



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

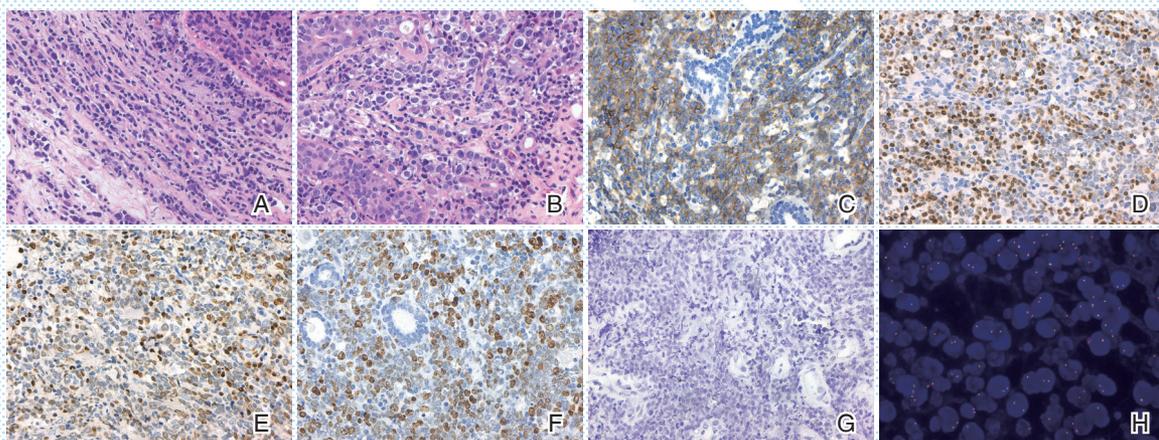
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2018年9月 第10卷 第5期 总第57期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 10 Number 5 September 2018



A: 肿瘤细胞浸润乳腺组织, 略呈单行列表样排列, 右上可见残存乳腺导管(HE, 400×); B: 肿瘤细胞呈中等-大的中心母或免疫母细胞样形态, 其间可见散在小淋巴细胞(HE, 400×); C: CD20 肿瘤细胞弥漫强阳性, 残存乳腺导管上皮细胞阴性[免疫组化染色 (immunohistochemical staining, IHC), 400×]; D: BCL2 肿瘤细胞阳性(IHC, 400×); E: C-MYC 肿瘤细胞阳性(IHC, 400×); F: Ki-67 肿瘤细胞阳性(IHC, 400×); G: 肿瘤细胞 EBER 原位杂交阴性(光镜镜检, 400×); H: 肿瘤细胞 MYC 荧光原位杂交阴性(荧光显微镜镜检, 1000×)。

图(P298) 原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤的病理学染色结果

Figure(P298) Pathological staining results of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692099



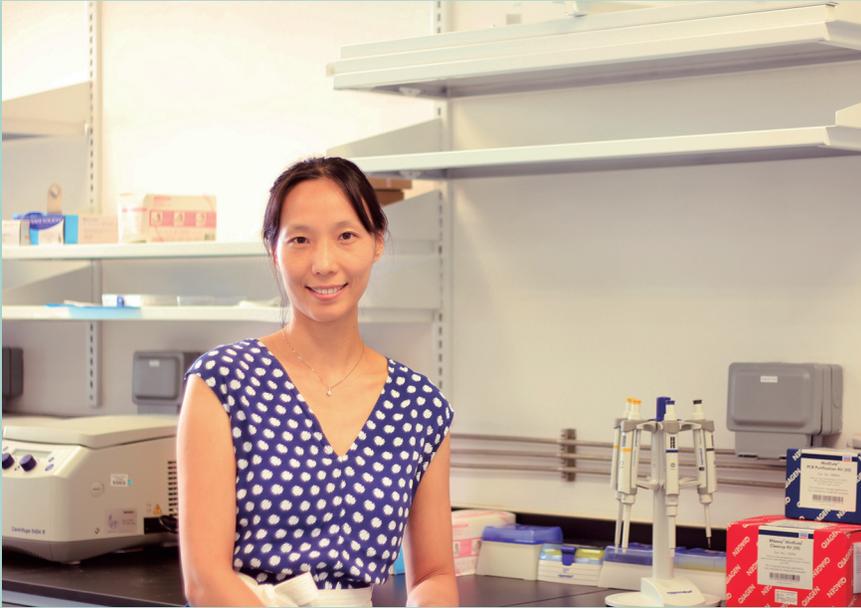
分子诊断与治疗杂志

二〇一八年九月

第十卷 第五期

中山大学

贾艳伟



1974年3月出生，先后于湖南大学获物理学学士(1996年)和硕士学位(2002年)，2006年于新加坡国立大学(National University of Singapore)获物理学博士学位。后赴美国布兰

迪斯大学(Brandeis University)进行博士后研究，自2006年至2012年先后任博士后研究员，研究助理与研究科学家，2013加入澳门大学任博士后研究员。

贾艳伟教授自2016年至今任澳门大学模拟与混合信号超大规模集成电路国家重点实验室助理教授，博士生导师，现任澳门大学模拟与混合信号超大规模集成电路国家重点实验室微流控实验室主任。为国际知名杂志“Lab on a Chip”，“Scientific Reports”，“Microfluidics and Nanofluidics”和“Crystal Growth and Design”等杂志特邀审稿专家。

贾艳伟教授长期研究微流控技术创新及其在生物化学中的应用，包括管道微流控与数字微流控，研究范围涵盖物理、化学、生物、工程等多个交叉学科，在DNA检测、蛋白质结晶、细胞培养、药物筛选和精准医疗方面形成了一定的特色和优势。承担及完成省部级及校级研究课题6项，项目基金总额近千万元。曾获新加坡教育部颁发杰出导师奖以及国际生物结晶组织颁发发明创造奖。获批美国、中国以及新加坡专利10余项，部分专利已授权公司进行产品生产。发表SCI论文20余篇，包括“Journal of the American Chemical Society”，“Nucleic Acids Research”，“Lab on a Chip”，“Fertility and Sterility”，“Applied Physics Letters”，“Biophysical Journal”和“Journal of Physical Chemistry B”等国际著名期刊，工作被“Science”和“Lab on a Chip”重点报道，并被“X-MOL”平台收录，以及国内外媒体新闻报道。目前有博士后、在读博士及硕士研究生近10名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2018年9月 第10卷 第5期 总第57期 Bimonthly Volume 10 Number 5 September 2018

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	来茂德 申子瑜
主编	李明
编辑部主任	郝芬
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 叶萍萍
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发售
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2018年9月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>HAO Fen</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2018.9.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2018年9月 第10卷 第5期

目次

述评

微流控技术在临床检测中的应用 沈韧 万谅 贾艳伟(289)

论著

原发性乳腺弥漫大B细胞淋巴瘤临床和病理特征 汪园园 杨喆 邓元 等(295)

子宫内膜癌患者肿瘤组织和血清中SOX1和VIM启动子的甲基化检测及其临床意义
..... 舒新红 范红莉 李小燕(301)

游离 β 人绒毛膜促性腺激素定量测定化学发光免疫分析法的建立与性能评价
..... 伍华颖 王小艳 李志雄 等(307)

2017年度人EGFR基因突变检测试剂盒抽验质量分析 孙楠 于婷 黄杰 等(315)

A组轮状病毒极速实时荧光RT-PCR检测方法的建立及临床评价
..... 陈峰 唐晓宇 仇保丰 等(320)

C-反应蛋白、血清淀粉酶A蛋白及中性粒细胞表面抗原CD64对新生儿感染性疾病的
早期诊断价值 吴玉芹 奎莉越 赵晓芬 等(327)

耐碳青霉烯类雷氏普罗威登斯菌耐药机制研究 贾琴妹 孙乐 满宝华(332)

2014-2017年玉林市手足口病监测结果分析 谭烈明 邓艺燕(337)

拉米夫定对乙肝合并肺结核患者免疫功能及肝功能的影响 韩美玉(342)

老年重症肺炎患者血清hs-CRP水平变化及临床意义 孙春荣 黄琳娜 崔晓阳 等(347)

血清LDL与2型糖尿病周围神经病变的相关性研究 黄娟 胡维 熊丹(352)

综述

细胞外囊泡与红细胞生成及相关制品的研究进展 孙士鹏 安成 刘贵建 等(356)

专家风采

贾艳伟 (封二)

实验室巡礼

澳门大学AMSV微流控实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 5 September 2018

CONTENTS

COMMENTS

Applications of microfluidic technology in clinical diagnosis

SHEN Ren, WAN Liang, JIA Yanwei (289)

ORIGINAL ARTICLES

The clinical and pathological characteristics of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

WANG Yuanyuan, YANG Zhe, DENG Yuan, CHANG Hongyun, LI Xiaofeng, ZHANG Guanjin, LIU Xi (295)

Detection of methylation of SOX1 and VIM promoters in tumor tissues and serum from patients with endometrial carcinoma and its clinical significance

SHU Xinhong, FAN Hongli, LI Xiaoyan (301)

Quantitative determination of free β human chorionic gonadotropin: establishment and performance evaluation of chemiluminescence immunoassay

WU Huaying, WANG Xiaoyan, LI Zhixiong, DONG Zhining, WU Yingsong, XU Weiwu (307)

Quality analysis of human *EGFR* gene mutation detection kits in 2017

SUN Nan, YU Ting, HUANG Jie, QU Shoufang (315)

Establishment and clinical evaluation of a rapid real-time RT-PCR for detection of rotavirus A

Chen Feng, Tang Xiaoyu, Qiu Baofeng, Li Linzhong, Yan Hui (320)

The value of C- reactive protein, serum amylase A protein and neutrophil surface antigen CD64 in the early diagnosis of neonatal infectious diseases

WU Yuqin, KUI Liyue, ZHAO Xiaofen, LI Yangfang, CUI Shan, DU Kun (327)

Study on the drug resistance mechanism of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri*

JIA Qinmei, SUN Le, MAN Baohua (332)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 5 September 2018

CONTENTS

Analysis of the surveillance results of hand, foot and mouth disease in Yulin City in 2014-2017

TAN Lieming, DENG Yiyun (337)

Effect of lamivudine on immune function and liver function in patients with hepatitis B complicated with pulmonary tuberculosis

HAN Meiyu (342)

Changes of serum hs-CRP level in elderly patients with severe pneumonia and its clinical significance

SUN Chunrong, HUANG Linna, CUI Xiaoyang, YANG Ji (347)

Correlation between serum LDL and peripheral neuropathy in type 2 diabetes

HUANG Juan, HU Wei, XIONG Dan (352)

REVIEWS

Advances in research on extracellular vesicles and erythropoiesis and related products

SUN Shipeng, AN Cheng, LIU Guijian, WU Zhikui (356)

微流控技术在临床检测中的应用

沈韧 万谅 贾艳伟*

[摘要] 微流控技术是近二三十年来飞速发展的一种对微小量级的液体进行操控的技术。通过压力装置、机械装置、电路控制系统、甚至是光波、声波等多种装置可以驱动微升到皮升量级的连续液体或者离散液滴进行移动、融合、分裂等动作。应用于生物医学领域,微流控技术可以节省样本和试剂用量,减少反应时间,缩小仪器体积,并提高实验的自动化程度,具有将一系列生化反应集成到一张微小的“芯片实验室”上的潜力。本文概述了微流控技术的基本原理以及微流控芯片在核酸检测、免疫分析、细胞分析等领域的应用,以展示该技术在临床检测领域的应用前景及挑战。

[关键词] 微流控; 临床检测; 芯片实验室

Applications of microfluidic technology in clinical diagnosis

SHEN Ren, WAN Liang, JIA Yanwei*

(State Key Laboratory of Analog and Mixed Signal VLSI, University of Macau, Macau, China, 999078)

[ABSTRACT] Microfluidics is a technology which has been rapidly developed in the past two or three decades to control tiny amounts of liquid. A large number of actuation forces can be used to activate the movement of fluids such as pressure pumps or valves, mechanic devices, electrical controlling system, optical forces and acoustic forces. When applied in biomedical field, microfluidics can reduce the consumption of sample and reagents and the reaction time, minimize the footprint of diagnostic devices. Also this technique is compatible with automated control system with the potential to form “lab-on-a-chip” platform by integrating a series of biological and chemical reactions for a complete analysis. In this review, the basic concepts in microfluidics, the applications of microfluidic chips in clinical diagnosis and its future prospect and challenges will be summarized.

[KEY WORDS] Microfluidics; Clinical diagnosis; Lab-on-a-chip

微流控技术是一种对微尺度流体(微升到皮升量级)进行精确控制和操纵的技术。近二三十年来,得益于纳米制造技术的成熟与生化技术对操纵微量液体的需求,微流控技术取得了飞速的发展。与传统的检测方法相比,基于微流控平台的检测技术具有节省样本与试剂用量,反应速度更快,高通量,易便携,自动化潜力高等优势。

1998年 Burns等^[1]提出的将多种生物、化学分析功能整合在一张微小芯片上的“芯片实验室”(lab-on-a-chip, LOC)的概念,展示了微流控技术应用于临床检测、精准医疗的美好前景。近年来,开发“芯片实验室”,又称“微型全分析系统”,已经发展为一个物理、微电子、材料、化学、生物、医学等多学科交叉的新型研究领域。本文

基金项目:澳门科学技术发展基金项目(FDCT 110/2016/A3);澳门大学校内资助项目(MYRG 2017-00022-AMSV, SRG 2016-00072-AMSV)

作者单位:澳门大学模拟与混合信号超大规模集成电路国家重点实验室,澳门 999078

*通讯作者:贾艳伟, E-mail: yanweijia@umac.mo

主要介绍了微流控技术的分类、原理,以及其在临床核酸检测、免疫蛋白检测、药物筛查等方面的应用,以展示该技术在临床检测领域的应用前景及挑战。

1 微流控的分类及原理

微流控技术有很多不同的细分领域。基于被操控的液体形态,微流控技术可简单分为连续流体微流控(continuous-flow microfluidics)和液滴微流控(droplet microfluidics)。基于液体移动的路径,微流控技术可分为通道微流控(channel-based microfluidics)和基于开放平台的微流控技术(open platform microfluidics)。

通道微流控通过在玻璃、硅片、高分子聚合物如聚二甲基矽氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)等材料上构建微流通道^[2-5],利用阀门、泵等部件控制液体流速。由于PDMS价格便宜、制造方便、透明、具有较高的生物相容性,基于PDMS的微流控芯片获得了广泛的应用。

基于开放平台的微流控技术使得被操控的液滴不限于在通道中流动,比如基于电润湿现象^[6](electrowetting on dielectric, EWOD)开发的数字微流控技术(digital microfluidics, DMF)^[7]。液体在介电表面的电润湿现象是指当液滴位于镀有一层疏水性介电层的平面电极阵列之上,对电极通电时,液滴与通电电极接触位置的接触角会变小,从而促使液滴移动。因此可以通过电路控制来操控微升到皮升量级的离散液滴进行移动、融合、分裂等动作。此外,除了加以电场驱动液滴^[8-10],还有利用光敏材料的光驱动型^[11]、利用压电材料的力驱动型^[12]和表面声波驱动型^[13]等数字微流控技术。与传统的管道式微流技术相比,数字微流控技术无需泵、阀门等外接部件即可对离散液滴进行独立控制,也更容易与温控系统整合,更具有集成化、自动化的潜力。

此外,纸质微流控^[14]也属于基于开放平台的微流控技术,其原理是通过在纸基质上构建亲水通道来驱动液滴被动移动。由于纸基质成本与其它基质相比大为降低,纸质微流控技术也吸引了众多研究者的目光^[7, 15]。

2 微流控在临床检测领域的应用及进展

微流控技术的发展促进了临床检测领域“即时检验”(point-of-care testing, POCT)^[16]概念的诞生与发展。“即时检验”是指在照顾病人的当下即可使用的医学检测方法,其检测设备需要具有便携性、操作简单、检测速度快、结果准确可靠,可由非专业检验人员甚至病人自己操作,可极大减轻专业医学检测人员的负担。目前微流控技术已在临床检测的多个方面如核酸检测、免疫测定、耐药性检测等获得应用。

2.1 在核酸检测中的应用

在对临床样本中的DNA或RNA进行分析之前,需要先将核酸分子从原始样本中提取、纯化。微流控芯片中最常用的核酸提纯方法是磁珠法^[17]。Sista等人^[18]在数字微流控芯片上利用磁珠法从人全血样本中成功提纯人基因组DNA,并用于后续的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)。在该系统中,血液样本在芯片上相继与裂解液、DNA捕获磁珠、清洗液、洗脱液结合。通过激活电极移动液滴,配合位于芯片底部的磁力装置,可实现不同液滴与磁珠的结合与分离,从而完成DNA提纯过程。许多微流控芯片在提取核酸时,会通过加热来加速细胞裂解^[19-20]。鉴于对核酸进行后续分析通常需要控温装置,这种设计在不增加设备复杂度的同时可以提高核酸提取的效率。除了磁珠法、加热法等方法,一些微流控芯片利用介电泳效应(dielectrophoresis trapping)^[21]、等速电泳分离^[22]等微流控领域独有的技术来完成核酸分子的提纯。此外,为了满足第二代测序技术对于更高纯度核酸样本的需求,Choi等人^[23]利用惯性聚焦技术(inertial focusing),使全血、血浆样本中的巨细胞病毒颗粒在通过螺旋形的微流通道后与血细胞分离,降低了样本中人类基因的比例,减少了后续测序的背景噪音。

作为一种高特异性、高灵敏度、反应快速的核酸扩增手段,PCR在微流控领域的应用也得以充分开发。精确的温度控制系统是完成PCR的基本条件。基于温控的实现方法,可以简单地将微流控芯片上的PCR方法分为2类:静止PCR和动态PCR。在静止PCR方法中,反应液在PCR过程中

位置不变,通过对固定反应点的升降温来实现热循环。如 Chang 等人^[24]利用金属铂作为加热元件和感温元件对固定的 PCR 反应位点进行温控,成功在数字微流控芯片上扩增出二型登革病毒核酸。在动态 PCR 方法中,反应液在几个具有特定温度的恒温域之间受控地来回移动,以此实现反应液的热循环。Sista 等人^[18]开发的用于 PCR 的微流控芯片具有一个 60℃ 恒温域和一个 95℃ 恒温域,反应液在 2 个恒温域之间移动,18 min 即可完成 40 个循环的 PCR 反应。PCR 与微流控技术的结合还突破了传统 PCR 方法反应速度的极限。对于液滴微流控来说,微小液滴具有的高表面积与体积比使得热量传导更快、更均一,可极大加速 PCR 反应进程。Wheeler 等人^[25]从反应热力学、DNA 聚合酶等角度探索了在微流控芯片上进行超快速 PCR 的极限,利用适合于进行快速 PCR 的 SpeedSTAR™ HS DNA 聚合酶或 KAPA2G DNA 聚合酶,并减少在变性、退火、延伸各步骤的停留时间,在 3 min 以内完成了 35 个循环的 PCR 扩增反应。陈天蓝等人^[26]设计的数字微流控芯片用铂电极作为温控系统,可以使液滴超快速升降温,在 7 s 之内完成对 SYBR 和特异性分子信标探针的溶解曲线分析。与传统的 PCR 设备相比,不丧失灵敏度的前提下,在大部分微流控芯片上进行 PCR 可以至少减少 50% 的反应时间和 70% 的样本消耗^[7]。

除了与 PCR 技术结合,各种基于微流控芯片的等温核酸扩增技术也得以开发。虽然在灵敏度和特异性方面与 PCR 有差别,但由于等温扩增技术对温度的精准控制要求较低,开发者更容易将相应设备小型化、便携化。万谅等人^[27]开发的便携式微流控设备,可在不到一个鞋盒大小的数字微流控平台上实现对布鲁氏菌基因的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)及检测。在 67℃ 40 min 的扩增反应之后,通过对分子信标探针的溶解曲线分析,不到 5 min 即可完成对目的基因的检测。Laili 等人^[28]开发的微流控核酸检测芯片则结合了滚环扩增技术(rolling circle replication, RCA)和微流电泳技术,在 37℃ 60 min 的 RCA 扩增反应后,可通过在微流通道中进行电泳分离来检测样本中是否含有霍乱弧

菌的目的基因。

鉴于微流控领域反应液的微小体积,更需要高灵敏度的检测方法检测样本中的核酸分子。目前微流控芯片上开发的实时 PCR 方法最常用的是荧光检测法^[29],通过 SYBR 等非特异性嵌入式染料或者 Taqman 探针、分子信标探针等特异性荧光探针检测目的基因。小型发光二极管可被整合到微流控系统中,代替较大的汞灯、水银灯等作为激发光源。除了实时 PCR,研究者在各种微流控平台上整合了核酸杂交技术^[13]、毛细管电泳技术^[30]、焦磷酸测序技术^[31]、DNA 光学图谱技术^[32]等核酸分析方法,作为核酸扩增产物的后续检测分析方法。

2.2 在免疫分析中的应用

基于抗原抗体之间特异性结合的免疫分析方法是临床诊断领域最常用的检测方法之一。传统的免疫分析方法,如酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),具有成本低,易操作的优点,但耗时长、费人力、需要额外设备如酶标仪等特性也阻碍了其应用于即时检测。基于微流控平台的免疫分析方法^[33-34],可以促进抗原抗体之间的吸附,减少反应时间,实现自动控制,整合小型光学探头使设备小型化,实现即时检测的目标。

诱饵抗原(或抗体)的包被、液相的转移和反应信号的捕捉是酶免分析试验最基本的 3 个方面。

诱饵抗原(或抗体)的包被对酶免试验的灵敏度和特异性有着极大影响。平面介质(如 PDMS、玻璃等)、磁珠和非磁性微球是微流控领域 3 类最常用的包被介质。Kevin 等人^[35]将蛋白质的包被整合到 PDMS 聚合过程中,由于该方法简单易行并具有较高包被效率,在 PDMS 微流芯片的应用具有很大潜力。

在通道型微流控芯片中,液相转移常通过操纵泵和阀门来完成,也可以利用离心力等方法完成。Wang 等人^[36]通过微型气动泵和微型气动阀,完成了在 PDMS 芯片上对丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)抗体的酶免检测。Lai 等人^[37]基于微离心力开发的酶免分析芯片,可将酶免试验整合到一张普通光碟大小的微流设备中。在数字微

流控芯片中,液相的更换通常由电极驱动液体移动配合着磁力装置完成。Wheeler 等人^[38]设计的数字微流控芯片中,位于芯片底部的磁力装置用于固定或移动包被了风疹病毒表面抗原的磁珠,驱动电极来控制样本、酶标记物、显色液等不同液滴与磁珠融合、分离,可同时完成风疹病毒 IgM 和 IgG 的自动化检测。

传统实验室进行的酶免分析方法中,通常使用酶标仪测吸光度来确认反应结果。而微流控设备多数选择用荧光信号来检测芯片上酶免反应的结果。相比于吸光度,荧光信号灵敏度和特异性都更高,且将现有的荧光标记系统用于微流控芯片上可实现多重检测。Tohid 等人^[39]设计的 PDMS 微流控芯片可以在单一通道完成对五种抗体的多重检测。除了光学信号,电化学信号也常应用于微流控芯片上去检测酶免反应结果^[40-42],通过检测被免疫反应改变的电势、电流、电压、电容、电阻等因素,可以获得定量结果。与光学信号相比,电化学信号不需要额外的激发光源,更容易被整合到小型化的微流控系统中,而且电化学信号的检测灵敏度不受光程、液体浊度等因素的影响,用于微流控系统有着天然的优势。

2.3 在细胞分析中的应用

开发能够进行细胞培养、分选、分析的微流控芯片也是微流控领域的一大研究热点。微流控技术小型化、高通量的特点使得其具有利用珍贵稀少的组织细胞样本进行高通量分析的潜力,为精准医疗、个性化医疗提供支持^[43]。Irena 等人^[44]验证了在数字微流控芯片上进行细胞培养、药物细胞毒性分析实验的可行性。该实验中,普朗尼克 F68 作为添加剂被加入液滴中,以减少芯片表面对细胞及蛋白质的吸附,从而降低驱动液滴所需的电压,以免对细胞造成伤害。Ada 等人^[45]研发的 PDMS 微流控芯片利用特殊设计的微流通道生成含单细胞的液滴,可以在 2.4 cm×2.4 cm 大小的芯片上实现对肿瘤细胞系以及原生肿瘤组织细胞的药物筛查。

基于微流控芯片的 3D 细胞培养技术也是近年来微流控技术应用于生物医学领域的一类发展方向。与传统的 2D 细胞培养方法相比,3D 环境下进行细胞培养能更好地模拟体内真实的细胞生

长环境、反应细胞与胞外基质的相互作用。Yu 等人^[46]设计的 PDMS 芯片中,多个平行的细胞培养腔与微小通道交联,模拟了体内组织与毛细血管网之间的相互作用。Raty 等人^[47]的实验结果证明小鼠胚胎细胞在微流通道中的生长速度比传统平板培养更接近体内真实生长速率。而 Yeong 等人^[48]将 PDMS 形成的特殊结构与多孔细胞培养板结合,灌注水凝胶形成多个平行的 3D 细胞培养腔体,构建了一个与传统细胞分析、药物筛选等实验方法完全兼容的、高通量的 3D 细胞培养微流控平台。

除了基于细胞培养的微流控芯片,能代替大型流式细胞设备的微型细胞分选芯片也是一个研究焦点。除了通过荧光标记、大小等因素进行分选,微流控芯片还可以通过介电泳效应对细胞进行分选。在非均匀电场中,不同极性的细胞会朝着不同电场强度的地方迁移,利用介电泳效应和经特殊设计的微流通道,Takahashi 等人^[49]完成了高通量细胞分选。此外,惯性微流体技术也常被应用于细胞分选。Kwon 等人^[50]利用螺旋形的微流通道,使得死细胞、细胞碎片等在通过微流控芯片后从细胞培养液中析出,可进一步应用于灌注式细胞培养。Abdulla 等人^[51]设计的多个微流通道级联的微流控芯片无需对细胞进行任何标记就可以将循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)从稀释的全血样本中分离,且分离出的 CTC 保持高存活率,便于进行后续药物筛查等试验。

3 展望

近年来,微流控技术在临床诊断领域的应用研究极大促进了现场、即时检测和精准、个性化医疗的发展。尽管现时微流控技术的全面推广还受限于制备过程中的复杂操作、芯片对生化成分的吸附等一系列问题,但随着新材料、新技术、新发现的不断涌出,有着来自各个学科的研究人员对微流控技术持续的研究与改善,微流控技术在临床诊断领域乃至基础医学研究领域的巨大潜能毋庸置疑。微流控技术的产业化也将推动临床检测方法朝着小型化、快速化、高通量、便携性、自动化的方向发展,“芯片实验室”的广泛应用指日可待。

参考文献

- [1] Burns MA, Johnson BN, Brahmasandra SN, et al. An integrated nanoliter DNA analysis device[J]. *Science*, 1998, 282(5388):484-487.
- [2] Lin CH, Lee GB, Lin YH, et al. A fast prototyping process for fabrication of microfluidic systems on soda-lime glass [J]. *J Micromechanics Microengineering*, 2001, 11(6):726-732.
- [3] McDonald JC, Whitesides GM. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices [J]. *Acc Chem Res*, 2002, 35(7):491-499.
- [4] Sollier E, Murray C, Maoddi P, et al. Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(22):3752-3765.
- [5] Ren K, Zhou J, Wu H. Materials for microfluidic chip fabrication [J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(11):2396-2306.
- [6] Gabriel L. Relation entre les phénomènes électriques et capillaires[D]. Paris: Gauthier-Villars, 1875.
- [7] Choi K, Ng AHC, Fobel R, et al. Digital Microfluidics[J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2012, 5(1):413-440.
- [8] Abdelgawad M, Wheeler AR. The digital revolution: A new paradigm for microfluidics [J]. *Adv Mater*, 2009, 21(8):920-925.
- [9] Cho SK, Moon H. Electrowetting on dielectric (EWOD) : new tool for bio/micro fluids handling [J]. *BioChip J*, 2008, 2(2):79-96.
- [10] Malic L, Brassard D, Veres T, et al. Integration and detection of biochemical assays in digital microfluidic LOC devices[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(4):418-431.
- [11] Chiou PY, Moon H, Toshiyoshi H, et al. Light actuation of liquid by optoelectrowetting sensors actuators [J]. *A Phys*, 2003, 104(3):222-228.
- [12] Peng C, Zhang Z, Kim CJ, et al. EWOD (electrowetting on dielectric) digital microfluidics powered by finger actuation[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(6):1117-1122.
- [13] Guttenberg Z, Müller H, Habermüller H, et al. Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump[J]. *Lab Chip*, 2005, 5(3):308-317.
- [14] Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays[J]. *Angew Chemie Int Ed*, 2007, 46(8):1318-1320.
- [15] Magro L, Escadafal C, Garneret P, et al. Paper microfluidics for nucleic acid amplification testing (NAAT) of infectious diseases [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(14):2347-2371.
- [16] Dincer C, Bruch R, Kling A, et al. Multiplexed point-of-care testing - xPOCT[J]. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(8):728-742.
- [17] Wu J, Kodzius R, Cao W, et al. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays[J]. *Microchim Acta*, 2014, 181(13-14):1611-1631.
- [18] Sista R, Hua Z, Thwar P, et al. Development of a digital microfluidic platform for point of care testing [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(12):2091-2104.
- [19] Zhu K, Jin H, Ma Y, et al. A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA[J]. *J Biotechnol*, 2005, 118(3):257-264.
- [20] Lee CY, Lee GB, Lin JL, et al. Integrated microfluidic systems for cell lysis, mixing/pumping and DNA amplification [J]. *J Micromech Microeng*, 2005, 15(6):1215-1223.
- [21] Prinz C, Tegenfeldt JO, Austin RH, et al. Bacterial chromosome extraction and isolation [J]. *Lab Chip*, 2002, 2(4):207-212.
- [22] Wainright A, Nguyen UT, Bjornson TL, et al. Pre-concentration and separation of double-stranded DNA fragments by electrophoresis in plastic microfluidic devices [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(21):3784-3792.
- [23] Choi K, Ryu H, Siddle KJ, et al. Negative selection by spiral inertial microfluidics improves viral recovery and sequencing from blood[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(7):4657-4662.
- [24] Chang YH, Lee GB, Huang FC, et al. Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics[J]. *Biomed Microdevices*, 2006, 8(3):215-225.
- [25] Wheeler EK, Hara CA, Frank J, et al. Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification [J]. *Analyst*, 2011, 136(18):3707-3712.
- [26] Chen T, Jia Y, Dong C, et al. Sub-7-second genotyping of single-nucleotide polymorphism by high-resolution melting curve analysis on a thermal digital microfluidic device [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(4):743-752.
- [27] Wan L, Chen T, Gao J, et al. A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:14586.

- [28] Mahmoudian L, Kaji N, Tokeshi M, et al. Rolling circle amplification and circle-to-circle amplification of a specific gene integrated with electrophoretic analysis on a single chip[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(7):2483-2490.
- [29] Hua Z, Rouse JL, Eckhardt AE, et al. Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(6):2310-2316.
- [30] Easley CJ, Karlinsey JM, Landers JP. On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation [J]. *Lab Chip*, 2006, 6(5):601-610.
- [31] Boles DJ, Benton JL, Siew GJ, et al. Droplet-based pyrosequencing using digital microfluidics [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22):8439-8447.
- [32] Müller V, Westerlund F. Optical DNA mapping in nanofluidic devices: principles and applications [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(4):579-590.
- [33] Lin CC, Wang JH, Wu HW, et al. Microfluidic immunoassays [J]. *J Assoc Lab Autom*, 2010, 15(3):253-274.
- [34] Han KN, Li CA, Seong GH. Microfluidic chips for immunoassays [J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2013, 6(1):119-141.
- [35] Heyries KA, Mandon CA, Ceriotti L, et al. "Macromolecules to PDMS transfer" as a general route for PDMS biochips [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(5):1146-1152.
- [36] Wang CH, Lee GB. Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 21(3):419-425.
- [37] Lai S, Wang S, Luo J, et al. Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(7):1832-1837.
- [38] Ng AHC, Lee M, Choi K, et al. Digital microfluidic platform for the detection of rubella infection and immunity: A proof of concept [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(2):420-429.
- [39] Didar TF, Foudeh AM, Tabrizian M. Patterning multiplex protein microarrays in a single microfluidic channel [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(2):1012-1018.
- [40] Hervás M, López MA, Escarpa A. Electrochemical immunosensing on board microfluidic chip platforms [J]. *Trends Anal Chem*, 2012, 31:109-128.
- [41] Rossier JS, Girault HH. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection [J]. *Lab Chip*, 2001, 1(2):153-157.
- [42] Ouyang W, Han J, Wang W. Enabling electrical biomolecular detection in high ionic concentrations and enhancement of the detection limit thereof by coupling a nanofluidic crystal with reconfigurable ion concentration polarization [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(22):3772-3784.
- [43] Gary DJ, Paul R. *Emerging Tools for Single - Cell Analysis* [M]. Wiley-Liss, 2000, 95-113.
- [44] Barbulovic-Nad I, Yang H, Park PS, et al. Digital microfluidics for cell-based assays [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(4):519-526.
- [45] Wong AHH, Li H, Jia Y, et al. Drug screening of cancer cell lines and human primary tumors using droplet microfluidics [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:9109.
- [46] Hsu YH, Moya ML, Abiri P, et al. Full range physiological mass transport control in 3D tissue cultures [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(1):81-89.
- [47] Raty S, Walters EM, Davis J, et al. Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture [J]. *Lab Chip*, 2004, 4(3):186-190.
- [48] Yu YJ, Kim YH, Na K, et al. Hydrogel-incorporating unit in a well: 3D cell culture for high-throughput analysis [J]. *Lab Chip*, 2018, Epub ahead of print.
- [49] Takahashi Y, Takeuchi S, Miyata S. High throughput cell sorting device using dielectrophoresis and fluid-induced shear force [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2013:4466-4469.
- [50] Kwon T, Yao R, Hamel JFP, et al. Continuous removal of small nonviable suspended mammalian cells and debris from bioreactors using inertial microfluidics [J]. *Lab Chip*, 2018, Epub ahead of print.
- [51] Abdulla A, Liu W, Gholamipour - Shirazi A, et al. High-Throughput Isolation of Circulating Tumor Cells Using Cascaded Inertial Focusing Microfluidic Channel [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(7):4397-4405.

原发性乳腺弥漫大B细胞淋巴瘤临床和病理特征

汪园园 杨喆 邓元 常红云 李晓锋 张冠军 刘希*

[摘要] **目的** 探讨原发性乳腺弥漫大B细胞淋巴瘤(primary breast diffuse large B-cell lymphoma, PB-DLBCL)的临床病理特征和遗传学上 *MYC* 基因重排情况。 **方法** 回顾性分析西安交通大学第一附属医院收治的8例PB-DLBCL临床病理资料,术前均诊断为乳腺癌或炎症。肿瘤最大直径1.8~7.4 cm,平均3.3 cm,其中 I EA 期5例, II EA 期2例, IV E 期1例。行免疫组织化学染色进行免疫分型,采用原位杂交检测EBV感染状态,采用荧光原位杂交检测 *MYC* 重排情况。 **结果** PB-DLBCL的肿瘤细胞弥漫或略呈结节状浸润乳腺组织,可见残存的乳腺导管。肿瘤细胞呈中等-大的中心母或免疫母细胞样形态。根据Hans分型,非生发中心B细胞型7例(87.5%),生发中心B细胞型1例(12.5%)。8例病例EBER原位杂交均为阴性,无EBV感染。*MYC* 荧光原位杂交检测显示无 *MYC* 重排或扩增。 **结论** PB-DLBCL临床表现难与乳腺癌、乳腺炎症区别,确诊需依靠病理组织学和免疫表型分析。PB-DLBCL免疫表型分型大部分为非生发中心型,目前研究尚未见PB-DLBCL中 *MYC* 重排阳性。

[关键词] 乳腺;弥漫大B细胞淋巴瘤;临床病理;免疫表型;*MYC* 基因重排

The clinical and pathological characteristics of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

WANG Yuanyuan, YANG Zhe, DENG Yuan, CHANG Hongyun, LI Xiaofeng, ZHANG Guanjun, LIU Xi*
(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, 710061)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the clinicopathological characteristics and the genetic *MYC* gene rearrangement of primary breast diffuse large B-cell lymphoma (PB-DLBCL). **Methods** The retrospective analysis was performed for the clinical pathology data collected from 8 cases of PB-DLBCL who admitted to the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University diagnosed with breast cancer or inflammation before surgery. The maximum diameter of the tumor ranges from 1.8 cm to 7.4 cm, with an average of 3.3 cm. There were 5 cases staged at I EA, 2 at II EA, and 1 at IV E. Immunophenotyping was performed by immunohistochemical staining. In situ hybridization was used to detect EBV infection status and *MYC* rearrangement. **Results** Tumor cells from PB-DLBCL were infiltrated into the breast tissues with a diffuse or slightly nodular pattern, and residual breast epithelium was present. The tumor cells were medium-large centroblastic-like or immunoblastic-like cytologic features. According to Hans classification, 1 case was germinal center B-cell group (GCB) (12.5%), while 7 cases were non-GCB group (87.5%). EBER in situ hybridization was negative in 8 cases and no EBV infection. No *MYC* rearrangement or amplification were detected by in situ hybridization. **Conclusions** It is difficult to distinguish PB-DLBCL from breast cancer and inflammation only by clinical features. The accurate diagnosis depends on histopathology and immunophenotypic analysis. Most of PB-DLBCL are non-GCB group. Currently, no *MYC* rearrangement is

基金项目:陕西省国际科技合作与交流计划项目(2016KW-001,2015KW-030);陕西省科学技术研究发展计划项目(2015SF128)

作者单位:西安交通大学第一附属医院病理科,陕西,西安 710061

*通讯作者:刘希, E-mail: liuxizgq@outlook.com

found in PB-DLBCL.

[KEY WORDS] Breast; Diffuse large B-cell lymphoma; Clinicopathology; Immunophenotype; *MYC* rearrangement

原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (primary breast diffuse large B-cell lymphoma, PB-DLBCL) 是恶性程度较高的淋巴瘤, 约占原发性乳腺恶性肿瘤的 0.5%, 占非霍奇金淋巴瘤的 1%, 占结外淋巴瘤的 3%^[1]。由于 PB-DLBCL 进展较快, 同时又较为少见, 临床表现不典型, 初诊时难以与乳腺癌或炎症等疾病区别, 因此需重视对本病的诊治研究, 避免误诊漏诊。尽管近年来证据表明, *MYC* 基因重排已成为弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 预后判断的重要指标之一^[2], 但在 PB-DLBCL 中 *MYC* 重排的情况仍少见报道。本研究分析西安交通大学第一附属医院 8 例 PB-DLBCL 的临床、病理组织学及免疫表型特点, 采用原位杂交技术检测 EB 病毒编码的小 RNA (epstein-Barr virus-encoded RNA, EBER) 的表达, 再使用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术检测 *MYC* 基因遗传学改变, 探讨 PB-DLBCL 的临床病理及 *MYC* 基因遗传学特征, 并进行文献复习, 以加强对本病的认识。

1 材料与方法

1.1 材料

收集西安交通大学第一附属医院 2010 年 1 月至 2018 年 4 月在病理科确诊的 8 例 PB-DLBCL。参照 2008 年国际结外淋巴瘤研究小组^[3]提出的原发性乳腺淋巴瘤诊断标准和 2016 年世界

卫生组织 (World Health Organization, WHO) 淋巴瘤组织肿瘤分类修订版^[2], 本研究 PB-DLBCL 的纳入标准为: ①患者无乳腺外恶性淋巴瘤的既往史; ②乳腺为病变首发部位, 可伴有同时性或继发性的同侧腋窝淋巴结累及; ③镜下可见乳腺组织与恶性淋巴组织共存, 淋巴瘤细胞浸润乳腺小叶和导管, 而乳腺上皮细胞无恶变; ④高年资病理医师复阅病理切片, 满足 2016 年 WHO 淋巴瘤组织肿瘤分类修订版中弥漫大 B 细胞淋巴瘤的病理诊断标准。结合临床及影像学检查结果, 按照 Ann Arbor 分期系统, 对纳入的病例进行分期^[4]。

8 例 PB-DLBCL 均为女性患者, 发病年龄 34~68 岁 (平均为 53.1 岁)。均以发现乳腺肿物为主诉就诊, 病程 1 周~30 年。7 例患者均无皮肤红肿、溃疡, 无乳头糜烂及溢液; 1 例患者肿物进行性增大并伴皮肤红肿, 局部疼痛。所有患者均无发热、盗汗和体重下降等淋巴瘤的全身表现即 B 症状。6 例患者血清乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 正常, 2 例升高, 分别为 258.4 U/L 和 261.3 U/L。7 例患者为单侧乳腺肿物, 其中左侧 5 例, 占 62.5%, 另 1 例患者为双侧乳腺肿物伴淋巴结累及。肿瘤最大直径 1.8~7.4 cm, 平均 3.3 cm。行肿物穿刺活检术 4 例, 占 50%; 行肿物局部切除活检术 2 例, 占 25%; 行乳腺单纯切除术 2 例, 占 25%。根据 Ann Arbor 分期, I EA 期 5 例, II EA 期 2 例, IVE 期 1 例 (表 1)。

表 1 8 例原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床特征

Table 1 Clinical features of the 8 cases of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

病例号	性别/ 年龄(岁)	肿瘤部位	术前诊断	病程	区域淋巴 结累及	血清乳酸脱 氢酶(LDH)	术式	Ann Arbor 分期
1	女/62	左侧外上象限	乳腺肿物	2月	是	正常	肿物切除活检术	II EA
2	女/35	右侧外上象限	乳腺炎	4月	否	正常	穿刺活检术	I EA
3	女/48	右侧内上象限	乳腺癌	1月	否	升高	穿刺活检术	I EA
4	女/55	左侧内上象限	乳腺癌	8月	否	正常	左侧乳腺单纯切除术	I EA
5	女/57	左侧外上象限; 右侧外上象限	乳腺炎	30年	是	升高	穿刺活检术	IVE
6	女/66	左侧内上象限	乳腺癌	10月	是	正常	肿物切除活检术	II EA
7	女/68	左侧内下象限	乳腺肿物	1周	否	正常	左侧乳腺单纯切除术	I EA
8	女/34	左侧外上象限	乳腺炎	12月	否	正常	穿刺活检术	I EA

1.2 方法

1.2.1 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)、免疫组织化学染色和判读

病变组织均由4%中性福尔马林液固定、石蜡包埋和HE染色。免疫组织化学染色方法为柠檬酸缓冲液微波修复抗原,使用 BenchMark Ultra Ventana (Roche 公司,瑞士)全自动免疫组织化学染色仪,按照说明书进行 EnVision 两步法行免疫组织化学染色。即用型一抗抗体如下:LCA、CD20、CD79 α 、CD3、CD10、BCL6、MUM1、BCL2、C-MYC、ALK、CD30、Ki-67、CK,抗体购自北京中杉和福州迈新生物技术开发有限公司。染色均设阳性对照及阴性对照。CD10、BCL6、MUM1、BCL2 和 C-MYC 的免疫组织化学染色结果的判读标准采用半定量法,计算10个高倍视野下阳性细胞百分数的平均值。阳性细胞>30%时为 CD10、BCL6 或 MUM1 (+),阳性细胞>50%时为 BCL2 (+)^[2, 5];阳性细胞 \geq 40%为 C-MYC (+)^[6]。根据 Hans 分型法,将入组的 PB-DLBCL 分为生发中心 B 细胞型(germinal center B-cell, GCB)和非生发中心 B 细胞型(non-GCB)^[5]。

1.2.2 EBER 原位杂交

使用 EBER 原位杂交检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)检测肿瘤石蜡切片 EBV 的感染情况。主要步骤为切片脱蜡、水化后,室温下蛋白酶 K 消化切片 5 min;蒸馏水洗涤后滴加杂交液,在 ThermoBrite FISH 杂交仪(Abbott Molecular 公司,美国)中进行杂交,过夜。滴加一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤后加二抗,室温孵育 20 min, PBS 洗涤后加 HRP,室温 10 min, DAB 显色,苏木精复染,脱水,封片。EBER 原位杂交阳性信号位于细胞核。

1.2.3 FISH 检测及判读

使用 MYC 双色分离探针(CytoTest Inc 公司,美国)对肿瘤组织的 3 μ m 石蜡切片进行 FISH 染色,操作步骤按照试剂盒说明书进行。主要步骤为组织学切片脱蜡后,于 95 $^{\circ}$ C 蒸馏水中煮片 20 min;室温晾干,滴加胃蛋白酶消化液,37 $^{\circ}$ C 消化 25 min;梯度乙醇(70%、90%和无水乙醇)脱水各 3 min。室温晾干切片后,避光滴加 MYC 双色分离探针,盖好盖玻片并注意避免产生气泡,使杂交液分布均匀。橡胶水泥封片后于 ThermoBrite FISH 杂交仪内进行变性、杂交过夜。切片洗涤后,

滴加 DAPI 复染剂到杂交区,盖上盖玻片,利用 BX41 荧光显微镜成像系统(Olympus 公司,日本)和 FISH 图像分析软件进行荧光图像的观察、采集和分析。按试剂盒说明书判读标准,MYC 正常信号为红色和绿色荧光融合的 2 个黄色信号,基因易位时为 1 黄 1 红 1 绿信号,基因扩增时为 \geq 3 个黄色信号。每个组织样本观察 200 个间期细胞核,计算异常信号细胞的百分比。以 5 例反应性增生淋巴结标本的 MYC FISH 结果按如下公式计算建立本实验室阈值,阳性阈值=假阳性信号频率的平均值+3 倍标准差。按照试剂盒说明书及上述方法得到本实验室的 MYC 探针基因易位阳性阈值为 4%,MYC 基因扩增阳性阈值为 8%。

2 结果

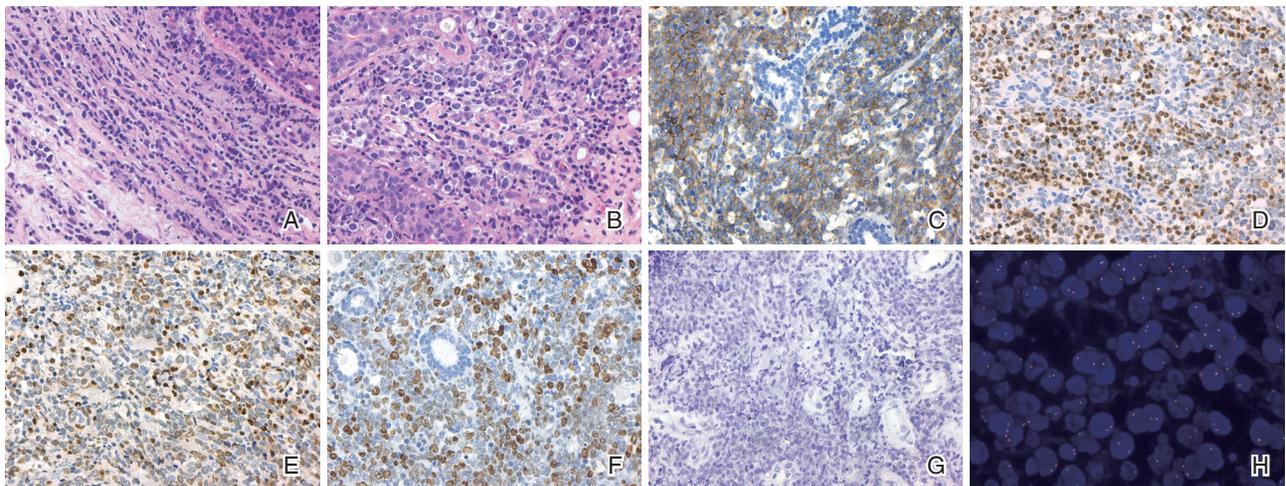
2.1 病理组织学形态结果

8 例病例中,行肿物局部切除活检术及乳腺单纯切除术的 4 例肿物,病理大体检查显示,肿物切面灰白、灰黄及灰红色,实性,质地细腻或稍硬,肿物周界不清。

光镜下见肿瘤细胞弥漫或略呈结节状浸润乳腺组织,致乳腺正常结构消失,可见残存的乳腺小叶。2 例病例可见松散的肿瘤细胞围绕残余乳腺导管略呈同心圆状排列(图 1A)。肿瘤细胞呈中等-大的中心母或免疫母细胞样形态,其间可见散在的小淋巴细胞(图 1B)。肿瘤细胞核呈圆形、卵圆形或空泡样,1 例病例的肿瘤细胞核稍不规则。核膜增厚,中心母样肿瘤细胞核染色质较细,可见多个靠近核膜的小核仁;免疫母样肿瘤细胞核染色质较粗,可见位于中心的大核仁。肿瘤细胞胞浆较少至丰富,嗜碱性。核分裂象多见,并可见病理性核分裂象。8 例病例均未见坏死,3 例病例伴有间质轻度纤维化。

2.2 免疫表型结果

8 例病例的肿瘤细胞均弥漫强阳性表达 LCA、CD20(图 1C)和 CD79 α 。5 例(62.5%)BCL6 阳性、7 例(87.5%)MUM1 阳性、3 例(37.5%)BCL2 阳性(图 1D)、3 例(37.5%)C-MYC 阳性(图 1E)、Ki-67 阳性率为 65%~95%(图 1F)。肿瘤细胞均呈 CD10、CD3、ALK、CD30 和 CK 阴性。残余的乳腺导管上皮可见 CK 阳性。根据 Hans 分型,本研究 8 例 PB-DLBCL 中,non-GCB 型 7 例(87.5%),GCB 型 1 例(12.5%)。根据 C-MYC 和 BCL2 蛋白表达



A: 肿瘤细胞浸润乳腺组织, 略呈单行排列兵样排列, 右上可见残存乳腺导管(HE, 400×); B: 肿瘤细胞呈中等-大的中心母或免疫母细胞样形态, 其间可见散在小淋巴细胞(HE, 400×); C: CD20 肿瘤细胞弥漫强阳性, 残存乳腺导管上皮细胞阴性[免疫组化染色(immunohistochemical staining, IHC), 400×]; D: BCL2 肿瘤细胞阳性(IHC, 400×); E: C-MYC 肿瘤细胞阳性(IHC, 400×); F: Ki-67 肿瘤细胞阳性(IHC, 400×); G: 肿瘤细胞 EBER 原位杂交阴性(光镜镜检, 400×); H: 肿瘤细胞 MYC 荧光原位杂交阴性(荧光显微镜镜检, 1000×)。

图 1 原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤的病理学染色结果

Figure 1 Pathological staining results of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

结果, 1 例为 C-MYC 和 BCL2 双表达淋巴瘤, Hans 分型为 non-GCB(表 2)。

2.3 EBER 原位杂交和 MYC FISH 结果

8 例病例 EBER 原位杂交均为阴性, 无 EBV

感染(图 1G)。MYC 基因 FISH 染色结果显示, > 96% 的细胞具有正常融合的 2 个黄色信号, 8 例病例基因易位和基因扩增均为阴性(图 1H, 表 2)。

表 2 8 例原发性乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤的病理学特征

Table 2 Pathological features of the 8 cases of primary breast diffuse large B-cell lymphoma

病例号	LCA	CD20	CD79 α	CD3	CD30	ALK	CD10	BCL6	MUM1	BCL2	C-MYC	Ki-67 (%)	EBER ISH	MYC FISH	分型
1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	70%+	-	-	非生发中心型
2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	75%+	-	-	非生发中心型
3	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	65%+	-	-	生发中心型
4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	70%+	-	-	非生发中心型
5	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	80%+	-	-	非生发中心型
6	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	70%+	-	-	非生发中心型
7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	95%+	-	-	非生发中心型
8	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	85%+	-	-	非生发中心型

3 讨论

发生在乳腺的淋巴瘤分为原发性和继发性。1972 年 Wiseman 等^[7]提出原发性乳腺淋巴瘤诊断标准如下: ①有足够的组织标本进行诊断, 经病理

确诊为淋巴瘤; ②发病时无乳腺外淋巴瘤病史; ③乳腺为首发部位, 除区域淋巴结(同侧腋窝和锁骨上淋巴结)可受累外, 无其他部位累及; ④乳腺组织与淋巴瘤组织密切相连。2008 年国际结外淋巴瘤研究小组对该诊断标准更新为, 单侧或双侧

乳腺病变为主要临床表现,伴/不伴区域淋巴结侵犯^[2]。而继发性乳腺淋巴瘤是指全身性淋巴瘤继发累及乳腺。

原发性乳腺淋巴瘤少见,Taniguchi等^[8]、Ryan等^[3]和周智俊等^[9]的报道显示,DLBCL是原发性乳腺淋巴瘤中的最常见的类型。由于DLBCL的优化管理有时与肿瘤原发部位相关,因此,研究起源于特定结外部位的DLBCL的独特的临床生物学行为是十分必要的。正如WHO将原发中枢神经系统的DLBCL列为一个独立亚型并进行特异性的评价和治疗^[2],由于PB-DLBCL原发部位的特殊性,Bierman等^[10]和国际结外淋巴瘤研究小组的Ryan等^[3]对PB-DLBCL是否可作为DLBCL的一个独立亚型进行了相关研究。通过该大宗病例分析,发现PB-DLBCL具有在对侧乳腺和其他结外部位复发等独特的临床病理特征^[3]。因此,研究分析PB-DLBCL的临床病理特征,可促进临床病理诊治水平的进一步提高。

PB-DLBCL好发于中老年女性,大多数为单侧乳腺发病,Ryan等^[3]的报道中,发病部位为右侧乳腺的占51%,左侧乳腺的占43%,双侧乳腺约占5%。本组研究中左侧的占62.5%,另有1例发病于双侧乳腺。需要注意的是,当双侧乳腺受累时,需仔细排除继发性乳腺淋巴瘤。PB-DLBCL一般表现为无痛性肿物,与皮肤无粘连,皮肤表面无橘皮样改变,乳头无凹陷和溢液,B症状少见^[3,8-9]。部分病例可出现局部红肿、不适等,临床上难与乳腺炎症鉴别。既往报道和本组病例术前大多数诊断为乳腺癌或炎症^[3,9,11]。Ryan等^[3]的报道中约19%的患者LDH升高,本组有2例病例LDH升高,分别为258.4 U/L和261.3 U/L。根据1972年Wiseman等^[7]提出的原发性乳腺淋巴瘤诊断标准,患者分期均为早期,即Ann Arbor I E(仅表现为乳腺肿物)或II E(乳腺肿物并累及区域淋巴结)。累及双侧乳腺的淋巴瘤分期仍有争议,研究发现该类病例侵袭性更强,预后更差,因此建议将其归为IV E期,约占5%^[3]。

PB-DLBCL的确诊依靠肿物细针穿刺、肿物局部切除或乳腺切除术后的病理学检查。其组织学形态和免疫表型类似于淋巴结内原发的DLBCL。组织学形态上,乳腺原有结构被破坏,可见中-大的异型肿瘤细胞弥漫性或略呈结节状浸润,肿瘤细胞间可见残存的乳腺导管和散在的小淋巴细胞。

部分病例肿瘤细胞粘附性差,呈单个散在的或单行条索状浸润于间质中或围绕乳腺导管,类似乳腺小叶癌的列兵样排列或靶环样结构。肿瘤细胞大多呈中心母或免疫母细胞样形态,核分裂象易见。肿瘤间质可有轻度的纤维化。免疫表型上,肿瘤细胞表达淋巴细胞标记物LCA和B细胞标记物(CD20和CD79 α),而不表达上皮标记物CK^[2,11]。本组的8例PB-DLBCL均符合上述病理诊断标准。

根据细胞起源,通过基因表达谱(gene expression profile, GEP)可以将弥漫大B细胞淋巴瘤分型为GCB和活化B细胞样(activated B-cell-like, ABC)^[2]。这2种亚型在染色体突变、信号通路和临床预后等方面均存在差异,GCB亚型患者总体生存率好于ABC亚型^[12]。但由于GEP尚未常规开展,因此2016年WHO淋巴瘤组织肿瘤分类修订版推荐基于CD10、BCL6和MUM1的IHC染色的Hans分型法,作为GEP分型的有效替代^[2]。既往研究报道PB-DLBCL中GCB和non-GCB的比例变化范围较大,GCB比例可从11.1%~39.3%^[8-9,11,13-14]。本研究根据Hans分型^[5],7例(87.5%)为non-GCB,1例(12.5%)为GCB。2种亚型的预后意义有待积累更多病例进行随访和统计学分析。此外,具有生发中心B细胞免疫表型特征的DLBCL发生于结外比如乳腺等部位的病理机制仍不明确,有待进一步阐明^[11]。

近来研究表明,C-MYC作为癌基因参与了DLBCL的发生发展过程,MYC的遗传学改变已成为DLBCL预后判断的重要指标之一^[2]。MYC转录因子可起基因扩增和通过调节P53凋亡通路下调肿瘤细胞增殖能力的双重作用^[15]。当用FISH检测确定淋巴瘤具有MYC重排伴BCL2重排和/或BCL6重排时,即为“双打击”或“三打击”淋巴瘤。2016年WHO分类已将其定义为“高级别B细胞淋巴瘤,伴MYC和BCL2和(或)BCL6重排”,预后较差^[2]。如果淋巴瘤免疫表型呈C-MYC(>40%)和BCL2(>50%)阳性而基因重排阴性时,可归为“双表达”淋巴瘤,预后也不良,但稍好于“双打击”或“三打击”淋巴瘤^[2,16-17]。因此在DLBCL中检测MYC的遗传学改变对指导临床治疗和预后评估具有重要意义。然而,我们注意到,尽管7%~21%的DLBCL可发生MYC基因重排^[15],在Taniguchi等^[8]及本研究的报道中,PB-DLBCL均呈MYC基

因重排 FISH 检测阴性,同时少数病例可呈 C-MYC 免疫表型阳性。目前,由于病例数有限,仍需累积病例进一步分析 MYC 基因在 PB-DLBCL 中的重排情况及与预后的关系。

综上,PB-DLBCL 是原发于乳腺的少见的淋巴瘤,临床表现难与乳腺癌、乳腺炎症区别。其确诊需依赖病理组织学和免疫表型分析。组织学上,PB-DLBCL 肿瘤细胞多表现为中等-大的中心母或免疫母细胞样形态,免疫表型分型大部分为 non-GCB。目前研究尚未见 PB-DLBCL 中 MYC 基因重排阳性报道。PB-DLBCL 的遗传性特征仍需积累病例进一步分析,特别是 MYC 基因重排在 PB-DLBCL 中的发生比例和意义。

参考文献

- [1] Cheah CY, Campbell BA, Seymour JF. Primary breast lymphoma[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(8): 900-908.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms [J]. Blood, 2016, 127(20):2375-2390.
- [3] Ryan G, Martinelli G, Kuper-Hommel M, et al. Primary diffuse large B - cell lymphoma of the breast: prognostic factors and outcomes of a study by the International Extranodal Lymphoma Study Group [J]. Ann Oncol, 2008, 19(2):233-241.
- [4] Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al. Report of the committee on hodgkin's disease staging classification[J]. Cancer Res, 1971, 31(11):1860-1861.
- [5] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. Blood, 2004, 103(1): 275-282.
- [6] van der Kwast TH, Bapat B. Predicting favourable prognosis of urothelial carcinoma: gene expression and genome profiling [J]. Curr Opin Urol, 2009, 19(5):516-521.
- [7] Wiseman C, Liao KT. Primary lymphoma of the breast [J]. Cancer, 1972, 29(6):1705-1712.
- [8] Taniguchi K, Takata K, Chuang SS, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B mutations in primary breast diffuse large B-cell lymphoma [J]. Am J Surg Pathol, 2016, 40(3):324-334.
- [9] 周智俊, 谢建兰, 韦萍, 等. 原发性乳腺淋巴瘤类型构成与预后分析 [J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(9):618-622.
- [10] Bierman PJ, Villanueva ML, Armitage JO. Diffuse large B-cell lymphoma of the breast: a distinct entity? [J]. Ann Oncol, 2008, 19(2):201-202.
- [11] Talwalkar SS, Miranda RN, Valbuena JR, et al. Lymphomas involving the breast: a study of 106 cases comparing localized and disseminated neoplasms [J]. Am J Surg Pathol, 2008, 32(9):1299-1309.
- [12] Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma [J]. N Engl J Med, 2002, 346(25):1937-1947.
- [13] 张静, 孙健, 罗玉凤, 等. 原发性乳腺弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤 12 例临床病理分析 [J]. 诊断病理学杂志, 2017, 24(9):641-646.
- [14] 黄瑛, 王莉, 范磊, 等. 原发乳腺弥漫大 B 细胞淋巴瘤 12 例 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2): 452-456.
- [15] Copie-Bergman C, Cuilliere-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study [J]. Blood, 2015, 126(22):2466-2474.
- [16] Hu S, Xu - Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from the international DLBCL rituximab - CHOP consortium program [J]. Blood, 2013, 121(20):4021-4031.
- [17] Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B - cell lymphoma [J]. Blood, 2013, 121(12):2253-2263.

子宫内膜癌患者肿瘤组织和血清中 SOX1 和 VIM 启动子的甲基化检测及其临床意义

舒新红 范红莉 李小燕*

[摘要] **目的** 检测子宫内膜癌(EC)患者血清中性别决定区Y框蛋白1(SOX1)和波形蛋白(VIM)启动子的甲基化情况,并探究其临床意义。**方法** 选择英山县人民医院2013年7月至2015年12月收治的120例EC患者为观察组,另选择50例功能性子宫出血患者作为对照组。采用甲基化特异性PCR(MSP)技术检测血清及肿瘤组织SOX1、VIM基因启动子的甲基化状态;分析血清SOX1、VIM基因启动子甲基化与EC患者临床病理特征的关系;并分析SOX1、VIM单一及联合检测方法的灵敏度、特异度和准确度。**结果** ①EC患者血清SOX1基因启动子甲基化率(71.67%)显著高于对照组(10.00%)($P<0.05$),EC患者肿瘤组织SOX1基因启动子甲基化率(95.83%)显著高于对照组(2.00%)($P<0.05$)。②EC患者血清VIM基因启动子甲基化率(60.83%)显著高于对照组(12.00%)($P<0.05$),EC患者肿瘤组织VIM基因启动子甲基化率(94.17%)显著高于对照组(4.00%)($P<0.05$)。③血清SOX1、VIM基因启动子甲基化水平与EC患者的淋巴结转移情况、病理分期、子宫肌层浸润深度有关($P<0.05$),与HCC患者的年龄、肿瘤类型无关($P>0.05$)。④血清SOX1、VIM启动子甲基化单独及联合诊断的灵敏度依次为71.67%、60.83%和81.67%,特异度依次为90.00%、88.00%和84.00%,准确度依次为77.06%、68.82%和86.47%。与SOX1、VIM单独诊断比较,联合诊断的灵敏度、准确度均显著升高($P<0.05$);不同诊断方式的特异度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** SOX1和VIM基因甲基化是EC发生的潜在标志物,血清SOX1和VIM基因启动子甲基化联合检测可用于临床EC的筛查及早期诊断。

[关键词] 子宫内膜癌;性别决定区Y框蛋白1;波形蛋白;DNA甲基化

Detection of methylation of SOX1 and VIM promoters in tumor tissues and serum from patients with endometrial carcinoma and its clinical significance

SHU Xinhong, FAN Hongli, LI Xiaoyan*

(Department of Gynecology, the People's Hospital of Yingshan County, Huanggang, Hubei, China, 438700)

[ABSTRACT] **Objective** To detect the methylation status of sex-determining region Y-box protein 1 (SOX1) and vimentin (VIM) promoters in serum from patients with endometrial carcinoma (EC), and to explore its clinical significance. **Methods** A total of 120 patients with EC who were admitted to Yingshan County People's Hospital from July 2013 to December 2015 were enrolled in the observation group, while 50 patients with functional uterine bleeding were recruited as the control group. Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of the promoters of *SOX1* and *VIM* gene in serum and tumor tissues. The relationship between the promoters of *SOX1* and *VIM* methylation and clinicopathological features of EC patients was analyzed. The sensitivity, specificity and accuracy of *SOX1* and *VIM* alone or combined detection were also analyzed. **Results** ①The methylation rates of the promoter of *SOX1* gene in serum and tumor tissues from EC patients (71.61% and 95.83%) were significantly higher than that in the control group (10.00% and 2.00%) ($P<0.05$). ②The methylation rates of the promoter of *VIM* gene in serum and tumor

作者单位:英山县人民医院妇产科,湖北,黄冈 438700

*通讯作者:李小燕, E-mail:2192300105@qq.com

tissues from EC patients (60.83% and 94.17%) were significantly higher than that in the control group (12.00% and 4.00%), ($P<0.05$). ③The promotor methylation levels of *SOX1* and *VIM* gene were correlated with the pathological staging, myometrial invasion depth and lymph node metastasis in patients with EC patients ($P<0.05$), and not associated with the patient's age or tumor type of HCC ($P>0.05$). ④The sensitivity of serum of the promoter of *SOX1* and *VIM* methylation alone and combined diagnosis was 71.67%, 60.83%, 81.67%, and the specificity was 90.00%, 88.00%, 84.00%, and the accuracy was 77.06%, 68.82%, 86.47%, respectively. Compared with *SOX1* and *VIM* alone, the sensitivity and accuracy of combined diagnosis significantly increased ($P<0.05$). There was no significant difference in the specificity of different diagnostic methods ($P>0.05$). Conclusion The methylation of the *SOX1* and *VIM* genes are potential markers for EC. The combined detection of the *SOX1* and *VIM* gene methylation in promoters can be used for clinical EC screening and early diagnosis.

[KEY WORDS] Endometrial carcinoma; Sex - determining region Y - box 1; Vimentin; DNA methylation

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,绝大多数为雌激素依赖型(即I型)子宫内膜样腺癌^[1]。国内外研究均表明^[2-3], EC的发病率不断增长,且趋于年轻化,美国等发达国家EC发病率高居妇科恶性肿瘤首位,中国EC的总死亡率居妇科恶性肿瘤第二位。表观遗传学改变在肿瘤的形成过程中起重要作用,尤其是基因启动子区异常甲基化,可造成抑癌基因沉默,从而促进肿瘤的发生、发展^[4]。性别决定区Y框蛋白1(sex determining region Y-box 1, *SOX1*)属于SOX家族,具有调控胚胎神经系统和晶状体发育的作用。研究发现^[5], *SOX1*在多种肿瘤中呈现低表达,且发现*SOX1*基因启动子区发生甲基化。波形蛋白(vimentin, *VIM*)属于中间丝家族,主要在结缔组织中表达,作用在于维持细胞形态、保持细胞质完整等。研究发现,*VIM*基因启动子区异常甲基化与乳腺癌、宫颈癌等多种癌症有关,但其在EC患者血清中的甲基化情况还未见报道^[6]。本研究采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)技术检测EC患者血清中*SOX1*、*VIM*基因启动子的甲基化状态,并探讨其对EC的临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择英山县人民医院2013年7月至2015年12月收治的120例EC患者为观察组,年龄33~76岁,平均(52.62±12.24)岁,平均体质指数(26.86±2.53)kg/m²,其中绝经期患者38例,所有患者均经病理检查确诊,且术前无进行放化疗及激素治

疗。根据2009年国际妇产科联盟的手术病理分期标准^[7]: I~II级104例, III~IV级16例;根据世界卫生组织EC组织分类标准^[8]: 子宫内膜样腺癌83例,浆液性腺癌23例,透明细胞腺癌14例;子宫肌层浸润深度<1/2者79例,浸润深度≥1/2者41例;淋巴结转移者25例,无淋巴结转移者95例。另选择同期于本院接受治疗的50例功能性子宫出血患者作为对照组,年龄35~70岁,平均(50.38±10.96)岁,平均体质指数(27.35±1.78)kg/m²,其中绝经15例。观察组与对照组的年龄、绝经情况、体质指数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所选受试者均排除心、肝、肾等器质性病变者。所有受试者均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 试剂和仪器

OIAamp DNA Blood Mini Kit 购自德国 Qia-gen 公司; QIAamp DNA Mini Kit 购自德国 Qia-gen 公司; EZ DNA Methylation-Gold Kit 购自美国 Zymo Research 公司; Zymo Taq DNA Polymerase 购自美国 Zymo Research 公司; *SOX1*, *VIM* 基因启动子甲基化引物购自上海生工生物工程有限公司; 溴化乙锭(EB)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 琼脂糖购自西班牙 Gene 公司; 微量移液器购自德国 Eppendorf 公司; 离心机购自美国贝克曼库尔特公司,型号: Allegra X-12; 翰旋震荡器购自广州仪科实验室技术有限公司; PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司; 蛋白核酸测定仪购自 Gene Quant 公司; 紫外灯箱购自美国 Coleparmer 公司; 凝胶电泳图像分析系统购自上海复日科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血液采集

采集受试者清晨空腹 5 mL 肘静脉血液, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液分装于 2 mL EP 管中, 保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.3.2 血清 DNA 的提取

分别用 OIAamp DNA Blood Mini Kit 和 QIAamp DNA Mini Kit 提取血清 DNA 和肿瘤组织 DNA, 实验操作方法严格按照说明书进行。用蛋白核酸测定仪测定 DNA 浓度及纯度, OD260/OD280 在 1.6~1.8 之间的 DNA 样品用于后续实验。

1.3.3 DNA 重亚硫酸盐修饰

用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 对 1 μg DNA 进行重亚硫酸盐修饰。向 PCR 管中分别加入 130 μL CT Conversion Reagent, 20 μL DNA 样品, 震荡混匀, 瞬时离心; 将 PCR 管放入 PCR 仪中 98℃ 10 min, 64℃ 2.5 h, 4℃ 保存; 向 PCR 管中加

入 600 μL M-洗涤缓冲液, 充分混匀; 将混合溶液转移至套有 2 mL 收集管的 Zymo-Spin™ IC 柱中, 离心 30 s; 依次向柱内加入 100 μL M-Wash, 200 μL M-脱磺化, 200 μL M-Wash, 10 μL M-Elution 缓冲液, 每次缓冲液加入后离心 30 s; 所得滤液即为修饰好的 DNA, 立即使用或于 -20℃ 冰箱中保存。

1.3.4 SOX1、VIM 基因启动子甲基化的检测

用 SOX1 和 VIM 基因启动子甲基化引物扩增修饰后的 DNA, 配制 25 μL MSP 反应体系: 12.5 μL Premix Taq, 1 μL 修饰 DNA, 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物和 10.5 μL DNase-free H₂O。MSP 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 45 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。最后用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯箱中曝光, 用凝胶电泳图像分析系统采集并分析图像数据, 见表 1。

表 1 SOX1 和 VIM 基因启动子甲基化引物
Table 1 Methylation primers for the promoters of SOX1 and VIM genes

引物名称		上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物大小(bp)
SOX1	M	CGTTTTTTTTTTTTTCGTTATTGGC	CCTACGCTCGATCCTCAACG	135
	U	TGTTTTTTTTTTTTTGTATTGGTG	CCTACACTCAATCCTCAACAAC	135
VIM	M	GGATTTTTTTGGTTTAGTTTTAGGC	AACATAATCCCGTTACTTCAACG	151
	U	ATTTTTTTGGTTTAGTTTTAGGTGG	ACATAATCCCATTACTTCAACACT	151

“M”指甲基化引物, “U”指非甲基化引物。

1.3.5 结果评定

甲基化引物扩增结果阳性, 非甲基化引物阴性代表“完全甲基化”; 甲基化引物扩增结果阳性, 非甲基化引物阳性代表“部分甲基化”; 甲基化引物扩增结果阴性, 非甲基化引物阳性代表“未甲基化”。“完全甲基化”与“部分甲基化”认定为甲基化阳性, “未甲基化”认定为甲基化阴性。甲基化阳性率 = 甲基化阳性数 / 总例数 × 100%。

1.4 数据统计分析

本研究利用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验; 计数资料用“率”描述, 用 χ^2 检验, 并对单独及联合检测的灵敏度、特异度进行分析。当 $P < 0.05$ 时, 差异有统计学意义。

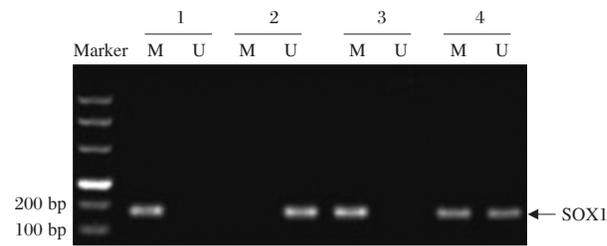
2 结果

2.1 EC 患者 SOX1 基因启动子甲基化情况

EC 患者血清 SOX1 基因启动子甲基化率为 71.67%, 对照组血清 SOX1 基因启动子甲基化率为 10.00%, 2 组间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。EC 患者肿瘤组织 SOX1 基因启动子甲基化率为 95.83%, 对照组肿瘤组织 SOX1 基因启动子甲基化率为 2.00%, 2 组间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1 和表 2。

2.2 EC 患者 VIM 基因启动子甲基化情况

EC 患者血清 VIM 基因启动子甲基化率为 60.83%, 对照组血清 VIM 基因启动子甲基化率为 12.00%, 2 组间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



M: 甲基化引物扩增结果; U: 非甲基化引物扩增结果。1: 阳性对照; 2: 对照组; 3: 血清组; 4: 组织组。

图1 SOX1 基因启动子甲基化 MSP 检测结果

Figure 1 The promoter of *SOX1* gene MSP detection results

EC 患者肿瘤组织 VIM 基因启动子甲基化率为 94.17%, 对照组肿瘤组织 SOX1 基因启动子甲基化率为 4.00%, 2 组间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 3。

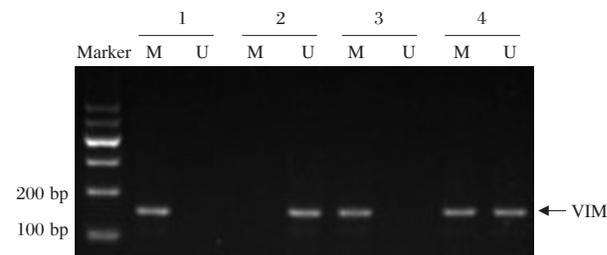
2.3 血清 SOX1、VIM 基因启动子甲基化与 EC 患者临床病理特征的关系

血清 SOX1、VIM 基因启动子甲基化水平与 EC 患者的病理分期、子宫肌层浸润深度、淋巴结转移情况有关 ($P < 0.05$), 与 HCC 患者的年龄、肿瘤类型无关 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 2 血清及肿瘤组织 SOX1 基因启动子甲基化阳性数目统计

Table 2 Statistics of methylation positivity of the promoter of *SOX1* gene in serum and tumor tissues

项目	血清 SOX1		χ^2	P	肿瘤组织 SOX1		χ^2	P
	观察组	对照组			观察组	对照组		
未甲基化	34	45	-	-	5	49	-	-
部分甲基化	52	3	-	-	67	1	-	-
完全甲基化	34	2	-	-	48	0	-	-
阳性率[n(%)]	86(71.67)	5(10.00)	53.955	0.000	115(95.83)	1(2.00)	143.371	0.000



M 代表甲基化引物扩增结果; U 代表非甲基化引物扩增结果。1: 阳性对照; 2: 对照组血清; 3: 血清组; 4: 组织组。

图2 VIM 基因启动子甲基化 MSP 检测结果

Figure 2 The promoter of *VIM* gene MSP detection results

2.4 血清 SOX1、VIM 基因启动子甲基化对 EC 的诊断价值

血清 SOX1、VIM 启动子甲基化单独及联合诊断的灵敏度依次为 71.67%、60.83%、81.67%, 特异度依次为 90.00%、88.00%、84.00%, 准确度依次为 77.06%、68.82%、86.47%。与 SOX1、VIM 单独诊断比较, 联合诊断的灵敏度、准确度均显著升高 ($P < 0.05$); 不同诊断方式的特异度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5。

表 3 血清及肿瘤组织 VIM 基因启动子甲基化阳性数目统计

Table 3 Statistics of methylation positivity of the promoter of *VIM* gene in serum and tumor tissues

项目	血清 VIM		χ^2	P	肿瘤组织 VIM		χ^2	P
	观察组	对照组			观察组	对照组		
未甲基化	47	44	-	-	7	48	-	-
部分甲基化	46	5	-	-	70	2	-	-
完全甲基化	27	1	-	-	43	0	-	-
阳性率[n(%)]	73(60.83)	6(12.00)	33.835	0.000	113(94.17)	2(4.00)	131.109	0.000

表4 血清SOX1、VIM基因启动子甲基化情况与EC患者临床病理特征的关系

Table 4 Relationship between serum of the promoter of *SOX1* and *VIM* methylation and clinicopathological characteristics of EC patients

临床病理特征	<i>n</i>	SOX1		χ^2	<i>P</i>	VIM		χ^2	<i>P</i>	
		阳性	阴性			阳性	阴性			
总数	-	120	86	34	-	-	73	47	-	-
年龄	<50岁	32	22	10	0.183	0.669	18	14	0.385	0.535
	≥50岁	88	64	24			55	33		
病理分期	I~II	104	71	33	4.434	0.035	59	45	5.510	0.019
	III~IV	16	15	1			14	2		
肿瘤类型	子宫内膜样腺癌	83	62	21	1.219	0.270	48	35	1.018	0.313
	其他类型	37	24	13			25	12		
子宫肌层浸润深度	<1/2	79	51	28	5.756	0.016	42	37	5.707	0.017
	≥1/2	41	35	6			31	10		
淋巴结转移	有	25	22	3	4.149	0.042	20	5	4.869	0.027
	无	95	64	31			53	42		

表5 血清SOX1、VIM启动子甲基化单独或联合诊断结果对比

Table 5 Comparison of diagnostic results of serum of the promoter of *SOX1* and *VIM* methylation alone or in combination

检测项目	灵敏度	特异度	准确度
SOX1	71.67%(86/120)	90.00%(45/50)	77.06%(131/170)
VIM	60.83%(73/120)	88.00%(44/50)	68.82%(117/170)
联合诊断	81.67%(105/120)*	84.00%(42/50)	86.47%(147/170)*

与SOX1单独诊断比较,**P*<0.05;与VIM单独诊断比较,**P*<0.05。

3 讨论

EC多发于中老年女性,在西方发达国家较为多发,在中国的发病率逐年上升^[9]。目前关于EC的具体发病机制尚未明确,大部分研究者认为是遗传信息改变,内分泌因素及外界环境因素共同作用的结果^[10]。虽然早期子宫内膜样腺癌(I型)的预后比较好,然而晚期,复发性及II型子宫内膜癌的预后极差,平均生存时间仅1年,及时治疗仍不能使中位生存时间提高。临床诊断EC的方法主要有诊断性刮宫、B超、电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)、核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、淋巴造影等。但B超难以分辨早期EC和子宫内膜炎;CT、MRI和淋巴造影步骤繁琐,费用昂贵,准确率仅为70%;诊断性刮宫不能确切评估病变范围,且可能会有漏诊或过度诊断^[11-12]。因此,寻找经济高效的肿瘤标志物是目前医学领域研究的方向。

本研究对EC患者血清SOX1基因启动子甲基化率进行检测,结果显示,EC患者血清SOX1基因启动子甲基化率较对照组女性显著升高,EC患者肿瘤组织SOX1基因启动子甲基化率显著高于对照组。DNA甲基化是一种常见的表观遗传学改变,其可抑制靶基因的表达,进而参与肿瘤的形成过程。SOX1蛋白在多种肿瘤中呈现低表达,SOX1基因启动子甲基化功能近年颇受关注。刘志礼等^[5]研究发现,宫颈癌组织中SOX1水平较良性组织明显降低,SOX1基因在宫颈鳞癌中呈现出高甲基化水平,甲基化率达81.5%,与本研究结果一致,说明EC患者血清SOX1启动子高甲基化水平,可用于EC的临床诊断。血清及肿瘤组织SOX1基因启动子甲基化水平与EC患者的病理分期、子宫肌层浸润深度、淋巴结转移情况有关,说明血清SOX1基因启动子甲基化水平越高,EC患者病情越严重,故血清SOX1启动子甲基化水平可一定程度上反映出EC患者病情的严重程度,其具体机制可能是SOX1基因启动子高甲基化而造成SOX1表达降

低,对肿瘤细胞局部侵袭和远处转移的影响。

本研究发现,EC患者血清VIM基因启动子甲基化率显著高于对照组女性,EC患者肿瘤组织VIM基因启动子甲基化率显著高于对照组。VIM为间充质细胞的特异性标志物,在细胞粘附、微管组装和骨架重塑过程中发挥重要作用。有研究发现^[6, 13-14],VIM与上皮-间质转化过程有关,而上皮-间质转化过程是癌细胞侵袭、转移的重要过程;VIM还可影响细胞凋亡,其在胞质内能与p53蛋白结合,影响p53的入核过程,从而促进细胞凋亡。以上研究结果说明VIM高表达能够抑制癌细胞侵袭、转移,促进癌细胞凋亡,而EC患者血清及肿瘤组织VIM启动子高甲基化水平,导致VIM表达降低,可能利于癌细胞增殖、侵袭和转移。与患者临床病理特征关系结果显示,血清VIM基因启动子甲基化水平与EC患者的病理分期、子宫肌层浸润深度、淋巴结转移情况有关,说明血清VIM启动子甲基化水平可一定程度上反映出EC患者病情的严重程度,其具体作用机制可能是因为VIM基因启动子甲基化而造成VIM及其他相关基因表达降低,进而导致EC患者发生病理学改变,但是具体机制尚不明确,还有待进一步分析。

本研究结果表明,血清SOX1、VIM启动子甲基化对EC均有一定的诊断价值,而与单独指标检测相比,血清SOX1、VIM启动子甲基化联合检测诊断EC的灵敏度、准确度均显著升高,与相关研究结果一致^[15-16],说明血清SOX1和VIM基因甲基化联合检测可用于临床EC的筛查及早期诊断,由于基因甲基化很容易在恶性肿瘤患者的个体或高危人群中检测到,因此对SOX1和VIM基因甲基化联合检测可进一步判定是否能作为临床筛查以及诊断的标准。

综上所述,EC患者血清SOX1、VIM启动子甲基化水平较对照组女性均显著升高,与患者病理分期、子宫肌层浸润深度及淋巴结转移情况有关,联合检测诊断EC的效能最高,说明SOX1和VIM基因甲基化是影响EC发生的潜在标志物,其联合检测可用于临床EC的筛查及早期诊断。然而,EC发生发展的机制复杂,血清SOX1、VIM启动子甲基化能否用于EC的临床诊断还需扩大样本进一步深入的探究。

参考文献

[1] 杨曦,马珂,吴成. 子宫内膜癌的流行病学及高危

因素[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(7):485-488.

- [2] 杨宝华,艾志宏. 子宫内膜癌的筛查现状[J]. 诊断学理论与实践, 2016, 15(2):202-204.
- [3] Doherty JA, Weiss NS, Freeman RJ, et al. Genetic factors in catechol estrogen metabolism in relation to the risk of endometrial cancer[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2016, 14(2):357-366.
- [4] 郑福利,党森,张森芳,等. 子宫内膜癌组织中趋化因子CXCL12及其受体CXCR4表达水平研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4):21-23.
- [5] 刘志礼,范永娟,李娜,等. GFRA1/SOX1甲基化检测对于宫颈癌诊断的临床意义[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(5):325-328.
- [6] Dwedar FI, Khalil GI, Nayer SA, et al. Aberrant vimentin methylation is characteristic of breast cancer[J]. *Advances in Breast Cancer Research*, 2016, 5(4):150-162.
- [7] 张英丽,丁国军,石磊,等. 术前磁共振对2009年FIGO分期标准I和II期子宫内膜癌诊断价值分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(20):1637-1640.
- [8] 沈丹华. 子宫内膜癌及癌前病变第4版WHO的分类解读[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(7):495-497.
- [9] 金滢,潘凌亚. 关注子宫内膜癌处理中的热点问题[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(4):435-435.
- [10] 杨晓辉,李小毛. 发病年龄对子宫内膜癌预后的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(7):1033-1036.
- [11] 郭威,曾照志,刘明标. CT联合MRI检查在子宫内膜癌临床分期诊断中的应用价值研究[J]. 中国现代医生, 2017, 55(17):99-101.
- [12] 艾永航. 宫腔镜在子宫内膜癌诊断中的应用价值[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2015, 11(1):69-71.
- [13] 陈震,郭燕. E-cadherin和Vimentin在OSCC上皮-间质转化中的作用及表达[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(8):857-860.
- [14] 吴佳玉,陈说,杨欣,等. Vimentin在子宫内膜腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(2):113-115.
- [15] Li N, Li S. Epigenetic inactivation of SOX1 promotes cell migration in lung cancer[J]. *Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology & Medicine*, 2015, 36(6):4603-4610.
- [16] Liu XY, Fan YC, Gao S, et al. Methylation of SOX1 and VIM promoters in serum as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *Neoplasma*, 2017, 64(5):745-753.

游离 β 人绒毛膜促性腺激素定量测定化学发光免疫分析法的建立与性能评价

伍华颖^{1,2} 王小艳³ 李志雄³ 董志宁³ 吴英松¹ 徐伟文*

【摘要】 目的 建立一种定量测定游离 β 人绒毛膜促性腺激素(free β human chorionic gonadotrophin, f- β -hCG)的化学发光免疫分析法,并对其性能进行评价。 方法 利用双抗体夹心法,对反应步骤进行筛选,建立游离 β 人绒毛膜促性腺激素定量测定的化学发光免疫分析法,并对其最低检测限、准确度、重复性、批间精密性、特异性、参考范围及样本比对进行评价。 结果 经过筛选,选用了二步法反应步骤;对f- β -hCG试剂盒进行方法学评价,最低检测限可达0.006 ng/mL,准确性相对偏差在2.56%~4.43%,线性在0~200 ng/mL,相关系数 $R^2=1$,重复性CV值均小于8%,批间CV值均小于15%;与罗氏的游离 β -绒毛膜促性腺激素定量测定试剂盒(电化学发光法)测定结果显著相关,一致性达0.965,线性回归方程为 $y=1.131x+0.826$,相关性 r 值为0.992,2种试剂盒的检测结果具有较高的一致性。 结论 本研究自制试剂盒的各项性能均能符合临床检验的要求,有望能替代昂贵的进口试剂应用于临床检测及研究。

【关键词】 化学发光免疫分析;游离 β 人绒毛膜促性腺激素;吖啶盐;磁微球

Quantitative determination of free β human chorionic gonadotropin: establishment and performance evaluation of chemiluminescence immunoassay

WU Huaying^{1,2}, WANG Xiaoyan³, LI Zhixiong³, DONG Zhining³, WU Yingsong¹, XU Weiwen^{1*}

(1. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. Zhaoqing Medical College, Zhaoqing, Guangdong, China, 526020; 3. Darui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

【ABSTRACT】 Objective To establish a chemiluminescence immunoassay for quantitative determination of free β human chorionic gonadotrophin (f- β -hCG) and evaluate its performance. Methods The double antibody sandwich method was used to screen the reaction steps, and the chemiluminescence immunoassay method for quantitative determination of free β human chorionic gonadotropin was established. The minimum detection limit, accuracy, repeatability, inter-assay precision and specificity were determined. The reference range and sample comparison were evaluated. Results After screening, the two-step reaction step was selected. The methodological evaluation of f- β -hCG kit was carried out. The minimum detection limit was 0.006 ng/mL, the relative deviation of accuracy was 2.56%-4.43%, the linearity was 0-200 ng/mL, the correlation coefficient $R^2=1$, the repetitive CV values are less than 8%, and the inter-assay CV values are less than 15%. Compared to the Roche's free β -chorionic gonadotropin quantification kit (electrochemiluminescence

基金项目:广东省重大科技专项项目(2012A080203012)

作者单位:1. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

2. 肇庆医学高等专科学校,广东,肇庆 526020

3. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

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

method), the results were significantly correlated, the consistency was 0.965, the linear regression equation was $y=1.131x+0.826$, and the correlation r value was 0.992. The detection results of the 2 kits were highly consistent. **Conclusion** The performance of the home-made kits in this study can meet the requirements of clinical testing, and it is expected to replace expensive imported reagents for clinical testing and research.

[KEY WORDS] Chemiluminescent immunoassay; free β human chorionic gonadotrophin; NSP-DMAE-NHS; Magnetic microspher

游离 β 人绒毛膜促性腺激素(free β human chorionic gonadotrophin, f- β -hCG)是由胎盘合体滋养细胞合成与分泌的一种糖蛋白激素,分子量为22.2 KD,是人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)的特有结构,决定其分子的生物学和免疫学特性。f- β -hCG在怀孕过程中伴随HCG一起出现及增长,因此是诊断早孕和孕中期的一项重要检测指标^[1-4]。血清中f- β -hCG测定不仅能诊断先兆流产、异位妊娠、葡萄胎、唐氏综合征、子痫前期等疾病^[5-7],也是治疗后及预后观察的重要检测指标。f- β -hCG检测还对生殖系统肿瘤如卵巢癌、滋养细胞肿瘤、男性睾丸肿瘤有辅助诊断价值,对一些非生殖系统的肿瘤也有一定辅助诊断意义^[8-9]。随着二胎政策的开放,高龄产妇增加,高危妊娠、异常妊娠概率相应增加,因此能准确测定作为孕期重要检测指标的f- β -hCG变得尤其重要。本研究旨在研制一种快速的、灵敏度高、准确性好的f- β -hCG定量测定化学发光试剂盒,以期为临床提供新的可选用的f- β -hCG检测试剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

确定参考值范围的样本:年龄在21~45岁未怀孕的女性健康查体者血清样本137例,平均年龄为34.5岁;年龄在19~48岁的9~13周低风险的孕妇血清样本635份,平均年龄为31.2岁,其中孕9周125例、孕10周129例、孕11周123例、孕12周131例、孕13周127例。

检测效能比对的样本:年龄在20~46岁的孕妇血清样本209例,平均年龄为38.3岁,其中孕9周11例、孕10周14例、孕11周62例、孕12周68例、孕13周54例。

以上血清样本均来自中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院。

1.1.2 试剂

一对配对f- β -hCG单克隆抗体均为美国Meridian公司产品;人源性f- β -hCG蛋白来源于美国Fitzgerald公司;磁微球购自美国的Invitrogen公司;发光物质吖啶盐来自于苏州亚科科技股份有限公司;德国罗氏公司的游离 β -绒毛膜促性腺激素定量测定试剂盒(电化学发光法);企业标准品和企业质控品由广州市达瑞生物技术股份有限公司制备。

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

1.1.3 仪器

厦门优迈科医学仪器有限公司的全自动化学发光免疫分析仪;德国罗氏公司cobas e601全自动电化学发光免疫分析系统。

1.2 方法

1.2.1 磁微球包被抗体

取0.5 mg f- β -hCG单克隆抗体于超滤离心管中,用0.1 mol/L MES缓冲液重复洗涤8次,收集抗体待用;磁微球用0.1 mol/L MES缓冲液清洗6次后活化20 min,活化后的磁微球再用0.1 mol/L MES缓冲液重复洗涤6次,加入收集好的待用的抗体,放置37℃振荡反应24 h;用0.1 mol/L MES缓冲液重复洗涤2次,再用含5% BSA的Tris缓冲液37℃振荡2 h进行封闭未结合位点;用含5% BSA的Tris缓冲液洗涤2次,加入含有蛋白保护剂的缓冲液,放置于2~8℃保存。

1.2.2 抗体标记吖啶盐

取0.5 mg单克隆抗体于超滤离心管中,用0.1 mol/L PB缓冲液重复洗涤6次后收集抗体,将0.01 mg吖啶盐加入收集好的单克隆抗体中,放置于恒温摇床上避光反应16 h,进行分离纯化,纯化后的标记抗体加入蛋白保护剂,放置于2~8℃保存。

1.2.3 使用浓度的选择

1.2.3.1 磁微球使用浓度的选择

将包被有抗体的磁微球稀释到50 μ g/mL、

100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 3 个使用浓度, 分别加入 25 μL 抗原及 100 μL 标记有吡啶盐的抗体, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min 后进行清洗, 加入预激发液和激发液进行发光值检测。通过发光值比较得出磁微球的使用浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.3.2 吡啶盐标记物使用浓度的选择

将标记有抗体的吡啶盐稀释到 15 ng/mL 、30 ng/mL 、60 ng/mL 3 个使用浓度, 分别加入 25 μL 抗原及 50 μL 200 $\mu\text{g/mL}$ 磁微球, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min 后进行清洗, 加入预激发液和激发液进行发光值检测。通过发光值比较得出吡啶盐标记物使用浓度为 30 ng/mL 。

1.2.4 反应步骤选择

1.2.4.1 一步法

分别将 25 μL 样本、50 μL 包被有抗体的磁微球、100 μL 标记有吡啶盐的抗体依次加入反应杯,

恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min 后进行清洗, 加入预激发液和激发液进行发光值检测。

1.2.4.2 一点五步法

将 25 μL 样本、50 μL 包被有抗体的磁微球加入反应杯, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min, 再加入 100 μL 标记有吡啶盐的抗体, 继续于恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min 后进行清洗, 加入预激发液和激发液进行发光值检测。

1.2.4.3 两步法

将 25 μL 样本、50 μL 包被有抗体的磁微球加入反应杯, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min 后进行清洗, 加入 100 μL 标记有吡啶盐的抗体, 继续恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 15 min, 再进行清洗, 加入预激发液和激发液进行发光值检测。

1.2.5 反应原理

f- β -hCG 化学发光法的反应原理如图 1。

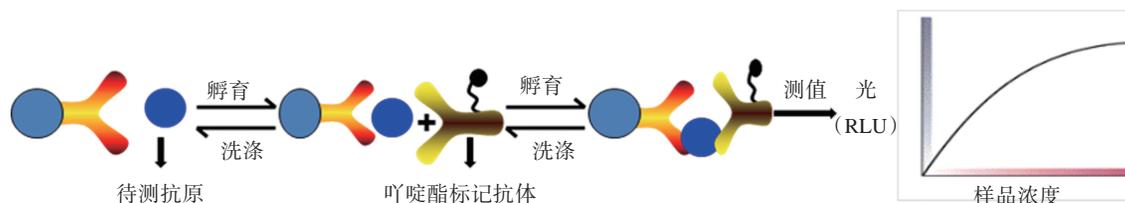


图 1 f- β -hCG 的反应原理
Figure 1 The reaction of f- β -hCG

1.3 分析性能评价

1.3.1 最低检测限试验

用自制的 f- β -hCG 试剂盒对零浓度校准品进行重复测定 20 次, 计算 20 次测量结果的平均发光值 (mean, M) 和标准差 (standard deviation, SD), 得出 $M+2SD$ 值, 根据零浓度校准品和相邻浓度校准品的发光值进行两点回归拟合得到一次方程, 将 $M+2SD$ 值代入上述方程中, 计算得到的浓度即为最低检出限。

1.3.2 准确性试验

用样本稀释液对游离 β -绒毛膜促性腺激素国家标准品进行稀释, 使其最终浓度约为 5 ng/mL 和 100 ng/mL , 将其作为样本重复检测 3 次, 测得的平均浓度记为 M, 根据公式: 测量偏差 = $(M - \text{理论值}) / \text{理论值} \times 100\%$ 。

1.3.3 线性试验

用高值样本按 5 个比例稀释为 5 个不同浓度样本, 其中最低浓度样本的浓度值接近最低检测

限浓度值。对 5 个浓度样本分别进行 3 次重复检测, 计算每个样本的平均值, 再用样本的平均值和相应的稀释比例进行四参数拟合, 计算线性相关系数 r 。

1.3.4 重复性试验

用自制的 f- β -hCG 试剂盒分别对浓度为 20 ng/mL 、50 ng/mL 、150 ng/mL 3 个低、中、高浓度的企业质控品进行重复检测 20 次, 再分别计算出每个质控品 20 次检测结果的平均值 (M) 和标准差 (SD) 值, 按变异系数 (variable coefficient, CV) 公式 $CV = SD / M \times 100\%$ 得出变异系数。

1.3.5 批间精密度试验

用 3 个不同批次自制 f- β -hCG 试剂盒分别检测 3 个低、中、高浓度的企业质控品, 重复检测 20 次, 计算 60 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD, 计算其变异系数 (CV)。

1.3.6 特异性试验

用自制 f- β -hCG 试剂盒对促甲状腺激素 (300

mIU/L)、促卵泡激素(200 IU/L)及促黄体生成素(250 IU/L)进行检测,各检测3次。

1.3.7 参考值范围

用自制的f-β-hCG试剂盒检测经德国罗氏公司β-绒毛膜促性腺激素定量测定试剂盒(电化学发光法)检测的772份血清样本,其中635例为9~13孕周的低风险母体血清样本,137例为未怀孕查体者的血清样本,根据检测结果提供自制试剂盒的参考值范围。

1.3.8 样本检测效能比对

以德国罗氏公司的β-绒毛膜促性腺激素定量测定试剂盒(电化学发光法)作为对照试剂,用自制的f-β-hCG试剂盒检测209例孕妇血清样本,分析2种试剂盒检测结果的相关性和一致性。

1.4 统计学处理

用OriginPro7.5进行四参数拟合建立自制试剂盒线性相关系数 r ,及对不同反应模式的浓度梯度

f-β-hCG剂量-反应拟合Hill曲线,选择线性关系较好的曲线对应的反应模式。利用SPSS 24.0统计软件统计分析f-β-hCG在各孕周的浓度分布情况及相关性;用Medcalc软件进行Bland-Altman分析,对2种试剂盒的一致性作进一步分析。

2 结果

2.1 反应步骤选择

用包被有抗体的磁微球和标记有抗体的吖啶盐按照一步法、一点五步法、两步法反应步骤,以双抗体夹心法建立f-β-hCG的化学发光免疫分析法,对不同浓度f-β-hCG企业标准品进行检测。将剂量-反应拟合Hill曲线,结果见表1,根据表1结果可知3种反应步骤中一步法不仅本底比较高且曲线线性相关性比较差,两步法本底比较低且曲线线性相关性最好, R^2 为0.9976。所以我们选择了曲线线性相关性最佳的两步法。

表1 浓度与发光值的Hill曲线方程

Table 1 Hill curve equation of concentration and luminescence

反应步骤	本底发光值	Hill曲线方程	R^2
一步法	5 487	$y=4\ 569\ 125x^{-0.894\ 54}/(66.451\ 2^{-0.894\ 54}+x^{-0.894\ 54})$	0.937 4
一点五步法	5 041	$y=12\ 674\ 522x^{-1.074\ 58}/(74.125\ 3^{-1.074\ 58}+x^{-1.074\ 58})$	0.954 2
两步法	1 472	$y=28\ 974\ 510x^{-1.257\ 84}/(66.451\ 2^{-1.257\ 84}+x^{-1.257\ 84})$	0.997 6

2.2 分析性能评价

2.2.1 自制f-β-hCG试剂盒定标与质量控制

用校准品对自制f-β-hCG试剂盒进行校准曲线定标,定标成功后,再用第三方广州邦德盛生物科技公司的血清质控品进行质量控制,定标结果见图2,质量控制结果见表2。

表2 质控品检测结果

Table 2 Measurement results of control

质控品	检测次数	检测结果 (ng/mL)	质控范围 (ng/mL)	是否符合质控标准
质控品1	3	18.45±0.65	15.46~23.54	符合
质控品2	3	48.33±2.58	41.33~51.25	符合
质控品3	3	147.58±5.42	121.41~180.20	符合

2.2.2 最低检测限

根据零浓度校准品和相邻浓度校准品的浓度-

发光值的结果进行两点回归拟合,得出一次性方程,得到零浓度校准品的M值为1 051,SD值为32.41,将零浓度校准品的M+2SD值1 115.82代入上述方程中,得到最低检测限为0.006 ng/mL,不高于0.5 ng/mL。

2.2.3 准确性

对浓度稀释至5 ng/mL和100 ng/mL的2个f-β-hCG国家标准品样本进行检测,浓度为5 ng/mL的国家标准品样本的检测结果为(5.13±0.21)ng/mL,相对偏差为4.43%;浓度为100 ng/mL的国家标准品样本的检测结果为(98.45±2.33)ng/mL,相对偏差为2.56%。本试剂盒准确性相对偏差均在±10%范围内。

2.2.4 线性

用浓度为200 ng/mL高值样本按5个比例稀释为5个不同浓度样本,对5个浓度样本分别进行3次重复检测,计算每个样本的平均值,将检

测结果进行四参数拟合,得出线性方程为 $Y=359\ 847.365\ 87+(0.068\ 94-359\ 847.365\ 87)/(1+(X/1\ 924.888\ 42)^{0.991\ 85})$,线性相关系数 R^2 为 1,线性很好(表3、图3)。

表3 线性检测结果($n=3$)

Table 3 Measurement results of linearity($n=3$)

样本	稀释比例	理论浓度 (ng/mL)	检测结果 (ng/mL)	相对偏差 (%)
1	1	200	198.86±1.08	-0.57
2	1/2	100	99.72±1.38	-0.28
3	1/4	50	50.65±2.38	1.30
4	1/40	5	5.22±0.20	4.40
5	1/400	0.5	0.48±0.03	-4.00

2.2.5 重复性

其变异系数(CV)在 1.83%~4.35%之间,均小于 8%,结果见表4。

2.2.6 批间精密度试验

用3个批次自制 f-β-hCG 试剂盒分别检测浓度为 20 ng/mL、50 ng/mL、150 ng/mL 3个低、中、高浓度的企业质控品,其变异系数(CV)分别为 2.88%、5.43%、3.67%,均小于 15%,结果见表4。

表4 重复性和批间精密度的结果

Table 4 The results of repeatability and precision between different assays

样本浓度 (ng/mL)	重复性($n_1=20$)			批间精密度($n_2=60$)		
	平均浓度(M) (ng/mL)	SD (ng/mL)	变异系数 (%)	平均浓度(M) (ng/mL)	SD (ng/mL)	变异系数 (%)
20	18.67	0.354	1.83	19.24	0.598	2.88
50	50.97	2.12	4.35	51.54	3.86	5.43
150	148.45	3.54	2.12	145.55	4.88	3.67

2.2.7 特异性

将促甲状腺激素(300 mIU/L)、促卵泡激素(200 IU/L)及促黄体生成素(250 IU/L)作为样本用自制 f-β-hCG 试剂盒检测,结果见表7,本自制试剂盒对促甲状腺激素检测结果为(0.32±0.015) ng/mL、促卵泡激素检测结果为(0.24±0.031) ng/mL、促黄体生成素检测结果为(0.45±0.024) ng/mL,交叉反应检测结果均不高于 0.5 ng/mL。

2.3 参考值范围建立

用自制 f-β-hCG 试剂盒对 137 份未怀孕查体

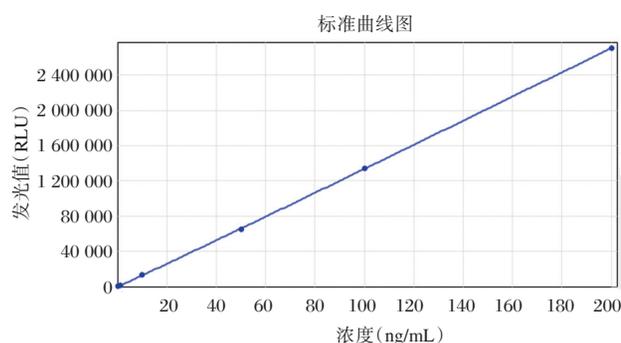


图2 f-β-hCG 定标曲线

Figure 2 Calibration curve of f-β-hCG

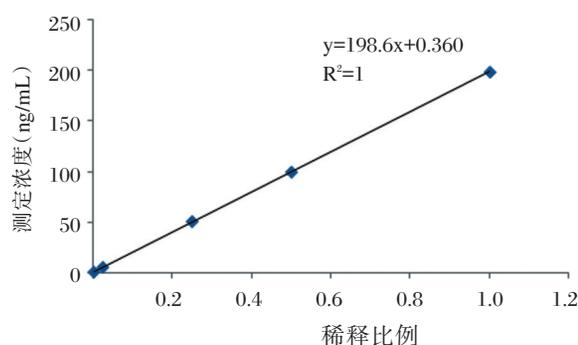


图3 f-β-hCG 线性拟合

Figure 3 Linear fitting of f-β-hCG

者的血清样本进行检测,检测结果用 SPSS 24.0 统计软件进行统计分析,并对检测结果按百分数法进行排序,得到未怀孕查体者样本研究的参考范围为 0~0.5 ng/mL,结果见图4。

用自制 f-β-hCG 试剂盒对 635 份 9~13 周低风险的孕妇血清样本进行检测,分别列出每个孕期的平均值、中位数、第二点五位百分数和第九十七点五位百分数,为自制 f-β-hCG 试剂盒提供不同孕周 f-β-hCG 的正常值参考范围,结果见表5。

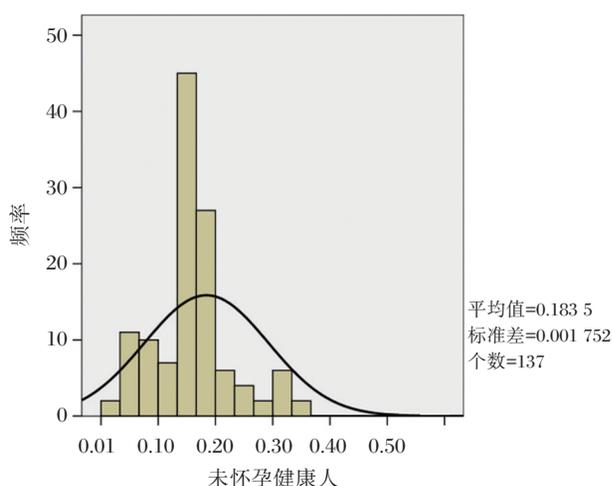


图4 137份未怀孕查体者f-β-hCG测值直方图

Figure 4 Histogram of f-β-hCG in 137 unpregnant women

表5 不同孕周孕妇血清中f-β-hCG的浓度

Table 5 Concentrations of f-β-hCG in serum at different weeks of gestation

孕周	例数	范围(ng/mL)			
		平均值	中位数	2.50%	97.50%
9	125	103.59	101.56	21.43	192.46
10	129	89.05	89.63	18.61	152.26
11	123	72.07	69.12	15.13	135.75
12	131	58.17	53.82	12.94	107.43
13	127	41.43	38.39	11.13	87.69

2.4 样本检测效能比对

对年龄在20~46岁的孕9~13周的209份孕妇血清样本进行检测,根据各孕周的正常参考值范围,对照试剂检测出高值样本46例,低值样本33例,正常样本130例;自制试剂盒检测出高值样本46例,低值样本35例,正常样本128例,两者不一致样本有4例,见表6。从定性结果的一致性上分析,自制试剂盒与对照试剂盒的高值异常符合率为97.8%,低值异常符合率为94.3%,正常符合率为99.2%,总符合率为98.1%。

采用SPSS 24.0统计软件计算卡方值及其置信区间、相关性r值、线性回归方程和画出散点图。一致性达0.965($P < 0.01$, 95%置信区间为0.934~0.992)(表7),相关性r值为0.992($P < 0.01$, 95%置信区间为0.989~0.995)(表8),线性回归方程为 $y = 1.131x + 0.826$ ($P < 0.01$, B的95%置信区间为

表6 样本统计归纳表

Table 6 Table of sample statistics summary

试验	对照试剂			合计	
	正常	高值异常	低值异常		
自制试剂	正常	127	1	0	128
	高值异常	1	45	0	46
	低值异常	2	0	33	35
合计	130	46	33	209	

表7 样本一致性的计算结果

Table 7 The calculated results of Kappa values for sample

测值	偏差	引导程序		
		标准误差	95%置信区间	
			低值	高值
一致性	0.965	0.000	0.934	0.992
有效例数	209	0	209	209

表8 样本相关性分析结果

Table 8 The results of correlation analysis for sample

	自制试剂	对照试剂	
	相关系数	1	0.992
显著性(双尾)	/	0.000	
数量	209	209	
自制试剂	引导程序偏差	0	0.000
	标准误差	0	0.001
	95%置信区间低值	1	0.989
	高值	1	0.995
	相关系数	0.992	1
显著性(双尾)	0.000	/	
数量	209	209	
对照试剂	引导程序偏差	0.000	0
	标准误差	0.001	0
	95%置信区间低值	0.989	1
	高值	0.995	1

相关性在 $\alpha = 0.01$ 水平上显著(双尾), / 表示空白。

1.111~1.151)(表9),散点图见图5,判定系数 $R^2 = 0.980$ 。采用MedCalc统计软件作Bland-Altman分析,对自制试剂盒和对照试剂盒的一致性作进一步分析,为了使Bland-Altman分析图成正态分布,将自制试剂盒与对照试剂盒的测值进行对数转

换,使用其对数值进行 Bland-Altman 分析,以自制试剂盒测值对数与对照试剂盒测值对数的均值为 X 轴,以两者的差值为 Y 轴,绘制散点图(图 6),由图 6 可见,差值的均数为-0.07,差值 95% 的分布界限,即 95% 一致性界限为 (-0.01~0.14) ng/mL,经反对数变换,95% 一致性界限为 (0.98~

1.38) ng/mL,偏差在±2.5 ng/mL 之间。在 95% 一致性界限的可信区间之外,仅有 6.2% (13/209) 的点存在;在 95% 一致性界限的可信区间之内,其中差值绝对值的最大值为 0.02,而其均值为 1.90,经反对数变换,差值绝对值的最大值为 1.08 ng/mL,其均值为 79.4 ng/mL。

表 9 样本线性回归分析表

Table 9 The analysis of linear regression for sample

模式	非标准化系数		标准系数	T	显著性	自制试剂盒的 95% 置信区间	
	自制试剂盒	标准错误	β			低值	高值
1(常量)	0.826	0.603		1.369	0.173	-0.363	2.015
对照试剂	1.131	0.010	0.992	110.667	0.000	1.111	1.151

因变量:自制试剂盒。

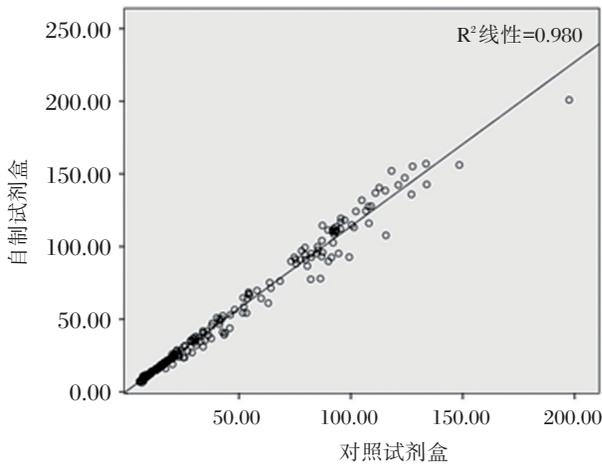


图 5 相关性分析散点图

Figure 5 The scatter plot of correlation analysis

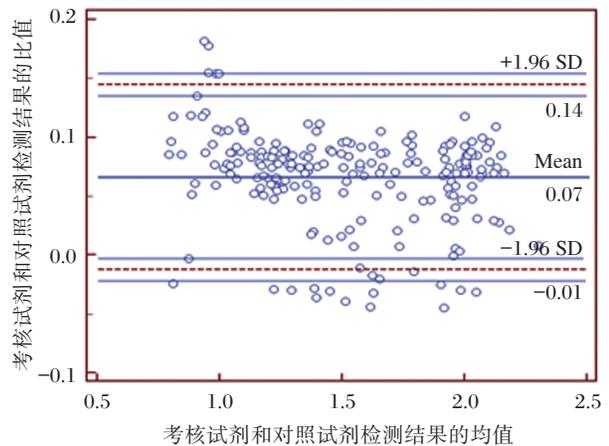


图 6 Bland-Altman 分析图

Figure 6 The chart of Bland-Altman analysis

3 讨论

在女性健康方面,f- β -hCG 的测定在临床上有助于诊断和检测妊娠滋养细胞疾病^[10-13]及早期诊断不良妊娠,是识别绒毛膜癌和胎盘部位滋养细胞肿瘤的一个标志物。f- β -hCG 也是女性多种非滋养细胞恶性肿瘤中的一个标志物,如宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌。f- β -hCG 联合 CA125 检测可提高卵巢癌的诊断率。

然而 f- β -hCG 并非女性的专属肿瘤标志物,在男性生殖细胞肿瘤特别是睾丸癌的检测与跟踪中,f- β -hCG 的检测也具有很重要的意义。对于胃肠道、肝部的恶性肿瘤的检出,f- β -hCG 的检测同

样具有意义^[14]。

f- β -hCG 检测对预后评价起着重要的作用。在胃肠道肿瘤和卵巢癌中,f- β -hCG 是一个独立的预后因子;f- β -hCG 在临床上亦用于监控肺癌;f- β -hCG 蛋白的高表达是乳腺癌不良预后的明显标志。因此,肿瘤患者在治疗之前检测 f- β -hCG 可为临床医生提供非常重要的治疗指导作用^[15]。

目前临床上用于定量检测 f- β -hCG 的方法主要有放射免疫分析法、时间分辨荧光法、酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法、化学发光法等。过去以放射免疫分析法为代表的游离 β 人绒毛膜促性腺激素测定试剂盒,由于受方法学的限制,存在试剂稳定性差、放

射性污染等缺点,且操作过程比较复杂,已基本退出市场,目前应用较广泛的是酶联免疫检测技术和化学发光技术^[16-17]。

本研究以双抗体夹心法建立了一种定量检测 f- β -hCG 的化学发光技术新方法,用磁微球以共价交联的方式包被抗体作为固相载体,不仅实现管式全自动化,还能增强发光信号,提高稳定性^[18]。用吡啶盐作为标记物,以过氧化氢和氢氧化钠为启动剂,直接发光反应,简单、快速、稳定、无放射性同位素损伤和污染。

迄今国内外暂未有用吡啶盐标记测定 f- β -hCG 的化学发光方法的相关报道,因此,本研究在质控品检测结果均符合要求、实验结果准确可靠的情况下,对自制 f- β -hCG 试剂盒进行各项性能评价,自制试剂盒的最低检测限能达到 0.006 ng/mL,而国内外市场使用率较高的罗氏进口 f- β -hCG 试剂盒最低检测限为 0.01 ng/mL,自制试剂盒灵敏度更优;通过样本效能比对试验,自制试剂盒与罗氏进口试剂盒的相关性达到 0.992、一致性达到 0.965,总符合率为 98.1%,说明自制试剂盒与进口试剂盒具有较好的一致性,同时也说明了自制试剂盒质量甚至更优于进口试剂盒。自制试剂盒的准确度的相对偏差最高为 4.43%,其具有良好的重复性和精密性,批内重复性 CV 值小于 8%,批间精密度试验 CV 值小于 15%,线性范围在 0~200 ng/mL 之间,相关性很好,特异性比较高。

自制试剂盒与罗氏进口试剂盒进行样本检测效能比对,自制试剂盒的一致性达到 0.965,相关性 r 值达到 0.992,说明自制试剂盒与应用较广的进口试剂盒具有较好的一致性及等效性。

根据郭翀等人^[19]和邹丽萍^[20]分别用时间分辨荧光法及光激化学发光法评价 f- β -hCG 的结果,时间分辨荧光法及光激化学发光法的灵敏度分别为 0.09 ng/mL 和 0.11 ng/mL、重复性均 CV 值小于 10%,而自制试剂盒的灵敏度能达到 0.006 ng/mL、重复性 CV 值小于 8%。因此,本研究用化学发光法研究的自制试剂盒各项性能均优于用时间分辨荧光法及光激化学发光法研制的试剂盒。综上所述,用化学发光法建立的游离 β 人绒毛膜促性腺激素定量测定试剂盒灵敏度高、准确性高、重复性好、线性范围宽、特异性高,有望能替代昂贵的进口试剂应用于临床检测及研究。

参考文献

- [1] 王伟. 血清学指标结合彩色多普勒超声对孕早期唐氏综合征筛查的研究[J]. 当代医学, 2011, 17(15):102-104.
- [2] Huang T, Dennis A, Meschino WS, et al. First trimester screening for Down syndrome using nuchal translucency, maternal serum pregnancy-associated plasma protein A, free- β human chorionic gonadotrophin, placental growth factor, and α -fetoprotein[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(7):709-716.
- [3] 张英芝, 薛志华, 李成磊. 孕中期血清学产前筛查的临床价值探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(5):70-71.
- [4] 龙伟, 陆蓓亦, 王晶, 等. 孕中期血清 AFP、uE3 和 f- β -hCG 水平与子痫前期的关系研究[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2016, 8(3):35-39.
- [5] 牛红玲, 陈永宏. 血清标志物 AFP、F- β hCG 与不良妊娠结局的相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(33):5751-5753.
- [6] 丁海英, 赵应梅, 朱品华, 等. 血清游离 β -人绒毛膜促性腺激素或甲胎蛋白水平与孕妇并发症的相关性[J]. 中国医药导报, 2016, 13(21):119-122, 126.
- [7] Illescas T, Ortega D, Soler P, Costa G, et al. First trimester screening for aneuploidies in successive pregnancies: correlations between markers[J]. Prenat Diagn, 2012, 32(1):50-56.
- [8] Toriola AT, Tolockiene E, Schock H, et al. Free β -human chorionic gonadotropin, total human chorionic gonadotropin and maternal risk of breast cancer[J]. 2014, 10(3):377-384.
- [9] 吴伟晴, 廖淑萍, 林小兰, 等. 血清肿瘤标志物在五种消化系统肿瘤诊断中的价值[J]. 现代消化及介入诊疗, 2016, 21(4):550-554.
- [10] Kirkegaard I, Ulbjerg N, Tabor A, Henriksen TB. Longer time-to-pregnancy in spontaneously conceived pregnancies is associated with lower PAPP-A and free β -hCG in first trimester screening for Down syndrome[J]. Prenatal Diagnosis, 2014, 34(3):235-240.
- [11] Cavoretto P, Giorgione V, Cipriani S, et al. Nuchal translucency measurement, free β -hCG and PAPP-A concentrations in IVF/ICSI pregnancies: systematic review and meta-analysis[J]. Prenatal Diagnosis, 2017, 37(6):540-555.
- [12] Spencer K, Cowans NJ. Analytical goal setting in aneuploidy screening: within person biological variability of first trimester biochemical markers[J]. Prenatal Diagnosis, 2013, 33(2):124-129. (下转第 346 页)

2017年度人EGFR基因突变检测试剂盒抽验质量分析

孙楠 于婷 黄杰 曲守方*

[摘要] 目的 按照国家体外诊断试剂抽验工作方案,从8家企业共抽检9批次的“人EGFR基因突变检测试剂盒”,评价该试剂盒的质量。方法 依据企业产品技术要求,使用企业参考品对试剂盒的准确性、特异性、检测限和重复性进行检验,同时依据EGFR基因突变检测试剂盒即将实施的行业标准,使用统一参考品,对试剂盒进行探索性研究。结果 9批次试剂均符合各自产品技术要求。探索性研究发现,试剂盒准确性和检测限均有1批次的1个突变位点未检出。结论 各企业产品技术要求存在差异,影响产品质量。建议将来及时根据行业标准更新企业技术要求,并统一使用国家参考品进行检测。

[关键词] EGFR; 检测试剂盒; 质量分析; 准确性; 特异性; 检测限

Quality analysis of human EGFR gene mutation detection kits in 2017

SUN Nan, YU Ting, HUANG Jie, QU Shoufang*

(The Key Laboratory of Biotechnology Product Test Method and Its Standardization of the Ministry of Health, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] Objective According to the national *in vitro* diagnostic reagent sampling program, 9 batches of “human EGFR gene mutation detection kit” were sampled from 8 companies to evaluate the quality of the kit. Methods The accuracy, specificity, limit of detection and repeatability were verified in accordance with the product technical requirements. Exploratory study was also contacted by using the national reference and referring to the industry standards to be released. Results All of testing reagents met the product technical requirements of each company. According to the industry standard to be implemented, one mutation from one batch was not detected in the accuracy and limit of detection. Conclusion There are differences in technical requirements of each company's products, which affect product quality. It is recommended that the technical requirements of the enterprise be updated in a timely manner according to industry standards, and the national reference products should be used for testing.

[KEY WORDS] EGFR; Detection kits; Quality analysis; Accuracy; Specificity; Limit of detection

人表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区以及胞内区组成。其中胞内区为酪氨酸激酶功能区,由EGFR的18~24号外显子编码。EGFR突变主要发生在胞内酪氨酸激酶区域的前4个外显子上(18~21),其中外显子19和外显子21突变最为常见,是EGFR酪氨酸

激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)的敏感性突变^[1-3]。而发生在外显子20上的T790M突变为EGFR-TKI耐药突变^[4]。目前,EGFR-TKI是非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)治疗中研究最多、证据最充分、应用最广泛的分子靶向治疗药物。因此,了解EGFR基因突变状态是临床衡量肿瘤患者对EGFR-TKI疗效的最重要手段。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划):新型体外诊断试剂质量评价体系和国家参考物质研究项目(2011AA02A115)

作者单位:中国食品药品检定研究院,卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京100050

*通讯作者:曲守方, E-mail:qushoufang@126.com

针对 *EGFR* 基因突变检测方法有直接测序法 (sanger sequencing)、探针扩增阻滞突变系统法 (amplification refractory mutation system, ARMS)、荧光原位杂交法 (fluorescence in situ hybridization, FISH)^[5]、高分辨熔点曲线分析法 (high resolution melting, HRM)^[6]、变性高效液相色谱技术 (denaturing high performance liquid chromatography, DH-PLC)^[7]、数字 PCR (digital PCR)^[8] 以及二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 等^[9]。其中, 直接测序由于技术的可靠性以及相对简单的操作使其成为基因突变检测的“金标准”^[10]。ARMS 荧光定量 PCR 法是检测 *EGFR* 基因突变最常用的方法^[11]。目前我国有很多企业研制针对 *EGFR* 基因突变检测的诊断试剂盒, 主要用于检测人 *EGFR* 基因中的 18-21 外显子上的常见突变。然而, 各厂家试剂盒质量参差不齐, 不能完全满足临床诊断需求。因此, 本文对抽样的 8 家企业 9 批次 *EGFR* 基因突变检测试剂盒进行检测, 分别采用各企业参考品以及国家参考品对抽检试剂盒进行性能评估, 以期了解各厂家研制的 *EGFR* 基因突变检测试剂盒质量情况。

1 材料与方法

1.1 材料

从 8 家使用单位和生产企业 (武汉海吉力生物科技有限公司; 厦门艾德生物医药科技股份有限公司; 益善生物技术股份有限公司; 北京雅康博生物科技有限公司; 无锡市锐奇基因生物科技有限公司; 上海源奇生物医药科技股份有限公司; 武汉友芝友医疗科技股份有限公司; 江苏为真生物医药科技股份有限公司) 共抽检到 9 批次的“人 *EGFR* 基因突变检测试剂盒”, 用于本研究抽验对象。其中荧光 PCR 法 8 批次, 流式荧光杂交法 1 批次。同时由各单位提供企业参考品用于评价抽检试剂盒是否符合该生产厂家的注册标准。

使用临床样本来源的人类 *EGFR* 基因突变检测统一参考品, 用于探索性研究测试本次抽检的 5 个批次试剂盒。该参考品浓度为 2 ng/ μ L, 通过已获注册证的 *EGFR* 试剂盒 (厦门艾德生物医药科技股份有限公司) 对临床样本进行初筛, 再用 Sanger 测序法进行确认突变位点信息。该参考品包括: ①阳性参考品 P1-P7, 来源于 7 例非小细胞肺癌患者的 FFPE 样本, 经 Sanger 测序验证具有相对应

的 *EGFR* 基因突变位点, 突变类型包括 19-Del、L858R、T790M、20-ins、G719X、S768I、L861Q。②阴性参考品 N1-N3, 来源于 3 例临床上经过 Sanger 测序法检测 *EGFR* 基因突变均为阴性的非小细胞肺癌患者的 FFPE 样本。③检测限参考品 L1-L21, 经数字 PCR 定量确定突变比率为 1% 的样本。④重复性参考品 P1-P3, P1 为野生型样本、P2 和 P3 分别具有 *EGFR* 19-Del 突变以及 S768I 突变的样本。

1.2 方法

1.2.1 以企业注册标准/产品技术要求检验

采用各企业提供参考品, 分别检测对应抽检的检测试剂盒。所有检验均按照企业注册标准/产品技术要求进行, 检验项目包括准确性 (阳性参考品符合率)、特异性 (阴性参考品符合率)、检测限和重复性。操作步骤严格按照各企业检测试剂盒说明书的要求进行, 最后对实验结果进行判定。

为了验证抽验试剂盒的有效性, 选取一家生产厂家的抽检试剂盒 (荧光 PCR 法), 分别从不同抽样环节、不同适用机型以及不同样本类型进行检测, 对比分析不同条件下试剂盒的准确性、特异性、检测限以及精密度。①从生产环节和使用环节抽取相同批号的试剂进行测定; ②根据其说明书中适用机型, 分别选取 PCR 测定仪 Stratagene Mx3000P (Agilent, 美国) 和 PCR 测定仪 ABI-7500 (Life Tech, 美国) 进行测定; ③针对检测样本适用于组织样本和外周血样本, 分别设置最低检出限要求进行测定 (病理组织样本在 10 ng/ μ L 野生型基因组 DNA 背景下, 对突变 DNA 含量为 5% 的检测限参考品能够准确检出; 外周血样本在突变 DNA 含量为 10% 背景下, 对 DNA 浓度为 1 ng/ μ L 的检测限参考品能够准确检出。)

1.2.2 探索性研究

采用人类 *EGFR* 基因突变检测统一参考品对本次抽验的 5 个 *EGFR* 检测试剂盒进行探索性研究。参照产品行业标准《人类 *EGFR* 基因突变检测试剂盒》^[12] 报批稿的要求, 同时进行准确性 (阳性符合率)、特异性 (阴性符合率)、重复性和检测限项目的检验。操作步骤严格按照各企业检测试剂盒说明书的要求进行, 最后对实验结果进行判定。

1.2.3 统计学分析

分别统计样本 Ct 值的平均值、标准差和变异系数 (coefficient of variation, CV)。采用 Ct 值的 CV 用于考察试剂盒的精密度。

2 结果

2.1 以企业注册标准/产品技术要求检验

9批次 *EGFR* 基因突变检测试剂盒准确性、特异性和检测限分别符合各企业注册标准/产品技术要求,重复性检测中,1批次由于抽样量不足,未进行检测,其他8批次均符合规定。

本次监督抽验对同一生产厂家,分别从不同抽样环节、不同适用机型以及不同样本类型进行检测,对比分析不同条件下试剂盒的准确性、特异性、检测限以及精密度。根据表1结果表明不同抽样环节的试剂盒以及不同适用机型条件下的检测结果均符合该生产厂家的注册标准。根据图1中病理组织样本和外周血样本检测扩增曲线和溶解

曲线结果可知,病理组织样本在10 ng/ μ L野生型基因组DNA背景下,对突变DNA含量为5%的检测限参考品能够准确检出;外周血样本在突变DNA含量为10%背景下,对DNA浓度为1 ng/ μ L的检测限参考品能够准确检出。在针对组织样本和外周血浆样本的检测中,试剂盒均符合该生产厂家的注册标准。

2.2 探索性研究

在本次抽验的探索性研究中,参照产品行业标准《人类 *EGFR* 基因突变检测试剂盒》报批稿的要求,同时进行准确性(阳性符合率)、特异性(阴性符合率)、重复性和检测限项目的检验。对5个 *EGFR* 检测试剂盒进行检测,结果表明准确性和检测限均有1批次的1个突变位点未检出(表2)。

表1 不同抽样环节获取同一试剂以及不同适用机型同一试剂检测结果对比

Table 1 Comparison of the results obtained by different reagents in different sampling procedures and detected from various applicable instruments

检验项目	生产环节	使用环节	Stratagene Mx3000P	ABI-7500
准确性(阳性符合率)	100%	100%	100%	100%
特异性(阴性符合率)	100%	100%	100%	100%
检测限	1%	1%	1%	1%
精密度(CV)				
G719X	1.10%	0.80%	1.03%	0.92%
E19del	0.50%	0.60%	1.19%	1.14%
L858R	0.30%	0.80%	1.13%	1.80%
L861Q	0.70%	0.20%	1.02%	1.15%
T790M	0.50%	0.90%	1.53%	1.23%
S768I	0.30%	0.50%	0.95%	1.54%
E20ins	0.60%	0.70%	0.75%	1.31%

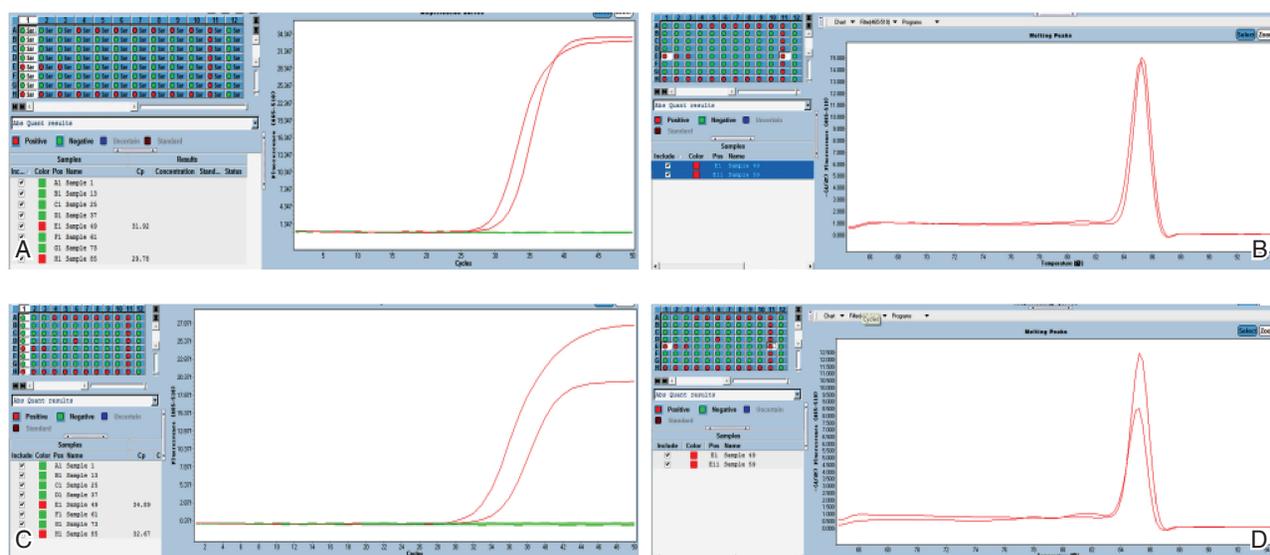
在特异性指标中,有5家产品仅对不同浓度的野生型DNA样本进行了规定,要求不得检出,而对于 *EGFR* 基因不同序列之间以及HER家族之间是否存在交叉反应并未进行要求,其企业参考品也没有做相应的设置,无法充分检测试剂盒的交叉反应。在探索性研究中,我们对试剂盒检测范围外的人类 *EGFR* 不同突变类型参考品进行了检测,包括21个突变位点,要求结果应为突变阴性。检测结果显示5批试剂盒均符合要求,未发现交叉现象。

对于精密度指标,抽检的有部分产品仅要求结果均为阳性,并未对Ct值的变异系数做出要求。仅有2家产品在验证精密度时包括弱阳性、中或强阳性参考品和阴性参考品。其他6家均只对中/强阳性精密度参考品进行检测,且以常见突变类型为

主,并未包括理论上较难测得的突变序列。在探索性研究中,我们分别对弱阳性、中或强阳性参考品和阴性参考品进行检测,并选取了较为常见的19-del缺失突变以及较为少见的S768I突变位点。检测结果显示,抽检的5批试剂盒中4个PCR方法的试剂其变异系数均小于5%,另外1个流式荧光杂交法试剂也能结果一致均为阳性,符合规定。

3 讨论

在中国, *EGFR* 基因突变检测试剂盒属于三类体外诊断试剂,须由国家食品药品监督管理总局审查批准后才能颁发医疗器械注册证。因此,在临床应用中,试剂盒的准确性、特异性、检测限、重复性都是质量控制的关键指标,能够反映试剂的



A: 病理组织样本检测扩增曲线; B: 病理组织样本检测溶解曲线; C: 外周血样本检测扩增曲线; D: 外周血样本检测溶解曲线。

图1 G719A 基因检测限结果
Figure 1 Detection limit results of G719A gene

表2 EGFR 基因突变检测试剂盒结果统计

Table 2 Statistics of the detection results of EGFR mutation detection kits

检验项目	标准要求	实验方法	结果统计
准确性	行业标准	以统一参考品进行检测	4个试剂盒均符合标准规定,1个产品的1个位点未检出
特异性	行业标准	以统一参考品进行检测	5个试剂盒均符合标准规定
检测限	行业标准	以统一参考品进行检测	4个试剂盒均符合标准规定,1个产品的1个位点未检出
重复性	行业标准	以统一参考品进行检测	5个试剂盒均符合标准规定

基本特性。因此,本研究选取这几项指标来进行试剂盒性能评价。对于无行业标准和国家参考品的产品,企业进行产品注册检验时通常会采用企业标准和参考品进行检验;对于有行业标准和国家参考品的情况下,检验机构会采用行业标准和国家参考品来进行注册检验^[13]。然而,针对EGFR基因突变检测的相关行业标准迟于大部分企业标准。因此,企业在研制过程主要依靠企业的产品标准/技术要求进行。

本文采用企业参考品对各自抽检试剂盒(分型或不分型)所能覆盖的所有突变位点进行检测,相应基因型别均能检测出。各企业生产的EGFR基因突变检测试剂盒也都能符合企业产品标准/技术要求。但是企业参考品均来源于质粒构建,并未采用临床样本提取的DNA储备液或细胞系作为原料,所以不能很好的模拟样本真实情况。因此企业参考品无法正确评估检测试剂盒的临床使用情

况。鉴于此,本文采用前期制备的临床样本来源人类EGFR基因突变检测统一参考品分别验证抽样试剂盒的准确性、特异性、检测限和重复性。

EGFR是表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor HER)家族成员之一。该家族由EGFR/HER1/erbB1、HER2/neu/erbB2、HER3/erbB3及HER4/erbB4 4个分子构成,在细胞的生长、增殖和分化等生理过程中发挥重要的调节作用。研究表明,EGFR突变主要发生在外显子18~21号外显子上。其中外显子19的缺失突变delE746-A750等约占EGFR突变的45%,外显子21上的L858R替代突变约占EGFR突变的40%~45%^[14]。另外10%的EGFR突变发生在外显子18(G719A、G719C和G719S)和外显子20上^[14-15]。其中外显子20上的S768I突变约占非小细胞肺癌患者EGFR突变的1.5%~3%左右^[16]。本次抽验的EGFR试剂盒所检测的突变位点和数量存在一定

的差异,有的仅仅检测2个基因型的10个突变位点,有的基本覆盖常见的30多种突变位点。在探索性研究中,我们采用的统一参考品以临床样本作为原料,覆盖18~21号外显子共4个基因型别的突变类型,可以满足不同试剂盒质控检测的需要。

在探索性研究中,抽检的5批试剂盒在准确性项目中有1个厂家的试剂盒1个位点未检出。准确性检测不符合规定则说明产品出现漏检及假阴性的现象。分析主要原因可能是产品设定的阈值较高,将弱阳性样本检测为阴性。通常在检测限设置时,应分别对扩增反应终体系中的突变序列百分率和反应体系中总核酸浓度2个因素做出规定,在本次抽检的EGFR试剂盒产品中企业注册标准/产品注册要求仅对突变比率进行了要求。另外,检测限的检测应覆盖所有突变位点,而有的EGFR试剂盒产品仅对部分突变位点的检测限进行了检测。在探索性研究中,我们要求试剂盒在10 ng基因组背景下能够检出突变比例(拷贝数)不高于5.0%的混合样本且型别准确。在统一参考品的检出下,有1个产品检测限不符合要求。检测限不符合规定则说明产品的灵敏度不够,对于突变频率较低的样本无法检出。由此可见,企业提供的参考品和统一参考品对试剂盒的测试存在差异。注册检验时采用企业参考品不能完全满足临床对诊断试剂盒的质量要求。因此,针对EGFR基因突变检测试剂盒的国家参考品以及相应行业标准对于产品质量把控具有十分重要的作用。

临床常用的检测样本类型有肿瘤组织基因组DNA和外周血中的游离DNA。其中,组织样本是基因突变检测的“金标准”^[17]。血液样本可作为组织样本不易获取时的补充样本^[18]。本文抽检的试剂盒中,有部分厂家产品说明书的预期用途中表明该产品用于体外定性检测肠癌、肺癌患者石蜡包埋病理标本和外周血分离的血浆样本的DNA中人类EGFR基因突变。由于EGFR病理组织学样本和外周血样本检测中存在较大差异性,在参考品及质控品设置、分析性能评估、临床评价要求、产品技术要求、产品说明书等多个方面均存在不同要求。本文对同一厂家试剂盒分别采用病理组织样本和外周血样本检测,检测结果符合该生产厂家的注册标准。

总之,各企业产品技术要求存在差异,企业参考品及产品技术要求并不能完全反应试剂盒的质量,结果与即将正式实施的行业标准有一定差

距。张欣涛等^[19]在2013-2016年的监督抽检中均发现存在企业产品技术要求低于国家行业标准的情况。因此,针对我国人EGFR基因突变检测试剂盒的发展现状,建议企业及时根据行业标准更新企业技术要求,并统一使用国家参考品进行检测。

参考文献

- [1] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24):8919-8923.
- [2] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8):786-792.
- [3] Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(27):3327-3334.
- [4] Inukai M, Toyooka S, Ito S, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16):7854-7858.
- [5] Costa V, Kowalski LP, Coutinho-Camillo CM, et al. EGFR amplification and expression in oral squamous cell carcinoma in young adults [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2018, 47(7):817-823.
- [6] Martinez-Carretero C, Pascual FI, Rus A, et al. Detection of EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer by high resolution melting. Comparison with other methods [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(12):1970-1978.
- [7] Que D, Xiao H, Zhao B, et al. EGFR mutation status in plasma and tumor tissues in non-small cell lung cancer serves as a predictor of response to EGFR-TKI treatment [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(3):320-327.
- [8] Gao W, Huang T, Yuan H, et al. Highly sensitive detection and mutational analysis of lung cancer circulating tumor cells using integrated combined immunomagnetic beads with a droplet digital PCR chip [J]. *Talanta*, 2018, 185:229-236.
- [9] Jing C, Mao X, Wang Z, et al. Nextgeneration sequencing based detection of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, Her2 and TP53 mutations in patients with nonsmall cell lung cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2):2191-2197. (下转第351页)

A组轮状病毒极速实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立及临床评价

陈峰* 唐晓宇 仇保丰 李林中 严辉

[摘要] **目的** 建立一种 A 组轮状病毒 (rotavirus A, RVA) 极速实时荧光 RT-PCR 检测方法。**方法** 根据 RVA 基因组中非结构蛋白 (non-structural rotavirus protein 3, NSP3) 基因保守区序列设计一对引物和一条荧光探针, 建立 RVA 极速实时荧光 RT-PCR 技术检测方法并对其进行灵敏度、特异性、精密度分析, 最后采用 200 例临床粪便样本同时进行该方法检测和测序结果对比分析, 以评价本方法的临床应用性能。**结果** 本方法检测 RVA 的灵敏度达到 2.00×10^2 PFU/mL; 对种属相近或引起相似症状的其他种属病毒无交叉反应; 不同浓度样本的 Ct 值的变异系数在 0.82% ~ 2.28% 之间。200 例临床样本的研究结果显示本方法与测序方法检测结果的总符合率达到 98.5%。**结论** 本研究建立的方法检测 RVA 具有灵敏、特异、精密度高、快速简便的特点, 并与测序方法具有很好的符合率, 在病毒性腹泻的快速诊断和疫情监测方面具有很好的应用前景。

[关键词] A 组轮状病毒; 极速实时荧光 RT-PCR; 性能评价

Establishment and clinical evaluation of a rapid real - time RT - PCR for detection of rotavirus A

CHEN Feng*, TANG Xiaoyu, QIU Baofeng, LI Linzhong, YAN Hui

(Nantong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nantong, Jiangsu, China, 226005)

[ABSTRACT] **Objective** To establish a rapid and early detection method of rotavirus A (RVA) by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Methods** A pair of primers and a fluorescence probe based on conservative sequences of non-structural rotavirus protein 3 (NSP3) in RVA genomes were designed to establish a RVA detection method by real-time RT-PCR, and then its sensitivity, specificity and precision were analyzed. A total of 200 cases from clinical stool samples were tested simultaneously and sequencing to evaluate the clinical performance of this method. **Results** The sensitivity of the method for detecting RVA reached 2.00×10^2 PFU/m. There was no cross-reactivity to other species viruses with similar species or similar symptoms. The coefficient of variation of Ct values of different concentrations of samples ranged from 0.82% to 2.28%. The results from 200 clinical samples showed that the total coincidence rate between the method and the sequencing method reached 98.5%. **Conclusion** The method established in this study has the characteristics of sensitive, specific, high precision, fast and simple, and has a good coincidence with sequencing methods. It has a good application prospect in the rapid diagnosis and epidemic monitoring of viral diarrhea.

[KEY WORDS] Rotavirus A; real-time RT-PCR; Performance evaluation

基金项目:南通市科技计划项目(NO.MS12016030)

作者单位:南通出入境检验检疫局,江苏,南通 226005

*通讯作者:陈峰, E-mail: 1350897752@qq.com

腹泻病是5岁以下儿童死亡的第二大原因,轮状病毒(rotavirus, RV)是最常见的引起儿童腹泻的主要原因。RV感染引起水性腹泻伴呕吐和发烧、严重脱水、电解质紊乱,严重者甚至死亡。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)提供的统计数据,中国在2008年193个国家参与的RV引起的死亡统计数据中排名第二十三,而在2013年194个国家中排名上升到第十五^[1]。

RV是一种双链核糖核酸病毒,属于呼肠孤病毒科轮状病毒属,病毒基因由11个双链RNA节段组成,编码6个结构蛋白(VP1-4, VP6-7)和6个非结构蛋白(non-structural rotavirus protein 1-6, NSP1-6),根据VP6抗原性的不同可以分为A-H 8组,其中A组轮状病毒(rotavirus A, RVA)是导致婴幼儿腹泻的主要病原体^[2-4]。目前,RV的检测方法主要有电子显微镜(electron microscope, EM)、胶体金法、酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assays, ELISA)、核酸杂交法、逆转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)以及逆转录定量PCR(reverse real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)。EM购买和维护价格都比较高,一般的诊断实验室负担不起;而胶体金法和ELISA直接抗原检测灵敏度低。近年来,RT-PCR、RT-qPCR结合高效液相色谱法、巢式PCR等核酸检测方法都被用于轮状病毒检测,并被认为具有比直接抗原检测更高的灵敏度,但存在耗时较长的缺点^[5-9],不能满足RVA发病急、需要随到随检的快速检测要求。有文献报道新的商品化分子诊断方法FilmArra和Luminex xTAG实现了RVA核酸快速检测^[10-12],但其高昂的价格限制了其在临床上的广泛应用。因此建立一种快速、准确、低成本的RVA检测方法能够为临床上实现轮状病毒的快速诊断及预后评价提供有力的技术支持,对该病防控具有重要意义。

本研究旨在建立一种快速检测RVA的方法,并对其性能进行系统的性能分析和临床性能评价,以明确该方法在临床应用上的可行性。

1 材料和方法

1.1 病毒株和临床样本

1.1.1 病毒株

RVA毒株购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),编号VR-2104和

VR-2018;特异性病原体包括F组肠道腺病毒40型、F组肠道腺病毒41型、肠道病毒71型、空肠弯曲杆菌、艰难梭菌,购自ATCC,编号分别为VR-931、VR-930、VR-1775、VR-37、33560、9689,肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌购自中国医学细菌保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collection, CMCC),编号50041和51571,诺如病毒为临床样本,来源于南通出入境检验检疫局。

1.1.2 临床样本

收集南通市出入境检验检疫局、南通市妇幼保健院中临床症状符合《儿童腹泻病诊断治疗原则的专家共识(2009年版)》^[13]描述的婴幼儿腹泻的临床样本共200例,其中男性病例119例,女性病例81例,年龄32天~6.1岁,平均年龄6.02岁。为考查临床特异性,还收集其它消化道细菌或病毒感染引起的婴幼儿腹泻、非感染性婴幼儿腹泻及健康婴幼儿。标本类型为粪便。

1.2 主要试剂和仪器

一步RT-PCR Master Mix(极速)(货号:G0105)、极速荧光定量PCR仪V280均购自南京美宁康诚生物科技有限公司;病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒(离心柱法)(货号:DP315)购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 引物和探针设计

从Genbank中查找并选择RVA基因组中NSP3基因的序列,利用Primer Premier 5设计一对引物和一条荧光探针,序列分别为上游引物RVA-F:5'-GTTGATGCTCAAGATGGAGT-3',下游引物RVA-R:5'-ACTTCATTGTAATCATATTGAATCC-3',荧光探针RVA-P:5'-(FAM)-CAGCAA-CAACTGCAGCTTCAAAAGAAGTGT-(BHQ1)-3',扩增片段长度129 bp,经BLAST进行同源性比对发现仅与RVA株的基因组序列完全匹配,而和其它物种的核酸序列均不匹配。引物和荧光探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 质控品的建立

利用空斑减数实验进行RVA培养上清标定,将标定后病毒培养上清稀释到 1.0×10^6 PFU/mL,存活后作为阳性质控品。灭菌的生理盐水作为阴性质控品。每次实验待检样本需与阴阳质控品同时检测,用于实验质控。其中阴性质控品要求无典型S型扩增曲线或无循环阈值(cycle threshold value, Ct值)显示;阳性质控品要求呈典型S型扩增

曲线且 Ct 值 ≤ 30 。

1.5 核酸提取

用粪便采集拭子,取粪便或腹泻物 5~8 g,置入无菌粪便收集管(含 1 mL 生理盐水),粪便悬液静置 2 min,或 6 000 r/min 离心 30 s,取 200 μ L 上清进行核酸提取。阳性质控品、阴性质控品 200 μ L 与待检样本同步进行处理。具体提取步骤请参照病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(离心柱法)说明书。提取的核酸可直接用于检测,也可保存于-70 $^{\circ}$ C 待用。

1.6 极速实时荧光 RT-PCR 检测

将提取后的核酸样本 3 μ L 加入到 7 μ L RVA RT-PCR 反应液中(含上下游引物 RVA-F、RVA-R 各 10 pmol,荧光探针 RVA-P 5 pmol,一步 RT-PCR Master Mix 5 μ L),取 8 μ L 移至 PCR 扩增芯片中,盖上芯片盖,使用极速荧光定量 PCR 仪 V280 进行扩增,扩增条件:50 $^{\circ}$ C 逆转录 5 min;95 $^{\circ}$ C 预变性 8 s;93 $^{\circ}$ C 7 s,60 $^{\circ}$ C 14 s,共 40 个循环。由于利用 ROC 曲线确定了本检测方法的 Cutoff 值为 38,因此 V280 RT-PCR 实时分析软件计算每个样本的 Ct 值,结合扩增曲线的形状即可判断样本的阴阳性,如果样本呈典型 S 型扩增曲线,且 Ct 值 ≤ 38 ,则判定为阳性,样本无典型 S 型扩增曲线或者呈典型 S 型扩增曲线,但 Ct 值 >38 ,则判定为阴性。

1.7 统计分析

采用 EXCEL 软件进行精密度分析,SPSS 18.0 软件进行 Kappa 一致性分析,Origin8 软件进行灵敏度分析。

2 结果

2.1 极速实时荧光 RT-PCR 扩增产物分析

将不同来源的 RVA 阴、阳性样本各 8 份进行实时荧光 RT-PCR 检测,图 1A 中 8 份阳性样本均呈现出典型的 S 型曲线,且 Ct 值均小于 38;图 1B 中 8 份阴性样本均无典型 S 型曲线,见图 1。

RT-PCR 产物电泳结果显示,8 份阳性样本全部可见 129 bp 的 RVA 特征条带(见图 2),8 份阴性样本全部未见 129 bp 的 RVA 特征条带,见图 3。

RAV 阳性标本的 RT-PCR 产物经克隆测序,测序结果如图 4 所示,结果显示均为 RVA 基因组编码非结构蛋白 3(NSP3)基因的序列。

2.2 极速实时荧光 RT-PCR 方法灵敏度分析

将经过空斑减数实验标定浓度为 5.32×10^8

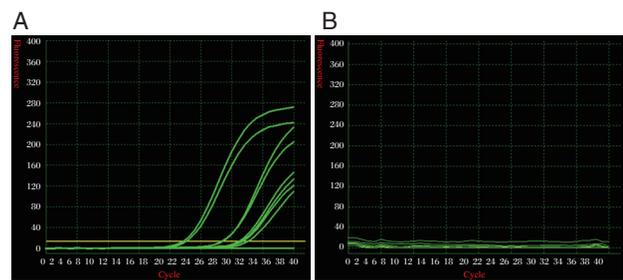
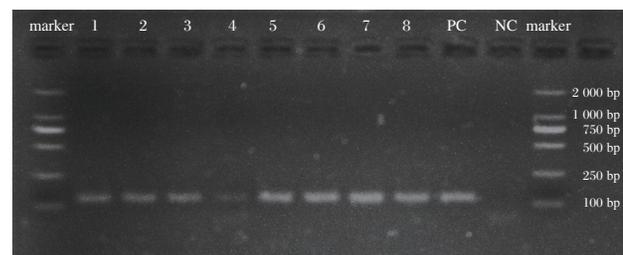


图 A 为 RVA 阳性样本,图 B 为 RVA 阴性样本。

图 1 阴、阳性样本的极速实时荧光 PCR 检测结果

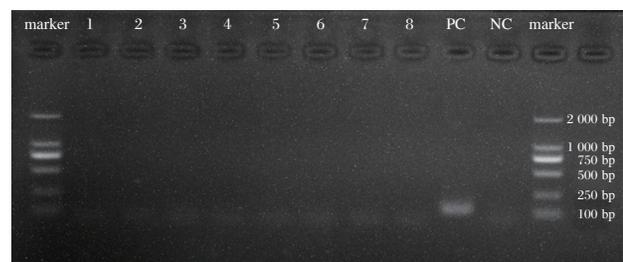
Figure 1 The results of ultrafast real-time RT-PCR, including positive and negative samples



从左到右:marker,阳性标本 1~8,PC:阳性对照,NC:阴性对照,marker。

图 2 8 份阳性标本 PCR 产物的电泳结果

Figure 2 The electrophoresis results of RT-PCR amplified products



从左到右:marker,阴性标本 1~8,PC:阳性对照,NC:阴性对照,marker。

图 3 8 份阴性标本 PCR 产物的电泳结果

Figure 3 The electrophoresis results of RT-PCR amplified products

PFU/mL 的 RVA 病毒上清分别稀释至 1.0×10^5 PFU/mL、 1.0×10^4 PFU/mL、 1.0×10^3 PFU/mL、 5.0×10^2 PFU/mL、 1.0×10^2 PFU/mL、50 PFU/mL、10 PFU/mL、5 PFU/mL,使用极速实时荧光 RT-PCR 方法进行 24 次重复检测,结果如表 1 所示。

按照美国临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NC-CLS)EP17-A 文件的要求,以样本浓度值的对数

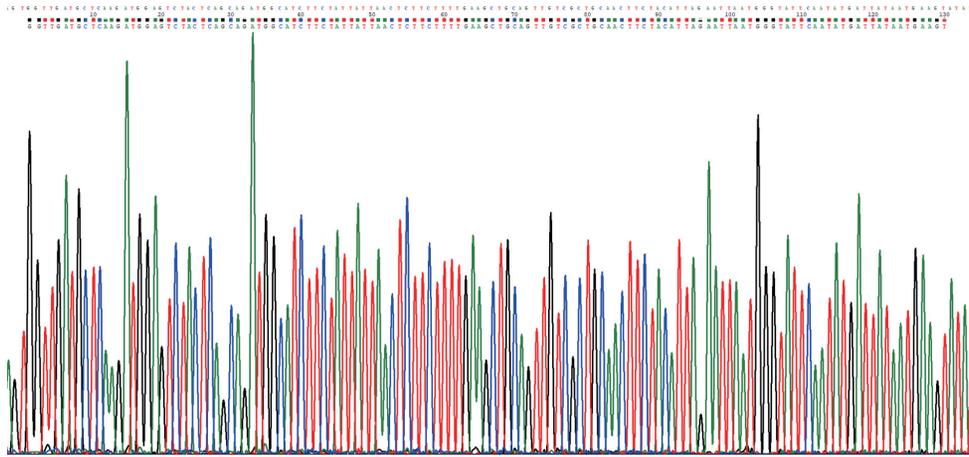


图4 RVA 阳性标本的 RT-PCR 产物克隆测序图
Figure 4 The RVA positive sample sequencing result of RT-PCR amplified products

表1 极速实时荧光 RT-PCR 方法灵敏度检测结果
Table 1 Sensitivity test result of ultrafast real-time RT-PCR

浓度(PFU/mL)	1.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3	5.0×10^2	1.0×10^2	50	10	5
检测次数	24	24	24	24	24	24	24	24
阳性次数	24	24	24	24	22	14	7	4
检出率(%)	100	100	100	100	91.67	58.33	29.17	16.67

为横坐标,检出率为纵坐标进行描点,用 Origin 软件的 Sigmoidal Fit 方法拟合曲线,根据软件给出的曲线公式 $y=1-0.833 \ 3/(1+\exp((x-1.699 \ 02)/0.215 \ 05))$,计算出当检出率为 95%时所对应的浓度为 2.00×10^2 PFU/mL,此浓度即为本方法的灵敏度,见图 5。

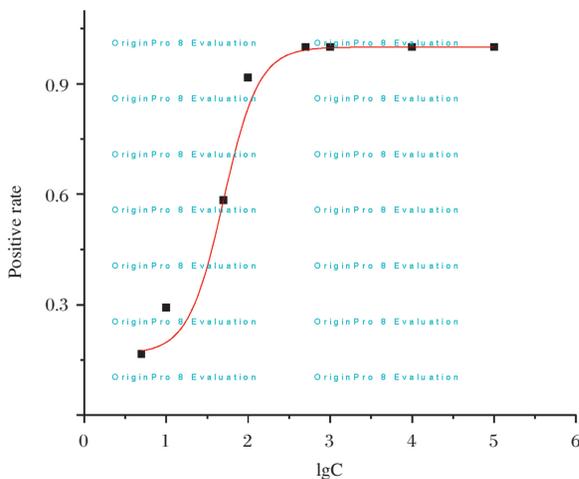
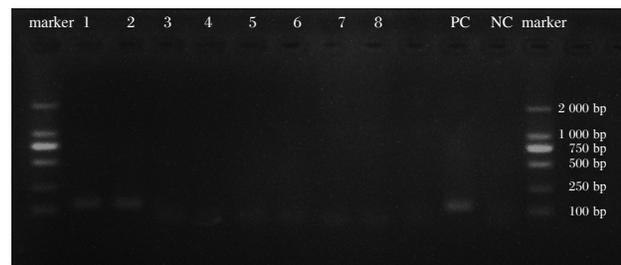


图5 实时荧光 RT-PCR 方法灵敏度的 Sigmoidal 拟合曲线
Figure 5 Sigmoidal fitting curve of the detection sensitivity of real-time RT-PCR

上述样本同时采用 RT-PCR 方法进行扩增,产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,结果显示 1.0×10^5 PFU/mL 和 1.0×10^4 PFU/mL 的样本可见 129 bp 的目的条带,而其余浓度样本均无目的条带(图 6),因此 RT-PCR 方法能够检出的最低样本浓度为 1.0×10^4 PFU/mL。



从左到右: marker, 1-8: 1.0×10^5 PFU/mL、 1.0×10^4 PFU/mL、 1.0×10^3 PFU/mL、 5.0×10^2 PFU/mL、 1.0×10^2 PFU/mL、50 PFU/mL、10 PFU/mL、5 PFU/mL, PC: 阳性对照, NC: 阴性对照, marker。

图6 不同浓度样本 PCR 产物的电泳结果

Figure 6 The electrophoresis results of RT-PCR amplified products for different concentration samples

2.3 极速实时荧光 RT-PCR 方法特异性分析

为了验证极速荧光 RT-PCR 方法的特异性,分别使用种属相近的、感染部位相同及引起症状相

似的其他病原,包括F组肠道腺病毒40型、F组肠道腺病毒41型、肠道病毒71型、空肠弯曲杆菌、艰难梭菌、肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌、诺如病毒作为待检样本进行检测,结果均为阴性,见图7所示。

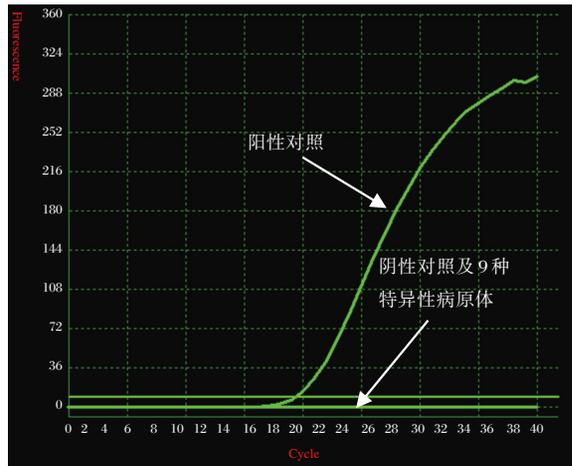
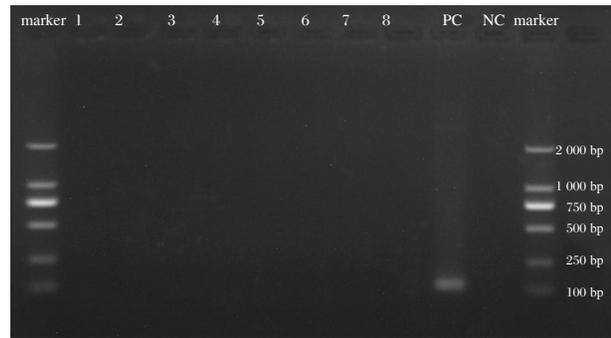


图7 特异性病原体极速实时荧光PCR检测结果
Figure 7 The results of ultrafast real-time RT-PCR for Specific pathogens

同时使用RT-PCR方法对上述病原体样本进行扩增,产物经2%琼脂糖凝胶电泳,结果均无目的条带。因此其他病原体对极速荧光RT-PCR方法和RT-PCR方法的检测均无干扰,不存在交叉反应。

2.4 极速实时荧光RT-PCR方法精密度分析
以 1.0×10^7 PFU/mL、 1.0×10^6 PFU/mL、 1.0×10^5



从左到右: marker, 1~8:F组肠道腺病毒40型、F组肠道腺病毒41型、肠道病毒71型、空肠弯曲杆菌、艰难梭菌、肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌、诺如病毒,PC:阳性对照,NC:阴性对照,marker。

图8 特异性病原体PCR产物的电泳结果

Figure 8 The electrophoresis results of RT-PCR amplified products for Specific pathogens

PFU/mL、 1.0×10^4 PFU/mL、 1.0×10^3 PFU/mL 5个不同浓度的RVA病毒上清作为待检样本,使用极速实时荧光RT-PCR方法进行30次重复检测,结果如表2,Ct值的标准差在0.19~0.43之间,变异系数(CV)在0.82%~2.28%之间,证实本方法可以满足检测的精密度要求。

2.5 极速实时荧光RT-PCR方法与测序方法临床样本检测结果对比

对南通市出入境检验检疫局、南通市妇幼保健院共200例临床样本同时采用本研究建立的极速实时荧光RT-PCR方法和测序方法进行检测,结果如表3所示。其中阳性符合率达100%,阴性符合率达97.4%,总符合率达到98.5%。

表2 极速实时荧光RT-PCR方法精密度检测结果

Table 2 Precision test results of ultrafast real-time RT-PCR

浓度(PFU/mL)	1.0×10^3	1.0×10^4	1.0×10^5	1.0×10^6	1.0×10^7
Ct值(Mean±SD)	29.69±0.43	26.79±0.22	23.52±0.24	20.39±0.19	17.28±0.39
CV(%)	1.44	0.82	1.03	0.93	2.28

表3 极速实时荧光RT-PCR方法与测序方法检测结果对比

Table 3 The results compared between ultrafast real-time RT-PCR and nucleotide sequencing

实验	测序方法			Kappa
	阳性	阴性	合计	
极速实时荧光RT-PCR方法	阳性	85	3	88
	阴性	0	112	112
	合计	85	115	200
	符合率(%)	100	97.40	98.50

3 讨论

RVA是导致婴幼儿腹泻的最重要的病原体,是导致5岁以下婴幼儿腹泻的主要原因^[14]。在我国,RV感染的发病率高达30%~40%,这种现状不仅对我国婴幼儿的生活质量构成了严重的威胁,而且也对我国国家的医疗资源造成了巨大的损失,给儿童健康带来严重危害,大大增加了防控任务难度^[15-17]。

RVA经粪-口途径传播,检测方法目前在临床上积累了一定的经验,其技术的主要开发方向是开发实用、经济,且适用基层实验室的快速检测方法^[18]。本研究开发了一种极速实时荧光RT-PCR检测RVA的方法,该方法最低检测限达到 2.00×10^2 PFU/ml, Ct值的变异系数小于2.5%,200例腹泻样本的研究发现,本方法与金标准测序方法的检测结果对比,阳性符合率达100%,阴性符合率达97.4%,总符合率达到98.5%,能够对腹泻样本中病原体进行监测,对疫情控制具有重要作用。

目前,基于各种检测原理的RVA的检测方法逐渐被应用于临床。免疫学检测技术,如ELISA,虽然是WHO推荐的检测方法,但该方法要求被测样本病毒含量足够高才能达到其检出限,相较于RT-PCR检测方法其漏诊率高^[19-21]。本研究建立的极速实时荧光RT-PCR方法最低检测限达到 2.00×10^2 PFU/mL,灵敏度比普通RT-PCR方法高10倍^[22],极大地降低了临床漏诊率。此外,免疫学检测技术基于方法学局限性容易出现轮状病毒组间交叉反应^[23],造成特异性偏低。本研究中对F组肠道腺病毒40型、F组肠道腺病毒41型、肠道病毒71型、空肠弯曲杆菌、艰难梭菌、肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌、诺如病毒等样本均进行了极速实时荧光RT-PCR方法的检测,结果均为阴性,表明该方法对种属相近或引起相似症状的其他种属病毒无交叉反应,结果与其他基于RT-PCR原理的检测方法一致^[24]。RT-PCR过程中还存在一个重要参数即Ct值,Ct值可以帮助临床医生确定疾病病因,病毒载量的高低可以为临床医生评判疾病过程提供更有力的证据^[19, 25]。本研究建立的RVA检测方法不同浓度的样本Ct值范围在 $(17.28 \pm 0.39) \sim (29.69 \pm 0.43)$ 之间,相较于文献中报道的基于RT-PCR原理的RVA检测方法Ct值范围26.18~36.01更低,表明本方法的检测灵敏度更高^[26]。不同浓度样本的Ct值的变异系数在0.82%~2.28%之间小于2.5%,也

表明本研究所建立的RVA检测方法具有良好的重复性,适用于临床检测。此外,200例临床腹泻样本的研究结果显示,本研究新建立的极速实时荧光RT-PCR检测方法与一代测序检测方法有着良好的等效性,阳性符合率达100%,阴性符合率达97.4%,总符合率达到98.5%,*Kappa*值为0.969,表明本研究的检测方法与现有的金标准测序方法检测性能一致性良好,说明本研究所建立的极速实时荧光RT-PCR检测方法具有临床可应用性。

鉴于RVA对婴幼儿的危害严重,且其流行病学研究显示RV在人群中流行的基因型会随时间、地区的不同而产生变化^[27-28],因此及时明确婴幼儿腹泻的根本原因有助于临床医师及时诊断和正确治疗轮状病毒性肠炎,并能动态了解该病的流行情况,对指导和预防该病具有重要意义^[29-30]。本研究中仅对200例临床样本进行对比检测分析,尚需更大的临床样本数据来进行性能优化,研究结果显示本研究建立的方法较目前临床上使用的其他检测方法成本低,且具有不易污染、操作简便、灵敏度高、检测时间短的特点,更适合我国国情,有利于在我国推广。

参考文献

- [1] Chen YH, Chen F, Zhou T, et al. Prevalence and clinical profile of rotavirus A infection among diarrhoeal children and phylogenetic analysis with vaccine strains in Chengdu, West China, 2009-2014 [J]. Trop Med Int Health, 2018, 23(7): 704-713.
- [2] Esona MD, Gautam R. Rotavirus [J]. Clin Lab Med, 2015, 35(2): 363-391.
- [3] Matthijnsens J, Otto PH, Ciarlet M, et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation [J]. Arch Virol, 2012, 157(6): 1177-1182.
- [4] Ianiro G, Delogu R, Fiore L, et al. Genetic variability of VP7, VP4, VP6 and NSP4 genes of common human G1P[8] rotavirus strains circulating in Italy between 2010 and 2014 [J]. Virus Res, 2016, 220: 117-128.
- [5] Hyun J, Ko DH, Lee SK, et al. Evaluation of a new multiplex real-time PCR assay for detecting gastroenteritis-causing viruses in stool samples [J]. Ann Lab Med, 2018, 38(3): 220-225.
- [6] Fan WL, Wang ZW, Qin Y, et al. Use of dual priming oligonucleotide system-based multiplex RT-PCR

- combined with high performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of five enteric viruses associated with acute enteritis [J]. *J Virol Methods*, 2017, 243:80-82.
- [7] Bergallo M, Galliano I, Montanari P, et al. Molecular detection of human parechovirus in under-Five-Year-Old Children with gastroenteritis [J]. *J Clin Virol*, 2016, 85:17-21.
- [8] Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD, Williams AL, et al. Sensitive and specific nested PCR assay for detection of rotavirus A in samples with a low viral load [J]. *J Virol Methods*, 2016, 236:41-46.
- [9] Kim HS, Kim JS. Discrepancies between antigen and polymerase chain reaction tests for the detection of rotavirus and norovirus [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46(3):282-285.
- [10] Piralla A, Lunghi G, Ardissino G, et al. FilmArray GI panel performance for the diagnosis of acute gastroenteritis or hemorrhagic diarrhea [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1):111.
- [11] Leva A, Eibach D, Krumkamp R, et al. Diagnostic performance of the Luminex xTAG gastrointestinal pathogens panel to detect rotavirus in Ghanaian children with and without diarrhoea [J]. *Virology*, 2016, 13:132.
- [12] Keske S, Zabun B, Aksoy K, et al. Rapid molecular detection of gastrointestinal pathogens and its role in antimicrobial stewardship [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(5).
- [13] 中华医学会儿科学分会消化学组, 中华医学会儿科学分会感染学组, 编辑委员会中华儿科杂志. 儿童腹泻病诊断治疗原则的专家共识 [J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(8):634-636.
- [14] Riddle MS, Chen WH, Kirkwood CD, et al. Update on vaccines for enteric pathogens [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, Epub ahead of print.
- [15] 沈国平, 姚娟, 李云, 等. 5岁及以下腹泻患儿A组轮状病毒检测结果分析 [J]. *预防医学*, 2017, 29(12):1279-1280, 1296.
- [16] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(2):136-141.
- [17] Liu N, Xu Z, Li D, et al. Update on the disease burden and circulating strains of rotavirus in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Vaccine*, 2014, 32(35):4369-4375.
- [18] 刘英. 轮状病毒检测技术概述及临床应用研究 [J]. *医学信息*, 2013, 26(2):313-314.
- [19] Izzo MM, Kirkland PD, Gu X, et al. Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia [J]. *Aust Vet J*, 2012, 90(4):122-129.
- [20] Maes RK, Grooms DL, Wise AG, et al. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1):290-294.
- [21] Ramani S, Paul A, Saravanabavan A, et al. Rotavirus antigenemia in Indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51(11):1284-1289.
- [22] 钱明明, 许海燕, 宗晴, 等. 常规RT-PCR与荧光定量RT-PCR检测GⅠ、GⅡ型诺如病毒方法的建立及其应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31(7):602-606, 611.
- [23] 罗明, 龚成, 史玲莉, 等. 五种常用轮状病毒检测方法的评价及应用策略 [J]. *疾病监测*, 2014, 29(3):223-227.
- [24] Wang H, Cong F, Zeng F, et al. Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute diarrhea syndrome Coronavirus (SADS-CoV) [J]. *J Virol Methods*, 2018, 260:45-48.
- [25] Phillips G, Lopman B, Tam CC, et al. Diagnosing rotavirus associated IID: using ELISA to identify a cut-off for real time RT-PCR [J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(3):242-245.
- [26] Soltan MA, Tsai YL, Lee PA, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species [J]. *J Virol Methods*, 2016, 235:99-104.
- [27] 郑通喜. 中国婴幼儿轮状病毒腹泻的研究进展 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(29):4627-4630.
- [28] 张丽杰, 方安. 中国婴幼儿轮状病毒腹泻的流行病学和疾病负担研究进展 [J]. *中国计划免疫*, 2007, 13(2):186-191.
- [29] 刘海霞, 张静. 国内外人轮状病毒腹泻流行趋势和疾病负担研究进展 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(12):1164-1168.
- [30] 高平. 婴幼儿腹泻患者A群轮状病毒快速检测分析及临床意义 [J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(19):2375-2376.

C-反应蛋白、血清淀粉酶 A 蛋白及中性粒细胞表面抗原 CD64 对新生儿感染性疾病的早期诊断价值

吴玉芹 奎莉越 赵晓芬 李杨方 崔珊 杜琨*

[摘要] 目的 探讨 C-反应蛋白(C reactive protein, CRP)、血清淀粉酶 A 蛋白(serum amyloid A, SAA)和中性粒细胞表面抗原 CD64 在新生儿感染性疾病早期诊断中的作用。方法 选取 2016 年 5 月至 2017 年 5 月于昆明市儿童医院新生儿监护病房住院并疑为新生儿感染性疾病病例 100 例,另选取 20 例非感染性疾病(如新生儿呼吸窘迫综合征、母乳性黄疸、胃肠功能紊乱、头颅血肿等)新生儿作为对照组,采用酶联免疫吸附试验检测 2 组新生儿 CRP 的表达,运用奥普金标数码定量分析仪检测 SAA 的水平,运用流式细胞仪检测 CD64 的水平,并分析 CRP、SAA 及 CD64 在新生儿感染性疾病早期临床诊断中的作用。结果 新生儿感染性疾病组 CRP、SAA 及 CD64 的水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。CD64 诊断新生儿感染性疾病的敏感性和特异性均高于 SAA 及 CRP。结论 CRP、SAA 均可以作为判断新生儿患感染性疾病的标准,但 CD64 是新生儿感染性疾病更为灵敏的早期诊断指标。

[关键词] 新生儿;感染性疾病; C-反应蛋白;血清淀粉酶 A;中性粒细胞表面抗原 64

The value of C - reactive protein, serum amylase A protein and neutrophil surface antigen CD64 in the early diagnosis of neonatal infectious diseases

WU Yuqin, KUI Liyue, ZHAO Xiaofen, LI Yangfang, CUI Shan, DU Kun*

(Special Hospital Ward, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650228)

[ABSTRACT] **Objectives** To investigate the value of C reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA) and neutrophils cell surface antigen 64 (CD64) in the early diagnosis of neonatal infectious diseases. **Methods** 100 neonates were recruited in a neonatal ward who suspected of neonatal infection between May 2016 and May 2017 in Kunming Children's Hospital. 20 hospitalized neonates with non-infectious diseases (such as neonatal respiratory distress syndrome, breast milk jaundice, gastrointestinal dysfunction, cephalohematoma) were enrolled as controls. CRP was detected by enzyme-linked immunosorbent assay, SAA was detected by Aopu gold digital quantitative analyzer and CD64 was detected by flow cytometry. The sensitivity and specificity of CRP, SAA and CD64 were analyzed in the early clinical diagnosis of neonatal infectious diseases. **Results** The levels of CRP, SAA and CD64 in the neonatal infectious diseases group were significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). The sensitivity and specificity of CD64 in the diagnosis of neonatal infectious disease are higher than that of SAA and CRP. **Conclusion** Both CRP and SAA can be used as criteria for judging neonatal infectious diseases. However, CD64 is a more sensitive early diagnostic indicator for neonatal infectious diseases.

[KEY WORDS] Neonate; Infectious diseases; C reactive protein; Serum amyloid A; Neutrophils cell surface antigen 64

作者单位:昆明市儿童医院特需病房,云南,昆明 650228

*通讯作者:杜琨, E-mail: dukun@etyy.cn

新生儿感染性疾病是发生在婴幼儿时期的一类常见疾病,包括肠炎、黄疸、新生儿肺炎、尿布性皮炎等多种感染性疾病^[1]。新生儿感染性疾病中,新生儿肺炎、肠炎这类感染性疾病的发生率及致死率均较高,早期诊断并进行相应的干预和治疗能够显著地改善预后,提高患者的生存率^[2]。但是新生儿各种感染性疾病早期的临床症状各不相同,多数症状并不典型,常规检测并不能在早期就灵敏的诊断出新生儿感染性疾病,再加上新生儿早期的免疫系统尚未发育成熟,自身对外界环境的抵抗力极差,导致感染疾病后,死亡率很高。因此,早期诊断和及时治疗是决定新生儿感染性疾病预后和生存率的关键,探索早期可靠、灵敏、特异的诊断新生儿感染性疾病的标志物,对于降低新生儿感染性疾病的死亡率至关重要^[3]。

C-反应蛋白(C reactive protein, CRP)是目前新生儿感染性疾病中研究的最广泛也是最多的一种急性时相反应蛋白标记物^[4]。当机体处于急性状态时如机体受到感染或者组织受到损伤时,CRP的合成会短时间内迅速增加,在36~50 h可达到高峰,含量能够达到正常值的100~1 000倍,因此可以通过检测患者血液中的CRP含量,初步判断患者是否受到感染^[5]。血清淀粉酶A蛋白(serum amyloid A, SAA)也是一种在急性时由肝脏分泌的相反反应蛋白,属于脂蛋白家族^[6]。正常情况下,SAA在健康人血液中含量较低,而新生儿的SAA水平大部分分布在能够检测水平的最低值。有研究表明,在炎症和组织损伤时,SAA明显升高,急性感染病人增高幅度能够较准确的反映病情严重程度,能够作为感染性疾病炎症的标志^[6]。中性粒细胞表面抗原CD64(neutrophil CD64, CD64)是一种免疫球蛋白,是IgG的Fc段受体,其相对分子质量为72 000。正常情况下,CD64大部分分布在外周血的巨噬细胞、单核细胞及树突状细胞表面,在中性粒细胞表面水平较低。当受到粒细胞集落刺激因子及细菌细胞壁中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等刺激时,CD64能够迅速在中性粒细胞表面大量表达,同时能够提高氧化代谢和脱颗粒水平,新生儿被细菌感染时CD64含量升高尤为明显^[7-8]。因此,本研究拟通过探讨CRP、SAA及CD64在新生儿感染性疾病早期的表达规律,为新生儿感染性疾病的早期诊断和及时治疗提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取2016年5月至2017年5月在昆明市儿童医院新生儿监护病房住院的新生儿疑似感染病例100例,遵循以下入选标准:日龄大于5 d,小于40 d的新生儿,入院时具有如体温升高、腹泻、黄疸、少吃、少哭、呕吐、皮肤黏膜局部感染、泌尿系统感染和感染性休克等疑似感染的临床表现。同时,选取20例相同时期入院,具有相似日龄及胎龄的非感染性疾病(其中新生儿呼吸窘迫综合征5例、母乳性黄疸4例、胃肠功能紊乱7例、头颅血肿4例)新生儿作为对照组。

1.2 研究方法

1.2.1 临床资料

2组患者中感染组100人,其中男性58例,女性42例,对照组20人,其中男性14例,女性6例。感染组和对照组新生儿胎龄分别为(29.3±3.2)周和(30.1±2.4)周,采血日龄为(14.3±1.8) d和(15.4±2.1) d,出生体重为(3.31±0.42) kg和(3.27±0.43) kg。比较2组患者资料,发现2组患者在性别、胎龄、采血日龄和出生体重方面均无统计学意义($P>0.05$)(表1)。详细记录所有被选入的研究对象入院以后的易感因素、临床症状等,并检测白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞以及CRP5项非特异性指标。

表1 2组新生儿的临床资料比较

Table 1 Comparison of clinical data in neonates

组别	<i>n</i>	胎龄(周)	日龄(d)	出生体重(kg)
感染组	100	29.3 ± 3.2	14.3 ± 1.8	3.31 ± 0.42
对照组	20	30.1 ± 2.4	15.4 ± 2.1	3.27 ± 0.43

1.2.2 标本收集

各组患儿均在治疗前,通过静脉采血2 mL,其中1 mL静置2 h待其凝血后,以3 000 r/min离心10 min,分离得到的血清,于-80℃冰箱保存,待检测CRP及SAA,另1 mL置于含25 U/mL肝素钠的抗凝血管中,用于检测CD64的水平^[7]。

1.2.3 CRP的检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附反应试剂盒(英国Abcam公司,货号:ab181416)检测血清CRP

含量。操作严格按照试剂盒说明书进行,以 ≥ 8 mg/mL 为阳性^[9]。

1.2.4 SAA 测定

采用奥普 Qpad 金标数码定量分析仪测定 SAA 的含量,奥普 SAA-SPOT 试剂盒购自上海奥普生物医药有限公司,操作严格按照操作说明书进行。

1.2.5 CD64 测定

流式细胞分析仪检测中性粒细胞表面抗原 CD64 的含量。取全血 50 μ L 加上 20 μ L CD64 PE/CD45 Percp 抗体(美国 BD 公司)混匀,暗处放 1 h 后加 FACS 溶血剂 2 mL,避光放置 20 min 后用流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS Calibur)检测 CD64 的含量^[7]。

1.3 统计方法

采用统计分析软件 SPSS 19.0 对数据进行统计分析。计数资料以百分比表示,计量资料采用均数 \pm 标准差的方式表示;2 组间计量资料的分析

采用 *t* 检验,相关性分析采用 *Pearson* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 感染组和对照组血清 CRP 和 SAA 水平比较

2 组患者中,感染组的 CRP 为 (24.48 ± 21.13) mg/L,而对照组的 CRP 为 (5.12 ± 2.21) mg/L,感染组的 CRP 的水平显著高于对照组的水平。同样,2 组患者中,感染组的 SAA 水平明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(表 2)。

表 2 感染组和对照组血清 CRP 和 SAA 水平比较
Table 2 Comparison of CRP and SAA in the serum between the infected group and the control one

组别	<i>n</i>	CRP(mg/L)	SAA(mg/L)
感染组	100	24.48 \pm 21.13	78.91 \pm 23.6
对照组	20	5.12 \pm 2.21	3.94 \pm 2.15

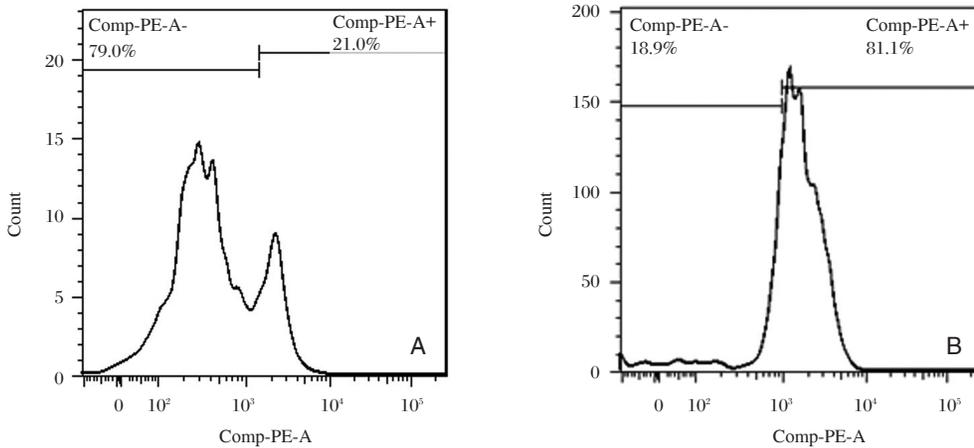


图 A 为对照组流式检测全血 CD64 的代表性直方图,图 B 为感染组流式检测全血 CD64 的代表性直方图。

图 1 CD64 的流式分析直方图

Figure 1 Histogram of CD64 by flow cytometry

2.2 感染组和对照组全血 CD64 水平比较

流式细胞仪 CD64 检测通过单参数直方图(图 1)来分析结果。2 组患者中,感染组的全血 CD64 水平均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

2.3 ROC 曲线图及 CRP、SAA 和 CD64 诊断新生儿感染性疾病的敏感性和特异性分析

根据 CRP、SAA 及 CD64 的结果绘制 ROC 曲线(图 2)。计算 CRP、SAA 及 CD64 的 ROC 曲线下面积分别为 0.600、0.567、0.870,最佳截断值分别

表 3 感染组和对照组全血 CD64 水平比较

Table 3 Comparison of whole blood CD64 between the infected group and control group

组别	<i>n</i>	CD64(荧光抗体分子/细胞)
感染组	100	5 023.94 \pm 1 221.13
对照组	20	623.94 \pm 325.35

为 CRP ≥ 8 mg/L、SAA ≥ 6 mg/L、CD64 $\geq 2 943$ 个荧光抗体分子/细胞。

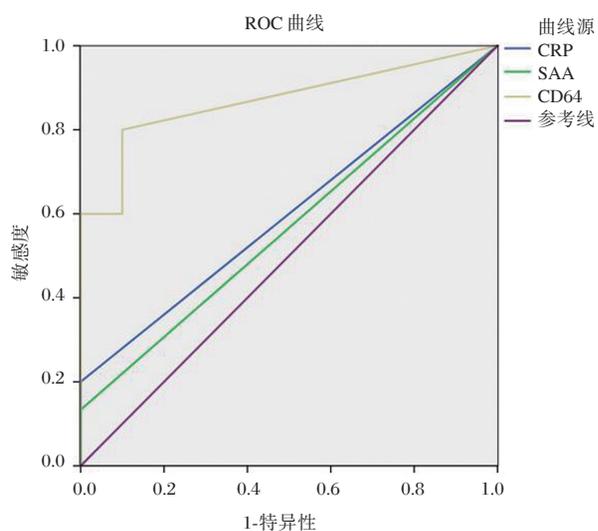


图2 CRP、SAA及CD64的ROC曲线

Figure 2 The ROC curves of CRP, SAA and CD64

CRP 诊断新生儿感染性疾病的敏感性和特异性分别为 58.23%、68.92%；SAA 分别为 64.21%、64.65%，而 CD64 分别为 92.31%、90.43%，以 CD64 的敏感性和特异性最强。

3 讨论

新生儿感染性疾病主要包括病毒性感染性疾病和细菌性感染性疾病，如败血症、手足口病等，这类疾病是造成新生儿死亡的主要原因之一。常规的血液检查如白细胞计数等，目前国内尚无新生儿的血常规参考值，各医院的检查方法缺乏标准化，阳性率不高，且标本容易受到污染，指导临床治疗相对滞后，也不能达到早期诊断的目的。因此，寻找高效、可靠、合理且操作方便的早期新生儿疾病感染标记物，具有极其重要的意义。

本研究所探讨的 3 种诊断新生儿感染性疾病的标志物在过去的研究中都有过类似的报道。CRP 的合成场所主要是肝脏，正常的新生儿出生早期自身免疫功能较低、免疫反应不成熟，导致其炎症反应较弱，因而血液中的含量非常低^[4]。但是在过去的研究中，Lannergard 等^[10]发现，CRP 和白细胞等都是非特异性的辅助诊断参考指标，不同个体之间的差异极为显著，而且经常受到感染性疾病以外的影响因素的干扰。因此，运用白细胞和 CRP 2 个指标作为新生儿感染性疾病的早期诊断均有可能误判。与李松等人^[7]研究结果一致，本

研究显示，CRP 对于新生儿感染性疾病的判断均具有较低的特异性和敏感性，其主要原因可能是因为 CRP 主要是细菌性炎症的活动指标，而新生儿感染性疾病的种类繁多，成因复杂，并不仅仅主要是由细菌性炎症导致，因此，CRP 对于新生儿感染性疾病的早期诊断有一定的参考价值，但不能成为诊断的金标准。

SAA 也是一种在急性时由肝脏分泌的反应蛋白，与 CRP 一样，在炎症和组织损伤时，会明显升高。但 SAA 是病毒性炎症的活动指标，CRP 在细菌性感染性疾病时明显增高，而 SAA 在细菌性感染性疾病时比 CRP 升高更早，下降更快，幅度更大，在除细菌以外等其他应急状态如病毒感染、呼吸道感染等发生时明显增高^[10]。有报道指出，检测 SAA/CRP 的比值，对 SAA 与 CRP 进行联合检测，比单独检测 SAA 或 CRP 具有更大的应用价值，联合检测 CRP 和 SAA 在血液中的含量可极大地提高早期的诊断效率，SAA/CRP 的比值与新生儿感染性疾病存在相关性^[11]。因此，SAA 为临床诊断的正确性和可靠性又增加了一个新的指标。本研究显示，在临床表现为疑似新生儿感染性疾病时，SAA 均明显高于对照组，多种感染性疾病均能出现 SAA 增高的情况，对于新生儿感染性疾病的早期诊断具有较高的敏感性，但是其特异性不高。与 Harr 和 Ulutas 等^[12-13]报道一致，SAA 在寄生虫感染与外伤等情况下，也会明显增加，这种在多种急性时均出现 SAA 增高的情况，一方面能使得 SAA 得到更广泛的应用，另一方面也说明，SAA 作为诊断新生儿感染性疾病的标准，特异性并不高。

CD64 是一种免疫球蛋白，正常情况下，大部分分布在外周血的巨噬细胞及其他细胞中，中性粒细胞表达较低^[15]。有研究报道指出，CD64 在非感染性炎症及病毒感染时均不会表达增加，从而说明 CD64 在早期诊断新生儿细菌性感染时具有较高的特异性^[14-15]。本研究显示，与对照组的新生儿相比，疑似感染性疾病的新生儿，其 CD64 的表达水平显著升高，且不受胎龄影响。CD64 的检测还可以使用免疫荧光染色，通过流式细胞分析仪快速检测，不仅操作简单，而且结果重复性好，通常在 2 h 内就可以完成检测，可为临床早期快速诊断提供重要的信息。与本研究结果一致，汪盈等^[15]也在研究中发现，CD64 对新生儿感染性疾病

的诊断具有较好的敏感性和特异性,而且随着感染程度的不同,CD64的表达水平也有所不同,是早期诊断新生儿败血症的灵敏指标。

综上所述,新生儿感染性疾病中,CRP、SAA、CD64水平的检测都对早期诊断具有一定的帮助。研究表明,与CRP和SAA相比,CD64具有更高的敏感性和特异性,是新生儿感染性疾病早期诊断的灵敏指标,但目前临床上采用2个或2个以上感染标记物的联合检测来诊断新生儿感染性疾病发生的报道越来越多,对新生儿的早期诊断和治疗具有积极作用。

参考文献

- [1] 葛青玮,高原,黄洁.高敏感C反应蛋白检测在新生儿感染性疾病中的应用[J].上海医学检验杂志,2002,17(4):211-212.
- [2] Hedegaard SS, Wisborg K, Hvas AM. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis—a systematic review[J]. *Infect Dis (Lond)*, 2015, 47(3):117-24.
- [3] 许彬,范志刚,杨云,等.血清降钙素原及C反应蛋白检测在新生儿重症感染性疾病诊断中的应用[J].实用临床医药杂志,2014,18(24):50-52.
- [4] Quadir AF, Britton, PN. Procalcitonin and C-reactive protein as biomarkers for neonatal bacterial infection [J]. *J Paediatr Child Health*, 2018, 54(6):695-699.
- [5] Liu S, Hou Y, Cui H. Clinical values of the early detection of serum procalcitonin, C-reactive protein and white blood cells for neonates with infectious diseases[J]. *Pak J Med Sci*, 2016, 32(6):1326-1329.
- [6] Arnon S, Litmanovitz I, Regev RH, et al. Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis [J]. *J Perinatol*, 2007, 27(5):297-302.
- [7] 李松,罗玲.新生儿败血症外周血中PCT、SAA、CD64含量与炎症反应程度及脏器功能的相关性[J].海南医学院学报,2017,23(4):542-545.
- [8] 汪浩.SAA、CD64及降钙素原在新生儿败血症早期诊断中的价值分析[J].中国妇幼保健,2016,31(10):2111-2113.
- [9] 周明莉,蔡爱玲,王雪峰.降钙素原及C反应蛋白测定在新生儿感染性疾病诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2011,32(6):683-684.
- [10] Lannergard A, Larsson A, Kraghsbjerg P, et al. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2003, 63(4):267-272.
- [11] 汪盈,黄玉梅,李海静,等.C-反应蛋白、中性粒细胞表面抗原CD64及血清淀粉酶A蛋白对极低出生体重儿败血症的早期诊断价值[J].中华围产医学杂志,2013,16(1):25-29.
- [12] Harr KE, Rember R, Ginn P E, et al. Serum amyloid A (SAA) as a biomarker of chronic infection due to boat strike trauma in a free-ranging Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) with incidental polycystic kidneys [J]. *J Wildl Dis*, 2011, 47(4):1026-1031.
- [13] Ulutas PA, Voyvoda H, Ulutas B, et al. Haptoglobin, serum amyloid - a and ceruloplasmin concentrations in goats with mixed helminth infection [J]. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 2008, 32(3):229-233.
- [14] Morsy AA, Elshall LY, Zaher MM, et al. CD64 cell surface expression on neutrophils for diagnosis of neonatal sepsis [J]. *Egypt J Immunol*, 2008, 15(2):53-61.
- [15] 汪盈,杨祖钦,孙忠敏,等.血清淀粉酶A蛋白、中性粒细胞表面抗原CD64在新生儿败血症中的诊断价值[J].临床儿科杂志,2013,6(31):526-529.

耐碳青霉烯类雷氏普罗威登斯菌耐药机制研究

贾琴妹¹ 孙乐² 满宝华^{1*}

[摘要] 目的 分析1株分离自足部感染的产KPC-2酶雷氏普罗威登斯菌的耐药性及其产酶类型。方法 常规方法分离培养、鉴定菌株;采用MIC及K-B法进行体外药物敏感试验;通过改良Hodge实验和EDTA协同实验进行碳青霉烯酶表型分析;应用PCR法进一步确定碳青霉烯酶的基因型。结果 这株雷氏普罗威登斯菌对喹诺酮类、 β -内酰胺类(包括碳青霉烯类)抗菌药物耐药,对阿米卡星敏感。改良Hodge实验阳性,EDTA协同实验阴性,仅检出KPC-2型基因,未检出IMP、VIM、NDM-1、OXA-48型碳青霉烯酶基因。结论 临床分离出的这株产KPC-2型碳青霉烯酶的雷氏普罗威登斯菌,警示我国需对产碳青霉烯酶的少见细菌进行严密监测,并采取感染控制措施以阻断耐药基因在细菌之间传播。

[关键词] 雷氏普罗威登斯菌;碳青霉烯酶;耐药基因

Study on the drug resistance mechanism of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri*

JIA Qinmei¹, SUN Le², MAN Baohua^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China, 650011; 2. Biochemistry Laboratory, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China, 650011)

[ABSTRACT] Objective To analyze the drug resistance and the enzyme production of a strain of *Providencia rettgeri* producing KPC-2 isolated from foot infection. Methods The strain was cultured, isolated and identified. The *in vitro* drug sensitivity test was performed by MIC and KB methods. The carbapenemase phenotype analysis was carried out by modified Hodge experiment and EDTA synergistic experiment. The carbapenemase genotype was further determined by PCR. Results The isolated *Providencia rettgeri* was resistant to quinolones and β -lactams (including carbapenems), and sensitive to amikacin. The modified Hodge test was positive and the EDTA-disk synergy test was negative. Only the KPC-2 gene was detected and the IMP, VIM, NDM-1 and OXA-48 carbapenemase genes were no detected. Conclusion The clinical isolate of this strain of KPC-2 carbapenemase, which is a rare strain of carbapenemase, requires close monitoring the carbapenemase-producing strain and adopts infection control measures to prevent the drug-resistance genes transmitted between bacteria.

[KEY WORDS] *Providencia rettgeri*; Carbapenemases; Drug-resistant genes

普罗威登斯菌属(*Providencia*)肠杆菌科细菌,是肠道中正常菌群之一。该菌属在自然界中分布广泛,属于条件致病菌。普罗威登斯菌属包括

产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*, *P.alcalifaciens*)、斯氏普罗威登斯菌(*Providencia stuartii*, *P.stuartii*)、雷氏普罗威登斯菌(*Providencia*

基金项目:云南省科技厅应用基础研究联合专项资金项目(201501UC00015)

作者单位:1. 云南省第三人民医院检验科,云南,昆明 650011

2. 昆明医科大学生物化学教研室,云南,昆明 650011

*通讯作者:满宝华, E-mail:782312993@qq.com

cia rettgeri, *P.rettgeri*)、鲁氏普罗威登斯菌(*Providencia rustigianii*, *P.rustigianii*)和亨巴赫普罗威登斯菌(*Providencia heimbachae*, *P.heimbachae*)。雷氏普罗威登斯菌极易在食品的加工、运输、销售等过程中大量繁殖而导致肠道感染和食物中毒^[1]。此外,国内外还有该菌引起的旅行者腹泻、眼部感染、菌血症、尿路感染等相关报道^[2-3]。本文将报道1株来自足部感染的耐碳青霉烯类雷氏普罗威登斯菌及其耐药机制,从而来加强医务人员的认识,意识到合理使用抗菌药物的重要性。

1 材料和方法

1.1 临床资料

患者,男性,60岁,因“右足脚趾红肿半月,发黑、流脓、发热3d”入住云南省第三人民医院。专科检查:右足背稍肿胀,色素沉着,脚趾发黑,恶臭,脚趾根部掌侧见鸽子蛋大小软组织缺损,见脚趾屈肌腱,无明显渗出,脚趾部分功能存在,感觉消失,余各指感觉稍减退。既往有糖尿病史20余年。入院检查:血生化示血糖9.8 mol/L;尿常规示葡萄糖2+,酮体阴性;血常规示白细胞 $12.16 \times 10^9/L$ 、中性粒细胞占72%;予抗炎和降血糖治疗。脚趾根部掌侧渗出液培养示雷氏普罗威登斯菌,治疗5d后,再次培养,结果无细菌生长。继续治疗7d后,所有症状好转,给予出院。

1.2 菌株来源

分离得到的雷氏普罗威登斯菌源于云南省第三人民医院内分泌科某糖尿病患者右足脚趾根部掌侧溃破处。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC25922),购自国家卫生计生委临床检验中心。

1.3 仪器与试剂

VTEK 2 Compact全自动微生物鉴定仪及配套鉴定/药敏卡购自法国生物梅里埃公司生产;CO₂培养箱购自美国Thermo公司产品;漩涡混合器VDRTEX-5购自海门其林贝尔仪器制造有限公司;PCR扩增仪购自美国PE公司;电泳仪购自美国Tanon公司;紫外凝胶成像仪购自上海复日生物技术有限公司。

1.4 菌株的分离培养、鉴定与体外药物敏感性试验

无菌采集患者足部感染灶中分泌物样本,接

种于血琼脂平板、麦康凯琼脂平板和巧克力琼脂平板等(郑州安图生物有限公司生产),置CO₂温箱37℃孵育24h。随后挑取纯菌落,采用Vitek 2 Compact全自动微生物鉴定仪及配套鉴定卡/药物敏感性卡,进行菌种鉴定和体外药物敏感性试验,确定其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值。同时采用美国临床实验室标准化协会(the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的纸片扩散法(英国Oxoid公司产品)来补充药物敏感性卡中没有覆盖到的抗菌药物。

1.5 碳青霉烯酶表型的检测

1.5.1 改良Hodge实验(modified Hodge test, MHT)方法

将0.5麦氏浊度的大肠埃希菌(ATCC25922)菌悬液进行1:10稀释后均匀涂布于水解酪蛋白琼脂平板上,待其干燥后将厄他培南纸片置于平板正中心;使用接种环挑取菌落从纸片边缘向平板边缘垂直划线,37℃孵育16~18h观察结果。如果在被测菌株与大肠埃希菌(ATCC25922)抑菌圈交汇处,大肠埃希菌生长增强,即产碳青霉烯酶。

1.5.2 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetra acetic acid, EDTA)协同实验

将0.5麦氏浊度的待检菌悬液涂布于水解酪蛋白琼脂平板上,待其干燥后将亚胺培南(10 μg)纸片置于距离EDTA纸片(4 μg)1 cm平板表面,37℃孵育16~18h观察结果。当亚胺培南抑菌圈在靠近EDTA纸片侧明显扩大者为产金属类碳青霉烯酶。

1.6 碳青霉烯酶耐药基因检测

根据文献报道合成聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物,引物序列见表1,包括最为常见的KPC酶和金属β-内酰胺酶(MBLs)IMP、VIM、NDM-1以及苯唑西林酶OXA-48^[4-5]。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,阳性PCR产物送上海生工公司测序。

2 结果

2.1 体外药物敏感性试验

雷氏普罗威登斯菌对氟喹诺酮类、大部分氨基糖苷类、β-内酰胺类抗菌药物耐药,对阿米卡星敏感,见表2。

表1 编码碳青霉烯酶耐药基因引物序列及扩增片段长度

Table 1 The drug resistance gene primer sequence and amplification fragment length of carbapenemases

基因	引物序列(5'~3')	扩增产物长度(bp)
<i>blaKPC</i>	F: TGTCACCTGTATCGCCGTCT	892
	R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
<i>blaIMP</i>	F: ATGGTTTGGTGGTTCTTGT	488
	R: TAATTTGGCGGACTTTGGC	
<i>blaVIM</i>	F: TATGGAGCAGCAACGATGT	920
	R: AAAAGTCCCCTCCAACGA	
<i>blaNDM-1</i>	F: CAGCACACTTCCTATCTC	292
	R: CCGCAACCATCCCCTCTT	
<i>blaOXA-48</i>	F: GCTTGATCGCCCTCGATT	281
	R: GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	

2.2 碳青霉烯酶表型检测结果

改良 Hodge 试验阳性,见图 1。

EDTA 协同试验阴性,见图 2。

2.3 碳青霉烯酶耐药基因检测结果

通过对 *KPC*、*IMP*、*VIM*、*NDM-1*、*OXA-48* 共 5 种常见碳青霉烯酶基因的扩增, *blaKPC* 为阳性,其余均为阴性,见图 3。测序结果显示检出的 *KPC* 与 *KPC-2* 有 99% 同源 (GenBank 登录号: FJ628167)。

3 讨论

由于抗菌药物不合理不规范的广泛应用,再加之随后的“王牌”抗菌药物——碳青霉烯类药物备受临床青睐,用量增多,导致多重耐药及泛耐药细菌日趋严重,其中耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 是重要组成成员之一,给人类健康带来严重的威胁。CRE 主要的耐药机制是产碳青霉烯酶,目前国外最流行的主要有 *KPC*、*IMP*、*VIM*、*NDM* 酶^[6-7],而国内主要流行的为 *KPC* 和 *IMP* 酶^[8],新德里金属 β 内酰胺酶-1 (*NDM-1*) 也有散在报道^[9]。*KPC* 型酶是一种几乎能水解所有 β-内酰胺类抗菌药物的 A 类水解酶。2001 年首次由 Yigit 等^[10]在美国北卡罗纳州从肺炎克雷伯菌中发现 *KPC-1* 型,2003 年 *KPC-2* 型在马里兰从肺炎克雷伯菌中发现。2004 年我国首次在浙江大学医学院附属第一

表2 雷氏普罗威登斯菌药物敏感性结果

Table 2 The results of the drug sensitivity of *Providencia rettgeri*

抗菌药物	MIC 值 (μg/mL)	KB 值 (mm)	敏感度
阿米卡星	8	/	S
氨曲南	≥64	/	R
环丙沙星	≥4	/	R
头孢曲松	≥64	/	R
头孢唑啉	≥64	/	R
厄他培南	≥8	/	R
头孢吡肟	≥64	/	R
头孢西丁	≥64	/	R
呋喃妥因	256	/	R
庆大霉素	≥16	/	R
左旋氧氟沙星	≥8	/	R
复方磺胺甲噁唑	≥16	/	R
替加环素	≥8	/	R
妥布霉素	≥16	/	R
哌拉西林-三唑巴坦	32	/	I
哌拉西林	-	20	I
头孢呋辛	-	6	R
头孢他啶	-	6	R
美罗培南	-	6	R
头孢哌酮-舒巴坦	-	6	R
氨苄西林	≥32	/	R
氨苄西林-克拉维酸	≥32	/	R
亚胺培南	≥16	/	R

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感; “/”表示未进行 KB 值检测; “-”表示仪器药敏卡上没有这些药。

医院从肺炎克雷伯菌中发现了 *KPC* 酶^[11]。目前为止, GenBank 已记录的 *KPC* 型酶有 14 亚种,全球范围内报道的 *KPC* 型酶多以 *KPC-2* 型和 *KPC-3* 型为主,国内以 *KPC-2* 型为主,且产 *KPC* 型酶的细菌以肺炎克雷伯菌为主。本报道中检测到的碳青霉烯酶就是国内主要流行的 *KPC-2* 型,未检测到 *IMP*、*VIM*、*NDM-1*、*OXA-48* 型等,且产酶菌株是从糖尿病足患者脚趾根部掌侧渗出液中分离培养出来的雷氏普罗威登斯菌,此菌属肠杆菌科细菌。从本文药物敏感性实验结果可知这株雷氏普罗威登斯

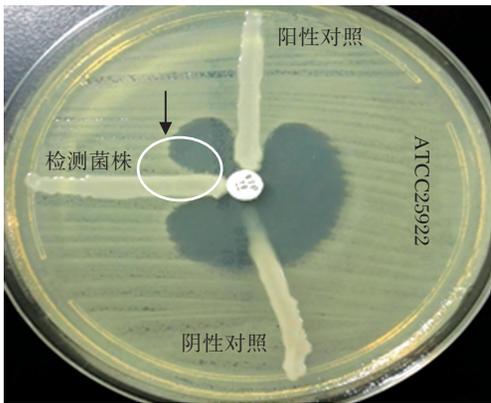


图1 改良 Hodge 实验检测碳青霉烯酶
Figure 1 The modified Hodge test of detection carbapenemases

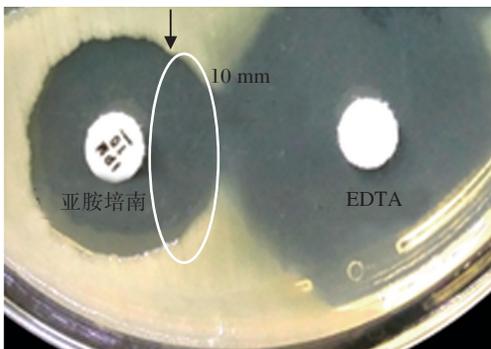
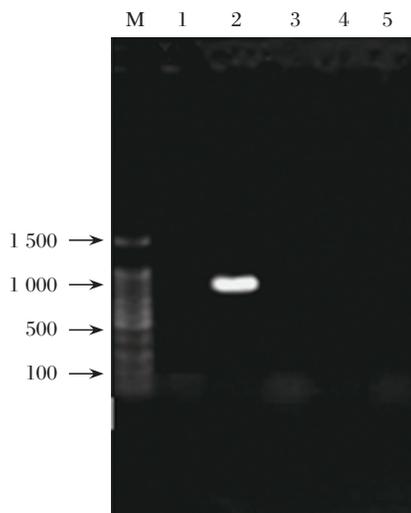


图2 EDTA 协同实验检测碳青霉烯酶
Figure 2 EDTA collaborative test of detection carbapenemases



M 为 DNA 100 bp 标准; 1 为 *blaVIM*; 2 为 *blaKPC*; 3 为 *blaIPM*; 4 为 *blaOXA-48*; 5 为 *blaNDM-1*。

图3 PCR 扩增雷氏普罗威登斯菌碳青霉烯酶耐药基因
Figure 3 PCR amplification resistance gene of carbapenemases of *Providencia rettgeri*

菌已是泛耐菌,其耐药机制除了产 *KPC-2* 型酶外,可能还存在其他的耐药机制,如:膜孔蛋白缺失、高水平产生头孢菌素酶(AmpC)或突变联合 ES-BLs、外排泵的过度表达等^[12],其中产生碳青霉烯酶 *KPC-2* 可能是这株菌最主要的耐药机制。同时,从本报道可知产碳青霉烯酶的细菌不仅仅局限于肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和鲍曼不动杆菌复合菌等分离培养较常见的细菌,而是细菌种类在向多样化方向发展,且存在着向不常见细菌种类蔓延趋势,这不单说明是产酶菌株种类在逐年涌现,更体现了碳青霉烯酶耐药基因可能在细菌之间存在水平传播或全球范围的扩散,所以医务人员应加强警惕,防止局部流行或爆发感染。

雷氏普罗威登斯菌主要分离自人的尿液、血液或痰液,很少分离自分泌物样本。本报道中雷氏普罗威登斯菌不仅感染部位及来源特殊,而且产碳青霉烯酶,在国内相关文献报道中也是较少见,但也偶有报道^[13]产 *NDM-1* 及 *ESBLs* 的雷氏普罗威登斯菌,如:2011 年我国广东省某三甲医院从患者肝脓肿引流液中分离出一株产碳青霉烯类酶 *NDM-1* 型的雷氏普罗威登斯菌^[14],除此之外至今未见其它相关的报道。国外已有多篇文献^[15-17]报道雷氏普罗威登斯菌属可产生 *IMP-1* 型金属 β -内酰胺酶以及各种 β -内酰胺酶,如 *CTX-M-15*、*VEB-1a* 和 *PER-1* 型 *ESBLs* 和 *ArmA* 型 *16SrRNA* 甲基化酶等^[18]。这说明国内国外对这种不常见菌株都面临着耐药性升高的难题,具体原因还需结合当地情况分析,找到有效的解决方法与措施,控制其继续传播。

近几年,国内外相关普罗威登斯菌属的报道在不断增多,其耐药问题应引起足够的重视,尽量做到防止或减少多重耐药菌株(主要是产碳青霉烯酶菌株)的出现,原因是产碳青霉烯酶细菌感染常伴随高致残率或高死亡率等严重后果,且编码碳青霉烯酶的基因大部分位于可移动基因元件(质粒或转座子)上,可以在不同的种属之间经接合、转导、转染、插入等进行传播^[19-21],而且可通过医疗器械及医务工作者等多种途径在患者间传播和交叉感染,具有局部暴发流行的潜在危害。因此,快速、准确地检测产酶菌株,对于患者的治疗、防止耐药基因的播散具有重要意义,与此同时,医护人员应提高意识,加强全院耐药监测、严格执行手卫生和消毒隔离等措施。本报道也再次敲响警

钟:规范合理使用抗菌药物。目前,市场上的抗菌药物已经赶不上细菌的变异速度,新的药物还在研发中,所以全球都面临着受威胁的困难处境。总之,为了全人类的健康,我们呼吁严格使用抗菌药物,加快新药问世的步伐。

参考文献

- [1] 章根华. 一起雷氏普罗威登斯菌引起的食物中毒调查[J]. 上海预防医学杂志, 2005, 17(3):128.
- [2] Dainel A, Thierry N, Marie FL, et al. Novel genetic structure associated with an extended-spectrum β -lactamase bla_{VEB} gene in a *Providencia stuartii* clinical isolate from Algeria [J]. J Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8):3590-3592.
- [3] 陈慧红, 沈伟伟, 罗芸, 等. 对碳青霉烯类抗生素敏感性下降的肠杆菌科细菌耐药机制的研究及流行病学调查[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(9):792-795.
- [4] Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, et al. Multiplex PCR for Rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 59(2):321-322.
- [5] Poirel L, Heritier C, Tolun V, et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in klebsiella pneumoniae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 48(1):15-22.
- [6] Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece a review of the current evidence [J]. Euro Surveill, 2013, 13(4):8023.
- [7] Oteo J, Delgado IA, Vega D, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical Escherichia coli during therapy [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 32(6):534-537.
- [8] 陈慧红, 沈伟伟, 罗芸, 等. 对碳青霉烯类抗生素敏感性下降的肠杆菌科细菌耐药机制的研究及流行病学调查[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 31(9):792-795.
- [9] 李智伟, 董路宁, 韩艳, 等. 产新德里金属 β 内酰胺酶-1的阴沟肠杆菌检测与鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(1):85-87.
- [10] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4):1151-1161.
- [11] Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2):763-765.
- [12] Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, et al. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) [J]. Expert Rev Infect Ther, 2016, 14(1):95-108.
- [13] 陈艳清, 贾建, 邝兆威. 普罗威登斯菌属 β -内酰胺酶的分类检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 12(18):1778-1779.
- [14] Xia S, Xiao SN, Zhang Q, et al. Emergence of carbapenem resistant *Providencia rettgeri* and its resistance mechanisms [J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 23(35):2508-2511.
- [15] Lee HW, Kang HY, Shin KS, et al. Multidrug-resistant *Providencia* isolates carrying bla_{PER-1}, bla_{VIM-2}, and armA [J]. J Microbiol, 2007, 45(3):272-274.
- [16] Shiroto K, Ishii Y, Kimura S, et al. Metallo-beta-lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan [J]. J Med Microbiol, 2015, 54(11):1065-1070.
- [17] Nordmann P, Couard JP, Sansot D, et al. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Europe [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(1):150-151.
- [18] Ji S, Lv F, Du X, et al. Cefepime combined with amoxicillin/clavulanic acid: a new choice for the KPC-producing *K. pneumoniae* infection [J]. Int J Infect Dis, 2015, 38:108-114.
- [19] 热那古·艾山, 帕丽扎提·阿布都依木, 李娟, 等. 产KPC型碳青霉烯酶细菌的耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10):2169-2171.
- [20] 蒋伟, 王思淼, 金鑫. 耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌耐药性与分子特征分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(8):1696-1705.
- [21] 蒋士命, 许德岳. 多重耐药药氏普罗威登斯菌致下呼吸道感染一例[J]. 检验医学, 2015, 27(9):735-740.

2014-2017年玉林市手足口病监测结果分析

谭烈明^{1*} 邓艺燕²

[摘要] **目的** 分析玉林市手足口病发病情况及其病原谱的构成,为手足口病的诊断、治疗及其防控提供科学依据。 **方法** 收集2014年1月至2017年12月玉林市红十字会医院临床诊断为手足口病患者的肛拭子标本32 077例,应用实时荧光定量-聚合酶链反应(qRT-PCR)技术对标本进行病毒核酸检测,并分析病毒类型与临床相关性。 **结果** 肠道病毒阳性率为80.1%(25 870/32 077),其中EV71型、CA16型及非EV71/CA16型阳性检出率分别为12.4%(3 203/25 870)、5.4%(1 402/25 870)及82.2%(21 265/25 870),以非EV71/CA16型为主;非EV71/CA16组与CA16组、EV71组在各年龄组中分别比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),在男性与女性之间的阳性率的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。手足口病各月均可发病,具有明显的季节性,病例数主要集中在4~9月。 **结论** 2014-2017年玉林市手足口病病原谱发生变化,非EV71/CA16的肠道病毒成为优势流行株,因此应加强未分型样本的监测工作。应重视儿童手足口的诊治、日常监测和防控工作。

[关键词] 手足口病;聚合酶链反应;肠道病毒

Analysis of the surveillance results of hand, foot and mouth disease in Yulin City in 2014-2017

TAN Lieming^{1*}, DENG Yiyan²

(1. Yulin Red Cross hospital clinical laboratory, Guangxi, Yulin, China, 53700; 2. Yulin Red Cross hospital Paediatrics, Guangxi, Yulin, China, 53700)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the incidence of hand-foot-mouth disease (HFMD) and its pathogen spectrum in Yulin city, and to provide a scientific basis for the diagnosis, treatment and prevention of HFMD. **Methods** A total of 32 077 anal swab specimens from patients with HFMD diagnosed in Yulin Red Cross Hospital from January 2014 to December 2017 were collected. The real-time fluorescence quantitative-polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique was used to detect viral nucleic acid samples and analyze the virus type and clinical relevance. **Results** The positive rate of enterovirus was 80.1% (25 870/32 077). The positive detection rates of EV71, CA16 and non-EV71/CA16 were 12.4% (3 203/25 870), 5.4% (1 402/25 870) and 82.2% (21 265/25 870), respectively. Non-EV71/CA16 type was the main type. There was a significant difference between non-EV71/CA16 group and CA16 or EV71 ($P < 0.01$). The positive rate between male and female was not statistically significant difference ($P > 0.05$). The incidence of HFMD has obvious seasonality of HFMD and the number of cases is mainly concentrated from April to September. **Conclusion** The pathogen spectrum of HFMD in Yulin city has changed in 2014-2017, and the non-EV71/CA16 enterovirus became the dominant strain. Therefore, the monitoring of untyped samples should be strengthened. More attention should be paid to the diagnosis, treatment, daily monitoring and prevention and control of HFMD.

[KEY WORDS] Hand foot and mouth disease; Polymerase chain reaction; Enterovirus

作者单位:1. 广西玉林市红十字会医院检验科,广西,玉林 537000

2. 广西玉林市红十字会医院儿科,广西,玉林 537000

*通讯作者:谭烈明, E-mail: 52992891@qq.com

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是儿童常见的传染性疾病,该病于5岁以下儿童多发,以手、足、口多发疱疹为主要特征,病情发展快,可导致个别重症患儿死亡^[1]。目前已有20多种肠道病毒可引发手足口病,最为常见的是肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒A16型(coxsackievirus A16, CA16)引起^[2-4],并且在全球多次大规模爆发流行。近年来, HFMD的病原除主要型别外,由其他型别所引起的HFMD,也逐渐被认识。为了解玉林市HFMD的主要病原谱构成,现对玉林市红十字会医院2014年1月至2017年12月共32 077例HFMD临床送检标本的病原学检测结果进行分析,为手足口病防治提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

采集2014年1月-2017年12月临床诊断为HFMD患者的肛拭子标本共32 077例,其中男性19 505例,女性12 572例,年龄10天至73岁,平均年龄(2.1±0.02)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

由护士或医生采集标本,采集前由专业人员对采集规范进行培训。肛拭子:可用棉签由肛门插入直肠内采取,使拭子变成湿润并染有一些粪便颜色。将棉签放入内装有2 mL生理盐水的采样管中并保存于2~8℃冰箱。

1.2.2 病毒RNA提取

使用中山大学达安基因股份有限公司提取试剂盒(离心柱提法)提取RNA,充分混匀标本后,取100 μL加入50 μL的蛋白酶K和200 μL的裂解工作液,

72℃ 10 min,加入250 μL乙醇,混匀后,全部移入离心柱中,离心,纯化,洗脱。提取好的RNA可以直接用于检测,也可存于-20℃,24 h内完成检测。

1.2.3 荧光定量PCR核酸检测

使用中山大学达安基因股份有限公司提供的荧光定量PCR试剂盒(PCR-荧光探针法),反应体系:RT-PCR反应液15 μL、逆转录酶2 μL、Taq酶3 μL;上述PCR反应管中分别加入处理后的阴性质控品、待测样品混浊液、阳性质控品各5 μL,3 000 r/min离心30s,放入PCR扩增仪。在瑞士罗氏cobas480实时荧光PCR仪器上进行RNA检测,具体反应条件参照试剂盒说明书。

1.2.4 结果判断

阴性质控品:无典型S型扩增曲线或无Ct值;阳性质控品:呈典型S型扩增曲线且Ct值≤30;如果检测结果无典型S型扩增曲线或Ct值>34.9,则判断标本为阴性;如果检测结果呈典型S型扩增曲线且Ct值≤34.9,则判断标本为阳性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 24.0软件进行数据分析处理,采用 χ^2 检验对结果进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原谱构成

共检测32 077份标本,其中肠道病毒阳性率为80.1%(25 870/32 077),其中EV71型阳性检出率为12.4%(3 203/25 870),CA16型阳性检出率为5.4%(1 402/25 870),非EV71/CA16型阳性检出率为82.2%(21 265/25 870)。4年间,非EV71/CA16型的阳性与EV71型和CA16型的比较差异有统计学意义($\chi^2=2 851.99, P=0.000, P < 0.01$),见表1。

表1 2014-2017年玉林市各年手足口病核酸检测结果

Table 1 Results of nucleic acid detection of hand, foot and mouth disease in Yulin City, 2014-2017

年份	总检测例数 (n)	EV		CA16		EV71		非EV71/CA16	
		检出例数 (n)	总阳性率 (%)	检出例数 (n)	占总阳性率 (%)	检出例数 (n)	占总阳性率 (%)	检出例数 (n)	占总阳性率 (%)
2014	6 550	4 964	75.8	374	7.5	1 440	29.0	3 150*	63.5
2015	8 780	6 990	79.6	234	3.3	331	4.7	6 425*	91.9
2016	7 577	6 284	82.9	755	12.0	765	12.2	4 764*	75.8
2017	9 170	7 632	83.2	39	0.5	667	8.7	6 926*	90.7
合计	32 077	25 870	80.1	1 402	5.4	3 203	12.4	21 265	82.2

*表示在2014年-2017年非EV71/CA16与EV71、CA16阳性比较, $\chi^2=2 851.99, P=0.000, P < 0.01$ 。

2.2 实时荧光定量PCR检测结果

阳性检测结果的扩增曲线呈典型S型扩增曲线且Ct值≤34.9。阴性检测的结果无典型S型扩增曲线或Ct值>34.9(图1,图2)。

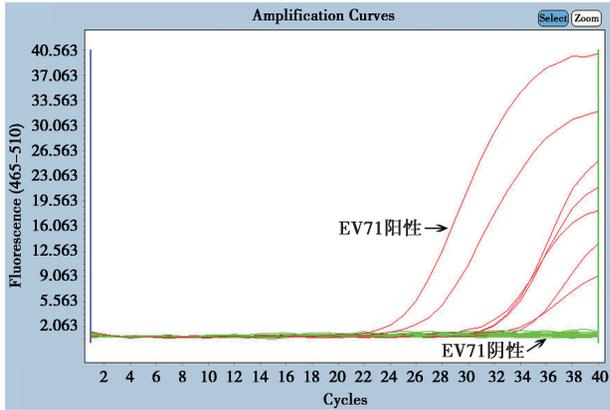


图1 荧光定量PCR检测曲线
Figure 1 The curve of RT-PCR

2.3 年龄分布特征

从年龄分布来看,玉林市2014至2017年发病年龄最小为10d,最大为73岁,发病的人群以5岁以下儿童为主,占97.97%(25 345/25 870)。其中0~3岁儿童发病最多,占总病例数的89.98%(23 278/25 870)。CA16型和EV71型的阳性率

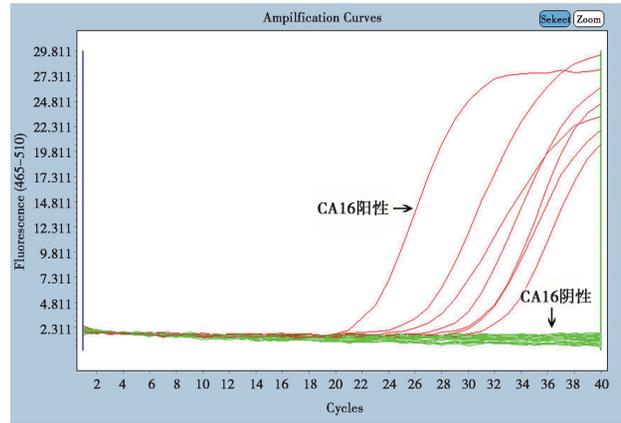


图2 荧光定量PCR检测曲线图
Figure 2 The curve of RT-PCR

在所有年龄组间比较,差异无统计学意义($\chi^2=5.48, P=0.48, P > 0.05$)。非EV71/CA16组与CA16组、EV71组在各年龄组中分别比较,差异具有统计学意义($\chi^2=424.35, P=0.000, P < 0.01$),见表2。

2.4 性别分布

手足口病病毒在男性与女性之间的阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.093, P=0.955, P > 0.05$),说明病毒感染在不同性别患者中的感染情况无差异,见表3。

表2 2014-2017年玉林市手足口病各年龄段分布情况

Table 2 Distribution of hand, foot and mouth Disease by age in Yulin City, 2014-2017

年龄(岁)	标本数(n)	EV总阳性 [n (%)]	CA16占总阳性 [n (%)]	EV71占总阳性 [n (%)]	非EV71/CA16占总阳性 [n (%)]
0~	4 782	3 876(81.1)	140(3.6)	230(5.9)	3 506(90.5)*
1~	11 868	9 906(83.5)	504(5.1)	1 017(10.3)	8 385(84.6)*
2~	7 343	6 013(81.9)	344(5.7)	855(14.2)	4 814(80.1)*
3~	4 378	3 483(79.6)	232(6.7)	657(18.9)	2 594(74.5)*
4~	1 962	1 492(76.0)	101(6.8)	248(16.6)	1 143(76.6)*
5~	832	575(69.1)	53(9.2)	110(19.1)	412(71.7)*
6及以上	912	525(57.6)	28(5.3)	86(16.4)	411(78.3)*
合计	32 077	25 870	1 402	3 203	21 265

“0~”表示年龄段未周岁,“1~”表示年龄段1周岁至未周岁,以此类推。“”表示在各年龄段中非EV71/CA16阳性组与CA16阳性组、EV71阳性组比较, $\chi^2=424.35, P=0.000, P < 0.01$ 。

2.5 月份分布特征

2014-2017年各月均有发病,发病具有明显的季节性,呈双峰型分布。4月开始上升,随后的5~7月持续处于高发水平,此为春夏高

峰,是发病的最高峰。自7月开始病例数逐渐递减,进入9月后病例数开始反弹上升,为发病的次高峰。春夏高峰的流行周期长于秋冬高峰(图3)。

表3 2014-2017年玉林市手足口病患者性别的分布情况

Table 3 Gender Distribution of hand, foot and mouth disease in Yulin City, 2014-2017

性别	标本数 (n)	EV 总阳性 [n (%)]	CA16 占总阳性 [n (%)]	EV71 占总阳性 [n (%)]	非 EV71/CA16 占总阳性 [n (%)]
男	19 505	15 656(80.3)	840(5.4)	1 927(12.3)	12 889(82.3)*
女	12 572	10 214(81.2)	562(5.5)	1 276(12.5)	8 376(82.0)*
合计	32 077	25 870	1 402	3 203	21 265
χ^2			0.461		
P 值			0.927		
P			> 0.05		

“*”表示在EV总阳性、CA16阳性、EV71阳性和非EV71/CA16阳性组中男与女比较, $\chi^2=0.461$, $P=0.927$, $P>0.05$, 差异无统计学意义。

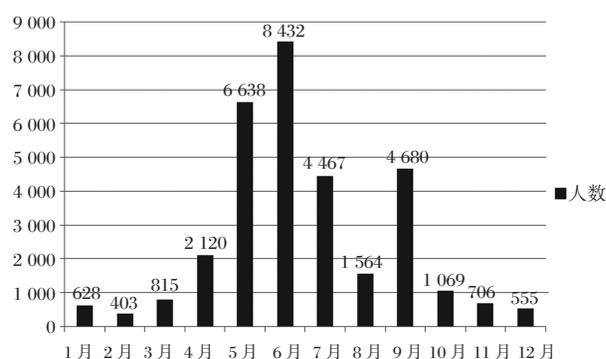


图3 2014-2017年不同月份手足口病发病人数分布

Figure 3 The incidence of HFMD in different months from 2014 to 2017

3 讨论

手足口病在我国流行强度较大,自2008年以来全国很多地方爆发过较大规模,已成为危害我国儿童健康的重要公共卫生问题^[5]。因此对于流行季节的实验室诊断,采用简便、快捷、准确的技术则是实验室诊断的关键。qPCR是将PCR技术和荧光检测技术结合起来实现了对核酸的自动化检测的技术,其原理是在PCR反应体系中加入荧光基团,利用PCR对DNA的高效扩增,运用高特异性的探针和高敏感性的光谱技术检测目的片段及定量。因此荧光定量基因检测方法可准确、灵敏地反映感染数量和治疗恢复情况,对手足口病早期诊断和疗效的观察具有重要的指导作用。

本文通过对玉林市2014-2017年手足口病病原体流行特征监测发现,玉林市手足口病全年均可发病,且发病存在季节性变化,病例主要集中在4~9月,这与胡跃华、孙军玲等^[6-7]报道的手足口病在夏、秋季均有明显流行高峰一致。玉林市2014-

2017年手足口病的发病人群为主要是5岁以下儿童,其中0~3岁儿童发病数最多,此结果与刘莹莹、杭惠等^[8-10]报道的结果相符,该现象可能与人群免疫水平及个人卫生习惯有关,5岁以下儿童免疫水平较低,卫生意识淡薄,容易受到各种细菌病毒入侵,疾病感染的风险增大。故儿童在0~3岁时发病最多,5岁后较少。从性别来看,男童发病例数高于女童,可能与男童好动,活动范围较女童广,个人卫生习惯不如女童有关。因此,在每年夏、秋季加强对5岁以下儿童,尤其是0~3岁男童的手足口病防控,可有效控制手足口病的蔓延。

叶瑞国等^[11]报道2012年玉林市手足口病主要以EV71型和CA16型为优势流行毒株。本研究发现2014年EV71型阳性率为29%,CA16型为7.5%,非EV71/CA16型阳性率为63.5%。并且2015-2017年非EV71/CA16型肠道病毒所占的比例逐渐增加,比率从63.5%升至90.7%。说明从2014年起玉林市流行季HFMD的肠道病毒感染已从EV71型和CA16型占主要,改变到非EV71/CA16型成为主要流行株,与朱俊萍、关恒云等^[12-13]报道的手足口病病原研究结果基本一致,和国内外有关报道相似^[14-15]。目前,国内有关HFMD致病机制和预防治疗关注的焦点主要集中于EV71型和CA16型2种病原,但是近年来国内很多地方报道EV71和CA16型感染比率已经减少,其它型别肠道病毒在HFMD流行中所占比例明显增加。从2010年起,陈前进、赵虹等^[16-18]陆续报非EV71/CA16型病毒株逐渐在国内HFMD中逐渐成为优势流行病毒株。廖琳虹、邱惠芳等^[19-23]也发现其他肠道病毒感染成为HFMD的重要组成部分。目前,玉林市手足口病常规的病原

学检测仅针对肠道病毒通用、EV71型和CA16型,而非EV71/CA16型病毒株逐渐成为引发手足口病暴发流行的优势菌株,为了预防和控制手足口病的暴发流行,下一步要对非EV71/CA16型病毒株进行基因分型,期待更多肠道病毒分型产品应用于临床。

因此,加强对玉林市手足口病其他型别病原体的监测,确立更为精确、全面的肠道病毒分型,建立并完善玉林市手足口病详细病原谱,把握手足口病病原体流行趋势,可为今后手足口病的诊治、日常监测和防控工作提供科学依据。

参考文献

- [1] ZHANG D, LI R, ZHANG W, et al. A case-control study on risk factors for severe hand, foot and mouth disease[J]. *SciRep*, 2017(7): 40282.
- [2] Zhu J, Luo Z, Wang J, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009[J]. *PLoS One*, 2013,8(2):e56318.
- [3] Li W, Yi L, SU J, et al. Seroprevalence of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in Guangdong, China, in pre- and post-2010 HFMD epidemic period [J]. *PLoS One*, 2013,8(12):e80515.
- [4] 郭青,张春曦,王晓风,等. 2008-2009年中国大陆手足口病流行特征分析[J]. *疾病监测*, 2011,26(11): 852-856.
- [5] 张勇,郭彦艳,许学伟,等. 2008-2013年安徽省滁州市手足口病流行特征分析[J]. *职业与健康*, 2015, 31(2):195-198.
- [6] 胡跃华,肖革新,郭莹,等. 2008-2011年中国大陆手足口病流行特征分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2014, 8(18):693-697,747.
- [7] 孙军玲,张静. 手足口病流行病学研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(9):973-975.
- [8] 刘莹莹,于秋丽,苏通,等. 2011-2015年河北省手足口病流行特征及病原特征分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2017, 21(2):151-155.
- [9] 蒋丽娜,谭毅,王晶,等. 2008-2015年广西手足口病流行病学特征及时空聚集性分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2017, 21(4):340-344.
- [10] 杭惠,夏瑜,陈立凌,等. 2011-2015年苏州市手足口病流行病学特征分析[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(21):3850-3854.
- [11] 叶瑞国,庞晓泸,蒋宁,等. 2010-2011年玉林市手足口病病原学检测结果分析[J]. *预防医学论坛*, 2012, 18(9):697-698.
- [12] 朱俊萍,徐子刚,陈辉,等. 2007年北京地区儿童手足口病病原的初步筛查[J]. *病毒学报*, 2009, 25(1):23-28.
- [13] 关恒云,杨梦婕,刘岚铮,等. GeXP多重基因表达遗传分析系统对2009-2012年济南市手足口病病原谱的研究[J]. *病毒学报*, 2014, 30(5):567-571.
- [14] 葛艳玲,郑亚旭,潘浩,等. 2010至2014年上海地区儿童手足口病的流行病学监测[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 9(9):676-683.
- [15] Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(2):337-339.
- [16] 陈前进,严延生,何家鑫,等. 一起CoxA16引起某幼儿园手足口病暴发调查[J]. *海峡预防医学杂志*, 2008, 14(1):45-47.
- [17] 廖琳虹,杨萍,廖亦红,等. 2012-2014年龙岩市手足口病病原学监测结果分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(6):536-538.
- [18] 赵虹,林鸿波,陈懿,等. 2012-2013年宁波市鄞州区手足口病病原分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(17):2543-2545.
- [19] Han J F, Xu S, Zhang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013 [J]. *J infect*, 2014, 69(3):303-305.
- [20] 邱惠芳,潘丽峰,汤琰,等. 上海市浦东新区2013年手足口病检测结果分析[J]. *中国初级卫生保健*, 2014, 28(9):97-99.
- [21] 廖琳虹,杨萍,曹春远,等. 2014-2015年龙岩市非EV71、非CoxA16手足口病肠道病毒病原谱分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(11):1549-1551.
- [22] Feng X, Guan W, Guo Y, et al. A novel recombinant lineage's contribution to the outbreak of Coxsackievirus A6 - associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013 [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11700.
- [23] HongYan G, ChengJie M, QiaoZhi Y, et al. Hand, foot and mouth disease caused by Coxsackievirus A6, Beijing, 2013 [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(12): 1302-1303.

拉米夫定对乙肝合并肺结核患者免疫功能及肝功能的影响

韩美玉*

[摘要] 目的 分析拉米夫定抗病毒治疗对乙肝合并肺结核患者免疫功能及肝功能的影响。方法 回顾2015年5月~2016年12月于本院治疗的乙肝合并肺结核患者146例,遵照随机数字法分为研究组和对照组各73例。对照组采用常规抗结核治疗,研究组采用拉米夫定联合常规抗结核治疗。比较2组患者治疗前后肝功能指标、免疫功能指标及血清HBV-DNA水平,并统计分析不良反应发生情况。结果 治疗后,2组各项肝功能指标ALT、TBiL、AST水平均有所增加,且对照组增加幅度更大。治疗3个月后,研究组各项指标值分别为(91.87±13.65)U/L、(65.25±9.58)μmol/L、(89.51±16.42)U/L,明显低于对照组,差异均具有统计学意义($t=3.247-11.256$, P 均 <0.05)。治疗后,2组CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺水平均有所上升,CD8⁺水平均有所下降,且研究组变化明显,其值分别为(39.86±5.47)%、1.66±0.14、(23.89±4.64)%,2组治疗后数据相比较,差异具有统计学意义($t=3.343-10.471$, P 均 <0.05)。治疗后研究组患者HBV-DNA水平呈下降趋势,对照组HBV-DNA水平呈上升趋势,最终研究组HBV-DNA含量为(3.14±1.25)copies/mL,低于对照组,差异具有统计学意义($t=25.406$, P 均 <0.05)。2组均出现不良反应情况,其中研究组不良反应发生率为20.55%,对照组不良反应发生率为23.29%,2组不良反应发生率无显著差异($\chi^2=0.689$, $P=0.530$)。结论 拉米夫定抗病毒治疗用于乙肝合并肺结核患者的治疗,能有效提高患者免疫功能指标,降低患者HBV-DNA水平,减轻患者肝损伤程度,改善患者肝功能状况,且具有较好的安全性,值得临床推广运用。

[关键词] 拉米夫定;乙型肝炎;肺结核;免疫功能;肝功能

Effect of lamivudine on immune function and liver function in patients with hepatitis B complicated with pulmonary tuberculosis

HAN Meiyu*

(Department of Infectious Diseases, The Second People's Hospital of Dongying, Dongying, Shandong, China, 257335)

[ABSTRACT] Objective To analyze the effects of lamivudine antiviral therapy on immune function and liver function in patients with hepatitis B complicated with pulmonary tuberculosis. Methods A total of 146 patients with hepatitis B complicated with pulmonary tuberculosis who were treated in the Second People's Hospital of Dongying city in Shandong province from May 2015 to December 2016 were enrolled. According to the random numbering method, the experimental group and the control group were divided into 73 cases. The control group received conventional anti-tuberculosis treatment, and the experimental group received lamivudine combined with conventional anti-tuberculosis treatment. The liver function indexes, immune function indexes and serum HBV-DNA levels before and after treatment were compared between the 2 groups, and the incidence of adverse reactions was statistically analyzed. Results The data indicated that the levels of 3 liver function indicators of ALT, TBiL and AST increased in 2 groups, and the increase in the control

作者单位:山东省东营市第二人民医院感染疾病科,山东,东营 257335

*通讯作者:韩美玉, E-mail:hanmeiyu1971@163.com

group was greater than in the experimental group after treatment. After 3 months of treatment, the index values of the experimental group were (91.87 ± 13.65) U/L, (65.25 ± 9.58) $\mu\text{mol/L}$, and (89.51 ± 16.42) U/L, respectively. which were significantly lower than that of the control group ($t = 3.247-11.256$, $P < 0.05$). Both of the CD4^+ and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ levels also increased after treatment, however, the CD8^+ levels decreased and the experimental group decreased even more significantly with values of $(39.86 \pm 5.47)\%$, 1.66 ± 0.14 , $(23.89 \pm 4.64)\%$, respectively. The difference was statistically significant ($t = 3.343-10.471$, $P < 0.05$). To compare levels of serum HBV-DNA after treatment, the results showed that the level of HBV-DNA decreased in the experimental group and increased in the control group. The HBV-DNA content in the experimental group was (3.14 ± 1.25) copies/mL, which was lower than in the control group ($t = 25.406$, $P < 0.05$). Adverse reactions were observed in both groups. The incidence of adverse reactions in the experimental group was 20.55%, while 23.29% in the control group. There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the 2 groups ($\chi^2 = 0.689$, $P = 0.530$). **Conclusion** Lamivudine antiviral therapy for the treatment of patients with hepatitis B complicated with pulmonary tuberculosis can effectively improve the immune function of patients and reduce the level of HBV-DNA and the degree of liver damage. Lamivudine treatment also enabled to improve liver function of patients. This therapy has good safety and is worthy of the clinical application.

[KEY WORDS] Lamivudine; Hepatitis B; Pulmonary tuberculosis; Immune function; Liver function

肺结核(pulmonary tuberculosis)是结核分枝杆菌引发的慢性传染病,以肺部感染最为常见。我国肺结核发病率和死亡率均很高,是22个高发国家其中之一^[1]。慢性乙型肝炎简称乙肝,是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引发的慢性传染病,一般有3个月左右的潜伏期,也是我国常见传染病之一^[2]。目前,乙肝合并肺结核在临床上较为多见,发病率约达39%,此类患者本身肝脏功能就有可能存在一定损伤,而常规抗结核治疗药物又对患者肝脏有一定损害,难以避免,副作用严重者甚至导致肝脏衰竭致死^[3-5]。因此,寻找既能起到抗结核作用,又能起到保护肝脏的理想化治疗方法势在必行。本文在常规抗结核治疗的基础上加用拉米夫定进行治疗,旨在分析探究其对乙肝合并肺结核患者免疫功能及肝功能的影响,现具体报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

患者纳入标准:①符合乙肝及肺结核防治指南中的诊断标准^[6];②肺结核涂片结果阳性;③肺结核首次治疗;④HBV血清标志物结果阳性;⑤无原发性心、肾功能异常。患者排除标准:①患自身免疫性肝病、酒精性肝病等其他肝脏疾病患者;②近期内使用过会引起肝损伤的药物者,如5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤等;③有饮酒史患者;④有吸烟史者。

选取2015年5月至2016年12月于本院接受治疗且符合纳入标准的患者146例,采用随机数字法分为研究组和对照组各73例。2组患者的各项基本资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,详细数据请见表1。本次研究经医院医学伦理委员会批准,所有患者均已告知并签署知情同意书,同意自愿配合此次研究。

1.2 仪器与试剂

AU5800全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司);荧光定量PCR分析仪(南京庚辰科学仪器有限公司);CytoFLEX流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);甘草酸二胺胶囊(正大天晴药业集团股份有限公司;规格50 mg;批号H10940191);拉米夫定片(湖南千金湘江药业股份有限公司;规格0.1 g;批号H20103481);异烟肼片(安徽华辰制药有限公司;规格0.1 g;批号H34020110);利福平胶囊(重庆药友制药有限责任公司;规格0.3 g;批号H50020505);盐酸乙胺丁醇片(广州白云山明兴制药有限公司;规格0.25 g;批号H44020250);ALT、TBiL、AST酶联免疫吸附法试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,规格96人份,批号:S10910113)。

1.3 治疗方法

对照组:采用常规抗结核及护肝治疗,护肝治疗采用甘草酸二胺;抗结核治疗采用异烟肼-利福平-乙胺丁醇治疗方案,其中异烟肼口服,0.4 g/次,一日一次;利福平口服,0.6 g/次,一日一次;乙胺丁醇口服,1.0 g/次,一日一次。

表1 2组患者临床基础资料比较
Table 1 Comparison of basic clinical data of 2 groups

组别	n	性别		年龄(岁)	肺结核病程(年)	乙肝病程(年)
		男	女			
研究组	73	44	29	45.64±6.15	5.46±1.13	8.75±2.45
对照组	73	43	30	44.98±6.34	5.37±1.24	8.86±2.66
<i>t/χ²</i>	-	0.028		0.638	0.458	0.260
<i>P</i>	-	0.866		0.262	0.324	0.398

研究组:在对照组治疗基础上加用拉米夫定治疗,口服,100 mg/次,一日一次,自治疗开始时使用,于3个月治疗结束时终止。

2组患者均进行3个月治疗后进行评价。

1.4 疗效评价指标

采用AU5800全自动生化分析仪分别于治疗前、治疗1个月及治疗3个月后测定谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBiL)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)等肝功能指标水平。采用荧光定量PCR分析仪测定治疗前后所有患者HBV-DNA含量。采用CytoFLEX流式细胞仪测定两组患者治疗前后CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺免疫功能指标水平。并统计两组治疗时不良反应发生情况以作比较。

1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件对所得所有数据进行统计分析。连续变量使用($\bar{x} \pm s$)表示。研究组与对照组比较计量资料采用独立样本*t*检验,计数资料以率(%)表示,采用卡方(χ^2)检验。*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者治疗前后肝功能指标情况

分别于治疗前、治疗1个月及治疗3个月后测定

所有患者ALT、TBiL、AST等肝功能指标水平,具体结果如表2所示。研究发现,治疗前,2组各项指标差异无统计学意义(*P*均>0.05)。治疗后,2组各项肝功能指标水平均有所增加,且对照组增加幅度更大。治疗3个月后,研究组的各项指标值明显低于对照组,差异具有统计学意义(*P*均<0.05)。

2.2 2组患者治疗前后免疫功能指标情况

治疗前后分别测定2组患者CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺等免疫功能指标水平,具体结果如表3所示。研究结果提示,治疗前,2组各项指标相比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);治疗后,2组CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺水平均有所上升,CD8⁺水平均有所下降,但研究组是变化明显,而对照组较治疗前无明显变化。2组治疗后数据相比较,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。

2.3 2组患者治疗前后血清HBV-DNA含量情况

分别于治疗前后测定患者血清HBV-DNA含量,具体数据如表4所示,研究发现,治疗后研究组患者HBV-DNA水平呈下降趋势,对照组HBV-DNA水平呈上升趋势,最终研究组HBV-DNA含量低于对照组,2组治疗后数据相比较,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。

表2 2组患者治疗前后肝功能指标情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of liver function indexes before and after treatment in the 2 groups of patients ($\bar{x} \pm s$)

	研究组			对照组		
	治疗前	治疗1个月后	治疗3个月后	治疗前	治疗1个月后	治疗3个月后
AST(U/L)	18.27±6.18	78.59±12.3 ^a	89.51±16.42 ^a	19.04±6.24	97.15±12.34 ^{ab}	108.63±16.18 ^{ab}
TBiL(μmol/L)	9.41±5.78	45.34±6.48 ^a	65.25±9.58 ^a	9.66±5.37	66.18±6.34 ^{ab}	78.16±9.78 ^{ab}
ALT(U/L)	20.96±5.37	75.67±9.44 ^a	91.87±13.65 ^a	20.58±5.22	105.19±9.83 ^{ab}	119.31±13.54 ^{ab}

与研究组相比,^a*P*<0.05;同组与治疗前相比,^b*P*<0.05。

表3 2组患者治疗前后肝功能指标情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of immune function indexes before and after treatment in the 2 groups of patients ($\bar{x} \pm s$)

	研究组 (n=73)			对照组 (n=73)		
	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗前	36.78±5.66	27.63±4.25	1.33±0.23	36.54±5.79	27.67±4.55	1.32±0.25
治疗后	39.86±5.47	23.89±4.64	1.66±0.14	37.08±5.16 ^b	26.66±4.31 ^b	1.36±0.11 ^b
t	3.343	5.078	10.471	0.595	1.377	1.251
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.276	0.085	0.106

与研究组相比, ^bP<0.05。

表4 2组患者治疗前后血清HBV-DNA含量比较

(copies/mL, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum HBV-DNA levels before and after treatment in the 2 groups of patients (copies/mL, $\bar{x} \pm s$)

	研究组 (n=73)	对照组 (n=73)
治疗前	6.39±1.04	6.44±1.13
治疗后	3.14±1.25	8.56±1.23 ^b
t	17.077	11.384
P	<0.001	<0.001

与研究组相比, ^bP<0.05。

2.4 2组患者不良反应情况

2组均出现不良反应情况,主要表现为恶心呕吐、消化不良、皮疹、腹泻、乏力等。其中研究组不良反应共15例,不良反应发生率为20.55%;对照组不良反应共17例,不良反应发生率为23.29%。2组不良反应无显著差异($P=0.160, \chi^2=0.689$)。

3 讨论

近年来,我国肺结核发病率逐渐增高,至今已有大于450万肺结核患者,常规抗结核治疗即会对患者肝脏造成一定的损伤,而合并乙肝患者在抗结核治疗中相比于单一肺结核患者更易造成肝损伤^[7-8]。因此,寻找既能达到治疗目的,又能起到肝保护作用的药物十分重要。拉米夫定是一种抗病毒药物,对病毒DNA的合成和延长有竞争性抑制的作用,但不干扰正常细胞脱氧核苷的代谢,长期运用可有效改善肝脏炎症及坏死情况^[9-10]。本文旨在探究其对乙肝合并肺结核患者肝功能的影响,并从免疫功能及HBV-DNA复制等多方面进行辅助说明。

本研究发现,治疗前,所有患者ALT、TBiL、AST等肝功能指标水平差异无统计学意义。通过

治疗,2组各项指标均呈上升趋势,由以上数据可知,肝功能的各项指标亦呈现高表达状态,不使用拉米夫定治疗的对照组各项指标呈持续增高趋势,而加用拉米夫定抗病毒治疗的研究组各项指标虽也升高,但相比于对照组上升幅度得到有效控制,最终研究组各项肝功能指标值远低于对照组,其数据差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明拉米夫定可有效减轻患者肝脏损伤,减缓患者肝功能指标水平上升趋势,改善患者肝功能状态,这与李多云等人^[11]的研究相符。有研究提示,CD4⁺、CD8⁺作为机体重要的免疫细胞,其比例失衡可能与肝细胞损伤相关,其比值的变化与HBV感染患者免疫功能的变化相关^[12]。本研究结果显示,通过治疗,2组患者CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺水平均有所上升,CD8⁺水平均有所下降,且研究组变化明显,2组治疗后数据相比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明研究组的治疗方法对于患者免疫功能的改善具有更好的效果,其指标变化与厉景南等人^[13]报道相一致。除此以外本研究对2组治疗时的不良反应进行了统计,研究组不良反应发生率为20.55%,低于对照组不良反应发生率23.29%,2组不良反应发生率均较低,且无明显差异($P>0.05$)。说明拉米夫定抗病毒治疗具有较好的使用安全性。血清HBV-DNA作为乙肝病毒复制的可靠指标,其含量降低表示患者病情减轻,因此,测定其含量能了解患者乙肝病情^[14]。研究发现,通过治疗,研究组患者HBV-DNA含量有所降低,对照组HBV-DNA含量有所增加,治疗后研究组HBV-DNA水平低于对照组,2组数据差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明联用拉米夫定进行抗病毒治疗,对于乙肝病毒的控制具有良好的效果,这与大多数拉米夫定抗病毒治疗报道相符。

综上,拉米夫定抗病毒治疗对于乙肝合并肺结核患者来说,能有效提高患者免疫功能,减轻患者肝损伤从而改善其肝功能状态,提高治疗有效率,在临床实践中具有实用和推广价值。当然,慢性病除了积极配合治疗以外,良好的生活习惯和心理建设也是十分重要,患者应当保持良好的休息,培养良好的生活习惯,调整好心理状态,积极对待疾病和生活^[15]。

参考文献

- [1] 孙丽梅,苏海涛,王海荣.不同治疗方案对合并乙型肝炎肺结核患者肝功能的影响及疗效分析[J].药物不良反应杂志,2015,17(5):330-333.
- [2] 陈美玲,周蓉,周俊霞.目标管理在慢性乙型肝炎合并肺结核患者中的应用体会[J].肝脏,2016,21(8):709-711.
- [3] 邓国防,孙丽珍,雷建平,等.拉米夫定联合抗结核药物治疗肺结核合并乙型肝炎病毒携带者的临床分析[J].中国防痨杂志,2014,36(2):104.
- [4] 姚君,钟皓成,章丹丹.莫西沙星与左氧氟沙星治疗中青年耐药药肺结核病的疗效比较[J].中国药房,2013,24(20):1884.
- [5] 李忠东.抗结核方案联合抗病毒方案治疗肺结核合并e抗原阳性慢性乙型肝炎病毒携带患者的临床效果[J].中国全科医学,2016(B12):183-185.
- [6] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中华传染病杂志,2011,29(2):65-80.
- [7] 陈雪霞.拉米夫定对预防肺结核合并乙型肝炎患者抗结核药对肝损伤的影响[J].中国医药指南,2016,14(13):99-99,100.
- [8] 杜姗菱,林锋,吴彪,等.医护一体化随访模式对肺结核合并乙肝患者预后的影响[J].重庆医学,2016,45(18):2586-2588.
- [9] 张雅雅.拉米夫定对肝癌合并慢性乙型肝炎患者血清OPN水平及肝功能的影响[J].临床军医杂志,2012,40(4):793-795.
- [10] Cho YK, Cui XJ, Jeong SU, et al. Different mechanism of selection of adefovir-resistant mutant viruses during adefovir monotherapy in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis [J]. Antiviral Res, 2014, 112:8.
- [11] 李多云,刘黎,周健,等.拉米夫定对乙肝合并肺结核病患者抗结核的临床观察[J].临床肺科杂志,2011,16(4):555-556.
- [12] 陈斌,彭建平,张涛,等.健脾、补肾与健脾补肾三法对慢性乙型肝炎患者外周血T细胞功能的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(11):48-51.
- [13] 厉景南,李朝霞,任琅,等.拉米夫定治疗初治涂阳肺结核合并乙型肝炎病毒携带者的临床疗效及对t淋巴细胞的影响[J].中国基层医药,2015,22(2):295-297.
- [14] 王灿灿.慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA与e抗原含量的关系[J].中外女性健康研究,2016(20):119-120.
- [15] 罗昭琴.心理护理对老年慢性病患者心理状态的影响[J].中国医药科学,2016,6(18):122-124.
- [13] Nevalainen J, Korpimäki T, KouruH, et al. Performance of first trimester biochemical markers and mean arterial pressure in prediction of early-onset pre-eclampsia[J]. Metabolism, 2017, 75:6-15.
- [14] Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, et al. The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of hCG is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation [J]. Brit J Cancer, 2000, 82(9):1553-1556.
- [15] 赵兴会,周晓光,赵霞,等.恶性肿瘤中人绒毛膜促性腺激素β亚单位的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(24):4773-4776.
- [16] Yao Y, Wang X, Duan W, et al. A label-free, versatile and low-background chemiluminescence aptasensing strategy based on gold nanocluster catalysis combined with the separation of magnetic beads [J]. Analyst, 2017, 143(3):709-714.
- [17] 王小平,向阳,张德永,等.化学发光法测定绒毛膜促性腺激素游离β亚单位对滋养细胞疾病的诊断价值[J].中国实用妇科与产科杂志,2001,17(11):23-25.
- [18] 肖勤,林金明.化学发光免疫分析方法的应用研究进展[J].分析化学,2015,43(6):929-938.
- [19] 郭翀,李白霞,张真铭,等.时间分辨荧光免疫分析法检测游离F-βHCG的方法学评价[J].云南医药,2012,33(4):352-355.
- [20] 邹丽萍.Free β-hCG和PAPPA光激化学发光免疫分析试剂的研制[D].广州:南方医科大学,2012.

(上接第314页)

老年重症肺炎患者血清 hs-CRP 水平变化及临床意义

孙春荣^{1*} 黄琳娜² 崔晓阳³ 杨霖¹

【摘要】 目的 探讨老年重症肺炎患者血清 hs-CRP 水平及其临床价值。方法 回顾性分析 2016 年 6 月至 2017 年 9 月在我院诊治的 83 例老年重症肺炎患者的临床资料,按照患者预后效果分组,其中 57 例患者预后较好,纳入 A 组,26 例患者预后不良,治疗无效,纳入 B 组,记录 2 组患者的年龄、性别、BMI、基础疾病及急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II) 评分,并对患者在第 1、4、7 天静脉取血,收集血清后采用 ELISA 实验检测 hs-CRP、PCT 水平。采用多因素 Logistic 回归分析研究与患者预后相关的因素。结果 B 组患者治疗后第 7 天血清 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分分别为(5.73±1.13) ng/mL、(6.84±0.45) ng/mL 和(34.62±5.27)分,均明显高于 A 组($P < 0.05$);A 组患者在治疗过程中 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分逐渐下降,B 组各项指标水平逐渐升高($P < 0.05$)。经多因素 Logistic 回归分析,发现 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分是患者影响预后的因素。通过 ROC 曲线分析发现 hs-CRP 评估患者预后的 AUC 为 0.834 (0.518~0.916)。PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分 3 项指标联合检查可以预测的检验效能,AUC 为达 0.864 (0.691~0.946),敏感性和特异性分别为 85.8% 和 86.4%。结论 患者治疗第 7 天后血清 hs-CRP 水平上升提示可能预后不良,需及时采取针对性的临床治疗减轻体内炎症反应,以改善患者预后。

【关键词】 重症肺炎;超敏 C-反应蛋白;酶联免疫反应

Changes of serum hs-CRP level in elderly patients with severe pneumonia and its clinical significance

SUN Chunrong^{1*}, HUANG Linna², CUI Xiaoyang³, YANG Ji¹

(1. Department of Respiration, Beijing Chui Yang Liu Hospital Affiliated to Tsinghua University, Beijing, China, 100022; 2. The Respiratory Center of China-Japan Friendship Hospital, Beijing, China, 100029; 3. The National Respiratory Disease Clinical Research Center of Respiratory and Critical Care Medicine of China-Japan Friendship Hospital, Beijing, China, 100029)

【ABSTRACT】 Objective To study the clinical value of serum hs-CRP in elderly patients with the severe respiratory disease. Methods The clinical data of 83 elderly patients with severe pneumonia diagnosed in the Respiratory Center of China-Japan Friendship Hospital from June 2016 to September 2017 were retrospectively analyzed. According to the outcome of the patients, 57 of them had better prognosis were classified into Group A, while 26 patients had poor prognosis with treatment failure were classified into Group B. Age, gender, BMI, basic diseases, and acute physiology and chronic health scoring system II (APACHE II) score of 2 groups of patients were recorded, and on the 1st, 4th, and 7th day, blood was taken from the vein of the patients, and serum was collected. The levels of hs-CRP and PCT were detected by ELISA.

作者单位:1. 清华大学附属北京市垂杨柳医院呼吸科,北京 100022

2. 中日友好医院呼吸中心,北京 100029

3. 中日友好医院呼吸与危重症医学科国家呼吸疾病临床研究中心,北京 100029

*通讯作者:孙春荣, E-mail:zzq19870429@qq.com

Multivariate Logistic regression analysis was performed to study the influencing factors of elderly patients with severe respiratory disease. **Results** The scores of serum PCT, hs-CRP and APACHE II in group B were (5.73 ± 1.13) ng/mL, (6.84 ± 0.45) ng/mL and (34.62 ± 5.27) respectively after 7 days of treatment, which were significantly higher than those in the group A ($P<0.05$). After treatment, the scores of PCT, hs-CRP and APACHE II in the group A decreased, but increased in the group B ($P<0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that PCT, hs-CRP and APACHE II score were independent risk factors for the poor prognosis for elderly patients. The ROC curve analysis showed that the AUC of hs-CRP in predicting the prognosis of patients was 0.834 (0.518-0.916). The 3 indexes of PCT, hs-CRP and APACHE II score can be used to predict the effectiveness of the test. The AUC is 0.864 (0.691-0.946), and the sensitivity and specificity are 85.8% and 86.4%, respectively. **Conclusion** The increase of serum hs-CRP level after the 7th day of treatment suggests that the prognosis may be poor. It is necessary to take timely targeted clinical treatment to reduce the inflammatory response *in vivo* to improve the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Severe pneumonia; High sensitivity C - reactive protein; Enzyme - linked immunosorbent reaction

老年重症肺炎患者大多身体机能衰退, 身体代谢能力下降, 并常伴发炎症感染, 易导致老年患者预后不良^[1]。因此, 对老年重症肺炎患者病情进行早期诊断对提高治疗效果有重要的临床价值。降钙素原 (procalcitonin, PCT) 是临床常作为感染性疾病炎症反应的评估指标, 但 PCT 特异性低, 评估炎症反应的假阳性率偏高, 糖脂代谢异常、肥胖等因素均可诱导该指标水平上升^[2]。超敏 C-反应蛋白 (hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP) 是一种机体因细菌感染等刺激后肝细胞分泌的炎症因子, 可在较短时间内显著上升, 具有抗感染功能, 体内炎症程度减弱后可较快恢复正常水平^[3]。老年重症肺炎患者体内免疫功能紊乱, 炎症因子分泌异常, 而 hs-CRP 与老年重症肺炎的相关性研究较少^[4]。本研究通过检测老年重症肺炎患者不同病程中血清 hs-CRP 的水平变化, 以期为早期评估该类患者病情提供临床参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

83 例老年重症肺炎患者自 2016 年 6 月至 2017 年 9 月在我院就诊, 其中男性 51 例, 女性 32 例, 年龄 63~79 岁, 平均年龄 (72.6 ± 6.4) 岁, 按照患者预后效果分组, 其中 57 例患者预后较好, 纳入 A 组, 男性 32 例, 女性 25 例, 平均年龄 (67.29 ± 5.42) 岁, 身体质量指数 (body mass index, BMI) 为 (5.32 ± 1.23) kg/m², 11 例有糖尿病史。26 例患者预后不良, 治疗无效, 纳入 B 组, 男性 19 例, 女性 7 例, 平均年龄 ($73.42\pm$

4.34) 岁, BMI 为 (6.13 ± 1.31) kg/m², 6 例有糖尿病史。同时记录患者的急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II) 评分。2 组患者的性别、年龄、BMI、糖尿病史差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。排除标准: 年龄低于 60 岁; 近 2 个月内接受激素或抗炎药物治疗; 患者肝肾功能不全; 患者病历资料不完整; 伴发肿瘤等重大疾病。

1.2 研究方法

患者接受治疗后第 1、4、7 天对患者静脉取血, 采用 ELISA 检测 hs-CRP、PCT 水平, 设置标准品孔, 空白对照孔, 对标准品进行梯度浓度稀释, 每孔加入 80 μ L 标准品及样本后, 加入 20 μ L 生物素标记的抗体, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 弃去液体后加入 HRP 标记的二抗, 轻轻混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 经 TBST 溶液清洗后加入 30 μ L TMB 显色, 孵育 15 min 后, 加入终止液以终止反应, 检测 450 nm 激发光条件下各孔 OD 值。

1.3 患者疗效标准^[5]

老年重症肺炎患者治疗痊愈标准: 临床症状 (包括呼吸困难、咳嗽) 等消失, 肺功能正常, 血液生化指标无异常, 呼吸道细菌学检查阴性; 治疗显效标准: 呼吸困难、咳嗽等临床症状基本消失, 肺功能有一定恢复, 血液生化指标大部分正常, 细菌学检查有少部分呈阳性; 治疗有效标准: 患者治疗后呼吸困难、咳嗽等症状有一定程度减轻, 血液生化指标有一部分正常, 病原学检查有部分呈阳性; 治疗无效: 患者治疗后呼吸困难、咳嗽等临床症状

无改善或加重。治疗总有效患者包括治疗后治愈、显效和有效。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 处理数据, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。采用多因素 Logistic 回归分析讨论患者预后因素。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A 组和 B 组患者血清 PCT、hs - CRP 及 APACHE II 评分的变化

B 组患者第 7 天的血清 PCT 水平升至 $(5.73 \pm 1.13) \text{ ng/mL}$, 显著高于 A 组患者 ($P < 0.05$); B 组患者第 7 天的血清 hs-CRP 水平升至 $(6.84 \pm 0.45) \text{ ng/mL}$, 显著高于 A 组患者 ($P < 0.05$); B 组患者第 7 天的 APACHE II 评分为 (34.62 ± 5.27) , 显著高于 A 组患者 ($P < 0.05$); A 组患者在治疗过程中 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分逐渐下降, B 组各指标水平逐渐升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 2 组血清 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分分析
Table 1 Analysis of serum PCT, hs-CRP and APACHE II scores in 2 groups

时间	组别	PCT (ng/mL)	hs-CRP (ng/L)	APACHE II 评分 (分)
第 1 天	A 组	0.35±0.12	4.56±0.09	24.31±5.27
	B 组	0.42±0.13	4.73±0.95	25.17±4.83
第 4 天	A 组	0.29±0.09 [*]	3.48±0.13 [*]	17.46±3.27 [*]
	B 组	4.83±0.95 [*]	5.48±0.45 [*]	29.51±5.63
第 7 天	A 组	0.16±0.07 ^{**}	0.41±0.15 ^{**}	14.28±2.16 ^{**}
	B 组	5.73±1.13 ^{**}	6.84±0.45 ^{**}	34.62±5.27 ^{**}

^{*} $P < 0.05$, 与第 1 天相比; ^{**} $P < 0.05$, 与第 4 天相比。

2.2 多因素 Logistic 回归分析老年重症肺炎患者影响因素

以患者是否预后良好为因变量, 并以患者的性别、BMI、糖尿病史、 PCO_2 、PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分为自变量进行多因素 Logistic 回归分析, 发现 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分是老年重症肺炎患者预后不良的危险因素, 见表 2。

表 2 老年重症肺炎患者预后不良危险因素的 Logistic 回归分析

Table 2 Logistic regression analysis of risk factors for poor prognosis in elderly patients with severe pneumonia

因素	β	Wald	OR	95% CI	<i>P</i>
PCT	1.214	7.263	4.372	5.276~9.658	0.034
hs-CRP	1.116	6.842	3.694	4.869~8.673	0.035
APACHE II 评分	0.846	8.546	2.867	7.143~9.758	0.024

表 3 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分预测老年重症肺炎患者预后的效能

Table 3 Prognostic value of serum PCT, hs-CRP and APACHE II scores in elderly patients with severe pneumonia

因素	AUC	95% CI	<i>P</i>	敏感性 (%)	特异性 (%)
PCT	0.756	0.658~0.837	0.045	76.2	81.7
hs-CRP	0.834	0.518~0.916	0.032	84.6	82.4
APACHE II 评分	0.812	0.664~0.938	0.038	79.2	77.3
联合预测	0.864	0.691~0.946	0.027	85.8	86.4

2.3 PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分预测老年重症肺炎患者预后不良的效能

PCT、hs-CRP 及 APACHE II 评分预测患者预后不良的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 分别为 0.756 (0.658~0.837)、0.834 (0.518~0.916)、0.812 (0.664~0.938), 单独检测是以 hs-CRP 预测效能最好。3 项联合检查可以预测的检验效能, AUC 达 0.864 (0.691~0.946), 敏感性和特异性分别为 85.8% 和 86.4% (表 3, 图 1)。

3 讨论

呼吸道及肺部感染是老年重症肺炎患者常见并发症, 及时评估患者的炎症状态对预后具有重要临床价值, 大多数老年患者免疫低下, 炎症感染对老年重症肺炎患者的病情有较大影响, 可导致其病情恶化^[5]。因此, 及时评估老年重症肺炎患者病情对提高治疗效果有重要价值。

PCT 是一种常用的临床评估机体炎症反应的

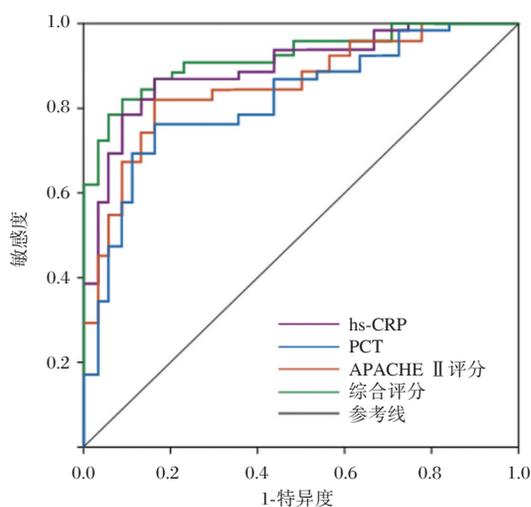


图1 PCT、hs-CRP及APACHE II评分预测老年重症肺炎患者预后不良的ROC曲线

Figure 1 PCT, hs-CRP and APACHE II scores predict the ROC curve of poor prognosis in elderly patients with severe pneumonia

指标。农贤刚等^[6]研究发现肺炎患者炎症感染5 h后血清PCT水平有一定程度上升,对评估患者的炎症反应有重要价值。有研究发现PCT在体内不易降解,患者在经治疗后炎症反应减轻后仍可维持较高的水平^[7]。因此PCT的灵敏度受到一定的限制。hs-CRP是体内肝脏在外界刺激下分泌的炎症因子,正常状态下血清hs-CRP水平较低,机体发生炎症反应后其水平可显著上升^[8]。Määttä等^[9]研究发现hs-CRP对评估老年重症肺炎患者的炎症反应程度,且结合其它指标可显著提高判断效能。APACHE II评分可对患者病情程度作出有效评估,对患者的治疗及预后提供一定指导^[10]。本研究发现2组患者的PCT、hs-CRP、APACHE II评分差异有统计学意义($P < 0.05$),结果表明hs-CRP、PCT、APACHE II评分均与老年重症肺炎患者的发病有密切相关,较高的hs-CRP水平提示患者预后不良。有研究发现患者炎症反应程度上升可导致hs-CRP水平上升,提示hs-CRP可反应患者的炎症反应指标^[11],与本研究一致。本研究发现预后良好的A组患者血清hs-CRP水平低于B组,提示A组患者的炎症反应程度较轻,与已有研究一致^[12]。徐瑜等^[13]检测64例老年重症肺炎患者血清hs-CRP水平,发现hs-CRP水平变化与患者的炎症反应相关性较小。这可能是重症肺炎的病因较为复杂导致的,也可能是患者的用药方案不

一致诱发体内的炎症反应程度出现差异,这需扩大研究对象数量并优化患者的选择方案。

本研究进一步采用多因素Logistic回归分析探讨老年重症肺炎患者的影响因素,发现hs-CRP水平及APACHE II评分是患者预后的影响因素。韩利等^[14]研究发现APACHE II评分较低的重症肺炎患者hs-CRP水平较低,与本研究一致。老年重症肺炎患者血清的hs-CRP水平上升后,可促进IL-4、TNF- α 等炎症因子分泌,进一步加重体内炎症反应程度,对患者的机能产生不利影响。王立民等^[15]研究发现重症肺炎患者hs-CRP水平与APACHE II评分的相关性较好,低hs-CRP水平的患者机体受炎症反应损伤程度较轻。有研究发现58例老年重症肺炎患者治疗后血清hs-CRP水平显著下降,可作为评估体内炎症反应程度的指标^[16]。Livnat等^[17]发现血清hs-CRP水平的变化与重症肺炎患者的预后密切相关。本研究通过ROC曲线进一步分析发现PCT、hs-CRP及APACHE II评分均有评估患者预后的效能,其中hs-CRP单独检测预测效能最好,通过三项指标联合检查可以提高预测的效能,这说明hs-CRP具有较好的临床应用价值。

综上所述,血清hs-CRP水平上升提示患者可能预后不良,该指标联合APACHE II评分可对评估老年重症肺炎患者疾病程度有重要价值,血清hs-CRP和APACHE II评分较高的需及时采取针对性的临床治疗减轻体内炎症反应,以改善患者预后。

参考文献

- [1] 谭杰,康艳虹,苏燕娜,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清PCT、IL-6、hs-CRP水平与肺功能的相关性研究[J].广州医药,2017,48(3):93-95.
- [2] 周静,石振东.痰热清注射液治疗老年重症肺炎的临床疗效及对血清超敏C反应蛋白、降钙素原的影响[J].检验医学与临床,2017,14(11):1637-1639.
- [3] 蒋一雅,仇铁峰,庄志方.血必净联合胸腺五肽辅助抗生素治疗老年重症肺炎对免疫功能及炎症因子的影响[J].海南医学院学报,2017,23(11):1471-1473.
- [4] 张起,王力慧.血清PCT及VEGF水平在老年获得性肺炎患者治疗及预后评估中的应用[J].中国老年学杂志,2016,36(16):3996-3998.
- [5] 李望璐,邢丽华,李晓燕,等.血清白介素-10评估不同年龄免疫功能受损并重症肺炎患者病情严重程度及预后的价值[J].中国老年学杂志,2017,37(14):3527-3528.

- [6] 农贤刚,程卫萍.中性粒细胞CD64和血清sTREM-1在老年社区获得性肺炎中的诊断价值探讨[J].中国免疫学杂志,2016,32(6):871-874.
- [7] Roshanravan N, Mahdavi R, Alizadeh E, et al. The effects of sodium butyrate and inulin supplementation on angiotensin signaling pathway via promotion of Akkermansia muciniphila abundance in type 2 diabetes; A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. J Cardiovasc Thorac Res, 2017, 9(4):183-190.
- [8] 吴大威,范穗强,杨玉双,等.达肺饮汤剂联合塞托溴铵治疗COPD临床疗效及血浆合肽素、hs-CRP影响[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(5):252-255.
- [9] Määttä AM, Kotaniemi-Syrjänen A, Malmström K, et al. Vitamin D, high-sensitivity C-reactive protein, and airway hyperresponsiveness in infants with recurrent respiratory symptoms[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2017, 119(3):227-231.
- [10] 邱建凯,尹占良,张芳芳,等.降钙素原、C-反应蛋白及乳酸与老年社区获得性肺炎预后的关系[J].解放军预防医学杂志,2016,34(4):501-503.
- [11] Duran L, Unsal M, Yardan T, et al. The Evaluation of Serum Pentraxin-3 and High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Patients with Acute Attack of COPD [J]. Clin Lab, 2015, 61(12):1911-1916.
- [12] 李达,余阶洋,周柳芳,等.无创正压通气治疗老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期并发重症呼吸对患者血气及炎性指标的影响[J].四川医学,2017,38(7):817-821.
- [13] 徐瑜,罗百灵.慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清hs-CRP、CA-125和IL-6水平变化及临床意义[J].临床肺科杂志,2017,22(3):458-460.
- [14] 韩利,张筠,张铁栓.重症肺炎患者D-二聚体、纤维蛋白原、IL-6水平变化及其临床意义[J].中国呼吸与危重监护杂志,2017,16(1):71-73.
- [15] 王立民,张建,戈艳蕾,等.老年重症肺炎患者预后的影响因素分析[J].山东医药,2017,57(12):65-67.
- [16] 郭秋霞.老年心力衰竭合并细菌性肺炎患者血清氨基末端脑钠肽原、热休克蛋白、降钙素原水平的变化及意义[J].中国老年学杂志,2017,37(15):3719-3721.
- [17] Livnat G, Yoseph RB, Nir V, et al. Evaluation of high-sensitivity serum CRP levels compared to markers of airway inflammation and allergy as predictors of methacholine bronchial hyper-responsiveness in children[J]. Lung, 2015, 193(1):39-45.

(上接第319页)

- [10] 高云,陈嘉昌,朱振宇,等. EGFR 基因突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1):51-57.
- [11] Feng Q, Gai F, Sang Y, et al. A comparison of QuantStudio 3D Digital PCR and ARMS-PCR for measuring plasma EGFR T790M mutations of NSCLC patients[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10:115-121.
- [12] 中国标准化委员会. YY/T 1591-2017 人类 EGFR 基因突变检测试剂盒[G]. 北京:中国标准出版社, 2018:12.
- [13] 杨振,黄杰,于婷,等.我国体外诊断试剂国家标准物质现状及对策分析[J].中国生物制品学杂志, 2015, 28(7):765-771.
- [14] Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer[J]. FEBS J, 2010, 277(2):301-308.
- [15] Kobayashi Y, Togashi Y, Yatabe Y, et al. EGFR Exon 18 Mutations in lung cancer: molecular predictors of augmented sensitivity to afatinib or neratinib as compared with first- or third-generation TKIs[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(23):5305-5313.
- [16] Costa DB. Kinase inhibitor-responsive genotypes in EGFR mutated lung adenocarcinomas: moving past common point mutations or indels into uncommon kinase domain duplications and rearrangements [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(3):331-337.
- [17] Lee Y, Park S, Kim WS, et al. Correlation between progression-free survival, tumor burden, and circulating tumor DNA in the initial diagnosis of advanced-stage EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. Thorac Cancer, 2018, Epub ahead of print.
- [18] Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status [J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(9):1345-1353.
- [19] 张欣涛,郝擎,石现,等.2013-2016年国家医疗器械监督抽检产品质量状况分析[J].中国医疗器械杂志, 2017, 3(41):216-219.

血清LDL与2型糖尿病周围神经病变的相关性研究

黄娟* 胡维 熊丹

[摘要] 目的 探讨分析血清低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)与2型糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)的相关性。方法 选择166例在2016年4月至2017年3月在我院接受治疗的2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者,其中有94例T2DM患者无周围神经病变,纳入非DPN组,有72例T2DM患者周围神经病变,纳入DPN组,检测2组患者的血清LDL水平和相关的临床生化指标。结果 经统计学分析 DPN组患者的年龄、糖尿病病程、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和LDL水平显著高于非DPN组患者($P < 0.05$);DPN组患者的空腹C肽水平显著低于非DPN组患者($P < 0.05$);非DPN组、DPN组患者的性别、体重指数(body mass index, BMI)、血钙浓度、血磷浓度、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, Scr)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)以及舒张压(diastolic blood pressure, DBP)无统计学差异($P > 0.05$)。通过Pearson相关分析发现血清LDL水平与患者糖尿病病程、HbA1c、BMI和BUN呈正相关($P < 0.05$);与血钙水平、血磷水平、Scr水平和空腹C肽呈负相关($P < 0.05$);与患者的年龄、SBP和DBP($P > 0.05$)无关。以DPN为因变量,以患者的血清LDL、糖尿病病程、HbA1c、BMI、BUN、血钙水平、血磷水平、Scr水平和空腹C肽为自变量,进行多因素Logistic逐步回归分析,发现LDL、HbA1c与DPN呈正相关;空腹C肽与DPN呈负相关。结论 本研究发现LDL、HbA1c是2型糖尿病周围神经病变的相关因素,血清LDL水平与患者的糖脂代谢指标及相关生化指标密切相关,具有重要的临床意义。

[关键词] 2型糖尿病;血清低密度脂蛋白;糖脂代谢指标

Correlation between serum LDL and peripheral neuropathy in type 2 diabetes

HUANG Juan*, HU Wei, XIONG Dan

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China, 410007)

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between serum low density lipoprotein (LDL) and diabetic peripheral neuropathy (DPN) in type 2 diabetes mellitus. Methods A total of 166 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) who were treated in the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine from April 2016 to March 2017 were enrolled. Among them, 94 patients with T2DM had no peripheral neuropathy and were included in the non-DPN group, while peripheral neuropathy in 72 patients with T2DM was included in the DPN group. Serum LDL levels and related clinical biochemical parameters were measured in the 2 groups. Results The age, duration of diabetes, hemoglobin A1c (HbA1c), malondialdehyde (MDA) and LDL levels were significantly higher in the DPN group than in the non-DPN group ($P < 0.05$). The fasting C-peptide level in the DPN group was significantly lower than that in the non-DPN group ($P < 0.05$). There was no difference between non DPN and DPN groups of the gender, body mass index (BMI), blood calcium concentration, blood phosphorus concentration, urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) ($P >$

作者单位:湖南中医药大学第一附属医院内分泌科,湖南,长沙 410007

*通讯作者:黄娟, E-mail: zhangjinlian@126.com

0.05)。Pearson correlation analysis showed that serum LDL levels were positively correlated with diabetes course, HbA1c, BMI and BUN ($P < 0.05$), and negatively correlated with serum calcium levels, serum phosphorus levels, Scr levels, and fasting C-peptide ($P < 0.05$) and not related to the patient's age, SBP or DBP ($P > 0.05$)。Using DPN as the dependent variable and the patient's serum LDL, diabetes course, HbA1c, BMI, BUN, blood calcium level, blood phosphorus level, Scr level and fasting C peptide as the independent variables, multivariate logistic stepwise regression analysis indicated that LDL and HbA1c were positively correlated with DPN, and fasting C peptide was negatively correlated with DPN. Conclusion This study demonstrated that LDL and HbA1c are related factors for the type 2 diabetic peripheral neuropathy. Serum LDL level is closely related to the glucose and lipid metabolism index and biochemical indicators of patients, and it has an important clinical significance.

[KEY WORDS] Type 2 diabetes mellitus; Serum low density lipoprotein; Lipid metabolism indexes

糖尿病是现代社会的多发病,我国的糖尿病患者约有 1.1 亿,且发病患者呈低龄化趋势^[1]。有研究发现糖尿病患者机体长期处于高血糖的内环境中,易导致患者发生失明、肾衰竭和出现心血管疾病等,并随着病情加重而威胁患者的生命质量^[2]。糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是其中常见的一种并发症,有研究表明糖尿病患者中至少有 10% 在治疗过程中发现 DPN^[3]。目前人们对糖尿病周围神经病变的诱发机理未有明确定论。有研究发现氧化应激状态贯穿于糖尿病的病程进展,对体内的生物大分子活性(如 DNA、脂蛋白、脂质)造成较大的伤害,引起机体的生理功能紊乱,氧化应激在糖尿病患者中较为明显,患者的丙二醛(malondialdehyde, MDA)等过氧化产物水平上升^[4]。血清内低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)水平可反映患者体内的糖脂代谢水平^[5]。张涛静等^[6]认为血清 LDL 可刺激巨噬细胞、中性粒细胞等分泌各类炎性因子,从而改变神经细胞的微环境,导致神经细胞功能异常。有研究发现 LDL 在糖尿病患者体内的氧化应激反应作用下形成糖脂混合物附着于血管内皮细胞,导致患者的毛细血管输运功能异常,刺激 DPN 的发生及发展^[7]。本研究拟探讨血清中 LDL 与 DPN 发生的关系,以便为 DPN 的预防提供一定依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 166 例在 2016 年 4 月至 2017 年 3 月在我院接受治疗的 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者。将患者分为非 DPN 组(该组患者未发现 DPN),94 例,男性 53 例,女性 41 例,年龄范围 44.3~59.6 岁,平均年龄(55.3±4.9)岁,糖尿

病病程(7.4±2.3)年,体重指数(body mass index, BMI)为(25.3±3.5)kg/m²;DPN 组(T2DM 患者被诊断有 DPN 并发症),72 例,男性 43 例,女性 29 例,年龄范围 45.1~67.2 岁,平均年龄(57.2±6.7)岁,糖尿病病程(8.4±2.7)年,BMI 为(24.1±3.3)kg/m²,DM 诊断流程参照中华医学会 2013 年制定的中国 T2DM 防治指南^[5];空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)>7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖(2 hours postprandial blood glucose, 2hPG)高于 11.1 mmol/L。本研究受试者的排除标准为:受试者患有内分泌失调症;受试者体内有心肺、肝肾等重要脏器衰竭;受试者近期服用激素类药物;受试者患有高血压。患者及家属均知情并签署知情同意书,且本研究经伦理委员会许可。2 组患者的性别、年龄、BMI、糖尿病病程差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 检测方法

称量受试者身高与体重,测量 3 次去平均值。受试者均采集空腹静脉血及尿液,通过全自动生化分析仪(PUZS-300,南京普朗医疗设备有限公司)检测糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)、血肌酐(serum creatinine, Scr)、MDA、空腹 C 肽、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血钙浓度、血磷浓度。血清中 LDL 含量检测应用紫外分光光度仪(T6 系列,北京普析通用仪器有限责任公司)。并记录患者收缩压(systolic blood pressure, SBP)及舒张压(diastolic blood pressure, DBP)。

1.3 DPN 评分标准

依据多伦多临床评分系统(Toronto clinical scoring system, TCSS)^[6]对受试者进行糖尿病周围神经病变分级测试,测试前将房间温度调整至 25℃左右,并使受试者心理状态稳定、放松。胫胫或伤口处不作为检测部位。采用 Semmes-Wein-

stein 法进行触压觉测试(检测3次,受试测试回答均正确0分,出现1次错误1分,2次以上错误2分);通过音叉测试受试者振动觉灵敏度(检测3次,受试测试回答均正确0分,出现1次错误1分,2次以上错误2分);使用 Tip-Therm(Germany)凉温觉检查器(受试者温度觉异常,2分;温度感觉均正常,0分);通过压力针测试受试者的疼痛(受试者针刺痛觉缺失,2分,针刺痛觉均存在,0分)。DPN 分级标准为:无 DPN 0~5分;轻度 6~8分;中度 9~11分;DPN,重度 12~19分。糖尿病周围神经病变分级测试专业医务人员检测。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析数据,采用 Shapiro-Wilk 检验数据的正态性,数据符合正态分布,用 *t* 检验分析计量数据。采用 Pearson 相关分析评估相关指标与血清 LDL 相关性。对自变量进行分组与转换后,采用多因素 Logistic 逐步回归分析 DPN 的相关因素。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本临床资料比较

经统计学分析,DPN 组患者的 HbA1c 含量、MDA、LDL 水平显著高于非 DPN 组患者($P < 0.05$);DPN 组患者的空腹 C 肽水平显著低于非 DPN 组患者($P < 0.05$);2 组患者的血钙浓度、血磷浓度、BUN 水平、SBP、DBP 差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 非 DPN 组和 DPN 组患者基本临床资料分析
Table 1 The basic clinical data analysis of Non-DPN group and DPN group

组别	非 DPN 组 (n=94)	DPN 组 (n=72)	P 值
血钙(mmol/L)	2.24±0.13	2.15±0.12	0.253
血磷(mmol/L)	2.14±0.22	2.31±0.14	0.302
Scr(μmol/L)	65.52±15.41	62.25±13.53	0.321
HbA1c(%)	7.96±1.21	9.52±2.23	0.024
BUN(mmol/L)	5.32±1.23	5.13±1.31	0.228
空腹 C 肽(ng/mL)	2.32±0.84	1.42±0.74	0.019
MDA(nmol/L)	4.33±0.31	6.16±0.46	0.015
SBP	131.46±22.17	128.59±18.82	0.178
DBP	79.36±7.39	76.42±8.34	0.314
LDL(mmol/L)	3.12±0.24	4.12±0.32	0.023

2.2 血清 LDL 水平与临床指标相关性

通过相关性分析血清 LDL 水平与患者临床指标相关性,发现血清 LDL 水平与患者 HbA1c、BUN 呈正相关($P < 0.05$);与血钙水平、血磷水平、Scr 水平、空腹 C 肽呈负相关($P < 0.05$);与患者的 SBP、DBP($P > 0.05$)无关,见表 2。

表 2 血清 LDL 水平与患者临床指标相关性分析
Table 2 The correlation analysis of serum LDL levels and clinical indicators of patients

临床指标	r 值	P 值
SBP(mmHg)	0.243	0.082
DBP(mmHg)	0.523	0.075
血钙(mmol/L)	-0.024	0.044
血磷(mmol/L)	-0.241	0.032
Scr(μmol/L)	0.246	0.253
HbA1c(%)	0.426	0.022
BUN(mmol/L)	0.114	0.034
空腹 C 肽(ng/mL)	-0.451	0.014

2.3 多元 Logistic 回归分析 DPN 的影响因素

以 DPN 为因变量,以患者的血清 LDL、HbA1c、BMI、BUN、血钙水平、血磷水平、Scr 水平、空腹 C 肽为自变量,进行多因素 Logistic 逐步回归分析,发现 LDL、HbA1c 与 DPN 呈正相关;空腹 C 肽与 DPN 呈负相关,见表 3。

表 3 多元 logistic 回归分析 LDL 与 DPN 关系
Table 3 Analysis of the relationship between LDL and DPN by multiple logistic regression analysis

自变量	OR	OR 的 95%CI	P 值
空腹 C 肽	0.859	0.578-0.934	0.014
HbA1c	1.254	1.128-1.963	0.019
LDL	1.354	1.178-1.867	0.013

3 讨论

2 型糖尿病患者由于血糖较高,体内的糖脂代谢异常,并诱发患者产生各类并发症。DPN 临床症状表现形式较为复杂,易与其它疾病相混,因而临床诊断较为困难^[8]。DPN 主要发生在感觉神经

细胞和运动神经细胞,患者出现的症状可包括肢体出现局部瘙痒,手足运动迟缓麻木,严重时患者肌肉乏力、萎缩进而出现瘫痪症状,严重影响患者的生活质量^[9]。沈娟等^[10]发现患者的年龄、糖尿病病程与T2DM的发病有一定相关性,认为机体衰老时器官功能的调节随之下降,对胰岛B细胞分泌胰岛素的能力产生影响。本研究发现2组的年龄、糖尿病病程差异无统计学意义,这可能是纳入研究的患者个体差异导致的。MDA是体内脂类物质遭受自由基攻击后断裂形成的氧化产物^[11]。本研究发现DPN组的MDA水平高于非DPN组患者,提示MDA水平与DPN的发生密切相关,可能是糖尿病患者体内的抗氧化能力下降,无法有效清除MDA,导致毛细血管功能障碍,供给神经细胞的营养因子相应减少,促使DPN的发生。因此,通过血清LDL-C水平评估DPN疾病程度有较高的临床价值。

本研究发现血清LDL水平与患者HbA1c、BUN呈正相关。HbA1c、BUN在一定程度上反映患者的糖尿病严重程度,这表明血清LDL水平同样可以作为反映糖尿病严重程度的指标。杨晓晖等^[12]纳入246例T2DM患者的临床资料分析发现LDL和患者的HbA1c呈正相关,但与BUN无明显相关性。这可能是由于血清BUN水平受患者的饮食、用药情况等较多因素的影响,导致临床检测数据波动较大,提示研究前需对患者的临床资料进行筛选,以减少对研究结果的影响因素。临床数据经多因素Logistic逐步回归分析糖尿病周围神经病变的相关因素,发现该症状的发生与LDL、HbA1c与DPN呈正相关;空腹C肽与DPN呈负相关。血钙和血磷水平和神经水平的兴奋性密切相关,而胰岛细胞分泌产生胰岛素时可同时产生等量的C肽,空腹C肽可反映糖尿病患者的胰岛素水平^[13-15]。Edwards等^[16]回顾性分析62例糖尿病患者后认为HbA1c、LDL-C水平是糖尿病患者并发症增多的相关因素。这说明血清LDL水平与糖尿病患者的周围神经病变密切相关,糖尿病患者的血糖异常诱发脂质代谢异常,血清LDL在相关氧化酶的催化作用下可能导致患者血清HbA1c、BUN的代谢进一步紊乱,加速神经组织病变,提示在对DPN的治疗中需密切监测患者血清LDL水平,以便评估患者的预后,并实施合理的治疗措施。由于本研究采用横断面设计方案探讨血清

LDL水平与DPN的相关性,并不能确定血清LDL水平是DPN的危险因素。因此,需进一步采用队列研究的方式来论证LDL水平对DPN的作用。

综上所述,本研究发现兼有周围神经病变并发的2型糖尿病患者的血清LDL水平较单纯2型糖尿病患者偏高,是糖尿病周围神经病变的相关因素。血清LDL水平与患者相关糖脂代谢指标密切相关,需进一步研究其相关的分子机制。

参考文献

- [1] 林潇,胡倩,姚和瑞,等.甲钴胺联合 α 硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变对神经电生理的影响[J].广东医学,2015,36(11):1754-1756.
- [2] 汪晓妹.参芪降糖颗粒联合银杏叶胶囊治疗糖尿病周围神经病变52例[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(5):201-205.
- [3] Li YB, Wu Q, Liu J, et al. miR-199a-3p is involved in the pathogenesis and progression of diabetic neuropathy through downregulation of SerpinE2[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):2417-2424.
- [4] Najafi B, Talal TK, Grewal GS, et al. Using plantar electrical stimulation to improve postural balance and plantar sensation among patients with diabetic peripheral neuropathy: a randomized double blinded study[J]. J Diabetes Sci Technol, 2017, 14(4):693-701.
- [5] Bai JW, Lovblom LE, Cardinez M, et al. Neuropathy and presence of emotional distress and depression in longstanding diabetes: Results from the Canadian study of longevity in type 1 diabetes [J]. J Diabetes Complications, 2017, 31(8):1318-1324.
- [6] 张涛静,龚燕冰,周晖,等.糖尿病周围神经病变的中西医诊治[J].中华中医药杂志,2014,29(8):2433-2436.
- [7] Stambolieva K, Petrova D, Irikeva M. Positive effects of plantar vibration training for the treatment of diabetic peripheral neuropathy: A pilot study [J]. Somatosens Mot Res, 2017, 34(2):129-133.
- [8] Short DJ, Zgonis T. Management of osteomyelitis and bone loss in the diabetic charcot foot and ankle [J]. Clin Podiatr Med Surg, 2017, 34(3):381-387.
- [9] Creigh PD, McDermott MP, Sowden JE, et al. In-vivo reflectance confocal microscopy of Meissner's corpuscles in diabetic distal symmetric polyneuropathy [J]. J Neurol Sci, 2017, 378:213-219.

(下转第360页)

细胞外囊泡与红细胞生成及相关制品的研究进展

孙士鹏 安成 刘贵建* 吴志奎

[摘要] 细胞外囊泡(extracellular vesicle, EVs)是包括微囊泡和外泌体在内的、直径 $\leq 1 \mu\text{m}$ 的含有蛋白质、脂质、mRNA和microRNA等分子的小磷脂囊泡,在组织、细胞之间传递功能信息,广泛参与了肿瘤侵袭转移、免疫、造血等功能。近年来研究发现EVs在红细胞生物学中也发挥着重要功能,红细胞相关功能性EVs分析将有望为红细胞生成障碍、贫血以及输血相关免疫调节等的研究提供新的思路和方法。本文就红细胞生成和红细胞制品的相关细胞外囊泡研究进展进行综述,以期为红细胞疾病的诊疗提供新的思路。

[关键词] 细胞外囊泡;红细胞生成;非编码RNA;红细胞制品

Advances in research on extracellular vesicles and erythropoiesis and related products

SUN Shipeng, AN Cheng, LIU Guijian*, WU Zhikui

(Clinical Laboratories, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, China, 100053)

[ABSTRACT] Extracellular vesicles (EVs) are small phospholipid vesicles ($\leq 1 \mu\text{m}$ in diameter) containing molecules, lipids, mRNAs and microRNAs, including microvesicles and exosomes. EVs can transmit functional information between tissues and cells, and involve in tumor invasion, metastasis, immunity and hematopoiesis. In recent years, studies have found that EVs also play an important role in erythrocyte biology. Analysis of erythrocyte-related functional EVs is expected to provide new ideas and methods for the study of erythropoiesis, anemia and transfusion-related immune regulation. In this review, the research progress of erythropoiesis and related extracellular vesicles in erythrocyte products will be summarized, to provide new ideas for the treatment of erythrocyte diseases.

[KEY WORDS] Extracellular vesicles; erythropoiesis; non-coding RNAs; erythrocyte products

细胞分泌的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)包括外泌体(exosomes)、外体(ectosomes)、微泡(microvesicles)、微粒(microparticles)、凋亡小体(apoptotic bodies)等成分^[1]。这些细胞分泌的EVs存在很大的异质性,目前依据透射电镜、免疫电镜和其他生物化学的方法,可把EVs主要分为外泌

体和微泡2大类^[2]。外泌体是多种活细胞晚期内体分泌的30~100 nm的小囊泡体,在蔗糖密度梯度溶液中密度范围为1.13~1.19 g/mL^[3]。EVs的主要功能是作为蛋白质、脂质和RNAs的递送载体,介导体内不同细胞类型之间的细胞间通讯,从而影响正常和病理状态。最初外泌体的发现源于红细

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81403192);国家重点基础研究发展计划(973计划)(2010CB530406);吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(320.6750.18107);国家中医临床研究示范基地科研专项暨所级科研基金课题(2014S305)

作者单位:中国中医科学院广安门医院检验科,北京 100053

*通讯作者:刘贵建, E-mail:liuguijian@163.com

胞成熟,外泌体与红系分化关系极为密切。EVs及其携带的 miRNA 等分子的功能研究主要集中在红细胞发育分化成熟的调控以及临床用红细胞制品领域,本文就红细胞生成和红细胞制品的相关 EVs 研究进展进行论述,以期对红细胞疾病的相关机制研究以及疾病治疗提供新的思路。

1 细胞外囊泡的定义及其发现

1.1 细胞外囊泡的定义及生成

EVs 是在多囊泡胞内体 (multivesicular endosome, MVE) 成熟过程中,由内体膜通过内出芽形成的管腔内囊泡,随后通过 MVE 与细胞膜融合的方式释放到细胞外^[4]。EVs 广泛存在于精液、血液、尿液、唾液、母乳、羊水、腹水液和脑脊液等体液中^[5]。迄今为止,文献报道包括树突状细胞、肥大细胞、T 细胞、B 细胞、表皮细胞、间充质干细胞、神经元细胞和许多肿瘤细胞等在内的几乎所有的细胞都能分泌外泌体^[1]。EVs 形成和排出细胞的过程中主要依靠 4 种内体分选复合物 (ESCRT0, I, II, III) 把细胞内含物、跨膜蛋白以及膜周边蛋白质掺入到外泌体中^[6]。作为 EVs 的主要存在形式,外泌体也可以以 ESCRT 非依赖的方式形成,四跨膜蛋白 CD63、CD81、CD9 也直接参与各种“货物”向外泌体的分选^[7]。

1.2 细胞外囊泡的发现源于红细胞成熟

红细胞是血液中数量最多的一种血细胞,主要功能是在脊椎动物体内运送氧气的最主要的媒介,同时还具有免疫功能。EVs 发现源于红细胞成熟,随着 EVs 研究的火热化,其在红系分化中的作用也被逐步揭示出来。20 世纪 80 年代研究人员陆续发现大鼠网织红细胞、绵羊红细胞等分泌小囊泡,并定义了外泌体,即起源于网织红细胞成熟时细胞外部膜囊泡。外泌体曾一度被视为是红细胞成熟时去除的胞内废弃物。直到 20 世纪末才发现 B 细胞分泌的外泌体能够携带并运输功能性的抗原提呈复合物,提出外泌体可能是免疫系统的细胞之间的通信载体^[8-9]。可见外泌体与红细胞的研究有很深的渊源,科学界对其功能认知也经历了否定之否定的过程。

2 细胞外囊泡的功能研究进展

几乎所有细胞都能分泌 EVs^[1],在多种体液中共存的 EVs 通过将核酸和蛋白质转移到靶细胞和

组织中,在细胞-细胞通讯中起关键作用。外泌体携带多种蛋白质、脂质和 RNAs,目前外泌体结构和功能数据库 ExoCarta (<http://exocarta.org/>) 数据库中已经鉴定出外泌体含有 9 769 种蛋白、3 408 种 mRNA 和 2 838 种 miRNA。不同的细胞来源 EVs,通常携带有独特的货物如 miRNA 或整合素,因而可作为相关疾病的分子标记物。多用于肿瘤诊断以确定特异性癌症亚型,例如胶质母细胞瘤患者血清外泌体包含特征性 EGFRv III 突变体基因 mRNA 和 miRNA 可能作为疾病诊断的标志物^[10]。EVs 尤其是外泌体介导体内不同细胞类型如肿瘤细胞、成纤维细胞、内皮细胞、白细胞等细胞之间的通讯,因而在炎症反应、肿瘤血管生成、组织炎症、免疫重建、肿瘤免疫治疗等方面发挥重要作用^[11-12]。例如 EVs 能在未来转移部位与肿瘤微环境中的基质细胞相互作用,以促进扩散的肿瘤细胞的存活和生长,并增加肿瘤细胞侵袭性^[10]。

3 红细胞中的细胞外囊泡

3.1 红细胞成熟过程中的细胞外囊泡研究

红系分化从造血干细胞开始,逐渐失去分化潜能,经历早期红系集落生成细胞 (burst-forming unit-erythroid, BFU-E) 和红细胞系集落形成单位 (colony-forming unit-erythroid, CFU-E) 最终脱核和变形成为有功能的成熟红细胞。造血前体细胞主要存在于骨髓中,少量释放到外周血中。成熟红细胞中含有血红蛋白但是没有细胞核和线粒体,因而成熟红细胞内没有 DNA 仅有少量残存的 RNA。*HBB* 是血红蛋白 β 亚基的编码基因,*HBB* mRNA 不会在成熟红细胞内大量存在。Jun 等^[13] 在外周血外泌体中可以检测大量 *HBB* mRNA,此结果说明含有大量 *HBB* mRNA 的外泌体应该是来自骨髓红系前体细胞释放到外周血中,而不可能来源于外周血成熟红细胞。这些含有大量 *HBB* mRNA 的外泌体是骨髓前体红细胞代谢的废物,还是主动释放到外周血中由红细胞等摄取而发挥特定的功能尚未被揭示。

成熟红细胞和红系前体细胞膜蛋白存在差异,这些差异蛋白的表达也与外泌体关系密切。红细胞在成熟过程中有一些不再需要的膜蛋白质可以通过外泌体排除途径释放出红细胞,致使成熟红细胞表面此蛋白减少或缺失。例如:大部分

成熟红细胞的转铁蛋白受体(Transferrin receptor, TfR)作为管腔内囊泡的货物通过 MVE 和随后的外泌体释放出来,其机制是基于细胞膜脂处理系统来调控膜蛋白的分选^[14]。此外乙酰胆碱酯酶和整合素 $\alpha 4\beta 1$ 也可以通过外泌体排除途径释放出红细胞,从而使细胞表面这些蛋白质减少或消失^[15]。网织红细胞上整合素 $\alpha 4\beta 1$ 的存在会导致某些疾病的血液循环并发症,因而通过外泌体清除红细胞上的整合素 $\alpha 4\beta 1$ 非常重要。整合素 $\alpha 4\beta 1$ 在造血祖细胞上表达,随着红系分化成熟细胞含量逐渐下调。外泌体上整合素 $\alpha 4\beta 1$ 能够与内皮细胞上的血管细胞粘附分子 1(VACM-1)结合,可能参与了其他重要的功能。相反,部分膜蛋白则只存在于成熟红细胞膜而外泌体膜上没有表达或含量很低。例如:B-spectrin 蛋白在网织红细胞成熟时不会从细胞膜上丢失,在网织红细胞外泌体上检测不到 B-spectrin 蛋白^[16]。血型糖蛋白 A(GPA)在红系来源的外泌体上的分布也远低于红细胞。还有一些蛋白在成熟红细胞和红细胞来源的外泌体上均有表达。ABCB6 是 ATP 转运蛋白家族的成员之一,被认为是负责线粒体摄取卟啉的蛋白。Katalin 等人^[17]发现 ABCB6 既存在于成熟红细胞上,在红细胞成熟的最后步骤从网织红细胞释放的外泌体上也有表达,但是其功能还有待揭示。相比红细胞的质膜来说,红细胞来源的外泌体膜中二酰基甘油(DAG)、胆固醇、补体受体 1(CR1, CD35)和 GPI 锚定蛋白如 CD55、CD59 以及乙酰胆碱酯酶相对含量较高^[18]。这些红细胞来源的外泌体是否还发挥着重要的生理功能?还是作为代谢废物经过肾脏通过尿液排出体外?近期的一项针对镰形红细胞贫血的研究提示这些外泌体可能仍是具有功能性作用的。研究发现镰形红细胞贫血患儿血浆外泌体主要来源于红细胞,其含量远高于健康对照组^[19]。镰形红细胞贫血患者的 EVs 能显著增加单核细胞与内皮细胞的粘附功能、促进内皮细胞 P-选择素高表达,而且病情严重的镰形红细胞贫血患儿的 EVs 增加单核细胞粘附功能最强。红细胞来源外泌体的功能还需要进一步的关注和研究。

当前对 EVs 及其装载物的功能研究主要集中在 miRNA 领域,红细胞相关 EVs 的 miRNA 研究也取得了一定的进展。虽然成熟红细胞内仅残留部分 RNA,但是这些 RNA 包含了多种 miRNA。

Simonas 等^[20]使用磁珠分选系统从人外周血分离获得 CD235a+ 的红细胞,提取 RNA 经过 Illumina HiSeq 2500 测序鉴定出 271 种已知 miRNA,而且每个样本大多数 miRNA 的平均 reads 读数 >1 000 reads。这说明成熟红细胞分泌的外泌体中应该装载有 miRNA,但是当前红细胞相关外泌体内非编码 RNA 功能研究较少,功能还有待揭示。miR-486 是氧化应激的急相反应 miRNA,在红系分化过程中发挥非常重要的作用^[21],研究发现外泌体来源的 miR-486 可以靶向人红系白血病 TF-1 细胞内 SIRT1 蛋白促进细胞向红系分化、增殖^[22]。外泌体来源的 miR-486 等理论上能够直接参与红系分化和氧化应激反应,在红细胞生成障碍、贫血等生物学过程中发挥的作用还需要进一步研究。

3.2 红细胞储存过程中细胞外囊泡的研究

当前红细胞相关 EVs 的研究较多的集中在红细胞制品领域。在血液储存过程中,红细胞经历新陈代谢和生化反应都会显著影响红细胞膜的完整性、变形性和携氧能力。由于输血成分的变化可能会导致组织缺氧或者炎症反应,进而降低输血后受者存活率。虽然为了确保血液制品的安全性,在浓缩红细胞制品(red blood cell concentrate, RCC)的加工和储存中应用了监管标准,但许多产品质量特性受到制造方法和低温保存的影响。目前,存储持续时间对血液制品质量和输血结果的作用一直是研究的焦点。血液中的 EVs 是输血后炎症和凝血的潜在影响因素,在 RCC 的存储过程中 EV 的异质性可以作为红细胞损伤的指示器^[23]。研究者们^[23]通过使用流式细胞术分析和可调电阻脉冲传感设备进行定量研究,在 RCC 产品中观察到 EV 亚群和浓度以及细胞质量参数的差异显著,随着低温贮存期延长,RCC 的 EVs 的数量增加。

研究发现随着红细胞 EVs 的释放,造成存储红细胞膜渐进性和显著的补体调节因子(如 CR1、CD55 和 CD59)的显著缺失,这些 EVs 具有潜在的输血相关免疫调节作用^[24]。除了逐渐失去补体调节作用,储存的红细胞 CR1 功能损失导致储存的红细胞结合和清除补体调理的能力稳步下降。虽然静息的中性粒细胞比红细胞表面的 CR1 表达量高出 200~300 倍,但是红细胞 CR1 免疫复合物的亲和力较中性粒细胞(PMN)CR1 强,所以调理颗粒优先结合到红细胞 CR1 上^[25]。临床上常用的红

细胞制品的储存时间在很大程度上影响了其释放的外泌体等胞外囊泡的大小和浓度^[26]。因而红细胞制品相关 EVs 的研究对输血相关免疫调节作用极为重要。因而,输血相关 EVs 的研究报道目前还很少。

4 小结及展望

健康个体持续每秒合成约 200 万的红细胞替代衰老的红细胞。这个新旧更替过程必须被严格控制以保证红细胞数量能够维持在一个很小的生理范围内。EVs 是多种活细胞晚期内体分泌的小囊泡体,主要功能是作为蛋白质、脂质和核酸等分子的运送载体。相对 EVs 在肿瘤和炎症等领域取得的成果来说,红系分化和红细胞制品相关的外泌体研究虽然有所进展,但是仍然进展缓慢。当前 EVs 的研究主要受到分离纯度和费用的限制,降低分离纯度成本并提高纯度是亟待解决的主要问题。在分离纯度方面,差速离心法结合超高速离心法仍是金标准的方法,可以获得人外周血 EVs 包括外泌体、外体、微泡、微粒、凋亡小体等成分,如何对这些异质性的 EVs 进行研究? 是通过物理化学的方法对不同大小的 EVs 进行分门别类的研究,还是对同种细胞来源的 EVs 进行研究? 科技进步需要更加细致和精密的研究,在当前科技水平条件下,笔者倾向于后者。对于某类细胞来源的 EVs(例如红细胞来源的 EVs)的分离纯化需要用到特定细胞表面标记分子的相应抗体标记的磁珠,用于研究或者诊断的费用则大为增加,我们期待技术的革新和进步。

EVs 及其运送的小分子功能涉及到表观遗传修饰、相关转录因子和基因的表达调控等,在红系细胞的分化和发育及成熟过程中起到关键作用。在红系细胞的分化和发育及成熟过程中会释放大量的 EVs 到外周血当中,但是相关的 EVs 的功能研究依然很少。由于遗传、营养以及缺铁、疟疾、血吸虫病、慢性肾脏病等病因导致红细胞生成、代谢或者细胞降解异常就会导致患者贫血。当前贫血是一种全球性的健康问题,全球约 1/3 的人群贫血^[26]。可见红细胞生成以及贫血机制的研究是全球亟待解决的难题。给贫血患者输注红细胞制品是贫血治疗的一种常用的临床方法,红细胞制品相关 EVs 在输血相关免疫调节中的作用也逐步被揭示出来,例如镰形红细胞贫血患者的研究从一

个侧面揭示了红细胞相关 EVs 参与了血管内皮屏障、单核细胞与内皮细胞的粘附功能。我们认为可以从以下点对红细胞相关 EVs 进行深入研究将会为贫血相关机制的揭示以及贫血治疗带来突破性的技术和思路:①红系造血相关 EVs 的机制研究;②炎症性 EVs 的机制研究;③血液制品 EVs 检测技术;④血液制品 EVs 质量及其对输血者的造血和免疫调节等。

参考文献

- [1] Larssen P, Wik L, Czarnewski P, et al. Tracing cellular origin of human exosomes using multiplex proximity extension assays [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(3):502-511.
- [2] van Niel G, D' Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4):213-228.
- [3] Koppers-Lalic D, Hogenboom MM, Middeldorp JM, et al. Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery; a new approach in nanomedicine [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(3):348-356.
- [4] Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal - gold transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding [J]. *Eur J Cell Biol*, 1984, 35(2):256-263.
- [5] Bortoluzzi S, Lovisa F, Gaffo E, et al. Small RNAs in circulating exosomes of cancer patients: A Minireview [J]. *High Throughput*, 2017, 6(4):13.
- [6] Wollert T, Hurley JH. Molecular Mechanism of multivesicular body biogenesis by escrt complexes [J]. *Nature*, 2010, 464 (7290):864-869.
- [7] Verweij FJ, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, et al. Lmp1 Association With CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation [J]. *EMBO J*, 2011, 30(11):2115-2129.
- [8] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3):1161-1172.
- [9] Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell - derived exosomes [J]. *Nat Med*, 1998, 4(5):594-600.
- [10] Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12):1470-1476.

- [11] Mentkowski KI, Snitzer JD, Rusnak S, et al. Therapeutic potential of engineered extracellular vesicles [J]. *AAPS J*, 2018, 20(3):50.
- [12] Kim YS, Ahn JS, Kim S, et al. The potential therapeutic (diagnostic + therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(2):113-125.
- [13] Aoki J, Ohashi K, Mitsunashi M, et al. Posttransplantation bone marrow assessment by quantifying hematopoietic cell - derived mRNAs in plasma exosomes/microvesicles [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(4):675-682.
- [14] Minetti G, Achilli C, Perotti C, et al. Continuous change in membrane and membrane - skeleton organization during development from proerythroblast to senescent red blood cell [J]. *Front Physiol*, 2018, 9:286.
- [15] Rieu S, Géminard C, Rabesandratana H, et al. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1 [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(2):583-590.
- [16] Blanc L, Liu J, Vidal M, et al. The water channel aquaporin - 1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume [J]. *Blood*, 2009, 114(18):3928-3934.
- [17] Kiss K, Brozik A, Kucsma N, et al. Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes [J]. *Plos One*, 2012, 7 (5) : e37378.
- [18] Pascual M, Lutz HU, Steiger G, et al. Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes [J]. *J Immunol*, 1993, 151(1):397-404.
- [19] Khalyfa A, Khalyfa AA, Akbarpour M, et al. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes [J]. *Br J Haematol*, 2016, 174(5):786-798.
- [20] Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, et al. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(16):9290-9301.
- [21] Wang LS, Li L, Li L, et al. MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors [J]. *Blood*, 2015, 125(8):1302-1313.
- [22] Shi XF, Wang H, Kong FX, et al. Exosomal miR-486 regulates hypoxia - induced erythroid differentiation of erythroleukemia cells through targeting Sirt1 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 351(1):74-81.
- [23] Almizraq RJ, Seghatchian J, Holovati JL, et al. Extracellular vesicle characteristics in stored red blood cell concentrates are influenced by the method of detection [J]. *Transfus Apher Sci*, 2017, 56(2):254-260.
- [24] McIver SC, Kang YA, DeVilbiss AW, et al. The exosome complex establishes a barricade to erythroid maturation [J]. *Blood*, 2014, 124(14):2285-2297.
- [25] Paccaud JP, Carpentier JL, Schifferli JA. Difference in the clustering of complement receptor 1 (CR1) on polymorphonuclear leukocytes and erythrocytes: effect on immune adherence [J]. *Eur J Immunol*, 1990, 20(2):283-289.
- [26] Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, et al. Iron deficiency anaemia [J]. *Lancet*, 2016, 387(10021):907-916.

(上接第 355 页)

- [10] 沈娟, 曾辉, 李连喜, 等. 振动感觉阈值(VPT)在糖尿病周围神经病变(DPN)中的诊断价值 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2013, 4(1):31-37.
- [11] 蒋韬, 朱东林, 高国芹. 2型糖尿病合并NAFLD患者血清Vaspin水平变化及其与胰岛素抵抗的关系 [J]. *山东医药*, 2016, 56(41):91-93.
- [12] 杨晓晖, 白颖. 糖尿病性周围神经病变的诊断和处理 [J]. *中华全科医学*, 2017, 15(1):5-7.
- [13] 张渭芳, 苏岑, 赵康仁, 等. 血清Lp-PLA2含量对早期无症状糖尿病周围神经病变的筛查价值 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2017, 27(4):324-327.
- [14] 陈光泽. 亚甲减与2型糖尿病患者微血管病变的关系 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2016, 30(6):494-495.
- [15] 徐季超, 胡皓璐, 丁薇. 2型糖尿病老年患者血清维生素D水平与周围神经病变的关系 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(5):684-688.
- [16] Edwards K, Pritchard N, Dehghani C, et al. Corneal confocal microscopy best identifies the development and progression of neuropathy in patients with type 1 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(8):1325-1327.

澳门大学 AMSV 微流控实验室

澳门大学 AMSV 微流控实验室位于澳门特别行政区澳门大学科研大楼 N21 的 3 楼,其主体为澳门大学模拟与混合信号超大规模集成电路国家重点实验室(State Key Laboratory of Analog and Mixed-Signal VLSI, AMSV)。该国家重点实验室经国家科技部及澳门特区政府批准于 2011 年正式落成,受澳门科学技术发展基金(Macao Science and Technology Development Fund, FDCT)和澳门大学的财政资助,现有上百名科研人员,配备有大量微电子仪器设备。其中微流控实验室于 2013 年成立,并于 2015 年建立澳门大学首间“千级无尘洁净室”,内设可实现软光刻、金属薄膜沉积等工艺的仪器。实验室现有博士生导师 1 名,博士后、在读博士及硕士研究生近 10 名,具有雄厚的科研力量。

该实验室以数字微流控为核心技术,主要研发自动化、便携式、可应用于生物医学领域的微流控平台,是一个结合了微电子、材料、生物、化学、编程等多个领域的交叉学科实验室。目前实验室主要研究数字微流控平台与 PCR 等温核酸扩增技术、高通量药物筛查、蛋白结晶等技术的融合,致力于充分利用微流控芯片节省样本和试剂用量、反应快、体积小、易自动化等优点,实现可集成一系列生化反应的“芯片实验室”,促进即时检验设备、个性化医疗设备的研发与产业化。实验室目前发表 SCI 文章 20 余篇,会议文章 10 余篇,拥有 13 项专利技术,已完成和在研项目共 6 项,并与中山大学达安基因股份有限公司合作研发耐药结核快速检测方法,与澳门大学健康科学学院合作研究高通量癌症药物筛选等课题,研究工作被“Science”和“Lab on a Chip”重点报道,并被“X-MOL”平台收录,以及国内外媒体新闻报道。

微流控实验室主任贾艳伟教授长期研究微流控技术研发及其在生物化学中的应用,包括管道微流控与数字微流控,研究范围涵盖物理、化学、生物、工程等多个交叉学科。承担及完成省部级及校级研究课题 6 项,项目基金总额近千万元。曾获得新加坡教育部颁发杰出导师奖以及国际生物结晶组织颁发发明创造奖。



→ 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