



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

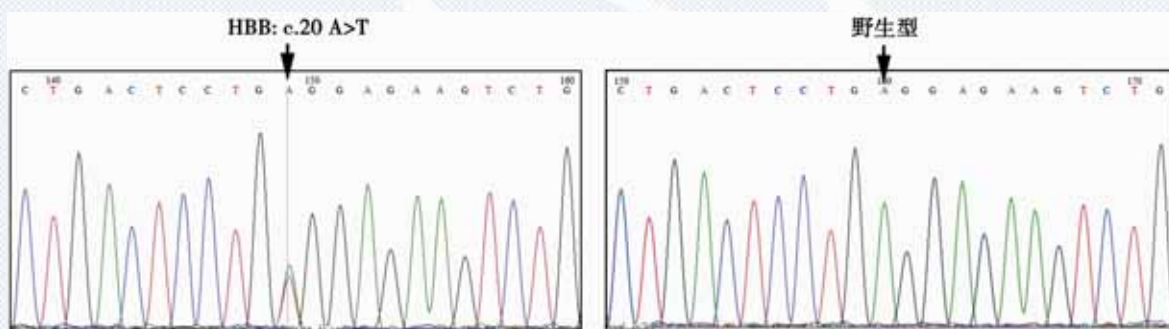
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2015年3月 第7卷 第2期 总第36期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 7 Number 2 March 2015



图(P81) PCR-DNA 测序结果

Figure(P81) The results of PCR-DNA sequencing

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊
中国期刊全文数据库全文必录期刊
中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

分子诊断与治疗杂志

二〇一五年三月

第七卷 第二期

中山大学



刘拥军

1968年3月出生。2002年毕业于北京协和医学院中国医学科学院血液学研究所，获医学博士学位。

研究员，客座教授，曾为北京协和医学院硕士生导师。现任天津和泽干细胞科技有限公司总裁。曾任国家干细胞工程研究

中心/泰达生命科学技术研究中心研发部主任，细胞产品国家工程研究中心副主任兼间充质干细胞库主任，协和华东干细胞基因工程有限公司技术总监、干细胞库主任，协和干细胞基因工程有限公司的总裁助理、间充质干细胞库主任。曾为全国生理学会会员、中国生物医学工程学会会员、国家自然科学基金评审人。

刘拥军博士从事间充质干细胞及基因工程的研究开发工作，在干细胞领域、基因表达与调控以及免疫生物学等方面取得了一定的国际领先学术成果。创建了和泽生物科技有限公司和天津和泽干细胞科技有限公司，建立了世界上首家脂肪干细胞库。在国际上首次克隆和表达了一个新型的干细胞因子-人促血液血管生成素（HAPO），该因子可刺激早期造血干细胞和血管祖细胞生长，提高辐射损伤动物的生存率。2004年带领科研团队成功从人脐带中分离、培养出间充质干细胞，并对其生物学特性、在支持造血干细胞移植，对骨髓移植后移植物抗宿主病（GVHD）以及脐带间充质干细胞在神经疾病和肝胆疾病应用方面进行了研究。脐带间充质干细胞项目已被细胞产品国家工程研究中心开发，建成世界上首家脐带间充质干细胞库。作为项目负责人承担及完成了科技部“863”、“十五”重大专项、国家自然科学基金项目、天津市自然基金等多项科研课题，作为骨干成员完成863计划、攀登计划、973项目、天津市公关项目等多项科研课题。获多项科技奖励。主持研发的“脐带间充质干细胞抗肝纤维化注射液”产品经过国家高科技产业化研究会组织专家论证鉴定后，获得“国际先进水平”的评价。申请国家发明专利8项，申请国际发明专利1项，获得5项国家发明专利。在国内外学术期刊上发表论文30余篇。培养硕士研究生2名，后离开高校，专注于间充质干细胞的产业化工作。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2015年3月 第7卷 第2期

目次

述 评

分子病理学技术在肿瘤诊治中的应用 董贺 孙青 (73)

论 著

赤道几内亚比奥科岛居民的镰型红细胞病的流行病学调查
..... 谢东德 陈江涛 Urbano Monsuy Eyi 等 (78)

云南省西双版纳州傣族 G6PD 缺陷症发生率及突变谱研究 詹小芬 张芹 周露 等 (83)

广西壮族及汉族人群 CD40 基因 rs4810485G/T 遗传多态性 向阳 蓝艳 罗宏成 等 (87)

厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗 EGFR 野生型或突变状态未知肺腺癌脑转移的疗效初探
..... 张亚雷 杨海虹 何绮华 等 (91)

两例短串联重复序列三带型等位基因的遗传多态性分析 许泽辉 严提珍 罗世强 等 (97)

糖皮质激素个体化用药系统平台的建立与评价 王昌富 彭长华 李琳芸 等 (103)

C 反应蛋白及血常规对肺炎支原体或军团菌感染儿童病情判断价值
..... 蔡妍 章金灿 陆卫歆 (107)

间充质干细胞移植治疗终末期肝病前后血清甲胎球蛋白的变化
..... 陈建华 徐玉琴 杨晋辉 等 (110)

综 述

电化学生物传感器在 microRNA 检测中的应用 马雯 吕微风 郑磊 (114)

血管紧张素 (1-7): 潜在的肿瘤治疗新靶点 陈秀生 林创珍 雷川 等 (122)

白细胞介素-21 与系统性红斑狼疮之关系研究进展 蓝艳 郭静 (127)

幽门螺杆菌抗生素耐药性基因检测: 下一步? 李云振 葛安国 王庆波 等 (132)

卵巢上皮癌的组织起源及其分子生物学特性 刘影 DUBEAU Louis (140)

专家风采

刘拥军 (封二)

实验室巡礼

天津市干细胞再生医学转化企业重点实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 3 March 2015

CONTENTS

COMMENTS

- The application of molecular pathological technology in the diagnosis and treatment of tumors
DONG He, SUN Qing (73)

ORIGINAL ARTICLES

- Epidemiological investigation of the sickle cell disease in local inhabits on Bioko Island, Equatorial Guinea
XIE Dongde, CHEN Jiangtao, Urbano Monsuy Eyi, Rocio Apicante Matesa, Maximo Miko Ondo Obono, Carlos Sala Ehapo, YUE Liang, GUO Yihua, GU Jiechao, ZHAN Xiaofen, YANG Hui, YANG Huitian, YANG Liye, LIN Min (78)
- The prevalence and mutations distribution of G6PD deficiency among Dai population in Xishuangbanna region, Yunnan province
ZHAN Xiaofen, ZHANG Qin, ZHOU Lu, YANG Hui, YANG Huitian, YANG Liye, LIN Min (83)
- The genetic polymorphism of CD40 gene in Guangxi Zhuang and Han populations
XIANG Yang, LAN Yan, LUO Hongcheng, CHEN Jianming, WU Chengjiang, JIANG Yuanwei, WEI Yesheng (87)
- The efficacy of erlotinib with pemetrexed/cisplatin for brain metastases patients from EGFR wild-type or unknown lung adenocarcinoma
ZHANG Yalei, YANG Haihong, HE Qihua, SHAO Wenlong, HE Jianxing (91)
- Genetic polymorphism analysis of two short tandem repeat three-banded allele patterns
XU Zehui, YAN Tizhen, LUO Shiqiang, WANG Qihua, TANG Ning (97)
- Establishment and evaluation of glucocorticoid individualized medication system platform
WANG Changfu, PENG Changhua, LI Linyun, MEI Bing (103)
- Evaluation of C reactive protein and blood routine examination for the assessment of mycoplasma and legionella pneumophila infection in children
CAI Yan, ZHANG Jincan, LU Weixin, ZHANG Danxuan, CHENG Longfei (107)
- The change of serum α -fetoprotein during mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of end-stage liver disease
CHEN Jianhua, XU Yuqin, YANG Jinhui, ZHANG Jun (110)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 3 March 2015

CONTENTS

REVIEWS

Applications of electrochemical biosensors in the detection of microRNA

MA Wen, LV Weifeng, ZHENG Lei (114)

Ang-(1-7): a potential therapy target for tumors

CHEN Xiusheng, LIN Chuangzhen, LEI Chuan, QU Xiangming, HU Ao, NIE Xin, CHEN Si, DU Hongyan (122)

Association of the interleukin-21 with systemic lupus erythematosus

LAN Yan, GUO Jing (127)

Antibiotic resistance genes detection of *Helicobacter pylori*: the next step?

LI Yunzhen, GE Anguo, WANG Qingbo, GAO Hongzhi, WANG Mingxi, HU Weipeng (132)

The histogenesis and molecular biological characteristics of epithelial ovarian cancer

LIU Ying, DUBEAU Louis (140)

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2015年3月 第7卷 第2期 总第36期 Bimonthly Volume 7 Number 2 March 2015

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司

总编辑 黄绮生
执行主编 李明
编辑部主任 徐伟文
编辑部执行主任 邓子华
编辑 李晓兰 谭舜菁
排版 钟华安
编辑出版 《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 广州中大印刷有限公司
出版日期 2015年3月18日
定价 RMB 15.00元

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

Editor in Chief HUANG Qisheng
Execute Editor in Chief LI Ming
Managing Director XU Weiwen
Execute Managing Director DENG Zihua
Editors LI Xiaolan TAN Shunjing
Typesetting ZHONG Huaan
Editing China Family Doctors Magazine Publisher Co.Ltd.

Add 10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou 510620, China
Tel (020)32290177 32290789-206
Fax (020)32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.
Publish Date 2015.3.18
Price RMB 15.00

分子病理学技术在肿瘤诊治中的应用

董贺 孙青*

[摘要] 近几十年来,新兴学科——分子病理学的出现,使得人类对疾病特别是肿瘤的研究从器官、组织、细胞水平深入到蛋白、染色体和 DNA 水平。这不仅能为病理诊断提供更准确、更客观的依据,且可更好地指导肿瘤的靶向治疗和预后判断等,极大地推动了病理学的发展。分子病理学的技术如免疫组化、原位杂交、基因突变检测、生物芯片、流式细胞术等,已经得到了广泛应用,并将在未来的医疗领域里扮演越来越重要的角色。本文就近年来分子病理学技术在肿瘤诊治中的应用进行综述。

[关键词] 分子病理学技术; 肿瘤诊治

The application of molecular pathological technology in the diagnosis and treatment of tumors

DONG He, SUN Qing*

(Department of Pathology, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong, China, 250014)

[ABSTRACT] In recent decades, the development of molecular pathology has deepen people's knowledge of disease and tumor from the level of organ, tissue, cell to the level of protein, chromosome and DNA. The molecular pathological technology has greatly promoted the development of modern pathology by providing more precise and objective evidence to guide the target therapy and prognosis of tumors. Molecular pathological technology has been widely applied, such as immunohistochemistry, *in situ* hybridization, gene mutation detection, biochips, flow cytometry and so on. The molecular pathology will play a more and more important role in the future medical treatment. Here we summarize the application of molecular pathology technology in recent years in the diagnosis and treatment of tumors.

[KEY WORDS] Molecular pathological technology; Diagnosis and treatment of tumors

传统病理学通常分为诊断病理学和实验病理学。前者通过尸体解剖(autopsy)、活体组织检查(biopsy)和细胞学(cytology)检查对疾病做出最终诊断;后者则以动物实验或在体外培养的细胞为材料进行研究。近几十年来,随着分子生物学、免疫学、遗传学等学科的发展和免疫组化、原位杂交、流式细胞术等技术的应用,极大地推动了病理学的发展,逐渐形成了一门新的分支学科——分

子病理学,使得对疾病特别是肿瘤的研究从器官、组织、细胞水平深入到蛋白、染色体和 DNA 水平;并使形态学观察从定性走向定位、定量,更具客观性和可重复性。而分子病理学技术能为病理诊断提供更准确、更客观的依据,从而更好地指导肿瘤的靶向治疗和预后判断等,是现代病理学发展的方向和必不可少的手段。下面就相关分子病理学技术在肿瘤诊治中的应用作简要介绍。

基金项目:国家自然科学基金(81272420);山东省科技发展计划(2011GSF11838);山东自然科学基金(2R2012HM085);济南市科技发展计划项目(201202039)

作者单位:山东大学附属千佛山医院病理科,山东,济南 250014

*通讯作者:孙青,E-mail:qingsw99@163.com

1 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC)

免疫组织化学是在蛋白水平上,利用抗原抗体的特异性结合反应检测和定位组织和细胞中某种蛋白成分的技术。免疫组化技术有较高的特异性和敏感性,能同时将细胞成分定位与形态学改变结合起来,且直接在组织切片、细胞涂片或培养细胞爬片上检测,结合计算机图像分析等技术,可对被检测物质进行定量分析。现在已经广泛应用于各种蛋白表达水平的检测、细胞属性和来源的判定、淋巴细胞的免疫表型分析、细胞增殖和凋亡的研究、激素受体和耐药基因蛋白表达的检测等。如对乳腺癌患者进行 ER、PR、HER2 的检测可以判断患者的预后和对靶向治疗药物(赫赛汀等)的敏感性及指导内分泌治疗^[1];进行 ERCC、RRM1、TS、TOPOIIA、 β -tubulin-III 等耐药基因蛋白表达的检测,以预测其对抗肿瘤化疗药物如铂类、吉西他滨、培美曲赛和紫杉醇类的疗效等^[2-3]。

2 原位杂交 (in situ hybridization, ISH)

原位杂交是用经标记的核苷酸片段作为探针,通过杂交直接在组织切片、细胞涂片或培养细胞爬片上检测和定位某一特定靶基因存在与否的技术。ISH 的原理是 DNA 变性、复性和碱基互补配对结合。根据探针标记物的不同,如荧光素、地高辛、生物素、放射性物质等,又分为荧光原位杂交,显色原位杂交,银染原位杂交等。

2.1 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)

FISH 可以检测基因(染色体)在较大的范围内发生的异常改变,如基因扩增、基因缺失、染色体转位或染色体数目变化等,因其性能稳定和结果直观等优点,已有很多商品化的试剂盒,如美国 Vysis、北京金菩嘉、广州安必平等。目前主要被用于乳腺癌和胃癌 HER2 基因扩增,尿路上皮癌、宫颈癌、淋巴瘤、白血病、性染色体的检测和产前诊断。在免疫组化检测乳腺癌和胃癌 HER2 蛋白表达意义不明确时,需做 FISH 检测进一步验证其有无 HER2 基因的扩增,以正确指导赫赛汀的应用;此外还对化疗以及疾病的预后预测有重要的指导意义^[4],是判断 HER2 基因扩增的金标准。FISH 一

般采用双色探针标记,其优点是对比鲜明,红色信号和绿色信号融合时可产生黄色信号,可用于一些融合或转位基因的判断。缺点是需配备荧光显微镜及采图软件(FISH 工作站),且玻片不能长期保存。

2.2 显色原位杂交 (chromogenic in situ hybridization, CISH)

CISH 的应用也很广泛,即一般意义的原位杂交。利用生物素和亲合素系统标记探针和第一抗体,用辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记第二抗体,以 DAB 系统显色后,就可在组织切片上把目的 DNA 标记出来。如应用原位杂交法检测人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV)、EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV) 等。原位杂交与免疫组化相比,具有高度特异性,尤其在无法得到可靠抗体时,不失为一种较好的检测方法。在普通光学显微镜下即可观察且能长期保存是其独特的优势。缺点是操作步骤多,易出现不稳定因素和人为差异^[5]。

2.3 银染原位杂交 (silver in situ hybridization, SISH)

近年来发展起来的 SISH 技术,将银沉淀和酶标记显色方法相结合,把 HER2 基因标记为黑色信号,染色体着丝粒标记为红色信号,标记过程在全自动免疫组化机上进行,并能在普通光学显微镜下观察并判读,且能永久保存,结果与 FISH 符合率高,可达 94 ~ 99%^[6-7]。随着探针成本的降低其将具有更广阔的应用前景。

3 基因突变检测

近年来兴起的针对肿瘤的靶向治疗,与传统的化学疗法相比,其特点在于能选择性地杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞低损伤或无损伤,具有高选择性和不良反应少的优点。而实现有效靶向治疗建立在检测靶基因是否发生突变的基础上。因此,基因突变检测对指导肿瘤的靶向治疗非常关键。其中有些已经得到广泛应用,如 EGFR 基因突变检测易瑞沙和特罗凯等靶向药物是否适用于非小细胞肺癌患者^[8],KRAS 基因突变检测西妥昔和帕尼等是否适用于结直肠癌患者^[9],KIT 和 PDGFRA 基因突变检测胃肠道间质瘤患者是否会对靶向治疗药物伊马替尼产生耐药性^[10]等。

基因突变是指染色体上一个位点内遗传物质的变化,主要形式有点突变、缺失突变、插入突变、基因易位或重排、甲基化及其他方式导致的基因结构异常。基因突变导致的癌基因突变、抑癌基因失活、基因表达失调等是肿瘤发生的重要因素。目前检测基因突变的方法有测序法、实时定量荧光 PCR 法、高分辨率熔解曲线法、扩增阻滞突变系统法等。

3.1 基因测序(gene sequencing, GS)

此技术能够最真实地反映基因上的信息,被普遍认为是分子诊断的金标准。目前已由经典的 Sanger 测序发展到二代测序技术,如 Roche 公司的 454 技术、Illumina 公司的 Solexa 技术以及 ABI 公司的 SOLiD 技术等;测序通量也急速提高,费用则大大降低^[11-12]。相对于 Sanger 测序,其它方法尽管灵敏度或特异度有所提高,但只能针对一些已知的常见突变进行,不能用于检测罕见或未知突变。而 Sanger 测序的缺点则是检测过程比较繁琐,耗时长;对标本中所含肿瘤组织的量要求比较高,且敏感性低,一般不能检出低于 20%的突变^[13]。

3.2 高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM)

HRM 是一种在实时定量荧光 PCR 的基础上,通过饱和染料监测核酸的熔解曲线变化并进行分析的方法。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 位点不匹配会使双链 DNA 在升温过程中先解开,荧光染料从局部解链的 DNA 分子上释放,从荧光强度与时间曲线上就可以判断是否存在 SNP,而且不同 SNP 位点、杂合子与纯合子等都会影响熔解曲线的峰形,因此 HRM 分析能够有效区分不同 SNP 位点与不同基因型。HRM 检测无需使用序列特异性探针,不受突变碱基位点和种类的局限,具有高灵敏度、成本低、高通量等优点,可应用于突变筛选、基因分型等多方面^[14-15]。由于 HRM 能够对单碱基差异进行区分,所以对温度分辨率的要求相当高,需要特定的仪器或配件。Ma 等^[16]分别用直接测序法和 HRM 方法检测了 100 例结直肠癌患者的 KRAS 基因突变,HRM 方法可检出 11 种突变类型,较测序法更为敏感,两种方法的一致性达 95%。

3.3 扩增阻滞突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS)

ARMS 法利用扩增阻滞突变的原理设计探

针,如其中 EGFR 29 型的试剂盒涵盖了 EGFR 基因的 29 个突变点,包括 3 种 18 外显子突变、19 种 19 外显子突变、5 种 20 外显子突变和 2 种 21 外显子突变等,能检测绝大多数已知的 EGFR 基因突变类型。此法灵敏度高,能检出 1%的常见突变,尤其是对于肿瘤细胞含量较少的样本,如穿刺、体液样本等具有很大的优势^[17];且其操作简便,耗时短,若与 Sanger 测序联合应用将使诊断更全面可靠。

4 生物芯片

生物芯片技术是近来影响深远的重大科技进展之一,是融生物学、微电子学和计算机科学等为一体的前沿技术。该技术将高密度的核酸、蛋白质、组织等包被在硅片、玻片等固相支持物上,通过设计不同的阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的用途,如基因表达谱研究、基因突变检测、多态性分析、产前诊断、分子标志物筛选等,为功能基因组的研究及医学诊断的发展提供了有力的工具。

4.1 基因芯片

采用基因芯片可分析患者和肿瘤高发人群的基因表达谱,并与正常对照组进行比对,为发现肿瘤致病基因提供线索;同时通过检测突变基因,还对具有发生肿瘤风险的个体提前预警;并使基于广泛基因表达分析的肿瘤分类方法成为可能,以区分利用常规手段难以辨明的肿瘤,提高了诊断的准确率^[18]。在产前诊断方面,基因芯片由于成本限制,尚未成为主流手段,但其相对于传统产前检测技术,仍具有高分辨率的优势和广阔的前景^[19]。

4.2 蛋白质芯片

蛋白质芯片技术为肿瘤标志物的联合检测提供了理想工具。现已有多篇文献报道,利用蛋白质芯片来检测肿瘤相关的血清蛋白,并利用联合诊断的方法对样品进行分级^[20-21]。如卵巢癌单个肿瘤标志物 CA125 已经被 IL-18、FGF-2 和 CA125 联合诊断所取代^[22]。由于血清蛋白的变化受性别、激素水平及营养状况等影响,而对肿瘤组织进行原位研究可以避免这些影响。Melle 等^[23]利用蛋白质芯片系统和显微切割技术分析头颈部肿瘤组织及其邻近淋巴结,找出了 2 个有显著差异表达的蛋白,未来可以作为肿瘤诊断和预后判断的新指标。

4.3 组织芯片

组织芯片将很多微小组织整齐地排列在一起,从而提供了一种高通量、大样本以及快速的疾病形态学分析工具。组织芯片技术与传统的病理学相结合,可做HE染色、特殊染色、免疫组化、原位杂交等。它的优点是具有良好的内对照和实验条件的一致性。林茂松等^[24]采集了54例直肠癌组织和40例癌旁直肠粘膜组织制成组织芯片,采用免疫组织化学染色方法检测了多种蛋白因子的表达,结果发现p53、CyclinD1、Bcl-2的异常表达与直肠癌的发生有关。

5 其他方法

5.1 流式细胞术(flow cytometry, FCM)

流式细胞术是利用流式细胞仪进行的一种单细胞定量分析和分选的技术,适用于单细胞悬液的样本(可以是血液、体液和细胞培养悬液),它是免疫细胞化学、激光和计算机科学综合的产物。流式细胞术在肿瘤诊治领域现也得到了广泛的应用。DNA非整倍体的出现是癌前病变向早期癌变发展的一个重要指标。流式细胞术可测定DNA含量的变化,即DNA非整倍体的出现,对癌前病变的性质及发展趋势做出评估,有助于癌变的早期诊断。流式细胞术还可以应用在白血病和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NH)的分型方面。传统形态学检查是诊断白血病的基础,但有局限性。当遇到形态学难以诊断的白血病,只有靠免疫分型来辅助诊断。目前白血病免疫分型主要用流式细胞术进行以下检测:(1)急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)的类型及分化阶段;(2)急性髓细胞性白血病(acute myelocytic leukemia, AML)的亚型;(3)诊断急性未分化白血病、一些少见类型白血病和混合型白血病;(4)指导治疗和判断预后等^[25-26]。在临床上,T淋巴细胞亚群分析对于肿瘤患者免疫功能的监测具有重要的意义^[27]。流式细胞术可以通过对肿瘤细胞和免疫细胞状态的监测来评估疗效,从而调整治疗方案^[28]。研究发现,肿瘤干细胞是肿瘤耐药性和复发的根源^[29]。流式细胞术还可以通过针对肿瘤干细胞的特殊标记,将肿瘤干细胞分选出来,对其进行研究,以达到彻底治愈肿瘤的目的^[30]。

5.2 PCR-反向点杂交法(PCR-reverse dot hybridization, PCR-RDH)

将PCR反应产物与载有特定序列探针的膜条进行杂交以显示出结果。可用于检测HPV,对宫颈样本、阴道分泌物、其他新鲜或石蜡活检样本,通过简单的DNA提取、PCR、杂交几个步骤,就能在膜条上对HPV分型。目前市场上有HPV28型检测试剂盒,能检出15种高危型、3种疑似高危型和10种低危型。

5.3 实时荧光定量PCR(real time PCR, RT-PCR)

此方法利用荧光共振能量转移的原理,用荧光信号的强度定量检测PCR产物,即模板DNA的拷贝数,在分子病理学中得到了广泛应用。如检测结核杆菌等病原菌,能检出最低 10^3 个拷贝数/mL,比传统的特殊染色的检出率提高很多。还有对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)融合基因^[31-32]用RT-PCR方法检测,相对于FISH法来说,灵敏度更高,结果判断更为客观;缺点是样本中RNA易降解,且易污染,对实验室环境要求高^[33]。RT-PCR也常用于对其他病原菌如肝炎病毒等的检测^[34-35]。

6 小结与展望

个体化治疗和靶向用药是未来医疗的必然趋势,而这均建立在对患者进行全面检测的基础上,如用免疫组化检测细胞中蛋白的表达水平,用原位杂交和基因突变检测分析细胞中核酸的含量及改变,用生物芯片来进行规模化的分析和比对等等。随着医疗水平的提高和各种新技术的应用,分子病理学必将在未来的医疗领域里扮演越来越重要的角色。

参考文献

- [1] Caldarella A, Crocetti E, Bianchi S, et al. Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2011,17(3):753-758.
- [2] Milovic-Kovacevic M, Srdic-Rajic T, Radulovic S, et al. Expression of ERCC1, RRM1, TS protein in biopsy specimen predicts survival in advanced ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy [J]. *Buon*, 2011,16(4):708-714.

- [3] Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, et al. Altered-tubulin isotype expression in paclitaxel resistant human prostate carcinoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2008, 77(4):562-566.
- [4] Fornier M, Risio M, van Poznak C, et al. HER2 testing and correlation with efficacy of Herceptin therapy[J]. *Oncology*, 2002,16(10):1340-1352.
- [5] 林蓁. 原位杂交检测 HPV 和 EBER 中常见问题和对策[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014,30(8):928-930.
- [6] Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, et al. Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens[J]. *Histopathology*, 2009,54(2):248-253.
- [7] Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, et al. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility[J]. *Am J Surg Pathol*, 2010,34(6):767-776.
- [8] Byers LA, Heymach JV. Dual targeting of the vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor pathways: rationale and clinical applications for non-small cell lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2007,8(Suppl2):79-85.
- [9] Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004,350(23):2343-2351.
- [10] Blanke CD. Long-term results from a randomized phase II trial of standard-versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT[J]. *J Clin Oncol*, 2008,26(4):620-625.
- [11] Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. *Nat Methods*, 2008,5(1):16-18.
- [12] Sultan M, Schulz MH, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome [J]. *Science*, 2008, 321(5891):956-960.
- [13] Wang XY, Liu YR, Niu YJ, et al. Advanced detecting techniques of EGFR mutation for non-small cell lung cancer[J]. *International Journal of Respiration*, 2012,32(10):797.
- [14] Vossen RH, Aten E, Roos A, et al. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening[J]. *Hum Mutat*, 2009,30(6):860-866.
- [15] Garritano S, Gemignani F, Voegelé C, et al. Determining the effectiveness of high resolution melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 Locus[J]. *BMC Genet*, 2009,10:5.
- [16] Ma ES, Wong CL, Law FB, et al. Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis[J]. *J Clin Pathol*, 2009,62(10):886-891.
- [17] Brevet M, Johnson ML, Azzoli CG, et al. Detection of EGFR mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor EGFR status and response to EGFR inhibitors [J]. *Lung Cancer*, 2011,73(1):96-102.
- [18] Pal NR, Aguan K, Sharma A, et al. Discovering biomarkers from gene expression data for predicting cancer subgroups using neural networks and relational fuzzy clustering[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007,8:5.
- [19] de Jong A, Dondorp WJ, Macville MV, et al. Microarrays as a diagnostic tool in prenatal screening strategies: ethical reflection[J]. *Hum Genet*, 2014,133(2):163-172.
- [20] Darcy KM, Schilder RJ. Relevant molecular markers and targets[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 103(Suppl 1):S6-S13.
- [21] Orckowski R, Hamelinck D, Li L, et al. Antibody Microarray Profiling Reveals Individual and Combined Serum Proteins Associated with Pancreatic Cancer [J]. *Cancer Res*, 2005,65(23):11193-11202.
- [22] Page C, Ouellet V, Madore J, et al. From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2006,118(7):1750-1758.
- [23] Melle C, Ernst G, Schimmel B, et al. A technical triade for proteomic identification and characterization of cancer biomarkers[J]. *Cancer Res*, 2004,64(12):4099-4104.
- [24] 林茂松,陈卫昌,黄俊星,等. 组织芯片研究直肠癌中肿瘤相关基因的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2010,37(2):141-145.
- [25] Hassan KA, Wang L, Korkaya H, et al. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma[J]. *Clinical cancer research*, 2013,19(8):1972-1980.
- [26] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3):919-928
- [27] Shikawa T, Saito H, Osaki T, et al. Elevated fas expression is related to increased apoptosis of circulating CD8⁺T cell in patients (下转第 82 页)

赤道几内亚比奥科岛居民的镰型红细胞病的流行病学调查

谢东德^{1,2} 陈江涛^{1,3} Urbano Monsuy Eyi⁴ Rocio Apicante Matesa⁴ Maximo Miko Ondo Obono⁵ Carlos Sala Ehapo⁵ 岳亮⁶ 郭翼华² 古杰超² 詹小芬⁶ 杨辉⁶ 杨惠钿⁶ 杨立业⁶ 林敏^{6*}

[摘要] **目的** 了解非洲赤道几内亚比奥科岛(Bioko Island)人群的镰刀形红细胞病(sickle cell disease, SCD)的流行病学特点。 **方法** 在2013年1月至12月期间,采用红细胞镰变试验对1 036名本岛居民进行筛查。用高分辨溶解曲线(high-resolution melting, HRM)分析和PCR-DNA测序法对筛查阳性的标本进行基因型鉴定。 **结果** 赤道几内亚比奥科岛居民的SCD发生率为16.99% (176/1 036)。HRM法与PCR-DNA测序法具有较好的一致性(100%)。 **结论** 比奥科岛是SCD高发区,当地政府和卫生部门应采取有效的干预措施来减少这种疾病的危害。HRM法对SCD的鉴定准确性较高。

[关键词] 镰刀形红细胞病; 比奥科岛; 高分辨溶解曲线分析; PCR-DNA测序

Epidemiological investigation of the sickle cell disease in local inhabits on Bioko Island, Equatorial Guinea

XIE Dongde^{1,2}, CHEN Jiangtao^{1,3}, Urbano Monsuy Eyi⁴, Rocio Apicante Matesa⁴, Maximo Miko Ondo Obono⁵, Carlos Sala Ehapo⁵, YUE Liang⁶, GUO Yihua², GU Jiechao², ZHAN Xiaofen⁶, YANG Hui⁶, YANG Huitian⁶, YANG Liye⁶, LIN Min^{6*}

(1. The Chinese Medical Aid Team to the Republic of Equatorial Guinea, Guangzhou, Guangdong, China, 510000; 2. Department of Medical Laboratory Science, Jiangmen People's Hospital, Jiangmen, Guangdong, China, 529020; 3. Laboratory Medical Center, The Huizhou Central Hospital, Huizhou, Guangdong, China, 516001; 4. Central Blood Transfusion Service, Hospital Regional De Malabo, Malabo, The Republic of Equatorial Guinea; 5. Department of Medical Laboratory Science, Hospital Regional De Malabo, Malabo, The Republic of Equatorial Guinea; 6. Laboratory Medical Center, Chaozhou Central Hospital, Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521021)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the epidemiological characteristics of the sickle cell disease (SCD) in local inhabits on Bioko Island, Equatorial Guinea. **Methods** During January 2013 to December 2013, 1 036 local inhabits were screened for SCD by sickle solubility test. Then, all the screening positive

基金项目:中国博士后科学基金(2013M542195);国家自然科学基金(81101329)

作者单位:1. 中国第二十六批援赤道几内亚医疗队,广东,广州 510000

2. 江门市人民医院检验科,广东,江门 529020

3. 惠州市中心医院医学检验中心,广东,惠州 516001

4. 赤道几内亚共和国马拉博市马拉博地区医院中心血站,赤道几内亚

5. 赤道几内亚共和国马拉博市马拉博地区医院医学检验科,赤道几内亚

6. 潮州市中心医院中心实验室,广东,潮州 521021

*通讯作者:林敏, E-mail: konfutea@hotmail.com

samples were identified by high-resolution melting (HRM) assay and PCR-DNA sequencing. **Results** The prevalence of SCD in local inhabitants on Bioko Island was 16.99% (176/1 036). SCD could all be efficiently identified by HRM analysis, and 100% concordance was found between the HRM analysis and the r PCR-DNA sequencing. **Conclusion** High prevalent SCD on Bioko Island indicated that the local health department and government should make efficiently strategy for the control of SCD in the region. HRM assay is a rapid, low-cost, accurate and high-throughput method to screen for SCD which is worthy to promote its use in high-prone areas of SCD in Africa.

[KEY WORDS] Sickle Cell Disease; Bioko Island; High-resolution melting assay; PCR-DNA sequencing

镰刀形红细胞病 (sickle Cell Disease, SCD) 是世界范围最为常见和临床上最重要的一种常染色体隐性遗传血红蛋白病, 它是由 β 珠蛋白基因的 6 号密码子 GAG > GTG 突变而成的血红蛋白 S (hemoglobin S, HbS) 导致的^[1]。该病的纯合子表型能够导致胎儿死产或成年前死亡, 而杂合子表型能导致贫血、感染合并症、慢性器官损害等一系列并发症^[2-3]。全世界每年大约有 30 万的新生儿受到镰刀形红细胞病的影响, 其中 75% 的病例发生在撒哈拉沙漠以南的非洲地区^[1,4]。对于镰刀形红细胞贫血, 目前只能依靠长期输血治疗, 此外就是应用基因诊断技术进行产前诊断, 降低人群的发病率^[5]。

比奥科岛 (Bioko Island), 是一个位于非洲几内亚湾中的岛屿。该岛距尼日利亚南部海岸约 100 公里, 在非洲西部大陆赤道几内亚西北 160 公里处, 是赤道几内亚共和国的首都马拉博 (Malabo) 的所在地。全岛有居民 26 万人, 疟疾感染率高达 29.8%。该国的医疗卫生水平低, 人民生活条件差, 是疟疾和镰刀形红细胞病的高度流行区和高发地区, 由于当地落后的经济和技术, 目前没有任何镰刀形红细胞病的流行病学的数据。

自 1971 年开始, 广东省承派援助赤道几内亚医疗队帮助当地居民治疗疟疾及其他基础疾病。因此, 我们在马拉博地区医院的支持下, 对比奥科岛进行了一次联合的流行病学调查, 总结如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013 年 1 月至 2013 年 12 月, 1 036 名比奥科岛的当地居民 (年龄: 1 ~ 84 岁, 95% 的个体为超过 18 岁的成人), 参与了我们的调查, 含男性 535 名,

女性 501 名。在取得马拉博地区医院伦理委员会和患者或其监护人的同意后, 在马拉博地区医院检验科用 EDTA-K₂ 真空管抽取外周血 2 mL, 同时用 903 标本采集滤纸 (Whatman-新华公司) 制备干血斑, 干燥后 4 °C 保存备用。

1.2 仪器及耗材

LightCycle 480II 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司), MJ mimi 型梯度 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad), 微量加样器 (德国 Eppendorf 公司), 超净工作台 (中国苏州精华设备有限公司), 干式恒温器 (杭州奥盛仪器有限公司), TGL-20B 型和 TGL-28C-C 型台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), LightCycle 480II 荧光定量 PCR 仪专用 96 孔 PCR 板及封板膜 (荷兰 Bioplastics 公司)。

1.3 红细胞镰变 (HbS) 试验

按照《全国检验操作规程》^[6] 第三版进行操作, 步骤如下: (1) 在清洁载玻片上被检鲜血 1 滴, 然后加 20 g/L 的偏重亚硫酸钠液 1 滴混匀; (2) 加盖玻片, 避免气泡, 用凡士林液体石蜡合剂封固, 置于 37 °C 温箱; (3) 在温育 15 min、30 min、1 h、2 h 及 12 h 后分别用高倍显微镜观察有无镰状红细胞形成, 同时用正常人做对照检查。

1.4 DNA 提取

按照本实验室以往文献^[7], 用 Chelex-100 法提取所有红细胞镰变试验筛查阳性者的干血斑样本 DNA, 步骤如下: 首先剪取 0.5 cm × 0.5 cm 血斑, 加入 500 μ L 蒸馏水, 震荡 30 s, 然后静置半小时以上, 然后用 13 600 rpm 离心 4 min, 弃上清; 加入 160 μ L 的 10% 浓度的 Chelex-100, 振荡后用 56 °C 孵育 2 h, 接着 98 °C 变性 8 min, 振荡 30 s, 13 500 rpm 离心 1 min, 最后置于冰箱 4 °C 冷却 30 min 以上, 吸取上清进行 PCR 扩增。

1.5 高分辨溶解曲线 (high-resolution Melting, HRM)分析

根据本实验室以往建立的 HRM 鉴定 HbS 的方法^[8], 针对导致血红蛋白 S 的 HBB:c.20 A > T 位点, 采用如下引物: HRM-S-F: 5'-CACCATGG TGCATCTGACTCC-3'; HRM-S-R: 5'-CACCAA CT TCATCCACG TTCA-3'。反应体系总体积 20 μL , 包括 0.2 μL 的 HotStat DNA 聚合酶(大连宝生物工程公司), 4 μL 的 5 \times PCR buffer (Mg^{2+} plus), 1.6 μL 的脱氧核苷三磷酸 (dNTP, 10 mmol/ μL), 上述引物各 1 μL (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), 9.2 μL 的双蒸灭菌水, 1 μL 的 LC Green I 染料(北京思博全)和 2 μL 模板 DNA。PCR 扩增及溶解曲线分析均在 LightCycle 480 II 荧光定量 PCR 仪上进行, PCR 扩增参数如下: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 扩增 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 共 45 个循环。溶解曲线鉴定程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 溶解曲线数据收集从 60 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$, 温度上升为 1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$, 且每升高 1 $^{\circ}\text{C}$ 进行 25 次的数据采集, 最终采用 LightCycle 480 II 软件对进行分析。

1.6 PCR-DNA 测序

对于 HRM 鉴定为 HbS 突变的样本, 用 PCR-

DNA 测序进一步确认。采用本实验以往建立的 β 珠蛋白基因测序引物^[9], 扩增体系为 25 μL , 包括 2 μL 模板 DNA, 12.5 μL PCR 混合 Mix (北京艾德来), 上下游引物各 1 μL , 纯净水 8.5 μL 。扩增后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳对产物进行鉴定, 然后纯化后用 ABI3730 双向测序, 查找突变点。

1.7 统计学分析

采用 IBM@SPSS 16.0 软件进行统计学分析。按 Hardy-Weinberg 平衡公式, 当 $P < 0.05$ 时, 说明群体基因遗传平衡, 数据来自同一孟德尔遗传群体。

2 结果

在 1 036 名参加筛查的比奥科岛居民中, 高达 16.99% (176/1 036) 的样本的红细胞镰变试验筛查阳性, 如图 1 所示, 绝大多数阳性的血样在 60 min 以后镰变现象就变得明显, 只有 1 例 1 周岁以下的婴儿的 60 min 的镰变现象不太明显, 但 24 h 时依然可以观察到一定比例的镰刀形红细胞。我们认为, 这应该是该婴儿的血液里面还有较多含量的 HbF, 因此降低了 HbS 的比例, 使红细胞镰变的现象减弱。

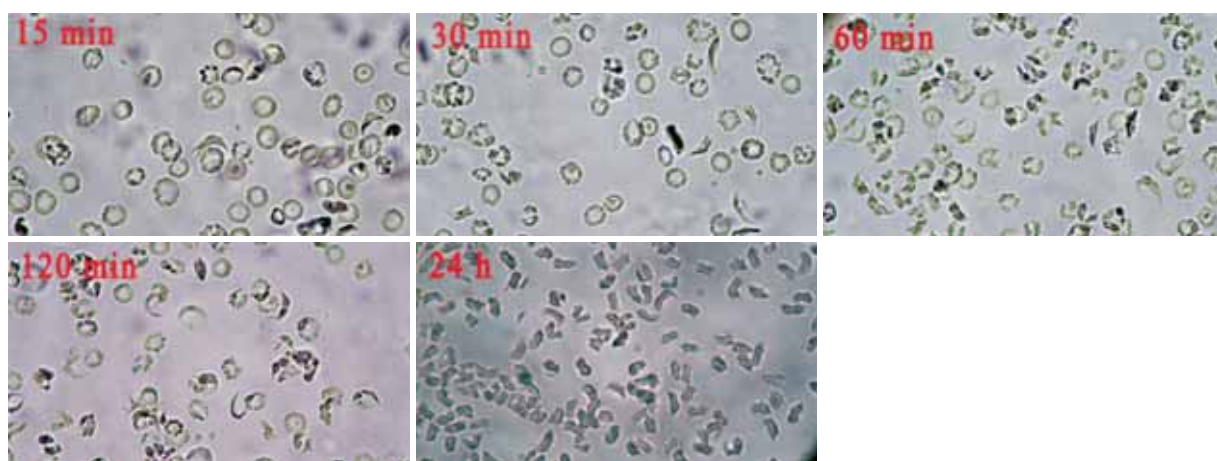


图 1 红细胞镰变(HbS)试验检测结果
Figure 1 The results of sickle solubility test

所有的筛查阳性结果, 均用高分辨溶解曲线(图 2)和 PCR-DNA 测序分析(图 3)。我们发现镰刀形红细胞病杂合子表型(c.20 A > T 杂合子)的曲线很容易和正常人(野生型)曲线区分。176 例样本通过 HRM 和 PCR-DNA 测序法均鉴定为镰刀型红细

胞病杂合子, 基因频率为 16.99% (176/1 036), 2 种方法的符合率 100%。由于我们的样本绝大多数采集自岛上的成人, 而且镰刀形红细胞病患者的纯合子在胎儿时就死产或成年前死亡, 因此数据不能符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 8.927$, $P = 0.002$)。

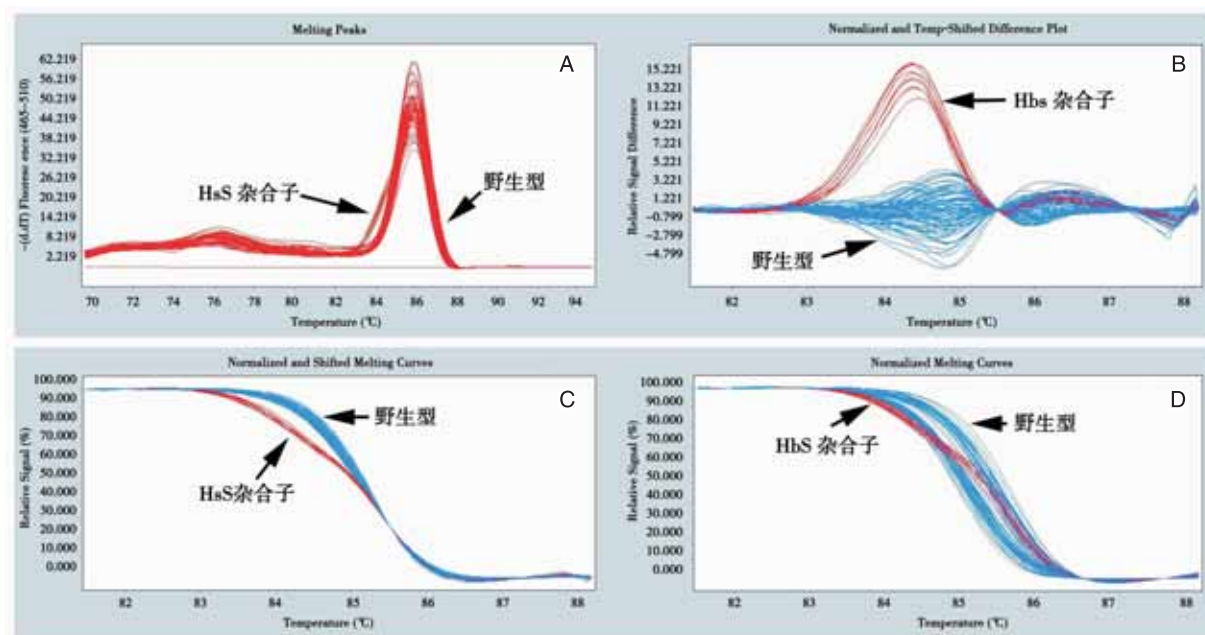


图2 高分辨熔解曲线分析结果

Figure 2 The results of HRM assay and PCR-DNA sequencing

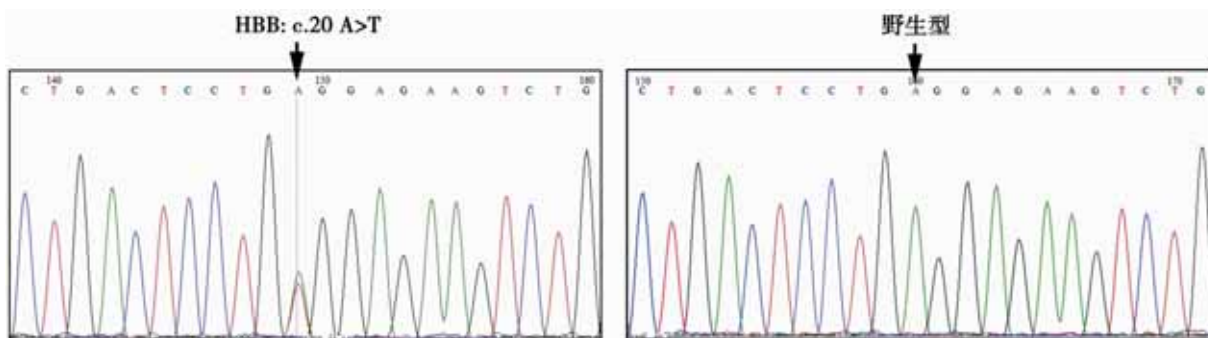


图3 PCR-DNA 测序结果

Figure 3 The results of PCR-DNA sequencing

3 讨论

镰刀形红细胞病是世界上危害最为严重的一种单基因遗传病,纯合子表型能够导致胎儿的死产或需要长期输血才能存活;杂合子表型导致患者体内的红细胞容易破坏且堵塞血管,会造成局部缺血、贫血、感染合并症、慢性器官损害等一系列并发症使患者的寿命缩短到40岁左右^[2-3]。与非洲中部报道的10%至40%的发生率一致^[10-12],比奥科岛居民镰刀形红细胞病发生率也高达16.99%。基于这个调查数据,按照Hardy-Weinberg平衡公式进行

估算,即在本岛26万居民之中大约有4万人的杂合子存在着,同时也造成每250个妇女怀孕就会产生1个纯合子,给当地居民的健康和社会经济造成严重的影响。赤道几内亚是一个发展中国家,缺乏足够的人力和物力进行流行病学的调查,本研究提供了比奥科岛镰刀形红细胞病的流行病学资料,为比奥科岛当地的卫生部门制定镰刀形红细胞病防控政策提供了参考。

传统的镰刀形红细胞病诊断方法,包括红细胞镰变试验、血红蛋白电泳、AMRS-PCR和PCR限制性片段多态性(PCR-RFLP),存在着耗时、操

作繁琐、PCR产物污染等各种缺陷,不利于大规模的人群筛查。HRM分析是新近发展起来的高效基因检测技术,具有灵敏度高、特异性强、高通量和成本低廉等优点,非常适合单个碱基或几个碱基的变化检测^[13]。在我们的研究中发现杂合子DNA能够准确的与野生型DNA区分开来。Chelex-100法提取血斑DNA操作简单,价格便宜,再结合HRM法的优点,合适在非洲地区推广针对镰刀红细胞病进行大规模的人群调查和遗传学研究。

参考文献

- [1] Biswas T. Global burden of sickle cell anemia is set to rise by a third by 2050 [J]. *BMJ*, 2013,347:f4676.
 - [2] Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2011, 108(31-32):532-540.
 - [3] Jastaniah W. Epidemiology of sickle cell disease in Saudi Arabia [J]. *Ann Saudi Med*, 2011,31(3):289-293.
 - [4] Dyson SM, Atkin K. Sickle cell and thalassaemia: global public health issues come of age [J]. *Ethn Health*, 2011,16(4-5):299-311.
 - [5] Marouf R. Blood transfusion in sickle cell disease [J]. *Hemoglobin*, 2011,35(5-6):495-502.
 - [6] 王羽. 全国临床检验操作规程[M]. 第3版. 南京: 东南大学出版社, 2006:186-187.
 - [7] 陈江涛,刘配芬,钟德善,等. SYBR Green I染料法定量PCR检测疟原虫感染及鉴别虫种的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013,5(4):225-229.
 - [8] Yue L, Lin M, Chen JT, et al. Rapid screening for sickle cell disease by polymerase chain reaction-high resolution melting analysis [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6):2479-2484.
 - [9] Lin M, Wen YF, Wu JR, et al. Hemoglobinopathy: molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka people in the Meizhou region, southern China [J]. *Plos One*, 2013,8(2):e55024.
 - [10] Aygun B, Odame I. A global perspective on sickle cell disease [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012,59(2):386-390.
 - [11] Olakunle OS, Kenneth E, Olakekan AW, et al. Knowledge and attitude of secondary school students in Jos, Nigeria on sickle cell disease [J]. *Pan Afr Med J*, 2013,15:127.
 - [12] Moussavou A, Vierin Y, Eloundou-Orima C, et al. Sickle cell disease pain management following the World Health Organization's protocol[J]. *Arch Pediatr*, 2004,11(9):1041-1045.
 - [13] Lin M, Jiao JW, Zhan XH, et al. High resolution melting analysis: a rapid screening and typing tool for common β -thalassemia mutation in Chinese population [J]. *Plos One*, 2014,9(8):e102243.
- (上接第77页)
- with gastric cancer[J]. *J Surg Res*, 2008,148(2):143-151.
- [28] Wee JG, Guat BT, Ponudurm K, et al. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004,11(2):168-173.
 - [29] Madka V, Rao CV. Cancer stem cell markers as potential targets for epithelial cancer [J]. *Indian J Exp Biol*, 2011,49(11):826-835.
 - [30] Chen T, Yang K, Yu J, et al. Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients[J]. *Cell Res*, 2012,22(1):248-258.
 - [31] Kim DW, Ahn MJ, Shi Y, et al. Results of a global phase II study with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(supple):488s.
 - [32] Zhang X, Zhang S, Yang X, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression[J]. *Mol Cancer*, 2010,9:188.
 - [33] 刘标,周晓军. 非小细胞肺癌个体化治疗的靶向分子检测[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012,28(8):831-837.
 - [34] Park Y, Lee JH, Kim BS, et al. New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification [J]. *J Clin Microbiol*, 2010,48(6):2253-2256.
 - [35] Hao Y, Zhang XY, Hu Y, et al. Comparison of a novel real-time PCR assay with sequence analysis, reverse hybridization, and multiplex PCR for hepatitis B virus type B and C genotyping[J]. *J Clin Microbiol*, 2011,49(9):3392-3394.

云南省西双版纳州傣族 G6PD 缺陷症发生率及突变谱研究

詹小芬¹ 张芹² 周露³ 杨辉¹ 杨惠钿¹ 杨立业¹ 林敏^{1*}

[摘要] 目的 了解云南省西双版纳州傣族人群的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症的发生率及基因型。方法 在2012年8月至2013年9月期间,用荧光斑点定性法对812例傣族居民进行G6PD缺乏筛查。用反向斑点杂交芯片和PCR-DNA测序法分析G6PD缺乏症的标本的基因型。结果 云南西双版纳州傣族人群的G6PD缺乏症总发生率为9.73%(79/812),其中男性32例(9.07%, 32/353),女性47例(10.24%, 47/459)。79例初筛G6PD缺乏标本65例检测出有突变,共检出8种基因突变类型,含16例1376G>T(24.24%)、10例1311C>T(15.15%)、9例1388G>A(13.63%)、7例392G>T(10.60%)、6例95A>G(9.09%)、5例1360C>T(7.57%)、2例871G>A(3.03%)、1例1024C>T(1.52%),和6种复合突变包括2例G871A/C1311T(3.03%)、2例G392T/G1376T(3.03%)、2例G392T/G1388A(3.03%)、1例C1024T/C1311T(1.52%)、1例C1311T/G1376T(1.52%)、1例C1311T/G1388(1.52%)。结论 云南西双版纳州傣族G6PD缺乏症检出率高,最常见的三种基因型是G6PD1376G>T、1311C>T和G6PD1388G>A。在西双版纳地区当地开展G6PD缺乏症的新生儿筛查、产前筛查和遗传咨询是非常有必要的。

[关键词] G6PD缺乏症;傣族;基因突变;斑点杂交;PCR-DNA测序

The prevalence and mutations distribution of G6PD deficiency among Dai population in Xishuangbanna region, Yunnan province

ZHAN Xiaofen¹, ZHANG Qin², ZHOU Lu³, YANG Hui¹, YANG Huitian¹, YANG Liye¹, LIN Min^{1*}

(1. The Central Laboratory, Affiliated Chaozhou Central Hospital, Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000; 2. The Medical Laboratory, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China, 650000; 3. The Medical Laboratory, Xishuangbanna Agricultural Reclamation Hospital, Jinghong, Xishuangbanna, Yunnan, China, 666100)

[ABSTRACT] Objective To investigate the prevalence and mutation distribution of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among Dai population in Xishuangbanna region, Yunnan province. Methods From Aug 2012 to Sep 2013, 812 Dai subjects were screened for G6PD deficiency by fluorescent spot test (FST). Then, all the screening positive samples were identified by reverse dot blot (RDB) chip and PCR-DNA sequencing. Results The prevalence of G6PD deficiency was 9.73% (79/812) among Dai population, of which 9.07% (32/353) in males and 10.24% (47/459) in females. Totally, 65 of

基金项目:国家自然科学基金(81101329);中国博士后科研基金(2013M542195);广东省医学科研基金(A2013780)

作者单位:1. 南方医科大学附属潮州市中心医院中心实验室,广东,潮州 521000

2. 云南省第一人民医院检验科,云南,昆明 650000

3. 西双版纳农垦医院检验科,云南,西双版纳傣族自治州,景洪 666100

*通讯作者:林敏, E-mail: konfutea@hotmail.com

the 79 screening positive samples were detected with coding mutations in G6PD gene that encompassing 8 kind of mutation types included 16 cases of 1376 G > T (24.24%), 10 cases of 1311C > T (15.15%), 9 cases of 1388 G > A (13.63%), 7 cases of 392 G > T (10.60%), 6 cases of 95 A > G (9.09%), 5 cases of 1360 C > T (7.57%), 2 cases of 871 G > A (3.03%) and 1 cases of 1024 C > T (1.52%). At the same time, 6 kind of compound mutation are observed in our study cohort including 2 cases of G871A/C1311T (3.03%), 2 cases of G392T/G1376T (3.03%), 2 cases of G392T/G1388A (3.03%), 1 cases of C1024T/C1311T (1.52%), 1 cases of C1311T/G1376T (1.52%) and 1 cases of C1311T/G1388 (1.52%). Conclusion The prevalence of G6PD deficiency was high among Dai population. G6PD 1376 G > T, 1311C > T and G6PD1388 G > A were the 3 most common mutations in this region. Obligatory newborn screening program, prenatal screening and counseling for G6PD deficiency were important and necessary in Xishuangbannan region.

[KEY WORDS] Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency; Dai population; mutation; Reverse dot blot (RDB); PCR-DNA sequencing

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 缺乏症, 又称蚕豆病, 是由 G6PD 基因发生突变而引起的一种 X 染色体连锁不完全显性遗传性溶血性酶缺陷疾病^[1]。大部份人终身没有任何临床症状, 只有在某些诱因下 (抗疟药物、蚕豆等), 可导致急性溶血性贫血、核黄疸等一系列病理改变。此病虽呈全球性分布, 但各人种和地区存在差异, 总体呈“南高北低”趋势^[2]。云南省是我国少数民族最多的省份, G6PD 缺乏症也是云南少数民族地区高发的遗传性疾病。傣族, 也称“泰老民族”或“傣泰民族”, 源于中国的云贵高原, 是世居云南的少数民族之一。

本文对西双版纳州景洪市的傣族人群进行了 G6PD 缺乏症的分子流行病学调查, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013年8月至2013年9月, 在西双版纳州景洪市农垦医院采集了体检的傣族 812 名人的血样标本, 包括 353 名男性, 459 名女性。本研究得到云南省第一人民医院伦理委员会、南方医科大学附属潮州市中心医院伦理委员会批准。在获得患者的知情同意之后, 用 Whatman S & S903 滤纸制备干血斑, 自然干燥后密封保存于 4 °C 备用。

1.2 G6PD 荧光斑点定性试验

用 G6PD 活性筛查试剂盒 (纯化学反应荧光法) (广州米基医疗器械有限公司, 广州) 进行 G6PD 活性筛查, 按试剂盒说明书进行操作。结果判断标准如下——活性正常者: 10 min 内出现强

荧光; 中度缺乏者: 10 min ~ 30 min 出现荧光为中度缺乏值; 重度缺乏或完全缺乏: 30 min 不出现荧光^[3]。

1.3 基因分型

1.3.1 基因组 DNA 提取

用 Chelex 法提取 G6PD 酶学异常标本的 DNA^[3]: 首先剪切 0.5 cm × 0.5 cm 滤纸血斑, 加 500 μL 去离子蒸馏水, 震荡 30 s, 然后静置半小时以上; 接着震荡后用 13 600 rpm 离心 4 min, 弃上清, 加 160 μL 的 10% 浓度的 Chelex-100 悬液, 振荡后用 56 °C 孵育 2 h, 接着 98 °C 变性 8 min, 振荡 30 s, 13 500 rpm 离心 1 min; 最后放置于 4 °C 冰箱冷却 30 min, 吸取上清备用。

1.3.2 基因分型流程

采用广东凯普生物公司生产的 G6PD 缺乏症基因检测试剂盒 (PCR + 反向斑点杂交) 检测 13 个中国人常见 G6PD 基因突变位点, 分别为: A95G、G392T、A493G、C592T、C1311T、C1360T、G1376T、G1381A、G871A、C1004T、C1024T、C1387T、G1388A。PCR、斑点杂交及结果判读严格按照说明书执行。对用反向斑点杂交未检测出 G6PD 基因突变的标本进行 2 至 13 号外显子进行测序, 方法均按照本实验室以往文献^[2]。

2 结果

在 812 例傣族中, 共检出 G6PD 酶学缺乏的样本 79 例, 总检出率为 9.73%。其中, 男女检出率分别为 9.07% (32/353) 和 10.24% (47/459)。男性检出率略低于女性检测率, 但两者之间不存在统计学差异 ($\chi^2 = 0.313, P = 0.576$)。

79例 G6PD 酶学缺陷样本经反向斑点杂交芯片分析,在 65 例(男 29 例,女 36 例)样本中发现 G6PD 存在突变,占 82.3%。部分膜反向斑点杂交结果见图 1。样本共检出 8 种 G6PD 基因点突变,包括 95A>G(c.185A>G)、392G>T(c.482G>T)、871G>A(c.961G>A)、1024C>T(c.1114C>T)、1311C>T(c.1401C>T)、1360C>T(c.1450C>T)、1376G>T(c.1466G>T)、1388G>A(c.1478G>A)。检出 6 种复合突变包括 G871A/C1311T、G392T/G1376T、G392T/G1388A、C1024T/C1311T、C1311T/G1376T、C1311T/G1388A,结果详见表 1。傣族人群最常见的基因型为 1376G>T(24.61%,16/65)和 1311C

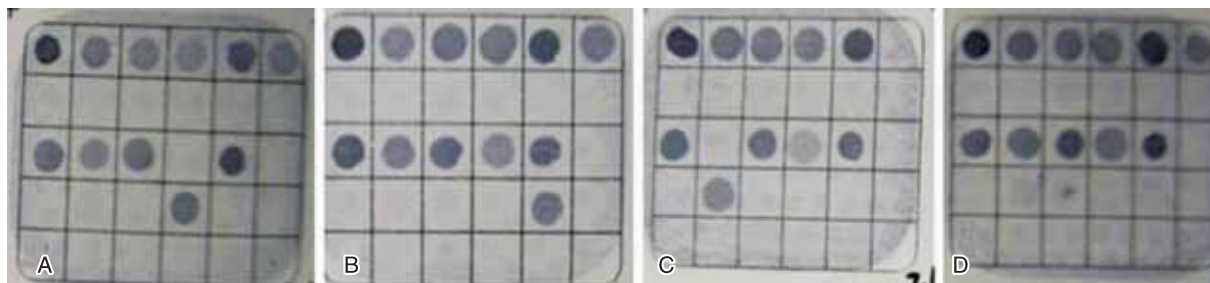
>T(15.38%,10/65),其次是 1388G>A(13.84%,9/66),3 种点突变占有所有病例总数的 50%以上,男性半合子未发现 C1024T 基因型。此外,还有 14 例(女 11 例,男 3 例)经膜反向斑点杂交未检测出突变的样本,进行 2~13 外显子和外显子-内含子接合区进行基因测序检测,与人 G6PD 基因序列(GeneBank:NC_000023.10)进行比对,未发现其他突变。

3 讨论

G6PD 缺乏症是最常见的一种遗传性酶缺乏病,全世界约 4 亿人受累。我国是本病的高发区之

表 1 傣族人群 G6PD 缺乏症患者基因型结果
Table 1 Genotyping results of G6PD deficiency among Dai population

突变类型	男性半合子(n)	女性纯合子(n)	女性杂合子(n)	合计	%
95A>G	4	0	2	6	9.23
392G>T	4	0	3	7	10.77
871G>A	1	0	1	2	3.08
1024C>T	0	0	1	1	1.54
1311C>T	0	3	7	10	15.38
1360C>T	3	0	2	5	7.69
1376G>T	9	2	5	16	24.61
1388G>A	6	0	3	9	13.84
871G>A/1311C>T	1	0	1	2	3.08
392G>T/1376G>T	0	0	2	2	3.08
392G>T/1388G>A	1	0	1	2	3.08
1311C>T/1376G>T	0	0	1	1	1.54
1311C>T/1388G>A	0	0	1	1	1.54
1024C>T/1311C>T	0	0	1	1	1.54
总计	29	5	31	65	100



A:1376M 纯合子; B:1388M 杂合子; C:1311M 纯合子; D: 正常标本

图 1 G6PD 基因突变部分膜反向斑点杂交结果

Figure 1 Results of reverse dot blot analysis for G6PD mutations

一,主要分布在长江以南各省,以云南,广东,广西,海南,贵州等省为高,其发病原因是由于 G6PD 基因突变,导致酶活性降低,红细胞不能抵抗氧化损伤而遭受破坏,引起溶血性贫血。本次筛查结果发现西双版纳州地区傣族人群的 G6PD 缺乏症总发生率为 9.73%, 低于 1987 年云南省计划生育研究所在德宏州调查的傣族为 16.1%的结果^[4], 高于忽丽莎等研究的西双版纳州傣族 2.6%的结果^[5], 这可能与不同民族, 地区或者不同的研究方法有关。目前, 用于 G6PD 缺乏症筛查的方法很多, G6PD 荧光斑点试验是国际血液学标准委员会 (ICSH) 推荐用于 G6PD 缺乏症的方法, 具有较好的敏感性和特异性。本次筛查男性 G6PD 缺乏症检出率为 9.07%, 女性 G6PD 缺乏症检出率为 10.24%。虽然女性发生率略高于男性, 但两者之间无统计学意义 ($\chi^2=0.313, P=0.576$)。这可能是由于筛查的人数少, 抽样偏差所造成的。女性纯合子和杂合子的估算可从男性检出率读出, 但 G6PD 缺乏率只代表有表现型的发生率, 女性杂合子不易全部检出, 因此发生率会比估计值偏低。G6PD 基因型的确定有助于 G6PD 缺乏症的明确诊断, 尤其是酶活性差异很大的女性杂合子。

PCR + 膜杂交法的检测原理是采用生物素标记的引物分别对 G6PD 基因突变区域进行特异性扩增, 将扩增产物与固定在尼龙膜上的不同突变位点探针在导流杂交仪上进行导流杂交 (flow-through hybridization), 然后通过化学显色对结果进行判读。具有准确性高, 特异性好, 低 DNA 浓度也能准确检出等优点。试剂盒能实现对多个突变位点的同步检测。本次筛查的 79 例 G6PD 缺乏样本中有 65 例存在突变, 共发现了 8 种基因点突变, 以 1376G>T、1311C>T、1388G>A 这 3 种突变为主, 其次是 392G>T、95A>G、1360C>T、871G>A、1024C>T。我们还发现了 6 种复合突变包括 G871A/C1311T、G392T/G1376T、G392T/G1388A、C1024T/C1311T、C1311T/G1376T、C1311T/G1388A。本次研究结果以 1376G>T 最常见。与以往调查的云南傣族以 G1388A 为最常见突变类型不同^[6], 也与我国南方的壮、瑶、傣、苗、黎、畲族等少数民族 G6PD 缺乏症以 G1376T 和 G1388A 为主不同^[7]。本次研究结果虽然 1376G>T (24.61%) 大于 1388G>A (13.84%), 但还是以 1376G>T 和 1388G>A

突变类型为主, 符合中国人群最常见的 2 种 G6PD 基因突变类型。这种可能是由于以往多采用 AMRS-PCR 或 PCR-RFLP 法对突变进行鉴定^[8], 能够鉴定的突变类型较少, 而此次我们斑点杂交芯片能鉴定的类型较多, 因此造成比例的不同。我们还发现了大量的 C1311T (15.38%) 突变, 除了 G871A/C1311T、C1024T/C1311T、C1311T/G1376T、C1311T/G1388A 四种复合突变外, 10 例 C1311T 突变的酶学结果也降低。由于 C1311T 是同义突变, 不引起功能的改变, 在临床上是属于良性的, 因此, 我们推测 C1311T 同时合并 (除了 13 种常见位点外) 的其它有功能的外显子的突变, 而引起酶活性降低^[8]。

西双版纳傣族自治州属于 G6PD 缺乏症高发区, 开展 G6PD 缺乏症的筛查, 指导临床医生用药、G6PD 缺乏症基因型的诊断、防止携带者通婚、能够提高人口素质和促进优生优育工作的进行。

参考文献

- [1] 詹小芬, 杨辉, 杨惠钿, 等. 广东潮州地区新生儿 G6PD 缺乏症基因突变分析[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 5:22.
- [2] Pan M, Lin M, Yang LY, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations detection by improved high-resolution DNA melting assay [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(4):3073-3082.
- [3] 詹小芬, 陈江涛, 谢东德, 等. 赤道几内亚比奥科岛 G6PD 缺乏症分子流行病学研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(5):31-36.
- [4] 骆毅, 主编. 云南德宏傣、景颇、阿昌、德昂先天性遗传疾病及健康情况调查研究[M]. 云南: 德宏民族出版社, 1990, 22-24.
- [5] 忽丽莎, 范丽梅, 邹团标, 等. 云南省西双版纳州傣族、布朗族、基诺族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症调查[J]. 中国生育健康杂志, 2010, 21(2):86-88.
- [6] 何永蜀, 杜传书, 陶大昌, 等. 四川省儿童中三种常见的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变型[J]. 中国儿科杂志, 2002, 40(6):371-372.
- [7] 楼彩霞, 张婉, 云妙英, 等. 我国南方少数民族地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症及基因突变研究进展[J]. 中央民族大学学报, 2009, 18(2):92-95.
- [8] 杨昭庆, 褚嘉佑, 班贵宏, 等. 云南籍 G6PD 缺乏症病例的基因型分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(4):259-263.

广西壮族及汉族人群 CD40 基因 rs4810485 G/T 遗传多态性

向阳¹ 蓝艳² 罗宏成¹ 陈健明¹ 吴成将¹ 蒋远文² 韦叶生^{1*}

[摘要] 目的 研究 CD40 基因 rs4810485 G/T 多态性各等位基因及基因型在广西地区壮族及汉族人群中的分布频率,比较其在不同种族间分布的差异。方法 采用单碱基延伸的 PCR 技术和 DNA 测序法检测 195 例壮族人和 200 例汉族人的 CD40 基因 rs4810485 G/T 多态性,比较两组 CD40 基因型及等位基因的分布频率;并结合文献进行不同种族间的比较分析。结果 在壮族人中 GG 基因型占 24.1%、GT 基因型占 49.2%、TT 基因型占 26.7%;在汉族人中 GG 基因型占 30.0%、GT 基因型占 47.0%、TT 基因型占 23.0%。在广西壮族及汉族人群中 CD40 基因多态性的分布频率差异均无显著性($P > 0.05$),但与波兰人、英国人及西班牙人比较,CD40 基因多态性的分布频率均存在显著性差异($P < 0.05$)。结论 在广西地区壮族及汉族人群中存在 CD40 基因多态性,其基因多态性的分布频率差异无显著性,但与其他种族人群比较存在显著性差异。这种差异对于人类学的研究可能起重要的作用。

[关键词] CD40; 基因多态性; 种族

The genetic polymorphism of CD40 gene in Guangxi Zhuang and Han populations

XIANG Yang¹, LAN Yan², LUO Hongcheng¹, CHEN Jianming¹, WU Chengjiang¹, JIANG Yuanwei², WEI Yesheng^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000; 2. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000)

[ABSTRACT] Objective To study the frequencies of allele and genotype distribution of CD40 gene rs4810485 G/T polymorphism in Guangxi Zhuang and Han populations, and to analyze the distributions of CD40 polymorphism among different ethnic groups. Methods The CD40 gene rs4810485 G/T polymorphism was examined by the polymerase chain reaction-single base extension (PCR-SBE) technique and DNA sequencing methods in 195 Zhuang and 200 Han populations. Genotype and allele frequencies of CD40 were compared between Zhuang and Han populations, as well as with other different races. Results The frequencies of GG, GT and TT genotypes were 24.1%, 49.2% and 26.7% in the Zhuangs, and 30.0%, 47.0% and 23.0% in the Hans, respectively. The frequencies of allele and genotype distribution of CD40 gene were not significant difference between the Zhuangs and the Hans ($P > 0.05$). Compared with Spanish and Russian populations, the

基金项目:国家自然科学基金(81260234);广西自然科学基金(2011GXNSFA018198);广西卫生厅重点科研课题(重 2012086)

作者单位:1. 右江民族医学院附属医院检验科,广西,百色 533000

2. 右江民族医学院附属医院皮肤科,广西,百色 533000

*通讯作者:韦叶生, E-mail: wysh22@163.com

CD40 polymorphism was significantly difference ($P < 0.05$). Conclusion There are CD40 gene polymorphism in Guangxi Zhuang and Han populations. The frequencies of polymorphism distribution of CD40 gene were not significant difference between the Zhuang and Han populations. Whose distributions are significantly difference compared with others ethnic populations. It might play an important role for anthropological research.

[KEY WORDS] CD40; Polymorphism; Ethnic

CD40 (白细胞分化抗原-40) 是肿瘤坏死因子受体超家族中的一员, 分布于多种免疫细胞及肿瘤细胞表面。与其配体 CD40L 结合后, 可以将细胞外的信号传导至胞内, 引起一系列生物学效应^[1,2]。编码它的基因位于 20 号染色体长臂 (q¹²-q^{13.2}) 上, 含有 9 个外显子和 8 个内含子。CD40 基因存在着基因变异及基因多态性, 这种基因多态性与人类动脉粥样硬化性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤的关系, 已成为国内外学者研究的热点^[3-5]。为此, 我们应用单碱基延伸 PCR 技术和 DNA 序列测定法, 进行 CD40 基因多态性研究, 对认识遗传因素的发病作用具有重要意义; 同时, 确定其在正常人群中的分布, 将为人类学及群体遗传学研究提供前瞻性基础资料。

1 对象与方法

1.1 对象

广西地区壮族人 195 例, 其中男 115 人, 女 80 人, 年龄 25~72 岁; 汉族 200 例, 其中男 110 人, 女 90 人, 年龄 22~75 岁。血常规、血脂及其他生化指标均在参考范围内, 心电图检查正常, 排除肝脏、肾脏、内分泌和心脑血管等疾病。全部研究对象均来自右江民族医学院附属医院, 为正常健康体检者, 且相互间无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

采集体检健康者静脉血 3 mL, 用 EDTA-K₂ 抗凝; 采用我们已建立的改良碘化钠法^[6]提取白细胞基因组 DNA, -70 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成

根据 CD40 基因 rs4810485 G/T 位点多态性和已知的 DNA 序列设计 PCR 引物, 由上海天昊生物科技有限公司合成。用于特异性扩增 CD40 基因包含 rs4810485 G/T 位点碱基的 DNA 片段的引物, 上游引物序列为: 5'-ATCCCCCAAGTACC TGGCTCCT-3'; 下游引物序列为: 5'-CCTTGCT

GCTCCCTTGCTTTC-3', 延伸引物为: 5'-TTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTTTAGA G G GCTGTAGATTCC-3'。

1.2.3 PCR 扩增

CD40 的 PCR 扩增反应体系为 20 μL, 其中含 10 × PCR 缓冲液 2.0 μL, 0.3 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 上、下游引物各 1.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, TaqDNA 聚合酶 1.0 U, 不足体积用灭菌双蒸水补足至 20 μL。PCR 产物用 Qiagen 公司的 HotStarTaq 进行多重 PCR 获得, PCR 产物经虾碱酶 (SAP) (Promega) 和外切酶 I (EXO I) (Epicentre) 纯化后用 ABI 公司的 SNaPshot Multiplex kit 进行延伸反应。延伸产物用虾碱酶 (SAP) (Promega) 纯化后在 ABI3130XL 上样。SNP 分型用 GeneMapper4.0 (Appliedbiosystems) 来分析。

1.3 统计分析

用 SPSS 11.5 软件包进行分析。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算, 各组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为统计学意义。

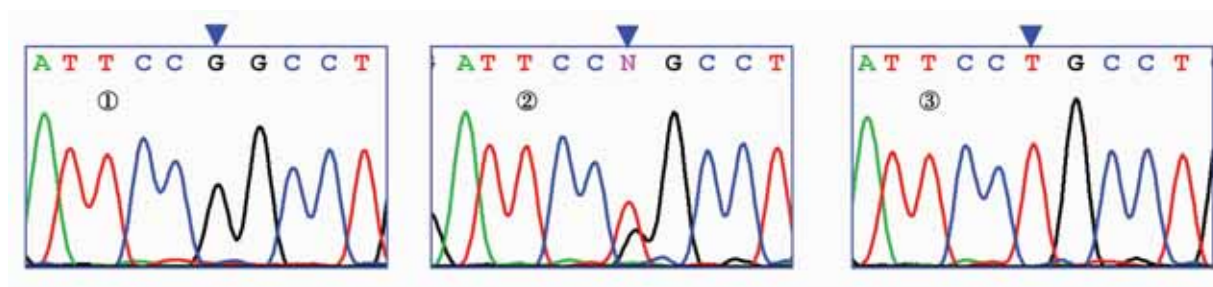
2 结果

2.1 CD40 基因型检测结果

CD40 基因 rs4810485 G/T 多态性, PCR 扩增产物片段大小为 131 bp。经 ABI3130XL 基因检测仪 SNP 分型结果显示 rs4810485 G/T 位点检测到 GG、GT 和 TT 三种基因型。基因测序进一步证实我们的结果 (图 1)。

2.2 CD40 基因多态性在壮、汉两民族人群中分布频率的比较

计算广西壮、汉两民族健康人群中 CD40 基因型和等位基因频率, 经 χ^2 检验, CD40 基因 rs4810485 G/T 位点的基因型及等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 说明所选的研究样本具有群体代表性。其中 rs4810485 G/T 位点基因型在壮、汉民族中以 GT 型最为常见, 分别占



图①、②、③分别表示 GG、GT 和 TT 基因型;箭头所示为基因突变位点

图 1 CD40 基因 rs4810485 G/T 测序图

Figure 1 Sequencing map of CD40 gene rs4810485 G/T polymorphism

49.2%和 47.0%。其基因型和等位基因频率分布在男女性别间比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 广西壮族及汉族人群中 CD40 基因多态性的分布频率也无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 广西壮族和汉族人群 CD40 基因型和等位基因分布频率的比较

Table 1 The distribution of genotype and allele frequencies of CD40 gene in Guangxi Zhuang and Han populations

组别	例数	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)		
		GG	GT	TT	G	T	
壮族人	男性	115	27 (23.5)	55 (47.8)	33 (28.7)	109 (47.4)	121 (52.6)
	女性	80	20 (25.0)	41 (51.3)	19 (23.8)	81 (50.6)	79 (49.4)
	合计	195	47 (24.1)	96 (49.2)	52 (26.7)	190 (48.7)	200 (51.3)
汉族人	男性	110	32 (29.1)	52 (47.3)	26 (23.6)	116 (52.7)	104 (47.3)
	女性	90	28 (31.1)	42 (46.7)	20 (22.2)	98 (54.4)	82 (45.6)
	合计	200	60 (30.0)	94 (47.0)	46 (23.0)	214 (53.5)	186 (46.5)

CD40 基因型及等位基因频率在壮族与汉族人之间比较、同组男女组间比较差异均无显著性, $P < 0.05$

2.3 CD40 基因多态性在不同种族人群间的比较 均有显著性 ($P < 0.05$); 而与台湾人^[9]及广西壮族广西汉族人群 CD40 基因型和等位基因频率分别比较差异均无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。分别与波兰人^[4]、英国人^[7]、西班牙人^[8]比较差异

表 2 不同种族及地区人群 CD40 基因 rs4810485 G/T 多态性分布频率的比较

Table 2 Comparisons of frequency distribution of CD40 gene rs4810485 G/T polymorphism among different ethnic and regional groups

组别	例数	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)	
		GG	GT	TT	G	T
波兰人*	545	309 (56.7)	207 (38.0)	29 (5.3)	825 (75.7)	265 (24.3)
英国人*	3043	1681 (55.2)	1189 (39.1)	173 (5.7)	4551 (74.8)	1535 (25.2)
西班牙人*	1548	828 (53.5)	597 (38.6)	123 (8.0)	2253 (72.8)	843 (27.2)
台湾人	569	198 (35.4)	262 (46.9)	99 (17.7)	658 (58.9)	460 (41.1)
广西壮族人	195	47 (24.1)	96 (49.2)	52 (26.7)	190 (48.7)	200 (51.3)
广西汉族人	200	60 (30.0)	94 (47.0)	46 (23.0)	214 (53.5)	186 (46.5)

CD40 基因型及等位基因频率与广西汉族人比较, * $P < 0.05$

3 讨论

随着人类基因组研究的进展,人们已经认识到不同的基因背景可以造成某些疾病不同的易感性。对于人类基因多态性的研究已成为必然,其渐成为一种解释不同人群中一些疾病存在不同发病率或不同临床表现、治疗反应及预后的内在机制。广西是我国多民族聚居最突出的地区,通过研究不同民族基因多态性,不仅有助于探索各民族间的相互关系,而且对于探索某些致病基因和易感基因的分布特征、研究某些疾病的发病机理及基因水平的诊断和治疗有重要意义。我们对广西壮族和汉族 CD40 基因多态性进行对比研究,为探索人类的起源、动脉粥样硬化性疾病、肿瘤及自身免疫性等疾病的基因遗传背景提供理论依据和分子生物学基础。

CD40 是肿瘤坏死因子受体超家族成员,是特异性免疫应答的中心分子,广泛表达于免疫细胞表面,包括 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞,同时也表达于上皮细胞、内皮细胞、血小板等非免疫细胞的表面。CD40 高亲和力与其配体 CD40L 结合,对 T/B 细胞活化和细胞因子的产生起诱导作用,参与多种疾病的发生发展。CD40 基因位于 20 号染色体长臂 (q^{12} - $q^{13.2}$) 上,其所编码蛋白产物含有 277 个氨基酸。CD40 基因存在 rs4810485 G/T 单核苷酸多态性,这种基因多态性的存在可能影响 CD40 基因的功能,进而可能影响到 CD40 基因多态性与系统性红斑狼疮、川崎病等的发生发展^[10,11]。因此,正确分析和阐明 CD40 基因多态性在不同种族和地域人群中的分布特点,为进一步研究不同人群中 CD40 基因多态性与某些疾病的发生发展之间的关系提供理论依据和分子遗传学基础。

我们采用单碱基延伸 PCR 技术检测了广西地区壮族及汉族正常人群中 CD40 基因 rs4810485 G/T 位点多态性的分布情况,结果显示,在壮族人中 GG 基因型占 24.1%、GT 基因型占 49.2%、TT 基因型占 26.7%;在汉族人中 GG 基因型占 30.0%、GT 基因型占 47.0%、TT 基因型占 23.0%。在广西壮族及汉族人群中 CD40 基因多态性的分布频率无显著性差异 ($P > 0.05$);其基因型和等位基因频率分布在男女性别间比较也无显著性差异

($P > 0.05$)。进一步将中国广西地区汉族人与波兰人^[4]、英国人^[7]、西班牙人^[8]、台湾人^[9]等人群基因多态性研究结果比较分析发现,我国广西汉族人群中 CD40 基因 rs4810485 G/T 位点 T 等位基因频率(46.5%)显著高于波兰人(24.3%)、英国人(25.2%)和西班牙人(27.2%),差异具有统计学意义($P < 0.05$);与台湾人及广西壮族人等比较差异无显著性($P > 0.05$)。从本文结果可以发现,CD40 基因型分布及等位基因频率在不同种族间存在着明显的差异,这一结果符合遗传学规律,即亲缘关系越近,其基因型分布越相似,反之则差异越显著。

综上所述,了解我国壮族与汉族人群中 CD40 基因多态性的分布,不仅为今后进一步研究我国壮族与汉族人群中 CD40 基因多态性与一些相关疾病发生、发展之间的关系提供理论依据,也将有助于我们更深入的理解这些疾病在不同种族、不同地区间具有的不同的遗传基因背景;同时也为进一步的人类学及群体遗传学的研究和基因多态性普查奠定了基础,并为进行疾病前瞻性研究提供了重要的基础资料。

参考文献

- [1] Inoue S, Niikura M, Inoue M, et al. The protective effect of CD40 ligand-CD40 signalling is limited during the early phase of plasmodium infection[J]. FEBS Lett, 2014,588(13):2147-2153.
- [2] Zhang B, Wu T, Chen M, et al. The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease[J]. Immunol Lett, 2013,153(1-2):58-61.
- [3] Wang M, Li Y, Li W, et al. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case-control study[J]. DNA Cell Biol, 2011,30 (3):173-178.
- [4] Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, et al. Single nucleotide polymorphism of CD40 region and the risk of systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2013,22(3): 233-237.
- [5] Shuang C, Dalin L, Weiguang Y, et al. Association of CD40 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han women of Northeast China [J]. Plos One, 2011,6(8): e23762.
- [6] 蓝艳,潘国刚,王春芳,等.中国广西人群 Nogo-A 基因 3'-非翻译区遗传多态性的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2012,4(3):153-157. (下转第 102 页)

厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗 EGFR 野生型或突变状态未知肺腺癌脑转移的疗效初探

张亚雷 杨海虹 何绮华 邵文龙 何建行*

[摘要] **目的** 评价厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗 EGFR 野生型和突变状态未知肺腺癌脑转移的疗效和毒副作用。**方法** 初治或复治的肺腺癌脑转移患者 17 例,其中 9 例患者为 EGFR 野生型,8 例患者 EGFR 突变状态未明。培美曲塞(500 mg/m^2)与顺铂(20 mg/m^2)分别于第 1 天和第 1~3 天给药,厄洛替尼(150 mg/d)于第 4~21 天给药,21 天为 1 周期。化疗结束后厄洛替尼维持治疗直至疾病进展或毒副作用不可耐受。**结果** 对于颅内病灶,3 例患者取得完全缓解(CR),9 例患者部分缓解(PR),4 例患者疾病稳定(SD),客观反应率(ORR)达到 70.6%(12/17),疾病控制率(DCR)达到 100%(17/17);对于颅外病灶,无 CR 患者,7 例患者取得 PR,9 例患者取得 SD,1 例患者疾病进展(PD),客观反应率(ORR)达到 41.2%(7/17),疾病控制率(DCR)达到 94.1%(16/17);颅内和颅外疾病控制的无进展生存期的中位数 11.1 个月和 10.7 个月。**结论** 厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗 EGFR 野生型或突变状态未知肺腺癌脑转移是有效的,而且耐受性好。但是,仍需要进一步的临床试验来证实。

[关键词] 培美曲塞;厄洛替尼;肺腺癌;脑转移癌

The efficacy of erlotinib with pemetrexed/cisplatin for brain metastases patients from EGFR wild-type or unknown lung adenocarcinoma

ZHANG Yalei, YANG Haihong, HE Qihua, SHAO Wenlong, HE Jianxing*

(Department of Thoracic Surgery, State Key Laboratory of Respiratory Diseases, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510120)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the efficacy and side effects of erlotinib and pemetrexed/cisplatin in the patients with brain metastases of EGFR wild-type or unknown lung adenocarcinoma. **Methods** Seventeen patients with brain metastases of lung adenocarcinoma were enrolled in this study. Among the 17 cases, 9 cases were EGFR wild-type and 8 cases were EGFR unknown. Pemetrexed (500 mg/m^2) and cisplatin (20 mg/m^2) were administered on day 1 and days 1~3, respectively. Erlotinib (150 mg) was administered daily on days 4~20, 21 days for 1 cycle. After the end of chemotherapy, erlotinib maintenance treatment until progressive disease or toxicity could not be tolerated. **Results** With regard to the BM, there were 3 cases with complete response (CR), 9 cases had partial response (PR) and 4 had stable disease (SD). The objective response rate (ORR) was 70.6% (12/17). Disease control rate (DCR) was 100% (17/17). As regards the extracranial tumors, there was no case with CR, 7 cases had PR, 9 cases had SD and 1 case had progressive disease (PD). The ORR was 41.2% (7/17) and DCR was 94.1% (16/17). The median progression-free survival time for intracranial and extracranial disease control was 11.1 and 10.7 months, respectively. **Conclusion** Erlotinib with pemetrexed/cisplatin is effective and well tolerated for brain metastases of EGFR wild-type or unknown lung adenocarcinoma. However, further clinical trials are required to confirm our conclusions.

[KEY WORDS] Pemetrexed; Erlotinib; Lung adenocarcinoma; Brain metastases

基金项目:广州市医药卫生科技项目(20131A011135)

作者单位:广州医科大学附属第一医院胸外科,呼吸疾病国家重点实验室,广东,广州 510120

*通讯作者:何建行, E-mail:hejx@vip.163.com

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是全世界癌症相关死亡的主要原因之一。脑转移瘤 (brain metastases, BM) 通常发生在肺腺癌患者, 与患者的不良预后和生活质量差相关。大约有 30% ~ 50% 的 NSCLC 患者在治疗前或治疗过程中发生脑转移^[1]。目前肺癌脑转移的治疗方法有限, 因此, 通常脑转移患者预后很差^[2]。

厄洛替尼和培美曲塞是治疗肺腺癌并脑转移患者的有效药物。厄洛替尼是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 为一种小分子药物, 能够穿越血脑屏障。研究表明厄洛替尼可以明显提高 EGFR 突变阳性肺腺癌脑转移瘤治疗的有效率和无症状脑转移患者的总生存率^[3,4]。然而, 对于 EGFR 野生型或突变状况未知的患者, 厄洛替尼治疗脑转移的有效率较差, 患者的生存期亦较短^[5]。培美曲塞是胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS)、二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 和甲酰甘氨酸核糖核苷酸转移酶的抑制剂 (glycinamide ribonucleotide formyltransferase, GARFT)^[6]。培美曲塞的耐药可能主要归因于 TS 表达的增加^[7]。

非小细胞肺癌具有很强的肿瘤的异质性, 靶向药物和化疗联合可能发挥协同效应^[8]。小样本的临床研究显示厄洛替尼联合培美曲塞在既往治疗过的晚期肺腺癌患者中具有较好的疗效^[9], 也具有很好的耐受性^[10]。

因此我们推测, 厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂的方案可能对 EGFR 野生型和突变状态未知的肺腺癌脑转移患者的治疗更有效。

1 资料和方法

1.1 病例选择

17 例患者均为广州医科大学附属第一医院胸外科胸部肿瘤专科于 2010 年 12 月 ~ 2013 年 10 月收治的晚期 NSCLC 患者, 均经细胞学或病理学证实为肺腺癌, 脑部 MRI 证实有脑转移; 伴或不伴其他部位转移; KPS 评分 ≤ 2 分; 患者具体临床资料见表 1。

1.2 EGFR 基因突变分析

从福尔马林固定石蜡组织中提取 DNA, 使用 QIAamp DNA 试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 进行检测。使用市售的 amoydx[®] 人类 EGFR 基因 29 种突变的荧光 PCR 诊断试剂盒检测 EGFR 突

表 1 17 例肺腺癌脑转移患者临床资料

Table 1 The characteristics of the 17 lung adenocarcinoma with brain metastases patients

患者编号	性别	年龄(岁)	吸烟状态	KPS 评分	神经系统症状	脑转移瘤数目	EGFR 状态
1	女	68	无	1	无	多发	野生型
2	男	54	有	1	无	多发	野生型
3	男	61	有	1	有	多发	野生型
4	男	73	无	1	无	多发	野生型
5	女	37	无	1	无	单发	野生型
6	男	70	无	1	无	多发	野生型
7	女	72	无	1	有	2个	野生型
8	女	42	无	0	无	多发	野生型
9	男	45	无	2	有	多发	野生型
10	女	61	无	2	有	多发	未知
11	男	44	无	2	无	多发	未知
12	女	58	无	2	有	多发	未知
13	男	49	有	1	无	多发	未知
14	女	44	无	2	有	单发	未知
15	女	43	无	2	无	2个	未知
16	女	56	无	1	无	2个	未知
17	男	68	有	1	有	单发	未知

变(厦门诊断技术有限公司,厦门,中国)。本试剂盒检测 EGFR 18-21 外显子 29 个位点的突变,包括 T790M、L858R、L861Q、S768I、G719S、G719A、G719C, 外显子 20 和 19 的插入及 19 外显子缺失突变。

1.3 治疗方法

给予患者培美曲塞 500 mg/m², 第 1 天进行静脉滴注; 顺铂 20 mg/m², 第 1~3 天进行静脉滴注, 每 3 周为 1 个周期。用药前 1 周开始给予患者口服叶酸 400 μg/天, 持续到化疗结束; 同时用药前 1 周给予 VitB₁₂ 1 mg 肌注, 每 9 周重复 1 次; 患者用药前 1 天、当天和第 2 天口服地塞米松片 3.75 mg, 每日 2 次。化疗开始后给予患者厄洛替尼每天 150 mg 口服(化疗当日除外), 直到疾病进展或毒性无法耐受。治疗过程中常规使用止吐药物及相关对症治疗。

1.4 疗效评价与随访

根据 RECIST 1.0 进行实体瘤近期疗效评价^[11], 分为完全缓解(CR), 部分缓解(PR), 疾病稳定(SD), 疾病进展(PD)。以 CR + PR 计算有效率(ORR), 以 CR + PR + SD 计算疾病控制率(DCR)。无进展生存期(PFS)是从患者开始接受化疗计算, 直至患者因疾病进展为止。最后的随访时间是 2014 年 8 月。

1.5 毒副反应

按照美国 NCI 制定的毒副反应标准 (CTC 第 3 版) 评价毒副反应, 分为 0~4 级共 5 个等级。

1.6 统计学分析

数据以 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理, 用卡方检验比较不同因素在缓解率及疾病控制率方面有无差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效

所有患者均接受 2~8 化疗周期 (中位数, 5 个周期)。在最后一次随访时仍然有 8 例患者存活。颅内和颅外病灶的中位 PFS 分别为 11.1 个月和 10.7 个月, 两者差异无显著性 ($P = 0.876$), 其中 11 号患者的 PFS 时间达到 45 个月且目前仍然存活。对于颅内病灶, 3 例患者取得 CR、9 例患者 PR、4 例患者 SD, 客观反应率(ORR)达到 70.6% (12/17), 疾病控制率(DCR)达到 100% (17/17); 对于颅外病灶, 无 CR 患者, 7 例患者取得 PR、9 例患者 SD、1 例患者 PD, 客观反应率(ORR)达到 41.2% (7/17), 疾病控制率(DCR)达到 94.1% (16/17) (具体见表 2 和图 1)。颅内病灶与颅外病灶的 ORR 差异无显著性 ($P = 0.084$)。图 2 显示的是 13 号患者脑转移瘤在联合方案治疗 3 个疗程后完全消失(CR)。

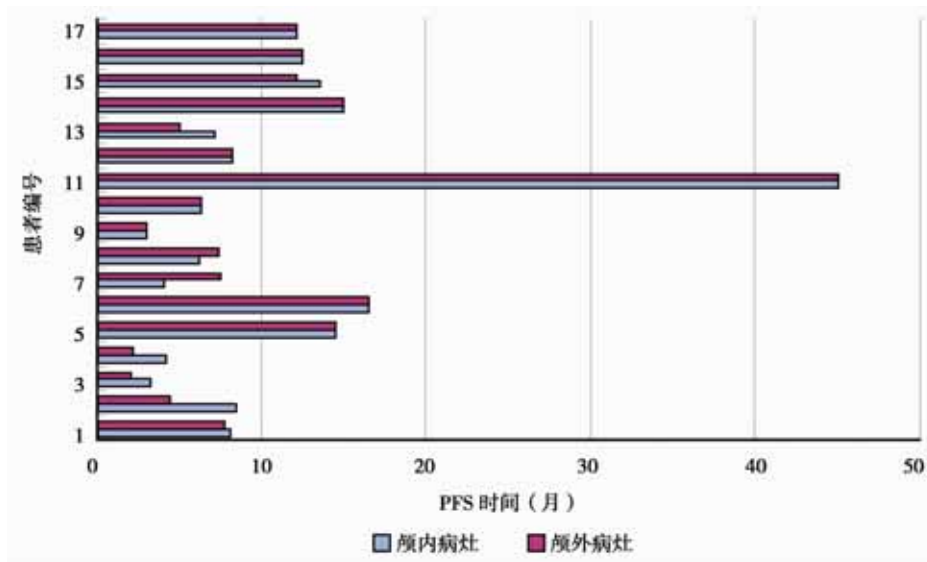


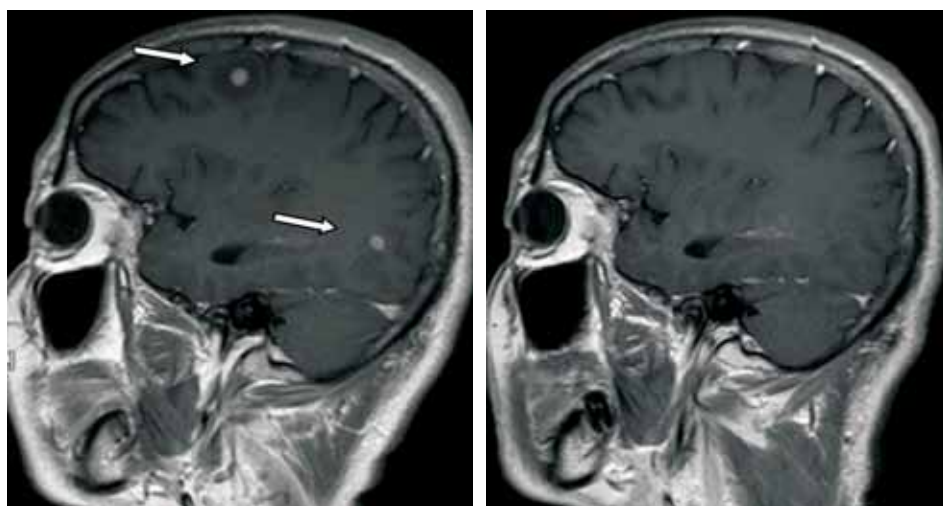
图 1 17 例患者颅内病灶及颅外病灶的 PFS 时间

Figure 1 Progression-free survival of 17 patients by extracranial or intracranial disease control

表2 17例肺腺癌脑转移患者治疗的疗效

Table 2 The tumor response and disease control of the 17 lung adenocarcinoma with brain metastases patients

患者编号	化疗周期数	颅内病灶	颅外病灶	神经系统症状	颅内病灶 PFS(月)	颅外病灶 PFS(月)	存活状态
1	6	PR	PR	-	8.1	7.8	死亡
2	2	PR	PR	-	8.5	4.5	死亡
3	3	PR	PD	改善	3.2	2.0	死亡
4	2	SD	SD	-	4.2	2.1	死亡
5	4	PR	PR	-	14.5	14.5	死亡
6	6	SD	SD	-	16.5	16.5	存活
7	6	SD	SD	改善	4.1	7.5	存活
8	4	SD	SD	-	6.2	7.4	存活
9	2	PR	SD	未改善	3.0	3.0	死亡
10	6	PR	SD	改善	6.3	6.3	死亡
11	8	CR	PR	-	45	45	存活
12	4	PR	PR	改善	8.2	8.2	死亡
13	6	CR	PR	-	7.1	5.0	死亡
14	8	PR	SD	改善	15	15	存活
15	6	CR	PR	-	13.5	12.1	存活
16	6	PR	SD	-	12.5	12.5	存活
17	6	SD	SD	改善	12.1	12.1	存活
中位 PFS					11.1	10.7	$P = 0.876$



左:治疗前;右:联合方案治疗3个疗程后

图2 13号患者治疗前后效果对比

Figure 2 The effect before and after treatment of the patient No.13

2.2 毒副作用

14例患者出现1~2度皮疹,1例患者出现3度皮疹,2度腹泻1例,2级口腔粘膜炎1例。患者对组合方案的耐受性良好,只有1~2级血液学毒性。

3 讨论

肺癌伴有脑转移的患者生存期短,生活质量差,预后不佳^[12]。培美曲塞是一种新的多靶点抗叶

酸化疗药物,通过干扰细胞复制过程中叶酸代谢途径而发挥抗肿瘤作用。研究显示,培美曲塞能明显抑制重要的叶酸依赖性辅酶胸苷酸合成酶(TS)、二氢叶酸还原酶(DHFR)和甘氨酸酰胺核苷甲酰基转移酶(GARFT)的活性。培美曲塞通过对这些关键酶活性进行多靶点抑制,使得嘌呤和胸腺嘧啶核苷生物合成减少,从而影响肿瘤细胞DNA和RNA合成^[13]。培美曲塞一线治疗的肺腺癌患者中46%的患者显效^[14,15]。吴一龙等^[16]研究结果显示对于中国的EGFR敏感突变的伴有无症状BM的肺腺癌患者,厄洛替尼作为二线治疗时的ORR可达到58.3%。而EGFR野生型的BM患者,对治疗的反应率及生存预后均差于EGFR突变的患者^[5]。

我们前期使用厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗方案治疗EGFR野生型的肺腺癌脑转移患者,取得了不错的疗效^[17]。在本研究中厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗EGFR野生型或突变状态未知肺腺癌脑转移患者的颅内治疗反应为70.6%(12/17),PFS达11.1个月,明显优于该方案对EGFR野生型的肺腺癌脑转移患者的疗效。原因(1)可能是由于厄洛替尼和培美曲塞的协同作用^[18,19]。EGFR-TKI可以降低TS酶的表达和活性^[20,21],从而增强肿瘤对培美曲塞的敏感性,与此同时,TS的抑制剂5-氟尿嘧啶可能增加EGFR的磷酸化,从而有可能提高EGFR-TKI的活性^[22]。(2)EGFR突变状态未知的患者中,部分患者因活检时肿瘤细胞量太少无法行EGFR检测,部分患者拒绝行基因检查,该类患者中可能有部分患者的EGFR突变状态是阳性,对TKI的治疗反应性好^[3],从而使得本研究中患者的PFS时间延长。

本研究中,我们观察到该联合方案对于颅内和颅外病灶的ORR分别为70.6%和41.2%,颅内疾病控制的表现有优于颅外疾病控制的趋势(PFS分别为11.1月vs 10.7月)。颅内病灶和颅外病灶的效果不完全一致,这可能是EGFR突变状态在肺腺癌中分布是不均一的^[23]。Weber等^[24]用同位素¹¹C标记的厄洛替尼作为PET-CT的示踪剂,结果显示,厄洛替尼能在非小细胞肺癌颅内转移灶中聚集,对原发灶和转移灶均有效。原发灶与转移灶EGFR突变状态可能存在着差异,从而影响到该联合方案对颅内和颅外病灶的效果。毒副作用

方面,大多是1-2级反应,整体来说患者对该方案的耐受性良好,这和既往的研究结果相似^[10]。

总之,通过本研究我们发现厄洛替尼联合培美曲塞/顺铂治疗EGFR野生型或突变状态未知肺腺癌脑转移是有效的,疗效优于我们既往该方案治疗EGFR野生型肺腺癌脑转移患者的疗效,而且耐受性好,有待于扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] Hazard LJ, Jensen RL, Shrieve DC. Role of stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases [J]. *Am J Clin Oncol*, 2005,28(4): 403-410.
- [2] Chi A, Komaki R. Treatment of brain metastasis from lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2010,2(4): 2100-2137.
- [3] Kim JE, Lee DH, Choi Y, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as a first-line therapy for never-smokers with adenocarcinoma of the lung having asymptomatic synchronous brain metastasis [J]. *Lung Cancer*, 2009,65(3):351-354.
- [4] Porta R, Sánchez-Torres JM, Paz-Ares L, et al. Brain metastases from lung cancer responding to erlotinib: the importance of EGFR mutation [J]. *Eur Respir J*, 2011,37(3):624-631.
- [5] Hsiao SH, Lin HC, Chou YT, et al. Impact of epidermal growth factor receptor mutations on intracranial treatment response and survival after brain metastases in lung adenocarcinoma patients [J]. *Lung Cancer*, 2013,81(3):455-461.
- [6] Shih C, Chen VJ, Gossett LS, et al. LY231514, a pyrrolo [2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(6):1116-1123.
- [7] Sigmond J, Backus HH, Wouters D, et al. Induction of resistance to the multitargeted antifolate pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003,66(3):431-438.
- [8] Spicer J, Harper P. Targeted therapies for non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Pract*, 2005,59(9):1055-1062.
- [9] Minami S, Kijima T, Takahashi R, et al. Combination chemotherapy with intermittent erlotinib and pemetrexed for pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase I dose-finding study [J]. *BMC*

- Cancer, 2012,12:296.
- [10] Ranson M, Reck M, Anthony A, et al. Erlotinib in combination with pemetrexed for patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): a phase I dose-finding study [J]. *Ann Oncol*, 2010,21 (11): 2233–2239.
- [11] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1) [J]. *Eur J Cancer*, 2009,45(2): 228–247.
- [12] 白皓,韩宝惠. 352例肺癌脑转移预后因素分析[J]. *中国肺癌杂志*, 2008,11(1):101–106.
- [13] Calvert H. An overview of folate metabolism: features relevant to the action and toxicities of antifolate anticancer agents[J]. *Semi Oncol*, 1999, 26(Supp 1):3–10.
- [14] Li C, Sun Y, Fang Z, et al. Comprehensive analysis of epidermal growth factor receptor gene status in lung adenocarcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2011,6(6):1016–1021.
- [15] Orlando M, Lee JS, Yang C, et al. Efficacy of pemetrexed-cisplatin (PC) in East Asian patients (pts): Subgroup analysis of a phase III study comparing PC versus gemcitabine-cisplatin (GC) in first-line treatment of advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Clin Oncol*, 2009,27(15s):abstr 8045.
- [16] Wu YL, Zhou C, Cheng Y, et al. Erlotinib as second-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer and asymptomatic brain metastases: a phase II study (CTONG-0803) [J]. *Ann Oncol*, 2013,24 (4):993–999.
- [17] Zhang Y, Yang H, Yang X, et al. Erlotinib with pemetrexed/cisplatin for patients with EGFR wild-type lung adenocarcinoma with brain metastases [J]. *Molecular and Clinical Oncology*, 2014,2 (3):449–453.
- [18] Giovannetti E, Lemos C, Tekle C, et al. Molecular mechanisms underlying the synergistic interaction of erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with the multitargeted antifolate pemetrexed in non-small-cell lung cancer cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2008,73(4):1290–1300.
- [19] Li T, Ling YH, Goldman ID and Perez-Soler R. Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(11):3413–3422.
- [20] Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, et al. ZD1839 (Iressa) modifies the activity of key enzymes linked to fluoropyrimidine activity: rational basis for a new combination therapy with capecitabine[J]. *Clin Cancer Res*, 2003,9(13):4735–4742.
- [21] Budman DR, Soong R, Calabro A, et al. Identification of potentially useful combinations of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase antagonists with conventional cytotoxic agents using median effect analysis[J]. *Anticancer Drugs*, 2006,17(8):921–928.
- [22] Van Schaeybroeck S, Karaiskou-McCaul A, Kelly D, et al. Epidermal growth factor receptor activity determines response of colorectal cancer cells to gefitinib alone and in combination with chemotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(20):7480–7489.
- [23] Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2011,29(22): 2972–2977.
- [24] Weber B, Winterdahl M, Memon A, et al. Erlotinib accumulation in brain metastases from non-small cell lung cancer: visualization by positron emission tomography in a patient harboring a mutation in the epidermal growth factor receptor [J]. *J Thorac Oncol*, 2011,6(7):1287–1289.

两例短串联重复序列三带型等位基因的遗传多态性分析

许泽辉^{1,2} 严提珍^{1,2} 罗世强^{1,2} 王秋华^{1,2} 唐宁^{1,2*}

[摘要] **目的** 本文分析亲子鉴定常用 STR 基因座的三带型等位基因特点。 **方法** 用 Chelex 法提取 3 600 例亲子鉴定检案(含 8 734 个个体)血液中的基因组 DNA,利用美国 ABI 公司 Amp FISTR[®] Identifiler[™] plus 试剂盒进行复合荧光 PCR 扩增确定 STR 基因座的遗传图谱 (ABI 3500Dx 遗传分析仪),若出现异常峰型则采用 PowerPlex[®] 21 系统进行复查验证和采用 Yunis 技术进行淋巴细胞染色体核型分析。 **结果** 2 个检案分别在 D18S51 和 FGA 基因座上出现三带型等位基因现象 (均属于 I 型),总检出率为 0.229%(2/8 734),携带三带型等位基因的个体经染色体核型分析均未发现三体综合征。 **结论** 三带型等位基因结果较少见,判读须慎重,应采用不同试剂盒进行验证以获得准确分型。

[关键词] 短串联重复序列;三带型等位基因;遗传多态性

Genetic polymorphism analysis of two short tandem repeat three-banded allele patterns

XU Zehui^{1,2}, YAN Tizhen^{1,2}, LUO Shiqiang^{1,2}, WANG Qiuhua^{1,2}, TANG Ning^{1,2*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Liuzhou Maternal and Child Care Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 2. Liuzhou Key Laboratory of Birth Disease Prevention and Control, Liuzhou, Guangxi, China, 545001)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the characteristics of three-banded alleles patterns. **Methods** Genomic DNA was extracted from blood samples of 3 600 paternity cases (including 8 734 individuals) by using Chelex method. Genetic profiles of STR loci were determined by multiplex fluorescence PCR amplification with the Amp FISTR[®] Identifiler[™] plus kit (ABI, America). Re-analysis was performed by using the PowerPlex[®] 21 system, and the karyotype of lymphocytes was analysed by Yunis' technique. **Results** 2 Type I three-banded allele patterns at D18S51 and FGA loci were observed. The frequency for tri-allelic patterns in autosomal STRs was 0.229%. Karyotype analysis showed no occurrence of trisomy with the three-banded patterns carriers. **Conclusion** Three-banded allele pattern events are extremely rare in paternity cases which need to be carefully assessed, and different amplification kit should be used to validate the results to obtain accurate genotyping.

[KEY WORDS] Short tandem repeat; Three-banded allele pattern; Genetic polymorphism

基金项目:柳州市科学研究与技术开发计划项目(2014G020404)

作者单位:1. 柳州市妇幼保健院检验科,广西,柳州 545001

2. 柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室,广西,柳州 545001

*通讯作者:唐宁,E-mail:tn825@126.com

注:许泽辉,严提珍为并列第一作者

短串联重复序列(short tandem repeat, STR)是一类存在于真核生物基因组中以2~6个碱基对为核心单位串联重复排列而成的DNA序列。由于STR基因座的高度遗传多态性和其在基因传递过程中遵循孟德尔共显性遗传规律等特点,PCR-STR复合扩增荧光检测技术成为国际法医学界不可或缺的一项重要技术手段,目前被广泛应用于群体遗传学、亲权关系鉴定、罪犯识别、疾病分析等方面。正常情况下,任何一个STR基因座均表现为两个等位基因(一个为父源性,另一个为母源性),经PCR扩增和电泳分析后,纯合子个体的图谱只表现为单一条带或单个基因峰,杂合子个体则表现为两条带或两个基因峰,不会出现三带型或三个基因峰的现象。Crouse等^[1]首次于1999年报道了三等位基因(tri-allelic pattern)或三带型等位基因(three-banded allele pattern)现象。根据各个等位基因的相对荧光强度可把三带型等位基因分为两种类型:一种是荧光强度低的两个“小峰”的峰高、峰面积之和等于荧光强度高的主峰的峰高、峰面积(I型);另一种是3个峰的峰高、峰面积接近相等(II型)^[2]。随着PCR-STR复合扩增荧光检测技术的发展,世界各个法医鉴定实验室或鉴定机构接待的案例越来越多,三带型等位基因陆续被报道。截至2014年12月10日,三带型等位基因在13个核心STR基因座(TPOX、CSF1PO、FGA、TH01、vWA、D3S1358、D5S818、D8S1179、D7S820、D13S317、D16S539、D18S51和D21S11)中已报道了247例,其中以D18S51和FGA基因座的频率最高,分别为38种和37种,vWA和D21S11基因座则均有24种^[3]。本文通过大样本分析,对三带型等位基因的特点和产生原因进行了探讨,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采集2012年8月到2014年8月柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室亲子鉴定检案3600例(包括8734个中国人群个体),检材为人体血样、带毛囊毛发、羊水、组织等。

1.2 方法

1.2.1 Chelex-100法提取血斑DNA

按照文献^[4]报道采用Chelex-100法提取血斑

DNA。剪取受检样本约0.5 cm²的血斑,加到0.5 mL的离心管中,加入500 μL纯水,剧烈振荡,室温下放置15 min。13 000 rpm离心3 min,去上清,收集沉淀。在沉淀中加入200 μL 5% Chelex-100溶液,在振荡器上反复振荡,放入56℃保温30 min以上。取出后振荡,100℃保温8 min,振荡后13 000 rpm离心3 min,上清用于PCR扩增,或放4℃保存备用。

1.2.2 复合荧光扩增和毛细管电泳检测

运用美国ABI公司AmpFISTR[®] Identifiler[™] plus试剂盒(包括16个STR位点:CSF1PO、D7S820、D8S1179、D21S11、D2S1338、D3S1358、D13S317、D16S539、TH01、D18S51、D19S433、TPOX、vWA、D5S818、FGA和Amelogenin)进行复合荧光PCR扩增,若发现出现异常峰型则采用PowerPlex[®] 21系统(包括20个STR位点和1个性别位点:D1S1656、D2S1338、D3S1358、D5S818、D6S1043、D7S820、D8S1179、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、Amelogenin、CSF1PO、FGA、Penta D、Penta E、TH01、TPOX和vWA)进行复查验证,严格按照试剂盒说明书进行操作。在美国ABI公司3500Dx遗传分析仪上进行荧光检测分析,最后采用GeneMapper ID-X-V1.4软件进行数据分析。

1.2.3 染色体核型分析

外周血细胞染色体核型分析采用淋巴细胞培养,常规步骤制备染色体,G显带,镜下计数和分析核型。严格按照SOP文件进行操作^[5]。

2 结果

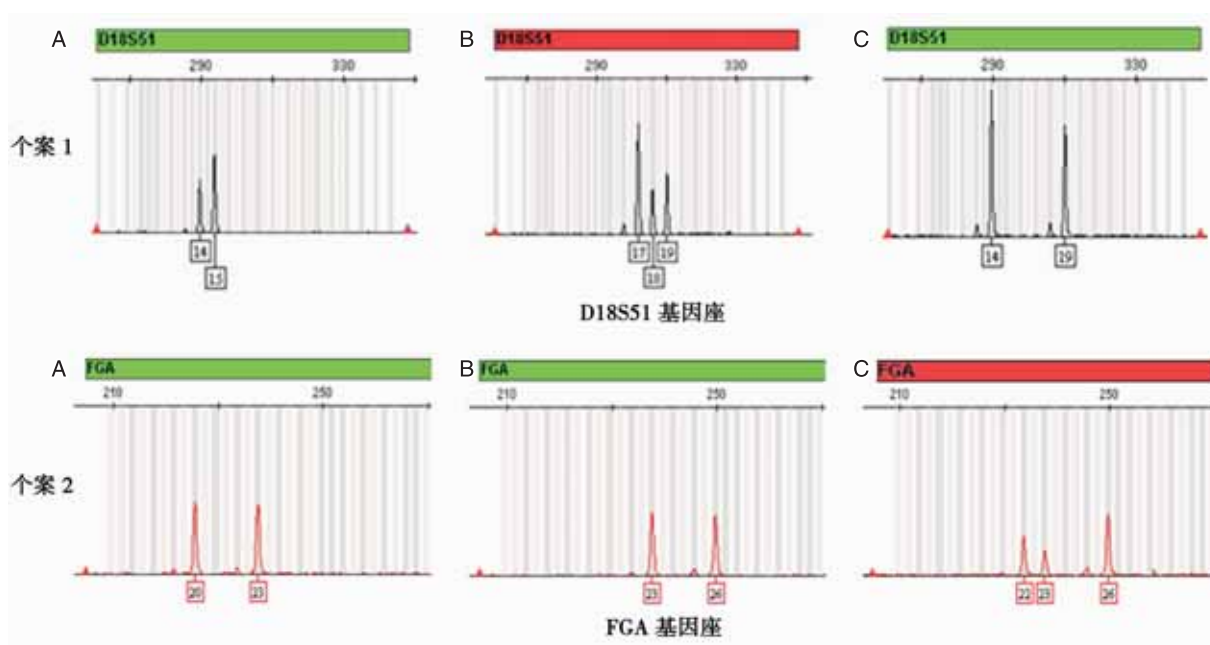
2.1 D18S51和FGA基因座毛细管电泳结果

检测3600个检案的血液纸样本,结果发现2例亲子鉴定的个案中出现了三带型等位基因。2例三带型等位基因结果见表1。利用Amp FISTR[®] Identifiler[™] plus试剂盒对2个检案的父亲、母亲和孩子的血样DNA进行16个STR位点检测,其中D18S51和FGA基因座的毛细管电泳检测结果见图1。个案1母亲和个案2孩子的DNA样品用PowerPlex[®] 21系统重复验证,进行21个STR位点检测,其中D18S51基因座的毛细管电泳结果见图2。与图1比较可见,个案1母亲的D18S51基因座结果一致,都检出17/18/19三个等位基因,

表 1 亲子鉴定中三带型等位基因的遗传分析

Table 1 Genetic analysis of three-banded allele patterns in paternity testing

检案	基因座	检材来源	等位基因	峰高	峰面积	分型	三等型等位基因频率
1	D18S51	父亲	14, 15	2317, 3442	17789, 26297	I 型	0.114‰ (1/8734)
		母亲	17, 18, 19	3084, 1224, 1690	23817, 9360, 12802		
		孩子	14, 19	3167, 2440	24412, 18604		
2	FGA	父亲	20, 23	1987, 1940	15299, 15531	I 型	0.114‰ (1/8734)
		母亲	23, 26	2305, 2212	17809, 17331		
		孩子	22, 23, 26	744, 485, 1168	5738, 3768, 9552		



A: 父亲; B: 母亲; C: 小孩。AmpFISTR® Identifiler™ plus 试剂盒, LIZ500 为内标。检案 1 的家系中母亲出现三个等位基因峰, 检案 2 的家系中孩子出现三个等位基因峰。X 轴是 PCR 产物的长度(碱基数), Y 轴是任意单位的荧光强度。每个峰下面的数字表示等位基因的名称和大小

图 1 I 型三带型等位基因携带者的亲子鉴定图谱

Figure 1 STR profiles of paternity testing with the three-banded allele pattern of Type I

其信号强度、峰高和峰面积之比约等于 2:1:1, 其中, 等位基因 19 遗传给了孩子; 个案 2 孩子的 FGA 基因座结果也一致, 均检出 22/23/26 三个等位基因, 其信号强度、峰高和峰面积之比约等于 1:1:2, 其中 23 等位基因来自父亲, 26 等位基因来自母亲, 22 等位基因在双亲均未发现。

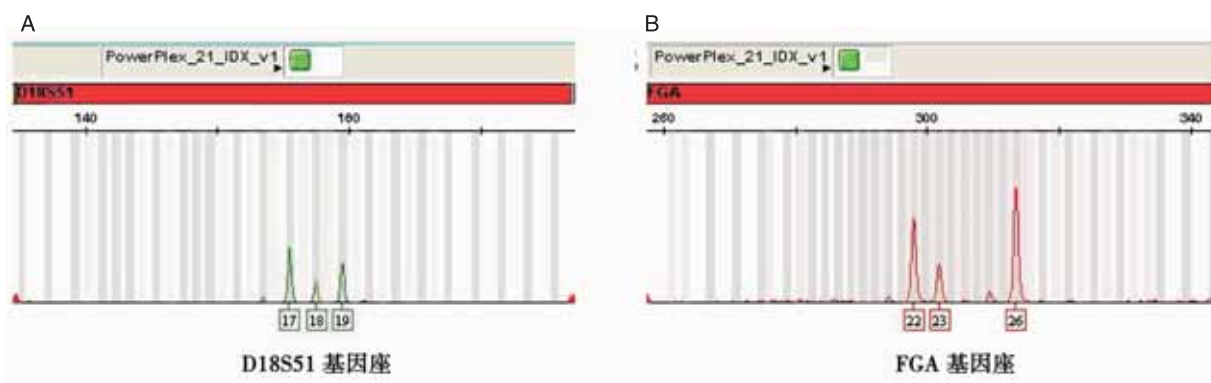
2.2 染色体核型分析结果

对 2 个携带三带型等位基因的个体进行了外周血淋巴细胞染色体核型分析, 检案 1 母亲的核

型为 46, XX, 检案 2 孩子的核型为 46, XY, 均未见染色体数目和结构明显异常。结果表明这 2 个个体未见染色体畸变现象(图 3)。

3 讨论

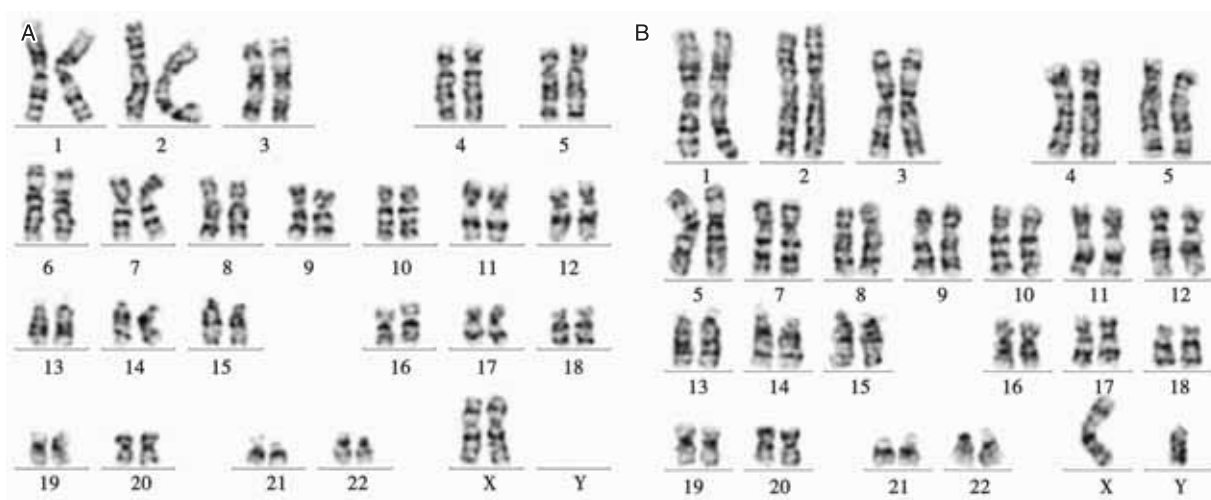
STR 是国内外法医学亲子鉴定和个体识别的主要方法, 其适用于各种来源的生物性检材, 具有灵敏度高、个体识别机率和非父排除率高、PCR 检测所需检材量少等优点。STR 主要是在 DNA 复制



A: 表示检案 1 母亲的图谱; B: 检案 2 孩子的图谱

图 2 D18S51 和 FGA 基因座三带型基因图谱 (PowerPlex® 21 system)

Figure 2 Three-banded allele patterns observed at locus D18S51 and FGA (PowerPlex® 21 system)



A: 检案 1 母亲核型结果; B: 检案 2 孩子核型结果

图 3 三带型等位基因携带者的淋巴细胞染色体核型分析结果

Figure 3 The results of karyotype analysis of the lymphocytes from the three-banded allele pattern carriers

过程中滑动,或复制和修复时滑动链与互补链碱基错配,引起一个或几个重复单位的缺失或插入而形成。单个 STR 基因座的 PCR 扩增,其图谱一般是杂合子个体有 2 个峰或 2 条带,而纯合子个体则只有 1 个峰或 1 条带,正常情况下不会出现 3 个峰或 3 条带。但是,在 STR 的应用过程中发现了一些个体的 STR 基因座出现 3 个峰或 3 条带(即三带型等位基因)。据 STRbase 的相关统计,目前已报道三带型等位基因有 363 种,其中 13 个核心 STR 基因座共 247 种,其它常见 STR 基因座(包括 D2S1338、D19S433、Penta D、Penta E、FES/FPS、

SE33、D10S1248 和 D12S391) 共 52 种,Y 染色体 STR 基因座共 64 种^[3]。

国内研究显示三带型等位基因在中国人群的检出率很低(检出总频率为 0.721‰),不同基因座的三等型等位基因检出率存在差异,以 D21S11、D18S51 和 FGA 基因座的检出率较高,检出率分别为 0.172‰、0.137‰和 0.103‰^[6]。本研究在 D18S51 和 FGA 基因组上检出三带型等位基因,检出率为 0.114‰(1/8734),这与其他大样本的三带型等位基因研究结果一致^[6-7]。研究者发现不同 STR 基因座三带型等位基因的类型分布不同,他们的分

析结果表明 D8S1179 基因座三带型等位基因以 II 型为主(占 35%), I 型占 7%; D18S51 基因座三带型等位基因则以 I 型为主(为 33%), II 型为 12%; 同时提出体细胞突变可能是 I 型三带型等位基因形成的主要原因, 而染色体重组或生殖细胞中染色体片段的局部重复可导致 II 型三带型等位基因的形成^[2]。本研究在 3 600 例亲子鉴定(包括 8 734 个个体)案件中发现了 2 例 I 型三带型等位基因, 峰高较低的两个等位基因均只相差一个核心重复序列, 推测可能是原本为杂合子的两个等位基因在个体发育过程中, 其中一个等位基因发生了一步滑动错配, 从而产生新的等位基因^[2,8]。我们重复提取 DNA, 按不同试剂盒说明书进行 PCR 扩增(Amp FISTR[®] Identifiler[™] plus 试剂盒和 PowerPlex[®] 21 系统)、毛细管电泳、分析, 其检测结果相吻合, 提示检出的三带型等位基因不是 PCR 扩增引起的非特异产物, 也不是实验室的污染或电泳时泳道渗漏造成的假象。

目前关于三带型等位基因产生的机制尚不太清楚, 研究者们^[2,9-10]认为可能的机制主要体现在以下几个方面: (1) 在减数分裂时父系或母系同源染色体不分离而整体遗传给子代, 即出现三多倍体现象。三带型等位基因的出现于染色体畸形导致的三体综合征时比较常见, 但是在正常人群中出现频率较低, 本文案例 1 的母亲 D18S51 基因座出现了 17/18/19 三带型等位基因, 其余 STR 位点正常, 怀疑该母亲患有 18 三体综合征, 虽然该病患者寿命一般很短, 但是也有报道发现成年人 18 三体病例。我们对该母亲外周血进行细胞染色体核型分析后发现, 18 号染色体并未增多, 可见该母亲在 18 号染色体上出现的三带型等位基因并非由于父系或母系同源染色体在减数分裂时不分离而整体遗传给子代而造成的。(2) 同源染色体在减数分裂时出现不等价交换导致等位基因重复。个体发生易位(translocation), 染色体或某些位点有重复均可影响 STR 的分型结果。如果重复伴随有核心重复序列的缺失或插入, 可形成三条带的带型。(3) 在受精卵发育过程中染色体不分离产生不同基因型细胞组成的嵌合体(由两种或多种不同染色体核型的细胞组成), 在 PCR-STR 分型时也可形成三带型等位基因。(4) STR 的不稳定性与许多肿瘤有关, 包括肺癌、消化道肿瘤、前列腺

癌、妇科肿瘤、肾肿瘤和白血病等。发生肿瘤病变的组织或细胞, 可以在一些 STR 位点检出三条或三条以上的带。(5) 骨髓移植或脐血移植受者体内有供者的细胞生长, 这些特殊个体在 PCR-STR 分型中, 可以检出有多条带, 或不同组织检出不同的基因型。

近几年来关于三带型等位基因是如何遗传给后代的课题已成为新的研究热点。2008 年 Vidal 等^[11]通过三代 5 个家庭成员的家系分析发现孙女 D3S1358 基因座三带型等位基因来源于其祖母。土耳其一对近亲结婚(哥哥和妹妹)的夫妇, 他们均为三带型等位基因携带者(携带 16/17/18 等位基因), 生下了一个四等位基因(17 和 18 等位基因均为双拷贝)的孩子^[12]。巴西里约热内卢天主教大学研究团队采集了一个四代 45 个家庭成员的大家系, 发现 6 名女性成员携带 TPOX 基因座的三带型等位基因(属于 II 型), 核型结果显示 2 号染色体短臂未见部分三体。携带者的基因型均为 8/10/11, 推测携带者所有细胞的 TPOX 基因座序列为三拷贝, 10 等位基因为 TPOX 基因座的额外形成的第三个等位基因, 因其距离 TPOX 基因座较远, 推测 10 等位基因可能与 Xq 存在连锁关系^[13]。2014 年国内学者提出 I 型三带型携带者随机传递一个等位基因给子代, II 型携带者可遗传两个等位基因给子代^[6]。在本文的 2 例检案中, 检案 1 虽然没有遗传给后代, 但特别值得一提。母亲的 17 等位基因的峰面积约等于 18、19 等位基因峰面积的总和, 提示等位基因 17 可能有两个拷贝, 它的基因型可能是 17/18 和 17/19, 在减数分裂时, 染色体分离并将其中一条传给子代, 但子代中并没有出现 17/19 等位基因, 只有 19 等位基因传给了子代。检案 2 的三带型等位基因只发现于孩子中, 父母均正常, 无法了解是否会遗传。本研究检出三带型等位基因例数较少, 并且仅观察了两代的遗传情况, 进行多代研究和积累更多的案例是后续研究的方向。目前对于亲子鉴定案件涉及的三带型 STR 基因座尚无统一的亲权指数(paternity index, PI)计算方法^[14], 一般将亲代传给子代的两个等位基因视为整体进行计算^[15]。

综上所述, 在亲子鉴定检案中三带型等位基因现象极为少见, 容易被忽视。因此, 在 PCR-STR

分型时出现此现象需引起重视。若发现可疑三带型等位基因,需要进行重复试验(包括标本提取、PCR扩增和电泳分析等全过程),排除泳道渗漏或者模板污染等问题;同时采用其他试剂盒或方法相互验证结果以免发生误判,保证鉴定结论的准确性、可靠性和科学性。

参考文献

- [1] Crouse CA, Rogers S, Amriott E, et al. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems[J]. *J Forensic Sci*, 1999,44(1):87-94.
- [2] Clayton TM, Guest JL, Urquhart AJ, et al. A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling [J]. *J Forensic Sci*, 2004,49(6):1207-1214.
- [3] John M. Short tandem repeat DNA internet database [DB/OL].http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/tri_tab.htm, 2014-12-09/2014-12-25.
- [4] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [J]. *Biotechniques*, 1991, 10(4):506-513.
- [5] Yunis JJ. New chromosome techniques in the study of human neoplasia[J]. *Hum Pathol*, 1981,12(6):540-549.
- [6] 陈玲,刘超,邱平明,等. 常染色体 STR 基因座三带型的观察与分[J]. *中国法医学杂志*, 2014,29(4):316-318.
- [7] Leclercq S, Rivals E, Jarne P. DNA slippage occurs at microsatellite loci without minimal threshold length in humans: a comparative genomic approach [J]. *Genome Biol Evol*, 2010,2:325-335.
- [8] Jenkins PA, Mueller JW, Song YS. General triallelic frequency spectrum under demographic models with variable population size [J]. *Genetics*, 2014,196(1):295-311.
- [9] Hodgkinson A, Eyre-Walker A. Human triallelic sites: evidence for a new mutational mechanism? [J]. *Genetics*, 2010,184(1):233-241.
- [10] 韩莉莉,潘棱,沈晓丽,等. STR 基因座中检出三带型等位基因三例及遗传分析[J]. *海南医学*, 2011,22(15):1-3.
- [11] Vidal C, Cassar M. A case of tri-allelic pattern at locus D3S1358 on chromosome 3p21 inherited from paternal grandmother[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2008,2(4):372-375.
- [12] Canturk KM, Emre R, Muslumanoglu O, et al. Brother-sister incest paternity case with the same tri-allelic pattern of parents at D3S1358 locus: a tetra-allelic baby? [J]. *Int J Legal Med*, 2014, [Epub ahead of print].
- [13] Picanço JB, Raimann PE, Paskulin GA, et al. Tri-allelic pattern at the TPOX locus: a familial study [J]. *Gene*, 2014,535(2):353-358.
- [14] 林汉光,许传超,唐剑频,等. 常染色体 STR 三体基因座父权指数计算方法探讨[J]. *中国法医学杂志*, 2013, 28(5):400-403.
- [15] Charles HB. Forensic mathematics [EB/OL]. <http://charlesbrenner.com/>, 2014-12-19/2014-12-25.

(上接第90页)

- [7] Orozco G, Eyre S, Hinks A, et al. Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010,69(5):813-816.
- [8] García-Bermúdez M, González-Juanatey C, López-Mejías R, et al. Study of association of CD40-CD154 gene polymorphisms with disease susceptibility and cardiovascular risk in Spanish rheumatoid arthritis patients[J]. *Plos One*, 2012,7(11):e49214.
- [9] Kuo HC, Chao MC, Hsu YW, et al. CD40 Gene polymorphisms associated with susceptibility and coronary artery lesions of Kawasaki disease in the Taiwanese population[J]. *Scientific World Journal*, 2012, 2012:520865.
- [10] Joo YB, Park BL, Shin HD, et al. Association of genetic polymorphisms in CD40 with susceptibility to SLE in the Korean population[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, 52(4):623-630.
- [11] Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, et al. A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease[J]. *Nat Genet*, 2012,44(5):517-521.

糖皮质激素个体化用药系统平台的建立与评价

王昌富^{1,2*} 彭长华^{1,2} 李琳芸^{1,2} 梅冰^{1,2}

[摘要] 目的 建立可靠的糖皮质激素(GC)实验诊断系统平台。方法 采用超高效液相色谱串联质谱法检测人工合成GC药物(泼尼松、甲基泼尼松和地塞米松)血药浓度,流式细胞分析法检测糖皮质激素受体(GR)- α 蛋白,逆转录实时荧光基因扩增定量分析法检测GR- α mRNA,并进行了方法学分析。结果 质谱法检测PNS、DPNS、DX血药浓度分别在1~15 ng/mL、1~100 ng/mL、20~400 ng/mL范围内线性关系良好。标本置26℃ 6h、置-20℃ 30d、加甘油三酯13.21 mmol/L、加总胆红素162.8 μ mol/L,比较各组血药浓度未发现统计学差异。PNS、DPNS、DX血药浓度日内CV分别小于10.81%、7.98%、5.47%,日间CV分别小于10.72%、6.29%、12.36%。回收率试验显示PNS、DPNS、DX在20 ng/mL、20 ng/mL、400 ng/mL浓度的平均回收率分别是99.91%、102.49%、109.89%。流式细胞术分析GR- α 蛋白,标本立即处理检测与放置6h、24h后处理检测结果比较无统计学差异,标本处理后5h检测结果无显著性变化,3种抗体反应条件(室温孵育30 min、37℃孵育30 min、4℃孵育6h)检测结果无统计学差异,百分率及荧光强度CV值分别为3.4%与9.8%。逆转录实时荧光基因扩增定量分析法检测GR- α mRNA检测灵敏度达到 10^1 copies/ μ L,批内和批间Ct值变异系数均小于2.0%。结论 初步证实本体系设计科学、方法先进、系统可靠。

[关键词] 糖皮质激素; 个体化用药; 质谱

Establishment and evaluation of glucocorticoid individualized medication system platform

WANG Changfu^{1,2*}, PENG Changhua^{1,2}, LI Linyun^{1,2}, MEI Bing^{1,2}

(1. Department of Laboratory Medicine, Jingzhou Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Jingzhou, Hubei, China, 434020; 2. Department of Immunology Research, School of Medicine, Yangtze University, Jingzhou, Hubei, China, 434020)

[ABSTRACT] Objective To establish reliable glucocorticoid hormone experimental diagnosis system platform. Methods Blood drug concentrations of synthetic glucocorticoid (GC), including prednisone (PNS), methyl prednisone (DPNS) and dexamethasone (DX), were measured through ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Expression levels of Glucocorticoid receptor- α (GR- α) protein were detected through flow cytometry. mRNA levels of GR- α were measured by using reverse transcription real-time fluorescent quantitative PCR. Methodological index were also analyzed, including sensitivity, precision, interference and recovery ratio, etc. Results Detections of PNS, DPNS and DX blood concentration using mass spectrometry showed good linear relationship in 1-15 ng/mL, 1-100 ng/mL and 20~400 ng/mL, respectively. Preservation of specimens in 26℃ for 6h, -20℃ 30 days, addition of 13.21 mmol/L triglyceride or 162.8 μ mol/L total bilirubin had no significant effect on the results. The intra-day CVs of PNS, DPNS and DX blood concentration were less than 10.81%, 7.98% and 5.47%, and inter-day CV less than 10.72%, 6.29% and 12.36%, respectively. The average recovery ratio of PNS, DPNS and DX

基金项目:湖北省科技厅攻关计划引导项目(2007AA301C54)

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属荆州医院检验医学部,湖北,荆州 434020

2. 长江大学医学院免疫研究室,湖北,荆州 434020

*通讯作者:王昌富, E-mail: jzyyjy@sina.com

(concentration at 20 ng/mL, 20 ng/mL or 400 ng/mL, respectively) were 99.91%, 102.49% and 109.89%. No significant difference existed between the levels of GR- α protein detected immediately and after preserving samples for 6h or 24 h using flow cytometry. The results detected at 5h time point after sample processing also showed no significant discrepancy. The results of 3 antibody reaction conditions (incubation for 30 min at room temperature, 30 min at 37 °C or 6 h at 4 °C) were no statistically different. The precision test showed CVs of percentage and fluorescence intensity were 3.4% and 9.8%. The sensitivity of GR- α mRNA detection with reverse transcription real-time fluorescent quantitative PCR was up to 10^1 copies/L. The precision test showed that the intra- and inter- assay coefficients of variation were both less than 2%.

Conclusion The glucocorticoid hormone experimental diagnosis system platform is preliminarily confirmed to be scientific, advanced and reliable.

[KEY WORDS] Glucocorticoid; Individualized medication; Mass spectrum

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 由肾上腺皮质束状带细胞合成与分泌, 广泛介导人体生物学效应, 包括调节物质代谢、炎症反应、免疫应答等多种生理和病理过程。人工合成 GC 是常用的治疗药物之一, 通过糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 介导发挥药效, 具有抗炎、抗毒、抗肿瘤和免疫抑制作用。作为配体发挥作用的主要受体, GR α 蛋白几乎表达于所有的被检测的组织与细胞中, 并入核与 GRE 序列结合调节基因表达^[1,2]。因此, 检测血药浓度、受体分子水平和基因表达状况, 建立可靠的糖皮质激素实验诊断系统平台对于协助制定针对患者的个体化治疗方案、疗效监测, 从而确保 GC 个体化用药的临床效果很有意义。

1 材料与方法

1.1 本实验诊断平台所涉及的项目、方法、器材与仪器^[3-5]。

1.1.1 GC 血药浓度的检测

采用超高效液相色谱串联质谱法, 检测仪器为 UPLC-ACQUITY® TQD (WATERS, USA), 标准品为 PNS-d4、DPNS-d4、DX-d5 (Toranto Research Chemicacs), 提取液使用二氯甲烷, 流动相 A 为 0.02% 甲酸乙腈, 流动相 B 为 0.02% 甲酸水, 色谱纯。

1.1.2 GR- α 蛋白和 GR- α mRNA 表达水平的检测

采用流式细胞分析法检测 GR- α 蛋白, 仪器为 Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, USA), 标准品采用兔抗 IgG (Coulter Immunotech), 主要试剂为兔抗人的 GR- α 多克隆抗体 (Santa Cruz)、FITC 标记的羊抗兔二抗 (Sigma)、细胞破膜剂 (Coulter Immunotech)。

1.1.3 GR- α mRNA 测定采用逆转录实时荧光基因扩增定量分析法

仪器为 7300 Real Time PCR System (Applied Bio Systems, USA)。反应体系: Premix ExTM Taq (2 ×) 25 μ L, 正向引物 (10 μ M) 1 μ L, 反向引物 (10 μ M) 1 μ L, 荧光探针 (10 μ M) 2 μ L, ROX Reference Dye (50 ×) 1 μ L, 已制备的 cDNA 模板 3 μ L, 加水使总反应体积为 50 μ L。反应条件: 采用两步法, 首先 95 °C 预变性 30 s, 然后 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火和延伸 31 s, 共 40 个循环。GAPDH 为内标。利用已制备的已知拷贝数的重组质粒 (重组载体: 大肠杆菌 DH52 α , 上海英俊公司) 制作标准曲线, 通过双标准曲线法计算 GR- α mRNA 的相对含量。

2 性能评价方法

2.1 血药浓度检测

2.1.1 标准曲线

将 3 种标准物质的贮存液 (1 mg/mL) 进行梯度稀释 (表 1), 以标准品与相应内标峰面积的比值 f 对浓度 c 作线性回归分析。

表 1 标准曲线应用液浓度 (ng/mL)

Table 1 The standard curve with concentration (ng/mL)

GC	S1	S2	S3	S4	S5
PNS	10	20	50	100	150
DPNS	10	20	100	500	1000
DX	200	400	1000	2000	4000

2.1.2 标本稳定性与干扰试验

将基质血清添加 10 管, 按表 2 处理。以 A 管为基准, 其余各管测定值与基准值比较。

表2 标本稳定性与干扰试验
Table 2 Sample stability and interference test

A	B	C	D	E
基准血清含标准品 S2	置 26 °C 6 h	置 -20 °C 30 d	加甘油三酯 13.21 mmol/L	加总胆红素 162.8 μmol/L
基准血清含标准品 S3	置 26 °C 6 h	置 -20 °C 30 d		

2.1.3 精密度与回收率试验

取 1.5 mL 离心管 15 支, 分别加入空白血清 270 μL。每 5 管分别加入 S2、S3、S4 的标准应用液 30 μL。每天检测 5 管计算日内精密度, 3 日共检测 15 管计算日间精密度, 并计算加标回收率。

2.2 GR 蛋白表达

2.2.1 标本稳定性

标本获取后立即处理检测或者分别于 4 °C 保存放置 6 h、24 h 后处理检测; 标本处理后立即检测或者处理后于 4 °C 避光保存放置 3 h、4 h、5 h、20 h、24 h 检测。

2.2.2 检测抗体孵育条件

室温孵育 30 min、37 °C 孵育 30 min、4 °C 孵育 6 h。

2.2.3 检测精密度

以标准检测程序对标本重复检测 5 次后计算阳性细胞百分率及荧光强度的 CV 值。

2.3 GR mRNA 水平

2.3.1 标准曲线

对质粒原液进行稀释, 制备出不同浓度梯度的质粒标准品: $10^1 \sim 10^5$ copies/μL, 进行 TaqMan 实时定量 PCR。

2.3.2 精密度

将 10^2 copies/μL 和 10^4 copies/μL 的标准品平行操作 5 次或在 5 天内分别测定, 获取批内与批间变异系数。

3 结果

3.1 血药浓度检测

3.1.1 标准曲线

PNS、DPNS、DX 标准曲线回归方程分别为: $c = -0.075 + 24.747f (r = 0.9969)$, $c = 0.089 + 96.240f (r = 0.9998)$, $c = -6.440 + 14.071f (r = 0.9995)$ 。结果表明, PNS、DPNS、DX 血药浓度分别在 1 ~ 15 ng/mL、1 ~ 100 ng/mL、20 ~ 400 ng/mL 范围内线性关系良好。

3.1.2 标本稳定性与干扰试验

各组间 PNS、DPNS、DX 血药浓度差异无统计

学意义。表明药品在血清中稳定 (S2: $F/P = 0.792/0.563, 0.407/0.841, 1.373/0.260$; S3: $F/P = 0.997/0.434, 1.045/0.399, 1.429/0.236$)。UPLC-MS 图谱见图 1。

3.1.3 精密度与回收率试验

PNS、DPNS、DX 在 3 种血药浓度的日内 ($n = 5$) CV 分别小于 10.81%、7.98%、5.47%。日间 ($n = 15$) CV 分别小于 10.72%、6.29%、12.36%。PNS、DPNS、DX 在 S2 浓度的平均回收率分别是 99.91%、102.49%、109.89%。

3.2 GR 蛋白表达细胞阳性率和荧光强度

标本立即处理检测与放置 6 h、24 h 后处理检测结果无统计学差异。标本处理后 5 h 检测结果无统计学差异。3 种反应条件无统计学差异 (使用 SPSS11.5 进行方差分析, 均 $P > 0.05$)。CV 值分别为 3.4% 与 9.8%。

3.3 GR mRNA 水平

3.3.1 标准曲线

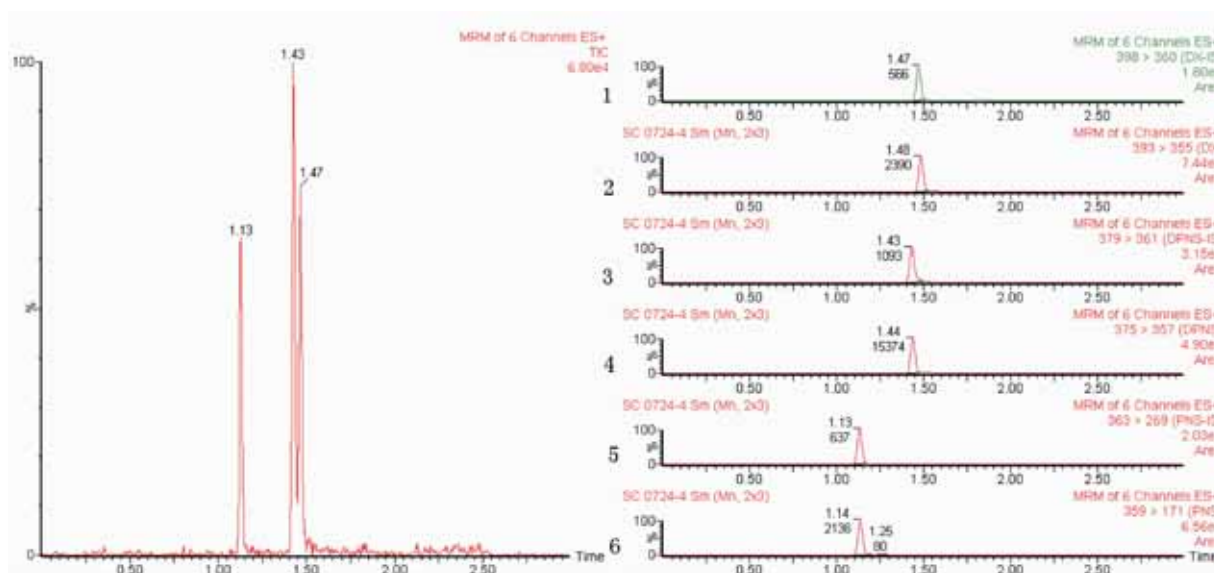
直线回归方程 $y = -3.388x + 37.198$, 相关系数 $r = 0.9885$, 显示模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系。检测灵敏度达到 10 copies/μL。

3.3.2 精密度

数据分析结果显示批内和批间 Ct 值变异系数均小于 2.0%, 表明实验重复性良好。

4 讨论

整体水平上, GR 基因表达水平的高低和 GR 分子密度的多少与糖皮质激素的敏感性不同有关。GC 用于临床后多数患者可明显改善症状, 取得良好治疗效果, 而部分患者对 GC 治疗存在抵抗; GC 在临床治疗中越广泛的应用, 而个体反应性差异和耐药性等问题则日益明显凸显^[6-8]。因此建立检测 GC 血药浓度、GR 蛋白分子和 GR 基因表达水平的综合实验诊断平台对于选择和确定 GC 治疗方案非常必要。



左图:泼尼松、甲泼尼松和地塞米松标准品图谱;右图:1、2地塞米松内标与样品;3、4甲泼尼松内标与样品;5、6泼尼松内标与样品

图1 糖皮质激素检测UPLC-MS图谱

Figure 1 UPLC-MS maps of glucocorticoid detection

表3 GR-αmRNA的批内和批间精密度检测结果

Table 3 The testing results of intra batch and inter batch precision GR-αmRNA

水平	精密度	Ct($\bar{x} \pm s$)	CV(%)
10 ² copies/μL	批内	31.03 ± 0.26	0.85
	批间	31.17 ± 0.59	1.91
10 ⁴ copies/μL	批内	22.59 ± 0.15	0.68
	批间	22.46 ± 0.28	1.23

本文对于检测方法的稳定性、特异性、重复性和线性等关键实验因素进行了系统评价,初步证实本体系设计科学、方法先进、系统可靠。从GC的药理本质方面进行研究,不仅可以检测GC血药浓度,还能反映GR基因表达水平和GR分子密度,应用临床医疗后将在个体化用药方案中发挥极大的作用。

参考文献

[1] 李琳芸,王柳燕,王昌富. 糖皮质激素受体及其检测方法的研究进展[J]. 微循环学杂志, 2005,15(3):68-71.
 [2] 李琳芸,王昌富. 糖皮质激素治疗抵抗与糖皮质激素受体分子表达异常的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2006,27(10):929-931.

[3] Sceves I, Vethe NT, Bergan S, et al. Quantification of 6 glucocorticoids in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry: method development validation and assessment of matrix effects[J]. Ther Trug Monit, 2011,33(4):410.
 [4] 李琳芸,梅冰,王昌富. 流式细胞术检测白细胞糖皮质激素受体-α方法的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010,2(1):21-24.
 [5] 陈永玲,王昌富,李琳芸,等.乙型肝炎患者糖皮质激素受体亚型 mRNA 表达水平的研究[J]. 中国优生优育杂志, 2012,20(3):16-18.
 [6] Inui S, Sumikawa Y, Asada H, et al. Glucocorticoid resistance in atopic dermatitis associated with decreased expression of glucocorticoid receptor-alpha in peripheral blood mononuclear cells[J]. J Dermatol, 2010,37(5):496-499.
 [7] Li X, Zha ng FS, Zha ng JH, et al. Negative relationship between expression of glucocorticoid receptor alpha and disease activity: glucocorticoid treatment of patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2010,37(2):316-321.
 [8] Tissing WJ, Meijefink J, den Boer ML,et al. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukemia, 2003,17(1):17-25.

· 论 著 ·

C 反应蛋白及血常规对肺炎支原体或军团菌感染儿童病情判断价值

蔡妍* 章金灿 陆卫歆 张淡璇 程龙飞

[摘要] 目的 探讨C反应蛋白(CRP)与血常规参数在肺炎支原体(MP)或军团菌(LP)感染患儿病情判断中的应用价值。方法 应用间接免疫荧光法检测1521例儿科患儿的血清支原体IgM抗体及军团菌IgM抗体;用免疫比浊法及Sysmex XT-1800i血球仪检测患儿血清CRP浓度水平及外周血各项血常规参数。结果 在1521名患儿中,24.39%(371/1521)的儿童单一感染了MP,10.32%(157/1521)的儿童单一感染了LP,还有5.06%(77/1521)的儿童是MP和LP复合感染。相对正常对照组,单纯MP感染组、单纯的LP感染组、复合感染组患儿体内的CRP、白细胞(WBC)、中性粒细胞(NEUT)水平显著升高($P < 0.05$),但年龄、红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)均低于非MP感染患儿($P < 0.05$)。结论 贫血患儿抵抗力低,更容易感染MP和LP。CRP与血细胞参数对MP或LP感染病情的判断有一定的价值。

[关键词] 肺炎支原体;嗜肺军团菌;C反应蛋白;血常规参数

Evaluation of C reactive protein and blood routine examination for the assessment of mycoplasma and legionella pneumophila infection in children

CAI Yan*, ZHANG Jincan, LU Weixin, ZHANG Danxuan, CHENG Longfei

(Medical Laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the diagnostic value of C reactive protein (CRP) and blood routine examination in children infected with mycoplasma pneumoniae (MP) or legionella pneumophila (LP). Methods IgM of MP and LP of 1521 children with respiratory tract infection were detected by indirect immunofluorescence. The CRP and hematological parameters were detected by immunoturbidimetry and Sysmex XE-1800i, respectively. Results The prevalence of a single MP infection, a single LP infection and co-infection (MP and LP) were 24.39% (371/1521), 10.32% (157/1521) and 5.06% (77/1521), respectively. Compared with the control group, the serum level of CRP, white blood cell (WBC), neutrophil granulocyte (NEUT) were higher in MP infected group, LP infected group and co-infected group (MP and LP) ($P < 0.05$). However, the age, red blood cell (RBC), hemoglobin (HGB) were lower in the three infected groups than the control group ($P < 0.05$). Conclusion Anemia was a risk factor of MP infection in children. There was of diagnostic value of CRP and hematological parameters in MP and LP infection.

[KEY WORDS] Mycoplasma pneumoniae; Legionella pneumophila; C reactive protein; Hematological parameters

急性呼吸道感染是全世界儿童最常见的疾病之一,而肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)、嗜肺军团菌(legionella pneumophila, LP)是小儿呼吸道感染的重要病原体。肺炎支原体能与

人心、肺、肝、肾、脑、平滑肌存在相同的抗原,由于交叉免疫的作用可引起靶器官损伤^[1]。嗜肺军团菌通过调整、改变基因表达在复杂的细胞环境下生存,从而引起多器官损伤^[2]。C反应蛋白(C

基金项目:潮州市卫生和计划生育局科研项目(201415)

作者单位:南方医科大学附属潮州市中心医院检验科,广东,潮州 521000

*通讯作者:蔡妍,E-mail:1146622626@qq.com

reactive protein, CRP) 是一种急性非特异性反应蛋白,它在正常人血液中含量很少,只有在人体发生细菌感染、非特异性疾病和创伤时,肝细胞才能大量合成 CRP,使体内的 CRP 浓度显著增高^[3-4]。因此,CRP 是临床上常用于评估炎症程度的一个重要指标。白细胞(white blood cell, WBC)、中性粒细胞(neutrophil granulocyte, NEUT)是传统诊断细菌感染的重要指标,大部分组织对于急性炎症的反应主要体现在中性粒细胞的改变^[5]、淋巴细胞(lymphocyte, LYMPH)是一种免疫细胞,其增多与急性传染病、病毒感染等密切相关。虽然 MP 和 LP 都是引起儿童急性下呼吸道感染(acute lower respiratory tract infection, ALRTI)重要病原,但目前对此两种微生物感染后患者体内的 CRP 与血细胞参数变化的研究报道不多。本实验旨在探讨血细胞参数和 CRP 联合检测对 MP 及 LP 感染患儿的诊断价值,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂

IX73 荧光显微镜(奥林巴斯,日本)、Dimension Xpand plus 全自动生化分析仪(西门子医学诊断产品有限公司,美国)、Sysmex XT-1800i 血球仪及配套试剂(SYSMEX 公司,日本)、高速离心机 H1650-W(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国)、低速离心机 TDZ4-WS(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国)、C 反应蛋白(CRP)测定试剂盒(西门子医学诊断产品有限公司,美国)、九项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测试剂盒(间接免疫荧光法)(VIRCELL, S.L., 西班牙)。

1.2 研究对象及诊断标准

2011 年 6 月至 2013 年 8 月本院收治的疑似下呼吸道感染的患儿 1 521 例,其中男 952 例,女 569 例,年龄为 1~14 岁,平均年龄为(3.35±2.6)岁。所有研究对象均排除肿瘤、风湿、免疫性疾病、严重器质性疾病及复合感染,诊断标准参照《实用儿科学》第 7 版^[6]。

1.3 检测方法

采用不含抗凝剂及含 EDTA-K2 抗凝剂的真空管分别抽取静脉血 3 mL 及 2 mL。不含抗凝剂外周血离心 10 min(3 000 R/min),分离血清。采用免疫比浊法检测 CRP,参考范围:<8 mg/L;采用间接免疫荧光法进行血清 MP-IgM、LP-IgM 抗体检测;EDTA-K2 抗凝血颠倒混匀后检测各项血细胞参数。

1.4 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 16.0 软件。采用两独立样本 *t* 检验进行数据的比较:(1)如果样本方差齐,选择 *t* 检验进行组间比较;(2)如果样本方差不齐,则选择校正 *t* 检验(*t'* 检验)。*P*<0.05 提示具有统计学差异。

2 结果

在 1521 名患儿中,24.39%(371/1 521)的儿童单一感染了 MP,10.32%(157/1 521)的儿童单一感染了 LP,还有 5.06%(77/1 521)的儿童是此两种病原体复合感染。我们将无此两种病毒感染的儿童(916 例)的数据作为对照组,与其他组数据相比较(表 1)。可以发现:(1)无论是单一感染还是混合感染,感染组的平均年龄均低于对照组的平均年龄(*P*=0.000),各组与对照组间数据比较均存在统计学意义(*P*<0.05);(2)单纯感染组及混合感染组儿

表 1 各感染组和对照组之间检验参数的比较

Table 1 Comparison of parameters between different inflectional groups and the control group

项目	对照组 (<i>n</i> = 916)	MP 感染组 (<i>n</i> = 371)	LP 感染组 (<i>n</i> = 157)	混合感染组 (<i>n</i> = 77)
年龄 (<i>y</i>)	3.80 ± 2.59	3.32 ± 2.31*	3.07 ± 2.28*	3.27 ± 2.56*
WBC (× 10 ⁹ /L)	9.75 ± 4.57	12.42 ± 5.67*	11.49 ± 6.09*	12.87 ± 6.94*
NEUT (× 10 ⁹ /L)	5.21 ± 3.76	7.76 ± 6.17*	6.75 ± 4.47*	7.86 ± 4.47*
LYMPH (× 10 ⁹ /L)	3.55 ± 2.14	3.67 ± 2.50	3.61 ± 3.09	3.57 ± 4.38
RBC (× 10 ¹² /L)	4.47 ± 0.43	4.55 ± 0.44*	4.15 ± 0.48*	4.13 ± 0.32*
HGB (g/L)	118.52 ± 36.51	109.91 ± 11.44*	107.65 ± 11.92*	100.65 ± 10.21*
CRP (mg/L)	8.77 ± 12.87	17.47 ± 25.09*	15.56 ± 20.62*	14.24 ± 16.24*

* 表示存在统计学差异(*P*<0.05)

童体内的 CRP ($P = 0.000$)、WBC ($P = 0.002$)、NEUT($P = 0.001$)均比对照组高,各组与对照组间数据比较均存在统计学差异($P < 0.05$);(3)单纯感染组及混合感染组儿童体内的红细胞 (red blood cell, RBC)($P = 0.002$)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)($P = 0.007$)水平均低于对照组,数据比较存在统计学差异($P < 0.05$),这可能是相对贫血的儿童免疫力较低,较为容易感染病毒。

3 讨论

肺炎支原体、嗜肺军团菌是儿童常见的呼吸道感染病原体。近年国内报道肺炎支原体及嗜肺军团菌的感染引起小儿肺炎的发病率有所上升^[7-8]。本研究对 1 521 例疑似呼吸道感染儿童的 CRP、WBC、NEUT、RBC、HGB、LYMPH 进行了分析。研究结果与文献报道的结果一致^[9-10],MP、LP 感染患儿的 CRP、WBC、NEUT 显著升高($P < 0.05$)。CRP 水平与炎症过程和组织损伤后修复的严重程度密切相关,其在发病初期迅速升高,随着病情的好转又迅速恢复正常^[11]。支原体感染引起 CRP 升高,其机制可能为支原体直接损伤细胞膜使之暴露出胆碱磷酸分子和 CRP 的附着点,通过白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 等将信息传递给肝脏产生大量 CRP,因而 CRP 是支原体所致组织损伤的敏感指标^[12]。本研究还发现 MP、LP 感染患儿的 RBC、HGB 均低于非 MP、LP 感染患儿,这说明贫血、RBC 低的患儿抵抗力低,更容易感染。但 MP、LP 感染与非感染的 LYMPH 比较无差别($P > 0.05$),或许本次收集群体还不够大,也或许确实存在这种现象,以后我们将进一步继续研究。

MP、LP 肺炎的临床表现复杂,有咳嗽、咯血等肺部病变表现,也可有恶心、呕吐、血尿、心肌炎等肺外多系统损害表现,依据上述临床表现很难与普通肺炎区分开,通常要借助病原学检查来确诊。以往的病原学检查有细菌培养鉴定、血清学试验、特异性核酸检测。但每一种检测方法都有它本身的局限性,细菌培养鉴定作为病原体诊断的金标准受培养周期长的限制在早期诊断上有其局限性;血清学检测灵敏性、特异性均较好,但对部分早期患者或免疫力低下患者,敏感性较差;特异性核酸检测容易污染、存在假阳性和假阴性可能。因此,急性呼吸道感染患儿更需要多种实验室检查,

多项指标去结合判断。CRP、血细胞参数均是临床常规项目,能与这些传统的实验室检查很好地结合,互补不足,其联合应用更能提高诊断的准确性。希望通过临床表现及 CRP 与血细胞参数的变化来初步判断是否为 MP 或 LP 感染,从而利于早期诊断、及时治疗,减少 MP 或 LP 感染的并发症。

参考文献

- [1] 王洪通,董宗祈. 肺炎支原体肺炎的肺外表现[J]. 实用儿科临床杂志, 2003,18(12):996.
- [2] Manske C, Hilbi H. Metabolism of the vacuolar pathogen Legionella and implications for virulence [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2014,9(4):125.
- [3] 周新,阮小明. 临床检验诊断学考核指南[M]. 第1版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006:122.
- [4] Fischer CL, Gill C, Forrester MG, et al. Quantitation of "acute phase proteins" postoperatively. Value in detection and monitoring of complications [J]. Am J Clin Pathol, 1976,66(5):840-846.
- [5] Al-Gwaiz LA, Babay HH. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections [J]. Med Princ Pract, 2007,16(5):344-347.
- [6] 胡亚美, 江载芳, 诸福棠. 实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1163-1199.
- [7] Jackowska T, Wrotek A. Etiology of community-acquired pneumonia in children hospitalized in the period of 2009-2012 [J]. Dev Period Med, 2014,18(2):209-215.
- [8] Wu Z, Li Y, Gu J, et al. Detection of viruses and atypical bacteria associated with acute respiratory infection of children in Hubei, China [J]. Respirology, 2014,19(2): 218-224.
- [9] Stevens D, Swift PG, Johnston PG, et al. Mycoplasma pneumoniae infection in children. Arch Dis Child [J]. Dev Period Med, 2014,18(2):209-215.
- [10] Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, et al. Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia [J]. Chest, 2012,141(6):1537-1545.
- [11] 蔡妍,章金灿,杨惠钿,等. 中性粒细胞中毒颗粒与 C 反应蛋白的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2013,29(19): 3231-3234.
- [12] 陈全景. 超敏 C 反应蛋白在小儿支原体肺炎急性期和恢复期的水平变化[J]. 微循环学杂志, 2009,19(3): 71.

间充质干细胞移植治疗终末期肝病前后血清甲胎球蛋白的变化

陈建华^{1*} 徐玉琴² 杨晋辉³ 张军⁴

[摘要] 目的 探讨间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)移植治疗终末期肝病甲胎球蛋白(α -fetoprotein, AFP)的变化,观察病人肝功能有无改善。方法 MSC移植治疗73例终末期肝病患者,其中包括失代偿期肝硬化患者45例,慢性重症肝炎5例,监测疗前和疗后1周、疗后1个月、2个月AFP及肝功能变化。结果 疗后1周AFP较疗前明显升高,其后降低,2个月至疗前水平,差别有统计学差异($P < 0.05$)。白蛋白(serum albumin, ALB)疗后1月、2月与疗前相比,差别有统计学意义($P < 0.05$)。胆碱酯酶疗后2月较疗前明显升高,差别有统计学意义($P < 0.05$)。所有接受干细胞移植的患者观察过程中未出现肝脏及其他器官肿瘤。结论 MSC移植治疗终末期肝病患者安全有效。

[关键词] 间充质干细胞(MSC); 移植; 甲胎球蛋白(AFP)

The change of serum α -fetoprotein during mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of end-stage liver disease

CHEN Jianhua^{1*}, XU Yuqin², YANG Jinhui³, ZHANG Jun⁴

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China, 637000; 2. The Infectious Department, No. 211 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Harbin, Heilongjiang, China, 150030; 3. Digestive Internal Medicine, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China, 650000; 4. The Life Health Department of Shenzhen Beike Biotechnology Company, Shenzhen, Guangdong, China, 518057)

[ABSTRACT] Objective To explore the changes of α -fetoprotein(AFP) in end-stage liver disease after mesenchymal stem cell (MSC) transplantation and observe whether patient's liver function had been improved.

Methods 73 patients with end stage liver disease were transplanted with MSC, including 45 decompensated hepatic cirrhosis and 5 chronic severe hepatitis patients. The serum levels of AFP, liver function were examined 1 week before treatment and 1 week, 1 month, and 2 months after treatment.

Results The level of AFP increased at 1 week after treatment, and returned to normal level 2 months later. There was statistical difference between before treatment and after treatment ($P < 0.05$). The results revealed a statistically significant difference between before treatment and after 1, 2 months treatment in serum albumin(ALB)($P < 0.05$). Likewise, there was significant difference between before treatment and after 2 months treatment in Cholinesterase ($P < 0.05$). No person suffered from any other tumor under thorough observation. **Conclusion** MSC transplantation is a safe and effective in the treatment of end-stage liver disease.

[KEY WORDS] Mesenchymal stem cell(MSC); Transplantation; α -fetoprotein(AFP)

基金项目:间充质干细胞临床应用高技术产业化(2011GH021787)

作者单位:1. 川北医学院药学院药理教研室,四川,南充 637000

2. 哈尔滨 211 医院感染科,黑龙江,哈尔滨市 150030

3. 昆明医学院第二附属医院消化内科,云南,昆明 650000

4. 深圳市北科生物科技有限公司生命健康部,广东,深圳 518057

*通讯作者:陈建华,E-mail:623551832@qq.com

终末期肝病目前最有效的治疗方法是肝移植,但由于供体来源有限且治疗费用高昂及移植后的排斥反应限制了其临床大规模应用。干细胞临床应用研究是目前国际生物医学领域的前沿科技,被誉为医学史上的第二次革命。近几年的研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)不仅具有支持造血的功能,而且没有免疫原性,能够诱导免疫耐受,对同种异体免疫反应具有负调节作用,目前已应用于治疗移植植物抗宿主病、克罗恩氏病、肝脏纤维化和骨关节损伤等多种疾病^[1]。本文采用MSC移植治疗终末期肝病,疗后1周甲胎球蛋白(α -fetoprotein, AFP)明显升高。为了解其转归及对患者的影响,笔者收集MSC治疗终末期肝病相关资料,观察治疗前后AFP和肝功能变化,探讨MSC治疗的临床效果及治疗过程中AFP的发展变化。

1 数据和方法

1.1 病例来源

于2009年1月至2012年10月收集昆明医学院第二附属医院肝病科MSC治疗肝硬化患者23例、哈尔滨211医院肝病科MSC治疗肝硬化患者45例,慢性重症肝炎5例,通过病史及临床症状、相关实验室检查确诊病例。患者年龄22~73岁(46.74 ± 11.01)岁。

纳入标准:(1)所有病例诊断均符合《肝脏病和感染病诊疗指南2010》。(2)年龄18~75岁的男性或女性。(3)半年内没有使用过MSC治疗。(4)理解并签署知情同意书者。

排除标准:(1)恶性肿瘤患者或血液系统疾病。(2)过敏体质、曾有对血制品过敏史。(3)孕妇、哺乳期妇女。(4)合并腹腔、肺部或其它系统感染。(5)心、肺、肾等重要脏器功能不全或衰竭以及不能配合治疗者。

1.2 实验方法

收集患者一般临床数据,术前实验室检查包括血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆红素、血浆ALB、凝血酶原时间、国际标准化率、血氨、AFP。患者入院后均行内科治疗,包括护肝、对症治疗等。脐带来源的MSC由深圳市北科细胞工程研究所实验室制备提供。治疗前1周、疗后1周、疗后1个月、疗后2个月检测血液中肿瘤标记物AFP含

量(化学发光法),并对患者的临床症状、疗效进行观察。

1.3 统计方法

使用SPSS 20.0统计软件包进行处理,计量资料进行描述性统计,变量用(均数 \pm 标准差)表示;治疗前后结果比较,因是单因素且在4个时间点进行采样,故采用单因素重复测量方差分析。

2 结果

2.1 MSC移植治疗终末期肝病AFP变化

治疗前后采用重复测量方差分析,Mauchly球形度检验卡方=21.007, $P < 0.01$,故用Greenhouse-Geisser进行校正, $F = 9.153, P = 0.029$,差别有统计学意义($P < 0.05$)。从表1可以看出,疗后1周AFP明显升高。

表1 MSC移植治疗终末期肝病AFP变化

Table 1 The changes of AFP during MSC transplantation in the treatment of end-stage liver disease

Group	N(miss)	$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)
AFP0	73(0)	28.91 \pm 15.18
AFP1	37(36)	178.97 \pm 87.23
AFP2	25(48)	59.36 \pm 23.27
AFP3	16(57)	10.85 \pm 6.53

2.2 MSC移植治疗终末期肝病ALB变化

经重复测量方差分析,Mauchly球形度检验卡方=0.426, $P > 0.05$,故用球形检验结果, $F = 2.502, P = 0.035$,差别有统计学意义。利用Bonferroni多重比较,ALB疗后1月、2月与疗前相比,差别有统计学意义, $P < 0.05$;疗后1周与疗前相比,差别无统计学意义, $P > 0.05$ 。结果见表2。

表2 MSC移植治疗终末期肝病ALB变化

Table 2 The changes of ALB during MSC transplantation in the treatment of end-stage liver disease

Group	N(miss)	$\bar{x} \pm s$ (g/L)	P值(与疗前比较)
ALB0	73(0)	29.91 \pm 6.15	
ALB1	62(11)	32.84 \pm 5.35	0.339
ALB2	28(45)	34.36 \pm 5.89	0.037
ALB3	20(53)	36.85 \pm 6.43	0.0412

2.3 MSC 移植治疗终末期肝病胆碱酯酶变化

经重复测量方差分析, Mauchly 的球形度检验卡方 = 13.703, $P = 0.019$, 故用 Greenhouse-Geisser 进行校正, $F = 1.322$, $P = 0.039$, 差别有统计学意义。利用 Bonferroni 两两比较, 胆碱酯酶疗后 2 月与疗前相比, 差别有统计学意义, $P < 0.05$; 疗后 1 周、1 月与疗前相比, 差别无统计学意义, $P > 0.05$ 。结果见表 3。

表 3 干细胞治疗终末期肝病胆碱酯酶与疗前比较
Table 3 The comparison to pretherapy of cholinesterase during MSC transplantation in the treatment of end-stage liver disease

Group	N(miss)	$\bar{x} \pm s$ (U/L)	P 值(与疗前比较)
胆碱酯酶 0	73(0)	2096.40 ± 898.23	
胆碱酯酶 1	59(14)	1971.21 ± 533.70	1.000
胆碱酯酶 2	36(37)	2151.92 ± 1627.0	0.587
胆碱酯酶 3	23(50)	3194.16 ± 997.60	0.032

3 讨论

AFP 的合成部位主要在啮齿动物及人类胚胎的肝脏, 也可在卵黄囊及胃肠道等部位合成, 它是啮齿类动物和人胚胎期血清中的主要蛋白成分。人类胚胎在子宫内发育的第 6 周左右用双向扩散法即能测出 AFP, 到第 13 周左右可达到高峰, 第 16 周后 AFP 的浓度迅速下降而 ALB 浓度上升; 出生后第 1 周末用双向扩散法即不再能测出 AFP^[2]。AFP 在原发性肝癌或胚胎性癌时增加^[3-4], 所以检查 AFP 在血液中的含量, 对这类疾病的发现和诊断有重要意义。动物和人在切除部分肝脏后, 组织和血清中 AFP 的浓度会明显增高。肝组织发生炎症或癌变时, AFP 也会升高^[5-6]。根据 2011 年卫生部肝细胞肝癌规范化诊治指南, 血清 AFP 大于 400 ng/mL 1 个月; 或 AFP 大于 200 ng/mL 持续 2 个月, 排除妊娠和生殖腺胚胎瘤者, 高度警惕肝癌, 应通过影像学检查^[7]。

本研究采用脐带来源的 MSC 治疗终末期肝病过程中也发现病人的 AFP 升高, 从表 1 可知, MSC 移植治疗 1 周后, 血液中的 AFP 明显升高, 差别有统计学意义, $P < 0.05$ 。血清胆碱酯酶是肝病很好的标记物, 有较好的敏感性和特异性, 可做

为进展期肝病判断预后一个有价值的标记物, 其值越低, 愈后越差^[8]。干细胞移植后, 表 3 结果表明胆碱酯酶与疗前相比, 2 个月后明显升高, 差别有统计学意义。因胆碱酯酶活性是反映肝细胞损害的敏感指标, 对估计肝硬化患者肝脏储备功能, 了解病情变化及预后判定具有一定临床价值, 再结合病人的 ALB 较疗前也有一定升高, 腹水减少, 乏力纳差等症状明显改善, 表明患者预后向好的方向发展, 肝功能得到一定改善。

MSC 是一种多潜能干细胞, 能自我更新并向不同组织分化, 已在不同的动物模型上证实其可向肝原性细胞分化^[9]。将人蜕膜来源的 MSC 与鼠肝匀浆共培养, 分析其向肝细胞样形态改变、表型和三维结构, 发现其表达肝特异性标记: ALB、肝细胞生长因子受体 (hepatocyte growth factor receptor, HGFR)、AFP 和细胞角蛋白-18 (cytokeratin-18, CK-18), 形成的肝样细胞具有肝细胞的功能: 包括糖原的存储和吸收/分泌吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG)。同时, 在共培养过程中, AFP 合成减少和 ALB 合成增加也与正常肝脏器官在胚胎期间发育过程中观察到的一致^[10]。当 MSC 与受伤的肝组织共培养时, 甲胎蛋白和白蛋白表达明显升高^[11-12], 这和我们观察到的结果一致。

而 MSC 移植治疗终末期肝病的不良反应, 有少数患者会出现低热, 体温一般不超过 38 度, 不须特殊处理或仅需对症处理即可, 1 ~ 3 天内症状消失; 个别患者出现高热寒战, 结合具体临床情况进行处理; 偶有恶心和呕吐、腹痛、皮疹发生, 经对症处理, 均在 1 ~ 3 天内消失^[13-14]。

血清 AFP 测定对急性重型肝炎临床治疗疗效及预后有重要的指导意义。重型肝炎患者血清 AFP 含量高, 则其治疗后肝功能逆转率高; 反之, 则肝功能逆转率低, 预后差^[15-16]。Kakisaka 等发现除了严重损害的肝脏, AFP 在急性肝损伤或急性肝衰竭的病人中明显升高且和细胞角蛋白-7 阳性的肝脏前体细胞数目呈现明显的相关性, 血清 AFP 水平可能反映此类病人肝脏前体细胞的诱导, 肝前体细胞持续诱导直到足够成熟肝细胞再生可能是急性肝衰竭病人恢复的必要条件。血清 AFP 可能是急性肝损伤或急性肝衰竭病人肝前体细胞的标记物, 若 AFP 水平低, 则这类病人的预后较差^[17], 这与我们的报道一致。

尽管 MSC 移植治疗肝病已取得可喜的成果,但是这些研究尚处于起步阶段,也缺乏合理设计的多中心随机对照临床研究验证疗效及长期随访数据了解移植可能发生的不良反应或并发症。本文的不足之处是收集的数据缺乏长期随访数据,AFP 升高的机制需要做进一步研究。尽管如此,仍有理由相信通过深入研究,可以安全地把 MSC 的基础研究转化为临床应用,为疑难杂症的治疗带来更为广阔的前景。

参考文献

- [1] 郭子宽. 间质干细胞及其临床应用中的几个问题[J]. 中国组织工程研究, 2012,16(01):1-10.
- [2] Terentiev AA, Moldogazieva NT. Alpha-fetoprotein: a renaissance[J]. Tumour Biol, 2013,34(4):2075-2091.
- [3] Simon K, Serafinska S, Pazgan-Simon M. Surveillance programmes for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2012,16(4):295-299.
- [4] Kim H, Kim K, Yu SJ, et al. Development of biomarkers for screening hepatocellular carcinoma using global data mining and multiple reaction monitoring[J]. Plos One, 2013,8(5):e63468.
- [5] 马军,段芳龄,颜伏归,等. 部分肝切除后的肝损伤血清和肝细胞生长因子促进大鼠骨髓细胞表达甲胎蛋白和白蛋白[J]. 中华肝脏病杂志, 2004,12(7):31-34.
- [6] 莫国辉,黄健旅,梁毓,等. 广西地区原发性肝细胞癌患者甲胎蛋白基因多态性检测及其临床意义分析[J]. 川北医学院学报, 2012,27(5):418-421.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 肝细胞肝癌规范化诊治指南(试行)[S]. 2011.
- [8] Ramachandran J, Sajith KG, Priya S, et al. Serum cholinesterase is an excellent biomarker of liver cirrhosis[J]. Trop Gastroenterol, 2014,35(1):15-20.
- [9] Duenas F, Becerra V, Cortes Y, et al. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses [J]. BMC Vet Res, 2014,12(10):154-163.
- [10] Bornstein R, Macias MI, Torre P, et al. Human decidua-derived mesenchymal stromal cells differentiate into hepatic-like cells and form functional three-dimensional structures [J]. Cytotherapy, 2012,14(10):1182-1192.
- [11] Burra P, Arcidiacono D, Bizzaro D, et al. Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury[J]. BMC Gastroenterol, 2012,12:88.
- [12] Yu J, Cao H, Yang J, et al. In vivo hepatic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood after transplantation into mice with liver injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,422(4):539-545.
- [13] 李浩. 人脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床研究[D]. 安徽医科大学. 2014.
- [14] 王方,云升皓,周新人,等. 经肝动脉自体骨髓或脐带血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化患者的安全性和近期疗效比较[J]. 实用肝脏病杂志, 2014,11(04):356-359.
- [15] 梅小平,敬雪明,李健. 血清甲胎蛋白水平对重型病毒性肝炎预后影响的相关性研究[J]. 川北医学院学报, 2011,26(2):139-140.
- [16] 龙云升, 罗林. 甲胎蛋白(AFP)在重型肝炎预后中的预测价值[J]. 临床合理用药杂志, 2014,7(20):109-110.
- [17] Kakisaka K, Kataoka K, Onodera M, et al. Alpha fetoprotein: a biomarker for the recruitment of progenitor cells in the liver in patients with acute liver injury or failure[J]. Hepatol Res, 2014. Epub ahead of print.

电化学生物传感器在 microRNA 检测中的应用

马雯 吕微风 郑磊*

[摘要] MicroRNA(miRNA)是一种内源性的单链非编码RNA,参与细胞的增殖凋亡分化和代谢等重要生理过程。近年来发现循环 miRNA 能够耐受 RNA 酶消化、强酸强碱、煮沸等极端条件,是一种潜在的疾病标志物。因此,miRNA 的检测对疾病的早期诊断具有重要的生物学意义。电化学生物传感器由于其简易、便携、灵敏、反应快速以及价格低廉等特点而被研究者广泛应用于 miRNA 检测的研究。本文综述了 miRNA 的电化学传感器的研究进展,评述了各类方法的优缺点,并对 miRNA 电化学检测的发展趋势进行了展望。

[关键词] microRNA(miRNA); 生物标志物; 电化学生物传感器

Applications of electrochemical biosensors in the detection of microRNA

MA Wen, LV Weifeng, ZHENG Lei*

(Department of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] MicroRNAs (miRNAs) are a class of short endogenous non-coding RNAs that involve in diverse biological processes of cells, including development, differentiation, proliferation, and apoptosis. In recent years, accumulating studies have shown that the circulating miRNAs are resistant to RNase digestion, extreme pH and temperature, and have been proposed as novel biomarkers in diagnostics. The detection of miRNA is of great biological significance for clinical diagnosis. Owing to the fact that electrochemical detector is simple, portable, sensitive, fast response and low cost, electrochemical biosensors have been recognized to be the most promising way for miRNA detection. In this paper, the progress of miRNA electrochemical biosensor is summarized. And the advantages and the disadvantages of all kinds of methods and prospect the miRNA electrochemical detection trends are reviewed.

[KEY WORDS] MicroRNA (miRNA); Biomarker; Electrochemical biosensors

电化学生物传感器是一门有关化学、物理学、生物学以及电子学等领域的交叉学科,它具有灵敏度高、检测速度快、操作简便、成本低、可进行连续动态监测等优点。其工作原理是:当待测物质经扩散作用进入敏感元件后,与敏感元件生物体成分(酶、激素、抗原、抗体、组织、细胞、细胞器等)特异性结合,发生生物化学反应,所产生的信息通过

相应的信号转换元件(固体电极、气敏电极、离子选择性电极等)以转换为定量处理的电信号,再经电子测量仪的放大、处理和输出,即可达到分析检测的目的。

1 miRNA

1993年,人类首次在秀丽新杆状线虫中发现

基金项目:国家自然科学基金(81371901);高等学校博士学科点专项科研基金(20134433110010);广东省科技计划国际合作项目(2012B050600021)

作者单位:南方医科大学南方医院检验科,广东,广州 510515

*通讯作者:郑磊,E-mail:nfyyl@163.com

lin-4, 随后又有研究者陆续发现 miRNA 广泛地存在于哺乳动物、果蝇和植物等生物中^[1]。目前已有研究证明, miRNA 参与生命过程中的一系列重要活动, 包括生长发育、免疫防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢、肿瘤发展、心脏发生等^[2]。虽然目前对已发现的 miRNA 分子功能和作用靶基因的研究还处于初步阶段, 但是从 miRNA 在不同组织和疾病中的表达谱中分析发现, 某些 miRNA 在特定疾病表达谱中具有明显的组织特异性^[3-5]。以上研究均表明, miRNA 在疾病发生发展过程中存在非常重要的作用。

2008年, Lawrie^[6]等在人类血清中首次检测到 miRNA, 并发现弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者血清 miR-21 表达上调。从此, 不少学者将研究方向转到血清和血浆中来。最近几年, 相继在乳腺癌、白血病、心肌梗死、肝炎^[7-10]等疾病患者中发现循环 miRNA 表达量与正常人相比具有明显差异, 且在某些疾病中还可用于诊断、分期和预后检测。另还有报道证明循环 miRNA 可耐受一些苛刻的环境, 如多次反复冻融, 强酸强碱、长期保存甚至煮沸^[11]。这些研究均证实了 miRNA 在血中十分稳定。目前关于血清和血浆样品中 miRNA 稳定性的机制虽然还没有定论, 但是已发现循环 miRNA 可与一些蛋白质结合形成复合物, 如 Argonaute2 (Ago2)、核仁磷酸蛋白 (nucleophosmin, NPM)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL), 也可以包含于微囊泡 (microvesicle)、外泌体 (exosome)、凋亡小体 (apoptosis body) 等, 这些特性均可为其稳定性提供基础^[12-13]。

循环 miRNA 的发现是临床分子生物学革命性的突破, 其高度的特异性和稳定性决定了其作为一种新的疾病生物标志物的巨大潜力。因此, 找到一种适合的检测方法显得尤为重要。

1.1 miRNA 检测的难点

(1) miRNA 成熟体只有 20 多个 bp, 降解温度低, 故 miRNA 提取后保存要求较高。(2) 同一家族 miRNA 碱基组成区别不大, 有的甚至只有 1 个碱基的区别。(3) miRNA 合成过程中, 由于存在 pri-miRNA、pre-miRNA、miRNA 成熟体, 在检测 miRNA 成熟体时必须排除其他 2 种形式的 miRNA 干扰。(4) miRNA 在人体内含量一般较低,

对检测方法的灵敏度要求相对较高^[14]。

1.2 目前常用的检测方法

目前常用的 miRNA 检测技术包括 Northern 印迹杂交 (northern blotting)、微阵列芯片 (microarray)、实时荧光定量 PCR (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 等。Northern blotting 一般先用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出特定 miRNA, 然后利用杂交原理与印迹膜上修饰的标记寡核苷酸探针杂交, 通过检测标记进而分析靶 miRNA 的含量。但是此方法由于其样品需求量大、灵敏度低、不适合高通量分析等特点而并不适用于临床^[15]。微阵列芯片又称基因芯片, 其可对 miRNA 实行高通量、多组分检测。可这种方法相对费用较高, 且存在背景及其他信号干扰导致重复性差, 一般只用于初筛, 所得结果最终还需实时荧光定量 PCR 验证^[16]。目前临床和科研中最常使用实时荧光定量 PCR 来进行 miRNA 的检测, 此方法将逆转录后的 cDNA 产物进行特异性的扩增, 从而大大提高检测能力。但是这种技术对实验条件以及实验操作者要求较高, 且检测费用相对较贵。此外, 还有研究者利用表面增强拉曼、生物发光、原位杂交、纳米孔技术来检测 miRNA, 但是这些方法一般需要特殊仪器, 不利于临床大规模开展。若发展一种适用于临床实验室的 miRNA 检测方法, 应满足以下几点要求: (1) 应具备灵敏的检测能力, 能定量敏感检测出不同临床标本甚至极低丰度的 miRNA; (2) 应具备良好的特异性, 能区分出高度同源的 miRNA; (3) 检测过程相对简便, 无需昂贵的设备和试剂。电化学生物传感器由于其简易、便携、灵敏、反应快速以及价格低廉等特点而被研究者广泛应用于 miRNA 检测的研究。现就 miRNA 电化学检测新技术作一综述。

2 miRNA 电化学检测技术

一个典型的 miRNA 生物传感器设计原理是将识别元件固定在载体表面, 加入可指示杂交信号的电活性物质, 通过检测电极在待测溶液中电化学信号的变化, 以确定靶 miRNA 的浓度。特异性和敏感性是评价 miRNA 生物传感器的 2 个至关重要的因素。特异性主要由识别元件 (一般为捕获探针) 来决定, 敏感性则主要由信号放大技术决定。

2.1 捕获探针设计

所有的 miRNA 电化学传感器检测方法均存在 1 个杂交的过程,因此捕获探针的设计显得尤为重要。由于 miRNA 的序列较短,所以捕获探针在设计上难度较大。目前常用的是线性寡聚 DNA 探针、具有茎环结构的分子信标探针、DNA 纳米结构的探针。

2.1.1 普通线型探针

一维线型探针合成简单,线性单链 DNA 探针分子作为识别元件非特异结合较多,配对碱基间结合力弱,无法鉴别单个碱基错配,检测特异性及灵敏度不高^[17]。但是又有文献^[18]报道可以通过提高杂交温度来消除碱基错配的影响。在 37 °C 时,线性探针无法消除错配的影响,但当杂交温度达到 65 °C 时,单碱基错配的电位信号接近背景值^[19]。

2.1.2 分子信标探针

分子信标探针是一种可在核酸 5' 和 3' 端自身形成的具有茎环状结构的寡核苷酸探针,其环状部分与目标序列互补,一般为 15 ~ 30 个碱基。其茎干区的碱基数一般为环状区的一半,过长,灵敏度下降;过短,则稳定性下降。由于分子信标杂交前后环状区与靶分子的双链结构之间存在着热力学平衡关系,它的杂交特异性明显高于常见的线状探针,是目前应用最广的捕获探针。

2.1.3 DNA 纳米结构探针

传统的 DNA 探针通常为一维(单链探针)或二维(茎环状探针)结构,传感界面在制备过程中均一性极难得到有效的控制,从而影响了实际样品检测的重复性和稳定性。三维 DNA 探针因其高结构稳定性和刚性的特点,可以有效提高 DNA 探针表面分布排列的均一性,精确调控探针之间的距离,因而显著提高了生物检测的灵敏度和特异性,这一研究结果显示了 DNA 纳米技术作为新型生物传感平台的巨大潜力^[20]。将 DNA 三维纳米结构探针组装到电化学装置的工作电极表面,使目标 miRNA 与工作电极表面 DNA 三维纳米结构探针杂交,随后加入氧化还原酶和相应的底物使用电化学装置进行电化学检测(图 1)。该方法检测限低至 10 aM,从而解决了现有技术需要大量检测样品的难点^[21]。另外,该检测方法的特异选择性强,能够很好区分同族的 miRNA 的碱基错配,与传统探针相比,本方法稳定性更高。

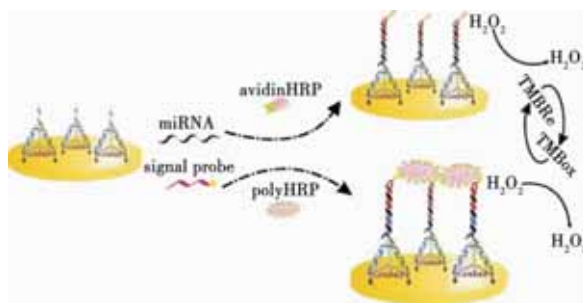


图 1 捕获探针为四面体结构的酶促生物传感器检测示意图^[21]

Figure 1 Scheme of strategy for a miRNA enzyme biosensor based on tetrahedral probes^[21]

2.1.4 其他

识别元件的取代基类型决定了其与靶物质的结合亲和力及稳定性。目前应用于传感器识别元件的核酸寡聚体除了传统的 DNA、RNA 之外,还有 RNA 的核酸模拟物(locked nucleic acid, LNA)及 DNA 的核酸模拟物肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)。锁核酸(LNA)^[22]是一种特殊的双环状核苷酸衍生物,结构中含有一个或多个 2'-O、4'-C-亚甲基-β-D-呋喃核糖核酸单体,核糖的 2'-O 位和 4'-C 位通过不同的缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥,并连接成环形,这个环形桥锁定了呋喃糖 C3'-内型的 N 构型,降低了核糖结构的柔韧性,增加了磷酸盐骨架局部结构的稳定性。与其他寡核苷酸相比,LNA 有如下优势^[23]:(1)和 DNA、RNA 互补的双链有很强的热稳定性;(2)抗 3' 脱氧核苷酸酶降解的稳定性;(3)LNA-DNA 杂交物能激活 RNaseH;(4)水溶性好,自由穿入细胞膜,易被机体吸收;(5)体内无毒性作用。基于以上这些优点,大量基于 LNA 探针的 miRNA 检测方法被大量开发。肽核酸(PNA)是一种人工合成的具有类多肽骨架的 DNA 类似物,其有如下特点:(1)骨架呈电中性,与靶序列杂交时不受静电排斥作用的影响;(2)杂交活性几乎不受介质盐浓度的影响;(3)PNA/RNA 杂交比 DNA/RNA 杂交更易受碱基错配影响;(4)体内无毒性作用^[24]。目前已有研究将 PNA 作为检测探针与氧化石墨烯结合成功实现在胞内同时检测多种 miRNA,并论证了 PNA 用于 miRNA 检测的优越性^[25](图 2)。

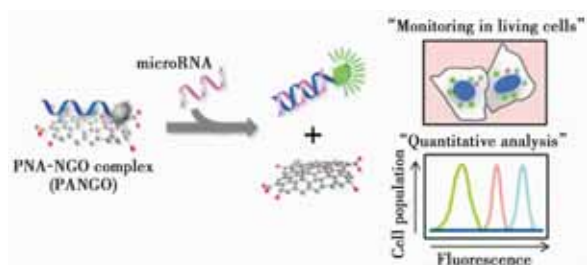


图2 基于PNA-NGO复合物的miRNA生物传感器检测示意图^[25]

Figure 2 Scheme of strategy for a miRNA sensor based on NGO and PNA^[25]

2.2 信号放大技术

由于miRNA在体内含量极少且本身序列较短,产生的信号很难与背景信号进行区分,所以需要使用信号放大技术将信号进行放大,使检测信号与背景信号很好的区分开来。目前,电化学传感器常用的信号放大技术有纳米材料放大技术、酶催化信号放大、电活性物质放大技术、鸟嘌呤氧化放大技术等。

纳米材料以其独特的化学、光学、磁学、热学、电学等性质引起了科学家的广泛关注。随着纳米材料研究的不断深入,越来越多具有良好电化学性能的纳米材料应用于传感器电极的构建。图3^[26]显示了基于纳米结构的微电极阵列电导率的变化来检测单层的电荷中性的吗啉代寡核苷酸与靶miRNA的杂交过程,将一个亲生物界面的单层的电荷中性的吗啉代寡核苷酸固定在硅烷活化的铟锡氧化物电极上,与靶miRNA杂交使生物传感器

表面形成高密度的负电荷。二甲氧基联苯胺、辣根过氧化物酶、过氧化氢的引入使得在生物传感器表面产生多聚二甲氧基联苯胺复合物膜,该复合物膜的电导率与miRNA量呈正比。该方法已在溶液中成功检测let-7c,检测限为2fM,且能成功鉴别单碱基错配。但使用临床血标本直接检测时,变异较大,可能是血清中的高蛋白及其他血液成分严重影响miRNA的测量。研究者又利用硅纳米线场效应管构成CMOS反相器在肺癌细胞和人类血清中成功检测miRNA(图4)^[27]。这种新型的生物传感器首先利用半导体技术在加工的硅纳米线上固定单链DNA探针,当靶miRNA附着在硅纳米线表面,与DNA探针杂交后,负电荷增加引起电流变化。该传感器检测限达到1zM,并成功检测肺癌细胞以及人类血清中的miRNA。然而,该传感器的性能易受到工艺偏差的影响。另外,纳米器件本身需要在较低的电压下工作,这将导致器件噪声容限的降低。所以,该传感器将来要运用于临床,还需进一步优化。

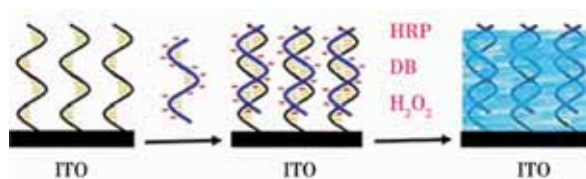


图3 基于纳米结构的微电极阵列电导率的变化来检测靶miRNA的生物传感器示意图^[26]

Figure 3 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on change of the conductivity of nano microelectrode array^[26]

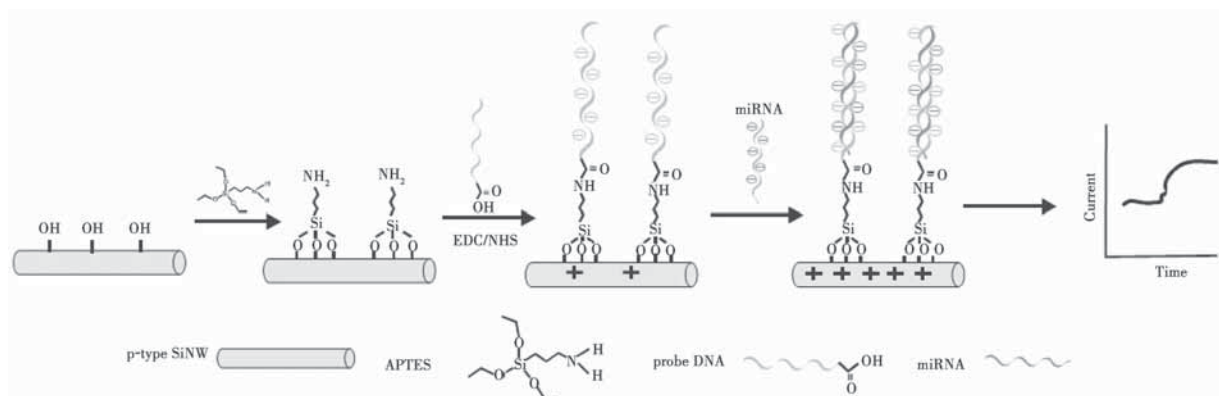


图4 硅纳米线场效应管构成CMOS反相器检测miRNA示意图^[27]

Figure 4 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistors^[27]

目前也有许多方法是利用纳米材料标记来进行信号放大^[28](图5)。该方法先将分子信标捕获探针固定在金电极上,当靶物质与捕获探针互补杂交时,分子信标茎环结构被打开,纳米银标记的寡核苷酸探针随之与捕获探针结合。纳米银在碱性条件下可催化 H_2O_2 还原,产生电化学信号。 H_2O_2 产生的电化学响应值与 miRNA 数量呈正相关。该电化学传感器的检测限达到 67fM。但该方法需要对探针预先进行标记,操作较为复杂且相对成本较高。

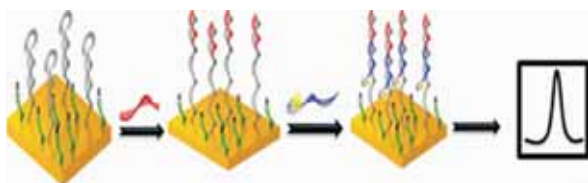


图5 纳米银标记寡核苷酸探针放大检测 miRNA 示意图^[28]

Figure 5 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on oligonucleotide encapsulated silver nanoclusters as probes^[28]

酶由于其对相应的底物具有催化转化能力和特异选择作用而被广泛应用于各类化学分析上。电化学酶基因传感器的原理为利用酶对底物的催化,使底物氧化或还原,产生可在电极上进行反应的物质,获得电流信号。例如,将生物素标记的捕获探针绑定在亲和素包被的纳米磁珠上,当探针遇到生物素化的靶 miRNA 时发生杂交,此时链霉亲和素标记的碱性磷酸酶就可连接到磁珠上,通过对酶促反应产物进行电化学检测,从而对 miRNA 进行定量^[29]。该方法成功用于检测细胞中 miRNA 的表达情况,其灵敏度达到 7 pM。随后,又有研究者将捕获探针固定在纳米金修饰的大电极上,在靶物质存在下,石墨烯-血红素复合物(具有类过氧化物酶催化活性)可连接到体系中,从而对 miRNA 进行定量^[30](图6)。该传感器由于石墨烯组分的引入增强了血红素本身的催化活性,具有协同作用,使其检测限达到 0.17 pM,并且成功用于拟南芥幼苗中 miRNA 的检测。为了得到更高的灵敏度,有学者又利用四面体纳米探针作为捕获探针,在靶 miRNA 存在的条件下与生物素标记的

2 条辅助探针一起形成杂交连锁反应,随后加入亲和素标记的辣根过氧化物酶,催化 H_2O_2 , 产生电信号^[31]。该方法检测限达到 10 aM。但是稍显不足的是,该体系并未用于检测任何临床标本。这种利用 2 条辅助探针形成杂交连锁结构的体系还需在临床样本中进一步验证。



图6 模拟酶催化系统电化学生物传感器检测 miRNA 示意图^[30]

Figure 6 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on mimic enzyme catalysis system^[30]

近年来,不少研究者开发了一系列基于电活性物质直接标记检测 miRNA 的方法。例如,将具有氧化还原活性和电催化活性的物质 Ru(PD) $2Cl_2$ 通过与 miRNA 上嘌呤碱基的配位作用连接到 miRNA 上,催化胂的氧化,检测限可以到 200 fM^[32]。虽然检测限相比其他方法不是很有优势,但是该方法样品用量很少,并且仅需 10 ng 的总 RNA 就能定量 miRNA。但是该方法需要对靶 miRNA 进行预先标记,操作较为复杂耗时,不适合临床广泛使用。为了提高灵敏度,有研究者利用 $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 能够结合带阴性电荷的 DNA 双链作为指示剂的特点,提出了一种定量检测 miRNA 的方法^[33](图7)。在靶物质存在的情况下,可发生杂交连锁反应,形成长的 DNA 双链片段。 $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 直接结合双链片段,进而被连接到电极上,产生放大电流信号。该方法检测限达到 100 aM,并成功用于血液标本的检测。

由于 miRNA 在体内含量极低,需要极为灵敏的方法进行检测,所以研究人员一般更倾向于多种放大技术联用达到多重放大的效果。在固定电极上利用纳米与酶双重放大技术成功检测了细胞中的 miR-21 的含量(图8)^[34],该传感器检测限达到 0.06pM。另外,还有研究者利用 3-氨基苯酚硼酸(3-amino phenol boric acid, APBA)与具有顺式二醇结构的核糖核酸特异性结合形成酯键的功能成功的将 miRNA 与单链 DNA 区分开来^[35]。该传感器使用了修饰了 APBA 和生物素的纳米金,

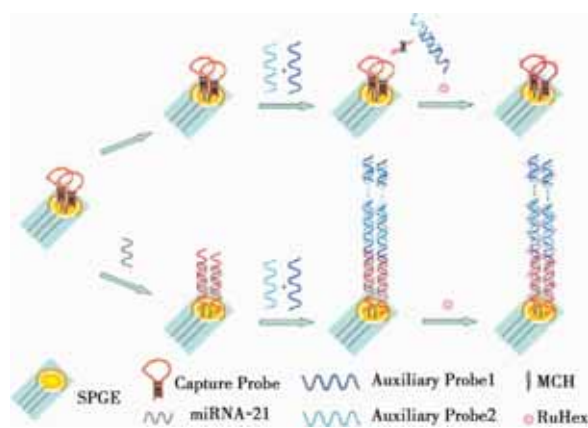


图7 电活性物质直接标记检测 miRNA 示意图^[33]
Figure 7 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on the electroactive materials^[33]

与生物素特异结合的亲和素标记的碱性磷酸酶,可使催化产物进行氧化还原循环的三(2-氯乙基)磷酸酯(Tris(2-chloroethyl) phosphate, TCEP),从而实现三重放大。经三重放大后,该传感器检测限达到 3 fM。但是该传感器目前只在溶液中检测了 miR-21,并未在临床样本中进行验证。虽然多重放大有利于提高传感器灵敏度,但操作较为复杂耗时,且批间差异较大,不适合临床广泛使用。

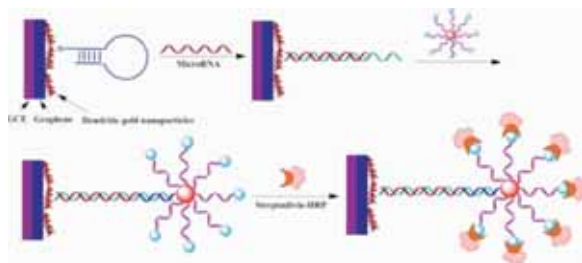


图8 双重信号放大系统联合检测 miRNA 示意图^[34]
Figure 8 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on dual signal amplifier system^[34]

2.3 电化学传感器新思路

目前,电化学传感技术所构造的体系一般是用捕获探针将靶 miRNA 捕获后,在后期通过利用纳米材料、酶、电活性物质等进行一系列的信号放大,从而提高其灵敏度,实现 miRNA 的检测。在此过程中一般不涉及 miRNA 的数量扩增。目前又有一些新的检测 miRNA 方案被逐渐提出。在 2012

年, Yin^[36]等利用双链特异性核酸酶进行一步反应成功检测了 miRNA(图 9)。当靶 miRNA 与 DNA 探针结合后,此种核酸酶能特异性水解 DNA-miRNA 杂交链中的 DNA 链,而 miRNA 保持完整,进而可以与另一条 DNA 探针结合,此过程不断进行进行,从而增强荧光强度,其检测限达到 100 fM。而 Jia 等^[37]则通过设计一段两端相同,中间含有切割酶酶切位点的探针作为扩增模板,利用 miRNA 3'端可以作为 DNA 引物的特点,在聚合酶的作用下形成双链产物。生成的双链产物在切割酶酶切位点处切割,产生新的羟基端继续引发聚合反应。被切割下来的序列与探针 3'端完全互补,又可以引发新的聚合反应,实现对 miRNA 的超敏检测,其检测限甚至达到 1zM。基于此,未来 miRNA 电化学生物传感器或许可以引入等温扩增的概念,与其他技术结合,从数量扩增以及信号放大两方面增加传感器的灵敏度,实现床旁检测(point of care testing, POCT)。

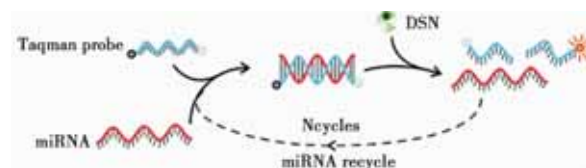


图9 基于 DSN 酶等温扩增直接检测 miRNA 示意图^[36]
Figure 9 Scheme of strategy for a miRNA biosensor based on Duplex-Specific nuclease signal amplification (DSNSA)^[36]

3 展望

血液循环中存在与疾病相关的 miRNA,并且可以耐受 RNA 酶的破坏而稳定地存在。目前对循环 miRNA 的研究还处于初步阶段,许多重要的问题急待解决,如研究的病种范围还非常有限、检测的样本数较小(通常仅有几十例)、检测方法繁琐且价格昂贵等,这些问题都将限制其进入临床应用。相信随着对 miRNA 研究的深入及检测方法的标准化,循环 miRNA 的检测最终将能应用于临床,为疾病无创诊断、治疗和预后提供新依据。如何进一步提高方法的灵敏度、减少操作的烦琐程度、缩短实验反应时间以及降低实验的成本,是各种检测方法的最终追求目标。电化学生物传感器

因其制作简单、灵敏度高、重现性好、成本低、易于实现微型化等诸多优点得到研究者的广泛青睐。未来电化学 miRNA 生物传感器的研究热点将集中在:(1)传感器设计的优化:寻求更好的纳米材料进行电极的修饰,更稳定的探针固定方法及更优良的杂交指示剂;(2)增加灵敏度:从数量扩增以及信号放大两方面增加灵敏度;(3)多靶标同时检测:一个仪器同时测量多种靶 miRNA,同时避免相互干扰;(4)微型化:实现 POCT,使此类产品渗透到人类的生活中去。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993,75(5):843–854.
- [2] de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2011,699(2):134–152.
- [3] Lo TF, Tsai WC, Chen ST. MicroRNA-21-3p, a berberine-induced miRNA, directly down-regulates human methionine adenosyltransferases 2A and 2B and inhibits hepatoma cell growth[J]. *Plos One*, 2013,8(9):e75628.
- [4] Yang X, Guo Y, Du Y, et al. Serum microRNA-21 as a diagnostic marker for lung carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Plos One*, 2014,9(5):e97460.
- [5] Shrestha S, Hsu SD, Huang WY, et al. A systematic review of microRNA expression profiling studies in human gastric cancer[J]. *Cancer Med*, 2014,3(4):878–888.
- [6] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008,141(5):672–675.
- [7] Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramirez JA, Malagon-Santiago I, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers [J]. *Dis Markers*, 2013,34(3):163–169.
- [8] Zhi F, Cao X, Xie X, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia[J]. *Plos One*, 2013, 8(2):e56718.
- [9] Rayner K, Dimmeler S, Calin GA, et al. Novel biomarkers for acute myocardial infarction: is microRNA the new kid on the block?[J]. *Clin Chem*, 2014,60(6):812–817.
- [10] Huang C, Zheng JM, Cheng Q, et al. Serum microRNA-29 levels correlate with disease progression in patients with chronic hepatitis B virusinfection[J]. *J Dig Dis*, 2014,15(11):614–621.
- [11] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010,127(1):118–126.
- [12] Li L, Zhu D, Huang L, et al. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles[J]. *Plos One*, 2012,7(10):e46957.
- [13] Chen X, Liang H, Zhang J, et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication [J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(3):125–132.
- [14] Cissell KA, Deo SK. Trends in microRNA detection[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009,394(4):1109–1116.
- [15] Pall GS, Hamilton AJ. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA [J]. *Nat Protoc*, 2008,3(6):1077–1084.
- [16] Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009,394(4):1117–1124.
- [17] Wang Y, Chen M, Zhang L, et al. Rapid detection of human papilloma virus using a novel leaky surface acoustic wave peptide nucleic acid biosensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009,24(12):3455–3460.
- [18] Wang J, Yi X, Tang H, et al. Direct quantification of microRNA at low picomolar level in sera of glioma patients using a competitive hybridization followed by amplified voltammetric detection[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(15):6400–6406.
- [19] Xia N, Zhang L, Wang G, et al. Label-free and sensitive strategy for microRNAs detection based on the formation of boronate ester bonds and the dual-amplification of gold nanoparticles[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013,47(15):461–466.
- [20] Pei H, Lu N, Wen Y, et al. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing[J]. *Adv Mater*, 2010,22(42):4754–4758.
- [21] Wen Y, Liu G, Pei H, et al. DNA nanostructure-based ultrasensitive electrochemical microRNA biosensor[J]. *Methods*, 2013,64(3):276–282.
- [22] Lin L, Liu Q, Wang L, et al. Enzyme-amplified electrochemical biosensor for detection of PML-RARalpha fusion gene based on hairpin LNA probe[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011,28(1):277–283.
- [23] Lin L, Chen J, Lin Q, et al. Electrochemical biosensor based on nanogold-modified poly-eriochrome black T

- film for BCR/ABL fusion gene assay by using hairpin LNA probe[J]. *Talanta*, 2010,80(5):2113–2119.
- [24] Yildiz UH, Alagappan P, Liedberg B. Naked eye detection of lung cancer associated miRNA by paper based biosensing platform[J]. *Anal Chem*, 2013,85(2): 820–824.
- [25] Ryoo SR, Lee J, Yeo J, et al. Quantitative and multiplexed microRNA sensing in living cells based on peptide nucleic acid and nano graphene oxide (PANGO) [J]. *ACS Nano*, 2013,7(7):5882–5891.
- [26] Gao Z, Deng H, Shen W, et al. A label-free biosensor for electrochemical detection of femtomolar microRNAs [J]. *Anal Chem*, 2013,85(3):1624–1630.
- [27] Lu N, Gao A, Dai P, et al. CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistors for ultrasensitive and label-free microRNAs sensing [J]. *Small*, 2014,10(10): 2022–2028.
- [28] Dong H, Jin S, Ju H, et al. Trace and label-free microRNA detection using oligonucleotide encapsulated silver nanoclusters as probes [J]. *Anal Chem*, 2012,84(20):8670–8674.
- [29] Bettazzi F, Hamid -Asl E, Esposito CL, et al. Electrochemical detection of miRNA -222 by use of a magnetic bead-based bioassay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013,405(2–3):1025–1034.
- [30] Zhou Y, Wang M, Xu Z, et al. Investigation of the effect of phytohormone on the expression of microRNA-159a in *Arabidopsis thaliana* seedlings based on mimic enzyme catalysis systematic electrochemical biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014,54(15):244–250.
- [31] Ge Z, Lin M, Wang P, et al. Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor [J]. *Anal Chem*, 2014,86(4):2124–2130.
- [32] Gao Z, Yu YH. Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assays [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007,22(6):933–940.
- [33] Hong CY, Chen X, Liu T, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of cancer-associated circulating microRNA in serum samples based on DNA concatamers [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013,50(15):132–136.
- [34] Yin H, Zhou Y, Zhang H, et al. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012,33(1):247–253.
- [35] Liu L, Xia N, Liu H, et al. Highly sensitive and label-free electrochemical detection of microRNAs based on triple signal amplification of multifunctional gold nanoparticles, enzymes and redox-cycling reaction [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014,53(15):399–405.
- [36] Yin BC, Liu YQ, Ye BC. One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification [J]. *J Am Chem Soc*, 2012,134(11):5064–5067.
- [37] Jia H, Li Z, Liu C, et al. Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010,49(32):5498–5501.

血管紧张素(1-7): 潜在的肿瘤治疗新靶点

陈秀生¹ 林创珍² 雷川¹ 翟向明¹ 胡奥¹ 聂鑫¹ 陈思¹ 杜红延^{1*}

[摘要] 血管紧张素(1-7) [angiotensin-(1-7), Ang-(1-7)]是一种内生性的肽类激素,已经广泛应用于心血管疾病的治疗。然而,近期许多研究表明其在肿瘤相关疾病的治疗方面也有着广泛的应用前景。Ang-(1-7)能够抑制肿瘤细胞中 ERK 信号转导通路和 DNA 的合成,并且可以通过下调 VEGF 的表达抑制肿瘤组织的血管新生,从而有效地抑制肿瘤细胞的生长。这一作用在肿瘤的治疗方面具有潜在的临床应用价值。近年来国内外研究者在细胞及动物水平上对 Ang-(1-7) 的作用途径及作用效果方面进行深入研究,了解到 Ang-(1-7)可以通过多种途径来抑制肿瘤的发生发展。本文对目前有关 Ang-(1-7)与多种肿瘤的关系的研究进展进行总结,为 Ang-(1-7)在肿瘤治疗方面的进一步应用研究提供依据和借鉴。

[关键词] Ang-(1-7); 肿瘤; 抑制; 治疗靶点

Ang-(1-7): a potential therapy target for tumors

CHEN Xiusheng¹, LIN Chuangzhen², LEI Chuan¹, QU Xiangming¹, HU Ao¹, NIE Xin¹, CHEN Si¹, DU Hongyan^{1*}

(1. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515;
2. The First Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] As an endogenous peptide hormone, angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] has been widely applied in therapy for cardiovascular disease. Recently many studies show that Ang-(1-7) has huge potentials in tumor-associated disease. As Ang-(1-7) can suppress the tumor development by affecting the extracellular regulated protein kinases (ERK) signal transduction pathway and the DNA synthesis in cancer cells and down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), it has potential value to clinical treatment of tumor. Recently more and more research results in cells and mammals about the therapeutic efficacy and functional mechanisms of Ang-(1-7) on different tumors are collected from different research groups. And a lot of facts suggest that Ang-(1-7) can greatly inhibit the development of tumor cells through several different pathways. Therefore, the progression of present researches on the relationship between the Ang-(1-7) and tumorigenesis are summarized in this paper, which could be base for further researches on Ang-(1-7) applied in clinic tumor therapy.

[KEY WORDS] Ang-(1-7); Tumor; Inhibition; Therapy target

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA020205); 2013 国家教育部博士点基金(20134433120020); 国家自然科学基金(81401920); 南方医科大学基础研究前期启动项目(QD2013N005); 2013 年国家级“大学生创新创业训练计划”项目(1212113058); 2014 年广东省“大学生创新创业训练计划”项目(201412121094); 广东省“大学生创新训练计划”(201412121094)

作者单位: 1. 南方医科大学生物技术学院, 广东, 广州 510515

2. 南方医科大学第一临床医学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 杜红延, E-mail: gzduhongyan@126.com

注: 陈秀生, 林创珍为并列第一作者

肾素-血管紧张素系统对血压、机体稳态平衡和细胞增殖起着调节作用,其核心化合物是血管紧张素原^[1]。血管紧张素原主要由肝脏合成,分泌到循环系统中,被血管紧张素肽原酶降解为十肽的血管紧张素 I (angiotensin- I, Ang I),由肺上皮细胞产生的血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)把血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II。部分血管紧张素 II 受血浆和组织液中血管紧张素酶 A 的作用,被水解为 7 肽的血管紧张素 III。血管紧张素-(1-7) [angiotensin-(1-7), Ang-(1-7)] 是肾素-血管紧张素系统中的一种内源性七肽,主要由血管紧张素 I 在组织肽酶如脯氨酰基肽链内切酶、脑啡肽酶(neprilysin)、THOP 蛋白(thimet oligopeptidase)的作用下产生。Ang-(1-7) 还可以由血管紧张素 II 通过血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)生成,具有扩张血管、降低血压和抗细胞增殖等作用,并可拮抗 Ang II 与其 AT1 受体结合产生的收缩血管、升高血压、尿钠潴留和细胞增殖等作用^[2]。阻断血管紧张素转化酶 I 的活性会抑制有血管收缩活性的有丝分裂原 Ang II 的生成,并会抑制有舒张血管活性的缓激肽和 Ang-(1-7)的降解,增加 Ang-(1-7)的含量,导致血管舒张,进而促使血压的下降^[3]。Ang-(1-7)在心血管疾病方面的作用从被发现至今,科研工作者已给予相当多的关注和研究。已有克服其不利的药物代谢动力学特点的口服非肽类类似物 AVE0991 问世,进入各项毒理学及药理学研究^[4-5]。近年来,在多种肿瘤的研究中也发现了 Ang-(1-7)的身影。Ang-(1-7)可以通过抑制与肿瘤细胞生长相关的信号途径以及 DNA 的合成和局部血管的新生等在肺癌、前列腺癌、乳腺癌以及血管肉瘤中发挥肿瘤的抑制作用,有望成为肿瘤治疗的潜在靶点。本文就近年来 Ang-(1-7)与肿瘤的关系的研究进展加以综述,期待为 Ang-(1-7)在肿瘤发生发展中的作用研究提供参考。

1 Ang-(1-7)与肺癌

在近期肺癌治疗的研究中发现 Ang-(1-7)能通过抑制与细胞生长相关的细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号途径和细胞 DNA 合成以及前列腺素的生成来抑

制肺癌细胞的生长增殖,同时还可通过抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的生成来抑制血管新生从而控制肿瘤的发生发展。肺癌是造成癌症相关死亡的最主要原因,全球每年有 130 万人死于肺癌。有研究表明用 10 nM Ang-(1-7) 预处理肺癌 SK-LU-1 细胞能抑制细胞外信号调节激酶 ERK1/2 活性,从而抑制肺癌细胞的生长^[6]。Gallagher 等人^[7]也发现 SK-LU-1 细胞内 ERK1/2 活性受 Ang-(1-7) 抑制而显著下降,抑制机制可能是由于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)活性被抑制^[8]。由此推测 Ang-(1-7)可能通过抑制 MAP 激酶的磷酸化激活来降低对丝裂原的反应性从而抑制肺癌细胞的生长,即 Ang-(1-7)通过 ERK 信号转导通路发挥抑制肺癌细胞生长。他们还同时发现 Ang-(1-7)降低癌细胞对胸腺嘧啶的摄入,并呈现剂量依赖性,IC₅₀ 处于次纳米范围,表明 Ang-(1-7)能抑制癌细胞 DNA 合成,抑制强度与剂量和时间呈正相关。还有报道称 Ang-(1-7)可通过抑制前列腺素(prostaglandin, PG)生成来抑制肺癌细胞的增殖。环氧合酶 2(cyclooxygenase 2, COX2)是花生四烯酸转化为前列腺素和凝血恶烷的关键酶,对细胞生长起重要的调节作用,酶活性受到生理条件如炎症、癌症生长等调节。丝裂原诱导的环氧合酶 2 在肺癌细胞中的活性相比与正常细胞显著升高,COX2 活性的升高会导致前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、前列腺素 D2(prostaglandin D2, PGD2)和血栓素 A2(thromboxane A2, TXA2)活性的升高,促进新血管的形成和肿瘤的生长^[9]。相反,环前列腺素是强力的血管舒张剂,抑制细胞生长。通过 COX-2 抑制剂拮抗 COX-2 活性,抑制了体外癌细胞的增殖,减弱了体内肿瘤细胞迁移的能力,表明 COX-2 在肺癌病理发生中起重要作用^[10]。Menon 等人^[11]将 Ang-(1-7)注射入肺癌移植瘤模型小鼠体内发现,与注射生理盐水的对照组相比,实验组小鼠体内 COX-2 蛋白表达量下降约 59%,表明 Ang-(1-7)能选择性降低 COX-2 活性,从而抑制促炎的前列腺素生成,进一步抑制肺癌细胞增殖。

VEGF 是主要的促血管生长因子,由肿瘤细胞合成释放,在已有血管基础上促进新血管的形成^[12]。肿瘤的生长和存活依赖于生成的血管为它

提供氧气和营养物质,肿瘤血管的生成对肿瘤的发生、发展、侵袭和转移有重要生物学意义,因此血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, VEGFA)可能在肺癌细胞生理活动中发挥重要作用^[13]。近年来发现 Ang-(1-7)还能通过抑制 VEGF 的生成来抑制肿瘤血管新生从而抑制肺癌的发生发展。Soto-Pantoja 等人^[14]鸡胚尿囊膜实验的研究表明 Ang-(1-7)可降低体外培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)血管增殖,抑制体内血管受损后新血管的形成,从而致使肿瘤缺血死亡。还有学者研究通过 Western Blot检测 A549 肺癌组织中 VEGFA 的含量,发现 Ang-(1-7)注射的小鼠体内的肿瘤组织中 VEGF 蛋白质含量相比生理盐水对照组显著下降,而且从肺癌异种移植植物中提取的总 RNA 也较对照组有所降低。通过荧光定量 PCR 测定发现 Ang-(1-7)注射后 VEGFA mRNA 含量也大幅下降,表明 Ang-(1-7)可能通过转录水平的调控或者降低 VEGFA mRNA 稳定性从而导致肺癌组织中 VEGFA 含量降低。Ang-(1-7)的这种活性能被 [D-pro7]-Ang-(1-7)阻断,同样发现 Ang-(1-7)也能降低胎盘生长因子 (placental growth factor, PIGF)的含量^[15]。如果用氨基胍或硝基精氨酸预处理癌细胞,Ang-(1-7)抑制血管生成的活性将被阻断,表明 Ang-(1-7)的这种活性由 NO 介导。Ang-(1-7)刺激动脉上皮细胞释放 NO,导致血管舒张^[16]。由此,可以推测 Ang-(1-7)抑制血管形成的活性可能是 Ang-(1-7)抑制肺癌生长的机制之一。

2 Ang-(1-7)与前列腺癌

Ang-(1-7)可通过抑制破骨细胞的生成来抑制前列腺癌的骨转移,还可通过降低 VEGF 的生成及功能来抑制血管新生起到抑制前列腺癌细胞的作用。前列腺癌在发达国家是男性最常见的恶性肿瘤之一,在美国前列腺癌发病率占第一位,死亡率仅次于肺癌^[17]。通过调节促性腺激素释放激素的雄性激素剥夺疗法是如今治疗前列腺癌最主要的方法,但效果不佳^[18]。前列腺癌能够转移到淋巴结、肺脏、肝脏等器官,但骨是其最主要的转移部位,将近 80%~90%的前列腺癌患者会并发骨转移,从而引发患者骨痛、骨折、骨质疏松、高钙血症等^[19]。近期有研究表明,Ang-(1-7)能够减弱前列

腺癌的转移并抑制破骨细胞的生成。Krishnan 等人^[20]通过体外培养 PC3 细胞和 DU145 细胞,用转移实验证实相比于对照组,发现用 Ang-(1-7)处理的癌细胞转移迁移能力显著下降。同时还将 PC3^{LUC} 注射入胫骨去检测 Ang-(1-7)能否在骨微环境抑制前列腺癌细胞的生长。癌细胞注射两周后连续 5 周注射 Ang-(1-7)或生理盐水,结果发现注射 Ang-(1-7)的实验组小鼠没有检测到肿瘤生长,免疫组化也未发现 PC3^{LUC},表明 Ang-(1-7)能抑制骨中转移的前列腺癌细胞的生长。胫骨组织通过 TRAP 染色发现生理盐水处理的对照组中破骨细胞边缘不规则、多核,呈现出癌细胞的特征。而 Ang-(1-7)处理后的破骨细胞正常,表明 Ang-(1-7)能抑制正常破骨细胞恶性分化,减弱骨髓细胞生成破骨细胞,抑制肿瘤的发生。有研究表明,与在肺癌类似,用 Ang-(1-7)处理移植有前列腺癌细胞的小鼠,其血液中 VEGF 显著降低,表明 Ang-(1-7)能通过减少血管形成因子来减弱血管舒张。与此同时,Ang-(1-7)还能增加血液中 VEGF 受体 1 可溶性片段(sFlt-1)的浓度,降低 VEGF 受体 1 和受体 2。sFlt-1 能与 VEGF 和 PIGF 结合,但不具有生物功能,因此 sFlt-1 可以使配体无法与膜结合的 VEGF 受体结合,从而阻断促血管形成的信号通路转导^[21]。

3 Ang-(1-7)与乳腺癌

Ang-(1-7)可通过抑制 ERK 磷酸化酶的作用来抑制 ERK 途径从而抑制乳腺癌细胞的生长增殖。乳腺癌是发生在乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤。在之前的研究中发现,在肿瘤的发生发展中,癌细胞和其周围细胞扮演着重要的角色。癌细胞和临近细胞之间的相互作用会改变细胞表型,影响细胞的正常功能,从而改变细胞生存的微环境。这些相互作用直接影响癌细胞的生成,在实体瘤尤其是乳腺癌的发生中,细胞之间的粘连最终导致纤维化。乳腺癌中的 80%活化基质是活化的肌成纤维细胞,其与细胞的粘连同乳腺癌的细胞纤维化有关。肿瘤相关纤维化(carcinoma-associated-fibroblasts, CAF)在肿瘤的发生和发展中扮演着重要的角色^[22]。Ang-(1-7)能够抑制由丝裂原引起的 VSMC 的生长,并且能够有效的抑制血管内膜的生成,从而有效的抑制细胞增殖及纤

维化^[23]。Cook 等人^[24]用裸鼠感染人类的 ZR-75-1 和 BT-474 原位乳腺癌细胞,发现 Ang-(1-7)能够有效地抑制癌组织的生长,用其处理后的癌组织体积明显小于对照组。Ang-(1-7)的这一作用可能归因于其在体外实验中能够有效的降低磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylation extracellular regulated protein kinases, pERK1/2)的含量,而 pERK1/2 是强效的促有丝分裂蛋白,促进细胞分裂增殖。用 Ang(1-7)处理后 ZR-75-1 和 BT-474 的间质纤维化体积有大量减少,这一功用可能是由于 Ang(1-7)能够上调 MAPK 的磷酸化酶双特异性磷酸酶 1 (dual-specificity phosphatase, DUSP1)从而使得 MAPK 的生物活性丧失,抑制了依赖于 MAPK 途径的间质细胞纤维化。前述的 pERK1/2 也因此有所下调,这与肺癌的研究结果有着相似之处^[25]。在裸鼠的体内试验中作者还发现 Ang(1-7)能够有效地降低成纤维细胞中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 和纤连蛋白的量,二者在癌组织间质纤维化的进程中都发挥重要的作用。因此 Ang(1-7)能够有效的降低肿瘤细胞的增殖和纤维化^[24]。

4 Ang-(1-7)与血管瘤

Ang-(1-7) 可通过下调低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 的表达来抑制 VEGF 和 PIGF 的表达从而抑制血管瘤的生长。血管瘤也称恶性血管内皮瘤,是由血管内皮细胞或向血管内皮细胞方向分化的间叶细胞发生的恶性肿瘤,较为少见。肿瘤细胞在一定程度上具有正常内皮细胞的形态和功能特点。在近期的研究中发现 Ang-(1-7)能够明显减慢血管瘤的生长,而这种作用原因在于其下调了 HIF-1 的表达^[26]。HIF-1 普遍存在于人和哺乳动物细胞内,在正常氧浓度下也有表达,但合成的 HIF-1 蛋白很快即被细胞内氧依赖性泛素蛋白酶降解途径所降解,只有在缺氧条件下 HIF-1 才可稳定表达。在正常氧饱和度下的细胞中基本检测不到亚基的表达,而在缺氧状态下,仅亚基的降解被抑制, 1α 和 β 亚基形成有活性的 HIF-1,转移到细胞核内调节多种基因的转录,从而调节相关基因的表达。这些基因表达后参与:如红细胞生成,血管形成,核苷、氨基酸、糖的能量代谢,细胞存活、凋亡和活动以及药

物抵抗等生物学效应,以维持组织、细胞在缺氧条件下内环境稳定,以适应缺氧。同时 HIF-1 及其诱导表达的基因还在生理性缺氧如干细胞微环境、胎盘发育、胚胎发育过程中组织细胞分化,以及多种病理情况如肿瘤的发展、转移中发挥着重要作用^[27]。

肿瘤的发生汲取大量的营养,使得周围健康组织相对处于生理性缺氧状态,导致 HIF-1 稳定表达。HIF-1 在体内通过上调 VEGF 和 PIGF 的表达达到促进血管发生发育的作用^[28-29]。在最近的研究中,研究者在临床和临床前期实验用生物探针和荧光定量 PCR 的方法检测基因表达量,发现 Ang-(1-7) 在肿瘤的组织中能够有效地发挥下调 HIF-1 的表达,从而相对降低组织细胞中促进血管生成因子的影响。并且在研究中还发现虽然在结构上血管紧张素 II 和 Ang-(1-7)相似。但是由于其偶联的 G 蛋白受体不同,所以在血管生成方面的作用相反。血管紧张素 II 能够上调 HIF-1 的表达促进血管的生成和发育,而 Ang-(1-7)在组织中能够抑制 HIF-1 的表达,逆转其促进血管生成的作用^[30]。在血管肉瘤的生长过程中,Ang-(1-7)抑制血管生成从而抑制血管肉瘤的发生发展和转移。

5 总结与展望

近年来对 Ang-(1-7)与肿瘤发生、发展及治疗的研究发现,在肺癌中 Ang-(1-7)主要是通过激活 MAPK 磷酸化酶,抑制 MAPK 激酶活性有效地抑制细胞增殖来抑制肿瘤细胞的生长。通过减少纤维化相关因子的表达量有效地降低肿瘤组织的纤维化。而组织的纤维化与肿瘤的发生发展有着直接的关系。由此我们推测 Ang-(1-7)对于肿瘤的发生发展起着重要作用,有可能成为潜在的肿瘤治疗靶点,有着广阔的治疗应用前景。Ang-(1-7)通过抑制 ERK 信号通路和血管的生成抑制肺癌细胞的生长,并通过抑制前列腺素的激活来抑制肺癌细胞的增殖。在前列腺癌中 Ang-(1-7)可通过抑制破骨细胞的生成来抑制前列腺癌的骨转移。在血管再生方面,Ang-(1-7)通过下调 VEGF、PIGF 等促血管生成因子的表达。在肺癌、乳腺癌、前列腺癌以及血管瘤的发生发展中起着关键的抑制血管新生的作用,从而有效地抑制肿瘤的生长和转移。但是这些研究都是阐述一般的生理现象,该过

程中详细的作用机制还尚未明确。在肿瘤组织中血管紧张素能下调某些基因的表达,但是这些基因表达的变化与肿瘤治疗之间的联系尚未完全清楚。我们未来的工作是需要阐明 Ang-(1-7)在这些现象发生中的具体机制,以便开发出有效治疗肿瘤的相关药物。

参考文献

- [1] Gallagher PE, Cook K, Soto-Pantoja D, et al. Angiotensin peptides and lung cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011,11(4):394-404.
- [2] 李文敏,徐暘,陈秀生,等. 血管紧张素(1-7)抑制血管生成的机制[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013,5(04):279-283.
- [3] Flores-Munoz M, Godinho BM, Almalik A, et al. Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor [J]. *Plos One*, 2012,7(9):e45564.
- [4] Santos RAS, Ferreira AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist[J]. *Cardiovascular drug reviews*, 2006, 24(3-4): 239-246.
- [5] Ferreira AJ, Oliveira TL, Castro MCM, et al. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991[J]. *Life sciences*, 2007,81(11): 916-923.
- [6] Dowell JE. Small cell lung cancer: are we making progress[J]. *Am J Med Sci*, 2010,339(1):68-76.
- [7] Gallagher P E, Tallant E A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7)[J]. *Carcinogenesis*, 2004,25(11):2045-2052.
- [8] Qi Y, Li H, Shenoy V, et al. Moderate cardiac-selective overexpression of angiotensin II type 2 receptor protects cardiac functions from ischaemic injury[J]. *Exp Physiol*, 2012,97(1):89-101.
- [9] Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2003,9(5):1604-1610.
- [10] Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas[J]. *Cancer Res*, 1998,58(17):3761-3764.
- [11] Menon J, Soto-Pantoja DR, Callahan MF, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2 [J]. *Cancer Res*, 2007,67 (6):2809-2815.
- [12] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2007,2:251-275.
- [13] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2002,20(21):4368-4380.
- [14] Soto-Pantoja DR, Menon J, Gallagher PE, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009,8 (6):1676-1683.
- [15] Lassoued W, Murphy D, Tsai J, et al. Effect of VEGF and VEGF trap on vascular endothelial cell signaling in tumors[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010,10(12):1326-1333.
- [16] Ferrario CM. Contribution of angiotensin-(1-7) to cardiovascular physiology and pathology[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2003,5(2):129-134.
- [17] American cancer society webpage. Detailed guide: prostate cancer[EB/OL]. http://www.cancer.org/docroot/CRI/CRI_2_3x.asp?nav=crigd&dt=36.
- [18] Cetnar JP, Beer TM. Personalizing prostate cancer therapy: the way forward[J]. *Drug Discov Today*, 2014. doi:10.1016/j.drudis.2014.07.006,[Epub ahead of print].
- [19] George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010,10(11):745-759.
- [20] Krishnan B, Smith TL, Dubey P, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates metastatic prostate cancer and reduces osteoclastogenesis[J]. *Prostate*, 2013,73(11):71-82.
- [21] Krishnan B, Torti FM, Gallagher PE, et al. Angiotensin-(1-7) reduces proliferation and angiogenesis of human prostate cancer xenografts with a decrease in angiogenic factors and an increase in sFlt-1[J]. *Prostate*, 2013,73(1): 60-70.
- [22] Cardone A, Tolino A, Zarcone R, et al. Prognostic value of desmoplastic reaction and lymphocytic infiltration in the management of breast cancer [J]. *Panminerva Med*, 1997,39(3):174-177.
- [23] Zhang F, Hu Y, Xu Q, et al. Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Plos One*, 2010,5(8):e12323. (下转第 131 页)

白细胞介素-21 与系统性红斑狼疮之关系研究进展

蓝艳* 郭静

[摘要] 白细胞介素-21(interleukin-21, IL-21)是近年来新发现的一种具有促进炎症反应和免疫调节的细胞因子,属于I型细胞因子家族成员,主要是由活化的CD4⁺T细胞合成和分泌。具有多种生物学功能。本文就IL-21与系统性红斑狼疮的相关性作一综述。

[关键词] 白细胞介素-21; 基因多态性; 系统性红斑狼疮

Association of the interleukin-21 with systemic lupus erythematosus

LAN Yan*, GUO Jing

(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000)

[ABSTRACT] Interleukin-21 (IL-21) is a recently discovered cytokine with promote inflammation and immunomodulatory activity. It is a new member of the I-type cytokine family and mainly secreted by the activated CD4⁺ T cells. It has a variety of biological functions. In this study, we give the reader an overview of the relationships between IL-21 and systemic lupus erythematosus.

[KEY WORDS] Interleukin-21; Gene polymorphism; Systemic lupus erythematosus

白细胞介素-21(interleukin-21, IL-21)是一种可介导多向性炎症反应和免疫调节的重要致炎细胞因子,属于I型细胞因子家族成员,主要是由活化的CD4⁺T细胞合成和分泌^[1,2],具广泛的生物学活性。能促进T细胞增殖及分化,诱导细胞毒性T细胞产生;调节B细胞增生,诱导免疫球蛋白的产生,促进抗体同类型转化,参与趋动B细胞分化成浆细胞,协助CD8⁺T细胞的增殖与活化,参与促进Th17细胞的分化;促进NK细胞增生并分泌干扰素- γ 、IFN- α ,增强NK细胞杀伤活性,尤其与NK细胞的功能调节密切相关^[3-4]。近来,研究发现IL-21基因均存在着多态性,这些多态性可能影响基因的转录和表达,并且在乳腺癌、自身免疫性疾病、慢性乙型肝炎病毒感染等发病机制中发挥重要作用^[5-7]。越来越多的研究发现,IL-21与系统性

红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的发生、发展及预后有一定关系。本文就近年来这方面的研究进展作一综述。

1 IL-21的分子生物学特性

人IL-21基因位于4号染色体长臂上(4q26-q27),包括5个外显子和4个内含子。转录一条由642个核苷酸组成的成熟mRNA,编码162个氨基酸组成的蛋白前体,其中前31个氨基酸为信号肽,后面的131个氨基酸组成具有四螺旋结构域,相对分子质量为15k的成熟IL-21^[8]。成熟的IL-21含有四螺旋族细胞因子结构域,该结构域与IL-2、IL-4、IL-15的四螺旋族细胞因子结构域有较高的同源性。IL-21与IL-15在相同的位置有两对相同的半胱氨酸,其中一对在IL-2、IL-4、GM-CSF中具

基金项目:国家自然科学基金(81260234)

作者单位:右江民族医学院附属医院皮肤科,广西,百色 533000

*通讯作者:蓝艳,E-mail:yylanyan@163.com

有保守性,另一对则为 IL-21 与 IL-15 所特有,表明 IL-21 与 IL-15 是结构上最相近的细胞因子^[9]。与 IL-2、IL-15 在同一染色体上,距 IL-2 基因大约 180 kb,距 IL-15 则较远。IL-21 的 5'调控区域含有 3 个 T 细胞激活核因子 (NFAT) 结合位点,IL-21 启动子的活性通过钙离子载体作用于细胞而产生^[10]。人 IL-21 受体(IL-21R)基因位于 16 号染色体短臂上(16p11),是一个由独有的亚单位和 γ 链组成的异二聚体,在淋巴细胞和造血细胞表面广泛表达,与 IL-2 家族的其他成员(IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13 和 IL-15) 共用 γ 链,IL-21R 亚单位为配体识别结合部位, γ 链为信号转导单位^[11]。IL-21 与其受体结合后,活化 JAK 家族成员(JAK1 和 JAK3),随后磷酸化 STAT1、STAT3、STAT4 和 STAT5,最后进入细胞核内调节相应基因的表达^[12, 13]。

2 IL-21 的免疫调节

IL-21 与其受体结合后可调节 T 细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞和 B 细胞的增殖、分化的功能,有效增强机体的天然免疫及获得性免疫^[14]。IL-21 及其受体能选择性地淋巴组织,尤其是 B 淋巴细胞、NK 细胞、T 淋巴细胞、树突状细胞、内皮细胞、巨噬细胞上表达,从而参与对多种免疫细胞的调节^[15]。在体液免疫应答中 IL-21 可诱导抗原特异 B 细胞的抗体类型转换,一方面,在免疫应答早期,IL-21 能参与 B 细胞的活化,另一方面又诱导活化的 B 细胞凋亡,阻止过度的免疫反应发生,维持自稳平衡。NK 细胞是机体天然免疫的重要效应细胞,IL-21 对 NK 细胞具有多方面的功能,且随着种系、细胞活化状态等不同而发挥不同的作用,但其主要功能是诱导骨髓祖细胞来源的 NK 细胞的增殖和分化,增加 NK 的细胞毒功能,促进其分泌颗粒酶和穿孔素^[16]。IL-21 能明显增强抗 CD3 mAb 诱导的 T 细胞增殖,并增加 CD8⁺ T 细胞的活化、增殖和效应功能,但在不同 T 细胞亚群或不同状态下,IL-21 的反应不一致,它可和 IL-4、IL-6 等一起诱导 Th 细胞向 Th2 应答分化,抑制 Th1 应答,调节 Th1/Th2 的比例,保持机体的免疫自稳平衡的调节^[17]。IL-21 对树突状细胞(dendritic cell, DC)也具有免疫调节作用。DC 是一类专职性抗原呈递细胞,机体启动免疫反应不仅要有抗原和淋巴细胞,还必

须要有抗原递呈功能的辅佐细胞存在,其中功能最强的是 DC。IL-21 能抑制 DC 的功能成熟和抗原递呈,对 DC 的功能发挥起重要调控作用^[18]。

3 IL-21 的表达与 SLE

目前关于 IL-21 与 SLE 相关的研究甚少。最近有学者对 23 例 SLE 患者和 20 例对照组血清 IL-21 水平表达作相关性分析,结果发现血清 IL-21 表达在 SLE 中表达显著高于对照组,高低与 SLE 的严重程度及活动度存在相关关系。研究结果表明,血清 IL-21 表达水平用于评估 SLE 的活动度具有重要的临床价值^[19]。2014 年 Lee^[20]等在 22 例 SLE 外周血单个核细胞、CD4⁺ T 细胞及血清中 IL-21 表达的实验中研究发现,IL-21 表达水平在 SLE 中的表达强度显著高于对照组,提出 IL-21 的表达可能与 SLE 发生发展密切,可以用于 SLE 诊断、治疗和判断患者预后的指标。最近希腊学者 Nakou^[21]等采用实时荧光定量 PCR 和流式细胞术检测了 SLE 外周血单个核细胞中的 IL-21 的表达,结果发现 IL-21 的 mRNA 的表达及 IL-21 流式荧光强度显著高于对照组,提示 IL-21 在炎症和免疫反应中的可能具有多种功能,其在 SLE 的发生中可能起着重要的作用。最近的研究显示,狼疮易感性 BXSB-Yaa 小鼠的血清 IL-21 水平明显升高,表明 IL-21 在自身免疫性疾病中有一定作用^[22]。另有研究表明,SLE 患者体内 IL-21 血清水平升高并且与疾病的严重程度具有相关性^[23, 24]。国内学者王晓非^[25]等在研究 SLE 患者血清 BAFF 和 IL-21 的变化及意义时发现,IL-21 在 SLE 患者中明显增高,特别是在较重的 IV 型狼疮肾炎患者中增加最为明显,并且 IL-21 与 SLE 诸多活动指标呈正相关变化。以上研究均提示,IL-21 表达失调对于 SLE 疾病的发展具有重要作用,IL-21 可能参与 SLE 的发病并可能成为其潜在的治疗靶点。但最近也有学者得出相反的结论,Pan^[26]等采用了 ELISA 方法检测了 57 例 SLE 病人和 30 例健康对照者血清中的 IL-21 的水平,结果发现血清 IL-21 水平在 SLE 中的表达显著低于健康对照者;同时进一步分析发现血清 IL-21 的表达水平在活动性和非活动性 SLE 患者中的比较差异无显著性;血清 IL-21 的表达水平在伴有肾炎和不伴有肾炎的 SLE 患者中

的比较差异也无显著性。因此 IL-21 在 SLE 的发生发展中是否起作用、起怎样的作用有待进一步研究。

4 IL-21 的基因多态性与 SLE

SLE 是一种病因未明、累及多系统多脏器、具有多种自身抗体为特征的自身免疫性疾病。然其病因和发病机制尚未完全阐明,但遗传基因在 SLE 发病过程中可能起着重要的作用^[27]。随着人类基因组计划的迅速发展,SLE 相关基因的定位和识别已成为研究的热点。IL-21 是一种具有多种免疫调节活性的细胞因子,在 SLE 体液免疫激活和自身抗体产生过程中可能起了重要作用,并且与多种自身免疫性疾病存在着密切关系。但 IL-21 在 SLE 中异常表达的分子遗传学机制尚不清楚。一些学者已经对 IL-21 基因多态性和 SLE 的相关性作了相应的研究,美国学者 Sawalha 等^[28]对 IL-21 基因 rs907715 C/T 和 rs2221903 T/C 多态性与 SLE 做了相关性研究,结果发现 IL-21 基因 rs907715 C/T 和 rs2221903 T/C 多态性与美国白人的 SLE 具有相关性,而与美国黑人 SLE 无相关性。Ding 等^[29]采用 TaqMan 探针等位基因分型法对 IL-21 两个 SNPs 位点 (rs2221903 和 rs907715) 与 SLE 的相关性作了报道,认为 IL-21 基因 rs907715 C/T 多态性与 SLE 发病无关,而发现 IL-21 基因 rs2221903 T/C 多态性与 SLE 的遗传易感性具有相关性,同时发现这 2 个 SNPs 位点 (rs2221903 和 rs907715) 存在着强烈的连锁不平衡,CC 单倍型 (rs2221903 和 rs907715) 携带者显著增加了 SLE 的发病风险。最近 Yu 等^[30]研究了 IL-21 基因拷贝数变异与 SLE 的关系,结果发现 IL-21 基因拷贝数变异的基因型和等位基因频率在 SLE 组分布显著高于对照组。提示 IL-21 基因拷贝数变异可能与 SLE 的发生可能相关。最近,我们^[31]采用病例-对照的研究方法对 IL-21 基因 rs907715 C/T, rs2221903 T/C 和 rs2055979 C/A 多态性进行分析,结果发现 SLE 患者白细胞介素-21 基因 rs2055979 C/A 多态性分布与正常人比较差异具有显著性 ($P < 0.05$),其中 rs2055979 A 等位基因可能是 SLE 的遗传易感基因。同时我们发现 IL-21 基因 rs2055979 C/A 多态性可影响其血清水平的表达,携带 A 等位基因 (CA 或 AA) 的 SLE 患者血

清 IL-21 水平显著高于不携带者 ($P < 0.05$)。故认为:在病理条件下,携带 A 等位基因的个体可促进 IL-21 的高度表达进而增加 SLE 的发病风险。联合基因型进一步分析发现,IL-21 基因 rs907715 C/T, rs2221903 T/C 和 rs2055979 C/A 单核苷酸多态性存在强烈的连锁不平衡,T-T-A 基因单倍型携带者与对照组比较显著增加了 SLE 的发病风险 (OR = 2.765; 95% CI, 1.255–6.090; $P = 0.009$)。结果提示,IL-21 基因 rs2055979 C/A 多态性和 T-T-A 基因单倍型与 SLE 的发病可能具有相关性。我们的结果与以上作者的研究结果不一致,可能是遗传因素、环境因素以及研究的样本例数大小等因素造成。但 IL-21 基因多态性与 SLE 发病的确切分子机制尚不清楚,还有待进行大样本、多地域、多民族广泛深入的协同研究,将有可能为 SLE 的风险预测、防治和治疗提供一条新的线索和途径。

综上所述,IL-21 是一种具有多种生物学功能的重要免疫调节因子,它可调节 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等的分化和增殖。在自身免疫性疾病、肿瘤疾病及慢性感染性疾病中均起到一定作用,其在 SLE 中的应用正逐步成为热点,IL-21 基因多态及表达与 SLE 的发生、发展等方面均有一定的相关性,推测可能可以作为 SLE 中临床诊断的一个新指标。但 IL-21 参与 SLE 发生发展的确切分子机制还有待进一步阐明,但随着其与 SLE 之间关系研究的不断深入,IL-21 有望成为在自身免疫性疾病等的诊疗领域中的一个新的靶标。

参考文献

- [1] Chevalier N, Thorburn AN, Macia L, et al. Inflammation and lymphopenia trigger autoimmunity by suppression of IL-2-controlled regulatory T cell and increase of IL-21-mediated effector T cell expansion[J]. *J Immunol*, 2014,193(10):4845–4858.
- [2] Carbo A, Olivares-Villagómez D, Hontecillas R, et al. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4⁺ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection[J]. *MBio*, 2014,5(4):e01243–1214.
- [3] Strengell M, Julkunen I, Matikainen S. IFN- α regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2004,76(2):416–422.

- [4] Cha Z, Guo H, Tu X, et al. Alterations of circulating follicular helper T cells and interleukin 21 in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Tumour Biol*, 2014,35(8): 7541–7516.
- [5] You Y, Deng J, Zheng J, et al. IL-21 gene polymorphism is associated with the prognosis of breast cancer in Chinese populations [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013,137(3):893–901.
- [6] Zhang J, Xiao WX, Zhu YF, et al. Polymorphisms of interleukin-21 and interleukin-21- receptor genes confer risk for autoimmune thyroid diseases[J]. *BMC Endocr Disord*, 2013,13 (1):26–31.
- [7] Li N, Zhu Q, Li Z, et al. IL21 and IL21R polymorphisms and their interactive effects on serum IL-21 and IgE levels in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hum Immunol*, 2013,74(5):567–573.
- [8] Muneta Y, Kikuma R, Uenishi H, et al. Molecular cloning, chromosomal location, and biological activity of porcine interleukin-21[J]. *J Vet Med Sci*, 2004,66 (3):269–275.
- [9] Li ZY, Chen J, Petersen E, et al. Synergy of mIL-21 and mIL-15 in enhancing DNA vaccine efficacy against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice [J]. *Vaccine*, 2014,32(25):3058–3065.
- [10] Gong F, Su Q, Pan YH, et al. The emerging role of interleukin-21 in allergic diseases (Review) [J]. *Biomed Rep*, 2013,1(6):837–839.
- [11] Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, et al. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome [J]. *J Exp Med*, 2013,210 (3):433–443.
- [12] Habib T, Senadheera S, Weinberg K, et al. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3 [J]. *Biochemistry*, 2002,41(27):8725–8731.
- [13] Hale MB, Krutzik PO, Samra SS, et al. Stage dependent aberrant regulation of cytokine-STAT signaling in murine systemic lupus erythematosus [J]. *PLoS One*, 2009, 25,4(8):e6756.
- [14] Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M, et al. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity[J]. *Nature*, 2010,466 (7302):113–117.
- [15] Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections[J]. *Microbes Infect*, 2010,12(14–15):1111–1119.
- [16] Karrich JJ, Jachimowski LC, Nagasawa M, et al. IL-21-stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete granzyme B, which impairs their capacity to induce T-cell proliferation[J]. *Blood*, 2013,121(16):3103–3111.
- [17] Blom L, Poulsen LK. In vitro Th1 and Th2 cell polarization is severely influenced by the initial ratio of naïve and memory CD4⁺ T cells [J]. *J Immunol Methods*, 2013,397(1–2): 55–60.
- [18] Brandt K, Bulfone-Paus S, Jenckel A, et al. Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo[J]. *J Invest Dermatol*, 2003,121(6):1379–1382.
- [19] Wang L, Zhao P, Ma L, et al. Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10 + B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheumatol*, 2014,41 (9):1781–1792.
- [20] Lee J, Shin EK, Lee SY, et al. Oestrogen up-regulates interleukin-21 production by CD4⁽⁺⁾ T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Immunology*, 2014,142(4): 573–580.
- [21] Nakou M, Papadimitraki ED, Fanouriakis A, et al. Interleukin-21 is increased in active systemic lupus erythematosus patients and contributes to the generation of plasma B cells[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013,31(2): 172–179.
- [22] Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O, et al. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of? systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009,106(5):1518–1523.
- [23] Wong CK, Wong PT, Tam LS, et al. Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity[J]. *J Clin Immunol*, 2010,30(1):45–52.
- [24] Nakou M, Papadimitraki ED, Fanouriakis A, et al. Interleukin-21 is increased in active systemic lupus erythematosus patients and contributes to the generation of plasma B cells[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013,31(2): 172–179.
- [25] 王晓非,袁双龙,蒋力,等. SLE患者血清BAFF和IL-21的变化及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007,23 (7):1041–1049.
- [26] Pan HF, Wu GC, Fan YG, et al. Decreased serum level of IL-21 in new-onset systemic lupus erythematosus patients[J]. *Rheumatol Int*, 2013,33(9):2337–2342.

- [27] Costa-Reis P, Sullivan KE. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2013,15(9):369.
- [28] Sawalha AH, Kaufman KM, Kelly JA, et al. Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008,67(4): 458–461.
- [29] Ding L, Wang S, Chen GM, et al. A single nucleotide polymorphism of IL-21 gene is associated with systemic lupus erythematosus in a Chinese population [J]. *Inflammation*, 2012,35(6):1781–1785.
- [30] Yu B, Guan M, Peng Y, et al. Copy number variations of interleukin-17F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2011,63(11):3487–3492.
- [31] Lan Y, Luo B, Wang JL, et al. The association of interleukin-21 polymorphisms with interleukin-21 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus [J]. *Gene*, 2014,538(1):94–98.

(上接第 126 页)

- [24] Cook KL, Metheny-Barlow LJ, Tallant EA, et al. Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors[J]. *Cancer Res*, 2010,70(21):8319–8328.
- [25] Gallagher PE, Tallant EA. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7)[J]. *Carcinogenesis*, 2004,25(11):2045–2052.
- [26] Petty WJ, Aklilu M, Varela VA, et al. Reverse translation of phase I biomarker findings links the activity of angiotensin-(1-7) to repression of hypoxia inducible factor-1 α in vascular sarcomas[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:404–410.
- [27] Mazure NM, Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis [J]. *Curr Pharm Des*, 2003,9(7):531–541.
- [28] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Mol Cell Biol*, 1996,16(9):4604–4613.
- [29] Mazure NM, Chen EY, Yeh P, et al. Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression[J]. *Cancer Res*, 1996,56(15):3436–3440.
- [30] Chen TH, Wang JF, Chan P, et al. Angiotensin II stimulates hypoxia-inducible factor 1 α accumulation in glomerular mesangial cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005,1042:286–293.

幽门螺杆菌抗生素耐药性基因检测: 下一步?

李云振^{1,2} 葛安国^{3*} 王庆波¹ 高宏志⁴ 王明席^{1*} 胡伟鹏^{4*}

[摘要] 抗生素耐药性是目前幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)根除治疗失败的重要原因。对于提高临床治疗效果,在某一地区的人群中*H. pylori*耐药发生率也应考虑。高效、快速、准确地检测出*H. pylori*抗生素耐药性和及时监控群体耐药发生率对提高临床治疗效果具有重要意义。目前,*H. pylori*抗生素的耐药机制逐渐清楚,这有助于探索新的检测方法、尤其是核酸检测技术。该文总结了用于*H. pylori*根除治疗最常用抗生素的主要耐药机制,并着重回顾了*H. pylori*抗生素耐药的基因检测技术进展,以期对改进*H. pylori*抗生素耐药的分子诊断提供理论指导和实践借鉴。

[关键词] 幽门螺杆菌; 抗生素耐药; 基因检测

Antibiotic resistance genes detection of *Helicobacter pylori*: the next step?

LI Yunzhen^{1,2}, GE Anguo^{3*}, WANG Qingbo¹, GAO Hongzhi⁴, WANG Mingxi^{1*}, HU Weipeng^{4*}

(1. Yun Leung Laboratory for Molecular Diagnostics, School of Biomedical Science and Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University and Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Xiamen, Fujian, China, 361021; 2. Wenzhou Institute of Biomaterials and Engineering, Wenzhou, Zhejiang, China, 325011; 3. Linyi Rongjun Hospital, Linyi, Shandong, China, 276005; 4. Research Center, The 2nd Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian, China, 362000)

[ABSTRACT] Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* is the most important reason for failure of its eradication. Overall prevalence of related antibiotic resistance in the region should be also considered for an effective treatment. It is clinically important to detect *H. pylori* antibiotic resistance efficiently and monitor its incidence in local population timely. With the mechanisms of antibiotic resistance for *H. pylori* becoming clear gradually, more diagnostic methods, especially the molecular technologies come to the fore. In this review, the main resistance mechanisms of the most commonly used antibiotics in *H. pylori* eradication therapy were briefly discussed and the progresses in molecular diagnostic technologies were emphatically summarized, which may provide theoretical guidance and practical reference for molecular diagnosis of *H. pylori* antibiotic resistance.

[KEY WORDS] *Helicobacter pylori*; Antibiotic resistance; Resistance gene detection

基金项目:福建省科技厅重大项目(2012Y4009);福建省自然科学基金(2011J01220);福建省教育厅资助课题(JA09118);厦门市科技计划(3502Z20123036);中央高校基本科研业务费专项资金(12J0445*, 13J0493*);华侨大学引进人才科研启动费(12Y0317*);泉州市科技项目(No. 2010Z87)

作者单位:1. 华侨大学生物医学学院 & 分子药物研究院 & 分子药物教育部工程研究中心, 润良分子诊断研究室, 福建, 厦门 361021

2. 温州生物材料与工程研究所生物材料事业部, 浙江, 温州 325011

3. 山东省临沂市荣军医院, 山东, 临沂 276005

4. 福建医科大学附属第二医院神经外科, 中心实验室, 福建, 泉州 362000

*通讯作者:葛安国, E-mail: geanguo@126.com; 王明席, E-mail: mxwang@hqu.edu.cn; 胡伟鹏, E-mail: hwplcj@sina.com

注:李云振, 葛安国为并列第一作者

人类致病菌幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 的发现和研究表明人类对于上消化道疾病有了重新认识, 并彻底改变了对该类病人的管理方式^[1]。据报道, 世界范围内有近一半人口被 *H. pylori* 感染^[1]。目前, *H. pylori* 已被认为是急性和慢性胃炎的致病菌, 同时也是消化性溃疡、胃癌和胃淋巴瘤的主要诱因^[2]。治疗该类疾病的常规方法是运用抗生素根除 *H. pylori*^[1]。

目前, 临床上用于根除 *H. pylori* 的常用抗生素种类和数目并不多, 但耐药性问题越来越严重, 耐药性产生是 *H. pylori* 感染治疗失败的重要原因。本文在简单总结 *H. pylori* 常用抗生素主要耐药机制的基础上, 着重回顾了 *H. pylori* 抗生素耐药性基因检测技术进展, 以期对本领域的发展提供理论指导和实践借鉴。

1 一线治疗药物耐药基因检测

1.1 克拉霉素

克拉霉素是当前治疗 *H. pylori* 效力最强的抗生素, 其耐药性涉及 23S rRNA 基因 V 功能域内发生的点突变。这些点突变能够抑制克拉霉素与核糖体亚基的结合, 从而引起 *H. pylori* 产生耐药性^[3]。

目前, 克拉霉素耐药性基因检测手段主要包括限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、实时定量 PCR (real time polymerase chain reaction, RT-PCR) 等。PCR-RFLP 是最早使用且较为简便的方法, 从胃活检标本中直接提取 DNA 后, 使用 PCR-RFLP 可在一天内完成 *H. pylori* 感染和耐药性的检测^[4]。其能检测的与克拉霉素耐药性相关的点突变包括 A2142G、A2143G、A2142C、T2717C^[5-7], 其中发现 A2142G 和 A2143G 最常见且最重要。然而研究表明其它克拉霉素耐药性相关突变在某些地区也较常见, 如 T2717C 在意大利为常见突变^[6]。同时采用巢式 PCR-RFLP (nested PCR-RFLP) 可提高该方法的敏感性和特异性。该方法也可无需细菌培养而直接检测胃液样本和粪便样本的 *H. pylori*, 是一种快速筛查 *H. pylori* 克拉霉素耐药性的非入侵性方法^[6], 且与酶联免疫吸附剂测

定方法 (ELISA) 相比, 具有很高的敏感性和特异性, 分别为 100% 和 90%^[8]。最近该方法已经被某些国家采用, 如伊朗等, 开展全国性 *H. pylori* 对克拉霉素耐药性发生率的群体检测研究^[9]。

荧光原位杂交技术是唯一可以直接对活检标本中微生物进行特异性可视化的检测方法^[10]。该方法检测对象一般为 A2142G、A2143G、A2144G。与 PCR 相比, 其检测样本常为福尔马林固定组织或石蜡包埋切片, 无需提取细菌 DNA, 对完整样本可进行半定量检测, 不到 3 小时即可完成检测, 与传统检测方法如与 Etest^[11] 结果的一致性可达 92.4%^[12]。目前已经开发出商业性的试剂盒, 其检测克拉霉素耐药性的敏感性和特异性分别可达 90% 和 100%^[13]。最近, 肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA)-荧光原位杂交技术 (PNA-FISH) 使该方法也得到了改进, 以 *H. pylori* 悬浮液为标本, PNA-FISH 可获得 100% 的敏感性和特异性^[14]。随后的研究以石蜡包埋胃活检标本为实验样本, 检测结果与 PCR 测序结果完全一致, 敏感性和特异性分别为 91% 和 84.2%^[10]。

如果不计成本的话, 实时定量 PCR 是目前用于检测克拉霉素耐药性最为理想的方法。该方法检测点突变的范围较广, 提取 DNA 后的检测时间仅需 1 小时^[15], 且该方法可同时处理多个样本。目前市场上已存在基于实时定量 PCR 技术检测 *H. pylori* 克拉霉素耐药性的试剂盒, 且敏感性和特异性分别可达 91% 和 96%^[15], 更重要的是, 该方法还可以对耐药菌进行准确的定量, 最低可准确定量 300 个细菌^[16]。检测样本可包括胃活检样本、粪便标本、福尔马林固定标本和石蜡包埋胃活检标本等, 无需细菌培养^[17-18]。

此外, 近年来也出现了新的检测技术和诊断试剂盒, 其中主要包括 DPO (dual priming oligonucleotide)、Microarray、GenoType HelicoDR^[19-21]。DPO 是一种新的引物技术。由于 DPO 通常很长, 一般可达 35 bp, 同时含有两个引发区域, 所以该引物具有很高的特异性, 可用于检测单核苷酸的多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。最近的研究表明, 与实时定量 PCR 相比, 其灵敏度可达 97.7%, 同时具有更高的特异性 (83.1% vs 80.7%), 可以作为实时定量 PCR 的替代检测工具, 并且也已存在相应的试剂盒^[22]。需要强调的是该技术应

用于检测幽门螺杆菌克拉霉素耐药性在韩国已进入临床试验 (NCT01453036)^[23]。Microarray 是比较热门的高通量检测技术,近几年也用于简单快速检测 *H. pylori* 感染并同时检测其致病性相关的基因型及耐药性。该技术主要依赖于特异性探针的设计^[20]。基于酶比色法建立的DNA芯片可直接对胃组织进行检测,其结果与DNA测序的结果具有96.83%的一致性,同时灵敏度可达 1.53×10^2 copy/mL^[24]。GenoType HelicoDR 是基于另一成功应用于结核分支杆菌耐药性检测的试剂盒 (GenoType MTBDR) 而开发的新型基因检测方法^[21]。该方法属于DNA条带技术,后者基于多重PCR与反向杂交的结合,成本相对低廉且易于操作,敏感性和特异性很高^[21,25],可分别达94%和99%,阳性和阴性预测值分别为99%和94%^[21]。最近,该方法已被南非用来开展整个国家的 *H. pylori* 抗生素耐药性检测^[26]。

1.2 甲硝唑

甲硝唑属于硝基咪唑类抗生素,是一种廉价的药物。甲硝唑耐药机制涉及 *rdxA* 基因的不同突变,这些突变使电子传递链组件烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 硝基还原酶失去活性,进而无法激活甲硝唑产生硝基阴离子自由基、亚硝基衍生物和羟氨以破坏DNA螺旋结构。这也是引起 *H. pylori* 甲硝唑耐药的可能主要机制,但是 *rdxA* 基因涉及的突变数目和类型较多、缺少规律性^[27],这增加了甲硝唑的耐药基因检测的难度。此外,研究表明甲硝唑耐药还涉及其他还原酶的失活^[28]。

总体上说,只在DNA水平上检测甲硝唑耐药性还不能指导用药。尔后发现,从RNA水平上检测相关基因是甲硝唑耐药性检测的一种准确方法^[29],而从蛋白质水平检测甲硝唑耐药性也已在临床菌株中得到了验证,后者如 *RdxA* 蛋白质的缺失可以快速确定大多数临床甲硝唑耐药株^[30]。

1.3 阿莫西林

阿莫西林属于β-内酰胺类抗生素大类中的青霉素类抗生素,具有很高的杀菌活性,可包含在用于 *H. pylori* 根除的所有治疗方案中^[1]。稳定的阿莫西林耐药性涉及不同的机制^[31-32]。其中,青霉素结合蛋白基因 1A (*pbp 1A*) 突变是稳定 *H. pylori*

阿莫西林耐药的常见机制,该基因的突变降低或消除了阿莫西林与青霉素结合蛋白的亲性和,后者在细胞壁的合成过程中具有重要作用^[33]。此外,关于其他青霉素结合蛋白 (*PBP2* 和 *PBP3*) 的编码基因突变,也可能都与阿莫西林耐药有关^[32]。虽然绝大多数研究表明β-内酰胺酶的产生在 *H. pylori* 内并不活跃,但已有研究发现了由内酰胺酶产生引起的 *H. pylori* 阿莫西林耐药性,该耐药机制通常会引起高水平耐药 (≥ 256 mg/L)^[31],因此,对 *H. pylori* 有必要进行该耐药基因的监控,以有效控制该基因的水平传播。

令人遗憾的是,目前鲜有关于阿莫西林耐药性基因检测方法的报道,可能有以下几个原因。首先,尽管研究表明 *pbp 1* 基因的突变是稳定 *H. pylori* 阿莫西林耐药的常见机制,但是涉及的突变类型和突变数量较多,且该机制引起的耐药水平较低。其次,内酰胺酶产生引起的 *H. pylori* 阿莫西林耐药性虽然很高,但该机制的发生较罕见^[31]。最后,膜通透性降低或阿莫西林外排泵系统作为高水平阿莫西林耐药性的可能机制,涉及的突变并未明确^[34]。

总之,基因检测方法应用于阿莫西林耐药性的检测需要对相关耐药机制,特别是 *pbp 1* 基因突变更加深刻的理解。尽管如此,据报道与 *H. pylori* 阿莫西林耐药性有关的绝大多数突变位于或临近 *PBP* 第二和第三个关键序列。其中 *PBP1 SKN* 关键序列附近的 Ser414 Arg、位于 *PBP1 KTG* 关键序列中心的 Thr556Ser 以及临近 *PBP1 KTG* 关键序列的 Asn562Tyr 和 Thr593Ala 是比较重要的常见替换突变^[35-36],或许是基因检测方法的理想靶点。

2 二线治疗或补救治疗药物耐药基因检测

2.1 左氧氟沙星

左氧氟沙星作为新一代氟喹诺酮类,具有广谱抗菌作用,在一线疗法、甚至二线疗法失败后的补救治疗中效果理想,用左氧氟沙星来根除 *H. pylori* 的方案正在世界范围内得到推广^[37]。*gyrA* 喹诺酮类药物耐药性决定域 (QRDR) 上的点突变可阻止左氧氟沙星与DNA促旋酶 (包括亚单位A和亚单位B,分别由 *gyrA* 和 *gyrB* 编码) 的结合,引起细菌的耐药^[38]。此外,最近的研究已确定 *gyrB* 上的突变, Glu463Gly, 是引起 *H. pylori* 氟喹

诺酮类耐药的另—新的机制^[39]。

至今，关于氟喹诺酮类药物耐药性的分子检测方法可包括实时定量 PCR、等位基因特异性 PCR (allele specific polymerase chain reaction, AS-PCR) 和最近的 GenoType HelicoDR^[21, 40-41]。实时定量 PCR 采用的是荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 溶解曲线分析方法 (FRET-RT-PCR)。根据溶解温度的差异, 该方法可以快速识别出主要突变 (*gyrA*) 包括 Asn87Lys、Asp91Gly、Asp91Asn、Asp91Tyr^[40]。AS-PCR 是一种比较简单的方法, 可在 3~4 小时内完成检测, 其能够检测的突变形式与实时定量 PCR 相同^[41]。GenoType HelicoDR 作为已经上市的试剂盒, 在检测左氧氟沙星耐药性方面具有不错的表

现, 是目前针对左氧氟沙星耐药性较为理想的基因检测方法。该方法检测时间不到 6 小时, 可准确地检测较多的突变, 包括 Asn87Lys、Asp91Gly、Asp91Asn、Asp91Tyr、Asp86Asn、Thr87Tyr, 前 4 种为主要检测对象。该方法可直接对胃活检标本进行检测, 无需培养, 且敏感性、特异性、阳性和阴性预测值分别可达 83%、95%、91%和 91%^[21, 25]。最近在南非对 *H. pylori* 的抗生素耐药性调查中, 该方法被证明可以简单、快速地确定左氧氟沙星耐药发生率 (10.26%)^[26]。

2.2 四环素

四环素是常常作为二线治疗方案、特别是三联疗法中的基本抗生素。虽然该药物的细菌耐药性并不常见, 但似乎在不断增加。四环素耐药性主

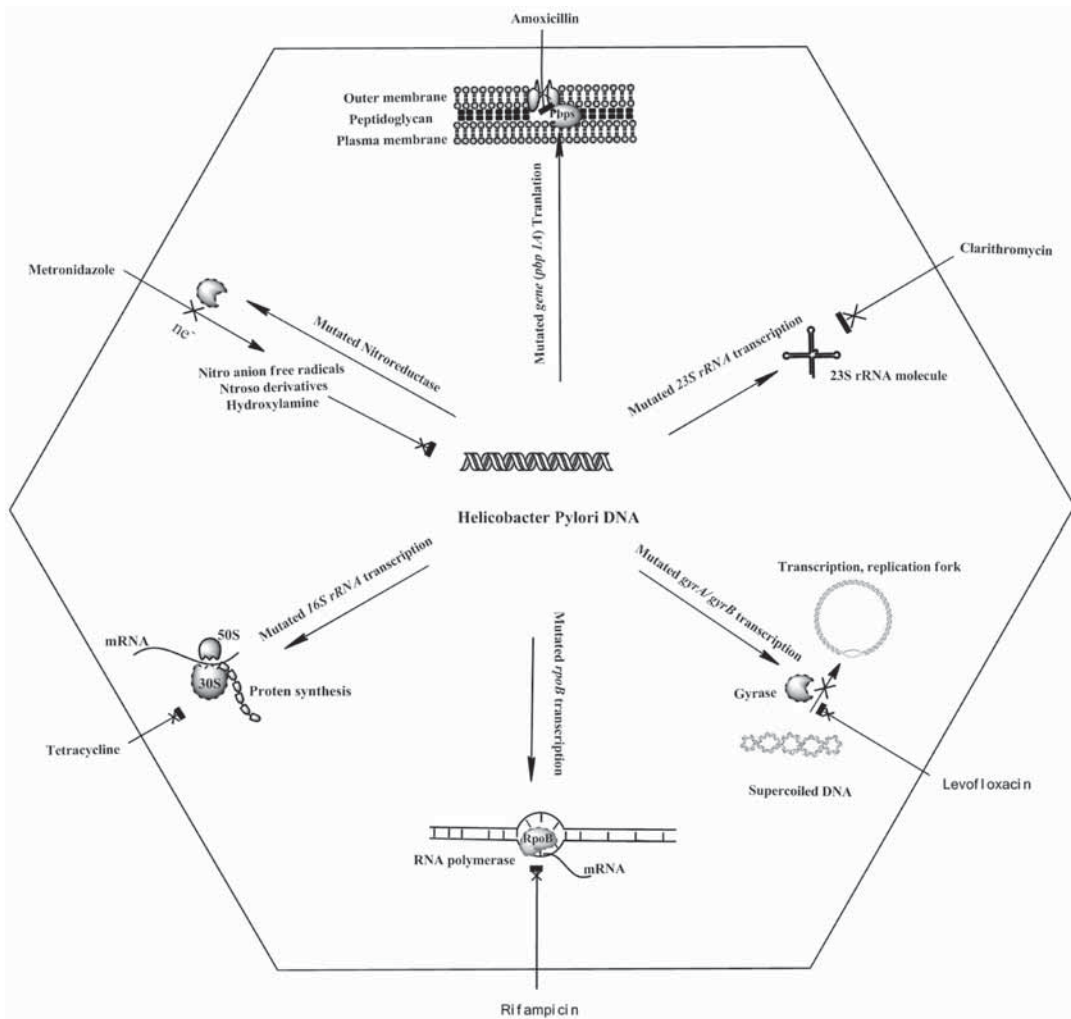


图 1 幽门螺杆菌常用抗生素主要耐药机制

Figure 1 Main resistance mechanisms of most-commonly used antibiotics for *H. pylori* eradication

表1 幽门螺杆菌耐药性基因检测突变和方法汇总

Table 1 Summary of mutations and methods for antibiotic resistance genes detection of *H. pylori*

抗生素	主要耐药机制	主要耐药基因	关键突变位点	主要检测方法
克拉霉素	23s rRNA gene point mutation	23S rRNA	A2142G,A2143G,A2142C	PCR-RFLP,FISH, 实时定量 PCR
甲硝哒唑	Nitroreductase mutations	<i>rdxA,frxA,fdxB</i>	随机突变	暂无
左氧氟沙星	<i>gyrA,gyrB</i> mutations	<i>gyrA,gyrB</i>	Asn87Lys,Asp91Gly,Asp91Asn, Asp91Tyr,Thr87Tyr,Asp86Asn	实时定量 PCR,AS-PCR, GenoType HelicoDR
阿莫西林	<i>pbp 1A</i> gene mutations	<i>pbp 1A</i>	Thr556Ser,Asn562Tyr,Thr593Ala, Ser414Arg	暂无
四环素	16s rRNA gene mutations	16S rRNA	AGA926-928TTC	PCR-RFLP, 实时定量 PCR
利福平和利福布汀	<i>rpoB</i> gene mutations	<i>rpoB</i>	Codon 525-545,Codon 585	暂无

要由 16S rRNA 内四环素初级结合位点(Tet-1)的点突变引起,这些突变导致四环素与 30S 核糖体亚基亲和力降低^[42]。

关于四环素耐药性的基因检测方法的报道目前仅涉及 PCR-RFLP 和实时定量 PCR 两种方法。其中 PCR-RFLP 仅对三重突变 AGA926-928TTC 进行检测。该方法可以将高水平四环素耐药菌株从低水平耐药菌株中区分开,因而可以作为四环素耐药性快速筛查方法^[43]。然而,最近的研究表明,对其他突变的检测也是有必要的,尽管这些突变通常引起的耐药性水平较低^[44]。通过熔点温度分析,实时定量 PCR 不仅可以鉴别最重要的三重突变 AGA926-928TTC,而且也可以检测二重突变如 AGA926-928GGC、AGA926-928GTA、AGA926-928TTA、AGA926-928ATC、AGA926-928TGC,以及单突变如 AGA926-928ATA、AGA926-928GGA。同时,此方法不仅可应用于从培养液提取的 DNA,而且也可以直接应用于从新鲜或冷冻胃活检样本提取的 DNA,大大缩短诊断时间^[45]。实验表明,该方法的敏感度可达每微升含 10 个基因组拷贝 *H. pylori*,且无特异性问题^[45]。最近的研究表明,该方法与传统方法相比的一致性可达 97%^[46]。

3 三线治疗或补救治疗药物耐药基因检测

3.1 利福平和利福布汀

利福平和利福布汀属于利福平类抗生素,与

氟喹诺酮类抗生素一样,此类药物一般用于 *H. pylori* 感染的补救治疗。利福平/利福布汀耐药性与 *rpoB* 基因的突变有关,其编码 RNA 聚合酶 β 亚基^[47]。

由于利福平类抗生素耐药率还处于非常低的水平,且该药物一般只用于 *H. pylori* 感染的补救治疗,目前还没有关于利福平类抗生素耐药性基因检测的报道。不过,重要的突变位置位于 525-545 氨基酸处 (Leu525Pro、Gln527Lys、Gln527Arg、Asp530Val、Asp530Asn、His540Tyr、His540Asn、Ser545Leu) 和 585 氨基酸处 (Ile586Asn、Ile586Leu)^[47-49]。

4 总结与展望

不可否认,越来越多基因检测方法已应用于 *H. pylori* 抗生素耐药性的筛查,其中,针对克拉霉素耐药性的基因检测和诊断已臻于成熟。然而,总体上讲,*H. pylori* 抗生素耐药性基因检测的效果有待于改善,还有许多问题需要解决。比方说,关于甲硝哒唑耐药性和阿莫西林的基因检测仍是个难点,更加深入的耐药机制研究和更加高效的基因检测方法将有助于该问题的解决。至于其他抗生素,如利福平类抗生素,虽然其耐药率还很低,但不能排除应用基因检测方法对其进行快速及时监控的必要性。更重要的是,目前 *H. pylori* 抗生素耐药性基因检测仅仅针对较为明确的耐药机制和突变,同时检测的抗生素种类和突变范围也有限,以

及鲜有涉及外排泵系统或膜通透性耐药机制,因而这种检测还需要在这些方面改进。另外,关于具体的突变与临床 *H.pylori* 抗生素耐药水平的定量关系也需要进一步的阐明。至于具体的基因检测方法,实时定量 PCR 是目前比较理想的基因检测方法。然而,该方法还是很难达到同时进行多种抗生素耐药性、多基因靶点分析的需要,昂贵的维护和检测成本也限制了该方法的大规模的应用。值得注意的是,目前测序技术,尤其是高通量测序技术(二代测序技术和三代测序技术),虽然还很少应用于幽门螺杆菌抗生素耐药性基因检测,但是随着测序成本的不断降低和测序时间的不断缩减,相信高通量测序将会在幽门螺杆菌耐药性基因检测方面充分发挥其用武之地。因此,除了更加深入的耐药机制研究以外,更加全面、高效、快速、低廉、高通量、多靶点检测技术是未来 *H. pylori* 抗生素耐药性基因检测的发展方向。

参考文献

- [1] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report[J]. *Gut*, 2007,56(6):772-781.
- [2] Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006,19(3):449-490.
- [3] Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996,40(2):477-480.
- [4] Bjorkholm B, Befrits R, Jaup B, et al. Rapid PCR detection of *Helicobacter pylori*-associated virulence and resistance genes directly from gastric biopsy material[J]. *J Clin Microbiol*, 1998,36(12):3689-3690.
- [5] Kim KS, Kang JO, Eun CS, et al. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance[J]. *J Korean Med Sci*, 2002, 17(5):599-603.
- [6] Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, et al. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2003,41(8):3636-3640.
- [7] Menard A, Santos A, Megraud F, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002,46 (4):1156-1157.
- [8] Rimbara E, Noguchi N, Yamaguchi T, et al. Development of a highly sensitive method for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from human feces[J]. *Curr Microbiol*, 2005,51(1):1-5.
- [9] Sadeghifard N, Seidnazari T, Ghafourian S, et al. Survey in Iran of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates by PCR-RFLP [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2013,44(1):89-95.
- [10] Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, et al. Validation of a fluorescence in situ hybridization method using peptide nucleic acid probes for detection of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in gastric biopsy specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2013,51 (6):1887-1893.
- [11] 张明霞. 何谓 Etest 法?它用于分枝杆菌药敏试验有哪些优点?[J]. *中华检验医学杂志*, 2005,28(8):856-856.
- [12] Juttner S, Vieth M, Miehlke S, et al. Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue [J]. *Mod Pathol*, 2004,17(6):684-689.
- [13] Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, et al. Evaluation of seafast, a rapid fluorescent in situ hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections [J]. *J Clin Microbiol*, 2005,43(7):3494-3496.
- [14] Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, et al. PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* [J]. *BMC Microbiol*, 2011,11:101-107.
- [15] Agudo S, Alarcon T, Urruzuno P, et al. Detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance in gastric biopsies of pediatric patients by using a commercially available real-time polymerase chain reaction after NucliSens semiautomated DNA extraction [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010,67(3):213-219.
- [16] Lascols C, Lamarque D, Costa JM, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2003,41(10):4573-4577.
- [17] Vecsei A, Innerhofer A, Binder C, et al. Stool polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in children[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2010,8(3):309-312.

- [18] Schmitt BH, Regner M, Mangold KA, et al. PCR detection of clarithromycin-susceptible and-resistant *Helicobacter pylori* from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies [J]. *Mod Pathol*, 2013,26(9):1222-1227.
- [19] Woo HY, Park DI, Park H, et al. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with gastric biopsy specimens [J]. *Helicobacter*, 2009,14(1):22-28.
- [20] 郭树彬,刘军波,陈琳洁,等. 幽门螺杆菌基因分型及耐药检测寡核苷酸芯片的制备及鉴定[J]. *中国医学科学院学报*, 2007,29(1):98-102.
- [21] Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, et al. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009,47(11):3600-3607.
- [22] Lehours P, Siffre E, Megraud F. DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect *Helicobacter pylori* and its resistance to clarithromycin[J]. *BMC Gastroenterol*, 2011,11:112-116.
- [23] Lee HJ, Kim JI, Cheung DY, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* according to 23S ribosomal RNA point mutations associated with clarithromycin resistance[J]. *J Infect Dis*, 2013,208(7):1123-1130.
- [24] Xuan SH, Zhou YG, Shao B, et al. Enzymic colorimetry-based DNA chip: a rapid and accurate assay for detecting mutations for clarithromycin resistance in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori*[J]. *J Med Microbiol*, 2009,58(11):1443-1448.
- [25] Miendje DY, Burette A, Bentatou Z, et al. Practical use of GenoType (R) HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011,70(4):557-560.
- [26] Tanih NF, Ndip RN. Molecular detection of antibiotic resistance in South African isolates of *Helicobacter pylori* [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, Article ID 259457:1-6.
- [27] Solca NM, Bernasconi MV, Piffaretti JC. Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: comparison of the *rdxA* gene sequences in 30 strains [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000,44(8):2207-2210.
- [28] Aldana LP, Kato M, Kondo T, et al. In vitro induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in *rdxA* and *frxA* genes from *Helicobacter pylori* isolates[J]. *J Infect Chemother*, 2005,11(2):59-63.
- [29] Kwon DH, Osato MS, Graham DY, et al. Quantitative RT-PCR analysis of multiple genes encoding putative metronidazole nitroreductases from *Helicobacter pylori* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2000,15(1):31-36.
- [30] Latham SR, Owen RJ, Elviss NC, et al. Differentiation of metronidazole-sensitive and -resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori* by immunoblotting with antisera to the *RdxA* protein[J]. *J Clin Microbiol*, 2001,39(9):3052-3055.
- [31] Tseng YS, Wu DC, Chang CY, et al. Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009,39(9):807-812.
- [32] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008,61(5):995-998.
- [33] Okamoto T, Yoshiyama H, Nakazawa T, et al. A change in PBPI is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002,50(6):849-56.
- [34] Kwon DH, Dore MP, Kim JJ, et al. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003,47(7):2169-2178.
- [35] Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, et al. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002,46(7):2229-2233.
- [36] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *Microbiol Immunol*, 2007,51(10):939-944.
- [37] Gisbert JP, Perez-Aisa A, Bermejo F, et al. Second-line therapy with levofloxacin after failure of treatment to eradicate *Helicobacter pylori* infection: time trends in a Spanish Multicenter Study of 1000 patients[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2013,47(2):130-135.
- [38] Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, et al. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003,47(12):3942-3944.
- [39] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: role of mu-

- tations at position 87 and 91 of GyrA on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in GyrB[J]. *Helicobacter*, 2012,17(1):36–42.
- [40] Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach[J]. *J Clin Microbiol*, 2004,42(5):2241–2246.
- [41] Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, et al. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2007,45(2):303–305.
- [42] Gerrits MM, de Zoete MR, Arents NL, et al. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002,46(9):2996–3000.
- [43] Ribeiro ML, Gerrits MM, Benvenuto YH, et al. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004,40(1):57–61.
- [44] Toledo H, Lopez-Solis R. Tetracycline resistance in Chilean clinical isolates of *Helicobacter pylori* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010,65(3):470–473.
- [45] Glocker E, Berning M, Gerrits MM, et al. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005,49(8):3166–3170.
- [46] Chisholm SA, Owen RJ. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61(1):67–71.
- [47] Heep M, Beck D, Bayerdorffer E, et al. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999,43(6):1497–1499.
- [48] Glocker E, Bogdan C, Kist M. Characterization of rifampicin-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007,59(5):874–879.
- [49] Heep M, Lehn N, Brandstatter B, et al. Detection of rifabutin resistance and association of *rpoB* mutations with resistance to four rifamycin derivatives in *Helicobacter pylori*[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002,21(2):143–145.

卵巢上皮癌的组织起源及其分子生物学特性

刘影* DUBEAU Louis

[摘要] 卵巢癌的致死率高居妇科恶性肿瘤之首。卵巢上皮癌是最常见的恶性卵巢肿瘤,而人们对它的起源一直存在争议。近年来分子生物学的发展将卵巢癌的研究带入了新的水平。本文主要通过概述卵巢上皮癌起源的主要学说,分子生物学标志物在卵巢癌中的最新应用,以及基因工程动物模型的建立等问题,来进一步了解卵巢癌的发病机制。这对该病的早期诊断以及探索新的治疗方案有重要意义。

[关键词] 卵巢上皮癌; 分子生物学标志物; 动物模型

The histogenesis and molecular biological characteristics of epithelial ovarian cancer

LIU Ying*, DUBEAU Louis

(Department of Pathology, University of Southern California, Los Angeles, USA, 90033)

[ABSTRACT] Ovarian cancer is the most lethal malignancy arising in female reproductive organ. Epithelial ovarian cancer is the most common histological type. However, the exact origin is still controversial. With the rapid development of molecular biology, ovarian cancer research has been greatly advanced. In this current article, the origin of epithelial ovarian cancer, application of appropriate molecular markers and establishing genomic manipulated animal models will be focused on. These will be helpful for early diagnosis and developing novel regimen for treatment of the disease.

[KEY WORDS] Epithelial ovarian cancer; Molecular biological marker; Animal models

卵巢癌是女性常见的妇科恶性肿瘤之一,其病死率一直高居妇科肿瘤之首^[1]。卵巢癌在一般人群中的终身发病率是1:70,主要见于绝经后女性。卵巢癌起病隐匿,70%患者在确诊时已有远处转移^[2]。造成其病死率居高不下的主要原因是卵巢癌生长部位隐蔽,对早期患者尚缺乏简便实用的诊断方法。卵巢上皮癌是卵巢癌中最常见的组织学类型,人们对它的起源和发病机制尚未完全认识。近年来,随着分子生物学科的蓬勃兴起,研究人员在卵巢上皮癌的确切起源,分子生物学标志物的发现及其应用等多方面取得了重要进展。本文针对这几个主要问题作一综述。

1 关于卵巢上皮癌起源问题的探讨

卵巢上皮癌按组织学类型主要分为浆液样癌,子宫内膜样癌,以及透明细胞癌。关于卵巢上皮癌的起源有下面几种主要学说。

1.1 传统的卵巢表面上皮化生学说

该学说认为卵巢上皮癌来自于覆盖卵巢表面的单层上皮^[3]。支持卵巢上皮癌来自于卵巢被覆上皮起源的假说的学者认为卵巢上皮癌各种组织亚型之所以和各种卵巢以外的肿瘤具有极高的相似性,是因为卵巢表面上皮先经过苗勒氏管样的化生。这样的观点就意味着卵巢上皮癌是比卵巢上

基金项目:美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)项目(RO1 CA119078)

作者单位:美国南加州大学病理系,美国,洛杉矶 90033

*通讯作者:刘影, E-mail: liuying@usc.edu

皮更进一步分化的细胞,这也与我们传统观点认为恶性肿瘤是分化不良的细胞相矛盾。

1.2 苗勒氏管系统起源学说

Dubeau 在 1999 年提出卵巢上皮癌并不是来自于卵巢自身,而是来自于苗勒氏管系统^[4]。卵巢上皮癌从组织学分型上来讲和来自同一胚胎结构——苗勒氏管的输卵管、子宫内膜、子宫颈的癌难以区分。同时一些被苗勒氏管上皮覆盖的微结构通常也会在输卵管和卵巢周围、卵巢的髓质和卵巢皮质深部发现,即为“二级苗勒氏系统”。二级苗勒氏系统和卵巢上皮癌的主要组织类型很相近,而这些结构最终可以发展为卵巢外的大的囊性结构和浆液性和粘液性卵巢囊腺瘤或者子宫内膜样癌。综上,苗勒氏管系统学说认为苗勒氏管和二级苗勒氏系统是卵巢上皮癌的起源,同时也解释了为何经过预防性输卵管-卵巢切除术后家族遗传性 BRCA1 和 BRCA2 基因突变携带者,仍然有发生浆液样腹膜癌的危险性^[5-6]。

1.3 输卵管起源学说

2001 年以来,研究人员证明多数卵巢浆液样癌和腹膜浆液样癌可能源自输卵管^[7]。该学说的主要观点认为,输卵管粘膜上皮的分泌性细胞在毒素影响下,DNA 损伤发生蓄积,引发分子生物学改变,改变后的异常细胞连接疏松,容易脱落种植于卵巢和盆腔继续生长,从而形成高级别卵巢或者盆腔浆液样癌。输卵管起源学说认为高级别和低级别的卵巢浆液样癌都可能来自于输卵管。而对于解释卵巢子宫内膜样癌,粘液样癌等的起源有一定的局限性。

1.4 卵巢癌二元论学说

2004年,Shih 和 Kurman 提出二元论学说,将卵巢癌分为 I 型和 II 型^[8]。卵巢癌的二元理论认为,I 型和 II 型卵巢癌具有不同的细胞起源和不同的分子通路。其中,I 型卵巢癌中,BRAF 和 KRAS 基因突变常发生在浆液样癌,KRAS 基因突变常发生在粘液样癌,beta-catenin 和 PTEN 突变以及微卫星不稳定性常见于子宫内膜样癌。对于 II 型卵巢癌目前人们认识到 p53 突变常发生在高级别的卵巢浆液样癌中。卵巢癌的二元理论反映了不同的肿瘤生物学行为,对治疗反应性和临床预后具有指导性作用。

2 分子生物学标志物在卵巢癌中的应用

由于卵巢癌早期症状隐匿,因而绝大多数患者就诊时已经为晚期。近年来随着分子生物学研究进展,使得早期分子水平的诊断成为可能。除了临床公认的筛查方法例如妇科检查、肿瘤标志物以及影像学检查,研究人员致力于寻找新的灵敏度和特异度高的早期卵巢上皮癌肿瘤标志物。实践已经证明卵巢癌免疫标志物如 CA125 等对肿瘤的诊断和判断预后有价值。由于卵巢癌是由多基因决定的特性,单用一种分子生物学标志物监测所有的组织学分型是不够科学的,所以早期卵巢癌的筛查通常需要综合多种分子生物学标志物。近年来一些被证明对早期诊断、指导预后及治疗有意义的肿瘤标志物如下。

CA125 是卵巢上皮癌的首选肿瘤标志物,是由人类卵巢浆液性囊腺癌细胞免疫接种小鼠,通过淋巴细胞杂交而获得的高分子量单克隆抗体。大量的研究表明 CA125 水平的改变与卵巢上皮癌的发生发展以及消退密切相关。单独检测血清 CA125 对区别卵巢疾病的良恶性有一定的准确性。Nakae 等在对 32 例卵巢癌病人、34 例良性卵巢肿瘤病人和 31 例健康女性的 CA125 水平比较中发现,CA125 对于预测卵巢癌的敏感性为 84.4%,特异性为 66.3%^[9]。CA125 被认为是已知卵巢上皮癌的肿瘤标志物中特异性和敏感性最高的一种,但是单独应用 CA125 检测卵巢癌也有一些不足。首先 CA125 在其他癌症,比如胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、肝癌以及妊娠、月经等生理情况下也有增高。另外,I 期卵巢癌患者中仅有 50%左右 CA125 有明显增高,单用 CA125 诊断率通常小于 10%。在 233 例卵巢肿瘤患者(其中包括良性肿瘤 166 例,恶性肿瘤 67 例)的研究中,采用联合检测血清 CA125 和人附睾蛋白(human epididymis protein 4,HE4)诊断卵巢癌的敏感度为 76.4%,特异度为 95%;比单独检测血清 CA125(敏感度为 43.3%,特异度为 95%)诊断卵巢癌有所升高。特别值得提出的是在对 I 期卵巢癌的联合检测中,敏感度为 39.5%,特异度为 95%;比单独检测血清 CA125(敏感度为 15.1%,特异度为 95%)明显升高^[10]。

人溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)是由激活的血小板产生的血清正常成分。虽然对正

常卵巢上皮细胞没有促进分裂作用,但LPA可作为一种生长因子刺激原发的卵巢癌细胞增殖,并且可以通过诱导血管生成因子促进卵巢癌生长。研究表明卵巢癌患者血浆LPA水平显著升高,同时在卵巢癌术后有明显下降^[11]。研究人员检测了363位卵巢癌患者以及273位正常对照血清中LPA水平,得出LPA诊断卵巢癌的敏感度为0.94(95%的可信区间为0.91–0.96),特异性为0.88(95%的可信区间为0.83–0.91),提示LPA是敏感性和特异性都比较高的肿瘤标志物^[12]。

可溶性间皮素相关蛋白(soluble mesothelin-related peptides, SMRP)是表达于体腔间皮细胞胞膜的糖蛋白,主要作用于细胞间的粘附。研究表明卵巢上皮癌以及恶性间皮瘤,血清中的SMRP有显著增高。早期筛查中的SMRP增高提示预后较差^[13]。McIntosh等检测卵巢癌血清SMRP以及CA125并对其进行比较,证明CA125敏感性好于SMRP。但如果将特异度定为98%,再将两者进行比较,SMRP的敏感性则好于CA125^[14]。可溶性间皮素相关蛋白的另外一个特点是它可以在尿液中检测到,无创性的检查给SMRP带来很大的临床应用前景^[15]。

HE4是二硫核心组蛋白成分。研究表明HE4在早期卵巢上皮癌患者中有显著升高,与其他的肿瘤标志物相比,具有较高的敏感性^[16]。对531例盆腔包块患者(包括352例卵巢良性肿瘤,129例卵巢上皮癌,22例卵巢交界性肿瘤,6例卵巢非上皮癌,22例非卵巢癌)的研究表明,联合HE4和CA125,同时也结合患者的月经状态,通过公式可以将盆腔包块患者分为高危和低危人群,为临床上早期发现和治疗卵巢癌提供可能性^[17]。进一步的研究^[18]结果提示不同组织形态的卵巢上皮癌HE4表达也有差别,100%卵巢内膜样癌和93%卵巢浆液样癌细胞都表达HE4,而在卵巢透明细胞癌中仅有50%表达,卵巢粘液样癌则几乎不表达。这说明HE4不仅在早期卵巢癌筛查有重要作用,同时对上皮癌的组织学分型有一定的帮助^[18]。

巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)是由多种细胞产生的一种特异性的细胞生长因子,能刺激骨髓造血细胞巨噬细胞集落的形成。同时M-CSF也是炎症反应介质,参与调节机体免疫状态。在肿瘤细胞发生发展过程中,M-CSF可以调节细胞生长、粘附与迁移

等。研究表明不同组织类型的早期卵巢癌血清中的M-CSF明显增多^[19]。Xu等证明在特异性设定为98%的条件下,68%卵巢癌患者的M-CSF增加。当和CA125联合用于检测卵巢癌,在90%的卵巢癌患者中可以检测到升高的M-CSF。该研究表明不同组织类型的早期卵巢癌血清中的M-CSF均有明显增多,但同时其他肿瘤细胞如粒细胞白血病、肺腺癌细胞、乳腺癌与子宫内膜癌的表达也有增加,所以M-CSF对卵巢癌早期诊断的特异性还有待进一步论证^[20]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是由血管内皮细胞和成骨细胞合成的粘附性糖蛋白,其能够抑制细胞凋亡,在肿瘤的进展和转移中有重要作用。OPN可以在早期卵巢癌患者的尿液中检测出来,晚期卵巢癌患者OPN水平明显增高,通常提示预后较差^[21]。研究表明卵巢癌患者中OPN水平显著增高,单独使用OPN作为检测指标,其敏感性为81.2%,联合采用CA125其敏感性升至93.8%^[22]。

另外一些潜在的卵巢癌肿瘤标志物,例如:血色素结合珠蛋白(haptoglobin),白细胞介素17、23(interleukin 17, interleukin 23, IL-17, IL-23)也被用于卵巢上皮癌标志物的临床实验,但是更多的临床实验仍在进行中^[23–25]。

3 卵巢癌基因工程动物肿瘤模型研究进展

随着分子生物学的蓬勃兴起,科学家们利用转基因技术将肿瘤形成相关基因转入动物体内进行表达,开展基于卵巢肿瘤发生信号通路中的促癌基因和抑癌基因动物模型的研究。这些动物肿瘤模型的致癌过程和病理表现更接近人体,从而可以更好地帮助人们从生物学角度和分子角度了解疾病的进展和转归,帮助人们对疾病进行早期诊断和研发新的治疗方法。

2002年,Orsulic等报道了第一个重要的卵巢肿瘤模型^[26]。科研人员利用逆转录病毒转染一种或者几种致癌基因到小鼠P53正常和P53敲除的卵巢细胞。实验结果表明,P53敲除以及同时转染至少两种包括C-MYC, KRAS或者AKT等的致癌基因对于在免疫缺陷的裸鼠中有效成瘤非常重要;而对于正常免疫力的小鼠,接种P53敲除的卵巢细胞后同时加上上述3种致癌基因会产生潜伏期相对较长的肿瘤。

另一个重要模型是2003年报道的。科研人员用腺病毒载体表达巨细胞病毒引导的Cre,并注入单独条件性敲除的P53或者Rb,或是P53和Rb两者同时条件性敲除小鼠的卵巢。相比单独敲除Rb或P53的小鼠偶发肿瘤的情况,同时敲除Rb和P53对小鼠的成瘤作用明显。产生的卵巢上皮瘤涵盖各种亚型,包括有腹水产生和肝脏肺部转移^[27]。

Connolly等人报道了第一个遗传性散发转基因小鼠卵巢上皮肿瘤模型。研究人员利用苗勒氏管抑制物质II型受体(mullerian inhibiting substance type 2 receptor, Mis2r)启动系列控制SV40LTAg(类人猿40病毒大T抗原)表达。在大约50%的转基因小鼠中发现分化程度较低的上皮癌并向腹膜扩散,这点和人类晚期卵巢肿瘤相似。然而此肿瘤的确切细胞来源仍然不确定^[28]。

通过敲除小鼠卵巢颗粒细胞的BRCA1基因,在大多数14到15个月小鼠的卵巢和子宫角中观察到上皮性囊肿。这些上皮性囊肿和人的卵巢浆液性腺瘤相类似,同时对应卵巢浆液性上皮癌。更进一步的研究证明这些上皮性囊肿并不是来源于卵巢颗粒细胞,而是来源于上皮细胞^[29]。囊肿细胞的BRCA1基因并没有出现Cre借导的BRCA1重组,提示这些肿瘤是BRCA1基因突变的间接结果。进一步的研究结果表明基因变异小鼠的月经周期出现异常,雌激素主导的子宫内膜增生期显著延长,血液中雌激素水平显著升高并且在雌激素的靶器官子宫内膜和长骨的长度和骨密度都观察到了相应的变化^[30-31]。

目前已知关于在低分化和高分化卵巢浆液性腺癌的激活的信号通路有:PTEN/PI3K和KRAS。科研人员破坏抑癌基因PTEN并且通过Mis2r启动子和Cre-Loxp系统诱导致癌基因KrasG12D的表达^[32-34]。

4 展望

卵巢上皮癌起源以及早期病变筛查的不确定性,是卵巢癌研究的一个绊脚石。随着分子生物学技术的进展,对卵巢上皮癌起源以及肿瘤标志物的了解,科学家们可以建立针对特定信号调控通路的基因工程动物模型,这样的动物模型能够更准确的模拟卵巢癌在人类中的致病过程。我们相信这些研究的进展将逐步推进人类对卵巢癌的认识和推动其临床治疗的发展。

参考文献

- [1] Rochet N, Kieser M, Sterzing F, et al. Phase II study evaluating consolidation whole abdominal intensity-modulated radiotherapy (IMRT) in patients with advanced ovarian cancer stage FIGO III—the OVAR-IM-RT-02 Study[J]. BMC Cancer, 2011,11(1):41.
- [2] Risch HA, Marrett LD, Howe GR. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer [J]. Am J Epidemiol, 1994,140(7):585–597.
- [3] Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours[J]. Lancet Oncol, 2008,9(12):1191–1197.
- [4] Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes[J]. Gynecol Oncol, 1999, 72(3):437–442.
- [5] Crum CP, Drapkin R, Miron A, et al. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007,19(1):3–9.
- [6] Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact[J]. J Clin Oncol, 2008,26(32):5284–5293.
- [7] Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer[J]. J Pathol, 2001,195(4):451–456.
- [8] Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis[J]. The American J of Pathology, 2004, 164(5):1511–1518.
- [9] Nakae M, Iwamoto I, Fujino T, et al. Preoperative plasma osteopontin level as a biomarker complementary to carbohydrate antigen 125 in predicting ovarian cancer[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2006,32(3):309–314.
- [10] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008,108(2):402–408.
- [11] Cai H, Xu Y. The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells[J]. Cell Communication and Signaling, 2013,11(1):31.
- [12] Lu Z, Chen Y, Hu Z, et al. Diagnostic value of total plasma lysophosphatidic acid in ovarian cancer: a meta-analysis[J]. Int J Gynecol Cancer. 2014. [Epub ahead of print].

- [13] Wu X, Li D, Liu L, et al. Serum soluble mesothelin-related peptide (SMRP): a potential diagnostic and monitoring marker for epithelial ovarian cancer[J]. Arch Gynecol Obstet, 2014,289(6):1309–1314.
- [14] McIntosh MW, Drescher C, Karlan B, et al. Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2004,95(1):9–15.
- [15] Hellstrom I, Hellstrom KE. SMRP and HE4 as biomarkers for ovarian carcinoma when used alone and in combination with CA125 and/or each other[J]. Adv Exp Med Biol, 2008,622(1):15–21.
- [16] Wang J, Gao J, Yao H, et al. Diagnostic accuracy of serum HE4, CA125 and ROMA in patients with ovarian cancer: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6):6127–6138.
- [17] Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2009,112(1):40–46.
- [18] Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4(HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas[J]. Cancer Res, 2005,65(6):2162–2169.
- [19] Kacinski BM, Stanley ER, Carter D, et al. Circulating levels of CSF-1 (M-CSF) a lymphohematopoietic cytokine may be a useful marker of disease status in patients with malignant ovarian neoplasms[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989,17(1):159–64.
- [20] Xu FJ, Ramakrishnan S, Daly L, et al. Increased serum levels of macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer [J]. Am J Obstet Gynecol, 1991,165(5):1356–1362.
- [21] Moszynski R, Szubert S, Szperek D, et al. Role of osteopontin in differential diagnosis of ovarian tumors[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2013,39(11):1518–1525.
- [22] Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2005,99(2):267–277.
- [23] Moszynski R, Szubert S, Szperek D, et al. Role of osteopontin in differential diagnosis of ovarian tumors[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2013,39(11):1518–1525.
- [24] Zhao C, Annamalai L, Guo C, et al. Circulating haptoglobin is an independent prognostic factor in the sera of patients with epithelial ovarian cancer[J]. Neoplasia, 2007,9(1):1–7.
- [25] Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments [J]. Blood, 2009,114(6):1141–1149.
- [26] Zhang Z, Zhou B, Zhang J, et al. Association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with risk of ovarian cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010,196(2):146–152.
- [27] Orsulic S, Li Y, Soslow RA, et al. Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system[J]. Cancer Cell, 2002,1(1):53–62.
- [28] Flesken-Nikitin A, Choi KC, Eng JP, et al. Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium[J]. Cancer Res, 2003,63(13):3459–3463.
- [29] Connolly DC, Bao R, Nikitin AY, et al. Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2003,63(6):1389–1397.
- [30] Chodankar R, Kwang S, Sangiorgi F, et al. Cell-nonautonomous induction of ovarian and uterine serous cystadenomas in mice lacking a functional Bca1 in ovarian granulosa cells[J]. Curr Biol, 2005,15(6):561–565.
- [31] Hong H, Yen HY, Brockmeyer A, et al. Changes in the mouse estrus cycle in response to BRCA1 inactivation suggest a potential link between risk factors for familial and sporadic ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(1):221–228.
- [32] Yen HY, Gabet Y, Liu Y, et al. Alterations in Bca1 expression in mouse ovarian granulosa cells have short-term and long-term consequences on estrogen-responsive organs[J]. Lab Invest, 2012,92(6):802–811.
- [33] Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation[J]. Nat Rev Cancer, 2009,9(6):415–428.
- [34] Fan HY, Liu Z, Paquet M, et al. Cell type-specific targeted mutations of Kras and Pten document proliferation arrest in granulosa cells versus oncogenic insult to ovarian surface epithelial cells[J]. Cancer Res, 2009,69(6):6463–6472.
- [35] Cancer genome atlas research network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma[J]. Nature, 2011, 474(7353):609–615.

广东省医师协会 检验医师分会2015年年会 暨第一届广东省检验与临床培训班

中国广州 2015.5.14-17
官方网站: www.nf1ab.net

主要内容

- (1) 检验医师规范化培训及师资培养;
- (2) 检验与临床沟通方法与技巧及检验医师在质量控制中的作用;
- (3) 循环系统与呼吸系统疾病实验室诊断;
- (4) 血液系统与消化系统疾病实验室诊断;
- (4) 风湿免疫与肾脏疾病实验室诊断;
- (5) 感染疾病实验室诊断;
- (5) 外科疾病与应急医学实验室诊断;
- (6) 妇儿疾病实验室诊断。

本次大会只接受网上投稿。

报名参会投稿网站: 南方检验医学网(www.nf1ab.net)

联系方式: 广东省医师协会: 罗思宇 020-83809407

南方医院检验科: 张鹏 020-61642140 元涛 020-62787683



南方检验医学
WWW.NFLAB.NET

分子诊断与治疗杂志 稿约

《分子诊断与治疗杂志》是由中山大学主管,面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物。本刊及时报道国内外分子医学新技术、新知识和新进展,集前瞻性、权威性、专业性于一身,是我国第一份以分子诊断与治疗为主要内容的科技学术期刊,也是我国分子诊断与治疗研究领域工作者的学术园地和交流平台,将成为我国分子诊断与治疗研究领域工作者在学术上走向世界的桥梁。国内统一刊号:CN44-1656/R,国际标准刊号:ISSN 1674-6929。

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,编号:GD272

中国期刊全文数据库全文必录期刊,编号:(Q)TH062

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,编号:(Z)Y0813

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

本刊设有《述评》、《论著》、《综述》、《前沿进展》、《专家笔谈》、《讲座》、《动态》和《专栏》等栏目。

内容涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等。

本刊以学术性和实践性为特色,欢迎各医疗相关领域的科研人员来稿。稿件要求和注意事项如下:

来稿内容应真实可靠、重点突出、论点明确、数据可信、层次清楚。论著、综述(包括图、表、参考文献)稿件字数控制在 5000 字以内,如确有需要,可适当延长。

论文应由摘要、关键词和正文组成,在结束时要有简单的总结。稿件须具备中英文题目、摘要、关键词和作者拼音名,中、英文必须一致;正确地引用参考文献;计量单位及符号应以国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》为准。

文题:简洁点题,以不超过 20 字为宜。

作者单位、署名:作者单位名称应包含省、市、区、县名和邮政编码。不同单位的多作者稿件应另起行写明第二或第三作者的姓名、单位名称、邮编。

摘要:属经验介绍、心得体会之类的短稿一般不要求写摘要,但属科研项目研究成果、调查分析和综述类的稿件必须有摘要。

关键词:3 ~ 8 个关键词,采用教育教学标准主题词,若规定标准词表中无该词的可使用自由词。

图表:正文、表、图三者中的数据不应重复。稿件内表或图应各有中英文表题、图题,同时必须有相应的表序号和图序号。采用三线表。

名词使用:文中使用的名词应注意全稿前后统一,须使用全国自然科学、社会科学名词委员会公布的各科名词,专用名词不随意缩写。

标点符号:请参照 GB/T 15834-2011《标点符号用法》进行。

参考文献:请依照中华人民共和国国家标准 GB/T7714-2005《文后参考文献著录规则》。

请勿一稿多投。本刊将对来稿进行及时处理。请自留底稿,恕不退稿。本刊对来稿有删改权,必要时根据专家审稿意见退给作者修改。

来稿请附作者的直接联系方式(电邮地址和电话),稿件请发到投稿邮箱。

来稿请寄:

广东省广州市高新技术开发区科学城香山路 19 号《分子诊断与治疗杂志》编辑部

邮政编码:510665

投稿邮箱:jmdt@vip.163.com

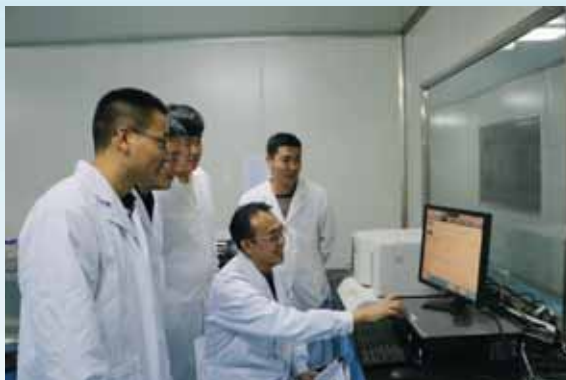
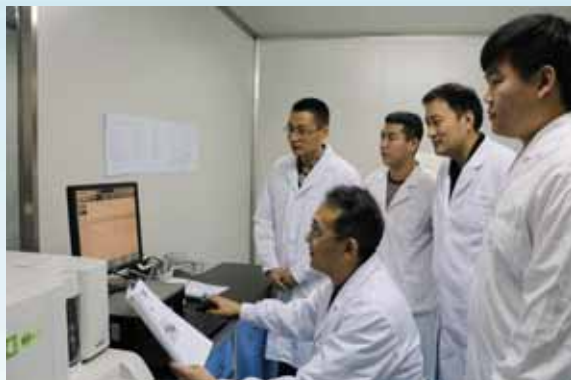
稿件查询电话:020-32290789-206, 020-32290177

天津市干细胞再生医学转化企业重点实验室

天津市干细胞再生医学转化企业重点实验室位于天津市空港经济区东九道 45 号，以天津和泽干细胞科技有限公司研发中心为主体，2014 年确定为天津市企业重点实验室——天津市干细胞再生医学转化企业重点实验室，2013 年获批为企业博士后工作站，现有在站博士后 1 人。实验室建筑面积 2600 平方米，划分为干细胞实验区、SPF 级实验动物区、分子生物学实验区、蛋白质学实验区、细胞培养区、病理实验区等 6 个功能区。整个中心实验室配备有国际先进的仪器设备，包括 OLYMPUS 荧光显微镜、ABI 实时定量 PCR 仪、Liuminex 液相多因子检测仪、BD 流式细胞仪、生物梅里埃自动血培养仪、Leica 冰冻切片机、Thermo 恒温培养箱、Beckman 离心机等，总值约 1000 万元。

该实验室以脐带间充质干细胞的应用研究为主攻方向，凭借多年的干细胞研究基础，创新出更为先进的干细胞分离方法，高效高质地分离脐带间充质干细胞及脂肪干细胞，克服了目前现有方法中存在的弊端，成功建立了国内首家脂肪干细胞库，为我国自体干细胞储存开辟了新的市场。脂肪干细胞可作为组织工程或细胞治疗新的同种异体种子细胞来源，同时还成为美容整形行业的新宠，受到无数爱美人士的追捧。还开发了胎盘造血干细胞及胎盘亚全能干细胞储存，有效解决了骨髓或动员后外周血来源不足，脐带血中造血干细胞数量不够成人使用等技术难题，拓展了干细胞治疗领域，为干细胞临床治疗提供了新的思路。在研究成体干细胞的同时，加大了产业化转化研究，成功研发出“脐带间充质干细胞抗肝纤维化注射液”、“脐带间充质干细胞免疫调节注射液”、“神经损伤干细胞修复液”、“青春源干细胞注射液”、“脐血来源 CIK 免疫细胞注射液”等系列产品。通过动物实验，得到人体使用的脐带间充质干细胞的推荐使用剂量。相续开发了一系列间充质干细胞相关产品，包括 2010 年以来承担“863”项目“干细胞促进围手术期肝脏再生修复和移植免疫耐受的应用研究”，天津市科技型中小企业创新资金项目和天津滨海新区科技小巨人成长计划项目，还有天津市企业重点实验室平台建设项目“干细胞药物研制技术平台建设”。目前已经获得多项研发技术成果，拥有多个干细胞相关的自主知识产权。申请发明专利 9 项，其中 4 项已获得授权；申请并授权的实用新型专利有 7 项。发表相关论文 20 余篇，其中 SCI 收录 10 余篇。

学科带头人刘拥军毕业于北京协和医学院中国医学科学院，2006 年被聘为中国医学科学院血液学研究所硕士研究生导师，是国家基金委员会医学科学部评审专家组成员、上海同济大学医学院的客座教授。2009 年离开高校，创办干细胞公司，长期从事脐带间充质干细胞的应用研究，在脐带间充质干细胞的大规模培养及临床应用等方面积累了丰富的经验。



实验室研究团队

→ 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