但无论是国内还是国外,二线还是多线,相关研究的病例数均较少,故期待着大样本量的临床研究。并且,随着国际上化疗药物与靶向药物/抗血管生成药物/免疫制剂联用的风潮兴起,结合 Nab-P 高效低毒的优点,可考虑进行研究将 Nab-P 与这些药物进行“强强联合”,争取更好的疗效。

总之,Nab-P 高效低毒的特性,可考虑将其作为晚期 NSCLC 多线治疗的一种选择,延长患者的生存期。

参考文献

- [1] Ferlay J, Dikshit R, Eser S, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. International Journal of Cancer, 2014, 136(5).
- [2] Yardley DA. Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery [J]. J Control Release, 2013, 170(3):365-372.
- [3] Hirsh V. Nab-paclitaxel for the management of patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2014, 14(2):129-141.

- [4] von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine[J]. *N Engl Med*, 2013, 369(18):1691-1703.
- [5] O'Shaughnessy J, Gradishar WJ, Bhar P, et al. Nab-paclitaxel for first-line treatment of patients with metastatic breast cancer and pool prognostic factors: a retrospective analysis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 138(3):829-837.
- [6] Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA, et al. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(17):2055-2062.
- [7] Malalasekera A, Tan CSY, Phan V, et al. Eastern cooperative oncology group score: agreement between non-small-cell lung cancer patients and their oncologists and clinical implications [J]. *Cancer Treatment Communications*, 2016, 5:17-21.
- [8] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. *European Journal of Cancer*, 2009, 45(2):228-247.
- [9] Hay JL, Atkinson TM, Reeve BB, et al. Cognitive interviewing of the US national cancer institute's patient-reported outcomes version of the common terminology criteria for adverse events (PRO-CTCAE)[J]. *Quality of Life Research An International Journal of Quality of Life Aspects of Treatment Care & Rehabilitation*, 2014, 23(1):257-269.
- [10] Madaan A, Singh P, Awasthi A, et al. Efficiency and mechanism of intracellular paclitaxel delivery by novel nanopolymer-based tumor-targeted delivery system, Nanoxel (TM) [J]. *Clinical & Translational Oncology*, 2013, 15(1):26-32.
- [11] Neesse A, Frese KK, Chan DS, et al. SPARC independent drug delivery and antitumor of Nnb-paclitaxel in genetically engineered mice [J]. *Gut*, 2014, 63(6):974-983.
- [12] Viúdez A, Ramírez N, Hernández-García I, et al. Nab-paclitaxel: a flattering facelift[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 92(3):166-180.
- [13] Socinski MA, Okamoto I, Hon JK, et al. Safety and efficacy by histology of weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9):2390-2396.
- [14] Saouchi M, Okamoto I, Sakai H, et al. Efficacy and safety of weekly nab-paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2013, 81(1):97-101.
- [15] Sakata S, Saeki S, Okamoto I, et al. Phase II trial of weekly nab-paclitaxel for previously treated advanced non-small cell lung cancer: kumamoto thoracic oncology study group (KTOSG) trial 1301 [J]. *Lung Cancer*, 2016, 99:41-45.
- [16] Saxena A, Schneider BJ, Christos PJ, et al. Treatment of recurrent and platinum-refractory stage IV non-small cell lung cancer with nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nab-paclitaxel) as a single agent [J]. *Medical Oncology*, 2016, 33(2):1-9.
- [17] Liu Z, Wei Z, Hu Y, et al. A phase II open-label clinical study of comparing nab-paclitaxel with pemetrexed as second-line chemotherapy for patients with stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer [J]. *Medical Oncology*, 2015, 32(8):1-6.
- [18] Hu W, Zhang Z. A phase II clinical study of using nab-paclitaxel as second-line chemotherapy for Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *Medical Oncology*, 2015, 32(6):1-5.
- [19] 陈秀, 任胜祥, 李雪飞, 等. 白蛋白结合型紫杉醇治疗多线治疗晚期非小细胞肺癌的疗效分析 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(22):1824-1827.
- [20] 方瑛, 王丽, 夏国豪, 等. 白蛋白结合型紫杉醇联合替吉奥作为三线及以上方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(12):1131-1134.
- [21] Ho C, Davies AM, Sangha RS, et al. Phase I/II trial of pemetrexed plus nab-paclitaxel in advanced solid tumor patients with emphasis on non-small cell lung cancer [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(6):1587-1591.
- [22] Zheng Q, Yao Y, Nan K, et al. Weekly intravenous nanoparticle albumin-bound paclitaxel for elderly patients with stage IV non-small-cell lung cancer: a series of 20 cases [J]. *J Biomed Res*, 2012, 26(3):159-164.

· 论 著 ·

未治和经治慢性乙型肝炎患者的病毒基因型分析及其核苷酸类似物耐药突变的模式特征

谭亚峰¹ 欧阳耀灵^{2*}

[摘要] **目的** 检测分析未治和经治慢性乙型肝炎患者病毒基因型及其核酸类似物耐药突变位点的模式特征,为慢性乙型肝炎患者的抗病毒治疗方案提供依据。**方法** 随机选取74例未治和66例经治的慢性乙型肝炎患者,PCR反向斑点杂交法检测其血清乙型肝炎病毒的基因型及核苷酸类似物耐药基因突变位点。**结果** 未治患者与经治患者的血清乙型肝炎病毒基因型均以B型为主,两组差异无统计学意义($P>0.05$),未治患者HBV C型的比例低于经治患者($P<0.05$),B+C和B+D型的比例则高于经治患者($P<0.05$)。未治患者同样存在耐药基因突变:尽管其B型和C型HBV的耐药突变比例均低于经治患者($P<0.05$),但其B+D型HBV的耐药突变比例高于经治患者($P<0.05$),且以236T单基因突变为特征;经治组患者HBV耐药突变单位点180M、204V和204I例数均高于未治组,而且经治组患者比未治组患者有更多的多位点耐药突变($P<0.05$)。**结论** HBV B基因型是本研究主要的基因型。未治患者亦存在耐药基因突变,以B+D型HBV的耐药基因突变和236T单基因突变为特征;与未治患者相比,经治患者有更多的单基因位点和多基因位点的突变。未治和经治慢性乙型肝炎患者,均应在治疗过程中定期监测NAs耐药突变发生,以便及时选择最佳治疗方案。

[关键词] HBV未治患者;HBV经治患者;HBV基因型;NAs耐药突变

Detection of hepatitis B virus genotyping in untreated or treated patients of chronic hepatitis B and its mutation patterns of the nucleotide analogues-resistant mutants

TAN Yafeng¹, OUYANG Yaoling^{2*}

(1. The second clinical medical college, Yangtze university, Jingzhou, Hubei, China, 434020; 2. Department of Laboratory of Jingzhou Central Hospital, Jingzhou, Hubei, China, 434020)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate and identify prevalent genotypes of hepatitis B virus (HBV) among untreated or treated patients with chronic hepatitis B (CHB) and the mutation pattern of the nucleotide analogues-resistant mutants. **Methods** A total of 74 cases with CHB who did not receive the treatment of lamivudine and any other antiviral drugs and 66 cases with CHB who receive the treatment of lamivudine and any other antiviral drugs were randomly chosen. After sample collection and HBV DNA extraction, PCR reverse spot hybridization was used to detect HBV genotypes and the nucleotide analogues (NAs)-resistant mutants. **Results** The main Genotypes of HBV is the B type in both untreated and treated patients. The rate of HBV C in the untreated patients was less than that of the treated patients ($P<0.05$), while B+C and B+D were higher in the untreated patients compared with the treated patients ($P<0.05$). The NAs-resistant mutants were found in both untreated and treated patients of CHB. Despite of the less rate of the NAs-resistant mutants in the virus genotypes B+C and higher rate of that in the virus genotypes B+D among untreated patients

作者单位:1. 长江大学第二临床医学院,湖北,荆州 434020

2. 荆州市中心医院检验医学部,湖北,荆州 434020

*通讯作者:欧阳耀灵, E-mail:ouyangyaoling67@126.com.

compared with treated patients ($P<0.05$), the single locus of NAs-resistant mutants were revealed 236T as the main mutation pattern in the untreated patients ($P<0.05$). While the 180M, 204V and 204I as the main single locus mutation pattern in the treated patients ($P<0.05$) and, more multiple gene loci mutation were detected among the treated patients compared with untreated patients. **Conclusion** HBV B is the main genotypes in this research. NAs-resistant mutants existed in the untreated patients. The mutant sites in the treated patients were more both in single gene locus and multiple gene loci than that in the untreated patients. Investigation of NAs-resistant mutants before treatment is crucial for the success of the treatment. In whole course of antiviral treatment, NAs-resistant mutants should be monitored for the optimal schedule.

[KEY WORDS] Untreated patients infected HBV; Treated patients infected HBV; HBV genotype; NAs-resistant mutants

HBV 基因型与临床表现、治疗效果、预后和药物抵抗均有一定关系,并存在地域分布特点^[1-2]。随着 HBV 抗病毒药物特别是核苷(酸)类似物(nucleotide analogues, NAs)在临床中的应用普及,HBV 发生 NAs 相关耐药基因位点突变而导致耐药更为常见^[3]。使用核苷(酸)类似物拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовir, ADV)、替比夫定(telbivudine, LdT)、恩替卡韦(entecavir, ETV)治疗的患者通过短期治疗难以实现持久应答,随着治疗时间延长, NAs 耐药发生率逐渐增加是乙肝治疗中面临的严峻问题^[4]。Januszkiewicz-LD 等^[5]发现从未治疗过的 HBV 患者也会出现耐药相关突变位点,但报道不多。研究 HBV 未治患者基因型和 NAs 耐药基因位点突变情况,为 HBV 治疗策略的制定提供依据,本文对 HBV 未治患者与经治患者血清样本进行了 HBV 基因型和耐药基因位点检测,并对检测结果进行了分析比较,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本收集

随机收集 2014 年 8 月至 2016 年 4 月湖北省荆州市中心医院门诊和住院慢性乙型肝炎感染患者(HBV DNA $>1.00E3$ IU/mL),其中未治疗患者 74 例,男 49 例,女 25 例,年龄(36.432 ± 12.941)岁和经 NAs 治疗的患者 66 例,男 53 例,女 13 例,年龄(38.667 ± 14.812)岁。两组患者年龄与性别的差异均无统计学意义($P>0.05$)。门诊患者通过口述和电话随访,住院患者通过查阅病历和病床前随访,从未经 NAs 治疗的患者纳入未治组,接受过 NAs 治疗的患者纳入经治组。抽取患者空腹静脉血 3 mL,4 h 内分离血清,4 °C 保存,12 h 内进行 HBV DNA 扩增,产物于-20 °C 保存,在合适的时间解冻

做核酸杂交试验检测 HBV 基因型和耐药突变位点。

1.2 仪器与试剂

美国 Backman 仪器有限公司生产的 AllcegraTM21 R 高速冷冻离心机;英国 Techne 公司生产的 GENIUS 扩增仪;亚能生物技术(深圳)有限公司生产的 YN-H16 恒温杂交仪;海门市其林贝尔仪器制造有限公司生产的 TS-8 摇床,PCR 反向斑点杂交法检测 HBV 基因分型和耐药突变基因试剂由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。

1.3 方法

HBV DNA 的提取、PCR 扩增及核酸杂交检测均按照试剂盒说明书操作。在杂交结果质控正常的基础上根据显色出现的阵列位点直接判读 HBV 的基因型和耐药突变类型。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理,两组数据间的 HBV 基因型和耐药位点比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

74 例 HBV 未治患者和 66 例 HBV 经治患者中成功检测到 HBV 基因型及部分患者 NAs 相关耐药基因位点。

2.1 HBV 未治患者和经治患者 HBV 基因型检测结果

HBV 未治患者和经治患者 HBV 基因型检测结果见表 1,两组间除 HBV B 型无统计学差异外,未治患者 HBV C 型比例低于经治患者,而 B+C 和 B+D 型则高于经治患者。

2.2 HBV 未治患者和经治患者 HBV 不同型别耐药突变基因检测

表1 HBV 未治患者和经治患者 HBV 基因型检测结果 [n(%)]

Table 1 The comparison of HBV genotypes among the untreated and treated patients [n(%)]

组别	例数	HBV 基因型			
		B	C	B+C	B+D
未治组	74	49(66.216)	6(8.108)	12(16.216)	7(9.459)
经治组	66	39(59.091)	25(37.879)	2(3.030)	0(0.00)
χ^2		0.759	17.935	6.739	6.572
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

HBV 未治患者和经治患者 HBV 不同型别耐药突变基因检测比较见表 2。两组间耐药突变除 HBV B+C 型差异无统计学意义外,未治患者 HBV B 型和 C 型比例均低于经治患者,而 B+D 型则高于经治患者。

2.3 HBV 未治患者和经治患者 HBV 耐药基因位点检测结果

74 例 HBV 未治患者和 66 例经治患者 HBV 耐药突变检测结果见表 3,经治患者 HBV 耐药突变位点 180M、204V 和 204I 比率均高于未治患者,但

表2 未治和经治患者不同 HBV 基因型耐药突变基因比较 [n(%)]

Table 2 The comparison of main resistant mutants sites in diverse HBV genotypes among the untreated and treated patients [n(%)]

分组	例数	HBV 基因型			
		B 型(%)	C 型(%)	B+C 型(%)	B+D 型(%)
未治组	74	9(12.162)	1(1.351)	4(5.405)	6(8.108)
经治组	66	17(25.757)	12(18.181)	1(1.515)	0(0.00)
χ^2		4.264	11.731	1.533	5.591
<i>P</i>		<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

经治患者 HBV 耐药突变位点 236T 比率低于未治患者,两组患者间其它位点突变差异无统计学意义。HBV 耐药基因单基因突变见表 4,多基因突变见表 5。经治患者组与未治患者组单位点耐药突变差异无统计学意义($\chi^2=0.0312, P>0.05$);经治患者组 16 例(24.242%)与未治患者组 4 例(5.405%)多位点耐药差异有统计学意义($\chi^2=10.109, P<0.05$)。

表3 HBV 未治患者和经治患者 HBV 耐药基因位点检测结果 [n(%)]

Table 3 The comparison of resistant mutant among the untreated and treated patients [n(%)]

组别	例数	HBV 耐药基因位点					
		180M	204V	204I	207I	181V	236T
未治组	74	5(6.757)	1(1.351)	1(1.351)	0(0)	1(1.351)	20(27.027)
经治组	66	14(21.212)	13(19.697)	17(25.758)	1(1.515)	4(6.061)	8(13.636)
χ^2		6.215	13.046	18.547	1.129	2.246	4.844
<i>P</i>		<0.05	<0.001	<0.001	>0.05	>0.05	<0.05

表4 HBV 未治患者和经治患者 HBV 耐药单基因突变

Table 4 The single mutant among the untreated and treated patients

突变模式	未治例数	经治例数	χ^2	<i>P</i>
180M	1	2	0.469	>0.05
204V	0	3	3.437	>0.05
204I	0	8	9.513	<0.05
207I	0	1	1.129	>0.05
181V	0	0	-	-
236T	16	2	10.762	<0.05
合计	17	16	0.0312	>0.05

3 讨论

乙型肝炎病毒的基因型分布不仅有明显的地区差异,而且与治疗的预后密切相关。BaqlaniSA 等^[6]对 HBV 感染患者 179 例血清样本研究发现,HBV 基因型 D (130/170, 76.47%) 和 A (32/170, 18.82%) 是阿曼主要的基因型。我国主要为 B、C 型,少见 D 型,中国南方和北方也有差异^[7]。我们早期对经治者研究也发现 B 型和 C 型是湖北荆州地区慢性乙型肝炎患者 HBV 的优势基因型^[8]。本次研究的 HBV 基因型分布流行病学特征与国外研

表5 HBV 未治患者和经治患者HBV 耐药多基因位点突变

Table 5 The diverse mutants among the untreated and treated patients				
突变模式	未治例数	经治例数	χ^2	P
180M+204V	0	2	2.275	>0.05
180M+204I	0	4	4.616	<0.05
180M+236T	1	0	0.898	>0.05
180M+204I+236T	1	1	0.006 65	>0.05
180M+181V+236T	1	1	0.006 65	>0.05
180M+204V+236T	1	1	0.006 65	>0.05
180M+204I+204V	0	1	1.129	>0.05
204I+204V+236T	0	1	1.129	>0.05
180M+204V+181V	0	1	1.129	>0.05
180M+204V+204I+181V+236T	0	1	1.129	>0.05
204I+204V	0	1	1.129	>0.05
204V+181V	0	1	1.129	>0.05
204V+236T	0	1	1.129	>0.05
合计	4	16	10.109	<0.05

究结果有差异^[6],而与国内的研究结果基本一致^[7]。同时我们在未治患者组发现7例B+D型,而经治组中则未发现B+D型。本研究发现,B+C型中以C型为主;B+D型中以B型为主,提示NAs经治患者和未治患者HBV基因型分布有差异。罗杰等^[9]研究发现,在HBV治疗过程中病毒基因型有可能发生改变,这种基因型改变是否与病毒的耐药突变相关联?详细机理何在?值得进一步研究。

本次研究中,无论是未治抑或经治慢性乙型肝炎患者,其病毒均存在耐药突变,而且HBV的基因型与病毒的耐药突变均呈现一定的关系。尽管B+C型HBV的耐药突变在未治和经治两组间的差异无统计学意义,但经治组HBV B和C型耐药突变高于未治组,尤其在多位点耐药突变方面,经治患者多于未治患者,提示HBV B和C型的经治患者在治疗过程中更易诱发耐药。未治患者B+D型HBV较易出现耐药突变,且以236T单位点突变为主,这是区别于经治患者病毒耐药突变的特征之一。

文献研究^[5]认为HBV自然突变导致抗病毒抵抗还不十分清楚,他们对HBV患者P区基因研究发现2.66%(7/263)从未接受NAs治疗过的HBV患者血清中检出耐药基因,认为检出耐药突变的未治患者有可能被HBV耐药株感染。Ciftci S等^[10]在从未接受NAs治疗过的慢性HBV患者血

清中检出37.5%(6/16)的患者存在耐药位点突变。Hamidi等^[11]从伊朗一年以上未接受NAs治疗的HBV患者血清中检出51.1%(23/45)患者存在耐药突变,而大部分与ADV相关。rt204V、rt204I是HBV患者LAM和LdT耐药的独立判断因子^[12],rt236T是HBV患者ADV耐药的独立判断因子^[13-14]。我们的检测结果显示未治患者HBV检测出耐药突变且以ADV相关位点rt236T突变为主,与文献^[11]研究结果相符。HBV经治患者中检测出主要为LAM相关位点rt204I突变为主,可能与LAM最早普遍应用于临床有关。我们对单位点耐药及多位点耐药统计分析显示经治患者组与未治患者组单位点耐药无统计学差异;经治患者组与未治患者组多位点耐药有统计学差异。提示NAs治疗后患者多位点耐药发生率高于未治患者,与文献^[10]的报道相符。根据2009年发布的《乙型肝炎病毒耐药专家共识》^[12],常见拉米夫定(LAM)耐药模式为:rt180M+rt204I、rt180M+rt204V、rt204I、rt204V、rt207I、rt181V;阿德福韦酯(ADV)耐药模式为:rt181V、rt236T,结合本研究的实验结果,推测未治患者可能对单ADV及LAM+ADV产生耐药;经治患者可能对单LAM、单ADV及LMA+ADV产生耐药,但仍需做进一步的研究。经治患者多位点耐药发生率高于未治患者。由于未治患者也有耐药突变存在,因此NAs治疗前检测HBV未治患者的基因型和耐药突变对患者成功治疗非常重要。在患者治疗过程中应定期监测NAs耐药突变,有利于调整最佳治疗方案。

参考文献

- [1] Liu Y, Miller MD, Kitrinis KM. HBV clinical isolates expressing adefovir resistance mutations show similar tenofovir susceptibilities across genotypes B, C and D[J]. *Liver Int*, 2014, 34(7):1025-1032.
- [2] Mello FC, Fernandes CA, Gomes Sde A. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012, 107(3):317-325.
- [3] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(14): 1486-1500.
- [4] 恩替卡韦临床应用专家委员会. 恩替卡韦临床应用专家共识:2015年更新[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2015, 7(2):19-25.

(下转第146页)

• 综述 •

表皮生长因子受体与鼻咽癌的关系

潘莉莉¹ 黄华艺^{1,2*}

[摘要] 作为发病率居首位的头颈部恶性肿瘤-鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是具有高侵袭性和易转移特征的恶性肿瘤。NPC多发于东南亚国家,尤其是中国南方地区。近年来的研究表明,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR),一种酪氨酸蛋白激酶受体,在鼻咽癌的发生、发展及预后过程中扮演着重要的角色。EGFR不仅是判断鼻咽癌预后、指导治疗的重要指标,而且成为鼻咽癌治疗的重要靶点之一。本文就近年来EGFR与鼻咽癌的相关研究及应用做一阐述。

[关键词] 表皮生长因子; 鼻咽癌; 潜伏膜蛋白1; 环氧化酶2; 核因子 κ B; 14-3-3 σ 蛋白

Epidermal growth factor receptor and nasopharyngeal carcinoma

PAN Lili¹, HUANG Huayi^{1,2*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China, 530021; 2. Surgical Oncology, Roswell Park Cancer Institute, New York, USA, 14263)

[ABSTRACT] Nasopharyngeal carcinoma (NPC) represents the most common cancer among the head and neck malignancies with a highly aggressive and metastatic phenotype. Nasopharyngeal carcinoma has a high rate of incidence in South East Asian countries, especially in Southern China. Recent studies have indicated that the tyrosine protein kinase receptor, epidermal growth factor receptor (EGFR) plays an important role in the occurrence, development, and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. EGFR is not only an important index for estimating prognosis and guiding treatment of nasopharyngeal carcinoma, it is also one of the recently developed chemotherapeutic targets for nasopharyngeal carcinoma treatment. This article summarizes recent studies on the association between EGFR and nasopharyngeal carcinoma.

[KEY WORDS] Epidermal growth factor receptor; Nasopharyngeal carcinoma; Latent membrane protein 1; Cyclooxygenase-2; NF- κ B; 14-3-3 σ protein

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种发源于上皮细胞的头颈部恶性肿瘤。就全世界范围而言,东南亚国家的黄种人(如中国、马来西亚、菲律宾、越南和泰国等)NPC的发病率高,而白种人却很少见;据世界卫生组织的调查显示:80%的NPC发生在中国和东南亚。在中国,南方地区的NPC发病率较高,尤其是广东、广西、湖南、福建和江西5省,越往北方发病率越低^[1]。

大部分的NPC为低分化鳞状细胞癌,具有高度的侵袭性和转移性,放射治疗为其首选治疗,但5年生存率徘徊在50%左右。大约有60%的NPC患者在确诊时已经出现了颈淋巴结和远处转移^[2]。目前中晚期的NPC治疗通常以放疗、化疗为主,辅助进行靶向治疗。尽管现在的医疗手段有了很大的进步,但治疗效果依旧令人失望。局部病灶对放疗不敏感、远处转移及多重耐药已经

作者单位:1. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530021

2. 美国罗斯威尔帕克癌症研究所肿瘤外科,美国,纽约,布法罗 14263

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

成为当今 NPC 治疗的难题。

目前认为 NPC 的发病与家族遗传、病毒感染及环境因素等有关,是一个多因素、多环节、多步骤的复杂病理过程,包括细胞粘附力下降、酶降解和血管生成等多种癌细胞生物学行为的改变,主要涉及信号转导、蛋白传递、癌基因与抑癌基因的表达调控、免疫相关基因以及 DNA 结合转录和转录因子等,而这些因素相互影响形成一个复杂的调控网路,但详细机制目前尚未完全明了。近年来的研究表明,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在 NPC 的发生、发展及预后过程中扮演着重要的角色^[3]。EGFR 作为信号传导受体,参与肿瘤细胞多种信号通路的转导,在 NPC 发病过程中均有不同程度的表达。针对 EGFR 为靶点的研究为 NPC 治疗带来新思路。本文拟对近年来 EGFR 与 NPC 的相关研究和应用及两者之间的联系做一阐述。

1 EGFR 的生物学特征与生理功能

表皮生长因子受体(EGFR/HER)是一种受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs),属于 I 型受体酪氨酸激酶超家族,是原癌基因 C-erbB-1 的表达产物,是表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)细胞增殖和信号传导的受体。EGFR/HER 家族由 4 个糖蛋白组成,即 ErbB1(EGFR)、ErbB2(HER-2)、ErbB3(HER-3)、ErbB4(HER-4)。ErbB1 也被称为 EGFR,其具有酪氨酸激酶活性的典型特征,能够被配体激活^[3]。EGFR 主要配体有 EGF 或转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)。EGFR 与 EGF 或 TGF- α 有效结合后,EGFR 被活化,其与自身分子发生同二聚体化或与同家族的其它分子发生异二聚体化,导致 EGFR 胞浆部分的特定酪氨酸残基磷酸化,并刺激下游信号传导通路的活化,从而调控细胞的增殖、转移、黏附、分化以及存活。在一定条件下,EGFR 可能自身激活而导致细胞的异常增殖,在细胞的恶性转化和增殖中发挥重要作用。自身磷酸化是 EGFR 的活性主要调节方式,EGFR 通过磷酸化的酪氨酸残基与下游底物酶反应而传递信号。其下游主要的信号通路包括 Ras、Raf-NF- κ B 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 JAK/STAT 信号通路等^[4]。近年来发现,在上皮来源的肿瘤中(包括头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌和结肠直肠癌等)

的细胞核内有 EGFR 高水平的表达,其作为一种新型转录因子在核内独立或作为转录共活化子,与其他转录因子相互作用,影响细胞周期进行或与细胞增殖密切相关^[3-4]。EGFR 作为靶基因,参与促进肿瘤的发生与发展。

2 EGFR 在鼻咽癌中的表达

EGFR 基因的染色体定位为 7p12,其基因编码 1 210 个氨基酸,分子量为 134 277 Da。EGFR 在人体组织细胞中有广泛的分布,是 EGF 细胞增殖和信号传导的受体,介导着信号转导通路。它在人体多种肿瘤中都存在高表达的情况,其中包括 NPC。EGFR 参与肿瘤的增殖、血管生成、侵袭、转移以及抑制凋亡,在恶性肿瘤中表达水平显著升高。EGFR 的激活能抑制肿瘤细胞的凋亡,从而降低肿瘤细胞的放射敏感性。研究表明,NPC 患者的肿瘤细胞中均有不同程度的 EGFR 表达,表达水平与临床分期和生存率有密切关系^[5]。EGFR 表达水平可作为鼻咽癌预后的独立预测因子,且是潜在的预后不良的标志。近来,随着基因组学、生物信息及蛋白质组学的发展,研究者在原有的研究基础上运用 Meta 综合分析技术对 EGFR 在鼻咽癌的表达情况进行重新分析研究,结果更充分地展示出 EGFR 在 NPC 的发生与发展中的重要地位,其介导的信号途径失调可能是 NPC 发病的机制之一^[6]。EGFR 在 NPC 患者中的表达情况,可以作为鼻咽肿瘤诊治的一个预测因子,可以作为一项独立的临床指标用于预后观察^[7-8]。

3 EGFR 与鼻咽癌发病进程的关系

作为一种跨膜型生长因子依赖的酪氨酸激酶受体,EGFR 在复层鳞状上皮细胞、子宫内膜腺体及涎腺等正常组织中均有表达,与配体 EGF、TGF- α 结合后,诱导形成同源二聚体而活化,触发细胞质内功能区酪氨酸激酶活化,主要通过 MAPK、PI3K 等通路将信号传入细胞核内,导致 DNA 合成增加,刺激细胞生长和增殖。同时活化后的 EGFR 二聚体可以在配体不存在的情况下可保持激酶活性,如在肿瘤中 EGFR 出现过度表达的情况,导致持续性地向细胞内传递分裂信号,引起细胞无限增殖,从而导致癌变的可能。EGFR 是涉及细胞增殖和肿瘤发生、发展中的极为重要的受体信号系统,参与肿瘤的侵袭、转移,与肿瘤恶性程度及

预后有着密切关系。应用免疫组织化学 SP 法检测 NPC 组织及鼻咽非肿瘤组织中 EGFR 蛋白以及实时荧光定量 PCR 法检测 EGFR mRNA 的表达时发现, EGFR 表达强度与患者的病情进展、总生存数及预后等有关, 提示 EGFR 与 NPC 发病的进程有密切的关系^[9]。同样, 利用免疫组化法对 110 例 NPC 患者进行的研究显示, NPC 组织中的 EGFR 的阳性率明显高于正常组织, 在 T3、T4 期患者中 EGFR 的表达显著高于 T1、T2 期患者, 说明 EGFR 的表达水平与 NPC 患者性别、年龄及肿瘤病理分型无相关性, 而与 NPC 的临床分期有显著关系^[10]。处于 NPC 晚期的患者组织中 EGFR 的表达水平明显高于早期患者, 再次说明 EGFR 在 NPC 的进展过程中起到重要作用。

4 EGFR 与其它蛋白激酶的关系及其在鼻咽癌中的作用

4.1 EGFR 与潜伏膜蛋白-1 (latent membrane protein 1, LMP1)

LMP1 是 EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV) 编码的主要致癌蛋白, 与 NPC 的发生和转移密切相关。目前公认的 NPC 发生主要与 EBV 感染有关。EBV 主要感染人体 B 细胞, 在 B 细胞内形成潜伏感染。LMP1 是使 B 细胞无限增殖的主要因素。LMP1 由 384 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 它所介导的信号转导途径, 可以参与调控下游靶基因的表达, 在细胞增殖、转化、凋亡、分化以及参与肿瘤细胞的侵袭和转移发挥重要作用。LMP1 能活化 3 类重要的核转录因子, 分别为核因子 κ B (NF- κ B) 和激活蛋白 1 (AP-1) 及 STAT。LMP1 可以异常激活 AP-1、NF- κ B、STAT 3 条信号转导通路和磷酸化这 3 条信号通路的 EGFR、JNK、JAK、STAT、I κ B、c-Jun 等蛋白质分子, 影响细胞周期进程, 促进细胞的生长发育与分化增殖, 同时对细胞周期检测点的调控、凋亡的诱导及肿瘤细胞的移行与侵犯等生物学特性的改变也有影响。而 EGFR 和 LMP1 介导的多条信号通路存在交联。研究发现, LMP1 通过转录因子 EGFR 调控酪氨酸磷酸化转移酶 TPST-1 催化趋化因子受体 CXCR4 活化, 从 LMP1-EGFR-TPST-1-CXCR4 信号转导通路来实现 NPC 细胞的转移^[11]。最近报道的一个新的磷酸化靶蛋白, 癌蛋白 18 (oncoprotein 18, Op18, Op18/stathmi 是 LMP1 调节的下游磷酸化蛋白质分

子。LMP1 能通过 MAPKs 与 edc2 激酶调控 Op18/stathmin 信号通路, 影响微管聚合与解聚的动态平衡; 这种作用与细胞周期密切相关, 具有细胞周期特异性^[12]。信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 是细胞增殖和凋亡的主要转录调节因子。EGFR 信号活化后磷酸化的 EGFR 及其下游分子可直接磷酸化 STAT3, 活化后的 STAT3 自细胞质转位到细胞核内调控靶基因表达, STAB 过度活化与多种肿瘤的发生、发展密切相关。有研究表明 NPC 中 EGFR 和 STAT3 的表达存在相关性。由 LMP1 激活使得 EGFR 和 STAT3 的相互作用增加^[13]。LMP1 反过来促进 EGFR 和 STAT3 结合细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 的启动子区, 提高 cyclin D1 启动子的活性。活化的 EGFR 和 STAT3 的增加会降低 cyclin D1 转录活性及其 mRNA 表达水平。证实了在 NPC 中 LMP1 通过 EGFR 和 STAT3 信号通路来调节 cyclin D1 的启动子活性, 从而影响 NPC 的发生与发展。随着现代生物科技的日益进步, 大家开始从蛋白质间相互作用的新视野中, 对 EB 病毒编码的癌蛋白 LMP1 调控转录因子 EGFR 的信号通路进行深入研究, 从而对 LMP1 的功能有了拓展, 同时为鼻咽癌分子靶向治疗研发新的靶点提供了新方向。

4.2 EGFR 与核因子 κ B (NF- κ B)

核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 是一类可与免疫球蛋白重链和 κ 轻链基因增强子 κ B 序列 (GGGACTITCC) 特异结合的核蛋白因子, 是一个多功能的核转录因子, 可以调控多种细胞因子和生长因子、粘附分子、酶等的表达, 其所编码的许多功能蛋白能促进肿瘤生长, 包括上调促细胞存活基因表达促进肿瘤细胞增殖分化、抑制促凋亡因子、抑制肿瘤细胞凋亡、促进恶性转化、浸润转移和肿瘤血管形成等。被活化的 NF- κ B 可进一步调节多种靶基因的表达, 其中一个重要的靶基因即表皮生长因子受体的启动子上有 1 个 NF- κ B 的结合位点。NF- κ B 活性增加后可直接结合 EGFR 启动子, 使 EGFR 表达增加, 从而使细胞生长失控和恶性化。通过 NF- κ B 信号通路在 NPC 细胞中上调 EGFR 的表达并使其发生。NF- κ B 在 NPC 的发生和发展过程中起关键的作用。在 NPC 细胞中存在大量活化的 NF- κ B, NF- κ B 的活化与鼻咽癌的恶性演进有关。研究发现放射治疗作为 NPC 的主要治疗方法, 肿瘤放射敏感性直接影响

肿瘤的放疗效果。很多因素能影响肿瘤细胞放射敏感性。研究发现,在NPC放射治疗中,EGFR与NF- κ B在反映NPC细胞的放射敏感度具有一致性,具有统计学意义($P < 0.05$),可以成为肿瘤放疗观察的一项临床指标^[14]。

4.3 EGFR与环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)

前些年对于肿瘤防治的研究主要集中在原癌基因及其抑制调节方面,近来发现真核细胞翻译的调节在基因表达调控方面起着非常关键作用,真核细胞翻译起始因子COX-2备受关注。COX-2是花生四烯酸合成前列腺素过程中的一个重要限速酶,被称为“快反应基因”。在正常的生理状态下几乎不表达,生长因子、细胞因子、炎性介质、促癌剂等多种因素可诱导COX-2的表达。在恶性肿瘤中广泛出现COX-2基因的扩增及其蛋白的高度表达。COX-2通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡,促进肿瘤新血管形成与细胞浸润,贯穿于肿瘤发展的整个过程。EGFR和COX-2在晚期NPC患者中表达高达90%以上^[15]。有研究者对128个NPC患者长达116个月放射治疗的追踪,发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、COX-2和EGFR在NPC存在高表达,能反映NPC的侵袭、转移等发展特征,其表达情况与局部控制和远处转移、生存率等临床分型指标无相关,COX-2、VEGF和EGFR和临床分期是独立的在非转移性NPC的不良预后因素的预测指标^[16]。有学者观察了69个NPC放疗组织标本中VEGF、COX-2、C-erbB2和EGFR的表达与各种临床病理参数之间的关系时发现,COX-2在预后不良的NPC中具有高表达的特点,而血管内皮生长因子却缺失^[17]。COX-2蛋白的高表达与NPC的病程进展有密切关系。EGFR和COX-2的表达水平不能单独用于预测放射治疗NPC患者的预后情况^[15-17]。EGFR和COX-2的表达存在正相关,COX-2的高表达可以诱导EGFR的表达增加。EGFR和COX-2相互作用共同影响着NPC的发展,在调控NPC发展变化中存在着密切的联系。这也成为肿瘤靶向治疗的热点。

4.4 EGFR与14-3-3 σ 蛋白

14-3-3蛋白是真核生物体内的一种高度保守、广泛表达、具有多种重要功能、分子量为25~30 kD的酸性蛋白。14-3-3蛋白家族至少包括 σ 、 β 、 ϵ 等

7个成员。14-3-3 σ 被认为是一种肿瘤抑制蛋白,是14-3-3家族成员之一,具有调控细胞周期、信号传导、细胞增殖与分化、细胞凋亡、细胞侵袭等多种重要的生理功能,是唯一受抑癌蛋白p53直接转录调控且与肿瘤关系最密切的14-3-3家族成员。14-3-3 σ 是细胞周期的负调控因子,其功能是阻滞细胞周期于G2/M期,保持基因组的稳定性,阻止细胞发生癌变。14-3-3 σ 表达量的下降与NPC的发生发展与转移密切相关^[18]。研究发现基因甲基化是引起鼻咽癌组织14-3-3 σ 蛋白表达降低或缺失的决定性因素,并提示14-3-3 σ 可能抑制NPC转移^[19]。研究者采用靶向蛋白质组学、生物信息学方法等研究发现在NPC细胞中存在14-3-3 σ /EGFR/Keratin 7相互作用蛋白组。通过EGFR与Keratin 8和Keratin 7相互作用,14-3-3 σ 通过p53与RAB7、HSP90、RPL1 1、VDAC2和VDAC1相互作用。14-3-3 σ /p53/RAB7相互作用组调控囊泡转运,14-3-3 σ /EGFR/Keratin 8调控细胞骨架,它们可能与NPC侵袭转移有关。14-3-3 σ 下调能增加NPC细胞EGFR和Keratin 8表达,增强NPC细胞的体外侵袭能力。结果提示,14-3-3 σ 表达下调可能通过14-3-3 σ /EGFR/Keratin 8相互作用组而促进NPC侵袭转移。与EGFR相关联的14-3-3 σ 蛋白下调可能是导致NPC发生发展的因素之一,可能是潜在的肿瘤基因治疗的靶点^[20]。

5 EGFR的阻断剂在鼻咽癌治疗中的应用

随着对肿瘤中存在EGFR的过度表达及突变现象的认识,EGFR在肿瘤发生发展中的重要作用被肯定,EGFR成为了肿瘤的诊疗和预后研究的重要靶点。针对EGFR的分子靶向治疗方法备受关注,目前已研究出多种靶向EGFR基因治疗的药物,主要分为2类:一为小分子酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs),如吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、拉帕替尼(lapatinib, tykerb)等;另为单克隆抗体,如西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumab)等^[21-22]。两类药物作用机制和部位不同,但都起到阻断EGFR所转导的信号通路,从分子水平上阻断肿瘤恶性生物学行为的发展,进而抑制肿瘤生长和转移,甚至促使肿瘤消退。这种肿瘤分子靶向治疗是一种全新的生物治疗模式,目前已在临床治疗肿瘤上显示出较好的疗效和安全

性,但其应用在 NPC 的靶向治疗处于起步阶段,尚未成熟。

吉非替尼为小分子酪氨酸激酶抑制剂,可抑制 EGFR 受体的酪氨酸激酶的自身磷酸化,抑制下游分子水平和通路活化,从而控制细胞增殖和诱导凋亡。有研究表明吉非替尼在作用于非角化性 NPC 细胞系实验中发现有较好的抑制增殖的效果^[23]。研究证实,吉非替尼通过 EGFR/AKT/ β -catenin 信号通路对鼻咽癌肿瘤干细胞进行调控,实现选择性抑制作用^[24]。这给临床运用吉非替尼治疗 NPC 提供了理论依据。

拉帕替尼是一种喹唑啉胺类化合物,是口服的小分子 EGFR/HER-2 双受体酪氨酸激酶抑制剂。它通过抑制细胞内的 EGFR 和 HER-2 的 ATP 位点阻止肿瘤细胞磷酸化和激活,阻断 EGFR 和 HER-2 受体的下调信号,从而抑制肿瘤进一步生长。EGFR/HER-2 是理想的抗肿瘤分子靶点。研究发现拉帕替尼在 NPC 体外模型中能有效抑制 EGFR 和 HER-2 磷酸化,随着显著抑制 NPC 细胞的生长(最大生长抑制率 > 90%)。对于拉帕替尼敏感细胞株,抑制细胞生长并阻滞于 G0/G1 细胞周期。PARP, Caspase-3 的裂解,显著下调 Survivin 蛋白(如 Mcl-1 和 Cyclin D1)。发现拉帕替尼能抑制 hk1-lmp1 和 Hone-1 细胞侵袭。拉帕替尼能抑制 NPC 细胞增殖和转移,并诱导其发生凋亡^[25]。

西妥昔单抗是一种 EGFR 的新型人鼠嵌合型单克隆抗体,作用于受体细胞外,与细胞表面的 EGFR 特异性结合,竞争性阻断 EGFR 与 EGF 及其他配体(如转化生长因子 n)的结合,从而阻断 EGFR 依赖的肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及血管生成等生物学效应。作为针对的 EGFR 抑制剂,西妥昔单抗被发现与放射治疗局部晚期肿瘤相结合联合作用,提高肿瘤细胞对放疗的敏感性,能有效延长肿瘤患者生存期。将西妥昔单抗用在复发或转移性头颈癌的一线治疗试验也显示与复发和转移的肿瘤化疗相结合的改进的良好效果^[26]。

运用单靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂药物进行 NPC 临床分子靶向治疗取得一定疗效,但不幸的是还会出现 EGFR-TKIs 耐药导致的肿瘤转移无法被遏制的现象。NPC 的靶向治疗研究成果取得较少,且疗效不一,涉及的分子机制尚未完全阐明,

迫切希望更多的研究是着眼于应用分子靶向治疗结合放化疗等多种联合治疗方法来提高 NPC 患者生存率,达到最终治愈的目的。

6 总结

尽管目前肿瘤治疗手段有着显著的进步,但在临床工作中依然存在很多治疗失败,效果不尽人意的案例。随着基因检测技术的不断进步,生物信息学和蛋白质组学的发展,对于 NPC 的研究逐步深入到分子水平,这为 NPC 的治疗提供了新的思路和方法,给患者带来新的希望。如何能提高 NPC 患者生存率,改善生存质量,降低其复发率和转移率,寻找出药物新靶点进行针对性更强的抗肿瘤治疗及多方法联合治疗,更好的治愈 NPC 患者是我们迫切努力的目标。如今针对 EGFR 靶点的治疗研究已经成为 NPC 治疗发展的新趋势,目前还需要进一步明确 EGFR 在 NPC 发生、发展中的作用和调控转导机制,寻找具有较高敏感性、特异性的检测和治疗靶点,探索 NPC 靶向性及个体化的诊断和治疗手段,进而更好地指导和帮助临床诊断和治疗任重而道远。

参考文献

- [1] Chang ET, Asami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 2006, 15(10):1765-1777.
- [2] Fang FM, Chen CY, Tai WL. Quality of life and survival outcome for patients with nasopharyngeal carcinoma receiving three-dimensional conformal radiotherapy VS. intensity-modulated radiotherapy - A longitudinal study[J]. *Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 72(2):356-364.
- [3] Ch'ng S, Low I, Ng D, et al. Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2008, 9(3):344-349.
- [4] Charalambous CT, Hannigan A, Tsimbouri P, et al. Latent membrane protein 1-induced EGFR signalling is negatively regulated by TGF alpha prior to neoplasia[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 8(8):1839-1848.
- [5] Zhang P, Wu SK, Wang Y, et al. p53, MDM2, eIF4E and EGFR expression in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with clinicopathological characteristics and prognosis: a retrospective study[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(1):113-118.

- [6] Tulalamba W, Larbcharoensub N, Sirachainan E, et al. Transcriptome meta-analysis reveals dysregulated pathways in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8):5931-5942.
- [7] Ma X, Huang J, Wu X, et al. Epidermal growth factor receptor could play a prognostic role to predict the outcome of nasopharyngeal carcinoma: A meta-analysis[J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14(4):267-277.
- [8] Sun W, Long G, Wang J, et al. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis [J]. *Head Neck*, 2014, 36(10):1508-1516.
- [9] Meng X, Shuo LU, Zhou X, et al. Expression and clinical significance of EGF receptor and IGF-1 receptor in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2009, 30(3):294-298.
- [10] Yuan TZ, Li XX, Cao Y, et al. Correlation of epidermal growth factor receptor activation to metastasis-free survival of nasopharyngeal carcinoma patients[J]. *Cancer*, 2008, 27(5):449-454.
- [11] Xu J, Deng X, Tang M, et al. Tyrosylprotein sulfotransferase-1 and tyrosine sulfation of chemokine receptor 4 are induced by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 and associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma[J]. *Plos One*, 2013, 8(3):1371.
- [12] Lin X, Liu S, Luo X, et al. EBV-encoded LMP1 regulates Op18/stathmin signaling pathway by cdc2 mediation in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(5):1020-1027.
- [13] Xu Y, Shi Y, Yuan Q, et al. Epstein-Barr Virus encoded LMP1 regulates cyclin D1 promoter activity by nuclear EGFR and STAT3 in CNE1 cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32(46):5369-5376.
- [14] Yang C, Yang Y, Ai Y. The relationship between the expression of EGFR NF-kappaB and radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1):137-147.
- [15] Krikelis D, Bobos M, Karayannopouloun G, et al. Expression profiling of 21 biomolecules in locally advanced nasopharyngeal carcinomas of Caucasian patients[J]. *Bmc Clin pathol*, 2013, 13(1):1.
- [16] Pan J, Tang T, Xu L, et al. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Head Neck*, 2013, 35(9):1238-1247.
- [17] Kim TJ, Lee YS, Kang JH, et al. Prognostic significance of expression of VEGF and Cox-2 in nasopharyngeal carcinoma and its association with expression of C-erbB2 and EGFR [J]. *Surg Oncol*, 2011, 103(1):46-52.
- [18] Yi B, Tan SX, Tang CE, et al. Inactivation of 14-3-3 sigma by promoter methylation correlates with metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5):858-866.
- [19] Chan SY, To KF, Leung SF, et al. 14-3-3sigma expression as a prognostic marker in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(4):949-955.
- [20] Huang WG, Cheng AL, Chen ZC, et al. Targeted proteomic analysis of 14-3-3sigma in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1):137-147.
- [21] Ma L, Zhang G, Miao X, et al. Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/ β -catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma [J]. *FEBS J*, 2013, 280(9):2027-2041.
- [22] Ma BB, Lui VW, Poon FF, et al. Preclinical activity of gefitinib in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma cell lines and biomarkers of response [J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28(3):326-333.
- [23] Takeuchi K, Ho F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(12):1774-1780.
- [24] Kabolizadeh P, Kubicek GJ, Heron DE, et al. The role of cetuximab in the management of head and neck cancers [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(4):517-528.
- [25] Lui VW, Lau CP, Ho K, et al. Anti-invasion, anti-proliferation and anoikis-sensitization activities of lapatinib in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(6):1241-1252.
- [26] Bourhis J, Lefebvre JL, Vermorken JB. Cetuximab in the management of locoregionally advanced head and neck cancer: expanding the treatment options [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(11):1979-1989.

肠道病毒EV71手足口病病原学及免疫功能改变研究现状

王宇婧 程邦宁*

[摘要] 手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是以手、足、口多发疱疹为主要特征的一类自限性疾病,5岁以下儿童多发,是由多种肠道病毒引起的儿童常见的急性传染性疾病。肠道病毒EV71是手足口病主要病原体,具有嗜神经性,可引起患儿神经症状甚至死亡。本文将对EV71病原学特征、发病机制、感染后机体免疫功能改变进行讨论,以便更加深入了解EV71特征,为手足口病的防治提供依据。

[关键词] 手足口病;肠道病毒EV71;体液免疫;细胞免疫

Research into the etiology and alterations in immunological function of hand, foot and mouth disease caused by Enterovirus 71

WANG Yujing, CHENG Bangning

(Pediatric Clinical College of Anhui Medical University (Anhui Province Children's Hospital), Hefei, Anhui, China, 230051)

[ABSTRACT] Hand, foot, and mouth disease (HFMD) is a self-limited disease characterized by multiple herpes of the hand, foot, and mouth, and caused by multiple enteroviruses in children under 5 years old. Enterovirus 71 (EV71) is the major pathogen of HFMD, that can cause neurological manifestations and even death due to its neuronal apoptosis function. The purpose of this review is to summarize recent discoveries regarding the pathogen, etiopathogenesis, EV71-derived alterations in immunological function, and to provide guidance on preventing and curing HFMD.

[KEY WORDS] Hand, foot and mouth disease; Enterovirus 71; Humoral immunity; Cellular immunity

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是儿童常见传染性疾病,以手、足、口多发疱疹为主要特征,是一类自限性疾病,由多种肠道病毒引起的全球儿童常见的急性传染性疾病^[1],5岁以下儿童多发。多由肠道病毒属的柯萨奇病毒A组(coxsackievirus, CoxA)16型,人肠道病毒(enterovirus, EV)71型引起。HFMD已经成为世界性疾病,目前已经在全球范围内造成多次大规模爆发流行,

引起全世界的广泛关注。EV71是导致HFMD的主要病原体^[2],其发病率呈逐年增加的趋势。重症病例主要由EV71引起,重症患儿可以出现神经症状,包括脑炎、脑膜脑炎、脑脊髓炎、急性迟缓性麻痹甚至死亡。本文以EV71为代表对HFMD在病原学特征、发病机制、感染后机体免疫功能改变等方面进行综述,通过对HFMD的进一步研究以达到及早治疗、防止病情进展、减少后遗症的目的。

基金项目:安徽省卫生和计划生育委员会科研项目(14FR017)

作者单位:安徽医科大学儿科临床学院(安徽省儿童医院),安徽,合肥 230051

*通讯作者:程邦宁, E-mail: pcbncbn@126.com

1 EV71 病原学特征

EV71 病毒无包膜,是属于小 RNA 病毒科肠道病毒属的单正链 RNA 病毒^[3],其 5'端与含有 VPg 蛋白共价连接,3'端为多聚腺苷酸尾,5'-非编码区长度为 745 个核苷酸呈高度结构化包含内部核糖体结合位点(internal ribosomal entry site, IRES),IRES 保证 RNA 合成完整的三叶草样结构并且对病毒 mRNA 的转运方向起决定作用。三叶草样结构功能具有多样性,作为顺式作用元件与病毒和细胞蛋白相互作用形成核糖核蛋白复合物。40S 亚基的核糖体识别特定序列时,翻译开始进行^[4]。有研究表明多种蛋白质与小 RNA 病毒 5'端非翻译区作用,参与病毒 RNA 复制或者 IRES 反应。上游元件结合蛋白(far upstream element binding protein, FBPI)是一种反式作用因子,通过结合实验,能绘制出 EV71 IRES 内负责 FBPI 结合的 RNA 决定物并且绘制出此反应中包括的蛋白质结构域。在 EV71 感染时,病毒复制的细胞胞质中核蛋白 FBPI 含量增高,表明 FBPI 在 EV71 复制过程中作为正调节蛋白与 EV71 中 IRES 结合^[5]。

EV71 基因组的 5'-非编码区(5'-untranslated region, 5'-UTR)和 3'-非编码区(3'-untranslated region, 3'-UTR)构成了仅有的一个开放阅读框(open reading frame, ORF),约占整个基因组的 90%,该 ORF 编码一个多聚蛋白,在病毒自身合成的蛋白酶作用下多聚蛋白被水解成前体蛋白 P1、P2 和 P3,而 P1 可继续被水解成 VP1-VP4 4 种衣壳蛋白,P2 和 P3 可分别水解成 2A-C 和 3A-D 7 种非结构蛋白^[6]。VP4 位于病毒颗粒外壳的内侧与病毒核心紧密连接,其余 3 种衣壳蛋白均暴露于病毒颗粒表面,因而决定病毒抗原性质的抗原表位主要位于 VP1-VP3 上,EV71 重要的中和抗体识别位点由 VP1 和 VP3 组成的 BC 环以及由 VP2 组成的 EF 环构成^[7]。Ku Z 等用 3 种不同的单克隆抗体与 EV71 结合,结果显示 3 种单克隆抗体均识别并结合 EV71 VP1 区 GH 环^[8]。EV71 病毒与其他肠道病毒的差异主要表现在 VP1 区,因此 VP1 区结构差异可能是导致 EV71 具有较强致病性的原因之一。VP1 区含有重要的中和抗体识别位点,该区基因变异状况可作为 HFMD 疫苗研制的靶点^[9]。病毒核衣壳蛋白的

变异改变病毒致病性,可以此为研究目标分析不同患儿基因型差异与病情的相关性,为疾病的防治提供依据。

2 EV71 感染发病机制

HFMD 的发病机制目前尚未明确。病毒与易感细胞表面受体结合后可启动病毒感染。细胞受体在决定细胞、组织、种属嗜性和病毒的致病性方面起到重要作用。病毒感染细胞和病毒在细胞之间传播依靠的是不同的细胞表面分子。在感染的组织中,细胞之间的传播在病毒发病机制中占重要作用。当病毒入侵机体后,以许多组织为目标引起胃肠道、心血管、呼吸道和中枢系统疾病。病毒结合到细胞表面受体后感染细胞,细胞受体被认为在发病机理以及组织嗜性中具有决定性^[4]。B 类清道夫受体 2(scavenger receptor class B, member 2, SCARB2)和 P-选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)被认为是 EV71 受体^[10-11]。

SCARB2 广泛表达于包括中枢神经系统在内的各种器官和组织中^[12],主要分布于内涵体与溶酶体上,Yamayoshi 等^[11]对 EV71 不易感的鼠 L929 细胞转染 EV71 高度易感的 RD 细胞基因组 DNA 后,筛选出单克隆细胞系 Ltr051 和 Ltr246,Ltr051 对 EV71 的感染效率类似于 RD 细胞,属于高度易感,Ltr246 相比于 Ltr051 感染效率低;进一步研究发现 Ltr051 细胞系携带人 SCARB2 基因。表达 SCARB2 的 L929 细胞,对检测的 EV71 病毒均高度易感。Yamayoshi 等^[13]通过比较发现人 SCARB2 (hSCARB2)与鼠 SCARB2 (mSCARB2)有 85.8% 的氨基酸相同,相似性达 99.9%,但表达 hSCARB2 的 L929 细胞,对于 EV71 的易感性却远高于表达 mSCARB2 的 L929 细胞,进一步研究发现 hSCARB2 第 142 ~ 204 位氨基酸在促进病毒颗粒与细胞的结合及 EV71 的易感性中都发挥重要作用。EV71 通过位于第 172 位谷氨酰胺残基周围的 VP1 区与 SCARB2 结合^[14],SCARB2 的第 4 个外显子在与 EV71 的 VP1 蛋白反应中起重要作用。研究还发现位于衣壳蛋白组成的 EF 环壁上的氨基酸,对病毒结合 SCARB2 及 EV71 病毒感染力具有重要意义^[13]。

SCARB2 广泛表达于各种细胞表面,而 PSGL-1 主要表达在髓系、淋巴系和树突状细胞表达,调节

白细胞与选择素之间的反应,因此在促炎反应中起重要作用。Nishimura等^[15]研究发现EV71依赖于硫酸化的酪氨酸基团结合到PSGL-1的N端。他们同时还发现病毒衣壳蛋白第145位氨基酸残基(VP1-145)决定了EV71是否与PSGL-1结合,通过影响病毒表面临近的赖氨酸残基(VP1-244)的定位发挥作用。据此推测VP1-145通过将VP1-244带正电荷的赖氨酸链转变为带负电荷而控制病毒的结合。这些发现为病毒受体反应和EV71结合PSGL-1表达的白细胞的研究提供了前景^[16]。

小肠道RNA病毒对在固有免疫抗病毒反应中起重要作用的干扰素IFNs很敏感,EV71可以通过血脑屏障进入中枢神经系统或者通过轴突从外周转运至中枢,中枢神经系统固有免疫表达的模式识别受体(toll-like receptors, TLRs),胞质视黄酸诱导基因1(retinoic acid inducible gene-1, RIG-1)和黑色素瘤分化相关基因5(melanoma differentiation associated gene5, MDA-5)可监视病毒核酸并且启动宿主抗病毒反应。MDA-5是RNA活化I型IFN表达的关键分子^[17]。EV71通过RIG-1和TLR3调节抑制I型IFN反应,从而抑制机体免疫反应。肠道病毒可逃避宿主免疫系统防御到达中枢神经系统,穿过血脑屏障通过血流传播至中枢,感染白细胞和神经细胞,神经系统的入侵被认为是发生在血脑屏障被破坏或者轴突退化的情况之下^[18]。某些小RNA也参与到病毒生命周期的复制和翻译,研究发现小分子RNA(miRNA)在病毒和宿主复杂的网络式反应中起到重要作用,能够调节转录后表达功能。miRNA的表达具有组织依赖性并且大量的同种miRNA可以成为该种miRNA是否在组织中起作用的依据^[19]。对EV71发病机制进行深入研究,通过有效阻断病毒与相应EV71受体结合而抑制病毒感染。同时通过对免疫抑制与免疫促进相关分子及其作用机制的研究,可从分子层面对病毒诱导机体发挥的免疫应答进行干预,以此为靶点,对病毒感染进行干预,减少患儿发病。

3 EV71感染的免疫调节

人类是唯一已知的HFMD相关肠道病毒感染的宿主。病毒入侵机体后机体体液免疫系统和细胞免疫系统启动免疫应答发挥免疫防御和抗病毒

作用。B细胞被抗原刺激后活化为浆细胞,浆细胞分泌免疫球蛋白发挥抗病毒效应。抗原刺激T细胞后,增殖分化为效应T细胞,在细胞因子的协同作用下发挥细胞免疫功能。

3.1 体液免疫在EV71感染中的作用

孙裕平等^[20]对EV71感染为主的HFMD患儿体液免疫功能研究显示重症组和轻症组患儿血清IgA、IgG含量与健康儿童无显著差异,而IgM明显高于健康儿童并随着病情加重而升高,治疗后IgM含量明显下降。重症组和轻症组患儿补体C3、C4含量明显低于健康儿童,随着病情的加重而降低。可能因为IgM是感染早期产生的免疫球蛋白,病毒感染初始阶段B细胞被激活分化为浆细胞产生IgM发挥抗病毒免疫作用保护机体,并且随着病情的进展而产生更多的抗体,经过治疗后抗体与病毒结合被清除而好转。C3、C4作为重要的补体成分参与机体免疫应答,通过多个补体激活途径参与调理吞噬靶细胞、促进炎症反应以及清除免疫复合物而被消耗,所以会随着病情的加重含量降低。说明可根据免疫球蛋白和补体含量判断患儿病情进展及转归为临床治疗提供依据。

3.2 细胞免疫及细胞因子在EV71感染中的作用

研究表明抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)处理抗原片段后激活NK细胞和Tc细胞,通过分泌颗粒酶穿孔素直接杀伤靶细胞。Th细胞作为辅助细胞分泌细胞因子促进体液免疫系统发挥作用。彭宏君等^[21]研究显示EV71感染树突状细胞(dendritic cells, DCs)后感染组DCs分泌的TNF- α 、IL-1 α 、IL-6和IL-12含量明显高于对照组且TNF- α 刺激后的DCs能够强烈刺激同种异体T淋巴细胞增殖。表明EV71能够刺激机体免疫细胞发挥免疫应答作用。EV71可促进NK细胞、T细胞凋亡,T细胞、NK细胞比例降低对机体免疫反应产生抑制作用,而随着病情加重比例不断下降^[22]。提示患儿病情进展进入重症期时,细胞免疫进一步受损,B细胞介导的体液免疫可能起更大作用,由此引发的抗体和炎性因子会大量增加。疾病的严重程度与细胞因子的水平有关,表明细胞因子的释放可以导致HFMD患儿的免疫损伤^[23]。细胞因子可促进炎性细胞渗出,吸引中性粒细胞和单核巨噬细胞迁移至炎症灶,增强免疫细胞的吞噬杀伤功能,还可刺激白细胞和内皮细

胞释放炎性介质导致组织损伤,加重病情发展。IFN- γ 、IL-13 等细胞因子能增加肺血管通透性,加重肺毛细血管渗漏,可能参与导致肺水肿,促炎因子 TNF- α 、IL-2、IL-6 及抗炎因子 IL-10 在重症 HFMD 患儿体内均高于普通患儿^[24],表明病毒在机体内引起严重的应激和全身炎症反应,机体内存在复杂的炎症抑制和炎症亢进状态。一个细胞因子的激活可引起连锁反应激活一系列细胞因子。近年陆续报告 EV71 感染患者血液和脑脊液 IL-10、IL-13、IFN- γ 、IFN- γ 诱导蛋白-10 (inducible protein 10, IP-10)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、IFN- γ 诱导单核因子 (monocyte interferon inducing factor, MIG)、IL-1 受体拮抗剂和粒细胞集落刺激因子 (colony stimulating factor, G-CSF) 等增高,并与 EV71 疾病严重程度相关^[25-26],说明由 IL-6、IL-1 β 、和 TNF- α 等介导的急性期蛋白和趋化因子激活可能会导致病毒感染后炎症加重和病理变化。这些研究发现有助于理解免疫细胞及其分泌的细胞因子在 HFMD 发病中的作用,说明细胞因子可能参与 HFMD 疾病进展过程,可作为患儿疾病进展的监测指标。

动态监测患儿体内免疫球蛋白、免疫细胞及细胞因子含量可有效反应机体免疫功能状况,有效掌握患儿病情变化,作为临床治疗和预后的指导。

4 小结

目前还没有治疗 HFMD 的特效药,临床上只能对症处理,进一步研究 HFMD 的病原特征、发病机制及病毒介导的免疫功能改变对于评价预后风险就显得更加重要。通过对 HFMD 病原学的进一步分析和研究,揭示病毒生命周期中起关键作用的分子,以参与病毒生命周期复制和翻译的分子为靶点,对病毒感染进行控制,防止病毒持续感染导致病程迁延;通过对发病机制的进一步研究可有效阻断病毒与细胞表面分子的相互作用,减少患儿发病率和死亡率,减少后遗症提高患儿生存质量,有助于 HFMD 的进一步防治;通过对患儿免疫功能的监测分析在疾病过程中免疫细胞和免疫活性物质在病情进展中的作用分析患儿病情及预后,有助于辅助临床诊断和治疗。

参考文献

- [1] Wu W, Xu WB, Chen L, et al. Molecular identification and analysis of human enteroviruses isolated from healthy children in Shenzhen, China from 2010 to 2011[J]. Plos One, 2013, 8(6):e64889.
- [2] Yang Q, Jie Q, Shaw N, et al. Studies on inhibition of proliferation of enterovirus-71 by compound YZ-LY-0[J]. Int Biol Sci, 2015, 11(11):1337-1347.
- [3] 顾红岩, 李兴旺. EV71 和 CoxA16 病毒的区别与联系[J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(1):132-136.
- [4] Lin JY, Shih SR. Cell and tissue tropism of enterovirus 71 and other enterovirus infections[J]. J Biomed Sci, 2014, 21:18.
- [5] Huang PN, Lin JY, Locker N, et al. Far upstream element binding protein 1 binds the internal ribosomal entry site of enterovirus 71 and enhances viral translation and viral growth[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(22):9633-9648.
- [6] Chang GH, Lin L, Luo YJ, et al. Sequence analysis of six enterovirus 71 strains with different virulences in humans[J]. Virus Res, 2010, 151(1):66-73.
- [7] 文萍. 肠道病毒 71 型感染的研究概况[J]. 中国当代医药, 2010, 17(4):127-128.
- [8] Ku Z, Ye X, Shi J, et al. Single neutralizing monoclonal antibodies targeting VP1 GH loop of enterovirus 71 inhibit both virus attachment and internalization during viral entry[J]. J Virol, 2015, 89(23):12084-12095.
- [9] Cao YG, Li ZH, Yue YY, et al. Construction and evaluation of a novel bacillus subtilis spores-based enterovirus 71 vaccine[J]. J Appl Biomed, 2013, 11(2):105-113.
- [10] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7):794-797.
- [11] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7):798-801.
- [12] Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Scavenger receptor b2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases[J]. Front Microbiol, 2012, 6(3):32.
- [13] Yamayoshi S, Koike S. Identification of human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection[J]. J Virol, 2011, 85(10):4937-4946.

- [14] Chen P, Song Z, Qi Y, et al. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenger receptor B 2 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9):6406-6420.
- [15] Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection [J]. *Plos Pathog*, 2010, 6(11): e1001174.
- [16] Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, et al. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocyte: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction [J]. *Plos Pathog*, 2013, 9(7):e1003511.
- [17] Kuo RL, Kao LT, Lin SJ, et al. MDA5 plays a crucial role in enterovirus 71 RNA-mediated IRF3 activation [J]. *Plos One*, 2013, 8(5):e63431.
- [18] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11):778-790.
- [19] Gottwein E. Roles of microRNAs in the life cycles of mammalian viruses [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 371:201-227.
- [20] 孙裕平, 马少春, 蒋玉红, 等. 血清免疫球蛋白、补体在手足口病患儿中的改变及其临床意义 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24(5):554-556.
- [21] 彭宏君, 侯学伶, 李祥, 等. 肠道病毒 71 型体外感染人树突状细胞后启动免疫应答反应的研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2014, 28(2):114-116.
- [22] 刘莉, 李青, 冯淑琴, 等. 静注人免疫球蛋白治疗手足口病合并脑炎患儿的疗效观察 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15(30):3516-3518.
- [23] 吕园园, 徐家丽. 手足口病引起免疫学变化及实验室诊断 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10):1114-1116.
- [24] 孙春艳, 徐书珍, 张定荣, 等. 手足口病患儿早期抗炎-促炎机制及免疫功能变化的研究 [J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2014, 10(5):86-89.
- [25] Griffiths MJ, Ooi MH, Wong SC, et al. In enterovirus 71 encephalitis with cardio-respiratory compromise, elevated interleukin1beta, interleukin 1 receptor antagonist, and granulocyte colony-stimulating factor levels are markers of poor prognosis [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(6):881-892.
- [26] Wang SM, Lei HY, Liu CC. Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012:876241.

(上接第 99 页)

- [15] Chang MH. Prevention of hepatitis B virus infection and liver cancer [J]. *Recent Results in Cancer Research*. 2014, 193:75-95.
- [16] Lee SC, Lim SG, Soo R, et al. Lack of somatic mutations in EGFR tyrosine kinase domain in hepatocellular and nasopharyngeal carcinoma [J]. *Pharmacogenetics & Genomics*, 2006, 16(1):73-74.
- [17] Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. Absence of EGFR mutation in the kinase domain in common human cancers besides non-small cell lung cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2005, 113(3):510-511.
- [18] Longatto-ilho A, Pinheiro C, Martinho O, et al. Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(1):212.
- [19] Taguchi T, Tsukuda M, Imagawa-Ishiguro Y, et al. Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines to gefitinib [J]. *Oncology Reports*, 2008, 19(1):65-71.
- [20] Shintani S, Matsuo K, Crohin CC, et al. Intragenic mutation analysis of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in malignant human oral keratinocytes [J]. *Cancer Research*, 1999, 59(16):4142-4147.
- [21] Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(8):855-860.
- [22] Young-Chul K, Kyu-Sik K, In-Jae O, et al. Abstract B43: SNP Q787Q of EGFR gene and efficacy of EGFR-TKI in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18.

血浆甲基化 *Septin9* 基因: 一个有潜力的结直肠癌早期筛查标志物

陈纪飞 戴盛明*

[摘要] *Septin* 是一类进化上高度保守的细胞骨架蛋白基因家族, 具有 GTP 酶 (guanosine triphosphatase, GTPase) 活性。家族内的 *Septin9* 基因参与细胞分裂、胞吐作用、细胞极性、细胞迁徙、DNA 修复等多种生理活动。近年, *Septin9* 基因与肿瘤发生发展中的关系受到广泛关注, 甲基化的 *Septin9* 基因 (methylated *Septin9* gene, mSEPT9) 被证实为结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 重要的表观遗传学改变。本文综述了目前常见的几种 *Septin9* 基因甲基化检测方法及其对不同种类样本的检测状况, 探讨了其在结肠癌早期筛查中的潜在应用价值。

[关键词] *Septin9*; 甲基化; 结肠癌; 早期筛查

Methylated plasma *Septin9* gene: a potential marker in colorectal cancer screening

CHEN Jifei, DAI Shengming*

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

[ABSTRACT] *Septin* belongs to a highly conserved cytoskeletal protein gene family, which has guanoinetriphosphatase (GTPase) activity. As one of the family members, *Septin9* is involved in cell division, exocytosis, polarity, migration, DNA repair, and other physiological activities. In recent years, the relationship between the *Septin9* gene and tumor development has received extensive attention. Methylation of the *Septin9* gene (mSEPT9) was confirmed to be an important epigenetic change in colorectal cancer (CRC). In this study, some mSEPT9 detection methods and conditions for detecting mSEPT9 in a variety of sample types are summarized, and the potential application value of mSEPT9 in CRC screening are discussed.

[KEY WORDS] *Septin9*; Methylation; Colorectal cancer(CRC); Early screening

2013 年全世界有 100 万新诊断的结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者^[1], 约 60 万患者死于 CRC, 其主要原因是早期临床症状不明显, 大多数患者确诊时已属中晚期, CRC 的筛查率亟待提高^[2]。目前最常用的 CRC 筛查手段为结肠镜和粪便潜血实验/粪便免疫化学检测^[3], 这两种检测方法相对有效, 作为早期的筛查手段, 其可以显著降低 CRC 的死亡率^[4-5]; 但利用率都不高^[6], 主

要是因为患者对结肠镜的花费和肠道准备的不依从, 以及粪便潜血实验的干扰因素多、特异性较低等。为改善相对低的筛查率, 肿瘤特异性 DNA 的基因学及表观遗传学检测受到关注, 其对应的样本为粪便、血清或血浆, 侵袭性较低, 依从性较高^[2, 7-8]。

哺乳动物正常细胞中大约 60% 编码基因中的 CpG 岛 (CpG islands, CGI) 不会甲基化, 然而在人

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

类几乎所有类型的癌症中,都存在相关基因的异常甲基化,并引起下游基因的异常表达^[9-11],其中有些具有明显的特异性,如CRC中甲基化的 *Septin9* 基因(methylated *Septin9* gene, mSEPT9)^[12-13]等。有研究者通过对比正常结肠上皮与CRC组织样本的相关候选生物标志物,发现超过90%的癌组织存在 *Septin9* 基因的异常甲基化^[14]。本文以 mSEPT9 在CRC的高特异性为切入点,通过对比几种目前应用较广泛的基因甲基化检测方法以及不同种类样本之间 mSEPT9 的检出差异,寻找一种依从性好、筛查比率高的CRC早期筛查诊断方法,即血浆甲基化 *Septin9* 基因检测方法。

1 *Septin9*基因简介

Septin9 基因最早发现于正混合系白血病基因(mixed lineage leukemia, MLL)的融合产物中^[15],随后发现在散发性的卵巢癌中高频缺失^[16],而在乳腺癌中却高表达^[17],从而推测该基因在癌症中既可作为癌基因,也可作为抑癌基因。*Septin9* 基因由219 kb组成,包含大量的CGI,存在18种不同的转录形式,编码15种异构体,编码与细胞微丝结构及细胞骨架相关的三磷酸鸟苷结合蛋白^[18-21]。该基因在人体中广泛表达且存在明显的组织表达特异性^[22];不过,由于其表达调控机制极其复杂,至今未能完全了解。

Wasserkort 等^[23]利用激光捕获显微切割获取了正常的结肠组织细胞、结肠腺瘤细胞以及CRC组织的上皮和基质细胞,随后用亚硫酸氢直接测序法,对该基因内、外的4个CGI共8个扩增子(amplicon, Amp)的甲基化状况分别进行了检测及对比分析,其中CGI3又包含Amp 4~7。结果发现,肿瘤组织与正常组织的甲基化差异高达80%,且这种甲基化主要发生于CGI3的Amp5内,这与最近在欧洲应用于临床的Epi proColon[®] test (m*Septin9* 检测试剂盒)所选择的位点一致,且甲基化差异由正常到腺瘤再到CRC阶段有逐步增高的趋势。

2 mSEPT9的检测方法

DNA甲基化的检测手段繁多,总的来说,可以根据样本预处理不同分为3大类,分别为酶消化法、亲和富集法、重亚硫酸盐转化法^[24]。目前针对于CRC样本的mSEPT9检测主要为重亚硫酸盐转

转化法,其中又以Methlight^[25],改良Methlight^[26]方法多见。此外,还有甲基化敏感高分辨率溶解曲线^[27](methylation-sensitive high resolution melting, MS-HRM),新兴的甲基化特异性PCR联合高压液相色谱^[28-29](methylation-specific PCR-denaturing high performance liquid chromatography, MSP-DH-PLC)及辅助依赖性链式反应^[12](help-dependent chain reaction, HDCR)等方法。

Methlight法即在重亚硫酸盐处理待测DNA片段后,利用特异性实时定量PCR反应进行扩增,以识别完全甲基化的序列,具有敏感度高、模板DNA用量少等特点。改良Methlight法则在原有基础上改用水解探针并增加了一组封闭寡核苷酸以提高分析敏感性。MS-HRM不需要荧光探针,其直接分析引物侧翼序列的所有甲基化位点,相对简单,成本较低,有一定优势,但准确性有待提高。MSP-DHPLC是最近在国内用于基因突变及甲基化检测的一种方法,测试程序较易,敏感性和特异性较高。HDCR法不需要重亚硫酸盐转化,但链式反应中需要特殊设计的辅助性寡核苷酸参与。总之,mSEPT9检测方法较多且还在不断的探索和发展中,目前较为成熟的是Methlight法及依据此法开发的Epi proColon[®] test试剂盒,其他的方法在文献报道中虽也显示出巨大的潜力,但目前仍然处在研究阶段,需要大量的前瞻性研究数据的支持。

3 不同种类CRC样本mSEPT9的检测

3.1 组织样本

关于组织样本mSEPT9检测的相关文献较少,但具有很高的敏感性。其分析敏感性高达88.4%,特异性为93.5%^[30]。由于该样本取样的特殊性,使其在应用时存在依从性差的缺点,且费用相对于病理及潜血试验更高;目前主要用于其他种类样本mSEPT9检测的敏感性验证,在大规模前瞻性研究及未来可能的CRC早期筛查中可能较难应用。

3.2 血浆样本

血浆mSEPT9检测作为一种高特异性、低侵袭性的CRC早期检测方法,因其简单、快速、灵敏等特性,在CRC早期筛查中成为热门,但其诊断敏感性在不同检测方法中存在一定差异(表1)。

表1 不同方法间血浆 mSETP9 检测的敏感性特异性比较
Table 1 Comparison of clinical sensitivity and specificity among different plasma mSETP9 detection methods

方法	敏感性(%)	特异性(%)
Methllight ^[31,41]	68~72	>80
MS-HRM ^[33]	69	90
Improved Methllight ^[34]	90	88
Epi proColon 2.0 CE*	81	97

*数据来自 Epigenomics AG Epi proColon 2.0 CE 试剂盒说明书的诊断敏感性及其特异性性能验证试验

CRC 的发生与环境因素高度相关^[29], 中国人群 CRC 患者 mSETP9 的甲基化状况是否与国外文献报道一致? 国外已应用于临床的血清 mSETP9 检测试剂盒是否适用于中国人群? Su 等用 MSP-DHPLC 研究发现, SEPT9 基因在中国人群 CRC 患者中也存在高度甲基化^[30]。He 等用 Methllight 法对 182 例中国人群 CRC 患者血浆 mSETP9 进行检测, 其分析敏感性为 75%^[31]。而另有报道指出^[13, 32-33], 应用 Methllight 的一种检测方法 (the abbott realtime mS9 colorectal cancer assay system) 对韩国 CRC 患者进行 mSETP9 检测时, 发现分析敏感性仅 36.6%; 虽具有 90.6% 的高特异性^[34], 但仍与我国以及欧美国家应用 Methllight 法得到的 50%~90% 分析敏感性相差很大。结果提示 *septin9* 的甲基化模式可能存在一定的种族差异性, 需要进一步探索。

3.3 粪便样本

CRC 患者的粪便中含有脱落的正常结直肠上皮细胞、结直肠癌组织脱落的癌细胞及游离的 DNA, 加之肠道的碱性环境, 理论上由粪便样本提取的 DNA 与血浆样本相比, 应具有更高的含量和质量。因此, 粪便样本 mSETP9 的检测可能具有较高的敏感性。赵慧霞等应用多重置换扩增结合巢式甲基化特异性 PCR^[35] 及 nMSP 结合 DHPLC^[36] 的方法分别检测了 126 例和 87 例 CRC 患者粪便 mSETP9 的甲基化水平, 其分析敏感性达到 82%~85%, 特异性 92%~100%。而 Carmona 等^[37] 应用 GoldenGate 基因分型芯片的方法对 87 例 CRC 患者粪便样本中的 5 种标志物 (AGTR1, WNT2, SLIT2, VIM 和 SEPT9) 进行了检测, 前三者敏感性达到了 78%, 相比之下, mSETP9 却只有 20%。粪便样本的 mSETP9 检测可能具有很好的特异性及

敏感性, 但是不同方法间的差异较大, 仍然有较多的技术问题需要解决。

4 mSETP9 检测在结直肠癌筛查中的应用

Septin9 基因 5' 端调控区 CpG 岛的甲基化与结直肠癌高度相关, 高甲基化发生率在 90% 以上, 相比于正常的癌旁或结肠组织有明显统计学差异, 具有较高的特异性, 已成为结直肠癌的早期诊断分子标志之一。国内外学者通过不同的检测手段对 CRC 患者外周血游离 DNA 进行的 mSETP9 检测, 在 CRC 诊断上获得了较为一致的高敏感性和特异性, 并且现今在欧洲也有基于 Methllight 法的血清 mSETP9 检测试剂盒 Epi proColon 上市。在超过 3 000 份的受检血浆样本中, CRC 检出率为 60%~70%^[32, 38]。2010 年 Digestive Disease Week conference 发布了对接近 8 000 名无症状患者血浆 mSETP9 检测的前瞻性研究结果, 显示 mSETP9 检测可以检出 67% 的 CRC 患者, 假阳性率为 11%^[39]。在对该项检测相对于现有筛查项目的性价比 (Cost-effectiveness) 进行对比时^[40], 发现尽管该项检测的花费要高于现有筛查项目, 但却可以显著提高早期筛查人口的比例^[41], mSETP9 检测作为早期筛查项目显示出了巨大的临床应用价值。

最近 Ahlquist^[33] 等发现, CRC 患者粪便中非 *septin9* DNA 分子标志物 (Methylated BMP3, NDRG4, vimentin, TFPI2, mutant KRAS) 对临床前患者的检测敏感性较血浆 mSETP9 的检测的敏感性更高, 并指出, 在进展期腺瘤及早期的 CRC 筛查检测中, 血浆 mSETP9 缺乏相对高的敏感性。Church 等^[42] 发表的文章中同样也指出此点。这使得与现有的 CRC 筛查策略相比, 血浆 mSETP9 的检测在临床前患者筛查中的应用就明显处于性价比劣势^[24]。

5 小结

如何将 mSETP9 这一高特异性的 CRC 表观遗传改变应用于临床, 又如何优化其检测技术、提高其敏感性, 成为学者们思考的主要问题。与此同时, 也有相关文献指出^[13, 25-26, 38], 在有远处转移及预后较差的 CRC 患者中, 血浆 mSETP9 检测具有更高的阳性率, 且 mSETP9 阳性的患者无病生存率也明显低于阴性患者, CRC 患者根治术前 mSETP9

阳性的患者其复发的几率也明显高于阴性者。在未来,血浆 mSETP9 检测不仅有可能显著提高 CRC 患者早期筛查率,而且可能在该病的预后评价、随访、根治术后复发风险评估中也占有一席之地。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Kuipers EJ, Rosch T, Bretthauer M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(3): 130-142.
- [3] U.S. preventive services task force. Colorectal Cancer: Screening [EB/OL]. <http://www.uspreventiveservices-taskforce.org/Page/Document/Recommendation-StatementFinal/colorectal-cancer-screening>, 2008-10-01/2015-06-18.
- [4] Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood[J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(19): 1365-1371.
- [5] Mandel JS, Church TR, Bond JH, et al. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(22): 1603-1607.
- [6] Joseph DA, King JB, Miller JW, et al. Prevalence of colorectal cancer screening among adults—behavioral risk factor surveillance system, United States, 2010 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2012, 61(Suppl): 51-56.
- [7] Creeden J, Junker F, Vogel-Ziebolz S, et al. Serum tests for colorectal cancer screening [J]. *Mol Diagn Ther*, 2011, 15(3): 129-141.
- [8] Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(2): 248-256, e25-e26.
- [9] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(6): 415-428.
- [10] Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7): 687-692.
- [11] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(21): 2042-2054.
- [12] Rand KN, Young GP, Ho T, et al. Sensitive and selective amplification of methylated DNA sequences using helper-dependent chain reaction in combination with a methylation-dependent restriction enzymes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(1): e15.
- [13] Toth K, Sipos F, Kalmar A, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers [J]. *Plos One*, 2012, 7(9): e46000.
- [14] Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(2): 414-423.
- [15] Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23; q25) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6428-6433.
- [16] Russell SE, Mcilhatton MA, Burrows JF, et al. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4729-4734.
- [17] Montagna C, Lyu MS, Hunter K, et al. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2179-2187.
- [18] Estey MP, Kim MS, Trimble WS. Septins [J]. *Curr Biol*, 2011, 21(10): R384-R387.
- [19] Sandrock K, Bartsch I, Blaser S, et al. Characterization of human septin interactions [J]. *Biol Chem*, 2011, 392(8-9): 751-761.
- [20] Mcilhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3 [J]. *Oncogene*, 2001, 20(41): 5930-5939.
- [21] Peterson EA, Petty EM. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease [J]. *Clin Genet*, 2010, 77(6): 511-524.
- [22] Scott M, Hyland PL, Mcgregor G, et al. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours [J]. *Oncogene*, 2005, 24(29): 4688-4700.
- [23] Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 398.

- [24] Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3):191-203.
- [25] Devos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(7):1337-1346.
- [26] Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer [J]. *BMC Med*, 2011, 9:133.
- [27] 王侦, 陈嘉昌, 何琼, 等. MS-HRM 检测游离甲基化 SEPT9 在结直肠癌早期诊断中的应用 [J]. *广东医学*, 2012(12):1732-1734.
- [28] Divine KK, Liechty KC, Crume KC, et al. Nested multigene MSP/DHPLC method for analyzing promoter hypermethylation status in clinical samples [J]. *Biotechniques*, 2006, 40(1):40, 42, 44.
- [29] Hall EH, Crowe SE. Environmental and lifestyle influences on disorders of the large and small intestine: implications for treatment [J]. *Dig Dis*, 2011, 29(2):249-254.
- [30] Su XL, Wang YF, Li SJ, et al. High methylation of the SEPT9 gene in Chinese colorectal cancer patients [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2):2513-2520.
- [31] He Q, Chen HY, Bai EQ, et al. Development of a multiplex methylLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 202(1):1-10.
- [32] Tanzer M, Balluff B, Distler J, et al. Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions [J]. *Plos One*, 2010, 5(2):e9061.
- [33] Ahlquist DA, Taylor WR, Mahoney DW, et al. The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(3):272-277.
- [34] Lee HS, Hwang SM, Kim TS, et al. Circulating methylated septin 9 nucleic acid in the plasma of patients with gastrointestinal cancer in the stomach and colon [J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(3):290-296.
- [35] 赵慧霞, 李秋文, 董伟伟, 等. 粪便 SEPT9 基因甲基化检测在结直肠癌早期诊断中的应用研究 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012(10):2599-2602.
- [36] 赵慧霞, 李秋文, 董伟伟, 等. nMSP-DHPLC 检测粪便 SEPT9 基因甲基化及其在结直肠癌诊断中的应用 [J]. *军事医学*, 2012(5):388-391.
- [37] Carmona FJ, Azuara D, Berenguer-Llargo A, et al. DNA methylation biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6(7):656-665.
- [38] Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay [J]. *Plos One*, 2008, 3(11):e3759.
- [39] Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective clinical validation of an assay for methylated SEPT9 DNA in human plasma as a colorectal cancer screening tool in average risk men and women 50 years and older [J]. *Digestive Disease Week*, 2010, 1(5):LB-711d.
- [40] Ladabaum U, Allen J, Wandell M, et al. Colorectal cancer screening with blood-based biomarkers: cost-effectiveness of methylated septin 9 DNA versus current strategies [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013, 22(9):1567-1576.
- [41] Adler A, Geiger S, Keil A, et al. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in Germany [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14:183.
- [42] Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer [J]. *Gut*, 2014, 63(2):317-325.

· 综述 ·

三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 基因单核苷酸多态性与痛风发病的相关性

闻海丰¹ 宋春蒙¹ 石豪妍² 温婵³ 秦瑾⁴ 冯忠军^{1*}

[摘要] 尿酸代谢异常被看作是高尿酸血症和痛风的主要病因之一,尿酸盐转运蛋白的功能异常是导致尿酸代谢异常的最主要原因,其影响了肾脏对尿酸的重吸收和排泄功能。近年来三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)作为最受关注的尿酸盐转运蛋白,得到国外国内学者的较多研究报道。ABCG2 定位在细胞膜,表达在近曲小管上皮细胞刷状缘侧,可以转运尿酸。其功能性障碍阻碍了肾脏和肠道对尿酸的排泄,从而引起高尿酸血症并引发痛风。本文就 ABCG2 基因单核苷酸多态性与痛风发病相关性的研究进展作一综述。

[关键词] 痛风;高尿酸血症;尿酸盐转运蛋白;ABCG2

The correlation of ATP-binding cassette transporter G2 gene single nucleotide polymorphism and gout

WEN Haifeng¹, SONG Chunmeng¹, SHI Haoyan², WEN Chan³, QIN Jin⁴, FENG Zhongjun^{1*}

(1. Laboratory, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050051; 2. Laboratory, the First Hospital of Yongnian County, Handan, Hebei, China, 057150; 3. Infection Control Department, Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei, China, 050051; 4. Infection Control Department, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050051)

[ABSTRACT] Abnormal uric acid metabolism is the main cause of hyperuricemia and gout. A variety of urate transporters affect the absorption and excretion of uric acid. In recent years, scholars have paid close attention to the ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2). ABCG2 is expressed on the cell membrane and in the brush border of the epithelial cells lining the proximal convoluted tubule and can transport uric acid. The functional obstacle hampering the kidney and intestine in the excretion of uric acid, causes high blood uric acid and gout. In this review, the research progress of the correlation between ABCG2 gene single nucleotide polymorphisms and the incidence of gout will be reviewed.

[KEY WORD] Gout; Hyperuricemia; Urate transporters; ABCG2

痛风是一种单钠尿酸盐(monosodium urate monohydrate, MSU)结晶沉积引起的一组临床症候群,绝大多数见于30~40岁以上的男性,男性占

95%,而女性多见于绝经后,占5%^[1]。一般认为痛风的前奏是高尿酸血症(hyperuricemia, HUA),当血尿酸浓度过高或酸性环境下,尿酸可析出结

基金项目:河北省卫生厅重点科技研究研究计划(20150271)

作者单位:1. 河北医科大学第三医院检验科,河北,石家庄 050051

2. 河北省永年县第一医院检验科,河北,邯郸 057150

3. 河北省儿童医院感控科,河北,石家庄 050051

4. 河北医科大学第三医院感控科,河北,石家庄 050051

*通讯作者:冯忠军, E-mail: fz702@sina.com

晶,沉积在骨关节、肾脏和皮下等组织,造成组织病理学改变,导致痛风性关节炎、痛风肾、痛风石等。尿酸是嘌呤代谢的终产物,因此代谢紊乱是导致高尿酸血症的直接原因。有研究表明尿酸排泄障碍是引起高尿酸血症的主要原因,其中尿酸转运蛋白作为嘌呤代谢过程中的重要环节和关键载体,它的表达异常和功能障碍是引起尿酸排泄障碍的主要原因^[2]。尿酸盐转运蛋白基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是影响尿酸盐转运蛋白表达和功能的重要因素。近年来国内外学者对痛风及高尿酸血症的发病机制和尿酸盐转运蛋白不断的研究,特别是对三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)的研究不断深入。本文对尿酸盐转运蛋白,特别是ABCG2基因多态性与痛风发病相关性研究进展做一个综述。

1 痛风的发病机制

临床上仅有部分高尿酸血症发展为痛风,痛风的确切发病机制目前仍未明确,其临床特点为高尿酸血症,临床上HUA患者发展为痛风性关节炎的比例不足20%,而且个别痛风患者发病时尿酸水平并没有明显升高,表明痛风发病与高尿酸血症并不能完全等同,高尿酸血症仅是痛风发病的基础条件之一^[3]。

目前普遍认为引起痛风发病的可能发病因素有遗传因素、饮食因素和不良生活习惯、性别和年龄、疾病因素、药物因素等。一般男性和绝经后女性血尿酸 $>420 \mu\text{mol/L}$ (7.0 mg/dL),绝经前女性 $>350 \mu\text{mol/L}$ (5.8 mg/dL)可诊断为高尿酸血症。中老年男性如出现特征性关节炎表现、尿路结石或肾绞痛发作,伴有高尿酸血症应考虑痛风。关节液穿刺或痛风石活检证实为尿酸盐结晶可做诊断。

2 痛风与尿酸盐转运蛋白

高尿酸血症是痛风发病的基础条件之一,它的形成主要是由于尿酸代谢异常即尿酸生成增多和排泄减少引起的。尿酸作为嘌呤代谢的终产物,其中90%来源于内源性途径,由体内氨基酸、核苷酸及其它小分子化合物合成,或由核酸分解代谢产生;10%来自于外源性途径,从富含嘌呤或核蛋白的食物中由核苷酸分解而来。另外,尿酸

排泄障碍也是引发高尿酸血症的重要因素,其中体内2/3的尿酸由肾排出,分4个经典步骤,包括肾小球滤过,肾近曲小管重吸收,肾小管分泌及分泌后重吸收,最后仅有8%~12%的尿酸被排出体外^[4]。肾小管上皮细胞顶端膜和基底膜上存在多个参与尿酸重吸收和分泌的转运蛋白和离子通道,整个过程中只有肾小球滤过,不需要依赖于尿酸盐转运蛋白参与,其它环节均需要依赖肾小管上皮细胞分布的尿酸盐转运蛋白的协助^[6],肾脏近曲小管对尿酸的重吸收增加或分泌减少,是造成尿酸排泄减少的主要原因。当由于各种原因导致尿酸重吸收转运蛋白功能上调或尿酸排出转运蛋白功能下调时,通过肾脏排出的尿酸减少,血尿酸水平升高,导致一过性或持续性高尿酸血症,从而引发痛风。尿酸转运蛋白主要分为尿酸重吸收转运蛋白和尿酸排出转运蛋白2大类,而ABCG2蛋白就属于尿酸排出转运蛋白的一种。ABCG2蛋白也来源于ABC家族,是一种必须以同型二聚体为活化形式的半转运蛋白,主要表达于近曲小管管腔膜侧。Woodward等^[5]研究证实ABCG2是具有离子泵功能的转运蛋白,在肾小管中起到了分泌尿酸的重要作用,是调节体内尿酸水平的一个重要尿酸转运蛋白成分。

3 痛风与ABCG2的相关性

ABCG2是ABC转运(ATP-binding cassette transporter, ABC)超家族的成员,主要表达于近曲小管的管腔膜侧,ABCG2形成同型二聚体后即具备转运尿酸的活性^[9]。ABCG2基因定位于人类染色体4q22-4q23,长67 171 bp,编码655个氨基酸,相对分子量72 343。ABCG2蛋白具有5个横跨膜螺旋结构域和1个单独的ATP结合域。对于ABCG2的早期研究主要集中在与肿瘤多重耐药的相关性,其中有Doyle等^[7]在乳腺癌细胞系MCF-7/Adr^{vp}3000中发现ABCG2蛋白表达;Bran-gi等^[8]在抗米托蒽醌的结肠癌细胞株S1-M1-80中发现ABCG2蛋白表达。而近年来的研究又发现ABCG2蛋白在尿酸转运方面发挥重要作用^[5]。

3.1 ABCG2基因的表达调控

ABCG2蛋白在人体的胎盘、咽、膀胱、脑、小肠和肾脏都有表达。通过对ABCG2基因在体内转录和表达的研究^[17]发现:在ABCG2基因序列上游存在一个过氧化物酶体激活受体g(peroxisome pro-

liferator-activated receptor g, PPAR γ)反应元件,在 *ABCG2* 基因启动子区域存在 2 个顺式作用元件,分别为雌激素反应元件^[11]和低氧反应元件^[12],这些基因表达调控结构共同发挥作用,调控 *ABCG2* 基因的表达水平。

3.2 *ABCG2* 基因多态性的研究进展

对 *ABCG2* 的研究发现,*ABCG2* 在机体内可能具有多种生物学功能:*ABCG2* 可能参与了血脑屏障、胎盘屏障、血睾屏障等功能的实现,参与体内多处结构对某些药物的通过性调节,影响药代动力学,维持内环境稳态;*ABCG2* 还可能与某些疾病的易感性密切相关。最初对 *ABCG2* 转运蛋白的研究主要集中于其与肿瘤相关的范围,研究发现,*ABCG2* 具有跨膜药物泵的功能,影响某些抗肿瘤药物的药代动力学^[18]。*ABCG2* 的高水平表达,可促进内源性物质和多种抗肿瘤药物等的转运,导致 *ABCG2* 跨膜药物外排泵作用增强,限制了脑、胎盘和睾丸等组织对药物的摄取能力,同时也提高了肝细胞、肠上皮细胞、肾小管细胞等部位的药物清除能力。近年来 *ABCG2* 作为主要存在于近曲小管的尿酸盐转运蛋白,引起了各国学者的关注和研究。最早,Woodward 等^[5]在表达了 *ABCG2* 蛋白的非洲爪蟾卵母细胞上计算累积的放射性尿酸清除率,发现细胞内尿酸盐含量显著下降,证实了卵母细胞上表达的 *ABCG2* 蛋白能促进尿酸排泄,降低细胞内的尿酸水平。Matsuo 等^[19]发现,161 名痛风患者中有 80% 的患者出现 *ABCG2* 基因变异,这可能是导致痛风患者体内尿酸排出水平下降,引起体内尿酸水平升高的一个重要原因。研究发现存在 *ABCG2* 基因变异的患者发生痛风的风险是一般人群的 26 倍^[19]。另有多项对 *ABCG2* 的全基因组关联研究证实 *ABCG2* 转运蛋白与体内尿酸水平和痛风发病率之间存在相关性^[20-21]。然后,Huls 等^[22]利用免疫组化技术,发现 *ABCG2* 蛋白在人体肾脏近端小管顶端刷状缘膜处有高水平表达,通过非洲爪蟾实验证实:*ABCG2* 蛋白是一种具有转运尿酸功能的转运蛋白。Hosomi 等^[23]通过氧嗪酸钾构建高尿酸血症小鼠模型,通过实验计算高尿酸血症小鼠模型体内肾脏、肠道和肝脏等各部位的尿酸清除率,实验证实肾脏是尿酸排泄的主要器官,其次是肠道。研究还利用依克立达作为 *ABCG2* 转运蛋白抑制剂,发现依克立达可以明显降低肾脏和肠道

的尿酸清除率,也间接印证了 *ABCG2* 蛋白具有尿酸转运功能。Ichida 等^[24]也以氧嗪酸钾建立高尿酸血症小鼠模型,证实了 *ABCG2* 转运蛋白是一种 ATP 依赖转运蛋白,实验中小鼠摄入 ATP 后,小鼠体内 *ABCG2* 蛋白表达明显上调,与未被摄入 ATP 小鼠相比,体内尿酸排泄量明显增加。实验还对比了 *ABCG2* 基因敲除小鼠与携带 *ABCG2* 基因小鼠体内的血尿酸水平,发现 *ABCG2* 基因敲除小鼠肠道尿酸清除率明显低于携带 *ABCG2* 基因小鼠,*ABCG2* 基因敲除小鼠体内尿酸水平明显高于携带 *ABCG2* 基因小鼠,该实验结果进一步证实 *ABCG2* 蛋白表达或功能障碍可引起体内血尿酸水平升高。Phipps 等^[25]的研究也报告了 *ABCG2* 功能障碍会导致尿酸排出减少,进而引发痛风发病。最新研究发现,*ABCG2* 的基因多态性与痛风发病关系密切,常见的基因变异有 Q141K、Q126X、V12M 等^[10, 16, 26],其中最常见的是 Q141K 变异^[13],Q141K 变异甚至与痛风患者易感的帕金森发病也表现出显著的相关性。

3.3 *ABCG2* 的 SNPs 与尿酸代谢

目前研究认为,*ABCG2* 是影响体内血尿酸水平的重要转运蛋白^[14-15],*ABCG2* 的基因序列存在超过 80 个不同的单核苷酸多态性位点,*ABCG2* 的基因变异种类在所有尿酸转运蛋白中最多最复杂,对血尿酸水平的影响最大,*ABCG2* 基因 SNPs 变异可能会影响其蛋白表达水平、尿酸的转运效率,也可能影响许多药物在体内的药代动力学^[22, 27-28]。有研究报道 *ABCG2* 存在功能性和非功能性的变异体,*ABCG2* 基因 SNPs 与体内 *ABCG2* 尿酸转运蛋白的尿酸转运功能密切相关。Dehghan 等^[32]通过对 *ABCG2* 基因与血尿酸水平进行相关性研究发现,*ABCG2* 基因第 5 个外显子的 421 位点碱基会发生由 C(胞嘧啶)到 A(腺嘌呤)的改变,导致其编码的 141 位氨基酸发生由谷氨酰胺转变为赖氨酸(Q141K),以此发现了 *ABCG2* 的 Q141K 变异(又称 C421A)与高尿酸血症和痛风发生之间存在密切关联,*ABCG2* 的 Q141K 变异是引起 70% 痛风危险的可能原因。Woodward 等^[5]采用全基因组关联研究方法对 14 783 例实验对象进行 *ABCG2* 的 SNP 分析发现,Q141K 突变与血尿酸水平密切相关,*ABCG2* 基因的 Q141K 变异导致尿酸排泄减少 54%,导致尿酸水平升高,从而可能引发痛风,此种影响在男性之中表现更显著,针对欧洲

高加索人群,约有10%痛风患者发病与 $ABCG2$ 基因的Q141K变异有关。Huls等^[22]研究也支持痛风的发生和 $ABCG2$ 基因的Q141K变异之间存在密切关联。Mastuo等^[27]通过诱导变异 $ABCG2$ 基因,成功得到 $ABCG2$ 的V12M、Q126X、Q141K、G268R等多个突变基因型,对比发现 $ABCG2$ 的Q141K突变型相比野生型转运尿酸的能力降低46%, $ABCG2$ 的Q126X、G268R基因突变型相比野生型变成了无功能型变异体,基本丧失转运尿酸能力。实验还检测分析739名日本人的 $ABCG2$ 基因,发现 $ABCG2$ 突变型会导致人体内尿酸排泄减少,导致血尿酸水平上升,引发高尿酸血症和诱发痛风。Maekawa等^[29]研究发现, $ABCG2$ 的SNP的等位基因在日本人群中出现频率较高,其中Q141K发生率为31.9%,V12M为19.2%,Q126X为2.8%。根据哈代-温伯格平衡定律计算出日本人群中53.6%出现Q141K型突变,37.2%出现V12M型突变,5.5%出现Q126X型突变。Huls等^[22]和Phipps^[25]等研究报道:中国人群、新西兰的高加索人群和环太平洋岛国的人群中 $ABCG2$ 的SNP位点Q141K与痛风之间存在相关性。Noguchi等^[30]对东亚人群、高加索人群和非洲人群 $ABCG2$ 的SNPs的研究发现, $ABCG2$ 的SNPs分布在不同人群中表现出显著性差异,Q141K位点中A(腺嘌呤)等位基因频率在中国人群中为29.0%~34.2%,日本人群为30.4%~35.5%,高加索人群为8.7%~11.9%,非洲人群中最为罕见,只有0.9%~5.3%。杨会勇等^[31]对中国南方闽南人群 $ABCG2$ 基因SNPs的研究显示,闽南人群 $ABCG2$ 的SNPs的改变与其痛风发病之间存在明显相关性。中国闽南人群的Q141K位点变异发生率在正常人中达到23.44%,而在痛风患者中达到40%以上,研究认为Q141K位点突变是导致中国南方闽南人高尿酸血症和痛风发生的显著相关因素之一。李发贵等^[32]对中国汉族人群的 $ABCG2$ 基因Q141K位点研究显示,中国汉族人群的 $ABCG2$ 的Q141K位点基因型改变与痛风发病之间存在明显相关性。Jiri等^[33]对中国汉族人群的研究也阐述了 $ABCG2$ 基因SNPs与高尿酸血症的发生之间存在相关性。多项研究表明 $ABCG2$ 基因型的Q141K变异在亚洲人包括中国在内发生率最高。然而相对于国外,我国对 $ABCG2$ 基因SNPs位点与高尿酸血症的相关研究明显滞后,所涉及的SNP位点单一,研

究对象总例数较少,研究对象的覆盖范围较小,均没有很充分的阐明中国汉族人群 $ABCG2$ 基因SNPs与高尿酸血症和痛风之间的关系,且由于痛风是多因素疾病,所以在我国尚需要更多的、更充分的相关研究进行补充。

4 结语与展望

高尿酸血症和痛风是一种至今病因并未明确的复杂疾病,疾病累及人体多个系统。尿酸的分泌和重吸收异常是高尿酸血症的重要发病原因,尿酸转运蛋白在尿酸代谢过程中起着至关重要的作用, $ABCG2$ 转运蛋白是尿酸在肾脏和肠道内转运密切相关的转运蛋白。研究发现 $ABCG2$ 基因的SNP对机体尿酸代谢有重要意义,当今国内外普遍关注精准医疗和个性化医疗的概念与对 $ABCG2$ 的基因组学研究目的是根本一致的。对于 $ABCG2$ 基因SNPs与高尿酸血症关系的研究、 $ABCG2$ 基因SNPs在不同人种间差异的研究、 $ABCG2$ 基因SNPs与高尿酸血症患者的性别和年龄之间关系的研究等都可能更进一步揭示高尿酸血症的病因学等问题,为高尿酸血症和痛风等疾病的预防、早期诊断和治疗提供新的理论方法和治疗手段。因此,我们还需对 $ABCG2$ 基因所涉及SNPs位点做更多的相关研究补充,结合不断发展的PCR技术和高通量基因测序等技术手段,增加研究对象覆盖范围,更进一步完善 $ABCG2$ 与痛风在基因型上的具体相关性的研究。

参考文献

- [1] 邓娟,贾红.高尿酸血症的流行病学研究现状[J].医学综述,2014,20(6):972-975.
- [2] Takada T, Ichida K, Matsuo H, et al. $ABCG2$ dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion [J]. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2014, 33(4-6):275-281.
- [3] Chilappa CS, Aronow WS, Shapiro D, et al. Gout and hyperuricemia [J]. *Compr Ther*, 2010, 36:3-13.
- [4] 刘伟,刘志刚,罗明琍,等.肾脏有机阴离子转运体在尿酸转运中的作用研究进展[J].安徽医药,2013,20(3):361-364.
- [5] Woodward O. Identification of a urate transporter, $ABCG2$, with a common functional polymorphism causing gout [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(25):10338-10342.

- [6] Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, et al. Molecular physiology of urate transport [J]. *Physiology* (Bethesda, Md.), 2005, 20(2):125-133.
- [7] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(26):15665-15670.
- [8] Matsuo H, Takada T, Ichida K, et al. ABCG2/BCRP dysfunction as a major cause of gout [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2011, 30(12):1117-1128.
- [9] Woodward OM. ABCG2: The molecular mechanisms of urate secretion and gout [J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2015, 309(6):F485-F488.
- [10] Zhou D, Liu Y, Zhang X, et al. Functional polymorphisms of the ABCG2 gene are associated with gout disease in the Chinese Han male population [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5):9149-9159.
- [11] Ee PL, Kamalakaran S, Tonetti D, et al. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(4):1247-1251.
- [12] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(23):24218-24225.
- [13] Matsuo H, Ichida K, Takada T, et al. Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout [J]. *Scientific reports*, 2013, 3:2014.
- [14] 张冰清, 张响, 曾学军. 尿酸转运蛋白是治疗高尿酸血症的新靶点 [J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(11):1582-1585.
- [15] Otero JA, Miguel V, González-Lobato L, et al. Effect of bovine ABCG2 polymorphism Y581S SNP on secretion into milk of enterolactone, riboflavin and uric acid [J]. *animal*, 2016, 10(2):238-247.
- [16] Dankers ACA, Roelofs MJE, Piersma AH, et al. Endocrine disruptors differentially target ATP-binding cassette transporters in the blood-testis barrier and affect Leydig cell testosterone secretion in vitro [J]. *toxicological sciences*, 2013, 136(2):382-391.
- [17] Han X, Gui L, Liu B, et al. Associations of the uric acid related genetic variants in SLC2A9 and ABCG2 loci with coronary heart disease risk [J]. *BMC genetics*, 2015, 16:4.
- [18] Nicolazzo JA, Katneni K. Drug transport across the blood-brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2) [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2009, 9(2):130-147.
- [19] Matsuo H, Takada T, Ichida K, et al. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population [J]. *Science Translational Medicine*, 2009, 1(5):3458-3458.
- [20] Dehghan A, Köttgen A, Yang Q, et al. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study [J]. *Lancet*, 2008, 372(9654):1953-1961.
- [21] Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, et al. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(3):210-215.
- [22] Huls M, Brown CD, Windass AS, et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(2):220-225.
- [23] Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, et al. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2 [J]. *Plos One*, 2012, 7(2):e30456.
- [24] Ichida K, Matsuo H, Takada T, et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia [J]. *Nature Communications*, 2012, 3(1):85-100.
- [25] Phipps-Green AJ, Hollis-Moffatt JE, Dalbeth N, et al. A strong role for the ABCG2 gene in susceptibility to gout in New Zealand Pacific Island and Caucasian, but not Maori, case and control sample sets [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(24):4813-4819.
- [26] Matsuo H, Tomiyama H, Satake W, et al. ABCG2 variant has opposing effects on onset ages of Parkinson's disease and gout [J]. *Annals of Clinical & Translational Neurology*, 2015, 2(3):302-306.
- [27] Matsuo H, Takada T, Ichida K, et al. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout. A function-based genetic analysis in a Japanese population [J]. *Sci Transl Med*, 2009, 1(5):5-11.
- [28] Rizwan AN, Burckhardt G. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(3):450-470.
- [29] Maekawa K, Itoda M, Sai K, et al. Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population [J]. *Drug Metab Pharmacokin*, 2006, 21(2):109-121.

(下转第 146 页)

HIV-1 耐药基因检测的研究进展

陈瑶 吴英松*

[摘要] HIV-1 耐药是影响艾滋病抗病毒治疗效果的主要因素。随着抗病毒疗法的普及和接受治疗者的增多, HIV-1 耐药的问题日益凸显, 使艾滋病治疗面临巨大的挑战。因此, 了解各抗病毒药物治疗引起的 HIV-1 耐药突变位点并及时采用有效方法进行耐药基因检测对临床治疗具有重要指导意义。HIV-1 耐药位点基因型检测方法因其快速准确的特点, 目前是 HIV-1 耐药检测最常用也是最有前景的方法。本文对 HIV-1 耐药位点和耐药基因检测的研究进展做简单综述。

[关键词] HIV-1; 耐药位点; 基因型; 耐药检测

Advances in the drug resistance genotype detection of HIV-1

CHEN Yao, WU Yingsong*

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

[ABSTRACT] Anti-retroviral therapy (ART) can help reduce viral loads and infection-associated morbidity. It can also prolong survival, prevent transmission, and improve clinical outcomes. However, with the spread of ART and increasing numbers of patients receiving treatment, more and more HIV-1 drug resistant strains have appeared, which brings about a great challenge to the therapy of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Therefore, to be familiar with and to detect HIV-1 resistance mutations caused by various anti-virus drugs in a timely manner will be of great significance for clinical treatment. In this review, we will summarize the advances in the detection of HIV-1 resistance mutations and genotypes.

[KEY WORDS] HIV-1; Drug resistance mutation; Genotype; Drug-resistance detection

艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)是由人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的传染病, 目前世界范围内主要流行 HIV-1。HIV 耐药是由于病毒基因发生突变, 使得药物作用靶点的生化特点或者结构特征发生改变, 导致病毒对抗病毒药物敏感性降低, 或者失去敏感性^[1-3]。随着高效联合抗逆转录病毒(highly active antiretroviral therapy, HAART)药物的广泛应用, 导致 HIV-1 病毒发生突变。耐药突变株在药物选择压力下逐渐成为优势病毒株, 导致耐药菌株感染的病例不断出现。因此, 作为帮

助临床医生选择联合用药方案的重要工具, 耐药检测就显得十分重要。目前 HIV-1 耐药检测方法主要有表型检测和基因型检测。其中, 基因型检测因其快速准确的特点, 成为调整治疗方案的首选^[3]。

1 耐药基因的分类

随着抗病毒治疗的发展及新型靶点抗病毒药物的临床应用, 已确定了 200 多个各种类型 HIV-1 耐药相关的基因突变, 它们对于耐药及病毒的生物学特性产生不同程度的影响^[4-5]。其中有不少受

基金项目: 重大传染病创新检测试剂的研制和应用研究(广州市协同创新重大专项, 201400000004-1)

作者单位: 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

到严重的关切,并且已经应用到临床的耐药位点筛查,下表(表1)列出了临床检测常用的HIV-1的耐药基因突变及其针对的药物^[6-13]。临床医生可

通过不同方法检测相应的位点,推测基因突变对临床耐药的影响,从而更好地指导临床药物的选择和调换。

表1 HIV-1 耐药基因检测靶点
Table 1 Targets of HIV-1 drug-resistant gene detection

抗病毒药物	位点名称
核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)	M41L、D67N、K70R、L210W、T215F/Y 和 K219Q/E、K65R、K70E/G/Q、L74V/I、Y115F、Q151M
非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)	V90I、L100I、K101E/P、K103N/S、V106A/M、V108I、E138A/G、V179D、Y181C/I/V、Y188C/H/L、G190A/S/E、M230L
蛋白酶抑制剂(PI)	D30N、V32I、M46I/L、G48V/M、I50V/L、I54V/T/A/L/M、L76V、V82A/T/L/F/S、I84V、N88S、L90M
融合抑制剂 整合酶抑制剂(INSTI)	G36D/E、V38E/A、Q40H N43D、Q148G140S/A 和 E138K/A Q148、G140S/A、E138K/A、N155H ± E92Q、Q148H/R/K ± G140S/A、Y143C/R+T97A
CCR5 拮抗剂	G36D/E/V、V38E/A、Q40H、N42TN43D

2 耐药基因的检测对象和检测时机

对 HIV-1 耐药及其临床意义的认识随着抗 HIV 药物的研发和应用逐步积累和深入。随着耐药菌株的不断出现,不管是新发的患者选择用药,还是治疗中的患者监控用药效果,都需要进行耐药性检测。

初始抗病毒治疗的患者应进行耐药检测,以指导并制定抗病毒治疗方案。已经证实耐药 HIV-1 毒株能够传播,因此现如今的观点是,从未治疗过的患者也可能携带耐药毒株,这将导致对初始治疗方案的无应答或应答差。对这类患者进行耐药检测有助于选择能够取得最大病毒抑制效果的治疗方案^[14]。在治疗过程中,对于接受抗病毒治疗的患者在改变抗病毒治疗方案时,病毒学应答失败(HIV-1 RNA > 1 000 copies/mL)或病毒抑制不理想时,耐药监测是判断是否发生耐药以及耐药类型,从而指导药物选择和调换进行后续治疗的必须手段^[15-16]。

目前耐药性检测有两种方法,一种是表型耐药分析,需要对病毒进行体外培养,时间较长,操作繁复,价格昂贵。因此基因检测的快速准确的特点让其越来越成为临床指导药物选择的重要手段。尤其是在对抗病毒联合治疗效果不好,病毒

学应答失败的患者的药物调整的过程中,快速准确的基因治疗有利于快速指导药物选择和调换^[15-16]。

3 HIV-1 耐药基因检测的常用方法

3.1 等位基因特异扩增 PCR (Allele-specific PCR, AS-PCR) 方法

AS-PCR 是一种基于单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)的 PCR 标记方法。上世纪 90 年代首次报道使用 AS-PCR 方法检测 HIV-1 耐药突变,后经技术改良,该方法已越来越成熟,具有高灵敏度和准确度,重复性好,较为省时省力,快速且经济实惠,也可检测变异率低于 1% 的病毒准种等特点。Hunt 等^[17]采用 AS-PCR 和深度测序法同时检测了 105 例使用奈韦拉平预防失败的 HIV-1 感染患儿,两种方法均可检测到低水平的变异株,本研究发现两种方法检测突变位点 Y181C 和 K103N 的相关系数分别为 0.94 和 0.89。但该方法存在一些不足,即需知道变异位点在核酸的具体位置;若引物或探针结合位点处出现多态性可显著降低该方法的准确性。另外,为了确保扩增效率相同,AS-PCR 要求引物退火位置相同。这局限了这种方法应对不断出现的新的耐药位点,不利于临床综合判断解释耐药检测的结果。

3.2 限制性片段质谱多态性技术(restriction fragment mass polymorphism, RFMP)

限制性片段长度多态性技术的原理是检测DNA在限制性内切酶酶切后形成的特定DNA片段的大小,该技术将基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术结合,根据被测物质的相对分子质量进行定量检测。该方法敏感,准确,重复性好,能够发现数量不足1%的变异株。Lee等采用该技术检测100份血浆标本,并与Sanger测序法进行比较,发现RFMP方法要求的病毒载量水平更低,两种方法在检测逆转录酶和蛋白酶编码区的K65R、T69Ins/D、L74V/I、V106A/M、Q151M、Y181C、M184V/I、T215Y/F、D30N、M46I、G48V、I50V、I54L/S、V82A、I84V、L90M等位点时的一致性均 $\geq 94\%$ ^[18]。但该方法仅能检测已知位点变异,且价格昂贵,很难在临床推广应用。

3.3 基因芯片技术

基因芯片技术是将大量特定的基因片段或寡核苷酸片段作为探针有序和高密度地排列,固定在玻璃或膜等载体上,然后与待测有标记的样品核酸按碱基配对的原则杂交然后检测结果。它借助荧光标记进行扫描观察,通量高,可实现大量SNP的检测。据报道,学者采用本方法共检测了来自瑞士和坦桑尼亚人群的HIV-1基因组片段序列,共获得2 550个SNP,与Sanger测序的一致性为92.7%^[19]。本方法同样主要针对已知变异位点,现随着基因芯片高通量测序技术的发展,也可用于检测未知变异位点。但本方法的成本高,受实验条件所限,尚不能在实验室普及开展。

3.4 Sanger测序法

随着测序技术不断深入各级实验室,许多分子生物实验室具备Sanger测序的条件,其价格合理,且可用于自建方法分析,该方法已经作为HIV-1耐药检测的主要技术平台和金标准,在临床和科研中均已被采用。目前基于该技术原理已产生了两种成熟的用于HIV-1耐药检测的商业化系统TRUGENE™和ViroSeq™以及实验室自建的In-house检测方法。耐药性的分析需要通过在线数据库完成,即用户将测序序列提交到数据库便可直接得到耐药突变分析结果。该方法便捷,但在碱基判读时设定的阈值较高^[20],且灵敏度低,只有

当HIV-1变异株超过准种池的20%时才可被检测到^[21],即低频率的突变易发生漏检,从而低估耐药突变情况,影响耐药监测的结果。

3.5 深度测序

随着测序技术的快速发展,深度测序通量高,已在发达国家广泛应用于HIV-1耐药检测。该方法可精确检测到只发生在1%的HIV-1毒株中的耐药性突变^[22],极大程度提高了检测的灵敏度,因低频突变对高效联合抗反转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)治疗的影响存在争议,比利时学者采用深度测序方法检测了70例接受NNRTI治疗患者的突变位点,发现该方法并不能确证逆转录区出现低频突变与治疗失败的关联性^[23]。有比较发现相同样本采用深度测序可检测到的HIV-1基因型耐药位点数目是Sanger测序法的1.5~3倍^[22]。但深度测序的检测质量受文库构建偏倚的影响,如引物结合位点耐药突变或多样性的出现或PCR扩增效应等。近年来深度测序技术已出现多种平台,其成本也已逐渐降低,不过对于低收入国家来说仍难以负担。此外,该技术前期手工操作步骤多,上机收集的数据量大,目前仍缺乏简单便捷的生物信息学分析流程。因此,深度测序尚不能在各实验室广泛开展应用于HIV-1耐药检测分析。

4 展望

患者服药依从性、药物间的相互作用等均可影响HIV-1耐药的产生。随着抗病毒药物的广泛应用,耐药问题凸显,出现的耐药突变位点极为多样,且突变位点间的相互作用也可引起耐药的发生,从而导致治疗失败。中低收入国家由于可使用的抗病毒治疗药物种类有限,主要存在NRTI、NNRTI耐药现象,约有10%~30%在接受NRTI或NNRTI治疗过程中出现病毒抑制失败,大多因出现了耐药病毒株^[1-2]。虽然PI、INSTI等药物在临床应用尚少,耐药率明显低于欧美发达国家,但随着条件许可,可使用的抗病毒药物逐渐增加。因此,有必要加强了解突变位点与各类耐药的相关性,以助于临床提供准确的治疗方案。此外,HIV-1耐药检测已被发达国家纳入监测指标,它既可为初始抗病毒治疗也可为已出现病毒学抑制失败的后续治疗选择或更换药物提供指导^[3-4]。多数情况下推荐使用基因型检测,因其相对操作简便、省

时、花费少,在野生毒株与耐药毒株混合存在的情况下具有较高的灵敏性。在常见的基因型检测方法中,质谱和基因芯片的方法因为成本较高较少应用于临床。随着成本降低及条件优化,未来传统的标准检测方法有望被深度测序所取代^[21-22]。

总而言之,与其他病毒性疾病的临床检验方法相比,HIV-1 基因型耐药检测的程序复杂,影响因素多,受 HIV-1 固有的高度变异和准种的影响,结果的解释比较困难。检测出耐药基因是一方面,后续复杂和繁琐的生物信息学处理以获得与结果的解释也存在极大的复杂性和难度。存在解释的结果与临床状况不能一致的现象^[19-20]。近年来随着深度测序技术的不断发展关于基因型变异的数据大量积累,前瞻性检验设计和回顾性临床研究的不断发展,将有助于改进分析方法,更好的理解突变、耐药和临床治疗应答 3 方面的关系,为耐药基因检测更好地应用于临床提供更有力的支持。

参考文献

- [1] Sluis-Cremer N, Wainberg MA, Schinazi RF. Resistance to reverse transcriptase inhibitors used in the treatment and prevention of HIV-1 infection [J]. *Future Microbiology*, 2015, 10(11): 1773-1782.
- [2] Rhee SY, Liu TF, Holmes SP, et al. HIV-1 Subtype B Protease and Reverse Transcriptase Amino Acid Covariation [J]. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3(5): e87.
- [3] Tang MW, Shafer RW. HIV-1 Antiretroviral Resistance [J]. *Drugs*, 2012, 72(9): e1-e25.
- [4] Wensing AM, Calvez V, Gunthard HF, et al. 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1 [J]. *Topics in Antivir Med*, 2015, 23(4): 132-141.
- [5] TenoRes Study Group. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(5): 565-575.
- [6] Melikian GL, Rhee SY, Varghese V, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(1): 12-20.
- [7] Codoñer FM, Pou C, Thielen A, et al. Added Value of Deep Sequencing Relative to Population Sequencing in Heavily Pre-Treated HIV-1-Infected Subjects [J]. *PloS One*, 2011, 6(5): e19461.
- [8] Shadrina OA, Zatselin TS, Agapkina YY, et al. Influence of drug resistance mutations on the activity of HIV-1 subtypes A and B integrases: a comparative study [J]. *Acta Naturae*, 2015, 7(1): 78-86.
- [9] Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, et al. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203(9): 1204-1214.
- [10] Geretti AM, Armenia D, Ceccherini-Silberstein F. Ceccherini-Silberstein, Emerging patterns and implications of HIV-1 integrase inhibitor resistance [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2012, 25(6): 677-686.
- [11] Menzo S, Castagna A, Monchetti A, et al. Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to Enfuvirtide during long-term treatment [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(9): 3253-3259.
- [12] Skhosana L, Steegen K, Bronze M, et al. High prevalence of the K65R mutation in HIV-1 subtype C infected patients failing tenofovir-based first-line regimens in South Africa [J]. *Plos One*, 2015, 10(2): e0118145.
- [13] Skhosana L, Steegen K, Bronze M, et al. High prevalence of the K65R mutation in HIV-1 subtype C infected patients failing tenofovir-based first-line regimens in South Africa [J]. *Plos One*, 2015, 10(2): e0118145.
- [14] Rhee SY, Jordan MR, Raizes E, et al. HIV-1 Drug Resistance Mutations: Potential Applications for Point-of-Care Genotypic Resistance Testing [J]. *Plos One*, 2015, 10(12): e0145772.
- [15] Rimsky L, Vingerhoets J, Eygen VV, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates obtained from patients on rilpivirine therapy experiencing virologic failure in the phase 3 ECHO and THRIVE studies: 48-week analysis [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2012, 59: 39-46.
- [16] Lathouwers E, Meyer SD, Dierynck I, et al. Virological characterization of patients failing darunavir/ritonavir or lopinavir/ritonavir treatment in the ARTEMIS study: 96-week analysis. *Antiviral Therapy*, 2011, 16(1): 99-108.
- [17] Hunt GM, Morris L, Moorthy A, et al. Concordance between allele-specific PCR and ultra-deep pyrosequencing for the detection of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations [J]. *J Virol Methods*, 2014, 207: 182-187.
- [18] Lee JH, Hachiya A, Shin SK, et al. Restriction fragment mass polymorphism (RFMP) analysis based on MALDI-TOF mass spectrometry for detecting antiretroviral resistance in HIV-1 infected patients [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(6): E263-270.

- [19] Masimba P, Gare J, Klimkait T, et al. Development of a simple microarray for genotyping HIV-1 drug resistance mutations in the reverse transcriptase gene in rural Tanzania [J]. *Trop Med Int Health*, 2014, 19 (6): 664-671.
- [20] Ji H, Liang B, Li Y, et al. Low abundance drug resistance variants in transmitted HIV drug resistance surveillance specimens identified using tagged pooled pyrosequencing [J]. *J Virol Methods*, 2013, 187 (2): 314-320.
- [21] Garcia-Diaz A, Guerrero-Ramos A, McCormick AL, et al. Evaluation of the Roche prototype 454 HIV-1 ultra-deep sequencing drug resistance assay in a routine diagnostic laboratory [J]. *J Clin Virol*, 2013, 58(2): 468-473.
- [22] Chang MW, Oliveira G, Yuan J, et al. Rapid deep sequencing of patient-derived HIV with ion semiconductor technology [J]. *J Virol Methods*, 2013, 189(1): 232-234.
- [23] Messiaen P, Verhofstede C, Vandebroucke I, et al. Ultra-deep sequencing of HIV-1 reverse transcriptase before start of an NNRTI-based regimen in treatment-naive patients [J]. *Virology*, 2012, 426(1): 7-11.

(上接第 120 页)

- [5] Januszkiewicz - L D, Rucka A, Kowala P, et al. Mutations in Pol gene of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B before and after therapy with nucleoside/nucleotide analogues [J]. *Acta Virol*, 2014, 58(2):185-189.
- [6] Al Baqlani SA, Sy BT, Ratsch BA, et al. Molecular epidemiology and genotyping of hepatitis B virus of HBsAg - positive patients in Oman [J]. *PloS One*, 2014, 9(5):e97759.
- [7] 李艳, 李金明. 乙型肝炎病毒感染底诊疗的个体化检测. 个体化医疗中的临床分子诊断[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:195-209.
- [8] 欧阳耀灵, 胡建兵, 卢亚祖, 等. HBV 基因分型和耐药突变基因检测 [J]. *中国卫生检验志*, 2015, 25 (13):2176-2178.
- [9] 罗杰, 李新华, 杜展, 等. 恩替卡韦初治慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型变化情况 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(23): 3484-3489.
- [10] Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, et al. Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 79(1): 25-30.
- [11] Hamidi - FM, Makvandi M, Samarbaft - ZA, et al. Mutation analysis of hepatitis B virus reverse transcriptase region among untreated chronically infected patients in Ahvaz city (South - West of Iran) [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2013, 31(4):360-365.
- [12] 乙型肝炎病毒耐药专家委员会. 乙型肝炎病毒耐药专家共识:2009年更新 [J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2009, 3(1):43-47.
- [13] Song B, Cui X, Shin J, et al. Response to adefovir depends on mutation patterns in precore region basal core promoter and reverse transcriptase and on - treatment responses in lamivudine - resistant chronic hepatitis B patients [J]. *Intervirology*, 2010, 53(4): 203-210.
- [14] Chen C, Lee C, Tung W, et al. Evolution of full-length HBV sequences in chronic hepatitis B patients with sequential lamivudine and adefovir dipivoxil resistance [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4):478-485.

(上接第 141 页)

- [30] Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, et al. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2) in chemotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(1):26-33.
- [31] 杨会勇, 许超尘, 王清瑶, 等. ABCG2 基因单核苷酸多态性与闽南地区人群原发性痛风相关性研究 [J]. *风湿病与关节炎*, 2013, 2(1):24-28.
- [32] 吴蕾, 何耀, 张迪. ABCG2 基因 rs2231142 位点基因多态性与东亚人群痛风相关性研究的 Meta 分析 [J]. *Chinese journal of Epidemiology*, 2015, 36(11): 1291-1296.
- [33] Jiri M, Zhang L, Lan B, et al. Genetic variation in the ABCG2 gene is associated with gout risk in the Chinese Han population [J]. *Clinical Rheumatology*, 2016, 35(1):159-163.

广州市第一人民医院检验科

广州市第一人民医院是广州市卫生和计划生育委员会下属大型综合性医院,是广州地区医疗、教学、科研、干部保健的重要基地。医院位于越秀山下,流花湖畔,东风西路主干道旁。占地面积约16.25万平方米,医疗业务建筑面积24万平方米,拥有固定资产约14.6亿元。检验科为广东省临床重点专科,广东省“十二五”医学重点实验室(临床分子医学与分子诊断),住院医师规范化培训基地,第三周期广州市医疗卫生机构重点专项,广州市临床检验质量控制中心,全国细菌耐药监测网单位之一。科室共有职工62人,其中取得正高资格专业技术人员10人,副高资格专业技术人员12人;博士7人;博士研究生导师1人,硕士研究生导师3人。检验科总建筑面积2200余平方米,实验室设计和流程科学、布局合理、设备先进齐全,拥有进口的全自动生化分析仪、化学发光仪、血细胞分析仪、全自动微生物培养和鉴定系统、荧光定量PCR扩增仪、全自动酶免分析系统、全自动凝血仪、特定蛋白分析仪、全自动毛细管电泳仪、测序仪、分子杂交系统、糖化血红蛋白分析仪、血红蛋白分析系统、流式细胞仪等先进设备,总价值5000余万元,年产值近2亿元人民币。

我科坚持开展亚专科和专科队伍的建设,加强与国内外合作,以国际最前沿的微流控芯片技术为基础的病原微生物快速检测与耐药研究、肿瘤的早期诊断与耐药研究、个体化医学检测等项目为核心,带动检验科整体临床与科研水平的发展与提高。形成了临床免疫、临床细菌、临床生化、临床血液、个体化分子诊断、急诊检验和临床新技术研究等七个亚专科体系。开设的检验项目齐全,总计约有500多项,可充分满足我院临床诊疗工作需要。已形成的专科业务发展方向有:1.建立了以荧光定量PCR和测序仪等为工具的精准医学分子诊断平台;2.建立了以微流控芯片技术为主体的临床生化、免疫科学研究平台;3.建立基于毛细管微液滴PCR扩增的病原微生物的快速检测与诊断平台;4.纸芯片的研究与产业化;5.初步建立了临床实验室室内质量实时监测与比对平台。

近五年来,科室团队获得国家自然科学基金5项,承担国家863子科技项目以及省市级科研立项10余项、申请国家专利3项、发表SCI论文10篇,最高影响因子为7.9,培养研究生20人。

学科带头人徐邦牢是广州市医学重点人才,医学博士,博士研究生导师,澳大利亚新南威尔士大学博士后,主任技师、教授。现主要研究方向:肿瘤以及感染性疾病的分子诊断。



→ 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