



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

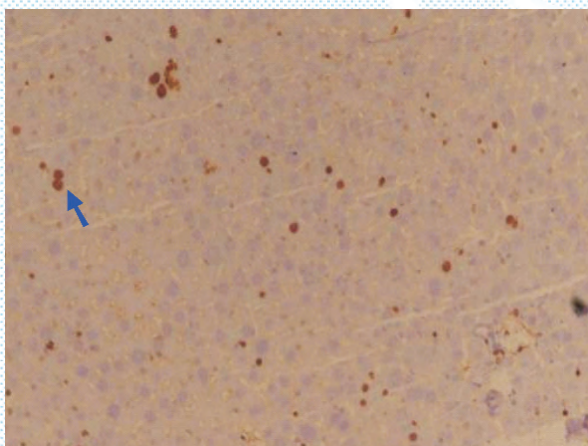
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2015年11月 第7卷 第6期 总第40期

JOURNAL OF

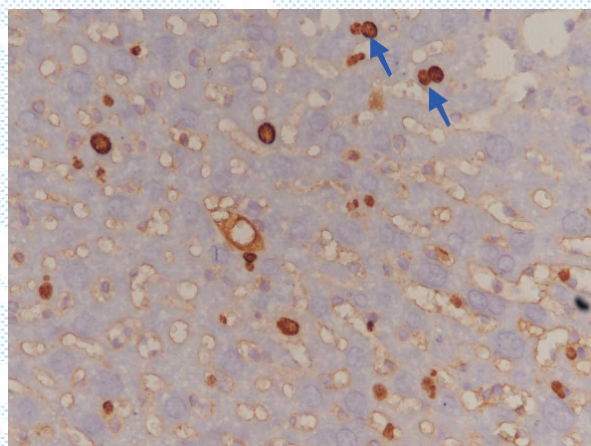
MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 7 Number 6 November 2015



图(P389) 正常组肝组织 ki67 的表达($\times 200$)

Figure(P389) Ki67 in liver of normal group($\times 200$)



图(P389) 移植组肝组织 ki67 的表达($\times 400$)

Figure(P389) Ki67 in liver of transplantation group($\times 400$)

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



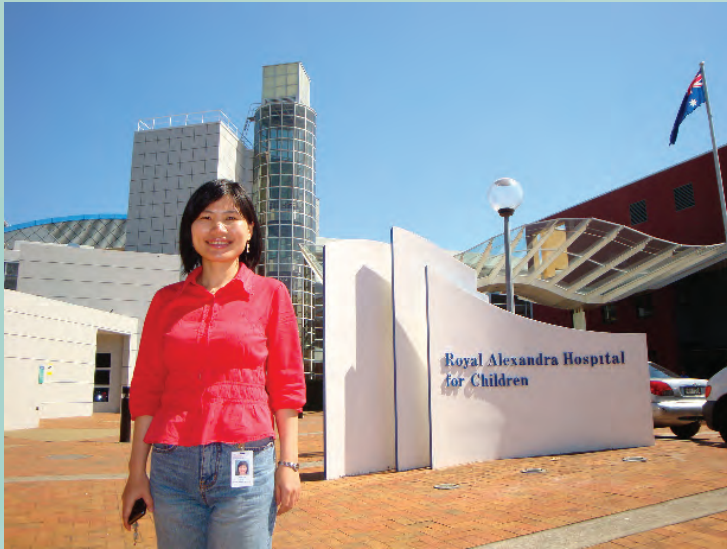
中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊
中国期刊全文数据库全文必录期刊
中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
中文生物医学期刊文献数据库收录期刊
中国生物医学期刊引文数据库收录期刊

分子诊断与治疗杂志

二〇一五年十一月

第七卷 第六期

中山大学



尹爱华

尹爱华，《分子诊断与治疗杂志》学术指导委员会委员、审稿专家。

1975年1月出生。2001年毕业于中山大学医学院，获硕士学位。2003年调入广东省妇幼保健院医学遗传中心工作至今。2007年毕业于中山大学医学院，获博士学位。2006年5月至2007年5

月在香港大学妇产科系产前诊断中心进修遗传咨询、产前诊断介入性手术、产前诊断实验室质量控制等技术；2008年11月至2009年3月在悉尼大学附属儿童医院遗传中心进修分子遗传与细胞遗传相关技术。

教授，副主任医师，博士研究生导师。现任广东省妇幼保健院番禺院区副主任、医学遗传中心主任及广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室副主任。并担任中国妇幼保健协会细胞分子遗传专业专家委员会副主任委员、中华医学会医学遗传学分会临床遗传学学组委员、中国优生优育协会常务理事、出生缺陷防治专业委员会副主任委员、广东省医学遗传学会常务委员、广东省地中海贫血防治协会副会长兼常务理事、广东省妇幼保健协会常务理事、广东省地贫防控项目专家组组长、广东省优生优育协会分子遗传与生化遗传常务委员兼第六届理事会专家委员会遗传咨询专业委员会委员。

尹爱华2003年调入广东省妇幼保健院医学遗传中心后一直从事出生缺陷的防治临床和科研工作，创建了广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室、临床基因扩增检验实验室、广东省妇幼保健院司法物证鉴定所、转化医学和生物样本库等，为出生缺陷防治作出了突出的贡献，在分子遗传病产前诊断和无创产前诊断有较深的学术造诣。近十年来，通过带领团队进行产前筛查和诊断，避免了近2500例重型地贫患儿和近1500例唐氏宝宝出生，挽救了近4000个家庭的幸福，为社会节约经济负担约40亿。承担及完成国家自然科学基金项目、国家863计划子项目及省、市部级重点课题近10项，获得国家教育部科技进步二等奖1项、国家科技进步奖二等奖1项、广东省科技进步一等奖1项、广州市科技进步一等奖1项、国家发明专利5项、计算机软件著作权1项。2006年被评为广东省妇幼保健院“百佳十优”医务人员，2008年荣获“广东青年五四奖章”候选人提名奖。2013年被广东省医学会评为广东省首届医疗技术临床应用能力审核申报优秀技术负责人。2014年荣获“广东青年五四奖章”。在SCI收录期刊和核心期刊发表论文近100篇，其中SCI收录近20篇（包括“Nat. Commun.” “EBioMedicine” “Proc Natl Acad Sci” “Plos One” “Am J Hematol” “Molecular Cytogenetics” “BMC Medical Genomics” “Modern Pathology”等）。副主编及参编专著2部。招收和培养博士及硕士研究生6名，已毕业硕士研究生3名。

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正规科技学术期刊，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。

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

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、蛋白分子治疗等内容。

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收录期刊，编号：001922

中国生物医学期刊引文数据库收录期刊，编号：001922

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的来稿，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：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。

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：020-32290177

《分子诊断与治疗杂志》第四届编辑委员会名单

(以姓氏汉语拼音排序, *为常务编委)

顾问	来茂德	申子瑜							
名誉主编	何蕴韶								
主编	李明								
副主编	高尚先	李金明	陆满晴	王前	徐伟文				
编辑委员	Endi WANG	陈昌杰	陈葳	程筱雯	戴二黑	戴盛明	丁彦青	范骏	
	符生苗	高尚先*	耿明	郭建巍	何蕴韶*	黄彬	黄华艺	姜晓峰	
	来茂德*	李代强	李金明*	李丽	李连青	李明*	李廷富	鲁凤民	
	陆满晴*	吕建新*	梅冰	钱程*	阮强	申子瑜*	沈佐君	孙青	
	万海英	王连唐	王前*	王小中	王哲	韦叶生*	魏军	温旺荣	
	温志国	邬玲仟	吴英松	伍严安	徐伟文*	许泼实	闫玉生	杨惠玲	
	杨立业	尹一兵	于农	张华	赵建宏	赵建华	郑磊	朱宝生	
	朱明华								
特邀编委	曹小飞	陈开红	程邦宁	董海新	黄莉萍	黄山	黎青	李春林	
	李辉	李鲁平	刘世国	卢忠心	欧志英	潘国庆	盛磊	唐吉斌	
	托娅	杨伟国	杨学文	曾赤佳	张艳亮	赵亚朴			

Members of the 4th Editorial Board of Journal of Molecular Diagnostics and Therapy Honorary Editor in Chief

Consultants

LAI Maode SHEN Ziyu

Honorary Editor in Chief

HE Yunshao

Editor in Chief

LI Ming

Associate Editors in Chief

GAO Shangxian LI Jinming LU Manqing WANG Qian XU Weiwen

Members of the Editorial Board

Endi WANG CHEN Changjie CHEN Wei CHENG Xiaowen DAI Erhei DAI Shengming DING Yanqing
FAN Jun FU Shengmiao GAO Shangxian* GENG Ming GUO Jianwei HE Yunshao* HUANG Bin
HUANG Huayi JIANG Xiaofeng LAI Maode* LI Daiqiang LI Jinming* LI Li LI Lianqing
LI Ming* LI Tingfu LU Fengmin LU Manqing* LV Jianxin* MEI Bing QIAN Cheng*
RUAN Qiang SHEN Ziyu* SHEN Zuojun SUN Qing WAN Haiying WANG Liantang WANG Qian*
WANG Xiaozhong WANG Zhe WEI Yesheng* WEI Jun WEN Wangrong WEN Zhiguo WU Lingqian
WU Yingsong WU Yanan XU Weiwen* XU Poshi YAN Yusheng YANG Huiling YANG Liye
YIN Yibing YU Nong ZHANG Hua ZHAO Jianhong ZHAO Jianhua ZHENG Lei ZHU Baosheng
ZHU Minghua

Guest Members of the Editorial Board

CAO Xiaofei CHEN Kaihong CHENG Bangning DONG Haixin HUAGN Liping HUANG Shan LI Qing
LI Chunlin LI Hui LI Luping LIU Shiguo LU Zhongxin OU Zhiying PAN Guoqing
SHEGN Lei TANG Jibin TUO Ya YANG Weiguo YANG Xuwen ZENG Chijia ZHANG Yanliang
ZHAO Yapu

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2015 年 11 月 第 7 卷 第 6 期 总第 40 期 Bimonthly Volume 7 Number 6 November 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 国内外公开发售
广告经营许可证 粤工商广字第 01139 号
印刷 广州中大印刷有限公司
出版日期 2015 年 11 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, China 510620
Tel (020)32290177 32290789-206
Fax (020)32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.
Publish Date 2015.11.18
Price RMB 15.00

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2015年11月 第7卷 第6期

目次

述 评

液态活检技术的发展及肿瘤领域的应用 陈颖 朱明华 (361)

论 著

广西人群 TGF- β 1 基因 rs1800469 C/T 遗传多态性的研究
..... 黄华佗 罗宏成 向阳 等 (367)

治疗前 NLR 和 PLR 对宫颈鳞癌患者预后的影响 郭煦 谢洪哲 柯尊富 (372)

血清脂联素、TNF- α 、CRP 联合检测在脓毒症患者中的临床应用价值 樊兵 胥顺 (383)

c-Kit⁺ Lin⁻ 细胞移植改善急性肝损伤的实验研究 张守华 杨慎华 杨文萍 等 (387)

NDRG1 与 E-cadherin 下调表达及其与胃癌淋巴结转移的关系研究
..... 廖爱辉 刘展 雷志胜 (392)

广东地区地中海贫血孕妇全血微量元素含量分析 兰菲菲 梁凯玲 杜丽 等 (397)

柳州市 2014 年手足口病实验室检测结果分析 许泽辉 罗世强 王敬仁 等 (401)

新疆伊犁州维吾尔族 20 个 STR 基因座的遗传多态性 高波 邱平明 (407)

反流性食管炎患者食管动力改变与幽门螺杆菌感染关系的研究 邱彩玉 (412)

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定蜂蜜中 5 种四环素类抗生素的探讨
..... 刘兆峰 钟启升 (416)

综 述

microRNA 与乙型肝炎病情转归的关系 张秀华 吴园园 (422)

胃癌 microRNA 表达谱分析及其意义 宋雅琴 温旺荣 (427)

专家风采

尹爱华 (封二)

实验室巡礼

广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 6 November 2015

CONTENTS

COMMENTS

- Recent advances of liquid biopsy and its application in medical oncology
CHEN Ying, ZHU Minghua (361)

ORIGINAL ARTICLES

- The genetic polymorphism of TGF- β 1 gene rs1800469C/T in Guangxi populations
HUANG Huatuo, LUO Hongcheng, XIANG Yang, CHEN Jianming, WU Chengjiang, WEI Yesheng (367)
- Effect of NLR and PLR from pre-treatment on the prognosis of patients with cervical squamous cell carcinoma
GUO Xu, XIE Hongzhe, KE Zunfu (372)
- Clinical application values of a combinational detection of serum adiponectin, TNF- α , CRP in patients with sepsis
FAN Bing, XU Shun (383)
- The study of transplantation of c-Kit⁺Lin⁻ cell for treatment of acute liver injure
ZHANG Shouhua, YANG Shenhua, YANG Wenping, XU Hongyan, LEI Jun, HUANG Hui, LIU Zhiqiang, TAO Qiang (387)
- The relationship study between the down expression of NDRG1 and E-cadherin with lymphonode metastasis in gastric cancer
LIAO Aihui, LIU Zhan, LEI Zhisheng (392)
- Analysis of microelement levels in pregnant woman with thalassemia in Guangdong area
LAN Feifei, LIANG Kailing, DU Li, YIN Aihua (397)
- Analysis of the laboratory diagnosis results of hand-foot-mouth disease in 2014 in Liuzhou city
XU Zehui, LUO Shiqiang, WANG Jingren, CAI Pengfei, QIN Xiao, TANG Ning (401)
- The genetic polymorphism of 20 STR loci in Uygur population of Yili of Xinjiang
GAO Bo, QIU Pingming (407)
- Study on the association of esophageal motility change and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis
QIU Caiyu (412)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 6 November 2015

CONTENTS

Discussion on determination of 5 kinds of tetracyclines residues in honey by ultra-performance

liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry

LIU Zhaofeng, ZHONG Qisheng (416)

REVIEWS

The relationship between microRNA and prognosis of hepatitis B

ZHANG Xiuhua WU Yuanyuan (422)

MicroRNA expression profiling and function in gastric cancer

SONG Yaqin, WEN Wangrong (427)

液态活检技术的发展及肿瘤领域的应用

陈颖 朱明华*

[摘要] 广义而言,液态活检是指以血液为主的体液标本中细胞及核酸的检测,包括了循环肿瘤细胞和游离 DNA 两大类。液态活检属于新型的无创性分子病理检测方式,具有广阔的临床应用前景;对于传统病理学而言,液态活检的出现既是机遇也是挑战。本文主要从分子检测技术以及临床应用价值这两方面综合阐述了液态活检作为一种新的非侵入式的检测方法在临床肿瘤早期诊断、筛查等领域的发展前景及面临的挑战。

[关键词] 液态活检;非侵入式检测;分子检测

Recent advances of liquid biopsy and its application in medical oncology

CHEN Ying, ZHU Minghua*

(Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, China, 200433)

[ABSTRACT] Liquid biopsy refers to the analyses of circulating tumor cells or cell-free fragments of DNA that mainly exist in the bloodstream and other body fluid. Liquid biopsy is a novel kind of non-invasive technique and has a wide prospect of clinical application in the molecular pathological field. The occurrence of liquid biopsy is both an opportunity and challenge towards traditional histopathology. In this paper, the advances in the emerging new techniques of liquid biopsy and its clinical application values in the field of cancer care, including prognosis assessment, early cancer screening and prediction of treatment responses will be reviewed.

[KEY WORDS] Liquid biopsy; Non-invasive analysis; Molecular test

组织病理学是在显微镜下直接观察病变组织的形态学改变,因而病理诊断被誉为是疾病诊断的“金标准”,在临床诊断中具有不可动摇的地位^[1]。随着分子生物学研究日益发展,人类对疾病的认识也不再局限于表型和形态学,根据肿瘤发生的分子机制,形成了分子病理学。分子病理学的研究对象十分广泛,包含了组织、细胞和体液,而“液态活检”(liquid biopsy)就是其中的重要分支之一。

“液态活检”这一概念最早在 1974 年由 Sorrells 等^[2]提出,当时指关节腔的滑液分析用于诊断滑膜疾病。液态活检的标本来源主要为以血液为

主的体液,其中包括胸水、腹水等其他体液成分,而血液是最容易获得的临床标本。本文详细总结了液态活检的对象、方法和应用领域,旨在为肿瘤的诊断和治疗提供新的手段,为病人的预后和转归提供新的依据。

1 液态活检的研究对象

液态活检的研究对象主要包括外周血循环中存在的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)和游离 DNA(cell-free DNA, cfDNA)两大类。

基金项目:国家自然科学基金(81172310)

作者单位:第二军医大学附属长海医院病理科,上海 200433

*通讯作者:朱明华, E-mail: mhzhu2000@hotmail.com

1.1 循环肿瘤细胞

CTCs的概念雏形最早于1869年由Ashworth提出^[3]。当时Ashworth设想,血液循环中可能存在与原发病灶性质相同的肿瘤细胞,而这正是患者体内肿瘤的播散机制。越来越多的研究证实肿瘤患者的外周循环中存在以小簇、团状形式存在的肿瘤细胞,现在认为CTCs是恶性肿瘤出现血路转移的主要生物学基础,其数量的多少与患者的预后关系密切^[4]。早期关于CTCs的研究主要集中于乳腺癌,30%~40%左右的乳腺癌患者的外周血或骨髓中可以检测到CTCs,尤其在缺乏明确淋巴结及远处器官转移、临床分期早期患者的体内就存在,是预测患者未来发生转移的独立预后因素^[5]。随着肿瘤特异性标记物应用的广泛开展和检测敏感性的提高,在许多恶性肿瘤如肺癌^[6]、胰腺癌^[7]、前列腺癌^[8]、膀胱癌^[9]、大肠癌^[10]等中均能发现CTCs,而且检出率也要远远高于上述的比例,甚至还有学者将CTCs形容为实体瘤的“白血病样”阶段(leukemic phase)^[11]。肿瘤进展过程中,肿瘤细胞通过基因突变或表观遗传学改变等而获得了更具侵袭能力的生物表型或干细胞特性,其中上皮-间叶转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)被认为是CTCs出现的主要机制之一^[12]。由此看来,CTCs与其起源的原发病灶中的肿瘤细胞虽然相似,但是两者之间并不存在完全相同基因谱或表达谱系。大量的临床试验均证实,CTCs具有很强的预后判断和转移预测价值^[13],因此通过研究CTCs的生物学和遗传学特性相较于原发灶具有更丰富的临床指导意义。

1.2 循环肿瘤DNA

1948年Mandel和Metais^[14]在人类血循环中发现了游离DNA的存在,称之为“Cell-free DNA”(cfDNA)。此后,cfDNA的检测开始增多,尤其是作为无创性检测手段(non-invasive prenatal testing, NIPT)应用于高危孕妇的产前诊断,比如唐氏综合症^[15]、先兆子痫^[16]等。

目前发现肿瘤患者的外周血中也能检测到游离核酸(cell-free nuclear acids, cfNAs)的存在^[17],认为是由肿瘤细胞产生的,其中以基因组和线粒体DNA成分为主,也被称为循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA),其他还包括RNA和microRNA。肿瘤细胞可以是来自组织中的病灶,也

可以来自外周血或骨髓中存在的微转移癌栓或CTCs^[18]。肿瘤细胞产生ctDNA主要通过被动和主动机制2种途径来完成。被动机制是指凋亡和坏死的细胞会释放出细胞核和线粒体DNA进入血液循环^[19]。在正常生理情况下,释放的DNA数量不多,单核巨噬细胞能及时清除坏死和凋亡细胞的碎片,因此正常人群外周血中的游离DNA含量几乎测不出来。而肿瘤患者体内由于肿瘤细胞生长快速,坏死和凋亡的细胞数目明显增加,释放的DNA数量也多,再加上肿瘤免疫功能的紊乱,不能及时清除,因而造成较多的ctDNA进入外周血循环^[20]。主动机制则是指肿瘤细胞能主动释放DNA到外周循环之中。研究发现,在前列腺癌^[18]、肺癌^[21]、乳腺癌^[22]、大肠癌^[23]、肝癌^[24]、膀胱癌^[25]、宫颈癌^[26]、胰腺癌^[27]、卵巢癌^[28]等人类恶性肿瘤中均能检测到ctDNA。外周血中提取得到的ctDNA包含了编码和非编码DNA,可以用于肿瘤相关基因的遗传学和表观遗传学研究,如基因突变、异常扩增、杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)、微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)、特异性靶点标记、表达谱分析、miRNA研究、染色体分析以及甲基化等,用于指导临床用药、判断预后、化疗效果评估、耐药性检测、监测病程进展以及复发转移的预测等方面。

2 常用检测技术

2.1 CTCs分离、富集相关技术

2.1.1 免疫磁珠富集法(immunomagnetic beads separation, IMS)

IMS技术基于细胞表面的抗原与连有特异性抗体的磁珠相结合,并在外源磁场的作用下富集细胞,其根据分离的策略可以分为阳性富集法和阴性富集法两大类。阳性富集法是指磁珠结合得到的细胞就是所需要的细胞。目前唯一已获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市的CELLSEARCH®循环肿瘤细胞检测试剂盒就是针对细胞表面的上皮细胞粘附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)来分离CTCs。该试剂盒提出了具有临床预后判断意义的CTCs的检出数目:转移性乳腺癌和前列腺中,CTCs数目小于5个/7.5 mL外周血表明患者预后较好;转移性大肠癌中,CTCs数目小于3个/7.5

mL外周血表明患者预后较好。根据 CTCs 的含量与临床预后的关联其他还在研究阶段的磁珠包被标记物如广谱标记物(全角蛋白)和其他肿瘤类型相关标记物如 CerBb2、Mucin、AFP 等。此外,用于分离 CTCs 的标记物除了蛋白质类标记物,还包括了 mRNA 和端粒酶类的标记物^[29],提高了 CTCs 的检出效率。但是肿瘤相关的标记物的种类非常繁杂,并没有一个标记物能“放之四海而皆准”。基于这些情况产生了阴性富集法。所谓阴性富集法是指磁珠结合得到的细胞不是所需要的细胞,主要应用了针对白细胞的广谱标记物 CD45,在磁场作用中剔除了有核细胞游中的白细胞,其中未被结合的细胞就是所需要的 CTCs^[30],能大大增加 CTCs 的检出数量。但是免疫磁珠法仍然受到标记物的限制,由于肿瘤细胞与正常细胞存在交叉抗原表达,并且肿瘤细胞本身存在显著异质性,同一个患者得到的 CTCs 并不会表达一致性的标记,因此容易出现假阳性或假阴性的结果。

2.1.2 CTCs 芯片技术

2007年,麻省总医院开发了第一代 CTCs 芯片,能从外周血中分离得到 CTCs^[31]。第一代 CTCs 芯片是基于微流体学原理,以微阵列的方式将针对 CTCs 细胞表面标记物——EpCAM 的抗体包被在芯片上,当血液样本通过芯片时,就能通过抗体将其中的 CTCs 细胞捕获下来。经过验证,Nagrath 等发现该芯片技术能高效地获取 99% 的转移性乳腺癌、肺癌、胰腺癌以及结肠癌患者外周血中的 CTCs,捕获的细胞数目范围在 5 个~1 281 个细胞/mL^[31]。2010年,Stott 等在第一代 CTCs 芯片的基础上经过改良,研发了第二代芯片,因为其阵列类似鱼骨样,因此被称为鲱鱼骨芯片(herringbone-chip, HB-chip)^[32]。与第一代平板型的芯片不同,第二代根据微流体涡流原理设计了弯道型的内槽,增加了细胞与包被抗体时间的接触时间,显著提高了 CTCs 的获取效率。因为第二代芯片表面设置的是透明的外壳,因此在芯片上还能进行各种原位检测,如苏木素-伊红染色、免疫荧光染色等,透过芯片通过显微镜能直观地观察 CTCs 的形态学特征和染色结果。但是由于目前报道较少,CTCs 芯片尚需要得到大规模样本的验证才能真正投入临床应用。

2.1.3 密度梯度离心法 (density gradient centrifuge, DGC)

DGC 技术基于 CTCs 与有核白细胞具有不同的漂浮系数的原理,在等渗溶液中提取 CTCs。商品化的等渗溶液有 LymphoPrep™、Ficoll-HyPaque™、Oncoquick[®] 等产品。StemCell 公司开发的 Rosette-Sep™ 人类循环上皮类肿瘤细胞试剂盒在密度梯度离心的基础上还添加了针对白细胞的抗体四聚体以增加其沉降效率,减少白细胞对 CTCs 的干扰。这些检测方法仍然存在灵敏度较低的缺陷,无法捕捉到少量、稀有的 CTCs。

2.1.4 滤过膜分离法 (filter membrane filtration, FMF)

FMF 技术基于 CTCs 的细胞体积显著大于白细胞的原理,采用一定孔径的滤过膜将 CTCs 从血液中分离出来,也被称为膜滤过分离肿瘤细胞技术 (isolation by size of epithelial tumor cells, ISET),每毫升血液中可以提取到至少 1 个肿瘤细胞^[33]。由于 ISET 法分离 CTCs 主要基于细胞的体积而不是细胞表面的相关抗原,因此主要适用于异质性明显的恶性肿瘤如肺癌、胃癌和前列腺癌等,大大降低了由于抗原交叉表达或差异表达而导致的假阳性率^[34]。但正因为如此,ISET 法只能分离得到体积较大的 CTCs,对于那些体积较小的 CTCs 就容易滤过,从而得到假阴性的结果。研究者^[35]研发了一种结合滤过膜和微机电原理的 CTCs 分离及原位电裂解系统 (micro-electro-mechanical system/MEMS-based *in situ* cell lysis),其能更高效地分离 CTCs 并及时抽提细胞基因组 DNA。

2.1.5 基于流式细胞仪的 CTCs 富集法 (flow cytometry-based CTCs enrichment, ImageStream[®])

该方法主要针对肿瘤细胞表面特异性抗原并应用流式细胞仪的细胞分选技术筛选分离得到表达相应标记物的 CTCs,可选用的标记物包括了角蛋白 (cytokeratin)、CA19-9、甲胎蛋白、癌胚抗原、表皮生长因子受体等多种肿瘤相关分子。同样,由于肿瘤细胞与正常细胞之间的交叉抗原表达,这种 CTCs 的富集方法也受到了标记物的限制,容易出现假阳性的结果,不能完全保证 CTCs 的纯度。

2.2 ctDNA 分离及检测技术

2.2.1 ctDNA 分离技术

ctDNA 由于片段较小、含量很少,而且容易和

血浆蛋白相结合,因而常规的提取效率都不高。针对血浆中 ctDNA 的抽提原理主要有四大类:盐析法、酚-氯仿抽提法、微柱吸附法和磁珠吸附法。目前商品化的试剂盒绝大多数都是基于以上后两种原理研发的。而传统的盐析法和酚-氯仿法由于操作步骤复杂、需要使用有机溶剂、ctDNA 的提取效率较低,现在基本上已经不再使用了。通过比较各类试剂盒发现,磁珠法获得的 ctDNA 在质量和含量上都要优于微柱吸附法,假阳性率也较低^[36]。

2.2.2 ctDNA 检测技术

ctDNA 研究的关键技术是如何从外周血中分离得到足够量的、高质量的游离 DNA,相对而言该检测技术比较简单。ctDNA 检测技术根据检测目的来选择相应的技术方法,其中大部分是以 PCR 技术为基础,如实时荧光定量 PCR、甲基化特异性 PCR 等,也有基于微珠富集原理的方法^[36]。目前,ctDNA 检测技术已经广泛地应用于 *K-ras*、*BRAF*、*HER-2*、*p53*、*EGFR*、*APC* 等肿瘤靶向治疗、诊断及预后相关标记的检测。尤其是新一代测序技术飞速发展的今天,基于 ctDNA 的全基因组测序、全外显子测序或全转录本深度测序方法将逐渐替代原来传统的基因突变或测序方法,也将探索出越来越多的肿瘤相关片段,如耐药、恶性生物学行为等方面。

3 临床应用价值

3.1 临床疗效监测

由于 ctDNA 和 CTCs 的分离和检测属于无创性检测手段,从外周血中提取即能实现,因此很适合临床上用于监测肿瘤患者的疾病发展及对药物治疗的反应性以及耐药情况,尤其是药物靶向治疗。肿瘤细胞在药物作用过程中会通过表型和基因改变形成耐药性克隆而产生继发性耐药现象,目前看来,这是影响药物治疗效果的主要原因。研究者对乳腺癌、卵巢癌和肺癌患者在接受常规化疗的不同时相的外周血中游离 DNA 进行了全外显子测序,从中筛选得到了一系列基因的改变,如 *PIK3CA*、*EGFR*(耐药相关突变 T790M)、*RBI* 等基因的突变,可以以此作为监测化疗疗效的良好靶标^[37-38]。

3.2 预后判断及临床分期

早期诊断、准确分期以及治疗监测是临床肿瘤学中的重要内容。以往的 TNM (tumor, nodal

metastasis 和 distant metastasis) 分期主要是基于肿瘤的临床特征,如肿瘤大小、侵犯周围组织的情况、淋巴结和远处器官转移情况。组织活检由于对病人造成一定程度的创伤,往往不能反复多次进行。肿瘤的原发灶和转移灶之间存在遗传学、表观遗传学甚至转录组学的差异。利用外周血中的 CTCs 或 ctDNA 能更准确、更高效评估肿瘤的进展,尤其是对于那些不宜进行活检的患者。

2012 年美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 重新修订了乳腺癌的 TNM 分期标准,将“缺乏临床或影像学证据证实的远处转移、但在外周循环、骨髓或其他远处组织内通过分子生物学或显微镜观察确定存在的、小于 0.2 mm 的转移灶定位 cM0 (i+) 期”,确定了 CTCs 及 ctDNA 的重要临床意义。

研究表明,外周血中出现高频的肿瘤相关基因突变如 *p53*、*KRAS* 和 *APC* 等,往往与较高的临床分期有关,也预示着患者较差的预后^[39]。研究者根据检测结肠癌患者经过化疗后血浆 ctDNA 中相关基因突变情况,筛选了一套用于预后相关的突变基因谱,认为能近乎 100%地预测患者的复发情况^[36]。2014 年,斯坦福大学的研究者提出了一种基于 NimbleGen 基因序列捕获技术的 ctDNA 深度测序检测方法,称为癌症个体化深度测序分析方法 (cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq)。该项技术主要根据已知的肿瘤基因突变数据库中通过生物信息学筛选得到与肿瘤复发相关的基因,将这些基因的突变区域定制了靶向序列捕获的筛选器,并在此基础上进行深度测序^[40]。研究者认为应用 CAPP-Seq 技术分析外周血中分离得到的 ctDNA,能准确确定患者的基因型,检测结果与常规活检标本得到的结果没有差别,该技术也有望能取代组织学活检而成为肿瘤基因检测的金标准。目前,ctDNA 或 CTCs 能否作为肿瘤复发的检测指标而广泛应用于临床还有赖于大样本、多中心的临床试验进一步证实。

3.3 肿瘤个体化治疗靶标

实体肿瘤具有明显的细胞异质性,不同的肿瘤患者之间同样也具有明显的异质性,对放疗的反应均不相同,尤其是随着分子靶向药物的应用,令这种个体差异性与套餐式的治疗策略之间的矛盾日益突出。根据每个肿瘤患者的“个性”制定个体化的治疗方案已经成为了肿瘤辅助治疗的必然发展方

向。相对于有创性组织活检,检测肿瘤患者外周血或体液中的 CTCs 或 ctDNA 的途径就非常简便,可以做到随时取样、随时监测,也不会造成医源性播散。研究者开发了基于新一代单分子测序手段的 GUARDANT360 技术,通过检测恶性肿瘤患者血液里 ctDNA 的基因型来判断临床预后以及化疗效果^[41]。

4 小结和展望

相较于传统的组织活检或固相活检,液态活检的优势十分明显。由于样本来源是体液,尤其是血液,临床获得样本途径非常简便,可以做到随时取样、随时监测,也不会造成医源性播散。但是液态活检有一定的局限性。其一,对于 ctDNA 而言,ctDNA 由于存在于外周循环中,含量很低,而且容易受到循环中非肿瘤细胞来源的野生型核酸的稀释干扰,降低了检测手段的敏感性;对于 CTCs,需要找到合理配伍的肿瘤细胞标记物,增加 CTCs 的检出效率。其二,进行 ctDNA 和 CTCs 分析之前的样本收集、处理等环节必须标准化,以降低各实验室之间的差异。其三,应用 CTCs 和 ctDNA 用于预测临床转移、复发,尤其对于 M0 分期、临床没有明确转移的患者,设定其外周血中 CTCs 和 ctDNA 的含量的阈值。

目前液态活检仍处于研究的初级阶段,尚需要大量大规模、多中心的研究进一步证实其临床应用价值。以形态病理学为基础,以分子病理学为辅助,两者相辅相成,液态活检将为人地更深入地了解疾病的本质提供更丰富的、可靠的手段。

参考文献

- [1] Wikipedia. Pathology[EB/OL]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pathology>, 2015-04-02/2015-05-20.
- [2] Sorrells RB. Synovioanalysis ("liquid biopsy")[J]. J Ark Med Soc, 1974, 71(1):59-62.
- [3] Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death [J]. Australian Medical Journal, 1869, 14:146-147.
- [4] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(9): 623-631.
- [5] Braun S, Pantel K, Muller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer[J]. N Engl J Med, 2000, 342(8):525-533.
- [6] Wong MP. Circulating tumor cells as lung cancer biomarkers[J]. J Thorac Dis, 2012, 4(6):631-634.
- [7] Iwanicki-Caron I, Basile P, Toure E, et al. Usefulness of circulating tumor cell detection in pancreatic adenocarcinoma diagnosis[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(1):152-155.
- [8] Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(12):3903-3012.
- [9] Gazzaniga P, de Berardinis E, Raimondi C, et al. Circulating tumor cells detection has independent prognostic impact in high-risk non-muscle invasive bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2014, 135(8):1978-1982.
- [10] Lighthart ST, Coumans FA, Bidard FC, et al. Circulating tumor cells count and morphological features in breast, colorectal and prostate cancer[J]. Plos One, 2013, 8(6): e67148.
- [11] Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, et al. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(3):130-139.
- [12] Mego M, Gao H, Lee BN, et al. Prognostic value of EMT-circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients undergoing high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation[J]. J Cancer, 2012, 3:369-380.
- [13] Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2014, 11(3):129-144.
- [14] Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme[J]. CR Acad Sci Paris, 1948, 142(3/4):241-243.
- [15] Lewis C, Silcock C, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing for down's syndrome: pregnant women's views and likely uptake[J]. Public Health Genomics, 2013, 16(5):223-232.
- [16] Cuckle H, Benn P, Pergament E. Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014, 27(3):320-321.
- [17] Heitzer E, Auer M, Ulz P, et al. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies[J]. Genome Med, 2013, 5(8):73.
- [18] Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for

- circulating tumor cells in prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3):1032–1038.
- [19] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6):426–437.
- [20] Pisetsky DS, Fairhurst AM. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells [J]. *Autoimmunity*, 2007, 40(4):281–284.
- [21] Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(1–2):179–188.
- [22] Friel AM, Corcoran C, Crown J, et al. Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(3):613–625.
- [23] Lefebvre B, Charbonnier F, Di Fiore F, et al. Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer[J]. *Ann Surg*, 2010, 251(2):275–280.
- [24] Zhou J, Shi YH, Fan J. Circulating cell-free nucleic acids: promising biomarkers of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4):440–448.
- [25] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224.
- [26] Javier MG, Sastre-Garau X. Uterine cervix carcinoma: recent biological data and update for improving follow-up and treatment[J]. *Isr Med Assoc J*, 2012, 14(11):700–704.
- [27] Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer[J]. *Cancer*, 2015, doi: 10.1002/cncr.29364.
- [28] Martignetti JA, Camacho-Vanegas O, Priedigkeit N, et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(1):97–103.
- [29] Kim SJ, Masago A, Tamaki Y, et al. A novel approach using telomerase-specific replication-selective adenovirus for detection of circulating tumor cells in breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(3):765–773.
- [30] Hyun KA, Lee TY, Jung HI. Negative enrichment of circulating tumor cells using a geometrically activated surface interaction chip[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(9):4439–4445.
- [31] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1235–1239.
- [32] Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(43):18392–18397.
- [33] Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1):57–63.
- [34] Zheng S, Lin H, Liu JQ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells[J]. *Journal of chromatography A*, 2007, 1162(2):154–161.
- [35] Farace F, Massard C, Vimond N, et al. A direct comparison of cell search and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(6):847–853.
- [36] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9):985–990.
- [37] Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA[J]. *Nature*, 2013, 497(7447):108–112.
- [38] Austin LK, Fortina P, Sebanovic D, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) as a molecular monitoring tool in metastatic breast cancer (MBC)[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(suppl):5s.
- [39] Nygaard AD, Garm Spindler KL, Pallisgaard N, et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(3):312–317.
- [40] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. *Nat Me*, 2014, 20(5):548–554.
- [41] Talasz A, Mortimer S, Sebanovic D, et al. Use of the GUARDANT360 noninvasive tumor sequencing assay on 300 patients across colorectal, melanoma, lung, breast, and prostate cancers and its clinical utility[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(suppl):e22041.

广西人群 TGF- β 1 基因 rs1800469 C/T 遗传多态性的研究

黄华佗 罗宏成 向阳 陈健明 吴成将 韦叶生*

[摘要] 目的 研究转化生长因子 β 1(TGF- β 1)基因 rs1800469C/T 位点多态性等位基因及基因型在广西人群中的分布频率,比较其在不同种族间的分布差异。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术和 DNA 测序法检测 210 例广西人群 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点多态性,并结合文献进行不同种族间的比较分析。结果 广西人群中,TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点表现出 CC、CT、TT 三种基因型,频率分别为 24.3%、49.5%、和 26.2%,C、T 等位基因型频率分别为 49.0%和 51.0%。其基因型及等位基因频率在男女间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。进一步将其分型数据与人类基因组计划公布的 4 个人群和参考文献中部分种族人群比较发现,广西人群中,TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点基因型及等位基因频率与英国人、土耳其人、欧洲人(HapMap-CEU)和非洲人(HapMap-YRI)比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),而与日本人(HapMap-JPT)、北京汉族人(HapMap-HCB)、福州人和重庆汉族人比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 在广西人群中存在 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点多态性,其基因多态性的分布频率差异无统计学意义,但与其他种族人群比较存在显著差异。这种差异可能是导致一些疾病在不同种族人群间临床表现及发病率存在较大差异的因素之一。

[关键词] TGF- β 1; 基因多态性; 种族

The genetic polymorphism of TGF- β 1 gene rs1800469C/T in Guangxi populations

HUANG Huatuo, LUO Hongcheng, XIANG Yang, CHEN Jianming, WU Chengjiang, WEI Yesheng*

(Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000)

[ABSTRACT] Objective Based on the study of the frequencies of allele and genotype distribution of TGF- β 1 gene rs1800469C/T polymorphism in Guangxi populations, to analyze the distributions of TGF- β 1 rs1800469 C/T polymorphism among different races. Methods The TGF- β 1 gene rs1800469C/T polymorphism was examined by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism methods in 210 Guangxi populations and compared with other ethnics. Results The TGF- β 1 gene rs1800469C/T showed three genotypes of CC, CT, TT, and the frequencies were 24.3%, 49.5% and 26.2%, respectively. Its allele frequencies of C and T were 49.0% and 51.0%, respectively. The frequencies of allele and genotype distribution of TGF- β 1 gene rs1800469C/T were no statistical significance between men and women in Guangxi populations ($P>0.05$). Compared with British, Turks, HapMap-CEU and HapMap-YRI populations, the TGF- β 1 gene rs1800469C/T polymorphism were in statistical significance ($P<0.05$). But compared with HapMap-JPT, HapMap-HCB, Fuzhou and Chongqing Han populations, there were no statistical significance ($P>0.05$). Conclusion There are TGF- β 1 gene rs1800469 C/T polymorphism in Guangxi populations, and its distributions has no statistical significance between men and women in Guangxi populations. Whose distri-

基金项目:国家自然科学基金(81260234,81060243,81560552)

作者单位:右江民族医学院附属医院检验科,广西,百色 533000

*通讯作者:韦叶生, E-mail:wysh22@163.com

butions are significant difference compared with others ethnic populations. The variation of TGF- β 1 gene polymorphism among different ethnic groups might account for the varied clinical spectrum of some TGF- β 1 gene related diseases.

[KEY WORDS] TGF- β 1; Polymorphism; Ethnic

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)是转化生长因子超家族中的一员,是由2条分子量为11KD,有112个氨基酸构成的单链通过二硫键结合而成,分子量为25 Kd的多肽。人类编码TGF- β 1的基因位于第19号染色体长臂(19q13.2)上,包含7个外显子和6个内含子。该基因目前已发现的突变位点有十多个,而常见的与疾病有密切联系的有7个,rs1800469C/T(-509C/T)是其中的一个重要的突变位点。该位点位于结构基因5'端上游的DNA序列启动子区内。TGF- β 1基因单核苷酸多态性与纤维化性疾病、肿瘤性疾病、免疫性疾病和糖尿病及其并发症等疾病的发病密切相关,成为近年来国内外学者研究的热点^[1-6]。为此,我们用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术和DNA测序法检测广西人群TGF- β 1基因rs1800469C/T位点单核苷酸多态,同时探讨其基因多态性在正常人群间的分布差异,为与TGF- β 1基因相关的疾病和遗传学及预防医学等方面的研究提供一些前瞻性基础资料。

1 对象与方法

1.1 对象

研究对象共210例,其中男139例、女71例,平均年龄47.9岁 \pm 10.1岁,选自2013年1月至2014年8月右江民族医学院附属医院体检人群的随机个体,年龄匹配,血脂、血常规和其他生化指标都在参考范围内,心电图检查正常,均排除癌症家族史、肝脏、肾脏、内分泌和心脑血管疾病。所有研究对象均为无血缘关系的广西人群。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

用EDTA-K2抗凝管采集以上健康体检者静脉血3 mL,参照我们已建立的改良碘化钠法^[7]提取白细胞基因组DNA,放于-70℃冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计与合成

根据TGF- β 1基因rs1800469C/T多态性和已知的DNA序列,用在线引物设计网站([http://](http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer)

www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer)设计PCR引物,委托上海天昊生物科技有限公司合成。用于特异性扩增TGF- β 1基因包含rs1800469C/T位点碱基的DNA片段的引物,上游引物序列为:5'-CAGACTCTAGAGACTGTCAG-3',下游引物序列为:5'-GTCACCAGAGA AAGAGGAC-3'。

1.2.3 PCR扩增

TGF- β 1 rs1800469C/T的PCR扩增反应体系为20 μ L,其中含10 \times PCR缓冲液2.0 μ L,0.3 mmol/L dNTPs 2.0 μ L,上、下游引物各1.0 μ L,模板DNA 1.0 μ L,TaqDNA聚合酶1.0 U,不足体积用灭菌双蒸水补足至20 μ L。TGF- β 1 rs1800469C/T的循环参数为:94℃预变性反应5min;94℃变性30 s,63℃复性45 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃延伸8min。

1.2.4 PCR扩增产物限制性酶切

TGF- β 1 rs1800469C/T的扩增产物用2 U *Bsu36 I*于37℃酶切2 h;全部内切酶均来自英国Biolabs公司。TGF- β 1 rs1800469C/T酶切产物于8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,染色后在紫外灯下鉴定结果,并用Bio-Rad自动凝胶成像及分析系统进行成像和分析。为进一步验证结果,我们将PCR产物送上海英俊生物技术有限公司进行DNA序列测定。

1.3 统计分析

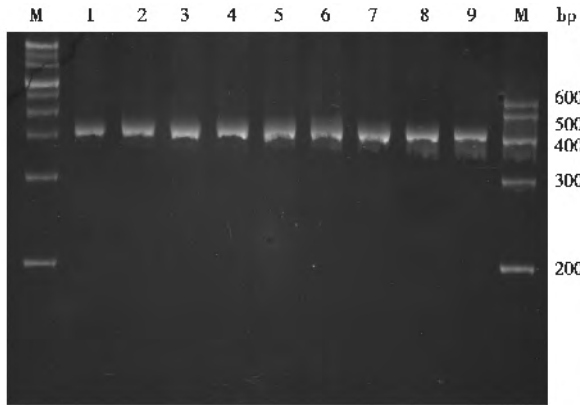
基因型和等位基因频率采用直接计数法计算,各组间基因型及等位基因频率的比较采用 χ^2 检验,所有数据计算和比较均在SPSS 11.5软件上完成。以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的参考。

2 结果

2.1 TGF- β 基因rs1800469C/T位点基因型检测结果

TGF- β 1基因rs1800469C/T位点PCR扩增产物片段大小为419 bp,根据限制性内切酶*Bsu36 I*酶切片段的情况基因型有3种,CC型(229 bp,190 bp 2条带),CT型(419 bp,229 bp,190 bp 3条

带),TT型(419 bp 1条带);PCR扩增产物及酶切产物电泳结果分别如下图1和图2。基因测序进一步证实我们的结果(图3)。



M:DNA 标准分子量; 1~9: PCR 扩增产物
图1 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点 PCR 扩增产物 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Figure 1 PCR amplified products of TGF-β1 gene rs1800469C/T in 8% polyacrylamide gel electrophoresis

2.2 广西人群 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因型和等位基因在男、女组间分布频率的比较

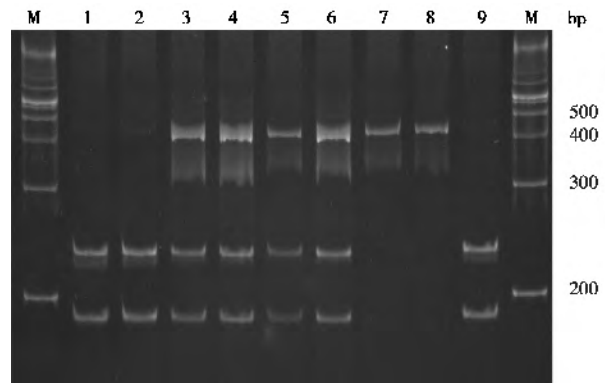
计算广西健康人群中 TGF-β1 基因和等位基因频率,经 χ^2 检验, TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因型及等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,说明所选的研究样本具有群体代表性。在广西人群中 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因型以 CT 型最为常见,占 49.5%,其次为 TT 基因型。等位基因型频率以 T 最高,占 51.0%。其基因型和等位基因频率分布在男女组间比较差异无统计学意义($P>0.05, P_1=0.941, P_2=0.942$ 。 P_1 和 P_2 分别表示男女间基因型和等位基因频率比较的 P 值),结果如下表 1。

表 1 广西人群 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因型和等位基因在男、女间分布频率的比较(%)

Table 1 Comparison of the frequency of genotype and allele distribution of TGF-β1 gene rs1800469C/T between male and female(%)

组别	例数	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
		CC	CT	TT	C	T
男性	139	33 (23.7)	70 (50.4)	36 (25.9)	136 (48.9)	142 (51.1)
女性	71	18 (25.4)	34 (47.9)	19 (26.8)	70 (49.3)	72 (50.7)
合计	210	51 (24.3)	104 (49.5)	55 (26.2)	206 (49.0)	214 (51.0)

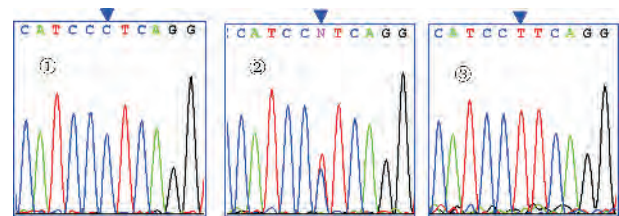
广西人群 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因型及等位基因频率在男女组间比较差异均无统计学意义, $P>0.05$



M:DNA 标准分子量; 1, 2, 9: CC 基因型; 3~6: CT 基因型; 7~8: TT 基因型

图2 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点多态性 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Figure 2 TGF-β1 gene rs1800469C/T polymorphism in 8% polyacrylamide gel electrophoresis



①、②、③分别表示 CC、CT、TT 基因型;箭头所示为基因突变位点
图3 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点测序图

Figure 3 Sequencing map of TGF-β1 gene rs1800469C/T

2.3 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因多态性在不同种族人群间的比较

广西人群中 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 位点基因型和等位基因频率与英国人^[8]、土耳其人^[9]、欧洲人和非洲人比较,差异均有统计学意义($P<0.05$, 基因型和等位基因频率比较 P 值均小于 0.001),但与日本人($P_1=0.335, P_2=0.222$)、北京汉

族人 ($P_1=0.176, P_2=0.135$)、福州人^[10] ($P_1=0.629, P_2=0.333$)和重庆汉族人^[11] ($P_1=0.475, P_2=0.470$)比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。 P_1 和 P_2 分别

表示广西人群与不同国家和地区人群间基因型和等位基因频率比较的 P 值)。结果如下表 2。

表 2 不同种族和地区人群间 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点基因型及等位基因频率的比较(%)
Table 2 Comparison of the frequency of genotype and allele distribution of TGF-1 gene rs1800469C/T between different races and regions(%)

种族	例数	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
		CC	CT	TT	C	T
英国人*	200	94(47.0)	84(42.0)	22(11.0)	272(68.0)	128(32.0)
土耳其人*	150	12(8.0)	73(48.7)	65(43.3)	97(32.3)	203(67.7)
欧洲人*	226	120(53.1)	82(36.3)	24(10.6)	322(71.2)	130(28.8)
非洲人*	226	144(63.7)	70(31.0)	12(5.3)	358(79.2)	94(20.8)
日本人	172	46(26.7)	92(53.5)	34(19.8)	184(53.5)	160(46.5)
北京汉族人	86	30(34.9)	36(41.9)	20(23.3)	96(55.8)	76(44.2)
福州人	723	196(27.1)	356(49.2)	171(23.7)	748(51.7)	698(48.3)
重庆汉族人	413	111(26.9)	201(48.7)	101(24.5)	423(51.2)	403(48.9)
广西人群	210	51(24.3)	104(49.5)	55(26.2)	206(49.0)	214(51.0)

不同种族和地区人群间 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点基因型及等位基因频率与广西人群比较, * $P<0.05$

3 讨论

分子生物学研究发现,基因多态是一种普遍的现象。随着分子生物学技术的日新月异,人们对基因多态的认识有了突破性的进展,基因多态性的研究逐渐成为解释人体对某些疾病或毒物的易感性与耐受性,疾病临床表现的多样性以及对药物治疗的反应性的内在机制。而在我们研究致病基因多态性分布之前,我们应该首先了解其在正常人群中的分布特点,这对我们探索某些致病基因和易感基因的分布特点,研究疾病的发病机理以及其在基因水平的诊断和治疗上都有重要意义。

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)是转化生长因子超家族中的一员,广泛表达于多种细胞表面,包括活化的 T 细胞、B 细胞和多数肿瘤细胞等细胞表面。TGF- β 1 可以通过调节淋巴细胞的增殖、分化,抑制 NK 细胞的增殖及杀伤等方式起到免疫抑制作用,这对于机体维持免疫内环境的稳定有着重要作用。然而,在病理情况下,TGF- β 1 通过其免疫抑制作用,损伤机体的免疫监督功能,使机体失去对自身抗原、肿瘤相关抗原和外来抗原的正常免疫应答,从而导致自身免疫性疾病或肿瘤的发生^[12]。

人类编码 TGF- β 1 的基因位于第 19 号染色体长臂(19q13.2)上,包含 7 个外显子和 6 个内含子。分子生物学研究表明,TGF- β 1 基因存在 rs1800469C/T 位点单核苷酸多态性,这些基因多态性的存在可能影响 TGF- β 1 基因的功能,从而可能导致与之相关疾病的发生和发展。TGF- β 1 基因存在多个单核苷酸多态性位点,国内外相关研究^[1-6]发现,这些多态性位点与纤维硬化性疾病、肿瘤性疾病、免疫性疾病和糖尿病及其并发症等疾病的发生和发展有着密切联系,而 rs1800469C/T 是其中一个重要位点。因此,正确分析 TGF- β 1 基因多态性在不同民族、国家和地区正常人群中的分布非常必要,其研究成果将为我们今后研究不同人群 TGF- β 1 基因多态性和某些疾病的发生与发展之间的关系提供基础理论依据和分子生物学及遗传学基础。

为此,我们采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术和 DNA 测序法检测广西地区正常人群 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点多态性的分布情况。结果,在广西人群中,TGF- β 1 基因 rs1800469 C/T 位点表现出 CC、CT、TT 三种基因型,频率分别为 24.3%、49.5%、和 26.2%;等位基因 C、T 频率分别为 49.0%和 51.0%。其基因型和等位基因频率分布男女组间比较,差异无统计学

意义($P>0.05$)。进一步将检测结果同英国人^[8]、土耳其人^[9]、欧洲人、非洲人、日本人、北京汉族人、福州人^[10]和重庆汉族人^[11]比较发现,广西人群 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点基因型和等位基因频率与英国人、土耳其人、欧洲人和非洲人比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$),与日本人、北京汉族人、福州人和重庆汉族人比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。而且广西人群 TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点 T 等位基因频率(51.0%)显著高于英国人(32.0%)、欧洲人(28.8%)和非洲人(20.8%)。从本文结果可以发现,TGF- β 1 基因 rs1800469C/T 位点基因型和等位基因频率在不同种族间比较,存在着明显的差异,而与同一种族不同人群比较差异较小。这一结果符合“亲缘关系越近,其基因型分布越相似,反之则差异越显著”的遗传学规律。

总之,研究我国广西人群中 TGF- β 1 基因多态性的分布,不仅为今后进一步研究我国广西人群 TGF- β 1 基因多态性与相关疾病发生和发展之间供理论依据,而且,将有助于我们更深入地理解这些疾病在广西人群的遗传基因背景,为后续的群体遗传学和预防医学研究提供前瞻性资料。

参考文献

- [1] Mohy A, Fouad A. Role of transforming growth factor- β 1 in serum and -509 C>T promoter gene polymorphism in development of liver cirrhosis in Egyptian patients [J]. *Meta Gene*, 2014, 9(2):631-637.
- [2] Li Z, Zhang L, He W, et al. Astragalus membranaceus inhibits peritoneal fibrosis via monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) pathway in rats submitted to peritoneal dialysis[J]. *Int Mol*, 2014, 15(7):12959-12971.
- [3] Miao ZF, Li WY, Wang ZN, et al. Lung cancer cells induce senescence and apoptosis of pleural mesothelial cells via transforming growth factor-beta1 [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4):2657-2665.
- [4] Tas F, Yasasever CT. Serum transforming growth factor-beta1 levels may have predictive and prognostic roles in patients with gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3):2097-2103.
- [5] 朱强, 朱明华, 罗俊, 等. IL-10 和 TGF- β 1 在系统性红斑狼疮患者血清中的表达及意义[J]. *军事医学*, 2015, 39(4):276-278.
- [6] Olivieri A, De Angelis S, Dionisi S, et al. Serum transforming growth factor β 1 during development in non-obese diabetic mice and humans[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162(3):407-417.
- [7] 吴成将, 陈健明, 蓝艳, 等. 广西壮族及汉族人群 CD40 配体基因 rs7050168G/A 遗传多态性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015,7(1):9-13.
- [8] Bayat A, Watson JS, Stanley JK, et al. Genetic susceptibility in Dupuytren's disease. TGF-beta1 polymorphisms and Dupuytren's disease [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2002, 84(2):211-215.
- [9] Kanra AR, Tulgar-Kinik S, Verdi H, et al. Transforming growth factor-beta1 (509 C/T, 915 G/C, 869 T/C) polymorphisms are not related to obesity in Turkish children [J]. *Turk J Pediatr*, 2011, 53(6):645-650.
- [10] Zheng WX, Yan CH, Wang XH, et al. The TGF- β 1 Functional Polymorphism rs1800469 and Susceptibility to Atrial Fibrillation in Two Chinese Han Populations [J]. *Plos One*, 2013,8 (12):e83033
- [11] 裴芳, 黄骥, 黄婕, 等. TGF- β 1 基因启动子区-509C/T 多态性与重庆汉族人群冠心病及其危险因素的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014,22(9):936-944.
- [12] Li MO, Wan YY. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 99-146.

治疗前 NLR 和 PLR 对宫颈鳞癌患者预后的影响

郭煦¹ 谢洪哲^{2*} 柯尊富³

[摘要] **目的** 探讨经手术治疗的宫颈鳞癌患者治疗前中性粒细胞与淋巴细胞比(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)及血小板与淋巴细胞比(platelet-to-lymphocyteratio, PLR)与总生存期(overall survival, OS)、无病生存期(disease-free survival, DFS)和各临床病理因素的相关性。**方法** 回顾性分析中山大学附属第一医院于2005年1月1日至2009年12月31日期间初治的并且经过手术治疗的143例宫颈鳞癌患者的临床病理资料,根据统计学方法选取NLR和PLR截断值,将患者根据截断值分组,分析NLR和PLR与患者生存、复发情况的相关性以及临床病理因素的相关性。**结果** 选取NLR=2.8和PLR=125分别作为截断值,高NLR组5年生存率为30.3%,低NLR组5年生存率为80%,差异有统计学意义($P=0.000$)。高NLR组复发率为69.7%,低NLR组复发率为24.5%,差异有统计学意义($P=0.000$)。高PLR组5年生存率为53.7%,低PLR组5年生存率为81.6%,差异有统计学意义($P=0.000$)。高PLR组复发率为50%,低PLR组复发率为22.4%,差异有统计学意义($P=0.000$)。经过单因素和多因素分析,国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期、术前化疗、病灶大小、外周血小板计数(platelet, PLT),NLR值和PLR值是影响宫颈鳞癌患者总生存率和无病生存率的独立危险因素。**结论** 治疗前NLR及PLR均是影响宫颈鳞癌患者总生存时间和无病生存时间的独立危险因素。

[关键词] 中性粒细胞与淋巴细胞比(NLR); 血小板与淋巴细胞比(PLR); 宫颈鳞癌; 总生存率; 无病生存率

Effect of NLR and PLR from pre-treatment on the prognosis of patients with cervical squamous cell carcinoma

GUO Xu¹, XIE Hongzhe^{2*}, KE Zunfu³

(1. Physical Examination Center, the First Affiliate Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. The Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliate Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 3. The Department of Pathology, the First Affiliate Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between neutrophil-to-lymphocyte ratio(NLR) and platelet-to-lymphocyteratio (PLR) from pre-treatment and clinical parameters including overall survival (OS), disease-free survival(DFS) and clinical pathologic factors in the patients with cervical squamous cell carcinoma. **Methods** In this retrospective analysis from January 1, 2005 to December 31, 2009, 143 cases of cervical squamous carcinoma patients were collected, which were firstly treated and undergone surgery in the first affiliated hospital of Sun Yat-sen university. According to the statistical methods, the patients were

基金项目:国家自然科学基金(81372501)

作者单位:1. 中山大学附属第一医院体检中心,广东,广州 510080

2. 中山大学附属第一医院妇产科,广东,广州 510080

3. 中山大学附属第一医院病理科,广东,广州 510080

*通讯作者:谢洪哲, E-mail:67477528@qq.com

divided into different groups based on the cut-off value of NLR or PLR. Then the relationship between NLR and PLR with the survival and recurrence situation of patients and the the factors of clinical and pathological were analyzed. **Results** NLR=2.8 and PLR=125 were selected as the cut-off value. The 5-year survival rate of high NLR group is 30.3%, while the 5-year survival rate of low NLR group is 80%, and the difference was statistically significant ($P=0.000$). The recurrence rate of high NLR group is 69.7%, while in low NLR group is 24.5%, and the difference was statistically significant($P=0.000$). The 5-year survival rate of high PLR group is 53.7%, while the 5-year survival rate of low PLR group is 81.6%, and the difference was statistically significant ($P=0.000$). The recurrence rate of high PLR group is 50%, while in low NLR group is 22.4%, and the difference was statistically significant ($P=0.000$). Univariate analysis and Cox regression analysis all showed that International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage, preoperative chemotherapy, the tumor size, platelet (PLT), NLR and PLR are all independent prognostic factors for overall survival rate and disease-free survival rate in cervical squamous cell carcinoma patients. **Conclusion** NLR and PLR values from pre-treatment are independent prognostic factor for cervical squamous cell carcinoma patients, respectively.

[KEY WORDS] Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR); Platelet-to-lymphocyte ratio (PLR); Cervical squamous cell carcinoma; Overall survival (OS); Disease-free survival (DFS)

流行病学调查结果显示,慢性炎症患者更容易罹患癌症。肿瘤也可引起非特异性的炎症反应,导致白细胞水平的特定改变,主要表现为中性粒细胞增多和淋巴细胞减少,同时也会出现血小板增多,这些改变均可以通过常规的外周血检测中来发现。作为非特异性的炎症反应指标,中性粒细胞与淋巴细胞比(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)及血小板与淋巴细胞比(platelet-to-lymphocyteratio, PLR)已经被一些研究证实与多种肿瘤患者的预后具有相关性^[1]。Smith等人在2009年的研究中发现,在可切除的胰腺导管癌患者中,手术前的高PLR可以作为独立的预后危险因素^[2]。2012年Kwon等人研究发现在结肠癌患者中,术前的高PLR和NLR也可作为独立的预后危险因素^[3]。另外在食管癌、小细胞肺癌、胃癌、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌和肾癌等多项研究中也发现NLR和PLR均与肿瘤的预后具有相关性^[4-12]。

目前,关于NLR和PLR对宫颈癌患者预后影响的研究很少,而宫颈鳞癌又占了宫颈癌总数的75%~80%。本研究旨在通过对143例宫颈鳞癌患者临床资料的回顾性分析,评价治疗前NLR和PLR与宫颈鳞癌患者预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 资料

选取2005年1月1日至2009年12月31日,

于中山大学附属第一医院妇科初治的并且经过手术治疗的宫颈鳞癌患者,所有病例均经病理证实为宫颈鳞状细胞癌,临床资料完整,并且随访至少满五年或至死亡。排除标准:(1)合并有免疫性疾病以及其他恶性肿瘤的患者。(2)治疗前合并有急性或慢性感染。(3)合并有血液系统疾病、血栓或出血性疾病;(4)合并有严重的肝、肾疾病;(5)治疗前曾接受过放疗或化疗。收集患者治疗前7日内的血常规检查结果,记录白细胞计数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数及血小板计数(platelet, PLT),通过中性粒细胞绝对值比淋巴细胞绝对值计算出NLR值,血小板绝对值比淋巴细胞绝对值计算出PLR值。本研究最终入组患者为143名,平均年龄为45.85岁(范围:29岁~68岁),其中50岁以下患者98名(68.5%),大于等于50岁以上患者45名(31.5%)。根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)2009(FIGO, 2009)的临床分期标准,分为I期患者70名(49%),II期患者69名(48.3%),III期患者4名(3.7%)。术前曾接受化疗治疗患者65名(45.5%),术前接受放疗治疗患者23名(16.1%)。根据术前体格检查、影像学检查结果、术中所见及术后病理检查确定病灶大小,病灶小于4cm患者76名(53.1%),病灶大于等于4cm患者67名(46.9%)。根据手术方式分组,行全子宫切除术

患者4名(2.8%),行腹式次广泛全子宫切除术及盆腔淋巴结切除术患者20名(14%),行腹式广泛全子宫切除术及盆腔淋巴结切除术患者89名(62.2%),行腹腔镜下广泛全子宫切除术及盆腔淋巴结切除术患者30名(21%)。根据术后病理检查结果,按癌细胞分化程度分为I、II、III级,I级高分化鳞癌患者21名(14.7%),II级中分化鳞癌患者36名(25.2%),III级低分化鳞癌患者86名(60.1%);无淋巴结转移患者116名(81.1%),有淋巴结转移患者27名(19.9%)。平均随访时间为72.1个月(3个月~122个月)。

1.2 随访

通过查阅病历资料及电话随访的方式进行随访以获得预后资料,随访截止时间为2015年2月28日。本研究中将患者从第一次入院确诊时间至死亡时间或者随访截止时间定义为总生存期(overall survival, OS);患者从手术时间至确诊局部复发或远处转移的时间定义为无病生存期(disease-free survival, DFS)。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0软件进行统计学分析。绘制ROC曲线确定NLR和PLR与OS及DFS的相关性,根据统计学方法选取(敏感度+特异性-1)最大值时所对应的数值为截断值。单因素分析采用Kaplan-Meier检验绘制生存曲线,组间生存率比较采用Log-rank分析。多因素分析采用Cox风险回归模型。以 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NLR与宫颈鳞癌预后及各临床病理因素的相关性

2.1.1 NLR截断值的选取

全组患者治疗前NLR中位值为1.74(范围:0.41~7.26)。根据NLR与OS、DFS的关系分别绘制ROC曲线(图1、图2),NLR与OS关系的ROC曲线下面积 $AUC=0.784$, $P=0.000$,说明NLR与宫颈鳞癌患者的总生存期具有相关性;NLR与DFS关系的ROC曲线下面积 $AUC=0.689$, $P=0.000$,说明NLR与宫颈鳞癌患者的无病生存期具有相关性。依照ROC曲线,根据统计学方法,选取 $NLR=2.8$ 作为截断值。

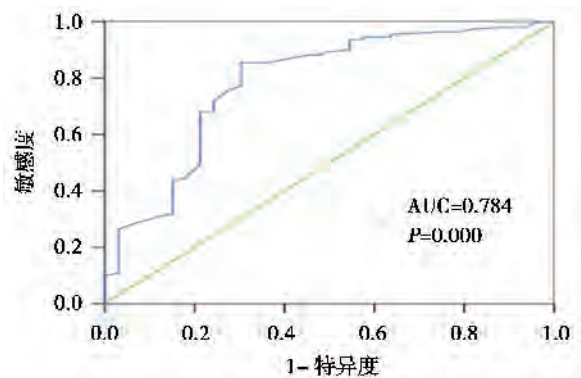


图1 治疗前NLR与OS关系的ROC曲线图

Figure 1 ROC curve for the relationship between OS and NLR before treatment

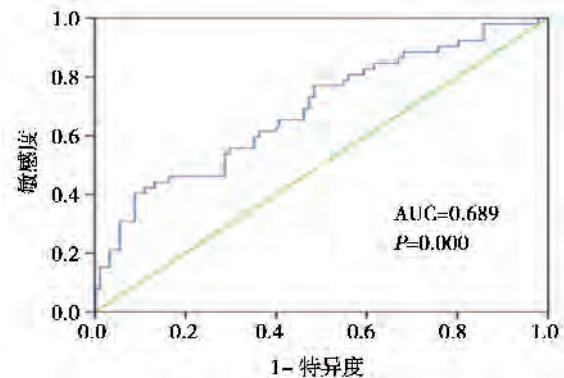


图2 治疗前NLR与DFS关系的ROC曲线图

Figure 2 ROC curve for the relationship between NLR and DFS before treatment

2.1.2 NLR与宫颈鳞癌患者预后的相关性

根据截断值2.8将全部患者分为2组:NLR \geq 2.8的高NLR组($n=33$),NLR $<$ 2.8的低NLR组($n=110$)。至随访截止,全组患者5年生存率为66.43%,高NLR组患者5年生存率为30.30%,低NLR组患者的5年生存率为77.27%,差异有统计学意义($P=0.000$)(图3)。全组患者的复发率为35%,高NLR组患者复发率为69.7%,低NLR组患者复发率为24.5%,高NLR组患者的复发率明显高于低NLR组,两者之间差异有统计学意义($P=0.000$)(图4)。

2.1.3 NLR与临床病理因素的关系

经过单因素分析,高NLR组和低NLR组在FIGO分期($P=0.005$)、术前有无化疗($P=0.005$)、

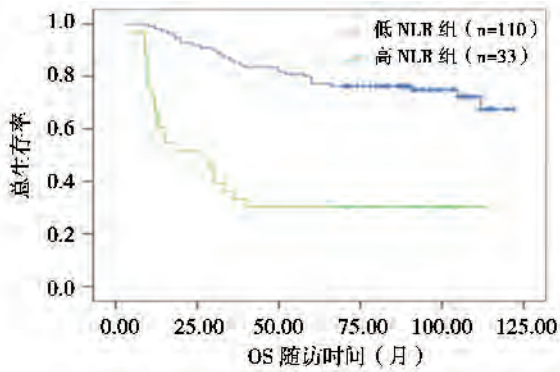


图3 治疗前低NLR组和高NLR组宫颈鳞癌患者OS曲线的比较

Figure 3 OS analysis between low NLR and high NLR groups from the patients with cervical squamous cell carcinoma before treatment

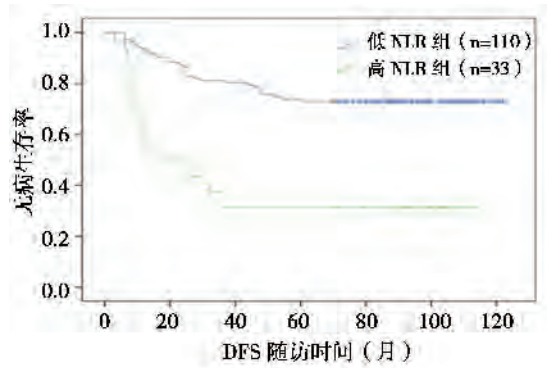


图4 治疗前低NLR组和高NLR组宫颈鳞癌患者DFS曲线的比较

Figure 4 DFS analysis between low NLR and high NLR groups from the patients with cervical squamous cell carcinoma before treatment

病灶大小($P=0.009$)和血小板计数($P=0.005$)方面差异有统计学意义。其他各方面无统计学差异(表1)。

2.2 PLR与宫颈鳞癌预后及各临床病理因素的相关性

2.2.1 PLR截断值的选取

全组患者治疗前PLR中位值为119.6(范围:20.6~384.9)。根据PLR与OS、DFS的关系分别绘制ROC曲线(图5、图6),PLR与OS关系的ROC曲线下面积 $AUC=0.633$, $P=0.006$,说明PLR与宫颈鳞癌患者的总生存期具有相关性;PLR与DFS关系的ROC曲线下面积 $AUC=0.662$, $P=0.001$,说

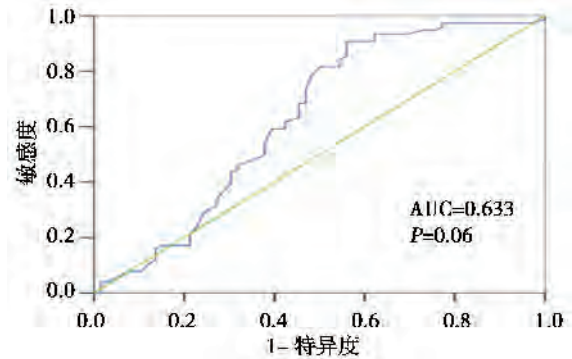


图5 治疗前PLR与OS关系的ROC曲线图

Figure 5 ROC curve for the relationship between OS and PLR before treatment

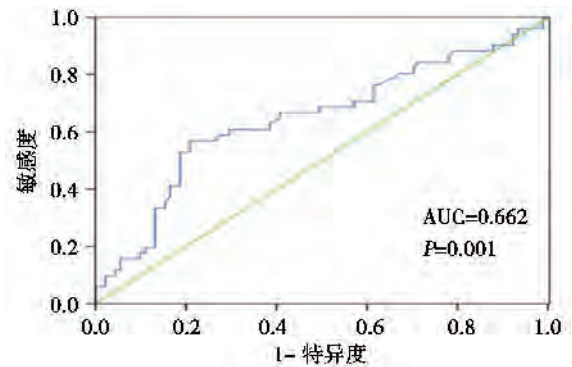


图6 治疗前PLR与DFS关系的ROC曲线图

Figure 6 ROC curve for the relationship between PLR and DFS before treatment

明PLR与宫颈鳞癌患者的无病生存期具有相关性。通过PLR与宫颈鳞癌患者预后相关性的ROC曲线,根据统计学方法,选取 $PLR=125$ 作为截断值。

2.2.2 PLR与宫颈鳞癌患者预后的相关性

根据截断值125将全部患者分为2组:PLR \geq 125的高PLR组($n=67$),PLR $<$ 125的低PLR组($n=76$)。其中,高PLR组患者5年生存率为54.5%,低PLR组患者5年生存率为81.6%,高PLR组患者的5年生存率明显低于低PLR组患者,两者之间差异有统计学意义($P=0.000$)(图7)。高PLR组患者复发率为50%,低PLR组患者复发率为22.4%,高PLR组患者的复发率明显高于低PLR组,两者之间差异有统计学意义($P=0.000$)(图8)。

表 1 NLR<2.8 组患者与 NLR≥2.8 组患者临床病例特征比较
Table 1 The analysis for the clinic pathological features between NLR<2.8 and ≥2.8 groups

因素	NLR<2.8		NLR≥2.8		P值
	例数	比例	例数	比例	
年龄					0.554
≥50	36	32.73%	9	27.27%	
<50	74	67.27%	24	72.73%	
FIGO 分期					0.005
I 期	60	54.55%	10	30.30%	
II 期	49	44.55%	20	60.61%	
III 期	1	0.90%	3	9.09%	
术前化疗					0.005
术前有化疗	43	39.09%	22	66.67%	
术前无化疗	67	69.91%	11	33.33%	
术前放疗					0.868
术前有放疗	18	16.36%	5	15.15%	
术前无放疗	92	83.64%	28	84.85%	
病灶大小					0.009
≥4 cm	45	40.91%	22	66.67%	
<4 cm	65	59.09%	11	33.33%	
手术方式					0.624
全子宫切除	4	3.64%	0	0.00%	
次广泛全子宫切除+盆扫	14	12.73%	6	18.18%	
广泛全子宫切除+盆扫	69	62.73%	20	60.61%	
腹腔镜下广泛+盆扫	23	20.90%	7	21.21%	
血小板计数					0.005
≥272	31	28.18%	18	54.55%	
<272	79	71.82%	15	45.45%	
病理分级					0.351
高分化鳞癌	18	16.36%	3	9.09%	
中分化鳞癌	25	22.73%	11	33.33%	
低分化鳞癌	67	60.91%	19	57.58%	
淋巴转移					0.907
有淋巴结转移	21	19.09%	6	18.18%	
无淋巴结转移	89	80.91%	27	81.82%	

2.2.3 PLR 与临床病理因素的关系

经过单因素分析,高 PLR 组和低 PLR 组在年龄($P=0.028$)、FIGO 分期($P=0.001$)、病灶大小($P=0.004$)、术前后有无化疗($P=0.028$)、血小板计数($P=0.000$)方面差异有统计学意义。其他各方面无统计学差异(表 2)。

2.3 治疗前外周血血小板计数与宫颈鳞癌患者预后的关系

将治疗前外周血血小板计数 PLT 与患者的预后情况绘制 ROC 曲线,ROC 曲线下面积 $AUC=0.645$, $P=0.004$,说明治疗前的外周血血小板数量与宫颈鳞癌患者的预后具有相关性。通过 ROC 曲

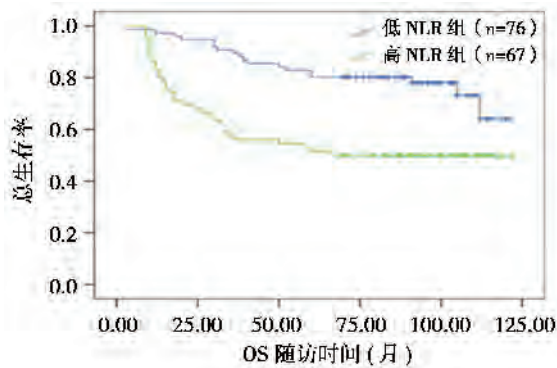


图 7 治疗前低 PLR 组和高 PLR 组宫颈鳞癌患者 OS 曲线的比较

Figure 7 OS analysis between low PLR and high PLR groups from the patients with cervical squamous cell carcinoma before treatment

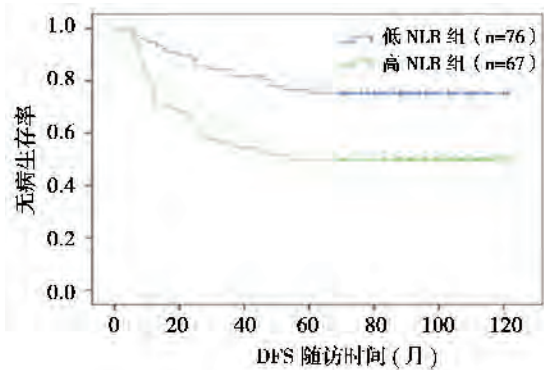


图 8 治疗前低 PLR 组和高 PLR 组宫颈鳞癌患者 DFS 曲线的比较

Figure 8 DFS analysis between low PLR and high PLR groups from the patients with cervical squamous cell carcinoma before treatment

线,根据统计学方法,选取 $PLT=272$ 作为截断值。按截断值将患者分组: $PLT \geq 272$ 的患者为高血小板组 (49 例), $PLT < 272$ 的患者为低血小板组 (94 例),高血小板组患者的 5 年生存率为 34.3%,低血小板组患者的 5 年生存率为 65.7%,高血小板组患者的 5 年生存率明显低于低血小板组患者,两组患者的总生存期有统计学差异 ($P=0.000$);两组患者的无病生存期有统计学差异 ($P=0.001$),说明治疗前外周血血小板计数为宫颈鳞癌患者预后的影响因素。

2.4 各临床病理因素与患者预后的相关性

经过单因素分析,FIGO 分期、术前有无化疗、病灶大小、NLR、PLR 和血小板计数均与宫颈鳞癌患者的预后具有相关性。而其他临床病理因素与宫颈鳞癌患者的预后不具有相关性(表 3)。

2.5 Cox 回归分析

建立 Cox 模型,将单因素分析有意义的因素(包括 FIGO 分期、术前是否进行化疗、病灶大小、治疗前血小板计数、NLR 和 PLR)纳入模型进行多因素分析。结果显示,NLR ($P=0.000$)、PLR ($P=0.001$)、FIGO 分期 ($P=0.000$)、病灶大小 ($P=0.001$)、术前是否有化疗 ($P=0.038$)、治疗前血小板计数 ($P=0.000$) 均是影响是宫颈鳞癌患者术后生存和复发的独立危险因素。

3 讨论

现已被广泛证实机体的炎症反应与免疫状态之间的关系对肿瘤细胞与间质组织相互作用中发挥了巨大的作用。早在 1990 年,Letomi 就发现当有肿瘤细胞生长时外周血中中性粒细胞数目增多,并据此猜测 NLR 可能与肿瘤患者预后相关。此后,在小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌等方面已经证实血液中 NLR 与患者的预后呈负相关,在结肠癌患者中、可切除的胰腺导管癌患者中以及卵巢癌患者中也证实术前的 PLR 提示不良预后^[2-3,13-15]。

目前,关于 NLR、PLR 与宫颈癌患者预后相关性的研究较少,Zhang 等曾报道高 NLR 是宫颈癌患者无病生存时间短的独立危险因素,但不是总生存率低的独立危险因素;而 PLR 与宫颈癌患者预后不具有相关性^[14]。但是该研究入组的宫颈癌患者即包括宫颈鳞癌患者又包括宫颈腺癌患者,由于宫颈鳞癌与宫颈腺癌病理类型不同,患者预后具有明显差异,所以将两者合并研究并不恰当。由于宫颈鳞癌在宫颈癌患者中占 75%~80%,所以本研究单独选取宫颈鳞癌患者,研究 NLR 及 PLR 与宫颈鳞癌患者预后的相关性。另外 Zhang 等的研究将 NLR 和 PLR 的中位数作为截断值,可能会影响 NLR 及 PLR 在预测宫颈癌患者预后价值的敏感性和特异性,而本研究根据 ROC 曲线兼顾敏感性和特异性,选取敏感性和特异性最高的数值作为截断值,更有利于判断 NLR 和 PLR 对宫颈癌

表 2 PLR<125 组患者与 PLR≥125 组患者临床病例特征比较
Table 2 The analysis for the clinic pathological features between PLR<125 and ≥125 groups

因素	PLR<125		PLR≥125		P 值
	例数	比例	例数	比例	
年龄					0.028
≥50	30	39.47%	15	22.39%	
<50	46	60.53%	52	77.61%	
FIGO 分期					0.001
I 期	47	61.84%	23	34.33%	
II 期	29	38.16%	40	59.70%	
III 期	0	0.00%	4	5.97%	
术前化疗					0.028
术前有化疗	28	36.84%	37	55.22%	
术前无化疗	48	63.16%	30	44.78%	
术前放疗					0.919
术前有放疗	12	15.79%	11	16.42%	
术前无放疗	64	84.21%	56	83.58%	
病灶大小					0.004
≥4cm	27	35.53%	40	59.70%	
<4cm	49	64.47%	27	40.30%	
手术方式					0.082
全子宫切除	0	0.00%	4	5.97%	
次广泛全子宫切除+盆扫	8	10.53%	12	17.91%	
广泛全子宫切除+盆扫	51	67.11%	38	56.72%	
腹腔镜下广泛+盆扫	17	22.36%	13	19.40%	
血小板计数					0.000
≥272	8	10.53%	41	61.19%	
<272	68	89.47%	26	38.81%	
病理分级					0.675
高分化鳞癌	13	17.11%	8	11.94%	
中分化鳞癌	19	25.00%	17	25.37%	
低分化鳞癌	44	57.89%	42	62.69%	
淋巴转移					0.202
有淋巴结转移	15	19.74%	12	17.91%	
无淋巴结转移	61	80.26%	55	82.09%	

患者预后的预测价值。本研究结论 NLR 与宫颈癌患者的无病生存期具有相关性，这与 Zhang 等的研究结论相一致。本研究还得出结论 NLR 与宫颈癌患者的总生存期具有相关性，且 PLR 与宫颈癌患者的无病生存期及总生存期均具有相关性，并且两者均为影响患者预后的独立危险因素，这与

Zhang 的研究结论不相符，但是与目前关于 NLR 及 PLR 与乳腺癌、结直肠癌、肝癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤相关性的研究结论相一致，考虑这个差异是由于病例选择范围不同以及截断值选取不同所造成的。

肿瘤细胞可产生促粒细胞生成素，引起白细

表3 DFS和OS的单因素生存分析情况
Table 3 Univariate survival analysis for DFS and OS

因素	例数	比例	五年生存率	P 值(DFS)	P 值(OS)
年龄				0.449	0.556
≥50	45	31.50%	73.30%		
<50	98	68.50%	66.30%		
FIGO 分期				0.000	0.000
I 期	70	49.00%	83.90%		
II 期	69	48.30%	69.40%		
III 期	4	3.70%	17.60%		
术前化疗				0.013	0.015
术前有化疗	65	45.50%	58.50%		
术前无化疗	78	54.50%	76.90%		
术前放疗				0.279	0.411
术前有放疗	23	16.10%	65.20%		
术前无放疗	120	83.90%	69.20%		
病灶大小				0.001	0.000
≥4 cm	67	46.90%	53.70%		
<4 cm	76	53.10%	81.60%		
手术方式				0.379	0.484
全子宫切除	4	2.80%	100.00%		
次广泛全子宫切除+盆扫	20	14.00%	64.30%		
广泛全子宫切除+盆扫	89	62.20%	78.20%		
腹腔镜下广泛+盆扫	30	21.00%	87.50%		
血小板计数				0.001	0.000
≥272	49	34.30%	44.90%		
<272	94	65.70%	80.90%		
病理分级				0.684	0.758
高分化鳞癌	21	14.70%	76.20%		
中分化鳞癌	36	25.20%	66.70%		
低分化鳞癌	86	60.10%	67.40%		
淋巴转移				0.773	0.914
有淋巴结转移	27	19.90%	66.70%		
无淋巴结转移	116	81.10%	69.00%		
治疗前 NLR				0.000	0.000
≥2.8	33	23.10%	30.30%		
<2.8	110	76.90%	80.00%		
治疗前 PLR				0.000	0.000
≥125	67	46.90%	53.70%		
<125	76	53.10%	81.60%		

胞和中性粒细胞数目增多。增多的中性粒细胞一方面可产生活性氧以及细胞因子,非特异性的杀死肿瘤细胞,对肿瘤的发展起到抑制作用。另一方面,中性粒细胞还可以抑制肿瘤坏死因子- α 的生成,释放弹性蛋白酶,产生白细胞介素-1、白细胞介素-6和血管内皮生长因子等细胞因子,促进肿瘤的血管生成以及远处转移^[15-16]。随着肿瘤细胞以及细胞因子的不断增多,中性粒细胞活化程度逐渐升高,开始表现为以促肿瘤生长作用为主。

作为肿瘤免疫应答重要成员的淋巴细胞,既可以抑制肿瘤细胞的成熟,又可以通过多种机制促进肿瘤细胞的凋亡,进而抑制肿瘤的发生、发展和复发^[17]。在卵巢癌、结直肠癌和黑色素瘤的研究中都发现,肿瘤部位的淋巴细胞增多与肿瘤患者的预后呈正相关。这种针对肿瘤细胞特异性抗原的机体免疫反应不仅发生在癌组织周围,亦存在于患者外周血中,并可作为评估肿瘤患者预后的相关因素。有研究发现,外周血中CD8T淋巴细胞数目增多,与肿瘤患者的预后成正相关^[18]。多项研究证实肾癌、胃肠道肿瘤、肝癌、非小细胞肺癌患者围手术期淋巴细胞数的变化与术后复发、远期生存率具有明显关系^[2-3]。因此,淋巴细胞减少可能提示患者的免疫调节功能异常,抗肿瘤物质分泌减少以及免疫应答功能减弱,从而导致抗肿瘤能力下降。

血小板不仅参与机体的凝血功能,还可以分泌多种细胞因子,直接或间接的参与机体的炎症反应,是人体炎症反应的一项指标。肿瘤患者慢性失血、营养不良以及组织坏死会引起血小板反应性的增高,而肿瘤细胞对血小板的破坏以及凝血功能异常也会引起血小板代偿性增高。有研究报道10%~60%的肿瘤患者出现血小板升高^[19]。增多的血小板可以分泌一些细胞因子,如血小板衍生生长因子、血管内皮生长因子、血小板因子IV、转化生长因子- β 、凝血酶敏感蛋白-1等,这些细胞因子是强有力的促有丝分裂剂,可以刺激肿瘤细胞增殖、促进肿瘤微血管生成,从而促进肿瘤的生长。同时,增多的血小板与肿瘤细胞相粘附形成癌栓,既可以保护肿瘤细胞逃避免疫监视,又可以促进肿瘤细胞与血管壁及组织粘附,完成转移。肿瘤患者的不良预后可能是肿瘤细胞与血小板之间相互促进的结果,在食管癌及胃癌患者中这一理论

已被证实^[20-21]。已经有报道,抗血栓形成药可抑制肿瘤转移。在本研究中也发现,外周血血小板数目为影响宫颈鳞癌患者预后的独立危险因素,这与现有报道的研究结果相一致^[22]。

NLR和PLR都是2种细胞数目的绝对值的比值,具有相对的稳定性,对肿瘤患者预后的预测价值更高。其增高往往并非由于单一类型的细胞数目变化所引起,而是由2种细胞比例失衡所造成。当NLR或PRL升高,机体的炎症反应和免疫状态之间的平衡被打破,促肿瘤细胞发展和转移的作用增强,抑制肿瘤的作用减弱,提示肿瘤患者的不良预后^[23]。

经过单因素和多因素Cox分析发现,NLR和PLR均为影响宫颈鳞癌患者预后的独立危险因素,说明机体的炎症反应与免疫状态之间的平衡影响着患者的预后。就此,我们可以通过降低患者机体的炎症反应以及提高免疫功能,进一步改善宫颈鳞癌患者的预后。已有的研究结果显示,非甾体类抗炎药可以降低40%~50%结肠癌发病风险,并且对预防胃癌、食管癌和肺癌具有一定的效果^[24-25]。或许这一类药物对宫颈鳞癌的预防也有一定效果,有待进一步研究。

目前很多研究已经证明高NLR和PLR与肿瘤患者的不良预后有关,但是不同种类的肿瘤之间甚至同一肿瘤的不同研究之间,截断值选择并不相同^[2-12]。Perez在NLR与胃肠间质瘤患者预后相关性的研究中将中位数2.7作为临界值^[26],Kishi在NLR与直肠癌肝转移患者预后关系的研究中以NLR=5作为临界值^[27]。而本研究是根据ROC曲线及统计学方法分别选取NLR=2.8、PLR=125作为截断值,由于本研究所选取的样本数较少,且为单机构的回顾性研究,对截断值选取造成了一定的局限性。考虑到不同部位的肿瘤生物学特征并不相同,以及现有的研究样本数量以及研究方法也并不相同,如果想选取统一的截断值用以预测肿瘤患者的预后,或者仅是用于预测某一种肿瘤患者的预后,仍需要进行多中心、大规模的前瞻性研究。

另外与宫颈鳞癌预后可能具有相关性的炎症指标如C反应蛋白、免疫学标志物鳞状上皮细胞癌抗原和与宫颈癌发病相关的人乳头瘤病毒在本研究中并未涉及到,主要是由于在2005年~2009年

以上几项指标并非为入院时常规检查,资料并不完整,所以此研究可能存在着不均衡性。因此,在进一步的研究过程中,我们可以选取以上资料完整的患者,结合 NLR 和 PLR 的动态变化,进一步分析与患者治疗效果以及预后的相关性,这样可以更好的评估炎症反应标志物与宫颈癌发生及发展的相关性。

由于 NLR 和 PLR 的获取具有简便、经济的优点,作为宫颈鳞癌患者病情评估的一个有益补充,值得广泛推广。

参考文献

- [1] Templeton AJ, Ace O, Mcnamara MG, et al. Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(7):1204–1212.
- [2] Smith RA, Bosonnet L, Raraly M, et al. Preoperative platelet-lymphocyte ratio is an independent significant prognostic marker in resected pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *The American Journal of Surgery*, 2009, 197(4):466–472.
- [3] Kwon HC, Kim SH, Oh SY, et al. Clinical significance of preoperative neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio in patients with operable colorectal cancer[J]. *Biomarkers*, 2012, 17(3):216–222.
- [4] Tomita M, Shimizu T, Ayabe T, et al. Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic predictor after curative resection for non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Research*, 2011, 31(9):2995–2998.
- [5] Shimada H, Takiguchi N, Kainuma O, et al. High preoperative neutrophil-lymphocyteratio predicts poor survival in patients with gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2010, 13(3):170–176.
- [6] Sharaiha RZ, Halazun KJ, Mirza F, et al. Elevated preoperative neutrophil: lymphocyte ratio as a predictor of postoperative disease recurrence in esophageal cancer [J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2011, 18(12):3362–3369.
- [7] Bhatti I, Peacock O, Lloyd G, et al. Preoperative hematologic markers as independent predictors of prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio [J]. *The American Journal of Surgery*, 2010, 200(2):197–203.
- [8] Gomez D, Farid S, Malik HZ, et al. Prasad preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor after curative resection for hepatocellular carcinoma[J]. *World Journal of Surgery*, 2008, 32(8):1757–1762.
- [9] Gomez D, Morris-Stiff G, Toogood GJ, et al. Impact of systemic inflammation on outcome following resection for intrahepatic cholangio carcinoma [J]. *Journal of Surgical Oncology*, 2008, 97(6):513–518.
- [10] Ohno Y, Nakashima J, Ohori M, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent predictor of recurrence in patients with nonmetastatic renal cell carcinoma[J]. *The Journal of Urology*, 2010, 184(3):873–878.
- [11] Azab B, Bhatt VR, Phookan J, et al. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short-and longterm mortality in breast cancer patients[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2012, 19(1):217–224.
- [12] Cho H, Hur HW, Kim SW, et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment [J]. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2009, 58(1):15–23.
- [13] Asher V, Lee J, Innamaa A, et al. Preoperative platelet lymphocyte ratio as an independent prognostic marker in ovarian cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2011, 13(7):499–503.
- [14] Zhang Y, Wang L, Liu Y, et al. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio before platelet-lymphocyte ratio predicts clinical outcome in patients with cervical cancer treated with initial radical surgery [J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2014, 24(7):1319–1325.
- [15] Duan RD, Nilsson A. Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development[J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, 48(1):62–72.
- [16] Paramanathan A, Saxena A, Morris DL. A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours [J]. *Surg Oncol*, 2014, 23(1):31–39.
- [17] Qin M, Brummel S, Singh KK, et al. Associations of host genetic variants on CD4+ lymphocyte count and plasma HIV-1 RAN in antiretroviral naïve children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(9):946–952.
- [18] Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8 lymphocytes predict clinical outcome in

- breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(15):1949–955.
- [19] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860–867.
- [20] Shimada H, Oohira G, Okazumi S, et al. Thrombocytosis associated with poor prognosis in patients with esophageal carcinoma[J]. *J Am Coll Surg*, 2004, 198(5): 737–741.
- [21] Ikeda M, Furuekawa H, Imamura H, et al. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2002, 9(3):287–291.
- [22] Mousa SA. Antithrombotics in thrombosis and cancer [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2003, 1(2):283–291.
- [23] Smith RA, Bosonnet L, Ghaneh P, et al. The platelet-lymphocyte ratio improves the predictive value of serum CA19-9 levels in determining patient selection for staging laparoscopy in suspected perampullary cancer[J]. *Surgery*, 2008, 143(5):658–666.
- [24] Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin on steroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Epidemiology*, 2001, 12(1): 88–93
- [25] Langman MJ, Cheng KK, Gilman EA, et al. Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database[J]. *British Medical Journal*, 2000, 320(7250): 1642–1646.
- [26] Perez DR, Baser RE, Cavnar MJ, et al. Blood Neutrophil-to-lymphocyte ratio is prognostic in gastrointestinal stromal Tumor[J]. *Surgical Oncology*, 2013, 20(2):593–599.
- [27] Kishi Y, Kopetz S, Chun YS, et al. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts survival in patients with colorectal liver metastases treated with systemic chemotherapy [J]. *Surgical Oncology*, 2009, 16(13): 614–622.

血清脂联素、TNF- α 、CRP 联合检测在脓毒症患者中的临床应用价值

樊兵^{1*} 胥顺²

[摘要] **目的** 探讨血清脂联素、肿瘤细胞坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)联合检测在脓毒症患者中的临床应用价值。 **方法** 选取2013年6月至2014年6月重庆市九龙坡区第五人民医院重症监护病房(intensive care unit, ICU)收治的40例脓毒症病例为观察组,另选随机抽取40例同期在本院行身体检查的正常体检者为对照组,应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定两组血清脂联素、TNF- α 水平,应用免疫比浊法测定两组CRP水平。 **结果** 观察组血清TNF- α 、CRP水平均高于对照组($P<0.05$),而血清脂联素水平低于对照组($P<0.05$)。随着急诊脓毒症死亡风险(mortality in emergency department sepsis, MEDS)增加,患者血清TNF- α 、CRP水平升高,而血清脂联素水平下降($P<0.05$)。 **结论** 联合检测血清TNF- α 、CRP、脂联素能更加准确的预测脓毒症患者病情进展,具有一定的临床应用价值。

[关键词] 血清脂联素;肿瘤细胞坏死因子 α ;C反应蛋白;脓毒症

Clinical application values of a combinational detection of serum adiponectin, TNF- α , CRP in patients with sepsis

FAN Bing^{1*}, XU Shun²

(1. Clinical Laboratory of Jiulongpo District Fifth People's Hospital of Chongqing City, Chongqing, China, 401329; 2. Darui Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate clinical applications value of a combinational detection of serum adiponectin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), C-reactive protein(CRP) in patients with sepsis. **Methods** Serum samples were chosen as the observation group from 40 patients with sepsis in intensive care unit (ICU). 40 healthy persons were chosen as the control group. All 80 specimens were collected in Jiulongpo District Fifth People's Hospital from June 2013 to June 2014. Concentration of adiponectin and TNF- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CRP were measured by immunoturbidimetry in both groups. **Results** Both levels of TNF- α , CRP in the observation group were higher than that in the control group while the serum adiponectin was lower. The differences were statistically significant ($P<0.05$). Moreover, with the risk of mortality in emergency department sepsis (MEDS) increased, the levels of TNF- α and CRP were elevated while adiponectin was decreased. The differences were statistically significant ($P<0.05$), as well.

Conclusion The method has certain clinical applications values.

[KEY WORDS] Serum adiponectin; Tumor necrosis factor- α ; C-reactive protein; Sepsis

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA020205)

作者单位:1. 重庆市九龙坡区第五人民医院检验科,重庆 401329

2. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

*通讯作者:樊兵, E-mail:767861243@qq.com

脓毒症^[1]即感染(可能或已有的)感染引起的全身炎症反应,可导致器官功能障碍或组织灌注不足。脓毒症是重症监护病房(intensive care unit, ICU)病房中常见的危急重症,患者治疗不及时则可导致多器官功能衰竭而死亡^[2-3]。其高发病率常导致ICU过度拥挤,危重患者停留时间延长,明显加大了医院负担及患者死亡风险。相关研究指出,脓毒症的发生与机体感染后产生大量炎症因子并作用于靶器官导致机体多器官功能衰竭有关^[4-5]。炎症因子的被激活及大量释放是引起脓毒症的重要因素,通过控制及抑制炎症因子水平的释放将有助于脓毒症病情的改善^[6-7]。脂联素是一种新近发现由脂肪细胞分泌的特异性蛋白,具有抗炎症的作用,介导促炎反应的作用^[7-8],其浓度水平与炎症因子分泌水平呈负相关。通过测定血清中脂联素水平可有效预测危重患者病情进展情况,有助于尽早对患者病情作出准确的诊断。C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是指在机体受到感染或组织损伤时血浆中一些急剧上升的蛋白质^[9-10],当CRP水平增加时则预示着机体出现急性炎症反应^[11]。肿瘤细胞坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)是由巨噬细胞分泌的炎症因子,正常水平的TNF- α 可以调节免疫应答、抗感染、促进组织修复、引起肿瘤细胞凋亡等,但大量产生和释放则会破坏机体的免疫平衡,与其它炎症因子一起产生多种病理损伤^[12],其水平升高则预测着患者体内出现炎症^[13]。酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法操作简单安全、灵敏度较高、特异性较好,可检测人血清APN及TNF- α 含量。CRP的检测方法众多,本实验采用灵敏度和精确度较高且成本较低的比浊法。

本研究将通过联合检测脓毒症患者血清脂联素、TNF- α 、CRP水平,并探讨这些指标对预测脓毒症患者病情进展的临床价值。

1 资料及方法

1.1 临床资料

自2013年6月至2014年6月连续收集重庆市九龙坡区第五人民医院ICU收治的40例严重脓毒症病例为研究对象(观察组)。纳入标准:(1)病例均符合美国危重病学会(Society of Critical Care Medicine, SCCM)对严重脓毒症的诊断标准;(2)病例均签署知情同意书;(3)均获得本院伦理委

员会批准。同时排除肝肾功不全、恶性肿瘤、严重心血管疾病、自身免疫性疾病及近期接受糖皮质激素治疗的患者。其中男性24例,女性16例,年龄22岁~78岁,平均年龄(48.96 \pm 3.45)岁;肺部感染12例,腹腔感染10例,泌尿感染5例,其他部分感染3例。另选随机抽取40例同期在本院行身体检查的正常体检者为对照组,男22例,女18例,年龄20岁~67岁,平均年龄(49.36 \pm 3.12)岁。两组性别、年龄无统计学差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 资料收集

记录观察组及对照组性别、年龄、入院时间、临床症状、生化指标、血常规、生命体征等情况,并记录患者感染部位及主诉症状。急诊脓毒症死亡风险(mortality in emergency department sepsis, MEDS)评分是2003年Shapiro等^[14]通过前瞻性研究筛选出与病死率相关的9个独立危险因素而组成的一套评分系统,根据此系统进行评分(表1),其中MEDS ≤ 4 分:极低危;MEDS 5~7分:低危型;MEDS 8~12分:中危型;MEDS 13~15分:高危型;MEDS >15 分:极高危型。

1.2.2 血清TNF- α 、CRP、脂联素测定

观察组入院后于次日清晨空腹抽取静脉血5 mL,体检者于体检当天空腹抽取静脉血5 mL。以3 000 r/min离心处理5 min后,留取上清,并置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。应用ELISA测定2组样本血清脂联素、TNF- α 水平。血清脂联素试剂盒由上海西唐生物技术公司提供,TNF- α 试剂盒由北京紫金生物技术公司提供。CRP水平采用免疫比浊法测定,测试过程严格按照试剂盒及仪器说明书进行操作。ELISA法简要操作流程如下:标准品、待测样本及一抗加入反应孔内;37 $^{\circ}$ C温育1 h;洗涤并用吸水纸拍干,重复此操作3次;加入80 μ L的辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(horseradish peroxidase conjugated streptavidin, HRP-Streptavidin),37 $^{\circ}$ C温育30 min;洗涤并用吸水纸拍干,重复此操作3次;加入底物A、B各50 μ L,37 $^{\circ}$ C温育10 min,避免光照;迅速加入50 μ L终止液,立即测定结果;在450 nm波长处测定各孔的光密度(optical density, OD)值。CRP的测定为两点终点法,试剂1+样本在37 $^{\circ}$ C保温2 min~5 min,加入试剂2,分别于保温10 s和300 s后记录吸光度(absorbance, A)。

表1 MEDS 评分标准

Table 1 Mortality in emergency department sepsis(MEDS) score

项目	定义	得分
终末期疾病	转移癌或1个月内>50%死亡可能的慢性病	6
呼吸困难	呼吸频率>20次/min,或SpO ₂ <90%,或PaCO ₂ <4.3 kPa	3
感染性休克	脓毒症+收缩压<90 mmHg (20~30 mL/kg 液体复苏后)	3
血小板<150×10 ⁹ /L		3
杆状核中性粒细胞>5%		3
年龄>65岁		3
下呼吸道感染	体检或影像学结果	2
居住在疗养院		2
意识改变	Glasgow 昏迷评分<15	2
总分		27

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间计量资料比较采用 *t* 检验,不同 MEDS 评分患者血清脂联素、TNF- α 、CRP 水平分析应用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组与对照组血清脂联素、TNF- α 、CRP 水平对比

观察组血清 TNF- α 、CRP 水平均高于对照组 ($P < 0.05$), 而血清脂联素水平低于对照组 ($P < 0.05$), 结果详见表 2。

表2 观察组与对照组血清脂联素、TNF- α 、CRP 水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum adiponectin, TNF alpha and CRP in observation group and control group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清脂联素 (mg/L)	TNF- α (ng/L)	CRP (mg/L)
观察组	40	4.25 ± 1.35	62.14 ± 10.28	47.12 ± 6.78
对照组	40	8.86 ± 2.45	20.36 ± 5.47	8.02 ± 1.32
<i>t</i> 值		5.978	6.712	8.125
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 不同 MEDS 评分血清脂联素、TNF- α 、CRP 水平分析

随着 MEDS 增加,患者血清 TNF- α 、CRP 水平升高,而血清脂联素水平下降 ($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

本研究通过联合检测血清脂联素、TNF- α 、CRP 三种血清学标志物来对脓毒症患者病情进行评估鉴定。结果显示,观察组血清 TNF- α 、CRP 水平均高于对照组 ($P < 0.05$), 而血清脂联素水平低于对照组 ($P < 0.05$)。根据已有报道提示,脂联素可作为脓毒症治疗的调控靶标, 且与血清 CRP 的表达呈负相关; 也有研究^[15]表明脂联素具有抗炎效

应,采用脂联素刺激巨噬细胞能够显著抑制脂多糖诱导的 TNF- α 的表达, 其浓度与致炎因子 TNF- α 水平呈反向变化, 两者相互拮抗可能发挥抗炎作用^[16], 说明血清脂联素水平降低可能是脓毒症发生发展的重要因素, 提示脂联素在脓毒症病理生理过程中参与了炎症反应的调节^[17], 这与本研究结论一致。而如果我们进行单个指标的检测, 可能无法得出与脓毒症密切相关的有意义结论。同时, 我们还发现, 观察组中随着 MEDS 评分增加, 患者血清 TNF- α 、CRP 水平升高, 而血清脂联素水平下降 ($P < 0.05$), 这也进一步支持了前面结论, 从而提示通过测定 TNF- α 、CRP 及脂联素水平将有助于临床对脓毒症患者病情的诊断, 具有一定的临床

表3 观察组不同MEDS评分血清脂联素、TNF-α、CRP水平分析($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Analysis of serum adiponectin, TNF alpha and CRP in observation group with different MEDS score ($\bar{x} \pm s$)

MEDS评分(分)	例数	血清脂联素(mg/L)	TNF-α (ng/L)	CRP(mg/L)
≤4	7	7.12 ± 0.85	23.45 ± 3.28	13.48 ± 2.10
5~7	8	5.48 ± 1.12 ^a	35.16 ± 5.485 ^a	23.05 ± 3.455 ^a
8~12	8	4.23 ± 1.08 ^{ab}	46.98 ± 6.825 ^{ab}	39.78 ± 4.215 ^{ab}
13~15	10	3.10 ± 0.98 ^{abc}	62.12 ± 8.965 ^{abc}	52.63 ± 3.785 ^{abc}
>15	7	1.12 ± 0.95 ^{abcd}	72.86 ± 9.635 ^{abcd}	62.12 ± 5.225 ^{abcd}
F 值		12.023	9.686	8.978
P 值		0.000	0.000	0.000

^a 与≤MEDS 4分相比, P<0.05; ^b 与MEDS 5~7分相比, P<0.05; ^c 与MEDS 8~12分相比, P<0.05; ^d 与MEDS 13~15分相比, P<0.05

应用价值。

越来越多对 TNF-α、CRP 及血清脂联素水平进行联合检测的研究显示^[7,18],联合检测 3 种标志物对于脓毒症的判断是具有临床价值的,在脓毒症的病情分析、预后判断以及疗效评估中发挥了重要作用。在脓毒症患者过程中,还有其他的一些炎症因子也起着不可或缺的作用,因此,我们需要进一步对更多个指标进行联合检测来评价其临床应用价值。

参考文献

[1] 高戈,冯喆,常志刚,等. 2012 国际严重脓毒症及脓毒性休克诊疗指南[J]. 中华危重病急救医学, 2013,25(8): 501-505.

[2] 边毓尧,寿松涛. 脓毒症患者早期血浆皮质醇水平变化及其临床意义研究[J]. 中国全科医学, 2013,9(8):463-464.

[3] Behnes M, Brueckmann M, Lang S. Alterations of leptin in the course of inflammation and severe sepsis[J]. BMC Infect Dis, 2012, 14(11):189-191.

[4] 赵永祯,李春盛. 急诊脓毒症病死率评分在急诊脓毒症患者中的应用[J]. 中华急诊医学杂志, 2011,8(5):378-379.

[5] Garcia P, Sood A. Adiponectin in pulmonary disease and critically ill patients[J]. Curr Med Chem, 2012,19(32): 5493-5500.

[6] 黄昭,王思荣,刘继云,等. 血液灌流治疗对脓毒症急性肾损伤患者炎症因子的清除及肾脏保护作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2011,1(5):597-598.

[7] 汤石林,符晖,赵正亮,等. 脓毒症患者血清脂联素水平及与炎症因子的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011,15(3):119-121.

[8] 李登清,陈琳磊,何笑恬,等. 人血清脂联素定量检测方法的建立及初步临床应用[J]. 第二军医大学学报, 2009,30(7):850-853.

[9] 刘慧琳,刘桂花,马青变,等. 降钙素原对急诊脓毒症患者早期诊断的价值[J]. 中国危重病急救医学, 2012,24(5):298-301.

[10] 贾利敏,黄立新. C-反应蛋白的临床应用及预测价值[J]. 实用心脑血管病杂志, 2006,14(9):761-762.

[11] 黄伟平,江稳强,胡北,等. 降钙素原对全身炎症反应综合征患者病情预后的判断价值[J]. 中国危重病急救医学, 2012,24(5):294-297.

[12] 田中秋,邓立普. TNF-α、IL-6 在全身炎症反应综合征表达的研究进展[J]. Journal of Snake, 2008,20(4):275-277.

[13] 李玖军,张涛. C 反应蛋白及降钙素原在小儿脓毒症血流感染及其他部位感染性疾病中的诊断价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2013,15(3):212-215.

[14] Shapiro NI, Wolfec RE, Moorec RB, et al. Mortality in emergency department sepsis(MEDS) score: a prospectively derived and validated clinical prediction rule [J]. Crit Care Med, 2003,31(3):670-675.

[15] Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypo adiponectinemia with coronart artery disease in men [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003,23(1):85-89.

[16] Xu L, Bao HG, Si YN, et al. Effects of adiponectin on acute lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis rats[J]. J Surg Res, 2013,183(2):752-759.

[17] 吴艳春,黄立权,王灵聪,等. 脓毒症患者血清脂联素水平的初步研究[J]. 中华危重症医学杂志, 2010,3(5): 297-300.

[18] 王永芹,李治国. 血清脂联素、TNF-α、CRP 在脓毒症患者中的临床应用价值分[J]. 中国免疫学杂志, 2014,4(30):528-530.

c-Kit⁺Lin⁻细胞移植改善急性肝损伤的实验研究

张守华¹ 杨慎华² 杨文萍³ 徐红艳³ 雷俊¹ 黄慧³ 刘志强³ 陶强^{1*}

[摘要] **目的** 探讨骨髓 c-Kit⁺Lin⁻(CD117)细胞移植治疗小鼠急性肝损伤的效果以及机制,为骨髓源性肝干细胞的临床应用提供实验依据。 **方法** 18只成年 BALB/c 小鼠随机分为正常组、实验组和干细胞移植组,正常组不予任何处理,模型组小鼠腹腔注射 CCl₄ 后仅输入生理盐水,移植组小鼠在腹腔注射 CCl₄ 后尾静脉输注骨髓 CD117 细胞(1×10⁶),48 h 后观察各组小鼠肝功能水平变化,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色分析肝脏病理学改变,免疫组化检测肝脏细胞增殖情况。 **结果** 模型组腹腔注射 CCl₄ 后肝功能严重受损,血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、胆红素(bilirubin)等升高,肝脏的 HE 染色可见片状坏死,炎症细胞浸润;移植组小鼠移植干细胞 48 h 后小鼠肝功能有所恢复,病理提示肝脏坏死区域有所减小,Ki67 免疫组化提示干细胞可促进肝脏再生。 **结论** 经尾静脉注入的骨髓来源的 CD117 干细胞能改善急性肝损伤肝功能以及修复受损肝脏,是治疗急性肝损伤的一种安全有效的方法。

[关键词] 骨髓 c-Kit⁺lin⁻细胞;肝干细胞;急性肝损伤

The study of transplantation of c-Kit⁺ Lin⁻ cell for treatment of acute liver injure

ZHANG Shouhua¹, YANG Shenhua², YANG Wenping³, XU Hongyan³, LEI Jun¹, HUANG Hui³, LIU Zhiqiang³, TAO Qiang^{1*}

(1. Department of General Surgery, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi, China, 330006; 2. Institute of Occupational Medicine of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi, China, 330006; 3. Department of Pathology, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi, China, 330006)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of bone marrow c-Kit⁺ lin⁻ cell(CD117) transplantation on acute liver injury mice model and provide experimental basis for clinical application. **Methods** 18 BALB/c mice were randomly divided into 3 groups: normal group, experiment group and stem cell transplantation group. In normal group, the mice did not give any processing. In experiment group, the CCl₄ was injected intraperitoneally, and then infused saline. In stem cell transplantation group, the mice injected bone marrow CD117 cell(1×10⁶) via tail vein after CCL₄ intraperitoneal injection. The liver functional was measured after 48 hours. The liver histologic changes were assessed by hematoxylin-eosin(HE) staining. The hepatocyte proliferation was assessed by immunohistochemical. **Results** The liver functional of experiment group was severely damaged after CCL₄ intraperitoneal injection.The expressions of alanine transaminase(ALT), glutamic oxalacetic transaminase(AST) and bilirubin in experiment group increased. The HE staining revealed extensive hepatocellular necrosis in mice subjected to CCL₄ intraperitoneal injection. In stem cell transplantation group.The liver function was recovered after 48h of stem cell transplantation, and the

基金项目:江西省卫生厅科技计划(20155568);江西省科技支撑计划项目(20112BBG70069)

作者单位:1. 江西省儿童医院普外科,江西,南昌 330006

2. 江西省职业病防治研究院,江西,南昌 330006

3. 江西省儿童医院病理科,江西,南昌 330006

*通讯作者:陶强, E-mail:taoqiang_2008@126.com

area of necrosis was significantly lower. The Ki67 expressions indicated the stem cell can improve hepatocyte proliferation. **Conclusion** Inject bone marrow CD117 cell via tail vein can protect the liver from acute liver injury and repair the damaged liver. It can be considered as a therapeutic option to prevent acute liver injury.

[KEY WORDS] Bone marrow c-Kit⁺Lin⁻ cell; Hepatic stem cell; Acute liver injury

众多学者已经证实骨髓来源的干细胞可分化为肝细胞、胆管细胞等^[1]。本课题组总结以往的研究成果,并结合自己的前期研究,发现在骨髓干细胞群中 c-kit⁺Lin⁻(CD117)干细胞群具有很强的向肝细胞分化的能力^[2-3],并且已经在以往的实验中发现可以分化为肝细胞并且改善肝纤维化小鼠的肝功能以及肝纤维化病变程度。但是 CD117 细胞是否可以改善急性肝损伤目前报道较少。本实验采用 CCl₄ 建立急性肝损伤模型,探讨移植 CD117 细胞是否有改善肝损伤作用以及机制。

1 材料与方 法

1.1 免疫磁珠法分离骨髓 c-kit⁺Lin⁻细胞

取 10 只 Balb/c 小鼠,无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)级,5 周龄~6 周龄、体质量 15 g~18 g,购自南昌大学实验动物中心。小鼠颈椎脱臼处死,置 75%的乙醇浸泡 15 min;无菌取出解剖双侧股骨,离断两端骨髓,PBS 反复冲洗骨髓腔;细胞悬液吹打后加入红细胞裂解液 6 mL,30 μm 400 目尼龙膜过滤,获取细胞悬液。利用德国 Miltenyi Biotec 公司 lin-细胞单抗分离系统先分离富集 lin-细胞,在此基础上再阳性分选出 c-kit⁺细胞,最后富集得到 CD117 细胞。分离方法按 c-kit⁺以及 Lin-试剂盒(德国 Miltenyi Biotec 公司)说明书进行。利用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测分选的 CD117 细胞,其纯度为 90%以上,台盼蓝染色细胞活力超过 95%。

1.2 实验动物和分组

小鼠急性 CCl₄ 肝损伤模型的建立:取 BALB/c 小鼠 18 只,雌雄各半,自由饮水及进食。采用橄榄油作溶剂,将 CCl₄ 溶于橄榄油中,配成 10%(V/V) CCl₄ 橄榄油。

小鼠随机分为 3 组,每组 6 只:正常组仅仅腹腔注射 300 μL/kg 橄榄油;模型组腹腔注射 10% CCl₄ 300 μL/kg;移植组腹腔注射 10% CCl₄ 300 μL/kg 后 1 h 给予尾静脉注射新鲜分选的 CD117

细胞,移植数量为 1×10⁶/只。

1.3 移植后的观察

移植后 48 h,取各组小鼠肝组织行常规组织病理学检查苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,同时眼球取血检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、白蛋白(albumin, ALB)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)等肝功能指标。

免疫组织化学法检测 Ki67:肝组织切片厚度 4 μm,常规脱蜡至水化,微波对抗原修复,5%的羊血清封闭非特异性蛋白,加 Ki67 第一抗体,37℃恒温孵育 30 min,再置 4℃冰箱过夜;加第二抗体,37℃恒温孵育 30 min;采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP),DAB 显色,阳性染色的细胞为棕黄色或棕褐色。用光学显微镜观察 Ki67 在肝组织中的分布情况以及表达指数:取 3 张不连续切片,每张切片随机选取 10 个视野,计数每个视野中的阳性细胞和总细胞数,取其均值,计算 Ki67 阳性表达指数,即阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。所有数据以均数±标准差表示。各组间数据的比较采用完全随机设计资料的多个样本均数比较。方差不齐时采用 Tamhane 检验。*P* ≤ 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织病理学变化

正常组小鼠肝脏颜色为暗红色,表面光滑,有光泽,HE 染色可见肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,结构清晰,未见炎性细胞浸润,肝索排列整齐(图 1)。模型组小鼠肝脏肝 HE 染色可见肝细胞片状坏死(箭头所示),细胞索紊乱,肝小叶中心带肝细胞胞浆肿大疏松,脂肪样变,炎性细胞浸

润(图2)。移植 CD117 细胞 48 h 后,HE 染色可见移植组小鼠肝脏坏死区域减小,肝细胞形态有所恢复,气球样变性减轻(图3)。

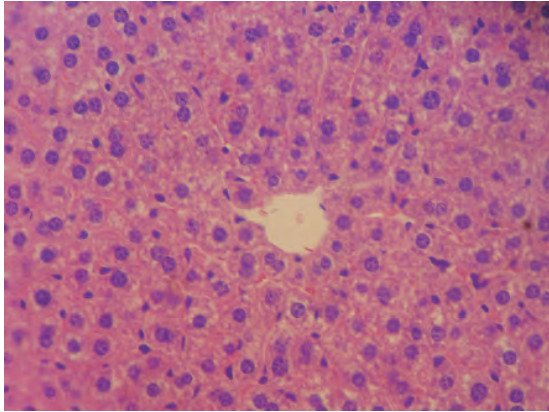


图1 正常组小鼠肝组织(HE ×400)
Figure 1 Liver tissue of normal group(HE ×400)

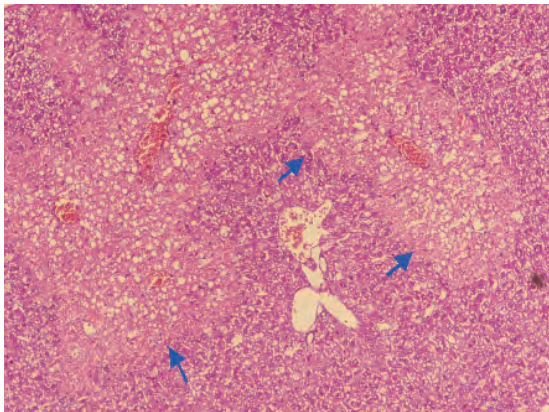


图2 模型组小鼠肝组织(HE ×200)
Figure 2 Liver tissue of model group(HE ×200)

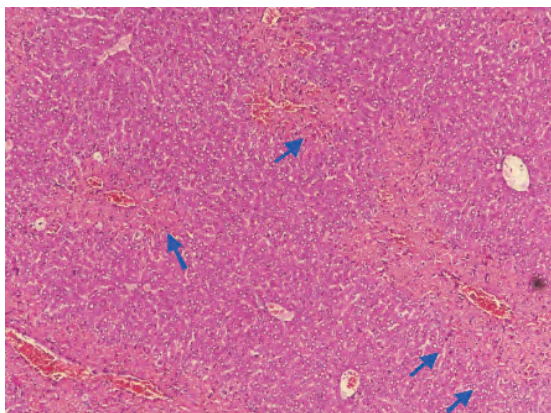


图3 移植组小鼠肝组织(HE ×200)
Figure 3 Liver tissue of transplantation group(HE ×200)

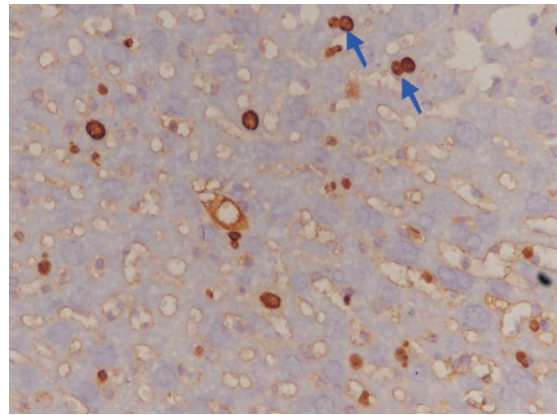


图4 移植组肝组织 ki67 的表达(×400)
Figure 4 Ki67 in liver of transplantation group(×400)

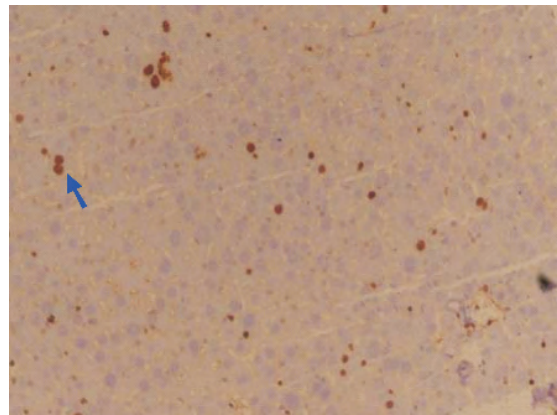


图5 正常组肝组织 ki67 的表达(×200)
Figure 5 Ki67 in liver of normal group(×200)

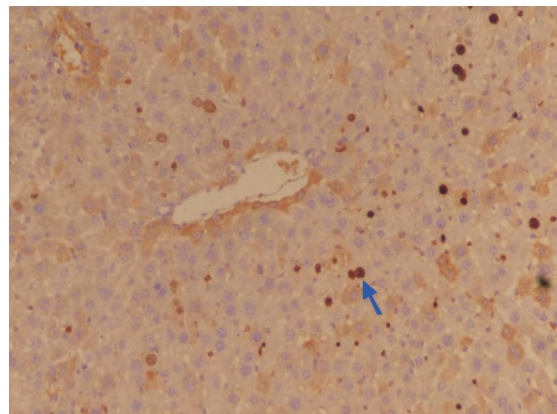


图6 模型组肝组织 ki67 的表达(×200)
Figure 6 Ki67 in liver of model group(×200)

2.2 肝功能变化

移植 48 h 后移植组与模型组相比,肝功能均有改善,AST、ALT、ALB 以及 TBIL 均有所恢复(表1)。

表 1 肝功能相关指标的变化

Table1 The changes of liver function related indices

组别	n	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALB(g/L)	TBIL(μmol/L)
正常组	6	106.0±12.3	44.4±6.2	39.5±5.1	6.83±0.43
移植组	6	217.2±49.5	289.1±46.2	33.5±4.3	19.68±5.53
模型组	6	386.3±81.9	481.3±117.3	28.3±2.6	50.87±11.01
P 值		P=0.007	P=0.025	P=0.047	P=0.001

移植组与模型组比较 P<0.05

2.3 Ki67 蛋白在各组肝组织中的表达

Ki67 阳性表达定位于细胞核,呈棕黄色颗粒,细胞膜、细胞浆均不染色。免疫组化结果显示移植组(图 4)ki67 的表达指数(4.0±1.0)明显高于正常组(0.9±0.2)(P=0.001)(图 5)以及模型组(1.9±0.4)(P=0.005)(图 6)。

3 讨论

自从骨髓中的干细胞能够在体内外分化成为肝细胞的现象被发现之后,越来越多的研究证实了肝脏干细胞在治疗肝脏疾病的有效性^[3]。CD117 细胞即为骨髓衍生肝干细胞(bone marrow derived liverstem cells, BMDLSC),我们在以往干细胞治疗肝纤维化的前期工作已经初步证实了 c-kit⁺Lin⁻(CD117)细胞向肝细胞分化的能力较强,移植入肝纤维化模型鼠体内可以改善病变过程,在一定程度上能恢复肝功能。本实验将 CD117 细胞移植入急性肝损伤小鼠体内,观察其对急性肝损伤是否有治疗效果。

目前,CCl₄ 诱导的小鼠急性肝衰竭是国内外学者普遍认可和使用的动物模型。CCl₄ 对肝脏毒性作用的机制复杂,与氧化应激和脂质过氧化反应有关。当 CCl₄ 进入肝细胞后,经过细胞色素 P450 酶代谢激活,产生三氯甲基自由基(CCl₃·)和过氧化三氯甲基自由基(OOCCl₃·),这些自由基与肝细胞膜、内质网和线粒体上的磷脂分子发生共价结合,引发脂质过氧化反应损害膜的结构和功能以及钙泵的活性,引起能量代谢障碍,导致细胞损伤^[4-5]。细胞损伤坏死刺激炎症细胞募集,释放炎症介质,进一步损伤肝细胞。膜结构的破坏使胞内的转氨酶 ALT、AST 溢出,使血浆中的 ALT、AST 等升高,在一定程度上反映了肝细胞的损伤程度^[6-7]。本实验运用 CCl₄ 腹腔注射建立小鼠急性

肝损伤模型,注射后小鼠转氨酶明显升高,实验结果显示建模成功。

Ki67 是一种与细胞分裂及增殖有关的蛋白,只在增殖细胞中表达,定位于细胞核,参与细胞周期调控,可准确反映细胞的增殖情况。Ki67 基因定位于第 10 号染色体的长臂(10q25)上,其表达出现在 G1 中期到晚期,在 S 期和 G2 期逐渐增加,且有丝分裂达到高峰,离开增殖周期后迅速降解或者抗原决定簇丢失,在 G0 期消失^[8]。由于 Ki67 半衰期短,仅 1 h 或更短,能有效地检测细胞的增殖活性与水平,出现假阴性或假阳性的概率较低^[9]。因此本实验采用 Ki67 作为肝脏损伤后肝脏再生、修复的一个重要指标。

在本研究中,考虑到免疫排斥因素,供体和受体均采用近交系的 BALB/c 小鼠,移植途径选择从尾静脉注入,移植过程安全、方便。移植组在接受 CD117 细胞移植后,结果显示肝功能与模型组相比有所恢复,AST 和 ALT 均下降,ALB 有所升高。腹腔注射 CCl₄ 后,模型小鼠肝脏病理可见众多区域的片状坏死,炎症细胞浸润,肝细胞胞浆气球样变;而移植组小鼠肝脏片状坏死区域减小,肝细胞结构有所恢复,ki67 免疫组化也显示移植组阳性率明显高于模型组,提示移植的 CD117 干细胞可促进肝脏再生。我们的前期研究提示,CD117 细胞体内移植后,需要一周以上的时间才能分化为肝样细胞,本实验移植时间仅仅 48 h,由此推论其改善肝功能并非通过定向分化这条途径。我们推测肝细胞坏死以及炎性细胞浸润所释放的炎症介质促使 CD117 细胞归巢于肝脏,在肝脏定居后分泌细胞因子如肝细胞生长因子、表皮生长因子等从而促进肝脏再生。有文献报道来源于脂肪的间充质干细胞可分泌 IL-18 保护 CCl₄ 诱导的肝脏损伤^[10],CD117 细胞刺激肝细胞的再生其机制需要进一步研究。

急性肝损伤是短时间内由于各种因素如用药不当、病毒、肝脏缺血再灌注、食物添加剂、乙醇摄入过多及接触、食入有毒食物、放射性损伤等诱发的肝细胞变性坏死,表现为转氨酶的升高,白蛋白下降,可导致肝脏不可逆的损伤,严重的可合并肝肾综合征、肝性脑病,凝血功能障碍,甚至导致个体死亡^[11]。近年来干细胞的研究在生物医学领域中取得的进展为肝脏疾病的治疗提供了新的契机。本实验所研究的 CD117 干细胞为造血干细胞的一种,肝脏与造血之间存在天然的内在联系,在胚胎发育过程中,胎肝是主要的造血器官,也是造血干细胞生存的场所,已有众多实验证实造血干细胞向肝细胞横向分化是可行的^[12]。骨髓中存在着与肝脏相同标志的干细胞如 c-Kit、CD34、Thy-1⁺等^[13-14],本实验所研究的 CD117 细胞即是此类细胞的一种,发现其有效的辅助治疗了急性肝损伤,为肝脏疾病的治疗开辟了新的领域。

参考文献

- [1] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. *Cell*, 2001, 105(3):369-377.
- [2] 唐浩, 廖彩仙, 周杰, 等. 小鼠 c-Kit⁺Lin⁻骨髓细胞移植生成肝细胞的实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(5):567-569.
- [3] 张守华, 肖菊花, 邓庆强, 等. 骨髓 c-Kit⁺Lin⁻细胞移植改善肝纤维化的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(7):821-824.
- [4] 朱安妮, 李蕊, 刘三海, 等. 四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤模型的建立和优化[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2014, 6(1):27-31.
- [5] Lin JC, Peng YJ, Wang SY, et al. Role of the sympathetic nervous system in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and systemic inflammation[J]. *Plos One*, 2015, 10(3):e0121365.
- [6] Lin X, Huang R, Zhang S, et al. Methyl helicterate protects against CCl₄-induced liver injury in rats by inhibiting oxidative stress, NF- κ B activation, Fas/FasL pathway and cytochrome P450E1 level[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(10):3413-3420.
- [7] Liu H, Wang Z, Nowicki MJ, et al. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(48):18189-18198.
- [8] 张继屏, 范静平, 邓月, 等. Ki67 和 nm23 蛋白在鼻咽癌中的表达及临床意义[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2015, 15(1):20-24.
- [9] Bridger JM, Kill IR, Lichter P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells[J]. *Chromosome Res*, 1998, 6(1):13-24.
- [10] Deng L, Liu G, Wu X, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells efficiently rescue carbon tetrachloride-induced acute liver failure in mouse[J]. *Scientific World Journal*, 2014, 2014:103643.
- [11] Shalimar, Acharya SK. Management in acute liver failure[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2015, 5(Suppl 1):S104-115.
- [12] Michalopoulos GK, Khan Z. Liver stem cells: Experimental findings and implications for human liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.004. [Epub ahead of print].
- [13] Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(10):98-104.
- [14] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*[J]. *Nat Med*, 2000, 6(11):1229-1234.

NDRG1 与 E-cadherin 下调表达及其与胃癌淋巴结转移的关系研究

廖爱辉¹ 刘展^{2*} 雷志胜³

[摘要] 目的 探讨 NDRG1 和 E-cadherin 基因 mRNA 表达与胃癌淋巴结转移关系。方法 收集 51 例液氮保存的新鲜原发性胃癌组织和 33 例淋巴结转移的胃癌, Trizol 常规方法提取组织总 RNA。在将这些总 RNA 逆转录成 cDNA 后, 利用实时荧光定量 PCR 检测 NDRG1 和 E-cadherin 基因在这两种组织中的表达情况, 统计分析它们表达变化与胃癌淋巴结转移的关系。结果 与原发性胃癌组织相比, NDRG1 与 E-cadherin mRNA 在淋巴结转移的胃癌组织中表达下调, 且两者表达明显呈正相关性。结论 降低的 NDRG1 和 E-cadherin 基因表达与胃癌的淋巴结转移密切相关。

[关键词] NDRG1; E-cadherin; 胃癌; 荧光定量 PCR

The relationship study between the down expression of NDRG1 and E-cadherin with lymphonode metastasis in gastric cancer

LIAO Aihui¹, LIU Zhan^{2*}, LEI Zhisheng³

(1. The First Surgical Department, the Geology and Mineral Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan, China, 410000; 2. Medical Department of Digestion, People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan, China, 410000; 3. General Surgical Department, the Center Hospital of Changsha City, Changsha, Hunan, China, 410000)

[ABSTRACT] Objective To explore the relationship between the down expression of NDRG1 and E-cadherin mRNA with the lymphonode metastasis in gastric cancer. Methods Total RNAs of 51 primary fresh gastric samples and 33 gastric cancer samples spreading to lymphonode were extracted by routine Trizol way. Then total RNAs were transcribed into cDNAs, and the expressions of NDRG1 and E-cadherin gene were detected by real-time quantitative PCR. Finally, the correlation of NDRG1 and E-cadherin expression in gastric cancer tissues of lymphonode metastasis was analyzed. Results Compared with primary gastric samples, the expressions of NDRG1 and E-cadherin were markedly reduced in gastric cancer tissues of lymphonode metastasis. Furthermore, the positive correlation of expression between NDRG1 and E-cadherin was also observed. Conclusion Reduced expressions of NDRG1 and E-cadherin were closely associated with the lymphonode metastasis of gastric cancer.

[KEY WORDS] NDRG1; E-cadherin; Gastric cancer; Real-time PCR

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率居各类肿瘤的前列^[1]。该疾病是一种严重威胁人类

身体健康的疾病, 其发病原因不明, 可能与多种因素, 如饮食种类、环境因素、遗传素质、以及长期幽

基金项目: 湖南省发改委科研项目(2014-2)

作者单位: 1. 湖南省地矿医院外一科, 湖南, 长沙 410000

2. 湖南省人民医院消化内科, 湖南, 长沙 410000

3. 长沙市中心医院普外科, 湖南, 长沙 410000

*通讯作者: 刘展, E-mail: Liuzhan2004@126.com

门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *HP*)感染等有一定的关系。胃正常黏膜在这些因素共同作用下,其细胞内基因表达会发生异常的改变,特别是瘤基因的激活和抑瘤基因的失活,最终会导致肿瘤的发生。

NDRG1 是转录因子 v-myc 禽髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生同系物(v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog, N-MYC)的下游调节基因,在肿瘤中主要受其抑制而下调表达。NDRG1 在多种肿瘤组织中表达明显减低。最近,Jiang 发现该基因在胃癌中表达也明显下调^[2],提示 NDRG1 参与了胃癌的发病过程。E-Cadherin 是一个上皮间充质转化标志基因,其在肿瘤侵袭转移过程中也常常发生表达下调,包括胃癌^[3-5]。在以往的研究中,虽有报道显示这两个基因与胃癌转移有一定的关系,但很少有使用原发性胃癌组织以及淋巴结转移胃癌组织探讨这两个基因在胃癌中转移的作用,且鲜有研究报道两者在胃癌淋巴结转移过程中的表达相关性。

1 材料与方法

1.1 组织标本

51 例原发性胃癌组织和 33 淋巴结转移性胃癌来自于中南大学湘雅二医院 2012 年 3 月到 2013 年 5 月收集的液氮保存标本。该组病人年龄在 31 到 76 岁之间,中位年龄 52.2 岁。其病理类型都为腺癌。

1.2 主要试剂

逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 引物设计

在线 Primer-blast 工具设计 NDRG1 和 E-cadherin 基因荧光定量 PCR 引物,NDRG1 上游引物:5'-GTTCTGGAGGTCGGGAAGGG-3',NDRG1 下游引物:5'-CCAAAGGCTTCACCTCAGCG-3',全长 201 bp。E-cadherin 上游引物:5'-AAGAGAGTGGAAGTGTCCTCGA-3',E-cadherin 下游引物:5'-GATCAGCAGAAGTGTCCTCG-3',全长 282 bp。内参引物为 Beta Actin,上游引物:5'-CACCCAGCA-CAATGAAGAT-3',下游引物:5'-CAAATAAAGC-CATGCCAAT-3',全长 255 bp。引物由上海英骏公司合成。

1.4 RNA 提取及逆转录

常规 Trizol 提取总 RNA,总 RNA 随即被逆转录成 cDNA,反应条件如下:总 RNA 1 μg ,2 μL dNTP mix(10 mmol/L),2 μL oligo(dT)₁₈(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),添加无 RNA 酶的去离子水 13.5 μL ,混匀,离心。70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,室温静置 2 min。然后依次添加 4 μL 5 \times Buffer,1 μL 0.1 M DTT,0.5 μL RNase inhibitor(40 U/ μL),1 μL 逆转录酶(200 U/ μL),混匀,离心,放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 1h,95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。

1.5 表达检测

应用实时荧光定量 PCR 在胃癌组织中扩增 NDRG1 和 E-cadherin 基因,反应体系为 SYBR Premix Ex(2 \times) 10 μL ,上下游引物(10 μmol)各 0.4 μL 、ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μL 、cDNA 模板 1 μL 和灭菌去离子水 7.8 μL ,共 20 μL 。反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,45 个循环;最后,产物在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,溶解曲线分析。实验重复 3 次。

1.6 实验数据处理及分析

采用 SPSS 11.5 统计分析软件包进行数据处理。在本研究中,我们基于目的基因和看家基因实时荧光定量扩增曲线得到 Ct(C:循环周期,Cycle;t:阈值,threshold)值,通过 $\Delta\text{CT} = \text{Ct}$ 目的基因-Ct 内参基因公式,计算出目的基因相对于看家基因的表达强度。 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (肿瘤样品)- ΔCt (正常样品)。目的基因相对肿瘤为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,当 >1 的时候,目的基因表达上调,反则下调。基因表达相关系分析采用 Bivariate 程序进行分析。

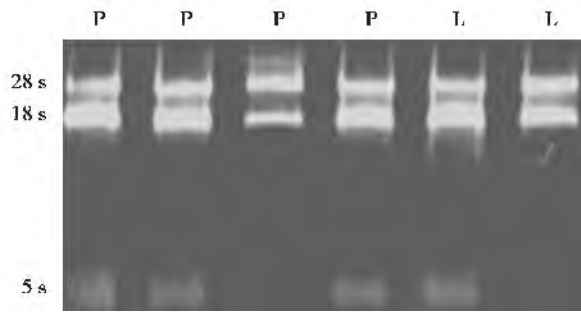
2 结果

2.1 RNA 提取

对样品总 RNA 行 260/280 的比值检测,样品基本上都在 1.7~2.1 之间,这表明这些提取的总 RNA 质量基本合格,可用于下一步实验(见图 1)。

2.2 NDRG1 在淋巴结转移胃癌中表达降低

我们利用实时荧光定量 PCR 检测了 NDRG1 在原发性胃癌组织与淋巴结转移的胃癌组织中表达(图 2)。结果显示,与原发性胃癌组织相比,NDRG1 在淋巴结转移的胃癌组织中表达明显下调($P=0.0097$)(图 3)。



P:原发性胃癌组织; L:淋巴结转移胃癌组织

图1 1%琼脂糖凝胶RNA电泳图

Figure 1 1% agarose gel electrophoresis map of RNA

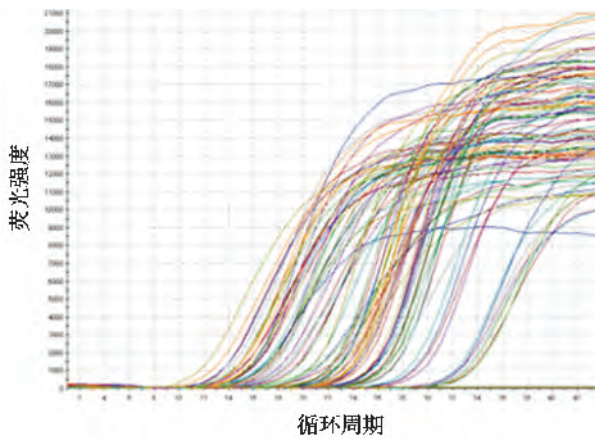


图2 NDRG1实时荧光定量PCR检测图

Figure 2 The examination map of real-time quantitative PCR of NDRG1

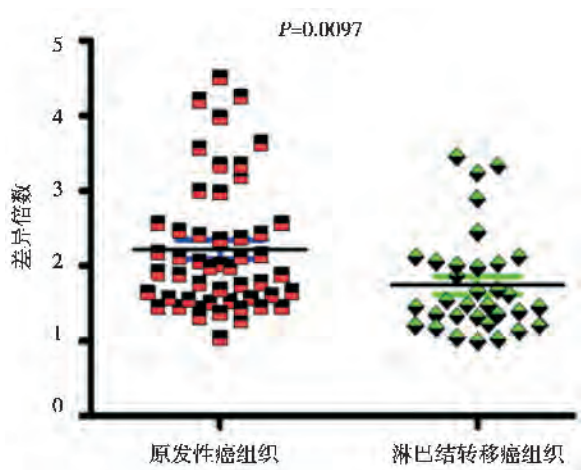


图3 NDRG1基因在原发性胃癌组织和淋巴结转移胃癌组织中差异表达

Figure 3 Differential expression of NDRG1 between primary gastric samples and gastric cancer tissues of lymphonode metastasis

2.3 E-cadherin 在淋巴结转移胃癌中表达降低

我们利用实时荧光定量PCR检测了E-cadherin在原发性胃癌组织与淋巴结转移的胃癌组织中表达(图4)。结果显示,与原发性胃癌组织相比,E-cadherin在淋巴结转移的胃癌组织中表达明显下调($P=0.014$)(图5)。

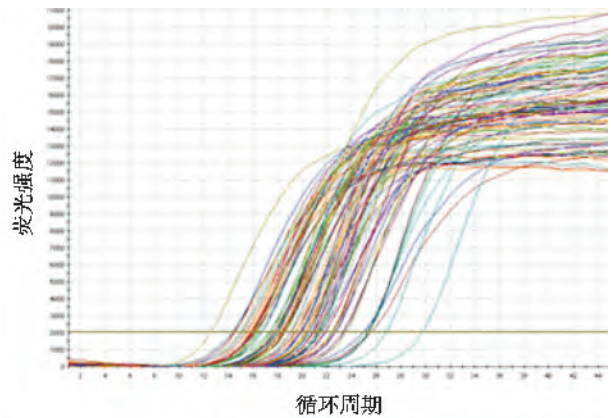


图4 E-cadherin实时荧光定量PCR检测图

Figure 4 The examination map of real-time quantitative PCR of E-cadherin

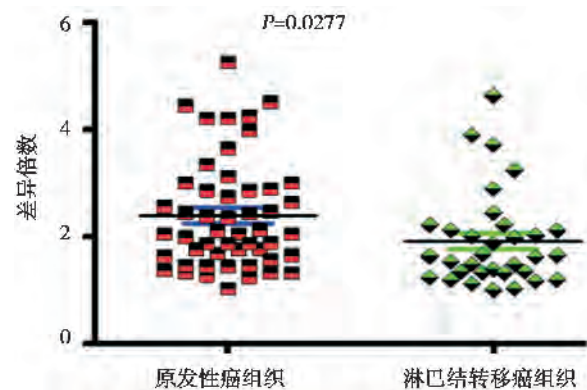


图5 E-cadherin基因在原发性胃癌组织和淋巴结转移胃癌组织中差异表达

Figure 5 Differential expression of E-cadherin between primary gastric samples and gastric cancer tissues of lymphonode metastasis

2.4 NDRG1 与 E-cadherin 淋巴结转移胃癌组织中呈表达正相关性

为了进一步明确NDRG1与E-cadherin基因在淋巴结转移胃癌组织中表达降低可能存在协同作用,我们利用SPSS软件Bivariate程序分析了2

个基因在淋巴结转移的胃癌组织中表达相关性。结果显示,其表达相关系数 $r=0.857, P<0.001$, 这表明了 NDRG1 与 E-cadherin 表达呈正相关性(图 5), 提示了它们在胃癌转移过程中发挥了协同作用。

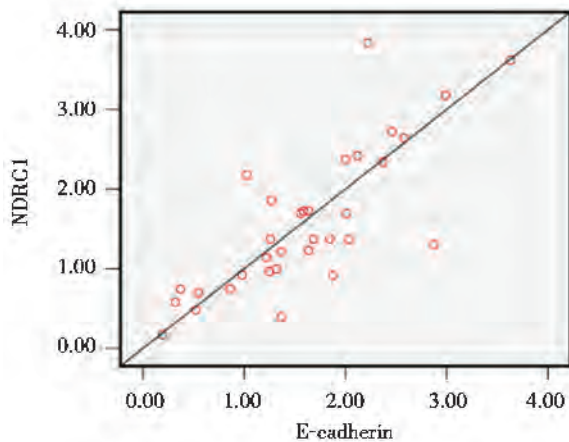


图 6 NDRG1 在淋巴结转移胃癌组织中与 E-cadherin 表达相关性分析

Figure 6 The expression correlation analysis of NDRG1 with E-cadherin in gastric cancer tissues of lymphonode metastasis

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,在消化系肿瘤发病中位居第一,其发病年龄多在 40 岁以上,男性多于女性^[1]。胃癌的发病与其基因调节紊乱密切相关^[6]。

NDRG1 基因定位于人染色体 8q24.3,长约 60 kb,其 mRNA 全长约 3 kb,编码蛋白产物含有 394 个氨基酸,分子质量为 43 kd。NDRG1 最初是在 N-MYC 敲除的小鼠胚胎组织中发现的,它受 N-MYC 的抑制而得名。该基因被多个学者通过差异显示法相继独立发现和分离^[7]。最近的研究显示,该基因在前列腺癌^[8]、胃癌^[2]和结肠癌^[9]中表达下调。将 NDRG1 cDNA 导入转移性结肠癌细胞系 SW620 中,观察到原先高转移性的结肠癌细胞系 SW620 体外侵袭能力明显下降;将其种植到裸鼠体内,肝脏转移能力也明显降低,这提示 NDRG1 基因参与了结肠癌的转移过程^[10]。

E-cadherin 基因定位于 16q22.1 染色体上,是一种钙依赖性细胞粘附分子,存在于正常上皮细胞中以维持组织正常形态,这对于保持细胞完整性,防止肿瘤细胞离散、脱落起着很重要的作用。E-cadherin 基因作为细胞上皮向间质转化关键基因,其表达降低提示肿瘤细胞开始发生转移^[11]。在以往研究中,已有不少报导显示 E-cadherin 在胃癌组织中表达下调促进了胃癌发病过程^[12-13],但这些研究基本上都是基于原发性胃癌标本进行研究。

有意思的是,在最新的研究中已经发现,在口腔鳞状细胞癌、过表达的 NDRG1 基因前列腺癌以及大肠细胞中能通过抑制 β -catenin 上调 E-cadherin 表达,从而抑制肿瘤发病侵袭和转移^[14-15]。而在口腔鳞状细胞癌中,NDRG1 也能正向调节 E-cadherin,从而抑制肿瘤细胞的转移^[16]。以上这些研究提示,NDRG1 和 E-cadherin 在肿瘤发病过程中发挥了协同作用,从而抑制发病过程中。

在本次研究中,为了明确 NDRG1 与 E-cadherin 是否参与了胃癌转移,我们首先利用实时荧光定量 PCR 对这两个基因在原发性胃癌与淋巴结转移的胃癌组织中的表达进行了检测。结果显示,与原发性胃癌组织相比,NDRG1 与 E-cadherin 在淋巴结转移的胃癌组织中表达都明显下调,提示它们与胃癌淋巴结转移密切相关。进一步,为了明确 NDRG1 与 E-cadherin 是否协同参与了胃癌淋巴结转移,我们分析了 NDRG1 与 E-cadherin 在淋巴结转移的胃癌组织表达相关性。与预期相符,NDRG1 mRNA 是明显正向相关于 E-cadherin mRNA 的表达,该结果类似于 Chang 等研究报告^[17]。他们发现,在胃癌转移过程中,下调的 NDRG1 蛋白表达与 E-cadherin 蛋白表达呈正向相关。我们的研究进一步支持 NDRG1 和 E-Cadherin 在胃癌中丢失的表达与胃癌转移密切相关,只是具体的调控机理还有待进一步研究。

综上所述,NDRG1 和 E-cadherin 作为胃癌转移的标志物,在胃癌淋巴结转移组织中表达呈正相关性,且它们下调的表达与胃癌淋巴结转移密切相关。

参考文献

[1] 邹小农,孙喜斌,陈万青,等. 2003-2007 年中国胃癌发病与死亡情况分析[J]. 肿瘤, 2012,32(2):109-114.

- [2] Jiang K, Shen Z, Ye Y, et al. A novel molecular marker for early detection and evaluating prognosis of gastric cancer: N-MYC downstream regulated gene-1 (NDRG1) [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010,45(7-8):898-908.
- [3] Nilsson GM, Akhtar N, Kannius-Janson M, et al. Loss of E-cadherin expression is not a prerequisite for c-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Oncol*, 2014,45(1):82-94.
- [4] Schildberg CW, Abba M, Merkel S, et al. Gastric cancer patients less than 50 years of age exhibit significant downregulation of E-cadherin and CDX2 compared to older reference populations[J]. *Adv Med Sci*, 2014,59(1):142-146.
- [5] Kim EY, Kim A, Kim SK, et al. Inhibition of mTORC1 induces loss of E-cadherin through AKT/GSK-3 β signaling-mediated upregulation of E-cadherin repressor complexes in non-small cell lung cancer cells[J]. *Respir Res*, 2014,15:26.
- [6] Kang W, Tong J, Lung R, et al. Targeting of YAP1 by microRNA-15a and microRNA-16-1 exerts tumor suppressor function in gastric adenocarcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2015,14(1):52.
- [7] Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-MYC-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-MYC mutant[J]. *Mech Dev*, 1999,83(1-2):39-52.
- [8] Song Y, Oda Y, Hori M, et al. N-MYC downstream regulated gene-1/Cap43 may play an important role in malignant progression of prostate cancer, in its close association with E-cadherin[J]. *Hum Pathol*, 2010,41(2):214-222.
- [9] Strzelczyk B, Szulc A, Rzepko R, et al. Identification of high-risk stage II colorectal tumors by combined analysis of the NDRG1 gene expression and the depth of tumor invasion [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009,16(5):1287-1294.
- [10] Guan RJ, Ford HL, Fu Y, et al. Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2000,1(60):749-755.
- [11] von Zeidler SV, de Souza BT, Mendonça EF, et al. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study[J]. *BMC Cancer*, 2014,14(1):972.
- [12] Jin R, Liu W, Menezes S, et al. The metastasis suppressor NDRG1 modulates the phosphorylation and nuclear translocation of β -catenin through mechanisms involving FRAT1 and PAK4[J]. *J Cell Sci*, 2014,127(Pt 14):3116-3130.
- [13] Ferrari-Amorotti G, Chiodoni C, Shen F, et al. Suppression of invasion and metastasis of triple-negative breast cancer lines by pharmacological or genetic inhibition of slug activity[J]. *Neoplasia*, 2014,16(12):1047-1058.
- [14] Lee JC, Chung LC, Chen YJ, et al. N-MYC downstream-regulated gene 1 downregulates cell proliferation, invasiveness, and tumorigenesis in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2014,355(2):242-252.
- [15] Murai T, Yamada S, Fuchs BC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis in clinical gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2014,109(7):684-689.
- [16] Wang ZS, Shen Y, Li X, et al. Significance and prognostic value of Gli-1 and Snail/E-cadherin expression in progressive gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014,35(2):1357-1363.
- [17] Chang X, Xu X, Ma J, et al. NDRG1 expression is related to the progression and prognosis of gastric cancer patients through modulating proliferation, invasion and cell cycle of gastric cancer cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2014,41(9):6215-6223.

广东地区地中海贫血孕妇全血微量元素含量分析

兰菲菲^{1,2,3} 梁凯玲^{1,2,3} 杜丽^{1,2,3} 尹爱华^{1,2,3*}

[摘要] **目的** 探讨广东地区地中海贫血孕妇全血中锌、铁、钙、铜、镁、钠、钾、铅8种微量元素的含量,了解地中海贫血孕妇检测微量元素含量的必要性,为合理营养和治疗提供科学依据。**方法** 选择247例基因诊断结果为地中海贫血的孕妇(α 和 β 地中海贫血组)、249例无地中海贫血的孕妇(正常对照组)和203例未怀孕的地中海贫血患者(未孕地贫组),分析全血8种微量元素的含量并进行统计学分析。**结果** 地中海贫血孕妇全血铁元素含量明显低于正常对照组($P<0.05$),与未怀孕的地中海贫血患者相比没有显著统计学意义,其他微量元素的含量与正常对照组和未怀孕的地中海贫血患者相比没有显著统计学意义。**结论** 地中海贫血孕妇应及时监测铁元素含量,以便尽早采取干预和治疗措施,以免影响孕妇和胎儿健康。

[关键词] 地中海贫血;微量元素;孕妇

Analysis of microelement levels in pregnant woman with thalassemia in Guangdong area

LAN Feifei^{1,2,3}, LIANG Kailing^{1,2,3}, DU Li^{1,2,3}, YIN Aihua^{1,2,3*}

(1. Medical Genetic Centre of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510010; 2. Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510010; 3. Biobank of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510010)

[ABSTRACT] **Objective** To explore microelement levels in pregnant women with thalassemia. **Methods** Microelement levels were detected in 247 pregnant women who were diagnosed with thalassemia by gene diagnosis (α - and β -thalassemia group), 249 normal women (normal control group) and 203 non-pregnant women with thalassemia (non-pregnant thalassemia group). The results were analyzed by statistical method. **Results** The levels of Fe in α - and β -thalassemia group were significantly lower than that of normal control group ($P<0.05$). There was no significant difference between α - and β -thalassemia group and non-pregnant thalassemia group. There was no significant difference in other microelement levels between α - and β -thalassemia group and normal control group or non-pregnant thalassemia group. **Conclusion** It is necessary to take intervention and treatment measures timely on Fe levels in pregnant women with thalassemia.

[KEY WORDS] Thalassemia; Microelement; Pregnant woman

基金项目:广东省医学科研基金(B2014021)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 510010

2. 广东省妇幼保健院妇幼代谢与遗传病重点实验室,广东,广州 510010

3. 广东省妇幼保健院生物样本库,广东,广州 510010

*通讯作者:尹爱华,E-mail:yinaiwa@vip.126.com

地中海贫血(thalassemia)是我国南方地区最常见的贫血之一,特别是广东和广西两省发病率较高。广东地区孕龄夫妇的 α 地贫发生率为8.56%^[1], β 地贫发生率为11.26%^[2]。地中海贫血对孕妇和胎儿均有一定的影响,尤其是中间型和重型地中海贫血影响较严重。血液中的微量元素对孕妇和胎儿发育都具有重要的生理作用,同时也反映了不同程度和不同基因型地中海贫血的情况。研究报道显示,孕妇全血铁(ferrum, Fe)、钙(calcium, Ca)、镁(magnesium, Mg)等微量元素含量明显偏低^[3-5],并且随着孕周的增加缺铁孕妇的比率升高^[6]。但是患有地中海贫血孕妇的全血微量元素指标分析研究和报道较少。由于孕妇血液中微量元素等微量元素的缺乏可由不同疾病和原因引起,为了解地中海贫血孕妇血液中微量元素含量与地中海贫血的关系,本文分析了247例地中海贫血孕妇的全血8种微量元素:锌(zinc, Zn)、铁(ferrum, Fe)、钙(calcium, Ca)、铜(cuprum, Cu)、镁(magnesium, Mg)、钠(sodium, Na)、钾(kalium, K)、铅(plumbum, Pb)的含量,以探讨广东地区地中海贫血孕妇全血微量元素的含量情况,为地中海贫血孕妇在孕期开展早期营养监测和合理营养治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

247例地中海贫血组、249例正常对照组和203例未孕地贫组研究对象来自2013年1月至2014年12月在广东省妇幼保健院就诊的患者,年龄范围在20岁~38岁之间,平均年龄为27岁。地中海贫血的诊断以基因诊断为依据,由医学遗传中心利用分子遗传学诊断方法确诊。

1.2 方法

1.2.1 样本采集和处理

采集EDTA-K2抗凝静脉外周血2 mL和肝素抗凝(微量元素专用管)静脉外周血1 mL,分别进行地中海贫血基因检测和全血微量元素含量检测。

1.2.2 地中海贫血基因检测

应用Lab-Aid核酸(DNA)分离试剂盒和Lab-Aid820自动核酸提取仪(厦门致善生物科技有限公司),提取地中海贫血组和对照组共496名孕妇

的外周静脉血DNA。利用液相芯片技术,使用 α -型和 β -型地中海贫血基因检测试剂盒(PCR-杂交法)(博尔诚北京科技有限公司)和多重微珠(DigiPlex)液相芯片平台检测和分析系统(博铄生技医疗科技有限公司),检测496名孕妇地中海贫血基因携带情况。检测范围包括23种突变类型(20种非缺失型 α 地中海贫血突变类型和 β 地中海贫血突变类型、3种缺失型 α 地中海贫血突变类型)。采用博尔诚(北京)科技有限公司提供的检测试剂和质控专用标准品。

1.2.3 全血微量元素含量检测

应用原子吸收分光光度法,使用BH7100和BH2100原子吸收光谱仪(北京博晖创新光电技术股份有限公司),检测496名孕妇全血8种微量元素(钙、铜、铁、钾、镁、钠、锌、铅)的含量情况。采用博晖公司提供的检测试剂和质控专用标准品。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件进行统计,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验方法分析数据。

2 结果

研究分析发现,与正常对照组相比,地中海贫血孕妇伴发铁元素缺乏,尤其是轻型和中间型的地中海贫血孕妇,铁元素缺乏率较高。

2.1 地中海贫血孕妇全血微量元素含量

经研究发现, α 地中海贫血组孕妇全血中铁元素的平均含量6.36 mmol/L, β 地中海贫血组孕妇全血中铁元素的平均含量6.94 mmol/L,正常对照组孕妇全血中铁元素平均含量为8.91 mmol/L,未怀孕的地中海贫血患者全血中铁元素平均含量为8.57 mmol/L。经过 t 检验分析, α 和 β 地中海贫血组孕妇全血中铁元素明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P=0.0415$),与未怀孕地贫患者组相比无显著性差异。 α 和 β 地中海贫血组孕妇全血中其他微量元素(锌、钙、铜、镁、钠)含量与正常对照组无显著性差异($P>0.05$),微量元素的分析结果见表1。

2.2 地中海贫血孕妇基因携带情况

经过基因诊断确诊的247名地中海贫血孕妇中, α 地中海贫血155人,点突变型12人,缺失型143人;其中静止型58人,轻型94人,中间型3人。 β 地中海贫血88人,均为轻型。 α 合并 β 地中

表 1 广东地区地中海贫血孕妇全血微量元素含量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Microelement levels of pregnant woman with thalassemia in Guangdong area ($\bar{x} \pm s$)

组别	锌($\mu\text{mol/L}$)	铁(mmol/L)	钙(mmol/L)	铜($\mu\text{mol/L}$)	镁(mmol/L)	钠(mmol/L)	钾(mmol/L)
α 地中海贫血	89.3 \pm 10.5	6.36 \pm 0.49*	1.85 \pm 0.39	22.61 \pm 10.87	1.33 \pm 0.24	95.01 \pm 13.64	43.02 \pm 5.37
β 地中海贫血	91.0 \pm 9.9	6.94 \pm 0.47*	1.77 \pm 0.33	20.97 \pm 10.01	1.36 \pm 0.25	96.11 \pm 12.39	42.64 \pm 5.41
未孕地贫组	100.3 \pm 14.7	8.57 \pm 0.53	1.85 \pm 0.34	24.02 \pm 9.05	1.50 \pm 0.41	107.06 \pm 15.19	43.29 \pm 5.08
正常对照组	98.7 \pm 13.9	8.91 \pm 0.65	1.82 \pm 0.33	24.65 \pm 10.11	1.47 \pm 0.32	102.51 \pm 15.06	45.38 \pm 5.73

*与正常对照组相比, $P < 0.05$

海贫血 4 人, 地中海贫血的基因分型和临床表现结果见表 2。

表 2 广东地区地中海贫血孕妇基因携带表

Table 2 Thalassaemia genetic typing of pregnant woman with thalassemia in Guangdong area

地中海贫血分类	基因分型	临床表现	检出例数
α 地中海贫血	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	静止型	31
	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	静止型	15
	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	静止型	3
	$\alpha^{OS}\alpha/\alpha\alpha$	静止型	7
	$\alpha^{WS}\alpha/\alpha\alpha$	静止型	2
	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	轻型	1
	$-\text{SEA}/\alpha\alpha$	轻型	93
	$-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$	中间型	2
	$-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$	中间型	1
β 地中海贫血	$\beta^{IVS-II-654}/\beta^A$	轻型	16
	β^{28}/β^A	轻型	3
	β^{29}/β^A	轻型	1
	$\beta^{CD41-42}/\beta^A$	轻型	53
	$\beta^{CD14-15}/\beta^A$	轻型	3
	β^{CD17}/β^A	轻型	6
	β^{CD28}/β^A	轻型	2
	$\beta^{CD71-72}/\beta^A$	轻型	4
α 合并 β 地中海贫血	$\alpha^{WS}\alpha/\alpha\alpha, \beta^{CD41-42}/\beta^A$	静止型	1
	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha, \beta^{CD41-42}/\beta^A$	静止型	2
	$-\text{SEA}/\alpha\alpha, \beta^{IVS-II-654}/\beta^A$	轻型	1

3 讨论

地中海贫血(thalassemia)是一种因珠蛋白合成障碍所致的遗传性溶血性疾病, 分为 α 地中海贫血和 β 地中海贫血 2 种类型。地中海贫血主要分布在地中海沿岸国家和东南亚各国, 广东是地

中海贫血的高发地区^[7]。目前对地中海贫血的分子诊断技术已经十分成熟^[8], 我们在 247 名地中海贫血孕妇的基因诊断检测中发现 α 地中海贫血 155 人, 其中静止型 58 人、轻型 94 人、中间型 3 人。 β 地中海贫血 88 人, 全部是轻型。很多孕妇缺乏对地中海贫血相关知识的了解, 多数人并不了解地中海贫血的发病原因及其对孕妇和胎儿的危害性, 也从未到医院就诊咨询。

微量元素是人体必不可少的元素, 对儿童的生长发育具有非常重要的作用。当微量元素缺乏时, 会引起各种不同程度的生理功能缺陷或者异常, 严重可导致发育异常和智力低下^[9-10]。研究报道孕妇血液中铁、钙等微量元素偏低, 铁元素可低于下限值 40.8%^[11], 但对于地中海贫血孕妇血液中微量元素含量的报道很少。本文分析了广东地区地中海贫血孕妇血液中的 8 种微量元素含量, 探讨地中海贫血孕妇血液中微量元素含量异常与地中海贫血的关系。研究显示, 在 496 名孕妇中, 地中海贫血孕妇血液中的铁元素显著低于对照组 ($P < 0.05$), 说明地中海贫血孕妇普遍缺乏铁元素。其他微量元素与对照组相比差异无显著性意义 ($P < 0.05$)。有研究报道贫血孕妇血液中会出现铁元素含量降低的情况, 我们的分析结果 α 地中海贫血孕妇血液中铁元素平均含量为 6.36 mmol/L, β 地中海贫血孕妇血液中铁元素平均含量为 6.94 mmol/L, 与文献报道的范围 (5.76 mmol/L~6.90 mmol/L) 相符合^[3-5]。从而说明不同基因型的地中海贫血孕妇与普通贫血孕妇都会出现血液中铁元素含量显著降低的情况, 需要在妊娠期及时补充铁元素。

铁元素是在人体内含量最多的微量元素, 它是构成血红蛋白和肌红蛋白的主要成分, 携带氧气, 还与人体许多重要酶的合成和活性有关。铁元

素缺乏可引起血红蛋白合成降低、氧气运输障碍,出现不同程度的缺氧、面色苍白、乏力,影响生长发育^[12-13]。我们发现地中海贫血孕妇普遍存在铁元素缺乏的现象,这不仅对孕妇本身健康有影响,对胎儿的生长发育也具有危害性。蔡敏敏等曾报道地中海贫血患儿血液微量元素含量情况,发现不同基因型的地贫患儿均缺乏铁元素^[14]。地中海贫血患者一般会伴有铁元素缺乏,其缺乏程度与地中海贫血的程度有关。本文通过对地中海贫血孕妇血液中铁元素含量的检测研究,发现地中海贫血孕妇普遍缺乏铁元素,对孕妇和胎儿健康有一定的影响。因此,应检测地中海贫血孕妇血液中的微量元素,掌握微量元素平衡情况,更好地指导孕妇及时补充铁等所需的微量元素,合理营养,保证孕妇的健康和胎儿的健康发育成长^[15]。同时要加强对育龄人群和孕妇的地中海贫血和优生优育相关知识的普及和宣传,以提高孕妇的对地中海贫血和微量元素缺乏的预防意识。

参考文献

- [1] 黄钰君,伍绍国,区小冰,等. 儿童地中海贫血的发生率及发病基因分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007,15(6): 28-31.
- [2] 黄钰君,区小冰,张力,等. 广州地区儿童 β 地中海贫血的发生率及基因检测结果分析[J]. 临床血液学杂志, 2006, 19(6):355-357.
- [3] 郭胜利,郭丽丽,李守霞,等. 某院贫血孕妇全血微量元素含量调查[J]. 国际检验医学杂志, 2013,34(19):2553-2556.
- [4] 郭丽丽,郭胜利,李守霞,等. 邯郸及周边地区孕妇微量元素铁缺乏与贫血的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013,34(17):2273-2276.
- [5] 褚雪莲. 妊娠期孕妇外周血微量元素检测及其临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2014,24(15):2255-2256.
- [6] 陈丽阳. 孕妇缺铁性贫血现状分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2011,10(2):135-138.
- [7] 吕福通,谢丹尼. 地中海贫血的相关研究进展[J]. 中国计划生育学杂志, 2013,21(7):490-493.
- [8] 徐祥虎,朱宝生. 珠蛋白生成障碍性贫血的分子诊断研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011,3(4):283-288.
- [9] 单振芬. 微量元素与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 2006,23(3):66-67.
- [10] 李冰,谷强. 微量元素对学龄前儿童身体发育影响研究[J]. 中国妇幼保健, 2014,(20):3287-3288.
- [11] 刘莹,张树琪,成艳,等. 孕中期妇女5项微量元素检测分析[J]. 微量元素与健康研究, 2011,28(4):15-16.
- [12] 张玉华,叶德胜. 微量元素与人体健康[J]. 江西化工, 2003,(3):52-54.
- [13] 李明璜. 微量元素对儿童生长发育的影响[J]. 中国伤残医学, 2013,21(11):260-261.
- [14] 蔡敏敏,黄钰君,伍绍国,等. 不同基因型地中海贫血患儿全血元素的分析[J]. 解剖学研究, 2010,32(1):25-27.
- [15] Al-Samarrai AH, Adaay MH, Al-Tikriti KA, et al. Evaluation of some essential element levels in thalassemia major patients in Mosul district [J]. Iraq Saudi Med J, 2008,29(1):94-97.

柳州市 2014 年手足口病实验室检测结果分析

许泽辉^{1,2} 罗世强^{1,2} 王敬仁^{1,2} 蔡鹏飞^{1,2} 覃肖^{1,2} 唐宁^{1,2*}

[摘要] **目的** 明确柳州地区手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)病毒的主要感染病毒型别及流行特征,为手足口病防治提供科学依据。 **方法** 收集2014年1月至2014年12月6 667例疑似手足口病感染者。运用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)方法,对肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇肠道病毒16型(coxsackievirus A16, CoxA16)特异性进行核酸检测。 **结果** 6 667例患者标本中,EV71阳性数为1 310例,阳性率为19.65%,CoxA16阳性数为858例,阳性率12.87%。EV71和CoxA16合并感染阳性数为11例,阳性率为0.16%。男性人群手足口病发病率高于女性,4月~9月份为发病高峰。 **结论** 柳州市2014年手足口病主要致病病毒为EV71、CoxA16,基因分型对手足口病临床诊治及疾病爆发的预防有一定指导意义。

[关键词] 手足口病;病毒核酸;流行特征;防控措施

Analysis of the laboratory diagnosis results of hand-foot-mouth disease in 2014 in Liuzhou city

XU Zehui^{1,2}, LUO Shiqiang^{1,2}, WANG Jingren^{1,2}, CAI Pengfei^{1,2}, QIN Xiao^{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 study the virus subtypes of hand-foot-mouth disease (HFMD) and prevalent features so as to provide scientific basis for the surveillance and control of HFMD. **Methods** A total of 6 667 specimens were collected from January to December in 2014. Nucleic acid in genotype of enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus 16 (CoxA16) were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** 1 310 cases (19.65%), 858 cases (12.87%) and 11 cases (0.16%) were positive for EV71, CoxA16 and EV71 combined with CoxA16, respectively. Male's morbidity was higher than that of female's, and peaks of incidence occurred from April to September. **Conclusion** EV71 and CoxA16 are the main pathogenic viruses of HFMD in Liuzhou in 2014. Genetic analysis has profound guiding significance for HFMD diagnosis and outbreaks prevention.

[KEY WORDS] Hand-foot-mouth disease; Viral nucleic acids; Prevalent features; Surveillance and control measures

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

由肠道病毒(enterovirus, EV)引起的手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是一种儿童期常见传染病。该病于 5 岁以下儿童好发,大多数患儿症状较轻,表现为低热、厌食、口痛及手、足、口腔等部位出现小溃疡或小疱疹。少数患儿会出现心肌炎、无菌性脑膜炎、肺水肿等并发症。若病情发展快,可导致个别重症患儿死亡。目前为止已有 20 多种(型)的肠道病毒可引发手足口病,最为常见的是肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16, Cox A16)^[1,2]。本文对 2014 年采集的共 6 667 例疑似 HFMD 感染者的咽拭子、粪便或疱疹液标本进行了 EV 核酸检测,并结合病例临床信息对结果进行分析。

1 对象与方法

1.1 对象

按照《手足口病预防控制指南(2010 年版)》要求,采集柳州市妇幼保健院的 6 667 例疑似 HFMD 感染者(即发热及手掌、脚掌、股部或口腔黏膜出现疱疹的患者)的咽拭子、粪便、疱疹液标本,其中男性 3 846 例,女性 2 821 例,年龄 5 天至 14 岁,平均年龄(2.30±0.02)岁。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 核酸提取

采用中山大学达安基因股份有限公司的病毒 RNA 核酸提取试剂盒进行 EV 核酸提取,严格按照说明书操作,收集病毒 RNA 提取液 30 μL,保存于-20℃备用。

1.2.2 EV 核酸检测

采用中山大学达安基因股份有限公司的肠

道病毒 71 型核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)、柯萨奇病毒 A16 型核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)进行 EV71、Cox A16 的核酸检测,所用仪器为美国 ABI 公司 ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 基因扩增仪。实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)的反应体系和反应条件参照其操作说明书进行。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 14.0 软件进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验进行分析, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 柳州市儿童手足口病的概况

柳州市手足口病全年的流行趋势见表 1。EV71 在不同季节流行情况的差异有显著意义($\chi^2=65.33, P<0.001$),其中以春夏两季最高;Cox A16 在不同季节流行情况的差异有显著意义($\chi^2=335.03, P<0.001$),其中以冬春两季最高;EV71 阳性合并 Cox A16 阳性的发病情况无季节差异。

对 6 667 例疑似 HFMD 感染者标本进行 RT-qPCR 检测,结果显示 EV71 型阳性者 1 310 例, Cox A16 阳性者 858 例, EV71、Cox A16 的阳性率分别为 19.65% (1 310/6 667)、12.87% (858/6 667), EV71 和 Cox A16 同时阳性者 11 例,阳性率为 0.16%,具体结果见表 2。EV71 型的阳性检出率显著高于 Cox A16 的检出率 ($\chi^2=112.53, P<0.001$),部分检测结果见图 1。

2.2 人群分布特征

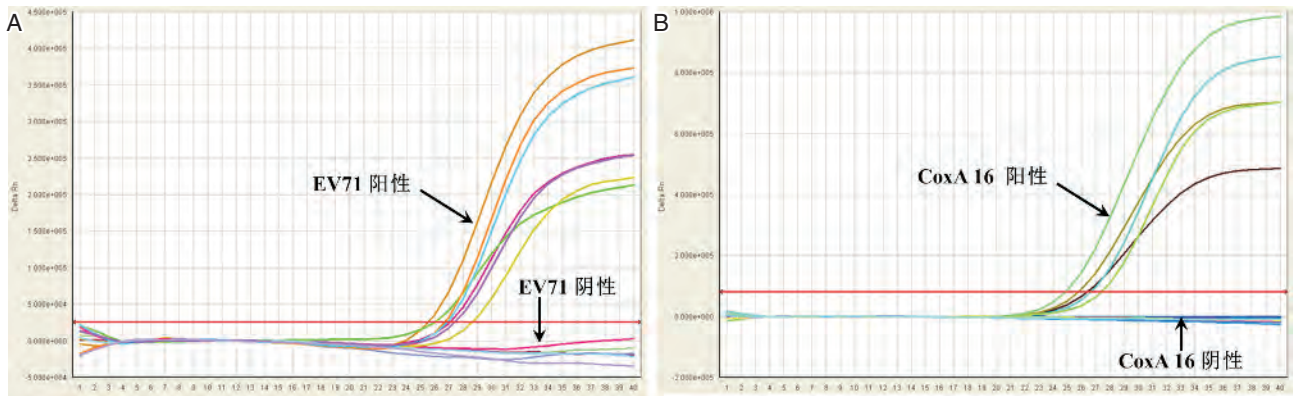
按照不同年龄组进行统计分析,计算其构成

表 1 不同季节患儿的 EV 检出情况

Table 1 The detectable rates of the virus subtypes in different seasons

季节	检测数	EV71	EV71	Cox A16	Cox A16	EV71+Cox A16	EV71+Cox A16
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
春季	2960	625	21.11	629	21.25	8	0.27
夏季	2858	615	21.52	204	7.14	3	0.10
秋季	746	74	9.92	20	2.68	0	0
冬季	103	7	6.80	16	15.53	0	0
合计	6667	1310	19.65	858	12.87**	11	0.16

** 与 EV71 型的阳性检出率相比, $P<0.001$



A:EV71 基因分型结果; B:Cox A16 基因分型结果

图 1 EV71、Cox A16 基因分型结果

Figure 1 The genotyping results of EV71 and Cox A16

比。按照手足口病病例的年龄(0~、1~、2~、3~、4~、>5岁)进行分组,在EV71病毒感染组中,不同年龄组发病构成由高到低依次为3~(31.71%)、2~(24.33%)、>5(23.90%)、4~(22.44%)、1~(17.79%)、0~(9.00%), $\chi^2=220.20, P<0.001$;在Cox A16病

毒感染组中,不同年龄组发病构成由高到低依次为4~(18.05%)、2~(13.79%)、3~(13.02%)、>5(12.91%)、1~(12.47%)、0~(11.05%), $\chi^2=15.64, P=0.008$ 。EV71和Cox A16病毒合并感染主要分布在2岁~5岁的儿童中,具体结果见表2。

表 2 不同年龄患儿的EV检出情况

Table 2 The detectable rates of the virus subtypes in different ages

年龄分组	样本数	EV71		Cox A16		EV71+Cox A16	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
0~	1511	136	9.00	167	11.05	0	0
1~	2085	371	17.79	260	12.47	4	0.19
2~	1414	344	24.33	195	13.79	5	0.35
3~	883	280	31.71	115	13.02	1	0.11
4~	410	92	22.44	74	18.05	1	0.24
>5	364	87	23.90	47	12.91	0	0
合计	6667	1310	19.65	858	12.87	11	0.16
χ^2		220.20		15.64		6.54	
P^*		<0.001 ^{△△}		0.008 ^{###}		0.26 [*]	

^{△△}不同年龄组EV71的阳性率比较, $P<0.001$; ^{###}不同年龄组Cox A16的阳性率比较, $P<0.001$; ^{*}不同年龄组EV71+CoxA16的阳性率比较, $P>0.05$

2.3 性别分布特征

根据性别对不同病原体进行统计分析,统计结果见表3。EV71在男女患儿中的阳性率均最高,其次为Cox16, EV71合并Cox A16感染的患儿则比较罕见;在EV71、Cox A16病毒感染及EV71阳性合并Cox A16阳性组中,男性人群的手足口病发病率与女性之间的差异无显著意义,说明

EV71、Cox A16病毒感染在不同性别的感染情况无差异。

2.4 月份分布特征

2014年手足口病的流行发病时间是4月~9月,5月份最高,达到2355例;1月、2月、3月、11月和12月发病人数在100以下;4月~9月发病人数为6338例,占全年的95.06%(图2)。

表 3 不同性别患儿的 EV 检出情况

Table 3 The detectable rates of the virus subtypes in different genders

性别	样本数	EV71		Cox A16		EV71+Cox A16	
		阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)
男性	3846	795	20.67	502	13.05	7	0.18
女性	2821	515	18.26	356	12.62	4	0.14
合计	6667	1310	19.65	858	12.87	11	0.16
χ^2		0.14		0.27		0.16	
<i>P</i>		0.71 ^a		0.60 ^b		0.70 ^c	

^a男性 EV71 的阳性率与女性 EV71 的阳性率相比, $P>0.05$; ^b男性 Cox A16 阳性率与女性 Cox A16 的阳性率相比, $P>0.05$; ^c男性 EV71+Cox A16 阳性率与女性 EV71+Cox A16 的阳性率相比, $P>0.05$

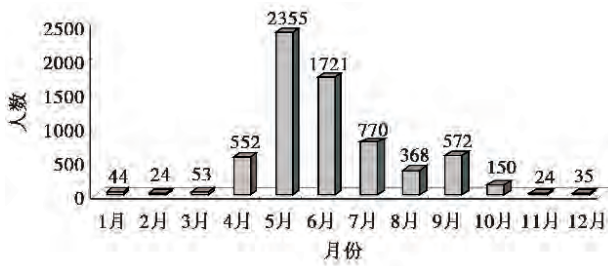


图 2 不同月份儿童手足口病发病人数趋势

Figure 2 Prevalent features of HFMD in different months

2.5 重型病例情况分析

2014 年备案的重型中, 由 EV71 引起的有 68 例, 其中危重型 4 例, 重型 55 例, 转为危重 9 例, 而 Cox A16 引起的重型病例一共 5 例(3 例重型, 2 例转为危重)。EV71 病毒感染导致危重型、重型及转为危重型病之和与 Cox A16 病毒感染导致危重型、重型及转为危重型病之和存在着明显的差异 ($P<0.05$), 且 EV71 病毒感染更容易导致重型手足口病, 结果见表 4。

表 4 EV71 与 CoxA16 病毒感染所导致的重型病例分布情况

Table 4 Severe HFMD caused by EV71 and CoxA16

	病例特征			合计	平均秩
	危重型病例数	重型病例数	转为危重型病例数		
EV71	4(5.88)	55(80.88)	9(13.24)	68	39.5
Cox A16	0	3(0.60)	2(0.40)	5	3.0
<i>Z</i>					-4.916
<i>P</i>					0.000

3 讨论

手足口病一般由多种肠道病毒共同引起, 其中以 Cox A16、EV71 为主。大多数患者症状轻微, 部分病例临床表现不典型, 患儿就诊时间早, 早期只表现为发热, 无皮疹及其他表现, 给早期诊断带来困难, 易导致误诊, 是引起危重手足口发生的重要原因之一^[3]。因此对于流行季节的婴幼儿, 虽无手足口病的典型表现也要高度怀疑, 做进一步实验室诊断, 而采用简便、快捷、准确的技术则是实验室诊断的关键^[4]。

RT-qPCR 是将 PCR 技术和荧光检测技术结合起来实现了对核酸的自动化检测的技术, 其原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用 PCR 对 DNA 的高效扩增, 运用高特异性的探针和高敏感性的光谱技术检测目的片段及定量。RT-qPCR 对病毒的检测极大地缩短了免疫学检测的“窗口期”问题, 可以尽早发现病毒携带者, 为疾病的预防及诊治提供科学依据。因此荧光定量基因检测方法可准确、灵敏地反映 EV 感染数量和治疗恢复情况, 对 EV 诊断和疗效的观察具有重要的指导作用^[5-8]。

本研究 6 667 例患者标本中,检测出 EV71 阳性数为 1 310 例,阳性率为 19.65%;CoxA16 阳性数为 858 例,阳性率 12.87%;EV71 和 CoxA16 合并感染阳性数为 11 例,阳性率为 0.16%。结合本地区与国内其他地区的结果说明 EV71 手足口病最常见的病原体^[9]。然而各地 EV71 和 CoxA16 占手足口病原体的比例存在差异,Yang 和 Li 等^[10-11]报道杭州与武汉等地的 EV71 和 CoxA16 病毒感染与本地区的相近,Lu 等报道广州地区 EV71 的感染明显高于本地区^[12]。从我们检测结果表明全年均有发病,以夏、秋季为高发季节,5 月份病例突然增加,并迅速达最高峰,10 月份发病人数开始下降,发病人数主要集中在 4 月~9 月。王春荣和 Xu 等^[13-14]报道济南和云南地区的发病趋势与本地相似,夏季为高发季节,5 月~7 月是发病高峰期。由此可以推测手足口病的发病与季节有直接的关系,春夏两季是手足口病的发病流行高峰。因此在疾病预防控制上应加强该段时间的监测与控制,做好消毒及疾病预防宣传工作,以防止疾病的暴发流行^[4]。本研究男性发病人数多于女性,可能是由于手足口病是由肠道病毒引起的,主要由接触了带有病毒的鼻咽排泄物、粪便和疱疹液而感染。而男孩生性好动,活动范围大,比女孩更容易接触被手足口病患者污染过的物品而感染手足口病。手足口重型病例,主要以 EV71 感染的为主。EV71 感染除了引起手足口病以外,还可能引起严重的神经系统疾病,如脑干脑炎、无菌性脑膜炎和脊髓灰质炎样麻痹等,甚至危及生命,因此在早期检测到 EV71 阳性的病例,需加强监测,预防病情的加重及并发症的发生^[15-18]。

对于婴幼儿而言,其免疫系统发育尚未完全成熟,体内无相应的抗体保护,机体的抵抗力相对较差,容易受到 EV 的感染^[4,17]。因此应加强对婴幼儿特别是 5 岁以下儿童进行 EV 病毒检测和分型。EV 感染的早期诊断,不仅能防止疾病的进一步恶化,更能避免手足口病在本地区流行性爆发^[19]。从我们所做结果来看,RT-qPCR 用于肠道病毒的检测,对于疑似手足口病患者,可以做到早诊断、早报告、早隔离和早治疗,能够广泛地运用于各种实验室检测。在柳州市 4 月~9 月份手足口病高发的季节,对于出现发热及手掌、脚掌、股部或口腔黏膜出现疱疹等疑似手足口病临床表现的患者,肠

道病毒感染的检测是必不可少的。

参考文献

- [1] Xing WJ, Liao QH, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–2012: an epidemiological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(4):308–318.
- [2] Zheng S, Cao CX, Cheng JQ, et al. Epidemiological features of hand-foot-and-mouth disease in Shenzhen, China from 2008 to 2010[J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(8):1751–1762.
- [3] Ventarola D, Bordone L, Silverberg N. Update on hand-foot-and-mouth disease[J]. *Clin Dermatol*, 2015, 33(3):340–346.
- [4] Xie YH, Chongsuvivatwong V, Tan Y, et al. Important roles of public playgrounds in the transmission of hand, foot, and mouth disease[J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(7):1432–1441.
- [5] Dubot-Peres A, Tan CY, de Chesse R, et al. SYBR green real-time PCR for the detection of all enterovirus-A71 genogroups[J]. *Plos One*, 2014, 9(3): e89963.
- [6] Tan EL, Yong LL, Quak SH, et al. Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR[J]. *J Clin Virol*, 2008, 42(2):203–206.
- [7] Wang D, Wang X, Geng Y, et al. Detection of enterovirus 71 gene from clinical specimens by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2014, 32(2):124–129.
- [8] Zhang S, Wang J, Yan Q, et al. A one-step, triplex, real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of enterovirus 71, coxsackie A16 and pan-enterovirus in a single tube[J]. *Plos One*, 2014, 9(7):e102724.
- [9] Liu SL, Pan H, Liu P, et al. Comparative epidemiology and virology of fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease in mainland China from 2008 to 2014[J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25(2):115–128.
- [10] Yang Q, Ding J, Cao J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(6): 954–960.
- [11] Li W, Zhang X, Chen X, et al. Epidemiology of childhood enterovirus infections in Hangzhou, China[J]. *Virol J*, 2015, 12(1):58.
- [12] Lu J, Zeng H, Zheng H, et al. Hand, foot and mouth disease in Guangdong, China, in 2013: new trends in

- the continuing epidemic[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(7):O442–O445.
- [13] 王春荣, 关恒云, 韩秀云, 等. 2009–2013 年济南地区重症手足口病病原学及流行病学分析[J]. *实用预防医学*, 2015, 22(01):60–62.
- [14] Xu W, Jiang L, Thammawijaya P, et al. Hand, foot and mouth disease in Yunnan province, China, 2008–2010[J]. *Asia Pac J Public Health*, 2015, 27(2):769–777.
- [15] Wang SM, Liu CC. Update of enterovirus 71 infection: epidemiology, pathogenesis and vaccine[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, 12(4):447–456.
- [16] Wang Q, Zhang W, Zhang Y, et al. Clinical features of severe cases of hand, foot and mouth disease with EV71 virus infection in China[J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(3):510–516.
- [17] Nguyen NT, Pham HV, Hoang CQ, et al. Epidemiological and clinical characteristics of children who died from hand, foot and mouth disease in Vietnam, 2011 [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 18(14):341.
- [18] 王琼珠, 范长玲. 白细胞介素 2 基因多态性与手足口病 EV71 脑炎患者的关联性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(1):26–29.
- [19] Ang LW, Tay J, Phoon MC, et al. Seroepidemiology of coxsackievirus A6, coxsackievirus A16, and enterovirus 71 infections among children and adolescents in Singapore, 2008–2010 [J]. *Plos One*, 2015, 10(5): e0127999.

新疆伊犁州维吾尔族 20 个 STR 基因座的遗传多态性

高波¹ 邱平明^{2*}

[摘要] **目的** 调查新疆伊犁州地区维吾尔族人群 20 个 STR 基因座(D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, Amelogenin, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX 和 vWA) 的遗传多态性及法医学应用参数。**方法** 应用 Promega 公司 PowerPlex21 试剂盒对 300 名维吾尔族无相关个体血样进行扩增, 3500XL 遗传分析仪对扩增产物进行检测, GeneMapper ID-X 软件进行结果分析, 计算基因座的基因频率以及群体遗传学参数。**结果** 在 300 名无相关维吾尔族个体中, 共发现 221 个等位基因, 其中单基因频率在 0.000 4~0.527 1 之间, 杂合度(heterozygosity, H)值在 0.679 4~0.882 4, 个体识别力(probability of discrimination power, DP)值在 0.793 8~0.980 6, 匹配率(match probability, Pm)值在 0.031 2~0.104 2, 非父排除率(probability of exclusion, PE)值在 0.401 2~0.759 5, 多态信息含量(polymorphism information content, PIC)值在 0.593 8~0.910 5。**结论** 20 个 STR 基因座在新疆伊犁州地区维吾尔族人群具有高度的遗传多态性, 满足该群体法医学个体识别及亲权鉴定的需要。

[关键词] 法医遗传学; 多态性; 短串联重复序列(STR); 维吾尔族

The genetic polymorphism of 20 STR loci in Uyghur population of Yili of Xinjiang

GAO Bo¹, QIU Pingming^{2*}

(1. Yili Public Security Bureau of Xinjiang, Kuitun, Yili, Xinjiang, China, 833200; 2. Department of Forensic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the genetic polymorphisms of 20 STR loci(D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, Amelogenin, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX and vWA) in unrelated Uyghur individuals in Yili of Xinjiang and to explore the application value in forensic practice. **Methods** Blood samples from 300 unrelated Uyghur individuals were amplified by using PowerPlex21 kit. The amplified products were detected by using 3500XL Genetic Analyzer and the genotyping was done by using GeneMapper ID-X. Allele frequency of all loci and population genetics parameters were calculated. **Results** Of the 300 unrelated Uyghur individuals, 221 alleles were detected, with an allele frequency of 0.000 4~0.527 1. The heterozygosity (H) values were 0.679 4~0.882 4, probability of discrimination power(DP) values were 0.793 8~0.980 6, match probability(Pm) values were 0.031 2~0.104 2, probability of exclusion(PE) values were 0.401 2~0.759 5, polymorphism information content(PIC) values were 0.593 8~0.910 5. **Conclusion** The 20 STR loci in the Uyghur population of Yili of Xinjiang have high genetic polymorphisms, and can be satisfied as genetic markers for population individual identification and paternity testing.

[KEY WORDS] Forensic genetic; Polymorphism; Short tandem repeats(STR); Uyghur nationality

作者单位: 1. 新疆伊犁州奎屯市公安局, 新疆, 伊犁 833200

2. 南方医科大学法医学系, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 邱平明, E-mail: qiupm@163.com

短串联重复序列(short tandem repeats, STR)是一类广泛存在于人类基因组中具有高度多态性的 DNA 序列^[1]。由于其分型简便快速,易于标准化,已经成为目前法医物证检验的主要手段之一。PowerPlex21 试剂盒由美国 Promega 公司 2012 年推出,除 CODIS 的 13 个核心基因座,还增加 7 个基因座。迄今为止,PowerPlex21 系统的人群遗传多态性数据和法医学应用评估还很少报道。本研究拟评估 PowerPlex21 系统在新疆维吾尔族的应用效果以及获得 PowerPlex21 系统在新疆维吾尔族人群的遗传多态性数据。

1 材料与方法

1.1 样本及 DNA 提取

对居住在伊犁州地区的维吾尔族随机采集无关个体血样并制成血卡,共 300 份。打孔器打取直径 1.1 mm 的圆形血片,分别放入 PCR 板中。

1.2 PCR 扩增、电泳及分型

采用美国 Promega 公司的 PowerPlex21 试剂盒在 ABI9700 扩增仪上直接扩增。PCR 扩增体系为 10 μL,扩增产物经 ABI3500 遗传分析仪毛细管电泳, GeneMapper ID-X 软件进行分型。

1.3 统计学分析

应用美国 Promega 公司 PowerStats V12.xls 软件,计算试剂盒中所有 STR 基因座的杂合度(heterozygosity, H)、个体识别力(probability of discrimination power, DP)、非父排除率(probability of exclusion, PE)、多态信息含量(polymorphism in-

表 1 新疆伊犁州地区维吾尔族群体 20 个 STR 基因座等位基因频率
Table 1 Allele frequency of 20 STR loci for Xinjiang Uygur groups in Yili

Allele	D3S1358	D1S1656	D6S1043	D13S317	Penta E	D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D
5					0.029 7					
6										0.013 6
7				0.004 9	0.102 6					0.015 8
8			0.002 2	0.176 1	0.009 8	0.029 8		0.005 1		0.025 5
9			0.002 9	0.093 5	0.009 8	0.181 0		0.019 4		0.214 7
10			0.028 2	0.107 5	0.073 1	0.107 5	0.004 9	0.167 7		0.153 9
11		0.070 5	0.244 1	0.274 8	0.093 5	0.323 8	0.000 4	0.293 1		0.204 0
12	0.005 1	0.040 5	0.186 0	0.240 3	0.117 4	0.206 4	0.078 0	0.405 9		0.115 6
13	0.005 1	0.092 3	0.090 1	0.093 0	0.078 6	0.127 0	0.166 7	0.084 3		0.158 9
14	0.068 2	0.075 7	0.092 8	0.009 8	0.049 2	0.014 9	0.216 1	0.013 7		0.061 7
14.3		0.001 8								
15	0.265 0	0.320 2	0.013 5		0.088 0	0.009 6	0.171 2		0.005 9	0.036 3
16	0.367 3	0.225 1	0.001 7		0.127 7		0.082 3	0.016 1	0.004 9	
16.3		0.007 9								
17	0.172 3	0.080 4	0.046 2		0.063 5		0.089 2	0.095 4		
17.3		0.050 6								
18	0.113 1	0.010 7	0.125 4		0.073 5		0.038 2	0.103 3		
18.3		0.021 3								
19	0.004 9		0.119 1		0.024 5		0.069 6	0.186 7		
19.3		0.002 0								
20			0.041 3		0.024 5		0.051 3	0.140 7		
21			0.005 0		0.019 8			0.036 0		
22			0.001 6		0.009 6		0.007 5	0.053 2		
23							0.009 8	0.165 5		
24				0.004 9			0.004 9	0.111 9		
25								0.070 9		
26							0.009 8	0.014 3		
27								0.005 6		
28								0.000 4		

Allele	TH01	vWA	D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	D8S1179	D12S391	D19S433	FGA
6	0.193 1									
6.2									0.000 7	
7	0.243 1			0.007 8	0.004 9					
8	0.124 5			0.163 8		0.527 1	0.014 7			
9	0.267 4			0.081 2	0.102 9	0.090 5	0.014 7		0.000 4	
9.3	0.171 9									
10				0.232 5	0.107 8	0.051 9	0.107 8		0.000 4	
11				0.283 4	0.352 9	0.291 3	0.063 7		0.005 1	
12				0.177 4	0.308 8	0.039 1	0.132 4		0.060 1	
12.2									0.002 5	
13		0.007 6		0.047 3	0.122 5		0.308 8		0.246 9	
13.2									0.036 6	
14		0.149 3		0.006 6			0.171 6	0.001 4	0.279 9	
14.2									0.073 5	
15		0.060 9					0.127 5	0.014 5	0.111 2	
15.2		0.007 7							0.093 8	
16		0.273 1					0.039 2	0.014 8	0.046 7	
16.2									0.031 1	
17		0.238 5					0.009 8	0.110 4	0.004 7	
17.2									0.005 4	
18		0.188 3					0.009 8	0.202 4		0.024 5
18.2									0.001 1	
18.3								0.010 5		
19		0.066 6						0.187 6		0.049 0
20		0.009 8						0.158 6		0.073 5
21								0.108 3		0.127 5
21.2										0.004 9
22								0.087 3		0.171 6
23								0.058 3		0.156 9
23.2										0.009 8
24								0.025 7		0.210 8
25								0.009 8		0.102 9
25.2										0.004 9
26			0.001 6					0.001 1		0.039 2
27			0.0093							
28			0.1209							
28.2			0.0064							
29										
29.2			0.2133							
30			0.2791							
30.2			0.0243							
31			0.0636							
32			0.0149							
32.2			0.1252							
33			0.0016							
33.2			0.0462							
34.2			0.0055							
35.2			0.0014							

formation content, PIC)等法医学应用参数。应用 Genepop 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡分析^[2]。累积非父排除率和累积个体识别力参照文献^[3] 进行计算。

2 结果

2.1 20 个 STR 基因座的等位基因频率

20 个 STR 基因座中共检测到 221 种等位基因,其中单基因频率在 0.000 4~0.527 1 之间,见表

1。20 个 STR 基因座 P 值均大于 0.05,满足 Hardy-Weinberg 平衡。

2.2 PowerPlex21 系统法医学应用参数

本研究发现这 20 个 STR 基因座的 H 值在 0.679 4~0.882 4 之间, DP 值在 0.793 8~0.980 6 之间, P_m 值在 0.031 2~0.104 2 之间, PE 值在 0.401 2~0.759 5 之间, PIC 值在 0.593 8~0.910 5 之间,见表 2。20 个基因座累计个人识别概率大于 0.999 999 999,累积非父排除率大于 0.999 999。

表 2 新疆伊犁州地区维吾尔族群体 20 个 STR 基因座群体遗传学参数
Table 2 Population genetics parameter of 20 STR loci for Xinjiang Uygur groups in Yili

基因座	H	DP	Pm	PE	PIC
D3S1358	0.714 9	0.891 3	0.103 8	0.449 8	0.717 4
D1S1656	0.810 9	0.950 1	0.055 1	0.649 7	0.801 3
D6S1043	0.854 7	0.959 8	0.038 5	0.703 7	0.837 2
D13S317	0.803 9	0.932 8	0.061 3	0.607 1	0.779 8
PentaE	0.882 4	0.980 6	0.021 3	0.759 5	0.910 5
D16S539	0.823 5	0.916 8	0.057 2	0.643 4	0.761 5
D18S51	0.823 5	0.963 7	0.058 1	0.643 4	0.862 7
D2S1338	0.887 1	0.961 8	0.028 7	0.745 8	0.864 8
CSF1PO	0.679 4	0.874 2	0.104 2	0.401 2	0.695 6
PentaD	0.774 5	0.950 3	0.050 1	0.650 7	0.824 6
TH01	0.813 7	0.911 6	0.060 3	0.624 8	0.753 5
vWA	0.833 3	0.924 8	0.035 1	0.662 3	0.776 3
D21S11	0.803 9	0.952 8	0.061 4	0.617 5	0.823 1
D7S820	0.821 4	0.931 5	0.051 3	0.615 8	0.781 9
D5S818	0.795 2	0.870 5	0.079 4	0.569 3	0.713 7
TPOX	0.689 1	0.793 8	0.070 5	0.416 8	0.593 8
D8S1179	0.843 7	0.932 9	0.051 9	0.671 9	0.815 3
D12S391	0.857 1	0.959 1	0.035 1	0.719 3	0.850 8
D19S433	0.820 6	0.949 2	0.058 4	0.637 9	0.815 9
FGA	0.863 1	0.960 2	0.031 2	0.730 2	0.850 6

3 讨论

PowerPlex21 系统法医学应用参数的结果表明这 20 个 STR 基因座在新疆伊犁州维吾尔族人群具有高度多态性,能够满足个人识别和亲权鉴定的需要,具有较高的法医学和人类遗传学的应用价值。

对遗传多态性进行调查旨在为群体遗传学和法医学个体识别及亲权鉴定提供基础数据。建立

适合案件所涉地区的群体遗传学数据对于该地区个体识别和亲权鉴定案件具有非常重要的意义^[4]。邵伟波等^[5]在对华东汉族 225 个无关个体的检测,在 D6S474 等 21 个非 CODIS STR 基因座上分别检出 5 个~12 个等位基因,12 种~41 种基因型。21 个非 CODIS STR 基因座具有良好的遗传多态性,能有效运用于个体识别和三联体亲子鉴定,也可作为二联体亲子鉴定案例的补充工具。张艳萍^[6]等对 203 例中国汉族无关个体的 9 个基因座进行遗

传分析,发现该9个STR基因座在中国汉族人群中均属于多态性程度高的遗传标记,可以用于法医亲权鉴定和个人识别,也可以用于人类学和遗传学研究。张晓红等^[7]在研究新疆喀什地区维吾尔族18个STR基因座的遗传多态性中发现这些STR基因座在新疆喀什地区具有高度多态性,可满足该群体个体识别和亲权鉴定,其遗传多态性更接近欧洲。本研究不仅获得了7个非CODIS STR基因座在新疆维吾尔族的群体遗传学数据,其相同基因座与张晓红^[7]的研究结果相近,而且还首次获得了D1S1656在新疆维吾尔族的等位基因频率等基础数据。

人类基因定位第11次国际会议的标准指出, $PIC \geq 0.6$ 时,说明该基因座具有高度的多态性^[8]。Gill等^[9]认为, $DP \geq 0.9$ 、 $H \geq 0.7$ 的基因座具有高鉴别力。Shriver等^[10]认为当 $DP > 0.80$ 、 $PE > 0.50$ 时,该基因座属于高度多态性。与目前法医实践中常用的试剂盒相比,PowerPlex21试剂盒增加了D1S1656基因座,该基因座的H、DP、PE、PIC值均显示满足高度多态性基因座的标准,可见D1S1656基因座在亲子鉴定和个体识别方面有很好的应用价值。这与陈玲等研究结果一致^[11]。

已有PowerPlex21系统进行方法有效性验证^[12],而且该系统采用直接扩增法对案件血痕的检测效果良好^[13]。因此本研究采用直接扩增法,应用PowerPlex21系统对新疆伊犁地区维吾尔人群20个基因座(D1S1656、D2S1338、D3S1358、D5S818、D6S1043、D7S820、D8S1179、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、CSF1PO、FGA、Penta D、Penta E、TH01、TPOX和vWA)进行遗传多态性分析,表明该20个STR遗传标记系统在新疆伊犁州地区维吾尔族人群中具有高度多态性,可满足法医个人识别和亲权鉴定的要求。

参考文献

- [1] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats[J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(4):746-756.
- [2] Raymond M, Ousset FR. GENEPOP(version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. *J Hered*, 1995, 86(3):248-283.
- [3] 侯一平. 法医物证学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 21-23.
- [4] Hering S, Nixdorf R, Dressier J, et al. Identification of more sequence variations in the D8S1179 locus [J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 149 (2/3):275-278.
- [5] 邵伟波, 张素华, 李莉. 21个非CODIS STR基因座的遗传多态性[J]. *法医学杂志*, 2011, 27(1):36-38.
- [6] 张艳萍, 王琳, 王毅, 等. 203例汉族人群9个STR基因座的遗传多态性分析 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2012, 20(1):27-29.
- [7] 张晓红, 李平, 翁玮霞, 等. 新疆喀什地区维吾尔族18个STR基因座的遗传多态性[J]. *法医学杂志*, 2012, 28(6):451-455.
- [8] 李国良, 肖莉, 孙瑜, 等. 江西地区汉族人群PLA2A、CSF1PO和D3S1358基因多态性分布[J]. *临床输血与检验*, 2004, 6(1):27-28.
- [9] Gill P. A new method of STR interpretation using inferential logic development of a criminal intelligence database[J]. *Int J Leg Med*, 1996, 109(1):14-22.
- [10] Shriver MD, Jin L, Boerwinkle E. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci[J]. *Mol Biol Evol*, 1995, 12(5):914-920.
- [11] 陈玲, 邱平明, 陆慧洁, 等. PowerPlex21系统在亲子鉴定中的应用评估[J]. *中国司法鉴定*, 2014, 15(2):58-60.
- [12] Gray K, Crowle D, Scott P. Direct amplification of casework bloodstains using the Promega PowerPlex (®) 21 PCR amplification system[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, 12:86-92.
- [13] Ensenberger MG, Hill CR, McLaren RS, et al. Developmental validation of the PowerPlex (®) 21 system [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2014, 9:169-178.

反流性食管炎患者食管动力改变与幽门螺杆菌感染关系的研究

邱彩玉*

[摘要] 目的 探讨反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)患者食管动力变化与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染的关系。方法 采用病例对照的方法,选取63例经内镜诊断为RE的患者(RE组)和60名健康志愿者(对照组)为研究对象;进行食管压力测定;检测Hp;将RE组患者分为Hp阳性组和Hp阴性组,比较2组患者间食管动力情况。结果 RE组与对照组食管下端压力比较多数有显著性差异;RE组食管远段平均蠕动收缩波幅显著低于对照组($P=0.03$);RE组无效食管运动次数显著多于对照组($P=0.04$);RE组与对照组的Hp感染率无显著性差异($P=0.87$);RE组中Hp阳性组与Hp阴性组食管运动指标均无显著性差异。结论 RE患者存在食管运动功能异常,RE的发生及食管动力学变化与Hp感染可能没有明确关系。

[关键词] 反流性食管炎;食管测压;幽门螺杆菌;食管运动异常

Study on the association of esophageal motility change and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis

QIU Caiyu*

(Department of Gastroenterology, First People's Hospital of Zhenjiang City, Zhenjiang, Jiangsu, China, 212002)

[ABSTRACT] Objective To analyze the association among reflux esophagitis(RE), esophageal motility and *Helicobacter pylori*(Hp) infection. Methods A case-control study was performed. 63 patients with RE diagnosed by endoscopy(RE group) and 60 healthy volunteers(control group) were selected. All individuals were tested about esophageal motility and Hp infection. Patients in RE group were divided into Hp positive or negative groups, to compare about the esophageal motility. Results Most of the results of lower esophageal sphincter between RE and control groups were significantly different. The average amplitude of peristaltic contraction of lower segment of esophageal body in the RE group was significantly lower than the control group($P=0.03$). The times of ineffective esophageal motility in the RE group was significantly more than the control group($P=0.04$). There was not significantly difference of Hp infection between the RE group and the control group ($P=0.87$). The test results of esophageal motility between Hp positive and negative groups in the RE group were not significantly differences. Conclusion Esophageal dysmotility may play an important role in RE. There is no obviously relationship between Hp infection and RE. Hp infection may have no significant effect on the esophageal motor function in RE.

[KEY WORDS] Reflux esophagitis; Esophageal manometry; *Helicobacter pylori*; Esophageal motility abnormalities

作者单位:镇江市第一人民医院消化内科,江苏,镇江 212002

*通讯作者:邱彩玉, E-mail:qiucaiyu1985@163.com

近来,反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)发病率有明显上升趋势^[1]。目前受到大多数学者认可的机制是防御机制削弱和食管酸清除能力下降^[2],其中食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)是主要防御机制之一。LES的结构受到破坏或功能相对降低时,易引起胃食管反流^[3]。从1983年发现幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)以来, Hp感染与RE的关系一直存在争议,且Hp影响RE的研究大多停留在胃酸上,同时研究食管动力与Hp感染关系的实验较少。食管运动异常是RE发生发展的一个重要影响因素。本研究旨在通过对RE患者进行食管压力测定和Hp检测,了解RE患者的食管动力异常和Hp感染的关系,并观察Hp感染对食管运动功能的影响,为RE的治疗提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 RE组

收集2012年12月至2014年12月期间在镇江市第一人民医院住院的RE患者共63例,其中男性48例,女性15例,年龄在25岁~64岁,平均年龄51.5岁。所有患者具有典型的胃食管反流症状并经胃镜证实,同时排除继发性反流性食管炎因素。

1.1.2 对照组

正常健康志愿者60例,男性38例,女性22例,年龄在24岁~62岁,平均年龄50.3岁。二组在性别、年龄构成方面无显著差异。

1.1.3 研究对象排除标准

(1)食管裂孔疝、糖尿病及体重指数>25者。(2)正在服用非甾体类药物或皮质激素类药物者。(3)妊娠、哺乳期女性。(4)有活动性溃疡、肿瘤及贲门失弛缓症。(5)伴有严重的心、脑、肺、肾及肝脏疾病。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准

采用Olympus电子胃镜参照洛杉矶标准^[4]诊断RE。

1.2.2 食管压力测定

1.2.2.1 仪器 采用气液压毛细管连续灌注系统(合肥凯利光电科技有限公司生产的XDJ-S8A型消化道动力检测仪)。

1.2.2.2 测压准备 3 d内未服用过抑酸药物及促胃肠动力药物,禁食及禁烟酒6 h。

1.2.2.3 食管测压方法 连接四腔测压导管,注水排气,使液气压达到300 mmHg,同时与计算机相连,陆续校正各通道压力,测压数据传输至计算机,报告结果。

1.2.2.4 食管测压步骤 取平卧位,将测压导管置入至侧孔全部抵达胃部(约65 cm),然后嘱受检者保持平静呼吸,至少安静5 min后,以每次上拉1 cm的速度定点牵拉,确定LES的部位后,主要测定食管下括约肌静息压力(lower esophageal sphincter pressure, LESP),通过湿吞咽试验6次测定食管下括约肌残余压(lower esophageal sphincter relaxation pressure, LESRP)及食管下括约肌松弛率(lower esophageal sphincter relaxation rate, LESRR),继续牵拉导管,将4个通道置于LES上的3 cm、8 cm、13 cm、18 cm处,再次结合湿吞咽试验,测定食管近端及远端蠕动波幅,观察食管体部蠕动波幅、波型、传播速度和方向。每次吞咽后食管运动包括有效蠕动及无效食管运动(infective esophageal movement, IEM)。

1.2.2.5 观察指标 LESP、LESRP、LESRR和食管体部运动功能(包括食管体部近段、远端蠕动收缩波幅、蠕动收缩波类型)。

1.2.3 Hp检测

对RE组患者采取胃粘膜快速尿素酶法和¹⁴C尿素呼气法两种方法检测Hp,将2种方法结果均为阳性的患者定义为Hp阳性;2种方法结果均为阴性的患者定义为Hp阴性;2种检测方法结果不一致的舍去。

1.2.4 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理。计量资料应用 t 检验,数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 RE组与对照组的LES检测结果比较

RE组LESP显著低于对照组,两组有显著性统计学差异($P=0.02$);RE组LESRP结果显著高于对照组,两组比较也有显著性统计学差异($P=0.03$);RE组LESRR与对照组比较无显著性差异($P=0.22$)。具体结果见表1。

表 1 RE 组与对照组食管下端动力参数比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of low esophageal motility between RE and control groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LESP	LESRP	LESRR
	(例)	(mmHg)	(mmHg)	(%)
RE 组	63	12.5±4.2 [#]	3.1±3.3 [#]	92.1±7.5
对照组	60	25.4±7.9	1.7±1.3	89.4±9.5

[#]与对照组相比, $P < 0.05$

2.2 RE 组与对照组的食管体部运动情况比较

RE 组食管近段(距 LES 上 18 cm 点)平均蠕动收缩波幅与对照组比较无显著差异 ($P=0.82$);

RE 组食管远段(距 LES 上 3 cm 点)平均蠕动收缩波幅显著低于对照组 ($P=0.03$); RE 组 IEM 次数显著多于对照组 ($P=0.04$)。具体结果见表 2。

2.3 RE 组与对照组的 Hp 感染情况比较

RE 组 Hp 感染率为 61.9%(39/63), 略低于对照组的 65.0%(39/60), 但二者无显著性差异 ($P=0.87$)。

2.4 在 RE 组中 Hp 感染与食管运动情况比较

RE 组中 Hp 阳性组与 Hp 阴性组食管运动指标比较: LESP、LESRP、LESRR、食管近段平均蠕动收缩波幅、食管远段平均蠕动收缩压力及低压蠕动率、同步蠕动率、非传导蠕动率等食管运动指标均无显著性差异。具体结果见表 3。

表 2 食管体部运动的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of esophageal body motility between RE and control groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	食管近端平均蠕动收缩波幅(mmHg)	食管远端平均蠕动收缩波幅(mmHg)	IEM 次数
RE 组	63	32.09±16.20	48.57±15.37 [#]	2.05±1.27 [#]
对照组	60	57.4±20.0	66.8±33.5	0.75±0.79

[#]与对照组相比, $P < 0.05$

表 3 RE 患者中 Hp 阳性、阴性组食管动力比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of esophageal motility between the Hp positive and negative groups in the RE group ($\bar{x} \pm s$)

项目	Hp 阳性(n=39)	Hp 阴性(n=24)	P 值
LESP(mmHg)	13.4±4.9	11.1±2.4	0.423
LESRP(mmHg)	2.8±3.8	3.6±2.4	0.345
LESRR(%)	92.4±8.4	91.7±6.2	0.440
无效食管运动			
低压蠕动率(%)	23.7±6.1	29.9±19.4	0.555
同步蠕动率(%)	5.2±8.3	7.7±12.2	0.273
非传导蠕动率(%)	5.3±8.5	5.0±9.3	0.909
食管近段平均蠕动收缩波幅(mmHg)	36.3±20.8	41.7±23.1	0.858
食管远段平均蠕动收缩波幅(mmHg)	59.7±21.5	50.5±16.1	0.655

3 讨论

RE 是食管腺癌的高危因素, 发病率逐年上升, 但其发病机制至今尚未完全阐明。LESP 降低, IEM 增多等 LES 功能障碍及食管体部运动功能异常是食管防御功能减弱的主要表现, 与 RE 的发病密切相关。LESP 降低是造成胃食管反流病的重要解剖基础和背景因素, LEM 的增多导致食管廓清能力的下降^[4]。本研究发现 RE 组平均 LESP 显著低于对照组, LESRP 明显高于对照组, 且食管远段的收

缩波波幅明显减低。结果说明 RE 患者存在明显的 LES 及食管体部运动功能障碍, 致使远段食管的酸清除能力明显减弱。非特异性食管动力紊乱是食管体部动力异常的类型之一, 而 IEM 是其中较重要的表现。近年来 IEM 在 RE 中所起的作用越来越受到医学界的重视, 认为 IEM 普遍存在于胃食管反流病患者中^[5]。本研究发现 IEM 见于大多数的 RE 患者, 且食管运动波形态显著异常, 与文献报道一致^[6], 因此 IEM 比正常食管动力患者易发生反流性食管, 存在食管酸清除障碍。

Hp 感染与 RE 的关系,各学者报道不一。Saad^[7]、Olokoba 等^[8]发现 *Hp* 感染促进反流性食管炎的发生。Xie 等^[9]认为 *Hp* 感染使患者胃酸分泌增加,加大对食管的损伤,同时 *Hp* 感染能通过对胃底的刺激传人神经,导致食管下段括约肌功能部分降低,致胃的排空与分泌异常。也有学者认为 *Hp* 感染可能是反流性食管炎的一种保护因素^[10-12]。Tan 等^[10]发现 *Hp* 可产生尿素酶分解尿素产生氨,中和胃酸,从而减少胃蛋白酶原的激活,减轻反流的胃内容物对食管的腐蚀作用;pH 值升高,致使血清胃泌素浓度上升,增加食管下端括约肌的压力;长期 *Hp* 感染可导致胃窦胃体黏膜炎症,腺体萎缩,胃酸分泌减少。在本研究中 RE 患者 *Hp* 感染率与普通人群无显著性差异。Qian 等^[13]分析认为,胃食管反流病的发生、发展与 *Hp* 无关。故 *Hp* 与 RE 的关系尚需大样本、多中心、随机对照研究,才能得出最终结论。

Hp 感染可通过不同的途径,既可通过促进胃泌素分泌增加 LES 压力,又可上调诱生型一氧化氮合酶的表达从而降低 LES 压力,故 *Hp* 对食管动力的影响说法不一。本研究发现,*Hp* 阳性与 *Hp* 阴性组中食管下端及食管体部动力无显著性差异。Grandet^[14]、Xinias^[15]、Xue 等^[16]报道 *Hp* 阳性与 *Hp* 阴性的 RE 患者食管动力学参数亦无差别,提示 *Hp* 感染可能对 RE 患者的食管动力无显著性影响。

虽然近年来 RE 的发生与食管动力异常及 *Hp* 感染之间的关系研究引起了学者们越来越多的关注,但迄今为止 RE 与 *Hp* 感染及 RE 患者食管动力异常与 *Hp* 感染的关系并无定论,尚需要进行大量流行病学、临床及实验研究来进一步阐明其中的关系,从而为 RE 的预防和治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 陈坚,徐三荣.胃食管反流病[M].实用内科学(13版),2009,1962-1966.
- [2] Ferguson DD, de Vanlt KR. Medical management of gastroesophageal reflux disease[J]. Expert Opin Pharmacother, 2007, 8(2):39-47.
- [3] Kim DJ, Lee JH, Kim W. Lower esophageal sphincter-preserving laparoscopy-assisted proximal gastrectomy in patients with early gastric cancer: a method for the prevention of reflux esophagitis[J]. Gastric Cancer, 2013,16(3):440-444.
- [4] Hayashi Y, Lwakiri K, Kotoyori M, et al. Mechanisms of acid gastrophageal reflux in the Japanese population [J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(1):1-6.
- [5] Henriquez DA, Csendes JA, Rencoret PG, et al. Primary esophageal motor disturbances among patients with esophageal symptoms[J]. Rev Med Chia, 2007,135(10):1270-1275.
- [6] 赵文治.胃食管反流病的动力学障碍研究及诊治分析[J].医学信息,2010,5(6):1379-1380.
- [7] Saad AM, Choudhary A, Bechtold ML. Effect of Helicobacter pylori treatment on gastroesophageal reflux disease(GERD): meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Scand J Gastroenterol, 2012,47(2):129-135.
- [8] Olokoba AB, Obateru OA. Helicobacter pylori eradication therapy: A review of current trends [J]. Niger Med J, 2013, 54(1):1-11.
- [9] Xie T, Cui X, Zheng H, et al. Meta-analysis: eradication of helicobacter pylori infection is associated with the development of endoscopic gastroesophageal reflux disease[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2013,25(10):1195-1205.
- [10] Tan J, Wang Y, Sun X, et al. The effect of helicobacter pylori eradication therapy on the development of gastroesophageal Reflux Disease[J]. Am J Med Sci, 2015, 349(4):364-371.
- [11] Kandulski A, Malfertheiner P. Helicobacter pylori and gastroesophageal reflux disease [J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2014, 30(4):402-407.
- [12] Malfertheiner P, Megraud F. Management of helicobacter pylori infection-the masstricht IV/Florence consensus report[J]. Gut, 2012,61(5):646-664.
- [13] Qian B, Ma SL. Effects of helicobacter pylori eradication on gastroesophageal reflux disease[J]. Helicobacter, 2011,16(4):255-265.
- [14] Grande M, Lisi G, de Sanctis F, et al. Does a relationship still exist between gastroesophageal reflux and Helicobacter pylori in patients with reflux symptoms? [J]. World J Surg Oncol, 2014,12(1):375-378.
- [15] Xinias I, Maris T, Mavroudi A, et al. Helicobacter pylori infection has no impact on manometric and pH-metric findings in adolescents and young adults with gastroesophageal reflux and antral gastritis: eradication results to no significant clinical improvement[J]. Pediatric Reports, 2013,5(1):e3-5.
- [16] Xue Y, Zhou LY, Lin SR, et al. Effect of helicobacter pylori eradication on reflux esophagitis therapy: a multi-center randomized control study [J]. Chinese Medical Journal, 2015,128(8):995-999.

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定蜂蜜中5种四环素类抗生素的探讨

刘兆峰^{1*} 钟启升²

[摘要] 目的 建立一种超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定蜂蜜中5种四环素类抗生素残留的方法。方法 通过固相萃取富集样品中的四环素类抗生素后,使用超高效液相色谱快速分离,三重四极杆质谱仪进行定量分析。结果 超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法能定量检出蜂蜜中5种四环素类抗生素的残留,对5 μg/L、10 μg/L和50 μg/L混合标准溶液的相对标准偏差在0.62%~3.79%之间,其检出限为31.9 ng/L~63.4 ng/L,定量限为127 ng/L~254 ng/L,样品加标回收率在86.9%~98.1%之间。结论 本法快速、准确、灵敏度高,能满足蜂蜜中5种四环素类抗生素残留的检测。

[关键词] 超高效液相色谱-三重四极杆质谱;四环素类抗生素;蜂蜜

Discussion on determination of 5 kinds of tetracyclines residues in honey by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry

LIU Zhaofeng^{1*}, ZHONG Qisheng²

(1. Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China, 510180; 2. Analytical Center, Guangzhou Branch, Shimadzu (China) Co., LTD., Guangzhou, Guangdong, China, 510010)

[ABSTRACT] Objective To establish a method for determination of 5 tetracyclines residues in honey by the ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Methods After concentrated by solid phase extraction, 5 tetracyclines in honey were then separated by ultra-performance liquid chromatography and quantified by triple quadrupole mass spectrometry. Results The 5 tetracyclines residues in honey were quantify detected by UPLC-MS/MS. The relative standard deviations of 5 μg/L, 10 μg/L and 50 μg/L mixed standard solution were in the range of 0.62%~3.79%. The limits of detection and limits of quantitation were 31.9 ng/L~63.4 ng/L and 127 ng/L~254 ng/L, respectively. The recoveries of three spiked levels were range from 86.9% ~ 98.1%. Conclusion The method of UPLC-MS/MS is rapid, accurate, sensitive and can meet the requirements for the determination of 5 tetracyclines residues in honey.

[KEY WORDS] Ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry(UPLC-MS/MS); Tetracyclines; Honey

四环素类抗生素(tetracyclines, TCs)包括金霉素(chlortetracycline)、土霉素(oxytetracycline)、四环素(tetracycline)、强力霉素(doxycycline)、去甲基金霉素(demeclocycline hydrochloride)等,是临床上广泛应用的广谱抗生素。然而,不合理地使用该类药物,如用药剂量过大、用药时间过长、滥用药

物及不遵守休药期提前屠宰等,会导致该类药物及其代谢产物残留于动物的肌肉、蛋、奶、脏器组织及分泌物中。四环素类抗生素并不能被动物完全吸收,有相当部分以原形或代谢物形式进入食物链和环境中,直接或间接对人体健康造成影响^[1]。

作者单位:1. 广东省食品药品检验所,广东,广州 510180

2. 岛津企业管理(中国)有限公司广州分公司分析中心,广东,广州 510010

*通讯作者:刘兆峰,E-mail:9016117@qq.com

近年来,蜂蜜产业发展迅速。我国蜜蜂大多是从国外引进的意蜂,发病率比较高,虽然国家提倡生物防治,但还是有一部分人用化学药物、抗生素来给蜜蜂预防和治疗疾病,导致蜂蜜中抗生素含量较高^[2-3]。因此,迫切需要建立蜂蜜中高效灵敏的抗生素检测方法。

高效液相色谱-串联质谱联用技术,特别是三重四级杆质谱仪可以进行母离子扫描、子离子扫描和中性丢失扫描,由于可以有效排除基质离子产生的非目标碎片离子的干扰,优化质谱检测信号,有效的防止了假阳性的检出,具有高的选择性和灵敏度,对复杂基体中的药物残留具有准确的定性能力,是近些年来发展很快的分析技术^[46]。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定蜂蜜中的 5 种四环素类抗生素的方法,以给分析检测人员提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统(岛津,日本)。具体配置为输液泵 LC-30AD×2,在线脱气机 DGU-20A5,自动进样器 SIL-30AC,柱温箱 CTO-30AC,系统控制器 CBM-20A,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040,色谱工作站为 LabSolutions Ver. 5.53。

1.2 分析条件

液相条件:使用 Shim-pack XR-ODS II(2.0 mm I.D.×100 mm L., 2.2 μm 粒径)色谱柱;流动相 A 为 0.1% 甲酸的水溶液,流动相 B 为甲醇;流速为 0.25 mL/min;柱温为室温;进样量为 20 μL;洗脱方式为梯度洗脱,B 相初始浓度为 20%,洗脱程序见表 1。

质谱条件:离子化模式为电喷雾离子源(正离子);离子喷雾电压为 4.5 kV;雾化气为 3.0 L/min 流速氮气;干燥气为 15 L/min 流速的氮气;碰撞气为氩气;去溶剂管温度为 250℃;加热模块温度为 400℃;扫描模式为多反应监测(multiple reacting monitoring, MRM),化合物信息和 MRM 优化参数见表 2;驻留时间为 10 ms;延迟时间为 3 ms。

1.3 样品制备

标准溶液配制:称取适量 5 种标准物质,分别为四环素、土霉素、去甲基金霉素、金霉素和强力霉素,用甲醇配制 1 000 mg/L 的混合标准储备

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

时间(min)	模块	命令	设置值
0.00	泵	泵 B 比例	20
5.00	泵	泵 B 比例	95
6.00	泵	泵 B 比例	95
6.01	泵	泵 B 比例	20
8.00	泵	泵 B 比例	20
8.00	控制器	停止	

液,用甲醇+0.1 甲酸水溶液(V/V, 1:4)稀释成不同浓度的混合标准工作液。

蜂蜜:市售蜂蜜。

样品前处理方法:蜂蜜样品的制备、净化、提取参照《GB/T 23409-2009 蜂王浆中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法》^[7]。

1.4 加标回收率计算

加标回收率按以下公式计算: 加标回收率=(加标样品检出浓度-样品基质中检出浓度)/加标浓度×100%。

2 结果

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

对 5 种四环素标准样品进行一级质谱图和产物离子扫描。由结果显示,5 种四环素均能得到加氢峰,其产物离子碎片均较为丰富。四环素的一级质谱图见图 1,产物离子扫描质谱图见图 2。土霉素的一级质谱图见图 3,产物离子扫描质谱图见图 4。去甲基金霉素的一级质谱图见图 5,产物离子扫描质谱图见图 6。金霉素的一级质谱图见图 7,产物离子扫描质谱图见图 8。强力霉素的一级质谱图见图 9,产物离子扫描质谱图见图 10。

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 11 为 100 μg/L 5 种四环素标准样品在最优色谱条件下得到的 MRM 色谱图。5 种四环素峰型对称、尖锐,分离度良好,基线较为平稳。

2.3 线性范围

将 0.2 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L、2.5 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 和 200 μg/L 不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定,外标法定量。以浓度为横坐标,峰面积

表2 化合物信息和MRM优化参数

Table 2 Compound informations and MRM optimal parameters

化合物名称	英文名	CAS 编号 (CAS. NO)	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais (V)	CE (V)	Q3 Pre Bais (V)
四环素	Tetracycline	60-54-8	445.20	410.10*	-22	-20	-29
				427.15	-22	-14	-30
土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	461.20	426.10*	-23	-19	-30
				443.20	-23	-14	-21
去甲基金霉素	Demeclocycline hydrochloride	64-73-3	465.10	448.10*	-23	-19	-30
				430.10	-23	-22	-30
金霉素	Chlortetracycline	57-62-5	479.15	444.20*	-24	-22	-30
				462.15	-24	-18	-22
强力霉素	Doxycycline	564-25-0	445.15	428.25*	-22	-19	-30
				154.20	-22	-34	-28

*表示定量离子



图1 四环素的一级质谱图

Figure 1 First order mass spectrum of tetracycline

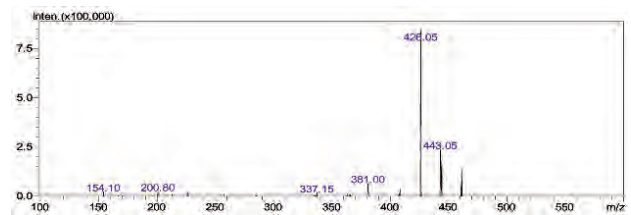


图4 土霉素的产物离子扫描图(CE值-19V)

Figure 4 Ion scanning graph of oxytetracycline products (CE-19V)

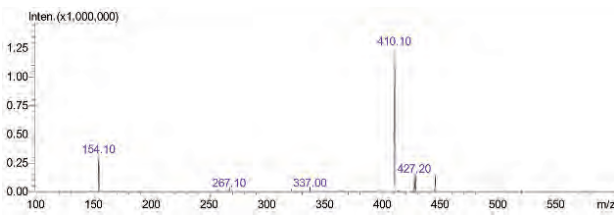


图2 四环素的产物离子扫描图(CE值-20V)

Figure 2 Ion scanning graph of tetracycline products (CE-20V)

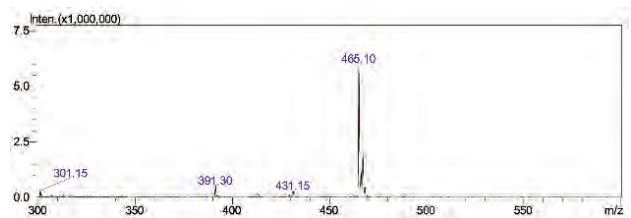


图5 去甲基金霉素的一级质谱图

Figure 5 First order mass spectrum of ledermycin

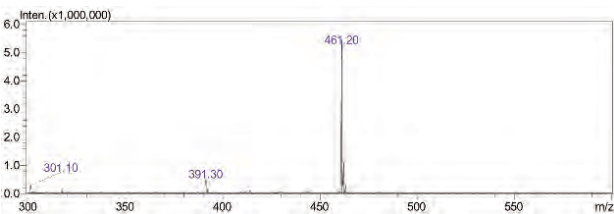


图3 土霉素的一级质谱图

Figure 3 First order mass spectrum of oxytetracycline

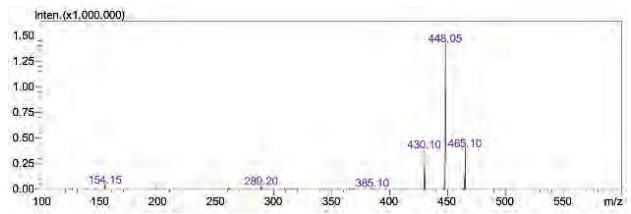


图6 去甲基金霉素的产物离子扫描图(CE值-19V)

Figure 6 Ion scanning graph of ledermycin products (CE-19V)

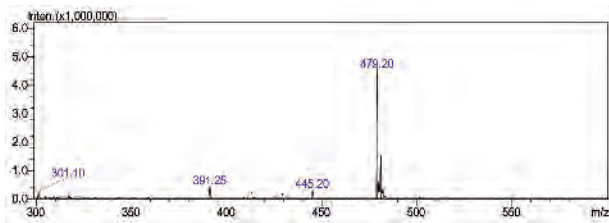


图7 金霉素的一级质谱图

Figure 7 First order mass spectrum of chlortetracycline

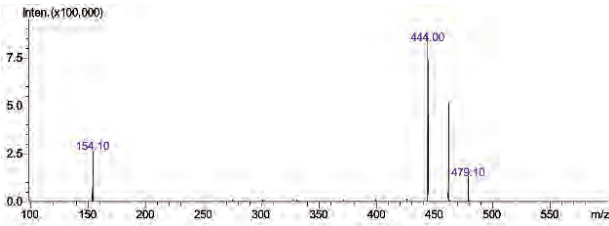


图8 金霉素的产物离子扫描图(CE值-22V)

Figure 8 Ion scanning graph of chlortetracycline products (CE-22V)

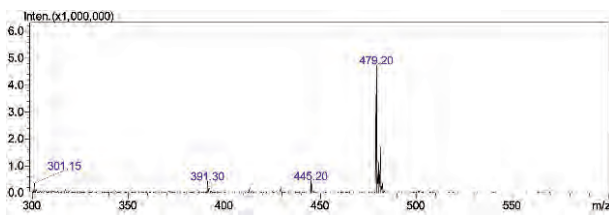


图9 强力霉素的一级质谱图

Figure 9 First order mass spectrum of doxycycline

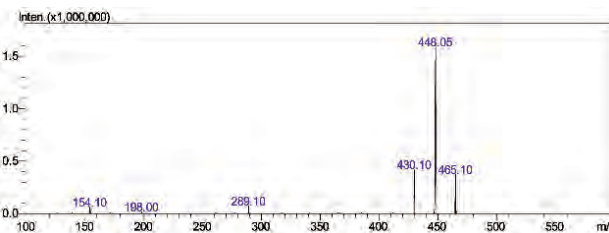


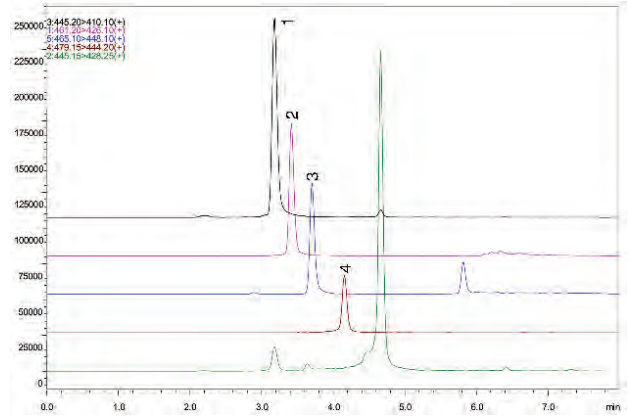
图10 强力霉素的产物离子扫描图(CE值-19V)

Figure 10 Ion scanning graph of doxycycline products (CE-19V)

为纵坐标,绘制校准曲线;所得校准曲线线性关系良好,线性方程及相关系数见表3。

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定6次,考察仪器的精密度,保留时间和峰面积的重复性结果如表4所示。结果显示:不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.20%~1.34%和0.62%~3.79%之间,仪器精密度良好。



1. 四环素; 2. 土霉素; 3. 去甲基金霉素; 4. 金霉素; 5. 强力霉素

图11 标准样品的MRM色谱图(100 µg/L)

Figure 11 MRM chromatography of standard sample (100 µg/L)

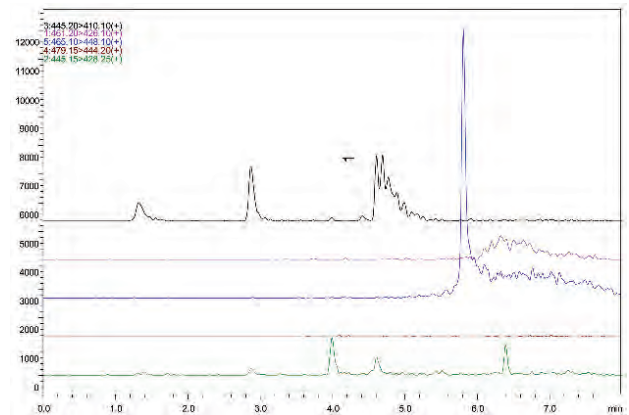
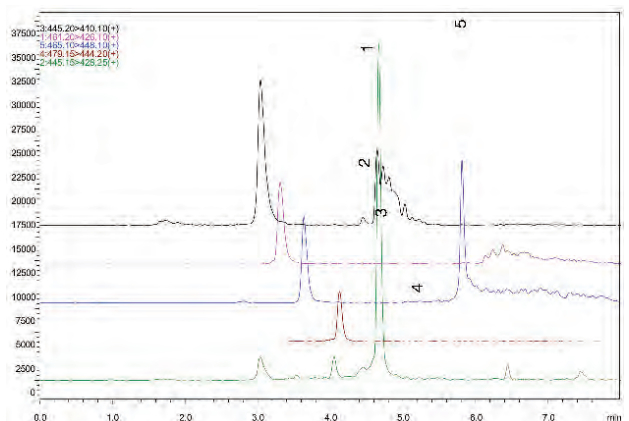


图12 无加标蜂蜜样品的MRM色谱图(检出1为四环素)

Figure 12 MRM chromatography of non-spiked honey sample (detected 1: tetracycline)



1. 四环素; 2. 土霉素; 3. 去甲基金霉素; 4. 金霉素; 5. 强力霉素

图13 蜂蜜加标(2 µg/kg)样品的MRM色谱图

Figure 13 MRM chromatography of honey sample adding standard solution (2 µg/kg)

表 3 校准曲线参数

Table 3 Parameters of calibration curve

名称	校准曲线	线性范围(μg/L)	相关系数 r
四环素	Y = 49 259.9 X -1866.27	0.2~200	0.999 9
土霉素	Y = 28 905.9 X -348.296	0.5~100	0.999 7
去甲基金霉素	Y = 27 468.4 X + 1698.49	0.5~100	0.999 6
金霉素	Y = 12 102.7 X + 571.906	0.5~100	0.999 7
强力霉素	Y = 77 333.8 X + 5973.94	0.2~100	0.999 8

表 4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

Table 4 The repeatability results of retention time and peak area(n=6)

样品名称	相对标准偏差(5 μg/L)		相对标准偏差(10 μg/L)		相对标准偏差(50 μg/L)	
	保留时间 (R.T.)	峰面积 (Area)	保留时间 (R.T.)	峰面积 (Area)	保留时间 (R.T.)	峰面积 (Area)
四环素	1.14	3.21	0.93	2.65	1.10	1.42
土霉素	0.82	2.76	0.91	2.87	0.79	0.62
去甲基金霉素	0.88	3.27	0.78	3.04	0.70	2.90
金霉素	0.48	3.79	0.46	2.98	0.38	1.80
强力霉素	0.20	2.71	0.22	1.72	0.20	1.20

表 5 四环素类抗生素的检出限和定量限

Table 5 The limits of detection and limits of quantitation of tetracycline

名称	标准偏差 (S)	检出限 (ng/L)	定量下限 (ng/L)
四环素	14.9	46.8	187
土霉素	20.2	63.4	254
去甲基金霉素	17.8	55.9	224
金霉素	18.4	57.8	231
强力霉素	10.2	31.9	127

2.5 检出限

配制浓度为 200 ng/L 标样 7 份, 直接进样分析, 将平行 7 次测定结果计算标准偏差 S, 此时检出限 MDL=3.14×S, 定量下限 LOQ=4×MDL。测定结果如表 5 所示。

2.6 回收率实验

以蜂蜜为待测样品, 检测 5 种四环素类抗生素。在 2 g 蜂蜜样品中检出四环素, 浓度为 0.249 μg/kg, 色谱图(图 12)峰型平滑、尖锐, 其他 3 种四环素类抗生素没有标准峰型出现。为了研究该分析方法对蜂蜜样品中四环素类抗生素的实际检

测效果, 向蜂蜜样品中加入浓度为 2 μg/kg 的 5 种四环素类抗生素标准物质, 加标色谱图(图 13)5 种四环素类抗生素均出现平滑尖锐峰型经加标回收率(表 6)计算, 其平均回收率分别为四环素 98.1%、土霉素 95.2%、去甲基金霉素 86.9%、金霉素 88.3%、强力霉素为 98.1%。

3 讨论

目前, 液相质谱联用技术已广泛用于微生物、蛋白质组学、化学生物学等学科, 在探究新的机理、新的化合物方面发挥着越来越重要的作用^[8-11]。同时, 在药物和食品残留分析方面, 与蜂蜜中四环素族检测传统标准方法^[12]相比, 液相质谱联用技术检测速度更快、定量更准确、分析四环素类化合物的具体种类更精确, 指导食品行业发展更有指向性, 提供给执法部门的数据更明确, 大大提高了相关部门的效率。以四环素、土霉素、强力霉素和金霉素与前处理方法相同的 GB/T 23409-2009^[7]相比, 其加标回收率土霉素(95.2%)比 85.2%~120.8%的回收率提高 10%左右, 四环素(98.1%)比 73.5%~115.4%的回收率提高 20%左右, 强力霉素(98.1%)比 65.8%~115.2%的回收率提高 20%左右,

表6 四环素类抗生素加标回收率结果

Table 6 The recoveries results of tetracyclines in honey

序号	名称	样品1 实测浓度(μg/kg)	样品2 实测浓度(μg/kg)	平均回收率(%)
1	四环素	2.18	2.25	98.1
2	土霉素	1.93	1.87	95.2
3	去甲基金霉素	1.67	1.81	86.9
4	金霉素	1.78	1.76	88.3
5	强力霉素	1.89	1.92	98.1

金霉素的加标回收率也有所提高。

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定蜂蜜样品中的四环素类抗生素 MRM 色谱图峰型对称、尖锐,分离度良好,基线较为平稳,同时校准曲线的相关系数都在 0.999 6 以上,说明该检测方法和前处理方法适合检测蜂蜜中四环素类抗生素残留,可以进一步研究稳定条件,提高检测精度和准确度,使其作为国标或行标被检测单位所采用。

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定蜂蜜样品中的四环素类抗生素残留量的检测方法,该方法前处理简单,分析时间快,灵敏度高,精密度良好,且线性范围宽,相关系数在 0.999 6 以上,对 5 μg/L、10 μg/L 和 50 μg/L 混合标准溶液的相对标准偏差在 0.62%~3.79% 之间,其检出限为 31.9 ng/L~63.4 ng/L,定量限为 127 ng/L~254 ng/L。通过对市售蜂蜜样品的测定,能够检测出微量四环素,对蜜蜂样品进行加标分析,得到样品加标回收率在 86.9%~98.1% 之间,证明该方法适合蜂蜜样品种衡量四环素的分析检测。

参考文献

[1] 贺德春, 许振成, 吴根义, 等. 四环素类抗生素的环境行为研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(4):98-102.
 [2] 夏环, 王妍, 荆涛, 等. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定蜂蜜中三种氟喹诺酮类抗生素残留[J]. 分析科学学报, 2012, 31(3):297-302.
 [3] 李坤威, 张剑, 沈克强, 等. 国内外蜂蜜标准比对分析[J]. 标准科学, 2015, 22(4):67-69.
 [4] 赵红霞. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS)对农作物中农药多残留的检测研究[D]. 济南: 山东大学化学与化工学院, 2013.

[5] Qi W, Guan Q, Sun T, et al. Improving detection sensitivity of amino acids in thyroid tissues by using phthalic acid as a mobile phase additive in hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 870:75-82.
 [6] Matsuda F, Ogura T, Tomita A, et al. Nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using the multiple reaction monitoring mode based quantitative platform for analyzing multiple enzymes associated with central metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using ultra fast mass spectrometry[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(1): 117-120.
 [7] GB/T 23409-2009. 蜂王浆中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法 [S]. 2009,1-6.
 [8] Son N, Hur HJ, Sung MJ, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic analysis of livers from aged rats[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(4):2551-2558.
 [9] Ertaş A, Boğa M, Yılmaz MA, et al. Chemical compositions by using LC-MS/MS and GC-MS and biological activities of *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(20):4601-4609.
 [10] Salminen JP, Shikov AN, Karonen M, et al. Rapid profiling of phenolic compounds of green and fermented *bergenia crassifolia* L. leaves by UPLC-DAD-QqQ-MS and HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS [J]. Nat Prod Res, 2014, 28(19):1530-1533.
 [11] de Rijke E, Essers ML, Rijk JC, et al. Selective androgen receptor modulators: in vitro and in vivo metabolism and analysis[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013,30(9):1517-1526.
 [12] GB/T 5009.95-2003. 蜂蜜中四环素族抗生素残留量的测定[S]. 2003,1-6.

microRNA 与乙型肝炎病情转归的关系

张秀华* 吴园园

[摘要] 微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类内源性非编码调控 RNA,由二十几个核苷酸长度组成,其通过抑制蛋白质翻译或降解 mRNAs 调控基因转录后的表达,参与调节细胞的分化,增殖及凋亡,并在肿瘤的发生发展中起重要作用。研究表明乙型肝炎病毒和宿主之间通过 miRNA 进行相互调节,这在 HBV 相关肝病的发生发展中起着非常重要的作用。本文就 miRNA 与 HBV 感染及其相关肝病的研究现状加以综述以探讨 miRNA 的研究对 HBV 相关肝病诊治的重要意义。

[关键词] miRNA; 急性乙型肝炎; 慢性乙型肝炎

The relationship between microRNA and prognosis of hepatitis B

ZHANG Xiuhua*, WU Yuanyuan

(Clinical Laboratory of Heze Municipal Hospital, Heze, Shandong, China, 274031)

[ABSTRACT] MicroRNA(miRNA) is a type of endogenous regulation of non-coding RNA which is made up of more than 20 nucleotides in length. MiRNA involves in the regulation of cell differentiation, proliferation and apoptosis by inhibiting the expression of protein translation or degrading mRNAs to regulate gene transcription. It plays an important role in the occurrence and development of cancer. Studies have shown that the hepatitis B virus(HBV) and its host carry out mutual adjustment through miRNA. It is very important in the occurrence and development of HBV-related liver disease. In this paper, the research status of miRNA and HBV infection will be reviewed to discuss the importance of miRNA on diagnosis and treatment of HBV-related liver disease.

[KEY WORDS] miRNA; Acute hepatitis B; Chronic hepatitis B

乙型肝炎(hepatitis B, HB)是全球广泛分布的传染病,是我国突出的公共卫生问题之一。目前世界上约有 3.5 亿慢性乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者,其中中国约有 1.2 亿人^[1]。慢性 HBV 感染是肝癌发生的主要因素之一,我国原发性肝癌患者中 HBV 感染者高达 80%以上,每年近 20 万人死于 HBV 相关疾病^[2]。近年来,在多种真核细胞及病毒中发现存在一类来源于内源性染色体上的非编码单链 RNA,即微小核糖核酸(mi-croRNA, miRNA)。miRNA 在进化上高度保守,与

靶 mRNA 碱基进行特异性的互补配对,通过引起靶 mRNA 降解或者抑制蛋白质翻译,进而调控基因转录后过程,在体内发挥重要的生物学功能。多种 miRNA 分子通过调控免疫细胞内的信号转导途径来影响机体的免疫应答^[3-4]。有研究发现,在 HBV 感染过程中,某些 miRNAs 参与了宿主的抗 HBV 免疫反应,并与细胞因子表达相关,其检测可为 HBV 感染的慢性化进展机制提供一个新的研究线索^[5-6]。因此 miRNA 在 HBV 相关肝病表达谱的研究中具有重要意义和广阔的应用前景。

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10002005)

作者单位:山东省菏泽市立医院检验科,山东,菏泽 274031

*通讯作者:张秀华, E-mail:zxhhzslyy@163.com

1 miRNA 的生物学特征和作用机制

miRNA 是一类由二十几个碱基长度组成的内源性非编码 RNA 分子 (small non-coding RNA, sncRNA), 目前在人类基因组中发现的成熟 miRNA 分子已达 2 000 多种。miRNA 在基因组中有单拷贝、多拷贝或基因簇等多种存在形式, 其位置大多落于基因间隔区, 有自身的转录调控机制, 独立于其他基因, 而且可能从前体到成熟的加工过程中, 前体本身满足了所需的所有顺式序列要求。大量的 miRNA 与其对应的靶基因之间形成了一个庞大而又错综复杂的基因表达调控网络 miRNA 的调控网络如图 1 所示 [7] (以 NF- κ B 信号通路为例)。

miRNA 基因在核内由 RNA 聚合酶 II 转录为初级 miRNA (pri-miRNA), 通过 Drosha 酶及蛋白 DGCR8 识别并剪切为长约 60 个~80 个核苷酸 (nucleotide, nt) 的含发夹状茎环结构的前体 miRNA (pre-miRNA), 再经转运蛋白 (exportin5) 转运至胞质, 最后在 Dicer 酶的作用下, 将 pre-miRNA 处理成为 22 nt 的成熟 miRNA。成熟 miRNA 5' 端有 6 个~8 个相对恒定的核苷酸, 称为“种子序列”, miRNA 通过种子序列与靶 mRNA 的 3' 非编码区 (3'-untranslated regions, 3'-UTR) 域配对结合抑制 mRNA 的降解或翻译。根据 miRNA 与靶 mRNA 的配对程度不同, 将其作用机制分为 2 种: 靶 mRNA 的切割以及翻译抑制。切割抑制是指 miRNA 与靶 mRNA 几乎或完全配对, 靶 mRNA 通过 RNA 诱导的沉默复合体作用, 直接被降解; 翻译抑制是指 miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 部分互补, 同样通过 RNA 诱导沉默复合体的形式来抑制转录后翻译水平的基因表达, 而不影响 mRNA 本身 [8], 许多动物体内 miRNA 的作用机制属于后者。病毒利用在核内由 RNA 聚合酶 II 合成的 miRNA 主要有 2 方面的作用: (1) 用于自身基因表达的调控; (2) 作用于宿主细胞的基因以便于自身感染。研究表明几种 DNA 病毒通过编码 miRNA 进行调节自身或作用于宿主细胞基因, 有利于自身的潜伏感染, 如 Sullivan 等发现的 SV40 编码的 miRNA [9]。此外, 每个 miRNA 可调控多个位点, 而同一位点又对应多个 miRNA。miRNA 的调控途径是一个复杂的网络, 因此, 依靠单个

miRNA 难以完全阻断靶 mRNA 的翻译, 需要若干 miRNA 协同表达, 联合调控靶 mRNA 的翻译功能。miRNA 的产生与作用机制如图 2 所示 [10]。

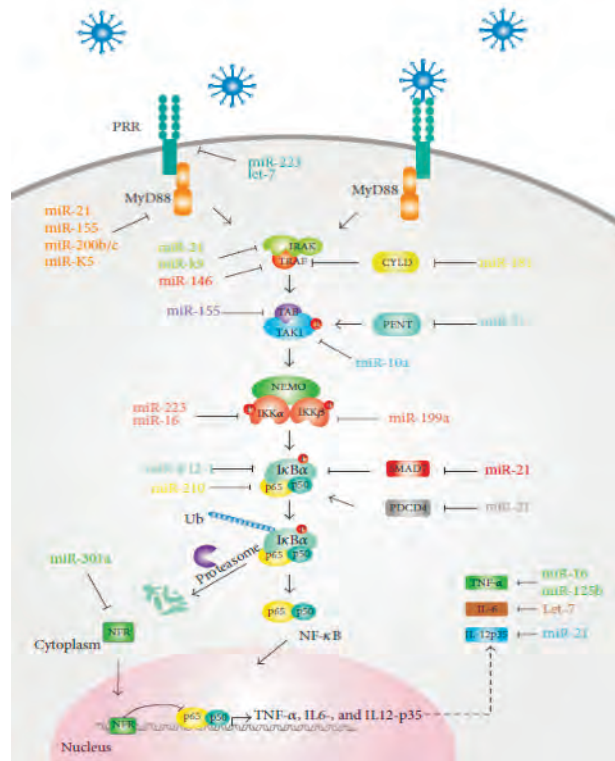


图 1 NF- κ B 信号通路的 miRNA 调控网络 [7]

Figure 1 NF- κ B signal pathway network regulated by miRNAs [7]

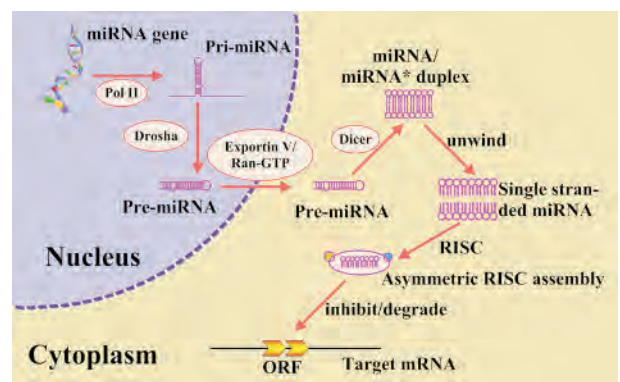


图 2 miRNA 的产生与作用机制 [10]

Figure 2 Schematic overview of miRNA biogenesis and function [10]

2 miRNA 与 HBV 感染及其慢性化

病毒可以利用宿主生物合成途径, 通过复杂

的机制来抵御宿主的细胞反应,在病毒-宿主细胞相互作用过程中 miRNA 介导了 RNA 沉默途径^[11]。在此过程中,病毒可以利用宿主细胞的 miRNA,也可以复制自身 miRNA^[12]。这说明宿主被病毒感染后,不仅宿主自身的 miRNA 可作用于病毒,病毒编码的 miRNA 也可作用宿主基因,二者的相互调控对病毒性疾病的发生发展至关重要。Jin 等^[13]利用计算机分析 HBV 作为一种 DNA 病毒能否编码 miRNA,并利用其调节自身或宿主基因的表达,结果发现一种候选的 HBV 编码的 pre-miRNA,可以靶向作用于病毒 mRNA,提示 HBV 可能利用编码 miRNA 来调节病毒自身的基因表达。来自于宿主编码的 miRNA 可能直接或间接调节病毒基因的表达。一些学者构建多种肝组织特异性 miRNA 表达载体,发现宿主编码的 miRNA 可以明显下调 HBsAg 和 HBeAg 的表达,并明显抑制 HBV 的复制和表达^[14-15]。miRNA 与基因调控、细胞分化、疾病的发生和发展密切相关^[16],患者感染 HBV 后,会发生急性乙肝、乙肝病毒携带、慢性乙肝、乙型肝炎肝硬化、肝衰竭甚至肝细胞癌等不同阶段的病理变化,miRNA 在 HBV 感染及病情发展中发挥重要作用。

急性乙型肝炎(acute hepatitis B, AHB)患者外周血和肝脏内对 HBV 有强烈的多克隆和多特异性的免疫反应,这种免疫反应最终可清除 HBV;而慢性 HBV 感染者免疫应答功能低下,从而导致 HBV 持续感染。在不同类型 HBV 感染者中 miRNA 分子的表达存在差异性,这可能与慢性化机制有关。王琳等^[5]在对乙型肝炎患者外周血单个核细胞中微小 RNA 的表达变化的研究中发现,急性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中 miRNA155 的表达水平在急性发作期明显高于健康对照组,随疾病进入发作期、病毒清除期、恢复期,其表达逐渐降低,而且 miRNA-155 与干扰素- α (interferon alpha, IFN- α)、干扰素- β (interferon beta, IFN- β)均具有良好的正相关性。miRNA181 在 HBV 感染者 PBMC 中的表达,除急性乙型肝炎恢复期外,均高于健康对照组。说明在 HBV 感染过程中,miRNAs 参与了宿主的抗 HBV 免疫应答反应,与 AHB 免疫发病有关。miR-155 能正性调节炎症因子的释放^[17],此外,miR-155 还能维持 CD4 细胞向

Th1 型细胞分化促使 IFN 的产生。miR-181 能增强 T 细胞信号转导的强度和敏感性^[17]。推测在 AHB 的病毒清除中,miR-155 与 IFN 的共同作用发挥了积极作用;而 miR-181 的表达上调,进一步增强了效应 T 细胞的抗病毒免疫应答作用,从而有助于宿主清除 HBV。因此,由于 miR-155 缺陷所致的 Th1/Th2 失衡及树突状细胞功能抑制,可能是 HBV 持续感染的原因之一。

I 型干扰素及其信号通路是宿主细胞抵抗病毒的重要防御系统,患者感染 HBV 时,宿主内源性 I 型干扰素分泌不足,并且干扰素下游的抗病毒信号转导同样也发生了异常,这直接导致许多 HBV 感染患者对于 INF- α 抗病毒治疗应答不良。在李宁等^[18]的研究中,发现 miR-548 家族成员,特别是 miR-548c5p 与 CHB 患者 I 型干扰素分泌紊乱密切相关。可能是 CHB 发生发展中 miRNA 调控的一个重要环节。此外,Liu 等^[19]研究结果发现 HBV 的复制引起肝细胞内 miR-181a 的表达显著上调,miR-181a 可靶向抑制人类白细胞抗原 A 的表达,从而 HBV 感染细胞的特异性表型减弱,使细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)对被感染细胞的识别和杀伤能力降低,调控被感染细胞逃避宿主的免疫清除,从而参与 HBV 的持续感染。

在微小 RNA 在不同时期慢性乙型肝炎病毒感染者的异常表达谱及其临床意义的研究中^[20],与健康对照比较,人 miR-4711-3p (homo sapiens miR-4711-3p, has-miR-4711-3p)和 has-miR-3191-5p 表达水平在慢性乙型肝炎患者和 HBV 携带者明显下调,has-miR-5704-5p 表达水平明显上调,has-miR-146a-5p 在 HBV 携带者明显下调,has-miR-548ah-5P 分子在慢性乙型肝炎患者中明显上调,has-miR-29b-3p 分子在 3 个阶段的慢性 HBV 感染者均明显下调。慢性 HBV 感染者 PBMC 中 miRNA 分子总体表达下调,可能与高水平的 HBV 抑制 miRNA 分子表达,导致机体特异性免疫功能低下有关;而慢性乙型肝炎患者 PBMC 中 miRNA 分子表达明显上调,也存在部分下调分子,可能与机体免疫功能部分恢复,而其清除功能仍不足有关;非活动性 HBV 携带者因 HBV 复制被抑制,miRNA 分子总体表达与健康对照差异无统计学意义。据此认为,HBV 与机体相互作用导致多种

miRNA分子的异常表达,可能在维持慢性HBV感染者免疫稳态机制中发挥重要作用。

3 miRNA与慢性HBV感染的转归

miRNA异常表达与慢性肝炎、肝硬化及向肝癌演变的过程密切相关。马兆龙等^[21]利用miRNA芯片技术,分析了在HBV感染、慢性肝炎肝硬化及肝癌演变过程中miRNA表达谱的变化。结果表明肝硬化和肝癌组织与正常组织相比,均发现有表达上调和下调的miRNA,并且这些与正常组织有差异表达的miRNA在肝硬化和肝癌组织中几乎没有差别。提示在不同类型肝脏组织中,在HBV感染→肝硬化→肝癌的发生发展过程中差异性表达的miRNA可能发生在进程早期,起到重要的类似癌基因或抑癌基因的作用,相关miRNA表达的改变可能促进了该进程的发生发展。其他实验结果则表明miR-21是抑癌基因PTEN的上游调控因子,调节miR-21能引起PTEN的改变,继而调控Akt信号途径和细胞的增殖活性^[22]。有的miRNA则可能作为肝癌预防和早期诊断的潜在标志物,比如miR-200a就极大程度地参与了肝癌的发生,在肝癌发生的各个阶段均有巨大的指示作用^[23]。而miR-148a在体外能抑制肝癌细胞SMMC-7721的侵袭和迁移,进一步明确miR-148a在肝癌侵袭转移中的分子机制,从而为肝癌的治疗提供实验依据^[24]。miR-122是肝脏中特异性高表达的miRNA,但在肝癌组织中表达低,且表达水平随着肿瘤分化程度的降低而下调,这种改变促进肝癌细胞的分裂和增殖,可将其作为未来肝癌诊断和预测的指标^[25]。构建miR-122慢病毒表达质粒并感染肝癌细胞,稳定表达的miR-122a能有效抑制肝癌细胞增殖及克隆增生,证实miR-122在肝癌生长侵袭方面发挥着重要作用^[26]。研究发现血清miR-222在肝癌患者表达显著上调,其高表达与肝硬化、肿瘤数目、门静脉癌栓、TNM分期相关,可能有助于肝癌患者的预后预测^[27]。Li等^[28]验证了肝癌患者体内miRNA-139与临床特征的相关性,血浆miRNA-139的表达水平可以作为HCC的诊断标志物和预后因素。上述研究表明miRNA在癌旁组织和正常肝组织表达存在差异。但是可能是由于采用的研究方法不同,许多研究发现虽然HCC中miRNA表达失调,但是结论并不一致,应注意因分

析方法不同所致的差异。

4 展望

miRNA在HBV相关肝病的发病机制中的意义重大,随着研究的不断深入,特别是miRNA芯片技术的发展,它为疾病的诊治带来全新的观念;从诊断方面来看,miRNA为肝脏疾病的诊断提供了大量信息,miRNA作为早期诊断HCC及病毒性肝炎感染的新标志物,将极大程度的提高病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化和HCC等肝脏疾病的诊断水平;从疾病治疗的角度分析,随着对循环miRNA的深入研究及检测方法的进步,将更加清晰地阐明许多疾病的发病机制,并为疾病的治疗提供新的思路。miRNA介导的RNAi作为一种新型的基因治疗技术,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 李晨, 万漠彬, 王慧芬. microRNA在HBV相关肝病中的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19(8):774-776.
- [2] Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. J Hepatol, 2010, 52(4):594-604.
- [3] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection [J]. Cell, 2007,129(1):147-161.
- [4] Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses[J]. Cell, 2010, 142(6):914-929.
- [5] 王琳, 谢青, 龚邦东, 等. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞中微小RNA的表达变化[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(8):473-479.
- [6] 张静, 史进方, 高纯, 等. 乙型肝炎病毒感染不同时期外周血单个核细胞微小RNA表达变化及其意义[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6):544-549.
- [7] Gao Z, Dou Y, Chen Y. MicroRNA roles in the NF- κ B signaling pathway during viral infections [J]. Biomed Research International, 2014, doi: 10.1155/2014/436097.
- [8] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116:281-297.
- [9] Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells [J]. Nature, 2005, 435(7042):682-686.

- [10] Liu B, Fang L, Wang X, et al. Identification of real microRNA precursors with a pseudo structure status composition approach[J]. Plos One, 2015, 10(3):e0121501.
- [11] Gottwein E, Cullen BR. Viral and cellular micrRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity [J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(6):375–387.
- [12] SkalBky RL, samols MA, Plaisance KB, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155[J]. J Virol, 2007, 81(23):12836–12845.
- [13] Jin WB, Wu FL, Kong D, et al. HBV-encoded microRNA candidate and its target [J]. Comput Biol Chem, 2007, 31(2):124–126.
- [14] Gao YF, Yu L, Wei W, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(29):4684–4689.
- [15] 罗祥基,程庆保,徐峰,等. 慢病毒介导基于 microRNA 系统的 hbsnai 技术抑制 hbv 复制[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(3):295–299.
- [16] Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(14):1665–1672.
- [17] Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/ TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock[J]. Immunology, 2007, 179(8):5082–5089.
- [18] 李宁,陈明泉,程琦,等. 调控慢性乙型肝炎患者 I 型干扰素信号通路的 microRNA 的筛选及鉴定[J]. 中国病毒病杂志, 2012, 2:107–112.
- [19] Liu Y, Zhao JJ, Wang CM, et al. Altered expression profiles of microRNAs in a stable hepatitis B virus-expressing cell line[J]. Chin Med J, 2009, 122(1):10–14.
- [20] 邢同京,徐洪涛,余文庆,等. 微小 RNA 在不同时期慢性乙型肝炎病毒感染者的异常表达谱及其临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2013, 31(10):586–592.
- [21] 马兆龙,杨炼,陈立波,等. miRNA 在 HBV 从感染经由肝硬化到肝癌进程中表达谱的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(20):2112–2116.
- [22] Zhang Y, Jia S, Xiang F, et al. Expression of miR-122 in hepatocarcinoma cell strains and its relationship with PTEN[J]. Chinese Clinical Oncology, 2014, 19(6):490–493.
- [23] 夏宁,高媛,王兴,等. 血清及肝组织 miR-200a 在大鼠肝癌发生过程中的动态表达分析 [J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(6):440–444.
- [24] 贾筱琴,缪俊俊,雍军,等. miR-148a 对肝癌细胞株侵袭和迁移的抑制作用及机制[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(6):412–417.
- [25] 张纓,贾绍昌,项方,等. miR-122 在肝癌细胞中的表达及其与细胞周期调控的关系 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(8):691–694.
- [26] 庄鹏,李志莹,王湘郴,等. miR-122 慢病毒载体的构建及其在肝癌细胞中的作用[J]. 2013, 29(7):529–531.
- [27] 占美晓,李勇,胡宝山,等. 肝癌患者血清中微小 RNA 的表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(23):1830–1832.
- [28] Li T, Yin J, Yuan L, et al. Downregulation of microRNA-139 is associated with hepatocellular carcinoma risk and short-term survival[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4):1699–1706.

胃癌 microRNA 表达谱分析及其意义

宋雅琴 温旺荣*

[摘要] 胃癌是一种高度恶性的肿瘤,由于缺乏灵敏与特异的早期诊断措施,导致胃癌的死亡率逐年上升。microRNA(miRNA)是近年来发现的一类非编码单链小分子RNA,其通过参与对靶基因的调控而影响细胞的生理及病理过程。miRNA表达失调会导致疾病的发生。研究显示异常表达的miRNA在胃癌增殖、侵袭与转移中起着重要的作用,为胃癌的早期诊断和预后提供潜在的敏感的生物标志物。本文就此方面作一综述。

[关键词] 胃癌; miRNA; 分子诊断

MicroRNA expression profiling and function in gastric cancer

SONG Yaqin, WEN Wangrong*

(Center of Clinical Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630)

[ABSTRACT] Gastric cancer is a kind of highly malignant tumor. As the early diagnostic measures are neither sensitive nor specific, the mortality of gastric cancer is increasing year by year. MicroRNA (miRNA) is a class of noncoding small molecular RNA founded in recent years, which participates in the regulation on target gene and impacts the physiological and pathological process of cells. Illness can be caused by the dysfunctional expression of miRNA. Researches showed that the abnormal expression of miRNA plays vital roles in the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer. MiRNA may provide potentially sensitive biomarkers for early diagnosis and prognosis of gastric cancer. And these contents will be reviewed in this paper.

[KEY WORDS] Gastric cancer; miRNA; Molecular diagnosis

胃癌(gastric cancer, GC)是最常见的恶性肿瘤之一。据世界卫生组织公布的统计数据显示,2012年全球胃癌新发病例95.2万,死亡病例72.3万,其中我国新发病例达40万,死亡病例达16万^[1],严重危害我国人民的身体健康。由于绝大多数胃癌患者早期缺乏特异性的临床表现,求医时往往已进展至中晚期,即使进行根治性手术复发率也很高,预后差,导致胃癌死亡率较高。早期胃癌通常预后良好,5年生存率高达90%^[2],故早期诊断成为改善患者预后的关键。因此寻找一

种高灵敏性和特异性的胃癌早期诊断标志物至关重要。胃癌的发生是一个多步骤、多因素的复杂渐进过程,它常发生在多年慢性炎症浸润刺激的胃里,并导致胃炎、胃粘膜萎缩和肠上皮化生,危险因素包括高盐饮食、十二指肠胃反流和幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染,这些因素与其他环境因素及遗传因素一起导致了胃癌的发生,其中有致癌作用的miRNA表达量升高和抑癌作用的miRNA表达量降低。miRNA在胃癌的发病、进展及预后中起着类似致癌基因或抑癌基因的作

项目基金:2011年广东省科技计划(2011B031600315)

作者单位:暨南大学附属第一医院临床检验中心,广东,广州 510630

*通讯作者:温旺荣, E-mail:wenwangrong@yeah.net

用。因此,miRNA 可能为胃癌的早期诊断和治疗提供有前途的潜在生物标志物和治疗靶点。但 miRNA 表达调控网络、生物学功能及其与胃癌的关系等仍有许多机制有待阐明,需要进行更深入的研究。

1 miRNA 在胃癌中的差异表达

有研究^[3-6]表明,多种 miRNA 的表达水平在胃癌组织或细胞中有不同程度的上升或下调,说明 miRNA 的异常表达与胃癌的发生发展密切相关。下面就一些参与胃癌形成的 miRNA 进行阐述。

1.1 在胃癌发生中起致癌作用的 miRNA

miR-21 位于 17q23 处,是研究最多的 miRNA 之一,在一系列实体肿瘤中表达升高,如胃癌^[3-6],乳腺癌^[7]、非小细胞肺癌^[8]、结肠直肠癌等^[9],且与癌症的发生、发展及预后密切相关。miR-21 在胃癌细胞中表达显著升高,并参与调控多种抑癌基因的表达。Cao 等^[3]利用实时定量 PCR 检测 46 例胃癌组织和相应正常胃粘膜组织的 miR-21 表达水平,结果显示有 92% 的胃癌组织中 miR-21 表达升高。过表达的 miR-21 通过碱基配对的方式结合到抑癌基因程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, PDCD4),抑制 PDCD4 蛋白的表达,促进了胃癌细胞增殖。有研究者^[4]通过荧光素酶报告基因实验发现,转染人第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN),miR-21 通过翻译水平上靶向调节 PTEN 蛋白的表达而影响胃癌细胞的增殖,说明 PTEN 是 miR-21 的靶基因,miR-21 还可以通过作用于 PTEN 激活胃癌细胞的生长信号通路,进而抑制肿瘤细胞的凋亡^[5]。另有研究^[6]显示胃癌组织高表达的 miR-21 在胃癌发生中起着致癌作用,其表达升高促进癌细胞的浸润扩散和淋巴结转移,但与患者生存期关系不大。近期报道指出,在胃癌组织中 miR-106 可以直接靶向作用于基质金属蛋白酶组织抑制因子 2(matrix metalloproteinases tissue inhibiting factor 2, TIMP2),降低其表达水平,进而促进肿瘤的转移和迁移^[10]。基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)的抑制剂,可降

解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜,是肿瘤转移的先决条件^[11]。另外 miR-17-5p/20a 在胃癌中有着类似的机制,miR-17-5p/20a 的过表达可以促进胃癌细胞浸润和迁移^[12]。

1.2 在胃癌发生中起抑癌作用的 miRNA

miR-148a 在胃癌的不同阶段低表达,其作用类似于肿瘤抑制基因,即使在早期胃癌,miR-148a 也会显著降低,并且肿瘤分期越晚,miR-148a 表达降低越明显^[13]。因此 miR-148a 可作为胃癌早期诊断与进展期检测的生物标志物。进一步研究表明,胃癌中的 miR-148a 低表达是由于基因的启动子区域发生了 DNA 甲基化使其活性降低,进而抑制胃癌细胞增殖^[13-15]。基因启动子区域的 CpG 岛是甲基化发生的主要位点,其参与基因表达的调控机制,调节紊乱即 DNA 甲基化对促进胃癌的发生发展起着重要的作用^[14]。Yan 等^[14]通过实验证实,在胃癌组织中,DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase, DNMT1)在胃癌中高表达导致 miR-148a 的 CpG 岛异常高甲基化,使 miR-148a 表达沉默。而减少 Runt 相关转录因子基因 3(runt-related transcription factor 3 gene, RUNX3)的表达使 miR-148a 在胃癌中的过表达^[15],提示 DNMT1 和 RUNX3 可能作为 miR-148a 调控 DNA 甲基化的靶点。也有研究^[16]发现 miR-375 在大部分胃癌患者中出现了明显的下降。在体外实验中,增加胃癌细胞 MGC-803 中 miR-375 的表达量,肿瘤生长受抑制,说明 miR-375 具有抑癌基因的功能,其作用靶点是 JAK 激酶 2(janus kinase 2, JAK2)。还有研究^[17]发现胃癌组织高表达的 miR-375 负向调控抑癌基因人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, ERBB-2),miR-375 过表达对胃癌细胞 BGC-823 的抑制作用可以被 ERBB-2 的过表达所逆转,说明 miR-375 在胃癌的发生发展中的抑癌作用。

2 与感染相关的致胃癌作用的 miRNA

胃癌的发病是多因素、多步骤的过程,幽门螺杆菌 *Hp* 感染与 EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)感染是诱发胃癌重要的危险因素。

2.1 与 *Hp* 感染相关的致胃癌作用的 miRNA

已有研究证实 *Hp* 持续感染会导致慢性胃炎,而多年来保持沉默进展可能会导致更严重的疾

病,如胃腺癌^[18]。*Hp*感染胃黏膜上皮细胞的主要天然免疫方式是通过细胞核因子 kappa B(nuclear factor-kappa B, NF-κB)信号活化使生长因子表达增加,而 miR-146a 对 *Hp* 感染引起的 NF-κB 信号活化起到负调控的作用^[19],促进 *Hp* 感染诱发胃癌。目前认为细胞毒素相关蛋白 A(cytotoxin-associated gene A, Cag A)阳性的 *Hp* 菌株与胃癌的发生发展关系密切,Cag A 致病岛是 *Hp* 的主要致病高危因子之一。通过对 *Hp* 感染的 Cag A 阳性的胃癌细胞进行研究,发现 Cag A 升高的胃黏膜病变细胞中 miR-let-7 的启动子高度甲基化,降低 miR-let-7 的表达,提高 Zeste 同源增强子 2 (enhancer of zeste homologue 2, EZH2)和 DNMT3B 的活化,再经 Ras 信号通路激活癌基因 C-myc,使病变细胞不断增殖形成肿瘤^[20]。*Hp* 感染胃黏膜细胞会诱导 miR-222 的表达,抑制伴有 kazal 基序富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白 (reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motif, RECK)基因的表达,促使胃癌细胞在体内增殖,导致癌细胞转移扩散^[21]。PTEN 作为 miR-222 的靶基因,也可能抑制胃癌细胞的增殖^[22]。说明 miR-222 参与 *Hp* 相关因素的胃致癌作用。也有研究显示一些 miRNA 在 *Hp* 感染后已经上调,如 miR-142-5p 和 miR-155^[23]。以上数据显示 *Hp* 感染可能通过改变一些 miRNA 的表达引发胃癌。

2.2 与 EBV 感染相关的致胃癌作用的 miRNA

EBV 与胃癌的发生也存在着密切的联系,研究证实,EBV 感染相关 miRNA 能够帮助胃癌细胞逃脱宿主的免疫监视,促进癌细胞生长,抑制癌细胞凋亡^[24]。研究人员^[25]发现,在 EBV 感染的胃癌组织中,miR-200a/b 的表达水平明显低于正常胃黏膜组织,导致肿瘤上皮细胞 E-钙粘蛋白(E-cadherin)低表达,而胃癌组织中 E 盒结合锌指蛋白 1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1)和 ZEB2 高表达,致使肿瘤细胞间的黏附能力降低,侵袭力增强。他们的研究提示,miR-200a/b 是 EBV 感染引起胃癌的发生发展进程中重要的组成部分。因此潜伏的 EBV 感染引起的 miR-200a/b 下调是 EBV 致胃癌作用的主要机制之一。

3 与胃癌化疗和预后相关的 miRNA

3.1 与胃癌化疗相关的 miRNA

化疗是治疗胃癌的主要手段之一,但目前癌

细胞对化疗药物耐药性或多药耐药性(multidrug resistance, MDR)的产生使肿瘤对化疗不敏感,导致治疗失败。miRNA 可通过调节胃癌耐药基因影响胃癌耐药。据报道^[26],胃癌组织高表达的 miR-27a 刺激肿瘤细胞增殖并导致胃癌,抑制胃癌细胞 MGC-803 中 miR-27a 表达能增强化疗药物对胃癌细胞生长的抑制作用,提示 miR-27a 可能作为胃癌的治疗靶点。另有研究^[27]显示 miR-27a 能负调控 P-21 基因并间接上调 P-糖蛋白(P-glycoprotein)和细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)在胃癌中的表达,降低 miR-27a 的表达可增加阿霉素在胃癌细胞中的积累并减少其排出,抑制胃癌细胞的耐药性。Wu 等^[28]发现 miR-129-5p 在 MDR 的胃癌细胞株中呈低表达,而恢复 miR-129-5p 的表达可以增强癌细胞对化疗药物的敏感性,诱导细胞凋亡,进一步研究证实 miR-129-5p 是通过作用于 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transponer)(ABCB1, ABCC5, ABCG1)参与调节肿瘤细胞凋亡。提示在胃癌中上调或下调 miRNA 可部分逆转肿瘤细胞的多药耐药表型,增加其对化疗药物的敏感性,这对寻找新的分子治疗靶标,指导临床用药有重要意义。

3.2 与胃癌预后相关的 miRNA

胃癌的预后主要取决于胃癌是否复发及转移,一些特殊的 miRNA 异常表达与胃癌的复发和转移密切相关,说明它们可能作为有意义的胃癌预后标志物。有研究发现,在 88%的胃癌患者中 miR-221 的表达较对照组显著上调,miR-221 的过表达显示胃癌的局部侵犯及淋巴转移,miR-221 的高表达对胃癌患者的总生存期是一个不利的预后因素^[29]。表明 miR-221 可作为胃癌一个潜在的诊断和预后指标。另外,有研究指出胃癌患者血清中 miR-196a 含量升高会导致胃癌的复发^[30]。miR-196a/196b 在胃癌组织中高表达,会导致根蛋白(radixin)水平降低,促进胃癌细胞迁移和入侵^[31]。miR-196a 还可以结合 CDK 抑制蛋白 p27(CDK inhibitory protein p27, p27kip1)的 3'非编码区域来抑制 p27kip1 的表达,进而促进胃癌的发生发展^[32]。这些研究提示在胃癌组织中高表达的 miR-196a/196b 加速癌细胞浸润侵袭和淋巴结远处转移,对胃癌的预后判断有一定参考价值。有实验证明,胃癌组织中低表达的 miR-125-3p 的患者更易

发生淋巴结转移,且生存期明显缩短,说明 miR-125-3p 能够作为独立的预测胃癌整体生存期和无病生存期的预后因子^[33]。

4 用于胃癌诊断与监测的循环 miRNA

循环 miRNA 指存在于血液等体液的细胞外游离的 miRNA 循环,它在经过反复冻融后提取,依然稳定存在,是用于恶性肿瘤诊断和监测的非常好的标志物。多数研究^[34-35]得到的结论说明,将肿瘤组织和外周血中 miRNA 的表达谱进行比较,外周血 miRNA 能较好地反应组织 miRNA 改变。miRNA 可以从癌细胞释放到周围环境中,肿瘤相关血浆或血清 miRNA 都源于坏死或凋亡的肿瘤细胞以及具有主动分泌功能的肿瘤细胞^[34]。Tsujiura 等^[34]利用 miRNA 芯片对 69 例胃癌患者的血浆标本进行筛选,发现胃癌患者外周血与健康对照组相比,let-7a 明显下调,而 miR-17-5p, miR-106a, miR-106b 及 miR-21 显著上调;对比术前术后外周血 miRNA 的表达,上调的 miRNA 在术后明显下降,下调的 miRNA 明显回升;通过分析这 5 个循环 miRNA 的比例,发现 miR-106 a/let-7a 的曲线下面积(area under the curve, AUC)最高(0.879),高于传统标志物癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)(0.503)和糖类抗原 CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)(0.600),提示外周血 miRNA 可以用于胃癌的联合诊断和病情监测。他们也有研究证实外周血 miR-18a 可能作为胃癌潜在的生物标记物,因为 miR-18a 在外周血中含量高且在手术后显著下降($P=0.0002$)^[35]。还有研究显示在胃癌患者的胃液中也有 miRNA,例如 miR-21 和 miR-106 在胃癌患者的胃液中表达明显升高,特别是在肠型胃癌标本中 miR-21 (ROC 面积是 0.969)和 miR-106 a (ROC 面积是 0.871)显著升高,而在良性病变标本中升高不明显^[36]。提示胃液 miR-21/miR-106a 的水平与胃癌的病理类型和进展相关,胃液 miRNA 可作为胃癌潜在的生物标志物以筛查胃癌。2009 年 Guo^[37]等采用 miRNA 芯片检测首次在胃癌组织中发现过表达的 miR-421, miR-421 在 73% 的胃癌标本中高表达。最近有研究者在胃癌患者胃液^[38]及外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)中均检测到 miR-421 表达显著升高^[39]。Wu 等^[40]利用生

物信息学分析发现 caspase-3 基因是 miR-421 的靶标。高表达的 miR-421 能够通过抑制 caspase-3 介导的凋亡通路显著增加肿瘤细胞活性,同时 miR-421 能够降低 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)的表达,从而促进胃癌细胞增殖和转移。这些发现将有助于理解 miR-421 在胃癌中的作用。上述研究说明循环 miRNA 可能作为一种有潜力的、敏感的、非侵入性血清诊断标志物对胃癌患者进行筛查。

5 小结

胃癌的早期诊断与预后有很大关系,因此积极寻找一种新的具有高敏感性和高特异性的肿瘤分子标志物对胃癌的早期诊断、治疗及预后具有极其重要的价值。miRNA 在胃癌发生发展中起着重要作用,近年来,越来越多的研究发现与癌基因、抑癌基因相关的 miRNA。这些 miRNA 通过结合癌基因的靶基因来抑制癌基因,上调抑癌基因表达水平来抑制肿瘤生长、分化、浸润及转移,从而为胃癌的早期诊断与治疗提供有价值的诊断标志物和治疗靶点。因此,miRNA 可能成为将来胃癌诊断高灵敏度与特异度的有潜力的新途径,这对降低胃癌的发生率和死亡率具有重要意义。循环 miRNA 具有非侵入性的特点,其价格相对低廉,为胃癌的无创、实时、动态监测提供新的线索。如果能将这方面的研究转化为临床可以应用的方法,将其用于胃癌早期诊断、预后判断和治疗,则更能够体现其临床应用价值。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide [J]. IARC Cancer-Base, 2013, 22(3):8-10.
- [2] Wang Z, Ma L, Zhang XM, et al. Long-term outcomes after D2 gastrectomy for early gastric cancer: survival analysis of a single-center experience in China [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(17):7219-7222.
- [3] Cao Z, Yoon JH, Nam SW, et al. PDCD4 expression inversely correlated with miR-21 levels in gastric cancers[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 611-619.

- [4] Yang SM, Huang C, Li XF, et al. MiR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating PTEN[J]. *Toxicology*, 2013, 2(14):162–168.
- [5] Zhang BG, Li JF, Yu BQ, et al. MicroRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4):1019–1026.
- [6] Song J, Bai Z, Zhang J, et al. Serum microRNA-21 levels are related to tumor size in gastric cancer patients but cannot predict prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(6):1733–1737.
- [7] Dong G, Liang X, Wang D, et al. High expression of miR-21 in triple-negative breast cancers was correlated with a poor prognosis and promoted tumor cell in vitro proliferation[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(7):57–64.
- [8] Liu ZL, Wang H, Liu J, et al. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372(1–2):35–45.
- [9] Xiong Y, Zhang YY, Wu YY, et al. Correlation of over-expressions of miR-21 and Notch-1 in human colorectal cancer with clinical stages[J]. *Life Sci*, 2014, 106(1–2):19–24.
- [10] Zhu M, Zhang H, He S, et al. MicroRNA-106a targets TIMP2 to regulate invasion and metastasis of gastric cancer[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(4):600–607.
- [11] Wong GS, Rustgi AK. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4):755–761.
- [12] Wang M, Gu H, Qian H, et al. MiR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(8):2010–2021.
- [13] Wang M, Li X, Zhou LS, et al. MicroRNA-148a suppresses human gastric cancer cell metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Tumor Biol*, 2013, 34(4):3705–3712.
- [14] Yan J, Guo X, Xia J, et al. MiR-148a regulates MEG3 in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase-1 [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3):879–886.
- [15] Zuo J, Xia J, Ju F, et al. MicroRNA-148a can regulate runt-related transcription factor 3 gene expression via modulation of DNA methyltransferase1 in gastric cancer[J]. *Mol Cells*, 2013, 35(4):313–319.
- [16] Xu YJ, Jin J, Liu Y, et al. Snailregulated MiR-375 inhibits migration and invasion of gastric cancer cells by targeting JAK2[J]. *Plos One*, 2014, 9(7):e99516.
- [17] Shen ZY, Zhang ZZ, Liu H, et al. miR-375 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by repressing ERBB2 expression [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(6):1757–1761.
- [18] Ricci V, Romano M, Boquet P, et al. Molecular cross-talk between Helicobacter pylori and human gastric mucosa[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(11):1383–1399.
- [19] Crone SG, Jacobsen A, Federspiel B, et al. MicroRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- κ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11(71):1476–1486.
- [20] Hayashi Y, Tsujii M, Wang J, et al. CagA mediates epigenetic regulation to attenuate let-7 expression in Helicobacter pylori-related carcinogenesis[J]. *Plos One*, 2013, 62(11):1536–1546.
- [21] Li N, Tang B, Zhu ED, et al. Increased miR-222 in H. pylori-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6):722–728.
- [22] Chun ZZ, Lei H, An LZ, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(367):1471–1786.
- [23] Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, et al. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma resistant to Helicobacter pylori eradication[J]. *Plos One*, 2012, 7(11):e47396.
- [24] Kim SY, Park C, Kim HJ, et al. Deregulation of immune response genes in patients with epstein-barr virus-associated gastric cancer and outcomes [J]. *Gastroenterology*, 2014, 16(14):1142–1251.
- [25] Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(4):745–754.
- [26] Liu D, Sun Q, Liang S, et al. MicroRNA-27a inhibitors alone or in combination with perifosine suppress the growth of gastric cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2):642–648.
- [27] Zhao X, Yang L, Hu J, et al. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 13(3):1179–1185.
- [28] Wu Q, Yang Z, Xia L, et al. Methylation of miR-129-

- 5p CpG island modulates multi-drug resistance in gastric cancer by targeting ABC transporters[J]. *Oncotarget*, 2014, 18(8):1949–1956.
- [29] Liu K, Li G, Fan C, et al. Increased expression of miRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Journal of International Medical Research*, 2012, 40(2):467–474.
- [30] Tsai KW, Liao YL, Wu CW, et al. Aberrant expression of miR-196a in gastric cancers and correlation with recurrence[J]. *Genes of Chromosome & Cancer*, 2012, 51(4):394–401.
- [31] Tsai MM, Wang CS, Tsai CY, et al. MicroRNA-196a/-196b promote cell metastasis via negative regulation of radixin in human gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 351(2):222–231.
- [32] Sun M, Liu XH, Li JH, et al. MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27(kip1)[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(4):842–852.
- [33] Hashiguchi Y, Nishida N, Mimori K, et al. Down-regulation of miR-125a-3p in human gastric cancer and its clinicopathological significance[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(5):1477–1482.
- [34] Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(7):1174–1179.
- [35] Tsujiura M, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Circulating miR-18a in plasma contributes to cancer detection and monitoring in patients with gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2014, 3(63):1007–1012.
- [36] Cui L, Zhang XJ, Ye GL, et al. Gastric juice microRNAs as potential biomarkers for the screening of gastric cancer[J]. *Cancer*, 2013, 119(9):1618–1626.
- [37] Guo J, Miao Y, Xiao B, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(4):652–657.
- [38] Zhang XJ, Cui L, Ye G, et al. Gastric juice microRNA-421 is a new biomarker for screening gastric cancer[J]. *Tumor Biol*, 2012, 33(6):2349–2355.
- [39] Zhou H, Xiao B, Zhou F, et al. MiR-421 is a functional marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients[J]. *Biomarkers*, 2012, 17(2):104–110.
- [40] Wu JH, Yao YL, Gu T, et al. MiR-421 regulates apoptosis of BGC-823 gastric cancer cells by targeting caspase-3[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(13):5463–5468.

2015年第7卷中文总目录

述 评

- 大肠癌相关的 microRNA 谱 温淑娴 温旺荣(1)
分子病理学技术在肿瘤诊治中的应用 董贺 孙青(73)
蛋白质组学在肝细胞癌诊断研究中的进展与展望 彭征 戴盛明(145)
疾病诊断新标志物挖掘转化中产业化链思考 徐伟文(217)
化学发光免疫分析法的研究进展 陆龙飞 葛胜祥 张军(289)
液态活检技术的发展及肿瘤领域的应用 陈颖 朱明华(361)

论 著

- 广西壮族及汉族人群 CD40 配体基因 rs7050168G/A 遗传多态性 吴成将 陈健明 蓝艳 等(9)
455 例季节性发热病人登革病毒感染情况分析 钟志成 马丹娟 汪安石 等(14)
鄂西北及周边地区汉族人群 D2S1338 和 D19S433 基因座多态性分析与调查 王晓勋 李瑞明 陈敏 等(18)
非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与扩增的比较及其与血清 CEA 水平的关系 黄宇筠 袁润强 陈应智 等(22)
5 个家系 $\delta\beta$ 地中海贫血的家系分析及产前诊断 杜丽 秦丹卿 王继成 等(27)
采用多重连接依赖式探针扩增技术对先天性心脏病患儿进行基因拷贝数变异分析 罗世强 严提珍 唐宁 等(33)
冠心病患者血清中晚期糖基化终产物与动脉硬化的关系 高锦雄 彭海军 严炳存 等(38)
建立一种 N-ras 突变检测的“凸背”引物荧光 PCR 新技术 金霆 费政芳(44)
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 等(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)
细粒棘球绦虫 14-3-3zeta 蛋白的生物信息学分析 符瑞佳 吕刚 尹飞飞 等(151)
广东男男性行为 HIV-1 感染者中耐药情况及基因型分布 于国龙 秦冰 鄢心革 等(156)
重组慢病毒载体介导不同启动子驱动的绿色荧光蛋白在多种(不同)细胞中的表达影响 张玲 翁云层 张云 等(161)
TIP30 基因敲除小鼠 EGFR 下游信号通路活性 陈逢生 陈晓华 李爱民 等(166)
广州地区 579 例儿童过敏性鼻炎患者吸入过敏原的临床分析 张大威 丘小汕 何健荣 等(171)
XpertMTB/RIF 技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究 王怡心 陈雄豪 林惠玲 等(176)
牙齿缺失对急性缺血性卒中患者预后影响的临床研究 唐爱群 朱瑾华 朱飞奇(180)
曼氏迭宫绦虫 annexinB8 的生物信息学分析和基因克隆 梁培 吕刚 周晓君 等(185)
鼻咽癌细胞 MeDIP-Seq 测序 reads 在染色体上分布差异的研究 林伟达 王冬辉 罗海丹 等(222)
响应面优化黄皮叶中的活性因子超声提取工艺及其抗氧化活性研究 苏志鹏 孔繁晟 方宇洪 等(227)
2004 年~2013 年肺癌患病风险基因相关临床研究文献的计量学分析 邹建军 苏珊 张贤兰 等(236)
人乳头瘤病毒 52 型 E2 和 E6/E7 在宫颈病变中的表达及其意义 李岳军 周妙姬 邱峰(241)

应用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应对鲍曼不动杆菌进行同源性分析 闻海丰 秦瑾 于文静 等(247)

潮州市哨点医院 2009 年~2014 年流感监测分析 苏雪鑫 谢壁珠 陈爱苗 等(253)

代谢综合征与肿瘤相关性流行病学调查 赵思文 吴君洁 冯焯 等(257)

伴神经内分泌分化肺癌血清癌胚抗原水平的分析 黄宇筠 袁润强 陈应智 等(261)

基于全自动管式化学发光免疫检测系统的人结核感染 T 细胞检测方法的建立 陈鹭颖 林海军 翁祖星 等(296)

硫酸脱氢表雄酮化学发光微粒子免疫法定量测定试剂的研制 黄明聪 张晓琍 林光华 等(302)

人肌红蛋白化学发光免疫分析定量检测方法的建立及性能评价 王楠 彭波 李基 等(306)

人胰岛素定量测定试剂盒化学发光免疫分析法的建立及方法学评价 陈超 彭波 李基(313)

癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的临床性能评价 梁丽萍 李志雄 董志宁(318)

总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的性能验证 方婉仙 李志雄 董志宁(323)

基于磁微粒化学发光法的肝纤四项检测限与功能灵敏度研究 王新灵 李忠信 关学 等(328)

碱性磷酸酶标记抗人绒毛膜促性腺激素抗体的工艺比较 杜晔 李基 彭波(333)

游离甲状腺素线性及回收实验的研究 孙臻懿 潘洁 彭波(341)

上海市健康成人血清铁蛋白参考值调查 江生 彭波 李基(347)

广西人群 TGF-β1 基因 rs1800469C/T 遗传多态性的研究 黄华佗 罗宏成 向阳 等(367)

治疗前 NLR 和 PLR 对宫颈鳞癌患者预后的影响 郭煦 谢洪哲 柯尊富(372)

血清脂联素、TNF-α、CRP 联合检测在脓毒症患者中的临床应用价值 樊兵 胥顺(383)

c-Kit⁺Lin⁻细胞移植改善急性肝损伤的实验研究 张守华 杨慎华 杨文萍 等(387)

NDRG1 与 E-cadherin 下调表达及其与胃癌淋巴结转移的关系研究 廖爱辉 刘展 雷志胜(392)

广东地区地中海贫血孕妇全血微量元素含量分析 兰王菲 梁凯玲 杜丽 等(397)

柳州市 2014 年手足口病实验室检测结果分析 许泽辉 罗世强 王敬仁 等(401)

新疆伊犁州维吾尔族 20 个 STR 基因座的遗传多态性 高波 邱平明(407)

反流性食管炎患者食管动力改变与幽门螺杆菌感染关系的研究 邱彩玉(412)

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定蜂蜜中 5 种四环素类抗生素的探讨 刘兆峰 钟启升(416)

综 述

EML4-ALK 融合基因-非小细胞肺癌治疗的新靶点 郑秋青 毛伟敏 谢发君(50)

微小 RNA 与肺动脉高压 廖颖 李卫国 方勇 等(55)

外周血循环肿瘤 DNA 检测方法及应用 杨超 程昌明 杨慧敏 等(60)

肿瘤循环线粒体 DNA 研究现状 金涛 辛毅娟(68)

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)

腺相关病毒载体:通往肿瘤基因治疗的桥梁 陈秀生 林创珍 雷川 等(193)

论华法林相关基因突变检测技术 孙雪 况赞 阳喜定 等(199)

细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)与免疫调节 黄元兰 闫伟 付兆强 等(205)

实时荧光定量 PCR 检测血清/血浆 microRNAs 临床应用前的准备 邓开凤 戴盛明(211)

核酸适配子及其在阿尔茨海默病研究中的应用 寇哲文 王家鹏 张兴梅(266)

miR-451 与肿瘤的相关性 李莎 白育庭(271)

人类白细胞抗原 B27 的实验室诊断 杨霄鹏 惠玲(276)

分子生物学检测在 α -地中海贫血中的应用 郭柳薇(281)
先天性肾上腺皮质增生症筛查的相关进展 吕萌萌 朱宇皇 张跃峰 等(351)
叶酸及维生素 B₁₂ 检测方法的发展及现状 陈伟才 李忠信 渠海 等(357)
miRNA 与乙型肝炎病情转归的关系 张秀华 吴园园(422)
胃癌 microRNA 表达谱分析及其意义 宋雅琴 温旺荣(427)

专家风采

于农 (封二)
刘拥军 (封二)
郭建巍 (封二)
王哲 (封二)
张军 (封二)
尹爱华 (封二)

实验室巡礼

军事医学科学院附属医院临床检验中心分子诊断实验室 (封三)
天津市干细胞再生医学转化企业重点实验室 (封三)
中国人民解放军海军总医院分子诊断实验室 (封三)
肿瘤生物学国家重点实验室病理单元暨第四军医大学病理学与病理生理学教研室 (封三)
国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 (封三)
广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室 (封三)

动态

2015 循环生物标志物检测与临床应用研讨会通知 (301)

讲座

《体外诊断试剂注册管理办法》解读 杨勇 雷孝锋 李尔华 等(286)

Total Contents (Volume 7, 2015)

COMMENTS

- MicroRNA profiles research in colorectal cancer
WEN Shuxian, WEN Wangrong (1)
- The application of molecular pathological technology in the diagnosis and treatment of tumors
DONG He, SUN Qing (73)
- New progress and future direction of diagnostic research in hepatocellular carcinoma proteomics
PENG Zheng, DAI Shengming (145)
- How to build networks on the way of translational medicine about new biomarkers for diagnosis
XU Weiwen (217)
- Review on the development of chemiluminescence immunoassay
LU Longfei, GE Shengxiang, ZHANG Jun (289)
- Recent advances of liquid biopsy and its application in medical oncology
CHEN Ying, ZHU Minghua (361)

ORIGINAL ARTICLES

- The genetic polymorphism of rs7050168G/A CD40 ligand gene in Guangxi Zhuang and Han populations
WU Chengjiang, CHEN Jianming, LAN Yan, LUO Hongcheng, XIANG Yang, WANG Chunfang, WEI Yesheng (9)
- Analysis of dengue infection among 455 seasonal fever clients
ZHONG Zhicheng, MA Danjuan, WANG Anshi, LI Yi, DU Qianyi, ZHAO Wei, HE Tianwen (14)
- Analysis of polymorphism of D2S1338 and D19S433 loci in Han population in northwest Hubei province
WANG Xiaoxun, LI Ruiming, CHEN Min, HE Jiao, YIN Xia, HU Qiaolin, MEI Jun, WU Huichao (18)
- The comparing of EGFR gene mutation and amplification and its relationship with the serum CEA in non-small cell lung cancer
HUANG Yujun, YUAN Runqiang, CHEN Yingzhi, YUAN Xiaoling, MIAO Zhoufeng, ZHUANG Chuxuan (22)
- Analysis and prenatal diagnosis of 5 families with $\delta\beta$ -thalassemia
DU Li, QIN Danqing, WANG Jicheng, GUO Hao, YUAN Tenglong, WANG Yixia, ZHANG Yanxia, LIANG Juqing, LUO Mingyong, WU Jing (27)
- Gene copy number variation analysis of children with congenital heart disease by using multiplex ligation dependent probe method
LUO Shiqiang, YAN Tizhen, TANG Ning, HUANG Jiwei, LIAO Fengwen, LI Wugao, LI Zhetao, LIANG Biao (33)
- Association between advanced glycation end products and arterial stiffness in patients with coronary artery disease
GAO Jinxiong, PENG Haijun, YAN Bingcun, LIANG Bixia, LI Mingguang, SHI Yanke (38)
- Establishment of a new "convex dorsal" primer fluorescence PCR method to detect the mutation of N-ras
JIN Ting, FEI Zhengfang (44)
- 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 Qiuhua, 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)
- Application of bioinformatic analysis in 14-3-3zeta protein of *Echinococcus granulosus*
FU Ruijia, LV Gang, YIN Feifei, LIANG Pei (151)
- Investigation of HIV-1 drug resistance and gene subtype prevalence in man have sex with man in Guangdong province
YU Guolong, QIN Bing, YAN Xinge, DIAO Limei, LI Jie, ZHOU Pingping, YAN Jin, LI Yan, YANG Fang, LIN Peng (156)

Green florescence protein expression in various cells driven by different promoters among lentivirus	
ZHANG Ling, WENG Yunceng, ZHANG Yun, SHUAI Lifang, LI Tingting, WANG Wenjing, LI Hongwei, ZHAO Wei, LI Chengyao	(161)
EGFR downstream signal molecules in TIP30 knockout mice	
CHEN Fengsheng, CHEN Xiaohua, LI Aimin, ZHOU Jin, LUO Rongcheng	(166)
Clinical analysis of inhaled allergens in 579 children with allergic rhinitis in Guangzhou	
ZHANG Dawei, QIU Xiaoshan, HE Jianrong, LIU Li	(171)
Application research of Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis in the primary laboratory	
WANG Yixin, CHEN Xionghao, LIN Huiling, JIANG Ying	(176)
A clinical research on tooth loss and the prognosis of acute ischemic stroke	
TANG Aiqun, ZHU Jinhua, ZHU Feiqi	(180)
Sequence bioinformatics analysis and gene cloning of annexinB8 from <i>Spirometra mansoni</i>	
LIANG Pei, LV Gang, ZHOU Xiaojun, CHEN Xinxin, CHEN Xiaojing, FU Ruijia	(185)
Research on different distributions of MeDIP-Seq reads in chromosomes of nasopharyngeal carcinoma cells	
LIN Weida, WANG Donghui, LUO Haidan, SU Bojin, ZHAO Cunyou, YANG Huiling	(222)
Optimization of extraction technology from <i>Clausena lansium</i> leaves by response surface and their antioxidant activity study	
SU Zhipeng, KONG Fansheng, FANG Yuhong, YANG Miaoting, LIU Xin, CHEN Zedan	(227)
Bibliometrics analysis of clinical research literature on lung cancer predisposing genes from 2004 to 2013	
ZOU Jianjun, SU Shan, ZHANG Xianlan, HAUNG Huiyi, CEN Wenchang	(236)
Expression of E2 and E6/E7 of human papillomavirus-52 and its significance in cervical lesions	
LI Yuejun, ZHOU Miaoji, QIU Feng	(241)
Study on the homology of <i>Acinetobacter baumannii</i> by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction	
WEN Haifeng, QIN Jin, YU Wenjing, FENG Yanrui, FENG Zhongjun	(247)
Analysis on influenza surveillance in sentinel hospitals in Chaozhou from 2009 to 2014	
SU Xueluan, XIE Bizhu, CHEN Aimiao, ZENG Shuquan, LIU Jie, LIN Songyan, YANG Huitian, LIN Min	(253)
Epidemiological study of relationship between metabolic syndrome and cancers	
ZHAO Siwen, WU Junjie, FENG Chuo, ZHANG Xiaoming	(257)
The analysis of serum carcinoembryonic in neuroendocrine differentiation of lung adenocarcinoma	
HUANG Yujun, YUAN Runqiang, CHEN Yingzhi, YUAN Xiaoling, MIAO Zhuofeng, ZHUANG Chuxuan	(261)
Development of detection kit for T cell infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer	
CHEN Luying, LIN Haijun, WENG Zuxing, XU Feihai, GE Shengxiang, ZHANG Jun	(296)
Development of chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate	
HUANG Mingcong, ZHANG Xiaoli, LIN Guanghua, WENG Zuxing, SUN Xudong, GE Shengxiang, ZHANG Jun	(302)
Establishment and performance evaluation of the quantitative detection for myoglobin based on chemiluminescent immunoassay	
WANG Nan, PENG Bo, LI Ji, TANG Liangliang	(306)
Establishment and performance evaluation of the quantitative detection for insulin based on chemiluminescent immunoassay	
CHEN Chao, PENG Bo, LI Ji	(313)
The clinic research of the carcinoembryonic antigen (CEA) quantitative diagnostic kit by chemiluminescent immunoassay (CLIA)	
LIANG Liping, LI Zhixiong, DONG Zhining, LI Ming, WU Yingsong	(318)
The verification of the performance of total prostate specific antigen(tPSA) quantitative diagnostic kit (chemiluminescent immunoassay)	
FANG Wanxian, LI Zhixiong, DONG Zhining, LI Ming, WU Yingsong	(323)
Research on magnetism particulate immuno chemistry luminescence method for limit of detection and functional sensitivity of four items of liver fibrosis	
WANG Xinling, LI Zhongxin, GUAN Xue, QU Hai	(328)
Process comparison of conjugating alkaline phosphatase with anti-human chorionic gonadotropin antibody	
DU Ye, LI Ji, PENG Bo	(333)
The research of free thyroxine linearity and recovery experiment	
SUN Zhenyi, PAN Jie, PENG Bo	(341)
Reference values survey for serum ferritin in shanghai health adults	
JIANG Sheng, PENG Bo, LI Ji	(347)
The genetic polymorphism of TGF- β 1 gene rs1800469C/T in Guangxi populations	
HUANG Huatuo, LUO Hongcheng, XIANG Yang, CHEN Jianming, WU Chengjiang, WEI Yesheng	(367)
Effect of NLR and PLR from pre-treatment on the prognosis of patients with cervical squamous cell carcinoma	
GUO Xu, XIE Hongzhe, KE Zufu	(372)
Clinical application values of a combinational detection of serum adiponectin, TNF- α , CRP in patients with sepsis	
FAN Bing, XU Shun	(383)
The study of transplantation of c-Kit ⁺ Lin ⁻ cell for treatment of acute liver injure	
ZHANG Shouhua, YANG Shenhua, YANG Wenping, XU Hongyan, LEI Jun, HUANG Hui, LIU Zhiqiang, TAO Qiang	(387)

The relationship study between the down expression of NDRG1 and E-cadherin with lymphonode metastasis in gastric cancer
LIAO Aihui, LIU Zhan, LEI Zhisheng (392)

Analysis of microelement levels in pregnant woman with thalassemia in Guangdong area
LAN Feifei, LIANG Kailing, DU Li, YIN Aihua (397)

Analysis of the laboratory diagnosis results of hand-foot-mouth disease in 2014 in Liuzhou city
XU Zehui, LUO Shiqiang, WANG Jingren, CAI Pengfei, QIN Xiao, TANG Ning (401)

The genetic polymorphism of 20 STR loci in Uygur population of Yili of Xinjiang
GAO Bo, QIU Pingming (407)

Study on the association of esophageal motility change and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis
QIU Caiyu (412)

Discussion on determination of 5 kinds of tetracyclines residues in honey by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry
LIU Zhaofeng, ZHONG Qisheng (416)

REVIEWS

EML4-ALK fusion gene: a novel target for non-small cell lung cancer
ZHENG Qiuqing, MAO Weimin, XIE Fajun (50)

MicroRNA and pulmonary arterial hypertension
LIAO Ying, LI Weiguo, FANG Yong, CHEN Liling, CHEN Kaihong (55)

The detection methods and applications of circulating tumour DNA in peripheral blood
YANG Chao, CHENG Changming, YANG Huimin, QIU Geng (60)

Research status of circulating mitochondrial DNA in tumor
JIN Tao, XIN Yijuan (68)

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)

Adeno-associated virus (AAV)-based vector: a bridge towards tumor gene therapy
CHEN Xiusheng, LIN Chuangzhen, LEI Chuan, QU Xiangming, NIE Xin, HU Ao, CHEN Si, DU Hongyan (193)

The overview of warfarin related gene mutation detection technologies
SUN Xue, KUANG Yun, YANG Xiding, GUO Chengxian, YANG Guoping (199)

The suppressor of cytokine signaling and immunoregulation
HUANG Yuanlan, YAN Wei, FU Zhaoqiang, DENG Anmei (205)

The preparation of real-time fluorescent quantitative PCR detection of serum/plasma microRNAs before clinical application
DENG Kaifeng, DAI Shengming (211)

Nucleic acid aptamers and its application in diagnosis and therapy of Alzheimer's diseases
KOU Zhewen, WANG Jiapeng, ZHANG Xingmei (266)

The relation between miR-451 and tumor
LI Sha, BAI Yuting (271)

Laboratory diagnosis of human leukocyte antigen B27
YANG Xiaopeng, HUI Lin (276)

Molecular biological detection of alpha-thalassemia
GUO Liuwei (281)

The progress of screening for congenital adrenal hyperplasia
LV Mengmeng, ZHU Yuhuang, ZHANG Yuefeng, FU Guangyu (351)

The development of detection methods for folic acid and Vitamin B₁₂
CHEN Weicai, LI Zhongxin, QU Hai, FU Guangyu (357)

The relationship between microRNA and prognosis of hepatitis B
ZHANG Xiuhua, WU Yuanyuan (422)

MicroRNA expression profiling and function in gastric cancer
SONG Yaqin, WEN Wangrong (427)

2015年第7卷作者索引(按汉语拼音字母顺序排列)

- Carlos Sala Ehapo(2):78
DUBEAU Louis(2):140
Maximo Miko Ondo Obono(2):78
Rocio Apicante Matesa(2):78
Urbano Monsuy Eyi(2):78
- B**
白育庭(4):271
- C**
蔡鹏飞(6):401
蔡妍(2):107
岑文昌(4):236
陈爱苗(4):253
陈超(5):313
陈逢生(3):166
陈建华(2):110
陈健明(1):9
(2):87
(6):367
陈江涛(2):78
陈开红(1):55
陈丽玲(1):55
陈鹭颖(5):296
陈敏(1):18
陈思(2):122
(3):193
陈伟才(5):357
陈小静(3):185
陈晓华(3):166
陈新新(3):185
陈雄豪(3):176
陈秀生(2):122
(3):193
陈颖(6):361
陈应智(1):22
(4):261
陈泽丹(4):227
程昌明(1):60
程龙飞(2):107
- D**
戴盛明(3):145
(3):211
邓安梅(3):205
邓开凤(3):211
刁丽梅(3):156
董贺(2):73
董志宁(5):318
(5):323
杜红延(2):122
(3):193
杜丽(1):27
(6):397
杜哲怡(1):14
杜晔(5):333
- F**
樊兵(6):383
方婉仙(5):323
方勇(1):55
方宇洪(4):227
费政芳(1):44
冯焯(4):257
冯彦蕊(4):247
冯忠军(4):247
- 符瑞佳(3):151
(3):185
付光宇(5):351
(5):357
付兆强(3):205
- G**
高波(6):407
高宏志(2):132
高锦雄(1):38
高旭年(4):286
葛安国(2):132
葛胜祥(5):289
(5):296
(5):302
古杰超(2):78
关学(5):328
郭成贤(3):199
郭浩(1):27
郭静(2):127
郭柳薇(4):281
郭煦(6):372
郭翼华(2):78
- H**
何建行(2):91
何建荣(3):171
何绮华(2):91
何天文(1):14
贺娟(1):18
胡奥(2):122
(3):193
胡巧林(1):18
胡伟鹏(2):132
黄华佗(6):367
黄惠怡(4):236
黄慧(6):387
黄际卫(1):33
黄明聪(5):302
黄宇筠(1):22
(4):261
黄元兰(3):205
惠玲(4):276
- J**
江生(5):347
蒋英(3):176
蒋远文(2):87
金涛(1):68
金霆(1):44
- K**
柯尊富(6):372
孔繁晟(4):227
寇哲文(4):266
况赞(3):199
- L**
兰菲菲(6):397
蓝艳(1):9
(2):127
(2):87
雷川(2):122
(3):193
雷俊(6):387
雷孝锋(4):286
雷志胜(6):392
- 黎诚耀(3):161
李爱民(3):166
李尔华(4):286
李红卫(3):161
李基(5):306
(5):313
(5):333
(5):347
李杰(3):156
李琳芸(2):103
李明(5):318
(5):323
李明光(1):38
李瑞明(1):18
李莎(4):271
李婷婷(3):161
李卫国(1):55
李伍高(1):33
李浩(3):156
李怡(1):14
李岳军(4):241
李云振(2):132
李哲涛(1):33
李志雄(5):318
(5):323
李忠信(5):328
(5):357
梁碧霞(1):38
梁彪(1):33
梁驹卿(1):27
梁凯玲(6):397
梁丽萍(5):318
梁培(3):151
(3):185
廖爱辉(6):392
廖凤文(1):33
廖颖(1):55
林创珍(2):122
(3):193
林光华(5):302
林海军(5):296
林惠玲(3):176
林敏(2):78
(2):83
(4):253
林鹏(3):156
林松炎(4):253
林伟达(4):222
刘杰(4):253
刘立(3):171
刘欣(4):227
刘影(2):140
刘展(6):392
刘兆峰(6):416
刘志强(6):387
陆龙飞(5):289
陆卫歆(2):107
罗海丹(4):222
罗宏成(1):9
(2):87
(6):367
罗荣城(3):166
罗世强(1):33
(6):401
骆明勇(1):27
吕刚(3):151
(3):185
- 吕萌萌(5):351
吕微风(2):114
- M**
马丹娟(1):14
马雯(2):114
毛伟敏(1):50
梅冰(2):103
梅俊(1):18
缪卓峰(1):22
(4):261
- N**
聂鑫(2):122
(3):193
P
潘洁(5):341
彭波(5):306
(5):313
(5):333
(5):341
(5):347
彭海军(1):38
彭长华(2):103
彭征(3):145
Q
秦兵(3):156
秦丹卿(1):27
秦瑾(4):247
丘小汕(3):171
邱彩玉(6):412
邱峰(4):241
邱耕(1):60
邱平明(6):407
渠海(5):328
(5):357
S
邵文龙(2):91
石延科(1):38
帅丽芳(3):161
宋雅琴(6):427
苏箔金(4):222
苏珊(4):236
苏雪莹(4):253
苏志鹏(4):227
孙青(2):73
孙旭东(5):302
孙雪(3):199
孙臻懿(5):341
T
覃肖(6):401
唐爱群(3):180
唐亮亮(5):306
唐宁(1):33
(2):97
(6):401
陶强(6):387
W
汪安石(1):14
王昌富(2):103
王春芳(1):9
王冬辉(4):222
王继成(1):27
王家鹏(4):266
王敬仁(6):401
王明席(2):132
王楠(5):306
王庆波(2):132
王秋华(2):97
王文敬(3):161
王晓勋(1):18
王新灵(5):328
王怡心(3):176
王奕霞(1):27
韦叶生(1):9
(2):87
(3):367
温淑娴(1):1
温旺荣(1):1
(6):427
闻海丰(4):247
翁云层(3):161
翁祖星(5):296
(5):302
吴成将(1):9
(2):87
(6):367
吴慧超(1):18
吴菁(1):27
吴君洁(4):257
吴英松(5):318
(5):323
吴园园(6):422
X
向阳(1):9
(2):87
(6):367
谢璧珠(4):253
谢东德(2):78
谢发君(1):50
谢洪哲(6):372
辛毅娟(1):68
胥顺(6):383
徐飞海(5):296
徐红艳(6):387
徐伟文(4):217
徐玉琴(2):110
许泽辉(2):97
(6):401
Y
鄢心革(3):156
闫伟(3):205
严炳存(1):38
严瑾(3):156
严提珍(1):33
(2):97
阳国平(3):199
阳喜定(3):199
(2):97
杨放(3):156
杨海虹(2):91
杨辉(2):78
(2):83
杨惠钿(2):78
(2):83
(4):253
杨惠玲(4):222
杨慧敏(1):60
杨晋辉(2):110
杨立业(2):78
(2):83
杨妙婷(4):227
杨慎华(6):387
杨文萍(6):387
杨霄鹏(4):276
杨勇(4):286
尹爱华(6):397
尹飞飞(3):151
尹霞(1):18
于国龙(3):156
于文静(4):247
袁润强(1):22
(4):261
袁腾龙(1):27
袁小玲(1):22
(4):261
岳亮(2):78
Z
曾树权(4):253
翟向明(2):122
翟向明(3):193
詹小芬(2):78
(2):83
张大威(3):171
张淡璇(2):107
张军(2):110
(5):289
(5):296
(5):302
张玲(3):161
张芹(2):83
张守华(6):387
张贤兰(4):236
张小明(4):257
张晓璐(5):302
张兴梅(4):266
张秀华(6):422
张亚雷(2):91
张艳霞(1):27
张跃峰(5):351
张云(3):161
章金灿(2):107
赵存友(4):222
赵思文(4):257
赵卫(1):14
(3):161
郑磊(2):114
郑秋青(1):50
钟启升(6):416
钟志成(1):14
周瑾(3):166
周露(2):83
周妙姬(4):241
周平平(3):156
周晓君(3):185
朱飞奇(3):180
朱瑾华(3):180
朱明华(6):361
朱宇皇(5):351
庄楚璇(1):22
(4):261
邹建军(4):236

2015年第7卷主题词索引(按汉语拼音字母顺序排列)

- 14-3-3zeta 蛋白(3):151
22q11 微缺失(1):33
Ang-(1-7)(2):122
annexin B8(3):185
CD40(1):9
(2):87
CYP2C9(3):199
C 反应蛋白(2):107
(6):383
E2(4):241
E6/E7(4):241
E-cadherin(6):392
ELISA(1):14
EML4-ALK(1):50
G6PD 缺乏症(2):83
Gene Xpert 检测(3):176
Hardy-Weinberg 平衡(1):18
HIV-1 耐药(3):156
microRNA(1):1
(2):114
MicroRNAs(3):211
miR-451(4):271
miRNA(6):422
(6):427
miRNAs(4):271
NDRG1(6):392
N-ras(1):44
NS1-IgM(1):14
PCR-DNA 测序(2):78
(2):83
RT-PCR(1):14
Sanger 测序法(1):44
SOCS(3):205
STR(1):18
TGF-β1(6):367
TIP30(3):166
VKORC1(3):199
α-地中海贫血(4):281
γ-干扰素定量检测(5):296
δβ 地中海贫血(1):27
- A**
阿尔茨海默病(4):266
癌胚抗原(1):22
(4):261
(5):318
- B**
靶向治疗(1):50
白细胞介素-21(2):127
斑点杂交(2):83
鲍曼不动杆菌(4):247
鼻咽癌(4):222
比奥科岛(2):78
标记(5):333
表皮生长因子受体(1):22
(3):166
病毒核酸(6):401
- C**
参考范围(5):313
参考值(5):347
产前诊断(1):27
产业链(4):217
肠杆菌科基因间重复序列-聚合酶链反应(4):247
超高效液相色谱-三重四极杆质谱(6):416
磁微粒化学发光法(5):328
重组慢病毒(3):161
- D**
大肠癌(1):1
傣族(2):83
代谢综合征(4):257
蛋白质组模式(3):145
蛋白质组学(3):145
登革热(1):14
等位基因频率(1):18
地中海贫血(6):397
电化学学生物传感器(2):114
定量试剂盒(5):302
动物模型(2):140
短串联重复序列(2):97
短串联重复序列(STR)(6):407
多功能(3):185
多态性(6):407
多重连接依赖性探针扩增(MLPA)(1):33
多重耐药性(4):247
多组分检测(5):289
- E**
厄洛替尼(2):91
- F**
发病机制(1):55
法医遗传学(6):407
反流性食管炎(6):412
防控措施(6):401
非侵入式检测(6):361
非小细胞肺癌(1):22
非小细胞肺癌(1):50
肺癌(4):236
肺动脉高压(1):55
肺腺癌(2):91
肺腺癌(4):261
肺炎支原体(2):107
分子病理学技术(2):73
分子机制(4):281
分子检测(6):361
分子生物学标志物(2):140
分子诊断(5):351
(6):427
蜂蜜(6):416
辐射抗拒(4):222
- G**
改良 rankin 评分(3):180
肝干细胞(6):387
肝细胞癌(3):145
肝纤维化(5):328
高分辨率熔解曲线分析(2):78
高效逆转录病毒治疗(3):156
高血压(1):38
个体化用药(2):103
功能(3):151
功能性敏感(5):328
宫颈癌(4):241
宫颈鳞癌(6):372
骨髓 c-Kit+lin- 细胞(6):387
固有免疫(3):205
冠心病(1):38
过碘酸钠(5):333
- 过敏性鼻炎(3):171
- H**
核酸适配子(4):266
华法林(3):199
化学发光(5):296
(5):333
化学发光法(5):347
(5):357
化学发光免疫分析(5):289
(5):306
化学发光免疫分析法(5):313
(5):318
(5):323
化学发光微粒子免疫法(5):302
患病风险基因(4):236
黄皮叶(4):227
回收(5):341
- J**
肌红蛋白(5):306
基因多态性(1):9
(2):127
(2):87
(6):367
基因检测(2):132
基因拷贝数变异(CNV)(1):33
基因突变(2):83
基因突变分析(1):60
基因突变检测(3):199
基因诊断(1):27
(4):281
基因治疗(3):193
急性肝损伤(6):387
急性心肌梗死(5):306
急性乙型肝炎(6):422
疾病标志物(4):217
甲基化(4):222
甲胎球蛋白(AFP)(2):110
间充质干细胞(MSC)(2):110
检测(4):253
检测分析(5):357
检出限(5):328
碱性磷酸酶(5):333
结构(3):151
结核分枝杆菌(3):176
结核感染 T 细胞(5):296
- K**
抗生素耐药(2):132
抗氧化活性(4):227
拷贝数(1):68
空白限(5):328
扩增(1):22
- L**
利福平(3):176
镰刀形红细胞病(2):78
量子点(5):289
量子点(5):357
临床分析(3):171
临床研究(5):318
流动注射分析(5):289
流感病毒(4):253
流行病学调查(4):257
流行特征(6):401
流行性感冒(4):253
- 硫酸脱氢表雄酮(5):602
卵巢上皮癌(2):140
绿色荧光蛋白(3):161
- M**
脉搏波传导速度(1):38
曼氏迭宫绦虫(3):185
慢性乙型肝炎(6):422
敏感度与特异性(3):176
- N**
男男性行为(3):156
脑转移瘤(2):91
腺癌(6):383
- P**
培美曲塞(2):91
皮肤点刺试验(3):171
- Q**
强直性脊柱炎(4):276
全自动化学发光法(5):341
缺血性卒中(3):180
- R**
人类细胞抗原 B27(4):276
人乳头瘤病毒 52 型(HPV52 型)(4):241
乳腺癌(3):166
- S**
三带型等位基因(2):97
筛查(5):351
神经内分泌分化(4):261
生物标志物(2):114
生物信息学(3):151
生物信息学分析(3):185
实时荧光定量 PCR(3):211
实验室诊断(4):276
食管测压(6):412
食管运动异常(6):412
嗜肺军团菌(2):107
手足口病(6):401
四环素类抗生素(6):416
溯源性(5):313
- T**
糖基化终产物(1):38
糖皮质激素(2):103
提取(4):227
铁蛋白(5):347
同源性(4):247
统计分析(1):18
突变(1):22
突变(1):68
“凸背”引物荧光 PCR 新技术(1):44
- W**
外周血(1):60
微量元素(6):397
微流控芯片(5):289
微小 RNA(1):55
维生素 B12(5):357
维吾尔族(6):407
胃癌(6):392
胃癌(6):427
- 文献计量学(4):236
无病生存率(6):372
- X**
吸入过敏原(3):171
稀释(5):341
系统性红斑狼疮(2):127
细粒棘球绦虫(3):151
先天性肾上腺皮质增生症(5):351
先天性心脏病(CHD)(1):33
腺相关病毒(3):193
响应面分析法(4):227
新生儿(5):351
性能验证(5):323
血常规参数(2):107
血清/血浆(3):211
血清学(5):328
血清脂联素(6):383
血小板与淋巴细胞比(PLR)(6):372
循环线粒体 DNA(1):68
循环肿瘤 DNA(1):60
- Y**
牙齿缺失(3):180
炎症(3):205
研究(4):271
研究进展(3):193
叶酸(5):357
液态活检(6):361
胰岛素(5):313
移植(2):110
遗传多态性(2):97
抑制(2):122
荧光定量 PCR(6):392
应用(3):193
(4):281
幽门螺杆菌(2):132
(6):412
游离甲状腺素(5):341
预后(3):180
孕妇(6):397
- Z**
早期诊断(1):1
指数级富集配体系进化(4):266
质谱(2):103
治疗靶点(2):122
中性粒细胞与淋巴细胞比(NLR)(6):372
肿瘤(1):68
(1):60
(2):122
(4):257
(4):271
肿瘤标志物(3):145
肿瘤细胞坏死因子 α(6):383
肿瘤诊治(2):73
种族(1):9
(2):87
(6):367
转化(4):217
总黄酮(4):227
总前列腺特异性抗原(tPSA)(5):323
总生存率(6):372

广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室

广东省妇幼代谢与遗传病医学重点实验室位于广州市番禺区兴南大道 521 号，以广东省妇幼保健院（广东省儿童医院、广东省妇产医院）为主体，成立于 1981 年。该实验室于 1994 年成为集遗传咨询门诊与遗传实验室为一体的产前诊断中心。经过多年发展建设，2005 年成为卫生部指定全国产前诊断技术师资和骨干培训中心；2007 年成为卫生部产前筛查与诊断质量控制中心；2009 年被评为广东省妇幼安康工程产前诊断技术指导中心；2011 年成为广东省地中海贫血诊断中心；2012 年被广东省卫生厅评为广东省“十二五”医学重点实验室，同年成立无创产前基因检测实验室；2013 年拓展为医学遗传中心实验室，同年与哈佛医学院附属儿童医院遗传中心成立联合实验室；2014 年成为婴幼儿 HIV 早期诊断区域中心实验室；2015 年获批为全国首批遗传咨询住院医师规范化培训基地以及成为广东省出生缺陷防治与干预中心。该实验室是广东省医学重点实验室，广东省妇幼保健院重点学科，广东省“九五”期间的“五个一”重点专科，中国疾病预防控制中心妇幼保健中心的产前诊断重点专科，首批卫生部产前诊断技术及师资培训基地及广东省产前诊断技术指导中心。系广州医科大学产前诊断专业方向的硕士学位培养点、暨南大学产前诊断专业方向硕士、博士学位培养点。拥有一支 105 人优秀的医学遗传专业团队，35 岁以下占 83.7%，硕士以上占 40.0%。大部分人员都曾到国内外进修学习，其中博士生导师 1 名，硕士生导师 2 人，高级职称 15 人，博士 12 人，硕士 30 人，拥有十多名能承担临床、遗传检测、超声检查的复合型人才。实验室功能齐全，设有细胞遗传室、生化遗传室、分子遗传室、地中海贫血筛查和基因诊断实验室、临床基因扩增检验实验室、转化医学和生物样本库等多个功能实验室。拥有一代测序仪、高通量测序仪、液相芯片系统、固相芯片系统、芯片杂交系统、毛细管电泳仪，高效液相色谱仪、凝胶图像分析仪、荧光及多功能显微镜、荧光定量 PCR 仪、温度梯度 PCR、自动工作站系统、超低温冰箱等大型设备，仪器设备总值约 5000 万元。能为患者提供各种完备的遗传病诊断技术，罕见病的产前诊断和生育指导，各项技术均在国内居于领先水平。

该实验室以降低出生缺陷，提高人口素质为目标，致力于遗传病诊断和产前诊断。2004 年以来承担国家“863”子项目、国家自然科学基金、广东省自然科学基金、广东省科技计划项目、广州市科技计划项目及广州市重大专项等研究课题近 20 项，其中国家自然科学基金 1 项、国家“863”子项目 1 项、广东省自然科学基金 1 项和广州市协同创新重大专项 1 项（立项资助 360 万）。获国家发明专利 5 项、计算机软件著作权 1 项。发表相关论文近 200 篇，其中 SCI 收录 20 余篇（包括“Nat. Commun.”“EBioMedicine”“Proc Natl Acad Sci”“PLOS one”“Am J Hematol”“Molecular Cytogenetics”“BMC Medical Genomics”“Modern Pathology”等）。

学科带头人尹爱华长期从事出生缺陷的防治临床和科研工作，在分子遗传病产前诊断和无创产前诊断有较深的学术造诣，为出生缺陷防治作出了突出的贡献。



院士在我们身边（院士论坛大合照）



科室徒步大合照

→ 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