



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

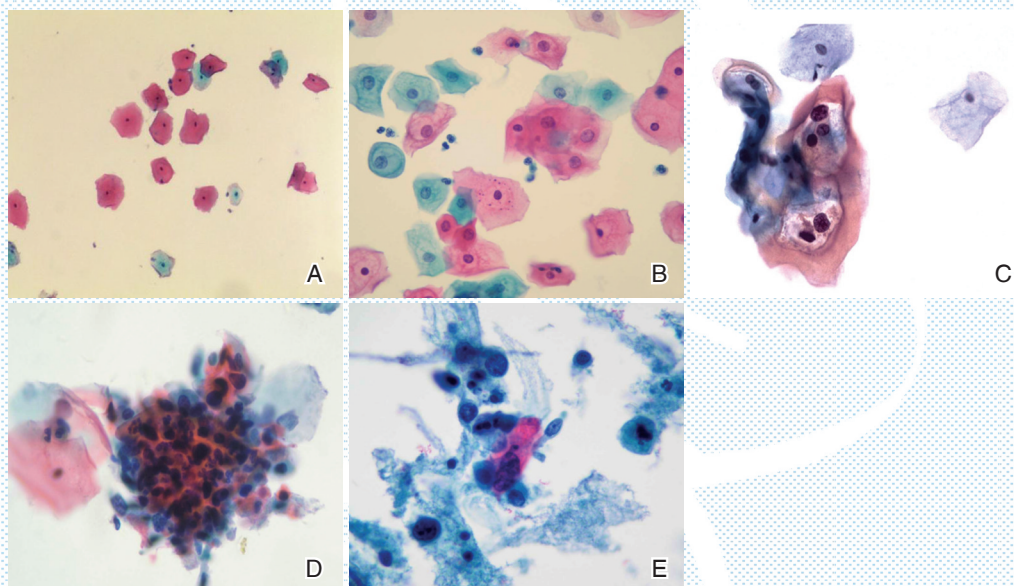
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2018年1月 第10卷 第1期 总第53期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 10 Number 1 January 2018



A: 正常的宫颈脱落细胞; B: 炎症改变的宫颈脱落细胞; C: 低度病变的宫颈脱落细胞; D: 高度病变的宫颈脱落细胞; E: 宫颈鳞状细胞癌的宫颈脱落细胞。

图(P30) 不同宫颈脱落细胞的病理结果(巴氏,×100)

Figure(P30) The biopsy pathologic results of different cervical exfoliated cells (Pap,×100)

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



分子诊断与治疗杂志

二〇一八年一月

第十卷 第一期

中山大学



周强

1970年正月出生。1994年毕业于重庆医科大学医学检验系，获医学学士学位；2007年毕业于原广州医学院，获医学硕士学位；现博士

就读于广州医科大学内科学，师从罗健东教授。

主任技师，硕士生导师。现任广州医科大学附属第二医院检验科负责人，广州医科大学附属第二医院临床检验基础教研室副主任、临床血液学检验教研室副主任。担任中国医学装备协会现场快速检测装备技术分会常委、中国医疗保健国际交流促进会基层检验技术标准化分会委员、中国医促会基层检验标准化分会免疫学组第一届全国委员、广东省微量元素科学学会副理事长、中国民族医药学会精准医学分会理事、广东省精准检测分会常委、广东省中西医结合学会医学实验室自动化专业委员会常委、广东省医疗安全协会检验医学分会常委、上海医学即时检测产业技术创新战略联盟理事、广东省医学会精准医学与分子诊断学分会委员、广州市医师学会检验医师分会副主任委员、广州市医学会检验分会第11届委员会副主任委员；科技部科技咨询专家、广东省科技咨询专家、广东省医学科研基金评审专家、广州市科技创新委员会专家、海南省科技评审专家、河北省科技奖励评审专家、湖北省科技奖励评审专家；广州市卫生系列高级专业技术资格评审委员会委员、广州市医疗事故鉴定专家；《中华检验医学杂志》审稿专家。

长期从事医学检验的临床、教学和科研工作，主要研究方向为糖尿病的基因诊断和发病机制的研究。承担及参与完成国家、省部级及市厅级课题12项，其中主要参与国家863计划、国家自然科学基金、广东省产学研重大项目、省卫生厅课题、广州市科创委课题等多项；主持863子课题、广东省科委课题、上海市科委产学研医重大项目子课题、卫生厅课题、卫生局课题等多项。主编专著一部，参编专著一部。获得实用新型专利2项。以第一作者或通讯作者发表中文专业期刊和SCI文章共50余篇。招收研究生7名，3名已顺利毕业。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2018年1月 第10卷 第1期 总第53期 Bimonthly Volume 10 Number 1 January 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 李彩珍 黄文珊
出版 《中国家庭医生》杂志社有限公司

地址 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话 (020) 32290177 32290789-206
传真 (020) 32290177
电子邮箱 jmdt@vip.163.com

刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R

邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发行
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1月18日
定价 RMB 15.00元

Responsible Institution Sun Yat-sen University
Sponsor China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.
Organizer DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University
Consultant LAI Maode SHEN Ziyu
Editor in Chief LI Ming
Managing Director HAO Fen
Editorial Office <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office
Editors LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen HUANG Wenshan
Editing China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.

Add 10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290177 32290789-206
Fax (020) 32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2018.1.18
Price RMB 15.00

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2018年1月 第10卷 第1期

目次

述评

无创性结直肠癌生物标志物概要 梁媛紫 徐军发 黄华艺(1)

论著

GeXP多重分析技术检测肝癌组织长链非编码RNA表达的实验研究
..... 史俊英 王晔 陈文 等(9)

红河州HIV/HCV合并感染者HCV基因亚型多样性及种系进化研究
..... 杨兰辉 陈梅 霍松 等(17)

2014-2016年惠州市手足口病住院患儿流行病学研究 杨坤祥 陈剑虹 贺海林 等(25)

高危型HPV基因型在门诊就诊人群中的分布特征 严鸣光 殷卫兵(30)

广东省潮州地区献血者乙肝感染血清学和分子生物学特征 卢玉香 周筠(34)

结直肠癌患者血浆中可溶性血栓调节蛋白的水平及其临床意义 白驹 杨力芳(38)

老年原发免疫性血小板减少症患者治疗前后T淋巴细胞亚群的变化及意义
..... 萨仁娜 托娅 白丽杰 等(43)

乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价 林健聪 王红翠 吴英松 等(47)

综述

高通量测序技术在检测循环肿瘤细胞中的应用 许芳 赵阳 武其文(56)

长链非编码RNA在乳腺癌中的研究进展 许家瑞 胡剑 刘冬冬 等(61)

人类微生物组学与健康及其临床检验的需求 王庆忠 范云 沈祁焯(67)

专家风采

周强 (封二)

实验室巡礼

广州医科大学附属第二医院检验科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 1 January 2018

CONTENTS

COMMENTS

A summary of biomarkers for colorectal cancer noninvasive detection

LIANG Yuanzi, XU Junfa, HUANG Huayi (1)

ORIGINAL ARTICLES

Development of a GeXP-based multiplex RT-PCR assay for detection of long non-coding RNA in
hepatocellular carcinoma

SHI Junying, WANG Ye, CHEN Wen, LIU Chengyu, MU Xiaofeng (9)

Genotypes diversity and phylogenetic analysis of HCV in HIV/HCV co-infection patients in Honghe

YANG Lanhui, CHEN Mei, HUO Song, MA Xingli, LI Qiongfeng (17)

Epidemiologic study of pediatric inpatients with hand foot and mouth disease in Huizhou during 2014–2016

YANG Kunxiang, CHEN Jianhong, HE Hailin, ZHONG Zeyan (25)

Infection status of high risk-human papillomavirus and its genotype distribution in outpatients

YAN Mingguang, YIN Weibing (30)

The serological and molecular characterization of hepatitis B virus infection in blood donors in

Chaozhou, Guangdong province

LU Yuxiang, ZHOU Yun (34)

The level and clinical significance of plasma soluble thrombomodulin in patients with colorectal cancer

BAI Ju, YANG Lifang (38)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 1 January 2018

CONTENTS

Changes and significance of T lymphocyte subsets before and after treatment in elderly patients with primary
immune thrombocytopenia

SA Renna, TUO Ya, BAI Lijie, NIU Yudong (43)

The performance verification and clinical application evaluation of the quantitative kit for Hepatitis B Virus Markers

LIN Jiancong, WANG Hongcui, WU Yingsong, DONG Zhining, LI Zhixiong (47)

REVIEWS

Application of high throughput sequencing technology in detection of circulating tumor cells

XU Fang, ZHAO Yang, WU Qiwen (56)

Progress of Long Non-coding RNA in Human Breast Cancer

XU Jiarui, HU Jian, LIU Dongdong, LI Youqiang, LIN Li, LIU Dan, XU Jianhua (61)

Human microbiome related with human health and its requirement for clinical diagnosis

WANG Qingzhong, FAN Yun, SHEN Qiye (67)

无创性结直肠癌生物标志物概要

梁媛紫¹ 徐军发^{1*} 黄华艺^{2,3*}

[摘要] 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种全球常见的恶性肿瘤,其早期症状不明显,因而容易被患者忽视,当患者出现症状时往往已是晚期。因此,有效的筛查方案可使结直肠癌的死亡率明显下降。目前临床上粪便隐血试验(fecal occult blood test, FOBT)和内镜检查仍然是结直肠癌最主要的筛查方法。近年来,关于结直肠癌遗传学和表观遗传学改变的报道越来越多,各种结直肠癌相关标志物如基因突变、microRNA、循环肿瘤DNA、干细胞和蛋白质表达检测为结直肠癌的早期诊断开辟了新途径。随着临床研究的进展,生物标志物检测对结直肠癌的诊断和治疗效果的评估起到重要辅助作用。鉴于结直肠癌相关生物标志物很多,可把它们大体分为有创性和无创性2大类。本文根据文献对无创性结直肠癌相关标志物的临床应用价值、检测的难易度和不足进行简要概括。

[关键词] 结直肠癌;生物标志物;肿瘤筛查;表观遗传学

A summary of biomarkers for colorectal cancer noninvasive detection

LIANG Yuanzi¹, XU Junfa^{1*}, HUANG Huayi^{2,3*}

(1. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523808; 2. Department of Laboratory Medicine, The People's Hospital of Guangxi Province, Nanning, Guangxi, China, 530021; 3. Department of Surgical Oncology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA, 14263)

[ABSTRACT] Colorectal cancer (CRC) is a common type of malignancy worldwide. The early stage is asymptomatic, thus it tends to be ignored by patients and typically develops into the advanced stage before any symptoms occur. Henceforth, efficacious screening strategies would be very helpful in the effort to reduce the mortality of CRC. The fecal occult blood test (FOBT) and endoscopy currently used in the clinic are 2 major tools in CRC screening. Recently, more and more evidences regarding the changes in genetics and epigenetics of CRC have been reported. Analysis of various biomarkers, such as the mutation of CRC associated genes, microRNAs, circulating tumor DNA, stem cells, and protein markers have provided new methods for diagnosing CRC. As the clinical research advanced, the detection of biomarkers has become very helpful in CRC diagnosis and prognosis. Since numerous CRC related biomarkers have been reported, the biomarkers for CRC are categorized into 2 major types in this summary: invasive and noninvasive. The noninvasive CRC biomarkers are summarized here, and their clinical application values, ease of detection, and disadvantages are also briefly evaluated based on literature research.

[KEY WORDS] Colorectal cancer; Biomarker; Cancer screening; Epigenetics

作者单位:1. 广东医科大学医学检验学院,广东,东莞 523808

2. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530021

3. 美国罗斯威尔帕克癌症研究所肿瘤外科,美国,纽约,布法罗 14263

*通讯作者:徐军发, E-mail: imxjunfa@163.com; 黄华艺, E-mail: Huayi.Huang@Roswellpark.org

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球3大常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。绝大部分CRC的发生、发展是一个多步骤、多阶段、多基因参与的过程,是外在环境因素和机体内在遗传因素相互作用的结果。CRC早期症状不明显,通常出现临床症状时已发展为难治愈的阶段,因此被称为“沉默”的疾病^[3]。CRC筛查5年存活率约为90%^[4]。大多数结直肠癌是由息肉发展而来,即结肠息肉为癌前病变疾病,如果息肉能在早期被发现并去除,就能预防结直肠癌的发生。因此,结直肠癌的早期诊断尤显重要。

分子标志物的检测是临床CRC筛查的一个很有前景的方法。然而,目前可用于检测早期CRC疾病进展的有效分子标志物不多,检测的灵敏度和特异性不理想仍然是亟待解决的问题。从技术上来说,检测CRC的手段可分为有创性和无创性检测2种技术,两者各有优缺点。随着研究的不断深入,CRC分子标志物在CRC患者治疗效果的监测、个性化治疗方案的选择和预后的评估中日益受到重视。为了合理使用现有的CRC标志物,本文根据文献报道,对无创性CRC标志物的临床应用价值、检测的难易度和不足之处进行简要概括。

1 粪便隐血试验

愈创木脂法粪便隐血试验(guaiac-based fecal occult blood test, gFOBT)是目前国内外最常用的结直肠癌筛查方法之一。对于检测CRC, gFOBT灵敏度为65%,特异度为77.87%^[5],具有简便、快速、无创、检测费用低等优点,也是唯一经前瞻性、随机对照试验证实有效的检测方法,能使CRC的死亡率降低11%~33%^[6]。虽然gFOBT的灵敏度和特异度都不高,且易受食物和药物影响出现假阳性,但由于检测的方便性和实用性,仍然受到临床的青睐。

2 粪便血红蛋白检测

粪便免疫化学检测(fecal immunochemical test, FIT),其原理是建立在针对人血红蛋白抗原的基础上的特异性抗原-抗体反应。在无症状的CRC高危人群中灵敏度为80%,特异度为90.12%^[5]。FIT避免了gFOBT易受药物和食物影响的特点,具有更高的灵敏度,少量粪便样本即可检测。研究发现, FIT对大肠癌及腺瘤性息肉的检出率更高,且由于其对患者无饮食和药物的限制,患者更倾向于FIT^[7-8]。为预防CRC的发生,美国预防服务工作组(U.S.

Preventive Services Task Force, USPSTF)推荐每年应进行一次FIT检测。综合方法学性能和实用性等方面的比较, FIT的优势比gFOBT大。

3 基于粪便CRC相关检测

3.1 基于基因突变的DNA检测

粪便DNA检测是针对人血红蛋白和特异性基因改变的非侵入性筛查检测,多年来CRC常见的基因突变频率一直是人们关注的焦点。基因APC和P53突变可作为CRC预后不良的标志物^[9-10];基因KRAS、BRAF和PIK3CA突变检测是抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)治疗的依据,根据检测结果评估CRC患者是否适合使用相应的靶向治疗药物^[11]。其他常见的突变基因有ARID1A、SMAD4、CTNNB1、TGFB2、SOX9、FAM123B和ERBB2,这些突变基因通过干扰关键信号通路(包括Wnt-β-连环蛋白通路、EGF-MAPK通路、PI3K和TGF-β通路等)的功能或阻碍DNA复制、修复等功能,促进CRC的发生发展^[12]。在粪便异常脱落细胞中小碎片癌组织即可发现DNA点突变,通过相关DNA检测便可对CRC进行筛查,故粪便DNA检测比血液DNA检测简单。

近年来关于CRC筛查试剂盒的研发越来越多,其中Cologuard是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的首个非侵入性CRC筛查试剂盒,通过分析粪便异常DNA和血红蛋白对CRC进行筛查,总灵敏度为92.3%,特异度为87%,其灵敏度比FIT高^[13]。此外,由中山大学附属第六医院研发的大肠癌粪便无创筛查试剂盒“长安心”,对粪便中CRC和癌前腺瘤的异常基因标志物的检出率分别超过90%和60%^[14],这在CRC的筛查、诊断、治疗和预后评估等领域取得一定的突破和发展。

3.2 基于表观遗传学的DNA检测

由于遗传和表观遗传变异共同影响CRC的发展,DNA甲基化生物标志物的使用对提高目前CRC的筛查、诊断、治疗和预后评估具有很大的潜在价值。经独立验证且深入研究的CRC诊断基因有VIM、SEPT9、ITGA4、OSM4、GATA4和NDRG4^[15],理论上这些甲基化标志物与长分散元件1(long interspersed element 1, LINE1)甲基化联合检测的灵敏度比FIT的灵敏度高;而经独立验证的预后基因有myopodin、KISS1、TMEFF2、HLTF、

hMLH1、*APAF1*、*BCL2* 和 *p53*^[15]。甲基孕激素受体 (methylated progesterone receptor, mPGR) 和 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, mMGMT) 是粪便独有的生物标志物^[16]。与血液标本相比,粪便中大量超甲基化基因的检出率高。因此,粪便 DNA 甲基化标志物可能比血液中的生物标志物更有筛查价值。

3.3 基于遗传特征的 CRC 检测

已知, 5%~10% CRC 由无蒂锯齿状腺瘤 (sessile serrated adenoma, SSA) 和锯齿状腺瘤演变而来。这 2 种腺瘤经过一系列组织学和分子学的改变, 逐渐由腺瘤发展为 CRC^[17]。基于基因和基因表型的变化, CRC 的衍生途径至少可分为 3 条: CpG 岛甲基化表型 (CpG island methylator phenotype, CIMP) 途径 (阐释了一些以右半结肠息肉为主的息肉从 SSA 发展为 CRC 的过程)、微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 途径和染色体不稳定性 (chromosomal instability, CIN) 途径, 后 2 条途径标志着腺瘤转化为 CRC。

CRC 主要由染色体不稳定性途径引起, CIN 导致染色体拷贝数改变是 CRC 的一个标志。染色体隔离缺陷、端粒酶功能缺失、DNA 损伤等功能障碍都会导致染色体不稳定和杂合性丢失。研究发现, 染色体 1p36、1p12、1q21、9p13、14q11、16p13 和 16p12 缺失在年轻 CRC 患者中更易见, 而染色体 7q11 和 7q22 增多在老年患者中更易见^[18]。另外, 基因 *p53* 和 *BUBR1* 表达异常与 CIN 的发生有关^[19]。然而, 机体内导致 CIN 基因突变的类型和模式更为复杂, 有待进一步研究。

错配修复系统 (mismatch repair, MMR) 对 DNA 复制校正意义重大, 主要由 *MLH1*、*MSH2*、*MSH6* 和 *PMS2* 这 4 个错配修复基因构成。MMR 任何一个蛋白功能丧失都会导致微卫星不稳定性, 从而有可能导致癌症发生。MSI 反映了 DNA 错配的修复能力, 因此 MSI 是引发 CRC 的一个途径^[20]。Lynch 综合征 (又称遗传性非息肉性结直肠癌) 通常表现为基因 *MLH* 或 *MSH2* 的突变, 而散发性 CRC 与基因 *hMLH1* 甲基化有关。新提出的 MSI 标志物基因组由 *BAT-25*、*BAT-26*、*NR21*、*NR24* 和 *NR27* 组成, 其中微卫星高度不稳定表型 (microsatellite instability-high, MSI-H) CRC 定义为 5 个标志物中至少有 2 个显示不稳定, 而大部分散发性 CRC 缺乏 MSI 特征, 定义为微卫星稳态^[20]。

SSA 是锯齿状肿瘤形成途径的癌前病变。基因的正常插入或缺失等会引起基因组不稳定, 大多情况下会导致高频微卫星不稳定性 (MSI-H) 腺瘤的发生, 其中基因 *BRAF* 的突变和 *SLC5A8* 的高甲基化就是引起 MSI-H 腺瘤的重要影响因素^[21]。

CRC 的各种遗传途径共同作用并单独存在, 同一个肿瘤通常由多重途径同时作用^[22]。因此, CRC 的遗传学改变因素复杂, 相应的生物标志物也复杂多样, 这给 CRC 的检测带来一定的挑战性。

3.4 基于多种标志物组套检测

多靶位粪便 DNA (multitarget stool DNA, MT-sDNA) 测试于 2014 年被批准作为 CRC 平均风险的筛查项目, 随后被 FDA 纳入医疗报销项目^[23]。尽管 MT-sDNA 检测对 CRC 早期筛查具有高度灵敏度, 美国预防服务工作小组 (USPSTF) 在 2015 年 10 月草案建议将该检测仅视为“可替代”或“可能有用的临床筛选”试验^[24]。第一代 MT-sDNA 原型测试 (包括 *KRAS* 基因突变, *VIM*、*NDRG4*、*BMP3* 及 *TFPI2* 甲基化, β -肌动蛋白和血红蛋白) 检测 CRC 的灵敏度为 87%, 进展性腺瘤 (advanced adenoma, AA) 54%~92% (具体取决于息肉的大小)^[25]。更为精准的第二代 MT-sDNA 自动化测试 (包括 *KRAS* 基因突变, *NDRG4* 及 *BMP3* 甲基化, β -肌动蛋白和血红蛋白) 检测 CRC 的灵敏度为 95%~97%, AA 为 57%~83%, AA 的灵敏度取决于腺瘤的大小^[25]。整体上, MT-sDNA 检测 CRC 的灵敏度为 93%, AA 和无蒂锯齿状腺瘤为 42%~66% (具体取决于息肉的大小), 总体特异度为 87%~90%。与 gFOBT 及 FIT 相比, MT-sDNA 试验的检出率更高, 但是检测成本昂贵。许多数据表明, 每 3 年进行一次 MT-sDNA 检测其性能和成本达到最优化^[26]。

3.5 基于蛋白质和 RNA 的检测

粪便中蛋白质和 RNA 作为早期筛查和诊断 CRC 的生物标志物越来越受关注。其中肿瘤 M2 型丙酮酸激酶 (tumor M2 pyruvate kinase, M2-PK) 来源于大肠肿瘤细胞, 而免疫层析 M2 型丙酮酸激酶 (immunochromatographic fecal tumor M2 pyruvate kinase, iM2-PK) 是潜在的筛查 CRC 的生物标志物。Kim 等^[27]检测 CRC 患者的 iM2-PK 值, 所得的 CRC 灵敏度为 92.8%, 腺瘤灵敏度为 69.4%。通过与免疫层析粪便隐血试验 (immunological fecal occult blood test, iFOBT) 及粪便 M2-PK 酶联免疫吸附试验比较, 三者中 iM2-PK 值的灵敏度最高, 且由于

其检测快速方便,是很有前景的CRC筛查标志物。钙卫蛋白(calprotectin)是中性粒细胞和巨噬细胞胞浆来源的含钙蛋白,是一种粪便中稳定的炎性标志物。对于可疑的CRC患者具有较高的阴性预测值^[28],钙卫蛋白的检测有望提高CRC的检出率。

此外,粪便微小RNA(miRNA)也可用于CRC的早期诊断,如miR-29a、miR-223和miR-224^[29]。粪便蛋白质和RNA的检测在一定程度上提高了CRC的检出率,但目前这些发现仍在研究阶段,还未在临床上实践应用。

3.6 基于微生物组的检测

肠道菌群失调与肠道肿瘤的发生和发展有关。CRC患者肠道菌群组成与健康人群肠道菌群组成不一样,与不同黏膜的基因表达谱相关^[30]。

CRC患者肠道菌群主要包括梭杆菌、脆弱类杆菌和致病性大肠杆菌等^[31]。这些病原微生物在肠道局部黏膜定植启动CRC,微生物在黏膜周围不断定植引起后续变化,从而促进疾病的进展。因此,筛查这些病原微生物有望能对CRC进行早期诊断或预防性干预^[32]。然而,宿主与病原菌之间相互作用的机制仍不太清楚,由于黏膜相关微生物与粪便微生物不同,目前对于选定哪种样本的微生物筛查CRC还未达成共识。以上阐述归纳于表1。

4 血液相关CRC标志物

4.1 异常DNA甲基化标志物

近年来,血浆中CRC相关的异常DNA甲基化标志物已投入大量研究,其中血浆SEPT9甲基化

表1 粪便中CRC相关生物标志物

Table 1 Stool CRC biomarkers

异常类型	标志物名称	灵敏度	特异度	应用	参考文献
血红蛋白	粪便隐血(gFOBT)	65%	77.87%	筛查	6
	粪便血红蛋白(FIT)	80%	90.12%	筛查	
DNA 突变	APC、P53、KRAS、BRAF、PIK3CA、ARID1A、SMAD4、CTNNB1、TGFBR2、SOX9、FAM123B和ERBB2	Cologuard: 92.3% 长安心: ≥90%	Cologuard: 87% 长安心: ≥60%	筛查、诊断、治疗及预后判断	9-14
第一代 MT-sDNA	KRAS、mVIM、mNDRG4、mBMP3、mTFPI2、β-肌动蛋白和血红蛋白	CRC: 95%~97%, AA: 57%~83%	87%~90%	筛查及预后判断	25
第二代 MT-sDNA	KRAS、mNDRG4、mBMP3、β-肌动蛋白和血红蛋白	CRC: 93% AA: 42%~66%	87%~90%	筛查及预后判断	26
蛋白质	iM2-PK	CRC: 62.8%, AA: 69.4%	-	筛查	27
异常DNA甲基化	VIM、SEPT9、ITGA4、OSM4、GATA4、NDRG4、KISS1、TMEFF2、HLTF、hMLH1、APAF1、BCL2、p53、mPGR和mMGM	-	-	筛查及预后判断	15-16
CIN	1p36、1p12、1q21、9p13、14q11、16p13和16p12缺失; 7q11和7q22增多	-	-	预后判断	18
MSI	BAT-25、BAT-26、NR21、NR24和NR27	-	-	预后判断	20
CIMP	BRAF和SLC5A8	-	-	预后判断	21
蛋白质	钙卫蛋白	-	-	筛查	28
MiRNA	miR-29a、miR-223和miR-224	-	-	筛查	29
微生物组	梭杆菌、脆弱类杆菌和致病性大肠杆菌	-	-	筛查	31

(mSEPT9)是研究热点。SEPT9是隔膜蛋白家族中的一员,与胞质分裂及细胞周期调控有关。mSEPT9试验多应用于CRC的早期诊断,灵敏度为76.6%,特异度为95.9%,联合血浆癌胚抗原检测敏感度为86.4%,联合FIT灵敏度达94.4%^[33],mSEPT9还可能是CRC治疗检测和预后判断的标志物^[34]。此外,基因*BCAT1*和*IKZF1*甲基化的联合检测CRC的灵敏度为77%,特异度为92.4%。由于2个基因都与肿瘤的生长及侵袭性相关,联合的甲基化程度与肿瘤进展的程度相关,可用于CRC的分期评估^[35]。血浆异常DNA甲基化标志物的联合检测可提高CRC的检测率。

4.2 RNA标志物

RNA的种类较多,如信使RNA(mRNA)、微RNA(miRNA)和长链非编码RNA(LncRNA)等,具有胞外性能稳定,且易于提取和保存等优点,在不同体液中均可研究。在肿瘤组织中,RNA表达高度异常,因此RNA更适合应用于肿瘤性能分析的研究。实时定量PCR(real time quantitative PCR, qPCR)是最先用于测定mRNA表达微阵列谱的方法,后来逐渐被下一代基因测序(next generation sequencing, NGS)技术取代。NGS技术具有简单、成本低和快速等优点,且能精准地测出整个转录组的序列^[36]。

4.3 miRNA标志物

miRNA是一类内生的、长度约为20~24个核苷酸的小RNA,在细胞内具有多种重要的调节功能,与癌症的发展及转移有关,血清miRNA是潜在的

CRC预后生物标志物^[37]。miRNA对肿瘤细胞具有正调节和负调节作用,可表现为原癌基因、抑癌基因或者两者兼为。miR-17-3p、miR-92、miR-29a、miR-141、miR-21、miR-152、miR-7和miR-92a等与晚期CRC有关^[38-41],提示预后差;miR-143、miR-195、miR-146a-5p、miR-140、miR-375和miR-577可抑制CRC的发展和转移^[42-47],有望成为CRC的替代治疗药物。然而,对于标本的采集、miRNA的提纯和分析的方法还未标准化,限制了miRNA的有效测试。

4.4 lncRNA标志物

lncRNA的长度大于200 nt,具有mRNA样结构。lncRNA通过干预mRNA的活性参与CRC的发展、侵袭和转移过程,对CRC早期诊断、预后、耐药和抗辐射等发挥重要作用。lncRNA直接与蛋白质结合以调节其活性或改变其定位,与内源RNA竞争通过抑制RNA聚合酶和调节基因表达来影响下游基因的表达,具有激活或抑制癌细胞的双重作用^[48]。Li等^[49]发现共有21个相关lncRNA在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达异常,其中7个变化明显:AFAP1-AS1、BCAR4、H19、HOXA-AS2、MALAT1和PVT1在CRC组织中上调,ADAMTS9-AS2下调,提示CRC患者预后不良。lncRNA有望成为CRC的诊断和治疗靶点。

4.5 循环肿瘤DNA标志物

循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是新兴的无创多功能的体液活检生物标志物,与CRC的早期诊断、治疗靶点的选择、癌细胞转

表2 血液中CRC相关生物标志物

Table 2 Blood-based CRC biomarkers

异常类型	标志物名称	应用	参考文献
异常DNA甲基化	<i>SEPT9</i>	筛查及诊断	33
	<i>BCAT1</i> 和 <i>IKZF1</i>	筛查及诊断	35
miRNA	miR-17-3p、miR-92、miR-29a、miR-141、miR-21、miR-152、miR-7和miR-92a、miR-143、miR-195、miR-146a-5p、miR-140、miR-375和miR-577	筛查及预后判断	37、47
LncRNA	AFAP1-AS1、BCAR4、H19、HOXA-AS2、MALAT1、PVT1和ADAMTS9-AS2	诊断、治疗及预后判断	49
DNA	循环肿瘤DNA	诊断、治疗及预后判断	50-51
干细胞	Nanog、Oct-4、Sox-2、lgr-5、CD133、CD24、CD29、ALDH1、EpCAM、CD44、CD166、CD26、ALDH1、CD24、CD44、CD133、CD166、EpCAM、lgr-5、Nanog和Sox-2	诊断、治疗及预后判断	53
可溶性蛋白	CRP、CEA、CA19-9、VEGF、CK20、IGFBP2、DKK3、mFOXEl和mSYNE1	筛查	55-59

移的检测以及抗治疗等相关^[50]。CRC患者血液中出现 ctDNA 是其复发和总生存期评估的一个指标^[51]。ctDNA 检测未来在临床到底能否应用,还有待更深入的研究。

4.6 干细胞CRC标志物

肿瘤干细胞可分化成更成熟的肿瘤细胞,具有自我更新的能力,与肿瘤的发生、发展、转移和复发相关,是肿瘤产生耐药性的主要原因^[52]。干细胞作为CRC标志物有 Nanog、Oct-4、Sox-2、Igr-5、CD133、CD24、CD29、ALDH1、EpCAM、CD44、CD166和CD26,通常用于干细胞的分离鉴定。此外,ALDH1、CD24、CD44、CD133、CD166、EpCAM、Igr-5、Nanog和Sox-2可对CRC的病理分期、治疗、癌症复发和患者的生存率等进行评估^[53]。肿瘤干细胞是诊断和治疗CRC新的研究方向。

4.7 血清(浆)可溶性蛋白CRC标志物

包括欧洲癌症和营养前瞻性研究在内的多项前瞻性研究发现,血清或血浆中高浓度的C反应蛋白(c-reactive protein, CRP)与CRC风险升高有关,高水平CRP可能与CRC的发生有直接关系^[54]。血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)和CA19-9与CRC的严重程度及转移有关^[55]。另外,血管内皮细胞生长因子C(vascular endothelial growth factor, VEGF-C)的过度表达与CRC患者的总生存期相关^[56];细胞角化因子20(cytokeratin 20, CK20)与CRC的治疗有关^[57]。单个可溶性蛋白标志物用于诊断CRC时,往往缺乏敏感性,而多个标志物联合检测可提高敏感性。如胰岛素样生长因子结合蛋白2(insulin like growth factor binding protein-2, IGFBP2)、Dickkopf-3(DKK3)和丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)可用于诊断CRC^[58];甲基化FOXO1和SYNE1也是潜在的CRC诊断标志物^[59]。可溶性蛋白具有易于取材、检测方便、易于自动化和重复性好的优点,易于推广应用。以上阐述归纳于表2。

5 结语

一项理想的检测应具有高度依从性、灵敏度和特异度、微创并保持一定的成本效益。CRC筛查仍存在许多局限性,例如来自组织(手术创伤性)和无创性(或微创性)的标本,其检测结果之间的一致性问题,但随着临床研究的逐渐深入,在对CRC患者治疗反应性的预测、个性化治疗方案的选择和预

后的评估中,分子标志物也日益受到重视。本文所列举的无创性CRC标志物中,粪便隐血试验仍然是目前结直肠癌最主要的无创筛查方法,其他标志物虽然有很大潜在性,但真正应用于临床检测的不多。有些生物标志物灵敏度高,但特异度不高,或相反;有些则成本昂贵,且临床意义不大,如一些基因检测;标志物的联合检测虽然在一定程度上提高了CRC的检出率,但关于项目的组合难以达成共识。因此无创性CRC标志物在临床实践方面仍存在许多需要解决的问题。总的来说,目前用于检测CRC方法的灵敏度和特异性不够理想,检测操作繁琐和成本高仍然是亟待解决的问题。

参考文献

- [1] Tessmer MS, Anderson KC. AACR Cancer Progress Report 2016: Improving Lives Through Research [J]. Cancer Research, 2016, 22(19):4759.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2):115.
- [3] Gleditsch D, Søreide OK, Nesbakken amanaging malignant colorectal obstruction with self-expanding stents. A closer look at bowel perforations and failed procedures [J]. J Gastrointest Surg, 2016, 20(9):1643-1649.
- [4] Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2012, National Cancer Institute [EB/OL]. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012, 2016-06-27/2017-07-06.
- [5] Elsafi SH, Alqahtani NI, Zakary NY, et al. The sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios of fecal occult blood test for the detection of colorectal cancer in hospital settings [J]. Clin Exp Gastroenterol, 2015, 8:279-284.
- [6] Faivre J, Dancourt V, Lejeune C, et al. Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study [J]. Gastroenterology, 2004, 126(7):1674-1680.
- [7] Robinson MH, Pye G, Thomas WM, et al. Haemoccult screening for colorectal cancer: the effect of dietary restriction on compliance [J]. Eur J Surg Oncol, 1994, 20(5):545-548.
- [8] Hassan C, Giorgi RP, Camilloni L, et al. Meta-analysis: adherence to colorectal cancer screening and the detection rate for advanced neoplasia, according to the type of screening test [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 36(10):929-940.

- [9] Chen TH, Chang SW, Huang CC, et al. The prognostic significance of APC gene mutation and miR-21 expression in advanced - stage colorectal cancer [J]. *Colorectal Dis*, 2013, 15(11):1367-1374.
- [10] Sarasqueta AF, Forte G, Corver WE, et al. Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:277.
- [11] Algars A, Sundstrom J, Lintunen M, et al. EGFR gene copy number predicts response to anti - EGFR treatment in RAS wild type and RAS/BRAF/PIK3CA wild type metastatic colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(4):922-929.
- [12] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A. The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. *cell*, 2013, 155(2):462-477.
- [13] No authors listed. A stool DNA test (Cologuard) for colorectal cancer screening [J]. *Jama*, 2014, 312(23):2566.
- [14] 褚焱. 大肠癌基因筛查使者——记广州市康立明生物科技有限公司创始人邹鸿志[J]. *科学中国人*, 2016(12):47-49.
- [15] Lam K, Pan K, Linnekamp JF, et al. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: a systematic review [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1866(1):106-120.
- [16] Xue M, Lai SC, Xu ZP, et al. Noninvasive DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: a systematic review[J]. *J Dig Dis*, 2015, 16(12):699-712.
- [17] Hisabe T, Hirai F, Matsui T. Development and progression of colorectal cancer based on follow-up analysis[J]. *Dig Endosc*, 2014, 26(S2):73-77.
- [18] Arriba M, Garcia JL, Inglada-Perez L, et al. DNA copy number profiling reveals different patterns of chromosomal instability within colorectal cancer according to the age of onset[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(5):705-716.
- [19] Zhao Y, Ando K, Oki E, et al. Aberrations of BUBR1 and TP53 gene mutually associated with chromosomal instability in human colorectal cancer[J]. *Anti-cancer Res*, 2014, 34(10):5421-5427.
- [20] Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, et al. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: a review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 51:19-26.
- [21] Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator[J]. *Nat Med*, 1996, 2(6):630-631.
- [22] Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3):729-737.
- [23] Berger BM, Levin B, Hilsden RJ. Multitarget stool DNA for colorectal cancer screening: a review and commentary on the United States Preventive Services Draft Guidelines [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2016, 8(5):450-458.
- [24] Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(2):248-256, e25-e26.
- [25] Lidgard GP, Domanico MJ, Bruinsma JJ, et al. Clinical performance of an automated stool DNA assay for detection of colorectal neoplasia[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(10):1313-1318.
- [26] Berger BM, Schroy PR, Dinh TA. Screening for colorectal cancer using a multitarget stool DNA test: modeling the effect of the intertest interval on clinical effectiveness [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2016, 15(3):e65-e74.
- [27] Kim YC, Kim JH, Cheung DY, et al. The usefulness of a novel screening kit for colorectal cancer using the immunochromatographic fecal tumor M2 pyruvate kinase test[J]. *Gut Liver*, 2015, 9(5):641-648.
- [28] Turvill J, Aghahoseini A, Sivarajasingham N, et al. Faecal calprotectin in patients with suspected colorectal cancer: a diagnostic accuracy study [J]. *Br J Gen Pract*, 2016, 66(648):e499-e506.
- [29] Zhu Y, Xu A, Li J, et al. Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(2):259-264.
- [30] Flemer B, Lynch DB, Brown JM, et al. Tumour-associated and non - tumour - associated microbiota in colorectal cancer[J]. *Gut*, 2017, 66(4):633-643.
- [31] Mármol I, Sánchez-De-Diego C, Pradilla DA, et al. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1):33-38.
- [32] Li S, Konstantinov SR, Smits R, et al. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(1):18-30.
- [33] Behrouz SS, Hashemzadeh S, Mousavi AR, et al. Detection of aberrant methylated SEPT9 and NTRK3 genes in sporadic colorectal cancer patients as a potential diagnostic biomarker [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):5335-5343.
- [34] Song L, Yu H, Jia J, et al. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in

- colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 18(4):425-432.
- [35] Pedersen SK, Baker RT, Mcevoy A, et al. A two-gene blood test for methylated DNA sensitive for colorectal cancer [J]. *Plos One*, 2015, 10(4):e125041.
- [36] Zhu L, Fang J. The structure and clinical roles of microRNA in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology Research & Practice*, 2016, 2016:1360348.
- [37] Tsukamoto M, Iinuma H, Yagi T, et al. Circulating exosomal microRNA-21 as a biomarker in each tumor stage of colorectal cancer [J]. *Oncology*, 2017, 92(6):360-370.
- [38] Nguyen MT, Weinberg DS. Biomarkers in colorectal cancer screening [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2016, 14(8):1033-1040.
- [39] 汪毅, 袁伟, 马肖, 等. miR-152 在结直肠癌组织中的表达及其与预后的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(10):763-766.
- [40] Nagano Y, Toiyama Y, Okugawa Y, et al. MicroRNA-7 is associated with malignant potential and poor prognosis in human colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(12):6521-6526.
- [41] Lv H, Zhang Z, Wang Y, et al. MicroRNA-92a promotes colorectal cancer cell growth and migration by inhibiting KLF4 [J]. *Oncol Res*, 2016, 23(6):283-290.
- [42] Bai JW, Xue HZ, Zhang C. Down-regulation of microRNA-143 is associated with colorectal cancer progression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(22):4682-4687.
- [43] Zhang X, Xu J, Jiang T, et al. MicroRNA-195 suppresses colorectal cancer cells proliferation via targeting FGF2 and regulating Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(11):2631-2640.
- [44] Lu D, Yao Q, Zhan C, et al. MicroRNA-146a promote cell migration and invasion in human colorectal cancer via carboxypeptidase M/src-FAK pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):22674-22684.
- [45] Yu L, Lu Y, Han X, et al. microRNA-140-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ADAMTS5 and IGFBP5 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):180.
- [46] Wei R, Yang Q, Han B, et al. microRNA-375 inhibits colorectal cancer cells proliferation by downregulating JAK2/STAT3 and MAP3K8/ERK signaling pathways [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10):16633-16641.
- [47] Jiang H, Ju H, Zhang L, et al. microRNA-577 suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in colorectal cancer [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(6). Epub 2017 Feb 2.
- [48] Luo J, Qu J, Wu DK, et al. Long non-coding RNAs: a rising biotarget in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13):22187-22202.
- [49] Li Q, Dai Y, Wang F, et al. Differentially expressed long non-coding RNAs and the prognostic potential in colorectal cancer [J]. *Neoplasma*, 2016, 63(6):977-983.
- [50] Tan CR, Zhou L, El-Deiry WS. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in colorectal cancer: pros and cons [J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2016, 12(3):151-161.
- [51] Basnet S, Zhang ZY, Liao WQ, et al. The prognostic value of circulating cell-free DNA in colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *J Cancer*, 2016, 7(9):1105-1113.
- [52] Munakata K, Uemura M, Tanaka S, et al. Cancer stem-like properties in colorectal cancer cells with low proteasome activity [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(21):5277-5286.
- [53] Wahab SM, Islam F, Gopalan V, et al. The identifications and clinical implications of cancer stem cells in colorectal cancer [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2017, 16(2):93-102.
- [54] Nimptsch K, Aleksandrova K, Boeing H, et al. Association of CRP genetic variants with blood concentrations of C-reactive protein and colorectal cancer risk [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):1181-1192.
- [55] Stojkovic LM, Stankovic S, Stojkovic M, et al. Can preoperative CEA and CA19-9 serum concentrations suggest metastatic disease in colorectal cancer patients? [J]. *Hell J Nucl Med*, 2017, 20(1):41-45.
- [56] Zong S, Li H, Shi Q, et al. Prognostic significance of VEGF-C immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 458:106-114.
- [57] Kust D, Samija I, Kirac I, et al. Cytokeratin 20 positive cells in blood of colorectal cancer patients as an unfavorable prognostic marker [J]. *Acta Clin Belg*, 2016, 71(4):235-243.
- [58] Fung KY, Tabor B, Buckley MJ, et al. Blood-based protein biomarker panel for the detection of colorectal cancer [J]. *Plos One*, 2015, 10(3):e120425.
- [59] Melotte V, Yi JM, Lentjes MH, et al. Spectrin repeat containing nuclear envelope 1 and forkhead box protein E1 are promising markers for the detection of colorectal cancer in blood [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(2):157-164.

· 论 著 ·

GeXP 多重分析技术检测肝癌组织长链非编码 RNA 表达的实验研究

史俊英^{1,2} 王晔¹ 陈文³ 刘成玉² 牟晓峰^{1*}

[摘要] 目的 运用多重基因表达遗传分析系统(genomelab gene expression profiler, GeXP), 创建一种能同时检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)表达的一种多重逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测方法, 为 HCC 的诊断及预后提供一定的方法学基础。方法 检索并筛选 Pubmed 数据库中近 10 年发表的与 HCC 有关报道的 8 种 LncRNAs, 并分别设计特异性引物。首先验证引物及多重反应体系的特异性及灵敏性, 经过系统优化后建立一种多重 RT-PCR 检测方法。另检测 23 对 HCC 肿瘤组织和癌旁非肿瘤组织标本, 并用实时定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, qPCR)来验证检测体系并进行结果统计。结果 优化后的 GeXP 多重检测体系, 特异性及灵敏性良好。另在 23 对 HCC 肿瘤组织及癌旁组织中检测到了这 8 种 LncRNAs 的差异表达: 与癌旁组织相比, HCC 组织中 LncRNA *NEAT1*、*H19*、*MALAT1*、*HOTAIR*、*DANCR*、*UCA1*、*BCAR4* 的表达显著下降(P 均 <0.05); 肝癌组织中 LncRNA *GAS5* 的表达显著上升($P<0.05$)。qPCR 方法验证与 GeXP 方法结果一致。结论 应用 GeXP 多重分析技术成功建立了一种于单管中同时检测 HCC 组织 8 种 LncRNAs 表达的检测方法, 该方法有效、快捷、灵敏、特异, 对 HCC 的诊断及预后具有启示作用并奠定了一定的方法学基础。

[关键词] GeXP 系统; 多重 RT-PCR; qPCR; LncRNA; 肝细胞癌

Development of a GeXP-based multiplex RT-PCR assay for detection of long non-coding RNA in hepatocellular carcinoma

SHI Junying^{1,2}, WANG Ye¹, CHEN Wen³, LIU Chengyu², MU Xiaofeng^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shandong, China, 266042; 2. Clinical Laboratory Diagnostics, Medical Department of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China, 266021; 3. Department of Hyperbaric oxygen, the Second Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shandong, China, 266042)

[ABSTRACT] Objective To develop a genomelab gene expression profiler (GeXP)-based reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of long non-coding RNAs (LncRNAs) and to provide the methodology for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. Methods 8 kinds of LncRNAs related to hepatocellular carcinoma were selected from the Pubmed database during the last decade. The specific primers were designed using Primer Premier 5.0 software. The specificity and sensitivity of the GeXP multiplex RT-PCR assay were verified. 23 pairs of hepatocellular carcinoma and adjacent noncancerous tissues were further detected by the optimized GeXP multiplex RT-PCR assay, and

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81670822, 81370990)

作者单位: 1. 青岛大学第二临床医学院检验科, 山东, 青岛 266042

2. 青岛大学医学部临床检验诊断学, 山东, 青岛 266021

3. 青岛大学第二临床医学院高压氧科, 山东, 青岛 266042

*通讯作者: 牟晓峰, E-mail: yewangsd@163.com

quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to validate the results of the GeXP system. **Results** Optimized GeXP multiplex PCR assay could detect LncRNAs in hepatocellular carcinoma with perfect specificity and high sensitivity. The expression levels of LncRNA *NEAT1*, *H19*, *MALAT1*, *HOTAIR*, *DANCR*, *UCA1* and *BCAR4* were significantly decreased compared with that in adjacent noncancerous tissues (all $P < 0.05$). The expression level of LncRNA *GAS5* was significantly increased ($P < 0.05$). For the qPCR assay, 8 kinds of LncRNAs were detected as a result of the GeXP assay. **Conclusions** A method of multiple RT-PCR based on the GeXP system was established to successfully and simultaneously detect the expression of 8 kinds of LncRNAs in the same reaction tube. The GeXP-based multiplex RT-PCR assay can be used as an effective, fast, sensitive, and specific method and provides the methodology for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma.

[KEY WORDS] GeXP system; Multiple RT-PCR; qPCR; LncRNA; Hepatocellular carcinoma

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见的严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 其死亡率在所有癌症中居第二位^[1]。临床上诊断 HCC 的常用方法有血清学、细胞学、病理学及影像学, 但都有一定的局限性和漏检率^[2-3]。随着精准医疗的迅速发展, 高通量技术如各种基因芯片的研发为基因序列测定及发现新的融合基因提供了有利工具, 但是其过程繁琐、成本较高。因此, 积极探索有效的诊断及预后标志物是提高 HCC 患者总生存率和综合治疗水平的有效手段。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类转录本长度超过 200 nt 的无蛋白质编码功能的 RNA, 在转录及转录后调控、表观遗传调控等方面调控基因的表达水平^[4-5]。近期研究表明, 不同 LncRNAs 在 HCC 组织中差异表达, 有促进或抑制 HCC 发生发展的作用^[6], 为 HCC 进程及预后评估提供了有利靶点, 有望成为临床应用的新的肿瘤标志物。

GeXP 多重基因表达遗传分析系统是把 PCR 技术和毛细管电泳分离技术紧密结合在一起, 能在同一反应管中对多达 35 个基因同时进行定量检测和分析, 具有较好的特异性和灵敏度。其在个体化用药指导、疗效与预后评估和病原体鉴定等方面应用广泛^[7]。因此本研究基于 GeXP 多重基因表达分析系统, 建立一种同时在一个反应管中检测 8 种 LncRNAs 的检测方法, 用于探讨 LncRNA 是否可作为 HCC 的潜在标志物, 为其诊断及预后做出积极贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

收集青岛大学第二临床医学院 2015 年 7 月至 2016 年 12 月经影像学检查或病理组织学确诊且术

前未经过化疗、栓塞、射频等治疗的 HCC Ⅲ期手术切除标本 23 例, 并以癌旁非肿瘤肝组织作为对照, 其中男 13 例, 女 10 例, 年龄 46~68 岁, 中位年龄 54 岁。肝癌诊断及分期符合中国卫生部“原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)诊断标准”^[8]。本研究经青岛大学第二临床医学院伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

Trizol 试剂购自美国 Life Technologies 公司, 用于 RT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统试剂盒购自上海 Invitrogen 公司, GenomeLab GeXP 遗传分析仪、阳性 RNA 样品及耗材均购自美国贝克曼公司, 荧光定量 PCR 仪 7500 和梯度 PCR 仪 Veriti 购自美国 ABI 公司, 台式离心机 ST 8R 购自美国 Thermo 公司, 超微分光光度计 SMA 4000 购自北京凯奥公司。

1.3 LncRNA 基因与引物设计

检索并筛选出 Pubmed 数据库中近十年间发表的与肝癌有相关报道的 LncRNAs, 特异性引物设计采用 NCBI Primer Blast, Primer Premier 5.0 软件, 并在每对设计好的引物的 5' 端加入一段通用引物标签 (Tag), 并在上游标记荧光染料 Cy5 (如表 1 所示)。全部引物合成源于上海 Invitrogen 公司。

1.4 组织总 RNA 的提取

采用 Trizol 法分别提取 23 对 HCC 及癌旁组织总 RNA, 利用超微分光光度计测定总 RNA 的浓度及纯度, 样品合格后置于 -80℃ 保存备用。

1.5 单重 RT-PCR 法验证引物

将 8 种特异性上、下游引物浓度分别稀释至工作浓度 1 μmol/L, 阳性 RNA 样品稀释至工作浓度 5 ng/μL。以阳性 RNA 样品 25 ng 作为反应模板量, 加入终浓度 1 μmol/L 的单下游引物 2 μL, 按照上海

表1 8种LncRNAs引物序列及片段大小

Table 1 Primer sequences and fragment sizes of 8 kinds of LncRNAs

LncRNA	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)
GAS5	上游:AGGTGACACTATAGAATATGTCCCCAAGGAAGGATGAG	157
	下游:GTACGACTCACTATAGGGAGGCAAGTTGGACTCCACCAT	
NEAT1	上游:AGGTGACACTATAGAATATGTGATTTTTTCAGGAGCTGGAA	167
	下游:GTACGACTCACTATAGGGAGACAAATGAGGAACAAATCCAGAA	
H19	上游:AGGTGACACTATAGAATAGCTCCCAGAACCCACAACAT	187
	下游:GTACGACTCACTATAGGGAACCTTCCAGAGCCGATTCTT	
MALAT1	上游:AGGTGACACTATAGAATACATTCCAAACAAGCAACAGTCTTC	197
	下游:GTACGACTCACTATAGGGATGTCCCCAAGGAAGGATGAG	
HOTAIR	上游:AGGTGACACTATAGAATAAGCCCTAGCCTTTGGAAGCT	207
	下游:GTACGACTCACTATAGGGAACCCATGTGTCTCAAGATGCATT	
DANCR	上游:AGGTGACACTATAGAATAAACTACAGGCACAAGCCATTGA	227
	下游:GTACGACTCACTATAGGGACTGTTGCCACCAGCATTGTC	
UCA1	上游:AGGTGACACTATAGAATAACGCAGTCCCTGGTCACACT	237
	下游:GTACGACTCACTATAGGGAGGCCACCTGGACGGATATG	
BCAR4	上游:AGGTGACACTATAGAATATCGACTGTGATTCTGGGACTCA	247
	下游:GTACGACTCACTATAGGGATCCTTGGAGACTTCCGCTTTT	

Invitrogen 公司用于 RT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统试剂盒操作说明书操作来制备 cDNA,并于 -20℃ 保存备用。然后建立 10 μL 的 PCR 反应体系,依次加入以下试剂: MgCl₂ 2 μL, 5×PCR buffer 2 μL, 单上游引物 1 μL, DNA 聚合酶 0.35 μL, cDNA 4.65 μL。混合均匀后,根据 PCR 结果对反应条件进行优化,最终确定反应条件为: 95℃ 10 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 70℃ 1 min, 35 个循环。随后,在 GeXP 样品板中加入 40 μL/孔的 SLS/DSS (80:1) 混合液,再加入 PCR 产物 1 μL,震荡混匀 10 s,加石蜡油覆盖样品。GeXP 上机操作过程谨遵 GeXP 系统软件说明书进行。

1.6 多重反应体系特异性验证

将 8 种单个上、下游引物分别取等量进行混合,配制成多重混合引物,使其工作浓度为 2 μmol/L,并在多重反应体系中终浓度为 200 nmol/L,余下各成分均同单重 RT-PCR。

1.7 多重反应体系灵敏性验证

以 23 对组织标本提取的总 RNA 及阳性 RNA 样品分别取等量配制成混合模板并梯度稀释至 10⁴、10³、10²、10¹ 拷贝/μL,分别取 2 μL 做模板,其余反应条件及程序不变,检测多重反应体系的灵敏度。

1.8 GeXP 多重 RT-PCR 体系对临床标本的检测

用已优化好的反应体系分别对 23 对组织标本进行检测,以总 RNA 均为 2 μg 作为反应模板量

进行多重 RT-PCR 检测,GeXP 系统各基因的表达水平由软件自行分析并导出计算。

1.9 qPCR 验证

严格按照用于 RT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统试剂盒来制备 cDNA。然后在 96 孔板中建立 10 μL 反应体系,依次加入以下试剂: 10 μmol/L 的上、下游单引物各 0.5 μL, 2×Mastermix 5 μL, 10 倍稀释的 cDNA 4 μL。最终确定 PCR 反应条件为: 95℃ 3 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 此处收集荧光信号(40 个循环)。以 GAPDH 作为反应内参,采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算肝癌及癌旁组织中各 LncRNA 基因相对表达水平。

1.10 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示定量资料。采用配对样本 t 检验进行统计学分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

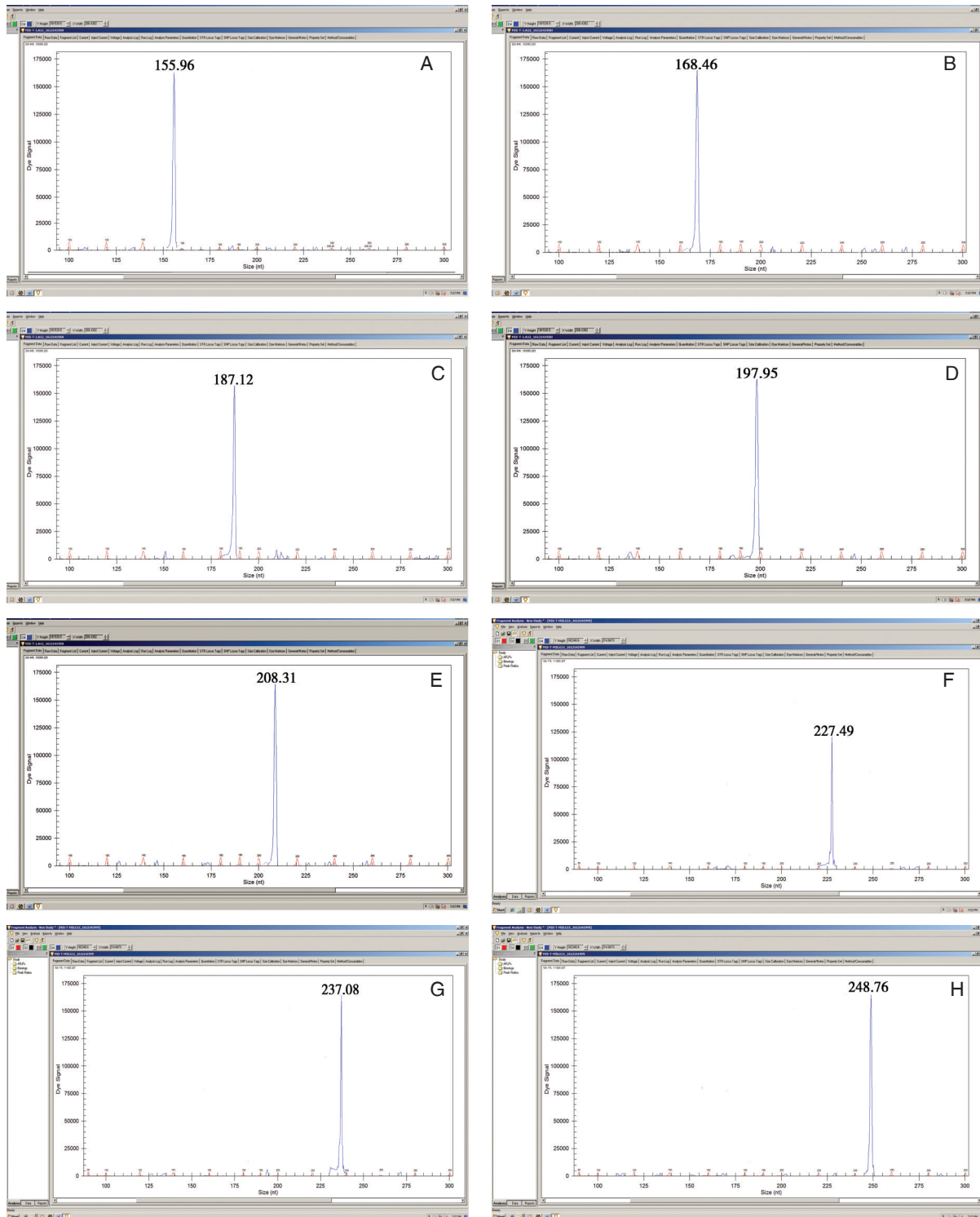
2 结果

2.1 GeXP 系统引物特异性验证结果

单重 PCR 产物经 GeXP 系统分析仪分析后,各靶基因扩增片段分别在如下区间出现扩增产物: GAS5: 155.11~157.90 bp; NEAT1: 165.21~168.67 bp; H19: 186.47~189.81 bp; MALAT1: 196.68~199.64 bp; HOTAIR: 205.33~208.77 bp; DANCR: 226.05~228.98 bp; UCA1: 236.75~238.58 bp; BCAR4:

246.57~248.97 bp。实际扩增片段和理论片段大小有±2 bp 的差异不影响对结果的判断,因此这8种 LncRNAs 扩增片段大小与设计相符。多重

RT-PCR 中可扩增出各引物的特异性片段,无交叉反应,提示该方法引物特异性良好,可根据片段大小来区分这8种 LncRNAs (图1)。



横坐标表示经 GeXP 系统分析后的片段大小(bp),纵坐标表示荧光信号强度的大小。其中,A-H 分别代表 GAS5, NEAT1, H19, MALAT1, HOTAIR, DANCR, UCA1, BCAR4 8种 LncRNAs 所对应的片段大小。

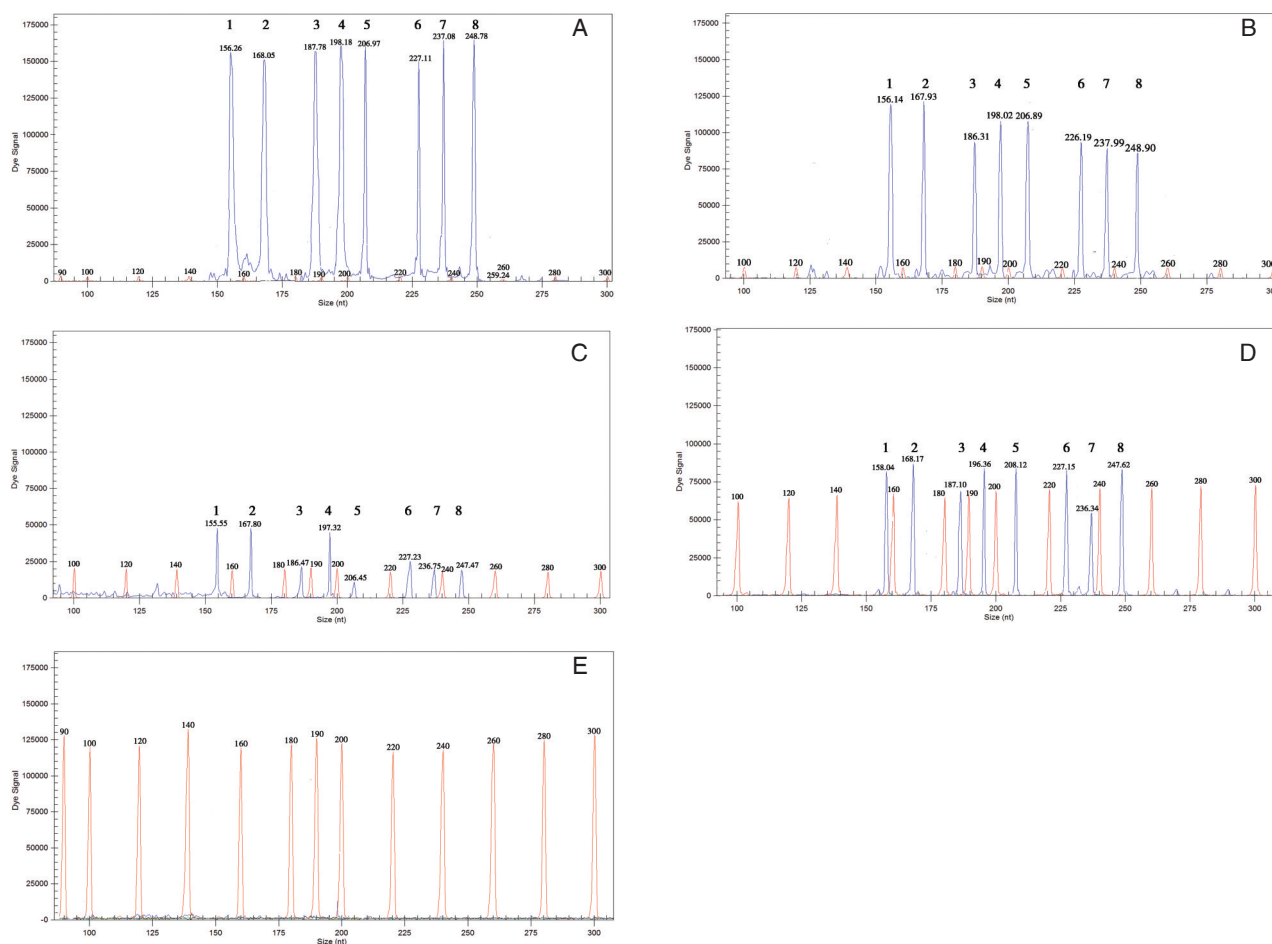
图1 GeXP 多重 RT-PCR 体系特异性分析

Figure 1 The specificity analysis of GeXP multiplex RT-PCR system

2.2 多重反应体系灵敏度验证结果

优化反应条件后,多重检测体系可在 10^4 、 10^3 、

10^2 、 10^1 拷贝/ μL 水平同时检测出混合模板的 8 种 LncRNAs,证实灵敏度良好(图 2)。



GeXP 多重检测体系可以对混合模板梯度稀释在 10^4 拷贝/ μL (A)、 10^3 拷贝/ μL (B)、 10^2 拷贝/ μL (C)、 10^1 拷贝/ μL (D) 同时进行检测。图 E 为用 DEPC 水作为阴性质控结果。其中 1~8 分别代表 *GAS5*、*NEAT1*、*H19*、*MALAT1*、*HOTAIR*、*DANCR*、*UCA1*、*BCAR4* 8 种 LncRNAs 所对应的片段大小。

图 2 GeXP 多重 RT-PCR 体系灵敏度分析

Figure 2 The sensitivity analysis of GeXP multiplex RT-PCR system

2.3 GeXP 多重分析技术对临床标本的检测结果

由表 2 可见,利用 GeXP 多重分析技术分别在 23 对肝癌和癌旁组织中检测出了 8 种 LncRNAs 的差异表达。与癌旁对照组比较,肝癌组织中 *NEAT1*、*H19*、*MALAT1*、*HOTAIR*、*DANCR*、*UCA1*、*BCAR4* 的表达量显著下降(P 均 <0.05); LncRNA *GAS5* 的表达量显著上升($P < 0.05$)。

2.4 qPCR 对临床标本的检测结果

由图 3 可知,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算 HCC 及癌旁组织中 8 种 LncRNAs 基因相对表达水平。与癌旁组织比较,HCC 组织中 *NEAT1*、

H19、*MALAT1*、*HOTAIR*、*DANCR*、*UCA1*、*BCAR4* 的相对表达量显著下降(t 值分别为 -2.253 、 -2.185 、 -2.385 、 -2.759 、 -2.448 、 -2.097 、 -2.148 , P 均 <0.05); 肝癌组织中 LncRNA *GAS5* 的相对表达量显著上升(t 值为 2.450 , $P < 0.05$)。qPCR 结果与 GeXP 多重 RT-PCR 结果相符。

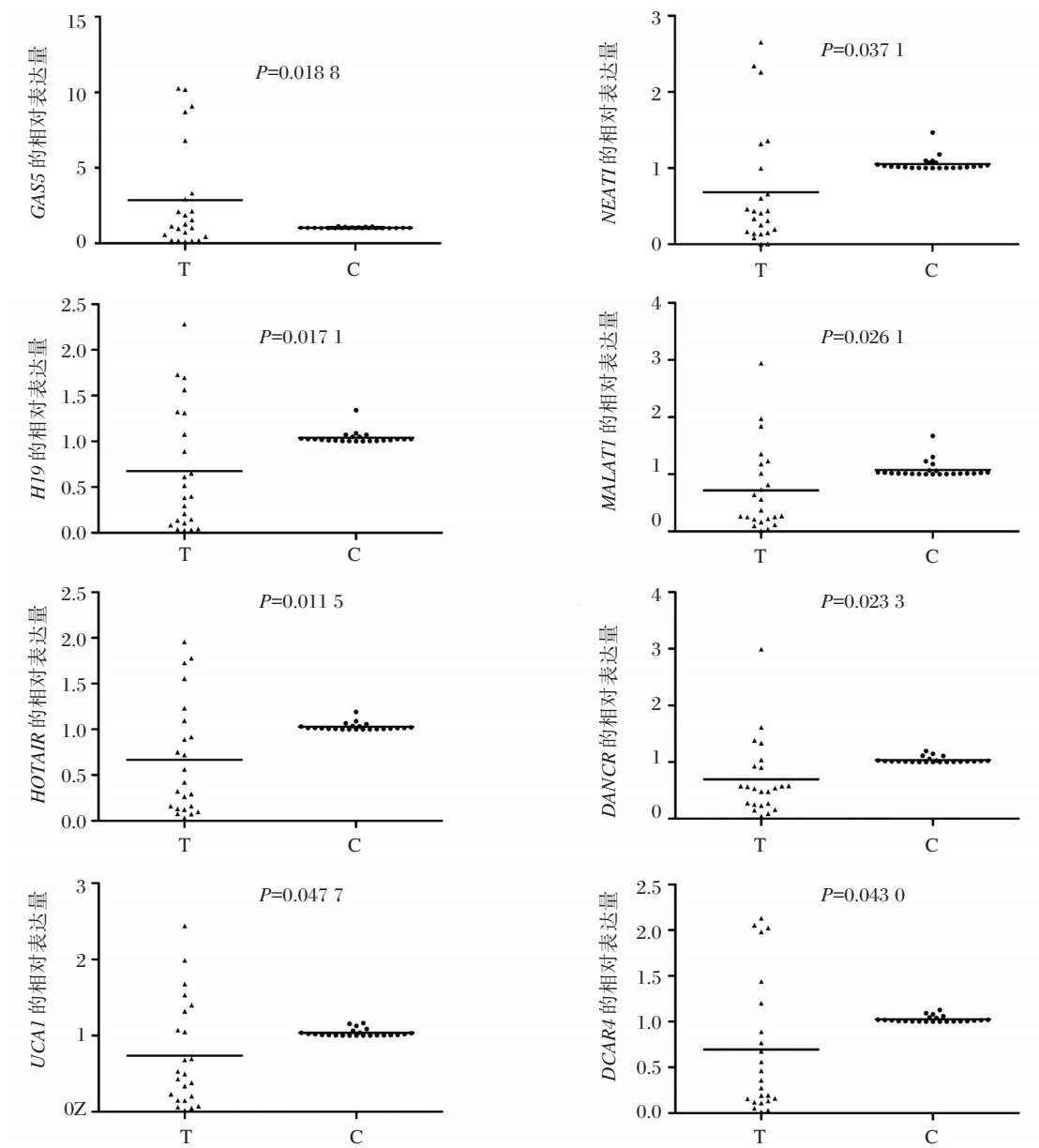
3 讨论

HCC 起病隐匿,早诊率低,大多数患者在确诊时已属晚期或者发生远处转移,错过手术或治疗最佳时机。甲胎蛋白作为传统的血清学诊断之

表2 GeXP实验对8种LncRNAs表达水平的检测($n=23, \bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression level of 8 kinds of LncRNAs detected in GeXP assay ($n=23, \bar{x} \pm s$)

LncRNA	肝癌	癌旁	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>GAS5</i>	99 501.00±50 438.65	57 706.00±42 940.10	3.714	0.001
<i>NEAT1</i>	55 381.78±2 549.70	65 622.74±22 641.08	-2.394	0.026
<i>H19</i>	17 958.48±6 166.25	29 035.74±15 102.35	-3.163	0.005
<i>MALAT1</i>	76 486.91±18 072.57	97 046.50±24 958.21	-3.661	0.001
<i>HOTAIR</i>	32 342.13±1 678.59	43 280.78±23 778.05	-2.257	0.034
<i>DANCR</i>	19 897.61±12 239.23	28 290.87±12 877.85	-2.467	0.022
<i>UCA1</i>	22 168.57±11 317.70	33 425.65±12 097.59	-3.490	0.002
<i>BCAR4</i>	27 717.39±15 351.01	35 647.65±10 604.61	-2.271	0.033



T:肝癌组织; C:癌旁组织。

图3 qPCR检测对23对临床标本中8种LncRNAs的相对表达量

Figure 3 The relative expression of 8 LncRNAs in 23 pairs of clinical specimens was detected in qPCR

一,广泛应用于临床,但灵敏性及特异性受限,而且在一些肝炎、肝硬化、妊娠女性中其含量也会升高^[3]。虽然有新的标志物被陆续发现并应用于临床(如:高尔基体蛋白、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、热休克蛋白等),但其都属于蛋白水平的检测,影响因素较多。高通量技术过程繁琐而且价格昂贵,外周血循环肿瘤细胞检测所用血量有限且早诊率低。GeXP多重RT-PCR技术可同时对多个基因进行定量检测和分析,特异性和灵敏度良好,在个体化用药指导、疗效及预后评估、遗传病及癌基因的分型鉴定等方面应用广泛^[7],为肿瘤的诊断、分型及预后评估方面具有重要的临床价值。

LncRNA是哺乳动物转录组的一个重要组成部分,影响基因的表达水平,调控细胞的增殖、转移和预后进程^[9]。有研究报道,*GAS5*在大多数晚期肝癌组织中表达下降^[10],而*NEAT1*在肝癌组织中表达上升,与肿瘤结节的数量、远处转移、血管侵犯等相关^[11]。LncRNA *H19*是一类由印迹基因编码,在胚胎发育期高表达,出生后大多数组织中低表达的LncRNA^[12],在胃癌、膀胱癌等肿瘤中发挥癌基因的作用,在肝癌和前列腺癌中却发挥抑癌基因的作用,其低表达与肝癌的不良预后呈正相关^[13]。*MALAT-1*是在转移性非小细胞肺癌中利用减除杂交法第一次鉴定到的另一种LncRNA^[14],可以预测肝移植后肝癌的复发和无病生存期的长短^[15]。*HOTAIR*是第一个以反式转录调控方式对靶基因进行调控的LncRNA,是判断肝癌患者瘤体的大小和复发的生物指标^[16],且高表达的*HOTAIR*与肝癌的分化、转移及早期复发密切相关^[17-18]。Yuan等^[19]最早在肝癌中发现*DANCR*,其在干细胞样HCC细胞中过表达,并且可作为HCC患者的预后生物标志物。Wang等^[20]首先在膀胱癌中检出高表达的LncRNA *UCA1*,后来Wang等发现*UCA1*在HCC组织中的表达显著上调,并且与TNM分期、转移和术后生存期相关^[21]。*BCAR4*首先在乳腺癌的耐药过程中被发现^[22],最新研究发现非小细胞肺癌患者*BCAR4*水平高表达者,其预后较差^[23]。总之,LncRNA在包括HCC的各种肿瘤进程中扮演着重要作用,对于差异表达的LncRNAs,进一步可以用siRNAs干涉或导入过表达载体后检测其基因表达,以确证基因调节通路,为HCC的治疗提供一种潜在的治疗措施。

利用GeXP多重基因表达遗传分析系统,Zeng等^[24]建立了一种同时检测8种免疫抑制性鸡病毒的方法,Wang等^[25]对患社区获得性肺炎的住院儿童合并感染的多种病毒进行检测,为儿科病毒感染的检测提供了有利工具。本研究建立了一种能同时检测人HCC相关的8种LncRNAs的方法,与qPCR方法比较,所需时间短,可以在单管中快速、高效地对1 ng~5 μg的总RNA做出检测并且灵敏度及特异性良好。但本方法与何玢等^[26]的研究均存在人为误差、小的杂峰等不足之处,但一般不会影响对结果的判定。此外,RNA不稳定易降解,需要操作人员认真操作,妥善保存样本及试剂并避免反复冻融。另外,本研究所采取标本均为肝癌Ⅲ期手术标本,由于个体差异和标本量的局限性,各LncRNAs的表达量差异较大,仍需大量的临床标本进一步验证反应体系及统计临床结果。总之,本研究建立的GeXP多重检测体系可以作为一种有效、快捷且特异的检测与HCC有关的LncRNAs的新方法,为HCC的诊断及预后奠定了一定的方法学基础。

参考文献

- [1] Au JS, Frenette CT. Management of hepatocellular carcinoma: current status and future directions [J]. Gut Liver, 2015, 9(4):437-448.
- [2] 祝普利,尹超,冯建龙,等.原发性肝癌综合治疗进展[J].临床肝胆病杂志,2015,31(6):965-968.
- [3] 王丹霞,全文婕,史晓欣,等.癌早期诊断标志物及其检测方法的研究进展[J].肿瘤药学,2016,6(1):15-20.
- [4] 赵睿,王启之.肝癌诊断的肿瘤标志物研究进展[J].国际消化病杂志,2013,33(1):29-31.
- [5] Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, et al. Long non-coding RNAs and the genetics of cancer [J]. Br J Cancer, 2013, 108(12):2419-2425.
- [6] Li J, Meng H, Bai Y, et al. Regulation of LncRNA and its role in cancer metastasis [J]. Oncol Res, 2016, 23(5):205-217.
- [7] 张寒,郑胡镛.一种新型多重PCR技术在肿瘤研究中的应用[J].转化医学研究(电子版),2014,4(3):48-57.
- [8] 中华人民共和国卫生部.原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(10):929-946.
- [9] Shi X, Sun M, Liu H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human disease [J]. Cancer

- lett, 2013, 339(2):159-166.
- [10] Tu ZQ, Li RJ, Mei JZ, et al. Down-regulation of long non-coding RNA GAS5 is associated with the prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7):4303-4309.
- [11] Guo S, Chen W, Luo Y, et al. Clinical implication of long non-coding RNA NEAT1 expression in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 8(5):5395-5402.
- [12] Feil R, Walter J, Allen N D, et al. Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *Igf2* and *H19* genes [J]. *Development*, 1994, 120(10):2933-2943.
- [13] Zhang L, Yang F, Yuan JH, et al. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3):577-586.
- [14] Lin R, Maeda S, Liu C, et al. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas [J]. *Oncogene*, 2007, 26(6):851-858.
- [15] Lai MC, Yang Z, Zhou L, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3):1810-1816.
- [16] Yang Z, Zhou L, Wu LM, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation [J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(5):1243-1250.
- [17] Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, et al. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3):946-950.
- [18] Svoboda M, Slysokova J, Schneiderova M, et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(7):1510-1515.
- [19] Yuan SX, Wang J, Yang F, et al. Long noncoding RNA DANCR increases stemness features of hepatocellular carcinoma by derepression of CTNNB1 [J]. *Hepatology*, 2015, 63(2):499-511.
- [20] Wang XS, Zhang Z, Wang HC, et al. Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(16):4851-1858.
- [21] Wang F, Ying HQ, He BS, et al. Upregulated lncRNA-UCA1 contributes progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10):7899-7917.
- [22] Godinho MF, Sieuwerts AM, Look MP, et al. Relevance of BCAR4 in tamoxifen resistance and tumour aggressiveness of human breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(8):1284-1291.
- [23] Gong J, Zhang H, He L, et al. Increased Expression of long non-coding RNA BCAR4 is predictive of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 241(1):29-34.
- [24] Zeng T, Xie Z, Xie L, et al. Simultaneous detection of eight immunosuppressive chicken viruses using a GeXP analyser-based multiplex PCR assay [J]. *Virology*, 2015, 12:226.
- [25] Wang L, Zhao M, Shi Z, et al. A GeXP-based assay for simultaneous detection of multiple viruses in hospitalized children with community acquired pneumonia [J]. *PloS one*, 2016, 11(9):e0162411.
- [26] 何玢, 王环宇, 张晨, 等. 8种脑炎相关虫媒病毒 GeXP 检测方法的初步建立 [J]. *病毒学报*, 2012, 28(1):57-62.

· 论 著 ·

红河州 HIV/HCV 合并感染者 HCV 基因亚型多样性及种系进化研究

杨兰辉^{1*} 陈梅² 霍松² 马兴丽¹ 李琼芬¹

[摘要] **目的** 探讨云南省红河州地区 HIV/HCV 合并感染者 HCV 基因亚型多样性及种系进化情况,为本地区 HIV/HCV 合并感染者合理的抗病毒治疗提供科学依据,同时监测该类患者体内的 HCV 是否存在遗传进化的新变异。**方法** 扩增 55 名红河州内 HIV/HCV 合并感染的 HCV 病毒载量阳性的丙型肝炎患者 C/E1 和 NS5B 2 个基因位点,通过测序分析和种系进化分析以明确研究对象所感染的 HCV 病毒的基因型和亚型。**结果** 综合 2 个外显子序列分析,结果显示红河州 HIV/HCV 合并感染患者的 HCV 以 3b 亚型最多见(40.0%),其次是 3a(20.0%)、6a(16.4%)、6n(12.7%)、1b(9.1%)、双重感染(1.8%)。课题组做本地区 HCV 基因亚型遗传进化分析时发现红河州地区流行的 6a 亚型毒株序列均与越南的 HCV 6a 亚型毒株的参考序列丛集。**结论** HCV 6a 亚型是越南和红河州内静脉吸毒人群(intravenous drug uses, IDUs)中高流行的病毒亚型,由于与越南接壤,红河州可能是 HCV 6a 亚型通过静脉吸毒途径由越南传入中国流行的一个传入点,进而再传入昆明或中国的其它地区。

[关键词] 丙型肝炎;基因型;基因亚型;种系进化分析

Genotypes diversity and phylogenetic analysis of HCV in HIV/HCV co-infection patients in Honghe

YANG Lanhui^{1*}, CHEN Mei², HUO Song², MA Xingli¹, LI Qiongfen¹

(1. Laboratory of Precision Medicine Diagnosis Center, the First People's Hospital of Honghe, Mengzi, Yunnan, China, 661199; 2. Department of Infectious Diseases, the First People's Hospital of Honghe, Mengzi, Yunnan, China, 661199)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the diversity of HCV genotype and phylogenesis in HIV/HCV co-infection patients in Honghe of Yunnan province. On one hand, it will provide reasonable therapy for the patients; on the other hand, we can supervise new variants of HCV in this area. **Methods** 55 HIV/HCV co-infection patients, who tested sero-positive and HCV-RNA positive, were recruited into this study. 2 regions of HCV gene, C/E1 and NS5B were PCR - amplified, sequenced and phylogenetically analyzed. **Results** Sequencing results of the 2 coding regions showed that subtype 3b was the most predominant (40.0%), followed by 3a (20.0%), 6a (16.4%), 6n (12.7%), 1b (9.1%), and lastly dual-infection (1.8%). Phylogentic analysis showed that subtype 6a strain from Honghe was clustered with reference sequence from Vietnam. **Conclusion** HCV 6a is a high prevalent subtype in intravenous drug users (IDUs) both in Vietnam and Honghe. Due to bordering Vietnam, Honghe might be one of the dissemination entrance points of HCV subtype 6a from Vietnam to China with the main transmission route of IDU.

[KEY WORDS] Hepatitis C; Genotype; Subtype; Phylogenetic analysis

基金项目:红河州第一人民医院院内基金(KY201409)

作者单位:1.红河州第一人民医院精准医疗诊断中心,云南,蒙自 661199

2.红河州第一人民医院感染科,云南,蒙自 661199

*通讯作者:杨兰辉, E-mail:1091549929@qq.com

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是全球导致慢性肝炎、肝硬化和肝细胞肝癌发病的一个主要致病因素。据统计, HCV病毒感染致肝硬化和肝细胞肝癌的比例分别为27%和25%^[1]。由于依赖RNA的RNA聚合酶复制具有高错误率的特点, HCV病毒变异频繁。因此, 至今为止尚未研发出有效的预防性疫苗^[2]。一方面HCV自身突变率高, 另一方面机体感染HCV后, 在宿主免疫系统免疫防御反应以及抗病毒药物筛选的双重压力作用下, 目前已驱使HCV进化成为7个不同基因型和超过67个亚型^[3]。基因型1~3型呈全球范围内分布^[4]。HCV 1a和1b亚型是流行于美国、欧洲、日本和中国中部地区最常见的基因亚型。2a和2b亚型约占全球HCV亚型的10%~30%, 主要流行于北美、欧洲和日本地区, 2c亚型发现于意大利北部^[5-9]。基因型3型普遍流行于南亚一些国家和中国的南方地区。不同国家分布的基因亚型也不尽相同^[8-9]。HCV 3a亚型还主要流行于欧洲和美国的静脉吸毒人群(intravenous drug users, IDUs)中^[10]。基因型4分布于北非和地中海东部的一些国家^[4, 11]。基因型5在南非地区普遍流行^[12]。基因型6主要流行于东南亚的一些国家和中国的西南部^[8, 13]。一般而言, HCV基因型6在各基因型中表现出更高的多样性。到目前为止, 基因型6包含24个(6a~6xa)已知亚型和一些暂未命名的新变种亚型。基因型7在刚果的一名移民中首次报道^[14]。就中国范围内而言, 1b和2a亚型主要分布在中国的中部地区。1b主要在中国的南方流行, 而2a主要在中国的北方流行^[6, 15]。然而在中国的西南地区, 基因型3和6型是最常见的基因型^[16-17]。此外, 越接近南亚国家的省份地区, 6a亚型的流行率越高^[11, 16, 18]。

HCV表现出非常高的遗传多样性, 这种多样性可对临床产生不同的影响和结局。虽然不同的亚型并未在病毒的毒力和致病力方面显示出明显的差异性, 但是不同基因型可引起病毒对于干扰素和利巴韦林联合治疗的反应性不同。明确HCV基因型对丙型肝炎患者选取合理的治疗方案是十分必要的^[19]。红河州位于中国偏远的西南地区, 和越南接壤, 有许多少数民族在红河世居。由于靠近毒品的集散地“金三角”, 该地区静脉吸毒率较高, 因此丙型肝炎和艾滋病的发病率在全国范围内也相对较高。本研究旨在通过扩

增HCV的C/E1和NS5B 2个外显子, 运用测序分析和遗传进化分析, 明确红河州地区HIV/HCV合并感染者HCV病毒基因型和亚型的流行及遗传进化情况。一方面为本地区该类患者合理的抗病毒治疗提供科学依据, 另一方面, 同时监测该类患者体内的HCV是否存在遗传进化的新变异。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象为2014年1月至2014年11月到红河州第一人民医院就诊的55名HCV-RNA检测呈阳性的HIV/HCV合并感染的患者。诊断标准为丙型肝炎诊断标准(WS 213-2008)^[20]。其中男性39名, 年龄范围30~51岁, 年龄(39.4±5.1)岁; 女性16名, 年龄范围29~48岁, 年龄(39.2±5.4)岁。其中IDU感染42例, 异性感染12例以及感染途径不详1例。

1.2 核酸提取及逆转录

患者血样离心后取200 μL血清, 按照操作指南指示在天隆核酸自动提取仪(西安天隆科技有限公司 DP968)上完成病毒核酸的提取。其中取20 μL核酸模板应用逆转录PCR技术检测样品HCV-RNA载量, 病毒载量 $>1 \times 10^3$ 的样本入选本组研究。取5 μL入选样本RNA模板应用Omega M-MLV First Strand Kit(Omega, 美国), 逆转录为cDNA。体系为: random 6 mers(50 μmol/L)1 μL, dNTP mix(10 mmol/L)1 μL, 加Nuclease-Free Water至18 μL, 之后70℃温浴5 min, 置于冰上2 min, 再往体系中加入5×RT Buffer 5 μL, M-MLV Reverse Transcriptase 1 μL, RNase Inhibitor(40 U/μL)1 μL, 轻轻混匀, 37℃温浴60 min完成逆转录。逆转录合成的cDNA放于-20℃冰箱冻存以备后用。

1.3 PCR扩增

采用巢式PCR扩增2个外显子位点Core/E1(C/E1)和NS5B。参照文献^[21]合成4对引物(引物序列见表1)。C/E1内套扩增片段为468 bp; NS5B内套为388 bp。PCR反应体系总体积50 μL: 10×PCR buffer 5 μL, dNTPs(各2.5 mmol/L)4 μL, TaKaRa Ex Taq 0.25 μL(5 U/μL), 1 U TaKaRa Ex Taq HS DNA Polymerase, 上下游引物各1 μL, cDNA 1 μL, 加水至50 μL。扩增程序分别为: 95℃预

变性 10 min; 95℃ 变性 1 min, 48℃ (C/E1)/50℃ (NS5B) 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min 完成扩增反应。每次扩增均

带入阴性和阳性对照。PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 经溴乙锭染色后用紫外成像系统进行观察。

表 1 C/E1 和 NS5B 的引物序列
Table 1 Primers of C/E1 and NS5B

基因	序列	位置	片段大小(bp)
C/E1 外套	上游引物: 5'-GCAACAGGGAAAYTDCCYGGTTGCTC-3'	834~859	493
	下游引物: 5'-GTRGGNGACCARTTCATCATCA-3'	1 306~1 327	
C/E1 内套	上游引物: 5'-TDCCCGGTTGCTCTTTYTCTAT-3'	847~868	468
	下游引物: 5'-TTCATCATCATGTCCCAGGCCAT-3'	1 293~1 315	
NS5B 外套	上游引物: 5'-CCHATGGGGTTYTCCTAI'GACACCAG-3'	8 241~8 266	406
	下游引物: 5'-GGNGCYGAGTAYCTGGTCATGGC-3'	8 625~8 647	
NS5B 内套	上游引物: 5'-TTCTCRTATGAYACCCGCTGYTTTGA-3'	8 250~8 275	388
	下游引物: 5'-TACCTVGTGCATAGCCTCCGTGAA-3'	8 616~8 638	

1.4 DNA 测序和种系进化分析

对经电泳鉴定显示有目的片段的产物进行双向测序分析(上海英骏生物技术有限公司)。测序结果与丙型肝炎数据库数据(http://hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html)进行比对, 初步确定样品 HCV 感染亚型并应用 MEGA6 进行样本种系进化分析, 并与 HCV 数据库中各亚型参考序列比对, 使用 Neighbor-Joining 方法 Kimura 2-parameter 模型构建种系进化树, 确定基因分型。

1.5 统计学分析

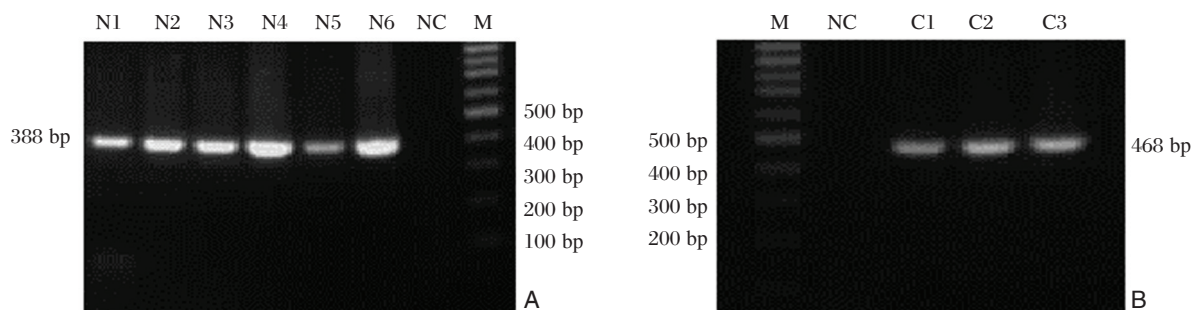
应用 SPSS 17.0 版统计学软件处理实验数

据。Pearson χ^2 检验或确切概率法用于确定在不同分组中 HCV 基因型和亚型分布比例之间的差异性分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 基因扩增

2 个扩增位点分别为 C/E1 和 NS5B。55 例 HCV 样品进行 PCR 扩增, NS5B 扩增成功率是 92.7%, C/E1 扩增成功率为 94.5%。PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳成像结果见图 1A 和图 1B。扩增产物基因测序曲线图见图 2A 和图 2B。



N1~N6: NS5B 内套扩增产物, 片段大小 388 bp; C1~C3: C/E1 内套扩增产物, 片段大小 468 bp; NC: 阴性对照; M: 100 bp Marker。

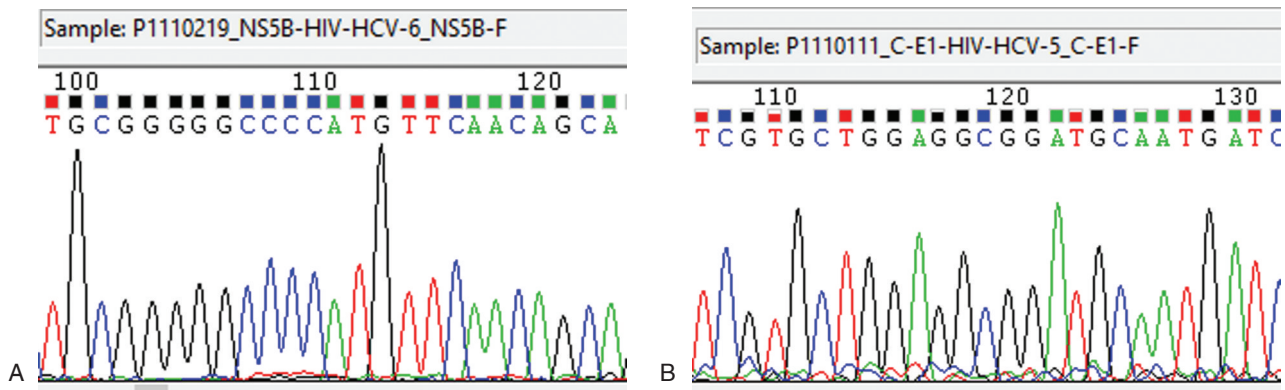
图 1 代表样品扩增产物电泳图

Figure 1 AGE results of amplification products

2.2 红河州地区 HIV/HCV 合并感染者 HCV 基因型及亚型多样性的分布情况

将扩增成功的 NS5B 和 C/E1 产物进行测序分

析, 初步判断样品 HCV 基因型及亚型的结果。综合 2 个外显子区域的比对结果, 红河州地区 HIV/HCV 合并感染者的 HCV 基因型及亚型分布情况见表 2。



A: NS5B 内套产物测序截图; B: C/E1 内套产物测序截图。

图2 代表样品扩增产物测序图

Figure 2 Sequencing results of amplification products

表2 红河州 HIV/HCV 合并感染者 HCV 基因型和亚型的流行情况 [n(%)]

Table 2 HCV genotypes and subtypes distribution of patient with HIV/HCV co-infection in Honghe [n(%)]

特征	基因亚型						合计
	1b	3a	3b	6n	6a	双重感染	
感染途径							
静脉吸毒	2(4.8)	7(16.6)	18(42.9)	6(14.3)	8(19.0)	1(2.4)	42
异性感染	2(16.8)	4(33.3)	4(33.3)	1(8.3)	1(8.3)		12
不详	1(100.0)						1
合计	5(9.1)	11(20.0)	22(40.0)	7(12.7)	9(16.4)	1(1.8)	55

1b、3a、3b、6n、6a 亚型的 χ^2 值分别为 1.929、1.598、0.351、0.290、0.771, P 均 > 0.05 ; 课题组中 HCV 各亚型在 IDU 感染组和异性感染组中的分布比例未见统计学差异。

如表 2 所示,在不同的感染途径组内,均发现 3 个基因型(1、3 和 6 型)和 5 个亚型(1b、3a、3b、6a 和 6n)。IDU 组和异性感染组之间各亚型的分布比例略有不同,可以看到 6a、6n 在 IDU 组的分布比例高于异性感染组,但是也许由于异性感染组病例相对较少的原因,HCV 不同基因亚型的分布比例在不同感染组间比较未见统计学差异($P>0.05$)。

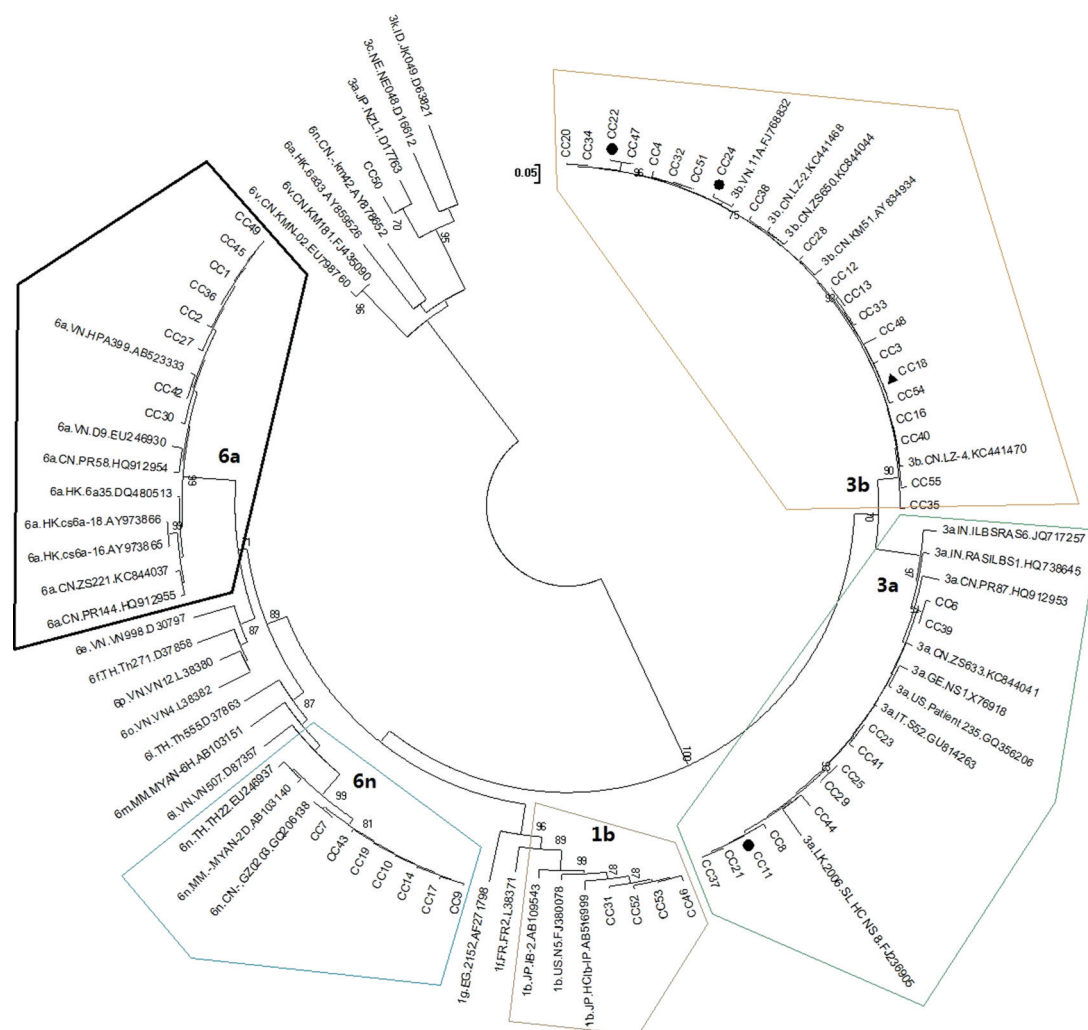
2.3 NS5B 和 C/E1 的种系进化分析

基于 NS5B 和 C/E1 的种系进化分析,如图 3 和图 4 所示,红河州地区 HIV/HCV 合并感染患者中流行的 HCV 基因型和亚型分布是大致吻合的,主要流行 3 个基因型(3、6 和 1 型)和 5 个亚型(3b、6n、3a、6a 和 1b)。当然也有部分不吻合的情况,首先在 NS5B 种系进化树图(图 3)中,18 号样品(CC18)为 3b 亚型;而在 C/E1 种系进化树图(图 4)中,它们却与 6a 亚型丛集在一起,且展支持率和核苷酸相似度均较高(图 3、图 4,标注▲)。其次,对于只有单个

外显子扩增成功的样本而言,如图 3 所示,依据高的展支持率和高核苷酸相似度,样品 11、22 和 24 号(CC11、CC22 和 CC24)分别认定为 3a、3b 和 3b 亚型(标注●);如图 4 所示,依据高的展支持率和高核苷酸相似度,样品 5、15、26、50 号(CC5、CC15、CC26 和 CC50)分别认定为 6a、3b、1b 和 3a 亚型(标注●)。除上述样品外,图 3 和图 4 中其余样本所示的 HCV 基因型和亚型的结果均吻合。

3 讨论

HCV 的遗传多样性并不是均匀地分布于病毒的整个基因组中。5'非编码区(5' non-coding region, 5' NCR)是 HCV 小的非编码区域,是 HCV 病毒最保守的区域,不同毒株中具有 90% 的序列同源性^[23]。在源于 5'NCR 的种系进化树图中,基因型 1 和 6 型的亚型会丛集在一起,因此它不能将基因型 1 和 6 型的亚型准确区分出来^[24-25]。由于



在 H77 HCV 标准毒株 (NC-004102) 的基因组中, NS5B 序列位于 8276-8615 bp 的位置。图 3 中红河州 HIV/HCV 合并感染者分离的 HCV 基因型, 主要为 3 型、6 型和 1 型。节点上的数字代表展支持率, 大于 70% 的显示在图中。比例尺表示每个位点存在 0.05 的核苷酸或氨基酸替代, 代表 HCV 的遗传变异性。依据高的展支持率和核苷酸相似度, C/E1 扩增失败的样本 CC11、CC22 和 CC24 (标注 ●), HCV 基因亚型认定为 3a、3b 和 3b。样本 CC18 (标注 ▲) HCV 基因亚型为 3b 型。除了上述样本外, 其他样品的 HCV 基因型和亚型的结果与图 4 所示结果一致。HCV 各亚型参考序列在 Genebank 中的序号分别是: CN.GZ0203.GQ206138, CN.LZ-2.KC441468, CN.LZ-4.KC441470, CN.KM42.AY878652, CN.KM51.AY834934, CN.KM181.FJ435090, CN.KMN-02.EU798760, CN.PR144.HQ912599, CN.PR58.HQ912954, CN.PR87.HQ912953, CN.ZS221.KC844037, CN.ZS633.KC844041, CN.ZS650.KC844044, GE.NS1.X76918, HK.cs6a - 16.AY973865, HK.cs6a - 18.AY973866 HK.6a33.AY859526, HK.6a35.DQ480513, ID.JK049.D63821, IN.ILBRSAS6.JQ717257, IN.RASILBS1.HQ738645, IT.S52.GU814263, JP.HClb-IP.AB516999, JP.IB-2.AB109543, JP.NZL1.D17763, LK.SL_HC_NS_8.FJ236905, MM.MYAN-2D.AB103140, MM.MYAN-6H.AB103151, NE.NE048.D16612, TH.Th22.EU246937, TH.Th271.D37858, TH.Th555.D37863, US.N5.FJ380078, US.Patient235.GQ356206, VN.11A.FJ768832, VN.D9.EU246930, VN.HPA399.AB523333, VN.VN4.L38382, VN.VN12.L38380, VN.VN507.D87357 和 VN.VN998.D30797。第一组大写字母代表参考序列来源的国家或地区: CN 中国; GE 格鲁吉亚; HK 中国香港; ID 印度尼西亚; IN 印度; IT 意大利; JP 日本; LK 斯里兰卡; MM 缅甸; NE 尼日尔; TH 泰国; US 美国以及 VN 越南。

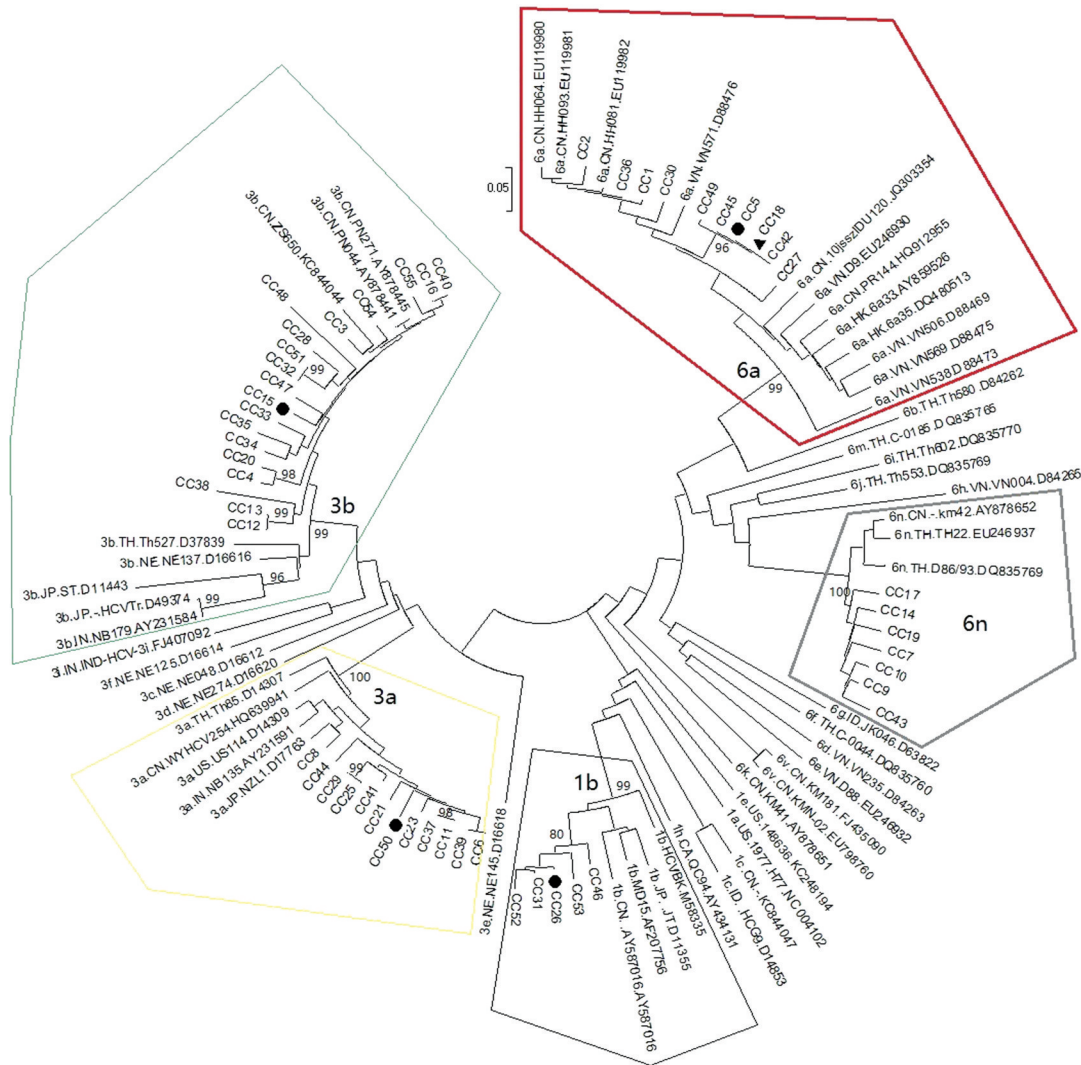
图 3 基于 NS5B 种系进化树图 HCV 基因型和亚型的分布情况

Figure 3 HCV genotypes and subtypes distribution based on phylogenetic trees of NS5B

RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (NS5B) 错配率较高, 因此丙肝病毒具有广泛的基因组变异性。另一个表现出重要的遗传变异性的区域是编码膜糖蛋白 E1 和 E2 的区域^[26]。这 3 个区域常用于 HCV 基因型和亚型的分型^[21-22, 27]。由于 5'NCR 存在上述局限

性, 在本研究中, 课题组选择 NS5B 和 C/E1 区域进行扩增, 测序分析和种系进化分析。

红河州是云南边疆的一个民族自治州, 主要聚居的民族有哈尼族、彝族、回族、苗族和壮族等。红河州包含 13 个县市, 其中 3 个县市与越南



在 H77 HCV 标准毒株 (NC-004102) 的基因组中, C/E1 序列位于 869~1292 bp 的位置。图 4 中红河州 HIV/HCV 合并感染者分离的 HCV 基因型主要为 3 型、6 型和 1 型。节点上的数字代表展支持率, 大于 70% 的显示在图中。比例尺表示每个位点存在 0.05 的核苷酸或氨基酸替代, 代表 HCV 的遗传变异性。依据高的展支持率和核苷酸相似度, NS5B 扩增失败的样本 CC5、CC15、CC26 和 CC50 (标注 ●), HCV 基因亚型认定为 6a、3b、1b 和 3a。样本 CC18 (标注 ▲) HCV 基因亚型为 6a 型。除了上述样本外, 其他样品的 HCV 基因型和亚型的结果与图 3 所示结果一致。HCV 各亚型参考序列在 Genebank 中的序号分别是: CA.QC94.AY434131, CN.10jsszIDU120.JQ303354, CN.HH064.EU119980, CN.HH082.EU119982, CN.HH093.EU119981, CN.PR144.HQ912599, CN.KM41.AY878651, CN.KM42.AY878652, CN.AY587016.AY587016, CN.KM181.FJ435090, CN.KMN-02.EU798760, CN.WYHCV254.HQ639941, CN.PN044.AY878441, CN.PN271.AY878445, HK.6a33.AY859526, HK.6a35.DQ480513 ID.JK046.D63822, ID.HCG9.D14853, IN.NB135.AY231591, JP.HCVBK.M58335, JP.HCV-Tr.D49374, JP.JT.D11355, JP.MD15.AF207756, JP.NZL1.D17763, NE.NE048.D16612, NE.NE137.D16616 NE.NE145.D16618, NE.NE274.D16620, TH.C-0044.DQ835760, TH.C-0185.DQ835765, TH.D86/93.DQ835769, TH.Th257.D37839, TH.Th22.EU246937 TH.Th553.DQ835769, TH.Th580.D84262, TH.Th602.DQ835770, US.H77.NC_004102, US.148636.KC248194, US.US114.D14309, VN.D88.EU246932, VN.D9.EU246930, VN.VN004.D84265, VN.VN235.D84263, VN.VN506.D88469, VN.VN538.D88473 和 VN.VN571.D88476。第一组大写字母代表参考序列来源的国家或地区: CA 加拿大; CN 中国; HK 中国香港; ID 印度尼西亚; IN 印度; JP 日本; NE 尼日尔; TH 泰国; US 美国以及 VN 越南。

图 4 基于 C/E1 种系进化树图 HCV 基因型和亚型的分布情况

Figure 4 HCV genotypes and subtypes distribution based on phylogenetic trees of C/E1

接壤。由于静脉吸毒人群较多以及 HCV 与 HIV 具有相同的传播途径, 该地区 HCV 和 HIV 的流行率都较高。Dunford 等^[22]学者报道在越南 HCV 病毒流行的亚型主要是 1a (42%), 其次是 1 b (28%),

6a (22.5%) 以及基因型 6 的其它亚型 (5.5%)。本研究显示, 尽管与越南接壤, 红河州地区 HCV 流行的基因型和亚型的总体分布和越南是不同的。红河州地区 HIV/HCV 合并感染患者中, HCV 主要

流行3个基因型(3型、6型和1型)和5个亚型(3b、3a、6a、6n和1b)。HCV 6a亚型在越南是普遍流行的亚型之一。Dunford等^[22]报道,6a在越南IDUs中的流行率是22.5%,而Pham等^[27]报道,6a在越南献血者中的流行率为37.1%。课题组进一步关注到,据文献报道,云南省地区HCV 6a亚型近十年来呈现逐渐递增的趋势^[13,17]。本研究数据显示在红河州的HIV/HCV合并感染患者中,HCV 6a亚型在IDUs中的流行率(19.0%)高于云南省平均水平(15%),而低于越南水平(22.5%)^[22]。另一方面,Dunford等^[22]报道6a在越南性工作者中的流行率为24.2%;而在本研究中,在红河州地区通过性接触感染的HCV患者中,6a亚型的流行率是8.3%(表2)。因此,课题组对红河州地区的HCV 6a亚型的来源及进化很感兴趣,进一步做种系分析时发现,如图3、图4所示,红河州地区分离的HCV 6a亚型分别与来自越南的参考序HPA399、AB523333和VN571.D88476丛集在一起,而且具有高的展支持率和核苷酸相似度;并且包括2008年Xia等^[17]报道的分离于红河州地区的3株HCV 6a亚型毒株(6a.CN.HH064.EU119980; 6a.CN.HH081.EU119982; 6a.CN.HH093.EU119981)均与越南株(6a.VN.VN571.D88476)丛集(图4)。提示越南和红河州地区分离的HCV 6a亚型具有进化关系。这些数据均提示,基于HCV 6a亚型在越南的高流行率,红河州可能作为一个传入点,HCV 6a亚型主要通过IDU的传播方式,由越南传入红河州流行,进而再传入昆明或中国的其它地区流行。

本研究数据显示,红河州HIV/HCV合并感染者中HCV基因型和亚型的流行情况与Lu等^[28]和李峥等^[29]报道的云南昆明HCV的流行情况略有不同。Lu等^[28]于2005年报道,3b(33.3%)是昆明HCV流行的最主要的基因亚型,其次是1b(20.0%)、2a(20.0%)和3a亚型(6.7%)。2006年李峥等^[29]研究报道显示46例样本中,HCV 1b亚型(34.78%)仍是最常见的亚型,紧随其后的是3b(21.74%)、基因型2型(17.39%,包括2a和2b)、3a(10.88%)和1a/2b的双重感染(6.52%)。上述2项研究数据相比,发现HCV 1b亚型流行比例明显上升。之后,Xia等^[17]另一项研究数据显示,在云南昆明主要流行3个基因型(1型、3型和6型)HCV。这一结论和本研究结果类似,基因型3型最常见,其次是6型和1型。和先前的研究数据相

比,云南省HCV基因型6型的流行率增高了,尤其是6a和6n亚型。相比之下,基因型1和2型(包括亚型1b、1a、2a和2b)的流行率大幅下降。这个结论也与Zhang等^[13]的研究报道数据相吻合。此外,样品18号(CC18)在NS5B种系进化树图中为3b亚型;而在C/E1种系进化树图中,它却与6a亚型丛集在一起,且展支持率和核苷酸相似度均较高(图3、图4,标注▲),预示该份样品可能存在双重感染和/或重组^[27,30]。

综上所述,HCV 6a亚型是一个在越南和红河州地区静脉吸毒人群中具有高流行率的病毒亚型。一方面,基于近些年来,包含红河州在内的云南省HCV 6a亚型病毒的流行率逐年增高(从2008年5%逐渐上升至2013年的15%)^[13,17];另一方面,基于NS5B和C/E1的种系进化分析,红河州地区分离的HCV 6a亚型毒株与来自越南的6a亚型的参考毒株丛集(图4),这些数据提示,红河州可能是HCV 6a亚型病毒由越南传入中国的一个传入点,HCV 6a亚型主要通过IDU的传播方式,由越南传入红河州流行,进而再传入昆明或中国的其它地区流行。

参考文献

- [1] Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, et al. Chronic hepatitis C in the advanced adult and elderly subjects [J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2009, 55(2):145-157.
- [2] Manns MP, Buti M, Gane E, et al. Hepatitis C virus infection [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17006.
- [3] Echeverria N, Moratorio G, Cristina J, et al. Hepatitis C virus genetic variability and evolution [J]. *World J Hepatol*, 2015 (6):831-845.
- [4] Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1):77-87.
- [5] Gower E, Estes C, Blach S, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(1 Suppl):S45-57.
- [6] Zhang Y, Chen LM, He M. Hepatitis C Virus in mainland China with an emphasis on genotype and subtype distribution [J]. *Virology*, 2017, 23, 14(1):41.
- [7] Sartori M, Andorno S, Avogadro E, et al. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) genotype 2 in Italian patients with chronic liver disease [J]. *Ital J Gastroenterol*, 1996, 28(8):452-456.
- [8] Wasitthanasem R, Vongpunsawad S, Siripon N, et al. Genotypic distribution of hepatitis C virus in Thai-

- land and Southeast Asia[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126764.
- [9] Narahari S, Juwle A, Basak S, et al. Prevalence and geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Indian patient cohort[J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(4): 643-645.
- [10] Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C [J]. J Infect Dis, 1995, 171(6): 1607-1610.
- [11] Antaki N, Craxi A, Kamal S, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report [J]. Liver Int, 2010, 30(3): 342-355.
- [12] Chamberlain RW, Adams NJ, Taylor LA, et al. The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236(1): 44-49.
- [13] Zhang Z, Yao Y, Wu W, et al. Hepatitis C virus genotype diversity among intravenous drug users in Yunnan Province, Southwestern China [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82598.
- [14] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource [J]. Hepatology, 2014, 59(1): 318-327.
- [15] Zhang TJ, Tully Damien C, Zhou SJ, et al. Characteristics of HCV co-infection among HIV infected individuals from an area with high risk of Blood-Borne infections in Central China [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94219.
- [16] Tian D, Li L, Liu YJ, et al. Different HCV genotype distributions of HIV-infected individuals in Henan and Guangxi, China [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50343.
- [17] Xia X, Lu L, Tee KK, et al. The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China [J]. J Med Virol, 2008, 80(7): 1142-1152.
- [18] Zhou X, Chan PK, Tam JS, et al. A possible geographic origin of endemic hepatitis C virus 6a in Hong-Kong: evidences for the association with Vietnamese immigration [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24889.
- [19] Chan J, Chung RT. Perspectives on HCV: current therapeutic regimens and drug-drug interactions [J]. Clin Pharmacol Drug Dev, 2017, 6(2): 147-163.
- [20] 中华人民共和国卫生部. WS 213-2008 丙型肝炎病毒性肝炎诊断标准[S]. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [21] Murphy DG, Willems B, Deschenes M, et al. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(4): 1102-1112.
- [22] Dunford L, Carr MJ, Dean J, et al. Hepatitis C virus in Vietnam: high prevalence of infection in dialysis and multi-transfused patients involving diverse and novel virus variants [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41266.
- [23] Pineiro D, Martinez-Salas E. RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis [J]. Viruses, 2012, 4(10): 2233-2250.
- [24] Laperche S, Lunel F, Izopet J, et al. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 733-739.
- [25] Hrabec PT, Fischer W, Bruno WJ, et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes [J]. Virol J, 2006, 3: 103.
- [26] Argentini C, Genovese D, Dettori S, et al. HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification [J]. Future Microbiol, 2009, 4(3): 359-373.
- [27] Pham DA, Leuangwutiwong P, Jittmittraphap A, et al. High prevalence of Hepatitis C virus genotype 6 in Vietnam [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2009, 27(2-3): 153-160.
- [28] Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants [J]. J Med Virol, 2005, 75(4): 538-549.
- [29] 李峥, 高玉红, 毕胜, 等. 云南省丙型肝炎病毒基因型及3b型遗传进化树分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(11): 979-981.
- [30] Lee YM, Lin HJ, Chen YJ, et al. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form_2b6w [J]. J Med Virol, 2010, 82(1): 57-68.

· 论 著 ·

2014-2016年惠州市手足口病住院患儿流行病学研究

杨坤祥* 陈剑虹 贺海林 钟泽艳

[摘要] 目的 了解2014-2016年惠州市手足口病住院患儿的流行病学和病原学特征。方法 采用实时荧光逆转录-聚合酶反应(RT-qPCR)对2 243份手足口病患儿粪便或肛拭子标本进行肠道病毒通用型(EV)、肠道病毒71型(EV71)和柯萨奇病毒A16型(CA16)检测,并对结果和病例资料进行统计分析。结果 2014-2016年共检测手足口病病例2 243份,CA16阳性357份,占15.92%;EV71阳性475份,占21.18%;CA16和EV71同时阳性22份,占0.98%;其他肠道病毒阳性1 180份,占52.61%。全年有2个高峰,分别为5-7月和9-10月,发病年龄主要集中在5岁以下儿童,其中10个月~3岁儿童发病率最高。2 637例住院病例中,门诊和急诊诊断为典型手足口病而入院的病例2 359例,占89.46%,平均住院天数为5.22天。结论 2014-2016年惠州市手足口病住院患儿病原学以其他型肠道病毒为主。应加强病原学监测,提高手足口病的诊断率,减少重症手足口病的发生。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒; 流行病学

Epidemiologic study of pediatric inpatients with hand foot and mouth disease in Huizhou during 2014-2016

YANG Kunxiang*, CHEN Jianhong, HE Hailin, ZHONG Zeyan

(Prenatal Diagnosis Center of Huizhou First Women and Children's Hospital, Huizhou, Guangdong, China, 516003)

[ABSTRACT] Objective To understand the characteristics of epidemiology and etiology of pediatric inpatients with hand, foot and mouth disease (HFMD) in Huizhou from 2014 to 2016. Methods 2 243 specimens were tested by reverse transcription quantitative real time PCR (RT-qPCR), adopted to perform the genotyping on universal enterovirus (EV), enterovirus 71(EV71) and coxsackie virus A16 (CA16), the results and case data were analyzed. Results A total 2 243 samples of HFMD were collected, among them, 357 cases (15.92%) were CA16 positive, 475 cases (21.18%) were EV71 positive, 22 cases (0.98%) were CA16 and EV71 double positive, and 1 180 cases (52.61%) were the other enterovirus positive. During the whole year there were 2 peaks of onset, from May to July and then September to October. The onset were predominant in the children aged 5 years old and under, and 10 months to 3 years old had the highest frequency of onset. Among the 2 637 inpatients, 2 359 cases (89.46%) were diagnosed as typical HFMD through outpatient and emergency departments, and the average length of stay was 5.22 days. Conclusion The etiology distribution of pediatric HFMD in Huizhou area during 2014-2016 was dominated by the other genotypes of enterovirus. The pathogenic monitoring of HFMD need to be enhanced to improve the diagnostic rate of HFMD and reduce the incidence of severe HFMD.

[KEY WORDS] Hand foot and mouth disease; Enterovirus; Epidemiology

作者单位:惠州市第一妇幼保健院产前诊断中心,广东,惠州 516003

*通讯作者:杨坤祥, E-mail:344878149@qq.com

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是由多种人肠道病毒引起的一种儿童传染病,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要症状。个别重症患儿病情进展快,特别是肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)病毒感染,可引起严重中枢神经系统并发症,如脑膜炎、脑炎、急性迟缓性瘫痪等,甚至死亡^[1]。2008年5月,国家卫生部将手足口病纳入传染病管理并在2009年要求提高手足口病病原学的检测比例^[2]。引起手足口病的2大主要病原体为EV71型和柯萨奇病毒A16型(coxsackie virus A16, CA16),但近年来,其他肠道病毒感染引起的手足口病也越来越多^[3]。实现对肠道病毒的检测有利于疫情监测以及制定有效的预防控制措施,实时荧光逆转录-聚合酶反应(reverse transcription quantitative real time PCR, RT-qPCR)作为近年来新发展起来的一项核酸检测技术,具有快速、高灵敏性和高特异性的优点,被广泛应用于病毒等病原微生物的核酸快速检测^[4]。为了解惠州市手足口病的流行病学特征,为制定有效的防治措施提供依据,本研究对2014-2016年我院收治的2 637例手足口病住院患儿流行病学进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源

2014年1月至2016年12月我院共收治手足口病病例2 637例,其中2014年572例,2015年987例,2016年1 078例;男性1 657例(62.84%),女性980例(37.16%),年龄范围从1个月到8岁,平均年龄为(3.25±0.24)岁。我院作为惠州市重症手足口病定点救治医院,接收的手足口病患者来自惠州市所辖的所有县和城区,能较好的反映惠州地区的手

足口病流行情况。

1.2 标本采集

所有病例均按《手足口病诊疗指南(2010版)》^[5]进行诊断及分型。病原学监测由病程3天内采集病例的粪便或肛拭子送检,于2 h内送检,-20℃低温保存,3天内检测。

1.3 仪器和方法

仪器为ABI 7500型实时荧光定量PCR基因扩增仪(ABI,美国);肠道病毒核酸检测系列试剂盒(EV71型、CA16型、其他肠道病毒型)由中山大学达安基因股份有限公司提供。该试剂盒利用RT-qPCR技术,分别以肠道病毒71型、柯萨奇病毒A16型、肠道病毒基因编码区的高度保守区为靶区域,分别设计特异性引物及荧光探针,进行一步法RT-qPCR多重扩增,用于样本中肠道病毒RNA以及肠道病毒71型、柯萨奇病毒A16型RNA的同步定量检测。另外该试剂盒带有内标物质,用于对核酸提取过程的监控,可减少假阴性结果的出现。

1.4 RT-qPCR检测

样本核酸提取采用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒(离心柱法),具体操作步骤完全按照试剂盒说明书指引进行。扩增反应体系和结果判读按照肠道病毒EV71/CA16/EV核酸检测系列试剂盒说明书操作和设置,在ABI 7500型实时荧光定量PCR基因扩增仪上进行检测,荧光通道检测选用FAM、VIC、Texas Red和CY5共4个通道。反应条件:50℃ 15 min,1个循环;95℃ 15 min,1个循环;94℃ 15 s,55℃ 45 s,45个循环;40℃ 10 s,1个循环。每次试验均检测空白对照、阴性质控品和阳性质控品,满足质量控制要求时才进行检测结果的判定。结果判读解释见表1。

表1 试验结果解释

Table 1 The test results interpretation

待检标本核酸PCR结果	鉴定结果
EV(-),EV71(-),CA16(-),内标(+)	非肠道病毒
EV(+),EV71(-),CA16(-),内标(+)	非EV71、CA16的其他肠道病毒
EV(+),EV71(+),CA16(-),内标(+)	EV71
EV(+),EV71(-),CA16(+),内标(+)	CA16
EV(+),EV71(+),CA16(+),内标(+)	EV71和CA16病毒同时存在
EV(-),EV71(-),CA16(-),内标(-)	空白对照

1.5 统计学分析

采用SPSS 16.0软件进行统计分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

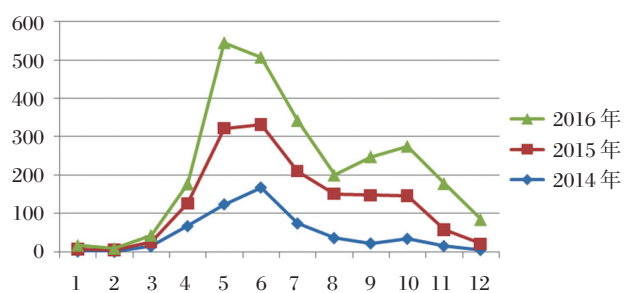
2 结果

2.1 时间季节分布

2014年1月至2016年12月,我院2 637例手足口病住院病例按照月份统计分析,手足口病全年均有发病,在5-7月份为发病高峰,9-10月出现一个次高峰。从3月份开始上升,5月份达到高峰,6月份以后呈逐渐下降趋势;9月份有轻微上升,10月份有一个小高峰。4-10月份病例数量达2 301例,占总病例的87.26%,夏秋季手足口病例明显上升,具有季节性,见图1。

2.2 年龄性别分布

2 637例手足口病住院患儿中,男童患儿1 657名,女童患儿980名,男女比例为1.69:1,男童患病率高于女童;本地区手足口病发病年龄最小的只有18天,年龄最大的为9岁。0~≤10个月患儿10例,占0.38%;10个月~≤3岁患儿2 095例,占79.44%;>3~≤5岁患儿398例,占15.09%;>5岁患



横坐标表示月份,纵坐标表示手足口病发生例数。

图1 2014-2016年惠州市手足口病患儿病例报告季节分布情况

Figure 1 The seasonal distribution of children with HFMD in huizhou during 2014-2016

儿134例,占5.08%。主要以大于10个月龄,小于3岁为手足口病高发年龄。不同年份各个年龄组进行构成比较,0~≤10个月组由于例数不足5例无法比较;10个月~≤2岁、2~≤3岁、4~≤5岁和>5岁比较得出不同年份的年龄构成比不同,差异有统计学意义($P < 0.05$);3~≤4岁比较得出不同年份的年龄构成比相同,差异没有统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 2014-2016年惠州市手足口病住院患儿病例年龄分布情况 [n(%)]

Table 2 The age distribution of children with HFMD in huizhou during 2014-2016 [n(%)]

年份	例数	≤10个月	10个月~≤2岁	2~≤3岁	3~≤4岁	4~≤5岁	>5岁
2014	572	2(0.35)	269(47.03)	142(24.83)	69(12.06)	46(8.04)	49(8.57)
2015	987	4(0.41)	663(67.17)	157(15.91)	96(9.73)	34(3.44)	37(3.74)
2016	1 078	4(0.37)	679(62.99)	198(18.37)	94(8.72)	59(5.47)	48(4.45)
合计	2 637	10(0.38)	1 598(60.60)	497(18.84)	259(9.82)	139(5.27)	134(5.08)

不同年份10个月~≤2岁年龄组构成比比较, $\chi^2=65.887, P < 0.05$;不同年份2~≤3岁年龄组构成比, $\chi^2=18.646, P < 0.05$;不同年份3~≤4岁年龄组构成比, $\chi^2=4.579, P > 0.05$;不同年份4~≤5岁年龄组构成比, $\chi^2=15.291, P < 0.05$;不同年份>5岁年龄组构成比, $\chi^2=18.666, P < 0.05$ 。

2.3 住院分布情况

2014-2016年报告的2 637例住院病例中,门诊和急诊诊断为典型手足口病而入院的病例2 359例,占89.46%,以发热抽搐、疱疹性咽峡炎、皮疹待查等诊断入院后再被诊断为不典型手足口病的病例278例,占10.54%。手足口病患儿平均住院天数为5.22天,住4-6天的占61.62%,最短的住1天,最长的住20天,见表3。

2.4 病原学构成

2 637例住院病例中,采集了粪便或肛拭子标本进行肠道病毒核酸检测2 243例,检出肠道病毒阳

性标本2 034例,阳性率为90.68%。在病原学构成方面,2014-2016年CA16阳性357例,EV71阳性475例,其他肠道病毒阳性1 180例,EV71和CA16同时阳性22例,构成比分别为:15.92%、21.18%、52.61%和0.98%。2014年引起手足口病的病原体最多的是EV71,构成比为37.66%;2015-2016年引起手足口病的病原体最多的是其他肠道病毒,构成比分别为66.51%和55.49%。肠道病毒阳性率及各型阳性病例病原体在不同年份之间的构成比比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表3 2014-2016年惠州市手足口病患儿住院天数分布情况(n)

Table 3 The hospital stays distribution of children with HFMD in huizhou during 2014-2016 (n)

年份	例数	≤2天	3天	4天	5天	6天	7天	≥8天
2014	572	45	81	141	117	60	42	86
2015	987	64	97	179	215	186	117	129
2016	1078	61	82	253	281	193	102	106
合计	2637	170	260	573	613	439	261	321

表4 2014-2016年惠州市手足口病患儿病原体检测情况[n(%)]

Table 4 The pathogen detection of children with HFMD in huizhou during 2014-2016 [n(%)]

年份	例数	阳性数	病原体构成			
			EV71	CA16	其他EV	EV71和CA16
2014	470	427(90.85)	177(37.66)	140(29.79)	100(21.28)	10(2.13)
2015	872	814(93.35)	171(19.61)	60(6.88)	580(66.51)	3(0.34)
2016	901	793(88.01)	127(14.10)	157(17.43)	500(55.49)	9(1.00)
合计	2 243	2 034(90.68)	475(21.18)	357(15.92)	1 180(52.61)	22(0.98)

不同年份肠道病毒阳性率比较, $\chi^2 = 14.948, P < 0.05$; 不同年份EV71阳性构成比比较, $\chi^2 = 104.501, P < 0.05$; 不同年份CA16阳性构成比比较, $\chi^2 = 129.557, P < 0.05$; 不同年份其他EV阳性构成比比较, $\chi^2 = 276.639, P < 0.05$ 。

足口病发病高峰为3-6月份和10-11月份^[7]; 而2011-2013年手足口病发病高峰为4-7月份和9-11月份^[8-9], 充分表明了手足口病流行的季节性。至于流行时间上细小的差别, 原因可能跟手足口病病毒流行的型别不同有关。2009-2013年主要以EV71型和CA16型为主, 而2014-2016年逐渐以非EV71型和CA16型的其他肠道病毒为主, 不同肠道病毒之间的流行期有一定的差异^[10]。本地区流行高峰持续时间长, 从3月份到11月份均为手足口病高发期, 这可能跟惠州市属于亚热带, 气候潮湿温暖, 适宜肠道病毒存活和传播的地理气候条件有关^[11]。惠州市人口密度高, 外来人口流动较大, 部分地区卫生条件较差, 家长缺乏保健意识, 这些因素都可能造成了肠道病毒的生存及传播能力增加, 从而导致惠州市手足口病高发。

手足口病好发于10个月~3岁儿童, 与杨勇等^[12]报道一致, 这可能与10个月以下的儿童还大部分得益于出生时母传抗体的保护^[13]和活动能力受限不至于被传染; 3岁以上儿童, 虽然活动不受限, 但通过疫苗或者自身免疫能力的慢慢提高, 减少了肠道病毒感染的机会, 而且随着年龄越大, 自身抵抗能力越强, 即使感染了肠道病毒, 也无需就医就能自愈; 而10个月

3 讨论

手足口病近年来全国每年都有局部暴发或流行^[6]。流行病学分析能够为今后手足口病的防控提供数据支持, 本研究对2014-2016年惠州市手足口病各项监测数据进行分析, 较好地反映了近几年惠州市手足口病流行特征。

惠州市2014-2016年手足口病在5-7月份为发病高峰, 9-10月出现一个次高峰; 2009-2010年手

~3岁儿童处在中间, 母传抗体渐渐消失, 自身抵抗力还未完善, 接触外界的机会越来越多, 感染的机会越来越大, 自然成了被感染的最大群体。而大部分研究都将0-3岁发病的人群划为一个研究组, 而不是将0-10个月划分到另一个研究组, 容易造成刚出生的婴儿手足口病发病率也很高的错觉^[14]。

典型手足口病容易根据临床症状诊断为手足口病, 但不典型手足口病诊断入院的也占10.54%。不典型手足口病患儿某些临床表现与典型病例存在一定的差异, 患儿首诊时未能明确诊断, 医生以“发热伴抽搐”“发热伴出疹”和“皮疹待查”等临床突出特征作为初步诊断。还有报道显示部分其他EV感染, 例如CA6感染后8周内会发生脱甲、脱皮或脱屑^[15], 由此可见肠道病毒感染的临床表现是多样的, 如果不加以病原学的检测来明确诊断, 可能会漏诊一部分的手足口病患儿。从平均住院天数看, 手足口病平均住院5.22天, 花费也接近5000多元, 加重了不少家庭的经济负担。手足口病发现并治疗的及时性影响住院的天数, 最短的住院1天, 最长的住院20天。重症手足口病病情复杂, 并发症多, 恢复时间长, 住院时间也长, 花费也就更多, 所以及时发现并及时检测肠道病毒可以帮助减轻社

会负担。

2 243 份手足口病标本进行病原学核酸检测, 结果为 90.68% 的标本检出肠道病毒核酸阳性, 说明手足口病核酸检测能起到很好的筛查作用, 特别是一些临床症状不典型的病人, 对临床诊疗起到很大的辅助诊断作用。2014 年各种型别的肠道病毒各占比例差距不大, 2015-2016 年其他肠道病毒明显上升, 从 21.28% 的构成比到 66.51% 的构成比, 成为优势型别, 跟惠州市 2009-2013 年的流行特征有所不同(以 EV71 和 CA16 为主)^[7-9], 提示致病病毒的类别有所转移。在其他地区的不同年份中, 肠道病毒流行型别则有所不同, 例如 2012-2013 年武汉的手足口病爆发以 CA16 型为主^[16], 而深圳市则在 2010 年就出现其他 EV 感染的增长并连续 3 年超过了 CA16 成为第二大致病原^[17], 至 2014 年其他 EV 已成为引发该地区 HFMD 的最主要致病原^[18]。此改变可能与手足口病的流行周期以及病原毒株流行后人群普遍具有一定的免疫力有关^[19], 也可能是由于病毒经受的免疫压力而不断变异进化所致^[20]。值得注意的是, 虽然目前 EV71 以及 CA16 仍作为感染的主要病原体, 但近年来国内有研究报道显示, 其他肠道病毒中的 CA6 及 CA10 感染有逐渐升高趋势^[21], 目前对于这些新型肠道病毒的检测已经开展, 对手足口病病例进行病原学监测, 对肠道病毒进行分型鉴定, 有助于了解优势病原的型别及变化情况, 对于手足口病的防治十分重要。

目前, 惠州市手足口病的病原学和流行病学监测网已经形成, 由惠州市卫计局牵头, 惠州市疾病预防控制中心作为技术支持和督导, 市属综合医院和妇幼保健院作为手足口病的定点收治单位, 形成逐级上报的流程, 有效的控制了手足口病的疫情。未来要加大对手足口病病原谱的监测及主要病原分子进化的研究, 做好手足口病的防治工作。

参考文献

[1] 杨兴林, 梁跃东, 洪章坪, 等. 2012 年贵阳地区住院患儿手足口病的病原学研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(14): 1946-1948.

[2] 杨洪, 何雅青, 张泽娜, 等. 2011 年广东省深圳市手足口病的病原学监测[J]. 疾病监测, 2013, 28(3): 189-192.

[3] 王玉肖, 赵灿, 李娟娟, 等. 2012-2015 年保定市唐县地区手足口病病原学分析[J]. 检验医学, 2017, 32(1): 18-21.

[4] 徐昌平, 郑春红, 严菊英, 等. EV71、CA16 和肠道病毒通用型三重荧光 RT-PCR 检测技术的建立[J]. 浙江预防医学, 2016, 28(3): 217-220.

[5] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版)[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24): 1473-1475.

[6] 韩江涛, 彭伟, 刘立, 等. 石家庄市 2009-2012 年手足口病病原学特征及变化规律分析[J]. 中国全科医学, 2014, 17(35): 4213-4216.

[7] 徐志华, 琚雄飞. 惠州市 2009-2010 年手足口病流行特征分析[J]. 中国热带医学, 2013, 13(3): 333-334.

[8] 罗泽燕, 方巧云, 曾健君, 等. 2011-2013 年惠州市手足口病流行特征分析[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(6): 846-849.

[9] 李宁. 2012-2014 年惠州市手足口病流行特征分析[J]. 职业与健康, 2016, 32(4): 522-524.

[10] 宋秦伟, 黄辉, 邓洁, 等. 2013 至 2014 年北京手足口病流行季相关肠道病毒型别变化和分析[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(8): 610-615.

[11] 李梅, 邱宝强, 颜云盈. 2013-2015 年南宁市手足口病流行病学及临床特征分析[J]. 广西医学, 2017, 39(1): 132-134.

[12] 杨勇, 孙伟, 李峥嵘, 等. 2014 年广州新塘地区手足 13 病病原体基因检测结果分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3): 165-169.

[13] 吴楠, 段永翔, 王颖, 等. 2012-2014 年深圳市南山区手足口病流行病学和病原学分析[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(5): 684-686.

[14] Wei SH, Huang YP, Liu MC, et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11: 346.

[15] 于秋丽, 谢赞, 刘莹莹, 等. 2008-2011 年河北省手足口病流行特征分析[J]. 预防医学情报杂志, 2013, 29(2): 89-93.

[16] Yang Q, Ding J, Cao J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A 10[J]. J Med Virol, 2015, 87(6): 954-960.

[17] He YQ, Chen L, Xu WB, et al. Emergence, circulation, and spatiotemoral phylogenetic analysis of coxsackievirus a6- and coxsackievirus a10-associated hand, foot, and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3560-3566.

[18] 李枫, 张仁利, 杨洪, 等. 2014 年深圳市儿童手足口病流行特征[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(9): 1247-1250.

(下转第 66 页)

高危型 HPV 基因型在门诊就诊人群中的分布特征

严鸣光* 殷卫兵

[摘要] **目的** 探讨门诊就诊人群高危型 HPV 基因型分布特征,为疫苗接种和宫颈癌的早期防治提供参考依据。 **方法** 对 5 086 例妇科门诊就诊女性的宫颈脱落细胞标本进行 HPV 基因分型检测,并对高危型 HPV (high-risk HPV, HR-HPV) 亚型感染情况进行对比分析。 **结果** 在所收集的 5 086 份标本中, HPV 阳性 1 641 例,其中 1 534 例为 HR-HPV 感染, HPV 阳性率为 32.27%, HR-HPV 阳性率是 30.16%。 HPV 阳性率从高到低的年龄组分别是: 55~64 岁组 (41.35%)、<25 岁组 (36.22%)、25~34 岁组 (34.12%)、45~54 岁组 (34.00%)、≥65 岁组 (30.11%)、35~44 岁组 (25.94%); 所有 HR-HPV 阳性标本经病理检测,未发现有病理改变 228 例,仅轻度炎症改变 724 例,低度病变 243 例,高度病变 312 例,原位癌 15 例,宫颈癌 12 例; HR-HPV 亚型最常见的类型分别是: HPV52、HPV58、HPV16,其阳性率分别为 21.77%、16.75%、15.31%。 **结论** 在就诊人群中 HPV 感染率最高的是 55~64 岁的人群,最常见的 HR-HPV 亚型是 HPV52, HPV 基因型检测对于宫颈癌的早期防治有重要的指导意义。

[关键词] 人乳头瘤病毒; 基因分型; 宫颈癌

Infection status of high risk - human papillomavirus and its genotype distribution in outpatients

YAN Mingguang*, YIN Weibing

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Shangqiu, Shangqiu, Henan, China, 476000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the different states of human papillomavirus (HPV) infection and the distribution of high-risk HPV (HR-HPV) genotypes in female outpatients. **Methods** Cervical exfoliated cell specimens were collected from 5 086 women for HPV screening in the department of Gynecology, and HR-HPV subtypes' infection state were analyzed. **Results** Among the 5 086 female exfoliated cell specimens, 1 641 (32.27%) were found to be positive for HPV infection, and 1 534 (30.16%) were HR-HPV positive. The HPV positive rates in different age groups were as follow: 55 to 64 years old group was 41.35%, <25 years old group was 36.22%, 25 to 34 years old group was 34.12%, 45 to 54 years old group was 34.00%, ≥65 years old group was 30.11%, and finally 35 to 44 years old group was 25.94%. According to the pathology reports, 228 cases were normal, 724 cases were inflammation, 243 cases were low grade lesion, 312 cases were high grade lesion, 15 cases were cervical carcinoma in situ and 12 cases were cervical carcinoma in all the HR-HPV positive outpatients. The top 3 high-risk subtypes of HPV found in the population were HPV52, HPV58 and HPV16 and the positive rates were 21.77%, 16.75% and 15.31% respectively. **Conclusions** The majority of HPV found in outpatients of our hospital was HPV52 and the positive rate of all detected HPV subtypes peaked among women aged 55 to 64 years old. Genotyping of HPV was meaningful for preventing and treating cervical cancer.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; Genotyping; Cervical carcinoma

作者单位: 河南省商丘市第一人民医院检验科, 河南, 商丘 476000

*通讯作者: 严鸣光, E-mail: ymg1982@126.com

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是女性通过性传播感染的最常见病毒^[1]。至今已发现的HPV亚型有100多种,分为低危型HPV(low-risk HPV, LR-HPV),如6、11型,和高危型HPV(high-risk HPV, HR-HPV),如16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59和68型等。各亚型与体内特定部位感染和病变有关,其中HR-HPV持续感染与女性宫颈癌的发生、发展密切相关^[2-3]。研究证实,在99.7%的宫颈癌患者中发现HPV-DNA的存在,其中16、18、45、31亚型最多见^[4-6]。所以在女性中检测HPV对于宫颈癌的早期筛查具有重要价值,也可以为本地区的HPV疫苗的研发提供重要的参考资料。因此,本研究对来我院妇科门诊就诊患者的HPV感染情况及基因亚型分布进行了流行病学回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 样本采集与保存

收集2014年1月至2017年1月在我院妇科门诊就诊的5 086例HPV可疑感染者的HPV检测样本,患者年龄14~78岁,平均年龄(40.5±10.1)岁。由妇科门诊医生采集宫颈脱落细胞,将其放入加有专用细胞保存液的取样管中。样本采集后放置于4~8℃保存,24 h内测定。

1.2 试剂和仪器

凯普生物科技有限公司提供:21种HPV分型检测试剂盒(包含HPV-DNA抽提试剂、PCR扩增试剂和杂交试剂)、医用核酸分子快速杂交仪;PCR扩增仪型号为Roche LightCycler480(罗氏公

司)。新柏氏ThinPrep2000全自动细胞制片机(Cytec,美国)、奥林巴斯显微镜(Olympus,日本)。

1.3 检测方法

1.3.1 HPV基因分型检测

按HPV-DNA抽提试剂说明书操作提取DNA:将采集的样本振荡混匀,取500 μL,14 000 r/min离心1 min,弃上清。PCR扩增:将提取的DNA作为模板进行扩增,每份PCR反应体系为25 μL。PCR产物杂交和显色按杂交试剂说明进行。

1.3.2 病理检查

样本类型为宫颈脱落细胞,按全自动细胞制片机的仪器操作说明制片,用95%乙醇固定,巴氏染色,显微镜下观察。

1.4 统计分析

统计学方法应用SPSS 17.0统计软件进行数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料间均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV感染者年龄分布

在本研究收集的5 086份门诊就诊病例中,共筛查出HPV阳性标本1 641例,阳性率为32.27%(1 641/5 086),其中HR-HPV 1 534例,阳性率为30.16%(1 534/5 086)。将所有标本按就诊人群年龄进行分组,结果显示,HR-HPV阳性率最高的年龄组是55~64岁,不同年龄组HPV阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=54.018, P=0.000$),见表1。

表1 各年龄组HPV和HR-HPV感染率

Table 1 HPV and HR-HPV infection rates in all age groups

年龄(岁)	<i>n</i>	HPV(-)	HPV(+)	HPV阳性率(%)	HR-HPV(+)	HR-HPV阳性率(%)
<25	127	81	46	36.22	34	26.77
25~34	1 896	1 249	647	34.12	604	31.86
35~44	1 561	1 156	405	25.94	382	24.47
45~54	794	524	270	34.00	249	31.36
55~64	532	312	220	41.35	214	40.22
≥65	176	123	53	30.11	51	28.98
总计	5 086	3 445	1 641	32.12	1 534	30.16

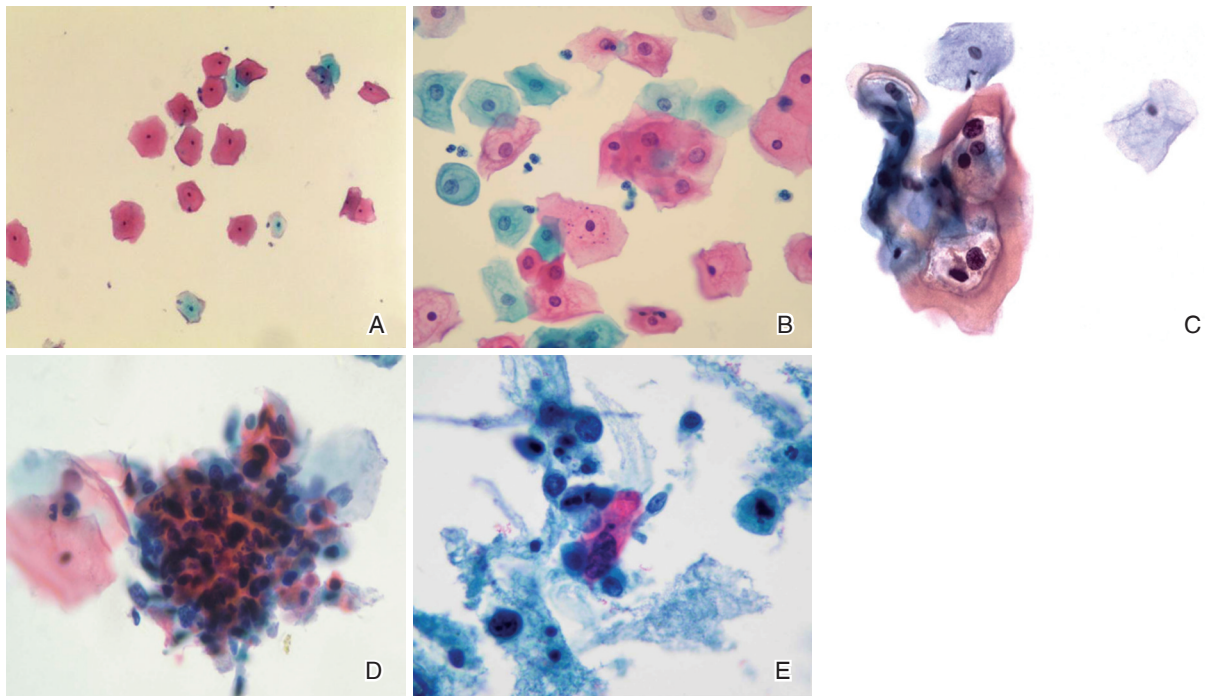
2.2 不同宫颈病变程度的病理结果

宫颈脱落细胞经巴氏染色后,在高倍显微镜下观察,结果如图1所示。

2.3 高危型HPV在不同病理类型感染者中的分布

一般认为LR-HPV与尖锐湿疣或低级别鳞状

上皮内病变有关,对宫颈癌的临床检测价值尚不明确,无法起到宫颈癌筛查作用,因此,本研究暂不对LR-HPV进行分析。在所有检测标本中未发现病理改变者228例,仅轻度炎症改变724例,低度病变243例,高度病变312例,原位癌15例,



A: 正常的宫颈脱落细胞; B: 炎症改变的宫颈脱落细胞; C: 低度病变的宫颈脱落细胞; D: 高度病变的宫颈脱落细胞; E: 宫颈鳞状细胞癌的宫颈脱落细胞。

图1 不同宫颈脱落细胞的病理结果(巴氏,×100)

Figure 1 The biopsy pathologic results of different cervical exfoliated cells (Pap,×100)

表2 不同病理类型感染者的HR-HPV分布 [n(%)]

Table 2 The distribution of HR-HPV in infected patients with different pathological types [n(%)]

	正常	炎症	低度病变	高度病变	原位癌	宫颈癌	总例数
HR-HPV(+)	228(12.95)	724(29.92)	243(59.71)	312(67.10)	15(71.43)	12(85.71)	1 534(30.16)
HR-HPV(-)	1 532(87.05)	1 695(70.08)	164(40.29)	153(32.90)	6(28.57)	2(14.29)	3 552(69.84)
总计	1 760(100.00)	2 419(100.00)	407(100.00)	465(100.00)	21(100.00)	14(100.00)	5 086(100.00)

宫颈癌12例,见表2。

2.4 HR-HPV亚型的分布

14种HR-HPV亚型检测结果与病理结果如表3所示。HR-HPV亚型最常见的类型分别是HPV52、HPV58和HPV16,其阳性率分别为21.77%(334/1 534)、16.75%(257/1 534)、15.31%(235/1 534)。

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,发病率居全球妇科恶性肿瘤第二位。相对于其它肿瘤,宫颈癌病因相对明确,流行病学及基础医学研究已经证实,高危型HPV的持续感染是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的主要病因^[7]。所以,对HR-HPV的早期分型检测,能够及时发现宫颈病变并进行早期治

疗,以降低宫颈癌的发病率,起到早发现早诊断早治疗的作用^[8-10]。目前,很多国家和地区都将HPV的基因分型检测纳入到宫颈癌前筛查计划中。

我国HPV的感染率因地区和研究人群的不同而存在明显差异。周成等^[11]报道的佛山地区15 867例女性受检者中HPV感染率为26.82%^[11];Singh等^[12]报道的上海市妇科就诊的患者中HPV感染率为31.84%;而Ding等^[13]报道的北京市1 082名患者中HPV感染率高达53.7%;陈捷等^[14]报道福州中医药大学附属人民妇科门诊和健康体检的有性生活史的女性HR-HPV的总感染率是17.18%;罗招云等^[15]报道的潮州地区参加新农村合作医疗的年龄在35~60周岁的妇女HR-HPV感染率为8.25%;本研究中HPV阳性率约32.27%,

表3 HR-HPV各亚型在不同病变患者中的分布(n)

亚型	正常	炎症	低度病变	高度病变	原位癌	宫颈癌	总例数
16	24	84	65	47	8	7	235
18	16	55	10	21	0	0	102
31	14	49	14	11	1	0	89
33	9	27	11	19	1	1	68
35	4	13	2	3	0	0	22
39	19	56	5	20	1	0	101
45	1	3	1	2	0	1	8
51	7	27	8	16	1	0	57
52	52	156	54	72	0	0	334
56	6	15	1	15	1	0	38
58	36	113	51	55	1	1	257
59	9	25	8	7	0	1	50
66	10	31	7	9	0	1	58
68	21	70	6	15	1	0	113
合计	228	724	243	312	15	12	1 534

HR-HPV 阳性率是 30.16%;这可能与各研究中使用的检测试验和研究人群不同以及与各地区人群社会习惯和生活方式不同有关。本研究观察的人群主要是妇科门诊就诊的患者,这提示 HPV 的感染率应该比健康体检人群高。

本研究的资料显示不同年龄组人群 HPV 阳性检出率有明显差异,其中 55~64 岁年龄组和 <25 岁组阳性率最高,分别为 41.35%、36.22%,且 HR-HPV 阳性率分别为 40.22%、26.77%。低年龄组高感染率可能与女性宫颈上皮修复功能尚未成熟有关,过早的性生活容易增加感染的风险。随着年龄增加,女性雌激素水平发生变化,机体免疫力下降,也容易发生多次感染,最终可能导致宫颈癌的发生。所以,有必要扩大这 2 个年龄组女性患者的 HPV 基因分型检测普查范围。

HR-HPV 的感染率随着宫颈病变的严重程度递增,在病理活检正常的组别中 HR-HPV 的感染率仅为 12.95%,而在高级别病变组上升到 67.10%,在宫颈癌组甚至高达 85.71%,这充分提示 HR-HPV 与宫颈癌的相关性。在本研究收集的 5 086 例妇科门诊就诊的病例中,共检测出 HR-HPV 感染患者 1 534 例,阳性率高达 30.16%。

有研究结果显示,上海市及山西省妇科门诊就诊的成年女性最常见的 HR-HPV 亚型是 HPV16、18、31、58、52、51 和 33^[11,16],但由于研究地区不同,不同亚型的感染率的高低排序也存在差异。本研

究结果显示,在本地区 14 种 HR-HPV 均有分布,其中 HPV52、HPV58、HPV16 3 个亚型感染人数最高。此结果再次验证了其它研究显示在亚洲地区 HPV52 是最为常见的 HR-HPV 亚型之一^[17]。同时本研究结果显示,HPV52 和 HPV58 亚型感染率要明显高于 HPV16 亚型。因此,依据 HR-HPV 亚型的流行与分布数据,给予高风险人群制订有针对性的 HPV 疫苗接种计划,开发引进包含 HPV52 和 58 亚型的预防性 HPV 疫苗显得尤为重要。

综上所述,本研究提供了门诊就诊女性 HR-HPV 感染情况及其基因亚型分布特点,对 HPV 疫苗的研制和接种及为宫颈癌的防治提供重要的参考价值。随着宫颈癌发病率的不断增加,HPV 分型筛查的应用具有积极的临床意义,应当引起患者、医院和社会的高度关注。

参考文献

- [1] Donders GG, Gabrovska M, Bellen G, et al. Knowledge of cervix cancer, human papilloma virus (HPV) and HPV vaccination at the moment of introduction of the vaccine in women in belgium [J]. Arch Gynecol Obstet, 2008, 277(4):291-298.
- [2] Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. Lancet, 2007, 370(9590):890-907.
- [3] 郑嵘,徐真. TCT 联合 DNA 倍体细胞检测在宫颈癌筛查中的应用效果 [J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(7):967-969.
- [4] Ribeiro J, Teixeira D, Marinho-Dias J, et al. Characterization of human papillomavirus genotypes and HPV-16 physical status in cervical neoplasias of women from northern Portugal [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2014, 125(2): 107-110.
- [5] 黄秀珍,姚心韵,陈文学,等. 人乳头瘤病毒基因型与宫颈病变的相关性分析 [J]. 实验与检验医学, 2015, 33(1):34-36.
- [6] Zou H, Sun Y, Zhang G, et al. Positivity and incidence of human papillomavirus in women attending gynecological department of a major comprehensive hospital in Kunming, China 2012-2014 [J]. J Med Virol, 2016, 88(4):703-701.
- [7] 李凌佳,张胜,刘彤云,等. 人乳头瘤病毒分子流行病学及临床相关疾病诊疗进展 [J]. 皮肤与性病, 2017, 39(1):21-23.
- [8] 宋晓霞,孔令非. 人乳头状瘤病毒分子生物学检测方法研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 5: 419-420.

(下转第 42 页)

广东省潮州地区献血者乙肝感染血清学和分子生物学特征

卢玉香* 周筠

[摘要] **目的** 了解潮州市无偿献血者乙肝病毒(HBV)感染情况,分析其血清学和分子生物学特征。 **方法** 采用酶联免疫吸附法(ELISA)对2013年1月至2016年12月35 184例无偿献血者的血液进行HBsAg筛查。采用荧光定量PCR、PCR-反向斑点杂交法(PCR-RDB)分析部分HBsAg阳性样本的病毒载量、HBV基因型和耐药突变基因。 **结果** 35 184份样本共筛查出HBsAg阳性样本824份,阳性率为2.34%。男性献血者的阳性率(2.56%)明显高于女性(1.82%),两者之间的差异有统计学意义($\chi^2=17.16, P<0.01$)。在73份乙肝基因分型的结果中,B基因型占87.7%(64/73),C基因型占8.2%(6/73),B+C混合基因型占4.1%(3/73),未检出D基因型,不同HBV亚型DNA表达量无明显差异($P>0.05$)。在73份样本中,仅检测出HBV拉米夫定耐药相关突变4例,未检出任何HBV阿德福韦耐药突变基因。 **结论** 潮州市献血者HBV感染阳性率呈平稳趋势。献血者中存在少量乙肝耐药基因突变,我们应予以重视和进一步研究。

[关键词] 乙型肝炎病毒;血清学;乙肝病毒基因型;献血者

The serological and molecular characterization of hepatitis B virus infection in blood donors in Chaozhou, Guangdong province

LU Yuxiang*, ZHOU Yun

(Chaozhou Blood Center, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

[ABSTRACT] **Objectives** To investigate the prevalence, serological and molecular characteristics of hepatitis B virus (HBV) infections of blood donors in Chaozhou, Guangdong province. **Methods** From January 2013 to December 2016, a total of 35 184 blood donors were screened for HBsAg by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Some blood donors with positive HBsAg were analyzed for virus load, HBV genotypes, and drug-resistance mutations by real-time fluorescent quantitative-PCR, PCR reverse dot blot hybridization (PCR-RDB). **Results** A total of 824 HBsAg positive samples were detected from 35 184 blood donors. The infection rate was 2.34%. The infection rate was higher in males (2.56%) than in females (1.82%), and the difference was statistically significant ($\chi^2=17.16, P<0.01$). Of 73 samples genotyped, genotype B constituted 87.7% (64/73), genotype C was 8.2% (6/73), C+B were 4.1% (3/73), and none of genotype D were detected. There were no significant differences in the expression of DNA in different HBV subtypes ($P>0.05$). Of the 73 samples, HBV lamivudine resistant mutations were found in 4 samples, and no HBV adefovir resistance mutations were detected. **Conclusion** The HBV infection rate illustrated a stable trend in Chaozhou. There were only a few cases of HBV drug-resistant mutations in the blood donors, therefore these mutations require more attention and further investigation in the future.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; Serology; Hepatitis B viral genotype; Blood donor

基金项目:潮州市卫生和计划生育局科研项目(潮卫科研2017085)

作者单位:潮州市中心血站,广东,潮州 521000

*通信作者:卢玉香, E-mail:172852229@qq.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的感染是危害人类健康最严重的问题之一,其呈世界性流行,全球约有20亿人口感染HBV,其中包括大约2.4亿的慢性感染携带者,每年约有65万人死于HBV感染所致的肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。我国是HBV感染中等流行区,面临HBV感染的严重威胁。2006年全国乙型肝炎血清流行病学调查表明,我国1~59岁一般人群的HbsAg携带率为7.18%。据此推算,我国有乙肝感染者约9300万人,其中慢性乙肝感染患者约2000万^[2]。HBV主要经血(如不安全注射等)、母婴及性接触传播。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)病毒性肝炎秘书处的报道,通过不安全血制品传播HBV的风险性极大,可高达70%^[3]。为了解潮州地区无偿献血人群HBV感染血清学和分子生物学特征,为提高输血安全提供理论和实践依据,我们对2013至2016年度无偿献血人员HBV感染情况进行分析,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013年1月至2016年12月期间在潮州市(湘桥区、枫溪区、潮安区和饶平县)采集无偿献血者合计35184人,其中男24873名,女10311名,年龄在18~55周岁之间,平均年龄37.5岁。所有研究均获得潮州市中心血站伦理委员会的批准及参与者的知情同意。

1.2 试剂和仪器

HBsAg酶联免疫吸附法试剂盒[英科新创(厦门)科技有限公司、北京万泰生物药业股份有限公司];HBV DNA提取试剂盒(磁珠法)(上海浩源生物科技有限公司);HBV-DNA实时荧光定量PCR试剂盒(上海浩源生物科技有限公司);HBV基因分型及耐药突变基因检测试剂盒(PCR-反向斑点杂交法)[亚能生物技术(深圳)有限公司];低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);EZbead磁珠法自动核酸提取系统(美国德克萨斯生物基因公司);ABI 7500荧光定量PCR仪(ABI,美国);PCR基因扩增仪(杭州博日科技有限公司);COMBI-H12型分子杂交仪(FINEPCR,韩国)。

1.3 HBsAg检测及判定

用无抗凝真空管采集35184名献血者每人静

脉血3 mL,置于离心机中3000 r/min离心10 min,分离血清。采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)对血清进行HBsAg初复检,所有操作均严格按照说明书进行。按照试剂说明书的标准进行结果判定,规则如下:(1)样本OD值S/CO \geq 1者为HBsAg阳性;样本OD值S/CO $<$ 1者为HBsAg阴性;(2)阴性对照OD均值 $>$ 0.1或阳性对照OD均值 \leq 0.4时,实验无效,应重新试验。

1.4 病毒核酸提取

随机选取上述判定为HBsAg阳性的样本250例,且样本无溶血、脂血现象。吸取1 mL血清置于1.5 mL离心管中, -20°C 保存;采用磁珠法试剂盒提取HBV-DNA,所有操作均由EZbead磁珠法自动核酸提取系统完成,严格按照仪器及试剂说明书进行。

1.5 HBV-DNA实时荧光定量PCR

采用HBV-DNA荧光定量PCR试剂盒检测各样本HBV-DNA拷贝数,荧光定量PCR在ABI 7500荧光定量PCR仪上完成。

1.6 HBV基因分型及耐药性突变基因检测

随机从上述DNA样本中选取73份HBV-DNA $>$ 1000 IU/mL的DNA样本,采用PCR-反向点杂交法检测HBV基因分型及耐药突变基因。该斑点杂交芯片能同时检测3种HBV基因型(HBV-B、HBV-C和HBV-D)和HBV拉米夫定耐药3个常见的突变位点(rt180、rt204和rt207)、HBV阿德福韦酯耐药2个常见的突变位点(rt181和rt236)。检测严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0对数据进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年度、性别和年龄的献血者HBsAg阳性率

在35184份献血者血液中,824份(2.34%)样本经ELISA法确证为HBsAg阳性。各年度阳性率分别为2.83%(2013年)、2.28%(2014年)、1.95%(2015年)和2.25%(2016年),年度之间基本呈现平稳趋势;从总体来说,HBsAg阳性检出率在男性献血者中(2.56%)明显高于女性献血者(1.82%),两者

之间的差异有统计学意义($\chi^2=17.16, P<0.01$)。将献血者按照年龄分为5组,每个年龄段的HBsAg阳性率见表2。与献血人数最多的31~40岁组相

比较,21~30岁组和41~50岁组的HBsAg阳性率明显高于31~40岁组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表1 不同年度、性别献血者HBsAg检出情况
Table 1 HBsAg in blood donors of different years and gender

时间(年)	检测人数		HBsAg 阳性[n(%)]		χ^2	P
	男	女	男	女		
2013	6 980	2 190	204(2.92)	56(2.56)	0.81	>0.05
2014	5 800	2 814	149(2.57)	48(1.71)	6.32	<0.05
2015	5 891	2 640	129(2.19)	38(1.44)	5.35	<0.05
2016	6 202	2 667	154(2.48)	46(1.72)	4.87	<0.05
合计	24 873	10 311	636(2.56)	188(1.82)	17.16	<0.01

表2 不同年龄段献血者HBsAg检出情况
Table 2 HBsAg in blood donors of different age group

年龄(岁)	HBsAg 阳性	χ^2	P
18~20	2.45%(102/4 169)	2.80	>0.05
21~30	2.58%(224/8 689)	7.37	<0.01
31~40	2.01%(250 /12 407)		
41~50	2.59%(213/8 216)	7.51	<0.01
50~55	2.01%(35/1 739)	0.00	>0.05

2.2 乙肝病毒基因型和耐药突变的分布在随机选择的250份HBsAg阳性血样中,经荧

光定量PCR筛查出147份HBV-DNA阳性,对其中73份病毒载量>1 000 IU/mL的样本进行HBV基因型和耐药突变分析。此73份样本分别检出HBV B基因型64例,占87.7%;HBV C基因型6例,占8.2%;HBV B、C混合基因型3例,占4.1%,未检出HBV D基因型。HBV B基因型的检出率明显高于HBV C基因型,但不同HBV基因型DNA表达量之间差异无统计学意义($P>0.05$)(表3)。在73份样本中,仅检测出HBV拉米夫定耐药相关突变4例,未检出任何HBV阿德福韦耐药相关突变,详见表3。

表3 73份样本的基因型、HBV病毒载量及耐药突变分布情况比较
Table 3 Comparison of genotype, HBV viral load and drug-resistance mutations in 73 samples

基因型	%(n/N)	HBV DNA 水平 (log ₁₀ IU/mL)	rt180M	rt204V	rt207I	rt181V	rt236T	W	合计
B型	87.7%(64/73)*	5.70±1.51	1	2	0	0	0	61	64
C型	8.2%(6/73)*	5.68±1.23	0	0	0	0	0	6	6
B+C型	4.1%(3/73)	5.63±1.61	0	1	0	0	0	2	3
合计	100%		1	3	0	0	0	69	73

n:每种基因型数量,N:检测基因型样本的总数,W:HBV野生型;B型组、C型组与B+C型组混合组比较,* $P<0.01$ 。

3 讨论

广东省从1992年起开始大力推行乙肝疫苗的预防接种工作,经过多年努力,广东省乙肝防治工作,尤其是儿童乙肝防治工作取得了显著成效。从广东省2014~2015年涉及169 211人的乙肝病毒社区流行病学调查数据可以看出,广东省的HBsAg阳

性率为8.76%,在0~12岁的儿童群体中HBsAg阳性率低至0.29%,在23~59岁的成人群体中HBsAg阳性率高达12.71%,广东省仍然是乙肝高度流行区域^[4]。由于在无偿献血者中,健康人群所占比例较一般人群高,因此本次潮州地区的献血者中HBsAg阳性率2.34%(824/35 184)明显低于广东省的一般人群的水平。HBsAg在中国不同地区的差异明显,

潮州地区 HBsAg 阳性率高于海南省(1.29%)^[5]、江苏南京(0.34%)^[6]、山东济南(0.067%)^[7]、四川绵阳(1.44%)^[8]和哈尔滨(2.1%)^[9]。由于至今未见任何潮州地区成人人群的 HBsAg 流行病学调查报告,尽管数据可比性差,笔者只能将本研究的数据与1997年倪孟汉等^[10](10.20%),2012年帅军等^[11](3.25%) 在潮州地区中小学生的调查数据做比较。基于根据2014年中国疾病预防控制中心(Chinese Center For Disease Control And Prevention, CDC)的调查数据^[12],我国人群呈现出年龄越小,HBsAg 携带率越低的趋势。本研究对本地成人献血者的调查数据却明显低于本地区中小學生人群^[10-11],笔者推断其原因如下:首先,本研究的对象为无偿献血者,有可能是因为近些年无偿献血活动的开展,多次献血者被淘汰,导致阳性率降低;其次,自从1992年乙肝疫苗预防接种在我国纳入免疫规划以来,我国乙肝控制取得显著成效,HBsAg 阳性率在人群中逐渐下降^[4]。

笔者发现,潮州男性献血者 HBsAg 阳性率显著高于女性,这一点与我国其他地区的观察结果一致^[7]。众所周知,HBV 感染是可以通过疫苗来进行预防的,理论上来说男女献血者之间的 HBsAg 阳性率应无差异。造成这两者的之间差异可能是男性的社会活动范围大于女性,与社会上感染人员接触机会多,其感染几率增加^[13]。另外,在5个年龄组中,31~40岁组的 HBsAg 阳性率明显低于其他4个年龄组($P < 0.05$)。笔者认为产生这种差异可能是由于在这个年龄区段有较多的献血者是潮州市事业单位人员(如医务人员、教师等),这些人有较强的健康意识和较高的文化水平,因此影响了这个年龄区段的 HBsAg 阳性率。

按照 HBV 全基因序列的异源性,可将其分为 A-H 共8种基因型,在全球存在一定的地理特征分布。A 基因型主要分布在北欧和非洲大陆,B、C 2种基因型主要分布在东亚地区,D 基因型主要分布在中东以及北美地区,E、F 2种基因型主要分布在南美和非洲地区,G 基因型在法国以及美国常见,而 H 基因型则主要在美国、墨西哥以及尼加拉瓜地区^[14]。我国南北差异较大,北方地区以 C 型为主,南方以 B 型为主,而西藏和新疆等少数民族聚集地多以 D 型为主^[14]。本研究分析了73份病毒载量 $> 1\ 000\ \text{IU/mL}$ 的样本的基因型和耐药突变,本研究的结果提示潮州地区 HBV 病毒感染可能是以

B 型和 C 型为主,C 型的感染可能是导致本地区 HBV 感染者肝硬化和肝癌的危险因素。这个结果与2012年陈立华等对本地区慢性乙肝患者中 HBV 基因型的调查一致^[15],也与中国大部分 HBV 基因型为 B 型和 C 型的流行病学报道一致^[14, 16]。

拉米夫定作为乙肝一线抗病毒治疗药物,其主要耐药机理为 HBV DNA 聚合酶基因发生突变^[17],导致与拉米夫定的结合力降低,突变主要分布在 B 区和 C 区,尤其是 C 区 YMDD 变异最为常见,其主要形式为 YIDD 或 YVDD^[17]。在本研究中,虽然绝大多数样本为野生型(未发现耐药突变),但也在3例样本中检测出 HBV 拉米夫定耐药 YVDD 突变。HBV 耐药突变多在那些长期使用抗病毒药物治疗的乙肝患者中发现,但目前对于献血人群 HBV 耐药变异的研究仅有少量报道,这应给予足够的重视和进一步的研究。

参考文献

- [1] Liang P, Zu J, Yin J, et al. The independent impact of newborn hepatitis B vaccination on reducing HBV prevalence in China, 1992 - 2006: A mathematical model analysis[J]. *J Theor Biol*, 2015, 386:115-121.
- [2] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J].*中国病毒病杂志*, 2015, 5(6):401-424.
- [3] 李婷婷,黎诚耀.献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染研究进展[J].*临床输血与检验*, 2014, 16(3):331-336.
- [4] Zeng F, Guo P, Huang Y, et al. Epidemiology of hepatitis B virus infection: results from a community-based study of 0.15 million residents in South China [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36186.
- [5] 蔡于旭,章雅清.海南地区无偿献血者血液筛查不合格情况分析[J].*海南医学*, 2017, 28(6):1013-1015.
- [6] 胡珀璐,鲍晶晶,印澄,等.南京地区无偿献血人群 HBV 感染情况调查[J].*中国输血杂志*, 2017, 30(5):448-451.
- [7] 滕彬,刘建云,唐建华,等.2010~2011年济南市部分在校大学生无偿献血者乙肝等检测分析[J].*预防医学论坛*, 2014, 20(3):218-219.
- [8] 席娜娜,左宗力,隆素素,等.四川省绵阳市乙型肝炎病毒感染现况研究[J].*四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(1):101-106. (下转第55页)

结直肠癌患者血浆中可溶性血栓调节蛋白的水平及其临床意义

白驹 杨力芳*

[摘要] **目的** 观察结直肠癌患者血浆中可溶性血栓调节蛋白(soluble thrombomodulin, sTM)水平,探究其与结直肠癌病情进展的关系。**方法** 选取中南大学湘雅医院2014年1月至2016年9月普外科结直肠癌患者血样60例为肿瘤组,体检中心正常体检人群血样60例为正常组,以及1活动期溃疡性结肠炎患者血样20例为溃疡组,应用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测3组患者血浆中sTM水平,比较3组sTM水平的差异及治疗前后结直肠癌患者sTM水平的变化。利用Spearman相关性分析法分析结直肠癌患者的TNM分期系统与患者血浆中sTM水平的相关性。**结果** 单纯手术及手术联合化疗患者的sTM水平在术后2个月及以后均出现显著降低,且手术联合化疗组患者的sTM水平显著低于单纯手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肿瘤组血浆sTM水平显著高于正常组和溃疡组,差异有统计学意义($P < 0.05$);溃疡组sTM水平显著高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且结直肠癌患者TNM分期与sTM水平呈正相关($r_s=0.675, P < 0.05$)。**结论** 结直肠癌患者血浆中sTM水平能在一定程度上反应病情的进展情况,是潜在的肿瘤诊断分子标志物。

[关键词] 结直肠癌;可溶性血栓调节蛋白;TNM分期;血管内皮细胞

The level and clinical significance of plasma soluble thrombomodulin in patients with colorectal cancer

BAI Ju, YANG Lifang*

(Cancer Institute, School of Basic Medical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan, China, 410008)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the level of plasma soluble thrombomodulin (sTM), and investigate its relationship with the progression of colorectal cancer. **Methods** 60 cases of blood samples from patients with colorectal cancer were selected as the tumor group in the general surgery department of Xiangya Hospital of Central South University from January 2014 to September 2016, 60 cases of blood samples from the healthy population were selected as the normal group in the medical examination center, and 20 cases of blood samples from patients with active ulcerative colitis were selected as the ulcer group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test the levels of sTM in the 3 groups. The differences in plasma sTM levels among the 3 groups and the changes of sTM levels in colorectal cancer patients before and after treatment were compared. Spearman's rank correlation was employed to analyze the correlation between classification of TNM and plasma level of sTM in patients with colorectal cancer. **Results** 2 months after surgery, the levels of sTM in patients with surgery and surgery combined with chemotherapy were significantly decreased and more in surgery combined with chemotherapy group of patients ($P < 0.05$). The plasma level of sTM in patients with colorectal cancer was significantly higher than that in the normal and ulcer group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The comparison of the plasma sTM level also revealed statistical significance between normal and ulcer groups ($P < 0.05$), and TNM stage of colorectal cancer patients

作者单位:中南大学基础医学院肿瘤研究所,湖南,长沙410008

*通讯作者:杨力芳, E-mail:1841380028@qq.com

and sTM levels were positively correlated ($r_s=0.675$, $P<0.05$). **Conclusion** The plasma sTM level in patients with colorectal cancer can partially reflect the progress of the cancer, it is a potential tumor molecular marker for diagnosis.

[KEY WORDS] Colorectal cancer; Soluble thrombomodulin; TNM stage; Vascular endothelial cells

随着人口老龄化的加重和生活方式的变化,中国结直肠癌的发生率和死亡率逐年攀升,到2015年止,结直肠癌在中国城市癌症发病率中位居第三位,死亡率位居第四位^[1-2],严重影响人类的生命健康。如何有效评估患者病情并明确其发生发展机制是临床及基础工作中面临的首要问题。可溶性血栓调节蛋白(soluble thrombomodulin, sTM)是一种存在于血管内皮细胞表面的糖蛋白,在血管内皮受损伤后可快速释放入血,可作为检测血管内皮损伤的标志物^[3]。近年来许多研究显示,sTM与急性淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤存在密切关系^[4-5],本研究旨在通过检测结直肠癌患者血浆中sTM水平及其在不同发展阶段的变化,探讨其在结直肠癌中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

观察对象为中南大学湘雅医院2014年1月至2016年9月普外科收治的60例结直肠癌患者,年龄在37~69岁,平均51岁,其他基本情况见表1。表1中的高恶性指病理检查结果为低分化的腺癌,TNM分期根据国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)和美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)合作制定的第7版肿瘤TNM分期^[6]。体检中心60例正常成人,其中男性35人,女性25人,年龄在37~70岁,平均年龄54岁;活动期溃疡性结肠炎患者20例,男性12例,女性8例,年龄在31~64岁,平均46岁。3组患者男女比例及年龄无显著差异($P>0.05$),具有可比性。所有结直肠癌患者均为首次发现结直肠癌,入院前未接受任何抗癌治疗,且不合并其他影响凝血功能的疾病,以及其他器质性疾病。

1.2 检测方法

采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测3组观察对象血浆中sTM水平,所用试剂盒由法国Dignosticastago公司提供,取患者入院后2h以内及治疗后1~2周的静脉血2 mL,体检中心单次采血2 mL,分装1 mL于

表1 结直肠癌患者临床病理资料

Table 1 Clinical pathological data of colorectal cancer patients

临床病理特征	n(%)
性别	
男	35(58.3)
女	25(41.7)
TNM分期	
I期	6(10.0)
II期	15(25.0)
III期	19(31.7)
IV期	20(33.3)
恶性程度	
低/中恶性	38(63.3)
高恶性	22(36.7)

抗凝管中,轻摇后,4℃ 3 000 r/min离心10 min, -80℃保存待测。检测时按试剂盒说明书操作。

1.3 治疗方法

术前PET-CT(positron emission tomography-CT)评估TNM分期,采用以手术为主的综合治疗原则,根据患者全身状况和各个器官的功能状态、肿瘤的位置、分期、病理类型等决定综合治疗措施。所有患者均行手术治疗,手术方法:患者于术前行纤维结肠镜检查,观察原发灶情况,在距肿瘤缘10 cm结扎肿瘤两侧肠管,腔内注入30 mg/kg的5-氟尿嘧啶,离断肠系膜血管行根部淋巴结清扫术,肠道重建并缝合切口,放置引流管,关闭腹腔。其中39例III期及IV期患者采用5-氟尿嘧啶(375 mg/m²)联合亚叶酸钙(20 mg/m²)的辅助化疗方案,疗程总时长6个月。患者每2个月定期复查血浆sTM水平,中途丢失的病例以最近一次检测结果代替。

1.4 统计分析

采用SPSS 19.0统计分析软件,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差分析比较检查结果, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,两两比较采用SNK法,sTM与TNM分期之间相关性分析采用Spearman相关分析。

2 结果

2.1 肿瘤组患者sTM的变化趋势

比较结直肠癌患者治疗过程中sTM水平的变化情况,结果显示,术后2月及以后,单纯手术组患

者及手术联合化疗治疗的患者的sTM水平均出现显著下降($P < 0.05$),手术联合化疗组在术后第2月时的sTM水平显著低于单纯手术组的sTM水平($P < 0.05$),在术后第4月及第6月时差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 肿瘤组患者在治疗过程中sTM水平的变化情况 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

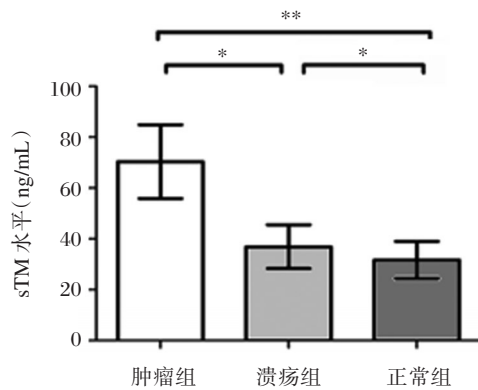
Table 2 The change of sTM level in the tumor group during treatment ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	n	术前	术后1天	术后2月	术后4月	术后6月
单纯手术组	21	69.7±13.9	70.7±11.6	59.1±10.4*	50.6± 8.3**	43.9±7.5**
手术联合化疗组	39	73.8±12.3	72.8 ± 15.8	54.5± 12.6* [△]	53.9± 7.1**	48.4±8.7**

相比术前* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 相比单纯手术[△] $P < 0.05$ 。

2.2 治疗前肿瘤组、溃疡组及正常组sTM水平比较

比较结直肠癌患者治疗前与溃疡组及正常组sTM水平之间的差异,结果显示,肿瘤组血浆中sTM水平为(70.4±14.5)ng/mL,显著高于溃疡组(36.9±8.6)ng/mL及正常组(31.7±7.3)ng/mL,差异有统计学意义(总F值为17.14,两两比较结果分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。溃疡组sTM水平显著高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 各组血浆sTM表达水平比较

Figure 1 Comparison of plasma sTM expression between each groups

2.3 肿瘤组TNM分期与sTM水平的关系

从表3结果可以看出,随着患者TNM分期的升高,sTM水平逐渐上升,组间差异具有统计学意义($P < 0.001$),且II、III、IV期患者与正常组差异具有统计学意义($P < 0.05$),I期患者与正常组差异无统计学意义($P > 0.05$)。Spearman相关性分析的结果显示,结直肠癌患者TNM分期与sTM水平呈正相关($r_s = 0.675$, $P < 0.05$)。

表3 正常组及肿瘤组不同TNM分期的患者sTM水平

Table 3 The sTM levels of the patients in the normal group and tumor group with different TNM stages

组别	n	sTM (ng/mL)
正常组	60	31.7 ± 10.3
肿瘤组		
I期	6	34.9 ± 25.0
II期	15	62.7 ± 22.5 [△]
III期	19	68.5 ± 24.4 [△]
IV期	20	77.2 ± 26.7 [△]
F值	-	22.83
P值	-	<0.001

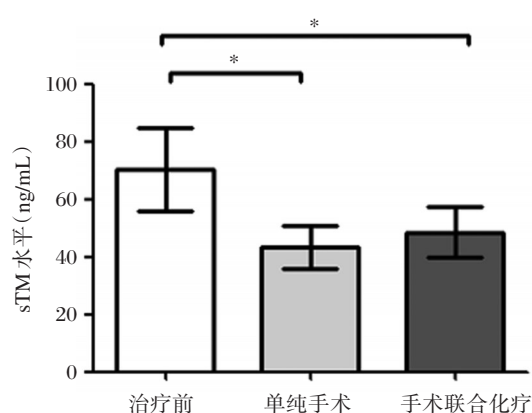
与正常组相比,[△] $P < 0.05$ 。

2.4 治疗前后结直肠癌患者sTM水平的变化

随访6个月后检测患者血浆中sTM水平,结果显示,行单纯手术治疗的患者治疗后sTM水平(43.9±7.5)ng/mL,手术联合辅助化疗的患者治疗后sTM水平(48.4±8.7)ng/mL,显著低于治疗前(70.4±14.5)ng/mL,差异有统计学意义(总F值为9.38,两两比较结果均为 $P < 0.05$)。单纯手术患者与手术联合辅助化疗患者sTM水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见图2。

3 讨论

sTM是存在于血管内皮细胞膜上的跨膜糖蛋白,生理情况下仅有少量由内皮细胞膜表面水解游离于血浆中。当内皮细胞大量受损时,其在血浆中的含量就会明显升高,因此sTM可作为反映内皮细胞损伤的标志物之一。恶性肿瘤的转移是导致患者死亡的主要原因,其发生过程主要经过局部浸润,侵入血管内皮进入循环系统,随血液循环系统



与治疗前相比, * $P < 0.05$ 。

图2 治疗前后结直肠癌患者血浆 sTM 表达水平比较

Figure 2 Comparison of plasma sTM levels in patients before and after treatment

转移并在血管中存活、移出,在转移部位定植。肿瘤细胞由原发部位浸润侵入循环系统后,作为游离的微转移灶是十分脆弱的,它们的转移潜力很大程度上取决于逃避免疫系统的能力和穿透血管内皮屏障的能力,然而目前其穿透血管内皮屏障的机制尚不完全明确。有许多研究报道,恶性肿瘤可通过多种途径损伤内皮细胞的结构和功能,以促进游离的肿瘤细胞定植,如研究显示,体内和体外的肿瘤细胞均能通过上调 NF- κ B 和 JNK 通路及 caspase-8-FLIPL 通路等^[7-11],促进淀粉样前体蛋白和其死亡受体-6(death receptor 6, DR-6)的表达,诱导内皮细胞坏死^[12],促进肿瘤细胞的外渗和转移。Thuringer 等^[13]的研究显示,结直肠癌细胞可通过影响毛细血管内皮细胞的紧密连接,使得内皮细胞功能发生障碍,有利于肿瘤细胞的迁移。sTM 水平的上调可能是由于恶性肿瘤致内皮细胞损伤使血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)释放入血所致。Hagag 等^[4]也在其研究中发现急性淋巴细胞白血病患者中持续高水平的 sTM 预示着不良预后。同时, Liu 等^[5]在其体外实验中发现干扰非小细胞肺癌 A549 细胞的 TM 的表达可显著增强细胞的侵袭转移能力; Wu 等^[14]在研究中发现抑制膀胱癌细胞 TM 的表达可促进肿瘤细胞的增殖及上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程的发生,并可促进血管生成; Zheng 等^[15]发现 TM 在非小细胞肺癌中可引起细胞 G1 期阻滞的发生和显著降低细胞克隆形成的能力,同时可显著升高钙粘附蛋白 E(E-cadherin)的表达,促进细胞间

黏附作用,逆转 EMT 的过程。综上, sTM 可能作为一种血管保护因子或肿瘤抑制因子,在体内发挥着拮抗肿瘤细胞侵袭转移的作用。

本研究显示,结直肠癌患者血浆 sTM 水平显著高于活动期溃疡性结肠炎患者及正常人群,姜齐宏等^[16]也在结直肠癌患者血清中发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的升高,推测结直肠癌的发生发展可能对血管内皮细胞产生损伤。进一步对结直肠癌患者各个 TNM 分期的人群与正常人群的血浆 sTM 水平比较,结果发现, I 期患者与正常人群差异无统计学意义,提示未发生淋巴结转移或远处转移的结直肠癌患者,可能由于血管内皮细胞无明显损伤, sTM 水平差异不显著。然而 II、III、IV 期患者出现局部淋巴结转移或远处转移,血管内皮细胞出现不同程度的损伤, sTM 水平随之升高。Spearman 相关性分析的结果显示 TNM 分期的级别与患者血浆 sTM 水平呈正相关,进一步证实了结直肠癌发生发展与 sTM 的密切关系。手术或联合化疗治疗后,患者 sTM 水平也随之降低,推测是由于癌细胞进展的控制,血管内皮细胞损伤减轻所致。单纯手术患者治疗后第 2 个月的 sTM 水平显著高于手术联合化疗组,推测可能的原因是由于手术联合化疗药物的短期疗效优于单纯手术,但第 6 个月后单纯手术患者 sTM 水平略低于手术联合化疗组,可能是因为手术联合化疗组患者本身来源于 III、IV 期结直肠癌患者,病情较重,即使短期控制效果优于单纯手术组,但长远疗效低于单纯手术组。郑娜娜^[17]在其研究中发现 TM 可抑制肺癌细胞的成瘤能力及迁移作用,是潜在的抑癌蛋白。基于 sTM 与结直肠癌病情严重程度的密切关系以及上述已有的研究,推测 sTM 可能通过促进细胞间的紧密连接,实现对抗结直肠癌细胞侵袭转移的过程,以及对肿瘤 EMT 过程的逆转,实现对结直肠癌细胞分子分型的影响。

本研究对 sTM 在不同情况下结直肠癌患者血浆中的表达水平进行了探究,但 sTM 在结直肠癌的侵袭转移过程中的作用并不明确,笔者拟进一步通过体内体外实验对其确切作用进行探究,进一步挖掘 sTM 在临床和基础工作中的潜在价值。综上所述, sTM 不仅能够有效地反映结直肠癌的发生发展情况,也为明确结直肠癌发生侵袭转移的机制提供了线索,是潜在的肿瘤诊断分子标志物。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1):11-30.
- [2] 沈琳. 重视大肠癌的早期防治[J]. *健康指南: 医疗保健服务*, 2016, 6(10):49-50.
- [3] Chao TH, Tsai WC, Chen JY, et al. Soluble thrombomodulin is a paracrine anti-apoptotic factor for vascular endothelial protection [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(2):340-349.
- [4] Hagag AA, Abdel-Lateef AE, Aly R. Prognostic value of plasma levels of thrombomodulin and von Willebrand factor in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2014, 20(5):356-361.
- [5] Liu PL, Tsai JR, Chiu CC, et al. Decreased expression of thrombomodulin is correlated with tumor cell invasiveness and poor prognosis in non small cell lung cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(10):874-881.
- [6] 薛卫成, 顾晋. 第7版结直肠癌TNM分期(2010)的变化及意义[J]. *中华外科杂志*, 2010, 48(21):1605-1606.
- [7] Silke J, Rickard J A, Gerlic M. Erratum: The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(7):689-697.
- [8] Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis [J]. *Nature*, 2011, 471(7338):363-367.
- [9] Kaiser WJ, Upton JW, Long AB, et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice [J]. *Nature*, 2011, 471(7338):368-372.
- [10] Pan G, Bauer JH, Haridas V, et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor [J]. *FEBS Letters*, 1998, 431(3):351-356.
- [11] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(1):58-73.
- [12] Strilic B, Yang L, Albarrán Juárez J, et al. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis [J]. *Nature*, 2016, 536(7615):215-218.
- [13] Thuringer D, Berthenet K, Cronier L, et al. Primary tumor- and metastasis-derived colon cancer cells differently modulate connexin expression and function in human capillary endothelial cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):28800-28815.
- [14] Wu CT, Chang YH, Lin P, et al. Thrombomodulin expression regulates tumorigenesis in bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1):1-11.
- [15] Zheng N, Huo Z, Zhang B, et al. Thrombomodulin reduces tumorigenic and metastatic potential of lung cancer cells by up-regulation of E-cadherin and down-regulation of N-cadherin expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476(4):252-259.
- [16] 姜齐宏, 方向明, 陈艳. 结直肠癌患者血清中血管内皮生长因子和一氧化氮表达水平及其临床意义 [J]. *内科急危重症杂志*, 2012, 18(2):96-97.
- [17] 郑娜娜. 血栓调节蛋白对肺癌细胞致瘤性和迁移的抑制作用及其机制 [D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- (上接第33页)
- [9] 马会, 舒丽莎. Cervista HPV HR 检测在宫颈病变筛查中的研究进展 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(4):641-644.
- [10] Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(12):1789-1799.
- [11] 周成, 郭晓玲, 刘正平, 等. 佛山地区 15 867 例女性 HPV 基因亚型分析 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(3):367-369.
- [12] Singh S, Zhou Q, Yu Y, et al. Distribution of HPV genotypes in Shanghai women [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9):11901-11908.
- [13] Ding X, Liu Z, Su J, et al. Human papillomavirus type-specific prevalence in women referred for colposcopic examination in Beijing [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(11):1937-1943.
- [14] 陈捷, 张璇. 福州地区妇女宫颈人乳头瘤病毒感染流行病学调查分析 [J]. *福建医药杂志*, 2017, 39(2):129-131.
- [15] 罗招云, 杨立业, 翁妙珊, 等. 潮州地区人乳头瘤病毒型别分布特征分析 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(3):177-180.
- [16] Zhao XL, Hu SY, Zhang Q, et al. High-risk human papillomavirus genotype distribution and attribution to cervical cancer and precancerous lesions in a rural Chinese population [J]. *J Gynecol Oncol*, 2017, 28(4):e30.
- [17] Paul KSC, Wendy CSH, Martin CWC, et al. Meta-analysis on prevalence and attribution of human papillomavirus types 52 and 58 in cervical neoplasia worldwide [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e107573.

· 论 著 ·

老年原发性免疫性血小板减少症患者治疗前后T淋巴细胞亚群的变化及意义

萨仁娜¹ 托娅^{1*} 白丽杰² 牛誉栋¹

[摘要] 目的 探讨老年原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)患者治疗前后T淋巴细胞亚群的变化及与临床疗效的关系。方法 选择2014年1月至2016年1月我院收治的80例老年ITP患者(ITP组),给予地塞米松40 mg/d静脉滴注4 d,小剂量利妥昔单抗静脉滴注4周,根据疗效分为有效组($n=59$)和无效组($n=21$),并选择同期在我院体检的健康老年人80例作为对照组。采用流式细胞术检测对照组及ITP患者治疗前后的外周血T淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 、 $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ 的水平变化。结果 治疗前,有效组患者的 CD_8^+ 、 $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ 水平明显低于无效组($P<0.05$),与对照组无明显差异($P>0.05$);无效组患者的 CD_8^+ 、 $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ 水平明显高于对照组($P<0.05$);有效组与无效组患者的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平无明显差异($P>0.05$),2组患者 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 均明显低于对照组($P<0.05$);治疗后,有效组患者的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平较治疗前明显升高($P<0.05$),各项指标与对照组无明显差异($P>0.05$);治疗前后,无效组患者各项指标均无明显变化($P>0.05$)。结论 老年ITP患者存在T淋巴细胞亚群失衡,导致患者免疫功能紊乱,是影响疾病发展和治疗效果的重要因素,动态监测老年ITP患者的T淋巴细胞亚群水平,利于把握治疗时机,提高临床效果。

[关键词] 免疫功能;原发性免疫性血小板减少症;T淋巴细胞亚群

Changes and significance of T lymphocyte subsets before and after treatment in elderly patients with primary immune thrombocytopenia

SA Rennan¹, TUO Ya^{1*}, BAI Lijie², NIU Yudong¹

(1. Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China, 010050; 2. Rheumatism Immunity Branch, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China, 010050)

[ABSTRACT] Objective To investigate the changes of T lymphocyte subsets in senile patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) before and after treatment and the relationship between these changes with clinical efficacy. Methods 80 senile patients with ITP (ITP group) enrolled in our hospital from January 2014 to January 2016, were given dexamethasone 40 mg/d for 4 d, small doses of rituxan for 4 weeks. According to the curative effect, patients were divided into effective group ($n=59$) and invalid group ($n=21$). In the same period, 80 healthy elderly subjects in our hospital were selected as the control group. The changes of peripheral blood T lymphocyte subsets, CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ , CD_4^+/CD_8^+ and $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ levels in the control group and ITP group were detected by flow cytometry. Results Before treatment, the CD_8^+ and $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ levels of the effective group were significantly lower than that of the invalid group ($P<0.05$), and there were no significant differences compared with that of the control group ($P>0.05$). The CD_8^+ and CD_4^+

基金项目:内蒙古医科大学附属医院重大科研项目 NYFYZD005

作者单位:1. 内蒙古医科大学附属医院检验科,内蒙古,呼和浩特 010050

2. 内蒙古医科大学附属医院风湿免疫科,内蒙古,呼和浩特 010050

*通讯作者:托娅, E-mail: antuoya@163.com

CD25⁺/CD4⁺ levels of the invalid group were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$); there were no significant differences in the levels of CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in effective group and invalid group ($P>0.05$). The CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ levels of the effective and invalid group were significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). After treatment, the levels of CD3⁺, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in effective group were significantly increased compared with those before treatment ($P<0.05$), and there were no significant differences between the effective group and the control group ($P>0.05$). Before and after treatment, the invalid group showed no obvious changes ($P>0.05$). **Conclusion** T lymphocyte subsets imbalance exists in elderly ITP patients and immune function disorders in patients. This is an important factor affecting the development and treatment of diseases. According to the levels of T lymphocyte subsets monitored continuously in elderly patients with ITP, the therapeutic effect can be measured.

[KEY WORDS] Immunity; Primary immune thrombocytopenia; T lymphocyte subsets

原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)是临床常见出血性疾病,儿童、育龄妇女及老年人是ITP的高发人群,临床表现为血小板数量减少,皮肤黏膜出血,严重患者可引起内脏出血或死亡^[1-2]。目前ITP的发病机制尚未明确,一般认为与患者机体免疫功能紊乱有密切关系,但近期研究发现T细胞异常活化、T细胞亚群比例失调、巨核细胞成熟障碍等因素也参与ITP疾病的发生和发展过程,外周血中自然杀伤(natural killer, NK)细胞数目及功能异常亦能影响病情进展^[3]。ITP治疗多采用脾切除、免疫抑制剂等非特异性手段,但老年患者因合并症多,影响因素较多,导致治疗效果并不十分显著^[4]。为对老年ITP患者的临床治疗提供参考,本研究通过观察80例老年ITP患者治疗前后T淋巴细胞亚群的水平变化,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2014年1月至2016年1月间在我院诊治的老年ITP患者80例作为ITP组,男43例,女37例;年龄60~80岁,平均年龄(69.54±6.27)岁。纳入标准:①确诊为原发性血小板减少症;②年龄≥60岁;③血小板计数 $<30\times 10^9/L$;④均为新诊断患者,近1个月内未接受过免疫抑制剂治疗及血小板输注。排除标准:①合并肝、肾、心、肺功能不全患者;②肿瘤患者;③其他原因导致血小板减少患者。选择同期在我院体检的80例健康老年人作为对照组,排除标准:血小板计数 $<30\times 10^9/L$,患有消化道溃疡、感染、免疫缺陷、糖尿病、高血压、冠心病、恶性肿瘤、病毒性肝炎等基础疾病者。对照组包括男44例,女36例;年龄60~81岁,平均年龄(70.13±6.32)岁,血小板计数均 $\geq 100\times 10^9/L$ 。2组患者在性别、年龄等

方面无明显差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 治疗方法

所有患者给予地塞米松(国药准字2001H4512,天津金耀药业有限公司)40 mg/d静脉滴注,连续4 d;利妥昔单抗(国药准字J20080054, F. Hoffmann-La Roche Ltd.)100 mg加入100 mL生理盐水,静脉滴注,每周1次,连续4周。在治疗过程中,辅以氨甲苯酸、酚磺乙胺等止血药物,若患者伴活动性出血或出现血小板计数 $<10\times 10^9/L$,则给予血小板悬液输注。

1.3 检测方法

采用流式细胞术检测T淋巴细胞亚群水平变化。分别于治疗前及治疗1周后,取对照组及老年ITP患者空腹静脉血2 mL,EDTA抗凝,取50 μL 外周血分别加入鼠抗人单克隆抗体(由美国BD公司提供)CD₂-FITC、CD₃-FITC、CD₄-APC、CD₈-PE、CD25-PE 20 μL ,室温避光孵育20 min,再加入溶血素450 μL ,室温避光孵育10 min后,采用FACSCalibur流式细胞仪(BD,美国)上机检测,应用Multi-SET软件计算T淋巴细胞亚群CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺的百分率及CD₄⁺/CD₈⁺、CD₄⁺CD25⁺/CD₄⁺的比值。计算方法:CD₃⁺%=CD₃⁺细胞数/所获取的淋巴细胞总数,CD₄⁺%=CD₃⁺CD₄⁺双阳性细胞数/CD₃⁺细胞数,CD₈⁺%=CD₃⁺CD₈⁺双阳性细胞数/CD₃⁺细胞数。

1.4 疗效判定标准

完全缓解(complete remission, CR):血小板计数 $\geq 100\times 10^9/L$ 且无出血;有效(remission, R):血小板计数 $\geq 30\times 10^9/L$,比治疗前血小板计数增加2倍,无出血;无效(no remission, NR):血小板计数 $<30\times 10^9/L$ 或血小板计数增加小于治疗前的2倍,有出血^[5];治疗有效率=(CR+R)/总例数 $\times 100\%$ 。完全

缓解及有效患者纳入有效组,无效患者纳入无效组。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验;计数资料以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 老年 ITP 患者治疗结果

治疗后,21 例患者完全缓解,38 例患者有效,有效组患者共 59 例,无效组患者 21 例,无死亡病例,总有效率为 73.75%。

2.2 治疗前各组 T 淋巴细胞亚群检测结果比较

治疗前,有效组患者的 CD_8^+ 、 $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ 水平明显低于无效组 ($P < 0.05$),与对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$);无效组患者的 CD_8^+ 、 $CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$);有效组与无效组患者的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平无明显差异 ($P > 0.05$),2 组患者以上指标均明显低于对照组 ($P < 0.05$),见表 1。

2.3 治疗前后各组 T 淋巴细胞亚群检测结果比较

治疗后,有效组患者的 CD_8^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平较治疗前明显升高 ($P < 0.05$),各项指标与对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$);无效组患者各项指标较治疗前无明显升高 ($P > 0.05$),与对照组相比差异明显 ($P < 0.05$),见表 2。

表 1 治疗前各组 T 淋巴细胞亚群检测结果比较

Table 1 Comparison of T lymphocyte subsets before treatment

组别	<i>n</i>	CD_3^+ (%)	CD_4^+ (%)	CD_8^+ (%)	CD_4^+/CD_8^+	$CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$
对照组	80	72.89±6.15	41.65±3.24	28.47±2.63	1.46±0.28	6.89±1.37
有效组	59	70.54±5.49 ^a	38.27±3.09 ^a	29.16±2.71 ^b	1.31±0.23 ^a	7.18±1.43 ^b
无效组	21	70.21±5.36 ^a	38.11±2.96 ^a	33.24±3.14 ^a	1.15±0.14 ^a	19.54±3.24 ^a
<i>F</i> 值		1.254	1.467	3.843	9.476	3.549
<i>P</i> 值		0.231	0.436	0.849	0.001	1.123

与对照组比较,^a $P < 0.05$;与无效组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 治疗前后各组 T 淋巴细胞亚群检测结果比较

Table 2 Comparison of the results of T lymphocyte subsets among the groups before and after treatment

组别	<i>n</i>	时间	CD_3^+ (%)	CD_4^+ (%)	CD_8^+ (%)	CD_4^+/CD_8^+	$CD_4^+CD_{25}^+/CD_4^+$
有效组	59	治疗前	70.54±5.49	38.27±3.09	29.16±2.71	1.31±0.23	7.18±1.43
		治疗后	72.57±6.21 ^a	41.39±3.26 ^a	28.84±2.65	1.44±0.27 ^a	6.94±1.38
无效组	21	治疗前	70.21±5.36	38.11±2.96	33.24±3.14	1.15±0.14	19.54±3.24
		治疗后	70.43±5.47 ^b	37.96±3.14 ^b	32.17±3.05 ^b	1.17±0.13 ^b	18.86±3.21 ^b
对照组	80		72.89±6.15	41.65±3.24	28.47±2.63	1.46±0.28	6.89±1.37

与治疗前比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

ITP 是自身免疫性的器官特异性血液病,患者外周血血小板计数降低,出血风险增加,严重威胁患者生命健康。目前,ITP 的发病因素尚未完全明确,但普遍认为与患者 T 淋巴细胞亚群分布紊乱、巨核细胞成熟障碍、血小板破坏加速等因素具有密切关系^[6-7]。其中,ITP 患者因自身抗体介导引起血小

板破坏是导致血小板计数减少的主要原因^[8]。除抗 GPIIb/IIIa 和抗 GPIb/IX 抗体等血小板自身抗体外,T 淋巴细胞也参与了 ITP 的发病过程。卢雨萌等^[9]研究指出 CD_8^+ 表达 Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),能够产生穿孔素、颗粒酶等,通过细胞毒作用导致巨核细胞和血小板的凋亡和破坏增加, CD_4^+ 细胞通过分泌多种细胞因子以及提供第二刺激信号等促进 B

细胞的分化增殖、抗体类别转换。杨蕾等^[10]研究指出,T淋巴细胞的表达异常是导致ITP的主要因素,CD₃⁺细胞是细胞免疫的主要活性细胞,可分为CD₄⁺、CD₈⁺2个亚群,在健康机体内CD₄⁺、CD₈⁺的细胞数量处于相对稳定平衡状态,有效维持机体免疫功能,而在ITP患者体内,CD₈⁺细胞、NK细胞以及CD₄⁺/CD₈⁺细胞比例存在异常;张红等^[11]研究发现ITP患者的确存在着CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺CD₂₅⁺T淋巴细胞亚群比例及CD₄⁺/CD₈⁺T淋巴细胞比值均不同程度下降,而CD₈⁺淋巴细胞比例显著增高。本研究发现老年ITP患者的CD₃⁺、CD₄⁺T淋巴细胞百分比正常降低,CD₈⁺百分比明显升高,CD₄⁺/CD₈⁺比值下降,CD₄⁺CD₂₅⁺/CD₄⁺比值升高,充分说明ITP患者的免疫功能遭到破坏,促进了疾病的发生、发展,与以上研究成果一致。

ITP的临床治疗方面尚无特效治疗方法,目前多采用丙种球蛋白、糖皮质激素或二线脾切除手术治疗等方式,具有一定的治疗效果^[12-13]。而老年ITP患者由于临床症状不典型、合并症多,易发展为慢性ITP等特点,增加了治疗难度,一般治疗方案效果并不理想。李振宇等^[14]采用大剂量地塞米松联合小剂量利妥昔单抗治疗ITP有效率达79.5%,效果显著,本研究对老年ITP患者采用该治疗方案,结果表明有效率达73.75%,与以往研究结果一致。研究结果发现,治疗有效的患者与治疗无效组患者相比较CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺水平明显上升,CD₈⁺、CD₄⁺CD₂₅⁺/CD₄⁺水平明显下降,且与正常对照组的各项指标无明显差异,表明老年ITP患者的免疫功能得到有效纠正,免疫功能得到有效恢复,纠正T淋巴细胞功能异常,对ITP治疗具有积极作用,同时也证实了T淋巴细胞功能紊乱是导致ITP的发病机制的因素之一。

本研究发现即便同一种治疗方案,对老年ITP患者的效果并不一致。除了59例有效患者外,还有21例患者经治疗并无明显改善,且有3例发展为慢性ITP,提示老年ITP患者虽然整体上T淋巴细胞各项指标低于正常对照组,但是在疾病发展过程中,可能存在自身免疫功能改善的情况。同时表明针对老年ITP患者动态监测细胞免疫功能,把握患者机体最佳免疫状态,此时采取治疗措施有利于增加机体耐受性,提高治疗效果^[15]。

综上所述,老年ITP患者基础疾病多,机体功能退化,预后影响因素多,通过动态监测患者T淋巴细

胞亚群的变化情况,对患者机体免疫功能进行相应判断,在老年患者最佳免疫状态时运用免疫治疗方案,调节T淋巴细胞亚群平衡,可能对老年ITP患者疗效具有积极影响。但是目前这一发现,尚无其他研究证实,还待有大样本量、多中心研究对象进一步研究。

参考文献

- [1] 李文倩,王小蕊,李建平,等.免疫性血小板减少症患者免疫抑制治疗前后免疫细胞亚群及细胞因子谱分析[J].中华内科杂志,2016,55(2):111-115.
- [2] 王俊,郑冬,张珑涓,等.ITP患者脾切除前后外周血Th亚群细胞因子的变化及意义[J].中国病理生理杂志,2012,28(5):901-906.
- [3] Rocha AM, Souza C, Rocha GA, et al. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. Haematologica, 2011, 96(10): 1560-1564.
- [4] 王立静,苗同国,宁更献,等.肝动脉化疗栓塞术对原发性肝癌患者T淋巴细胞亚群的影响[J].介入放射学杂志,2015,24(2):165-168.
- [5] 龙潺,唐雪元,郑方英,等.苦参碱联合糖皮质激素治疗原发免疫性血小板减少症的临床疗效观察[J].广西医科大学学报,2016,33(6):1027-1029.
- [6] 张恒,潘歆,陈志刚,等.原发免疫性血小板减少症患者血小板表面CD41、CD62P及T淋巴细胞亚群水平变化[J].山东医药,2014,54(32):60-62.
- [7] 苏文芳,陈梅英,郑振光.T淋巴细胞亚群、NK细胞及B细胞在急性原发免疫性血小板减少症患儿外周血中的表达[J].海南医学,2016,27(22):3656-3658.
- [8] 杨莉,翁巍,孙寒晓,等.慢性免疫性血小板减少症患者外周血淋巴细胞亚群及相关细胞因子的研究[J].血栓与止血学,2017,23(1):111-115.
- [9] 卢雨萌,程韵枫.原发免疫性血小板减少症中调节性T淋巴细胞的异常[J].中国临床医学,2016,23(5):672-676.
- [10] 杨蕾,庄芸,钱锡峰,等.老年免疫性血小板减少症患者外周血T淋巴细胞亚群检测及其临床意义[J].临床血液学杂志,2015,28(5):384-388.
- [11] 张红,刘庆华,田芳.急慢性特发性血小板减少性紫癜患者外周血淋巴细胞亚群的表达[J].中国实用医药,2014,27(9):26.

(下转第55页)

乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价

林健聪¹ 王红翠¹ 吴英松² 董志宁¹ 李志雄^{1*}

[摘要] **目的** 验证乙型肝炎病毒血清标志物(HBV-M)定量测定试剂盒的定量分析性能,并与 Abbott 的 HBV-M 试剂进行比对,以评价其临床应用价值。**方法** 本研究根据 WS/T 420-2013 的验证方法,对 HBV-M 定量检测试剂盒的精密度、正确度和线性(测量区间)进行验证,然后与 Abbott 的试剂同步测定临床样本,并对两种试剂的检测结果进行统计分析,以评价其临床应用价值。**结果** 本研究按照 WS/T 420-2013 的方法进行验证,HBV-M 定量检测试剂盒标示的精密度、正确度和线性(测量区间)是可靠的,与 Abbott 试剂的结果对比,两者的总符合率分别为 HBsAg 99.25%、抗 HBs 98.63%、HBeAg 100%、抗 HBe 98.77%及抗 HBc 100%。HBsAg 和抗 HBs 项目的样本测值相关系数 R^2 值分别为 0.973 和 0.979,2 种试剂的检测结果无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 本研究评估的 HBV-M 定量检测试剂盒,能满足临床定量检测的需求,且能达到进口试剂的性能水平,具有较高的临床应用价值。

[关键词] 化学发光法;乙肝标志物;分析性能验证;定量测定;对比研究

The performance verification and clinical application evaluation of the quantitative kit for Hepatitis B Virus Markers

LIN Jiancong¹, WANG Hongcui¹, WU Yingsong², DONG Zhining¹, LI Zhixiong^{1*}

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

[ABSTRACT] **Objective** The study validated the quantitative analysis of hepatitis B virus markers (HBV-M) quantitative kit and compared it with Abbott's HBV-M reagent to evaluate its clinical value. **Methods** According to the verification method of WS/T 420-2013, the precision, accuracy and linearity of HBV-M quantitative kit were verified, and then clinical samples were measured synchronously with Abbott's reagent. Finally, the results were analyzed to evaluate its value for clinical application. **Results** According to the method of WS/T 420-2013, the precision, accuracy and linearity of the HBV-M quantitative kit are reliable. When compared with the results of the Abbott reagent, the total coincidence rate is 99.25% for HBsAg, 98.63% for anti-HBs, 100% for HBeAg, 98.77% for anti-HBe and 100% for anti-HBc. The correlation coefficients of HBsAg and anti-HBs were 0.973 and 0.979 respectively, and there were no significant differences between the results of the 2 reagents ($P>0.05$). **Conclusion** The effect of the HBV-M quantitative kit was evaluated in this study, the results showed that it had a preferable clinical value, which compared well with the Abbott reagent, and could meet the requirements of clinical quantitative testing.

[KEY WORDS] Chemiluminescence immunoassay; Hepatitis B virus markers; Analytical performance validation; Quantitative analysis; Comparative study

基金项目:广州市科技计划项目(201504291007307)

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:李志雄, E-mail: paullee_0113@21cn.com

乙型肝炎 (hepatitis B) 是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 引起的全球性流行的传染性疾病。近年来,世界感染乙型肝炎的人数和因乙型肝炎死亡的人数与日俱增。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报道,全球约有 2.57 亿乙肝病毒感染者,仅 2015 年就有 88.7 万人死于乙型肝炎导致的并发症,如肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌等。其中,乙型肝炎在世界卫生组织西太平洋区域和非洲区域的成年人口感染率分别为 6.2% 和 6.1%^[1]。我国也是乙型肝炎的重灾区,据估计全国约有 9 300 万人携带乙肝病毒,其中慢性乙型肝炎患者约 2 000 万例^[2]。另外,据 2014 年全国 1~29 岁人群乙型肝炎血清流行病学调查结果显示,1~4 岁、5~14 岁和 15~29 岁人群 HBsAg 流行率分别为 0.32%、0.94% 和 4.38%^[3]。

乙型肝炎作为一个极其严重的世界卫生问题,能正确、及时地诊断出其感染的情况,对乙型肝炎的预防控制、及早治疗和疗效观察具有重要的意义。乙型肝炎病毒血清标志物 (hepatitis B virus markers, HBV-M) 是诊断乙型肝炎感染和机体免疫状态的常见标记物^[4],通常包括乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg), 乙型肝炎病毒表面抗体 (抗 HBs)、乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg)、乙型肝炎病毒 e 抗体 (抗 HBe) 及乙型肝炎病毒核心抗体 (抗 HBc), 俗称乙肝五项或乙肝两对半。

近年来,随着时间分辨免疫分析、化学发光免疫分析等灵敏度高、线性范围宽的定量检测技术的发展,国内的诊断试剂厂商也开始推出关于 HBV-M 定量检测的试剂盒。本研究拟根据 WS/T 420-2013^[5] 技术标准的要求,对国产全自动化学发光免疫分析系统配套的 HBV-M 定量检测试剂盒进行定量分析性能评估,并与国内外主流的雅培 HBV-M 全自动磁微粒化学发光试剂盒进行平行比对,以评价国产全自动化学发光 HBV-M 定量检测试剂盒的定量分析性能及其临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源

本研究涉及的标本均来源于广州军区广州总医院收集的门诊患者的血液标本,收集时间段为 2016 年 6 月至 2016 年 12 月,所有标本均为患者静脉取血后,经离心分离得到的血清标本,标本

放置 -20℃ 储存。

HBsAg、抗 HBs 和抗 HBc 项目的参考物质来源于 WHO 的国际标准物质,分别为 NIBSC Code: 12/226 (HBsAg), 07/164 (抗 HBs) 和 95/522 (抗 HBc)。HBeAg 和抗 HBe 项目的参考物质来源于德国 Paul-Ehrlich-Institut 研究所的标准物质,分别为 PEI code: 129097/12 (HBeAg) 和 129095/12 (抗 HBe)。

1.2 仪器与试剂

美国 Abbott Laboratories (以下简称“Abbott”) 的全自动免疫分析仪 ARCHITECT i2000sr 及配套 Abbott HBV-M 试剂盒、校准品和专用质控品。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 Caris200, 配套广州市达瑞生物技术股份有限公司 (以下简称“达瑞生物”) 的 HBV-M 定量检测试剂盒和专用的质控品。

1.3 方法步骤

1.3.1 HBV-M 试剂定标

根据 Abbott 和达瑞生物的 HBV-M 系列试剂盒的要求,使用定标品进行定标,定标合格后,再进行下一步的检测操作,且每天进行测试前,测定质控品浓度,保证定标曲线的可靠性。

1.3.2 精密度的验证

用达瑞生物的 HBV-M 系列试剂盒,测定其专用的质控品,连续测试 5 天,每天重复测量 3 次。计算检测结果的重复标准差和期间标准差,并与厂家标示的精密度变异系数转化的标准差进行比对,判断试剂盒的精密度是否符合要求。

1.3.3 正确度的验证

本研究采用 WHO 和德国 Paul-Ehrlich-Institut 研究所的标准物质作为参考物质,进行正确度验证实验。各项目的参考物质共稀释成 3 个浓度梯度,且其中浓度值 1 为试剂盒的临界值 (Cut off 值, CO 值)。使用达瑞生物的 HBV-M 系列试剂盒测定不同浓度梯度的参考物质,连续测试 5 天,每天重复测量 2 次。计算参考物质的偏移值、偏移验证区间,并判断试剂盒的正确度是否符合要求。

1.3.4 线性(测量区间)的验证

线性(测量区间)验证的研究,选用接近试剂盒预期测定上限(线性范围上限)的高浓度标本,再用试剂盒临界值附近的低浓度标本,稀释成不同浓度的标本,具体稀释过程见表 1、表 2。

表1 HBsAg、HBeAg的线性(测量区间)实验标本的制备
Table 1 Preparation of the linear specimen of HBsAg and HBeAg

标本编号	1	2	3	4	5	6
低浓度标本/mL	5.00	4.95	4.80	4.00	2.50	0.00
高浓度标本/mL	0.00	0.05	0.20	1.00	2.50	5.00

表2 抗HBs、抗HBe、抗HBc的线性(测量区间)实验标本的制备

Table 2 Preparation of the linear specimen of Anti-HBs, Anti-HBe and Anti-HBc

标本编号	1	2	3	4	5	6
低浓度标本/mL	5.00	4.90	4.60	3.50	2.50	0.00
高浓度标本/mL	0.00	0.10	0.40	1.50	2.50	5.00

线性(测量区间)验证的标本制备完成后,用达瑞生物对应项目的HBV-M系列试剂盒进行测定,每份样本重复测定5次,计算均值。根据标本稀释度和测量浓度均值,作线性回归图,并计算相关系数 r 值和各浓度标本的差异值,要求相关系数 r 值或其平方 R^2 大于0.995,且各浓度标本的差异

值在厂家标示的允许差异百分数(差异限)内。

1.3.5 样本比对试验

采用达瑞生物和Abbott的HBV-M系列试剂盒,同步测定HBsAg、抗HBs、HBeAg、抗HBe、抗HBc项目的标本,其中HBsAg的标本133例,抗HBs的标本219例,HBeAg的标本159例,抗HBe的标本163例,抗HBc的标本165例。检测结束后,统计分析达瑞生物、Abbott 2种HBV-M试剂盒的符合率和测值相关性。

1.3.6 统计学方法

精密度、准确度、线性(测量区间)的验证,按照WS/T 420-2013^[5]的要求进行统计分析。其他数据采用SPSS18.0软件进行统计分析,测值的差异性,通过配对 t 检验进行评价, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度的验证结果

达瑞生物的HBV-M系列试剂盒,厂家标示的重复精密度变异系数为8%,期间精密度变异系数为10%。使用其试剂盒,测定专用的质控品,连续测试5天,每天重复测量3次,得到的总精密度变

表3 达瑞生物HBV-M系列试剂盒精密度验证结果
Table 3 The results of precision verification of HBV-M kit

项目	质控品	总均值	精密度 CV/%	重复标准差 S_r	期间标准差 S_i	厂家标示的重复标准差 σ_r	厂家标示的期间标准差 σ_i
HBsAg (IU/mL)	质控品 1	0.50	3.76	0.019 2	0.018 6	0.039 8	0.049 8
	质控品 2	2.46	4.05	0.092 7	0.100 8	0.196 8	0.246 0
	质控品 3	105.00	3.47	3.962 1	3.582 8	8.378 7	10.473 0
抗 HBs (mIU/mL)	质控品 1	19.60	4.43	0.796 7	0.880 1	1.569 6	1.962 0
	质控品 2	80.40	3.88	2.718 9	3.186 7	6.433 6	8.042 0
	质控品 3	417.00	3.10	14.299 0	12.698 0	33.371 0	41.713 0
HBeAg (PEIU/mL)	质控品 1	0.50	3.44	0.018 4	0.016 9	0.039 7	0.049 6
	质控品 2	4.93	3.85	0.189 9	0.190 0	0.394 3	0.492 9
	质控品 3	84.20	2.39	2.180 7	1.979 7	6.736 0	8.420 0
抗 HBe (PEIU/mL)	质控品 1	0.80	5.57	0.043 0	0.044 8	0.064 0	0.080 0
	质控品 2	2.50	4.24	0.118 5	0.103 8	0.199 9	0.249 9
	质控品 3	8.62	5.19	0.481 1	0.441 5	0.689 4	0.861 8
抗 HBc (IU/mL)	质控品 1	1.49	5.05	0.062 9	0.077 3	0.119 5	0.149 4
	质控品 2	3.53	4.36	0.170 6	0.150 6	0.282 2	0.352 7
	质控品 3	9.04	4.86	0.460 9	0.435 2	0.723 0	0.903 7

异系数均不大于8%,其重复标准差(S_r)和期间标准差(S_i)均小于厂家标示精密度变异系数转化成的重复标准差(σ_r)和期间标准差(σ_i),详见表3。

2.2 正确度的验证结果

使用达瑞生物的HBV-M系列试剂盒测定各项目不同浓度梯度的参考物质,连续测试5天,每天测量2次。参考物质是来源于WHO或德国

Paul-Ehrlich-Institut研究所的标准物质,无标示不确定度,故将参考物质测量偏移值的验证区间与参考物质的赋值进行对比,对比结果显示,参考物质的赋值在偏移值的验证区间范围内,表明厂家标示的HBV-M系列试剂盒的正确度可靠,详见表4。偏移值的验证区间根据WS/T 420-2013^[4]中8.3.6.3.2的公式进行计算,其中参考物质无标示测量标准的不确定度,设定为0。

表4 达瑞生物HBV-M系列试剂盒正确度验证结果
Table 4 The results of correct verification of HBV-M kit

项目	浓度梯度	赋值	测量均值	标准差 S_x	精密度 CV/%	偏移值 $b_{\text{参}}$	偏移值验证区间 VI	
							区间下限值	区间上限值
HBsAg (IU/mL)	浓度值1	0.1	0.099	0.003 7	3.70	-0.000 9	-0.055	0.253
	浓度值2	10.0	10.000	0.389 8	3.90	0.000 4	8.415	11.586
	浓度值3	100.0	99.827	3.364 9	3.37	-0.173 3	95.168	104.485
抗 HBs (mIU/mL)	浓度值1	10.0	9.902	0.262 7	2.65	-0.098 5	8.600	11.203
	浓度值2	80.0	78.576	2.627 0	3.34	-1.424 4	74.460	82.692
	浓度值3	600.0	591.307	19.324 5	3.27	-8.692 8	580.144	602.471
HBeAg (PEIU/mL)	浓度值1	0.2	0.202	0.009 8	4.85	0.002 1	-0.049	0.454
	浓度值2	5.0	4.915	0.144 2	2.93	-0.085 3	3.950	5.879
	浓度值3	100.0	99.623	3.128 3	3.14	-0.377 5	95.131	104.114
抗 HBe (PEIU/mL)	浓度值1	0.5	0.494	0.024 7	5.00	-0.006 4	0.094	0.893
	浓度值2	2.0	2.012	0.109 0	5.42	0.011 8	1.173	2.850
	浓度值3	10.0	10.392	0.307 5	2.96	0.391 9	8.984	11.800
抗 HBc (IU/mL)	浓度值1	1.0	0.990	0.039 1	3.94	-0.009 8	0.488	1.492
	浓度值2	4.0	3.985	0.187 0	4.69	-0.014 8	2.887	5.083
	浓度值3	12.0	11.767	0.450 0	3.82	-0.233 2	10.063	13.470

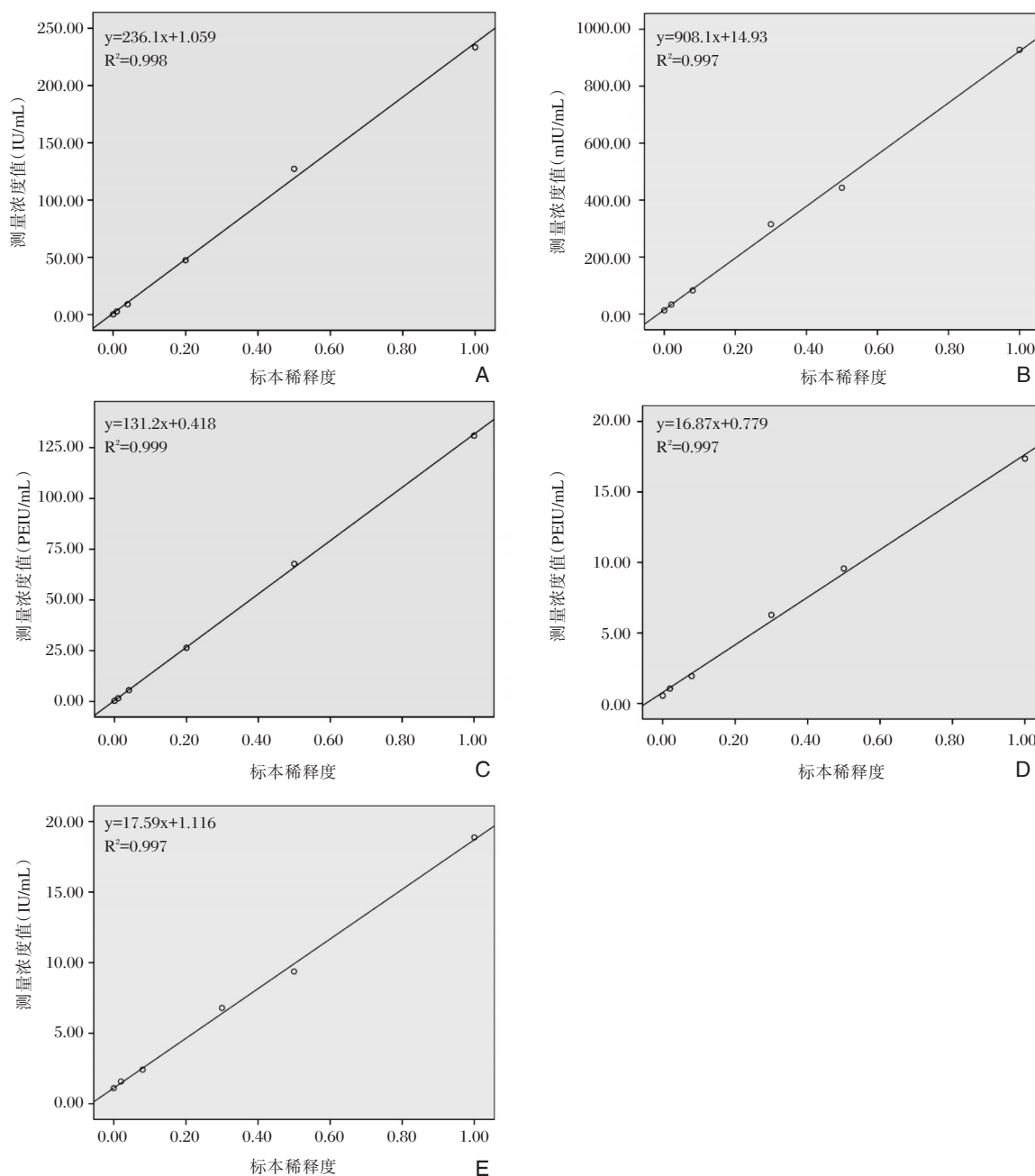
2.3 线性(测量区间)的验证结果

按表1、表2的方法,配制各项目线性(测量区间)验证实验的标本,再用对应项目的达瑞生物的HBV-M系列试剂盒进行测定,重复测定5次,计算均值。以标本的稀释度为横坐标、测定浓度的均值为纵坐标绘制线性回归图,详见图1。其中,HBsAg项目的线性回归方程为: $y=236.1x+1.059$, $R^2=0.998$;抗HBs项目的线性回归方程为 $y=908.1x+14.93$, $R^2=0.997$;HBeAg项目的线性回归方程为: $y=131.2x+0.418$, $R^2=0.999$;抗HBe项目的线性回归方程为 $y=16.87x+0.779$, $R^2=0.997$;抗HBc项目的线性回归方程为 $y=17.59x+1.116$, $R^2=0.997$ 。各项目的线性回归相关系数 R^2 ,均大于

0.995。另外,再根据公式差异百分数(%)=(测定浓度均值-理论浓度)/理论浓度 $\times 100\%$,统计试剂盒测定不同浓度标本的差异百分数,详见表5。

2.4 样本比对的阴阳性检测结果

使用达瑞生物和Abbott的HBV-M系列试剂盒,同步测定HBsAg、抗HBs、HBeAg、抗HBe、抗HBc项目的标本。其中,HBsAg项目,达瑞公司和Abbott的总符合率为99.25%;抗HBs项目,达瑞公司和Abbott的总符合率为98.63%;HBeAg项目,达瑞公司和Abbott的总符合率为100%;抗HBe项目,达瑞公司和Abbott的总符合率为98.77%;抗HBc项目,达瑞公司和Abbott的总符合率为100%,统计结果详见表6、表7。



A: HBsAg 线性回归图; B: 抗 HBs 线性回归图; C: HBeAg 线性回归图; D: 抗 HBe 线性回归图; E: 抗 HBc 线性回归图。

图 1 达瑞生物 HBV-M 系列试剂盒线性(测量区间)验证的线性回归图

Figure 1 Linear regression diagram of linear verification of HBV-M kit

2.5 样本比对的测值相关性分析结果

Abbott 的 HBV-M 试剂盒中, HBsAg 和抗 HBs 项目的试剂盒是定量试剂, 将达瑞生物试剂的测值与其进行测值相关性的评价。使用 SPSS 18.0 的软件进行统计分析, 以达瑞生物试剂盒的检测结果为横坐标, Abbott 试剂盒的测值为纵坐标, 对 HBsAg、抗 HBs 的标本检测结果进行相关性分析。HBsAg 的相关性系数 R^2 值为 0.973, 线性回归

方程为 $y = 0.981x - 28.91$, 两者的检测结果无显著性差异 ($P > 0.05$); 抗 HBs 的相关性系数 R^2 值为 0.979, 线性回归方程为 $y = 1.016x - 3.254$, 两者的检测结果无显著性差异 ($P > 0.05$), 分析结果见图 2、表 8、表 9。

2.6 差异样本的结果分析

达瑞公司和 Abbott 的 HBV-M 试剂盒对比, 有部分标本的阴阳性判断不一致, 使用 Roche 对应项

表5 达瑞生物 HBV-M 系列试剂盒线性(测量区间)验证的结果

Table 5 The results of linear verification of HBV-M kit

项目	理论浓度	测量均值	标准差	CV/%	差异值	差异百分数/%
HBsAg (IU/mL)	0.120	0.114	0.004 8	4.21	-0.006	-5.00
	2.524	2.576	0.084 3	3.27	0.052	2.06
	9.735	8.896	0.124 9	1.40	-0.839	-8.62
	48.196	47.377	1.981 2	4.18	-0.819	-1.70
	120.310	127.230	6.493 2	5.10	6.920	5.75
	240.500	233.389	7.285 0	3.12	-7.111	-2.96
	13.000	12.593	0.627 2	4.98	-0.407	-3.13
抗 HBs (mIU/mL)	31.180	33.173	1.116 7	3.37	1.993	6.39
	85.720	82.806	3.684 4	4.45	-2.914	-3.40
	285.700	315.214	15.948 6	5.06	29.514	10.33
	467.500	443.371	22.097 1	4.98	-24.129	-5.16
	922.000	927.949	25.767 4	2.78	5.949	0.65
HBeAg (PEIU/mL)	0.220	0.208	0.004 7	2.26	-0.012	-5.45
	1.538	1.516	0.073 8	4.87	-0.022	-1.43
	5.491	5.464	0.347 6	6.36	-0.027	-0.49
	26.576	26.368	1.085 2	4.12	-0.208	-0.78
	66.110	67.735	3.146 6	4.65	1.625	2.46
	132.000	130.854	4.285 3	3.27	-1.146	-0.87
抗 HBe (PEIU/mL)	0.610	0.546	0.021 7	3.97	-0.064	-10.49
	0.956	1.048	0.055 4	5.29	0.092	9.62
	1.996	1.936	0.096 9	5.01	-0.060	-3.01
	5.806	6.275	0.189 4	3.02	0.469	8.08
	9.270	9.564	0.325 6	3.40	0.294	3.17
	17.930	17.361	0.716 5	4.13	-0.569	-3.17
	1.080	1.104	0.057 7	5.23	0.024	2.22
抗 HBc (IU/mL)	1.421	1.580	0.050 3	3.18	0.159	11.19
	2.443	2.416	0.152 1	6.30	-0.027	-1.11
	6.192	6.790	0.348 9	5.14	0.598	9.66
	9.600	9.371	0.316 2	3.37	-0.229	-2.39
	18.120	18.876	0.974 7	5.16	0.756	4.17

目的试剂盒进行检测,其中 HBsAg、抗 HBe 项目的检测结果与达瑞生物的一致,且 Abbott 均为弱阳性测值;抗 HBs 项目的检测结果,1 例与达瑞生物的测值一致,2 例与 Abbott 的测值一致,详细结果见表 10。

3 讨论

HBV-M 是 HBV 感染机体后,在体内产生的一系列反映病毒感染状态和机体免疫状态的标志物。其定性检测始于 80 年代中期,对乙型肝炎的疾病诊断、病程监测、疗效观察等起到了一定的作用^[6]。随着定量检测技术的发展,科学家们对 HBV-M 定量检测的研究越来越多,其临床意义及

临床指导作用也越来越明确^[7]。据李金明教授等^[8]的介绍,HBV-M 的定性检测和定量检测,其应用目的不同,前者主要用于分析患者 HBV 感染状态,后者则主要用于抗病毒药物治疗的疗效预测和评估,特别是针对慢性乙型肝炎的治疗。如监控 HBsAg 的浓度,可评价抗病毒药物的治疗效果和间接反映体内 HBV 复制的活跃程度等;检测抗 HBs 的浓度,可反映出机体对 HBV 抵抗能力的强弱;监控 HBeAg 的浓度,可判断慢性乙肝病毒携带者是否发病、预测抗病毒治疗的效果、判断抗病毒治疗的终点等^[9];测定抗 HBe 的浓度,可以对慢性乙肝抗 HBe 定量持续很高的患者进行密切观察,及时给予干预性治疗,避免疾病的加重;测定病人

表6 HBV-M系列试剂盒标本检测结果统计表

Table 6 The results of specimen of HBV-M kit

试验	达瑞生物结果	达瑞生物结果		合计
		阳性	阴性	
HBsAg	阳性	93	1	94
	阴性	0	39	39
	合计	93	40	133
抗HBs	阳性	136	1	137
	阴性	2	80	82
	合计	138	81	219
Abbott结果 HBeAg	阳性	59	0	59
	阴性	0	100	100
	合计	59	100	159
抗HBe	阳性	93	2	95
	阴性	0	68	68
	合计	93	70	163
抗HBc	阳性	91	0	91
	阴性	0	74	74
	合计	91	74	165

表7 达瑞生物与 Abbott HBV-M系列试剂盒符合率结果统计表(%)

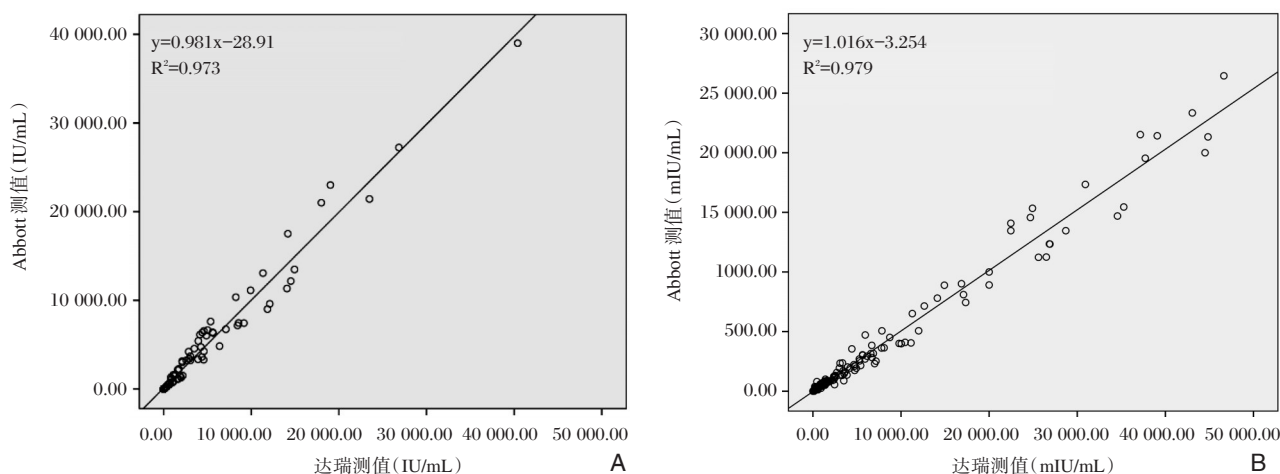
Table 7 The results of coincidence rate of Darui biotechnology and Abbott HBV-M kit (%)

项目	阴性符合率	阳性符合率	总符合率
HBsAg	97.50	100.00	99.25
抗HBs	98.55	98.76	98.63
HBeAg	100.00	100.00	100.00
抗HBe	97.14	100.00	98.77
抗HBc	100.00	100.00	100.00

定的预测价值^[3]。

为了满足市场对HBV定量检测的需求,国内越来越多的体外诊断试剂厂家推出相关的试剂产品,试剂的性能参差不齐。对此,本研究选用WS/T 420-2013^[5]的标准方法,对达瑞生物的HBV-M定量检测试剂盒的定量检测性能进行了验证。验证结果显示,达瑞生物的HBV-M定量检测试剂盒的重复精密度和期间精密度均小于厂家标示的重复精密度和期间精密度;正确度验证中,参考物质的赋值均处于偏移值的验证区间内;线性(测量)区

的抗HBc含量,可对HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的聚乙二醇干扰素和核苷(酸)类似物治疗有一



A: HBsAg 标本测值相关性分析散点图; B: 抗HBs 标本测值相关性分析散点图。

图2 标本测值相关性分析散点图

Figure 2 The scatter plot of correlation analysis

表8 HBsAg 标本测值配对t检验结果

Table 8 The results of t-test pairs of HBsAg

达瑞测值 -Abbott测值	配对差异				系数T	自由度	双侧 显著性	
	均值	标准差	均值的 标准差	95%的置信区间				
				下限				上限
	-86.276 09	971.099 02	84.204 96	-252.841 83	80.289 65	-1.025	132	0.307

表9 抗HBs标本测值配对 t 检验结果
Table 9 The results of t -test pairs of Anti-HBs

达瑞测值 -Abbott 测值	配对差异					系数 T	自由度	双侧 显著性
	均值	标准差	均值的 标准差	95%的置信区间				
				下限	上限			
	-0.843 15	71.610 02	4.838 96	-10.380 28	8.693 98	-0.174	218	0.862

表10 差异样本的检测结果
Table 10 The review results of the inconsistent samples

项目	达瑞生物		Abbott		Roche	
	测值	阴阳判断	测值	阴阳判断	测值	阴阳判断
HBsAg	0.01 IU/mL	-	0.05 IU/mL	+	0.02 IU/mL	-
抗HBs	13.03 mIU/mL	+	8.29 mIU/mL	-	11.54 mIU/mL	+
抗HBs	8.18 mIU/mL	-	17.05 mIU/mL	+	15.32 mIU/mL	+
抗HBs	12.29 mIU/mL	+	6.88 mIU/mL	-	8.47 mIU/mL	-
抗HBe	0.47 PEIU/mL	-	0.95 S/CO 值	+	1.35 COI 值	-
抗HBe	0.33 PEIU/mL	-	0.98 S/CO 值	+	1.62 COI 值	-

间的验证实验中,各项目的线性回归相关系数 R^2 为0.997~0.999,均大于0.995,且不同浓度标本的差异百分数均不大于20%,符合厂家标示的允许差异百分数。根据WS/T 420-2013^[5]的要求可判断,达瑞生物的HBV-M定量检测试剂盒的定量分析性能是可靠的。本研究还对达瑞生物与Abbott的HBV-M试剂盒检测临床样本的性能进行了对比,结果显示,达瑞生物的HBsAg、抗HBs、HBeAg、抗HBe和抗HBc定量检测试剂盒与Abbott相应试剂盒的阴阳性总符合率分别为99.25%、98.63%、100.00%、98.77%、100.00%,说明2种试剂在检测HBV-M时的符合性很高。此外,Abbott只有HBsAg、抗HBs项目可以进行定量检测,达瑞生物和Abbott的该项目测值相关系数 R^2 值分别为0.973、0.979,经过配对 t 检验,两者的检测结果无显著性差异($P > 0.05$),这说明了2种试剂的测值具有很高的一致性,检测结果具有互通性。据谢而付等^[10]的研究显示,Abbott和Roche 2种分析系统在测定HBV-M时,具有一定的检测符合率和相关性,而杨凡等^[11]则报道了Roche和LIASON化学发光分析系统的HBV-M检测结果具有很高的一致性。这说明了进口的化学发光分析系统在检测HBV-M技术方面,是比较稳定的。而本研究通过达瑞生物与Abbott的HBV-M试剂盒的对比,探讨

了国产HBV-M化学发光试剂与进口试剂的性能差距,期望能为国产HBV-M化学发光试剂的发展提出一些想法。

通过对2种试剂检测结果不一致的样本进行分析,其中抗HBs的检测结果最复杂,达瑞生物、Abbott和Roche等3种试剂盒对3份标本的检测结果不完全一致,该情况与谢而付等^[10]的研究结果相符。原因可能是不同的试剂在检测抗HBs时,由于不同厂家使用的活性原料不同、抗HBs产生的原因不同,而导致不同厂家的试剂盒对其反应性存在差异^[12]。故抗HBs的阴阳判断,可参考国际上通用的方法,使用多家试剂进行标定,同时结合其他4项HBV-M项目的检出结果进行判断^[13]。

目前,Abbott、Roche等进口的免疫发光分析系统在国内临床上得到广泛的应用。在提倡减轻患者负担、检验结果互认的情况下,国内新兴的化学发光免疫检测试剂,应与广泛运用的Abbott、Roche等试剂进行对比,并保证较高的符合率和测值相关性。本研究初步验证了达瑞生物HBV-M定量检测试剂盒可靠的定量分析性能,且与Abbott同类试剂的对比,具有较高的符合率和测值相关性,因此临床应用价值较高。此外,抗HBs在结果判断,也应引起重视,避免不同试剂测值不一致而难以进行判断的情况。

参考文献

- [1] World Health Organization. Guidelines on Hepatitis B and C Testing [EB/OL]. <http://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>, 2017-04/2017-10-19.
- [2] Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122:3-4.
- [3] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(3):1-18.
- [4] 邱华, 谭华炳. 慢性乙型肝炎病毒感染者健康知识普及研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(16):3332-3334.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 420-2013 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [6] 刘金涛, 曾显坤. 乙型肝炎病毒血清学标志物(HBV-M)的检出及应用[J]. 中华医药杂志, 2007, 7(1):6.
- [7] 吕迎霞, 张学东, 于林. 乙肝五项定量检测及罕见模式分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(14):1820-1821.
- [8] 李金明, 张瑞. 常用乙型病毒性肝炎血清学标志物检测结果报告解释及临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4):296-300.
- [9] 魏来. HBV 标志物定量和标准化是临床检测的方向[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(9):967-970.
- [10] 谢而付, 蒋理, 刘雁雁, 等. 不同化学发光分析系统对乙型肝炎血清标志物检测的比较[C]. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议论文汇编, 2012:582-584.
- [11] 杨凡, 单咏梅, 周宏, 等. 不同方法学检测乙型肝炎血清标志物结果的评价分析[J]. 检验医学, 2010, 25(9):723-726.
- [12] 张学东, 张泉, 谢惠波, 等. 不同厂家试剂盒检测人血清乙肝表面抗体浓度值相关性分析[J]. 科技信息, 2009(7):362-363.
- [13] Huzly D, Schenk T, Jilg W, et al. Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis B virus surface antigen [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4):1298-1306.

(上接第 37 页)

- [9] 田纳, 庞淑芬, 关仲, 等. 哈尔滨市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 哈尔滨医药, 2010, 30(1):33.
- [10] 倪孟汉. 潮州市区小学生 HBsAg 携带者 HBV 感染标记物检测结果分析[J]. 广东卫生防疫, 1997, 23(2):44-45.
- [11] 帅军, 蓝淑宝, 周玉刚, 等. 潮州市中小学生乙型肝炎流行病学调查及影响因素分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(7):1634-1636.
- [12] Yonghao G, Jin X, Jun L, et al. An epidemiological serosurvey of hepatitis B virus shows evidence of declining prevalence due to hepatitis B vaccination in central China [J]. Int J Infect Dis. 2015, 40:75-80.
- [13] 侯莹. 乙肝疫苗接种后无/低应答原因分析及加强对策的进展[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(8):1123-1124.
- [14] 刘鱼, 王憬惺, 曾沛斌, 等. 中国部分地区献血者中乙型肝炎病毒的基因型和亚型分布特征[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(11):1061-1067.
- [15] 陈立华, 黄泽伟, 罗招云, 等. 潮州地区乙肝病毒分型和耐药突变基因检测的应用[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(14):3444-3446.
- [16] 谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 等. 多引物对巢式 PCR 法检测 HBV 基因型的流行病学分析[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(5):1073-1076.
- [17] 李晓斐, 王丽娜. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异与基因分型及临床关系的研究[J]. 检验医学, 2011, 26(7):479-481.

(上接第 46 页)

- [12] 邓冬祥. 血管紧张素 II 受体阻断剂诱发免疫性血小板减少症一例[J]. 海南医学, 2015, 26(23):3581-3582.
- [13] 孙慧平, 陈颖, 李军民, 等. 达那唑治疗老年难治性免疫性血小板减少性紫癜疗效和安全性评估[J]. 老年医学与保健, 2013, 19(4):232-233.
- [14] 李振宇, 李德鹏, 闰志凌, 等. 不同治疗方案对原发性免疫性血小板减少症患者外周血调节性 T 细胞水平的影响[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(6):478-481.
- [15] 孙媛媛, 谢军, 鲍扬漪, 等. 老年原发性免疫性血小板减少症患者治疗前后 T 淋巴细胞亚群的临床研究[J]. 安徽医学, 2015, 36(6):688-690.

高通量测序技术在检测循环肿瘤细胞中的应用

许芳¹ 赵阳² 武其文*

[摘要] 肿瘤作为一种基因组疾病,常涉及一系列基因组变化。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是原发肿瘤和转移瘤的桥梁,往往可揭示原发肿瘤和转移瘤的遗传特性。目前 CTCs 的检测方法有很多,但鉴于 CTCs 在循环外周血中的量非常稀少,纯度低,常规方法的检测不能提供肿瘤形成、分化、转移的本质。基于大规模平行测序的高通量测序技术可从分子层面对 CTCs 进行基因序列分析,对肿瘤诊断、预后判断、转移、个体化治疗提供更多的信息。循环肿瘤细胞结合高通量测序技术在未来研究中展现出广阔的前景,本文就循环肿瘤细胞的检测方法,高通量测序技术的应用成果及进展作一综述。

[关键词] 循环肿瘤细胞;高通量测序;基因组分析;肿瘤

Application of high throughput sequencing technology in detection of circulating tumor cells

XU Fang¹, ZHAO Yang², WU Qiwen*

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

[ABSTRACT] As a genomic disease, cancer involves a series of changes in the genome. Circulating tumor cells (CTCs) are the bridge between primary tumors and metastases, and can often reveal the genetic characteristics of primary tumors and metastases. Currently, there are many detection methods for CTCs, but as CTCs are scarce and low purity in the circulating peripheral blood, conventional detection methods often fail to reveal the nature of tumor formation, differentiation and metastasis. However, high-throughput sequencing technology based on large scale parallel sequencing can provide more pertinent information for tumor diagnosis, prognosis, metastasis and personalized therapy at the molecular level of CTCs gene sequence analysis. The detection of CTCs by high-throughput sequencing technology will play a profound role in the future. In this paper, the detection methods of CTCs and the applications and development of high-throughput sequencing technology are summarized.

[KEY WORDS] Circulating tumor cells; High-throughput sequencing; Genome analysis; Neoplasm

肿瘤是威胁人类生命健康的一大重要因素,据统计全球 1/8 的死者死于癌症,我国每一分钟有 6 人确诊为癌症。由于传统成像技术固有的局限性和缺乏特异性的肿瘤标志物导致多数恶性肿瘤预后不良和 5 年生存率较差。找到一种合理有效的方法对肿瘤患者进行早期诊断和治疗具有重要意义,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)

作为新兴的肿瘤标志物,可用于筛查、检测、诊断、预后预测、分层、治疗反应监测等。已证明在乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌等恶性肿瘤中,CTCs 计数可作为独立的预后判断指标。但外周血中 CTCs 数量的稀有及其结构的异质性和聚集特性是影响其分离和分析的主要障碍^[1]。几种较常见的循环肿瘤细胞检测实验方法:免疫细胞化学法、逆转录

基金项目:国家自然科学基金(81301512);国家级大学生创新创业计划训练项目(AH201410368027)

作者单位:皖南医学院第一附属医院检验科,安徽,芜湖 241001

*通讯作者:武其文, E-mail: yjslab@163.com

聚合酶链反应、纳米免疫磁珠富集检测法等,由于自身各自的缺点在临床应用中均受到不同程度的限制。目前,基因组学家强调对原发性肿瘤和部分转移灶进行大规模测序以全面分析和理解癌症基因组特征^[2]。高通量测序从分子层面对 CTCs 进行基因序列分析以适应临床需要。该技术采用大规模平行测序,能够一次对数百万至数十亿个 DNA 片段进行序列测定,可完成在相对较低成本及不增加样本量情况下,对上万个肿瘤相关基因、全外显子以及全基因组进行检测。高通量测序技术与 CTCs 的综合运用在未来研究中展现出广阔的前景,本文就二者的应用作一综述。

1 循环肿瘤细胞

1.1 循环肿瘤细胞概述

CTCs 常作为循环上皮细胞被检测,在健康人群中非常罕见,但在各种实体瘤患者血液中可检测到^[3],被称为新兴的肿瘤标志物,早在 100 多年前被提出,是原发性或转移性肿瘤脱落进入到外周血液循环中的肿瘤细胞^[4-5]。CTCs 与原发肿瘤具有相似的遗传特征,并可携带这些遗传信息随血液循环播散至全身各个器官^[6]。原发肿瘤每天可释放上万个肿瘤细胞,但只有约 0.01% CTCs 可存活。有研究者采用白细胞分离法分别从 7 例直肠癌患者、5 例乳腺癌患者以及 3 例胃癌患者外周血中获得平均循环肿瘤细胞数各为 17.1(10-34)、10.0(2-27)、24.0(2-42),并对这些 CTCs 进行了成功培养^[7]。随着对 CTCs 的深入研究发现 CTCs 在血液运行过程中部分会发生上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),这与干细胞表型有关,且 EMT 可帮助 CTCs 抵抗细胞凋亡信号,更好的存活和躲避治疗药物的攻击,增强侵袭迁移能力^[1]。CTCs 表现出的这些生物学特点是我们甄选 CTCs 作为研究肿瘤的依据,是机遇也是挑战,未来需要更深入的研究。

1.2 循环肿瘤细胞临床价值

CTCs 的临床应用范围从诊断、预后预测、合理治疗方案选择到临床病理分期等。如根据早期肿瘤患者或术后近期内血液中有无 CTCs 再评估是否需要对那些具有高危转移因素的患者进行放化疗方面有重要指导作用^[8]。CTCs 可作为评估晚期癌症患者治疗是否有效的早期指标以及发现潜

在靶向治疗的新方法^[9]。在结直肠癌中, *KRAS* 基因的外显子 2 突变是表皮生长因子受体抑制剂治疗的不利标志^[10]。CTCs 还可能为原发性肿瘤和转移肿瘤的分析提供遗传信息。鉴于疾病发展过程中,恶性肿瘤可能会发生获得性遗传变异,CTCs 作为一个实时的液体活检可避免对转移组织进行多次侵害性的病理活检^[11]。此外,CTCs 计数还可作为监测化疗疗效的标志物,评估乳腺癌和前列腺癌患者对化疗的反应^[12-14]。根据 Scher 和 Jia 等^[15] 2 008 项研究数据分析发现,CTCs 计数作为一个连续变量分析时,结合乳酸脱氢酶基点是一个重要的预后变量(一致性概率估计 0.72 至 0.75)。在用醋酸阿比特龙治疗前列腺癌的第二阶段,有研究者根据治疗后 CTCs 的变化评估 47 位难治性、去势抵抗的前列腺癌患者对治疗的反应,结果显示治疗后 CTCs 数量明显减少,且 *ERG* 基因的重排和 CTCs 数量的减少之间具有明显的相关性($r=0.762, P=0.001$)^[16]。对于膀胱癌切除术患者而言术前 CTCs 的存在是无癌生存期的独立的不良预兆。最近一项研究表明 CTCs 依然是膀胱癌患者接受膀胱癌根治术但没有辅以化疗的癌症特异性死亡率的独立预兆^[17]。

综合上述观点我们不难发现 CTCs 作为一种液体活检标本,相比于影像学、病理组织学,血清标志物具有独特的优势,能够提供更多的临床信息。

2 循环肿瘤细胞检测方法

2.1 免疫学技术

检测 CTCs 最具有代表性的免疫学技术是基于免疫磁珠平台的 Cellsearch 系统,该系统是目前唯一得到美国食品和药物管理局批准的 CTCs 检测系统^[18]。该方法利用包被有上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体的免疫磁珠,通过抗原抗体反应与外周血中所有表达 EpCAM 的细胞结合,从而分离捕获 CTCs,然后利用荧光标记的细胞角蛋白(cytokeratins, CK)抗体对 CTCs 进行识别鉴定。然而,关于是否所有的循环 CK 细胞都是肿瘤细胞仍然存在争议。相反,对于重要的细胞亚群,如发生 EMT 的细胞存在漏检,且因其无法检测 EpCAM 阴性的细胞,使得检测 CTCs 的敏感性和特异性降低。Li 等^[19]应用 Cellsearch 系统和依据细胞大小的膜滤法(isolation by size of epithelial tumor, ISET)对 61 例食管

鳞状细胞癌患者进行检测, ISET方法检测出CTCs有20例(32.8%), 检测出循环肿瘤微栓子3例(4.9%), 而Cellsearch系统分别检测出1例(1.6%)和0例。另外, 该方法主要侧重于循环肿瘤的计数, 缺乏在基因层面的深入, 在展现信息全面方面表现出一定的弊端, 一项转移性乳腺癌患者的研究报告显示单纯根据CTCs计数转换治疗并不能提高患者的总体生存率^[20]。免疫学技术作为一种传统检测方法, 应用广泛, 但随着技术发展其弊端日益凸显。

2.2 CTCs芯片技术

CTCs芯片技术使用抗EpCAM抗体包被的微流体装置, 基于EpCAM经常在肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤中过度表达, 能够从血液中特异性捕获CTCs, 细胞可快速分离并可视化, 早期研究表明该技术在多种转移癌中的检出率达99%, 且CTCs的数量多(平均50 CTCs/mL)^[21-22]。然而, 该技术主要用于CTCs的捕获和分离, 因仍以抗体为基础, 同样可因肿瘤细胞发生EMT, 上皮抗原消失而敏感性降低。

2.3 逆转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)技术

自20世纪90年代以来, RT-PCR开始用于检测外周血中的肿瘤特异性核苷酸^[10]。相比于依赖抗体结合的检测方法其敏感性明显提高, 且可用于检测血液中游离的RNA, 应用范围广。但限于常见的靶RNA的非特异性表达、标本及PCR产物的污染、PCR扩增过程中条件控制不当、非特异性细胞低水平的非法转录等原因, 使RT-PCR方法的检测结果出现较高的假阳性率。此外, 该技术无法用于观察肿瘤细胞的形态学特征。

3 高通量测序在循环肿瘤细胞检测中的应用

3.1 高通量测序技术

高通量测序又称下一代测序(next generation sequencing, NGS)或深度测序, 以能一次并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定和一般读长较短著称, 引起业内广泛关注。2015年初, 国家卫生和计划生育委员会首次批准了26家肿瘤诊断与治疗采用高通量测序技术的应用试点单位, 这预示着我国正逐步进入规范化的肿瘤高通量测序检测行列。高通量测序检测CTCs的实验过程主要包括: 抽取CTCs DNA-制备测序文库-测序-生物信息分析, 获

取高纯度的CTCs DNA是检测的前提, 而先进的生物信息学分析技术是获取检测结果的保障。

3.2 高通量测序的应用

3.2.1 结直肠癌

高通量测序可揭示体细胞单核苷酸多态性和拷贝数变化, 2013年Heitzer等人^[23]利用高通量测序技术对68个结直肠癌相关基因进行序列分析, 比较原发肿瘤和转移灶的突变谱及相应的CTCs, 在相应的CTCs中检测到已知的原发肿瘤和转移灶的突变驱动基因[如结肠腺瘤样息肉(*APC*), *KRAS*, *PIK3CA*], 并发现CTCs也存在基因突变。并且, 利用深度测序分析这些突变的来源, 发现原本在CTCs检测出的大多数突变也存在于原发肿瘤和转移灶。检测肿瘤基因拷贝数往往受到正常细胞掺杂和非整倍数因素的影响, 且正常细胞会干扰肿瘤细胞的基因信号, 给全面分析肿瘤基因带来挑战, 下一代测序技术提供了精确到碱基水平的基因信息, 使检测不同类型的基因变异以及确定基因片段大小、位置等信息成为可能。

3.2.2 胰腺癌

RNA测序可显示肿瘤转移的相关路径, 有研究人员采用微流控器对来自小鼠胰腺癌模型的内源性CTCs进行高效捕获, 并对CTCs进行单分子RNA测序, 可筛选出*Wnt2*作为候选基因在CTCs中表达活跃^[24]。在胰腺癌细胞中通过*Wnt2*的表达抑制失巢凋亡, 增强非依赖贴壁球体的形成, 增加体内转移倾向。胰腺肿瘤细胞形成非粘附的肿瘤球体与多个*Wnt*基因表达上调有关, 11例胰腺癌中有5例CTCs的*Wnt*信号表达丰富。由此对CTCs进行分子分析可确定治疗靶点, 预防肿瘤远处扩散。

3.2.3 肺癌

有研究显示通过对肺癌的CTCs外显子组进行测序可发现其转移和突变。Ni等人^[25]对11例肺癌患者的CTCs进行外显子基因组测序分析, 发现特征性肿瘤相关的单核苷酸变异和CTCs外显子的插入和缺失。这些突变可提供个体化治疗所需的信息, 如耐药和表型转变。此外, 同一病人的每个CTCs, 无论肿瘤亚型, 具有的重复性拷贝数变异(copy number variation, CNV)模式与转移瘤类似, 同样是胰腺癌的不同患者, CTCs的CNV模式相似, 而小细胞肺癌患者的CNV明显不同于胰腺癌患者。这表明特定基因位点的CNV可提示癌症转移, 肿瘤特异性CNV的重复性提供了潜在

的基于 CTCs 的临床诊断价值。

3.2.4 膀胱移行细胞癌

2013年 Guo 等^[26]利用全基因和全外显子测序对 99 例膀胱移行细胞癌患者基因组进行分析,除了证实已被确定在移行细胞癌(transitional cell carcinoma, TCC)中发生突变的基因外,还发现 *STAG2* 和 *ESPL1* 基因频繁的突变以及 *FGFR3* 和 *TACC3* 重复性融合在姐妹染色单体的结合和分离(sister chromatid cohesion and segregation, SCCS)过程中发挥重要作用。研究表明基因突变对 SCCS 过程的影响可能参与了膀胱肿瘤的发生,为找到一种新的治疗方法提供了思路。Sharron 等^[27]在 2014 年利用 RNA 测序对膀胱移行细胞癌进行分析,确定了一个在 T1NIBC a (T1 nonprogressive bladder cancer) 和 T1PBC a (T1 progressive bladder cancer) 间表达差异显著的基因标志。基于特征的分层显示基因识别标志与肿瘤由 T1 期发展到 T2 期的时间密切相关,表明分子标志可作为高评分 T1 膀胱癌发展的独立预测因子。

3.2.5 头颈癌

受各种因素的影响,近年来头颈部肿瘤的发病率和致死率持续上升,其中以青年患者尤为突出,美国在 2014 年有 73 240 例患者确诊为头颈癌,27 450 例患者死于头颈癌^[28]。早在 2011 年发表在 *Science* 杂志上的 2 篇文章同时报道了利用高通量测序技术对头颈部鳞癌进行分析,发现在头颈部肿瘤患者中存在大量的碱基突变,其中以 *TP53*、*CDKN2A*、*PIK3CA*、*NOTCH1* 基因的突变最为普遍,在 HPV 阴性的肿瘤患者中,这种突变更为常见^[29-30]。2014 年有学者对 *TP53*、*NOTCH1* 基因在头颈肿瘤中的变化进行了更为详细深入的研究和报道^[31-32]。Farah 等^[33]分别从转化性研究、个性化医学、验证目标基因、癌症药物基因组、药物靶点、未来可能采取的治疗方法等方面详细描述了 NGS 在头颈癌中的应用。

3.2.6 乳腺癌

对乳腺肿瘤进行分子层面分析可促进耐药机制的研究,如雌激素受体靶向治疗乳腺癌出现耐药是由于 *ESR1* 基因发生了突变^[34]。由于血液 CTCs 非常少,高纯度的 DNA 量获取困难,一般难以达到高通量测序平台检测的下限,这也是高通量测序技术的一大重要挑战。最近的一项研究很好的解决了这一问题,该研究综合运用全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)和 NGS 对比

分析了乳腺癌细胞株和经乳腺癌细胞株转染而成的癌细胞,提出在 WGA 过程中使用 DNA 无创管可解决 WGA 试验与细胞固定剂不相容问题^[35]。

通过上述实例,我们不难看出高通量测序技术在检测循环肿瘤细胞,从分子层面研究肿瘤疾病等方面具有重大的应用价值。相信随着技术的不断发展和完善,高通量测序技术可以揭示更多的肿瘤基因信息,为肿瘤的预防、诊断、治疗奠定夯实的理论基础,为肿瘤病人带去真正的福利。

4 展望

目前,人们越来越重视从基因层面分析肿瘤疾病,CTCs 很早就开始进入人们视野,但限于在外周血中的量稀少以及受技术的限制,无法广泛应用。近年来,随着各种 CTCs 富集和检测技术的发展,尤其是在高通量测序技术的推动下,CTCs 又重新受到人们的关注。对 CTCs 的研究有利于更好的理解为什么同一种癌症中的细胞具有不同的侵袭和转移能力、对同一种药物产生不同的治疗效果,更好的为癌症患者提供个体化的治疗方案。2015 年国家卫生计生委妇幼司发布了第一批高通量测序技术临床应用试点单位,这是对高通量测序的高度认可。高通量测序技术应用的范围非常广泛:人类千人基因组计划、动植物全基因组研究、表观遗传研究和甲基化分析、微生物基因组测序组装、外显子组基因测序分析、小 RNAs 序列分析、单细胞全基因组测序等等。目前高通量测序呼声最响的是在无创产前诊断中的应用。近期我院正着力于高通量测序技术平台实验室的创建,高通量测序进入公众视野指日可待。

为了使高通量测序技术更好地走进临床,发挥更大的应用价值,应与其它技术更好的结合,如高效的细胞分离和富集技术,全基因组扩增技术。另外,要加快精密型实验室的建设。此外,高通量测序技术对科研工作者和临床医生来说是一个新的领域,在测序过程中产生庞大的数据需依赖于复杂的生物信息学技术分析,这并不是简单易懂的,为此应该朝着更加简捷化和自动化发展。最后高通量测序技术作为一种新兴的技术,还处在探索前进阶段,应朝着更加规范化发展,真正发挥其价值。总之随着高通量测序技术的临床开展和各技术环节的日益完善,其必将结出丰硕之果,我们深信基于测序技术的基因数据分析方法将成为主流发展方向,有望改变个性化医疗的前景。

参考文献

- [1] Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(12): 693-701.
- [2] Hudson TJ, Anderson W, Aretz A, et al. International network of cancer genome projects [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 993-998.
- [3] Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 1032-1038.
- [4] Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(6): 650-661.
- [5] Heitzer E, Auer M, Ulz P, et al. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies [J]. *Genome Med*, 2013, 5(8): 73-84.
- [6] Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, et al. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2): 292-303.
- [7] Soya R, Taguchi J, Nagakawa Y, et al. A large number of circulating tumor cells (CTCs) can be isolated from samples obtained by using leukapheresis procedures [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2015, 42(9): 1069-1072.
- [8] Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells [J]. *Br Med Bull*, 2010, 94(1): 49-64.
- [9] Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, et al. Circulating tumor cells as surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(6): 1188-1192.
- [10] Walther A, Johnstone E, Swanton C, et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7): 489-499.
- [11] Small AC, Gong Y, Oh WK, et al. The emerging role of circulating tumor cell detection in genitourinary cancer [J]. *J Urol*, 2012, 188(1): 21-26.
- [12] Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, et al. Circulating tumor cells predicted survival in early average- to high risk breast cancer patients [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(5): 2504-2511.
- [13] Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(4): 406-414.
- [14] Scher HI, Heller G, Molina A, et al. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual - level surrogate for survival in metastatic castration - resistant prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(12): 1348-1355.
- [15] Scher H, Jia XB, Fleisher M, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data [J]. *Lancet Onco*, 2009, 10(3): 233-239.
- [16] Reid AH, Attard G, Danila DC, et al. Significant and sustained antitumor activity in post-docetaxel, castration-resistant prostate cancer with the CYP17 inhibitor abiraterone acetate [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(9): 1489-1495.
- [17] Alva A, Friedlander T, Clark M, et al. Circulating tumor cells as potential biomarkers in bladder cancer [J]. *J Urol*, 2015, 194(3): 790-798.
- [18] Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells - biology and biomarkers [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 129-144.
- [19] Li H, Song P, Zou B, et al. Circulating tumor cell analyses in patients with esophageal squamous cell carcinoma using epithelial marker dependent and -independent approaches [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(38): e1565.
- [20] Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500 [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(31): 3483-3489.
- [21] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-1239.
- [22] Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex - generating herringbone-chip [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(43): 18392-18397.
- [23] Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(10): 2965-2975.
- [24] Yu M, Ting DT, Stott SL, et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis [J]. *Nature*, 2012, 487(7048): 510-513.
- [25] Ni X, Zhuo M, Su Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor

长链非编码 RNA 在乳腺癌中的研究进展

许家瑞 胡剑 刘冬冬 李有强 林莉 刘丹 徐建华*

[摘要] 长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是非编码 RNA 的重要一员,长度超过 200 个核苷酸,缺乏开放的阅读框,无编码蛋白质的功能。近年来研究发现 LncRNA 的表达异常与乳腺癌的发生、发展和侵袭转移密切相关。最新研究数据显示,LncRNA 的组织特异性表达具有区分正常和肿瘤组织甚至乳腺癌不同阶段的潜能,深入研究 LncRNA 在乳腺癌中的机制作用有望对乳腺癌的早期诊断、治疗、预后提供新的思路与方法。

[关键词] 乳腺癌;长链非编码 RNA;基因

Progress of long non-coding RNA in human breast cancer

XU Jiarui, HU Jian, LIU Dongdong, LI Youqiang, LIN Li, LIU Dan, XU Jianhua*

(Department of Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510120)

[ABSTRACT] Long non-coding RNA (LncRNA) genes, with more than 200 nucleotides, the lack of an open reading frame (ORF), and no protein-coding capacity, are an important member of non-coding RNAs. In recent years, many studies have shown that the abnormal expression of LncRNAs plays an important role in tumorigenesis, development, invasion and metastasis, especially in breast cancer. Based on the latest research data, the tissue specific expression signature of LncRNAs may represent a potential to discriminate between normal and tumor tissue or even different stages of breast cancer, which makes them clinically beneficial as possible biomarkers and provide new ideas and methods for early diagnosis, treatment, and prognosis of breast cancer.

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

自上世纪 90 年代以来,乳腺癌发病率呈现快速上升趋势。国际癌症研究机构实况报道显示,乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率占女性癌症的 15%,居女性各类恶性肿瘤死亡率之首^[1]。其高发病率与高死亡率都引起了人们广泛的关注。国内外的众多学者对乳腺癌的危险因素进行了相关的流行病学研究,对乳腺癌危险因素的认识不断深入,但至今乳腺癌的病因尚不完全清楚,其治疗仍面临着巨大挑战。近年来研究发现,长链非编码 RNA (long non-coding

RNA, LncRNA)在一种或多种肿瘤中存在异常表达。因此,深入对 LncRNA 与乳腺癌的相关性研究有望为乳腺癌的诊断与治疗提供新的思路。本文就 LncRNA 在乳腺癌中的研究进展做一综述。

1 LncRNA 的生物学特性及功能

近些年 DNA 平铺阵列和深度测序这两项新技术在人类基因草图绘制完成的基础上迅速发展^[2],这使得人们能够特征性识别完整的人类转录物组。随着研究的不断深入,人们发现人类基因

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212274);广州市科技计划项目(201510010044);广东省中医院转化医学专项(YN2014ZHR201);国家自然科学基金项目(81601736)

作者单位:广东省中医院检验医学部,广东,广州 510120

*通讯作者:徐建华, E-mail: jhXu1976@126.com

组序列中仅有 1.5% 的核酸序列用于蛋白质编码, 基因组中 98.5% 的基因并不编码蛋白^[3], 在占据人类基因组 98.5% 的非蛋白编码序列中, 绝大多数被转录成长度大于 200 nt 的“长链非编码 RNA”。一般认为 LncRNA 是一类生物来源广泛、主要由 RNA 聚合酶 II (PolII) 转录生成、并具备甲基鸟苷帽子和多聚腺苷酸尾 (polyA) 结构的非编码 RNA。这些 LncRNAs 能在转录、转录后、表观遗传水平对基因组印记、X 染色体沉默、染色质修饰与重塑、转录激活与干扰等生物学进程发挥重要调控作用^[4], LncRNA 不仅生物学功能复杂, 还具有极强的时空特异性^[5]。LncRNA 具有高度保守的结构, 这与 LncRNA 生物学功能密切相关^[6]。根据 LncRNA 与邻近蛋白质编码基因的相对位置, 将其分为正义 LncRNA (sense LncRNA)、反义 LncRNA (antisense LncRNA)、双向 LncRNA (bidirectional LncRNA)、内含子 LncRNA (intronic LncRNA)、基因间 LncRNA (intergenic LncRNA); 依据 LncRNA 在乳腺癌发生、发展和侵袭转移, 大致可分为 3 大类: 致癌 LncRNA、抑癌 LncRNA、侵袭与转移相关 LncRNA。

2 乳腺癌相关 LncRNA

2.1 致癌 LncRNA

2.1.1 H19

H19 是第一个被发现的 LncRNA, 是最早发现的父系印记基因之一。位于染色体 11p15.5, 其转录本长度约为 2 300 bp^[7]。主要在人类胚胎细胞中表达, 但在组织受损后再生或肿瘤形成过程中被激活, 由此表明 H19 是一种促癌基因^[8]。已证实, H19 参与从转录到转录后对不同肿瘤细胞的抑制和促进的多种过程, 尤其在乳腺癌中 H19 可通过生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、转录因子 (E2F1)、泛素连接酶 E3 家族 (c-Cbl、Cbl-b) 的调控作用影响乳腺癌细胞的增殖、分化和侵袭过程^[9]。并与缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、转录因子 (E2F1)、p53 等相互作用, 调控乳腺癌细胞增殖、侵袭等过程^[10]。此外, H19 在乳腺癌细胞中的表达水平还与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 及孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 明显相关。Sun 等^[11]研究发现 H19 在乳腺癌中的表达显著高于正常组织, 且 ER 阳性乳腺癌细胞株 MCF-7 中的表达高于三阴性乳

腺癌细胞株 MDA-MB-231, 由此表明 H19 可能与雌激素促进乳腺癌细胞增殖有关。Vennin 等^[12]研究发现, H19 作为 miR-675 的前体可增强乳腺癌细胞的生长和转移。最近, Vennin 等^[13]研究发现 91H, H19 和 AGF2 在乳腺癌中过表达。通过敲除乳腺癌细胞中的 91H 可以降低 H19 和 IGF2 的表达; 通过染色质免疫沉淀和甲基化研究发现 91H 过表达抑制了母源等位基因段 H19 / IGF2 印记蛋白和 DNA 甲基化。这些结果表明, H19 通过表观遗传修饰, 维持 H19 / IGF2 基因组印记表达, 使得 H19 和 IGF2 等位基因特异性表达。Bai 等^[14]通过对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞进行异丙酚处理, 发现异丙酚可下调乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的 H19, 从而抑制乳腺癌细胞的入侵和转移。最新研究发现, H19 作为海绵 miRNA let-7 的竞争性内源性 RNA, 导致 let-7 靶标的表达增加, 核心多能性因子 LIN28 富集在乳腺癌干细胞 (breast cancer stem cells, BCSC) 群体和乳腺癌患者样品中。研究发现 LIN28 表达的增加也可以反馈逆转 H19 损失介导的 BCSC 性质的抑制。研究还揭示了 LIN28 阻断成熟 let-7 生产, 从而解除抑制乳腺癌细胞中的 H19 表达。H19 和 LIN28 表达在原发性乳腺癌中表现出强相关性。总的来说, 这些发现显示 LncRNA H19, miRNA let-7 和转录因子 LIN28 形成双负反馈环, 其在维持 BCSCs 中具有关键作用。因此, 破坏该途径提供了乳腺癌的新型治疗策略^[15]。到目前为止, H19 调节癌症干细胞的机制仍然不明确, 但以上研究表明其在癌的发生中起着致癌作用。

2.1.2 LSINCT5

应激诱导长非编码转录本 5 (long stress induced non-coding transcript 5, LSINCT5) 是由 RNA 聚合酶 III 从反义链转录的应激反应性 LncRNA, 位于染色体 5p15.33, 转录本长度约为 2 600 bp。研究发现 LSINCT5 在乳腺癌和卵巢癌中的表达异常升高^[16], 在乳腺癌细胞中表达水平远高于正常乳腺上皮细胞, Lei 等^[17]观察到 LSINCT5 在一组乳腺癌细胞中过表达。体外干扰 LSINCT5 表达可抑制乳腺癌细胞的增殖^[18]。此外, LSINCT5 的表达降低可减少趋化因子受体 CXCR4 的表达, 从而抑制乳腺癌细胞的侵袭转移^[18]。由此可见, LSINCT5 增强肿瘤细胞增殖, 具有乳腺癌诊断标记物的潜在价值和成为肿瘤治疗的潜在靶点。

2.1.3 NEAT1

核富集丰富转录物1(nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1)是一种促进癌症进展的LncRNA,在乳腺癌细胞系和组织中表达上调。Ke等^[19]发现,下调乳腺癌细胞中LncRNA NEAT1的表达可以抑制细胞生长和诱导细胞凋亡。此外,RNA结合蛋白肉瘤融合/脂肪肉瘤转运蛋白(fused in sarcoma/translocated in liposarcoma protein, FUS/TLS)与NEAT1相互作用,减少FUS/TLS的表达也可诱导细胞凋亡。多个miRNAs被鉴定为NEAT1的调节子,但只有miR-548ar的过表达能够降低NEAT1表达并促进凋亡。这些结果表明NEAT1, miR-548ar-3p和FUS之间的相互作用及其在调节乳腺癌细胞凋亡中的作用。最近,Li等^[20]研究发现,NEAT1通过诱导乳腺癌细胞中的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进侵袭,NEAT1在5-氟尿嘧啶(5-FU)抗性中起作用。NEAT1和miR-129之间相互抑制。此外,EMT诱导剂ZEB2被鉴定为miR-129的下游靶标。LncRNA NEAT1通过miR-129/ZEB2轴诱导EMT和5-FU抗性。最新研究发现,lncRNA-NEAT1通过靶向调节miR-101来促进乳腺癌细胞生长。NEAT1诱导的乳腺癌细胞生长中需要miR-101对EZH2的调节。这些研究结果表明NEAT1可能通过miR-101依赖的EZH2调节抑制肿瘤生长。以上研究结果表明LncRNA NEAT1可促进乳腺癌细胞的增殖,是乳腺癌的新的诊断生物标志物和治疗靶标^[21]。

近年来,研究发现还有PVT1^[22]、SOX2OT^[23]、ROR^[24]等LncRNA在乳腺癌细胞中表达上调,这些LncRNA的高表达与乳腺癌的增加密切相关。LncRNA除了包括致癌LncRNA还包括抑癌LncRNA。

2.2 抑癌LncRNA

2.2.1 GAS5

生长阻滞特异转录本5(growth arrest-specific transcript5, GAS5)是一个长度大约0.6~1.8 kb的LncRNA,在人体内,位于非编码蛋白染色体1q25.1。GAS5与糖皮质激素受体DNA结合域竞争性结合,从而抑制凋亡相关基因表达^[25]。Mourtada等^[26]发现乳腺癌组织标本中GAS5水平显著低于正常乳腺上皮组织,同时,GAS5的表达水平与乳腺癌细胞的增殖呈负相关,表明GAS5可

能起着抑癌基因的作用。GAS5过表达还可增加乳腺癌细胞对紫外线照射、顺铂、阿霉素等化疗药物的敏感性,诱导细胞凋亡。Pickard等^[27]发现PI3K/mTOR抑制剂可以增强各种乳腺癌细胞中的GAS5表达,从而促进肿瘤细胞凋亡;Zhang等^[28]发现miR-21可抑制GAS5的表达,促进肿瘤的增殖与转移。Li等^[29]发现GAS5作为miR-21分子海绵抑制肿瘤增殖,从而抑制miR-21的内源性目标磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN),抑制PTEN需要与GAS5表达下调有关的mTOR的活化,HER2阳性乳腺癌常用曲妥珠单抗治疗,但患者易出现抗药性,GAS5在用曲妥珠单抗治疗的患者乳腺癌组织中表达下调,说明GAS5可作为HER2阳性乳腺癌的一种新型预后标记物和候选药物新靶点。Mark等^[30]研究表明,GAS5激素反应元件模拟(hormone response element mimic, HREM)寡核苷酸可以克服细胞凋亡阻力,继发内源性GAS5 LncRNA水平降低,因此,GAS5 LncRNA HREM序列能单独充分诱导乳腺癌细胞凋亡,这一发现为乳腺癌的治疗提供了新依据。最近,Li等^[29]发现在乳腺癌细胞株SKBR-3/Tr细胞和曲妥珠单抗治疗病人的乳腺癌组织中LncRNA GAS5的表达下调,抑制GAS5促进SKBR-3细胞增殖,部分敲除GAS5可逆转拉帕替尼对SKBR-3/Tr细胞增殖的抑制作用,说明GAS5可作为乳腺癌的一种新型预后标记物。

2.2.2 MEG3

人母系表达基因3(maternally expressed gene 3, MEG3)是第一个被发现具有肿瘤抑制功能的LncRNA。位于人类染色体14q32。属于印记DLK1-MEG3基因上的一个印记基因,包含12个亚型基因。MEG3在人的睾丸、卵巢、胰腺、脾、乳腺多种正常组织中表达^[31],而在乳腺癌细胞中含量极低或基本不表达^[32],MEG3可刺激修饰p53和/或MDM2(murine double minute 2, MDM2)的蛋白质表达,阻断MDM2介导的p53降解过程从而发挥抑癌作用^[33]。最近,Sun等^[34]研究发现,通过在乳腺癌细胞MCF7和MB231中过表达MEG3,发现其可通过增强p53目标基因,包括p21, Maspin和KAI1转录抑制乳腺癌细胞MCF7和MB231的增殖、迁移和侵袭能力。这些研究结果表明,MEG3在乳腺癌组织中表达下调,并促进癌细胞的恶性行为,将可能可作为乳腺癌潜在的

治疗靶标。

近年来研究发现还有 LINC00628^[35]、LIM1^[36]等 LncRNA 在乳腺癌细胞中表达下调,影响乳腺癌细胞增殖,可能和乳腺癌的发生和发展有关,可能成为新的乳腺癌分子标志物。

2.3 侵袭转移相关 LncRNA

2.3.1 HOTAIR

HOX 转录反义 RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR) 是第一个被发现以反式转录方式调控基因表达的 LncRNA, 转录本长度约为 2 200 bp。位于染色体 12q13 区域, 由 5 个短外显子和 1 个长外显子共同组成^[37]。Miao 等^[38]用 Meta 分析评估了 HOTAIR 在各种实体肿瘤中的预测意义, 分析表示在大多数实体肿瘤中, 高水平的 HOTAIR 总生存数较差, 由此可推断 HOTAIR 可作为实体肿瘤发展预后不良的标记物。与正常对照乳腺组织相比较, HOTAIR 在原发性和转移性乳腺癌组织中表达均增高, 且转移性乳腺癌组织中 HOTAIR 的表达量更高。高表达的 HOTAIR 促进了乳腺癌的侵袭转移且患者预后较差^[39]。HOTAIR 能与活化 T 细胞的核因子 5 (NFAT5) 直接靶向的 miR-568 相互作用, 通过上调钙结合蛋白 S100A4 的表达, 促进上皮-间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 和细胞侵入并促进乳腺的血管生成上皮细胞, 并因此通过转录激活血管内皮生长转移的发展因子 C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C); G 蛋白偶联雌激素受体 (G protein-coupled estrogen receptor, GPER) 通过抑制 miR-148a 在乳腺癌中的表达水平, 诱导 HOTAIR 表达, 从而促进乳腺癌的转移^[40-41]。研究发现, HOTAIR 在乳腺癌血清中表达增高, 乳腺癌患者的 HOTAIR DNA 是健康对照组的 2.15 倍, 且根据肿瘤的不同阶段, HOTAIR 的平均浓度逐渐增加, 由此表明 HOTAIR 的水平与乳腺癌发展有相关性^[42]。最近, Zhang 等^[43]研究结果显示, 血浆 HOTAIR 的表达水平与 ER, c-erbB-2 和淋巴结转移密切相关, HOTAIR 的表达水平在乳腺癌组织和乳腺癌血浆中均显著增高。这些结果表明, HOTAIR 可作为乳腺癌的潜在生物标志物。

2.3.2 BC200

脑胞质 RNA200 (brain cytoplasmic RNA 200, BC200) 是一个长度为 200 bp, 位于染色体 2p21 的胞浆型 LncRNA, 其主要由 RNA 聚合酶 III 转录, 特

异性表达于神经系统。研究发现 BC200 在正常乳腺组织中无显著表达, 而在侵袭性乳腺癌组织中表达升高, 且其过表达与肿瘤分级和肿瘤侵袭性密切相关。Sosinska 等^[44]结果表明 BC200 对树突蛋白的表达起着重要作用; BC200 的定位错误和过表达都会使传递到突触的 RNA 不足, 导致阿尔茨海默病神经退行性过程和不同组织中的肿瘤改变。最新研究显示在乳腺癌中 BC200 表达上调, 且 ER 阳性的乳腺癌中高于 ER 阴性者, 进一步研究发现激活雌激素信号可诱导 BC200 的表达。用 CRISPR/Cas9 敲除乳腺癌细胞中的 BC200, 发现其可通过促细胞凋亡基因 Bcl-xS 的表达抑制体内外肿瘤细胞的生长。BC200 包含与 Bcl-x 前 mRNA 互补的 17 核苷酸序列, 其可以促进其与 Bcl-x 前 mRNA 的结合使剪接因子异质核糖核蛋白 (hnRNP) A2 / B1 募集从而干扰 Bcl-x 前 mRNA 与 Bcl-xS 促进因子 Sam68 的结合, 导致 Bcl-xS 表达的阻断。这些结果表明, BC200 在乳腺癌中具有致癌作用, 可作为预后标记和减少雌激素依赖性乳腺癌细胞增殖失调的可能靶点^[45]。

3 结语

LncRNA 通过调控增殖、细胞表型和远处转移等多种途径影响着乳腺癌的发生发展, 某些特定 LncRNA 可作为乳腺癌发生、发展的标志物, 本文结合最新的研究进展对部分与乳腺癌进展相关的 LncRNA 进行了综述, 但 LncRNA 的研究仍存在一定局限性, 其序列进化迅速, 保守序列较少, 物种间序列差异较大等加大了 LncRNA 的研究难度。对于 LncRNA 的研究目前还处于初级阶段, 还有很多 LncRNA 的功能特征, 如其在核内运输、染色质修饰、转录激活与干扰等多种重要调控过程的确切机制有待进一步解读, 需要更多的研究来反映 LncRNA 在识别正常和肿瘤组织甚至乳腺癌的不同阶段的潜能, 使它们尽可能的在临床有益于乳腺肿瘤的诊断和预后。尽管他们可能有治疗应用价值, 但仍需更进一步研究才能被用于临床实践, 并且对于 LncRNA 的广泛应用还存在着许多待克服的挑战。LncRNA 为肿瘤治疗和生物标志物提供了一个新的途径, 相信随着研究不断深入, LncRNA 有望成为乳腺癌诊断、治疗和预后的分子新靶点。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer a long non-coding RNA point of view[J]. *RNA Biology*, 2012, 9(6): 703-719.
- [3] Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project [J]. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1760-1774.
- [4] Jalali S, Kapoor S, Sivadas A, et al. Computational approaches towards understanding human long non-coding RNA biology [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(14): 2241-2251.
- [5] Zhu J, Fu H, Wu Y, et al. Function of LncRNAs and approaches to LncRNA - protein interactions [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(10): 876-885.
- [6] Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(3): 300-307.
- [7] Park JY, Lee JE, Park JB, et al. Roles of Long Non-Coding RNAs on Tumorigenesis and Glioma Development [J]. *Brain Tumor Res Treat*, 2014, 2(1): 1-6.
- [8] Matouk IJ, Raveh E, Abu-lail R, et al. Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(7): 1414-1426.
- [9] Malih S, Saidijam M, Malih N. A brief review on long noncoding RNAs: a new paradigm in breast cancer pathogenesis, diagnosis and therapy [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(2): 1479-1485.
- [10] Matouk IJ, Mezan S, Mizrahi A, et al. The oncofetal H19 RNA connection: hypoxia, p53 and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(4): 443-451.
- [11] Sun H, Wang G, Peng Y, et al. H19 LncRNA mediates 17 β -estradiol-induced cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 3045-3052.
- [12] Vennin C, Spruyt N, Dahmani F, et al. H19 non coding RNA derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29209-29223.
- [13] Vennin C, Spruyt N, Robin YM, et al. The long non-coding RNA 91H increases aggressive phenotype of breast cancer cells and up-regulates H19/IGF2 expression through epigenetic modifications [J]. *Cancer Lett*, 2016, S0304-3835(16): 30644-30649.
- [14] Bai JJ, Lin CS, Ye HJ, et al. Propofol suppresses migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells by down-regulating H19 [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2016, 36(9): 1255-1259.
- [15] Peng F, Li TT, Wang KL, et al. H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2569.
- [16] Xu MD, Qi P, Weng WW. Long non-coding RNA LSINCT5 predicts negative prognosis and exhibits oncogenic activity in gastric cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2014, 93(28): e303.
- [17] Nie L, Wu HJ, Hsu JM, et al. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2012, 4(2): 127-150.
- [18] Silva JM, Boczek NJ, Berres MW, et al. LSINCT5 is over expressed in breast and ovarian cancer and affects cellular proliferation [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(3): 496-505.
- [19] Ke H, Zhao L, Feng X, et al. NEAT1 is required for survival of breast cancer cells through FUS and miR-548 [J]. *Gene Regul Syst Bio*, 2016, 10(1): 11-17.
- [20] Li X, Wang S, Li Z, et al. NEAT1 induces epithelial-mesenchymal transition and 5-FU resistance through the miR-129/ZEB2 axis in breast cancer [J]. *FEBS Lett*, 2016. [Epub ahead of print].
- [21] Qian K, Liu G, Tang Z, et al. The long non-coding RNA NEAT1 interacted with miR-101 modulates breast cancer growth by targeting EZH2 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 615: 1-9.
- [22] Conte F, Fiscon G, Chiara M, et al. Role of the long non-coding RNA PVT1 in the dysregulation of the ceRNA-ceRNA network in human breast cancer [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171661.
- [23] Tang X, Gao Y, Yu L, et al. Correlations between lncRNA - SOX2OT polymorphism and susceptibility to breast cancer in a Chinese population [J]. *Biomark Med*, 2017, 11(3): 277-284.
- [24] Zhang HY, Liang F, Zhang JW, et al. Effects of long noncoding RNA - ROR on tamoxifen resistance of breast cancer cells by regulating microRNA-205 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(2): 327-337.
- [25] Hassan S, Buchanan M, Jahan K, et al. CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(1): 225-232.

- [26] Mourtada MM, Pickard MR, Hedge VL, et al. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2):195-208.
- [27] Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: Implications for chemo-therapy[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145(2):359-370.
- [28] Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, et al. Negative regulation of LncRNA GAS5 by miR-21[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(11):1558-1568.
- [29] Li W, Zhai L, Liu C, et al. Downregulation of LncRNA GAS5 causes trastuzumab resistance in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19):27778-27786.
- [30] Pickard MR, Williams GT. The hormone response element mimic sequence of GAS5 lncRNA is sufficient to induce apoptosis in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9):10104-10116.
- [31] Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(11):5119-5126.
- [32] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor[J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(3):R45-53.
- [33] Sheng X, Li J, Yang L, et al. Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long noncoding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1):277-285.
- [34] Sun L, Li Y, Yang B. Downregulated long non-coding RNA MEG3 in breast cancer regulates proliferation, migration and invasion by depending on p53's transcriptional activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(1):323-329.
- [35] Chen DQ, Zheng XD, Cao Y, et al. Long non-coding RNA LINC00628 suppresses the growth and metastasis and promotes cell apoptosis in breast cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2):275-283.
- [36] Sas-Chen A, Aure MR, Leibovich L, et al. LIMT is a novel metastasis inhibiting lncRNA suppressed by EGF and downregulated in aggressive breast cancer[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(9):1052-1064.
- [37] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNA[J]. *Cell*, 2007, 129(7):1311-1323.
- [38] Miao ZI, Ding J, Chen B, et al. HOTAIR overexpression correlated with worse survival in patients with solid tumors[J]. *Minerva Med*, 2016, 107(6):392-400.
- [39] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. *Nature*, 2010, 464(7291):1071-1076.
- [40] Li JT, Wang LF, Zhao YL, et al. Nuclear factor of activated T cells 5 maintained by HotaIR suppression of miR-568 upregulates S100 Calcium binding protein A4 to promote breast cancer metastasis[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(5):454.
- [41] Tao S, He H, Chen Q. Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer[J]. *J Transl Med*, 2015, 13:131.
- [42] Zhang L, Song X, Wang X, et al. Circulating DNA of HOTAIR in serum is a novel biomarker for breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 152(1):199-208.
- [43] Zhang Y, Zhang K, Luo Z, et al. Circulating long non-coding HOX transcript antisense intergenic ribonucleic acid in plasma as a potential biomarker for diagnosis of breast cancer[J]. *Thorac Cancer*, 2016, 7(6):627-632.
- [44] Sosinska P, Mikula-Pietrasik J, Ksiazek K. The double-edged sword of long non-coding RNA: The role of human brain-specific BC200 RNA in translational control, neurodegenerative diseases, and cancer[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015, 766:58-67.
- [45] Singh R, Gupta SC, Peng WX, et al. Regulation of alternative splicing of Bcl-x by BC200 contributes to breast cancer pathogenesis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6):e2262.

(上接第29页)

- [19] 江敏, 付继玲, 马丽. 2009-2013年九江市手足口病流行病学特征分析[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(11):1936-1938.
- [20] 史晓燕, 柴青, 宫金伶, 等. 2013年青岛地区手足口病病原谱及三种主要肠道病毒青岛分离株的基因特征分析[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2015, 35(10):765-770.
- [21] 李晓君, 李芳, 唐海丰. 上海市普陀区2013年手足口病病原学监测结果分析[J]. *海南医学*, 2015, 26(5):755-757.

· 综述 ·

人类微生物组学与健康及其临床检验的需求

王庆忠* 范云 沈祁烨

[摘要] 人类微生物组是人出生以后才进入人体与人类共生的位于身体不同部位的完整的人类微生物菌群基因组信息的总和。它与人类基因组形成超生物体,其间的微生物种属构成、相互作用、遗传进化与人类的健康、疾病密切相关。诸如肥胖症、糖尿病、自闭症、抑郁症、过敏症、炎症性肠道疾病、心血管疾病、多种癌症等均与人体的微生物群系高度相关。近20年来高通量测序、生物信息学等现代生物学技术和大数据处理技术的高速发展,为研究者提供了可靠的技术手段。逐渐建立起以16S rDNA系统分析为基础,宏基因组为依托的现代整体微生物学研究方法。人类微生物组爆发性的基础研究为临床应用打下坚实的基础,它的应用可从3个方面展开:加法,即添加或补充自然或工程微生物菌群;减法,消减或消除宿主体内有害微生物菌群;调节治疗,通过非生物制剂或益生元,调节宿主内源微生物群的组成和活性。为了更好地支撑人类微生物组在临床上的应用,需要保证在不同实验室之间检验结果的一致性,对检验前、中、后3个阶段进行全程质量管理。本文就人类微生物组概念、与人类健康关系、研究技术和临床检验需求等方面作一综述,以有利于该技术在临床更好地应用。

[关键词] 人类微生物组;高通量测序;生物信息学;临床检验

Human microbiome related with human health and its requirement for clinical diagnosis

WANG Qingzhong*, FAN Yun, SHEN Qiye

(Shanghai Clinical Laboratory Center, Shanghai, China, 200126)

[ABSTRACT] Human microbiome is the total genome of the complete microbial community in different parts of the body. The microbiome collaborates with the human genome to form a superorganism. Microbial species composition, interaction, genetic evolution are closely related with human health and disease, which include obesity, diabetes, autism, depression, allergies, inflammatory bowel disease, cardiovascular disease, cancer, etc. Over the past 20 years, with the development of modern biological technology and big data processing technology, such as high-throughput sequencing and bioinformatics, have yielded reliable methods for researchers. They gradually established an analytical system based on the 16S rDNA analysis, and an overall research method that relies on metagenomic technology. The human microbiome research founded a solid foundation for clinical application. Applied microbiome technology in a clinical setting has 3 aspects: addition of natural or engineered bacteria; subtraction or elimination of host harmful microorganisms; regulation by non-biological agents or prebiotics and regulation of host endogenous microbial composition and activity. The application of human microbiome in a clinical setting needs to ensure the consistency of the results in different laboratories, based on total quality management of the 3 test stages. In this paper, the concept of human microbiome and its relationship with human health will be reviewed; furthermore, research techniques and requirements for clinical diagnosis, and how to make the best use of the application of human microbiome in the clinic will be discussed.

[KEY WORDS] Human microbiome; High throughput sequencing; Bioinformatics; Clinical diagnosis

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会重要疾病联合攻关项目资助(2013ZYJB0010)

作者单位:上海市临床检验中心,上海 200126

*通讯作者:王庆忠, E-mail: zlwqz@163.com

微生物与人类共生了数百万年,在基因构成和代谢功能上与宿主形成“超生物体(Superorganism)”,微生物种属构成、相互作用、遗传进化与人类的健康和疾病密切相关。传统研究方法依赖于菌株分离与纯培养,通过表型和生化特性鉴定,研究的微生物不到1%,不能在深度和广度上发掘余下众多微生物群系的系统发育及群落功能。近20年来高通量测序、生物信息学等现代生物学技术和大数据处理技术的发展,逐渐建立了以16S rDNA系统分析为基础,宏基因组为发展方向的微生物组学研究方法。本文通过介绍微生物组学概念及其与疾病的关系和研究技术,探讨微生物组学临床应用和对诊断的需求,便于加深对这一新兴学科的认识,有利于该技术在临床更好地应用。

1 人类微生物组学概念及与健康的关系

1.1 人类微生物组学概念

人体皮肤、呼吸道、消化道、生殖系统等部位共生的微生物群落数量庞大,涵括病毒、古菌、细菌和真菌等微生物类型,成人体表和体内的微生物细胞估计是人类自身细胞的10倍,占体重的1%~2%^[1-2]。为了解析人类健康和疾病与微生物群系的关系,研究者提出人类微生物组(human microbiome)或者“宏基因组(megagenome)”的概念。人类微生物组是人出生以后才进入人体与人类共生的位于身体不同部位的完整的人类微生物菌群基因组信息的总和^[3]。宏基因组(metagenome)和宏转录组(metatranscriptome)指全基因组和RNA来源的特定的微生物基因转录本的总和。病毒组(virome)主要是指所有病毒的基因组,真菌组(mycobiome)主要是指所有真菌的基因组。

21世纪初,2个宏大的国际人类微生物组项目,由欧洲主导的人体肠道宏基因组学(metagenomics of human intestinal tract, MetaHit)和由美国主导的人类微生物组计划(human microbiome project, HMP)开始聚焦人体中的微生物群系。2016年5月,美国白宫科学和技术政策办公室宣布启动“国家微生物组计划(national microbiome initiative, NMI)”。经过十余年的研究,2个计划发布初步研究成果。MetaHit分析了来自健康人、超重和肥胖的成年人以及肠炎病患者124种肠道细菌的330万条非冗余基因,据估计,在人类肠道微生物存在超过1000种细菌^[4-5]。HMP初步分析178个与人类宿

主有关的细菌基因组序列^[6-7]。

1.2 微生物组与人类健康的关系

人体同微生物群体之间是共生与互惠关系。宿主为微生物提供保护和丰富的营养,微生物则为宿主提供消化、免疫和神经系统发育等支持和协作。研究表明,微生物与诸多重大人类疾病息息相关,如肥胖症、糖尿病、自闭症、抑郁症、过敏症、炎症性肠道疾病、心血管疾病、多种癌症等代谢、精神、免疫类疾病。

研究较为全面的是人类的肠道菌群与宿主之间的相互作用。肠道微生物与人类肥胖、营养物质(如糖类、短链脂肪酸)的吸收、重要维生素(维生素K、维生素B12)的产生、潜在致癌物质的脱毒等高度相关。肠道微生物基因组的测序工作揭示,微生物影响肠道血管生成和运动,减少肠道屏障的通透性,提高肠道免疫能力^[8]。肠道微生物群系的定植和种群构成影响因素众多。首先是出生时分娩方式,其次是早期的生活饮食类型,随着年龄的增长,个人微生物群系逐渐稳定^[9]。成年人肠道菌群的组成一般以严格厌氧菌为主,厚壁菌和拟杆菌类最为丰富,其次是变形杆菌、放线菌^[10]。每个个体肠道微生物群系具有一定的独特性,只有不到30%微生物为个体之间所共享^[11]。华大基因研究院、欧洲分子生物学实验室和深圳大学医学院等单位完成的“肠道微生物与II型糖尿病的宏基因组关联分析”,识别了约6万个II型糖尿病候选生物标记物,并成功应用于糖尿病的临床评定和病人诊断^[4]。

神经退行性疾病与肠道微生物组的关系密切。淀粉样蛋白与神经退行性疾病,特别是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)密切相关。人体微生物产生的淀粉样蛋白与AD、异常行为、自闭症等神经退行性疾病的发病率存在一定关联^[12-13]。细菌淀粉样蛋白可以激活TLR2、NFκB、TLR1、CD14等炎症分子^[14]。TLR2导致notch1上调,notch1在AD的发展中起着关键的作用^[15]。在胃部,健康人的胃是以普氏菌、链球菌、韦荣球菌、罗思氏菌和嗜血杆菌为主^[16]。幽门螺杆菌是慢性胃炎患者的主导菌群,该菌在肠道菌群和其他物种之间的相互作用可能会导致胃癌高发;数量众多的链球菌属与胃窦炎有关^[17]。胃癌患者和健康人群之间胃部菌群的大类差异不显著,差异主要体现在链球菌、乳酸杆菌、韦荣球菌、普氏菌等大类菌群的具体菌种差异上。在肺脏,微生物调节机体免疫防御病毒感

染。在神经系统方面,微生物还通过减少突触连接,调节焦虑和痛感等影响人类行为。

2 微生物组学研究主要技术

微生物组学是新兴学科,它的发展与高通量基因测序和大数据的生物信息学分析密切相关。主要通过2种方式研究微生物组,一是通过16S rDNA基因序列的测定,提供一个全景式的微生物组成;二是通过宏基因组数据分析,深度揭示上述微生物已知和潜在的功能。

2.1 基于16S rDNA基因序列的微生物组学研究

16S rDNA的测序是近年来微生物生态领域最核心、最具突破性的技术。通过Roche 454焦磷酸测序、Illumina Solexa合成测序等第二代测序仪高通量测定16S rDNA可变区序列,获得全面、系统、结构化的群落结构信息。该方法设计针对16S rDNA基因的V3-V1、V2-V4、V4、V3-V6、V9等不同区域的引物,通过PCR和高通量基因测序,生物信息学分析测序结果。大数据分析一般流程包括:序列提取、质控、相似序列聚类分析(operational taxonomic unit, OTU)、种属分类、alpha以及beta多样性分析等^[18-19], OTU是16S rDNA序列分析的关键控制点之一。

16S rDNA的测序通过提供丰富的全局性物种类群信息,可在微生物集群的层面揭示它们之间的相互作用。但方法局限在于注释是基于OTU,一般情况下仅可将微生物分析到科或属水平,不能精确地鉴定到物种水平。同时特定的基因并不直接测序,加之微生物间基因水平转移和数量众多未知菌株的存在^[20-21],极大地限制对未知微生物的发现和进一步研究。

2.2 基于微生物组学的宏基因组研究

基于全基因组测序的宏基因组技术,通过鸟枪法高通量测序,可以在获得菌群分类数据的同时采集到功能基因信息。此外该技术可以减少PCR扩增导致的偏差,原因在于检测时一般直接测序。宏基因组数据分析常包括如下步骤:序列质控——序列组装(也可不经组装,直接比对目标数据库)——比对检测序列与已知微生物基因数据(统计门、纲、目、科、属、种的分类和丰度)——比较物种多样性(如采用PCA分析、聚类分析、筛选与样品分组显著相关因子)——分析基因组份(前噬菌体预测、可转座原件、基因预测)——功能注释(比对KEGG、egg-

NOG、CAZy等数据库,分析代谢通路、主要化合物活性酶、同源性)——抗生素耐药组的比对分析等^[22-24]。

宏基因组测序和16S rDNA测序尽管在菌群分布上基本一致^[25],但分辨率差异显著。II型糖尿病患者肠道菌群和对照人群在群落层面,并无显著不同;而在功能基因上,宏基因组揭示的信息量却显著多于16S rDNA测序^[4, 26]。宏基因组技术仍然存在一些技术难题需要解决。首先,通过常规的序列相似度注释基因功能,对某些基因而言不准确也存在一定量的误注;其次,存在无法找到匹配的数据库序列,这在病毒组由甚,有多达80%的序列无法找到匹配;再次,对于低丰度的菌株的微生物基因组,通过宏基因组难以将其进行组装拼接。

3 临床应用及检验需求

人类微生物组的基础研究为本方向的临床应用提供了坚实的基础。本学科正处于从现象描述、关联分析,到机制研究、模型干预,逐渐向疾病诊断、预测和治疗的井喷式发展。该技术应用于临床需要保证在不同实验室之间结果的一致性,对检验前、中、后3个阶段进行全程质量管理。

3.1 微生物组的临床应用

在临床应用人类微生物组可从3个侧面展开:加法,即添加或补充自然或工程微生物菌群;减法,消减或消除宿主体内有害微生物菌群;调节治疗,通过非生物制剂或益生元,调节宿主内源微生物群的组成和活性^[27-28]。

益生菌和益生元构成的第一代微生物组疗法已经在临床得到了越来越多的应用^[20-31]。Shanahan等^[32]研究发现炎症性肠道疾病患者与非患者之间的菌群存在显著差异,通过对人体微生物组的干预和调整,达到治疗和预防疾病的目的。在临床上给患者喂服具有胆盐水解酶活性的罗伊氏乳杆菌菌株,通过调节胆汁酸池水平从而降低胆固醇水平^[33-34]。

消减疗法可使用化学物质、多肽等去除患者体内特定的微生物种群。细菌素是由核糖体合成的抗菌肽,可以对易感菌产生细胞毒性。利用宏基因组学鉴定、筛选和使用对特定病原体定向杀灭细菌素,调节微生物种群^[35-36]。另外,噬菌体疗法通过自然或工程化的噬菌体杀灭特定细菌,细菌和噬菌体种群稳定共存于健康小鼠肠道^[37]。

设计特定的微生物群系和选择性的抗菌药物所构成的新一代重组益生菌,已为广大临床微生物学家关注。通过修改益生菌的基因达到更好的治疗效果,如表达N-酰基磷脂乙醇胺(N-acylphosphatidylethanolamines)的大肠杆菌 Nissle 1917 基因工程益生菌小鼠,喂养高脂饮食时,相对于对照组可以减轻肥胖症、胰岛素耐受和脂肪肝的形成^[38]。

3.2 微生物组的检验需求

2014年,Dominianni C等^[39]进行微生物组分析时对粪便样本的收集方法进行了研究。3个健康人的粪便样本分4种采集方法进行了采集。一是采用便隐血检测试剂卡,在室温保存;二是放入Eppendorf管保存,在室温保存;三是室温下放入带有RNAlate的Eppendorf管;四是样品立即冻结在-80℃作为对照。所有样本均在各自处理方式下保存3d,后经16S rDNA基因测序。全面比较不同样本处理方法的微生物类群分布和主要微生物类群的相对丰度,显示低成本的便隐血检测试剂卡可以为粪便样本可靠的采集方法。

样本处理阶段也可能产生附加DNA污染,分子生物学级别的实验用水、PCR试剂和DNA提取试剂盒均是潜在的污染源。常见的污染微生物包括不动杆菌属、产碱杆菌、芽孢杆菌、军团菌、新鞘脂菌属、假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、鞘氨醇单胞菌、草螺菌属、短根瘤菌属、中间根瘤菌属、甲基杆菌、雷弗森菌、青枯菌属、假平胞菌属、狭长平胞菌^[40-41]。

德国临床微生物学家Hiergeist A等^[42]在世界卫生组织临床实验室质量保证和标准化合作中心的帮助下,2014至2015年组织了9家来自奥地利、德国和挪威的实验室进行了基于16S rDNA的粪便微生物组分析的室内质量评估。评估了包括标本采集、DNA的提取和纯化、PCR扩增纯化或浓缩、测序和生物信息学等多个过程。结果显示不同实验室之间在不同微生物类别DNA含量、不同微生物类别丰度、鉴定的菌株数量等方面均存在很大的差异。如不同微生物类别丰度在不同实验室差别极大,厚壁菌门最高丰度78.14%,最低仅为45.98%;拟杆菌门最高丰度44.36%,最低仅为0.96%;放线菌属最高丰度19.42%,最低仅为0.43%;变形菌门最高丰度2.5%,最低仅为0.27%^[42]。

2015年3月,在欧洲卢森堡首都卢森堡市举行的第五届国际人类微生物组联盟(international human microbiome congress, IHMC)学术会议上,就如

何对临床样品收集、DNA提取、储存和转运等问题进行了探讨。Thomas V教授指出建立全过程的标准化操作规程(standard operating procedure, SOP)至关重要。尤其是样本采集和保存方法,将直接影响测序结果和数据分析。实验室必须要确保每份研究样品的合格有效。Sinha R教授通过开展微生物组质控项目(Microbiome QC, MBQC),依据不同实验室的不同研究者在进行试验(湿库)和数据分析结果(干库)所产生的差异,整理和评估不同的实验方法和分析方法对实验结果的影响。显示,湿库的差异比干库造成的偏差更大,但对于单个样品来说,这些差异并没有影响数据的有效性^[43]。

4 前景展望

人类微生物组学研究作为新兴的发展方向,其在理论上和临床应用上还有许多方面有待进一步深入。在人类健康与微生物的关系方面,不同群系微生物,在不同部位,对不同疾病,不同种族人群,不同年龄、性别人群的影响的科学解析,是否可以归纳出针对不同疾病的参考微生物群系的诊断图谱或参数?在微生物组研究技术方面,强大的基因测序技术已经生成巨大的数据库,如何采用新型的信息学技术挖掘?需要对其功能进行研究,特别是对大量基因功能信息的获得、针对性基因的研究和新型微生物菌株的鉴定方面需要新的理论和算法作为支撑。在临床应用上,迫切需要解决不同实验室的相互比较的可行性。在样本的采集、运输、储存,检验过程的方法选择、性能评估,以及结果的输出和临床的应用上,均要取得业界的共识,形成一系列的SOP文本。为了保证结果的室内一致性,组织国际间或国内的室内质评计划显得十分必要。

参考文献

- [1] Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [2] Ley RE, Peterson DA, Gordon JL. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 837-848.
- [3] Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 260-270.

- [4] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464(7285):59-65.
- [5] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2011, 473(7346):174-180.
- [6] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717):1915-1920.
- [8] Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(99):15451-15455.
- [9] Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(9):496-503.
- [10] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26):11971-11975.
- [11] Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, et al. The long-term stability of the human gut microbiota [J]. *Science*, 2013, 341(6141):1237439.
- [12] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders [J]. *Cell*, 2013, 155(7):1451-1463.
- [13] Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, et al. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children [J]. *Plos ONE*, 2013, 8(7):e68322.
- [14] Tükel C, Nishimori JH, Wilson RP, et al. Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms [J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12(10):1495-1505.
- [15] Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(38):174-183.
- [16] Li XX, Wong GL, To KF, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use [J]. *Plos ONE*, 2009, 4(11):e7985.
- [17] Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? [J]. *United Europ Gastro J*, 2015, 3(3):255-260.
- [18] Sanschagrin S, Yergeau E. Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons [J]. *J Vis Exp*, 2014, 90(90):e51709-e51709.
- [19] Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis [J]. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(D1):D633-D642.
- [20] Kim Y, Koh I, Rho M. Deciphering the human microbiome using next-generation sequencing data and bioinformatics approaches [J]. *Methods*, 2015, 79-80:52-59.
- [21] Konstantinidis KT, Tiedje JM. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10(5):504-509.
- [22] Rho M, Tang H, Ye Y. FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, 38(20):e191.
- [23] Markowitz VM, Chen IM, Palaniappan K, et al. IMG 4 version of the integrated microbial genomes comparative analysis system [J]. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(D1):D560-D567.
- [24] Huang K, Brady A, Mahurkar A, et al. MetaRef: a pan-genomic database for comparative and community microbial genomics [J]. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(D1):D617-D624.
- [25] Walker AW, Duncan SH, Louis P, et al. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(5):267-274.
- [26] Wu X, Ma C, Han L, et al. Molecular characterization of the faecal microbiota in patients with type II diabetes [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 61(1):69-78.
- [27] Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(2):827-835.
- [28] Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(1):69-75.
- [29] Mimeo M, Citorika RJ, Lu TK, et al. Microbiome therapeutics—Advances and challenges [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 105(Pt A):44-54.
- [30] Varankovich NV, Nickerson MT, Korber DR. Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6(1):1-14.
- [31] Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(2):153-158.
- [32] Shanahan F, Quigley EM. Manipulation of the micro-

- biota for treatment of IBS and IBD-challenges and controversies [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6):1554-1563.
- [33] Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The Treatment-Naive microbiome in New-Onset crohn's disease [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(3):382-392.
- [34] Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2012, 66(11):1234-1241.
- [35] Millette M, Cornut G, Dupont C, et al. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(7):1997-2003.
- [36] Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, et al. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract [J]. *Nature*, 2015, 526(7575):719-722.
- [37] Maura D, Morello E, du Merle L, et al. Intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* supports long-term bacteriophage replication in mice [J]. *Environ Microbiol*, 2012, 14(8):1844-1854.
- [38] Chen Z, Guo L, Zhang Y, et al. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(8):3391-3406.
- [39] Dominianni C, Wu J, Hayes RB, et al. Comparison of methods for fecal microbiome biospecimen collection [J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1):103.
- [40] Laurence M, Hatzis C, Brash DE. Common contaminants in nextgeneration sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes [J]. *PLoS One*, 2014, 9:e97876.
- [41] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses [J]. *BMC Biology*, 2014, 12(1):87.
- [42] Hiergeist A, Reischl U. Multicenter quality assessment of 16S ribosomal DNA -sequencing for microbiome analyses reveals high inter-center variability [J]. *Int J Med Microbiol*, 2016, 306(5):334-342.
- [43] 李兰娟. 国际人类微生物组最新研究进展—第五届国际人类微生物组联盟学术会议纪要 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2015, 8(2):188-192.

(上接第60页)

- cells of lung cancer patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(52):21083-21088.
- [26] Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12):1459-1463.
- [27] Sharron LX, Hu L, Sandy K, et al. Differentiating progressive from nonprogressive T1 bladder cancer by gene expression profiling: applying RNA-sequencing analysis on archived specimens [J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(3):327-336.
- [28] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1):9-29.
- [29] Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Science*, 2011, 333(6046):1157-1160.
- [30] Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1 [J]. *Science*, 2011, 333(6046):1154-1172.
- [31] Song X, Xia R, Li J, et al. Common and complex notch1 mutations in Chinese oral squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(3):701-710.
- [32] Gaykalova DA, Mambo E, Choudhary A, et al. Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e93102.
- [33] Farah CS, Jessri M, Kordbacheh F, et al. Next-generation sequencing applications in head and neck oncology [J]. Springer International Publishing, 2015, 2(23):401-422.
- [34] Robinson DR, Wu YM, Vats P, et al. Activating ESRI mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12):1446-1451.
- [35] Yee SS, Lieberman DB, Blanchard T, et al. A novel approach for next-generation sequencing of circulating tumor cells [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2016. Epub ahead of print.

广州医科大学附属第二医院检验科

广州医科大学附属第二医院检验科位于广东省省会广州市昌岗东路,创立于1982年,参照《临床实验室设计指南》的国家标准设计,符合二级实验室标准。科室按照ISO 15189建立实验室质量管理体系,经过几代人30多年的不懈努力,传承广州医科大学校训厚德修身、博学志远的精神,现已成为集临床检验、教学、科研于一体的大型综合性实验室。该实验室是广东省首批入选的临床基因扩增培训基地的示范实验室之一,是卫生部检验医师培训基地,是我省临床重点专科建设项目,是广州市重点学科。同时,它还是广东省细菌耐药监测中心、广州医科大学、广东医科大学等院校的医学检验技术教学、研究生培养基地。

科室现有技术人员51人,其中正高级职称6人,副高级职称20人,中级职称15人,初级职称10人,获博士学位者3人,硕士学位者22人。学科队伍拥有广州市医学会检验分会主任委员1人次,国家级医学分会委员1人次,省市级医学分会副主委5人次,常委1人次,省医学分会青年委员1名,在全国及广东省检验界拥有稳固的学术地位和影响力。

科室下设6个亚专业组,分别为门急诊组、临床血液体液专业组、生化组、免疫组、微生物组和分子生物组。实验室拥有世界一流的先进设备,总资产约为3000万元。科室常规开展项目500余项,基本覆盖综合三级医院的检验科必须开展的检验项目,可为临床提供准确、及时、项目齐全的检验报告。科室积极参加国际、国家卫计委和广东省临床检验中心组织的室间质量评价活动,成绩优秀,通过室间质评监控各亚专业的检测服务能力。其技术已逐渐渗透到疾病发病机制、诊断、治疗及预防等医学科学领域。开展的新技术新项目辐射全省及周边多个省份,先后举办国家级、省级及市级学术会议10余次,社会效益显著。

科室承担中国博士后基金、国家自然科学基金、广东省自然科学基金、广东省科技厅、广东省教育厅、广东省卫计委、广州市教育局及广州市卫计委等多项研究。主持完成的科研成果奖获得广州市科学技术进步三等奖,获国家发明专利1项,实用新型专利4项。在国内外重要期刊发表研究论文300余篇,编写教材30部,主编3部,副主编5部;主编专著1部。培养硕士研究生20多名。

学科带头人周强为广州医科大学硕士研究生导师,同时担任广州市医师协会检验医师分会副主任委员、广州市医学会检验分会副主任委员等职务。从事医学检验医疗、教学和科研工作23年,取得了丰实的业绩,主要研究方向为糖尿病疾病的基因诊断及发病机制的研究。



→ 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