



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

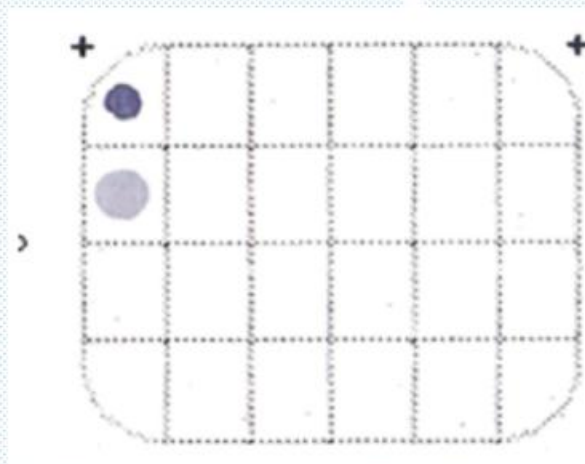
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2016年1月 第8卷 第1期 总第41期

JOURNAL OF

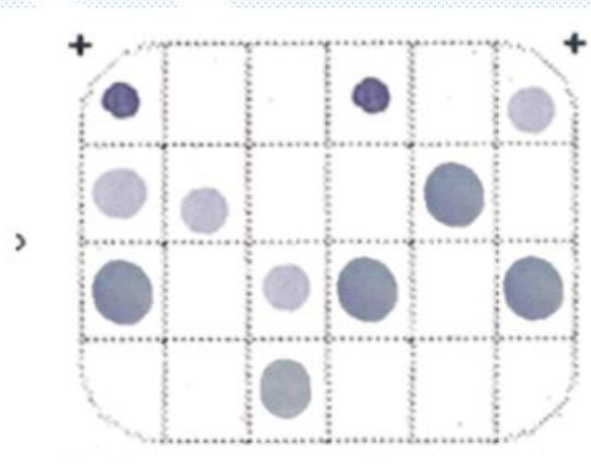
MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 8 Number 1 January 2016



图(P33) HPV-DNA分型阴性对照

Figure(P33) Negative control of HPV-DNA genotyping



图(P33) HPV9重感染(HPV16, HPV33, HPV51, HPV52, HPV56, HPV39, HPV66, HPV42, HPV44)

Figure (P33) 9 types of HPV infection (HPV16, HPV33, HPV51, HPV52, HPV56, HPV39, HPV66, HPV42, HPV44)

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



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收录期刊
中国生物医学期刊引文数据库收录期刊

分子诊断与治疗杂志

二〇一六年一月

第八卷 第一期

中山大学

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016年1月 第8卷 第1期 总第41期 Bimonthly Volume 8 Number 1 January 2016

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司

顾问 来茂德 申子瑜
主编 李明
编辑部主任 徐伟文
编辑部 《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑 邓子华 李晓兰 谭舜菁
排版 钟华安
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 广州中大印刷有限公司
出版日期 2016年1月18日
定价 RMB 15.00元

Responsible Institution *Sun Yat-sen University*
Sponsor *China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.*

Consultant *LAI Maode SHEN Ziyu*
Editor in Chief *LI Ming*
Managing Director *XU Weiwen*
Editorial Office *<JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office*
Editors *DENG Zihua LI Xiaolan TAN Shunjing*
Typesetting *ZHONG Huaan*
Editing *China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.*

Add *10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620*
Tel *(020) 32290177 32290789-206*
Fax *(020) 32290177*

E-mail *jmdt@vip.163.com*

CSSN *ISSN 1674-6929*
CN 44-1656/R

Printing *Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.*
Publish Date *2016.1.18*
Price *RMB 15.00*



刘新光

刘新光，1964年10月出生。1985年毕业于江西医学院临床医学专业，获医学学士学位；1992年毕业于中国协和医科大学生物化学专业，获医学硕士学位；1999年毕业于中山医科大学生物

化学与分子生物学专业，获医学博士学位。

教授，博士生导师。现任广东医学院医学检验学院院长、广东省医学分子诊断重点实验室主任、生物化学与分子生物学研究所所长和衰老研究所所长。担任的学术职务有：中国老年学会衰老与抗衰老科学委员会副主任委员，广东省生物化学与分子生物学学会常务理事，广东省医学会检验分会学常委，《国际老年医学杂志》、《中国药理学通报》和《广东医学院学报》编委。

刘新光于1994年起一直从事蛋白激酶CK2的分子生物学与生化药理学研究。目前研究方向为衰老与老年性疾病的分子机制与分子诊断研究。1999年以来作为项目负责人主持国家自然科学基金3项，省部级科研项目5项和市厅级科研项目9项，参与“973”项目子课题1项。主持的科研成果获广东省科学技术奖二等奖与三等奖各1项和湛江市科技进步一等奖2项。担任省级精品视频公开课《生物化学》和精品资源共享课《临床生物化学及检验》课程负责人，医学检验专业省级教学团队负责人。主持的教学成果获广东省优秀教学成果一等奖和二等奖各1项。2008年获广东省高校教学名师奖，2009年获“全国模范教师”称号。2013年获国务院政府特殊津贴。目前已发表科研论文190多篇，其中SCI收录论文36篇。主编、副主编《生物化学》等教材7部，参编教材11部。指导培养硕士研究生41名，已毕业32名，在读9名。指导培养博士研究生8名，毕业4名，在读4名。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2016年1月 第8卷 第1期

目次

述 评

GPC3在肝癌诊治中的价值及存在问题····· 谢春梅 徐伟文 (1)

论 著

血清GPC3在中国人群和国外人群诊断原发性肝癌的价值:一项基于meta分析的比较研究
····· 银一臻 徐伟文 (7)

4R22修饰的紫杉醇脂质体对肺癌细胞多药耐药的逆转作用
····· 周毅 王赫 朱丽娜 (17)

29例男性乳腺癌临床分析····· 韩娜 王晓稼 (23)

采用ERIC-PCR与PFGE分析鲍曼不动杆菌基因型和同源性并对比方法学差异
····· 闻海丰 冯忠军 秦瑾 等 (27)

乌海市3918例女性HPV基因分型结果的分析····· 武燕红 吕伟 郑海燕 等 (32)

三种实验室检测方法在儿童传染性单核细胞增多症的诊断应用
····· 邓坤仪 彭建明 范汉恭 等 (37)

米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的临床疗效观察····· 王静 (42)

综 述

单基因遗传病基因诊断技术研究进展····· 郭弈斌 梁宇静 郭东炜 (46)

CD-DST技术:为肿瘤细胞量“身”定药····· 徐伟 李文迪 邓天颖 等 (54)

单细胞转录组测序的方法原理及应用····· 朱翔 浦春 武其文 (61)

低密度粒细胞在自身免疫性疾病中的病理生理作用····· 周丽彬 周剑涛 丁海峰 (66)

讲 座

体外诊断试剂临床试验方案的设计要求····· 王嘉明 雷孝锋 李尔华 等 (70)

专家风采

刘新光····· (封二)

实验室巡礼

广东省医学分子诊断重点实验室····· (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 1 January 2016

CONTENTS

COMMENTS

The applications of GPC3 in the diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma as well as its remaining issues

XIE Chunmei, XU Weiwen (1)

ORIGINAL ARTICLES

Significance of circulating glypican-3 in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a comparative study
between the population in China and that from other countries by using meta-analysis

YIN Yizhen, XU Weiwen (7)

Overcoming the drug resistance in lung cancer cells with 4R22-modified paclitaxel liposome treatment

ZHOU Yi, WANG He, ZHU Lina (17)

Clinical analysis of 29 cases of male breast cancer

HAN Na, WANG Xiaojia (23)

Comparison between PFGE and ERIC-PCR for genotyping and homologous analysis of *Acinetobacter baumannii*

WEN Haifeng, FENG Zhongjun, QIN Jin, YU Wenjing (27)

Analysis of HPV genotypes in 3 918 female patients in Wuhai city

WU Yanghong, LV Wei, ZHENG Haiyan, WANG Zhen, PEI Liucheng (32)

Application of 3 laboratory tests in the diagnosis of infectious mononucleosis in children

DENG Kunyi, PENG Jianming, FAN Hangong, YANG Haixia, WU Jianzhuo (37)

Clinical efficacy of mifepristone in the treatment of perimenopausal dysfunctional uterine bleeding

WANG Jing (42)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 1 January 2016

CONTENTS

REVIEWS

Research advance in genetic diagnosis of monogenic inherited diseases

GUO Yibin, LIANG Yujing, GUO Dongwei (46)

Advance of collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test in anticancer chemotherapy:
a personalized medicine in cancer treatment

XU Wei, LI Wendi, DENG Tianying, ZHANG Zhigao, DU Hongyan (54)

Principle and application of single cell transcriptome analysis

ZHU Xiang, PU Chun, WU Qiwen (61)

Pathophysiological effect of low-density granulocytes in autoimmune diseases

ZHOU Libin, ZHOU Jiantao, DING Haifeng (66)

GPC3 在肝癌诊治中的价值及存在问题

谢春梅 徐伟文*

[摘要] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(glypican-3, GPC3)是一种硫酸乙酰肝素糖蛋白,通过糖基化磷脂酰肌醇连接到细胞膜表面。在细胞生长、形态发生和肿瘤发展中有重要作用。近年来的研究表明,GPC3与肝细胞癌的发生、发展关系密切。本文就 GPC3 在肝癌中的作用及作为肝癌肿瘤标志物的研究进展作一综述。

[关键词] GPC3; 肝细胞癌; 肿瘤标志物; 诊断; 靶向治疗

The applications of GPC3 in the diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma as well as its remaining issues

XIE Chunmei, XU Weiwen*

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

[ABSTRACT] Glypican-3 (GPC3), a heparin sulfate proteoglycan, binds to the cell membrane via glycosyl phosphatidyl inositol anchor. It plays a key role in cell growth, morphogenesis and tumorigenesis. Recent studies have demonstrated that GPC3 significantly attributes to the development and progression of hepatocellular carcinoma (HCC). In this article, we review the literatures about the role of GPC3 in hepatic carcinogenesis and the advance in the study of GPC3 as a HCC marker.

[KEY WORDS] Glypican-3; Hepatocellular carcinoma; Tumor markers; Diagnosis; Targeted therapy

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),以下简称肝癌,是全球最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。根据世界卫生组织报告显示,我国肝癌的发病率为25.7/10万,居全球之首,每年新发和死亡患者占全球总数的一半。尽管HCC的治疗水平有了极大提高,但死亡率并无明显改善,5年以上生存率仅为10%左右^[3],其主要原因是肝癌起病隐匿,早期没有症状或症状不明显,又缺乏有效的早期诊断手段,患者就诊时通常已经达到晚期,失去了最佳治疗的机会。因此,早期发现癌变并有效治疗是提高HCC生存期的关键。

甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)及其异质体是目前临床上诊断HCC重要指标和特异性较强的肿瘤标志物,然而在多项研究^[3-6]及实践工作中均

发现,AFP在一些良性肝病、生殖性畸胎瘤、肺癌、妊娠活动期等患者中也可出现升高,临床上大概有30%~40%的HCC患者AFP为阴性,所以存在一定的误诊率和漏诊率。2010版美国肝病研究学会指南已不再将AFP作为筛查指标。因此,临床上迫切需要敏感性高、特异好、重现性好的新肿瘤标志物作为早期诊断肝癌的理想标志物。

目前随着蛋白质组学及基因组学等多种方法的建立与运用,人们发现了可用于HCC辅助诊断的标志物^[6]如磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)、高尔基体蛋白73、 α -L-岩藻糖苷酶、异常凝血酶原等。其中,GPC3在HCC呈特异性高表达,且在早期即可检出,尤其在小肝癌及AFP阴性的HCC患者中阳性率很高^[4,7-8],显示出GPC3对

基金项目:十二五国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA020205);广州市产学研协同创新重大专项(201508020052)

作者单位:南方医科大学生物技术学院,广东,广州510515

*通讯作者:徐伟文, E-mail: xu_sandy2006@126.com

肝癌的诊断与靶向治疗价值。本文就 GPC3 在肝癌中的作用及作为肝癌肿瘤标志物的研究进展作一综述。

1 GPC3 的分子结构

GPC3 (又称 glypican-3, GTR2-2, MXR7, OCI-5, SDYS, SGB, SGBS, SGBS1) 是 1996 年 Pilia 等^[7] 从过度生长综合症中发现的硫酸乙酰肝素聚糖蛋白家族的新成员, 通过糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白连接于细胞表面。GPC3 基因定位于人染色体 Xq26^[8], 该基因组全长 900 kb, 是人类基因组中最长的基因之一。其基本结构^[9] 包含核心蛋白、硫酸乙酰肝素链和糖基化磷脂酰肌醇 3 部分(图 1)。

GPC3 由 8 个外显子和 7 个内含子组成, 5' 端朝向端粒区, 3' 端朝向中心粒区。其启动子区有许多转录因子结合位点^[7-8], 提示 GPC3 表达可能受多种因子调控。GPC3 蛋白前体为 580 个氨基酸残基的蛋白质, 分子量约为 66 kDa; 功能 GPC3 蛋白的羧基末端与糖基化磷脂酰肌醇共价结合连接胞膜上, 氨基末端则游离在细胞外, 其内部有多个二硫键连接, 使其具有球形立体结构。至目前, 已发现 GPC 家族在哺乳动物的基因组包括 GPC1~GPC6 共 6 个成员; 而在果蝇中仅发现有 dally 和 dally-like 两个成员^[10]。

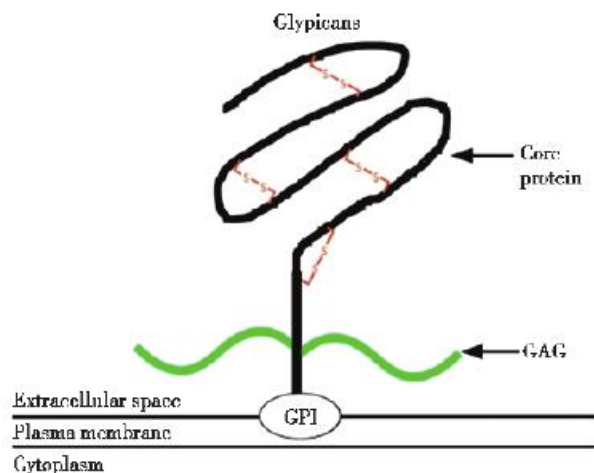


图 1 GPC3 结构示意图^[10]

Figure 1 Structure diagram of GPC3^[10]

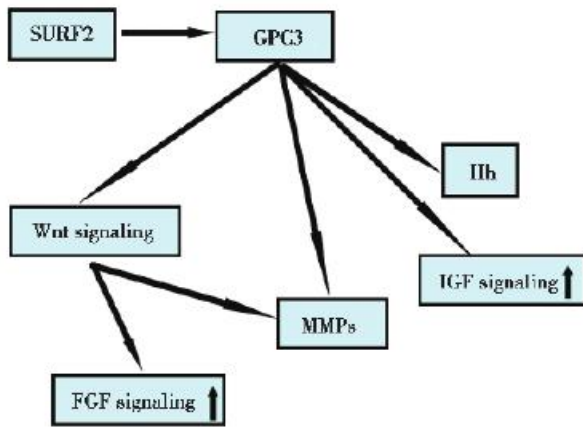
研究发现, 蛋白转换酶 (Furin 酶) 可以水解 GPC3, 酶切位点位于第 358 位精氨酸和第 359 位丝氨酸残基的肽键, 形成一个 30 kDa 的具有 2 条

硫酸乙酰肝素链的 C 亚单位和 1 个 40 kDa 的游离 N 亚单位, N 亚单位进入循环系统后将成可溶性 GPC3 分子 (soluble glypican-3, sGPC3)^[10]。因此, 循环系统中, sGPC3 含量与 GPC3 阳性细胞数量相关, 检测血清中 sGPC3 含量可间接反映体内 GPC3 阳性细胞数量水平。

2 GPC3 的生物学功能

GPC3 作为一种跨膜糖蛋白, 虽然在胎肝及胎盘中表达, 但在正常成人肝细胞及良性肝病组织 (包括肝腺瘤)、心、脑、脾、胃、小肠、大肠、睾丸、膀胱、肾及胰腺这些组织中均不表达^[11-12]; 约 80% 的 HCC 却特异地表达 GPC3^[13-14], 一方面可通过 Wnt 信号通路 β -catenin 降解复合体解散, 致胞质内 β -catenin 积累入细胞核, 激活 *c-myc*、*cyclinD1* 等基因的转录; 另一方面还可调节刺猬刺激分子 (hedgehog, Hh) 信号通路受体蛋白, 磷酸化跨膜 G 蛋白偶联受体蛋白 Smoothened 而解除对 Smoothened 的抑制, 活化下游转录因子 *Cubitus interruptus* (Ci)/*Gli*, 进一步激活 Hh 信号通路下游基因的表达, 促进肝癌的生长^[15-16]。GPC3 的硫酸乙酰肝素支链与游离的 Wnt 配体结合, 在硫酸酯酶-2 的作用下, 与 GPC3 结合的 Wnt 配体释放出来, 促进 Wnt 信号分子与其受体 Frizzled 结合, 并与之形成稳定的 GPC3/Frizzled/Wnt 复合物, 进而激活经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路, 激活上皮细胞黏附分子等下游靶基因的转录与表达, 上皮细胞黏附分子可通过上调原癌基因 *c-Myc*、细胞周期 D1 (Cyclin D1) 等, 加快细胞周期及诱导细胞增生, 导致肝癌发生与发展, 促进肝细胞增生并最终导致恶变^[16-17]。

新近研究^[18-19] 发现 GPC3 可与对 Hh 信号起负调控作用且由肿瘤抑制基因 *Patched* 编码的 Hh 受体竞争性地结合 Hh, 引起 GPC3-Hh 复合物细胞内吞, 减少 Hh 与其受体的结合, 进而解除对 Hh 信号通路的抑制, 致 Hh 信号通路的异常激活而诱导细胞癌变^[20]。此外, GPC3 还可通过 N-端的脯氨酸富集结构区域可以结合胰岛素样生长因子 IGF-II 和胰岛素样生长因子 I 受体 IGF-IR 并使之磷酸化^[21], 诱导肝细胞呈持续增殖状态, 导致肝细胞发生恶性转化。因此, GPC3 与 Wnt、Hh 及 IGF 等信号通路的相互作用与肝癌的发生及发展密切; 具体分子机制尚需进一步研究。



MMPs: 基质金属蛋白酶; SURF2: 硫酸脂酶-2; FGF: 碱性成纤维细胞生长因子; IGF: 胰岛素样生长因子; Hh: 刺猬刺激分子

图2 GPC3与相关信号分子关系图

Figure 2 Digram of GPC3 associate with signaling molecules

3 GPC3 在 HCC 中的诊断价值

3.1 GPC3 在组织中的表达

1997年, GPC3被首次发现在体内表达具有明显的组织特异性和时相特异性^[22]: 胚胎和胎儿期肝脏高水平 GPC3 表达, 而在成人肝脏中 GPC3 并不表达; 但约有 75% 的肝癌组织、特别 HCC 组织中 GPC3 mRNA 呈高水平表达, 而肝母细胞瘤、肝腺瘤、胆管癌及肝转移性瘤不表达或极低水平表达。现有多项研究表明^[17, 23-24]在肝癌组织 GPC3 mRNA 和蛋白都呈特异性的高表达, 尽管检测方法不同, 但是这让我们看到了 GPC3 对肝细胞性肝癌的诊断价值。

近年来研究^[11-12]发现, 约有 56.3% 的早期肝癌的肝癌细胞表达 GPC3, 显著高于 AFP (31.3%); 而且 GPC3 的表达与肿瘤大小及 HCC 分期并无相关性。由此可见, GPC3 相对于 AFP 可提高早期 HCC 诊断率。进一步比较 GPC3 在 HCC 和非肝细胞癌组织的表达方式^[25], 结果提示 GPC3 在肝癌细胞中, 胞质和膜呈弥漫性阳性; 在分化良好的 HCC 肝癌细胞中, GPC3 阳性强度也明显高于周围的非癌细胞; 而局灶性结节性增生组织中 GPC3 为阴性。比较 HCC、肝内胆管癌及胆囊癌组织中 GPC3 的表达状况也发现, GPC3 在 85% HCC 中高度表达, 而在肝内胆管癌及胆囊癌中检测不到^[26], 这揭示 GPC3 对 HCC 与肝内胆管癌具有重要的鉴别诊

断价值。

近年以来, GPC3 作为一个有价值的诊断肝癌标志分子已经得到了证实, 并已被《原发性肝癌规范化病理诊断指南 (2015)》^[27]、《原发性肝癌规范化病理诊断方案专家共识》^[28]、《原发性肝癌诊疗规范 (2011 年版)》^[29]、《EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma》和《2010 年美国肝病年会 (AASLD) 肝细胞癌诊疗指南》^[30] 等作为 HCC 公认的诊断指标。我国王红阳院士团队研发的用于临床病理检测的 GPC3 免疫组化检测试剂盒也已在 2014 年获得国家食品药品监督管理局的批准。

3.2 GPC3 在血清中的表达

肝癌组织中 GPC3 阳性患者, 其血液中同样可检测到 GPC3, 这是由于 GPC3 易受细胞的蛋白转换酶水解作用, 形成游离 sGPC3 进入循环系统。因此, 血清中 sGPC3 水平间接反映着成人机体内 GPC3 阳性肝癌细胞数量水平; 约有 83% HCC 患者血清可检测到高水平 GPC3, 而肝硬化患者血清 GPC3 阳性率仅为 9.38% 且呈低水平^[15]。这些研究结果提示血清 sGPC3 含量将可能作为早期筛查、诊断 HCC 的依据, 并以此监测患者的预后状况。

在我国, 约 30% 的 HCC 患者血清 AFP 为阴性, 研究发现 GPC3 在血清 AFP 阴性 HCC 患者中却有很高检出率^[11]; 在血清 AFP < 400 μg/L 的 HCC 患者中, GPC3 阳性率达到 48.8%, 这提示联合 AFP 与 GPC3 的检测可以提高 AFP 阴性 HCC 患者的阳性检出率。研究表明 HCC 患者血清 sGPC3 和 AFP 水平不具相关性, 提示联合检测 AFP 和 GPC3 可提高 HCC 检出率, 已有多项研究证明 GPC3 对于诊断 HCC 有较高的特异性, 在一定程度上可以弥补 AFP 的特异性不足, 因此, 联合检测可显著提高 HCC 检出率。

3.3 GPC3 的表达与 HCC 患者预后的相关性

随着肝癌的进展, GPC3 的表达水平逐渐增高, 可能成为用于判断肝癌的预后、转移和复发的标志物^[17, 31-32]。Chen 等^[33]将 99 例手术切除的肝癌病理组织标本行免疫组织化学染色, 并分为 GPC3 阳性组和阴性组, 通过随访发现, GPC3 阳性表达肝癌患者的 5 年生存率显著低于 GPC3 阴性患者 (27% vs 62%, $P=0.0036$), 证明 GPC3 的表达与肝癌生存期密切相关。Fu^[34]研究发现在外科切除后

的 HCC 患者中, 患者血清中 GPC3 出现降低或消失, 表明预后良好, 而 GPC3 出现高表达可能是癌症复发或转移的潜在标志。一项包含 1 070 例患者的荟萃分析结果显示^[35], 在 HCC 患者中, GPC3 过高表达与肿瘤的分级、临床病理分期以及血管侵犯有关, 也再次证明了 GPC3 可用于预测肿瘤的复发或转移、侵袭及生存期的一种潜在的肿瘤血清标志物。然而, GPC3 用于预测患者的生存期仍然存在争议^[36]。

3.4 GPC3 作为血清标志物目前存在的问题

值得一提的是, 尽管 GPC3 作为血清学标志物, 单独检测 HCC 时特异性高, 联合 AFP 可提高 HCC 检出率, 但是临床上仍然存在诸多问题有待解决: 首先, 随着对 GPC3 研究不断深入, 已陆续发现其不仅在肝癌细胞中表达, 而且还表达于肝母细胞瘤^[37-38], 此外在肾母细胞瘤^[39]、卵黄囊瘤^[40]和肺鳞状细胞癌等^[41]多种肿瘤也存在低水平表达, 这使其成为诊断 HCC 的特异性标志物受到了挑战。另外, GPC3 不仅在 HCC 的血清中含量高, 在肝硬化进展期其血清也有一定水平, 这给 HCC

的鉴别诊断带来了困难。目前, 对 GPC3 的研究主要集中在评价 sGPC3 对 HCC 的诊断效能, 由于检测方法不同, 得出的结果也不尽相同, 其中有一部分结果显示 HCC 患者血清中 GPC3 的阳性率低于 AFP 的阳性率, 也不及 HCC 的 GPC3 免疫组织化学染色阳性率, 因此建立和完善检测新方法是推进 GPC3 临床诊断应用的关键。

4 GPC3 在 HCC 临床治疗中的价值

由于 GPC3 在 HCC 中高度特异表达, 并可通过多条信号通路参与肝癌的发生与发展, 因此, 应用配体与抗体结合并封闭 GPC3 信号正成近年来研究的热点。目前第一个用于治疗 HCC 的抗 GPC3 单克隆抗 GC33, 在移植肝癌鼠体内可诱导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用^[42-43], 并能抑制肿瘤生长的作用; 且 GC33 联合索拉非尼较索拉非尼单药更有效抑制肝癌生长, 目前该药已进入 II 期临床试验。此外, 尚有 YP7、HN3、MDX-1414 也正在 HCC 治疗研究 (见表 1)。

表 1 当前主要用于 HCC 治疗的 GPC3 单抗

Table 1 Current therapeutic monoclonal antibodies targeting GPC3 in HCC

抗体名称	种属	抗体形式	发展阶段	开发企业	参考文献
hGC33	鼠源(人源化)	IgG	二期临床	Roche	[44-47]
YP7	鼠源(人源化)	IgG	临床前期	NCI	[48]
HN3	人源	VH-hFc	临床前期	NCI	[49]
MDX-1414	人源	IgG	临床前期	Bristol-Myers Squibb Co.	AACR 2009(Abstract# 1223), 58

5 展望

目前, GPC3 是继 AFP 后又一个对 HCC 具诊断价值的肿瘤标志物, sGPC3 检测不仅利于 HCC 早期筛查与诊断, 同样对 HCC 的疗效与预后判断也具较高价值。但在 HCC 的血清诊断中 sGPC3 标准化临界点尚未确定。因此, 开发特异性高、灵敏度高、合理的 cut-off 值, 且与 HCC 吻合度高的 GPC3 血清学免疫诊断试剂盒对 HCC 诊断具有积极意义。同时, 以 GPC3 作为 HCC 免疫治疗的新靶标, 应用 GPC3 抗体进行 GPC3 信号通路的封闭, 有利于抑制肿瘤细胞增殖与迁移, 诱导肝癌细胞凋亡。目前 GPC3 抗体封闭治疗临床试验正在

进行, 然而距离应用于临床还有很长的一段路, 但随着人们对 GPC3 的深入研究, 相信 GPC3 将在肝癌的筛查、诊断及 HCC 靶向药物治疗等方面发挥更为重要的作用与社会价值。

参考文献

- [1] Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6):394-399.
- [2] Della CC, Colombo M. Surveillance for hepatocellular carcinoma[J]. Semin Oncol, 2012, 39(4):384-398.
- [3] Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2010,

- 16(4):418-424.
- [4] Lee HJ, Yeon JE, Suh SJ, et al. Clinical utility of plasma glypican-3 and osteopontin as biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut Liver*, 2014,8(2): 177-185.
- [5] Lai JP, Oseini AM, Moser CD, et al. The oncogenic effect of sulfatase 2 in human hepatocellular carcinoma is mediated in part by glypican 3-dependent Wnt activation[J]. *Hepatology*, 2010,52(5):1680-1689.
- [6] Hussein TD. Serological tumor markers of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *Int J Biol Markers*, 2015,30(1):e32-e42.
- [7] Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome [J]. *Nat Genet*, 1996,12(3):241-247.
- [8] Huber R, Mazzarella R, Chen CN, et al. Glypican 3 and glypican 4 are juxtaposed in Xq26.1 [J]. *Gene*, 1998, 225(1-2):9-16.
- [9] de Cat B, David G. Developmental roles of the glypicans[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2001, 12(2):117-125.
- [10] Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans[J]. *Genome Biol*, 2008, 9(5):224.
- [11] Li B, Liu H, Shang HW, et al. Diagnostic value of glypican-3 in alpha fetoprotein negative hepatocellular carcinoma patients[J]. *Afr Health Sci*, 2013,13(3):703-709.
- [12] Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, et al. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(1):129-137.
- [13] Lin X, Perrimon N. Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling[J]. *Nature*, 1999, 400(6741):281-284.
- [14] Wang YL, Zhu ZJ, Teng DH, et al. Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(19):2408-2414.
- [15] Liu H, Li P, Zhai Y, et al. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(35):4410-4415.
- [16] Zhang Q, Xiao Q, Lin Z, et al. Development of a competitive radioimmunoassay for glypican-3 and the clinical application in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(12):1003-1008.
- [17] Yao M, Yao DF, Bian YZ, et al. Values of circulating GPC-3 mRNA and alpha-fetoprotein in detecting patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2013, 12(2):171-179.
- [18] Han C, Belenkaya TY, Wang B, et al. Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process [J]. *Development*, 2004, 131(3):601-611.
- [19] Yuan Z, Goetz JA, Singh S, et al. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma[J]. *Oncogene*, 2007, 26(7):1046-1055.
- [20] Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(1):68-76.
- [21] Cheng W, Tseng CJ, Lin TT, et al. Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(7): 1319-1326.
- [22] Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5179-5184.
- [23] Yao M, Yao DF, Bian YZ, et al. Oncofetal antigen glypican-3 as a promising early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2011, 10(3):289-294.
- [24] Gong L, Wei LX, Ren P, et al. Dysplastic nodules with glypican-3 positive immunostaining: a risk for early hepatocellular carcinoma [J]. *Plos One*, 2014, 9(1): e87120.
- [25] Yao S, Zhang J, Chen H, et al. Diagnostic value of immunohistochemical staining of GP73, GPC3, DCP, CD34, CD31, and reticulin staining in hepatocellular carcinoma [J]. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(9): 639-648.
- [26] Yu J, Ma Q, Zhang B, et al. Clinical application of specific antibody against glypican-3 for hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(3):234-239.
- [27] 丛文铭,步宏,陈杰,等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015版)[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31(3): 241-246.
- [28] 丛文铭. 原发性肝癌规范化病理诊断方案专家共识 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(6):645-647.

- [29] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(11):1141-1159.
- [30] 王莉琳, 张永宏, 陈新月. 2010年美国肝病年会(AASLD)肝细胞癌诊疗指南[J]. 北京医学, 2011, 35(3):236-251.
- [31] Pan C, Wang X, Chen W, et al. Reevaluation of glypican-3 as a prognostic marker in HCC using X-tile software[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1):359.
- [32] Li J, Gao JZ, Du JL, et al. Prognostic and clinicopathological significance of glypican-3 overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(20):6336-6344.
- [33] Chen IP, Ariizumi S, Nakano M, et al. Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy[J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(1):117-125.
- [34] Fu SJ, Qi CY, Xiao WK, et al. Glypican-3 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Surgery*, 2013, 154(3):536-544.
- [35] Xiao WK, Qi CY, Chen D, et al. Prognostic significance of glypican-3 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:104.
- [36] Wang Y, Shen Z, Zhu Z, et al. Clinical values of AFP, GPC3 mRNA in peripheral blood for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence following OLT: AFP, GPC3 mRNA for prediction of HCC [J]. *Hepat Mon*, 2011, 11(3):195-199.
- [37] Liu X, Wang SK, Zhang K, et al. Expression of glypican 3 enriches hepatocellular carcinoma development-related genes and associates with carcinogenesis in cirrhotic livers[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(2):232-242.
- [38] Xiong XL, Qin H, Yan SQ, et al. Expression of glypican-3 is highly associated with pediatric hepatoblastoma: a systemic analysis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(3):1029-1031.
- [39] Tretiakova M, Zynger DL, Luan C, et al. Glypican 3 overexpression in primary and metastatic Wilms tumors [J]. *Virchows Arch*, 2015, 466(1):67-76.
- [40] Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, et al. Glypican 3 expression in pediatric malignant solid tumors[J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2015, 25(1):138-144.
- [41] Lin Q, Xiong LW, Pan XF, et al. Expression of GPC3 protein and its significance in lung squamous cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2):663-669.
- [42] Yamamoto M, James D, Li H, et al. Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(1):299-308.
- [43] Nakano K, Orita T, Nezu J, et al. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(2):279-284.
- [44] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23):9832-9838.
- [45] Nakano K, Ishiguro T, Konishi H, et al. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization[J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(10):907-916.
- [46] Nakano K, Orita T, Nezu J, et al. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(2):279-284.
- [47] Takai H, Kato A, Kinoshita Y, et al. Histopathological analyses of the antitumor activity of anti-glypican-3 antibody (GC33) in human liver cancer xenograft models: The contribution of macrophages[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(10):930-938.
- [48] Phung Y, Gao W, Man Y G, et al. High-affinity monoclonal antibodies to cell surface tumor antigen glypican-3 generated through a combination of peptide immunization and flow cytometry screening [J]. *MAbs*, 2012, 4(5):592-599.
- [49] Feng M, Ho M. Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(2):377-382.

血清 GPC3 在中国人群和国外人群诊断原发性肝癌的价值:一项基于 meta 分析的比较研究

银一臻¹ 徐伟文^{2*}

[摘要] **目的** 通过 meta 分析探讨血清磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(glypican-3, GPC3)在中国人群和国外人群诊断肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的价值,并分析产生差异的原因。 **方法** 检索中国知网、万方、中国生物医学、PubMed、Ovid Lippincott Williams & Wilkins、Cochrane Library 等数据库获取国内外关于 GPC3 肝癌诊断价值的相关文献。依据纳入及排除标准筛选文献并提取数据,对纳入文献进行质量评价、异质性分析并计算合并的诊断准确度指标。 **结果** 共有 31 篇文献入选本研究,以研究地所在国家划分为国内组 19 篇,国外组 12 篇,合并后的敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比和诊断比值比、综合受试者工作 sROC 曲线的曲线下面积、Q 指数及相应的 95%CI 如下:国内组:0.65(0.63-0.68),0.91(0.90-0.92),7.43(4.82-11.44),0.35(0.28-0.44),23.01(11.99-45.28),0.8723 和 0.8027;国外组:0.61(0.57-0.64),0.85(0.82-0.87),6.35(3.04-13.29),0.51(0.41-0.63),19.15(6.62-55.37),0.8344 和 0.7667。 **结论** 在中国人群中应用血清 GPC3 的检测对于 HCC 的诊断较之国外人群具有更高的价值。人种的差异很可能是导致国内外关于 GPC3 诊断效能不同的主要原因之一。

[关键词] GPC3; 原发性肝癌; 诊断; 人群

Significance of circulating glypican-3 in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a comparative study between the population in China and that from other countries by using meta-analysis

YIN Yizhen¹, XU Weiwen^{2*}

(1. The Major of Eight-year Program of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] **Objective** This study applied meta-analysis to evaluate the value of the serum glypican-3 (GPC3) in the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) comparing between the population in China and the population from the other countries, and to analyze the causes for the difference between the two populations. **Methods** The relevant studies in English and Chinese literatures were identified by searching the following resources: Chinese National Knowledge Infrastructure, Wan Fang, China Biology Medicine disc, PubMed, Ovid Lippincott Williams & Wilkins and Cochrane Library. The data was collected from the studies screened and selected according to the predetermined criteria for the inclusion and exclusion. We then assessed the included studies for quality and the heterogeneity, and calculated the combined indexes of diagnostic accuracy. **Results** A total of 31 studies, including 19 studies performed in China and 12 in the foreign countries, were enrolled with full-text evaluation. The combined sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, diagnostic odds ratio with 95% confidence interval (95% CI), the

基金项目: 十二五国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA020205); 广东省重大科技专项(2012A080203012); 广州市产学研协同创新重大专项(201508020052)

作者单位: 1. 南方医科大学临床医学八年制, 广东, 广州 510515

2. 南方医科大学生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 徐伟文, E-mail: xu_sandy2006@126.com

area under the summary receiver operating characteristics (ROC) curve and Q^* were calculated as follows: 0.65 (0.63–0.68), 0.91 (0.90–0.92), 7.43 (4.82–11.44), 0.35 (0.28–0.44), 23.01 (11.99–45.28), 0.8723 and 0.8027, respectively, for the population in China; 0.61 (0.57–0.64), 0.85 (0.82–0.87), 6.35 (3.04–13.29), 0.51 (0.41–0.63), 19.15 (6.62–55.37), 0.8344 and 0.7667, respectively, for the population from the other countries. **Conclusion** Serum GPC3 had higher sensitivity and specificity for the diagnosis of HCC in the population in China than in the population from the other countries. The difference in the diagnostic efficacy between the two populations is likely explained by the racial difference.

[KEY WORDS] Glypican3; Hepatocellular carcinoma; Diagnosis; Population

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见、多发、死亡率高的恶性肿瘤,国际上对 HCC 主要应用甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP)、超声和其他影像学相结合的诊断技术进行筛查,但是超声检查依赖于操作者的经验和设备,而其他影像学手段需要高昂的费用,故广泛应用受到限制,而 AFP 对早期肝癌的检出率不高,极大限制了现有肝癌治疗手段的疗效,所以早诊早治的需求迫切要求找到新的肝癌标志物。近年研究发现了许多潜在分子标志物,如血清磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (glypican-3, GPC3)、异常凝血酶原、高尔基蛋白-73 等,并初步证实了它们的临床应用价值,正在进行多中心和大样本的验证与产业化^[1]。GPC3 在 HCC 中高表达,而在其他肿瘤及良性肝病等中呈低表达或不表达,在 AFP 阴性的 HCC 中亦有表达,对 HCC 的诊断具有较高的敏感性和特异性^[2];与 HCC 预后亦有一定的关系并有望成为 HCC 治疗的新靶点^[3]。不同研究方法检测得到的血清 GPC3 范围存在明显差异,检测敏感度也各异,即使使用相同的方法如 ELISA 法,每个研究者所检测到的 HCC 中 GPC3 血清值相差甚大,如周伟等^[4]的检测值与 Hippo 等^[5]的检测值相差 37 倍。可见国内外各研究报道的诊断指标间有较大的差异,如血清 GPC3 诊断 HCC 的敏感度范围就有 50%~90%,缺少统一的诊断标准应用于临床实践。而目前国内外已经发表多篇关于 GPC3 诊断肝癌的 meta 分析文章,分析了 GPC3 在肝癌及早期肝癌中的诊断价值^[6-8],比较了 AFP 与 GPC3 在肝癌诊断中的敏感度和特异度^[6,9],以及 GPC3 与 AFP 联合检测在肝癌诊断中的价值^[9-10]。未有文献就国内外 GPC3 在肝癌诊断价值的差异性上进行讨论。本文选取以 ELISA 法作为检测方法测定血清 GPC3 的文献进行 meta 分析,以 meta 分析法初步探究 GPC3 对 HCC 诊断价值在中国与国外人群中

的状况。

1 材料与方法

1.1 文献检索策略

计算机检索中国知网、万方、中国生物医学文摘数据库、PubMed、Ovid Lippincott Williams & Wilkins、Cochrane Library 等医学文献数据库,检索时间限制为 2001 年 1 月至 2014 年 5 月,检索语种限定为中文和英文。中文数据库检索式为:(1) GPC3, Glypican 3, 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3; and (2) 肝癌,肝细胞癌,原发性肝癌; and (3) 诊断。英文数据库检索式为:(1) GPC3, Glypican 3; (2) hepatocellular carcinoma, primary liver cancer, hepatic cancer; and (3) diagnosis。

1.2 纳入和排除标准

(1) 纳入标准:任何已公开发表的临床研究或临床试验;经 CT、MRI 影像学检查或组织病理活检诊断为 HCC 的患者;样本量大于 20;用 ELISA 法检测血清中的 GPC3 浓度,并且报告了敏感度和特异度等诊断性能特征。(2) 排除标准:没有全文的文献;数据不全的文献;综述文献;研究对象为实验动物;研究前患者接受过相应治疗;未设置对照组。

1.3 文献筛选与数据提取

所获文献及数据由两位相关学科研究生分别独立提取,并且采用统一的纳入和排除标准,提取后进行交叉核对,意见不一致时讨论解决,以确保文献提取和质量评价结果的一致性。对于重复发表的文献选取报道较全面和较新的文献。资料提取的内容包括:(1) 基本情况:作者、发表时间、试验地点、试验设计、结果观察(是否为盲法)、检测方法、诊断阈值;(2) 试验对象:试验人数、对象选择、年龄、性别、人种;(3) 结果指标:真阳性(true positive, TP)、假阳性(false positive, FP)、真阴性

(true negative, TN)、假阴性(false negative, FN)。

1.4 质量评价

采用 Cochrane 协作网推荐的诊断试验质量评价 2 (quality assessment for studies of diagnostic accuracy studies 2, QUADAS 2)表对纳入文献进行质量评价, 偏倚风险评估的每个条目以“是”、“否”及“不清楚”三种结果界定, 实际应用评估的每个条目以“高”、“低”及“不清楚”三种结果界定^[11]。这项工作由上述两位研究生分别独立完成, 任何分歧经过讨论解决。

1.5 统计分析

首先检测文献的异质性, 通过 Spearman 相关分析检查有无阈值效应引起的异质性, 其他原因引起的异质性则用 Cochran-Q 统计学方法进行检验, 若存在非阈值效应, 即 $P < 0.05$, 进一步用 Meta 回归分析异质性来源。国家、年龄、人种、性别、诊断阈值为可能的异质性来源, 将其作为自变量, 若 $P < 0.1$, 则认为是潜在的异质性来源, 因部分文献缺少其中的部分数据, 所以仅就具有数据的文献进行相应异质性来源的分析。若异质性存在, 则采用随机效应模型对各统计学指标进行汇总处理, 反之则用固定效应模型。对各统计学指标进行汇总处理后, 分别比较汇总后 AFP 与 GPC3 的敏感度和特异度, 检验其是否有统计学差异, 并绘制 sROC 曲线下面积及 Q 指数, 最后应用 Deeks' 漏斗图来识别发表偏倚^[12], 以上采用 MetaDisc 1.4 及 STATA 12.0 软件完成。

2 结果

2.1 文献检索结果及纳入文献的基本特征

将检索到的共 1 706 篇可能相关文献排除重复后为 367 篇, 经过标题、摘要和关键词的阅读筛选, 排除不相关文献后剩余 65 篇, 阅读全文并按设定的纳入和排除标准进行筛选, 34 篇因不符合纳入标准、重复发表或属综述、无法提取相关数据而被排除, 最后符合纳入标准的文献总共 31 篇。其中中文文献 17 篇, 英文文献 14 篇。共计 5 031 例研究对象, 病例组 2 082 例, 其中国内为 1 335 例, 国外为 747 例; 对照组 2 949 例, 其中国内为 2 150 例, 国外为 799 例。所有试验均以病理学检查及影像学检查为参考标准, 以血清 GPC3 为检测

指标。将文献按研究地所在国家分为国内组和国外组, 国内组包括 19 篇文献^[13-31], 国外组包括 12 篇文献^[5, 32-42]。纳入文献基本特征见表 1。

2.2 纳入文献的质量评价

根据 QUADAS 2 量表的项目对纳入的 31 篇文献进行质量评价, 结果见图 1。总体上看, 所入选文献均为较高质量文献, 因大部分文献没有提供足够详细的实验设计细节, 以致有些信息无法获得。病例选择域的偏倚风险中, 只有一篇文献^[37]有报道病例的选择是连续的且有一定的时间范围, 其余入选文献均未明确报道病例的选择是否是连续或者随机的, 有些文献也未说明病例选取的时间范围, 所以病例选择域的偏倚风险总结果评为“未知风险”, 另有一篇文献^[33]研究 GPC3 在酒精性肝病和非酒精性脂肪肝中的诊断价值, 所选病例特异性排除了有肝炎背景的患者, 产生较大的选择偏倚, 所以此篇病例选择域的偏倚风险总结果评为“高风险”。待评价试验域中, 除了四篇文献^[15, 19, 26, 29]之外, 其余文献的诊断阈值均非预先设定, 所以偏倚风险总结果评为“未知风险”。金标准域中, 两篇文献^[35, 38]未明确报道 HCC 患者诊断金标准的方法, 所以偏倚风险总结果评为“未知风险”。病例流程和进展情况域中, 四篇文献^[34, 36-38]未对 HCC 患者采用统一的诊断金标准, 所以偏倚风险总结果评为“未知风险”。

2.3 异质性分析

由于阈值的不同而导致效应量的差异而产生的效应称为阈值效应, 若较大, 则不适合做 meta 分析。分别计算国内组、国外组和全部文献的敏感度对数与(1-特异度)对数的 Spearman 相关系数, 结果分别为 0.451、0.438、0.284, $P = 0.053$ ($P > 0.05$)、 $P = 0.155$ ($P > 0.05$)、 $P = 0.121$ ($P > 0.05$), 说明组内与组间文献均不存在阈值效应。在诊断试验的系统评价中, 除了阈值效应引起的研究间异质性外, 还有人群特征、实验条件、疾病程度等原因导致异质性的产生。诊断比值比同时考虑了敏感度和特异度, 故采用其作为分析其他来源异质性的指标。应用 Cochran-Q 检验法, 国内组对应的 Cochran-Q 值为 62.45, $P = 0.0000$ ($P < 0.05$), $I^2 = 71.2\%$, 国外组对应的 Cochran-Q 值为 105.67, $P = 0.0000$ ($P < 0.05$), $I^2 = 89.6\%$, 总文献对

表1 纳入文献基本特征
Table 1 Characteristic of the included studies

作者	年份	国家	肝癌/ 对照	男/女 (肝癌组)	平均年龄 (肝癌组)	人种	GPC3				
							TP	FP	FN	TN	阈值
Chen ^[13]	2013	中国	155/440	-	-	黄	62	27	93	413	25.25 ng/mL
白吉明 ^[14]	2012	中国	55/30	32/18	55.5	黄	45	6	10	24	2 ng/mL
陈耀敏 ^[15]	2012	中国	89/30	63/26	54.5±8.4	黄	72	5	17	25	120 ng/mL
付顺军 ^[16]	2010	中国	67/71	-	-	黄	59	10	8	61	3 ng/mL
李鹏 ^[17]	2010	中国	66/16	48/18	57.1±9.3	黄	31	1	35	15	300 ng/mL
刘阳 ^[18]	2014	中国	35/76	19/16	43.3	黄	29	33	6	43	3.94 ng/mL
王媛媛 ^[19]	2008	中国	45/195	30/15	45	黄	29	5	16	190	5μg/mL
杨贵敏 ^[20]	2013	中国	50/80	38/12	57±11	黄	21	3	29	77	20.7 ng/mL
杨华瑜 ^[21]	2013	中国	45/72	33/12	51.8±10.3	黄	14	6	31	66	15 ng/L
叶迎宾 ^[22]	2012	中国	100/100	62/38	53.2	黄	86	4	14	96	3 ng/mL
范公忍 ^[23]	2013	中国	79/65	52/27	52.5	黄	62	2	17	63	9.5 ng/mL
卞银珠 ^[24]	2011	中国	123/296	103/20	58.4	黄	65	2	58	294	-
马庆庆 ^[25]	2014	中国	54/164	33/21	49	黄	46	43	8	121	60 pg/mL
王丽丽 ^[26]	2008	中国	64/117	54/10	58.06±12.13	黄	48	0	16	117	80 ng/mL
王延峰 ^[27]	2013	中国	30/80	20/10	53.5	黄	22	9	8	71	60pg/mL
吴诗品 ^[28]	2010	中国	80/118	54/26	44.4	黄	52	13	28	105	412.6pg/mL
张华 ^[29]	2011	中国	44/46	31/13	52	黄	27	2	17	11	200 ng/L
周助权 ^[30]	2014	中国	53/66	37/16	52.6±9.3	黄	30	7	23	59	283.5 ng/L
Qiao ^[31]	2011	中国	101/88	72/29	53.4±11.1	黄	70	10	31	78	20.68 ng/mL
Hippo ^[5]	2004	日本	69/38	-	-	黄	35	4	34	34	2 ng/mL
Capurro ^[32]	2003	加拿大	34/91	-	-	白	18	1	16	90	100 ng/mL
Beale ^[33]	2008	英国	50/41	40/10	67.5±12.02	白	34	22	16	19	-
Ozkan ^[34]	2011	土耳其	75/83	54/21	63±9.9	白	46	48	29	35	3.9pg/mL
Nakatsura ^[35]	2003	日本	40/110	-	66	黄	16	0	24	110	10U/mL
Akutsu ^[36]	2010	日本	64/31	-	-	黄	32	1	32	30	0 ng/mL
Tangkijavnich ^[37]	2010	泰国	100/190	75/25	58.8±12.7	黄	53	2	47	188	0 ng/mL
Lee ^[38]	2014	韩国	120/40	94/26	59.4±10.9	黄	65	14	55	26	73 ng/mL
Abdelgawad ^[39]	2013	埃及	40/20	32/8	60.5	黑	38	1	2	19	4.9 ng/mL
Soha ^[40]	2012	埃及	85/85	67/18	55.74±5.2	黑	54	25	31	60	19 ng/mL
Youssef ^[41]	2010	埃及	40/40	23/17	47.5±7.9	黑	33	2	7	38	4.6 ng/mL
Badr ^[42]	2014	埃及	30/30	25/5	56.97±10.94	黑	30	2	0	28	240 μg/L

应的 Cochran-Q 值为 214.94, $P=0.0000$ ($P<0.05$), $I^2=86.0\%$ 。结果提示两组文献和总文献均存在其他来源的异质性。根据设定的资料收集条目,将国家、年龄、人种、性别作为可能的异质性来源,分别对两组文献和总文献进行 meta 回归分析(国内组文献不行国家和人种的回归分析),结果显示国内组与国外组无统计学意义的异质性来源,而总文献的人种所对应 $P=0.0198$ ($P<0.05$),

提示人种可能是国内外研究差异的主要异质性来源。

2.4 合并效应值并比较

由异质性检验可知,国内组与国外组均存在较大的异质性,所以采用随机效应模型进行各效应值的合并。根据 Mose 线性模型,国内组的 $P=0.1687$ ($P>0.05$),国外组的 $P=0.1406$ ($P>0.05$),所以其 sROC 曲线均为对称的,采用相应方法合并

	偏向风险			实际应用		
	病例选择	待评价试验	标准和进展情况	病例选择	待评价试验	金标准
Abdelgawad 2013	+	?	+	+	+	+
Akutsu 2010	?	?	+	+	+	+
Badr 2014	?	?	+	+	+	+
Beale 2008	●	?	+	●	+	+
Capurro 2003	?	?	+	+	+	+
Chen 2013	?	?	+	+	+	+
Hippo 2004	?	?	+	+	+	+
Lee 2014	?	?	?	+	+	+
Nakatsura 2003	?	?	?	+	+	+
Ozkan 2011	?	?	?	+	+	+
Qiao 2011	?	?	+	+	+	+
Soha 2012	?	?	+	+	+	+
Tangkijavich 2010	?	?	?	+	+	+
Youssef 2010	?	?	+	+	+	+
付顺军 2010	?	?	+	+	+	+
刘阳 2014	?	?	+	+	+	+
卞银珠 2011	?	?	+	+	+	+
叶迎宾 2012	?	?	+	+	+	+
吴诗品 2010	?	?	+	+	+	+
周助权 2014	?	?	+	+	+	+
张华 2011	?	+	+	+	+	+
李翊 2010	?	?	+	+	+	+
杨华瑜 2013	?	?	+	+	+	+
杨贵敏 2013	?	?	+	+	+	+
王丽丽 2008	?	+	+	+	+	+
王媛媛 2008	?	+	+	+	+	+
王延峰 2013	?	?	+	+	+	+
白吉明 2012	?	?	+	+	+	+
范公忍 2013	?	?	+	+	+	+
陈锋敏 2012	?	+	+	+	+	+
马庆庆 2014	?	?	+	+	+	+

● 高 ? 不清楚 + 低

图1 纳入文献的 QUADAS 2 质量评价结果

Figure 1 Summary assessment of methodological quality of included studies by QUADAS 2

GPC3 诊断原发性肝癌的敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、诊断比值比、sROC 曲线下面积

和 Q 指数及相应的 95%CI, 结果如下, 国内组: 0.65 (0.63-0.68), 0.91 (0.90-0.92), 7.43 (4.82-11.44), 0.35 (0.28-0.44), 23.01 (11.99-45.28), 0.8723 和 0.8027, 国外组: 0.61 (0.57-0.64), 0.85 (0.82-0.87), 6.35 (3.04-13.29), 0.51 (0.41-0.63), 19.15 (6.62-55.37), 0.8344 和 0.7667。相应结果见表 2 及图 2 至图 7。

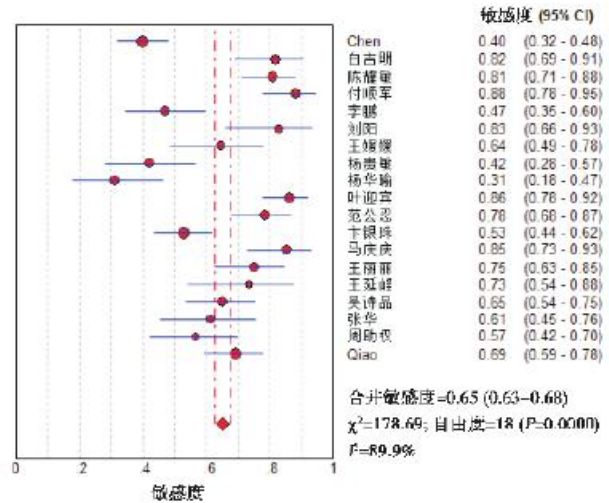


图2 国内组 GPC3 敏感度的森林图

Figure 2 Forest plot of sensitivity of using GPC3 in Chinese group

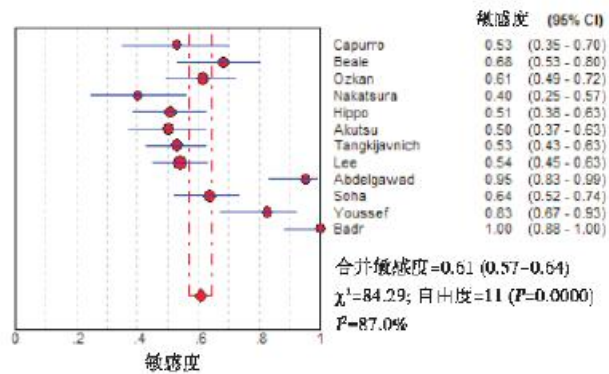


图3 国外组 GPC3 敏感度的森林图

Figure 3 Forest plot of sensitivity of using GPC3 in foreign group

2.5 发表偏倚

应用 Deeks' 漏斗图来识别发表偏倚, 其非对称检验的斜率国内组为 $P=0.42$, 国外组为 $P=0.52$, 均大于 0.05, 结果见图 8 和图 9。

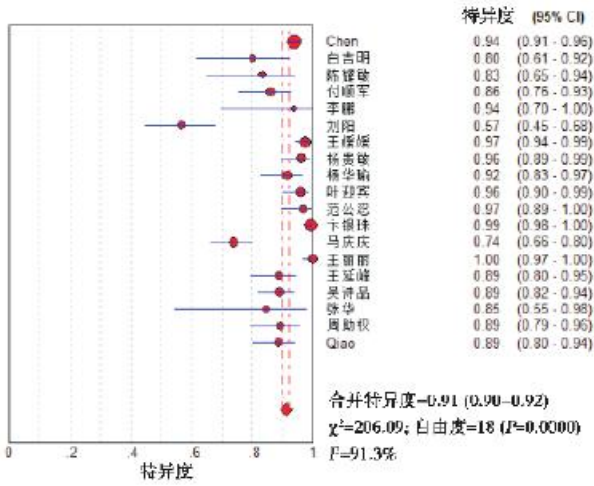


图4 国内组 GPC3 特异度的森林图

Figure 4 Forest plot of specificity of using GPC3 in Chinese group

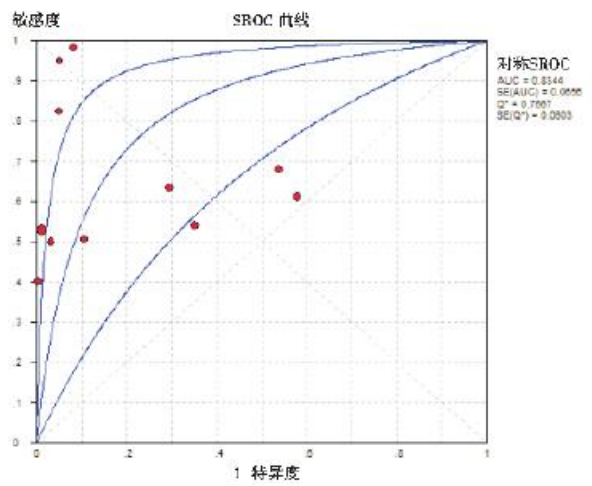


图7 国外组 GPC3 的 SROC 曲线

Figure 7 SROC for GPC3 in foreign group

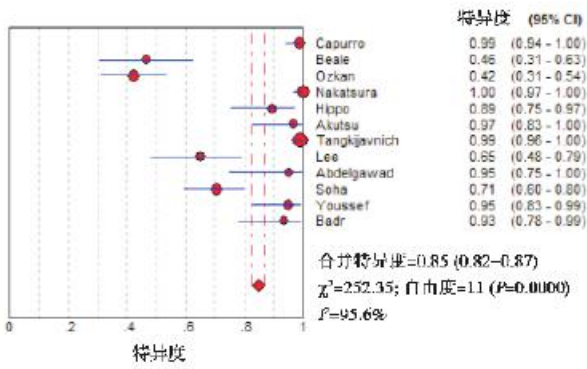


图5 国外组 GPC3 特异度的森林图

Figure 5 Forest plot of specificity of using GPC3 in foreign group

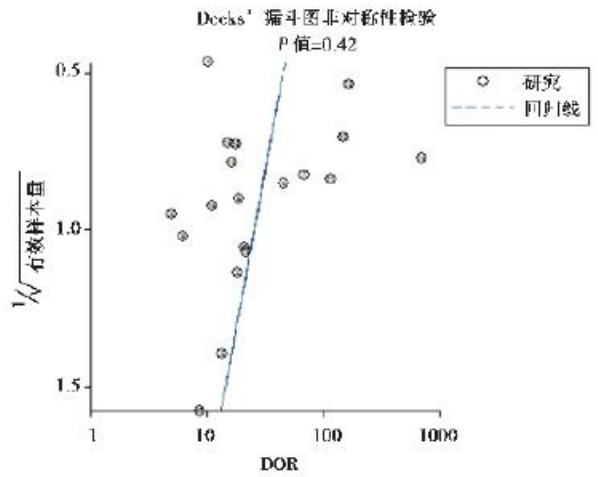


图8 国内组的 Deeks' 漏斗图

Figure 8 Deeks' funnel plot of Chinese group

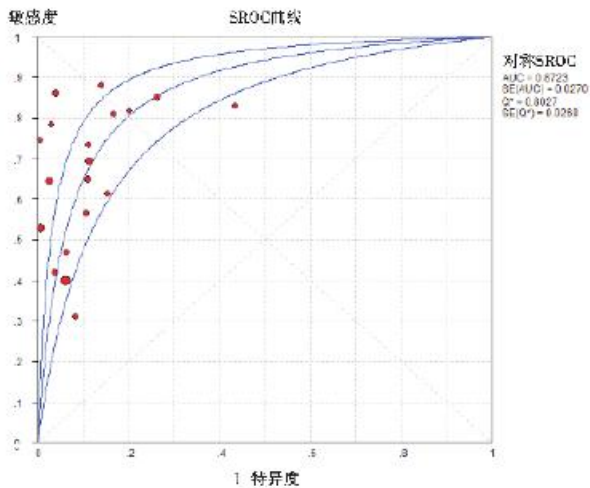


图6 国内组 GPC3 的 SROC 曲线

Figure 6 SROC GPC3 in Chinese group

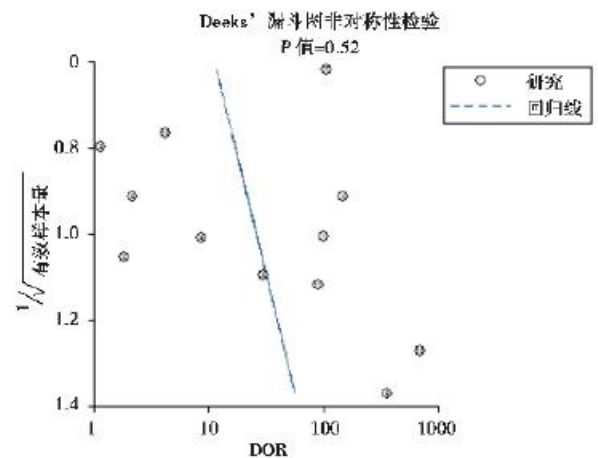


图9 国外组的 Deeks' 漏斗图

Figure 9 Deeks' funnel plot of foreign group

表 2 国内组和国外组合并的诊断效应值(随机效应模型)

Table 2 Summary of diagnostic accuracy of Chinese and foreign group (random effects model)

合并值	国内组(95% CI)	国外组(95% CI)
敏感度	0.65(0.63-0.68)	0.61(0.57-0.64)
特异度	0.91(0.90-0.92)	0.85(0.82-0.87)
阳性似然比	7.43(4.82-11.44)	6.35(3.04-13.29)
阴性似然比	0.35(0.28-0.44)	0.51(0.41-0.63)
DOR	23.01(11.99-45.28)	19.15(6.62-55.37)

3 讨论

在近年来国内外的研究报道中, GPC3 一直被认为是 HCC 的特异性标志物, 对诊断 HCC 具有较高的敏感性和特异性, 是最具有潜力的候选标志物之一。鉴于国内外研究水平、人群特征、质量控制等差异, 二者关于 GPC3 诊断价值的研究结果是否有显著差异, 本文通过 meta 分析就此作了初步研究。

根据纳入及排除标准, 共筛选出 31 篇符合要求的文献, 均是关于血清 GPC3 在 HCC 诊断价值中的研究。国内外病例组与对照组样本量均较多且相差不大。从效应量合并后的结果可看出, 国内组比国外组的敏感度高 4%, 特异度高 6%, 阳性似然比表明诊断试验结果呈阳性时实际患病与不患病机会的比值越大诊断价值越高, 国内组高于国外组约 1.1, 阴性似然比表明诊断试验结果呈阴性时实际患病与不患病机会的比, 值越小诊断价值越高, 国内组低于国外组约 0.2。诊断比值比反映诊断试验的结果与疾病的联系程度, 取值 >1 时, 其值越大说明该诊断试验的判别效果较好, 而国内组与国外组的诊断比值比均大于 1, 且前者高于后者约 4。当诊断界值发生改变时, 敏感度和特异度会随之发生变化并产生阈值效应, 故其不能完整地评价某一诊断试验的诊断价值。sROC 曲线下面积因同时考虑了敏感度和特异度, 故常被用于评价诊断试验鉴别疾病的能力^[43-44], sROC 曲线下面积越接近 1.0, 表示其诊断准确性越高; 越接近 0.5, 表示其诊断效能越低。国内组与国外组的 AUC 均高于 0.5, 且前者的 AUC 高于后者约 0.04。Q 指数也常被用于评价试验的诊断效能, 其值越接近 1.0, 试验的诊断效能越高, 国内组的 Q

值高于国外组约 0.04。由此可看出, 国内与国外的研究结果相比, 有关 GPC3 诊断 HCC 的各指标均显示出更高的诊断价值, 提示基于现今国内的患病人群及 GPC3 的检测水平, 国内应用血清 GPC3 的 ELISA 检测法能够更准确地筛选出 HCC 患者, 对于 HCC 的诊断较之国外具有更高的价值。

异质性分析中, 发现国内组与国外组内均有较大的异质性, 但使用 meta 回归分析后, 国家、年龄、人种、性别的差异并不是有统计学意义的异质性来源, 这可能是由于纳入研究的文献数量有限。将两组合并后再进行分析, 发现人种可能是主要的异质性来源, 是造成各文献间诊断准确性不同的主要因素, 说明造成国内外研究差异的主要原因可能为人种差异造成的 GPC3 表达水平不同。已有研究报道我国的肝癌发病率远高于发达国家^[45]。对 1990 年至 2006 年间发表的所有有关中国人群 HBV 和 HCV 双重感染与肝细胞肝癌关系的研究进行 Meta 分析, 发现 HBV、HCV 感染是中国人群肝细胞肝癌高发的独立危险因素^[46]。Tangkijvanich^[37]研究显示在 40 例健康者、50 例慢性肝炎、60 例肝硬化、50 例胆管癌、50 例转移癌病人中, 仅有 1 例阳性, 证实对于大多数肝癌患者血清 GPC3 的增高与 AFP 水平无关, 与肝炎病毒标记物有关; 卞银珠等^[24]的研究也同样提示血清 GPC3 含量与肝炎标志物有关, GPC3 可能更适于合并病毒性肝炎或肝硬化肝癌患者的诊断。同时 Beale 等^[35]的研究也间接证实了这一点, 在检测病例组酒精性肝病所致肝癌患者, 对照组为酒精性肝病者(均完全除外肝炎病毒感染)时发现 GPC3 的诊断敏感度 68%(34/53), 特异度仅为 46.3%(22/38), 不具备诊断价值。而从流行病学角度看, 亚洲人和非洲人更容易感染 HBV, 中国人与欧美白种人相比感染 HBV 慢性化的发生率更高^[47], 这或许可间接说明为何 GPC3 在国内人群中的诊断价值高于国外人群, 虽然无直接研究证据表明 GPC3 的表达是否与人种的差异有直接关系, 但二者均与肝炎病毒相关性肝癌的发生有联系, 应进一步深入研究肝炎病毒相关性肝癌背景下人种差异对 GPC3 表达的影响机制, 其对于揭示 GPC3 在 HCC 中细胞信号传导通路的表达机制和临床相关检测方法的研究具有重要意义。Deeks' 漏斗图是评价诊断试验 meta 分析发表偏倚常用

且有效的方法,漏斗图非对称性检验:国内组斜率 $P=0.85$, 国外组 $P=0.83$, 均大于 0.05, 提示漏斗图基本对称,表明纳入文献无明显发表偏倚。

在有关血清 GPC3 的众多研究中,应用最多的检测方法是 ELISA,其操作简便、成本较低,但同时存在敏感度较低,影响因素较多,很容易造成结果失真等缺点,难以满足临床中早期肝癌诊断所需的高敏感度与特异度的要求,可以通过联合其他标志物检测或改进检测方法来提高 GPC3 的诊断准确度。2003 年之后 GPC3 抗体研究开始成熟并出现 GPC3 的免疫分析技术,包括 ELISA 检测技术和血清学定量检测^[33,48],并开始 GPC3 含量的血清学变化与 HCC 发展阶段的关系研究。Hippo 等^[5]进行 GPC3 血清学检测,发现主要是 GPC3 蛋白的 N 端形式进入血液循环,并建立了夹心反应模式的分析方法,实现了血液中 N 端 GPC3 的检测,但之后该作者^[48]又报道检测到 C 端蛋白也进入血液循环,具有同样重要的临床应用价值。Ma, Yu 等^[49-51]一系列研究筛选出了对识别 GPC3 蛋白较敏感的单克隆抗体 7D11,并建立以其为基础的双抗夹心化学发光免疫法,并将其在临床中肝癌检测的应用方面进行了验证,开发了具有临床实用性的 GPC3 检测试剂盒,推动了 GPC3 检测在肝癌诊断中的临床实际应用。李丹等^[52]建立了双抗夹心时间分辨荧光免疫法检测血清 GPC3,其诊断 HCC 的敏感度和特异性分别为 58.5% (24/41) 和 95.5% (42/44)。双抗夹心时间分辨荧光免疫法具有敏感度高、可测浓度范围宽、重复性好等优点,且较易控制阴性标本的本底,因而较少出现假阳性。Zhang 等^[53]建立了放射竞争免疫分析方法,同时特异识别血清 N 端和 C 端的 GPC3 蛋白,检测 HCC 的敏感度得到提高,为 91.7% (33/36),特异性为 100% (36/36),继而建立了磁颗粒化学发光酶免疫分析方法,进一步提高了分析敏感度和缩短了分析时间。但 GPC3 的血清学检测仍停留在实验室阶段,各研究单位所采用 GPC3 抗体的亲和性和特异性差异很大,且缺乏统一的阳性标准对照浓度。此外,肝癌患者中 GPC3 浓度升高幅度较小,不易与对照,尤其是与肝硬化对照区分。

本研究尚存在以下不足:第一,只有一篇文章^[39]有报道病例的选择是连续的且有一定的时间范围,其余入选文献均未明确报道病例的选择是

否是连续或者随机的,有些文献也未说明病例选取的时间范围,所以可能存在选择偏倚。第二,纳入研究的人群基线不尽统一,所有文献均为电子检索到的公开发表的研究不排除有少数文献未被纳入,可能也会有一定的发表偏倚。第三,筛选文献的语言仅限于英语和中文,故可能导致语言偏倚。第四,检测 GPC3 的血清学检测方法限制为 ELISA,因其他血清学检测方法的相关文献少,无法进行比较分析,可能存在信息偏倚,待其他方法研究更加成熟后可进一步评估不同方法对 GPC3 的检测价值。

参考文献

- [1] 王红阳. 肝癌诊断与预后判断的分子标志物[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(4):241-243.
- [2] 余娟平, 徐伟文. Glypican-3 的血清检测与原发肝癌诊断的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(3):189-193.
- [3] Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Sci, 2009, 100(8):1403-1407.
- [4] 周伟,郭霞,曹志刚,等. 血清 Glypican-3 检测在肝癌诊断中的临床意义[J]. 肿瘤, 2007, 27(9):679-682.
- [5] Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, et al. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(7):2418-2423.
- [6] Jia X, Liu J, Gao Y, et al. Diagnosis accuracy of serum glypican-3 in patients with hepatocellular carcinoma: a systematic review with meta-analysis[J]. Arch Med Res, 2014, 45(7):580-588.
- [7] Yang SL, Fang X, Huang ZZ, et al. Can serum glypican-3 be a biomarker for effective diagnosis of hepatocellular carcinoma? A meta-analysis of the literature[J]. Dis Markers, 2014, 2014:1-11.
- [8] Liu XF, Hu ZD, Liu XC, et al. Diagnostic accuracy of serum glypican-3 for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Biochem, 2014, 47(3):196-200.
- [9] Xu C, Yan Z, Zhou L, et al. A comparison of glypican-3 with alpha-fetoprotein as a serum marker for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(8):1417-1424.
- [10] 喻超,黄早早,杨盛力,等. 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 联

- 合甲胎蛋白检测对原发性肝癌诊断价值的 Meta 分析 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2014, 20(8):566-571.
- [11] Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155(8):529-536.
- [12] Deeks JJ, Macaskill P, Irwig L. The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed [J]. *J Clin Epidemiol*, 2005, 58(9):882-893.
- [13] Chen M, Li G, Yan J, et al. Reevaluation of glypican-3 as a serological marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 423:105-111.
- [14] 白吉明, 李建华, 钱浩, 等. 甲胎蛋白糖类抗原磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 单独或联合检测在原发性肝癌诊断中的研究 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2012, 19(2):126-128.
- [15] 陈耀敏. Glypican-3 和 AFP 联合检测对原发性肝细胞癌的诊断意义 [J]. 现代诊断与治疗, 2012, 23(5):392-394.
- [16] 付顺军, 李绍强, 林杰, 等. 血清磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 蛋白测定在肝细胞癌诊断中的价值 [J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2010, 4(6):553-556.
- [17] 李鹏, 翟云, 刘晖, 等. 血清 AFP、GPC3、VEGF、IGF-II 单独及联合检测对原发性肝细胞癌的诊断价值 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 25(5):2702-2706.
- [18] 刘阳, 喻红波, 黎健. 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 对原发性肝细胞癌的诊断价值评价 [J]. 现代医学, 2014, 47(2):128-131.
- [19] 王媛媛. 肿瘤生物标志——Glypican-3 临床应用价值的基础研究 [D]. 2008, 南方医科大学.
- [20] 杨贵敏, 杨运强, 赵运胜. 血清异常凝血酶原磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 联合甲胎蛋白检测在原发性肝癌诊断中的临床意义 [J]. 山西医药杂志, 2013, 42(7):783-785.
- [21] 杨华瑜, 王绎忱, 徐海峰, 等. 血清 AFP、GP73、GPC3 单独及联合检测对肝细胞癌的诊断价值 [J]. 癌症进展, 2013, 11(3):249-253.
- [22] 叶迎宾, 张宏, 李淑敏, 等. 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 和 α -岩藻糖苷酶在原发性肝癌中的表达及其诊断意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22):2781-2783.
- [23] 范公忍, 熊锦华, 蔺会云, 等. 血清磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 在肝细胞癌中的表达及其与临床病理因素的相关性 [J]. 肿瘤研究与临床, 2013, 25(10):685-688, 692.
- [24] 卞银珠, 姚登福, 张崇国, 等. 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的表达特征及其在肝癌诊断与鉴别诊断中的价值 [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(4):260-265.
- [25] 马庆庆, 黄建廷, 童华波, 等. 血清标志 Glypican-3 对肝细胞癌诊断价值初步评价 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(2):127-130.
- [26] 王丽丽. Glypican-3 在原发性肝癌中的检测及与 AFP 联合检测的诊断价值 [D]. 2008, 吉林大学.
- [27] 王延峰. 高尔基体蛋白 73 和磷脂酰基醇蛋白聚糖-3 联合测定对原发性肝癌的早期诊断价值 [D]. 2013, 河北医科大学.
- [28] 吴诗品, 刘真真, 杨智. 外周血磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 检测在原发性肝癌诊断中的意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 18(21):3271-3274.
- [29] 张华, 李永兴, 毛顺露, 等. 血清 GPC3 对原发性肝细胞癌的诊断价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6):100-102.
- [30] 周助权, 张民军, 宋胤. 血清 GPC3 与 AFP-L3 检测在原发性肝癌诊断中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 36(1):49-50, 53.
- [31] Qiao SS, Cui ZQ, Gong L, et al. Simultaneous measurements of serum AFP, GPC-3 and HCCR for diagnosing hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58(110-111):1718-1724.
- [32] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(1):89-97.
- [33] Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, et al. AFP, PIVKAI, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease [J]. *BMC Cancer*, 2008, 18(8):200.
- [34] Ozkan H, Erdal H, Kocak E, et al. Diagnostic and prognostic role of serum glypican 3 in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Lab Anal*, 2011, 25(5):350-353.
- [35] Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(1):16-25.
- [36] Akutsu N, Yamamoto H, Sasaki S, et al. Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(28):3521-3528.
- [37] Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, et al. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(1):129-137.

- [38] Lee HJ, Yeon JE, Suh SJ, et al. Clinical utility of plasma glypican-3 and osteopontin as biomarkers of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut Liver*, 2014, 8(2):177-185.
- [39] Abdelgawad IA, Mossallam GI, Radwan NH, et al. Can Glypican3 be diagnostic for early hepatocellular carcinoma among Egyptian patients?[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12):7345-7349.
- [40] Soha ZE, Maha MES, Nashwa S, et al. Diagnostic role of serum glypican-3 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Nature and Science*, 2012, 10(4):32-38.
- [41] Youssef M, El-Sharkawy S, Abbas N. Clinical utility of Glypican-3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Integ Biol*, 2010, 10(1):41-47.
- [42] Badr EAE, Korah TE, Ghani AA, et al. Role of serum glypican-3 in the diagnosis and differentiation of small hepatocellular carcinoma from hepatitis-C virus cirrhosis[J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2014, 50(3):221-226.
- [43] Walter SD. Properties of the summary receiver operating characteristic (SROC) curve for diagnostic test data [J]. *Stat Med*, 2002, 21(9):1237-1256.
- [44] Rosman AS, Korsten MA. Application of summary receiver operating characteristics (sROC) analysis to diagnostic clinical testing[J]. *Adv Med Sci*, 2007, 52:76-82.
- [45] 王永川, 魏丽娟, 刘俊田, 等. 发达与发展中国家癌症发病率与死亡率的比较与分析 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(10):679-682.
- [46] 彭仙娥, 林建银, 林万松, 等. 中国人群 HBV 和 HCV 双重感染与肝细胞肝癌关系的 Meta 分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(2):89-92, 104.
- [47] Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution[J]. *Am J Transplant*, 2002, 2(6):560-567.
- [48] Hippo Y, Abutatani H, Satoh H. Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma-response[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(1):372-373.
- [49] Ma RJ, Wang SH, Qin SN, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody against glypican-3 [J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2012, 31(6):455-461.
- [50] Yu J, Ma Q, Zhang B, et al. Clinical application of specific antibody against glypican-3 for hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(3):234-239.
- [51] Yu JP, Xu XG, Ma RJ, et al. Development of a clinical chemiluminescent immunoassay for serum GPC3 and simultaneous measurements alone with AFP and CK19 in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Lab Anal*, 2015, 29(2):85-93.
- [52] 李丹, 张菁, 白鑫, 等. 新型肝癌标志物 Glypican-3 时间分辨荧光免疫法的建立[J]. *中华核医学杂志*, 2011, 31(3):201-204.
- [53] Zhang QY, Xiao Q, Lin Z, et al. Development of a competitive radioimmunoassay for glypican-3 and the clinical application in diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(12):1003-1008.

4R22 修饰的紫杉醇脂质体对肺癌细胞多药耐药的逆转作用

周毅¹ 王赫^{2*} 朱丽娜¹

[摘要] **目的** 探索 4R22 修饰的紫杉醇脂质体逆转肺癌细胞(耐顺铂阿霉素细胞株 A549/Adr)多药耐药的能力。**方法** 薄膜分散法制备 4R22 修饰的紫杉醇脂质体(4R22-liposome-paclitaxel, 4R22-LP-PTX);通过马尔文粒径、电位仪测试脂质体的物理性能,通过流式细胞仪检测 4R22-LP-PTX 在普通 A549 和耐药的 A549/Adr 细胞中诱导凋亡的能力和转染能力;通过 MTT 法测试 4R22-LP-PTX 对 A549/Adr 细胞的抑制率;通过流式细胞仪定量观察 4R22-LP-PTX 转入细胞中的荧光量。**结果** 成功构建 4R22-LP-PTX,平均粒径为 106.5 nm,电位为 3.12 mv, PDI 为 0.22,包封率 85%。4R22-LP-PTX 能显著性的逆转耐药,有效的诱导 A549/Adr 细胞的凋亡,有效诱导 A549/Adr 细胞的增殖的抑制和有效的转染进入细胞表达, $P < 0.05$ 。**结论** 成功构建的 4R22-LP-PTX 具有逆转人肺癌细胞 A549/Adr 耐药性的能力。

[关键词] 4R22;紫杉醇脂质体;耐药肺癌细胞

Overcoming the drug resistance in lung cancer cells with 4R22-modified paclitaxel liposome treatment
ZHOU Yi¹, WANG He^{2*}, ZHU Lina¹

(1. College of Pharmaceutics Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 511436; 2. Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510260)

[ABSTRACT] **Objective** To study how to regain the sensitivity to the drugs in the drug resistant lung cancer cells with 4R22 modified paclitaxel liposome (4R22-LP-PTX) treatment. **Methods** 4R22-LP-PTX was prepared by film dispersion method. The biophysical properties of 4R22-LP-PTX were tested by Malvin size and potentiometer. The apoptosis of lung cancer cells (A549 cells and A549/Adr cells [resistant cell line]) and carrying capacity induced by 4R22-LP-PTX were evaluated by flow cytometry. Inhibition rates of 4R22-LP-PTX on A549/Adr cells were determined by MTT method, and fluorescence of 4R22-LP-PTX penetrated in the cells was quantified by flow cytometry. **Results** 4R22-LP-PTX was successfully constructed. The average particle size, potential, PDI, and coating rate were 106.5 nm, 3.12 mv, 0.22, and 85%, respectively. 4R22-LP-PTX could be effectively transfected into A549/Adr cells, significantly overcome the drug resistance, induce apoptosis of A549/Adr cells, and thus inhibit the proliferation of A549/Adr cells, compared with A549 cell ($P < 0.05$). **Conclusion** 4R22-LP-PTX can be successfully constructed, transfected into the drug resistant human lung cancer cells, and thus overcome the drug resistance of the cancer cells.

[KEY WORDS] 4R22; Paclitaxel liposome; Drug resistant lung cancer cells

基金项目:国家自然科学基金(81402023)

作者单位:1. 广州医科大学药学院,广东,广州 511436

2. 广州医科大学附属第二医院肿瘤科,广东,广州 510250

*通讯作者:王赫, E-mail: wanghe97@hotmail.com

化疗是肺癌的主要治疗手段之一,而多药耐药是导致肺癌化疗失败的主要原因^[1-2]。大量文献已经报道肿瘤靶向给药系统能逆转耐药性从而诱导耐药细胞的凋亡^[3]。肿瘤靶向给药系统是指借助载体、配体或抗体将药物选择性地浓集定位于靶组织、靶器官、靶细胞或细胞内结构的给药系统^[2]。其中靶头修饰的纳米粒或者胶束能有效的逆转多药耐药性^[4],目前靶头主要集中在抗体或者多肽方面,与前者相比,小分子短肽有着体积小、易渗入组织和免疫原性小等优点。前期文献报道 4R22 是经过噬菌体库筛选后特异性的靶向非小细胞肺癌的小分子短肽,它具有和药物传递系统靶向肺癌的靶头功能^[5],但其是否能有效逆转多药耐药尚未定论。因此本研究以脂质体为载体,制备了 4R22 修饰的紫杉醇脂质体 (4R22-liposome- paclitaxel, 4R22-LP-PTX),检测其逆转多药耐药的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

Sizer Nano ZS 90 型激光粒度仪及 ZETA 电位分析仪(英国 Malvern instruments Ltd)。大豆磷脂(上海太伟药业有限公司);胆固醇(美国 sigma 公司);DSPE-PEG 2000 和 DSPE-PEG 3500(美国 Avanti polar lipids);香豆素-6(coumarin-6, coumarin, 美国 sigma 公司);DMEM 高糖培养基和胎牛血清(美国 GIBCO 公司);其余试剂为分析纯。人肺癌细胞 A 549 和顺铂(CDDP)诱导耐受的 A549/Adr 由本实验室提供。4R22(CSNIDARAC)由 invitro 公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 4R22-LP-PTX 的制备及其表征

参照文献方法^[6-7]合成 磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 3500-4R22(DSPE-PEG 3500-4R22)。使用薄膜分散法制备 4R22 修饰脂质体。将处方量的紫杉醇, SPC, Cho, DSPE-PEG 3500-4R22, DSPE-PEG 2000, DSPE-PEG-OMe(保证总磷脂:胆固醇=73:27(摩尔比),分别溶于氯仿,置 50 mL 茄形瓶中旋转蒸发成膜后,再置真空干燥器中过夜。加入 2.5 mL PBS 缓冲液(pH 7.4),置空气浴摇床中,37℃, 180 r/min, 20 min 水化,水浴超声 5 min 脱膜,探头超声制备得到 4R22-LP-PTX 或者载香豆素-6 脂质体(4R22-LP-coumarin)。

取适量制备得到的脂质体样品,用激光粒度仪测定其粒径和电位。采用葡萄糖凝胶柱色谱法分离脂质体与未包载的紫杉醇,将过柱后的脂质体采用甲醇破乳,用高效液相色谱法在 228 nm 检测紫杉醇含量。按照 $EE\% = \frac{W_{包}}{W_{投}} \times 100\%$ 计算包封率。 $W_{包}$:脂质体中包载的药物量。 $W_{投}$:制备脂质体的投药量。

1.2.2 A549 细胞对载 coumarin 脂质体的摄取

流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)用于本次实验^[8]。将对数生长期的细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,37℃培养 24 h 后,每孔加入 coumarin, LP-coumarin 和 4R22-LP-coumarin 0.5 h, coumarin 最终浓度为 1.0 mol/L。相同的培养液作为对照组。孵育后,细胞用冰冷的 PBS 冲洗 2 次停止细胞的吸收。而后加入 0.5% trypsin-EDTA,最后吸收的细胞量使用流式细胞仪计数。每个实验重复 3 次。

1.2.3 荧光显微镜检测 4R22-LP- rhodamine 123 进入细胞内的研究^[9]

简要如下:A549, A549/Adr 细胞种在 12 孔板中,密度是 10×10^4 cells/孔。在 5% CO₂, 37℃培养 24 h 后,细胞分别使用 rhodamine 123, LP- rhodamine 123 和 4R22-LP- rhodamine 123 作用 2h, rhodamine 123 在 A549 和 A549/Adr 细胞上的终浓度为 10.0 mol/L。细胞用冰冷的 PBS 冲洗 2 次,再使用 Hoechst 333342 (10 mol/L) 孵育 30min 后,冲洗细胞,最后用流式细胞仪检测。对照组使用相同条件处理。

1.2.4 细胞毒性实验

培养 A549 和 A549/Adr 细胞并接种于 96 孔板中。孔板中细胞完全贴壁且处于对数生长期时加入无菌过滤后的紫杉醇浓度分别为 0.25 μg/mL、2.5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL 的脂质体。将孔板移入 37℃或 4℃ CO₂ 孵箱中培养 24 h 后取出,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,再放回孵箱中继续孵育 4 h,将孔板中液体倒出,每孔加入 200 μL DMSO。37℃避光振摇 15 min,用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的光密度值。

1.2.5 细胞凋亡实验

A549 和 A549/Adr 细胞并接种于 96 孔板中。孔板中细胞完全贴壁且处于对数生长期时加入无菌过滤后的 Taxol, LP-PTX, 4R22-LP-PTX, 最终

紫杉醇浓度为 10 mol/L 的脂质体。将孔板移入 37℃或 4℃ CO₂ 孵箱中培养 24 h 后取出,细胞混悬在缓冲液中,分别加入 10 μL 的 Annexin V-FITC,室温孵育 15 min,再加入 5 μL PI,使用流式细胞仪分析,重复 3 次。

1.2.6 统计学方法

正态计量数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,两组间比较用 *t* 检验,多

组间比较用方差分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4R22-LP-PTX 的表征

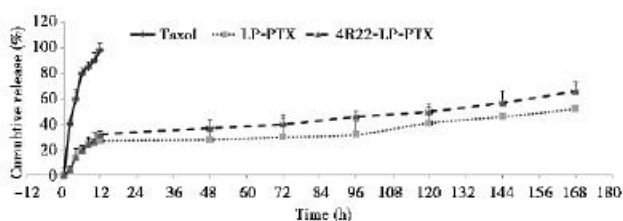
制备得到的 4R22-LP-PTX 的粒径在 106.5 nm 左右,粒径分布系数 PDI<0.3,zeta 电位为 3 mV 左右,紫杉醇的包封率为 88.5%(见表 1)。

表 1 不同 PTX 纳米粒的物理特征(*n* = 3)

Table 1 The physical characteristics of different PTX nanoparticles (*n* = 3)

	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	PDI	Encapsulation (%)	DLC (%)
LP	85.3 ± 6.8	-2.1 ± 2.1	0.17 ± 0.08	-	-
LP-PTX	99.2 ± 5.3	-2.5 ± 1.3	0.21 ± 0.04	88.2	17.2 ± 4.5
4R22-LP-PTX	106.5 ± 10.3	3.1 ± 1.2	0.22 ± 0.05	89.5	16.3 ± 3.2

图 1 显示体外评估纳米粒在包含 10%FBS 的 PBS 中释放 PTX 的累积量。结果显示,在 2 h 时,所有纳米粒释放 PTX 都少于 20%。超过 12 h,注射的 PTX 在体液中释放超过了 98%,但注射剂 Taxol 不及 10%。同时,LP-PTX 和 4R22-LP-PTX 纳米粒释放 PTX 在 12 h 时分别为 (32.3±2.23)%, (44.4±4.45)%和 (53.4±5.54)%。与注射 PTX 相比,纳米粒释放 PTX 都出现了延迟的特点。然而,12 h 后,所有纳米粒的释放曲线趋于平衡。



3种不同的 PTX 制剂在 37℃, pH 7.4, 含 10%胎牛血清 PBS 中的释放率(mean±SD, *n* = 3)

图 1 Paclitaxel 纳米粒的释放率(%)

Figure 1 Release rates (%) of Paclitaxel-loaded nanoparticle

2.2 A549 细胞对脂质体的摄取

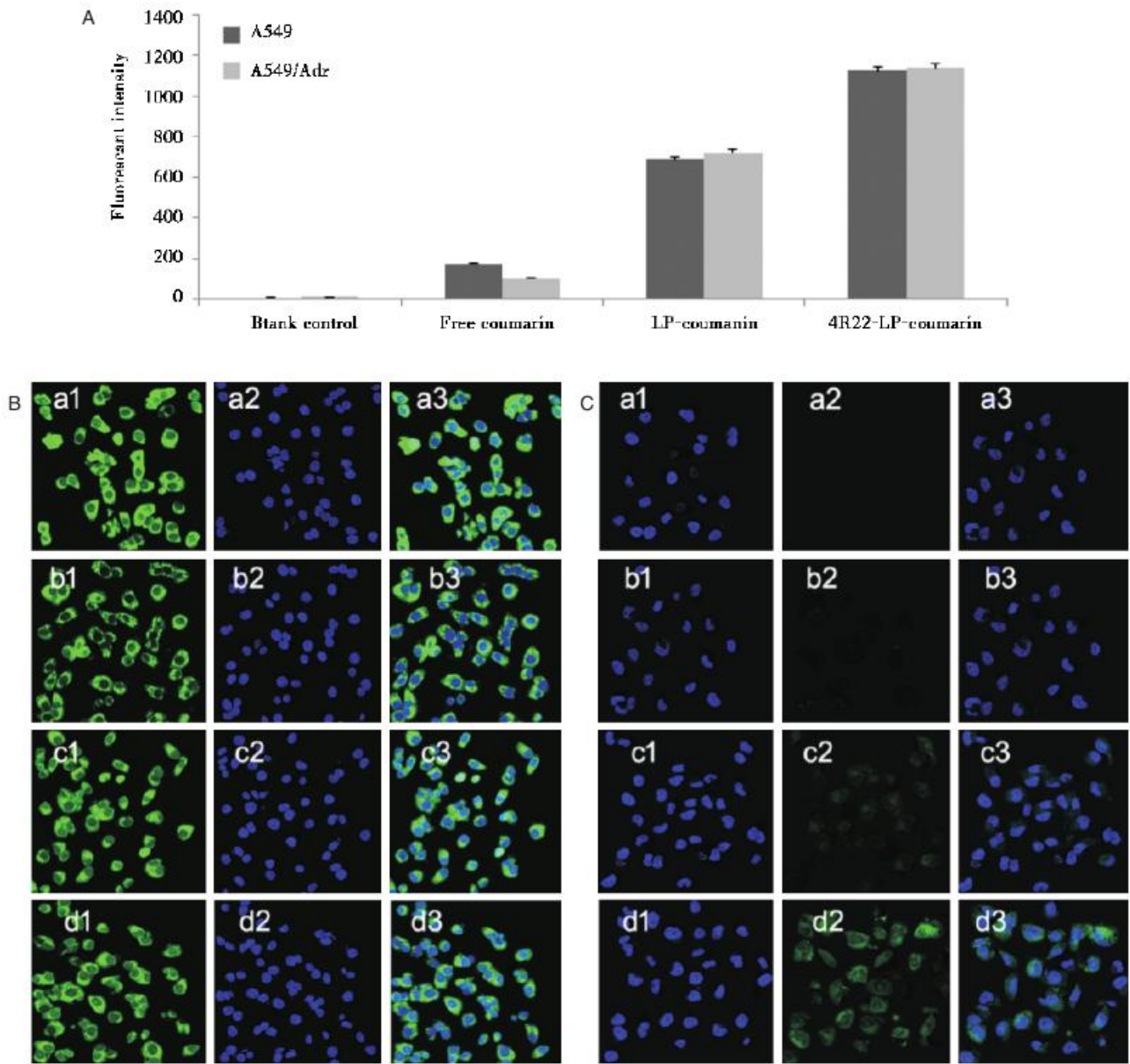
图 2A 显示的是肿瘤细胞对各种包载 PTX 制剂吸收后的流式结果。肿瘤细胞对脂质体的摄取量与流式细胞检测的荧光强度成正比,空白组、Taxol、LP-PTX 和 4R22-LP-PTX 在 A549 细胞上的荧光强度分别为 5.45.55 ± 1.22, 224.56 ± 3.45,

510.34±12.33, 778.98±12.34; 而在 A549/Adr 中的强度分别为 6.44 ± 1.21, 121.34 ± 1.34, 465.56 ± 13.23, 790.65±12.45。靶向制剂在 A549/Adr 中的吸收略高于 A549, 提示靶向制剂能有效逆转耐药。

为了进一步观察细胞对不同组药物吸收的情况,使用 rhodamine 123 代替 PTX 制备并分组成 rhodamine 123, LP-rhodamine 123 纳米粒和 4R22-LP-rhodamine 123 纳米粒。图 2B 显示,亲水性的 rhodamine 123 能较好的分布在 A549 细胞中,导致了绿色荧光累积。当 rhodamine 123 被包入形成纳米粒时,与 rhodamine 123 和 LP-rhodamine 123 纳米粒相比,4R22-LP-rhodamine 123 纳米粒在细胞浆中的重叠图像显示出更强的绿光。相反,rhodamine 123 在 A549/Adr 中的荧光强度有限(图 2C)。同时,我们发现,4R22-LP-rhodamine 123 在 A549/Adr 细胞中的重叠的荧光强度接近在 A549 细胞中的(图 2C)。该结果进一步证明了 4R22-LP-rhodamine 123 纳米粒能更有效的逆转耐药。

2.3 4R22-LP-PTX 体外诱导耐药 A549 凋亡和细胞毒性

图 3 显示在空白组、taxol 组、LP-PTX 组和 4R22-LP-PTX 组作用中,A549 和 A549/Adr 细胞凋亡的情况。细胞早期凋亡作为评价标准。空白组、Taxol 组、LP-PTX 组和 4R22-LP-PTX 组诱导



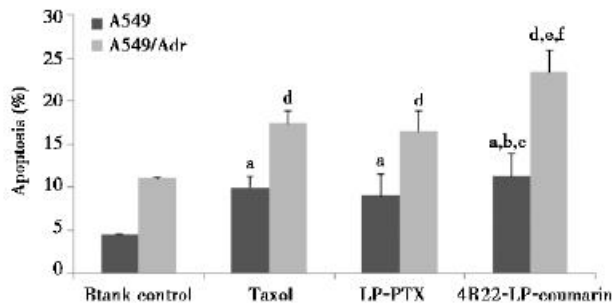
A: A549 细胞对脂质体的摄取。应用流式细胞仪观察人肺癌细胞 A549、A549/Adr 对 coumarin(A) 标记纳米粒的摄取及观察人肺癌细胞对 rhodamine 123(B,C) 标记的纳米粒的吸收。B: A549; C: A549/Adr; “a, b, c, d” 分别代表 PBS, rhodamine 123, LP-rhodamine 123 和 4R22-LP-rhodamine 123。“1”代表 rhodamine 123; “2”代表使用 Hoechst 33342 染色; “3”代表两则合并

图 2 A549 细胞对脂质体的摄取

Figure 2 Intracellular uptake of liposome by A549 cells

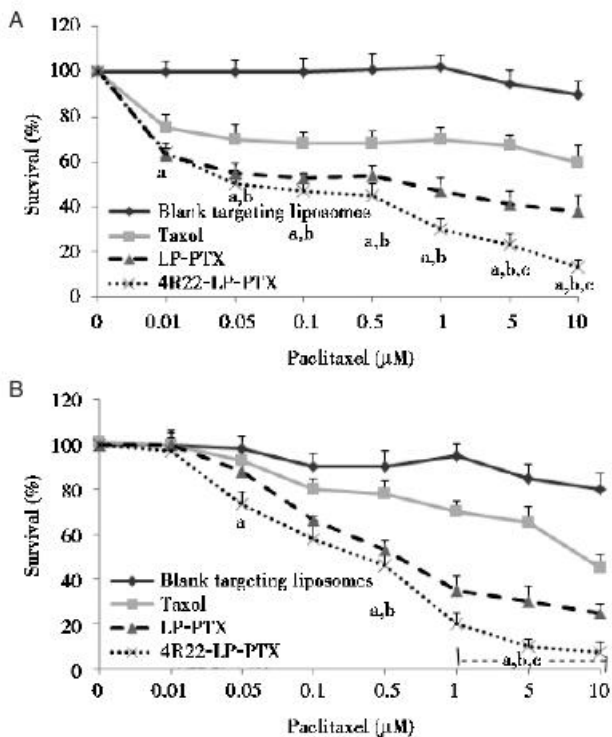
A549 细胞凋亡率分别是 4.44%, 10.43%, 9.34% 和 11.65%, 而诱导 A549/Adr 凋亡率分别为 11.54%, 17.65%, 16.45% 和 23.46%。其中 4R22-LP-PTX 组诱导的 A549/Adr 相对凋亡率(4R22-LP-PTX 组减掉 PBS 组后的凋亡值)与 A549 相比, 差异不显著 ($P=0.085$) 提示 4R22-LP-PTX 组能逆转耐药, 诱导肺癌细胞凋亡。

图 4 显示了在不同组药物对 A549 (A) 和 A549/Adr(B) 细胞的抑制性。和 Taxol 以及 LP-PTX 相比, 4R22-LP-PTX 在 1, 5, 10 mol/L 的浓度下显著抑制了 A549 和 A549/Adr 细胞, $P<0.05$ 。空靶向纳米粒展现较小的抑制性 ($<1 \text{ mol/L}$), 并且在高浓度 10 μm 对两细胞的抑制率小于 30%。



不同制剂作用 A549, A549/Adr 后的凋亡率 (mean±SD, n=3) 在 A549 细胞: a, 与空白对照组相比, P<0.05; b, 与紫杉醇注射用相比, P<0.05; c, 与紫杉醇脂质体相比, P<0.05. 在 A549/Adr: d, 与空白对照组相比, P<0.05; e, 与紫杉醇注射用相比, P<0.05; f, 与紫杉醇脂质体相比, P<0.05

图3 4R22-LP-PTX 体外诱导耐药 A549 凋亡和细胞毒性
Figure 3 4R22-LP-PTX induced drug resistance A549 apoptosis *in vitro*



PTX 脂质体作用 A 549 (A) 和 A549/Adr (B); 细胞 48 h 后的增殖抑制率 a, P<0.05, vs blank targeting liposomes; b, P<0.05, vs taxol; c, P<0.05, vs LP-PTX

图4 4R22-LP-PTX 在耐药 A549 细胞上的细胞毒性
Figure 4 Cell toxicity in 4R22-LP-PTX treated drug resistant A549 cell

3 讨论

MDR是导致恶性肿瘤化疗疗效差的主要原因之一^[10],寻找和开发新药或治疗策略成为当务之急。药物传递系统在传递抗癌药物到达肿瘤部位逆转耐药、提高疗效发挥着重要的功效,其中靶向基因修饰、且由生物降解材料构建的载体在药物传递系统研究中备受关注^[11]。

4R22-LP-PTX 纳米粒具有以下的特点:小粒径,高包封率和较低的阳性点位(图1)。小粒径和高包封率能使 4R22-LP-PTX 进入肿瘤组织,并且通过 EPR 效应在肿瘤组织中累积^[12]。较低的阳性电位能使纳米粒进入肿瘤细胞后很好的与带有负电荷的线粒体结合^[13]。

在药物释放实验中,释放期间的前 2h,纳米粒中小量药物释放可以防止药物在传递过程中因泄漏带来的较大损失。即能保证药物释放后期在细胞、肿瘤中的药物累积达到较高的浓度。在肿瘤细胞毒性评价中,虽然 Taxol 的抑制能力在 A549/Adr 细胞中受到限制,但 4R22-LP-PTX 在 A549 和 A549/Adr 展现出强大的抑制率,而且两者的抑制率相近,提示 4R22-LP-PTX 有较强的逆转耐药的能力(图1)。

在凋亡评价中,4R22-LP-PTX 同样在 A549 和 A549/Adr 表现出优秀的诱导细胞凋亡的能力(图3)。各种剂型诱导凋亡的效率相似或者有轻微不同。诱导 A549/Adr 细胞高凋亡率是由于未加药 A549/Adr 细胞高凋亡(与空白对照 10.65±0.43%, 4R22-LP-PTX: 24.05±0.40%) 造成。而在 A549 细胞上的低凋亡率起源于未加药 A549 细胞低凋亡(与空白对照: 4.63±0.27% 相比, 4R22-LP-PTX: 11.33±0.58%)。在未加药 A549/Adr 中的高凋亡是由于 CDDP 诱导并保持 CDDP 耐受 A549 的培养中造成的。从结果,我们可以清晰的看出 4R22-LP-PTX 诱导耐药的 A549/Adr 细胞凋亡的效果与普通的 A549 无显著性差异,进一步证实了 4R22-LP-PTX 逆转耐药、诱导肿瘤细胞的凋亡。

通过流式细胞仪检测,我们清晰观察到 rhodamine 123 进入细胞浆产生的绿光的情况;同时借助 Hoechst 33342 染核产生的蓝光,观察脂质体作用到核,最后诱导细胞死亡的情况。与普通 A549

细胞相比,普通 rhodamine 123 进入 A549/Adr 细胞核的量有限,产生较弱的蓝光;而 4R22-LP- rhodamine 123 带来显著的蓝光(重叠部分)。重要的是,与 A549 细胞相比,4R22-LP-rhodamine 123 转入 A549/Adr 细胞率无显著性差异,提示 4R22-LP- rhodamine 123 有较好的逆转耐药功能。其机制可能是靶头 4R22 修饰的脂质体运载了大量 rhodamine 123 在 A549 细胞的聚集、内吞并且作用细胞核。

综上所述,4R22-LP-PTX 能显著性的逆转耐药,并有效的诱导 A549/Adr 细胞的凋亡,该制剂可成为临床治疗耐药的手段的选择。

参考文献

- [1] Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, et al. Drug delivery systems: An updated review[J]. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 2012, (2):2-11.
- [2] Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS letters, 2006, 580 (12):2903-2909.
- [3] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998,281(1):1309-1312.
- [4] Wong ST, Goodin S. Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer[J]. Pharmacotherapy, 2009,29(2):954-965.
- [5] Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria—the death signal integrators[J]. Science, 2000,289(25):1150-1151.
- [6] Dash R, Richards JE, Su ZZ, et al. Mechanism by which Mcl-1 regulates cancer-specific apoptosis triggered by mda-7/IL-24, an IL-10-related cytokine[J]. Cancer Research, 2010,70(35):5034-5045.
- [7] 黄宇筠,袁润强,陈应智,等. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与扩增的比较及其与血清 CEA 水平的关系 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(1): 22-26.
- [8] Zhao X, Ayer RE, Davis SL, et al. Apoptosis factor EI24/PIG8 is a novel endoplasmic reticulum-localized Bcl-2-binding protein which is associated with suppression of breast cancer invasiveness[J]. Cancer Research, 2005,65(25):2125-2129.
- [9] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [J]. Annual Review of Biochemistry, 1999,68(5):383-424.
- [10] Biasutto L, Dong LF, Zoratti M, et al. Mitochondrially targeted anti-cancer agents[J]. Mitochondrion, 2010,10 (13):670-681.
- [11] Galeano E, Nieto E, Garcia-Perez AI, et al. Effects of the antitumoural dequalinium on NB4 and K562 human leukemia cell lines. Mitochondrial implication in cell death[J]. Leukemia Research, 2005,29 (20):1201-1211.
- [12] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. MolPharm, 2007,4(8):4807-4818.
- [13] Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor[J]. J Control Release, 2005,103(3):405-418.
- [11] Zheng J, Yang YB, Zhang DY, et al. Application and comparison of 3 kinds of vibrio parahemolyticus using sero-grouping, PFGE-typing and ERIC-typing[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(5):1051-1056.
- [12] Merzougui S, Lkhider M, Grosset N, et al. Differentiation by molecular typing of bacillus cereus isolates from food in morocco: PFGE-Eric PCR [J]. Food & Public Health, 2013,3(4):223-227.
- [13] Casarez EA. Genotype diversity of escherichia coli isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR[J]. Water Research, 2007,41(16):3643-3648.
- [14] 孙晶,常军霞,刘巍. ERIC-PCR 与 PFGE 检测铜绿假单胞菌同源性的方法学比较[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(4):297-302.
- [15] Ture M, Altinok I, Capkin E. Comparison of PFGE and ERIC-PCR and biochemical tests to characterize *Lactococcus garvieae*[J]. Journal of Fish Diseases, 2015, 38(1):37-47.
- [16] 闻海丰,冯忠军,于文静,等. PFGE 对医院分离鲍曼不动杆菌的同源性分析[J]. 现代医学, 2015,43(4):403-409.
- [17] 闻海丰,秦瑾,于文静,等. 应用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链式反应对鲍曼不动杆菌进行同源性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015,7(4):51-56.

(上接第 31 页)

29例男性乳腺癌临床分析

韩娜 王晓稼*

[摘要] 目的 探讨男性乳腺癌的临床特征及影响预后的因素。方法 回顾性分析2004年12月至2013年12月本院收治的29例男性乳腺癌患者的临床资料,应用Kaplan-Meier模型分析男性乳腺癌的生存情况。结果 本组5年生存率为47.9%,2年生存率为81.2%。单因素分析示手术方式($P=0.026$)、腋窝淋巴结转移($P=0.010$)和肿瘤分期($P<0.001$)影响患者预后。Cox回归多因素分析示肿瘤分期($P=0.037$)是影响预后的主要因素。结论 对男性乳腺癌应提高早期诊断率,一旦确诊应积极采取外科手术联合放、化疗、内分泌治疗提高患者的生存率。男性乳腺癌的预后与临床分期有一定关系。

[关键词] 乳腺肿瘤;男性;临床特征;综合治疗

Clinical analysis of 29 cases of male breast cancer

HAN Na, WANG Xiaojia*

(Department of Medical Oncology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, Zhejiang, China, 310022)

[ABSTRACT] **Objective** To discuss the clinical characteristics and prognostic factors of male breast cancer (MBC). **Methods** The clinical data of 29 male patients with breast cancer between December, 2004 and December, 2013 were collected and analyzed retrospectively. Survival rate was evaluated with Kaplan-Meier method. **Results** In this study, the 5-year overall survival rate was 47.9%, and the 2-year overall survival rate was 81.2%. Univariate analysis demonstrated that the prognoses of the patients were significantly influenced by the surgical options ($P = 0.026$), axillary lymph node metastasis ($P = 0.010$) and tumor stage ($P < 0.001$). Multivariate Cox regression showed that tumor stage ($P = 0.037$) was an independent prognostic factor for MBC. **Conclusion** The management of male breast cancer could be improved with early diagnosis. The surgical resection combined with radiotherapy, chemotherapy and endocrine therapy is the optimal treatment for male breast cancer. The prognoses of MBC correlates with the tumor stages.

[KEY WORDS] Breast cancer; Male; Clinical characteristics; Combination therapy

男性乳腺癌(male breast cancer, MBC)是一种相当罕见的特殊类型的乳腺癌,其发病率占所有乳腺癌患者中占0.5%~1%^[1-2],治疗方法国际上尚无统一的金标准。临床上其发病年龄一般比女性发病晚,通常表现为乳头或乳晕无痛性肿块及乳头溢液。本病易引起早期皮肤及深部组织结构侵犯,预后较差。但近年来其发病率呈增长趋势,

严重影响患者的身体健康。

为探讨男性乳腺癌患者的临床特征及预后因素,本文对近几年本院收治的29例男性乳腺癌患者的临床资料进行回顾性分析,并结合国内外参考文献,对其临床特征、诊治规范及影响预后因素进行探讨,现分析如下。

基金项目:国家自然科学基金(81202806)

作者单位:浙江省肿瘤医院化疗中心,浙江,杭州 310022

*通讯作者:王晓稼, E-mail: wxiaojia0803@163.com

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2004年12月至2013年12月浙江省肿瘤医院收治的29例男性乳腺癌患者为研究对象,本组病例均经活检或术中病理证实为乳腺癌,性别均为男性。年龄41岁~75岁(中位年龄55岁),其中60岁以上者12例,占41.3%。1例患者为多原发恶性肿瘤,3例患者有肿瘤家族史。所有患者均无前列腺癌史或长期应用雌激素治疗史。

1.2 临床表现

自觉症状到确诊时间最短10天,最长20年,平均40.7个月,就诊时均有乳房肿块,其中27例患者的首发症状均表现为无痛性乳腺肿块,1例是扪及左腋下淋巴结肿大就诊,1例外伤无意中发现。其他伴随症状为皮肤粘连或乳头回缩5例,乳头破溃溢液1例。

1.3 病理特征

按照美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer Staging, AJCC)第7版肿瘤、淋巴结、远处转移分期(tumor node metastasis, TNM)标准:I期7例,II期8例,III期11例,IV期3例,29例患者均经病理学确诊,浸润性导管癌27例,浸润性筛状癌1例,单纯癌1例。有腋窝淋巴结转移患者18例,腋窝淋巴结转移率为62.1%。其中26例患者进行了激素受体检测:雌激素受体(estrogen receptor, ER)/孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性24例,阴性2例。

1.4 治疗方法

除1例患者乳房肿块局切术后自动出院,其他28例患者接受以手术为主的综合治疗,手术方式包括乳腺癌根治术6例,乳腺癌改良根治术20例,全乳房切除术2例。3例行术前辅助化疗;23例术后接受以表阿霉素和紫杉醇为主的辅助化疗,化疗方案为环磷酰胺+表柔比星+氟尿嘧啶、多西他赛+表柔比星+环磷酰胺、表柔比星+环磷酰胺和多西他赛+表柔比星;6例淋巴结转移者行术后辅助放疗,靶区包括胸壁及锁骨上下淋巴引流区;9例患者接受三苯氧胺内分泌治疗;1例患者接受香化酶抑制剂治疗。

1.5 随访及统计学方法

生存时间自病理诊断明确之日起计算,所有

患者均随访至2014年12月。应用SPSS 19.0统计软件进行分析,用Kaplan-Meier法计算生存率,Long-rank进行检验,多因素分析采用Cox比例风险模型, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

本组患者27例获随访,失访2例,随访率93.1%。随访期为8个月~120个月,中位随访44个月。本组5年总生存率为47.9%,2年生存率为81.2%(图1)。I期患者5年生存率为83.3%,II期患者5年生存率为66.7%,III期患者5年生存率为13.9%,IV期患者无5年生存病例。

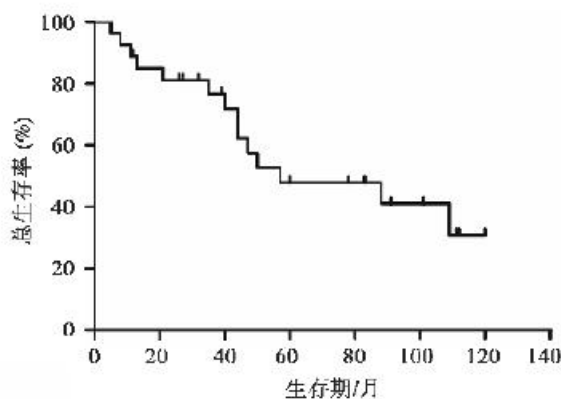


图1 全组患者的生存曲线

Figure 1 The survival curve of all patients

预后经单因素分析结果显示,手术方式、腋窝淋巴结转移和肿瘤分期是影响预后的主要因素(表1)。对单因素分析显示与男性乳腺癌患者预后相关的因素进行Cox回归多因素分析,结果显示肿瘤分期($P=0.037$)是影响预后的主要因素。

3 讨论

男性乳腺癌较为少见,发病年龄分布以单峰形态为主,发病率与年龄呈正相关,发病高峰为68岁~71岁,平均年龄一般是60岁,较女性患者相对要晚约10年^[3]。本组患者平均年龄为57岁。男性乳腺癌发病率近来有上升趋势,病因至今尚未明确。研究认为,内分泌异常导致的雌激素过多,可能与男性乳腺癌有直接关系,如Klinefelter综合征、肝硬化、前列腺癌、肥胖等^[4]。癌症家族尤其是乳腺癌家族,其患乳腺癌的危险性将增加。乳腺癌易感基因2(breast cancer susceptibility gene 2,

表1 患者一般资料及预后因素分析结果
Table 1 The results of clinical data and prognostic factors analysis

部分临床特征	例数	5年生存率(%)	P值
年龄			
≥60岁	12	50.5	0.950
<60岁	17	47.4	
部位			
左侧	20	38.7	0.068
右侧	9	74.0	
肿瘤大小			
≤2cm	15	55.9	0.194
2~5cm	14	50.1	
手术方式			
改良根治	20	67.5	0.026
根治	6	44.0	
其他	3	0.0	
腋窝淋巴结			
阳性	18	25.8	0.010
阴性	11	77.8	
临床分期			
I+II	15	75.0	<0.001
III+IV	14	12.1	
ER/PR			
阳性	24	55.4	0.147
阴性	2	12.0	
化疗			
有	23	51.7	0.445
无	6	27.8	
放疗			
有	6	40.0	0.500
无	23	49.5	
内分泌治疗			
有	10	71.4	0.157
无	19	35.7	

BRCA2)属于肿瘤抑癌基因,在男性,BRCA2基因突变将导致5%的患病风险^[5-6]。此外,与编码细胞周期调节激酶(cell-cycle-checkpoint kinase gene, CHEK2)、细胞色素CYP17A1 (cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1, CYP17A1)变异、职业和环境因素、饮酒都可能是致病因素^[7]。Nilsson等^[8]发现男性乳腺癌样本中ER/PR阳性率高达77%~93%,均显著高于女性乳腺癌患者。本组患者ER/PR阳性的比例92.3%,这提示局部

ER、PR因素是男性乳腺癌的重要因素,对发病及治疗可能起着非常重要的作用。

男性乳腺癌首发症状相对单一,一般为单侧,以乳腺肿块为最常见。国外资料表明其占有首发症状的比例为61%~98%^[9]。据报道就诊时肿块直径平均大小3.0cm~3.5cm,可伴有乳头凹陷、乳头溢液或乳头皮肤溃疡、腋窝淋巴结肿大等^[10-11]。本组患者27例(93.1%)以乳房肿块就诊,与文献报道相符。MBC的病理类型以浸润性导管癌最为常见,本组浸润性导管癌有27例,占全组病例的93.1%。

由于难以开展大规模的临床研究,男性乳腺癌的治疗措施多借鉴女性乳腺癌,采取以手术治疗为主,辅以化疗、放疗及内分泌的综合治疗^[12]。本组患者除1例自动出院外,其余患者均接受了手术治疗。术后放疗适应证包括皮肤、乳晕或胸肌受累,切缘阳性以及腋窝淋巴结转移等。本组患者有28例接受了手术治疗,其中根治术占20.7%,改良根治术占70.0%,2004年以后的患者接受改良根治术居多。本文的多因素分析显示手术方式对预后影响无显著性影响,这从一定程度上证实了当代手术理念的合理性。尽管没有确切数据说明辅助化疗在男性乳腺癌中的作用和疗效,多项研究均认为辅助化疗能够减少复发和提高存活率,选择治疗方案时可参照女性乳腺癌的标准^[13]。本组26例患者接受术后化疗,但是病例数少,未得出有统计学意义的结果。由于男性乳腺癌多为老年病人,常合并内科疾病,应对化疗可能带来的风险和获益进行更充分的评估^[14]。有研究显示接受放疗的男性乳腺癌患者可使局部区域的5年复发率降至3%~20%,但对死亡率的影响尚小^[15],本组患者只有6例接受放疗,未得出统计学意义。男性乳腺癌中雌激素受体阳性的占到90%以上,故一般认为服用他莫西芬是早期和进展期辅助激素治疗的标准方法。最近几年芳香化酶抑制剂在应用于绝经后女性乳腺癌时显示出比他莫西芬更好的作用,但对于MBC尚处于试验阶段^[15-17]。因为男性80%的雌激素是在外周组织中雄激素通过芳香化酶转变而成,另外睾丸产生20%的雌激素不依赖于芳香化酶,因此老年男性血中雌二醇的含量约为绝经后女性的3倍~4倍。新一代芳香化酶抑制剂和药物性去势应用于男性乳腺癌时显示出更强的特异性和更少的副作用,虽然他莫西芬仍作

为一线药物使用,但阿那曲唑和来曲唑显示出更好的疗效,将会更广泛的应用于临床化疗^[10]。本组研究中仅 10 例(34.5%)患者接受内分泌治疗,无统计学结果可能与阴性样本量少有关,需更多的临床资料进一步证明。

在第 37 届美国圣安东尼奥乳腺癌大会上,研究者报道,男性乳腺癌的 PIK3CA 和 TP53 基因突变率较女性乳腺癌更低,同时,男性乳腺癌的 DNA 修复相关基因如 BRCA 突变更加富集。这些结果也许能为靶向治疗男性乳腺癌提供新的研究方向。

文献报道总结男性乳腺癌患者的资料发现其预后同女性没有明显的差异^[19-21],本研究单因素分析结果提示肿瘤腋窝淋巴结转移、分期、手术方式是显著影响患者预后的重要因素,而多因素分析发现三者中只有分期对预后的影响具有统计学意义。

男性乳腺癌临床少见,发病年龄偏晚,乳腺体积小,转移率高,分期晚,肿瘤易发生浸润性转移,预后差。本组患者平均发现时达 40.6 月,这同缺乏积极的健康知识宣传和自我保健意识有很大关系。作为临床医生,只有充分认识男性乳腺癌的危险因素和临床特征,做到早期发现、早期诊断和早期治疗。

参考文献

- [1] Speirs V, Shaaban AM. The rising incidence of male breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 115(2): 429-430.
- [2] Siegel R, Ma J, Jemal A. Cancer statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1):9-29.
- [3] Pant K, Dutta U. Understanding and management of male breast cancer: a critical review [J]. *Med Oncol*, 2008, 25(3):294-298.
- [4] Huang J, Tan PH, Thiyagarajan J, et al. Prognostic significance of glutathione s-transferase-pi in invasive breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(6):558-565.
- [5] Rizzolo P, Silvestri V, Tommasi S, et al. Male breast cancer: genetics, epigenetics, and ethical aspects[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(8):75-82.
- [6] Qiu LX, Yao L, Xue K, et al. BRCA2 N372h polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 44 903 subjects [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(2):487-490.
- [7] Wasielewski M, den Bakker MA, van den Ouweland A, et al. CHEK2 1100delC and male breast cancer in the Netherlands[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 116(2): 397-400.
- [8] Nilsson C, Johansson I, Ahlin C, et al. Molecular subtyping of male breast cancer using alternative definitions and its prognostic impact[J]. *Acta Oncol*, 2013, 52(1): 102-109.
- [9] Jepson AS, Fentiman IS. Male breast cancer[J]. *Int J Clin Pract*, 1998, 52(8):571-576.
- [10] Joshi MG, Lee AK, Loda M, et al. Male breast carcinoma: an evaluation of prognostic factors contributing to a poorer outcome[J]. *Cancer*, 1996, 77(3):490-498.
- [11] Fentiman IS, Fourquet A, Hortobagyi GN. Male breast cancer[J]. *Lancet*, 2006, 367(9510):595-604.
- [12] La Verde N, Collovà E, Lonardi S, et al. Male breast cancer: clinical features and multimodal treatment in a retrospective survey analysis at Italian centers [J]. *Tumori*, 2013, 99(5):596-600.
- [13] Christian R. Male breast cancer[J]. *Breast Care*, 2008, 3: 183-189.
- [14] Korde LA, Zujewski JA, Kamin L, et al. Multidisciplinary meeting on male breast cancer: summary and research recommendations [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(12): 2114-2122.
- [15] Zagouri F, Sergentanis TN, Koutoulidis V, et al. Aromatase inhibitors with or without gonadotropin-releasing hormone analogue in metastatic male breast cancer: a case series[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(11):2259-2263.
- [16] Hayes T. Pharmacologic treatment of male breast cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 10 (15):2499-2510.
- [17] Arriola E, Hui E, Dowsett M, et al. Aromatase inhibitors and male breast cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2007, 9 (3):192-194.
- [18] Doyen J, Italiano A, Largillier R, et al. Aromatase inhibition in male breast cancer patients: biological and clinical implications[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(6):1243-1245.
- [19] Miao H, Verkooijen HM, Chia KS, et al. Incidence and outcome of male breast cancer: an international population-based study. *J Clin Oncol*, 2011, 29(33):4381-4386.
- [20] Jamy O, Rafiq A, Laghari A, et al. Male breast cancer: a 24 year experience of a tertiary care hospital in Pakistan [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(4):1559-1563.
- [21] O'Brien B, Koru-Sengul T, Miao F, et al. Disparities in overall survival for male breast cancer patients in the state of Florida (1996-2007)[J]. *Clin Breast Cancer*, 2015, 10(3):e0118957.

采用 ERIC-PCR 与 PFGE 分析鲍曼不动杆菌基因型和同源性并对比方法学差异

闻海丰^{1*} 冯忠军¹ 秦瑾² 于文静³

[摘要] **目的** 比较脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)与肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链式反应(enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR)检测鲍曼不动杆菌同源性的结果差异。**方法** 分别采用 PFGE 和 ERIC-PCR 对我院院内分离的 43 株鲍曼不动杆菌进行分型检测。**结果** 43 株鲍曼不动杆菌通过 PFGE 分型得出:A 型 22 株、B 型 10 株、C 型 3 株、D 型 4 株、E 型 2 株、F 型 1 株、G 型 1 株;通过 ERIC-PCR 得出 7 种型别:I 型 22 株、II 型 10 株、III 型 3 株、IV 型 2 株、V 型 3 株、VI 型 1 株、VII 型 2 株。2 种方法结果相符率为 76.8%。我院鲍曼不动杆菌存在克隆株传播。**结论** ERIC-PCR 操作简便、结果可靠,与 PFGE 结果一致性高,2 种分型方法均适合作为医院进行病原菌流行病学调查的分型检测手段。

[关键词] 脉冲场凝胶电泳;肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链式反应;鲍曼不动杆菌

Comparison between PFGE and ERIC-PCR for genotyping and homologous analysis of *Acinetobacter baumannii*

WEN Haifeng^{1*}, FENG Zhongjun¹, QIN Jin², YU Wenjing³

(1. Department of Laboratory Medicine, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050051; 2. Department of Nosocomial Infection Control, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050051; 3. Department of Laboratory Medicine, Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei, China, 050031)

[ABSTRACT] **Objective** To compare the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) with the enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) in genotyping and homologous analysis of *Acinetobacter baumannii*. **Methods** PFGE and ERIC-PCR were used to test the genotypes of 43 isolates of *Acinetobacter baumannii*, respectively. **Results** 43 isolates of *Acinetobacter baumannii* were classified into 7 genotypes by PFGE, including genotype A in 22 samples, genotype B in 10, genotype C in 3, genotype D in 4, genotype E in 2, genotype F in 1 and genotype G in 1. Correspondingly, they were categorized by using ERIC-PCR method as following 7 genotypes: type I in 22, type II in 10, type III in 3, type IV in 2, type V in 3, type VI in 1 and type VII in the remaining 2 samples. The correlation coefficient between the two methods was 76.8%. It was suggested that there were spreads of clonal *Acinetobacter baumannii* among the patients in our hospital. **Conclusion** ERIC-PCR is a simple and reliable method of bacterial genotyping. The data are highly correlated with the results acquired by PFGE. Both

基金项目:河北省卫生厅重点科技研究计划(20110099)

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. 河北医科大学第三医院感控科,河北,石家庄 050051

3. 河北省儿童医院检验科,河北,石家庄 050031

*通讯作者:闻海丰, E-mail:50559419@qq.com

methods are suitable for applying in the epidemiological investigation of nosocomial infections.

[KEY WORDS] Pulsed field gel electrophoresis (PFGE); Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction(ERIC-PCR); *Acinetobacter baumannii*

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, ABA) 为不动杆菌属中最常见的一种需氧、非发酵、革兰阴性球杆菌,广泛分布于自然界的水及土壤中,正常人体的皮肤、呼吸道和尿道也有存在。由于近年鲍曼不动杆菌所引起的医院感染暴发流行明显增多^[1],耐药性日益增强,已经得到临床的普遍重视。检测医院内鲍曼不动杆菌基因同源性是进行院内感染流行病学调查的重要手段,具有十分重要的流行病学意义。本研究分别采用脉冲场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 和肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链式反应 (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction, ERIC-PCR) 2种方法对医院内鲍曼不动杆菌进行同源性检测,并对比分析2种检测方法的可靠性及一致性,为今后开展相关工作提供参考,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2014年3月至2014年11月我院住院病人肺部感染患者送检细菌培养标本经过分离培养得到菌株43株,均为血培养和痰培养标本,所有菌株均经过API鉴定系统鉴定。

1.2 主要试剂

溶菌酶(0.1 mg/mL,德国默克Merk公司),蛋白酶K(0.5 mg/mL,德国默克Merk公司),苯甲基磺酰氟(德国默克Merk公司),限制性内切酶 *ApaI* (美国NEB公司),Lambda Ladder PFG Marker(美国Bio-Rad公司),脉冲场级琼脂糖(美国Bio-Rad公司),肠杆菌科和其它非苛氧革兰阴性鉴定试剂盒ID32E 鉴定试剂卡(法国生物梅里埃中国有限公司),5×TBE 溶液(上海双螺旋生物科技有限公司),10×TAE 溶液(上海双螺旋生物科技有限公司),ERIC-PCR 引物(北京赛百盛基因技术有限公司),细菌基因组DNA提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),PCR绿色体系(加拿大富酶泰斯MBI Fermentas公司),GoldView I(北京索莱宝科技有限公司),琼脂糖(北京赛百盛基因技术有限公司),DNA

Marker DL2000(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

Genepath 脉冲电泳仪 II 型(美国Bio-Rad公司),凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司),API7300 型荧光定量PCR检测仪(美国生物应用公司),BG-Power 600 通用电泳仪(北京百晶生物技术有限公司),WD-9403F 紫外仪(北京六一生物技术有限公司),TGL-16G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.4 PFGE 试验方法

1.4.1 细菌的包埋

取试验菌落配制3麦氏浓度菌悬液1 mL,12 000 rpm 离心2 min,弃上清,取0.05 mL 细菌悬浮缓冲液,重新悬浮沉淀,平衡至50℃;加入50℃等体积2% Cleancut 琼脂糖凝胶,充分混合并灌注模具,4℃冰箱中凝固10 min~15 min。

1.4.2 细菌的裂解

向胶块加入0.3 mL 溶菌酶稀释液,37℃孵育2 h。无菌水清洗胶块2次。加入0.3 mL 蛋白酶K稀释液,50℃孵育12 h,吸出蛋白酶K稀释液,加清洗缓冲液充分清洗后加入1 mL 浓度为1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟灭活剩余的蛋白酶K,室温震荡1 h后,重复清洗2次。

1.4.3 限制性酶切

加入80 U 限制性内切酶 *ApaI* 和0.2 mL 酶切缓冲液,37℃孵育过夜后清洗胶块。

1.4.4 加样和电泳

用0.5×TBE 缓冲液配制100 mL 1%的PFGE 级琼脂糖,制胶并小心上样。在电泳槽中加入2 000 mL 0.5×TBE 缓冲液,将凝胶放入电泳槽中,调节程序为起始转换时间为1 s,最终转换时间为17 s,电场强度6 V/cm,电场夹角120°,电泳时间18.5 h,非线性。

1.4.5 结果图像采集与分析

使用凝胶成像仪采集电泳结果图像并进行结果分析:把泳道中的条带按照出现与否进行二进制积分,依据Dice系数(F)比较各菌株之间的相

似性, $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$ (N_{xy} : X 和 Y 分离株之间共同拥有的条带数目; N_x : X 分离株的总的条带数目; N_y : Y 分离株之间总的条带数目)。依据国外研究^[2]报道, 实验以相似性系数 80% 为分型界值, 相似度=1 为同一菌株, 相似度 $\geq 80\%$ 为同一亚型, 相似度 $< 80\%$ 为不同基因型。

1.5 ERIC-PCR 试验方法

1.5.1 细菌 DNA 模板的制备

将 1 mL 0.5 麦氏浓度菌悬液 10 000 rpm 离心 1 min, 向沉淀中加入 180 μ L Buffer GTL, 混匀。加入 20 μ L 蛋白酶 K, 混匀, 56 $^{\circ}$ C 孵育, 直至菌体完全裂解。加入 200 μ L Buffer GL, 混匀。加 200 μ L 无水乙醇, 震荡混匀。将所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱中, 10 000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加 500 μ L Buffer GW1, 10 000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。向吸附柱中加 500 μ L Buffer GW2, 10 000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中, 并重复一次。12 000 rpm 离心 2 min, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温 5 min, 彻底晾干。将吸附柱置于一个新的离心管中。向吸附柱的中间部位悬空加入 100 μ L Buffer GE, 室温放置 5 min, 10 000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存 DNA。

1.5.2 ERIC-PCR 引物制备

根据文献^[3]合成 ERIC-PCR 引物: ERIC1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3, 稀释引物至浓度为 10 μ mol/L 备用。

1.5.3 ERIC-PCR 反应体系

反应体系总体积为 50 μ L; ERIC1, ERIC2 各 2 μ L, DNA 模板 5 μ L, PCR 反应绿色体系 Green PCR Master Mix 25 μ L, PCR 超纯水 16 μ L。

1.5.4 PCR 反应条件

95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5.5 PCR 扩增产物电泳

以 2% 琼脂糖制备电泳凝胶胶块, 以 1 \times TAE 溶液为电泳缓冲液, 取 5 μ L 扩增产物, 电泳电压 110 V, 电泳时间为 45 min。

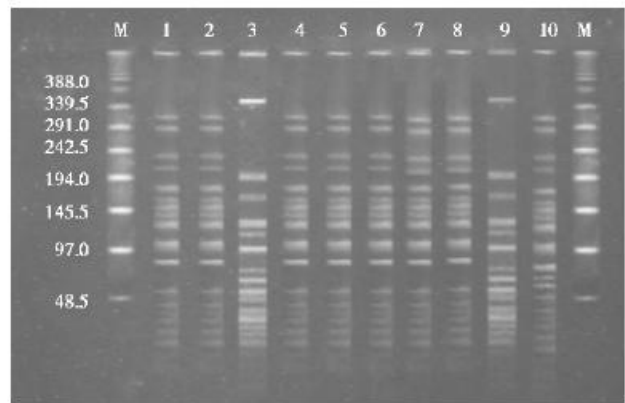
1.6 统计学方法

根据 2 种分型方法的分型结果差异, 通过 SPSS 19.0 进行四格表卡方检验。

2 结果

2.1 应用 PFGE 对鲍曼不动杆菌分型结果

43 株鲍曼不动杆菌经提取基因组 DNA 后进行脉冲场凝胶电泳, 形成碱基条带在 10 bp~300 bp 之间的指纹图谱。通过分析 PFGE 电泳图谱, 43 株鲍曼不动杆菌主要分为 7 型: A 型 (22 株)、B 型 (10 株)、C 型 (3 株)、D 型 (4 株)、E 型 (2 株)、F 型 (1 株)、G 型 (1 株), 其中 A 型又被细分为 A1、A2 共 2 种亚型, 结果见图 1。



M: Marker (bp); 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 为 A1 型; 3, 9 为 D 型; 10 为 A2 型

图 1 部分菌株 PFGE 图谱

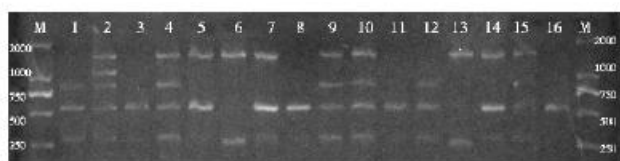
Figure 1 The partial result of genotyping by using PFGE method

2.2 应用 ERIC-PCR 对鲍曼不动杆菌分型结果

43 株鲍曼不动杆菌经过 ERIC-PCR 后, 形成 5 条左右的碱基条带, 条带长度在 100 bp~2 000 bp 之间, 通过分析, 菌株可被分为通过 ERIC-PCR 分型, 被分为 I 型 (22 株), II 型 (10 株), III 型 (3 株), IV 型 (2 株), V 型 (3 株), VI 型 (1 株), VII 型 (2 株) 共 7 种型别, 结果见图 2。

2.3 应用 PFGE 和 ERIC-PCR 分型结果对比分析

43 株鲍曼不动杆菌通过 PFGE 和 ERIC-PCR 分型后, 结果基本相互吻合, 但是仍然存在少数标本的分型结果差异, 总体上结果一致率为 76.8%, 具体见图 3。43 株鲍曼不动杆菌应用 PFGE 与 ERIC-PCR 方法的分型结果以散点图的分布形式



M:Marker(bp); 4、9、10 为 I 型; 3、8、11、16 为 II 型; 5、7、14 为 III 型; 1、12 为 V 型; 2 为 VI 型; 6、13 为 VII 型

图 2 部分菌株 ERIC-PCR 图谱

Figure 2 The partial result of genotyping by using ERIC-PCR method

表示, 可见在 A 型 (PFGE) 与 V、VI 型 (ERIC-PCR), D 型 (PFGE) 与 I 型 (ERIC-PCR) 等处存在分型结果差异。

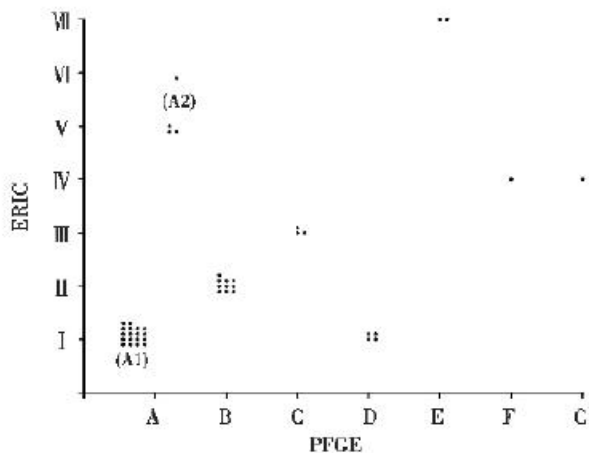


图 3 鲍曼不动杆菌采用 PFGE 和 ERIC-PCR 分型结果对比
Figure 3 The genotyping results contrast between PFGE and ERIC-PCR methods

2.4 统计学分析

比较 PFGE 和 ERIC-PCR 分型结果, 以 PFGE 分型结果为基础, 并结合 ERIC-PCR 结果和菌株耐药谱结果进行校正, 以此结果为标准对比 2 种分型方法的分型结果, 进行四格表卡方检验, 见表 1。43 株医院分离鲍曼不动杆菌 PFGE 结果中 42 株结果一致, 1 株不一致; ERIC-PCR 分型结果中 37 株一致, 6 株不一致。经卡方检验 $P>0.05$, 可以认为 2 种分型方法没有显著差别。

3 讨论

鲍曼不动杆菌是不动杆菌属中最主要的菌株之一, 由于鲍曼不动杆菌具有耐干燥^[4], 生存能力

表 1 对 2 种分型方法的分型结果进行卡方检验

Table 1 The Chi square test results of two genotyping methods

分型方法	分型结果		合计	卡方	P 值
	分型不一致	分型一致			
ERIC-PCR	6	37	43	3.888	0.115
PFGE	1	42	43		
合计	7	79	86		

强, 有较强的消毒剂抗性^[5], 对多种抗生素耐药严重^[6], 所以在医院内有很强的生存力, 是近年来引起医院暴发流行的重要病原菌之一。对医院内鲍曼不动杆菌进行菌株分型, 检测其同源性, 是对鲍曼不动杆菌院内感染进行流行病学调查, 有效控制鲍曼不动杆菌院内感染暴发流行的重要手段, 具有十分重要的意义。研究发现^[7], 同一基因型的不同菌株, 其抗生素耐药谱是可能并经常存在不同程度的差别, 进一步说明了在对菌株进行流行病学研究时应用基因分型取代传统应用耐药谱分型的必要性。近年来国内外最常用的病原菌分子生物学水平的分型方法主要为 PFGE^[8]分型法和 ERIC-PCR^[3]分型法。2 种分型方法在方法原理上存在较大的差别: PFGE 通过对细菌的全部基因组 DNA 进行消化切割, 产物在动态变换角度的电场中电泳, 依据消化产物的大小及构象而分离出指纹图谱, 依此作为分型的依据; 而 ERIC-PCR 是利用肠杆菌科基因的高度保守并且重复的序列设计引物, 通过 PCR 扩增产生不同的指纹图谱, 进行基因分型。PFGE 分型指纹图谱图像分辨力强, 结果辨识度和重复性好, 操作标准化, 并且有成熟分型结果数据库, PFGE 被国内外分子流行病学者广泛认同, 被认为是病原菌分子生物分型的“金标准”方法^[9]。ERIC 基因虽然是保守序列, 但是细菌基因组 DNA 中依然可能出现该基因不完整、缺失、突变等情况发生, 甚至会导致试验变成一种随机扩增实验^[10], 又由于 ERIC-PCR 扩增产物长度不能确定, 也会在电泳的时候出现条带缺失, 产量低的条带显像模糊或条带分辨不清晰等情况, 所以 PFGE 和 ERIC-PCR 2 种分型方法结果可能会存在差异。近年来的多项研究报告了对 PFGE 与 ERIC-PCR 2 种分型方法应用在多个种属间的病原菌分型和分型结果对比^[11-15], 本研究也平行对比了 2 种

分型方法在鲍曼不动杆菌分型结果。

本研究对我院临床分离 43 株鲍曼不动杆菌采用 PFGE 和 ERIC-PCR 2 种方法进行基因分型,均分出 7 种型别。分型结果显示,通过 PFGE 分型的 B 型菌株与通过 ERIC-PCR 分型的 II 型菌株全部吻合对应,通过 PFGE 分型的 C 型菌株与通过 ERIC-PCR 分型的 III 型菌株全部吻合对应,通过 PFGE 分型的 E 型菌株与通过 ERIC-PCR 分型的 VII 型菌株全部吻合对应,实验中有 15 株鲍曼不动杆菌通过 PFGE 和 ERIC-PCR 2 种分型方法的结果高度一致,占总分型菌株的 34.9%。通过 PFGE 分型的所有 A1 菌株和所有 D 型菌株共同对应 ERIC-PCR 分型的所有 22 株 I 型菌株,2 种分型方法的分型结果基本一致。而实验中有 10 株鲍曼不动杆菌通过 2 种分型方法得到的分型结果存在明显差异。实验结果显示,2 种分型方法所得到的大多数菌株的分型结果可以完全对应,少量菌株的分型结果呈现为多种 PFGE 型别对应一种 ERIC-PCR 型别。实验结果显示 2 种分型方法在区分主要型别方面一致性非常高,分型结果总体一致率达到 76.8%,只是在非主要型别和亚型的区分上存在一定差异,通过统计学卡方检验, $P>0.05$,可以认为 2 种分型方法的分型结果没有显著差异,与国内外相关研究报道相一致。Merzougui 等^[12]研究认为 PFGE 具有较好的分型辨别力,但 PFGE 分型周期长,ERIC-PCR 可以作为其很好辅助和补充分型方法,孙晶等^[14]研究同样显示 PFGE 和 ERIC-PCR 方法的病原微生物分型结果表现出较好的一致性。但国外也有研究报道 PFGE 与 ERIC-PCR 的分型结果缺少关联性^[15],ERIC-PCR 是基于肠杆菌科基因间保守重复序列的分型技术,该技术对于乳球菌属等菌属分型的型别辨识度低可能是其中的重要原因。本实验研究对比 2 种分型结果可以发现:通过 PFGE 分型方法对鲍曼不动杆菌分型时,对某些型别的分辨率要优于 ERIC-PCR 方法,PFGE 方法对型别的辨识度更高,此结论也与国外相关研究结论相一致^[13,15]。

通过 PFGE^[16]和 ERIC-PCR^[17]都可以很好地对我院分离鲍曼不动杆菌进行分型和菌株同源性分析。PFGE 对仪器设备要求较高,试剂耗材较贵,操作复杂、时间周期长,因此 PFGE 在国内开展并不十分广泛。ERIC-PCR 方法简单、快速,对仪器设备和试剂等要求相对较低,更方便医院广

泛开展。总之,PFGE 和 ERIC-PCR 方法都可以较好的完成对鲍曼不动杆菌的分型和同源性分析,达到有效的控制鲍曼不动杆菌在医院内的暴发流行的目的。

参考文献

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008,21(3):538-582.
- [2] Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, et al. Molecular epidemiology of enterobacteriaceae isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004,42(8):3805-3808.
- [3] Fouad M, Attia AS, Tawakkol WM, et al. Emergence of carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii* harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals[J]. *Int J Infect Dis*, 2013,17(12): e1252-1254.
- [4] Catalano M, Quelle LS, JERIC PE, et al. Survival of *acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases[J]. *Journal of Hospital Infection*, 1999,42(1):27-35.
- [5] 于文静, 闻海丰, 秦瑾, 等. 临床分离鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因携带情况分析及其消毒对策[J]. *河北医药*, 2014,36(6):25-27.
- [6] 孙成栋, 李斯, 刘思, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌医院感染的耐药性分析[J]. *中华危重病急救医学*, 2013,25(6):369-372.
- [7] Johnson R, Jordaan AM, Warren R, et al. Drug susceptibility testing using molecular techniques can enhance tuberculosis diagnosis[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2008,2(1):40-45.
- [8] Abdalhamid B, Hassan H, Itbaileh A, et al. Characterization of carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia[J]. *New Microbiologica*, 2014,37(1):65-73.
- [9] Souza AV, Moreira CR, Pasternak J, et al. Characterizing uncommon *burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2004,53(10):999-1005.
- [10] Durmaz R, Otlu B, Koksall F, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *acinetobacter baumannii*, *escherichia coli* and *klebsiella* spp [J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2009,62(5):372-377. (下转第 22 页)

乌海市 3 918 例女性 HPV 基因分型结果的分析

武燕红 吕伟 郑海燕 王珍 裴刘成*

[摘要] **目的** 探讨内蒙古乌海地区妇女人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染情况及各亚型的分布。**方法** 回顾分析 2008 年 10 月至 2015 年 5 月在我院妇科就诊的女性患者 3 918 例,采用 PCR+导流杂交法对其宫颈脱落细胞进行 21 种 HPV 基因型检测的结果。**结果** 3 918 例样本中阳性 1 957 例,感染率为 49.95%,21 种亚型均有检出。HPV16 (12.81%)、HPV52 (8.65%)、HPV58 (8.58%)、HPV53 (5.36%)及 CP8304 (4.59%)感染率较高,感染年龄主要分布在 21 岁~49 岁,各年龄组间 HPV 感染率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 乌海地区妇女 HPV 感染亚型以 HPV16、HPV52、HPV58、HPV53、CP8304 为主。HPV 感染率与年龄有关。

[关键词] 人乳头状瘤病毒;基因分型;宫颈病变

Analysis of HPV genotypes in 3 918 female patients in Wuhai city

WU Yanghong, LV Wei, ZHENG Haiyan, WANG Zhen, PEI Liucheng*

(Department of Laboratory Medicine, Wuhai Maternity and Child Health Care Hospital, Wuhai, Inner Mongolia, China, 016000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the epidemiology of human papilloma virus (HPV) infection and the distribution of its different subtypes among women in wuhai, Inner Mongolia. **Methods** 3 918 cases of female patients who visited our gynecologic clinic between October, 2008 and May, 2015 were retrospectively analyzed. PCR and flow-through hybridization were used to test for the 21 genotypes of HPV in the cervical exfoliated cells from the patients. **Results** Of 3 918 cases, 1 957 were positive for HPV, with the infection rate of 49.95%. All the 21 genotypes were detected, with higher detection rates seen in certain genotypes than others, such as, HPV16 (12.81%), HPV52 (8.65%), HPV58 (8.58%), HPV53 (5.36%) and CP8304 (4.59%). The highest risk for the infection fell in the age group between 21 and 49 years, and the differences in the infection rates among all age groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** HPV16, HPV52, HPV58, HPV53, and CP8304 were the main genotypes of HPV infecting women in Wuhai area. The infection rate correlates with age.

[KEY WORDS] Human papilloma virus; Gene subtypes; Cervical pathological changes

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV)是一种嗜上皮性的双股环形无包膜 DNA 病毒,目前已经发现超过 200 多种,其中超过 35 种能够感染人类生殖系统^[1]。HPV 感染被证实是宫颈癌发生的必要原因^[2],其检测已成为筛查和预防宫颈癌的关键问题之一。HPV 的感染具有很强的地域性,世界范围内不同国家或地区 HPV 的感染率及型别分布均存在差异^[3]。本文对 3 918 例就诊

者的宫颈脱落细胞进行核酸分子快速导流杂交分型检测,以了解乌海地区妇女宫颈 HPV 的感染情况及其常见亚型。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 病例来源

2008 年 10 月至 2015 年 5 月于本院妇科就诊

作者单位:内蒙古自治区乌海市妇幼保健院检验科,内蒙古,乌海市 016000

*通讯作者:裴刘成, E-mail:39947629@qq.com

的女性患者 3 918 例, 年龄 16 岁~80 岁 (37.75±9.8) 岁, 98.95% (3877/3918) 为汉族, 居住于乌海市及周边。所有患者均为初次进行 HPV 检测, 检测前未经宫颈或阴道治疗, 剔除二次复查及术后或宫颈治疗后检测数据。

1.1.2 仪器与试剂

人乳头状瘤病毒 (HPV) 分型检测试剂盒 (PCR+膜杂交法) 及医用核酸分子快速杂交仪均来源于潮州凯普生物化学有限公司, PCR 仪为博日 LITTLE GENIUS 基因扩增仪。

1.2 实验方法

1.2.1 HPV DNA 提取

振荡混匀样本管, 取保存有宫颈细胞的细胞保存液 0.5 mL, 以 14 000 rpm 离心 1 min, 弃上清后, 利用凯普的细胞裂解液严格按照说明书操作步骤提取 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 HPV DNA

按照凯普说明书比例要求将 PCR Mix、Taq 酶和 DNA 模板混匀, 低速离心数秒后, 按下述反应条件进行 PCR 扩增: 95℃ 9 min; 95℃ 20 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环; 72℃ 5 min; 最后 4℃ 保存。

1.2.3 导流杂交及结果判读

均按试剂盒要求进行, 可检测出 15 种高危亚型 (HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV56、HPV58、HPV59、HPV66、HPV68)、6 种低危亚型 (HPV6、HPV11、HPV41、HPV42、HPV44、CP8304)。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行 χ^2 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 HPV 感染各亚型分布情况

每批实验均加阴性及阳性对照, 阴性对照结果的 2 个紫蓝色点为质控对照点, 详见图 1。阳性对照为 HPV18 型, 结果见图 2。在 3 918 例样本中, 21 种基因亚型均有检出, HPV16 是感染率最高的亚型 (12.81%, 502/3918), 其次为 HPV52 (8.65%, 339/3918)、HPV58 (8.58%, 336/3918)、HPV53 (5.36%, 210/3918)、CP8304 (4.59%, 180/3918)。具体结果见表 1。

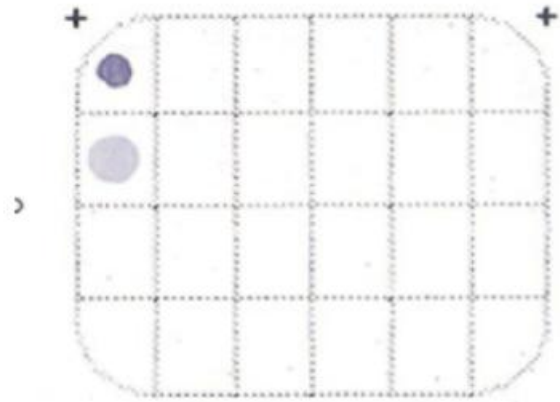


图 1 HPV-DNA 分型阴性对照

Figure 1 Negative control of HPV-DNA genotyping

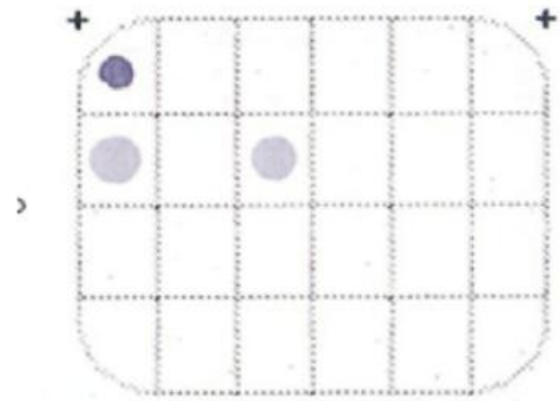


图 2 HPV-DNA 分型阳性对照 (HPV18)

Figure 2 Positive control of HPV-DNA genotyping (HPV18)

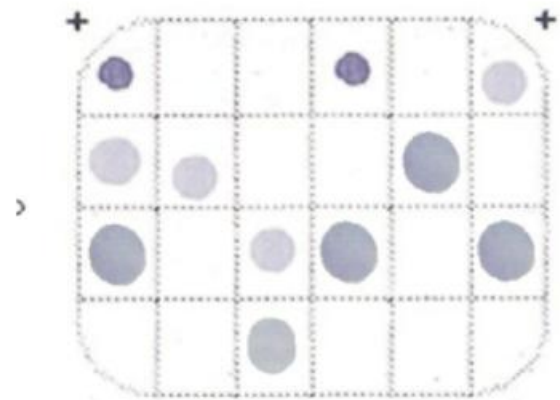


图 3 HPV 9 重感染 (HPV16, HPV33, HPV51, HPV52, HPV56, HPV39, HPV66, HPV42, HPV44)

Figure 3 9 types of HPV infection (HPV16, HPV33, HPV51, HPV52, HPV56, HPV39, HPV66, HPV42, HPV44)

表 1 HPV 感染各亚型的排序分布情况

Table 1 Sorting in the subtypes and the distribution of HPV infection

类别	基因型	感染例数(例)	感染率(%)	类别	基因型	感染例数(例)	感染率(%)
高危	HPV16	502	12.80%	低危	CP8304	180	4.59%
	HPV52	339	8.65%		HPV6	158	4.03%
	HPV58	336	8.58%		HPV11	123	3.14%
	HPV53	210	5.36%		HPV42	46	1.17%
	HPV31	148	3.78%		HPV44	30	0.77%
	HPV33	146	3.73%		HPV43	10	0.26%
	HPV18	130	3.32%				
	HPV66	130	3.32%				
	HPV39	129	3.29%				
	HPV51	129	3.29%				
	HPV68	116	2.96%				
	HPV56	115	2.94%				
	HPV59	81	2.07%				
	HPV35	32	0.54%				
	HPV45	25	0.64%				

2.2 HPV 单一及多重感染情况

3 918 例样本中,HPV 感染共 1 957 例,感染率为 49.95%(1957/3918)。755 例检出 2 个或 2 个以上亚型,多重感染率为 19.27%(755/3918),结果见表 2。多重感染中 2 重感染(472 例)较多,感染最多型别的是 9 重感染,共 3 例,实例一见图 3。5 种最常见的多重感染模式为 HPV16 和 HPV52 (61 例),HPV16 和 HPV58(54 例),HPV52 和 HPV53(43 例),HPV16 和 CP8304(42 例),HPV58 和 HPV52(42 例)。

2.3 HPV 感染与年龄的关系

3 918 例受检者分为 5 个年龄组。经 χ^2 检验,各年龄组 HPV 感染率比较, $\chi^2=38.131$, 自由度为 4, $P=0.000$; 各年龄组高危型感染率比较, $\chi^2=11.784$, 自由度为 4, $P=0.019$; 各年龄组高危型占

阳性比率比较, $\chi^2=20.435$, 自由度为 4, $P=0.000$; 各年龄组多重 HPV 感染率比较, $\chi^2=64.071$, 自由度为 4, $P=0.000$; 差异均有统计学意义。30 岁~39 岁、40 岁~49 岁、 ≥ 50 岁 3 组间多重 HPV 感染率比较, $\chi^2=3.442$, 自由度为 2, $P=0.179$, 差异无统计学意义。具体结果见表 3。

表 2 3 918 例标本中 HPV DNA 单一感染及多重感染情况
Table 2 Samples of HPV DNA single infection status and multiple infection status in 3 918 cases

感染情况	感染数(例)	感染率(%)
单一感染	1202	31.68%(1202/3918)
多重感染	755	19.27%(755/3918)
合计	1957	49.95%(1957/3918)

表 3 各年龄组 HPV 感染情况

Table 3 HPV infection status among all age groups

年龄(岁)	检测人数(例)	感染人数(例)	感染率(%)	高危 HPV 感染数(例)	高危 HPV 感染率(%)	高危 HPV 占阳性比(%)	多重 HPV 感染数(例)	多重 HPV 感染率(%)
<20	29	23	79.31	18	64.00	78.26	14	48.28
20~29	922	524	56.83	440	47.72	83.97	246	26.68
30~39	1 278	624	48.83	557	43.58	89.26	197	15.41
40~49	1 270	604	47.56	551	43.39	91.23	218	17.16
≥ 50	419	182	43.44	168	40.10	92.31	80	19.09

各年龄组的 HPV 感染率用 χ^2 检验, $\chi^2=38.131$, $v=4$, $P=0.000$, $P<0.05$, 有统计学意义

3 讨论

2012年,子宫颈癌居全球女性最常见恶性肿瘤第4位,新发病例为528 000例^[4]。目前已公认,宫颈高危型HPV持续感染99%以上是宫颈癌发生的必要条件^[5-6]。国外研究^[7]得出结论,基于HPV的筛查方法预防浸润性宫颈癌的效果相当于在细胞学检查方法的基础上提高60%~70%。因此HPV检测是宫颈癌筛查的有效方法之一,可以达到早发现,早治疗的目的。降低宫颈癌的发生率最好做到防治并举,预防首先要了解各地区的感染状况及型别分布特点。有文献报道,HPV16亚型是目前世界范围内共同的最常见的基因型,在宫颈癌中的阳性率可高达51.00%~81.25%^[8],HPV52和HPV58是亚洲特有的2个基因亚型,在中国、日本等亚洲国家有较高的检出,而在世界其他地区很少或者没有检出^[2]。之前的研究表明,HPV16是中国大部分地区尤其是北方地区的主导亚型,HPV52和HPV58排在第2位或第3位^[9-11]。有些南方地区,尤其是东南地区如湖北、上海、江苏、江西、湖南、海南以及广东一些地区人群中HPV感染以HPV52、HPV16和HPV58型为主,HPV52排在第一位^[12-14]。内蒙古中西部地区HPV感染排在前3位的是HPV16、HPV58和HPV52型^[15]。本研究中乌海市HPV感染HPV16共检出502例,检出率为12.8%,排第一位,是本地区的主导亚型。HPV52检出率达8.65%,排第2位。目前HPV58检出率为8.58%,排第3位,与HPV52相差仅3例,HPV58型常超越HPV52型排在第2位。乌海市地处中国内蒙古西部,此结果符合HPV感染的地域特征。在本研究中HPV18检出率为3.32%,相对较低,排在第9位;众多研究^[16-17]显示HPV18型感染率低,但致癌性高,所以也不容忽视。由于乌海市的优势型别除了HPV16外,HPV52和HPV58型也具有显著优势,因此乌海地区的宫颈癌防治除了重视HPV16、HPV18型之外,还要重视HPV52及HPV58型的防治,乌海市地区妇女HPV感染的型别与宫颈病变的关系将在下一步研究。

HPV在我国妇女宫颈病变中平均感染率为46.51%(5 632/12 110),其中北方地区HPV平均感染率高于南方(55.67%和42.06%, $P<0.01$)^[18]。本研究对乌海地区女性进行HPV检测,阳性检出

率为49.95%,较接近我国妇女宫颈病变平均感染率,高于内蒙鄂尔多斯杭锦旗(蒙古族人口占50%以上)的23.89%^[19]。并且高于2011年对内蒙古中西部地区HPV感染的调查研究结果——HPV感染总阳性率23.3%(975/4 188)^[15]。乌海市属于内蒙西部经济不发达地区,本地区妇女的卫生及自我保健意识相对较差。受经济条件限制,很大一部分人在细胞学检查结果异常时才愿意接受HPV的检测,这是本地区HPV检出率较同省其它地区高的原因之一。细胞学检查作为筛查手段已经使子宫颈癌的发病率大幅下降,而HPV亚型测定作为一个细胞学检查附属的筛查方法使宫颈病变的早期筛查更敏感更有效率^[2]。加强本地区的健康教育,使人们对HPV感染与预防有一定的认识,是相对有效的措施。地区感染率的差异也可能与检测人群有关,今后随着筛查的普及,这种影响也会排除。

宫颈高危型HPV感染的相关因素包括初次性生活的年龄、性伴侣数、吸烟、长期口服避孕药、免疫缺陷与抑制等,年龄是影响宫颈高危型HPV感染最重要的因素之一^[20]。本调查结果显示<20岁、20岁~29岁、30岁~39岁、40岁~49岁、≥50岁5个年龄组HPV的感染率分别为79.31%、56.83%、48.83%、47.56%、43.34%,经 χ^2 检验, $P<0.001$;高危型HPV感染率分别为64.00%、47.72%、43.58%、43.39%、40.10%,经 χ^2 检验, $P<0.05$ 。说明HPV的感染率与年龄有关,本研究显示随着年龄的增长有下降的趋势,可能与性生活频率有关。各年龄组高危HPV占阳性比,经 χ^2 检验, $P<0.001$,显示随着年龄的增长HPV感染有增长的趋势,可能随着年龄的增长,免疫力下降,导致更易感染高危型HPV,这样得宫颈癌的风险就相对较高。很多研究结果显示<20岁年龄组HPV阳性率较其它年龄组高,于莉和张刘东^[21]认为可能是由于青春期其免疫系统还未被致敏,导致初次性生活时极易感染。张咏梅^[22]认为年轻女性宫颈不成熟,感染HPV的机会多。本研究中<20岁年龄组HPV感染率最高,但检测人数较少,只有29人。20岁以下有性生活史的女性占少数,来医院做常规检查的更少,临床症状严重时才来医院就诊,这也可能是其感染率高的一个原因。本研究HPV感染年龄主要集中在20岁~49岁年龄段,HPV感染数占总感染数的89.52%(1 752/1 957)。≥50岁年龄组感染率

最低,但是高危型占阳性比最高,此年龄段的检查也是不容忽视的。

除了年龄外多重感染也是与子宫颈癌和 HPV 感染相关的危险因素^[2]。多重感染在我们的研究中占有 HPV 感染的 19.27% (755/3 918),高于以前对内蒙古自治区调查的多重感染率 6.2%^[15],低于中国整体的多重感染率 28.98%^[25]。本研究中多重感染率 29 岁以下 2 个年龄段较其它年龄段高 ($P < 0.05$),感染最多型别的是 9 重感染,共 3 例,为多性伴或伴侣多性伴者,其中一例 58 岁,另外 2 例和 7 重感染 1 例、8 重感染 2 例均在 20 岁~29 年龄段。多重感染型别多者可能与性伴的数量及性生活的频率有关。很多关于多重感染与宫颈癌的关系的研究结果不一致,我们将继续积累这一方面的数据,进行进一步的研究。

参考文献

- [1] Siddiqi A, Zainab M, Qadri I, et al. Prevalence and genotyping of high risk human papillomavirus in cervical cancer samples from punjab, pakistan [J]. *Viruses*, 2014, 6(7):2762-2767.
- [2] 赵颖,林敏,潘美晨,等. HPV 分型及高危八型定量检测在宫颈病变中的意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013, 5(2):102-106.
- [3] Berman NR. Cervical cancer screening today. The role of HPV DNA testing[J]. *Advance For Nurse Practitioners*, 2006, 14(4):24-29.
- [4] Bray F, Ren JS, Masuyer E, et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(5):1133-1145.
- [5] Yildirim JG, Arabaci Z. Innovations in HPV vaccination and roles of nurses in cervical cancer prevention [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(23):10053-10056.
- [6] Demir F, Kimiloglu E, Igdem AA, et al. High risk HPV in situ hybridization, p16 INK 4A, and survivin expressions in cervical carcinomas and intraepithelial neoplasms evaluation of prognostic factors [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2014, 35(6):708-717.
- [7] Ronco G, Dillner J, Elfström KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials[J]. *The Lancet*, 2014, 383(9916):524-532.
- [8] Canales NA, Marina VM, Castro JS, et al. A1BG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2):939-947.
- [9] 杨琳,李霓,郭兰伟,等. 2010 年黑龙江省大庆市妇女人乳头状瘤病毒感染状况及其危险因素调查[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(2):118-123.
- [10] 秦宇,杨立娟,刘欧. 导流杂交基因芯片技术检测人乳头瘤病毒结果分析[J]. *疑难病杂志*, 2013, 12(11):865-867.
- [11] 侯萌,李娜,朱广霞,等. 妇科门诊患者宫颈人乳头瘤病毒感染情况调查 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2013, 34(2):229-232,262.
- [12] 管建花,张蓉,侯文静,等. 上海奉贤地区部分妇女宫颈 HPV 阳性感染特征分析[J]. *山东医药*, 2012, 52(37):39-41.
- [13] 蔡静芬,杨幼易. 无锡市 113207 名妇女感染人乳头瘤病毒感染状况分析[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(7):104-107.
- [14] 李发涛,廖灿,李焱,等. 人乳头状瘤病毒感染妇女的年龄及其亚型分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(17):4345-4347.
- [15] 宿瑞俊,杜瑞军. 内蒙古自治区中西部地区妇女宫颈人乳头瘤病毒感染现状调查分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(3):173-176.
- [16] Park JS, Kim YT, Lee A, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in cervicall adenocarcinoma in Korean womenn [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 130(1):115-120.
- [17] Cuschieri K, Brewster DH, Graham C, et al. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(11):2721-2726.
- [18] 张东红,林美珊.人乳头瘤病毒在国人宫颈病变中感染及型别分布特征的 Meta 分析[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(12):1287-1290.
- [19] 段仙芝,张瑞请,田晶,等. 应用 HPV 和液基细胞筛查内蒙古杭锦旗宫颈病变的研究[J]. *中国民族医药杂志*, 2012, 18(12):65-68.
- [20] Martinez SB, Palomares JC, Artura A, et al. Comparison of the amplacor human papillomavirus and the linear arraytests for detection of HPV types 16 and 18 in cervical samples[J]. *J Virol Methods*, 2012, 180(1-2):7-10.
- [21] 于莉,张刘东. 儋州地区女性感染人乳头瘤病毒基因亚型分析[J]. *海南医学*, 2013, 24(15):2271-2273.
- [22] 张咏梅. 7455 例人乳头瘤病毒检测临床分析[D]. 河北省石家庄市:河北医科大学, 2013.
- [23] Li N, Yang L, Zhang K, et al. Multiple human papillomavirus infections among Chinese women with and without cervical abnormalities:a population-based multi-center cross-sectional study[J]. *Front Oncol*, 2011, 1:38.

三种实验室检测方法在儿童传染性单核细胞增多症的诊断应用

邓坤仪^{1*} 彭建明¹ 范汉恭¹ 杨海霞¹ 吴键卓²

[摘要] 目的 探讨EB病毒-DNA(Epstein-Barr virus-deoxyribonucleic acid, EBV-DNA)载量、EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)抗CA-IgM(IgM to Epstein-Barr viral capsid antigens, CA-IgM)及异型淋巴细胞计数在儿童传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)中的诊断意义。方法 对116例IM患儿EBV-DNA载量、抗CA-IgM、异型淋巴细胞计数的敏感性和特异性进行比较。结果 IM患儿EBV-DNA载量的敏感性为85.34%,特异性为96.00%;抗CA-IgM的敏感性为84.48%,特异性为94.00%;外周血异型淋巴细胞比例 $\geq 10\%$ 占39.66%,特异性为100.00%。抗CA-IgM联合异型淋巴细胞检测的敏感性为88.79%,特异性为94.00%。EBV-DNA载量联合异型淋巴细胞检测的敏感性为88.79%,特异性为96.00%。抗CA-IgM联合EBV-DNA载量检测的敏感性为93.10%,特异性为90.00%。EBV-DNA载量和抗CA-IgM诊断儿童IM的敏感性明显高于异型淋巴细胞检测(χ^2 分别为46.05和43.61, $P < 0.05$),三者的特异性较高。结论 EBV-DNA载量、抗CA-IgM和异型淋巴细胞计数两两联合检测,可提高儿童IM的诊断。

[关键词] 传染性单核细胞增多症; EB病毒抗体; EB病毒DNA; 异型淋巴细胞

Application of 3 laboratory tests in the diagnosis of infectious mononucleosis in children

DENG Kunyi*, PENG Jianming¹, FAN Hangong¹, YANG Haixia¹, WU Jianzhuo²

(1. Department of Clinical Laboratory, Boai Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong, China, 528403; 2. Clinical Medical Laboratory, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To investigate the diagnostic significance of Epstein-Barr virus-deoxyribonucleic acid (EBV-DNA), EBV CA-IgM and atypical lymphocytes in children with infectious mononucleosis (IM). Methods 116 children with IM and 50 healthy controls were studied, and the sensitivity and specificity of EBV-DNA, EBV CA-IgM and atypical lymphocytes were calculated, and compared. Results The sensitivity of EBV-DNA, EBV CA-IgM, and atypical lymphocytes in 116 children with IM were 85.34%, 84.48% and 39.66%, respectively. The specificity of EBV-DNA, EBV CA-IgM and atypical lymphocytes were 96.00%, 94.00% and 100.00%, respectively. The sensitivity of pair covering test with combined EBV CA-IgM and atypical lymphocytes, combined EBV-DNA and atypical lymphocytes, or combined EBV CA-IgM and EBV-DNA was 88.79%, 88.79% or 93.10%, respectively. The specificity of pair covering test with combined EBV CA-IgM and atypical lymphocytes, combined EBV-DNA and atypical lymphocytes, or combined EBV CA-IgM and EBV-DNA was 94.00%, 96.00% or 90.00%, respectively. The sensitivity of EBV-DNA and EBV CA-IgM were significantly higher than that of atypical lymphocytes ($P < 0.05$). All of the 3 methods had high specificity. Conclusion Pair covering test with combined EBV CA-IgM and atypical lymphocytes, combined EBV-DNA and atypical lymphocytes, or combined EBV CA-IgM and EBV-DNA may improve the diagnosis of IM in children.

[KEY WORDS] Infectious mononucleosis; Epstein-Barr virus antibody; Epstein-Barr virus DNA; Atypical lymphocyte

作者单位:1. 中山市博爱医院检验科,广东,中山 528403

2. 南方医科大学医学检验(临床方向),广东,广州 510515

*通讯作者:邓坤仪, E-mail:13823969783@139.com

传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)是指主要由EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染引起的单核-巨噬细胞系统增生性传染病^[1]。IM时EBV主要感染B细胞,继之引起T细胞的免疫反应,形成周围血中可见到的异型淋巴细胞^[2]。本病好发于青年及儿童,临床表现为发热、咽峡炎、淋巴结和肝脾肿大等^[3]。病程常具有自限性,多数预后良好,少数患儿出现严重并发症,引起后遗症,甚至导致死亡。由于病变可涉及血液系统、神经系统、消化系统、呼吸系统等,临床表现变化多端,症状多样化,早期常易误诊或漏诊。为了解3种实验室检测方法在儿童IM诊断的意义,本文对我院临床诊断为IM并治愈的116例患儿的EBV-DNA载量、抗CA-IgM及异型淋巴细胞计数结果进行比较分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2013年12月至2014年12月在中山市博爱医院临床首次诊断为IM并治愈的116例住院患儿,符合IM临床诊断标准^[2],并在IM用药治疗前进行抽血检验。其中男性83例,女性33例;发病年龄6个月至13岁,其中6月至1岁3例(2.59%),>1岁~3岁50例(43.10%),>3岁~6岁41例(35.34%),>6岁~13岁22例(18.97%)。对照组为正常体检健康儿童50例,男29例,女21例,年龄6月~13岁。

1.2 IM的诊断标准^[2]

根据第8版《诸福棠实用儿科学》,IM的诊断标准如下:(1)临床诊断病例:满足下列I中任意3项及II中第4条。(2)实验室确诊病例:满足下列I中任意3项及II中第1条~第3条中任意一条。I.临床症状:①发热;②咽峡炎;③颈淋巴结肿大,④肝脏肿大;⑤脾脏肿大;⑥眼睑水肿。II.实验室检查:①抗CA-IgM和抗CA-IgG阳性,且抗NA-IgG阴性;②抗CA-IgM阴性,但抗CA-IgG阳性,且为低亲和力抗体;③双份血清抗CA-IgG滴度4倍以上升高;④外周血异型淋巴细胞比例 $\geq 10\%$ 。

1.3 方法

1.3.1 EBV抗体检测

静脉抽血2 mL,采用ELISA方法测定EBV4

种抗体,包括:抗CA-IgM、抗NA-IgG、抗EA-IgM和抗CA-IgG。UNION-C免疫分析仪和试剂盒由深圳亚辉龙有限公司提供。

1.3.2 EBV-DNA载量检测

静脉抽血1 mL,用EDTA-K2抗凝,采用Taq-Man荧光标记探针基因扩增技术进行测定。荧光探针序列为:FPEBV5' X-CCTCG GACAGCTCC-TAAGAAGG-CACC-Y3',26 bp。引物序列为:PQEBVF5'-AAGCCCAA-CACTCCACCAC-3',19 bp;PQEBVR5'-CTGGTAGGACT-GGGCGAC-3',18 bp。PCR扩增条件:将各反应管放入DA7600全自动荧光定量PCR仪按下列条件扩增:93℃ 2 min 预变性;然后93℃ 45 s~55℃ 60 s,10个循环;最后93℃ 30 s~55℃ 45 s,30个循环。试剂购自中山大学达安基因股份有限公司,结果低于 1.0×10^3 拷贝/mL为阴性。

1.3.3 异型淋巴细胞计数

采集病人血液,制作血片。瑞姬氏染色,奥林巴斯CX-41双目显微镜油浸分类异型淋巴细胞比例。异型淋巴细胞在白细胞分类中 $\geq 10\%$,判断为阳性,<10%为阴性。

1.3.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行分析,3种实验室诊断方法和正常对照组间的阳性率比较用 χ^2 检验(Pearson Chi-Square),3种实验室诊断方法敏感性比较采用 χ^2 检验(McNemar Test)。

2 结果

2.1 EBV 4种抗体检测结果

116例IM患儿EBV抗体阳性率如下:抗CA-IgM阳性率最高,为84.48%(98/116),对照组阳性率为6.00%(3/50),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2=90.33, P=2.01 \times 10^{-21}, P<0.01$)。抗CA-IgM的特异性为94.00%(47/50),诊断符合率为87.35%[(98+47)/(116+50)];抗NA-IgG阳性率为9.48%(11/116);抗EA-IgM阳性率为49.14%(57/116);抗CA-IgG阳性率为14.66%(17/116)。具体结果分布见表1。由于抗CA-IgM阳性一直是EBV感染IM的依据^[4],因此本文主要探讨抗CA-IgM与异型淋巴细胞、EBV-DNA的分析比较。

表1 EBV4种抗体检测结果不同模式的分布表

Table 1 Distribution of the test results of 4 kinds of EBV antibody

CA-IgM	NA-IgG	EA-IgM	CA-IgG	IM组(116例)	对照组(50例)
+	-	+	-	49	0
+	-	-	-	40	0
-	-	-	-	8	28
-	+	-	+	8	18
-	+	+	+	1	0
+	+	-	+	1	1
+	+	+	-	1	0
+	-	+	+	5	2
-	-	+	-	1	1
+	-	-	+	2	0

2.2 EBV-DNA 载量检测结果

116例IM患儿中EBV-DNA的阳性率为85.34%(99/116),对照组阳性率为4.00%(2/50),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2=97.04, P=6.79 \times 10^{-23}, P<0.01$)。EBV-DNA 特异性为96.00%(48/50),诊断符合率为88.55%[(99+48)/(116+50)]。EBV-DNA 阴性模式见图1,EBV-DNA 阳性模式见图2。

2.3 异型淋巴细胞检测结果

116例IM患儿中,异型淋巴细胞分类计数 $\geq 10\%$ 为39.66%(46/116)。对照组异型淋巴细胞分类计数阳性为0.00%(0/50),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2=27.43, P=1.63 \times 10^{-7}, P<0.01$),异型淋巴细胞 $\geq 10\%$ 特异性为100.00%(50/50),诊断符合率为57.83%[(46+50)/(116+50)]。外周血正常淋巴细胞见图3,异型淋巴细胞见图4。

2.4 抗CA-IgM和异型淋巴细胞结果对比

116例IM患儿中抗CA-IgM和异淋细胞联合检测,只要有1项阳性的有103例,阳性率为88.79%,2项同时阴性的有13例,阴性率为11.21%,见表2。可以认为这2个指标对IM检出率有明显差异,而2项同时检测对IM的诊断具有互补性,能提高IM的检出率。

2.5 EBV-DNA和异型淋巴细胞结果对比

116例IM患儿中EBV-DNA和异型淋巴细胞联合检测,只要有一项阳性的有103例,阳性率为88.79%,2项同时阴性的有13例,阴性率为11.21%,见表3。可以认为这2个指标对IM检出率有明显差异,而2项同时检测对IM的诊断具有互补性,能提高IM的检出率。

表2 IM患儿抗CA-IgM和异型淋巴细胞检测结果

Table 2 Results of CA-IgM and atypical lymphocytes

CA-IgM	异型淋巴细胞		合计
	阳性	阴性	
阳性例数	41	57	98
阴性例数	5	13	18
合计	46	70	116

$\chi^2=43.61$ (McNemar Test 公式手工计算), $P=3.07 \times 10^{-12}, P<0.05$

表3 IM患儿EBV-DNA和异型淋巴细胞检测结果

Table 3 Test results of EBV DNA and atypical lymphocytes in children with IM

EB-DNA	异型淋巴细胞		合计
	阳性	阴性	
阳性例数	42	57	99
阴性例数	4	13	17
合计	46	70	116

$\chi^2=46.05$ (McNemar Test 公式手工计算), $P=4.85 \times 10^{-13}, P<0.05$

2.6 EBV-DNA载量和抗CA-IgM结果对比

116例IM患儿中EBV-DNA载量和抗CA-IgM联合检测,只要有一项阳性的有108例,阳性率为93.10%,2项同时阴性的有8例,阴性率为6.90%,见表4。可以认为这2个指标对IM检出率无明显差异。

2.7 3种方法两两并联检测的敏感性、特异性以及诊断符合率的比较

统计分析3种方法两两并联检测116例IM患儿和50例正常儿童的敏感性、特异性以及诊断

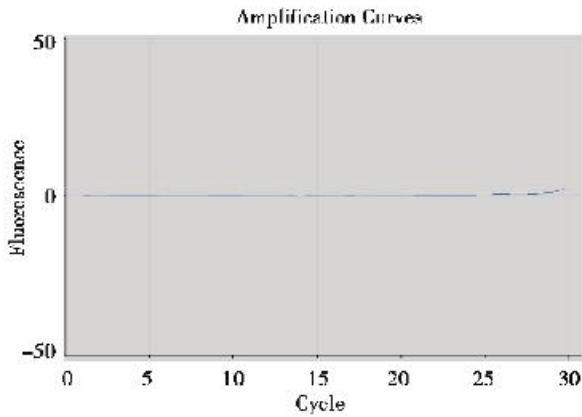


图1 EBV-DNA 阴性
Figure 1 Negative of EBV-DNA

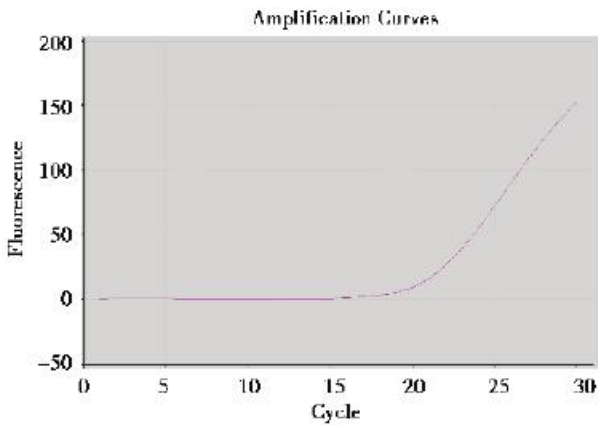


图2 EBV-DNA 阳性
Figure 2 Positive of EBV-DNA

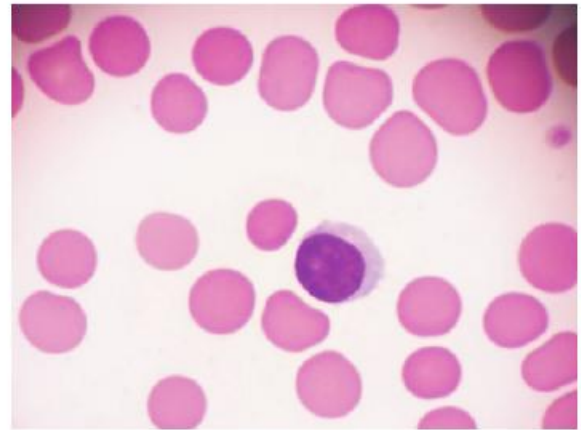


图3 正常淋巴细胞(光学显微镜, ×1 000)
Figure 3 Normal lymphocyte(Optical microscope, ×1 000)

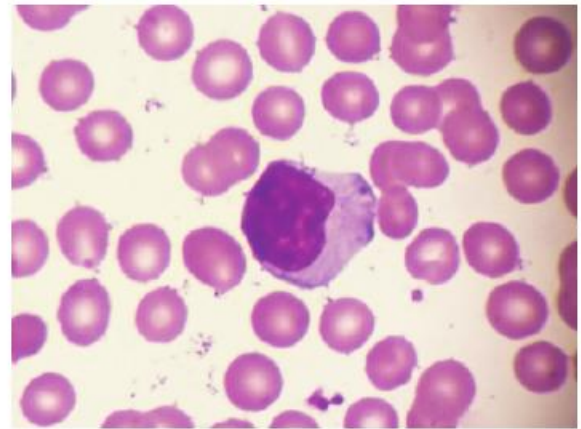


图4 异型淋巴细胞(光学显微镜, ×1 000)
Figure 4 Atypical lymphocyte(Optical microscope, ×1 000)

表4 IM 患儿 EBV-DNA 和抗 CA-IgM 检测结果

Table 4 Test results of EBV DNA and CA-IgM in children with IM

EB-DNA	CA-IgM		合计
	阳性	阴性	
阳性例数	89	10	99
阴性例数	9	8	17
合计	98	18	116

$\chi^2=0$ (McNemar Test 校正公式手工计算), $P=1.00$, $P>0.05$

符合率。3种方法两两并联检测的敏感性稍有提高,诊断符合率超过单独检测的任何一种方法,特异性稍有下降,但能满足临床需要。3种方法两两并联检测与单独检测敏感性、特异性以及诊断符合率的比较见表5。

3 讨论

外周血异型淋巴细胞是IM早期诊断的主要指标之一,成本低,取材易。但近半数学龄前儿童感染IM的异型淋巴细胞比例<10%。关于IM患儿的异型淋巴细胞比值,文献报道不一。如本文116例IM患儿中异型淋巴细胞比例≥10%的占39.66%,比常琴报道的89.73%^[5]低,与郭勇报道的41.40%^[6]相近。有报道该病的异型淋巴细胞一般在病后3天出现,第1周逐渐增多,第2周~第3周可达10%~35%,以后逐渐降低^[7]。因此,对怀疑IM的患者,应多次进行外周血涂片异型淋巴细胞检查,以免漏检。据本实验室统计数据,巨细胞病毒、支原体、衣原体、肝炎、流感和风疹等感染患儿

表5 3种方法两两并联检测与单独检测敏感性、特异性以及诊断符合率的比较

Table 5 Comparison of sensitivity, specificity and diagnose accordance rate of combined detection and single detection of the 3 test methods

检测方法	敏感性(%)	特异性(%)	诊断符合率(%)
EBV-DNA 载量	85.34	96.00	88.55
抗 CA-IgM	84.48	94.00	87.35
异型淋巴细胞	39.66	100.00	57.83
抗 CA-IgM 联合异型淋巴细胞	88.79	94.00	90.36
EBV-DNA 载量联合异型淋巴细胞	88.79	96.00	90.96
抗 CA-IgM 联合 EBV-DNA 载量	93.10	90.00	92.17

中可见异型淋巴细胞,但其百分比一般不超过10%。本文116例IM患儿通过与正常对照组比较,可见异型淋巴细胞在IM诊断中的敏感性较低,但特异性较高。

EB病毒抗体检测中主要包括抗CA-IgM、抗CA-IgG、抗EA-IgM和抗NA-IgG4项。116例IM患儿中抗CA-IgM的阳性率为84.48%,比严海燕报道的91.43%^[8]稍低。本文统计116例IM患儿可见抗CA-IgM的阳性率最高,其次分别是抗EA-IgM、抗CA-IgG和抗NA-IgG。EB感染后由于各项抗体是先后出现的,本文中出现的各种阳性组合可能在疾病的不同阶段检测有关。一般认为,抗CA-IgM在发病时滴度已经是最高,随着病程的推移而逐渐消失,抗CA-IgM阳性是IM急性期诊断的重要指标。抗CA-IgG在疾病恢复期继续存在,并终身持续,可用于流行病学调查。抗NA-IgG在3周~5周后开始出现,2个月~3个月后达高峰,滴度稍降低至较高水平终身保持,故无早期诊断价值。抗EA-IgM出现于原发感染的急性感染早期阶段,但有关该抗体的出现时间文献报道较少,有待进一步研究。EB病毒抗体血清学检查有助于动态反映感染后的各项抗体水平,并协助区分原发感染与既往感染,抗CA-IgM和抗CA-IgG浓度上升与原发感染有关。抗NA-IgG是既往感染的标志^[4]。EBV感染的血清学反应复杂多样,有的病例抗CA-IgM产生延迟、有的持续缺失或长时间存在,这给IM的确诊带来一定难度。对于免疫功能低下或接受免疫球蛋白治疗的患儿,仅凭EBV特异性抗体往往难于诊断本病。

PCR方法则是检测病毒核酸,理论上可以更准确地反映EBV感染和病毒复制情况。实时荧光

定量PCR技术,其扩增和产物检测一步完成,整个检测过程全封闭进行,避免了产物污染。且方法操作简便,重复性好,易标准化。在2010年版的《传染性单核细胞增多症临床路径》中已有提出EBV-DNA阳性可作为临床诊断依据之一^[9]。血清学检查是诊断EBV感染的有效方法,但其只能作为病毒感染的指标,不能准确反应出体内EBV感染复制情况,而实时荧光定量PCR技术可以准确测定出病毒表达的丰度^[10]。本文116例IM患儿EBV-DNA的阳性率为85.34%,与严海燕报道的87.14%^[8]相近。经过治疗后,共有35例IM患儿通过检测EBV-DNA载量进行复查,其中26例从发病时的阳性变为阴性,9例结果虽仍为阳性,但载量较发病时已大大降低,十分接近于正常值。因此,定量检测外周血EBV-DNA载量能更好反应体内EBV的活动情况,在判断EBV感染的病情转归方面比血清学抗体检测更具价值。Pitetti等^[11]研究显示IM患儿的外周血中EBV-DNA载量与临床表现的严重程度成正相关,这对患者病情严重程度的监测有重要意义。由于血清EBV阳性转化的健康人口部亦可不定时排病毒,因此,咽拭子或唾液标本不适合进行EBV-DNA检测^[2]。

本文对116例IM患儿的3种实验室检测结果进行分析,可见抗CA-IgM和EBV-DNA载量的敏感性和特异性都较高。异型淋巴细胞的敏感性较低,但特异性较高,与郭勇认为异型淋巴细胞特异性不高^[6]结论相反。抗CA-IgM和EBV-DNA载量进行对比,可以认为这2个指标对IM检出率无明显差异。血涂片进行异型淋巴细胞计数是诊断IM简便有效的筛查手段,但敏感性仅达39.66%,若能与抗CA-IgM或EBV-DNA载(下转第72页)

米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的临床疗效观察

王静*

[摘要] 目的 探讨米非司酮治疗围绝经期功血的临床效果。方法 将62例围绝经期功血患者随机分为2组,实验组34例患者采取口服米非司酮治疗,疗程6个月;对照组28例患者采取口服炔诺酮治疗,持续6个疗程。于治疗前定时检测患者5项血清内分泌水平,并比较患者治疗前后的血红蛋白值和子宫内膜厚度。结果 米非司酮治疗组的有效率显著高于炔诺酮组的有效率($P<0.05$, 97.06% vs 82.14%);实验组治疗后的促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)水平较治疗前无显著变化($P>0.05$),但是血清孕酮(progesterone, P)、雌二醇(estradiol, E_2)水平较治疗前大幅降低($P<0.01$),泌乳素(prolactin, PRL)水平较治疗前有所降低($P<0.05$);米非司酮治疗后子宫内膜增生和贫血情况显著好转($P<0.01$);在不良反应方面两治疗组无显著区别($P>0.05$)。结论 米非司酮可以作为一种安全有效治疗围绝经期功血的优先药物,具有良好的临床使用价值。

[关键词] 米非司酮;围绝经期;功能失调性子宫出血;临床疗效

Clinical efficacy of mifepristone in the treatment of perimenopausal dysfunctional uterine bleeding

WANG Jing*

(Obstetrics and Gynecology Departments, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu, China, 212002)

[ABSTRACT] Objective To investigate the clinical effect of mifepristone in the treatment of perimenopausal dysfunctional uterine bleeding. Methods 62 patients were included in this study. They were randomly divided into 2 groups, treatment group (34) and control group (28). The treatment group was given mifepristone for 6 months, while the control group was given norethindrone for 6 courses. The levels of 5 serum hormones, blood hemoglobin and thickness of endometrium were measured before and after the treatment, and the data were compared. Results The effective rate of treatment group (97.06%) was significantly higher than the control group (82.14%) ($P<0.05$). Compared to the serum hormones before the treatment, the levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) had no significant change ($P>0.05$), while progesterone (P) and estradiol (E_2) were markedly decreased ($P<0.01$), and prolactin declined significantly after the treatment ($P<0.05$). The degrees of endometrial hyperplasia and severity of anemia were improved after mifepristone treatment ($P<0.01$), and the therapeutic effect was significantly better than the control group. In respect to the side effects, there was no significant difference between the 2 groups ($P>0.05$). Conclusion Mifepristone may be used as one of the first line drugs for effective treatment of perimenopausal dysfunctional uterine bleeding.

[KEY WORDS] Mifepristone; Perimenopause; Dysfunctional uterine bleeding; Clinical efficacy

围绝经期功能失调性子宫出血(简称围绝经期功血),是由于卵巢功能衰退引起一系列激素水

平失衡所致的子宫内膜长期不规则出血。中老年妇女在围绝经期,由于卵巢中的卵子数已趋于耗

作者单位:镇江市第一人民医院妇产科,江苏,镇江 212002

*通讯作者:王静, E-mail: vcdgirl@163.com

竭,逐渐失去对垂体的正反馈作用^[1],导致垂体分泌的促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)水平大幅提高,更加抑制了卵巢的排卵;而卵巢的不排卵使其无法正常产生孕激素,导致孕激素与雌激素水平失衡^[2],并最终导致子宫内膜在此失衡的激素水平刺激下不断的增生增厚与坏死脱落出血。在此期间,由于孕激素与雌激素水平的失衡还导致子宫内膜内纤溶酶活化物质、前列环素、磷脂酶 A₂、花生四烯酸、前列腺素以及破坏性水解酶等一系列激素和活性物质^[3]之间的多对平衡关系被破坏,促进了围绝经期功血的发生。围绝经期功血通常可持续数月甚至一年以上,因此容易造成患者贫血及继发性感染,对患者的身心健康造成极大困扰。现对本院妇科门诊的62例已确诊为围绝经期功血患者使用米非司酮的治疗效果进行分析总结,以探讨其临床治疗价值,希望藉此对米非司酮应用于围绝经期功血治疗的效用有更为科学的临床医学评价。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入2012年10月到2015年2月,因阴道不规则出血至本院妇科门诊经检查确诊为围绝经期功能失调性子宫出血的患者62例,年龄分布46岁~54岁,平均50.3岁,病程3个月~19个月,平均9.2个月。上述患者经诊断性刮宫检查均发现存在不同程度的子宫内膜增生,血常规结果显示血红蛋白检查项平均值为(77.8±12.4)g/L。经常规妇检和子宫及附件B超检查结果,均排除子宫及附件存在肿瘤等器质性病变^[4];且排除存在凝血功能障碍的病例;经询问诊察未发现上述患者存在服用米非司酮和炔诺酮相关禁忌证。将62例围绝经期功血患者随机分为2组,34例构成米非司酮组,采取口服米非司酮治疗;另28例构成炔诺酮组,采取口服炔诺酮治疗。2组患者在上述年龄、病程及血红蛋白值等一般临床资料方面经对照比较, $P>0.05$,差异不具有统计学意义,有可比性。

1.2 治疗方法^[5-6]

1.2.1 米非司酮组

口服米非司酮(上海制药厂,规格10mg),剂量10mg/次/日,疗程3个月;减小剂量至5mg/

次/日,疗程3个月;总疗程前后持续6个月。

1.2.2 炔诺酮组

口服复方炔诺酮(上海制药厂,规格5mg),剂量5mg/次/日,连服3天;减量1/3,3.75mg/次/日,连服6天;减至2.5mg/次/日,依此剂量持续用药至血止后22天,此为第1疗程。此后,每次月经期第5天开始以2.5mg/次/日剂量连续用药至血止后22天为1个疗程,再连续治疗5个疗程,总计为6个疗程。

2组患者在上述治疗期间,在抗贫血饮食调整和其它注意事项方面均一致。

1.3 评定标准

1.3.1 治疗有效标准^[7]

(1)治疗期间阴道不规则出血症状消失,疗程结束后半年内绝经或正常规律月经;(2)治疗期间与疗程结束后半年内有阴道不规则出血症状,但出血量明显减少。无效:治疗期间与疗程结束后半年阴道仍不规则出血,且血量无减少。

1.3.2 检测方法

(1)分别于治疗前和开始治疗后第1个月、第3个月及第6个月各抽取1次空腹静脉血,检验患者如下5项血清内分泌^[8]水平:FSH、LH、血清孕酮(progesterone, P)、雌二醇(estradiol, E₂)和泌乳素(prolactin, PRL)。(2)完成治疗疗程后,做1次血常规检查患者血红蛋白值,做1次腹部B超检测患者子宫内膜厚度,并与治疗前的检查结果数据作比较。

1.4 统计学方法

对统计结果采用SPSS 12.5统计软件分析,计数资料的检验采用卡方检验,计量资料的检验采用 t 检验,所有分析设定 P 值为双侧分布,并以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗有效率方面

34例口服米非司酮患者,22例绝经(64.71%),4例恢复正常月经(11.76%),7例出血量减少(20.59%),总有效率为97.06%(33/34);28例口服复方炔诺酮患者,10例绝经(35.71%),5例恢复正常月经(17.86%),8例出血量减少(28.57%),总有效率为82.14%(23/28)。米非司酮治疗组的有效率显著高于炔诺酮组的有效率($P=0.001$, 97.06% vs 82.14%)。详情参见下表1。

表1 治疗后2组总有效率比较

Table 1 Comparison of total effective rate between the 2 groups after treatment

组别	绝经(例数)	恢复正常月经(例数)	出血量减少(例数)	总有效率
米非司酮组(n=34)	22	4	7	97.06%
炔诺酮组(n=28)	10	5	8	82.14%

2.2 内分泌水平方面

34例口服米非司酮治疗者治疗后的FSH和LH水平较治疗前无显著变化, $P>0.05$,差异不具有统计学意义;治疗后的P和 E_2 水平较治疗前大幅降低($P=0.001$),治疗后的PRL水平较治

疗前有所降低($P=0.001$),差异均具有统计学意义。2组治疗前后激素水平均有不同程度的改变,口服米非司酮治疗组激素水平变化($P=0.001$)较炔诺酮组更为明显。详情参见下表2及表3。

表2 采用米非司酮治疗的患者5项内分泌水平变化对照表

Table 2 Changes of 5 endocrine levels of patients treated with mifepristone

组别	FSH(IU/L)	LH(IU/L)	P(nmol/L)	E_2 (pmol/L)	PRL(μ g/L)
治疗前	9.7±2.1	5.8±1.2	1.74±0.07	94.8±8.3	13.8±0.9
治疗1个月	10.5±2.3	6.0±1.3	1.51±0.05	73.1±6.9	12.4±0.8
治疗3个月	10.7±2.3	6.2±1.3	1.28±0.04	57.6±5.2	11.2±0.8
治疗6个月	10.2±2.2 ^a	6.1±1.2 ^a	1.05±0.04 [△]	42.7±3.8 [△]	10.1±0.6 [□]

相对于治疗前,[△] $P<0.01$;[□] $P<0.05$;^a $P>0.05$

表3 采用炔诺酮治疗的患者5项内分泌水平变化对照表

Table 3 Changes of 5 endocrine levels of patients treated with norethindrone

组别	FSH(IU/L)	LH(IU/L)	P(nmol/L)	E_2 (pmol/L)	PRL(μ g/L)
治疗前	10.2±1.1	6.2±1.1	1.93±0.05	96.1±6.3	14.1±0.7
治疗1个月	11.5±1.6	6.6±0.83	1.41±0.03	70.1±5.3	11.4±0.7
治疗3个月	11.7±0.63	6.8±0.93	1.18±0.02	56.1±4.3	10.8±0.9
治疗6个月	11.3±1.2 ^a	6.9±0.72 ^a	1.01±0.04 [△]	45.2±2.6 [△]	10.7±0.3 [□]

相对于治疗前,[△] $P<0.01$;[□] $P<0.05$;^a $P>0.05$

2.3 其它方面

2.3.1 子宫内膜厚度方面

经B超检查,34例口服米非司酮治疗者治疗前子宫内膜厚度为 16.3 ± 0.3 mm,完成治疗后子宫内膜厚度为 6.2 ± 0.13 mm,子宫内膜增生情况显著好转, $P<0.01$,差异均具有统计学意义。2组治疗前后子宫内膜厚度水平均有不同程度的改变,米非司酮治疗组子宫内膜厚度水平变化($P=0.03$)较对照组更为明显,见下表4。

2.3.2 血红蛋白值方面

经血常规检查,34例口服米非司酮治疗者治疗前血红蛋白值为 (77.8 ± 12.4) g/L,完成治疗后血红蛋白值为 (107.6 ± 5.9) g/L,贫血情况显著好转,

表4 采用米非司酮及炔诺酮治疗的患者子宫内膜厚度变化

Table 4 Changes of endometrial thickness of patients treated with mifepristone and norethindrone, respectively

组别	例数	治疗前厚度(mm)	治疗后厚度(mm)
米非司酮组	34	16.3±0.3	6.2±0.13
炔诺酮组	28	16.0±1.5	8.1±0.15

$P=0.002$,差异均具有统计学意义,具体结果见表5。2组治疗前后血红蛋白值水平均有不同程度的改变,米非司酮治疗组与炔诺酮治疗组对于纠正患者的贫血疗效无明显差别。

表5 采用米非司酮及炔诺酮治疗的患者血红蛋白值变化
Table 5 Changes of hemoglobin value of patients treated with mifepristone and norethindrone, respectively

组别	例数	治疗前(g/L)	治疗后厚度(g/L)
米非司酮组	34	77.8±12.4	107.6±5.9
炔诺酮组	28	79.8±10.4	108.1±1.5

2.3.3 不良反应方面

治疗期间,米非司酮治疗组2例患者存在轻度恶心不适感,1例轻微腹痛,经肝肾功能检查均无异常结果,不影响继续治疗且不适感逐渐自行缓解;炔诺酮治疗组2例患者存在轻度恶心不适感,1例头晕,也均无异常检查结果,可继续顺利治疗。2组患者在不良反应方面无显著差异, $P>0.05$,差异不具有统计学意义。

3 讨论

围绝经期功能失调性子宫出血是因女性步入中老年后卵巢功能衰退引发的一系列激素水平及活性物质水平失衡所致的子宫内膜增生增厚与坏死脱落出血。其病程多较长、不易治愈、易复发,对患者的身心都造成一定的伤害。对围绝经期功血的治疗方法众多,最常采用的是内分泌药物治疗^[9],如孕激素、雌激素等。但采用孕激素治疗过程中易出现突破性出血且其不适合长期使用,长期雌激素治疗会加重子宫内膜的增生^[10]情况,雄激素止血效果较差止血缓慢,而手术治疗危险性大费用高且因其永久的伤害性不易被患者接受。

米非司酮是一种甾体类药物^[11],具有良好的抗孕激素和抗糖皮质激素的药物作用。米非司酮本身不具有孕酮活性,但与孕酮受体之间有良好的亲和能力,因此,不仅可以单纯拮抗雌孕激素,而且对下丘脑、垂体、卵巢、子宫均有影响。其能有效抑制子宫内膜过度增生;通过对月经等诸多方面的影响,达到闭经,使机体得到休整;停药后月经尚能重建平衡,联合用药促发绝经,对围绝经期功血发挥综合治疗作用。

研究资料显示,米非司酮既可直接作用于人下丘脑和垂体,又可直接作用于卵巢诱导黄体溶解^[12],从而导致体内孕激素与雌激素水平的下降。如本研究中的P和E₂水平均于米非司酮治疗后有了显著下降,治疗总有效率为97.06%,较传统药

物炔诺酮治疗总有效率82.14%, $P<0.05$,差异具有统计学意义。同时,正因为米非司酮与孕酮较好的拮抗作用,其可有效促进子宫内膜细胞凋亡,加速子宫内膜萎缩,并可抑制子宫内膜内血管的生成,诱导患者顺利闭经。

以往的研究表明不同剂量的米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的疗效不存在明显的差异,其中以中等剂量的治疗方案的不良反应较小且远期复发率较低^[3]。因此本研究采用的剂量为10mg/次/日,疗程3个月;随后3个月减小剂量至5mg/次/日,从而来优化治疗方案,减少不良反应提高安全性。另有研究表明,诊刮联合米非司酮组对围绝经期功能性子宫出血症状和体征改善的总有效率高于诊刮联合雌孕激素组,且复发率低,但是在FSH、LH、E₂、P水平及子宫内膜厚度,血红蛋白数量方面2组差异无明显统计学意义^[1]。但是,本研究表明米非司酮组患者的P、E₂、PRL水平较治疗前均有所降低,且子宫内膜增生和贫血情况有所好转。

本研究结果提示,使用米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血可收获良好的治疗效果(有效率高达97.06%),具有不可替代的优势,就近期疗效和改善贫血方面米非司酮疗法与炔诺酮疗法均有显著疗效,二者之间无明显差别。在远期疗效、激素水平变化和副反应方面米非司酮疗效优于传统的炔诺酮疗法,米非司酮可作用于下丘脑、垂体和卵巢以有效降低患者体内的雌孕激素水平,有效改善患者子宫内膜增生情况,加速子宫内膜的萎缩,并无严重的不良药物反应,无明显损害患者的肝肾功能,因此可以被选择作为一种安全有效治疗围绝经期功血的优先药物,有良好的临床使用价值,这为围绝经期功血治疗提供了新的思路和方法。

参考文献

- [1] 顾静,杨克虎,张莉,等.米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血疗效与安全性的系统评价[J].中国循证医学杂志,2012,12(4):451-459.
- [2] Kayastha S. Study of endometrial tissue in dysfunctional uterine bleeding[J]. Nepal Med Coll J, 2013, 15(1): 27-30.
- [3] 哈丽娅.米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的使用剂量及疗效分析[J].中国保健营养(下旬刊),2012,22(08):2803-2804.

单基因遗传病基因诊断技术研究进展

郭奕斌^{1*} 梁宇静² 郭东炜³

[摘要] 单基因遗传病(简称单基因病)种类、分型繁多,常规诊断难以确诊,而基因诊断技术在遗传病特别是单基因病的确诊、分型等方面都发挥着不可或缺的作用。近一、二十年来,基因诊断技术进展迅猛,各种检测方法层出不穷。本文重点围绕基因诊断技术的最新进展进行综述,以期对临床诊断和预防工作提供一些有益的启示。

[关键词] 单基因病; 基因诊断; 技术方法

Research advance in genetic diagnosis of monogenic inherited diseases

GUO Yibin^{1*}, LIANG Yujing², GUO Dongwei³

(1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Amateur Team, Department of Medical Genetics, Clinical Medicine (Grade 2011), Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 3. Clinical Medicine (Grade 2014), Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361102)

[ABSTRACT] Monogenic diseases are caused by inheritance of single mutated gene, but the type of the diseases are diversified depending on the type and locus of genetic mutation inherited. While conventional laboratory methods may contribute to an initial identification, a definitive diagnosis and classification of these inherited disorders often need molecular/genetic testing. In the past twenty years, diagnostic techniques for the genetic disorders have rapidly advanced, leading to the invention of many laboratory tests for the detection of genetic disorders. In this article, we review the recent advance in the diagnostic modalities for the genetic disorders, in hope of setting light on improvement of the clinical diagnosis and prevention.

[KEY WORDS] Monogenic disease; Gene diagnosis; Technology and method

在5大类遗传病[包括单基因遗传病(简称单基因病)、多基因病、染色体病、线粒体病和体细胞遗传病]中,病种最多的当属单基因病^[1-3]。据在线人类孟德尔遗传最新报道,已被美国国家生物技术信息中心正式收录的就有22 000多种^[3]。

对于基因病,基因诊断被公认是确诊该类疾病最准确、最可靠的诊断技术和金标准,它可以在分子水平甚至在单个碱基发生改变的情况下作出明确诊断。基因诊断是继形态学、生物化学和免疫诊

断学之后的第四代诊断技术,是诊断学领域的一次革命^[4]。它打破常规诊断的方式,不以疾病的表型为主要依据,而是采用分子生物学的技术和方法,直接检测被检者某一特定基因的结构或者功能是否异常,从而对疾病作出诊断。相对于常规诊断,基因诊断更注重个体基因状态,不仅可以对患者所患疾病做出判断,还可以对表型正常的携带者或者遗传易感者做出前瞻性诊断^[4-5]。基因诊断具有高特异性、高灵敏性、早期诊断性和应用广泛性等特点,因

基金项目:国家自然科学基金(30772069);闽粤横向科研基金(71010025)

作者单位:1.中山大学中山医学院医学遗传学教研室,广东,广州 510080

2.中山大学医学遗传室业余科研小组/2011级临床医学专业,广东,广州 510080

3.厦门大学医学院2014级临床医学专业,福建,厦门 361102

*通讯作者:郭奕斌, E-mail: aguoabin@qq.com

此日益得到普及和推广。近一、二十年来,基因诊断技术取得了前所未有的进步。随着该技术在临床检测中的推广、应用,其已为早期诊断单基因病、多基因病以及肿瘤遗传病、线粒体遗传病等带来了曙光。回顾基因诊断的发展历程,不难看出,它经历了从间接诊断到直接诊断,从简单到复杂再回归简单,从单一技术到整合技术,从时间长、成本高、通量低、需手工操作到快速、廉价、高通量、自动化,从多细胞到单分子,从用量多到用量少的过程^[6]。下面重点对单基因病的最新基因诊断技术做一概述。

1 基因诊断技术分类

基因诊断通常在基因定位、基因克隆、基因序列、蛋白结构已经弄清或虽未弄清但与其他遗传标记的连锁关系已经明确的情况下进行,大致分为间接诊断和直接诊断2大类。

从发展历程和诊断策略来看,基因诊断技术包括:(1)连锁分析类:限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、可变数目串联重复(variable number of tandem repeat, VN-TR)、短串联重复(short tandem repeat, STR)、简单序列长度多态性(simple sequence length polymorphism, SSLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, Amp-FLP)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP);(2)分子杂交类:Southern 印迹杂交(Southern blot)、斑点杂交(dot blot)、反向点杂交(reverse dot blot, RDB)、Northern 印迹杂交(northern blot)、蛋白质印迹杂交(western blot)、抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH);(3)PCR 及其衍生技术类:聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、不对称 PCR (asymmetric PCR)、多重 PCR (multiplex PCR)、多重巢式 PCR (multiplex-nested PCR)、长片段 PCR (long PCR)、三引物 PCR (triprimer PCR, TP-PCR)、逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)、实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RTQ-PCR 或 qPCR)、数字 PCR 技术(digital PCR, dPCR)、PCR 寡核苷酸探针杂交(sequence-specific oligonucleotide primed PCR, PCR-SSO)、扩增阻碍突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS)[即等位基因特异性扩增(allele-specific amplification, ASA)]、高分辨

熔解曲线分析(high-resolution melting curve analysis, HRM)、多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)、变性高效液相色谱分析(denaturing high-performance liquid chromatograph, DHPLC)、DNA 生物传感器检测法(DNA biosensors);(4)基因芯片(DNA chip)技术:cDNA 芯片、寡核苷酸芯片等;(5)基因序列分析类:Sanger 法测序、高通量测序技术(high-throughput sequencing)[即下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)]、基因组扩增转录同步测序法(genomic amplification with transcript sequencing, GAWTS)、全外显子测序(whole-exome sequencing, WES)[即外显子组测序(exome sequencing)]、全基因组测序(whole-genome sequencing, WGS)、第三代测序技术等数十种。随着科学技术的飞速发展,基因诊断和各种组学的新技术新方法也在不断涌现并日益在临床医学中发挥着重要的作用。

2 间接诊断

间接诊断是指当致病基因本身尚属未知或致病基因虽然已知但其突变尚属未知时,可以通过对患者及其家系成员进行连锁分析或单倍型分析,从而推断受检者是否带有致病基因的一种诊断方法。

连锁分析是基于紧密连锁的基因或遗传标记通常会一起传递给子代,因而考察相邻 DNA 是否传递给了子代,即可间接地判断致病基因是否传递给子代。连锁分析多使用基因组中广泛存在的各种 DNA 多态性位点,特别是基因突变部位或紧邻的多态性位点作为遗传标记。RFLP、SSLP、STR、SNP 等均可用于连锁分析。通过多位点的连锁分析,还可进行亲子鉴定等。通常,RFLP 被认为是第一代遗传标记,SSLP/STR 是第二代遗传标记,SNP 是第三代遗传标记^[7]。

3 直接诊断

对于基因序列、结构、功能、突变类型都清楚的、且发生于候选基因内的突变的检测,可以采用直接诊断的方法。直接诊断是指直接检查目的基因本身有无异常。它通常是用基因本身或紧邻的 DNA 序列作为探针,或通过 PCR 扩增产物,以探查基因有无突变、缺失等异常并阐明突变的性质和突变的类型等。直接诊断适用于已知基因异常的疾病。下

面分别介绍。

3.1 分子杂交及相关技术

互补的 DNA 单链能够在一定条件下结合成双链,即所谓的分子杂交。分子杂交技术包括 Southern blot、northern blot、dot blot、RDB、SSH、DNA biosensors、western blot 等。其中,Southern blot、northern blot 和 dot blot、RDB、SSH、DNA biosensors 也称核酸的分子杂交,用于检测特定的 DNA、RNA;western blot 又称免疫学测定,用于检测特定的蛋白质。核酸分子杂交是基因诊断的最基本的方法之一,其中,SSH 技术、DNA 生物传感器检测法比较新颖,本节重点介绍它们。

3.1.1 SSH 技术

SSH 技术是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术,是一种以抑制性 PCR(利用链内退火优于链间退火,使非目的序列片段两端的长反向重复序列在退火时产生“锅柄样”结构,无法与引物配对,从而选择性抑制非目的序列片段扩增)反应为基础,将标准化测试 cDNA 单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术。它是建立在抑制性杂交和选择性 PCR 基础上的差异表达基因筛选手段。通过合成 2 个不同的接头,接于经限制性内切酶消化后的测试 cDNA 片段的 5'末端,将测试和驱动进行两轮杂交^[8-9]。

该技术具有筛选高效、假阳性率低的优点,因而广泛应用于动物、植物、人类及癌症等研究领域^[5]。在高血糖发病的研究中,研究者利用 SSH 方法发现丙酮酸羧激酶和胆固醇 O-乙酰基转移酶 2 个基因与葡萄糖激酶代谢紧密相关,并利用 RTQ-PCR 对其进行了验证^[10];在进行葡萄糖激酶对肾脏功能影响研究时筛选到谷胱甘肽过氧化物酶 3 (glutathione peroxidase-3, GPX3)基因表达发生改变,并且 GPX3 可作为肾脏损伤初期的标记物^[11]。Ren 等^[12]利用 SSH 方法鉴定出旋毛虫肌肉期幼虫与肠道期幼虫的 9 个差异表达基因(*Ts7*、*Ts8*、*Ts11*、*Ts17*、*Ts19*、*Ts22*、*Ts23*、*Ts26*、*Ts33*),对旋毛虫肌肉期幼虫转变成肠道期幼虫的相关机理进行了阐述。曹振龙等^[9]利用 SSH 方法对小鼠 MOE 内受 AC3 调控的差异表达基因进行了筛选,获得了 *kenk3*、*mapk7*、*megf11*、*c-mip*、*skp1a*、*mlycd*、*tmem88b*、*trap-pc5*、*ppat*、*ssr3* 等差异表达基因,并证实这些基因分别与 K⁺通道、胞外信号调控、胞内蛋白泛素化因子、

胞内蛋白转膜与运输等生物学功能相关。SSH 法所需实验材料是通过 PCR 扩增获得,整个过程包括多次酚:氯仿抽提,这些过程可能会使部分基因丢失,此为其不足之处。

3.1.2 DNA biosensors 技术

该技术是由固定有已知的核苷酸序列的单链 DNA(ssDNA)的电极(探头)和换能器 2 部分组成。固定在传感器电极上的 ssDNA 探针与待测样品的目标 DNA 杂交,形成双链 DNA,杂交反应在传感器电极上直接完成,换能器将杂交过程中所产生的变化转换成电、光、声等物理信号,从而对待检样品进行检测^[13]。该技术灵敏度高,快速经济,无需标记;检测装置简单轻巧,易于实现微型化;检测过程中不受样品混浊度限制。适合研究碱基错配对 DNA 电子传递性质的影响^[13]。

3.2 PCR 及其衍生技术

对于基因突变的检测,在 1985 以前主要是利用 Southern 印迹法,它可以检出基因的缺失、插入、重组等突变形式,而点突变、微缺失、微插入则很难检出,只能应用 PCR 结合其他方法完成。PCR 技术是突变研究中的重大进展,目前几乎所有的基因突变检测技术都是建立在 PCR 基础之上,并且由 PCR 衍生出许多新方法,目前已达 20 余种,自动化程度也越来越高,分析时间也大大缩短,分析结果的准确性也有很大提高。这是因为 PCR 技术可以使特定的基因或 DNA 片段在短短的 1.5 h~3 h 内体外扩增数十万至百万倍。扩增的片段可以直接通过电泳观察,也可用于进一步的分析。这样,少量的单拷贝基因不需通过同位素来提高其敏感性,而通过扩增至百万倍后直接观察到,而且原先需要一、二周才能作出的诊断现可以缩短至数小时甚至 1 h~2 h。

PCR 技术目前有许多新的发展,用途日益扩大。本小节重点介绍 TP-PCR、实时荧光定量 PCR、数字 PCR 这几种。

3.2.1 TP-PCR 技术

TP-PCR 是一种不需要限制性内切酶和连接酶的重组 DNA 的方法。可用于拼接融合基因;目的基因中碱基的定点突变;目的基因中某些功能结构域的人工缺失研究;在目的基因中的任何位置插入外源基因片段,进行重组基因的研究。

该法的原理是:TP-PCR 反应体系中有 2 种模板和 3 种引物,可以在同一个反应体系中产生一个

重组 DNA 分子。设计合理的中间引物是保证 TP-PCR 反应成功的关键。只有中间引物设计合理才能保证 2 种 DNA 片段在融合位点正确连接。3 条引物的浓度比例是另一个关键因素。要适当调节中间引物的比例使得 TP-PCR 反应获得最理想的结果。实验结果表明,合适的比例范围可有效增加目的片段的扩增,同时减少非特异产物的扩增,一般来说在 1/1 000~1/100 范围内比较合适。除此之外,为了保证 PCR 产物的高忠实性,需用高忠实的 DNA 聚合酶来代替 Taq 聚合酶^[14-15]。

TP-PCR 法简便、快捷、经济,可以在所期望的任何位点将 2 种 DNA 片段连接起来,而无需知道 DNA 片段的限制位点。通过 TP-PCR 进行重组操作,可以在几个小时内于一个 PCR 反应体系中完成,无需高档设备仪器和试剂盒,即可实现对所研究的目的基因的改造。邓朝阳等^[14]用这种方法构建融合蛋白基因——SCK 基因获得成功。朱艳等^[15]用该法构建抗人 CD28 嵌合抗体双启动子昆虫杆状病毒重组转移载体也获得圆满成功。该法的突出优点在于无需设计外源的 DNA 序列,即可实现对目的基因的任何常规性改造,从而避免在原有基因中引入冗余的酶切位点的碱基序列^[14-16]。

3.2.2 RT-PCR, RTQ-PCR 和多重巢式 RT-PCR 技术

RT-PCR 为逆转录 PCR (reverse transcription PCR) 的缩写。逆转录 PCR 是 PCR 的一种衍生技术。在逆转录 PCR 中,一条 RNA 链被逆转录成为 cDNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增。RT-PCR 的指数扩增是一种很灵敏的技术,可以检测很低拷贝数的 RNA。RT-PCR 广泛应用于遗传病的诊断,并且可以用于定量检测某种 RNA 的含量。

RT-PCR 有时候也会指代实时 PCR (real time PCR)。为了与逆转录 PCR 相区别,通常被写作实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RTQ-PCR)^[17]。实时 PCR,属于定量 PCR 的一种,以一定时间内 DNA 的增幅量为基础进行 DNA 的定量分析。

多重巢式 RT-PCR 的原理同多重巢式 PCR,不同之处在于所用的模板是 cDNA 而不是 DNA。逆转录 PCR 可在 RNA 水平检测基因的突变类型和突变效应。实时荧光定量 PCR 具有灵敏、特异、技术成熟和操作简便等优点,对于临床上明确诊断、具

体分型、动态观测肿瘤负荷、选择合适治疗方案、评估治疗效果和预后都有较大价值。在产前监测和产前基因诊断也具有重要意义。

逆转录 PCR (RT-PCR) 和多重巢式 RT-PCR 有一个共同的缺点就是所提的 RNA 易降解且操作较繁琐。

3.2.3 dPCR 技术

dPCR 技术是一种新的核酸检测和定量技术,与传统 qPCR (即 RTQ-PCR) 技术不同,dPCR 采用绝对定量的方式,不依赖于标准曲线和参照样本,直接检测目标序列的拷贝数。由于这种检测方式具有比 qPCR 更加出色的灵敏度和特异性、精确性,故得到广泛的应用。这项技术在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测和表达量微小差异鉴定方面都具有诸多优势,其在基因表达研究、microRNA 研究、基因组拷贝数鉴定、癌症标志物稀有突变检测、致病微生物鉴定、转基因成分鉴定、NGS 测序文库精确定量和结果验证等诸多方面也具有广阔的应用前景。

该技术是采用“分而治之”(divide and conquer) 的策略,将一个标准 PCR 反应分配到大量微小的反应器中,在每个反应器中包含或不包含一个或多个拷贝的目标分子 (DNA 模板),实现“单分子模板 PCR 扩增”,扩增结束后,通过阳性反应器的数目“数出”目标序列的拷贝数。

dPCR 是 PCR 领域最激动人心的创新之一,该技术可应用于单细胞分析、罕见肿瘤等位基因检测、产前诊断以及血液中游离肿瘤 DNA、表观遗传学直接相关的 DNA 甲基化定量检测、ChIP 定量鉴定等众多领域^[18-32]。如果将 PCR 技术进行分代的话,那么第一代 PCR 技术就是我们目前最常用的常规 PCR 了,它可通过凝胶电泳获得定性结果。而曾经风靡全球的 RTQ-PCR 可称为第二代 PCR 技术,它利用荧光试剂监控扩增,来实现相对定量,在开展基因表达分析时,需要标准曲线或参考基因来协助定量。而 dPCR 则可谓是第三代 PCR 技术,它不再依赖 Cq 值或内参基因,即可确定低至单拷贝的待检靶分子的绝对数目,它是一种核酸分子绝对定量技术,主要采用当前分析化学热门研究领域的微流控或微滴化方法,将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或微滴中,每个反应器的核酸模板数少于或者等于一个。这样经过 PCR 循环之后,有

一个核酸分子模板的反应器就会给出荧光信号,没有模板的反应器就没有荧光信号。根据相对比例和反应器的体积,就可以推算出原始溶液的核酸浓度。它比 RTQ-PCR 更加灵敏、特异、精确,故日益得到广泛的应用。可应用于:癌症生物标志物研究和拷贝数变异分析;病原体检测;与 NGS 无缝对接,对二代测序结果进行验证;miRNA 表达分析;单细胞基因表达分析;环境监测;食品检测^[19-32]。Floren 等^[20]用 dPCR 法成功对肉类及肉制品进行了品种鉴定和量化。日本科学家 Miyake 等^[33] 2013 年对一对患有雷特氏综合征 (rett syndrome, RTT) 的同卵双生双胞胎进行了基因组学以及表观遗传学的研究。文章对该双胞胎姐妹(其中一个为非典型 RTT,另一个为典型 RTT)采用了第一代毛细管测序,二代测序、SNP 和 CNV 芯片、基因组 DNA 甲基化芯片、RTQ-PCR 以及 dPCR 等分析方法,得出结论:是表观遗传学水平上而非基因组水平上的差异,导致了两姐妹不同的临床表现。表观遗传学上的差异也许主要源自 X 染色体失活。在对双胞胎姐妹的 CNV 位点是否相同进行确认时,Miyake 等首先采用 CNV 芯片的方法删除 8 195 个位点的不同;然后采用 NGS 进一步确认,发现其中仅有 29 个 CNV 位点可能存在差异;使用更加准确的 dPCR 平台后,发现在这对姐妹中没有存在 CNV 位点的差异,就遗传背景而言两者完全一致。在讨论部分中,作者特别指出:需要对采用芯片或 NGS 得到的 SNP/CNV 位点的相关数据采用进一步定量的分析。这篇文章正是采用了 dPCR 法进行验证,并进一步纠正了 NGS 的错误数据。

3.3 PCR 基础上的基因突变检测技术

3.3.1 扩增阻碍突变系统/限制性核酸内切酶(amplification refractory mutation system/restriction endonuclease, ARMS/RE)技术

ARMS/RE 双重鉴定法特别适用于种植前基因诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)等需快速特异、准确灵敏检测的项目。此法是将 ARMS^[34-35]与 RE 巧妙结合,在设计 3'端错配碱基的特异引物的同时引入酶切位点。有时一个碱基的错配不一定含有酶切位点,这时可根据限制酶的识别序列,人为设计成双错配甚至三错配。

ARMS/RE 将 ARMS 法和 RE 法合二为一,具有双重鉴定的效能,即首先用 ARMS 法鉴定一次,然后再用 RE 法鉴定一次,故可大大提高鉴定的准

确率。中山大学中山医学院医学遗传学教研室曾用该法用于软骨发育不全的 PGD 研究并获得成功^[36]。但该法也有不足,其不足是往往需要花费很多时间为人为错配碱基才能找到酶切位点,且所用的内切酶多数较罕见,成本较高,且酶易失活,保存期有限。

3.3.2 DHPLC 技术

DHPLC 是一种高通量筛选 DNA 序列变异的技术,主要用来分析异质性双链结构:(1)在不变性的温度条件下,检测并分离分子量不同的双链 DNA 分子或分析具有长度多态性的片段;(2)在完全变性温度条件下,可以区分单链 DNA 或 RNA 分子,适用于寡核苷酸探针合成纯度分析和质量控制;(3)在部分变性的温度条件下,变异型和野生型的 PCR 产物经过变性复性过程,不仅分别形成同源双链,同时也错配形成异源双链,根据柱子保留时间的不同将同源双链和异源双链分离,从而识别变异型^[37-38]。

该技术可进行基因突变检测、SNP 分析等方面的研究;可检测出含有单个碱基的置换、插入或缺失的异源双链片段;快速高效无毒经济;除了检测已知突变还能检测未知突变;自动化程度高;其敏感性和特异性可达 90%以上,明显高于单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)检测技术。但该技术不能检测纯合突变,检测纯合突变需在 PCR 产物中加入野生型扩增产物;不能确定突变的具体位点,也不能确定是哪种突变类型;仪器价格高,分离柱有一定的使用寿命,需定时更换;目前仅用于检测 200 bp~500 bp 大小的 DNA 片段;引物二聚体、非特异扩增产物以及与样品碱基数类似的污染产物将会影响分析,需通过优化 PCR 去除之;PCR 产物浓度必须足够大,否则会导致信噪比下降,分析结果的可靠性也会随之下降^[37-38]。

3.3.3 HRM 技术

HRM 主要用于未知突变筛查。根据目标 DNA 序列的长度、GC 含量及碱基的互补性差异,利用 HRM 对样品的基因型进行分析,其分辨精度可达单个碱基的差异。由于每一段 DNA 都有其独特的序列,因而在加热变性时就会有独特的溶解曲线形状,它可以通过 DNA 分子缓慢升温过程中饱和荧光染料荧光值的变化而得到具体显现。如同 DNA 指纹图谱一样,具有很高的特异性、稳定性和可重复性。根据它们独特的溶解曲线,即突变片段与野生型片段溶解曲线的形状和位置存在差异,就可以

对不同的核酸片段进行区分^[39]。

该法在突变筛查中其便捷性、灵敏性与特异性均优于 DHPLC, 并且检测成本较低, 耗时较少, 是近年来发展起来的核酸分析技术。灵敏快速无毒高效, 对已知和未知的突变都可检测。但和 DHPLC 一样, 不能准确检测具体突变^[39]。

3.3.4 MLPA 技术

针对基因内每个待检区域设计一对 DNA 探针。每个 MLPA 探针包括 2 个荧光标记的寡核苷酸片段, 一段引物序列和一段特异性杂交序列。在 MLPA 反应中, 2 个寡核苷酸片段都与靶序列进行杂交, 之后使用连接酶连接 2 部分探针。连接反应高度特异, 只有当 2 个探针与靶序列特异性序列完全互补, 连接酶才能将 2 段探针连接成一条完整的核酸单链; 反之, 如果靶序列与探针序列不完全互补, 即使只有一个碱基的差别, 连接反应也无法进行。连接反应完成后, 用一对通用引物扩增连接好的探针, 每个探针扩增产物的长度都是唯一的, 范围在 130 bp~480 bp。最后, 通过毛细管电泳分离扩增产物, 收集数据, 软件分析, 得出结论。只有当连接反应完成, 才能进行随后 PCR 扩增并收集到相应探针的扩增峰, 如果检测的靶序列发生点突变或缺失、重复突变, 那么相应探针扩增峰便会缺失、降低或增加, 根据扩增峰的改变就可判断靶序列是否有拷贝数的异常或点突变存在^[40-41]。

该法高效、特异, 在一个 PCR 反应中可以同时扩增数十个探针的连接产物, 可用 40 对~50 对特异探针, 一次性检测 40 种~50 种突变类型, 可以检测 45 个核苷酸序列拷贝数的改变, 实现了高通量的缺失检测。同时该技术所具有的相对定量能力还能对基因的重复进行判断。近年来, MLPA 在技术与应用上又有许多新的发展, 如运用化学合成法制备 3'、5' 探针, 在基因甲基化检测、基因表达水平分析、基因部分片段重复区域拷贝数分析及转基因基因分型中获得广泛应用, 加上 MLPA 与基因芯片微阵列技术的结合, 使得多重连接探针扩增真正具备了高通量检测能力^[41]。但该法需要毛细管电泳装置, 试剂盒价格较高; 只能检测已知突变。

3.3.5 蛋白截短测试法 (protein truncation test, PTT)

本方法是从蛋白质水平的变化来检测基因突

变, 它主要检测导致开放阅读框架改变的碱基缺失或插入突变等。检测时须提取细胞 mRNA, 将待测靶基因逆转录为 cDNA, 所用逆转录引物含一段 T7 启动子和真核细胞翻译起始序列, 逆转录产物在无细胞提取液中翻译为相应的蛋白质。如果基因突变导致了开放阅读框架的改变, 那么合成的蛋白质经 SDS-PAGE 分离时会出现比正常蛋白质或长或短的蛋白产物^[42-43]。

本法突变检出率高, 一次可处理大量的样品, 并可检测 4~5 kb 片段的突变。但不能检测不影响开放阅读框架的突变, 且需要抽提组织 mRNA。另外, 移码突变如果太靠近基因的 5' 端或 3' 端, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳也无法检测出, 由差异剪切所形成的异构体也会影响结果的分析。

3.4 DNA chip 技术

用于检测已知突变, 是 90 年代后发展的一项 DNA 分析新技术。按应用的不同, 基因芯片可分为: 基因表达谱芯片和寡核苷酸芯片。按核酸探针的不同, 可分为: 寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片。按介质的不同, 可分为: 玻璃片、硅片、尼龙膜、陶瓷和微型磁珠等。按用途的不同, 可分为: 表达谱芯片、诊断芯片、测序芯片、毒理芯片和指纹图谱芯片等。按点样方法的不同, 可分为光刻基因芯片、机械微型点样基因芯片、液体喷射技术基因芯片等。按制备方法的不同, 可分为: 原位合成和直接点样^[38]。基因芯片技术集合了集成电路计算机、激光共聚焦扫描、荧光标记探针和 DNA 合成等先进技术, 可用于基因定位、DNA 测序、物理图谱和遗传图谱的构建等。在基因突变检测方面也有广阔的前景。DNA 芯片技术将生物技术和信息技术有机结合, 是今后基因诊断的发展方向 and 趋势^[44-46]。

该技术检测信息高通量, 自动化程度高, 一次可检测众多突变位点, 具有很大的发展潜力, 将在基因突变检测中发挥非常重要的作用, 可用于疾病临床早期诊断和批量筛选, 确定疾病亚型和选择最佳治疗方案; 也可用于耐药基因的筛选以及新药的研发。PCR 核酸诊断技术虽经典, 但难以满足现今检验、检疫需求, 而“微流控芯片技术”既涵盖微流体操作系统又满足实验结果的分析功能。由于芯片“实验室”排污很少, 故被称作是一种“绿色”技术^[45-46]。芯片技术虽然优点众多, 但成本高, 技术含量高, 目前普及推广还有一定难度。

3.5 DNA 序列分析技术

DNA 序列分析是一种非常重要的基因诊断技术,被称为是基因诊断的金标准。近 10 年来发展非常迅速,从第一代 Sanger 法测序开始,经历第二代的高通量测序技术,至今已发展到第三代——单细胞测序技术。

关于 1 代~3 代测序技术的原理、优缺点、在基因诊断中的应用以及 3 代测序技术特点的比较,详见文献^[6],本文不再赘述。

4 小结与展望

随着医学技术的不断发展,凭借人体基因密码预测相关疾病的风险性和发展进程,做到早检测、早预防、早治疗,基因诊断技术在临床的应用将有更加广阔的前景。展望未来,我们可以预见:(1)染色体水平与基因水平的检测将结合得更加紧密;(2)高通量、自动化、低成本获得更大发展;(3)PCR 技术将以优化反应和拓展应用为主,随着反应速度、延伸范围和检测成本的不断优化,PCR 技术将继续引领现代分子生物学的发展;(4)无创性产检将相当普及,PGD 也将进入到一个更普及的阶段;(5)群体筛查的项目将更多,技术手段将更高、更快捷、更准确;(6)随着仪器成本的降低、小型化,试剂、试剂盒的大量研发,个体化、自主化检测程度将更加提高;(7)临床与基础研究结合将更加密切,研究成果将更加及时应用于临床防治,转化医学得到充分体现;(8)每个人一生的生老病死有望在胚胎早期就被解读、破译,疾病的预防有望得到更早期、更有效的控制;(9)可以为基因治疗寻找更多新的治疗靶点,从而促进基因治疗的迅猛发展。

参考文献

- [1] 杜传书. 医学遗传学(第 3 版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014.
- [2] 傅松滨. 医学遗传学(第 3 版)[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2013.
- [3] OMIM Entry Statistics. Gene description[EB/OL]. <http://omim.org/statistics/entry>, 2015-06-15/2015-06-17.
- [4] 方兴东. 基因诊断[EB/OL]. <http://www.techcn.com.cn/index.php doc-view-113399>, 2009-04-06/2015-06-17.
- [5] 百度百科. 基因诊断[EB/OL]. <http://baike.baidu.com/view/94960.htm func=retitle>, 2015-03-11/2015-06-17.
- [6] 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点[J]. 遗传, 2014,36(11):1121-1130.
- [7] 百度百科. 复杂基因[EB/OL]. <http://hanyu.iciba.com/wiki/150455.shtml>, 2014-05-24/2015-06-17.
- [8] Liu D, Li J, Cao L, et al. Analysis of differentially expressed genes in two immunologically distinct strains of *Eimeria maxima* using suppression subtractive hybridization and dot-blot hybridization[J]. Parasit Vectors, 2014,7(1):259.
- [9] 曹振龙, 郝江叶, 周艳芬, 等. 利用 SSH 方法筛选与鉴定 AC3 基因缺失小鼠主要嗅觉表皮内的差异表达基因[J]. 遗传, 2014,36(6):574-583.
- [10] Xu W, Li H, Wang R, et al. Differential expression of genes associated with the progression of renal disease in the kidneys of liver-specific glucokinase gene knockout mice[J]. Int J Mol Sci, 2013,14(3):6467-6486.
- [11] Wang R, Gao H, Xu W, et al. Differential expression of genes and changes in glucose metabolism in the liver of liver-specific glucokinase gene knockout mice[J]. Gene, 2013,516(2):248-254.
- [12] Ren HJ, Cui J, Yang W, et al. Identification of differentially expressed genes of *Yrlichinella spiralis* larvae after exposure to host intestine milieu[J]. Plos One, 2013,8(6):e67570.
- [13] Jung J, Kim SJ, Lee KW, et al. Approaches to label-free flexible DNA biosensors using low-temperature solution-processed InZnO thin-film transistors [J]. Biosens Bioelectron, 2014,55:99-105.
- [14] 邓朝阳, 宋贵生, 徐军望, 等. 一种简单易行的重组方法——三引物 PCR 法[J]. 科学通报, 2002,47(16):1247-1249.
- [15] 朱艳, 陈永井, 邱玉华, 等. TP-PCR 法构建抗人 CD28 嵌合抗体双启动子昆虫杆状病毒重组转移载体[J]. 生物工程学报, 2005,21(5):832-836.
- [16] Chen YX, Liu H, Zhang WB, et al. A novel tri-primer PCR method (TP-PCR) for rapid construction of fpg gene[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3):359-364.
- [17] 严昕, 王均永, 吴小末, 等. 实时荧光定量 PCR 检测原发性肝癌中 hNTKL-BP1 基因的表达[J]. 复旦学报(自然科学版), 2007,3:411-416.
- [18] Baker M. Digital PCR hits its stride[J]. Nature Methods, 2012,9(6):541-544.
- [19] Marx V. PCR: paths to sensitivity[J]. Nature Methods, 2014,11(3):241-245.
- [20] Miotke L, Lau BT, Rumma RT, et al. High sensitive detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR [J]. Anal Chem, 2014,86(5):2618-2624.

- [21] Coudray-Meunier C, Fraisse A, Martin-Latil S, et al. A comparative study of digital RT-PCR and RT-PCR for quantification of hepatitis A virus and norovirus in lettuce and water samples[J]. *Int J Food Microbiol*, 2015,201: 17-26.
- [22] Kinugasa H, Nouse K, Tanaka T, et al. Droplet digital PCR measurement of HER2 in patients with gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015,112(10):1652-1625.
- [23] Doi H, Takahara T, Minamoto T, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species[J]. *Environ Sci Technol*, 2015,49(9): 5601-5618.
- [24] Zhu G, Ye X, Dong Z, et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *J Mol Diagn*, 2015,17(3):265-272.
- [25] Hayden RT, Gu Z, Sam SS, et al. Comparative evaluation of three commercial quantitative cytomegalovirus standards by use of digital and real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2015,53(5):1500-1505.
- [26] Tanaka H, Yamamoto S, Nakamura A, et al. Hands-off preparation of monodisperse emulsion droplets using a poly (dimethylsiloxane) microfluidic chip for droplet digital PCR[J]. *Anal Chem*, 2015,87(8):4134-4143.
- [27] Huang H, Li S, Sun L, et al. Digital detection of multiple minority mutants and expression levels of multiple colorectal cancer-related genes using digital-PCR coupled with bead-array[J]. *Plos One*, 2015,10(4):e0123420.
- [28] Floren C, Wiedemann I, Brenig B, et al. Species identification and quantification in meat and products using droplet digital PCR (ddPCR)[J]. *Food Chem*, 2015,15: 173:1054-1058.
- [29] Devonshire AS, Honeyborne I, Gutteridge A, et al. Highly reproducible absolute quantification of mycobacterium tuberculosis complex by digital PCR [J]. *Anal Chem*, 2015,87(7):3706-3713.
- [30] Zhang BO, Xu CW, Shao Y, et al. Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4):1383-1388.
- [31] Kinz E, Leiherer A, Lang AH, et al. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR[J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(2):217-224.
- [32] Doi H, Uchii K, Takahara T, et al. Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys [J]. *Plos One*, 2015,10(3): e0122763.
- [33] Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, et al. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for rett syndrome[J]. *Plos One*, 2013, 8 (6):e66729.
- [34] Liu W, Hu T, Chen Y, et al. Development and validation of a tetra-primer amplification refractory mutation aystem-polymerase chain reaction combined with melting analysis-assay for clinical JAK2 V617F mutation detection[J]. *Mol Diagn Ther*, 2014,18(5):579-585.
- [35] Cheng C, Zhou Y, Yang C, et al. Detection of rare point mutation via allele-specific amplification in emulsion PCR[J]. *BMB reports*, 2013,46(5):270-275.
- [36] 李荣, 毕博文, 沈晓婷, 等. 软骨发育不全植入前遗传学诊断的方法学研究[J] *分子诊断与治疗杂志*, 2014,6 (6):372-377.
- [37] Liu W, Smith DI, Reichtzige KJ, et al. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998,26(6):1396-1400.
- [38] 新浪博客. DHPLC 变性高效液相色谱原理 [EB/OL]. http://blog.sina.com.cn/s/blog_4d82e72b01000ax1.html. 2007-07-22/2015-06-17.
- [39] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics[J]. *Pharmacogenomics*, 2007,8(6):597-608.
- [40] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002,30(12):e57.
- [41] 胡晓, 李汶, 卢光琇. 多重连接依赖性探针扩增技术及其应用进展. *现代生物医学进展*[J]. 2010,10(2):362-365.
- [42] Necker J, Kovac M, Attenhofer M, et al. Detection of APC germ line mosaicism in patients with de novo familial adenomatous polyposis: a plea for the protein truncation test[J]. *J Med Genet*, 2011,48(8):526-529.
- [43] 新浪博客. 瞬时基因表达技术[EB/OL]. http://blog.sina.com.cn/s/blog_4e0c3abb010096ph.html, 2008-05-09/2015-06-17.
- [44] 中华论文网. 概述基因芯片技术原理等[EB/OL]. <http://www.zhonghualw.com/xumushouyi/net201202090638543029.html>, 2012-02-09/2015-06-17.
- [45] 好搜问答. 基因芯片技术[EB/OL]. <http://wenda.so.com/q/1378647361064338> src=140, 2013-09-08/2015-06-17.
- [46] 滕牧洲, 马文丽. 走进医学研究领域中的基因芯片技术 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014,6(6):361-365.

CD-DST 技术:为肿瘤细胞量“身”定药

徐伟 李文迪 邓天颖 张志高 杜红延*

[摘要] 肿瘤原代细胞三维立体培养法药敏检测技术(collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test, CD-DST)是一种先进的体外化疗药物敏感性检测方法,相对于其它方法有着无可比拟的优势,比如细胞用量少、简便快速等。自该法建立以来,大量基于此平台的临床研究便陆续开展起来,主要针对一些常见的恶性肿瘤,如大肠癌、乳腺癌等。大量研究证实,CD-DST 技术的检测结果与临床治疗效果的拟合程度很高,应用该方法模拟的化疗方案,患者都取得了较好的疗效。CD-DST 对于建立肿瘤患者的个体化治疗方案有着重要的指导意义,相信随着技术的不断发展以及更广泛的应用,会在个体化治疗中得到更广泛的应用。本文综述了 CD-DST 技术的建立及研究进展,有望为该技术的发展提供新的思路,为肿瘤患者提供新的治疗手段。

[关键词] 体外药敏检测; 肿瘤; CD-DST; 化疗

Advance of collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test in anticancer chemotherapy: a personalized medicine in cancer treatment

XU Wei, LI Wendi, DENG Tianying, ZHANG Zhigao, DU Hongyan*

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

[ABSTRACT] The drug sensitivity of tumor cells is one of the critical issues to conduct individualized therapy for cancer patients. One of the therapeutic approaches is *in vitro* anticancer drug sensitivity test. Collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitive test (CD-DST) is one of the best chemosensitivity tests, and is apparently superior to other methods currently available, because it requires a low number of the cells, has a short turn-around time and involves a simple and easy procedure. Since its establishment, CD-DST has been extensively applied and evaluated in clinical studies for the treatment of malignant tumors. It has been demonstrated that the chemotherapeutic protocols designed according to the results of CD-DST shows a high degree of fitting to the clinical scenario with high therapeutic efficacy and remission rate. CD-DST, as a guideline for the therapeutic decision making, is indispensable in individualized chemotherapy for cancer patients, and it may achieve more extensive clinical application with advance of new techniques. In this article, we review the establishment and advance of CD-DST, hoping to provide some basis for the future study.

[KEY WORDS] Chemosensitivity assay *in vitro*; Tumor; CD-DST; Chemotherapy

随着社会经济和医疗卫生的发展,健康已成为人们越来越关心的问题。浙江大学医学院巴德年院士提出“3P”医学理念,被誉为 21 世纪医学发

展的新方向。“3P”医学指的是预防医学(preventive)、预测医学(predictable)和个体化医学(personal)。其中“个体化”在慢性疾病治疗中的重

基金项目:国家教育部博士点基金(20134433120020);国家自然科学基金(81401920);南方医科大学基础研究前期启动项目(QD2013N005)

作者单位:南方医科大学生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:杜红延, E-mail:gzduhongyan@126.com

注:徐伟和李文迪为并列第一作者

要性和必要性日益提升,特别是在肿瘤的诊疗方面。化疗是治疗肿瘤的主要手段之一,但由于肿瘤的个体化差异,同一化疗手段对不同肿瘤患者甚至不同肿瘤的疗效差异较大,盲目的使用化疗药物不但会给患者带来不必要的经济损失,甚至会导致治疗失败。显而易见,在患者进行化疗前,利用体外检测技术检测患者肿瘤对化疗药物的敏感性相当重要。传统的体外检测药敏性的方法有很多,比如琥珀脱氢酶抑制试验、四唑蓝比色法、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)生物荧光体外药敏检测法及立体组织培养药物检测试验等,它们在一定程度上解决了部分肿瘤个体化治疗的问题,但限制条件多,检测效果并不理想。在此研究背景下,肿瘤原代细胞三维立体培养法药敏检测技术(collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test, CD-DST)应运而生。

最初有报道称在胶原培养基上进行肝细胞单层培养可以成功维持细胞的形态与功能^[1]。随后Yang^[2]等研究者便尝试将小鼠乳腺癌上皮细胞种植于胶原培养基上,他们发现在胶原形成的三维立体结构中可以提供类似体内细胞的生长环境。经历了近20年的试验和探索,最终在1997年,Kobayashi^[3]等人在已有的经验基础上正式建立了一种新型体外药敏检测技术——CD-DST技术。CD-DST技术一出现便以其培养成功率高、细胞需量少、所培养细胞的生物学特性与体内相似、结果可靠性强等优点得到了广泛的重视。到目前为止,CD-DST技术已被应用于部分实体瘤的临床治疗和研究中,取得了一定程度的认可。本文主要针对近年来CD-DST技术在临床上的研究应用进行综述,以便为后续研究者提供一定的帮助。

1 CD-DST的原理及特点

在机体内,细胞外基质可以为细胞提供获取营养和排出代谢物的稳定生长场所。同样,肿瘤组织也是由肿瘤细胞、组织细胞和细胞外基质所构成,肿瘤细胞所处的微环境对肿瘤细胞的生长繁殖具有重要影响。CD-DST技术采用的胶原凝胶在37℃时可以形成三维立体的结构,模拟体内细胞的生长微环境,肿瘤细胞得以在类似体内的环境下生长,在其细胞形态、生长状态与体内肿瘤细胞相似的情况下对抗癌药物进行定量分析便可得到

较准确的结果。

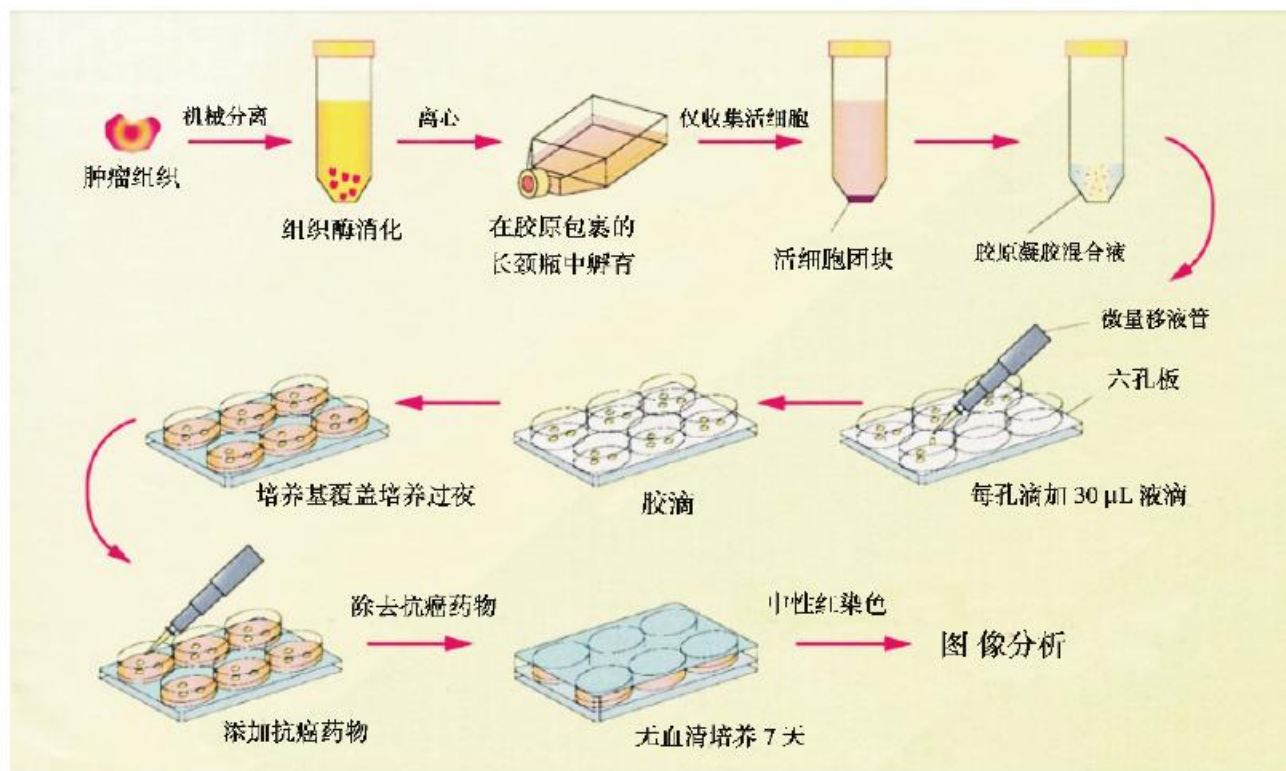
CD-DST技术的主要流程包括以下5部分:(1)原代肿瘤细胞悬液制备:取新鲜肿瘤组织机械分离,用组织消化酶消化2 h~3 h后,通过80 μm的筛网过筛形成单细胞悬液;(2)肿瘤细胞单层培养:将上述细胞悬液加入到I型胶原蛋白包被的细胞培养瓶中培养24 h,弃上清未贴壁死细胞;(3)胶原凝胶内培养:用胶原酶消化上述细胞得到细胞悬液,计数后将活细胞加入胶原凝胶混合液中混匀,在冰浴条件下接种于六孔板37℃培养,形成胶滴后加入培养基培养过夜;(4)待测药物添加:将待测抗癌药物加入六孔板中,继续培养24 h后清洗细胞除去抗癌药物,将细胞转移至无血清培养基中培养7 d;(5)结果分析和评估:利用中性红染色、甲醛固定,经扫描将图像传输到计算机,利用图像分析药物的抑制率,评估药物体外的杀伤效果^[4]。具体流程如图1所示。

2 CD-DST技术的临床研究进展

2.1 大肠癌

近年在我国,大肠癌的发病率也在逐年攀升。目前对于肿瘤治疗公认的最佳方案是进行个体化治疗,而其中首要的就是为大肠癌患者筛选敏感有效的化疗药物进行有针对性的治疗。为患者进行药物敏感性的体外检测可以有效提高治疗效果,减少药物带来的不良反应。CD-DST技术在发展初期便被用于确定多种针对大肠癌的化疗药物的有效治疗浓度,其结果被应用于癌细胞的杀伤动力学试验。Ochiai^[5]等人利用该技术检测大肠癌细胞对5-氟尿嘧啶(5-fluoropyrimidine, 5-FU)的敏感性,并通过分析上述试验的数据明确了所检测患者对该药的反应程度与体外敏感性之间的关系。

近几年,随着药物基因组学的发展,发现化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效应与基因的多态性和表达水平有关,其中药物的目标酶和代谢酶的表达和活性尤为重要。在该方面研究中,CD-DST技术主要参与探究大肠癌细胞中5-FU药物敏感性与相关代谢酶活性之间的关系,其中包括胸苷酸合成酶(thymidylate, TS)、二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine, DPD)和乳清酸磷酸核糖转移酶(orotate phosphoribosyltransferase, OPRT)。研究人员认为DPD和OPRT活性具有预测5-FU药物敏感性的

图 1 CD-DST 技术流程图^[4]Figure 1 Flow chart of CD-DST^[4]

潜力,若将 CD-DST 技术与细胞酶活性检测相结合可能会更有效地预测药物敏感性^[6]。参与肿瘤形成的一些关键分子,也在肿瘤细胞耐药性的形成中发挥着重要作用。Syndecan1 分子(CD138)属粘附分子整合素跨膜粘蛋白(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)家族成员,可与多种因子结合,参与组织器官分化发育、血管形成、组织再生等一系列生理过程的调节,并与肿瘤细胞归巢及转移等过程有关,也是判断某些肿瘤预后的指标。研究表明, Syndecan1 分子在大肠癌细胞中的脱落增加,导致了癌细胞对 CD-DST 技术指导下的体外化疗的耐药性升高,这可能是由于 Syndecan1 分子的脱落使表皮因子生长受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)磷酸化增强继而下调了该通路的信号,最终导致了大肠癌细胞对化疗药物的耐药性升高^[7]。笔者认为,由于 CD-DST 技术结果与临床化疗的相关性较高,可以利用 CD-DST 技术明确一些与肿瘤发生发展密切相关的分子对化疗的影响,以此来有针对性地筛选化疗药物,这将会对大肠癌个体化治疗的建立

有着十分积极的意义。

不同时期的肿瘤对化疗的敏感性不同,在个体之间的差异更为显著。近期,在针对Ⅱ~Ⅲ期大肠癌的研究中发现在 CD-DST 技术辅助下以 5-FU 为基础的辅助化疗药物治疗的成功率为 79.9%^[8];此后在利用 CD-DST 技术指导Ⅳ期大肠癌患者的用药治疗中,接受体外检测敏感药物治疗的患者比接受体外检测不敏感药物治疗的患者的药效反应率、无进展生存期和总生存期均提高 2 倍左右^[9],提示以 CD-DST 技术结果为依据选择的化疗方案能明显延长患者生存时间,改善患者预后。

为提高试验的准确率和成功率,研究者有针对性地 CD-DST 技术进行了改进。杂菌污染是导致大肠癌细胞培养失败的主要原因,有试验表明提前用抗生素灌洗大肠癌标本可以有效控制杂菌污染,提高肿瘤细胞生长率^[10]。在探究蛋白结合多糖-K(protein-bound polysaccharide, PSK)与氟尿嘧啶衍生物在胃肠道癌症抗癌作用关系的试验中,为更好模拟体内免疫环境,CD-DST 体系中还

加入了外周血单核细胞,即建立了免疫 CD-DST 技术(Immuno-CD-DST),并证实该改进可以更好地用于评估药物的免疫机制^[11]。综上所述,通过一系列 CD-DST 技术在大肠癌治疗中的应用,证明该技术可有效地补充化疗准备期信息的不足,为通向大肠癌个体化治疗打下坚实基础。

2.2 乳腺癌

全球乳腺癌发病率自 20 世纪 70 年代末开始一直呈上升趋势,每年约有 50 万人死于乳腺癌,近年来我国乳腺癌发病率的增长速度呈持续走高态势^[12]。乳腺癌具有遗传异质性,不同患者的个体差异较大,因此乳腺癌的个体化治疗就显得尤为重要。在乳腺癌中,CD-DST 技术多被应用于检测个体癌细胞对药物敏感性。CD-DST 技术被用于检测以吡柔比星(pirarubicin, THP)和表柔比星(epirubicin, EPI)药物方案为基础的化疗药物对乳腺癌的化疗效果的结果表明 CD-DST 技术检测乳腺癌化疗药物敏感性的可行性高^[13]。

和其它许多肿瘤一样,乳腺癌具有遗传异质性,这就提示我们可以通过分析乳腺癌相关标记物的表达并辅助应用 CD-DST 技术来建立个体化治疗方案。Ki67 是一种与细胞增殖有关的核抗原,Ki67 标记指数高的患者淋巴结转移率高,无瘤缓解期和存活时间短,与乳腺癌组织学分级、核分裂指数和淋巴结转移的情况密切相关。研究者利用 CD-DST 技术检测 Ki67 的表达与药敏性之间的关系,结果显示 Ki67 表达较高的乳腺癌患者对紫杉醇(paclitaxel, PTX)的药敏性也相应增高^[14]。多二磷酸腺苷核糖聚合酶 1(poly ADP-ribose polymerase-1, PARP1)是一种 DNA 修复酶,最新的一项研究中指出,细胞核内 PARP1 的表达量可以作为预测乳腺癌细胞对化疗药物敏感性的指标^[15]。研究发现,在 CD-DST 技术的指导下,乳腺癌细胞核内 PARP1 的高表达和癌细胞对紫杉醇与表柔比星敏感性的升高呈正相关,那些核内高表达 PARP1 的乳腺癌细胞对以蒽环类抗生素联合紫杉醇类药物为基础的化疗更敏感^[15]。由此看来,CD-DST 技术是推动乳腺癌个体化化疗的又一有效技术,它以显著的优点加速了其在临床研究中的应用。

2.3 胃癌

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,目前是世界上

第四大癌症,发病率和死亡率均很高,每年大约有 93.3 万新发病例,约 70 万人死于胃癌^[16]。胃癌早期症状不明显,部分患者仅出现消化道疾病的常见症状,发现时多已是晚期,手术常常只能达到缓解病情和短暂延长生存而达不到根治的效果,所以晚期胃癌的化疗就显得尤为重要。目前临床上影响化疗药物对胃癌的治疗效果的因素主要是多耐药性,而随着近些年兴起的 CD-DST 技术在胃癌中的应用,将有望改善这一现状并进一步推动建立胃癌的个体化治疗方案。有国内学者对 CD-DST 技术在胃癌中的应用进行了多项研究,结果提示 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、血浆谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione-S-transferase π , GST- π)及 TS 三种酶的表达与胃癌多耐药性的形成有关,前两者和耐药性呈正相关,而 TS 酶与耐药性呈负相关^[17]。在为胃癌患者筛选化疗药物时如果辅助以检测以上耐药相关分子的表达情况,可以更准确地筛选到有效的药物。CD-DST 技术可以预测单独用药和联合用药对于胃癌患者的治疗效果。一项研究针对晚期胃癌患者的分层 II 期临床试验中,应用 CD-DST 技术检测 3 种化疗方案对患者的体外效果并与体内疗效进行对比,结果显示体外敏感组的患者生存率明显高于体外耐药组,这进一步说明了 CD-DST 技术能较好地预测晚期胃癌患者对化疗药物的敏感性^[18]。表明不同分化时期以及不同转移部位的胃癌细胞对化疗药物的敏感性有差异,应用 CD-DST 技术能更精准地检测其差异性。有学者利用 CD-DST 检测技术时发现不同分化程度的肿瘤细胞对于不同药物的敏感性不同,其中顺铂、奥沙利铂、5-FU 对 MGC-830、BGC-823、SGC-7901 三种胃癌中分化细胞株的增殖均有显著的抑制作用,丝裂霉素仅对 SGC-7901 细胞有抑制作用,且试验结果测出的相关敏感度数值与临床数据基本一致,这就提示 CD-DST 的检测结果可以有效预测体内药物敏感度^[19]。CD-DST 技术本身是一种体外药敏检测技术,尽管该技术模拟的肿瘤细胞生长微环境相较其他技术更接近体内情况,但差异仍难避免,故其结果须与临床数据相结合方可得出更加准确的结论。相信随着 CD-DST 在胃癌治疗中的应用越来越广泛,将对胃癌患者的个体化治疗产生更为积极的推动作用。

2.4 胰腺癌

胰腺癌是一种恶性消化系统肿瘤。据统计,近些年全世界范围内的胰腺癌患者的死亡率由 2.2/10 万上升到 10.5/10 万^[20]。胰腺癌恶性程度高,手术切除率仅 10%,化疗是胰腺癌的主要治疗手段之一,但其单独用药或联合化疗的有效率很低。胰腺癌的化疗效果很差与肿瘤的个体差异性、多重耐药性(原发性、继发性)等因素有关,选择个体敏感药物进行个性化治疗是提高治疗成功率的关键。由于 CD-DST 技术中的胶原能抑制成纤维细胞的生长,且通过染色和图像分析技术可以很好地排除成纤维细胞对结果的干扰,因此非常适合于胰腺癌这种间质细胞成分多的肿瘤的体外化疗药物敏感性检测^[21]。CD-DST 技术在胰腺癌中的应用研究与其它类型的肿瘤相类似。CD-DST 技术在胰腺癌中的应用主要集中于各种化疗药物针对肿瘤细胞的敏感性预测上,尤其是一线化疗药物,如 5-FU、顺铂(cis-diamine dichloroplatinum, CDDP)、丝裂霉素(mitomycin c, MMC)。有报道称,一位患有胰腺实性假乳头状瘤(solid pseudopapillary tumor, SPT)的患者在进行了末梢胰切除术 4 年后病情复发,在应用 CD-DST 技术筛选出敏感药物的基础上进行治疗后,患者在第二次术后的 1.5 年中保持健康,没有发现肿瘤复发的迹象^[22]。CD-DST 技术在胰腺癌中的应用方向也随着更加广泛的应用在不断扩展中。徐强^[23]在 2009 年关于 CD-DST 技术在胰腺癌中的应用研究中发现,胰腺癌细胞原代培养到一定程度时,成纤维细胞的生长开始占优势,最后肿瘤细胞被纤维类细胞包裹,这可能在体外模拟了胰腺癌硬癌的形成过程。令人更感兴趣的是,研究人员还在纤维细胞中发现了星状细胞的存在,这种细胞是胰腺癌细胞的“帮凶”,能促进胰腺细胞的纤维化^[23]。进一步说明了 CD-DST 技术所营造的细胞生长微环境与胰腺癌细胞在体内的环境拟合度较高,同时也为 CD-DST 技术在胰腺癌乃至其它肿瘤的研究应用提供一个新思路,即模拟肿瘤细胞在体外生长过程中的病理及生化改变。

2.5 非小细胞型肺癌

非小细胞肺癌患者约占所有类型肺癌患者的 80%,其中约 75%的人被发现时已处于中晚期^[24]。非小细胞肺癌目前主要的治疗手段是化疗,紫杉

烷类化合物以及顺铂是治疗非小细胞肺癌关键的化疗药物。然而,非小细胞肺癌患者对这些化疗药物的敏感性并不清楚,因此,需要一项能够指导非小细胞肺癌患者用药的技术,从而减小无效用药的概率,CD-DST 技术应其所需。考虑到体内外药物作用效果的差异,需要先验证 CD-DST 技术的临床关联性。就非小细胞型肺癌而言,在 CD-DST 技术指导下的化疗结果中,预测化疗反应的准确率约为 70%,且对于淋巴结复发转移的非小细胞肺癌的准确率更高,达到了 86%^[25]。CD-DST 技术的临床关联性较好,可以在临床通过预测回应率和药物有效率来指导非小细胞肺癌患者选择化疗药物,使用 CD-DST 技术选取的化疗药物可以延长非小细胞型肺癌患者的生存时间及提高患者的生存质量。

对于无法采取切除手术的非小细胞肺癌患者,CD-DST 技术可以为他们选择化疗药物,选择成功率约为 61%,使用了由 CD-DST 技术筛选的化疗药物后,患者的临床回应率约为 70%^[26]。同样,对已切除癌变部位的非小细胞肺癌患者,CD-DST 技术也可用于帮助患者选择合适药物以防止术后复发,提高临床手术的效果^[27]。CD-DST 技术给非小细胞肺癌患者提供了更佳的个体化治疗,但此项技术在该型癌症方面的应用尚未成熟,其在非小细胞肺癌中的应用也有局限,对已发生转移的非小细胞肺癌患者,CD-DST 技术有效率较低,如骨转移和胸膜转移,其检测结果与临床反应关联不大,这意味着,对于某些抗癌药物,癌转移的路线和位置可能会影响 CD-DST 技术的预测效果^[28]。

2.6 CD-DST 技术在其它肿瘤中的研究进展

CD-DST 除了在以上提到的肿瘤的临床研究有应用之外,还在其它很多肿瘤上有所应用,比如卵巢癌、宫颈癌、头颈鳞癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、恶性胸膜间皮瘤等。曾有报道称一例脾脏组织肉瘤患者接受了 CD-DST 指导下的化疗药物治疗,这也是相关病例的首次报道,结果证实治疗十分有效^[29]。关于黑色素瘤的一项研究表明 CD-DST 技术可以用于体外评估黑色素瘤对化疗药物敏感性,但少数药物除外,比如抗黑瘤素,因其为前体药,须经体内酶的转化释放出活性药物方能发挥药效,这也指出了 CD-DST 技术应用的一个限制

因素^[30]。CD-DST技术在更多肿瘤中的应用还有待进一步实验探究。

3 总结与展望

目前化疗已由传统的经验性治疗逐步优化为个体化治疗,而在其中不可或缺的就是体外药敏检测技术,通过这种技术可以前瞻性地指导患者的临床用药,对个体化治疗方案的建立具有重大的意义。CD-DST技术作为其中新兴的先进技术,有着其它技术不可比拟的优势。CD-DST技术最先由日本学者创立,其后的研究也主要集中在日本,笔者所能查阅到的文献多数由日本学者提供,而且日本已有公司将该技术产业化。我国的研究开展得较晚,但是发展很迅速,取得了丰硕的研究成果。CD-DST技术的应用研究在肿瘤个体化治疗中十分热门,目前主要应用于预测肿瘤对于各种药物的化疗敏感性,为患者筛选有效的抗癌药物,另外还可以用于与肿瘤相关的临床研究、化疗药物的开发等等。CD-DST技术具备的所需细胞少、特异性高等优点,弥补了当前大部分临床化疗药敏检测技术的弊端,并且扩大了其在临床上的应用范围。大量的国内外临床试验均证实了其良好的效果,该技术的应用能指导临床科学用药,真正达到个体化治疗的目的,提高肿瘤患者的治疗效果。不过和传统方法一样,CD-DST技术的发展也存在着一些制约,如体外细胞生长环境无法完全模拟肿瘤体内环境,药物浓度及持续时间受给药途径、肝肾功能等各种因素影响而无法完全再现该浓度变化、某些药物须经代谢转化或免疫介导发挥作用而体外药敏试验无法很好体现等等。对于这些不足之处研究者们已经开始在寻求改进的方法,以让CD-DST得到更为广泛的应用,比如上文提到的Immuno-CD-DST技术等。笔者认为,未来CD-DST技术的发展方向应集中于如何更有效地使胶原内的环境尽可能地接近体内肿瘤细胞生长微环境以及将该技术与肿瘤相关分子检测技术相结合以探究相关分子在肿瘤发生发展中所起的作用等方面。随着该技术的进一步发展以及对相关理论和技术更深入的研究,体外模拟的细胞生长环境会和体内更加接近,这将使CD-DST技术的临床应用更加广泛。总而言之,CD-DST技术已经被国内外医学工作者广泛认同,并且随之在临床

应用的逐步深入及不断改进,该技术将会在指导个体化治疗方案的建立以及抗癌药物相互作用的研究和新药研发等方面得到更进一步的发展应用,对临床的真正应用起到非常重要的作用。

参考文献

- [1] Michalopoulos G, Pitot HC. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations[J]. *Exp Cell Res*, 1975,94(1):70-78.
- [2] Yang J, Richards J, Bowman P, et al. Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979,76(7):3401-3405.
- [3] Kobayashi H, Tanisaka K, Doi O, et al. An in vitro chemosensitivity test for solid human tumors using collagen gel droplet embedded cultures[J]. *Int J Oncol*, 1997,11(3):449-455.
- [4] 梁智, 张伟. 胶滴肿瘤药敏检测技术的研究进展[J]. *癌症进展*, 2005,3(05):442-448.
- [5] Ochiai T, Nishimura K, Watanabe T, et al. Identification of responders/non-responders to 5-fluorouracil based on individual 50% inhibitory area under the concentration curve of 5-fluorouracil obtained with collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitivity test in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2011,2(2):309-313.
- [6] Tokunaga Y, Ohnishi T, Sasaki H. [Investigation of chemotherapy based on enzyme expression and drug sensitivity test in colorectal cancer[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2011,38(1):69-73.
- [7] Wang X, Zuo D, Chen Y, et al. Shed syndecan-1 is involved in chemotherapy resistance via the EGFR pathway in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014,111(10):1965-1976.
- [8] Mekata E, Sonoda H, Shimizu T, et al. Clinical predictive value of anticancer drug sensitivity test for the therapeutic effect of adjuvant chemotherapy in patients with stage II-III colorectal cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2013,1(4):763-767.
- [9] Takebayashi K, Mekata E, Sonoda H, et al. Clinical potential of the anticancer drug sensitivity test for patients with synchronous stage IV colorectal cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013,72(1):217-222.
- [10] Yamada T, Kan H, Matsumoto S, et al. Success rate of collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test in colorectal cancer: are antibiotics a prerequisite for

- specimen irrigation?[J]. *J Nippon Med Sch*, 2012,79(2): 163-165.
- [11] Mekata E, Murata S, Sonoda H, et al. Protein-bound polysaccharide-K augments the anticancer effect of fluoropyrimidine derivatives possibly by lowering dihydropyrimidine dehydrogenase expression in gastrointestinal cancers[J]. *Oncol Rep*, 2013,30(6):2845-2851.
- [12] 李玉阳. 山东省乳腺疾病调查报告与乳腺癌危险因素分析[D]. 山东大学, 2011.
- [13] 臧梦芳,张咏梅,智英辉,等. 乳腺癌对吡柔比星和表柔比星的药物敏感性及其有效性的对比观察[J]. *中华医学杂志*, 2011,91(20):1388-1392.
- [14] Horiguchi J. Collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitivity test and Ki67 expression in estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancer[J]. *Molecular and Clinical Oncology*, 2013,1(1):93-99.
- [15] Zhai L, Li S, Li X, et al. The nuclear expression of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in invasive primary breast tumors is associated with chemotherapy sensitivity[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2015,211(2): 130-137.
- [16] 张晶晶,范开席. 晚期胃癌的治疗策略[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012,6(18):5571-5573.
- [17] 韩旭,谭志军,姜伟. 胃癌多药耐药相关基因表达与胶滴肿瘤药物敏感的关系[J]. *新医学*, 2011,42(09):568-570.
- [18] Naitoh H, Yamamoto H, Murata S, et al. Stratified phase II trial to establish the usefulness of the collagen gel droplet embedded culture-drug sensitivity test (CD-DST) for advanced gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2014,17(4):630-637.
- [19] 谭志军,姜伟,谷川,等. 胶滴肿瘤药敏试验检测胃癌细胞化疗敏感度[J]. *肿瘤防治研究*, 2011,38(09):1074-1075.
- [20] 张子旭. 吉西他滨双药联合化疗与单药化疗治疗晚期胰腺癌疗效比较的 Meta 分析[D]. 新疆医科大学, 2013.
- [21] 张强. 胸苷酸合成酶基因多态性与胰腺癌化疗敏感性的关系[D]. 北京协和医学院, 2011.
- [22] Shimizu T, Murata S, Mekata E, et al. Clinical potential of an antitumor drug sensitivity test and diffusion-weighted MRI in a patient with a recurrent solid pseudopapillary tumor of the pancreas[J]. *J Gastroenterol*, 2007,42(11):918-922.
- [23] 徐强. 胰腺癌多细胞球样体的化疗敏感性特点及机理初探[D]. 北京协和医学院, 2009.
- [24] 孙芳初. 非小细胞肺癌[EB/OL]. http://baike.baidu.com/link?url=VvXRDdYfsndJ689mJ4uEoWM0oRniqfFl6Gox_hk6lgZRuwBjJvftUZErBya6sPDRtdm7A7hecmi2HKvzSHnp9K, 2015-02-06/2015-04-23.
- [25] Higashiyama M, Oda K, Okami J, et al. Prediction of chemotherapeutic effect on postoperative recurrence by in vitro anticancer drug sensitivity testing in non-small cell lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2010,68(3): 472-477.
- [26] Kawamura M, Gika M, Abiko T, et al. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) using collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST)[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007,59(4): 507-513.
- [27] Higashiyama M, Oda K, Okami J, et al. Prediction of chemotherapeutic effect on postoperative recurrence by in vitro anticancer drug sensitivity testing in non-small cell lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(3): 472-477.
- [28] Higashiyama M, Okami J, Maeda J, et al. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: In vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST) [J]. *J Thorac Dis*, 2012,4(1):40-47.
- [29] Yamamoto Y, Hiasa Y, Hirooka M, et al. Complete response of a patient with advanced primary splenic histiocytic sarcoma by treatment with chemotherapeutic drugs selected using the collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test[J]. *Internal Medicine*, 2012, 51(20):2893-2897.
- [30] Tanioka M, Utani A, Araki E, et al. Evaluation of the chemosensitivity of primary cultured malignant melanoma cells using the collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test[J]. *Exp Ther Med*, 2010, 1(1):65-68.

单细胞转录组测序的方法原理及应用

朱翔 浦春* 武其文

[摘要] 常规的转录组分析方法通常需要 10^3 个细胞,所以无法揭示单个细胞之间基因表达的异质性,也难以对诸如早期胚胎及异质性的组织干细胞和肿瘤干细胞等极少量细胞进行分析,而单细胞转录组测序技术的出现为此提供了有效的研究工具。单细胞转录组测序技术是在单细胞水平对全转录组进行扩增与测序的一项新技术。本文主要就单细胞转录组测序技术的操作方法、应用成果以及进展作一综述。

[关键词] 转录组;单细胞分离;高通量测序;全基因组扩增

Principle and application of single cell transcriptome analysis

ZHU Xiang, PU Chun*, WU Qiwen

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui, China, 241001)

[ABSTRACT] The conventional transcriptome analysis requires minimally 10^3 cells, which makes it hard to identify the heterogeneity of gene expression among individual cells, or difficult to evaluate the specimens with very limited number of cells, such as early embryos, heterogeneous tissue specific stem cells and tumor stem cells. However, the emerging of single cell transcriptome analysis provides an efficient tool to achieve such research purposes. The single cell transcriptome sequencing technique is a new strategy to amplify and sequence the whole transcriptome in single cell. In this article, we review the development, relevant operating procedures, and applications of single cell transcriptome sequencing technique.

[KEY WORDS] Transcriptome; Single cell isolation; High-throughput sequencing; Whole genome amplification

在过去的二三十年里,基因组测序技术快速发展,人类千人基因组计划和癌症基因组计划等大型测序项目相继开展。这些测序所使用的材料均为数百万个细胞的混合样本,虽能够得到为全基因组序列信息,但其结果显示的只是一群细胞中信号的平均值,或只代表其中占优势数量的细胞信息,对单个细胞间的差异却被忽视。对同一组织众多细胞的测序会生成多重数据,不利于追踪细胞病变过程和细胞间状态差异。

对临床上诸如循环肿瘤细胞、早期发育的胚胎细胞等含量稀少的细胞而言,混合细胞群样本

的测序方法也已不再适用。2006年,Zhang在“Nature Biotechnology”上发表文章最先提出单细胞基因组测序技术^[1],即在单个细胞水平对全基因组或转录组进行扩增与测序的一项新技术,这在近年取得突飞猛进的发展。本文就单细胞转录组测序的技术原理及应用进展作一综述。

1 单细胞转录组测序技术

1.1 单细胞转录组测序概述

转录组是指在某一特定阶段,由细胞转录出来的全部RNA,包括mRNA和非编码RNA^[2-3]。转

基金项目:国家自然科学基金(81301512);安徽省自然科学基金(10040606Q68)

作者单位:皖南医学院第一附属医院检验科,安徽,芜湖 241001

*通讯作者:浦春, E-mail: philpcpu@163.com

录组学就是从 RNA 水平研究基因的表达情况,在整体水平上研究细胞中基因转录的情况及转录调控的规律。与基因组不同,转录组学研究包含了时间和空间的限定。同一细胞在不同的生长时期及生长环境下,其基因表达情况是不完全相同的。近几年兴起的单细胞测序技术可以在单细胞水平对全转录组进行扩增与测序,其原理是将分离的单个细胞的微量全转录组 RNA 进行扩增后进行高通量测序。利用该技术能够揭示单个细胞内整体水平的基因表达状态和基因结构信息,准确反映细胞间的异质性,深入理解其基因型和表型之间的相互关系。单细胞基因组技术已经应用到多个领域,如植物细胞、动物细胞(包括人体细胞)和微生物等。但是,单细胞基因组测序技术仍有3个关键技术点:第一,单细胞分离技术;第二,单细胞全基因组扩增技术;第三,高通量测序技术。

1.2 单细胞分离技术

进行单细胞转录组的测序,首先要对单个细胞进行分离分获得到单细胞样品。迄今为止,已经有多种技术方法被用于单细胞的分离,常用的单细胞分离方法主要有连续稀释法(serial dilution)、显微操作法(micromanipulation)、荧光流式分选法、激光捕获显微切割技术以及微流控平台(microfluidic platforms)。这些方法各有利弊,所以要根据具体的情况选择合适的方法进行分离。

1.2.1 连续稀释法

该技术通过将细胞进行一系列的倍比稀释最终使细胞处于单个状态,已成功应用在不同组织的干细胞、前体细胞体外克隆形成分析的研究中^[1,4-5]。此方法操作简便,且不需要特殊的设备,但是依赖于梯度稀释计算,不是直观的单细胞分离,容易出现错误。

1.2.2 显微操作法

显微操作法是指在高倍倒置显微镜下,利用显微操作器(控制显微注射针在视野中移动的机械装置)进行细胞或早期胚胎等操作的一种技术方法。此技术主要应用于目标细胞所在的群体数量较少的样品分离中^[6],能够高效地控制单个细胞的吸取和释放。

1.2.3 荧光流式分选法

荧光流式分选法是一种通过流式细胞仪,根据细胞特异性分子标志或者细胞光散射的特性,

分选单个细胞或者特殊细胞群的技术^[7]。此技术主要的优势在于能够选择特异和非特异的分选,并且在分离单细胞时具有很高的精度和通量^[8]。

1.2.4 激光捕获显微切割技术

激光捕获显微切割技术^[9]是选择性地将目标组织切片或细胞固定在装配有可以激光脉冲激活的热塑膜的涂片上,其中膜包括聚乙烯乙酸乙烯酯膜、聚对苯二甲酸乙二醇酯膜和聚萘二甲酸乙二醇酯膜等,显微镜直视下选择并激光切割目标细胞。应用此技术可以直观地在显微镜下准确、快速地获取单一细胞亚群或者单个细胞,解决了组织中细胞异质性的问题。该技术现已广泛应用于结肠癌^[10]、乳腺癌^[11]、结核病^[12]和丙型肝炎^[13]的研究中。

1.2.5 微流控平台

与其他方法比较,微流控平台相结合单细胞测序技术在降低单细胞测序的噪声以及基因组扩展更加均匀方面具有优势,显示出了良好的应用前景^[14-16]。此外,微流体芯片的微量反应容积还提高了扩增的精确率和反应效率。许多实验室开始设计将微流控平台用于他们的研究对象^[17-18],并且有微流控平台已经商品化^[19]。例如,Fluidigm公司最近推出一款C1单细胞扩增仪器,其原理就是在微流控芯片中进行细胞裂解、反转录与cDNA扩增,再利用转座酶技术构建测序文库^[20-21],显著提升了建库通量。

1.3 单细胞全转录组 cDNA 扩增技术

全基因组扩增是单细胞转录组测序的关键步骤,对于形成足够量的DNA片段用于测序分析起着至关重要的作用。如今已研发出多种扩增方法,例如简并寡核苷酸引物PCR、引物延伸预扩增PCR、连接介导的PCR等。尤其近年发展起来的基于多重置换扩增和多次退火环状循环扩增单细胞测序,他们在全基因组扩增中有着较为广泛的应用。

1.3.1 多重置换扩增技术

多重置换扩增技术最先由Dean等在2002年报道。多重置换扩增技术作为一种不依赖于PCR的全基因组扩增方法,近些年来得到广泛应用。该方法利用Phi29DNA聚合酶和随机六聚体引物对人基因组进行指数扩增,首先随机六碱基寡核苷酸作为引物在多个位点与基因组模板DNA退火,接下来Phi29DNA聚合酶在多个位点同时开始复制,沿着DNA模板合成DNA,同时取代模板的互

补链。被置换的互补链又作为新的模板来进行扩增,形成一个级联分支的放大系统,最终可获得相对高分子质量的DNA。该反应在常温下扩增,避免了高温下DNA降解对扩增产物质量的影响及GC含量不同引发的优势扩增。但是此方法的扩增均匀性不高。多重置换扩增技术可用于单核苷酸多态性以及突变相关的研究。

1.3.2 多次退火环状循环扩增技术

2012年12月,哈佛大学的研究团队在Science上发表介绍多次退火环状循环扩增技术的文章^[22],该技术是目前最先进的全基因组扩增技术。不同于以往的扩增方法,多次退火环状循环扩增能够从一个细胞的基因组中,分离来自单细胞的DNA,然后添加特殊的引物,这些引物可与DNA的随意部分互补,从而使它们能够附着到DNA链上,充当DNA复制起点。这些引物由两个部分构成——一个包含8个核苷酸的粘性部分变化多样,可与DNA结合,再加上一个包含27个核苷酸的共同序列。这一共同序列通过将自身掺入到新拷贝链,从而自身成环,防止了过度拷贝,从而大大地降低了扩增偏倚,提高了基因组覆盖率,可以使单细胞中93%的基因组被测序。另外,多次退火环状循环扩增的灵敏度较高。单细胞、单染色体或0.5 pg的基因组DNA即可进行扩增,扩增的均匀性也显著优于其它技术。该技术可用于那些样本稀少,用常规方法无法进行基因组或转录组分析或者样本高度异质,细胞之间存在重要差异的样本。

1.4 高通量测序技术

自2005年以来,以Roche公司的454技术、Illumina公司的Solexa技术和ABI公司的SOLiD (supported oligo ligation detection) 技术为标志的高通量测序技术相继诞生^[23-24]。高通量测序技术是测序技术发展中的一个里程碑,该技术可以对数百万个DNA分子进行同时测序,从而使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能,因此也称其为深度测序(deep sequencing)或下一代测序技术。Roche公司首先推出了基于焦磷酸测序法的超高通量基因组测序系统。该技术的原理是酶级联化学发光反应:首先将PCR扩增的单链DNA与引物杂交,并与DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶、ATP双磷酸酶、底物荧光素酶和5'-磷酸硫酸腺苷共同孵育。在每一轮测序反应中只加入一种

dNTP,若该dNTP与模板配对,聚合酶就可以将其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸。焦磷酸盐被硫酸化酶转化为ATP,ATP就会促使氧合荧光素的合成并释放可见光。电荷耦合器件检测后通过软件转化为一个峰值,峰值与反应中掺入的核苷酸数目成正比^[24]。随后,Illumina公司和ABI公司也相继推出了Solexa和SOLiD测序技术。正如高通量测序技术在基因组测序中发挥了强大的作用,它也极大地促进了转录组测序的发展。将以上高通量测序技术应用到由RNA逆转录生成的cDNA上,就产生了RNA-Seq技术^[25]。

2 单细胞转录组测序技术的应用

2.1 肿瘤和循环肿瘤细胞

2011年,来自冷泉港实验室的Navin等^[26]运用一种单细胞测序,通过基于拷贝数变异的数据结果分析了乳腺癌的癌细胞种群结构,指出肿瘤的进化可能是间断性的,挑战了传统的肿瘤渐进式演化模型。2012年,深圳华大基因研究院将其自主研发的一种解析单细胞基因组的新方法应用于原发性血小板增多症和肾透明细胞癌的肿瘤内部遗传特征的研究。此方法解决了之前用组织样本测序时无法解决的肿瘤高异质性难题,为从单核苷酸水平深入研究癌症发生、发展机制及其诊断、治疗提供了新的研究思路并开辟了新的研究方向。为了探究肿瘤的演化及遗传特性,研究人员对取自一例典型的JAK2基因阴性原发性血小板增多症病人的90个单细胞进行了全外显子测序^[27],通过分析,研究人员揭示了此原发性血小板增多症在肿瘤发生中遵循单克隆演化模型,并鉴定了一些与原发性血小板增多症的发生、发展相关的突变基因。另外,研究人员为了更好地解析肾癌内部的遗传变异情况,运用此方法对一例肾癌进行了研究^[28]。他们发现此例肾癌并非由常见的两个突变基因VHL和PBRM1导致,说明在病人群体中所鉴定的频发突变可能与肿瘤个体无关,同时也强调了在癌症分析和诊断过程中进行个性化治疗的重要性。

循环肿瘤细胞是一种从肿瘤原发灶中脱落进入患者血液的肿瘤细胞,数量极为稀少,但与肿瘤的转移和复发有着密切关系^[29]。单细胞转录组测序为其转录组分析提供了工具。例如Daniel等^[30]利用Smart-Seq技术对单个循环系统肿瘤细胞进

行分析,利用各个细胞类型中微量的个体细胞找到了多个基因的不同表达,成功检测出前列腺淋巴瘤细胞中的大多数活跃基因,并发现了不同的基因表达模式和生物标记物。

2.2 胚胎和器官发育

来自斯坦福大学的研究团队^[17]从一名40岁男性体内分离出91个精子,并首次对它们进行单细胞测序。研究人员通过比较这名男性的精子基因组序列和他的二倍体细胞基因组序列,观察到单倍体精子细胞染色体中哪些地方发生了重组。研究人员也在每个精子细胞中鉴定出25个~36个新的单核苷酸突变,这些突变在这名男性的二倍体细胞基因组中并不存在。这些随机突变是产生遗传变异的另一种方式,但是如果它们在基因组特定位点发生,那么它们能够产生有害的影响。单细胞转录组测序技术在早期胚胎发育方面也有所应用。例如Yan等^[31]从植入前胚胎和单个人类胚胎干细胞中选取了124个细胞,测定了它们的基因表达,并成功检测到22 687个表达的基因,其中包括8 701个长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)。

2.3 免疫系统

近年来,单细胞转录组测序技术开始被应用于免疫系统的研究当中。免疫细胞对抗原物质的应答反应具有复杂和不均一性的异质性特点,单细胞转录组测序技术有望在此方面揭示丰富的未知信息。最近Shalek等^[32]就对脂多糖诱导的树突状细胞应答反应进行了研究。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分,能够通过激活树突状细胞的Toll样受体引发显著的转录组改变。研究者利用RNA转录5'末端转换机制技术对18个小鼠骨髓来源的树突状细胞进行了cDNA文库的构建,并进行测序分析,他们发现在单细胞水平上,树突状细胞的反应具有高度的异质性^[32]。许多已知的炎症反应基因在部分细胞中被强烈激活,而在其他细胞中仅被低度激活或完全未被激活,并且进一步发现这种反应应答的异质性源于两个方面,一方面是树突状细胞的成熟状态,另一方面则是基因调控网络的随机性特征。

通过上述的实例,我们不难看出单细胞转录组测序技术在疾病研究等领域具有重大的应用价值。相信随着其技术的不断发展和完善,单细胞转录组测序技术可以揭示更多基因表达网络、异质性、随机性表达等相关信息,从而更加完善地揭示更多疾

病的机理,为人类战胜疾病奠定理论基础。

3 展望

近年来,单细胞转录组测序技术已经取得了较为明显的发展,被应用于诸多领域,从最初的哺乳动物早期胚胎发育阶段的转录组分析,到组织器官的发育,再到免疫系统和肿瘤等研究领域都可以见到单细胞转录组测序的身影。它的广泛应用为科研人员研究细胞之间的异质性带来了希望,使人们对各种疾病的发病机理有了更为深刻和具体的认识。

为了使单细胞转录组测序技术能够在未来发挥更大的作用,还应当将其与其他技术相结合,例如细胞成像技术等。另外,单细胞转录组测序技术应当朝着更加高通量的方向发展,在未来实现不单单针对单个样品或细胞的大规模集成化的分析,从而大大节约时间和成本。最后,由于目前的单细胞转录组测序技术的操作过程相对比较繁琐,过多的依赖实验人员的操作技术,使得该技术的效率和稳定性都有所欠缺,为此应当朝着自动化的方向进一步发展,争取实现整个过程的自动操作。

总之,相信随着单细胞转录组测序技术的不断发展,各技术环节的日臻完善,其必将在医疗卫生等领域取得更加丰硕的成果,成为人们治疗疾病、探索生命科学的一项必不可少的技术。

参考文献

- [1] Zhang K, Martiny AC, Church GM, et al. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning [J]. *Nature Biotechnology*, 2006,24(6):680-686.
- [2] Costa V, Angelini C, De FI, et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010,2010:853916.
- [3] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009,10(1):57-63.
- [4] Reizel Y, Chapal-Ilani N, Adar R, et al. Colon stem cell and crypt dynamics exposed by cell lineage reconstruction[J]. *Plos Genetics*, 2011,7(7):e1002192.
- [5] Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, et al. Determining mammosphere-forming potential: application of the limiting dilution analysis [J]. *Journal of Mammary GlandBiology and Neoplasia*, 2012,17(2):119-123.
- [6] Kirkness EF, Grindberg RV, Yee-Greenbaum J, et al. Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyp-

- ing of a human genome[J]. *Genome Res*, 2013, 23(5): 826–832.
- [7] Porer NE, Ermini L, Papaemmanuil E, et al. Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer [J]. *Genome Res*, 2013, 23(12):2115–2125.
- [8] Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(12):1120–1127.
- [9] Virginia Espina, Julia DW, Valerie SC, et al. Laser-capture Microdissection[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2):586–603.
- [10] Enam S, Del VL, Lara C, et al. Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23):7093–7101.
- [11] Charafe-Jauffret E, Moulin JF, Ginestier C, et al. Loss of heterozygosity at microsatellite markers from region p11-21 of chromosome 8 in microdissected breast tumor but not in peritumoral cells[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(5):989–996.
- [12] Selva E, Hofman V, Berto F, et al. The value of polymerase chain reaction detection of mycobacterium tuberculosis in granulomas isolated by laser capture microdissection[J]. *Pathology*, 2004, 36(1):77–81.
- [13] Sansonno D, Lauletta G, Dammacco F. Detection and quantitation of HCV core protein in single hepatocytes by means of laser capture microdissection and enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Viral Hepat*, 2004, 11(1):27–32.
- [14] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics[J]. *Nature*, 2006, 442(7101):368–373.
- [15] Squires TM, Quake SR. Microfluidics: fluid physics at the nanoliter scale[J]. *Rev Mod Phys*, 2005, 77:977–1026.
- [16] Streets AM, Huang Y. Chip in a lab: microfluidics for next generation life science research [J]. *Biomicrofluidics*, 2013, 7(1):11302.
- [17] Wang J, Fan HC, Quake SR, et al. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm[J]. *Cell*, 2012, 150(2): 402–412.
- [18] Streets AM, Zhang X, Cao C, et al. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(19):7048–7053.
- [19] Wu AR, Neff NF, Kalisky T, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1):41–46.
- [20] Wu AR, Neff NF, Kalisky T, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1):41–46.
- [21] Pollen AA, Nowakowski TJ, Shuga J, et al. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(10):1053–1058.
- [22] Zong C, Xie XS, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338(6114):1622–1626.
- [23] 王曦, 汪小我, 王立坤, 等. 新一代高通量RNA测序数据的处理与分析 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(8):834–846.
- [24] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057):376–380.
- [25] Fatih O, Patrice MM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(2):87–98.
- [26] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing[J]. *Nature*, 2011, 472(7341):90–94.
- [27] Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm [J]. *Cell*, 2012, 148(5):873–885.
- [28] Xu X, Hou Y, Yin X, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor[J]. *Cell*, 2012, 148(5):886–895.
- [29] Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63:199–215.
- [30] Daniel R, Luo SJ, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777–782.
- [31] Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(9): 1131–1139.
- [32] Shalek AK, Satija R, Adiconis X, et al. A Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells[J]. *Nature*, 2013, 498(7453): 236–240.

低密度粒细胞在自身免疫性疾病中的病理生理作用

周丽彬¹ 周剑涛^{2*} 丁海峰²

[摘要] 疾病期增强活化异常的中性粒细胞可能导致组织损伤和异常免疫应答。最近报道了一种中性粒细胞亚群,即从系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者的外周血单核细胞部分分离出的低密度粒细胞(low-density granulocytes, LDGs)。LDGs的表型和功能不同于循环中性粒细胞,其具有促炎性和致病性功能,包括内皮细胞毒性和合成干扰素-I的能力。此外,LDGs容易形成中性粒细胞胞外诱捕网(low-density granulocytes, NETs),NETs促进自身抗原外显与器官损伤。阐明LDGs的致病作用,有可能为SLE和其他自身免疫性疾病设计新的治疗策略。

[关键词] 低密度粒细胞;中性粒细胞;自身免疫性疾病;中性粒细胞胞外诱捕网;I型干扰素

Pathophysiological effect of low-density granulocytes in autoimmune diseases

ZHOU Libin¹, ZHOU Jiantao^{2*}, DING Haifeng²

(1. Laboratory Department of Skin Disease Hospital of Luotian County, Luotian, Hubei, China, 438600; 2. Medical and Health College of Huanggang Polytechnic University, Huanggang, Hubei, China, 438000)

[ABSTRACT] Tissue damage and potential aberrant immune responses could be caused by increased activation of abnormal neutrophils during the progression of autoimmune diseases. Recent studies have demonstrated a distinct subset of neutrophils isolated from the fraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the patients with systemic lupus erythematosus (SLE), which has been defined as low-density granulocytes (LDGs). Compared with the circulating neutrophils in healthy individuals, LDGs show distinct phenotype and abnormal functions. They demonstrate proinflammatory activity and pathogenic effects, including injury to endothelial cells and enhanced capability to synthesize type I interferons (IFN-I). Moreover, LDGs facilitate the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) which plays an important role in promoting autoantigen externalization and resulting in organ damage. With elucidation of the pathogenicity of LDGs, novel therapeutic modalities may be designed for the treatment of SLE and other autoimmune diseases in the near future.

[KEY WORDS] Low-density granulocytes; Neutrophil; Autoimmune diseases; Neutrophil extracellular traps; Type I interferon

1986年,Hacbarth等^[1]首先采用Ficoll-Hypaque密度梯度制备技术,从系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)成人患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)制备物中发现“低浮力密度粒细胞”(low buoyant density granulocytes),这种低浮力密度粒细胞与

SLE病情活动性相关。2003年,Bennett等^[2]对SLE小儿患者的PBMCs进行微阵列分析,发现其高度表达中性粒细胞特异性基因,并认为该现象是患者PBMCs部分所存在的未成熟中性粒细胞表达的结果。2008年,Nakou等^[3]分析SLE成人患者骨髓基因微阵列,证实上调粒细胞生成基因与疾病

作者单位:1. 湖北省罗田县皮肤病医院检验科,湖北,罗田 438600

2. 黄冈职业技术学院医药卫生学院,湖北,黄冈 438000

*通讯作者:周剑涛, E-mail:hgwx8@163.com

注:周丽彬和周剑涛为并列第一作者

活动性有关,其中几个上调基因出现在中性粒细胞早期发育阶段。2010年,Denny等^[4]采用负性选择技术从SLE患者PBMCs得到高纯化的低密度中性粒细胞,并将此称之为“低密度粒细胞”(low density granulocytes, LDGs)。本文围绕SLE阐述LDGs的形态学与病理生理特征。

1 从PBMCs中分辨LDGs

研究者最初在SLE成人患者血液中证实LDGs的存在^[1]。目前已知人、鼠和猪的血液中能分离出LDGs^[5]。基于单核细胞和中性粒细胞表达标记物分化抗原簇(cluster of differentiation, CD)14与CD15的差异,采用流式细胞分析技术^[4],可从PBMCs中分辨单核细胞和LDGs。单核细胞为CD14⁺/CD15^{lo}(“lo”表示“低”),而LDGs为CD14^{lo}/CD15⁺。有学者通过CD14/CD15标志物,检测了SLE患者PBMCs中LDGs水平^[4]。65份SLE样本中,12份(19%, 12/65)SLE患者PBMCs的LDGs占PBMCs总数的25%以上,并发现LDGs水平升高的SLE患者伴有皮肤并发症(包括血管炎)和/或滑膜炎。相比之下,其PBMCs谱与健康对照组相当的SLE患者没有观察到这些临床并发症。不仅SLE患者的PBMCs中能分离出CD15⁺中性粒细胞,在创伤^[6]、人类免疫缺陷病毒感染^[7]、内脏型利什曼虫病^[8]、类风湿关节炎^[9]、牛皮癣^[10]、癌症^[11]和正常妊娠期^[12]的PBMCs中也能分离出CD15⁺中性粒细胞。

除了CD14/CD15标志物,还可以基于单核细胞表达主要组织相容性复合体II(major histocompatibility complex II, MHC II)和辅刺激分子CD86,而不表达膜肽酶CD10进一步分辨出LDGs。相比之下,LDGs表达CD10,但缺乏MHC II和CD86。分析CD86/CD16显示几种亚群。大多数健康对照单核细胞显示CD86⁺CD16⁻静止表型,SLE单核细胞显示CD86⁺CD16⁺激活表型,而LDGs显示CD16^{hi}/CD86⁻(“hi”表示“高”)^[4]。

2 LDGs的形态学特征

独特的多形核与粒细胞颗粒是中性粒细胞的2个典型形态学特征。中性粒细胞在发育成熟期获得细胞颗粒物,存在于细胞颗粒内的各种蛋白质合成时限不同,根据细胞分化的特定阶段形成具有不

同肽类的不同细胞颗粒。在原始粒细胞发育至核分叶阶段,中性粒细胞的细胞颗粒异质性增加。正常情况下,末端分化的中性粒细胞才从骨髓释放。

在Ficoll密度梯度分离程序中,成熟中性粒细胞与红细胞位于同一沉降区,而LDGs则位于PBMCs沉降区。采用鉴别染色法观察LDGs的细胞核形态^[2],显示出分叶状、带状或者中幼粒细胞样细胞特征。使用透射电子显微镜观察纯化的SLE-LDG超微结构特征^[5],结果显示LDGs相对于正常密度中性粒细胞分叶核更少,清晰地显示出稠密的异染色质与去致密的常染色质,在其细胞质中可识别出各种细胞颗粒。超微结构分析,细胞核形态表现为更大程度的未成熟状态,如带状/幼稚形。这些观察证明:(1)LDGs并不是已释放出颗粒的激活态中性粒细胞的亚群;(2)LDGs的细胞质未经历液泡化或者细胞凋亡。LDGs的发育状态及其形成机制目前尚不十分清楚。

3 LDGs的病理生理作用

3.1 LDGs的促炎作用

中性粒细胞作为第一线免疫细胞,除了吞噬作用和脱粒作用之外,还具有另一种抗微生物机制,即释放细胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)用以捕获与杀灭入侵的病原体。NETs是中性粒细胞DNA与组蛋白、细胞质内颗粒(源性)蛋白质形成的胞外网络结构,形成NETs的过程是一种细胞死亡通路^[13]。中性粒细胞释放NETs的死亡通路被描述为“NETosis”。Villanueva报道^[14],SLE患者的致敏中性粒细胞形成NETs,特别是LDGs形成NETs的能力显著增强。在感染部位募集的中性粒细胞通过脱粒作用和/或NETosis释放出蛋白酶,以及合成促炎细胞因子和类花生酸类。中性粒细胞在粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子作用下有能力合成各种炎症因子mRNAs,包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)mRNA。LDGs分泌TNF- α 的水平高于正常密度中性粒细胞^[4]。在未激活状态,LDGs、SLE正常密度中性粒细胞(SLE组)与正常密度中性粒细胞对照组(Control组)的TNF- α 实验测定值[平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI) \pm 标准平均误差(standard error of mean, SEM)]分别为 70 ± 25 、 39.3 ± 80 和 38 ± 0.1 。在激活状态,LDGs、SLE组与

Control组的 TNF- α 实验测定值(MFI \pm SEM)分别为 2688 \pm 960、62.6 \pm 18 和 50 \pm 0.2。由此可知,LDGs 有可能代表 SLE 疾病状态 TNF- α 的来源之一。

LDGs 合成白介素(interleukin, IL)-8 和 IL-6 的水平高于自体狼疮中性粒细胞和对照中性粒细胞^[4],例如,在未激活状态,LDGs、SLE 组与 Control 组的 IL-8 实验测定值(MFI \pm SEM)分别为 33 \pm 13.2、29 \pm 9.2 和 27 \pm 11.7。在激活状态,LDGs、SLE 组与 Control 组的 IL-8 实验测定值(MFI \pm SEM)分别为 42 \pm 10.9、40 \pm 3.46 和 34 \pm 7。这些炎性细胞因子增高可能导致 SLE 炎症反应和组织损伤增强。

I 型干扰素(type I interferons, IFN-I)是有效抗病毒和抗细胞增殖的细胞因子。持续产生 IFN-I 是 SLE 患者的特征之一^[15]。SLE 患者长期固有地激活类浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)分泌 IFN-I 是引发自身免疫的关键早期事件^[16]。IFN-I 可以促进成熟中性粒细胞产生 NETs,这可能会导致一个自我实现的循环,即细胞因子激活粒细胞 NETosis 而死亡,反过来又导致 pDCs 合成更多的 IFN-I。此外,LDGs 形成 NETs 有能力在狼疮巨噬细胞激活 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎性体,增加 IL-1 β 和 IL-18 产生,依次进一步促进炎症反应和 NETosis,形成潜在的恶性炎症循环^[17]。

3.2 LDGs 合成 IFN-I 与内皮细胞损伤

研究表明^[18],IFN-I 在 SLE 的内皮细胞损伤,进而导致动脉粥样硬化形成的病理过程中发挥重要作用。SLE 患者的内皮细胞损伤和修复严重失衡,其特点是内皮细胞凋亡加快,以及血管生成的关键细胞,如骨髓内皮祖细胞(bone marrow-derived endothelial progenitor cells, EPCs)与髓循环血管生成细胞(myeloid circulating angiogenic cells, CACs)的表型和功能异常。当去除狼疮 EPCs/CACs 中 IFN-I 信号传导,可导致正常表型恢复,表明 IFN-I 对降低血管修复功能具有重要作用。研究报道^[19],使用细胞形成检测法计数 EPCs, SLE 患者的 EPC 细胞形成单位较对照组显著降低,对照组 EPC 细胞形成单位中位数为 28.5/mL 外周血(四分位距 14.7~47.3),SLE 患者为 5.7/mL 外周血(四分位距 1.9~12.8),而对于 IFN-I 水平升高的 SLE 患者 EPCs 减少更加显著,进一步证实 IFN-I 水平升高引起 EPCs 减少与 SLE 患者的内

皮功能障碍和心血管风险增加相关。Denny 等^[4]指出,培养的 LDGs 合成足够量 IFN-I,干扰内皮祖细胞分化为成熟内皮细胞的能力,这一现象与 SLE 患者过早地形成动脉粥样硬化有关。

LDGs 对内皮细胞的细胞毒性效应似乎与 LDGs 形成 NETs 的能力有关,因为当有核酸酶存在,分解 NETs 时,血管细胞死亡现象消失^[14]。更高数量的 LDGs 可能与狼疮并发症有关,如皮肤病和血管炎^[4]。此外,在伴有皮肤病和肾脏并发症的 SLE 患者的皮肤和肾脏中,观察到诱捕网样中性粒细胞的浸润^[14]。然而,这些细胞是否代表 LDGs 或正常密度中性粒细胞尚不清楚,目前,在组织水平尚没有可以区分这两类中性粒细胞的细胞标记物。

4 展望

LDGs 代表激活中性粒细胞的一种亚群,具有与成熟的正常密度的中性粒细胞不同的表型和功能。流式细胞术和电镜技术已证明 LDGs 存在于 SLE 患者外周血中,并与其病理过程相关。未来的研究应探讨其他的自身免疫性疾病是否也存在 LDGs,以及 LDGs 是否与这些疾病和器官损伤的发生有关。进一步系统地研究评估 LDGs 的起源、分化成熟状态及其病理生理作用,有可能为 SLE 和其他自身免疫性疾病设计新的治疗策略。

参考文献

- [1] Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever [J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29(11):1334-1342.
- [2] Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(6):711-723.
- [3] Nakou M, Knowlton N, Frank MB, et al. Gene expression in systemic lupus erythematosus: bone marrow analysis differentiates active from inactive disease and reveals apoptosis and granulopoiesis signatures [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(11):3541-3549.
- [4] Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs [J]. *J Immunol*, 2010, 184(6):3284-3297.
- [5] Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulo

- cytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity[J]. *Semin Immunopathol*, 2013,35(4):455-463.
- [6] Bryk JA, Popovic PJ, Zenati MS, et al. Nature of myeloid cells expressing arginase 1 in peripheral blood after trauma[J]. *J Trauma*, 2010,68(4):843-852.
- [7] Cloke T, Munder M, Taylor G, et al. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection [J]. *Plos One*, 2012,7(11):e48939.
- [8] Abebe T, Takele Y, Weldegebreal T, et al. Arginase activity-a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia[J]. *Plos Negl Trop Dis*, 2013,7(3):e2134.
- [9] Hoffmann MH, Bruns H, Backdahl L, et al. The cathelicidins LL-37 and rCRAMP are associated with pathogenic events of arthritis in humans and rats[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013,72(7):1239-1248.
- [10] Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis[J]. *J Immunol*, 2011,187(1):490-500.
- [11] Raber P, Ochoa AC, Rodríguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: Mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives[J]. *Immunol Invest*, 2012,41(6-7):614-634.
- [12] Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies[J]. *Plos One*, 2014,9(2):e85696.
- [13] 周剑涛,姚振国,丁海峰. 游离中性粒细胞胞外诱捕网DNA的研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013,5(2):134-138.
- [14] Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol*, 2011,187(1):538-552.
- [15] Eshleman EM, Lenz LL. Type I interferons in bacterial infections: taming of myeloid cells and possible implications for autoimmunity[J]. *Front Immunol*, 2014,5:431.
- [16] Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus[J]. *Sci Transl Med*, 2011,3(73):73ra19.
- [17] Kahlenberg JM, Carmona-Rivera C, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages[J]. *J Immunol*, 2013,190(3):1217-1226.
- [18] Kaplan MJ, Salmon JE. How does IFN- α insult the vasculature Let me count the ways [J]. *Arthritis Rheum*, 2011,63(2):334-336.
- [19] Lee P, Li Y, Richards H, et al. Type I interferon as a novel risk factor for endothelial progenitor cell depletion and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2007,56(11):3759-3769.

(上接第45页)

- [4] NitishN, Anna G, Kai D, et al. Toward developing a once-a-month pill: a double-blind, randomized, controlled trial of the effect of three single doses of mifepristone given at midcycle on the pattern of menstrual bleeding [J]. *Fertility and Sterility*, 2006,86(04):819-824.
- [5] 刘爱华,李春晓. 3种方法治疗围绝经期功能失调性子宫出血的临床分析[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011,20(20):2535-2536.
- [6] 曾麟,杨昱. 米非司酮与安宫黄体酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的临床分析[J]. *赣南医学院学报*, 2009,29(01):60-62.
- [7] 申秀荣. 小剂量米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血36例临床分析[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2005,21(05):311-312.
- [8] 黄莉. 米非司酮和去氧孕烯炔雌醇治疗围绝经期功能失调性子宫出血分析[J]. *中国新药与临床杂志*, 2007,26(12):888-890.
- [9] Hatim AM, Akram E, Jane MT, et al. Calretinin: immunohistochemical marker for the normal functional endometrial stroma and alterations of the immunoreactivity in dysfunctional uterine bleeding [J]. *Pathology-Research and Practice*, 2007,203(02):79-83.
- [10] 唐双玲,马赞,崔毅,等. 米非司酮与妈富隆治疗围绝经期功能失调性子宫出血的临床观察[J]. *中国实用医刊*, 2010,12(0):845-846.
- [11] 官帅花. 米非司酮配伍甲基睾丸素治疗围绝经期功能失调性子宫出血临床观察[J]. *临床和实验医学杂志*, 2009,8(10):113-114.
- [12] 郑蔓嘉. 米非司酮治疗围绝经期功能失调性子宫出血的剂量与疗效[J]. *广东医学*, 2011,32(14):1874-1876.

体外诊断试剂临床试验方案的设计要求

王嘉明 雷孝锋 李尔华 高旭年*

随着体外诊断技术的不断发展,越来越多的新技术被应用于体外诊断试剂。新型体外诊断试剂若要面向市场,得到临床应用,均要通过临床试验(少数特殊类型可以免临床),只有临床试验验证合格的试剂盒,才能最终被食品药品监督管理局批准注册,走向市场。

要开展临床试验,设计临床试验方案是必要的,合格的临床试验方案需结合国家食品药品监督管理局(下称“国家局”)最新发布的《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》(下称《指导原则》)的体外诊断试剂临床试验方案的设计要求以及结合产品特点、临床预期用途来制定。本文根据《指导原则》的要求再结合一般体外诊断试剂的特点,总结出临床试验方案常采用的设计要求。

1 临床试验方案内容

1.1 伦理方面

法规指出体外诊断试剂的临床试验(包括与已上市产品进行的比较研究试验)是指在相应的临床环境中,对体外诊断试剂的临床性能进行的系统性研究。也即方案要以试剂盒临床性能评估考核为主,检测结果不对病人发布,且不作为临床诊治依据为宗旨设计。

方案中应提及:临床试验必须符合赫尔辛基宣言的伦理学准则,必须获得临床试验机构伦理委员会的同意。研究者应考虑临床试验用样本,如血液、羊水、胸水、腹水、组织液、胸积液、组织切片、骨髓等的获得或试验结果对受试者的风险性,应提交伦理委员会的审查意见及受试者的知情同意书。对于例外情况,如客观上不可能获得受试者

的知情同意或该临床试验对受试者几乎没有风险,可经伦理委员会审查和批准后免于受试者的知情同意。受试者的权益、安全和健康必须高于科学和社会利益。为受试者保密,尊重个人隐私。防止受试者因检测结果而受到歧视或伤害。临床前研究结果支持进行临床试验。是否符合伦理要求是决定临床试验能否开展的关键。

1.2 试验要求方面

法规要求:申请人应在符合相关资质要求的临床单位开展,在满足临床试验最低样本量要求的前提下,根据产品临床预期用途、相关疾病的流行率和统计学要求,制定能够证明其临床性能的临床试验方案。所以设计方案时必须考虑这几点:符合要求的临床单位、满足临床试验最低样本量、临床预期用途、相关疾病的流行率和统计学要求。

1.2.1 符合要求的临床单位

应根据产品特点及其预期用途,综合不同地区人种、流行病学背景、病原微生物的特性等因素选择获得国家局资质认可的临床试验机构。就是要求要在有符合试剂盒检测用的样本的地地区的医院开展。例如检测登革热病毒的试剂盒,样本要感染登革热患者的血液样本,就应该选择登革热高发地区的医院。临床试验机构资质可在国家局网站数据查询里查到。

1.2.2 满足临床试验最低样本量

要求样本量要满足能正常开展临床试验,样本量不能太少。各临床试验机构样本量和样本分布应相对均衡。例如:按《指导原则》要求,属第三类的产品,临床研究的总样本数至少为1 000例。其中阳性病例数视各临床单位实际收治患者情况

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

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

*通讯作者:高旭年, E-mail:gaoxunian@126.com

确定,但应满足统计学要求。

1.2.3 临床预期用途

应该涵盖试剂盒的检测方法、检测物,说明试剂盒的用途。例如:试剂盒采用XX方法,可对XX标本中XX进行检测。

1.2.4 相关疾病的流行率

可在临床试验方案的背景里提及,每一份方案都应该有一个临床试验背景来描述相关疾病、目前主流检测方法等等,相关疾病的流行率可简单叙述。

1.2.5 统计学要求

国家局有发布相关试剂技术审评指导原则的,可以根据指导原则要求来制定统计学内容,没有特定统计要求的一般可以统计Kappa值、符合率、相关系数、线性等常规的统计。合理的统计学设计是十分重要的,统计分析是证明临床性能的有力数据支持。

除以上几点外,设计方案还应考虑临床试验采用的操作方法、试验样本入选要求以及试验持续时间等。例如:试验采用盲法、对比试验设计,采用对照试剂和考核试剂同时进行盲法检测,试验结束后揭盲,对不符标本进行复检;根据对照试剂检测结果将受试标本分为病例组(阳性组)和对照组(阴性组)等;试验样本主要选取何种病例作为入选病例、样本类型为何种、临床试验持续时间几个月等。

2 临床试验方案具体格式

2.1 试验背景

试验背景可以涵盖被测物质的介绍,通过背景可以了解被测物质的基本情况,还可以介绍目前检测用的主要方法,这样可以体现试剂盒使用的方法处于怎样的水平。尤其对于申报创新产品,由于运用了新的技术方法,更应突出产品具有显著的临床应用价值,例如更便捷、更灵敏、更省时、成本更低等等。此外,还可以提及产品的应用前景等。

2.2 预期用途

可以算作是对背景的总结,可用简短的一段话来概括。

2.3 试验的方法、内容和目的

例如临床试验采用XX方法的试验设计。将样

本编码,采用对照试剂和考核试剂同时进行检测,对不符标本进行复检。根据对照试剂检测结果将标本分为阳性组和阴性组,将考核试剂检测结果与其进行比较分析,用以评价考核试剂的临床应用性能,并对有效性及安全性提供重要的依据。

2.4 整个试验过程

介绍整个试验流程,例如检测指标→试验对象入选要求→研究样本→数量及分组方法→样本跟踪研究→选取的对照试剂→质控→结果的统计分析方法。

2.5 试剂盒性能评价和统计分析

要用数据来支持试剂盒的性能,包括普遍采用的包括灵敏度、特异度、准确度、Kappa值、相关系数、线性回归分析、可靠性、效益评价等。

2.5.1 试剂盒性能评价

2.5.1.1 灵敏度 又称阳性符合率,取值范围在0%~100%之间,其值越接近100%,真实性愈大。

2.5.1.2 特异度 又称阴性符合率,取值范围在0%~100%之间,其值越接近100%,真实性愈大。

2.5.1.3 准确度 又称总符合率,取值范围在0%~100%之间,其值越接近100%,与对照方法符合程度越高。

2.5.1.4 Kappa值 用于2种试剂盒测值一致性的评价。又称吻合度系数,Kappa值在0~+1间判断一致性才有意义。Kappa值越大,表示一致性越好,吻合度越高。一般认为Kappa值 ≥ 0.75 ,说明已经取得相当满意的一致程度。若Kappa值 < 0.4 ,则说明一致程度不够理想。

2.5.1.5 相关系数 r 代表2种试剂盒测定结果的相关程度,越接近于1表明考核试剂盒与对照试剂盒检测结果的相关程度越好。

2.5.1.6 线性回归分析 评价2种试剂盒测定结果的线性程度。考核试剂盒的结果与对照试剂盒结果所呈现的图越接近于一条直线,表明考核试剂与对照试剂测值所呈的线性越好。

2.5.1.7 可靠性 即检测阴阳性质控,结果应符合要求。

2.5.1.8 效益评价 就是对整个试验的操作、结果分析、质量控制等过程做的综合评价,表明试剂盒的临床应用价值。

2.5.2 统计分析

应结合试剂盒性能评价中的评价指标进行统

计分析,用于支持试剂盒性能评价。统计分析灵敏度、特异度、准确度、Kappa值、相关系数、线性回归等指标见表1。

表1 临床试验结果的统计分析
Table 1 Statistical analysis of clinical trial results

试验	对照试剂		合计	
	阳性	阴性		
考核试剂	阳性	A	B	A+B
	阴性	C	D	C+D
总数	A+C	B+D	A+B+C+D	

用下列公式计算:

$$\text{灵敏度} = A / (A + C) \times 100\%$$

$$\text{特异度} = D / (B + D) \times 100\%$$

$$\text{准确度} = (A + D) / (A + B + C + D) \times 100\%$$

Kappa值、相关系数、线性回归等通过

SPSS 15.0 统计软件进行分析计算。

只有当这些评价指标的结果符合相关要求时,才能表明试剂盒的性能评价符合临床应用需求,达到了临床试验的目的。

3 结论

综上所述,符合要求的临床试验方案,应当包括充分的背景介绍、试验机构和样本的选择、详实的试验流程、充分的性能评价、合理的统计分析等。试验方案设计的好坏,直接关系到整个产品临床评价的质量及注册申请的审评审批进度,继而影响到试剂能否快速有效地推向市场。所以,临床试验方案设计的合理、规范、全面,才能充分的验证试剂的临床性能,提升可信度,使临床试验机构和审批部门更认可整个临床试验过程的质量,还可以指导整个临床试验过程有序、快速、准确地开展下去,对推动产品更快的走向市场起到极其重要的作用。

(上接第41页)

量同时检测则能提高IM诊断的敏感性,可达88.79%。对116例IM患儿进行3种方法两两联合检测,可提高敏感性和诊断符合率,但特异性稍有下降。因此,EBV-DNA载量、抗CA-IgM和异型淋巴细胞计数两两联合检测可提高儿童IM的诊断率,对减少临床的漏诊和误诊有重要意义。

参考文献

- [1] 王云峰. EB病毒和巨细胞病毒双重感染的传染性单核细胞增多症的临床特征[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(4):299-301.
- [2] 江载芳, 申昆玲, 沈颖, 等. 诸福棠实用儿科学第8版[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015, 916-919.
- [3] Cohen JL. Epstein-Barr virus infection[J]. N Engl J Med, 2006, 343(7):481-492.
- [4] 易庆军, 刘文君. 儿童传染性单核细胞增多症的诊治进展[J]. 西南军医, 2011, 13(4):698-701.
- [5] 常琴, 赵雪晴, 吕奎林, 等. 263例儿童传染性单核细胞增多症的临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(14):1479-1484.
- [6] 郭勇, 向尹, 熊学芳, 等. EB病毒抗体检测对儿童传染性单核细胞增多症的诊断价值[J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(5):103-104.
- [7] 郭霞, 李强, 赵亚宁, 等. 不同年龄组传染性单核细胞增多症患儿临床特点分析[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(11):870-871.
- [8] 严海燕, 罗晓红, 陈娟, 等. EB病毒抗体和DNA联合检测可提高儿童传染性单核细胞增多症的诊断灵敏度[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 6(23):540-542.
- [9] 陈锐. 传染性单核细胞增多症临床路径(2010年版)[J]. 中国社区医师, 2011, 27(5):13.
- [10] Sakamoto Y, Mariya Y, Kubo K. Quantification of Epstein-Barr virus DNA is helpful for evaluation of chronic active Epstein-Barr virus infection [J]. Tohoku J Exp Med, 2012, 227(4):307-311.
- [11] Pitetti RD, Lacs S, Wadowsky RM, et al. Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children[J]. Pediatr Infect Dis I, 2003, 22(8):736-739.

广东省医学分子诊断重点实验室

广东省医学分子诊断重点实验室位于广东省东莞市大岭山镇新城路松山湖路段，以广东医学院东莞校区科研中心为主体，是广东省唯一以医学分子诊断为主要研究方向的省级重点实验室，2010年经广东省科技厅批准立项，支撑学科为临床检验诊断学、肿瘤学、生物化学与分子生物学，其中临床检验诊断学和肿瘤学学科是硕士、博士学位授权学科，生物化学与分子生物学学科是硕士学位授权学科及省级重点特色学科。实验室有科研人员64名，其中具有正高级职称者16名，副高级职称者18名；博士学位者44名；博士生导师4名，硕士生导师27名。实验室功能齐全，设有细胞癌变机制与肿瘤分子诊断研究室、衰老与老年性疾病机制与分子诊断研究室、慢性非传染性疾病机制与分子诊断研究室和免疫与感染性疾病机制与分子诊断研究室4个研究室和分子生物学诊断技术、分子免疫学诊断技术和分子病理学诊断技术3个技术平台，总面积约2500平方米，拥有莱卡激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、测序仪、核酸电泳和蛋白质印迹系统、核酸蛋白质含量测定仪、高速冷冻离心机、荧光显微镜、双色红外激光成像系统、多功能酶标仪、凝胶自动成像仪、杂交炉、真空转移系统、半干印迹系统、台式制冷型摇床、多功能细胞融合仪、研究级正立式型金相显微镜、荧光报告系统、冰冻切片机、组织阵列仪、实时荧光定量PCR仪等仪器，仪器设备总值约1500万元。

该实验室主要研究方向是紧密围绕国家和广东重点鼓励发展战略性新兴产业之一的医学分子诊断，以转化医学为核心，医学分子诊断为主要研究内容，研究衰老与老年性疾病、细胞癌变、慢性非传染性疾病、免疫与感染性疾病的分子机制，确定新的分子诊断靶点和建立新的诊断方法，属于具有前瞻性的产学研领域。2010年以来获得科研项目72项，总科研经费2264.27万元（未含学校配套经费）。其中承担国家重点基础研究发展计划（973计划）项目子课题2项，国家自然科学基金项目30项和省部级科研项目15项。2014年以本重点实验室为牵头单位，申报的广东省医学分子诊断协同创新发展中心获省级立项（培育）。获广东省科学技术奖二等奖和市级科技进步一等奖等2项。获授权国家发明专利7项。2010年以来共发表科研论文260余篇，其中SCI收录文章120余篇。主编及参编专著20余部。近3年共培养72名硕士毕业生，在读全日制硕士研究生90名；联合培养博士研究生6名，独立招收博士研究生3名。

学术带头人刘新光是广东医学院医学检验学院院长、实验室主任兼衰老与老年性疾病机制与分子诊断研究室主任，并担任中国老年学会衰老与抗衰老科学委员会副主任委员、广东省生物化学与分子生物学学会常务理事、广东省医学会检验分会学常委等学术职务，自1994年一直从事蛋白激酶CK2的分子生物学与生化药理学研究，目前研究方向为衰老与老年性疾病的分子机制与分子诊断研究。



省重点实验室建设专家指导工作



广东省医学分子诊断重点实验室学术委员会合影

→ 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