



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2018年11月 第10卷 第6期 总第58期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 10 Number 6 November 2018



A: CT标准曲线; B: HSV-2标准曲线; C: HPV16型标准曲线。1:10⁷拷贝/μL; 2:10⁶拷贝/μL; 3:10⁵拷贝/μL; 4:10⁴拷贝/μL。

图(P388) 3种病原体质粒标准曲线

Figure(P388) Standard curve of 3 kinds of pathogen plasmids

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库CMCC收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库CMCI收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



9 771674 692099



分子诊断与治疗杂志

二〇一八年十一月

第十卷 第六期

中山大学

肖 昕



1962年12月出生。1997年毕业于德国柏林自由大学,获医学博士学位。

教授,主任医师,博士生导师,广东省医学领军人才,中山大学“百人计划”引进人才。现任中山大学附属第六医院儿科主任,遗传代谢病实验

室主任。担任中国医师协会新生儿专业委员会内分泌及遗传代谢病专业委员会副主任委员,海峡两岸医药卫生交流协会理事兼新生儿专业委员会副主任委员,广东省医师协会儿科专业委员会副主任委员,广东省健康管理学会儿科学及青少年健康管理专业委员会副主任委员,广东省优生优育学会小儿早期发育专业委员会副主任委员,广东省医学会围产医学分会副主任委员兼遗传代谢病学组组长,广东省医学会新生儿分会常委兼遗传代谢病学组组长。担任《Journal of Pediatric Infectious Diseases》《中华围产医学杂志》《中华实用临床儿科杂志》《中华新生儿科杂志》《中国小儿急救医学》《中国当代儿科杂志》和《广东医学》等杂志编委,国家和广东省自然科学基金项目评审专家,广东省和广州市医疗事故专家鉴定委员会委员。

从事儿科临床工作近30年,致力于研究小儿遗传代谢性疾病及新生儿疾病的诊断与治疗。在国内较早开展新生儿重症监护、新生儿窒息复苏、新生儿机械通气、新生儿全肠道外营养及遗传代谢性疾病等诊疗技术。主持美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)国际合作项目1项、国家自然科学基金4项、教育部回国博士研究基金1项、广东省自然科学基金5项和广州市重大创新项目1项等。主编《新生儿机械通气治疗学》(人民卫生出版社)、《新生儿危重症监护治疗学》(江西科技出版社)和《实用儿童重症医学》(人民卫生出版社)等学术著作,参编《实用新生儿学》(人民卫生出版社)、教育部普通高等教育“十二五”规划教材《儿科学》和《儿科门急诊手册》(江西科技出版社)等学术著作,并主笔育儿科普读物《育婴宝典-从出生到周岁》和《新生儿婴儿护理手册》。

在国内外期刊发表论文120余篇,其中SCI收录论文12篇。曾以第一作者于《中国新生儿科杂志》《中国小儿急救医学》以及《中华微生物学和免疫学杂志》等杂志分别发表《质谱技术在小儿遗传性代谢病筛查中的应用》《有机酸血(尿)症及其临床处理》和《不同胎龄新生儿免疫球蛋白重链基因CDR3序列特征》等优秀论文。培养博士4名,硕士60余名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2018年11月 第10卷 第6期 总第58期 Bimonthly Volume 10 Number 6 November 2018

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	来茂德 申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 叶萍萍 李彩珍
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290177 32290789-206
传真	(020) 32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
广告经营许可证	粤工商广字第01139号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2018年11月18日
定价	RMB 15.00元
Responsible Institution	<i>Sun Yat-sen University</i>
Sponsor	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Organizer	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
Consultant	<i>LAI Maode SHEN Ziyu</i>
Editor in Chief	<i>LI Ming</i>
Managing Director	<i>JIANG Xiwen</i>
Associate Editor	<i>LIU Yue</i>
Editorial Office	<i><JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office</i>
Editors	<i>LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen</i>
Editing	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
Add	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
Tel	<i>(020) 32290177 32290789-206</i>
Fax	<i>(020) 32290177</i>
E-mail	<i>jmdt@vip.163.com</i>
CSSN	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
Printing	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
Publish Date	<i>2018.11.18</i>
Price	<i>RMB 15.00</i>

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2018年11月 第10卷 第6期

目次

述评

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用 朱娟娟 唐吉斌(361)

论著

人乳头状瘤病毒少见亚型在宫颈病变患者分布状况的研究 李娇 李娜 赵静妮 等(367)

脊髓背角 NMDA 受体 NR2B 亚基对舒芬太尼耐受形成的影响研究
..... 郑孝振 毛珊珊 任益锋 等(372)

非小细胞肺癌 *EGFR*、*ALK* 和 *ROS1* 基因联合检测及突变共存分析
..... 李晓锋 张冠军 汪园园 等(378)

沙眼衣原体、单纯疱疹病毒 2 型、人乳头瘤病毒 16 型多重荧光定量 PCR 检测方法的
建立及其应用 胡天 卓永光 樊祖茜 等(385)

HAART 过程 HIV/AIDS 患者 PBMC 中 HIV-1 前病毒 DNA 的动态变化及其意义
..... 陈伟烈 何瑞英 雷华丽 等(390)

吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者 CD8⁺T 细胞的影响 刁鑫 兀威 张进召(395)

联合检测抗苗勒管激素和性激素对卵巢储备功能评估的临床价值
..... 郑建波 李艳 夏尊恩(400)

胰岛素样生长因子 1 基因多态性与多囊卵巢综合征相关性研究 马龙飞 李娟 冯赓(406)

尿酸联合糖化血红蛋白早期检测对高龄孕妇妊娠期糖尿病发病的预测
..... 李华 殷红梅 李英(411)

前列地尔联合左卡尼汀对 ESDN 患者肾功能、炎症因子的影响 李昌艳 刘娟 顾芳 等(417)

黑豆汁制何首乌中大豆苷元含量测定 邓青 李霓冰(422)

综述

手足口病实验室检测方法的研究进展 欧晓燕 许彬(428)

专家风采

肖昕 (封二)

实验室巡礼

中山大学附属第六医院遗传代谢病实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 6 November 2018

CONTENTS

COMMENTS

Clinical application of polymorphism analysis in the methylenetetrahydrofolate reductase gene

ZHU Juanjuan, TANG Jibin (361)

ORIGINAL ARTICLES

Study on the distribution of rare human papillomavirus subtypes in patients with cervical lesions

LI Jiao, LI Na, ZHAO Jingni, LI Yanqing, ZHAO Siyu, LIU Yufeng, LI Yuwei, NIU Jing, WANG Yawen (367)

Effect of NMDA receptor NR2B subunit on the tolerance of sufentanil in spinal dorsal horn

ZHENG Xiaozhen, MAO Shanshan, REN Yifeng, HAN Xiaodi, SONG Junjie (372)

Combined detection and coexistent genetic mutation analysis of *EGFR*, *ALK* and *ROS1* in
non-small cell lung cancer

LI Xiaofeng, ZHANG Guanjin, WANG Yuanyuan, YANG Zhe, LIU Xi (378)

Application of multiplex fluorescence quantitative PCR assay for detection of Chlamydia trachomatis,
herpes simplex virus type 2 and human papillomavirus type 16

HU Tian, ZHUO Yongguang, FAN Zuqian, HUANG Yongxia (385)

Dynamic change of HIV-1 proviral DNA in PBMC from HIV/AIDS patients during highly active antiretroviral
therapy and its significance

CHEN Weilie, HE Ruiying, LEI Huali, YUAN Xiaozhen, HU Fengyu, LI Linghua (390)

Effect of smoking on CD8⁺ T cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease

DIAO Xin, WU Wei, ZHANG Jinzhao (395)

Clinical significance of combined detection of anti-mullerian hormone and sex hormone on ovarian reserve function

ZHENG Jianbo, LI Yan, XIA Zunen (400)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 6 November 2018

CONTENTS

- Association between insulin-like growth factor 1 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome
MA Longfei, LI Juan, FENG Geng (406)
- Early detection of uric acid combined with glycosylated hemoglobin for predicting the incidence of gestational diabetes in elderly pregnant women
LI Hua, YIN Hongmei, LI Ying (411)
- Effects of alprostadil combined with levocarnitine on renal function and inflammatory factors in patients with ESDN
LI Changyan, LIU Juan, GU Fang, XIONG Chaolei (417)
- Study on the content of Daidzein in Polygonum multiflorum Thunb with black bean juice
DENG Qing, LI Nibing (422)

REVIEWS

- Research advances of laboratory detection methods for hand, foot and mouth disease
OU Xiaoyan, XU Bin (428)

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用

朱娟娟 唐吉斌*

[摘要] 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢与同型半胱氨酸代谢中的关键酶。该酶具有多种基因多态性,目前最具有临床意义的2个多态性位点分别是 *MTHFR* C677T 和 *MTHFR* A1298C,可影响酶的活性,造成高同型半胱氨酸血症、核酸合成和甲基化异常,目前多数研究提示,这2个位点多态性可能与心血管疾病、出生缺陷、肿瘤等多种疾病相关。本文对 *MTHFR* 基因多态性的分布特点及其与疾病的关系进行述评,以期对疾病的个体化预防和治疗提供一定的指导意义。

[关键词] 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶;单核苷酸多态性; *MTHFR* C677T; *MTHFR* A1298C

Clinical application of polymorphism analysis in the methylenetetrahydrofolate reductase gene

ZHU Juanjuan, TANG Jibin*

(Clinical Laboratory Center of Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui, China, 244002)

[ABSTRACT] 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme in folic acid metabolism and homocysteine metabolism. MTHFR has a variety of gene polymorphisms. Two of the most clinically significant polymorphic loci are *MTHFR* C677T and *MTHFR* A1298C, which can affect the activity of enzymes, resulting in hyperhomocysteinemia, nucleic acid synthesis and methylation. Most studies suggest that these 2 polymorphisms may be associated with cardiovascular diseases, birth defects, tumors and other diseases. In this article, the distribution characteristics of the *MTHFR* gene polymorphism and its relationship with diseases will be reviews, which has a certain guiding significance for individualized prevention and treatment of diseases.

[KEY WORDS] 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; Single nucleotide polymorphisms; *MTHFR* C677T; *MTHFR* A1298C

5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)是叶酸代谢与同型半胱氨酸代谢中的关键酶^[1],催化5,10-亚甲基四氢叶酸转化为5-甲基四氢叶酸。5-甲基四氢叶酸一方面可作为细胞内甲基的供体,在甲硫氨酸合酶和维生素B12的催化下,使血中同型半胱氨酸发生甲基化,生成甲硫氨酸,从而维持了血中同型半胱氨酸的水平;另一方面还可作为一

碳单位的供体,参与体内嘌呤、嘧啶的合成及DNA、RNA、蛋白质的甲基化。*MTHFR*基因发生突变会导致MTHFR酶活性下降,引起高同型半胱氨酸血症、核酸合成和甲基化的异常,进而导致多种疾病的发生^[2]。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指在基因组水平上由单个核苷酸的突变所引起的DNA序列多态性。SNP是人

基金项目:铜陵市科技局计划项目(2017NS22)

作者单位:安徽省铜陵市人民医院检验科,安徽,铜陵 244002

*通讯作者:唐吉斌, E-mail: jibin158@163.com

类可遗传的变异中最常见的一种,在人类基因组中广泛存在,其检测易于自动化和批量化,已被认为是近年来最有发展潜力的第三代分子标记^[3]。研究 SNP 所揭示的人种、人群和个体之间 DNA 序列的差异以及这些差异所表现的意义将对疾病的诊断、治疗和预防具有重要的指导意义。

MTHFR 基因位于 1 号染色体短臂末端 (1p36.3),该基因有多种突变类型,至今已发现有近 30 个 SNP 位点,其中最具有临床意义的 2 个多态性位点分别是 677 位的 C/T 多态和 1298 位的 A/C 多态,这 2 个位点的多态性与酶活性及热稳定性密切相关,已有研究报道^[4-6]这 2 个多态性位点的分布在世界不同种族及地区有明显不同,中国地区也有相关研究报道^[7-9]。为了明确 *MTHFR* C677T 和 A1298C 基因多态性检测的临床价值,本文对这 2 个多态性位点在不同人群的分布情况及其相关疾病进行述评,以期对疾病的预防、诊断和治疗提供依据。

1 *MTHFR* C677T 基因多态性在不同人群中的分布

MTHFR C677T 基因多态性是第 677 位的点突变,是目前发现的最常见的突变位点,该位点的碱基胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)置换,从而使编码的丙氨酸被缬氨酸替代,这种功能性的突变直接影响 *MTHFR* 酶的活性和耐热性,表现为不同程度的酶活性和耐热性降低^[1]。该位点的突变产生了 3 种基因型,野生型 CC,杂合突变型 CT,纯合突变型 TT,其中 CT 型的酶活性是 CC 型的 65%,TT 型的活性仅为 CC 型的 30%。加热 5 min 后,TT 型酶活性为 22%,CT 型酶活性为 56%,CC 型作为对照组剩余酶活性为 67%^[10]。

研究表明 *MTHFR* 基因 C677T 位点突变频率在不同国家、同一国家的不同地区和不同种族的分布是有显著差异的,在欧洲和北美 *MTHFR* C677T 等位基因的频率要比非洲和东亚高^[11];中国汉族人群 C677T 的突变频率为 40%,高于大多数国家^[8]。*MTHFR* C677T 等位基因分布在中国呈现一定地理梯度:①突变频率随着纬度的增加先增加再减少,TT 基因型频率在南方地区为 6.6%,中部地区为 14.2%,北部地区为 21.3%,最北部

地区为 15%;②突变频率随着经度的增加也是先增加再减少,TT 基因型频率在西方地区为 11.1%,中部地区为 20.5%,北部地区为 14%^[11]。在我国不同种族间,该突变位点的分布也有差异。在中国汉族中,C677T 等位基因的频率在海南最低(24%),其次是湖北(40.3%)和江苏(43.5%),在山东(63.1%)观察到最高频率^[12]。

2 *MTHFR* C677T 基因多态性检测的临床意义

2.1 *MTHFR* C677T 基因多态性与心血管疾病的关系

MTHFR 酶活性的明显下降使血中同型半胱氨酸水平升高,同型半胱氨酸可损伤血管内皮细胞,刺激血管平滑肌细胞增生,破坏机体凝血和纤溶系统,导致早期动脉粥样硬化形成,增加了冠心病、脑梗死、高血压等心脑血管病的发生风险,目前高同型半胱氨酸血症已被认为是独立于高血脂症、高血压、糖尿病、吸烟和年龄之外,引发动脉硬化性血管疾病的一个独立的危险因素。已有全基因组关联研究(genome wide association study, GWASS)证实了健康人群中 *MTHFR* C677T 基因型与同型半胱氨酸水平之间具有相关性^[13],是引起高同型半胱氨酸的主要遗传因素^[14]。

很多研究表明 *MTHFR* C677T 基因多态性与心脑血管疾病相关,Zhu 等人^[15]对 2014 年 8 月前关于中国人群 *MTHFR* C677T 多态性和缺血性脑卒中关系的 20 项研究进展进行了总结,认为 TT 型突变可能是缺血性脑梗死发病的风险因子;也有报道指出 *MTHFR* C677T 多态性与静脉血栓症(venous thromboembolism, VTE)有关,该报道对 10 篇文献进行了分析,内容包括 VTE 患者 938 例,正常人对照 1 157 例,结果显示 *MTHFR* 677 突变基因 T 可使 VTE 发病风险增加^[16];一项涉及了从 1997 到 2017 年世界范围内的 71 项关于 *MTHFR* C677T 多态性和妊高症相关性的荟萃分析表明,*MTHFR* C677T 的等位 TT 基因是妊高症的风险因子,空气污染和 *MTHFR* C677T 基因多态性相互作用可以提高女性对妊高症的易感性^[17]。针对不同地区人群 *MTHFR* 相关位点基因进行筛查,对有基因突变的人群进行重点关注,有助于相关疾病的预防和

治疗,针对存在高同型半胱氨酸血症的 *MTHFR* C677T 位点 CT、TT 基因型高血压患者,给予依那普利配合叶酸进行降压治疗,可显著降低首发脑卒中风险^[18]。

2.2 *MTHFR* C677T 基因多态性与糖尿病的关系

MTHFR C677T 基因多态性与糖尿病的相关性也引起了人们的关注,但目前的研究还有不一致的情况,有研究比较了阿拉伯联合酋长国内 169 例 II 型糖尿病患者和 209 例健康对照的 *MTHFR* C677T 基因多态性的差异,发现并无明显差异,但 C677T 多态性与脑血管意外病史、肾病史和 LDL 胆固醇水平有显著相关性^[19];我国有研究者选取黑龙江省佳木斯地区汉族人群血液样本 350 例,其中 II 型糖尿病患者 200 例及健康体检者 150 例,应用直接测序法对 C677T 位点多态性进行检测,分析不同基因型与 II 型糖尿病以及 2 种降糖药物疗效之间相关性,发现黑龙江省东部地区汉族 II 型糖尿病人群 *MTHFR* C677T 基因突变频率显著增加,且携带 T 等位基因的 CT/TT 患者用二甲双胍餐后 2 h 血糖、糖化血红蛋白等与治疗前比较显著下降,提示 T 等位基因与二甲双胍降糖疗效有显著相关性^[20]。值得注意的是,更多的研究表明 *MTHFR* C677T 基因突变型的糖尿病患者发生血管并发症的可能性增大,如在中国进行了一项包括了 13 项关于中国人群 *MTHFR* C677T 多态性与糖尿病和糖尿病肾病关系的研究,得出结论是 *MTHFR* C677T 等位基因可能是糖尿病肾病而不是糖尿病的风险因子^[21]。

2.3 *MTHFR* C677T 多态性与出生缺陷的关系

MTHFR 基因相关位点的突变会导致 *MTHFR* 酶活力的下降,使同型半胱氨酸浓度升高,可能会导致妊娠女性血液呈高凝状态及妊高症,造成母胎循环不足,与此同时,该酶活性下降也影响叶酸代谢利用,导致了嘌呤、嘧啶和核酸的代谢及 DNA 的甲基化受影响,这些都是引起流产或使胎儿生长受限等的原因。

目前的研究也支持 *MTHFR* C677T 多态性与出生缺陷相关,韩国学者认为在韩国女性 *MTHFR* C677T 基因多态性与早产发生显著相关^[5];也有研究认为母亲 *MTHFR* 基因突变与生育人类神经管畸形患儿有相关性,一项对 42 篇文献(4 374 例患者,7 232 例对照)进行荟萃分析的研究表明 *MTH-*

FR 基因第 677 位点中的 C/C 可能为先天神经管缺陷的保护基因^[22];Nauman 等人^[23]的研究提供了进一步的证据表明,母体叶酸缺乏和 *MTHFR* C677T 基因多态性可能与后代的神经管缺陷(neural tube defects, NTD)风险增加有关;在中国也有相关报道,有研究采用病例对照研究的方法,以 549 例正常妇女(对照组)及 300 例有不良孕产史(观察组)妇女为对象,发现 *MTHFR* C677TT 基因型在观察组的分布频率较对照组明显升高^[24];对携带风险基因的育龄女性有针对性地实施叶酸增补,可降低因 *MTHFR* 基因突变带来的妊高症及出生缺陷风险^[25]。

2.4 *MTHFR* C677T 基因多态性与肿瘤的关系

近些年来,*MTHFR* C677T 基因多态性与肿瘤发生及预后的关系逐渐引起人们的重视,有研究认为 *MTHFR* C677T 基因 T 的突变会增加食管癌、胃癌的风险,但会降低结肠癌的风险^[26];Sun 等人^[27]做了一个包括 2 165 个胃癌病人和 3 279 正常人对照的荟萃分析,认为胃癌发病与 *MTHFR* C677T 基因的 T 突变相关;也有学者针对 13 篇关于 *MTHFR* C677T 和乳腺癌相关性的文献进行了分析,内容包括乳腺癌 3 273 个,正常人对照 4 419 个,分析结果显示中国人群中 *MTHFR* C677T 与乳腺癌发生有关^[28];Liu 等人^[29]应用 Meta 分析了 11 篇关于 *MTHFR* C677T 多态性与肺癌的研究论文(包含 2 487 例肺癌患者和 3 228 例正常人对照),发现 *MTHFR* C677T 多态性与中国人群肺癌发生没有显著相关性,但是进行亚组分析时发现 *MTHFR* C677T 的多态性与中国北部人群的肺癌发生相关;除了与肿瘤的发生风险相关,*MTHFR* C677T 多态性还与肿瘤的疗效及预后相关,董翠梅等^[30]通过检测 92 例进行培美曲塞联合卡铂化疗肺腺癌患者外周血中 *MTHFR* C677T 多态性,发现 *MTHFR* C677T 中 CC 型患者疾病进展时间(TTP)显著长于 TT/TC 基因型患者,指出 CC 型患者可能是使用培美曲塞联合卡铂化疗有效的人群。

2.5 *MTHFR* C677T 基因多态性与其他疾病的关系

还有一些报道指出 *MTHFR* C677T 多态性与其他一些疾病相关,Xiao 等人^[31]用 11 篇文献(包括 1 738 急性淋巴细胞白血病患者和 2 438 健康对照)做了荟萃分析,认为在中国人群中该基因多态

性与急性淋巴细胞白血病显著相关;有荟萃分析结果表明目前尚不能认为精神分裂症人群 *MTHFR* C677T 的 T 等位基因及 TT 基因型频率明显高于正常人群,但不同地域和种族间基因多态性分布差异有统计学意义^[32]。

3 *MTHFR* A1298C 基因多态性在不同人群中的分布

MTHFR A1298C 多态性是由第 1298 位的点突变导致的,该位点的碱基腺嘌呤(A)被胞嘧啶(C)置换,可将 *MTHFR* 基因编码的谷氨酸变为丙氨酸,从而影响酶的活性。该位点的突变产生了 3 种基因型,野生型 AA,杂合突变型 AC,纯合突变型 CC,与 C677T 突变相比,其纯合子和杂合子个体并未表现出血清同型半胱氨酸升高和叶酸降低,但同时具有 *MTHFR* C677T 和 *MTHFR* A1298C 复合突变的杂合子个体活性可降低 40%,表现出高同型半胱氨酸和低叶酸血症^[14, 33]。从全球范围来说,A1298C 等位基因频率在亚洲为 17%~19%,西欧为 27%~36%^[34],中国人群 *MTHFR* A1298C 等位基因频率约为 22.4%^[11],和 *MTHFR* C677T 相比,*MTHFR* A1298C 的突变分布呈现相反的地理趋势:①突变频率随着纬度的增加先减少再增加,CC 基因型频率在南方地区为 7.6%,中部地区为 3.7%,北部地区为 3.0%,最北部地区为 4.5%;②突变频率随着经度的增加也是先减少再增加,CC 基因型频率在西方地区为 6.5%,中部地区为 3.2%,东部地区为 4.2%^[11]。该基因多态性在不同种族间的分布是否具有一定的差异性^[35]。

4 *MTHFR* A1298C 基因多态性检测的临床意义

MTHFR A1298C 基因多态性相关疾病的研究和 *MTHFR* C677T 相比较少,主要见于在以下几种情况。

4.1 *MTHFR* A1298C 基因多态性与出生缺陷

虽然 A1298C 纯合子没有表现出明显升高的血同型半胱氨酸血症,但有研究显示 C677T/A1298C 的复合杂合子可能存在高同型半胱氨酸血症和低叶酸水平的风险,也能导致许多疾病:韩国学者认为 *MTHFR* A1298C 等位基因也可能与韩国女性早产发生有关^[5];如果母亲携有 A1298C

的突变基因,则后代发生唇裂的风险会增加 2.93 倍^[11],如果父母双方携带纯合子突变基因型则发生神经管缺陷的风险会增加 3.5 倍;但是也有研究指 *MTHFR* A1298C 多态性与神经管缺陷并不相关^[22];Callejon 等人^[36]的研究表明如果存在 *MTHFR* C677T 和 A1298C 的双重突变,胎儿存活的几率是很低的,会导致不明原因的流产;李茜西等^[24]发现在有不良孕产史的妇女中,*MTHFR* A1298C 的频率明显升高。

4.2 *MTHFR* A1298C 基因多态性与心血管疾病

目前的研究显示 *MTHFR* A1298C 多态性与冠心病并不显著相关^[11],Yang 等^[37]人也对 A1298C 多态性与妊高症的关系做了研究,分析了 21 项研究,包括 2 533 例妊高症患者和 2 976 个正常对照,却发现无论是从整体还是亚群来说,*MTHFR* A1298C 基因多态性与妊高症之间都没有显著相关性。

4.3 *MTHFR* A1298C 基因多态性与肿瘤

MTHFR A1298C 基因多态性与肿瘤显著相关的报道并不多,提示其可能与肿瘤发生及预后关系不大,有研究对 13 篇文献进行了荟萃分析,结果表明乳腺癌发生与 *MTHFR* A1298C 基因多态性无明显相关^[28];Sun 等人^[27]的荟萃分析结果同样显示胃癌发病与 *MTHFR* A1298C 多态性并不相关;在肺癌患者采用培美曲塞联合卡铂化疗时,*MTHFR* A1298C 不同基因型总有效率和疾病进展时间比较差异均无统计学意义^[30]。

5 小结与展望

目前多数研究提示,*MTHFR* 基因突变会引起关键代谢酶活性下降,从而导致高同型半胱氨酸血症和低叶酸水平,可能与心血管疾病、出生缺陷、肿瘤等多种疾病相关,其中尤其以 *MTHFR* C677T 基因多态性相关疾病研究的较为多见,单纯 A1298C 多态性相关疾病的研究较少。明确 *MTHFR* 基因的多态性与疾病的关系,可针对性地指导心血管疾病的一级预防和药物治疗,帮助孕妇制定个性化的叶酸补充方案,对肿瘤病人根据基因型不同进行个体性化疗,这样根据不同人群制定出的有效防治措施,可极大地减轻人们和社会的负担。

但同时我们也要注意对于 *MTHFR* 基因相关疾病的研究尚存有争议,其原因可能是研究的设计和方法有差异,研究的样本量也有所

不同,而且 *MTHFR* 基因多态性在世界范围内存在地理和种族分布差异,因此未来的研究应该在确定样本表型和基因突变频率的基础上,进行大样本、跨区域的调查,建立不同地区、不同人群 *MTHFR* 基因多态性数据库,完善基因诊断方法,以对疾病的有效预防和治疗提供重要指导意义。

参考文献

- [1] 胡媛. 叶酸还原酶基因多态性与缺血性脑血管病的关系[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(5): 1267-1270.
- [2] Huang X, Qin X, Yang W, et al. *MTHFR* gene and serum folate interaction on serum homocysteine lowering: prospect for precision folic acid treatment [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 679-685.
- [3] 许家磊, 王宇, 后猛, 等. SNP 检测方法的研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 475-482.
- [4] Saraswathy KN, Asghar M, Samtani R, et al. Spectrum of *MTHFR* gene SNPs C677T and A1298C: a study among 23 population groups of India[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 5025-5031.
- [5] Hwang IW, Kang YD, Kwon BN, et al. Genetic variations of *MTHFR* gene and their association with preterm birth in Korean women[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2017, 53(6): 380-385.
- [6] Yafei W, Lijun P, Jinfeng W, et al. Is the prevalence of *MTHFR* C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia? [J]. *J Hum Genet*, 2012, 57(12): 780-786.
- [7] Mao X, Han L. The relationship of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and ischemic stroke in Chinese Han population [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(2): 242-247.
- [8] 毛仁芳, 范义辉, 白静, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性及其与疾病的关系[J]. 国际遗传学杂志, 2007, 30(1): 39-44.
- [9] Xiong X, Lin XK, Xiao X, et al. Association between *MTHFR* C677T polymorphism and diabetic nephropathy in the Chinese population: An updated meta-analysis and review[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2016, 21(1): 5-12.
- [10] Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification[J]. *Nat Genet*, 1994, 7(4): 551.
- [11] Yang B, Fan S, Zhi X, et al. Geographical and ethnic distribution of *MTHFR* gene polymorphisms and their associations with diseases among Chinese population [J]. *Clin Genet*, 2017, 92(3): 243-258.
- [12] Yang B, Liu Y, Li Y, et al. Geographical distribution of *MTHFR* C677T, A1298C and *MTRR* A66G gene polymorphisms in China: findings from 15357 adults of Han nationality [J]. *Plos One*, 2013, 8(3): e57917.
- [13] Lange LA, Croteau-Chonka DC, Marvelle AF, et al. Genome-wide association study of homocysteine levels in filipinos provides evidence for *CPS1* in women and a stronger *MTHFR* effect in young adults [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(10): 2050-2058.
- [14] Moll S, Varga EA. Homocysteine and *MTHFR* Mutations[J]. *Circulation*, 2015, 132(1): e6-9.
- [15] Zhu XY, Hou RY, Pan XD, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene C677T polymorphism and ischemic stroke in the Chinese population: a meta-analysis[J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(12): 885-894.
- [16] 王阳, 陈建立, 陈俊卯, 等. 中国人群 *MTHFR* C677T 基因多态性与静脉血栓症相关性的 Meta 分析[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(9): 1004-1008.
- [17] Yang YL, Yang HL, Shiao SPK. Meta-prediction of *MTHFR* gene polymorphisms and air pollution on the risk of hypertensive disorders in pregnancy worldwide [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(2): 326.
- [18] 孙宁玲, 李建平, 卢新政, 等. H 型高血压诊断标准依据解读[J]. 中华高血压杂志, 2017, 25(6): 508-510.
- [19] SWEH Chehadeh, HF Jelinek, WAA Mahmeed, et al. Relationship between *MTHFR* C677T and A1298C gene polymorphisms and complications of type 2 diabetes mellitus in an Emirati population [J]. *Meta Gene*, 2016, 9: 70-75.
- [20] 孙川川, 杨玉红, 李萌, 等. 黑龙江省东部地区汉族人群 *MTHFR* 基因多态性与 2 型糖尿病易感及降糖药效的相关性[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(7): 948-950, 964.
- [21] Chang WW, Zhang L, Yao YS, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism and susceptibility to diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients: a meta-analysis[J]. *Ren Fail*, 2013, 35(7): 1038-1043.

- [22] Zhang T, Lou J, Zhong R, et al. Genetic variants in the folate pathway and the risk of neural tube defects: a meta-analysis of the published literature [J]. *Plos One*, 2013, 8(4):e59570.
- [23] Nauman N, Jalali S, Shami S, et al. Low maternal folate concentrations and maternal MTHFR C677T polymorphism are associated with an increased risk for neural tube defects in offspring: a case-control study among Pakistani case and control mothers [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2018, 27(1):253-260.
- [24] 李茜西, 伍萍芝, 何琳琳, 等. 叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产发生易感性的关系[J]. *重庆医学*, 2015, 4(10):1330-1333.
- [25] 毛宝宏, 邱伟涛, 王燕侠, 等. 孕前及孕期叶酸摄入与妊娠期高血压疾病的关联性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(24):6087-6091.
- [26] Zacho J, Yazdanyar S, Bojesen SE, et al. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism and risk of cancer: cross-sectional and prospective studies and meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(3):644-652.
- [27] Sun L, Sun YH, Wang B, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and susceptibility to gastric cancer in Chinese populations: a meta-analysis [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2008, 17(5):446-452.
- [28] Liang H, Yan Y, Li T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population: a meta-analysis of 22 case-control studies [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2):1695-1701.
- [29] Liu NB, Li J, Qi JF, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype may be associated with an increased lung cancer risk in North China: an updated meta-analysis [J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20:2817-2823.
- [30] 董翠梅, 康马飞, 赵燕仪, 等. 亚甲四氢叶酸还原酶基因多态性与培美曲塞联合卡铂治疗肺腺癌疗效的关系[J]. *川北医学院学报*, 2015, 30(5):618-621.
- [31] Xiao Y, Deng TR, Su CL, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population: a meta-analysis [J]. *Oncol Res Treat*, 2014, 37(10):576-582.
- [32] 王巍, 程文桃, 林力, 等. 精神分裂症人群亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性流行病学特征的 Meta 分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(9):33-40.
- [33] Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review [J]. *Am J Epidemiol*, 2000, 151(9):862-877.
- [34] 赵加洪, 李瑛, 鲁衍强, 等. MTHFR 基因多态性检测在生殖健康领域的临床价值 [J]. *中国妇幼卫生杂志*, 2015, 5:79-83.
- [35] 庞强, 鲁衍强, 王宏, 等. 广西百色地区壮族与其他地区少数民族女性叶酸代谢关键酶基因 SNPs 的分布特征 [J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(6):1351-1354.
- [36] Callejon G, Mayor-Olea A, Jimenez AJ, et al. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(12):3249-3254.
- [37] Yang B, Fan S, Zhi X, et al. Associations of MTHFR gene polymorphisms with hypertension and hypertension in pregnancy: a meta-analysis from 114 studies with 15411 cases and 21970 controls [J]. *Plos One*, 2014, 9(2):e87497.

· 论 著 ·

人乳头状瘤病毒少见亚型在宫颈病变患者分布状况的研究

李娇¹ 李娜² 赵静妮² 李琰清² 赵思雨² 刘宇峰³ 李雨薇⁴ 牛婧⁵ 王亚文^{2,3*}

[摘要] 目的 探讨人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)少见亚型感染在 HPV 常见亚型检测阴性的宫颈病变患者的分布状况、与宫颈病变的关系及诊断价值。方法 对 12 043 例女性行宫颈筛查,共确诊 793 例宫颈病变的患者,对该人群 HPV 21 种基因分型检测结果为阴性的患者,行 HPV 37 种基因分型检测,并对 793 例宫颈病变患者根据宫颈病理学结果,分为不明意义非典型细胞(atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS)组、低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesions, LSIL)组、高度鳞状上皮内病变组(high-grade squamous intraepithelial lesions, HSIL)、浸润性宫颈癌(invasive cervical cancer, ICC)组。分析 HPV 21 种基因分型检测方法结果阴性的患者中,HPV 少见亚型感染的情况。结果 204 例 HPV 21 种基因分型检测阴性的宫颈病变患者中,HPV 37 种基因分型阳性率为 22.06% (45/204),各组占比分别为 ASCUS 组 5.39% (11/204);LSIL 组 4.90% (10/204);HSIL 组 9.31% (19/204);ICC 组 2.45% (5/204)。45 例阳性样本包括单一感染 35 例,多重感染 10 例。共检测出少见 HPV 亚型 8 种,检出率分别为 HPV54 型,3.43% (7/204);HPV82 型,2.45% (5/204);HPV84 型,2.45% (5/204);HPV61 型,1.96% (4/204);HPV83 型,1.47% (3/204);HPV26 型,0.98% (2/204);HPV34 型,0.98% (2/204);HPV40 型,0.49% (1/204)。结论 对 HPV 常见亚型检测为阴性的宫颈病变患者行 HPV 少见亚型检测,是对原有方法的有效补充,可对该类宫颈病变患者的疾病诊断、病因探索及随访治疗提供重要补充。

[关键词] 宫颈病变; 宫颈癌; HPV 少见亚型

Study on the distribution of rare human papillomavirus subtypes in patients with cervical lesions

LI Jiao¹, LI Na², ZHAO Jingni², LI Yanqing², ZHAO Siyu², LIU Yufeng³, LI Yuwei⁴, NIU Jing⁵, WANG Yawen^{2,3*}

(1. Department of Gynecology, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shaanxi, China, 710061; 2. Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, 710061; 3. Biobank, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, 710061; 4. Genetic Center, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, China, 710061)

[ABSTRACT] Objective To investigate the distribution of rare human papillomavirus (HPV) subtype infection in cervical lesions with negative common HPV subtypes, and the relationship between rare

基金项目:西安交通大学第一附属医院临床研究中心重点项目(XJTU1AF-CRF-2015-009);西安交通大学第一附属医院临床研究中心面上项目(XJTU1AF-CRH-2016-011)

作者单位:1. 西安交通大学第一附属医院妇产科,陕西,西安 710061

2. 西安交通大学第一附属医院检验科,陕西,西安 710061

3. 西安交通大学第一附属医院生物样本信息资源中心,陕西,西安 710061

4. 西北妇女儿童医院遗传中心,陕西,西安 710061

*通讯作者:王亚文, E-mail: wangyw1269@mail.xjtu.edu.cn

human papillomavirus (HPV) subtype infection and cervical lesions, and diagnostic value. **Methods** A total of 12043 women were screened for cervical cancer, and 793 patients with cervical lesions were diagnosed. Patients with negative results of HPV 21 genotyping test in this group were further performed by HPV 37 genotyping test. Based on the results of cervical pathology, 793 patients were divided into atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) group, low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) group, highly squamous intraepithelial lesion (HSIL) group, and invasive cervical cancer (ICC) group. The HPV rare subtype infection with negative HPV 21 test results was analyzed. **Results** The positive rate of HPV 37 genotyping test was 22.06% (45/204) in 204 patients with cervical lesions with negative HPV 21 genotyping. The proportion of each group was 5.39% (11/204) in ASCUS group, 4.90% (10/204) in LSIL group, 9.31% (19/204) in HSIL group and 2.45% (5/204) in ICC group. 45 positive samples had 35 with single infection and 10 with multiple infections. A total of 8 rare HPV subtypes were detected, and the detection rates were HPV54, 3.43% (7/204), HPV82, 2.45% (5/204), HPV84, 2.45% (5/204), and HPV61, 1.96% (4/204); HPV83, 1.47% (3/204); HPV26, 0.98% (2/204); HPV34, 0.98% (2/204); HPV40, 0.49% (1/204). **Conclusion** The detection of HPV rare subtypes in cervical lesions with negative HPV subtypes is an effective supplement to the original method, which can provide important evidence for the diagnosis, etiology and follow-up treatment of cervical lesions.

[KEY WORDS] Cervical lesions; Cervical cancer; HPV rare subtype

宫颈癌是全世界女性高发癌症,人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续性感染是宫颈癌发生的主要病因,约有95%的宫颈癌的发生都与HPV感染有关^[1]。中国食品与药品监督管理局(China Food and Drug Administration, CFDA)规定将13种HPV高危亚型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)和5种HPV中等风险亚型(HPV26、53、66、73、82)为与宫颈癌发生相关的常见亚型,并用于常规宫颈癌筛查方案^[2]。常见HPV亚型的检测,在健康女性进行宫颈癌筛查及预防方面已见成效。但在临床工作中,仍有一些宫颈病变患者,应用现有HPV检测方法造成漏诊,引发不良结局。其原因与HPV检测方法的局限性^[3]及病变病理类型的特殊性有关^[4]。本研究将针对HPV检测亚型的数量和方法的限制因素,对HPV常见亚型检测为阴性的宫颈病变患者行HPV少见亚型的检测,以期了解HPV少见亚型的分布情况,并为疾病病因探索及病程随访提供重要补充。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2016年1月至2017年6月在西安交通大学第一附属医院妇科门诊就诊,进行宫颈癌联合筛查女性12 043例。平均年龄(45.81±11.04)岁,年龄范围20~76岁。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 HPV DNA分型检测

①仪器:ABI 2720 PCR扩增仪(美国应用生物系统公司)、凯普医用核酸分子快速杂交仪(凯普生物化学有限公司)。②试剂:人乳头状瘤病毒(HPV)21分型核酸检测试剂盒、人乳头状瘤病毒(HPV)37分型核酸检测试剂盒(PCR+膜杂交法)(凯普生物化学有限公司)。HPV 21分型可检测,包括13种高危亚型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68);6种低危亚型(HPV6、11、42、43、44、81)。HPV37分型检测试剂盒在21种分型的基础上新增了16种少见亚型(HPV26、34、40、54、55、57、61、67、69、70、71、72、73、82、83、84)的检测。

1.2.2 病理学诊断

液基细胞自动制片染色系统(安必平医药科技有限公司)及配套宫颈细胞保存液及巴氏染液。

1.3 检测方法

12 043例女性行HPV 21种分型核酸检测以及新柏氏液基细胞学技术(thinprep cytologic test, TCT)检查,TCT为低级别宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)及以上病变者行阴道镜,取组织进行病理学检查。病理结果确诊为宫颈病变且HPV 21种基因分型结果阴性患者,行HPV 37种基因分型补充检测。

1.3.1 HPV DNA 核酸检测及分型

① DNA 分离提取:按照 DNA 分离提取试剂盒说明书进行 DNA 提取及扩增。②导流杂交:采用核酸分子快速杂交仪及配套试剂盒,按试剂盒说明书进行导流杂交,酶标显色。③结果判读:检测结果为清晰可见的蓝紫色圆点。Biotin 对照点和内对照点为阳性,判定结果有效。

1.3.2 宫颈细胞及组织病理检查

根据2014年子宫颈细胞学 Bethesda 报告系统 (the Bethesda System, TBS) 诊断标准^[5], 病理科医生双人检测结果进行判读, 本研究以检测结果为不明意义非典型细胞 (atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS)、低度鳞状上皮内病变 (low-grade squamous intraepithelial lesions, LSIL)、高度鳞状上皮内病变 (high-grade squamous intraepithelial lesions, HSIL) 及浸润性宫颈癌 (invasive cervical cancer, ICC) 患者为研究对象。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据处理, 计数资料采用例数和百分率 (%) 描述。按照 HPV 检测方法分为 HPV 21 分型、HPV 37 分型组; 按照宫颈病变诊断分为 ASCUS、LSIL、HSIL、ICC 组。各组间率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈病变患者的 HPV 感染分布状况

本研究 12 043 例行宫颈癌筛查的女性, 共筛查出 793 例宫颈病变患者, 其 HPV 阳性率为 74.27% (589/793), 各组 HPV 阳性率分别为 ASCUS 组 46.23% (43/93); LSIL 组 71.13% (138/194); HSIL 组 76.41% (217/284); ICC 组 86.04% (191/222) 各组间阳性率差异具有统计学意义 ($P = 0.001$)。对 204 例 HPV 21 分型检测阴性的患者行 HPV 37 分型检测, 研究流程及各流程患者 HPV 感染分布状况如表 1 所示。

2.2 HPV 37 分型在宫颈病变患者的分布状况

本研究 204 例行 HPV 37 分型检测的患者, 阳性率为 22.06% (45/204), HPV 37 分型在不同宫颈病变下的检测结果及累积阳性例数与阳性率如表 2 所示。37 分型补充检测使宫颈病变患者 HPV 总阳性率增加 5.67% (45/793), 提高至 79.95% (634/793)。2 种 HPV 检测结果在各组阳性率分布状况如图 1 所示。

表 1 研究流程及患者 HPV 感染分布状况 (n)

Table 1 Study flow and patient flow included in the study (n)

病理类型	HPV21 分型(+)	HPV21 分型(-)	HPV37 分型(+)	HPV37 分型(-)
ASCUS	43	50	11	39
LSIL	138	56	10	46
HSIL	217	67	19	48
ICC	191	21	5	26
合计	589	204	45	159

表 2 HPV 37 种分型基因芯片的检测结果

Table 2 Results of 37 types of HPV gene chip tests

病变类型	HPV 37 分型 (n=204)		HPV 21 分型+HPV 37 分型 (n=793)	
	阳性例数	阳性率 (%)	阳性例数	阳性率 (%)
ASCUS	11	5.39	54	6.81
LSIL	10	4.9	148	18.06
HSIL	19	9.31	236	29.76
ICC	5	2.45	196	24.72
合计	45	22.06	634	79.95

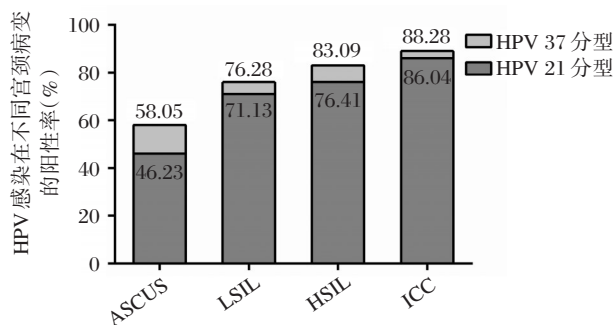


图 1 HPV 21 分型与 HPV 37 分型在不同宫颈病变的感染分布状况

Figure 1 Distribution of HPV 21 and HPV 37 genotypes in different cervical pathological groups

2.3 少见亚型在宫颈病变的分布情况

45 例 HPV 37 分型检测的阳性样本中, 22 例为 HPV 21 分型检测已包含型别, 其中单一感染 14 例, 多重感染 8 例。单一感染以 HPV16、52、58、39 为主; 多重感染中, 4 例为常见亚型感染, 4 例为少见亚型和常见亚型混合感染。本研究检测出 8 种

少见亚型,检出率分别为 HPV54 型, 3.43% (7/204); HPV82 型, 2.45% (5/204); HPV84 型, 2.45% (5/204); HPV61 型, 1.96% (4/204); HPV83 型, 1.47% (3/204); HPV26 型, 1.47% (2/204); HPV34

型, 0.98% (2/204); HPV40 型, 0.49% (1/204)。其他少见亚型未被发现。各亚型在不同宫颈病变的分布如表 3。其中单一感染 35 例, 多重感染 10 例, 多重感染分布状况如表 4。

表 3 少见亚型在 HPV 阴性宫颈病变患者的感染分布状况

Table 3 Distribution of infection of HPV rare subtype in patients with HPV-negative cervical lesions

病变类型	HPV 少见亚型 (n)								总例数
	HPV26	HPV34	HPV40	HPV54	HPV61	HPV82	HPV83	HPV84	
ASCUS	0	2	0	2	0	0	1(1)*	1	6
LSIL	0	0	0	2(1)*	1(1)*	1	1	2	7
HSIL	0	0	1	3(2)*	2	4(1)*	1(1)*	2	13
ICC	2(1)*	0	0	0	1	0	0	0	3
合计[n(%)]	2(0.98)	2(0.98)	1(0.49)	7(3.43)	4(1.96)	5(2.45)	3(1.47)	5(2.45)	29(14.22)

*括号内代表多重感染例数。

表 4 不同宫颈病变下 HPV 多重感染分布状况

Table 4 Distribution of multiple infections of HPV in different cervical lesions

病变类型	HPV 37 分型 (n)				合计
	单一感染	二重感染	三重感染	四重感染	
ASCUS	9	1	1	0	11
LSIL	8	1	0	1	10
HSIL	15	1	3	0	19
ICC	3	0	2	0	5
合计	35	3	6	1	45

3 讨论

本研究在广泛应用 HPV 21 分型检测进行宫颈癌普遍筛查时,发现部分宫颈癌患者 HPV 检测结果阴性,其发生率比既往报道多,因此,选用 HPV 37 分型对 HPV 21 分型阴性的宫颈病变患者做进一步检查,证实了部分患者漏诊的现状。其原因在于 HPV 37 分型具有更高的灵敏度,且可以检测出更多 HPV 亚型。在进行 HPV 37 分型检测中,仍有 22 例为 HPV 21 分型已包括亚型,而在 HPV 21 分型检测中未检测出来,其原因可能是病毒载量低于 HPV 21 分型的检测下限,或 HPV 21 分型检测对于某些亚型的扩增效率略低^[6]。HPV 37 分型相比普通筛查的型别多,可排除由于检测型别限制造成的假阴性^[7]。虽然对人群进行 HPV

常见亚型的普筛,既可以筛出高风险人群,又可以减少患者由于致病性不高的亚型感染造成的过度恐慌,但对于已经确诊的患者,其 HPV 检测结果对病因探索、治疗和随访至关重要。

研究发现宫颈癌的发生 90%左右都与 HPV 感染相关^[8-9],一项全球流行率研究报告称,13.0%的鳞状细胞癌和 28.2%的罕见宫颈腺癌 HPV 阴性,并估计常规 HPV 检测可能会漏掉 3%~4%的宫颈癌^[10]。目前研究已经公认,所有已建立和验证的针对高危型 HPV 感染的筛查方案,会错过 1%~2%与非高危型 HPV 感染有关的宫颈癌^[11]。本研究发现宫颈癌患者有 2.45%因为型别限制未被检出,与以上结论相一致,而宫颈癌前病变的患者有 5.67%在初筛时未被检出,且具有更高的未检出率。本研究认为对高危型 HPV 阴性的宫颈病变患者行少见亚型的检测,可以为更多患者提供临床监管的机会,并成为临床鉴别诊断宫颈癌的必要手段。

在对 HPV 少见亚型分型的研究中,共发现 8 种少见亚型的感染。与国内外研究相比,罗招云等^[6]对 285 例 HPV 21 分型未能检出 HPV 型别者行 37 分型检测,成功分型 251 例。Igidbashian 等^[12]对 HPV 37 例宫颈癌的患者研究表明,31.1%患者在利用 HC2 检测高危型 HPV 为阴性结果,其中包括 1 例低危型 HPV 阳性和 1 例少见亚型 HPV69/71 阳性。Petry 等^[13]在 371 例宫颈癌患者

中发现 31 例高危型 HPV 检测结果为阴性,进一步检测发现有少见亚型 1 例 HPV53、1 例 HPV71 及 3 例 HPV73 的感染。以上研究表明, HPV“阴性”的宫颈癌中,存在因为检测型别的限制而导致的 HPV 检测假阴性,各研究检测出的少见亚型型别各不相同,其原因可能与 HPV 分布的地域特点及 HPV 少见亚型的感染本就是小概率事件有关,但都证明了宫颈癌患者中存在 HPV 少见亚型感染。本研究对象为 ASCUS 及以上病变患者,比单纯宫颈癌患者研究面更广,感染 HPV 型别种类更多,且多重感染率更高,可以推测 HPV 少见亚型虽没有 HPV 高危亚型致癌率高,但仍有一定的致癌性,是宫颈病变发生的原因之一。

本研究仍有 159 例宫颈病变患者未检出 HPV 感染,其 HPV 感染状况以及特殊的发病机制仍需进一步验证。其原因可能与病毒复制缓慢、异常细胞过少或者严重的细胞受损,使病毒载量过低等因素造成的假阴性有关^[14]。也可能与特殊病理类型所致非 HPV 感染所致宫颈癌有关^[15]。HPV 检测在对疾病病因诊断中仍有局限性,需要临床工作者进一步研究其特殊病理类型的致癌机制。

综上所述,本研究认为 HPV“阴性”的宫颈癌可能因为漏诊,而导致的监管和治疗不及时,应该加强对此部分患者检验方法的弥补。另外,是否存在非 HPV 感染导致的宫颈癌发生的特殊致病机制,尚需要大量流行病学深入研究。对 HPV 检测结果为阴性的宫颈病变患者进行少见亚型的检测,是对原有方法的有效补充,将对该类患者的病因探索、诊断治疗以及疾病随访提供补充依据。

参考文献

[1] Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? [J]. *Journal of Pathology*, 1997, 181(3):253-254.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 人乳头瘤病毒(HPV)核酸检测及基因分型、试剂技术审查指导原则[EB/OL]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1421/136488.html>, 2015-11-26/2018-08-21.

[3] Choi YD, Jung WW, Nam JH, et al. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 98(3):369-375.

[4] Rodríguez-Carunchio L, Soveral I, Steenberg R, et al. HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis [J]. *Gynaecological oncology*, 2014, 122(1):128.

[5] Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014 [J]. *Acta Cytologica*, 2015, 123(5):121-132.

[6] 罗招云, 杨立业, 陈强. 潮州地区少见型人乳头瘤病毒型别分布及与宫颈病变的关系 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(6):394-397.

[7] Petry KU, Cox JT, Johnson K, et al. Evaluating HPV-negative CIN2+ in the ATHENA trial [J]. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(12):2932-2939.

[8] Katki HA, Schiffman M, Castle PE, et al. Five-year risks of CIN 3+ and cervical cancer among women with HPV-positive and HPV-negative high-grade Pap results [J]. *Journal of lower genital tract disease*, 2013, 17(5 Suppl 1):S50-55.

[9] TCGA Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 543(7645):378-384.

[10] Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases [J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(12):1559-1567.

[11] Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, et al. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(9):817-826.

[12] Igidbashian S, Schettino MT, Boveri S, et al. Tissue genotyping of 37 in situ and invasive cervical cancer with a concomitant negative HC2 HPV DNA test [J]. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2016, 18(1):87-91.

[13] Petry KU, Liebrich C, Luyten A, et al. Surgical staging identified false HPV-negative cases in a large series of invasive cervical cancers [J]. *Papillomavirus Res*, 2017, 4:85-89.

[14] Laila SAM, Davit B, Camilla L, et al. Does human papillomavirus-negative condylomata exist? [J]. *Virology*, 2015, 485:283-288.

[15] Ibragimova MK, Tsyganov MM, Karabut IV, et al. Disease-free and overall survival of patients diagnosed with HPV-associated or HPV-negative cervical cancer [C]. *Aip Conference*. Aip Conference, 2015, 1688(1):118-120.

脊髓背角 NMDA 受体 NR2B 亚基对舒芬太尼耐受形成的影响研究

郑孝振* 毛珊珊 任益锋 韩箫笛 宋俊杰

[摘要] 目的 研究脊髓背角 NMDA 受体 NR2B 亚基对舒芬太尼耐受形成的影响。方法 32 只成年雄性小鼠随机分为 2 组, 每组 16 只, A 组小鼠采用逐日递增法皮下注射生理盐水; B 组小鼠经皮下注射舒芬太尼建立舒芬太尼耐受小鼠模型, 并通过检测小鼠机械缩足反射阈值及热缩足反射潜伏期进行验证, 同时合成并筛选对 NR2B 基因抑制效果较好的 siRNA。对舒芬太尼耐受小鼠鞘内注射 siRNA-NR2B 后, 检测舒芬太尼耐受小鼠机械缩足反射阈值及热缩足反射潜伏期, 同时通过 RT-PCR、Western blot 技术分析舒芬太尼耐受小鼠 NR2B 亚基表达水平变化。结果 与 A 组相比, B 组小鼠的机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值检测明显下降 ($P < 0.05$)。通过 RT-PCR 及 Western blot 实验发现, 舒芬太尼耐受小鼠 NR2B 亚基表达水平上升 ($P < 0.05$); 将 siRNA-1 经鞘内注射舒芬太尼耐受小鼠后, siRNA-1 可显著降低舒芬太尼耐受小鼠脊髓背角组织中 NR2B 的 mRNA 及蛋白水平 ($P < 0.05$)。通过 RT-PCR 及 Western blot 实验发现, siRNA-1 对脊髓背角细胞的 NR2B 的 mRNA 及蛋白抑制效果较好 ($P < 0.05$)。舒芬太尼耐受小鼠转染 siRNA 后, 舒芬太尼耐受小鼠的机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值显著高于 B 组 ($P < 0.05$)。结论 脊髓背角 NMDA 受体 NR2B 亚基与舒芬太尼耐受形成密切相关, 减少体内 NR2B 亚基水平可能增强舒芬太尼的镇痛效果。

[关键词] 脊髓背角; NR2B 亚基; 舒芬太尼耐受

Effect of NMDA receptor NR2B subunit on the tolerance of sufentanil in spinal dorsal horn

ZHENG Xiaozhen*, MAO Shanshan, REN Yifeng, HAN Xiaodi, SONG Junjie

(Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng, Henan, China, 475000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect of NMDA receptor NR2B subunit on the formation of sufentanil tolerance in spinal dorsal horn. **Methods** 32 adult male mice were randomly divided into 2 groups, 16 in each group. Group A mice were injected with normal saline subcutaneously daily, while group B mice were subcutaneously injected with sufentanil to establish sufentanil tolerance. The mouse model was validated by detecting the mechanical withdrawal threshold and paw withdrawal thermal latency of mice. At the same time, siRNAs with better inhibition effect on NR2B gene were synthesized and screened. After intrathecal injection of siRNA-NR2B in sufentanil-resistant mice, the mechanical withdrawal threshold and paw withdrawal thermal latency of sufentanil-resistant mice were detected. The expression levels of NR2B subunits in sufentanil-resistant mice were analyzed by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared to group A, the mechanical withdrawal threshold and paw withdrawal thermal latency of mice in group B was significantly

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(15A320054)

作者单位: 河南大学第一附属医院麻醉科, 河南, 开封 475000

*通讯作者: 郑孝振, E-mail: hedazxz@sina.com

decreased ($P<0.05$). The expression of NR2B subunit in sufentanil-tolerant mice increased ($P<0.05$). After intrathecal injection of siRNA-1 into sufentanil-tolerant mice, the expression of NR2B mRNA and protein in spinal dorsal horn of sufentanil-tolerant mice decreased significantly ($P<0.05$). RT-PCR and Western blot showed that siRNA-1 inhibited the mRNA and protein of NR2B in spinal dorsal horn cells ($P<0.05$). The mechanical withdrawal threshold and paw withdrawal thermal latency of sufentanil tolerance mice with siRNA-1 intrathecal injection were significantly higher than those of B group ($P<0.05$). **Conclusion** The NMDA receptor NR2B subunit of spinal dorsal horn is closely related to the formation of sufentanil tolerance. Decreasing the level of NR2B subunit *in vivo* may enhance the analgesic effect of sufentanil.

[KEY WORDS] Spinal dorsal horn; NR2B subunit; Sufentanil tolerance

舒芬太尼是缓解急慢性疼痛的常用麻醉药物,但长时间应用后会诱导产生耐受,从而对患者的疼痛控制及生活质量产生不良后果^[1]。已有研究发现 N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体在体内神经发育、突触可塑性及痛觉信号传导等生理、病理过程中发挥着重要作用^[2]。NMDA受体2B(NMDA receptor 2B, NR2B)是NMDA受体的一个重要亚基,参与外周痛觉感受阈扩大、中枢过度兴奋及痛觉过敏的形成,可促进患者疼痛的产生及中枢性痛觉敏化形成^[3]。有研究发现,脊神经结扎疼痛模型小鼠鞘内注射NR2B亚基的选择性抑制剂后,小鼠疼痛反应有明显减弱的趋势,提示NR2B表达水平与痛觉过敏的产生和维持密切相关^[4]。目前NR2B基因表达在舒芬太尼耐受中的作用报道较少。本课题拟体外合成并筛选出针对NR2B基因的有效siRNA,经采用鞘内注射将siRNA导入舒芬太尼耐受模型小鼠体内,研究脊髓背角NR2B表达水平在舒芬太尼耐受形成中的作用,为改善慢性疼痛患者生活质量提供理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 小鼠饲养及模型构建

选择32只Wistar成年雄性小鼠,购自浙江省实验动物中心,其动物合格证号为SCXK(浙)2014-0001,小鼠体重在290~310 g。饲养室温度为(24±3)℃,空气湿度为60%左右,维持自然昼夜节律,小鼠均可自由饮食。小鼠随机分为2组,均为16只,A组作为舒芬太尼假耐受对照,采用逐日递增法皮下注射生理盐水,第1天注射1 mL,每天递增0.1 mL注射剂量,共21天。B组采用每天递增法经皮下注射舒芬太尼,其注射剂量(mL)与对应的

A组注射的生理盐水体积相同。

1.2 舒芬太尼耐受小鼠模型的评估

1.2.1 机械缩足反射阈值的测定

在第5天、10天、15天、20天、25天、30天将小鼠置于有机玻璃箱内,采用弗雷纤维丝(VonFrey纤维)对小鼠精修机械感应阈值测试,待小鼠适应3天后,用弗雷纤维丝刺激小鼠后肢足底,持续刺激3 s左右,刺激强度由小到大,每次间隔30 s,若小鼠发生5次以上的缩足反应,则把该强度设为小鼠机械缩足反射阈值。

1.2.2 热缩足反射潜伏期的测定

在第5天、10天、15天、20天、25天、30天将小鼠放入辐射热测痛仪的玻璃格子中,实验前使小鼠适应环境15 min,调节光源与石英玻璃板之间的距离,观测小鼠的缩足反应,重复测量3次小鼠的热刺激缩足潜伏期,刺激相同部位的时间间隔在15 min,不同部位间隔5 min。热刺激缩足潜伏期指启动光源照射至小鼠发生缩足反射的时间。若光源照射小鼠30 s无反应,则停止照射,每只小鼠检测3次。热刺激强度在整个实验过程中保持一致。

1.3 siRNA-NR2B对脊髓背角细胞NR2B基因的敲减效果

1.3.1 siRNA-NR2B设计、合成和体外筛选

根据小鼠NR2B基因序列和siRNA设计工具设计针对NR2B的siRNAs,由上海锐赛生物技术有限公司合成,设计3个siRNA序列并设计相应反义寡核苷酸,同时设计一条含4个碱基错配的siRNAs作为阴性对照。采用含10%胎牛血清DMEM培养基培养脊髓背角细胞(购自上海信裕生物科技有限公司),置于37℃、5%CO₂培养箱培养。取对数生长期细胞接种至12孔板,待细胞密度达到50%时,对细胞用不同的

siRNA 处理,均为 20 nmol/L,采用阳离子脂质体法包封 siRNAs,并转染体外培养脊髓背角细胞,见表 1。

表 1 siRNA-NR2B 碱基序列

Table 1 The base sequence of siRNA-NR2B

编号	碱基序列(5'-3')
阴性对照	GTCGCACGTCCACTGCACGC
siRNA-1	GTCACTGACTGACTGCACGC
siRNA -2	GCTTCAGTCACGCTCACTGA
siRNA-3	CACTGCACTGCCTGCACTGC

1.3.2 逆转录聚合酶链式扩增反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测脊髓背角细胞 NR2B 基因的 mRNA 水平影响

收集对数期脊髓背角细胞,加入 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,采用 Nanodrop 分光光度仪检测 RNA 质量,通过反转录合成 cDNA。以 GAPDH 基因作为内参。NR2B 基因引物:上游 5'-GCTGACTGCACTGCACTGCAC-3',下游 5'-GCATTGCCTCCTTGATTTGG-3'; GAPDH 引物:5'-CGTGCACGTGCACGTCACCTC-3',下游 5'-GCACTGCACTGCACTGCAC-3'。PCR 条件设置:95℃ 2 min;95℃ 30 s,58℃ 25 s,72℃ 40 s,32 个循环;72℃ 延伸 5 min。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对水平。

1.3.3 Western blot 技术检测 siRNA 对脊髓背角细胞 NR2B 蛋白的水平

收集对数期脊髓背角细胞后,加入预冷的蛋白提取液,置于 0℃ 条件裂解 30 min,后以 10 000 r/min 转速离心 10 min,经二喹啉酸(bicinchoninic acid, BCA)法检测蛋白水平。将蛋白样品与上样液混匀后煮沸 5 min,冷却后用加样枪转入加样孔中,采用 10% 十二酰硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳,上样量均为 100 μg,电压 120 V,电泳时间 60 min 左右,待溴酚蓝染料移至凝胶底部 1/3 处停止电泳。采用湿转法将凝胶上分离的蛋白转至 PVDF 膜上,经含 5% 脱脂奶粉的封闭液孵育 30 min 后,加鼠抗人 NR2B 蛋白单抗(按 1:600 比例稀释),4℃ 孵育过夜,经 TBST 清洗后加入兔抗鼠二抗(按 1:2 000 比例稀释),置于摇床孵育 2 h,经 TBST 清洗后加 ECL 化学发光试剂,经显影、拍照后采用胶成像系统分析条带灰度值。

1.4 siRNA 对模型小鼠行为及脊髓背角细胞 NR2B 表达影响

1.4.1 siRNA 对模型小鼠行为

机械缩足反射阈值的测定参见 1.2.1 步骤;热缩足反射潜伏期的测定参见 1.2.2 步骤。

1.4.2 siRNA 对模型小鼠脊髓背角组织细胞 NR2B 表达影响

小鼠经戊巴比妥钠深麻醉后断头处死,快速取出脊髓背角组织经预冷的 PBS 清洗后,经胰酶处理 5 min,加入 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA。采用 RT-PCR 检测大鼠脊髓背角细胞 NR2B 基因的 mRNA 水平影响(参见 1.3.2 步骤)。同时采用 Western blot 技术检测 siRNA 对小鼠脊髓背角组织细胞 NR2B 蛋白的水平(参见 1.3.3 步骤)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件处理数据,计量资料均表达为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 表示数据差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 舒芬太尼耐受小鼠的机械刺激缩足反射阈值变化

与 A 组相比,B 组机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值检测均明显下降($P < 0.05$),见表 2、表 3。

表 2 舒芬太尼耐受小鼠的机械缩足反射阈值检测 (g)

Table 2 Detection of mechanical reflex threshold in mice with sufentanil tolerance (g)

组别	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
A 组	11.26±0.34	11.31±0.27	11.16±0.24	11.27±0.23	11.12±0.21	11.24±0.19
B 组	6.12±0.27 [*]	6.21±0.31 [*]	6.42±0.26 [*]	6.14±0.23 [*]	6.32±0.28 [*]	6.16±0.17 [*]

^{*} $P < 0.05$,与 A 组相比。

表3 舒芬太尼耐受小鼠的热缩足反射阈值检测 (s)

Table 3 Detection of paw withdrawal thermal latency of mice with sufentanil tolerance (s)

组别	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
A 组	8.12±0.23	8.23±0.19	8.07±0.18	8.26±0.19	11.12±0.21	11.24±0.19
B 组	4.17±0.16*	4.09±0.14*	4.08±0.12*	4.16±0.13*	4.21±0.14*	4.18±0.13*

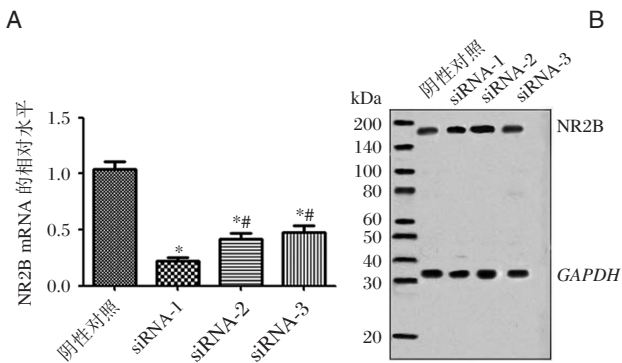
*P<0.05, 与 A 组相比。

2.2 siRNA-NR2B 对脊髓背角细胞的 NR2B 基因表达的抑制效果

将 siRNA-NR2B 转染脊髓背角细胞后,通过 RT-PCR 及 Western blot 实验发现,siRNA-1 对脊髓背角细胞的 NR2B 的 mRNA 及蛋白抑制效果较好 (P<0.05), 见图 1。

2.3 舒芬太尼耐受小鼠的 NR2B 基因表达情况

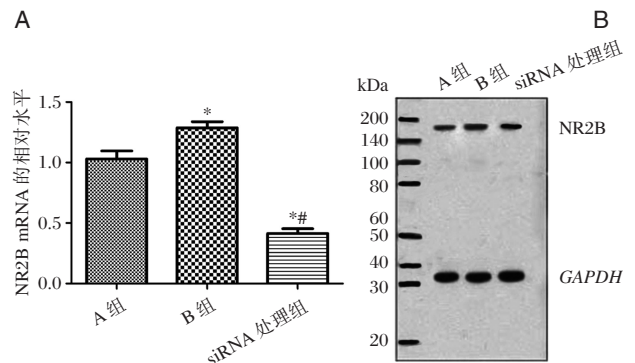
通过 RT-PCR 及 Western blot 实验发现,舒芬太尼耐受小鼠 NR2B 基因表达水平上升 (P<0.05); 将 siRNA-1 经鞘内注射舒芬太尼耐受小鼠后,siRNA-1 可显著降低舒芬太尼耐受小鼠脊髓背角组织中 NR2B 基因的 mRNA 及蛋白水平 (P<0.05), 见图 2。



A: 脊髓背角细胞中 NR2B 的 mRNA 相对水平, 与阴性对照相比, * P<0.05; 与 siRNA-1 组相比, #P<0.05; B: 脊髓背角细胞中 NR2B 蛋白水平。

图1 siRNA 对脊髓背角细胞的 NR2B 表达的影响

Figure 1 Effect of siRNA on NR2B expression in spinal dorsal horn cells



A: 脊髓背角细胞中 NR2B 的 mRNA 相对水平, 与阴性对照相比, * P<0.05; 与 siRNA-1 组相比, #P<0.05; B: 脊髓背角细胞中 NR2B 蛋白水平。

图2 siRNA 对小鼠脊髓背角细胞的 NR2B 表达的影响

Figure 2 Effect of siRNA on NR2B expression in spinal dorsal horn cells of mice

表4 siRNA 转染后舒芬太尼耐受小鼠的机械缩足反射阈值变化 (g)

Table 4 Changes of the mechanical withdrawal threshold of mice after sufentanil tolerance after siRNA transfection (g)

组别	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
A 组	11.32±0.25	11.24±0.32	11.26±0.35	11.26±0.28	11.12±0.21	11.24±0.19
B 组	6.12±0.27	6.21±0.31	6.42±0.26	6.14±0.23	6.32±0.28	6.16±0.17
siRNA 处理组	9.23±0.24*	9.16±0.19*	9.26±0.25*	9.17±0.22*	9.21±0.23*	9.16±0.17*

*P<0.05, 与 B 组相比。

2.4 siRNA-NR2B 对舒芬太尼耐受小鼠的作用效果

舒芬太尼耐受小鼠转染 siRNA 5 天后,舒芬太

尼耐受小鼠的机械缩足反射阈值显著高于 B 组 (P<0.05); 舒芬太尼耐受小鼠的热缩足反射阈值显著高于 B 组 (P<0.05), 见表 4、表 5。

表5 siRNA 转染后舒芬太尼耐受小鼠的热缩足反射阈值变化 (s)

Table 5 Changes of paw withdrawal thermal latency in sufentanil tolerant mice after siRNA transfection (s)

组别	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
A 组	8.25±0.21	8.18±0.17	8.13±0.23	8.09±0.24	8.17±0.16	8.31±0.26
B 组	4.05±0.12	4.11±0.13	4.13±0.14	4.15±0.09	4.09±0.12	4.17±0.11
siRNA 处理组	7.43±0.27*	7.37±0.24*	7.41±0.19*	7.34±0.23*	7.35±0.29*	7.34±0.22*

* $P < 0.05$, 与 B 组相比。

3 讨论

临床医疗中阿片类药物对缓解患者疼痛有重要的作用,但患者在使用阿片类药物容易发生药物耐受,导致提高麻醉药物的用量,进一步导致药物耐受的加重^[5]。有研究发现对小鼠长期使用舒芬太尼可促使小鼠发生痛觉过敏,当对小鼠给予适量的氯胺酮(一种 NMDA 受体拮抗剂)可防止痛觉过敏发生^[6-7]。Xie 等^[8]发现 NMDA 受体拮抗剂可抑制阿片类药物耐受的发生。NR2B 亚基是 NMDA 受体的重要组织部分,对痛觉感知和中枢敏化的形成有重要价值。因此,阐明 NR2B 亚基对舒芬太尼耐受形成的作用,有助于临床治疗舒芬太尼耐受,提高药物的镇痛效果。

本研究通过采用逐日递增法皮下注射舒芬太尼的方法建立舒芬太尼耐受小鼠模型,通过机械压痛法测定小鼠痛域下降,提示舒芬太尼耐受小鼠模型建立成功。NMDA 受体激活后可促使细胞内的 Ca^{2+} 离子水平上升,促进 NO 的合成,导致小鼠的机械疼痛阈值下降^[9-10]。本研究结果提示 NR2B 亚基与舒芬太尼耐受形成密切相关,可见中枢神经系统及脊髓水平 NR2B 亚基在痛觉感知、信号传递和阿片类药物耐受过程中起着重要作用。NR2B 亚基作为 NMDA 受体的重要组成部分,介导疼痛神经信息的传递,同时该受体可调控细胞内外钙离子及镁离子水平,钙离子的细胞内流可活化钙调蛋白,刺激神经递质的释放产生影响,进一步促使 NR2B 亚基活性增强,通过自身信号放大机制进一步促进舒芬太尼耐受的形成,选择性抑制 NR2B 亚基活性可能是治疗麻醉药物耐受的有效方式。

RNA 干扰技术是一种可特异性抑制目的基因表达的生物技术,可特异性阻断目的基因转录^[11-12]。本研究在设计并合成针对 NR2B 的 siRNA 后通过筛选试验发现 siRNA-1 可有效抑制 NR2B 亚基表达水平。在给予舒芬太尼耐受小鼠 siRNA-1 后发现小鼠的机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值均显著上升,与已有研究一致^[13]。同时通过 RT-PCR、Western blot 实验发现 NR2B 亚基表达水平下降,提示 NR2B 亚基表达水平舒芬太尼耐受密切相关,这可能是由于 NR2B 亚基介导神经病理性疼痛,该蛋白表达水平下降可导致痛觉神经元信号的传递功能削弱,进而产生一定的镇痛作用^[14-15]。NR2B 亚基活性基团的磷酸化修饰对神经疼痛的调控有明显作用,本研究仅检测了 NR2B 亚基表达水平对舒芬太尼耐受形成的影响,需同时检测 NR2B 亚基的磷酸化水平,以更加全面地分析 NR2B 亚基对神经疼痛调控的作用。Martel 等^[16]通过鞘内注射 NR2B-iRNA 抑制脊髓背角 NR2B 的 mRNA 表达,结果减轻了外周炎症引起的疼痛反应,表明 NR2B 在脊髓水平伤害性信息传递以及痛觉过敏的产生和维持中发挥作用。Nakamori 等^[17]通过动物实验发现 NR2B 亚基在选择性拮抗剂作用后可缓解疼痛,并可改善记忆障碍等不良症状。本研究通过 siRNA 干扰技术发现脊髓背角 NR2B 亚基水平下降后可缓解舒芬太尼耐受形成,提示 NR2B 亚基可能是治疗舒芬太尼耐受的作用靶点。

综上所述,NMDA 受体 NR2B 亚基水平上升可促使舒芬太尼耐受的形成,通过 siRNA 技术降低 NR2B 基因表达后可有效缓解舒芬太尼耐受,为改善慢性疼痛患者生活质量提供理论依据和实践基础。

参考文献

- [1] 付桃芳, 杜俊英, 王玲玲, 等. 中枢 μ 阿片受体磷酸化与阿片耐受的相关性研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 26(1):65-68.
- [2] 陆彦霓, 汤晓青, 沈丽达. OPRM1(A118G)基因多态性对阿片类药物镇痛效应影响的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(9):1477-1480.
- [3] 宋扬, 赵昱, 曾凡荣, 等. 小鼠脊髓内大麻素 CB2 受体在芍药苷拮抗吗啡镇痛耐受中的作用[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(5):635-640.
- [4] 沈茜, 高进, 陈萍. NMDA 受体拮抗剂对神经病理性疼痛小鼠脊髓背角 bFGF 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(1):50-55.
- [5] Jantzie LL, Talos DM, Jackson MC, et al. Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits in human white and gray matter: potential mechanism of increased vulnerability in the immature brain [J]. *Cereb Cortex*, 2015, 25(2):482-495.
- [6] 李欢颜, 阳巧云, 彭良玉, 等. NMDA-NR2B 亚基受体与神经病理性疼痛的研究进展[J]. 海南医学, 2015, 26(23):3503-3506.
- [7] 刘树珍, 于剑锋. 神经病理性疼痛引起成年小鼠空间记忆损害和内侧面额叶的 NMDA 受体 NR2B 亚基下调表达[J]. 中国疼痛医学杂志, 2015, 21(1):21-27.
- [8] Xie JD, Chen SR, Chen H. Presynaptic N-Methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activity is increased through protein kinase C in paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(37):19364-19373.
- [9] 郑晓波, 吴晶, 王向东, 等. 神经病理性疼痛机制及药物治疗研究进展[J]. 江西医药, 2017, 52(6):579-581.
- [10] Lu KW, Yang J, Hsieh CL, et al. Electroacupuncture restores spatial learning and downregulates phosphorylated N-methyl-D-aspartate receptors in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Acupunct Med*, 2017, 35(2):133-141.
- [11] 刘佩强, 覃丹雪, 陈慧英, 等. NMDA 受体磷酸化调控及其与神经系统疾病关系的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 33(26):88-91.
- [12] Thaweerattanasin P, Heckman CJ, Tysseling VM, et al. Firing characteristics of deep dorsal horn neurons after acute spinal transection during administration of agonists for 5-HT1B/1D and NMDA receptors [J]. *J Neurophysiol*, 2016, 116(4):1644-1653.
- [13] Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, et al. Dopamine D1-like receptors regulate constitutive, μ -opioid receptor-mediated repression of use-dependent synaptic plasticity in dorsal horn neurons: more harm than good? [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(20):5661-5673.
- [14] Rajgor D, Fiuza M, Parkinson GT, et al. The PICK1 Ca^{2+} sensor modulates N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor-dependent microRNA-mediated translational repression in neurons [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(23):9774-9786.
- [15] Li S, Bjelobaba I, Stojilkovic S. Interactions of pannexin1 channels with purinergic and NMDA receptor channels [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1860(1):166-173.
- [16] Martel G, Uchida S, Hevi C, et al. Genetic demonstration of a role for stathmin in adult hippocampal neurogenesis, spinogenesis, and NMDA receptor-dependent memory [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(4):1185-1202.
- [17] Nakamori T, Sato K, Kinoshita M, et al. Positive feedback of NR2B-containing NMDA receptor activity is the initial step toward visual imprinting: a model for juvenile learning [J]. *J Neurochem*, 2015, 132(1):110-123.

非小细胞肺癌 *EGFR*、*ALK* 和 *ROS1* 基因联合检测及突变共存分析

李晓锋 张冠军 汪园园 杨喆 刘希*

[摘要] 目的 研究非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)和C-ros原癌基因1-受体酪氨酸激酶(C-ros oncogene 1-receptor tyrosine kinase, *ROS1*)驱动基因异常的情况及临床病理特征。方法 分析西安交通大学第一附属医院116例NSCLC的临床病理资料,采用扩增阻滞突变系统检测3种驱动基因改变情况,统计分析其与临床病理特征的关系。结果 116例NSCLC中,*EGFR*突变率36.2%, Exon19 del和Exon21为最常见的2种突变,*EGFR*外显子的双重突变率为7.1%。在女性、腺癌患者中*EGFR*的突变率较高,分别为52.3%、45.2%。*ALK*融合基因阳性率为6.9%;在年龄小于60岁组中的发生率较高,为13.5%。*ROS1*融合基因阳性率为4.3%,均发生于腺癌和晚期NSCLC患者。本研究还检出少见的*EGFR*和*ALK*突变共存1例、*EGFR*和*ROS1*突变共存1例。结论 NSCLC中*EGFR*突变或*ALK*融合基因较常见,*ROS1*融合基因稍少见,突变常发生于女性、较年轻的、腺癌患者中;NSCLC驱动基因异常并非绝对互斥,特别是在年轻患者中可出现*EGFR*和*ALK*或*ROS1*突变共存;治疗初期时的多驱动基因联合检测,对促进NSCLC多种分子靶向药物联合治疗具有重要意义。

[关键词] 非小细胞肺癌;表皮生长因子受体;间变性淋巴瘤激酶;C-ros原癌基因1-受体酪氨酸激酶;共存突变

Combined detection and coexistent genetic mutation analysis of *EGFR*, *ALK* and *ROS1* in non-small cell lung cancer

LI Xiaofeng, ZHANG Guanjun, WANG Yuanyuan, YANG Zhe, LIU Xi*

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China, 710061)

[ABSTRACT] Objective To investigate the characteristics of epidermal growth factor receptor (*EGFR*), anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) and C-ros oncogene 1-receptor tyrosine kinase (*ROS1*) driver genes alterations in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods The clinical and pathological data of 116 cases of NSCLC from the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University were analyzed. Amplification refractory mutation system was used to detect the alterations of the 3 driver genes. The relationship between alterations and clinicopathological features was analyzed statistically. Results Among 116 NSCLCs, the *EGFR* mutation rate was 36.2%, Exon19 del and Exon21 were the most common 2 mutations, the double mutation rate was 7.1%. The mutation rates of *EGFR* in female and adenocarcinoma patients were higher, with 52.3% and 45.2%, respectively. The positive rate of *ALK* fusion gene was 6.9%; the incidence was higher in the group of younger than 60 years old, at 13.5%. The positive rate of *ROS1* fusion

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

作者单位:西安交通大学第一附属医院病理科,陕西,西安 710061

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

gene was 4.3%, all of which occurred in adenocarcinoma and advanced NSCLC patients. Interestingly, 1 case of a rare case of *EGFR* and *ALK* and 1 case of *EGFR* and *ROS1* mutation coexisted were detected.

Conclusions *EGFR* mutation and *ALK* fusion gene are more common in NSCLC, *ROS1* fusion gene is slightly rare. Mutations often occur in female, younger, and adenocarcinoma patients. NSCLC-driven genetic abnormalities are not absolutely mutually exclusive, especially in young patients with the presence of *EGFR* and *ALK* or *ROS1* mutations. The combined detection of multiple driver genes at the early stage of treatment is critical to the multiple molecular targeting therapies for NSCLC patients.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer; Epidermal growth factor receptor; Anaplastic lymphoma kinase; ROS proto-oncogene 1-receptor tyrosine kinase; Coexistent genetic alterations

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,高居癌症死亡率的首位^[1]。其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的75%~85%,大部分患者就诊时已为中晚期,5年存活率低^[2]。近年来随着NSCLC多种驱动基因异常的发现,如表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)突变、间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, *ALK*)融合基因和C-ros原癌基因1-受体酪氨酸激酶(C-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase, *ROS1*)融合基因,以它们作为分子靶点的靶向药物针对性强、疗效可靠、不良反应轻,极大地改善了患者的预后,促使NSCLC的临床治疗进入到个体化分子靶向药物治疗时代^[3]。

对NSCLC患者进行驱动基因检测是精准药物治疗的基础^[3]。既往大多数研究认为肺癌驱动基因的异常是绝对互斥的,即患者仅可能具有单一的驱动基因异常^[4-5]。然而最近有少数研究报道了*EGFR*和*ALK*突变共存的NSCLC病例^[6-9],加用*ALK*抑制剂药物治疗可提高这组患者的总体生存率^[6-7]。此外,国内外仅见*EGFR*和*ROS1*共存突变的散在个案报道^[10-12]。本研究采用扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)方法,对西安交通大学第一附属医院116例NSCLC患者进行*EGFR*、*ALK*和*ROS1*基因联合检测,分析这些驱动基因异常特点及相关的临床病理特征,旨在探讨NSCLC驱动基因异常与患者临床病理特征的关系,探讨驱动基因突变的互斥性及突变共存特点,分析多驱动基因联合检测的意义,为临床NSCLC患者驱动基因检测项目的选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2018年1月至2018年5月西安交通大

学第一附属医院收治住院,行肿物活检、手术切除或胸腔积液穿刺,并于病理科确诊为NSCLC的患者的石蜡组织样本、胸腔积液细胞块标本和临床资料,进行回顾性研究分析。研究经我院伦理委员会批准,并征得患者或家属的知情同意。

所有纳入患者在确诊前均未接受酪氨酸激酶抑制剂药物治疗。根据苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色结果,按照2015年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)肺肿瘤分类标准进行NSCLC分类^[13]。研究共纳入116例NSCLC,女性44例(37.9%),男性72例(62.1%)。患者年龄28~86岁,平均年龄51.2岁。无吸烟史61例(52.6%),有吸烟史55例(47.4%)。腺癌93例,鳞状细胞癌21例,腺样囊性癌1例,粘液表皮样癌1例。临床分期为I~II期的20例(17.2%),III~IV期的96例(82.8%)(表1)。

1.2 方法

1.2.1 ARMS检测*EGFR*、*ALK*和*ROS1*突变

分别切取石蜡包埋组织4 μm厚切片5~8张,放入2个1.5 mL EP管。脱蜡后,分别按照AmoyDx FFPE DNA Kit试剂盒(厦门艾德生物有限公司)和AmoyDx FFPE RNA Kit试剂盒(厦门艾德生物有限公司)说明书提取石蜡标本的DNA和RNA。使用Q5000微量紫外分光光度计(QUAWELL公司,美国)检测所提取DNA和RNA样品的质量和浓度。应用ARMS方法,采用ADx-ARMS-人类*EGFR*基因21种突变检测试剂盒(厦门艾德生物有限公司),将提取的DNA样品进行实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)反应体系的配置,利用CFX96荧光定量PCR仪(BIO-RAD公司,美国)进行*EGFR*基因突变检测。采用ADx-

ARMS-*ALK* + *ROS1* 基因融合联合检测试剂盒(厦门艾德生物有限公司),将RNA样品进行逆转录得到cDNA,再利用该试剂盒进行*ALK*、*ROS1* 融合

基因的qRT-PCR检测。实验同时配备阳性和阴性对照,并根据试剂盒说明书判读结果。具体检测的突变类型见表1。

表1 扩增阻滞突变系统方法检测NSCLC的驱动基因及突变类型

Table 1 Detection of the driving genes and mutation types of NSCLC by amplification refractory mutation system

异常的驱动基因	突变类型
<i>EGFR</i> 基因突变	
Exon18	G719A、G719S、G719C
Exon19	E746_A750del (2235-2249del15、2236-2250del15)、L747-P753>S、E746-T751>I、E746-T751del、E746-S752 > V、L747-T751 > Q、L747-E749del、L747-S752del、L747-A750 > P、L747-P753 > Q、L747-T751del、L747-T751>P
Exon20	T790M、S768I、D770-N771insG
Exon21	L858R、L861Q
<i>ALK</i> 融合基因	<i>EML4</i> Exon6/13/20- <i>ALK</i> Exon20、 <i>EML4</i> Exon14/15- <i>ALK</i> Exon20、 <i>EML4</i> Exon2/3/17/18- <i>ALK</i> Exon20、 <i>KIF5B</i> Exon17/24- <i>ALK</i> Exon20、 <i>TFG</i> Exon4- <i>ALK</i> Exon20
<i>ROS1</i> 融合基因	<i>SLC34A2</i> Exon4/14 - <i>ROS1</i> Exon32、 <i>CD74</i> Exon6 - <i>ROS1</i> Exon32、 <i>SDC4</i> Exon2/4 - <i>ROS1</i> Exon32、 <i>SLC34A2</i> Exon4/14- <i>ROS1</i> Exon34、 <i>EZR</i> Exon10- <i>ROS1</i> Exon34、 <i>CD74</i> Exon6- <i>ROS1</i> Exon34、 <i>SDC4</i> Exon4- <i>ROS1</i> Exon34、 <i>TPM3</i> Exon8- <i>ROS1</i> Exon35、 <i>LRIG3</i> Exon16- <i>ROS1</i> Exon35、 <i>GOPC</i> Exon8- <i>ROS1</i> Exon35、 <i>GOPC</i> Exon4- <i>ROS1</i> Exon36

1.2.2 统计分析

采用SPSS 22软件进行统计分析。比较驱动基因*EGFR*、*ALK*、*ROS1*异常与NSCLC患者临床病理特点的关系时,采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法进行统计分析计算P值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *EGFR* 基因突变、*ALK* 或 *ROS1* 融合基因特征

116例NSCLC中,42例发生*EGFR*突变(36.2%)(图1,表2)。其中Exon19 del 23例,Exon21 L858R 12例,Exon21 L861Q 2例,Exon20 ins 1例,Exon18 G719X 1例,*EGFR*外显子双重突变3例(表3,图2)。

116例NSCLC中,8例发生*ALK*基因重排(6.9%)(表2),均为*ALK* Exon20与棘皮动物微管相关类蛋白4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4, *EML4*) Exon6、13、20位点融合。而在*EGFR*突变阴性的74例患者中,7例患者*ALK*

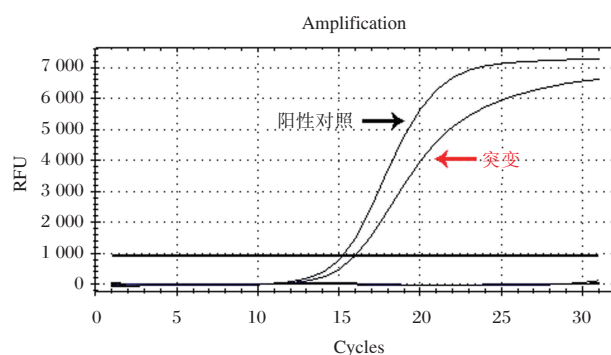


图1 扩增曲线显示*EGFR* Exon19 del 突变阳性
Figure 1 Amplification curve shows positive of *EGFR* Exon19 del mutation

融合基因阳性,阳性率稍增高达9.5%。

116例NSCLC中,5例发生*ROS1*基因重排(4.3%)(表2)。其中*ROS1* Exon34基因融合4例,*ROS1* Exon35基因融合1例。而在*EGFR*突变和*ALK*融合基因均为阴性的67例患者中,4例出现*ROS1*融合基因,阳性率稍增高达6%。

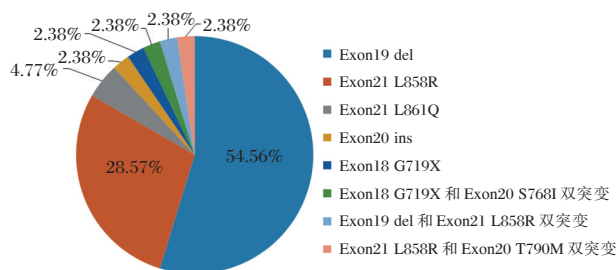


图2 42例EGFR突变NSCLC患者EGFR外显子突变率示意图

Figure 2 Mutation rates of EGFR exons of 42 patients of NSCLC with EGFR mutation

2.2 EGFR基因突变、ALK或ROS1融合基因与临床病理的相关性

EGFR基因在女性患者中的突变率为52.3%，高于男性患者的26.4% ($P=0.005$)；在腺癌患者中EGFR的突变率为45.2%，而鳞状细胞癌等其他非腺癌患者未见EGFR突变 ($P<0.0001$)。EGFR突变在患者年龄、吸烟史、临床分期等方面的差异无统计学意义 (P 值分别为0.218, 0.973, 0.902) (表2)。

ALK融合基因在年龄小于60岁组中的发生率为13.5%，高于超过60岁组中的1.6% ($P=0.032$)。此外，ALK在除年龄外等方面或ROS1融合基因与

表2 EGFR、ALK和ROS1基因异常与NSCLC临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between EGFR, ALK and ROS1 gene alterations and the clinicopathological characteristics of NSCLC

	n	EGFR [n(%)]		P值	ALK [n(%)]		P值	ROS1 [n(%)]		P值
		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
总例数	116	42(36.2)	74(63.8)		8(6.9)	108(93.1)		5(4.3)	111(95.7)	
年龄(岁)										
<60	52	22(42.3)	30(57.7)	0.218	7(13.5)	45(86.5)	0.032	3(5.8)	49(94.2)	0.812
≥60	64	20(31.3)	44(68.7)		1(1.6)	63(98.4)		2(3.1)	62(96.9)	
性别										
女	44	23(52.3)	21(47.7)	0.005	5(11.4)	39(88.6)	0.268	2(4.5)	42(95.5)	0.923
男	72	19(26.4)	53(73.6)		3(4.2)	69(95.8)		3(4.2)	69(95.8)	
吸烟史										
无	61	22(36.1)	39(63.9)	0.973	5(8.2)	56(91.8)	0.83	3(4.9)	58(95.1)	0.735
有	55	20(36.4)	35(63.6)		3(5.5)	52(94.5)		2(3.6)	53(96.4)	
病理组织学类型										
腺癌	93	42(45.2)	51(54.8)	<0.0001	8(8.6)	85(91.4)	0.353	5(5.4)	88(94.6)	0.581
其他	23	0(0)	23(100)		0(0)	23(100)		0(0)	23(100)	
临床分期										
I~II	20	7(35.0)	13(65.0)	0.902	1(5.0)	19(95.0)	0.702	0(0)	20(100)	0.586
III~IV	96	35(36.5)	61(63.5)		7(7.3)	89(92.7)		5(5.2)	91(94.8)	

患者的临床病理特征中的差异无统计学意义 (表2)。

2.3 EGFR基因外显子双重突变和ALK或ROS1融合基因共存突变分析

116例NSCLC中，EGFR外显子双重突变3例，其中Exon18 G719X和Exon20 S768I双突变1例，Exon19 del和Exon21 L858R双突变1例，

Exon21 L858R和Exon20 T790M双突变1例(图2)。值得注意的是，研究检测出1例晚期年轻女性患者具有EML4 Exon6/13/20-ALK Exon20融合基因和EGFR Exon19 del共存突变(表3)。1例晚期年轻男性患者具有SLC 34A2 Exon4/14-ROS1 Exon34融合基因和EGFR Exon19 del共存突变(表3)。

表3 EGFR 双重突变、EGFR 与 ALK 或 ROS1 共存突变的 NSCLC 临床病理特征

Table 3 Clinicopathological features of NSCLC with double exons mutations of EGFR and coexistent alterations of EGFR and ALK or ROS1

病例号	性别	年龄	吸烟史	取材部位	组织学类型	临床分期	EGFR 突变类型	ALK 融合基因类型	ROS1 融合基因类型
1	男	58	有	左肺下叶穿刺活检	腺癌	IV	Exon18 G719X; Exon20 S768I	-	-
2	女	64	无	右肺上叶穿刺活检	腺癌	IV	Exon19 del; Exon20 L858R	-	-
3	女	47	无	左肺上叶穿刺活检	腺癌	IV	Exon20 L858R, Exon20 T790M	-	-
4	女	35	无	左肺上叶穿刺活检	腺癌	IV	Exon19 del	EML4 Exon6/13/ 20-ALK Exon20	-
5	男	29	有	右肺下叶穿刺活检	腺癌	IVa	Exon19 del	-	SLC34A2 Exon4/ 14-ROS1 Exon34

3 讨论

肺癌作为世界上特别是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,遗传学上具有很高的异质性^[14]。随着针对 NSCLC 驱动基因 EGFR 突变、ALK 和 ROS1 融合基因的一系列酪氨酸激酶抑制剂药物的开发,以及临床分子靶向治疗的深入开展,总结分析 NSCLC 患者驱动基因异常的特点,分析驱动基因的互斥或共存突变特性,有助于加强对 NSCLC 患者驱动基因检测的认识,为促进多驱动基因联合检测提供实验依据^[3, 14]。

EGFR 是一种跨膜受体酪氨酸激酶,参与细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等多种信号通路的调节^[15]。研究发现,EGFR 基因突变在女性、无吸烟史、腺癌及亚裔人群中的发生率较高。Shi 等^[15]在包括来自 7 个亚洲地区的 1 482 例患者的研究显示,EGFR 突变率在亚洲女性中高达 61.1%,无吸烟史的患者中为 60.7%。本研究结果也显示 EGFR 基因在女性患者中的突变率高于男性;在腺癌患者中 EGFR 的突变率为 45.2%,而 21 例鳞状细胞癌,1 例腺样囊性癌,1 例粘液表皮样癌患者中均未见 EGFR 突变。此外,EGFR 基因突变主要集中在 Exon18-21,根据 Li 等^[16]对 5 125 例中国肺癌患者的研究显示,36.2%的患者发生 EGFR 突变,其中 Exon19 del 突变约占总 EGFR 突变的

49.7%, Exon21 L858R 和 L861Q 突变约占 46.7%, EGFR 双重突变约占 3.1%。本研究结果与该文献报道基本一致, Exon19 和 Exon21 为最常见突变的 2 种外显子, EGFR 双重突变率为 7.1%。EGFR 的二次突变如 T790M 突变是最常见的获得性耐药突变机制^[17]。值得注意的是,在 Li 等^[16]的研究发现在从未接受酪氨酸激酶抑制剂治疗的患者中,大约 2.4% 的患者检测出 T790M 或 E545K 这 2 种耐药突变。本研究也在未接受酪氨酸激酶抑制剂治疗的患者中检测出 EGFR L858R 和 T790M 双重突变 1 例,这些实验结果表明 NSCLC 中 EGFR 基因突变的异质性和复杂性。

NSCLC 中 ALK 融合基因最常见的类型为 EML4-ALK 融合基因,少部分为 KIF5B-ALK 和 TFG-ALK 融合基因^[18]。它们产生的融合蛋白可使 ALK 受体持续自磷酸化,激活下游信号通路导致细胞恶性转化^[18]。Pan 等^[19]利用 qRT-PCR 技术检测 1 139 例中国肺腺癌患者 ALK 融合基因状态,结果显示 ALK 融合基因阳性率为 5.1%,且在小于 60 岁组中的发生率为 6.7%,高于超过 60 岁组的 3.2%。ALK 融合基因阳性在患者性别、吸烟史和临床分期中的差异无统计学意义^[19]。Pan 等^[19]的研究与本研究结果均显示在小于 60 岁的患者中 ALK 融合基因的发生率相对更高,因此在临床上需要重视在年轻患者中 ALK 融合基因的检测。

ROS1 属于 II 类受体酪氨酸激酶的胰岛素受体家族, *ROS1* 融合基因将异常激活多种下游信号通路, 如 RAS - MAPK/ERK、JAK/STAT3、PI3K/AKT/mTOR, 导致细胞过度增殖、抑制凋亡、促进细胞侵袭和迁徙^[19-20]。*ROS1* 融合基因在 NSCLC 中的阳性率约为 1.0%~3.4%, 常见于年轻、无吸烟史、亚裔和晚期的 NSCLC 患者, 在 *EGFR*、*ALK* 和 *KRAS* 均阴性的患者中, *ROS1* 融合基因的阳性率可达 5.7%^[19-21]。本研究结果亦显示 5 例 *ROS1* 融合基因均发生于腺癌和晚期 NSCLC 患者, 但限于样本量有限, 仍有待进一步累积病例进行统计分析。

Zhang 等^[22]研究发现, 在 103 例中国 NSCLC 患者中, *ALK* 融合基因阳性率为 11.6%; 而在同时缺乏 *EGFR* 和 *KRAS* 突变的腺癌患者中 *ALK* 融合基因阳性率升高达 42.8%。本研究结果也显示, *ALK* 融合基因阳性率在 *EGFR* 突变阴性患者中较总体患者中稍增高; 同样, *ROS1* 融合基因阳性率在 *EGFR* 突变和 *ALK* 融合基因均为阴性的患者中较总体患者中稍增高。这些结果也证实肺癌驱动基因的激活突变具有一定程度的互斥现象。

尽管既往研究认为肺癌驱动基因的激活突变是绝对互斥的^[4-5]。但最近有少数研究报道了 *EGFR* 和 *ALK* 突变并存的 NSCLC 病例, 这些病例特点是大部分为女性患者、亚裔、无吸烟史的晚期 NSCLC 患者^[6-7]。并且与传统观点认为 *ALK* 融合基因会导致 *EGFR* 突变患者对酪氨酸激酶抑制剂耐药不同^[23], 研究显示对 *ALK* 和 *EGFR* 共存突变的患者加用 *ALK* 抑制剂治疗, 可提高患者的总体生存率^[6-7]。此外, 国内外仅见 *EGFR* 和 *ROS1* 共存突变的散在个案报道, 主要发生于非吸烟的腺癌患者^[10-12]。本组研究检测出 1 例 35 岁女性腺癌晚期患者具有 *EML4-ALK* 融合基因和 *EGFR* Exon19 del 突变, 1 例 29 岁男性腺癌晚期患者具有 *ROS1* 融合基因和 *EGFR* Exon19 del 突变。此类病例仍需要累积资料研究, 有研究提出同时应用多种靶向药物联合治疗可能使这一组罕见 NSCLC 患者受益^[12]。

综上, 本研究采用扩增阻滞突变系统方法对 116 例 NSCLC 进行 *EGFR*、*ALK* 和 *ROS1* 基因联合检测, 结果显示女性、较年轻的、腺癌患者常常出现驱动基因的突变。NSCLC 驱动基因异常具有一

定的互斥性, 但少数年轻患者仍可具有 *EGFR* 和 *ALK* 或 *ROS1* 共存突变。因此, 在治疗初期的多驱动基因联合检测, 对促进 NSCLC 分子靶向药物联合治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30.
- [2] Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, et al. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide [J]. Ann Transl Med, 2016, 4(8):150-153.
- [3] Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the college of American pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the association for molecular pathology [J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(3):323-358.
- [4] Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, et al. *ALK* rearrangements are mutually exclusive with mutations in *EGFR* or *KRAS*; an analysis of 1 683 patients with non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(15):4273-4281.
- [5] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. *EML4-ALK* fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers [J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(1):13-17.
- [6] Yang JJ, Zhang XC, Su J, et al. Lung cancers with concomitant *EGFR* mutations and *ALK* rearrangements: diverse responses to *EGFR*-TKI and crizotinib in relation to diverse receptors phosphorylation [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(5):1383-1392.
- [7] Won JK, Keam B, Koh J, et al. Concomitant *ALK* translocation and *EGFR* mutation in lung cancer: a comparison of direct sequencing and sensitive assays and the impact on responsiveness to tyrosine kinase inhibitor [J]. Ann Oncol, 2015, 26(2):348-354.
- [8] 宋业颖, 许春伟, 吴永芳, 等. 非小细胞肺癌患者肿瘤组织中驱动基因的分子病理检测分析 [J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(6):970-977.
- [9] 蔡忠福, 欧阳学农, 余宗阳, 等. *EGFR* 与 *EML4-ALK* 基因突变共存型非小细胞肺癌 1 例 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(6):575-576.
- [10] Ju L, Han M, Zhao C, et al. *EGFR*, *KRAS* and *ROS1* variants coexist in a lung adenocarcinoma patient [J]. Lung Cancer, 2016, 95:94-97.

- [11] Zhu YC, Xu CW, Ye XQ, et al. Lung cancer with concurrent EGFR mutation and ROS1 rearrangement: a case report and review of the literature [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:4301-4305.
- [12] Tang Z, Zhang J, Lu X, et al. Coexistent genetic alterations involving ALK, RET, ROS1 or MET in 15 cases of lung adenocarcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2018, 31(2):307-312.
- [13] Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(9):1243-1260.
- [14] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066):299-311.
- [15] Shi Y, Au JS, Thongprasert S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER) [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(2):154-162.
- [16] Li S, Li L, Zhu Y, et al. Coexistence of EGFR with KRAS, or BRAF, or PIK3CA somatic mutations in lung cancer: a comprehensive mutation profiling from 5125 Chinese cohorts [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(11):2812-2820.
- [17] Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8):2240-2247.
- [18] Costa DB, Shaw AT, Ou SH, et al. Clinical experience with crizotinib in patients with advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastases [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(17):1881-1888.
- [19] Pan Y, Zhang Y, Li Y, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features [J]. *Lung Cancer*, 2014, 84(2):121-126.
- [20] Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(21):1963-1971.
- [21] Kim HR, Lim SM, Kim HJ, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9):2364-2370.
- [22] Zhang X, Zhang S, Yang X, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:188-197.
- [23] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(26):4247-4253.

· 论 著 ·

沙眼衣原体、单纯疱疹病毒2型、人乳头瘤病毒16型多重荧光定量PCR检测方法的建立及其应用

胡天* 卓永光 樊祖茜 黄永霞

[摘要] 目的 建立一种可准确、快速检测沙眼衣原体、单纯疱疹病毒2型、人乳头瘤病毒16型3种病原体DNA的多重荧光定量PCR检测方法。方法 本研究针对沙眼衣原体、单纯疱疹病毒2型、人乳头瘤病毒16型分别设计了一对特异性探针引物,构建了可同时检测沙眼衣原体、单纯疱疹病毒2型、人乳头瘤病毒16型的多重荧光PCR反应体系,并与商业试剂同时检测300例临床标本,评估其一致性。结果 性能评价结果显示,所建立的多重荧光PCR检测方法具有较好的特异性和敏感性,与对照商业试剂检查结果符合率达到100%。结论 所建立的多重荧光PCR检测方法能实现3种病原体的快速、正确定量检测。

[关键词] 多重荧光定量PCR;沙眼衣原体;单纯疱疹病毒2型;人乳头瘤病毒16型

Application of multiplex fluorescence quantitative PCR assay for detection of *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus type 2 and human papillomavirus type 16

HU Tian*, ZHUO Yongguang, FAN Zuqian, HUANG Yongxia

(Department of Clinical Laboratory, Qinzhou Maternal and Child Health-Care Hospital of Guangxi, Qinzhou, Guangxi, China, 535000)

[ABSTRACT] Objective To establish a multiplex quantitative PCR method for the accurate and rapid detection of DNA from 3 pathogens, *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus type 2 and human papillomavirus type 16. Methods A pair of specific probe - primers were designed for *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus type 2 and human papillomavirus type 16, respectively, and a simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus type 2, human papillomavirus type 16 was constructed. A multiplex PCR reaction system was used to simultaneously detect 300 clinical specimens with commercial reagents to assess their consistency. Results The results of performance showed that the established multiplex PCR assay had good specificity and sensitivity, and the coincidence rate with the control commercial reagents reached 100%. Conclusion The established multiplex PCR assay can achieve rapidly and accurately quantitative detection of 3 pathogens.

[KEY WORDS] Multiple fluorescence quantitative PCR; *Chlamydia trachomatis*; Herpes simplex virus type 2; Human papillomavirus type 16

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, CT)是常见的人类生殖道疾病致病菌^[1],还可导致呼吸道、眼结膜等疾病^[2]。单纯疱疹病毒2型(herpes sim-

plex virus-2, HSV-2)是引起生殖器疱疹最主要的原因。人乳头瘤病毒16型(human papillomavirus type 16, HPV16)与宫颈癌的发生、发展密切相

基金项目:广西钦州科技公关计划(20145008)

作者单位:广西钦州市妇幼保健院检验科,广西,钦州 535000

*通讯作者:胡天, E-mail:81132083@qq.com

关^[3-4]。文献报道,相比其他病毒亚型,HPV16型更有可能长期在宫颈上皮内复制生存^[5]和更易导致宫颈上皮内瘤变^[6-7]。在所有的高危型病毒中,HPV16型是流行程度最广的一种型别。HPV16型和HSV-2协同感染可增加宫颈癌的患病率,两者与宫颈癌的发生及其发展有着密切的关系^[8]。目前对这3种病原体的致病原因及其致病性都有较为系统的研究,CT、HSV-2和HPV16型3种病原体对健康造成了很大的危害。目前还未见3种病原体同时检测的报道。多重荧光定量PCR技术克服了常规PCR技术的很多难题。具有操作简便及很高的敏感性,它可以通过不同的引物设计在同一反应体系中同时对多个靶基因分子进行扩增^[9],达到对多种疾病的同步诊断,缩短检测时间,减少试剂消耗。因此,本文展开了多重PCR检测CT、HSV-2和HPV16型的方法研究,旨在建立同时快速检测这3种病毒的方法,并应用于临床实践中。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、解脲支原体、人型支原体、生殖道支原体、肺炎衣原体及鹦鹉热衣原体培养物为本科室微生物室所留菌种,沙眼衣原体L血清型培养物购自西南医院检验科,HPV16型为本科室用凯普HPV基因分型试剂检为16型阳性所保留的标本。临床检测标本为本单位2015年1月至2016年12月门诊收集的妇女阴道拭子300例。标本保存于-20℃。

1.1.2 主要试剂与仪器

天跟生化科技(北京)有限公司基因组DNA提取试剂盒DP304,质粒小量提取试剂盒DP103,北京康为世纪生物科技有限公司GoldStar Taq-Man Mixture(探针法)CW0932。杭州安杰思医学科技有限公司AFD9600核酸扩增仪。Taq酶、PCR反应液为宝生物工程(大连)有限公司产品。全自动化学发光/荧光图像分析系统:上海天能科技有限公司5200 Multi, PMD-18T载体。

1.2 多重PCR法

1.2.1 引物的设计与合成

通过在NCBI上查找比对CT、HSV-2、HPV16型的保守序列,用DNASTAR软件对这3种基因序列进行比对并设计3对引物(表1)和相应的探针(表2)。

表1 3种病原体的引物序列及其产物长度

Table 1 Primer sequences and product length of 3 pathogens

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)
CT-F	5'-TGATTTGAGCGTGTGTAGCG-3'	160
CT-R	5'-ACGGAGATCTACGCAATGGA-3'	
HSV2-F	5'-TGGTAAACACGCTTCACCCC-3'	226
HSV2-R	5'-CTGCGCCAAATACGCCTTAG-3'	
HPV16-F	5'-ACAGATTCCAGGTGGCCTTAT-3'	175
HPV16-R	5'-AAGCTCATACACTGGATTTCCGTT-3'	

表2 3种病原体的寡核苷酸探针序列

Table 2 Oligonucleotide probe sequences of 3 pathogens

引物名称	寡核苷酸探针序列	荧光报告基团
CT-probe	5'-TCCGCTCGTTTAATGAGTACAATGA-3'	FAM
HSV2-probe	5'-TGGAAATGTAAACACCACCAATCGA-3'	ROX
HPV16-probe	5'-CCTCGCTGAAGGTGGCCGATCC-3'	VIC

1.2.2 3种病原体DNA目的片段扩增及其扩增片段验证

用基因组DNA提取试剂盒DP304提取3种病原体标准菌株DNA,用3对特异性引物分别扩增所提取的标准菌株DNA模板,应用相应引物建立

单重PCR体系。PCR反应体系25 μL:2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, DNA模板1.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1.0 μL,灭菌双蒸水补至25 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性45 s,56℃退火30 s,72℃延伸45 s,40个循环;72℃

延伸 5 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果并送 PCR 产物进行测序,取凝胶回收的目的片段与 pMD-18T 载体链接,与感受态细胞进行转化,再进行重组质粒的提取与双酶切鉴定。

1.2.3 多重 PCR 反应体系建立、优化及标准曲线的建立

对影响多重 PCR 扩增效果的 Taq 酶浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、引物混合物(Primer Mix)浓度和退火温度 5 个参数进行调整和优化,通过多次试验从而确定最佳参数。多重 PCR 反应体系 50 μL: 2×Taq PCR MasterMix 25 μL, 3 种病原体 DNA 模板各 1.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, 灭菌双蒸水补至 50 μL, 退火温度调整为 58℃。2%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,采用凝胶图像分析系统观察并记录结果。测 3 种病原体重组质粒浓度并且换算成拷贝数后,10 倍稀释成 10⁴ ~ 10⁷ 拷贝/μL 的 4 个梯度,用稀释成的 4 个浓度梯度的质粒 DNA 作为模版进行扩增(探针和上、下游引物稀释成浓度为 10 μmol/L)反应结束后。利用计算机自带的分析软件自动得到标准曲线。

1.2.4 敏感性检测

3 种病原体 DNA 按 10 倍梯度稀释为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10 拷贝/μL 8 个样本,检测多重 PCR 的敏感性。

1.2.5 特异性检测

分别以 3 种病原体基因组 DNA 的混合物样本、淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、解脲支原体、人型支原体、生殖道支原体、肺炎衣原体及鹦鹉热衣原体培养物的 DNA 样本为模板,用同样的反应体系进行多重 PCR 扩增,检测所建方法的特异性。

1.2.6 临床标本应用性检测

用所建立的多重荧光定量 PCR 检测方法和商业试剂盒同时检测 300 例临床标本,评估所建多重定量 PCR 检测方法 with 常规单重荧光试剂鉴定方法的一致性,以验证本研究建立的多重荧光定量 PCR 法的临床可行性。

2 结果

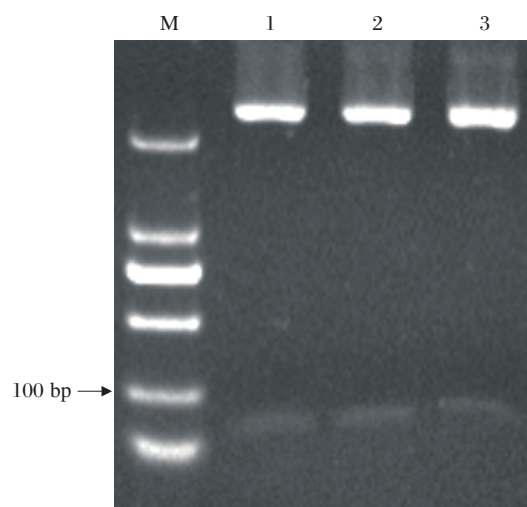
2.1 单重 PCR 扩增结果

用建立的单重 PCR 反应体系对目的基因扩增,产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,能扩

增出 CT 为 160 bp, HSV-2 为 226 bp, HPV16 型为 175 bp, 与预期扩增片段大小相符。3 种病原体目的片段双酶切结果进一步证实扩增的正确(图 1)。

2.2 多重 PCR 反应体系标准曲线的建立

3 种病原体的重组质粒分别稀释成 4 个梯度的模板,取探针和上、下游引物稀释成浓度为 10 μmol/L, 扩增后利用计算机自带分析软件自动得到标准曲线(图 2)。



M: DL20000 DNA Marker; 1: pMD18T-CT 双酶切; 2: pMD18T-HPV16 型 双酶切; 3: pMD18T-HSV-2 双酶切。

图 1 目的片段双酶切电泳结果

Figure 1 The electrophoresis figure of double enzyme digestion of target fragments

2.3 多重荧光定量 PCR 性能评价结果

2.3.1 多重荧光定量 PCR 敏感性检测

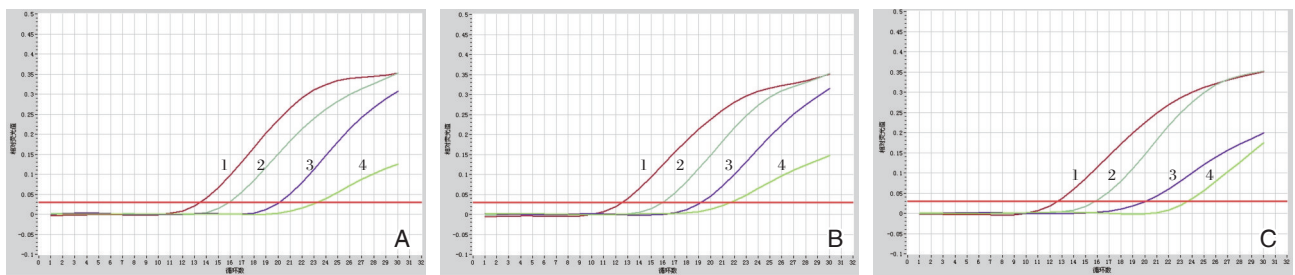
如图 3 所示,用 3 种病原体重组质粒 8 个梯度浓度进行多重 PCR 扩增,经过分析得知所建立的多重荧光 PCR 体系 CT、HSV-2 以及 HPV16 型的最小检出量为 1 000 拷贝/μL。

2.3.2 多重荧光定量 PCR 特异性测定

分别以 3 种病原体基因组 DNA 的混合物样本和淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、解脲支原体、人型支原体、生殖道支原体、肺炎衣原体及鹦鹉热衣原体培养物的 DNA 样本为模板进行多重荧光定量 PCR 扩增。图 4 表明 CT、HSV-2、HPV16 型的特异性均为 100%。

2.3.3 多重荧光定量 PCR 检测方法的应用

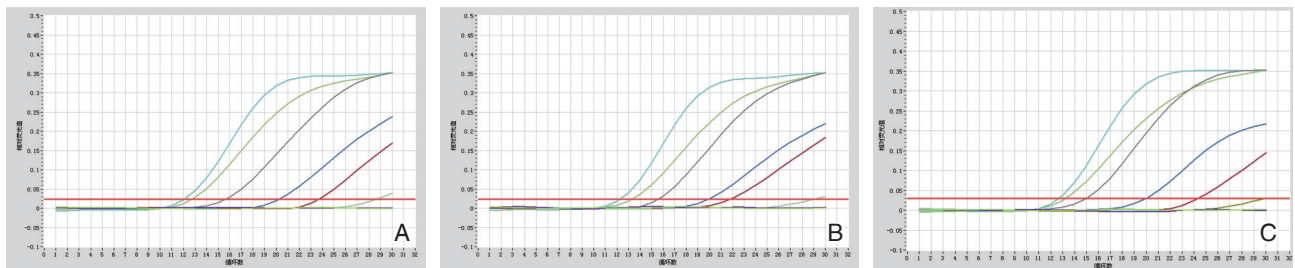
多重荧光定量 PCR 检测的 300 例标本中 CT



A: CT标准曲线; B: HSV-2标准曲线; C: HPV16型标准曲线。1: 10^7 拷贝/ μL ; 2: 10^6 拷贝/ μL ; 3: 10^5 拷贝/ μL ; 4: 10^4 拷贝/ μL 。

图2 3种病原体质粒标准曲线

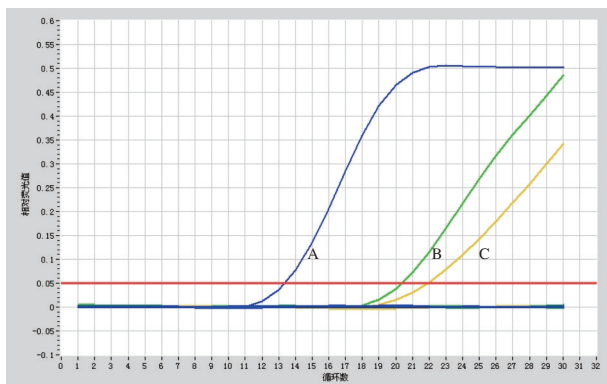
Figure 2 Standard curve of 3 kinds of pathogen plasmids



A: CT敏感性检测; B: HSV-2敏感性检测; C: HPV16型敏感性检测。

图3 3种病原体多重荧光定量PCR法敏感性检测示意图

Figure 3 Sensitivity testing diagrams of 3 kinds of pathogens with multiplex fluorescence quantitative PCR assay



A: CT; B: HSV-2; C: HPV16型。

图4 CT、HSV-2、HPV16型多重荧光定量PCR法特异性检测示意图

Figure 4 Specificity detection diagram of CT, HSV-2 and HPV16 with multiplex fluorescence quantitative PCR assay

阳性数为44例,检出率14.7%; HPV16型12例,检出率4%; HSV-2 16例,检出率5.3%。60例(20%)为全阴性。双重感染的患者检出14例(4.6%),分别为:CT+HPV16型4例(1.3%),CT+HSV-2 6例(2%),HPV16型+HSV-2 4例(1.3%)。无三重感染的患者。用中山大学达安基因股份有限公司的CT和HSV-2试剂盒检测300例标本的

CT和HSV-2的感染情况,用凯普HPV基因分型试剂检测HPV16型的感染情况,也得到同样的数据。本研究设计的多重PCR与商业试剂盒具有很好的一致性(CT符合率为100%,HSV-2为100%,HPV16为100%)。

3 讨论

随着分子生物技术的发展,PCR方法尤其是多重PCR方法以其灵敏度高、特异性强、成本低、快捷等优点而越来越被重视。多重PCR(multiplex PCR)又称多重引物PCR或者复合PCR,它是在同一PCR反应体系里加入多对引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,其反应原理、反应试剂和操作与普通PCR相同。但是由于反应中要求多对引物之间不能发生相互作用,扩增产物大小相近就很难通过电泳分开,因此本研究的多重荧光定量PCR就解决了此问题。多数学者^[10-11]认为多重PCR体系的优化主要为改变退火温度、 MgCl_2 、dNTPs和聚合酶的浓度等。多重PCR扩增对试验操作的条件要求就很高,任何一种试验条件控制不当,都将导致扩增的失败^[12]。这一概念是由Chamberlian等^[13]首次提出,目前已经被广泛应用

于医学及生物领域,包括基因敲除分析、突变、多态性分析、定量分析、RNA检测及微生物耐药检测,不仅是科研的主要手段,也具有很高的实用价值^[14]。国内报道的多重PCR体系,大多都是针对同一DNA模板的不同区域扩增多个片段,而对不同模板的多重PCR体系的建立却很少见。本试验是针对3个不同病原体的基因设计,需要对多重PCR反应体系的目标产物进行分析、反复试验才能建立最适宜的反应体系和反应条件。CT可能导致不可逆炎症后遗病变,甚至可能与某些肿瘤的发生密切相关^[15]。HSV-2曾是最早被认为在诱发宫颈癌过程中起重要作用的一种病毒^[16]。HPV的亚型现已发现有100多种,其中HPV16型是宫颈癌的高危因素^[4, 17],HPV16型最易导致宫颈鳞癌。这些研究都说明CT、HSV-2、HPV16型对宫颈病的发生,甚至发展为宫颈癌都有密切的关系。这3种病原体的检查就非常有必要作为临检常规项目,但是常规的PCR检测法为单对引物扩增一种病原体DNA,每次只能单独检测一种病原体,这样容易在操作中引起交叉污染以及增加患者的检查费用,多重荧光PCR能同时解决诸多问题。

对于几个病原体的同时检测,目前有分子杂交法、PCR-琼脂糖电泳法、基因芯片和多重荧光定量等方法。分子杂交法操作比较繁琐,费时而且灵敏度不是很高。PCR-琼脂糖电泳法容易导致交叉污染,费时而且不能定量。基因芯片成本高,增加患者的费用,对常规项目的检测很难推广。本研究针对CT、HSV-2、HPV16型分别设计引物和探针,同时在这3种探针的5'端分别标记了FAM、ROX、VIC不同波长的报告荧光基团。将CT、HSV-2、HPV16型的引物和探针混合于一个反应管中同时进行3种病原体DNA的扩增。多重荧光PCR是在单重荧光PCR技术基础上发展起来的技术,在设计引物和探针时,要在保证特异性的同时,多对引物和多对探针之间的T_m值也应尽量接近。结果显示本研究设计的3对引物的T_m值均在56℃左右,3对探针的T_m值在58℃,3种病原体扩增效率基本保持一致,且3种荧光信号的收集不存在互相干扰。

试验结果数据表明设计的引物探针可以应用多重荧光定量PCR技术检测临床标本,本试验设计的多重荧光定量PCR的检测下线为1 000

拷贝/μL,与中山大学达安基因股份有限公司商业试剂的检测下线500拷贝/μL还是有些差距,这与多重荧光定量PCR反应体系里的各种成分比例有关。从定量分析的结果可以看出本研究虽然对3种病原体的靶基因的引物和探针浓度进行优化,但是3种病原体病毒的检测最低阈值还是偏高。由于本试验的临床标本数只有300例,所以还需要大量的临床数据来验证实验的稳定性,如果今后在临床大规模使用,还应在本试验基础上继续进行优化。本研究的下一步计划是用本实验方法来检测宫颈癌患者中3种病原体感染情况,为临床提供更系统、更具体的实验数据支持。综上所述,本研究建立的3重荧光定量PCR检测方法具有特异性好、灵敏度高、快速简便等优点,可为CT、HSV-2、HPV16型同时快速的检测提供一种有效的技术手段。

参考文献

- [1] 陈曦,刘朝晖.生殖道沙眼衣原体感染的流行病学现状[J].中国性科学,2016,25(1):95-97.
- [2] 肖秀美,高爽,杨旭,等.2998例男性患者解脲脲原体、淋病奈瑟菌和沙眼衣原体感染调查分析[J].中国男科学杂志,2016,30(1):21-24.
- [3] 李小梅.宫颈癌与性传播疾病的相关性分析[J].实用医技杂志,2008,15(21):2750-2751.
- [4] Zanotti KM, Belinson J. Update on the diagnosis and treatment of human papillomavirus infection [J]. *Cleve Clin J Med*, 2002, 69(12): 948, 951-955, 56 passim.
- [5] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution [J]. *Virology*, 2005, 337(1): 76-84.
- [6] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14): 1072-1079.
- [7] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, et al. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14): 1066-1071.
- [8] 李芳.人乳头状瘤病毒16/18及单纯疱疹病毒2型协同感染与宫颈病变的相关性分析[J].中国妇幼保健,2015,30(21):3596-3598. (下转第405页)

HAART 过程 HIV/AIDS 患者 PBMC 中 HIV-1 前病毒 DNA 的动态变化及其意义

陈伟烈^{1*} 何瑞英¹ 雷华丽¹ 袁小珍¹ 胡凤玉¹ 李凌华²

[摘要] 目的 分析高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 过程中 HIV-1 感染者/艾滋病 (HIV/AIDS) 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中 HIV-1 前病毒 DNA 的动态变化及其在临床治疗中的意义。方法 38 例接受 HAART 最长至 168 周的 HIV/AIDS 患者纳入本研究, 在不同随访时间点检测患者 PBMC 中 HIV-1 DNA 水平, 并与同时间点外周血 CD4⁺ T 细胞数量及血浆 HIV-1 RNA 病毒载量进行比较, 数据进行统计学处理及相关性分析。结果 随着 HAART 时间的增加, 患者 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 及血浆 HIV-1 RNA 水平逐渐下降 ($r = -0.27, P = 0.0003; r = -0.39, P < 0.0001$), 外周血 CD4⁺ T 细胞计数逐渐上升 ($r = 0.55, P < 0.0001$); HIV-1 前病毒总 DNA 水平与 CD4⁺ T 细胞数量之间呈负相关 ($r = -0.16, P = 0.0397$), 与 HIV-1 RNA 病毒载量之间呈正相关 ($r = 0.35, P < 0.0001$)。不同 HAART 方案之间 HIV-1 前病毒总 DNA 水平随 HAART 进行而下降的患者比例没有差异 ($\chi^2 = 1.030, P = 0.598$)。结论 HAART 过程 HIV/AIDS 患者 PBMC 中 HIV-1 前病毒 DNA 水平逐渐下降, 与外周血 CD4⁺ T 细胞数量、血浆 HIV-1 RNA 病毒载量之间有一定相关性, 可作为 HAART 效果监测及病情预测的一个指标。

[关键词] 人类免疫缺陷病毒 1 型; 高效抗逆转录病毒治疗; 外周血单个核细胞; 前病毒 DNA

Dynamic change of HIV-1 proviral DNA in PBMC from HIV/AIDS patients during highly active antiretroviral therapy and its significance

CHEN Weilie^{1*}, HE Ruiying¹, LEI Huali¹, YUAN Xiaozhen¹, HU Fengyu¹, LI Linghua²

(1. Institute of Infectious Diseases, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510060; 2. Center for Infectious Diseases, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 510060)

[ABSTRACT] Objective To investigate the dynamic change of total HIV-1 DNA in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from HIV-1 infected/AIDS (HIV/AIDS) patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) and its significance. Methods 38 patients with HIV/AIDS who received HAART for up to 168 weeks were enrolled in the study. HIV-1 DNA levels in PBMC were measured at different follow-up time points, and the number of peripheral blood CD4⁺ T cells and plasma HIV-1 were simultaneously observed. The RNA viral load was compared and the data were statistically analyzed. Results The total HIV-1 DNA and HIV-1 RNA load decreased ($r = -0.27, P = 0.0003$ and $r = -0.39, P < 0.0001$, respectively) and CD4⁺ T cell count increased ($r = 0.55, P < 0.0001$) with the increasing HAART time. There was a negative correlation between the total DNA level of HIV-1 provirus and the number of CD4⁺ T cells ($r = -0.16, P = 0.0397$), and a positive correlation between the total DNA level of HIV-1 provirus and HIV-1 RNA virus loads ($r = 0.35, P < 0.0001$). There was no difference in the proportion of patients with

基金项目:广州市科信局科技惠民专项(2014Y2-00149)

作者单位:1. 广州市第八人民医院传染病研究所, 广东, 广州 510060

2. 广州市第八人民医院感染病中心, 广东, 广州 510060

*通讯作者:陈伟烈, E-mail:gz8hewl@126.com

HIV-1 proviral total DNA levels decreasing with HAART between different HAART regimens ($\chi^2=1.030$, $P=0.598$). **Conclusions** The HIV-1 proviral DNA level in PBMC of HIV/AIDS patients in HAART process is gradually decreased, and there is a correlation between the number of peripheral blood CD4⁺ T cells and plasma HIV-1 RNA viral load, which can be used as an indicator to monitor the treatment effect and predict the disease progression.

[KEY WORDS] Human immunodeficiency virus type 1; Highly active antiretroviral therapy; Peripheral blood mononuclear cell; HIV-1 proviral DNA

艾滋病的病死率及传染率明显下降得益于高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 的广泛使用^[1], 然而患者体内人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 可以潜伏形式即前病毒 DNA 持续存在, 在细胞和组织中形成病毒储存库, 持续存在的 HIV 储存库是 HIV 感染不能根治的关键^[2]。一旦停止用药, 储存库的病毒将有机会再次复制和扩增, 导致体内病毒载量迅速反弹^[3]。近年来针对 HIV 潜伏储存库的临床治疗策略研究重新点燃了人们对治愈 HIV 感染的希望^[4], 但临床上需要评估病毒储存库准确可靠的标志物^[5]。细胞相关性总 HIV DNA 是一个通用的生物标志物, 其包括编码有活性及缺陷病毒的整合型及非整合型病毒基因组, 很容易从全血、细胞或组织中进行检测, 被认为是参与疾病进程的所有感染细胞和组织中持续存在的各种形式 HIV 储存库的一个生物标志物^[6]。国外对 HIV 储存库已有不少研究, 但关于中国 HIV/艾滋病 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 患者的 HIV 储存库及其在 HAART 中的动态变化报道不多。由于中外患者遗传背景存在差异, 各国 HIV 流行株也有所不同, 因此了解中国 HIV/AIDS 患者血细胞中 HIV 前病毒 DNA 储存库的特点及其在 HAART 过程的变化规律有着重要的临床意义。本文对 38 例进行 HAART 并随访长至 168 周的 HIV/AIDS 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中 HIV-1 总 DNA 的水平进行动态检测, 并与相应随访时间点外周血 CD4⁺T 细胞数量、血浆 HIV-1 RNA 病毒载量进行相关性分析, 探讨 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 检测在艾滋病 HAART 过程中的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2006 年 1 月至 2010 年 5 月期间我院门诊或住

院接受 HAART 治疗后无病毒血症或低病毒血症的 AIDS 患者 38 例, 其中男 26 例, 女 12 例, 年龄 20~56 (33.8±7.6) 岁; 患者接受 HAART 治疗时间 48~168 (80.3±22.3) 周, 所有患者的随访时间点共计 170 个。HAART 总体方案为 2 种核苷类反转录酶抑制剂+一种非核苷类反转录酶抑制剂 [奈韦拉平 (nevirapine, NVP) 或依非韦伦 (efavirenz, EFV)] 或 2 种核苷类反转录酶抑制剂+一种蛋白酶抑制剂, 具体分组如下: 接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂+奈韦拉平 (NVP) 治疗患者为 I 组, 共 23 例, 其中 15 例患者接受司他夫定 (stavudine, D4T)+拉米夫定 (lamivudine, 3TC)+奈韦拉平 (NVP), 8 例患者接受齐多夫定 (zidovudine, AZT)+拉米夫定 (3TC)+奈韦拉平 (NVP); 接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂+依非韦伦 (EFV) 治疗患者为 II 组, 共 13 例, 其中 8 例患者接受司他夫定 (D4T)+拉米夫定 (3TC)+依非韦伦 (EFV), 3 例患者接受齐多夫定 (AZT)+拉米夫定 (3TC)+依非韦伦 (EFV), 2 例患者接受替诺福韦 (tenofovir, TDF)+拉米夫定 (3TC)+依非韦伦 (EFV); 接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂+一种蛋白酶抑制剂治疗患者为 III 组, 共 2 例, 其中 1 例患者接受司他夫定 (D4T)+拉米夫定 (3TC)+克力芝 (lopinavir/ritonavir, LPV/r), 1 例患者接受齐多夫定 (AZT)+拉米夫定 (3TC)+克力芝 (LPV/r)。本研究已通过广州市第八人民医院伦理委员会审查 (编号: 市八伦字 20121055)。

1.2 主要仪器及试剂

仪器: ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国), FACSCanto II 流式细胞仪 (BD, 美国), COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 96 全自动荧光定量分子诊断系统 (罗氏, 美国), 生物安全柜 (BAKER, 美国), 5417R 型低温高速离心机 (Eppendorf, 德国)。试剂: HIV-1 DNA 定量检测试剂盒 (广州海力特生物科技有限公司, 中国), Cobas

AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 1.0(罗氏,美国), CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC 四色荧光标记组合抗体(BD,美国), TruCOUNT管(BD,美国), 10浓缩溶血素(BD,美国)。

1.3 标本采集及保留

所有患者在相应随访时间点采集 EDTA-K2 抗凝静脉血 10 mL, 2 mL 全血用于 CD4⁺T 淋巴细胞数量检测, 8 mL 用于分离血浆及 PBMC, 血浆及 PBMC 分离后于 -80℃ 保存备用。

1.4 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 水平检测

依据 HIV-1 DNA 定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书进行操作。主要步骤如下:①提取 PBMC 中总 DNA, 加 5 μL 提取物、0.8 μL 酶至 44.2 μL PCR 反应液中, 按如下条件进行 PCR 反应: 37℃, 5 min; 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 65℃ 15 s, 72℃ 20 s 共 5 个循环; 95℃ 15 s, 62℃ 15 s, 72℃ 20 s, 共 10 个循环; 95℃ 15 s, 52℃ 15 s, 72℃ 32 s(荧光采集), 共 40 个循环。②HIV-1 总 DNA 计算: 同一份标本中, 用 2 条标准曲线分别定量的 HIV-1 总 DNA 定量值(单位: 拷贝/μL)除以细胞定量结果(单位: 细胞/μL), 再乘以 10⁶ 得出标本中每 10⁶ 个细胞中 HIV-1 总 DNA 含量(单位: 拷贝/10⁶ 个细胞)。检测结果以对数值表示。

1.5 血浆 HIV-1 RNA 病毒载量检测

按照罗氏 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 96 全自动荧光定量分子诊断系统及配套试剂罗氏 Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 1.0 说明书进行操作。简要步骤如下: 将试剂及耗材放入仪器, 吸取上述保留的血浆 1 mL 至样品处理管, 放入 COBAS AmpliPrep 全自动核酸提取系统, 病毒核酸提取后仪器自动加样至 PCR 反应管并自动传送至 COBAS TaqMan 96 系统进行逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增, 扩增的靶核酸位置是 HIV gag 区, 可扩增 HIV-1 M 组的 A~H 亚型, 扩增完成后软件依据样品扩增信号与内部定量标准品扩增信号自动计算出血浆中 HIV-1 RNA 水平, 试剂检测线性范围为 40~10⁷ 拷贝/mL。检测结果以对数值表示, 如检测结果低于检测下限, 则结果的对数值记为 0。

1.6 外周血 CD4⁺T 淋巴细胞数量检测

加 10 μL 四色荧光标记抗体至含有已知数量标准微球的 TruCOUNT 管后再加入 50 μL EDTA-

K2 抗凝全血, 室温避光放置 15 min 后加入 10 倍稀释溶血素 450 μL, 室温放置 15 min, TruCOUNT 管放入 FACSCanto II 流式细胞仪自动加样转盘中, 运行 FACSCanto 软件对 CD4⁺T 淋巴细胞进行检测, 检测完成软件自动计算出 T 细胞及其各亚群细胞的绝对值及相应百分比。

1.7 统计方法

数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 结果以均值±标准差、比例表示。使用相关性分析有关变量之间的相关性, 3 组 HAART 方案患者 HIV-1 前病毒总 DNA 水平随 HAART 进行而下降比例之间的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HAART 过程 HIV/AIDS 患者 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 水平、HIV-1 RNA 水平及 CD4⁺T 细胞计数的变化

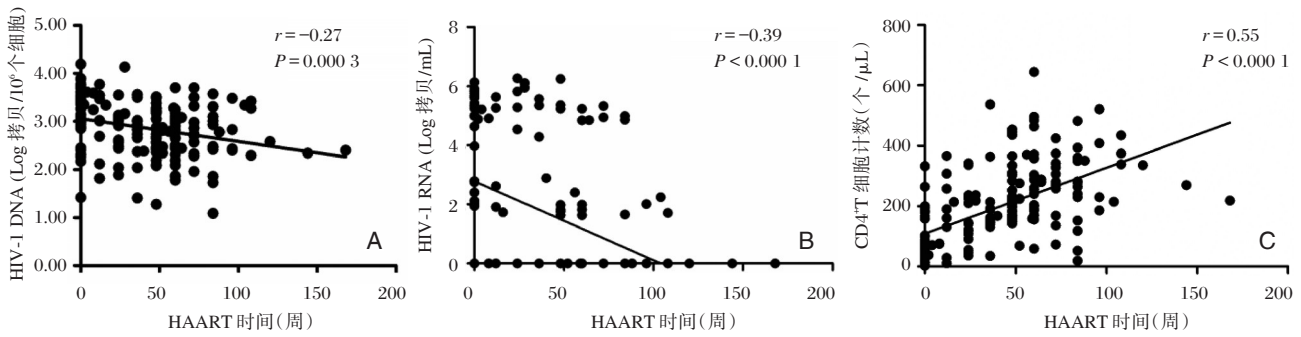
在 HAART 治疗基线(0 周)、治疗 48 周及最后一个随访时间点(平均 80 周)患者 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 水平分别为 3.13 ± 0.59 、 2.78 ± 0.53 、 2.72 ± 0.52 Log 拷贝/10⁶ 个细胞; HIV-1 RNA 病毒载量分别为 3.16 ± 2.50 、 1 ± 1.88 、 0.75 ± 1.51 Log 拷贝/mL; CD4⁺T 细胞计数分别为 75 ± 85 、 243 ± 99 、 283 ± 111 个/μL。图 1 显示, 随着 HAART 的进行, PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 及血浆 HIV-1 RNA 水平逐渐下降, 与 HAART 时间呈负相关(图 1A: $r = -0.27$, $P = 0.0003$; 图 1B: $r = -0.39$, $P < 0.0001$); 外周血 CD4⁺T 细胞计数逐渐上升, 与 HAART 时间呈正相关(图 1C: $r = 0.55$, $P < 0.0001$)。

2.2 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 水平与外周血 CD4⁺T 细胞数量、HIV-1 RNA 水平的关系

外周血 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 水平与 CD4⁺T 细胞数量之间呈负相关(图 2A: $r = -0.16$, $P = 0.0397$), 与 HIV-1 RNA 病毒载量之间呈正相关(图 2B: $r = 0.35$, $P < 0.0001$), 见图 2。

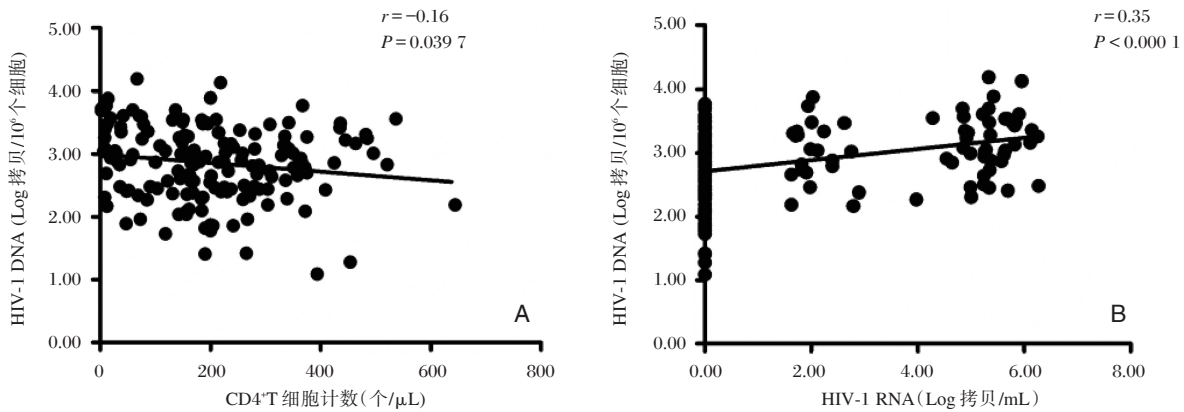
2.3 不同 HAART 方案患者外周血 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 水平随 HAART 进行而下降的比例

接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂 + 一种蛋白酶抑制剂治疗患者(Ⅲ组) HIV-1 前病毒总 DNA 水平随 HAART 进行而下降的比例最高(2 例患者均下降, 下降比例 2/2), 其次是接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂 + 奈韦拉平治疗患者(Ⅰ组, 23 例患者



A: HIV-1 总 DNA 水平与 HAART 时间的相关性; B: HIV-1 RNA 水平与 HAART 时间的相关性; C: CD4⁺T 细胞计数与 HAART 时间的相关性。

图1 PBMC 中 HIV-1 总 DNA、血浆 HIV-1 RNA 水平及外周血 CD4⁺T 细胞计数在 HAART 过程中的变化
Figure 1 Changes of total HIV-1 DNA, HIV-1 RNA level and CD4⁺T cell count during HAART



A: HIV-1 总 DNA 水平与 CD4⁺T 细胞计数的相关性; B: HIV-1 总 DNA 水平与 HIV-1 RNA 水平的相关性。

图2 HIV-1 总 DNA 水平与 CD4⁺T 细胞计数、HIV-1 RNA 水平的相关性
Figure 2 The correlation between total HIV-1 DNA level and CD4⁺T cell count, HIV-1 RNA load

中有 18 例患者下降,下降比例 18/23)及接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂+依非韦伦治疗患者(Ⅱ组,13 例患者中有 9 例患者下降,下降比例 9/13),但 3 组之间下降的比例相比较没有差异性($\chi^2=1.030, P=0.598$)。不同 HAART 方案患者 PBMC 中 HIV-1 总 DNA 水平在 HAART 过程中的变化见图 3。

3 讨论

由于 HIV-1 前病毒 DNA 可以不断被 HIV-1 病毒逆转录补充并且可被激活恢复病毒感染活性, HIV-1 DNA 水平可以提供有意义的治疗信息。CD4⁺T 淋巴细胞计数被认为是反映 HIV 感染者免疫状况损害最明确的指标,病毒载量则是监测 HIV 感染者病程进展的一个重要指标,CD4⁺T 淋巴细胞计数随着疾病的进展而降低,而病毒载量

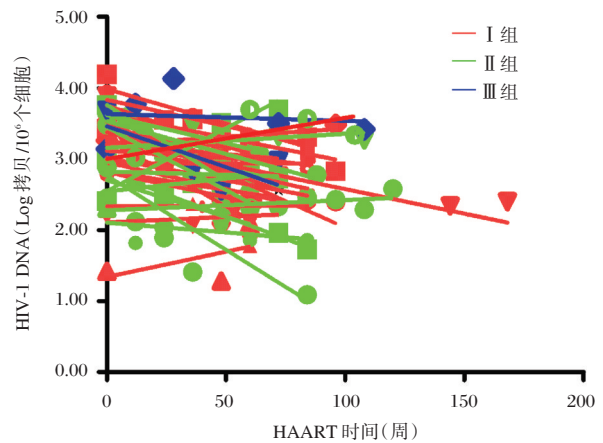


图3 不同 HAART 方案患者 HIV-1 总 DNA 水平在 HAART 过程中的变化

Figure 3 Changes of total HIV-1 DNA level of patients receiving different HAART practices during HAART

随着疾病的进展而升高,两者呈显著的负相关^[7-8];另外,有效的抗病毒治疗应伴有 CD4⁺ T 细胞数量升高及 HIV-1 RNA 病毒载量下降^[9-10],因此,了解 HIV-1 前病毒 DNA 水平与 CD4⁺ T 细胞数量及 HIV-1 RNA 病毒载量之间的关系,有助于探讨 HIV-1 前病毒 DNA 水平在 HIV 疾病进展中的作用及评估 HAART 的治疗效果。相关研究表明,随着 HAART 的进行,HIV-1 感染者 HIV-1 前病毒 DNA 逐渐下降,同时 CD4⁺ T 细胞计数上升、血清 HIV-1 RNA 水平下降,提示 HIV-1 前病毒 DNA 水平是监测 HIV 感染的一个重要参数,对于抗病毒治疗疗效的判断以及病情进展的预测都有着重要的意义^[11-13]。本研究也发现 HAART 过程中 HIV/AIDS 患者外周血 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 水平逐渐下降,外周血 CD4⁺ T 细胞数量逐渐升高,血浆 HIV-1 RNA 病毒载量逐渐下降,进一步的分析显示 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 水平与外周血 HIV-1 RNA 病毒载量之间正相关($r=0.35, P<0.0001$)、与 CD4⁺ T 细胞数量之间负相关($r=-0.16, P=0.0397$),表明外周血 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 水平可能可作为监测 HAART 效果、判断疾病进展的一个指标,与上述文献报道的结论相类似。本研究的数据同时显示,HAART 前 48 周 HIV-1 DNA 下降的速度快于 48 周后至随访结束(平均 80 周)这段时间的速度(差值分别为 0.35 和 0.06 Log 拷贝/10⁶个细胞),这说明 HAART 早期 HIV-1 前病毒 DNA 下降的速度更快,可能原因有:①HAART 有效以及迅速抑制 HIV-1 病毒的复制,使外周血中 HIV-1 病毒水平迅速下降(两段时间的差值分别为 2.16 Log 拷贝/mL 和 0.25 Log 拷贝/mL),大大减少了 HIV 储存库的病毒来源;②潜伏状态的 HIV 在一定条件下被激活,减少了 HIV 储存库的容量。

另外,本研究比较了不同 HAART 方案中 HIV/AIDS 患者 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 水平随 HAART 进行而下降的比例,发现不同方案之间患者下降的比例没有差异性($\chi^2=1.030, P=0.598$),这提示不同 HAART 方案抑制血浆中 HIV-1 病毒进而控制 HIV-1 储存库水平的效果可能相近,但因本研究的研究对象数量有限(特别是 III 组),需增加样本量做进一步的研究。该结果与文献报道^[14]的 HIV 感染者外周血 DNA 储存库大小与 HAART 治疗方案无关的观点相类似。

目前的 HAART 疗法很容易控制 HIV-1 病毒,大部分感染者经有效治疗后 HIV-1 RNA 可持续检测不到,这时就存在缺乏有效指标指引 HAART 的困惑。HIV-1 总 DNA 的检测为进一步有效治疗提供了一个前进探索的可能。在 HAART 过程中持续监测 HIV-1 总 DNA 水平,如果药物能持续控制 HIV-1 DNA 在 100 拷贝/百万外周血单核细胞(类似于 VISCONTI 队列^[15])以下,经过适当时间后考虑是否可对患者进行简化治疗的思路值得不断探索。因此,在 HAART 后 HIV-1 RNA 已经较低,甚至检测不到的时候,检测 HIV-1 总 DNA 对继续的抗病毒治疗方案可能有一定的指导意义。

总之,由于 PBMC 中 HIV-1 前病毒总 DNA 水平与外周血 CD4⁺ T 细胞数量、血浆 HIV-1 RNA 病毒载量之间有一定相关性,HIV-1 总 DNA 水平作为反映 HIV 储存库容量的一个指标,可用于 HIV/AIDS 患者 HAART 效果监测及病情预测。

参考文献

- [1] He M, Zheng YH, Zhou HY, et al. Prospective observation for seven year's highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV-1 infected patients [J]. *Curr HIV Res*, 2011, 9(3):160-165.
- [2] Archin NM, Sung JM, Garrido C, et al. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(11):750-764.
- [3] Le T, Farrar J, Shikuma C. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication [J]. *AIDS*, 2011, 25(6): 871-872; author reply 872-873.
- [4] Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? [J]. *AIDS*, 2011, 25(7):885-897.
- [5] Li JZ, Smith DM, Mellors JW. The need for treatment interruption studies and biomarker identification in the search for an HIV cure [J]. *AIDS*, 2015, 29(12):1429-1432.
- [6] Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, et al. Total HIV-1 DNA, a marker of viral reservoir dynamics with clinical implications [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(4):859-880.
- [7] 严亚军, 桂希恩, 荣玉萍, 等. 不同疾病阶段 HIV 感染者的 CD4⁺ T 淋巴细胞计数与病毒载量的变化 [J]. *医学动物防制*, 2017, 33(6):623-624, 627.

(下转第 416 页)

吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者CD8⁺T细胞的影响

刁鑫* 兀威 张进召

[摘要] **目的** 观察吸烟对慢性阻塞性肺疾病(COPD)稳定期患者外周血及支气管肺泡灌洗液中CD8⁺T细胞含量的影响。**方法** 选取自2014年5月至2018年1月在我院收治的COPD缓解期患者,按照吸烟情况将其纳入非吸烟COPD组、吸烟COPD组、戒烟COPD组,每组均为50例,另选取50例健康体检者纳入健康组。4组均于入院首日抽取外周静脉血5 mL,检测其中CD3⁺、CD4⁺及CD8⁺T细胞水平;采血完成后,采用纤维支气管镜行肺泡灌洗术取4组患者的支气管肺泡灌洗液,检测其中CD3⁺、CD4⁺及CD8⁺T细胞水平。**结果** 非吸烟COPD组、吸烟COPD组及戒烟COPD组的肺功能预测值(FEV₁)、病程、疾病程度及合并症均基本一致($P>0.05$)。与健康组比较,非吸烟COPD组、吸烟COPD组及戒烟COPD组患者血清及支气管肺泡灌洗液中CD3⁺、CD4⁺T细胞及CD4⁺/CD8⁺比值均明显降低($P<0.05$),而CD8⁺T细胞均明显增高($P<0.05$)。与吸烟COPD组比较,健康组、非吸烟COPD组及戒烟COPD组患者血清及支气管肺泡灌洗液中CD3⁺、CD4⁺T细胞及CD4⁺/CD8⁺比值均明显增高($P<0.05$),而CD8⁺T细胞均明显降低($P<0.05$)。**结论** 吸烟的COPD缓解期患者肺部及全身均存在CD8⁺等T淋巴细胞异常变化,而戒烟可有效改善COPD患者肺部及全身CD8⁺T淋巴细胞功能紊乱。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;吸烟;外周血;CD8⁺T细胞

Effect of smoking on CD8⁺ T cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease

DIAO Xin*, WU Wei, ZHANG Jinzhao

(Department of Respiratory and Critical Illness Medicine, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shanxin, China, 710077)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the effect of smoking on the content of CD8⁺ T cells in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Patients with COPD remission who were admitted to our hospital from May 2014 to January 2018 were enrolled in the non-smoking COPD group, smoking COPD group, and smoking cessation COPD group according to the smoking status. Each group was 50 cases. 50 healthy subjects were included in the health group. In the 4 groups, 5 mL of peripheral venous blood was taken from the first day of admission, and the levels of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were detected. After the blood collection was completed, bronchoalveolar lavage fluid was taken from 4 groups of patients by fiberoptic bronchoscopy. The levels of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were detected. **Results** The situation of FEV₁, course of disease, degree of disease and complications were not significantly different ($P>0.05$) in non-smoking COPD group, smoking COPD group and smoking cessation COPD group. Compared to the healthy group, the ratio of CD3⁺, CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ in serum and bronchoalveolar lavage fluid of non-smoking COPD group, smoking COPD

基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-066)

作者单位:西安医学院第一附属医院呼吸与危重症医学科,陕西,西安 710077

*通讯作者:刁鑫, E-mail: xidiaox@163.com

group and smoking cessation COPD group were significantly decreased ($P<0.05$), while $CD8^+$ T cells were significantly increased. ($P<0.05$). Compared to the smoking COPD group, $CD3^+$, $CD4^+$ T cells and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ in serum and Bronchoalveolar lavage fluid of healthy group, non-smoking COPD group and smoking cessation COPD group were significantly increased ($P<0.05$), while $CD8^+$ T cells were significantly decreased. ($P<0.05$). **Conclusion** In COPD patients, there are abnormal changes of $CD8^+$ and other T lymphocytes in the lungs and whole body, while smoking cessation could effectively improve the function of $CD8^+$ and other T lymphocyte dysfunction in COPD patients.

[KEY WORDS] Chronic obstructive pulmonary disease; Smoking; Serum; $CD8^+$ T lymphocytes

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以气流受限不完全可逆为主要特征的呼吸内科疾病,随着近年来环境污染日益严重,该疾病的患病率和死亡率均明显升高,已逐渐成为重要的公共卫生问题之一^[1-2]。诸多研究结果显示,吸烟是引起 COPD 的主要原因之一,其能够刺激肺部核变形白细胞的炎性因子合成作用,从而促进局部氧化应激反应,引起周围血管内皮功能紊乱,增加气道反应性,最终引起肺部损伤,加剧 COPD 的进展^[3]。由此可见,戒烟和控烟已经成为我国乃至全球一项重要的任务,临床迫切需要从理论上解释吸烟的危害以及戒烟对气道炎症的改善作用^[4]。 $CD8^+$ T 细胞在 COPD 患者呼吸道慢性炎症的发生及发展过程中均扮演重要角色,其变化情况与 COPD 患者肺功能的恶化程度存在相关性,故该细胞可能是加剧 COPD 慢性炎症的主要因素之一^[5]。目前临床仅研究了吸烟对 COPD 患者呼吸道分泌物中 $CD8^+$ T 细胞含量的影响,对于吸烟与外周血中该指标关系的研究则基本未见开展。为此,本文通过检测非吸烟 COPD 人群、吸烟 COPD 人群、戒烟 COPD 人群及健康人群支气管肺泡灌洗液和外周血中 $CD8^+$ T 细胞含量,期望探讨吸烟对 COPD 患者细胞免疫及炎症情况影响,为戒烟提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本项目中所有研究对象均来自于 2014 年 5 月至 2018 年 1 月在我院住院接受治疗及门诊接受治疗的 COPD 缓解期患者,按照吸烟情况将其纳入非吸烟 COPD 组、吸烟 COPD 组、戒烟 COPD 组,每组均为 50 例,其中戒烟组患者均戒烟 3 年以上,而吸烟组患者烟龄均在 3 年以上。排除合并肺癌、支气管哮喘、胸腔积液、活动性肺结核及尘肺等其他

类型呼吸系统疾病的患者;排除严重心脑血管疾病、肝肾疾病及严重自身免疫性疾病的患者;排除不配合随访工作的患者。另选取我院体检中心进行体检的健康者 50 例纳入健康组,健康者均无吸烟史,且通过痰液细胞学、血液分析、肺功能检查及胸部 X 线片均无异常发现。所有患者及健康者均知情同意并签署知情同意书。4 组的性别、年龄、体重指数及教育程度等一般情况相比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,非吸烟 COPD 组、吸烟 COPD 组及戒烟 COPD 组的 FEV1、病程、疾病程度及合并症等一般情况相比较,均差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。

1.2 方法

4 组均于入院首日清晨空腹状态下抽取外周静脉血 5 mL,采用乙二胺四乙酸二钾进行抗凝处理,置于 -20°C 冰箱中保存。测定时向其中加入溶血素 2 mL,充分震荡后避光放置 10 min。采用高速离心机离心 5 min(3 000 r/min)后弃去上清液,加入生理盐水 2 mL 后震荡,再次离心 5 min(1 000 r/min)后弃去上清液,加入生理盐水 100 mL 后充分震荡混匀,依次加入 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 抗体后,采用 HJ-8 型流式细胞仪(美国安捷伦公司)检测外周血中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 细胞占全部淋巴细胞的百分率。

采血完成后,采用 37°C 灭菌生理盐水对 4 组右肺中叶行纤维支气管镜行肺泡灌洗术,20 mL/次,总计进行 5 次,负压回收灌洗液,根据上述方法,采用流式细胞仪检测支气管肺泡灌洗液中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 细胞占全部淋巴细胞的百分率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以百分比表示,采用独立样本 t 检验进行正态资料的两样本比较,3 组以上比较采用方差分析;采用 Mann-Whitney U 检验进行非正态

表1 4组一般情况比较 (n=50)
Table 1 The comparison of general situation in the 4 groups (n=50)

临床指标	非吸烟 COPD 组	吸烟 COPD 组	戒烟 COPD 组	健康组	F 值/卡方值	P 值
性别(例)					0.482	0.697
男性	26	27	26	25		
女性	24	43	24	25		
平均年龄(岁)	57.45±5.67	56.47±5.72	57.35±5.27	55.68±5.12	0.981	0.614
平均病程(年)	5.57±0.58	5.65±0.55	5.72±0.57	-	0.762	0.683
FEV1(%)	51.92±5.13	49.31±4.56	52.14±5.32	81.34±8.34	0.872	0.672
疾病程度(例)					0.863	0.684
轻度	27	26	27	-		
中度	13	12	12	-		
重度	10	12	11	-		
合并症(例)					0.582	0.711
高血压	25	23	26	-		
骨质疏松	11	12	13	-		
冠心病	18	19	17	-		
糖尿病	4	5	5	-		
轻度抑郁症	5	4	5	-		
轻度焦虑	3	2	3	-		
体重指数(kg/m ²)	21.92±2.45	21.21±2.37	23.14±2.56	22.34±2.42	1.102	0.597
教育程度(例)					0.419	0.824
小学及小学以下	11	12	11	13		
初中及高中	23	24	21	20		
本科及本科以上	16	14	18	17		

计量资料的比较;采用卡方检验对组间分类变量进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺比较结果

与健康组比较,非吸烟 COPD 组、吸烟 COPD

组及戒烟 COPD 组患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺及 CD4⁺/CD8⁺均明显降低($P<0.05$),而 CD8⁺均明显增高($P<0.05$)。与吸烟 COPD 组比较,健康组、非吸烟 COPD 组及戒烟 COPD 组患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺比值均明显增高($P<0.05$),而 CD8⁺T 细胞均明显降低($P<0.05$),见表 2。

表2 4组血清中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及 CD4⁺/CD8⁺比较结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The comparison of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in the serum 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康组	50	68.90±6.92 [*]	37.78±3.45 [*]	16.45±1.55 [*]	2.29±0.23 [*]
非吸烟 COPD 组	50	62.45±6.26 ^{**}	32.45±3.12 ^{**}	20.34±2.12 ^{**}	1.59±0.14 ^{**}
吸烟 COPD 组	50	54.56±5.78 [#]	27.34±2.76 [#]	25.14±2.47 [#]	1.08±0.09 [#]
戒烟 COPD 组	50	61.12±6.17 ^{**}	33.14±3.61 ^{**}	21.45±2.45 ^{**}	1.54±0.15 ^{**}

与健康组比,^{*} $P<0.05$;与吸烟 COPD 组比,[#] $P<0.05$ 。

2.2 4组支气管肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺比较结果

与健康组比较,非吸烟 COPD 组、吸烟 COPD 组及戒烟 COPD 组患者支气管肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显降低

($P < 0.05$), 而 CD8⁺T 细胞均明显增高($P < 0.05$)。与吸烟 COPD 组比较,非吸烟 COPD 组及戒烟 COPD 组患者支气管肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显增高($P < 0.05$), 而 CD8⁺T 细胞均明显降低($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 4组支气管肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及 CD4⁺/CD8⁺比较结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The comparison of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in the bronchoalveolar lavage fluid of 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
健康组	50	66.78±6.67*	36.73±3.62*	15.67±1.49*	2.34±0.25*
非吸烟 COPD 组	50	61.34±6.12**	30.45±3.05**	21.35±2.09**	1.43±0.13**
吸烟 COPD 组	50	53.45±5.13*	25.67±2.57*	27.89±2.75*	0.92±0.07*
戒烟 COPD 组	50	60.57±6.21**	31.45±3.15**	22.34±2.21**	1.53±0.16**

与健康组比,* $P < 0.05$;与吸烟 COPD 组比,** $P < 0.05$ 。

3 讨论

COPD 是一种发病率及病死率均较高的常见疾病,可引起患者出现缺氧、二氧化碳潴留及呼吸困难等症状,不及时有效治疗可危及患者生命^[6-7]。目前,临床对于该疾病的发病机制尚未研究清楚,但有炎症反应、氧化应激紊乱、自身免疫异常及蛋白酶抗蛋白酶失调等多种病理学假说被提出,其中多数学者认为,涉及 T 淋巴细胞、中性粒细胞及巨噬细胞等多种炎症细胞的呼吸道慢性炎症反应是造成 COPD 的主要原因^[8]。T 淋巴细胞是体内最重要的免疫细胞之一,主要参与机体细胞免疫功能的调节作用,根据 T 细胞的不同功能及表面分子标记,该类型细胞可分为 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺亚群,其中 CD3⁺为机体总 T 淋巴细胞,可有效反映机体的细胞免疫功能状态;CD4⁺则为辅助型及诱导型 T 细胞,主要功能为调节细胞免疫。庄虹等^[9]的研究结果显示,CD8⁺细胞主要起源于骨髓造血干细胞中,通过胸腺的阳性选择及基因重排后,进入淋巴器官与外周血中,在静息状态下可有效识别特定抗原的 CD8⁺细胞数量极少,但在外界抗原的刺激作用下细胞可被大量活化及扩增,并参与免疫应答,COPD 患者呼吸道中存在较多炎症反应,引起 CD8⁺细胞数量异常。郭庆玲等^[10]学者亦证实,CD4⁺/CD8⁺可直接反映机体 T 细胞亚群的异常状态,且能够一定程度上可间接表现细胞免疫功能的情况,而由于 COPD 患者存在着严重的细胞免疫紊乱,故患者机体中

CD4⁺/CD8⁺水平亦处于异常状态。本研究结果显示,非吸烟 COPD 组、吸烟 COPD 组及戒烟 COPD 组的 CD4⁺/CD8⁺均明显低于健康人群,而 CD8⁺T 细胞水平均高于健康人群,充分说明 COPD 患者的细胞免疫功能遭到破坏,促进了疾病的发生、发展,与以上研究成果一致。

吸烟是 COPD 的最重要危险因素之一,即使是无症状、肺功能正常的吸烟者,在其肺泡、肺血管、中央气道及外周气道中亦均可观察到有别于非吸烟者的炎症改变^[11]。梁建华等^[12]学者研究证实,吸烟可通过影响患者机体及局部炎症因子,从而影响 COPD 的发生、发展、转归及预后等全部病理生理过程,且吸烟量越大、吸烟时间越长,吸烟者发生 COPD 的概率也越高。据不完全统计,吸烟者发生 COPD 的患病率是未吸烟者的 12 倍,且超过 90% 的 COPD 患者曾有吸烟史,而高达 25% 的烟龄大于 30 年吸烟者最终会发展为 COPD^[13]。本研究结果显示,吸烟 COPD 组 CD4⁺/CD8⁺均明显低于非吸烟 COPD 组、戒烟 COPD 组及健康组人群,且 CD8⁺水平均高于非吸烟 COPD 组、戒烟 COPD 组及健康组,充分揭示了吸烟能够明显增加 COPD 的发病率,戒烟则可有效避免 COPD 的发生或者阻滞 COPD 的发展,提高运动耐受性,缓解肺功能下降程度,而该结果亦证实了,同时也证实了吸烟所引起的 T 淋巴细胞功能紊乱可能是导致 COPD 的发病机制的因素之一。

郭韶梅等^[14]的结果表明,吸烟与 COPD 及 CD8⁺细胞数量均存在密切关系,吸烟的 COPD 患

者支气管肺泡灌洗液中 CD8⁺ 细胞明显高于不吸烟的患者,且 CD4⁺/CD8⁺ 明显低于不吸烟患者,该变化可能是吸烟引起 CD8⁺T 细胞在 COPD 患者肺部微环境中募集,引起局部 CD8⁺T 细胞数量增加所致。陈菁等^[15] 研究则发现,烟草刺激物不仅可促进 CD8⁺ 细胞的增殖作用,还能够抑制 CD8⁺ 细胞的凋亡,故吸烟能够引起 COPD 患者肺部 CD8⁺ 细胞数量增多。本研究中对不同类型 COPD 患者血清及支气管肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 含量进行检测,结果发现吸烟 COPD 组患者支气管肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 均明显低于非吸烟 COPD 组、戒烟 COPD 组及健康组,证实了吸烟不仅可引起 CD8⁺T 细胞在 COPD 患者气道出现异常浸润,并造成局部气道免疫损伤,还可诱发全身性炎症反应,引起免疫功能下降,而戒烟后肺部及外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 含量均得到有效改善,表明戒烟可有效改善 COPD 患者呼吸道及全身性炎症反应,与上述研究结果均基本相符。与此同时,本研究结果亦提示 COPD 患者虽然整体上 T 淋巴细胞各项指标均存在不同程度的紊乱,但是在疾病发展过程中,对患者进行戒烟处理,能够有利于调节 T 淋巴细胞水平,提高治疗效果。

上述结果显示,目前临床已普遍认可吸烟可引起肺部局部 CD8⁺ 细胞数量增加,且通过多项支气管肺泡灌洗液检测研究对其进行了证实,然而相关研究均以气道内分泌物检测为主,对于 COPD 患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞 + 及 CD4⁺/CD8⁺ 含量与吸烟的关系则并未进行探讨。由于血液标本采集更容易,受干扰小,患者耐受性较好,而支气管肺泡灌洗液取样难度大、患者耐受性差、样本取样稳定性不佳,且部分患者灌洗时易出现危险,故对外周血中相关指标进行检测更为便捷、快速且安全,已成为 COPD 患者 CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 含量监测的新趋势。

综上所述,吸烟可引起 COPD 患者肺部及外周血中 CD8⁺ 等 T 淋巴细胞异常变化,加剧全身性及局部炎症反应,故戒烟对于 COPD 的治疗及预防均具有重要意义。然而本研究中仍存在一定的问題,尤其是本研究尚无其他研究证实,故后期还待有大样本量、多中心研究对象进一步确证。

参考文献

- [1] Cazzola M, Rogliani P, Ora J, et al. Olodaterol and tiotropium bromide for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2015, 8(5):529-539.
- [2] Elbehairy AF, Ciavaglia CE, Webb KA, et al. Pulmonary gas exchange abnormalities in mild chronic obstructive pulmonary disease. Implications for dyspnea and exercise intolerance [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(12):1384-1394.
- [3] 赵莹,唐文慧,韩丽丽,等.慢性阻塞性肺疾病患者吸烟和戒烟状况初析[J].首都医科大学学报,2016,37(5):579-582.
- [4] 陈刘通,廖晨,涂洪波,等.吸烟及全身炎症反应与慢性阻塞性肺疾病患者中发生肺动脉高压的相关性研究[J].第三军医大学学报,2016,38(11):1293-1296.
- [5] 阎萍,张纳新,曾金洁,等.吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者炎症反应及和肽素水平的影响[J].中国老年学,2016,36(15):3754-3756.
- [6] 曹景兰,华毛,冯喜英,等.雾化吸入在慢性阻塞性肺疾病中的治疗进展[J].中华肺部疾病杂志:电子版,2016,9(3):341-343.
- [7] 吴亮亮,颜春松.慢性阻塞性肺疾病并发症研究进展[J].中国老年学,2016,36(16):4127-4130.
- [8] 孙倩倩.慢性阻塞性肺疾病合并症研究进展[J].安徽医学,2017,38(5):668-671.
- [9] 庄虹,卓宋明.慢性阻塞性肺疾病中 CD8⁺T 细胞数量增多的机制研究进展[J].医学综述,2017,23(23):4599-4604.
- [10] 郭庆玲.慢性阻塞性肺疾病患者外周血 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞和 GDF-15 水平与其血清炎症因子水平的关系[J].实用医学杂志,2016,32(4):597-599.
- [11] 谢娟,张莹,张山,等.吸烟对老年慢性阻塞性肺疾病患者 ICS/LABA 治疗疗效的影响[J].中国临床医学,2016,23(1):34-37.
- [12] 梁建华.长期吸烟慢性阻塞性肺疾病患者炎症因子表达水平与体质量指数的相关性研究[J].国际呼吸杂志,2016,36(19):1454-1457.
- [13] 王飞,周苑频,夏建军,等.吸烟与慢性阻塞性肺疾病患者肺部结构改变的相关性[J].临床肺科杂志,2018,23(1):17-20.
- [14] 郭韶梅,王爱平.CD8⁺T 细胞在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的作用[J].国际呼吸杂志,2007,27(3):188-190.
- [15] 陈菁,徐清,杨硕,等.吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者支气管肺泡灌洗液中 T 细胞功能的影响[J].实用医学杂志,2011,27(9):1565-1567.

联合检测抗苗勒管激素和性激素对卵巢储备功能评估的临床价值

郑建波 李艳* 夏尊恩

[摘要] 目的 探讨联合检测抗苗勒管激素(anti-mullerian hormone, AMH)、雌二醇(estradiol, E2)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、孕酮(progesterone, PROG)和LH/FSH水平对卵巢储备功能评估的临床价值。方法 将2017年1月至12月武汉大学人民医院生殖遗传中心进行体外受精及胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)助孕患者分为卵巢储备功能减退(declined ovarian reserve, DOR)组(卵巢储备功能减退患者, 46例)、对照组(月经周期正常, 女方输卵管因素及男方因素引起不孕患者, 216例)并将对照组按年龄段分为3小组: 20~30岁、31~40岁、≥41岁, 分别检测2组血清AMH、E2、FSH、LH、PROG水平, 并计算LH/FSH。应用ROC曲线评价单独检测AMH和联合检测AMH与性激素对卵巢储备功能减退的临床意义。结果 DOR组血清AMH水平明显低于对照组, LH/FSH水平、FSH水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.001$); 对照组AMH值随年龄升高而明显降低, 3组两两比较差异有统计学意义($P<0.05$); FSH水平随年龄升高而升高, 41~45年龄段升高更明显, 差异有统计学意义($P<0.05$); 单独检测AMH评估卵巢储备功能的ROC曲线下面积0.872, 差异有统计学意义($P<0.001$); 联合检测AMH与性激素评估卵巢储备功能的ROC曲线下面积0.889, 差异有统计学意义($P<0.001$)。结论 AMH可作为独立因子评估卵巢储备功能, 其敏感性高、稳定性好; 联合检测AMH与性激素在评估卵巢储备功能时更准确、更全面, 优势更明显。

[关键词] 抗苗勒管激素; 卵巢储备功能减退; 性激素; ROC曲线

Clinical significance of combined detection of anti-mullerian hormone and sex hormone on ovarian reserve function

ZHENG Jianbo, LI Yan*, XIA Zunen

(The Laboratory of Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, China, 430060)

[ABSTRACT] Objective To investigate the combined detection of anti-mullerian hormone (AMH), estradiol (E2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), progesterone (PROG) and LH/FSH levels, and evaluate the clinical significance for ovarian reserve function. Methods Infertility patients undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) from January to December 2017 at the Reproductive Genetics Center of People's Hospital of Wuhan University were divided into the declined ovarian reserve (DOR) group (patients with diminished ovarian reserve, 46 cases); and the control group (normal menstrual cycle, female fallopian tube factors and male factors caused infertility patients, 216 cases), and the control group further divided into 3 groups according to age group: 20 to 30 years old, 31 to 40 years old, ≥ 41 years old, respectively. The serum levels of AMH, E2, FSH, LH and PROG were detected and LH/FSH was calculated in 2 groups. ROC curve was applied to evaluate the clinical significance of detecting AMH

作者单位: 武汉大学人民医院检验科, 湖北, 武汉 430060

*通讯作者: 李艳, E-mail: yanlitf1120@163.com

alone and combined detection of AMH and sex hormones in decreasing ovarian reserve function. **Results** The serum AMH level of the DOR group was significantly lower than that in the control group, and the level of LH/FSH and FSH was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.001$). The AMH value of the control group decreased significantly with age, and the difference between the 3 groups was statistically significant ($P<0.05$). The FSH level increased with age, and the 41~45 age group increased significantly ($P<0.05$). AMH was used to evaluate the ovary alone. The area under the ROC curve of AMH alone evaluated ovarian reserve was 0.872, the difference was statistically significant ($P<0.001$); the area under the ROC curve of combined detection of AMH and sex hormones to evaluate ovarian reserve function was 0.889, and the difference was statistically significant ($P<0.001$). **Conclusion** AMH can be used as an independent factor to evaluate ovarian reserve function, which has high sensitivity and good stability. Combined detection of AMH and sex hormones is more accurate and comprehensive in evaluating ovarian reserve function.

[KEY WORDS] Anti-müllerian hormone; Declined ovarian reserve; Sex hormone; ROC curve

随着国家二孩政策的放开,很多高龄女性都有再育计划。然而,卵巢储备功能减退(declined ovarian reserve, DOR)却越来越成为阻碍生育的重要因素。卵巢储备功能减退是指由于卵巢内存留的可募集卵泡数量减少,卵母细胞质量下降,导致生育能力降低或出现过早绝经的现象^[1]。高龄女性是DOR的高发人群,寻找一个良好的评估卵巢储备能力的指标迫在眉睫。目前临床上用于评估卵巢储备功能的指标主要是血清基础性激素以及年龄、成熟卵泡数等,但由于受被检者月经周期、年龄等诸多因素的影响,性激素指标缺乏良好的稳定性和敏感度,且容易受各种激素类药物的影响,可重复性较低^[2]。抗苗勒管激素(anti-müllerian hormone, AMH)作为一个新型卵巢储备评估血清指标在早期诊断DOR中显得更加稳定、方便^[3],同时AMH的测定值受到多种因素的影响,存在一定的局限性^[4]。那么,在临床工作中,将性激素和AMH联合检测,对评价患者卵巢储备功能是否更具有价值呢?鲜有报道。本研究旨在对此进行探讨。

1 资料与方法

1.1 临床资料

从2017年1月至12月我院生殖遗传中心进行体外受精及胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)助孕患者中选取已经诊断为卵巢储备功能低下者46例作为DOR组,年龄26~45岁,平均(34.39±4.98)岁;另选取月经周期正常,因女方输卵管因素及男方因素引起不孕并在我中心拟行IVF-ET助孕的患者216例为对照组,

年龄22~45岁,平均(32.44±5.32)岁,并将该组患者按年龄段分为20~30岁、31~40岁、≥41岁3个小组。DOR组与对照组2组患者的年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。入选患者最近2个月内未用激素治疗,肝肾功能正常;排除有多囊卵巢综合征、甲状腺功能亢进、乳腺疾病、甲状腺机能减退、糖尿病、肿瘤放化疗病史及卵巢手术史的患者。

1.2 标本采集

分别采集受检者空腹静脉血4 mL于非抗凝管中(月经周期第2~3 d,闭经者日期不限),室温静置2 h,3 000 r/min离心4 min分离血清,置4~6℃冰箱保存,24 h内送检。标本采集后应尽早提取,尽快实验。若不能及时送检,可将标本放于-20℃保存,避免反复冻融。

1.3 实验用试剂及仪器

血清AMH检测采用广州康润生物科技有限公司生产的试剂盒(批号2016030701),仪器为郑州安图生物科技有限公司Biocell2010型(450 nm、620/630 nm)双波长检测酶标仪。性激素检测采用德国西门子全自动化学发光分析仪及原装试剂(批号:E2, 4866251;FSH, 4423627;LH, 4902331;PROG, 4533234)。

1.4 检测指标

酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法测定血清AMH水平,450 nm、620 nm双波长测量其吸光度值(optical density, OD),以标准浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘制标准曲线,以标本的OD值在标准曲线上计算相对应的浓度,单位为ng/mL。化学发光法测定雌二醇

(estradiol, E2)、卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、孕酮 (progesterone, PROG) 水平并计算 LH/FSH, 检测人员经过系统的岗前培训, 严格按照 SOP 文件进行实验操作。

1.5 方法步骤

1.5.1 加样

在酶标包被板上设 10 个标准孔, 在第一、第二孔中分别加标准品 100 μL , 然后加标准品稀释液 50 μL , 混匀; 后面各空依次对比稀释, 混匀后从第九、第十孔中各取 50 μL 弃掉。设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL , 然后再加待测样品 10 μL (样品最终稀释度为 5 倍), 轻轻混匀。

1.5.2 温育

用封板膜封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。

1.5.3 配液

将 30 (48T 的 20 倍) 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 (48T 的 20 倍) 倍稀释后备用。

1.5.4 洗涤

轻轻揭去封板膜, 弃掉液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。

1.5.5 加酶

每孔加入酶标试剂 50 μL , 空白孔除外。

1.5.6 温育

操作同 1.5.3。

1.5.7 洗涤

操作同 1.5.5。

1.5.8 显色

每孔先加入显色剂 A、B 各 50 μL , 小心震荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。

1.5.9 终止

每孔加终止液 50 μL , 静置 15 min。

1.5.10 测定

以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用成组 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 ROC 曲线评价单独和联合检测 AMH 与性激素对 DOR 的诊断价值。

2 结果

2.1 2 组患者各项检测指标比较

DOR 组患者血清 AMH 和 LH/FSH 水平明显低于对照组, FSH 水平明显高于对照组, 差异均有显著统计学意义 ($P < 0.001$); 而 2 组间血清 E2、LH、PROG 水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 2 组患者的各项检测指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The comparison of detection index between 2 groups of patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄 (岁)	AMH (ng/mL)	E2 (U/L)	FSH (U/L)	LH (U/L)	LH/FSH	PROG ($\mu\text{mol/L}$)
DOR 组	46	34.39 \pm 4.98	1.00 \pm 1.06*	41.88 \pm 15.60	11.25 \pm 4.66*	3.51 \pm 1.43	0.33 \pm 0.11*	0.79 \pm 0.55
对照组	216	32.44 \pm 5.32	3.46 \pm 2.72	44.72 \pm 19.62	6.87 \pm 2.59	3.82 \pm 2.24	0.58 \pm 0.31	0.73 \pm 1.00
t		0.785	4.714	0.541	7.522	0.516	4.304	0.114
P		0.213	0.001	0.462	0.001	0.480	0.001	0.747

与 DOR 组比较, * $P < 0.001$ 。

2.2 对照组不同年龄段各项检测指标比较

对照组 3 年龄段患者血清 AMH 水平: 22~30 年龄段高于 31~40 年龄段, 31~40 年龄段高于 41~45 年龄段, 差异有统计学意义 ($t = 3.983$, $P < 0.05$); 血清 FSH 水平: 41~45 年龄段高于 22~

30 和 31~40 年龄段, 差异有统计学意义 ($t = 4.041$, $P < 0.05$), 但 22~30 年龄段与 31~40 年龄段无明显差异 ($t = 0.592$, $P > 0.05$); 各年龄段 E2、LH、LH/FSH、PROG 水平均无明显差异, 见表 2。

表2 对照组中不同年龄阶段各项指标结果比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The comparison of various indicators in different age groups ($\bar{x} \pm s$)

年龄段 (岁)	AMH (ng/mL)	E2 (U/L)	FSH (U/L)	LH (U/L)	LH/FSH	PROG ($\mu\text{mol/L}$)
22~30	4.49±2.77 [○]	41.83±18.00	6.33±1.76 [○]	3.86±2.07	0.62±0.28	0.76±1.36
31~40	3.06±2.57 [○]	46.18±21.25 [●]	6.88±2.50 ^{●○}	3.80±2.48 [●]	0.58±0.35 [●]	0.75±0.73 [●]
41~45	1.63±1.68	48.10±15.78 [●]	8.84±4.31	3.77±1.52 [●]	0.51±0.20 [●]	0.56±0.20 [●]

与22~30岁年龄段比较, ● $P>0.05$;与41~45岁年龄段比较, ○ $P<0.05$ 。

2.3 联合检测 AMH 和性激素对 DOR 的诊断价值
根据 ROC 曲线下面积, 单独检测 AMH 的 ROC

曲线下面积 0.872; 联合检测 AMH 与性激素的 ROC 曲线下面积 0.889, 见图 1、图 2 和表 3。

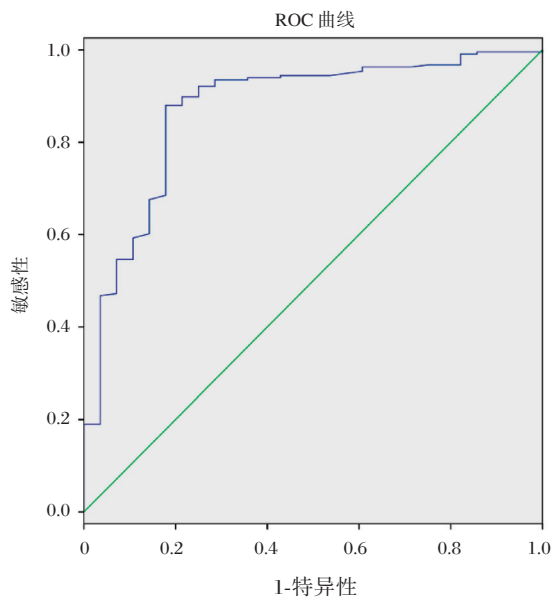


图1 单独检测 AMH 的 ROC 曲线

Figure 1 The ROC curve of AMH was detected separately

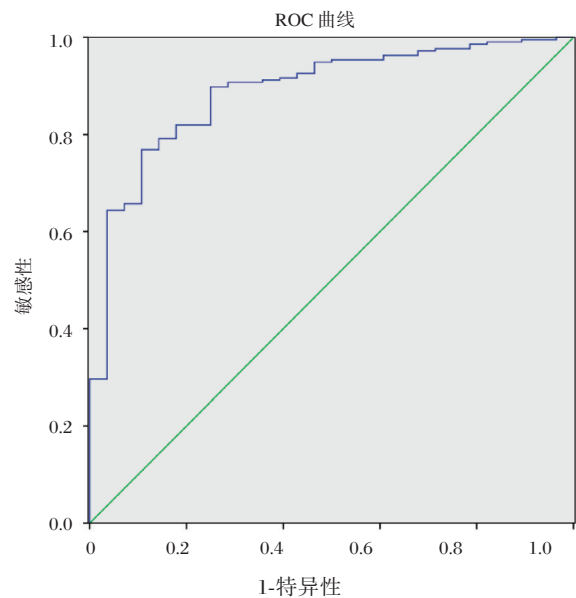


图2 联合检测 AMH 和性激素的 ROC 曲线

Figure 2 The ROC curves of AMH and sex hormones were detected in combination

表3 各项检测指标结果比较 ROC 曲线下面积
Table 3 The comparison of ROC curve area in detection index result

检验结果变量	面积	标准误	界值	敏感度	特异性	P 值	渐近 95% 置信区间	
							下限	上限
AMH	0.872	0.038	0.049	0.872	0.177	0.000	0.798	0.947
AMH 联合性激素	0.889	0.031	-0.099	0.785	0.116	0.000	0.828	0.949

3 讨论

随着国家二孩政策的放开,人们再次生育的需求逐步提升,卵巢储备功能作为评价女性生育能力的重要指标也越来越受到关注和重视。研究显示传统评估卵巢储备功能指标如年龄、性激素等预测的敏感性较低^[5],评估卵巢功能的可重复性较差^[6]。为了证实这一点,笔者做了进一步研究,文中表1显示DOR组LH/FSH、FSH明显高于对照组,而年龄、PROG、E2、LH等则变化不明显,说明FSH以及LH/FSH确实可以作为卵巢储备功能的敏感指标,而年龄、PROG、E2、LH敏感性则要差很多;表2各年龄段性激素指标无明显变化。由此可见,仅用性激素来评价女性卵巢储备功能敏感性差,特异性明显不足。

近几年,AMH作为一个新的指标逐渐取代传统项目,用于评价女性卵巢储备功能^[6-8]。AMH于1947年由法国内分泌学家Profess Alfred Jost首先发现,它由2个相同的70 kb亚基通过二硫键连接组成的二聚糖蛋白,是构成转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的一种多肽^[9-10]。胚胎期男性AMH由5周的胚胎、睾丸内的支持细胞合成,女性由36周的胚胎、卵巢内的小生长卵泡合成;儿童期以后男性AMH由睾丸内的支持细胞合成,女性由窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞分泌。陈华干等^[11]、Samantha等^[12]对血清AMH水平在预测卵巢储备功能等方面的研究显示其水平可以预测卵巢储备功能,在月经周期任意一天均可进行检测且周期内和周期间差异小,不受操作者影响,能稳定、可靠地反映卵巢储备功能,预测卵巢刺激反应,本研究表1显示DOR组血清AMH水平明显低于对照组,证实了AMH可作为判断卵巢储备功能的敏感指标。表2显示,正常女性AMH随着年龄的增大呈明显下降趋势,从侧面证明了AMH在女性整个生理周期都具有较好的敏感性和特异性。然而,张芳等^[13]的研究显示在卵泡发育过程中,AMH可抑制原始卵泡发育为生长卵泡并降低生长卵泡对FSH的敏感性,加剧了卵巢萎缩和卵巢功能的衰退。所以,单独用AMH来评估卵巢储备功能仍存在缺陷,本研究认为联合AMH和性激素进行评估可能更有意义。

DOR时,由于下丘脑-垂体-卵巢轴的调解作用,血清FSH水平会增高,LH水平要晚2年以上,

且FSH与LH必须在月经第2~3天进行检测且存在周期内和周期间差异^[14-15],临床灵敏度低,可靠性差(正常浓度不能排除DOR)。AMH作为新型的卵巢储备功能的检测和评价指标却弥补了性激素的不足。同时,在下丘脑-垂体-卵巢轴调节系统中FSH、LH由垂体分泌,而AMH由卵巢分泌,本文表1、2显示对照组AMH随年龄升高明显降低,FSH水平随年龄升高有升高的趋势,因此,笔者认为FSH和LH可能与AMH的分泌具有相互调控作用。李轶等^[16]的研究证实FSH能够通过抑制AMH启动子活性及AMH mRNA表达,从而抑制卵巢颗粒细胞过度分泌AMH,促进卵泡的生长发育,与本文观点一致。

应用ROC曲线分别对单独检测AMH和联合检测AMH与性激素的数据进行分析并计算曲线下面积,结果显示,单独检测AMH面积0.872,说明AMH可作为独立循环因子评估卵巢储备功能,这与田春花等^[17]的研究相符;联合检测AMH与性激素(FSH、LH、LH/FSH)面积0.889,说明联合检测AMH与性激素血清指标在评估卵巢储备功能时更具临床价值。

综上所述,联合检测血清AMH和性激素弥补了单独检测性激素和将AMH作为独立循环因子的缺陷,排除了月经期及周期内、周期间的的影响,能更准确地评价卵巢储备功能,具有更高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 郭丽, 银铎. 子宫切除术中预防性切除输卵管对卵巢储备功能的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(2):127-129.
- [2] 王飞霞, 杨瑞利, 邹永妮. 不同年龄段孕前保健妇女抗苗勒氏管激素与性激素水平分析[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(1):87-89.
- [3] Tobler KJ, Shoham G, Christianson MS, et al. Use of anti-mullerian hormone for testing ovarian reserve: a survey of 796 infertility clinics worldwide[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(6):1441-1448.
- [4] 高姗, 赵冬妮, 谭季春. 抗苗勒氏管激素评估卵巢储备功能的临床应用现状[J]. 生殖与避孕, 2016, 8(36):648-652.
- [5] 吴惠华, 李红, 孟庆霞, 等. 年轻妇女卵泡刺激素/黄体生成素比值预测卵巢储备功能及体外受精-胚胎移植的结局[J]. 生殖医学杂志, 2013, 22(2):101-105.

- [6] Barbakadze L, Kristasashvili J. Antimüllerian hormone in cases of different reproductive pathologies [J]. Georgian Med News, 2014, 32(3):16-21.
- [7] 叶虹. 血清抗苗勒管激素检测在LVF中的意义[J]. 生殖医学杂志, 2015, 24:1-4.
- [8] Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, et al. Anti-Müllerian hormone: above and beyond conventional ovarian reserve markers [J]. Dis Markers, 2016, 16(8):5246217.
- [9] 郑艳萍, 彭祥焱, 杨菁, 等. 腹腔镜手术与超声引导下穿刺治疗卵巢巧克力囊肿对IVF结局的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 3(5):493-495.
- [10] 杨诗源, 阮洁, 黄薇, 等. 血清抗苗勒管激素水平在基于2012年中国多囊卵巢综合征诊断标准患者中的初步研究[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(11):819-824.
- [11] 陈华干, 杨婷, 伍萍芝, 等. 抗苗勒管激素在高龄妇女卵巢功能评估中的价值探讨[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(19):3895-3898.
- [12] Cassar S, Teede HJ, Moran LJ, et al. Polycystic ovary syndrome and anti-müllerian hormone: role of insulin resistance, androgens, obesity and gonadotrophins [J]. Stepto Clinical endocrinology, 2014, 81(6):899-906.
- [13] 张芳, 王建辉. 抗苗勒管激素用于多囊卵巢综合征诊断的探讨[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 6(38):578-580.
- [14] Ortega - Hrepich C, Polyzos NP, Anckaert E, et al. The effect of ovarian puncture on the endocrine profile of PCOS patients who undergo IVM [J]. RRreprod Biol Endocrinol, 2014, 12(4):18.
- [15] 赵玲, 肖春辉. 抗苗勒管激素水平在不同卵巢储备功能女性之间的差异[J]. 临床合理用药, 2013, 6(3):38-40.
- [16] 李轶, 梁晓燕. 卵泡刺激素对多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞分泌抗苗勒管激素的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(1):5-8.
- [17] 田春花, 胡蓉, 罗艳, 等. 抗苗勒管激素在卵巢储备功能不同患者中的表达及相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(9):809-811.

(上接第389页)

- [9] 王玉倩, 薛秀花. 实时荧光定量PCR技术研究进展及其应用[J]. 生物学通报, 2016, 51(2):1-6.
- [10] Altinok I, Capkin E, Kayis S. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens [J]. Vet Microbiol, 2008, 131(3-4):332-338.
- [11] Altinok I. Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease [J]. Dis Aquat Organ, 2011, 93(3):199.
- [12] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰焯, 等. 影响多重PCR扩增效果的因素[J]. 遗传, 2003, 25(1):65-68.
- [13] Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 23(23):11141-11156.
- [14] 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉. 多重PCR技术在病原检测中的应用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(5):863-865.
- [15] Alibek K, Karatayeva N, Bekniyazov I. The role of infectious agents in urogenital cancers [J]. Infect Agent Cancer, 2012, 7(1):35.
- [16] 韩存芝, 郑曙民, 荆洁线, 等. 宫颈癌患者病毒感染及其细胞因子水平变化的调查研究[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(7):442-444.
- [17] Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer [J]. J Low Genit Tract Dis, 2002, 52(6):342.

胰岛素样生长因子1基因多态性与多囊卵巢综合征相关性研究

马龙飞* 李娟 冯康

[摘要] 目的 分析胰岛素样生长因子1(IGF-1)基因多态性与多囊卵巢综合征(PCOS)的相关性。方法 选择自2016年2月至2017年3月在我院接受治疗的274例PCOS患者作为病例组,同时选择同期250名体检健康者作为对照组,经静脉取血后收集血清后,采用自动生化分析仪分析测定相关糖脂代谢指标,包括空腹胰岛素(FINS)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹血糖(FPG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),同时采用ELISA实验检测黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH),并计算体重指数(BMI);采用PCR-RFLP法分析IGF-1基因位点G201A、T455C的多态性;同时经Logistic回归分析讨论PCOS的危险因素。结果 PCOS组患者的BMI为(24.63±3.71) kg/m², LDL-C为(2.23±0.38) mmol/L, FPG为(5.43±0.64) mmol/L, FINS为(9.35±1.96) mIU/L, LH为(6.49±1.23) IU/L,显著高于对照组(P<0.05);PCOS组患者的HDL-C为(1.39±0.21) mmol/L, FSH为(5.68±1.14) IU/L,显著低于对照组(P<0.05)。病例组的T455C位点TT基因型、CT基因型、CC基因型与对照组分布差异有统计学意义(P<0.05)。病例组G201A位点AA基因型、AC基因型、CC基因型与对照组差异有统计学意义(P<0.05)。经多因素Logistic回归分析,发现IGF-1基因T455C、G201A位点多态性和血清中高水平FINS是PCOS的危险因素(P<0.05)。结论 IGF-1基因多态性与PCOS发生密切相关,为患者临床治疗提供实验依据。

[关键词] 胰岛素样生长因子1; 基因多态性; 多囊卵巢综合征

Association between insulin - like growth factor 1 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome

MA Longfei*, LI Juan, FENG Geng

(Department of Endocrinology, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo, Henan, China, 454000)

[ABSTRACT] Objective To analyze the gene polymorphism of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and the association with polycystic ovary syndrome (PCOS) in women. Methods 274 patients in our hospital for treatment of patients with PCOS from February 2016 to March 2017 were selected as pcos group. will 250 healthy persons were enrolled as control group. And intravenous blood serum was collected and analyzed by automatic biochemical analyzed for the determination of fasting insulin (FINS), low density lipoprotein protein cholesterol (LDL - C), fasting blood glucose (FPG) and high density lipoprotein cholesterol (HDL - C) and luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) were analyzed ELISA, and body mass index (BMI) was determined; PCR - RFLP was used to analyze IGF - 1 gene polymorphism sites of G201A and T455C. And risk factors of PCOS was evaluated by using Logistic regression analysis. Results The BMI of patients in the PCOS group was (24.63 ± 3.71) kg/m², LDL-C was (2.23 ± 0.38) mmol/L, FPG were (5.43 ± 0.64) mmol/L, and FINS was (9.35 ± 1.96) mIU/L. LH was (6.49 ± 1.23) IU/L, which was significantly higher than that of the control group (P<0.05). The HDL-C of patients in the PCOS group was (1.39 ± 0.21) mmol/L, and the FSH was (5.68 ± 1.14) IU/L, which were significantly lower than that of the control group (P<0.05). There was significant difference in the distribution of TT

作者单位:焦作市人民医院内分泌科,河南,焦作 454000

*通讯作者:马龙飞, E-mail:ljmljmljm0920@163.com

genotypes, CT genotypes, CC genotypes of T455C loci in case group compared with control group ($P<0.05$). There was significant difference in the distribution of AA genotypes, AC genotypes, CC genotypes of G201A loci in case group compared with control group ($P<0.05$). The multiple factor Logistic regression analysis showed that the polymorphism of the G201A, T455C locus of the *IGF-1* gene and the high level of FINS in the serum were the risk factors for PCOS ($P<0.05$). **Conclusion** The polymorphism of *IGF-1* gene is closely related to the occurrence of polycystic ovary syndrome, which can provide experimental basis for the clinical treatment of patients.

[KEY WORDS] Insulin-like growth factor-1; Gene polymorphism; Polycystic ovary syndrome

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是临床常见的妇科内分泌紊乱疾病,主要表现为肥胖、不孕和高雄激素血症等症状,该疾病严重影响女性的生活质量^[1]。PCOS发病机制较为复杂,有研究发现饮食习惯、生活环境及遗传因素均可能促进PCOS的发生^[2]。胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是一种主要由肝脏分泌的肽类激素,主要由70个氨基酸残基组成,其相对分子量约为76 kD,与胰岛素有较高的同源性,对机体内的细胞代谢及分化有调控作用;同时IGF-1与体内的内分泌有密切相关^[3]。IGF-1可通过结合卵巢上皮细胞的膜外特异性受体,激活细胞内下游基因的表达,从而对卵巢的生理功能产生影响^[4]。Quinn等^[5]通过体外实验发现IGF-1可促进卵巢颗粒细胞合成孕酮,并可与卵泡刺激素协同作用,以维持卵巢生理功能的稳定的合成。本研究旨在分析*IGF-1*基因多态性与PCOS的相关性,以期患者临床治疗提供遗传学依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择自2016年2月至2017年3月在焦作市人民医院治疗的274例PCOS患者,均纳入病例组,年龄为23~32岁,平均年龄为(26.4±5.3)岁;同时选取250例健康女性为对照组,年龄为21~34岁,平均年龄为(27.8±6.3)岁。2组研究对象的年龄、体重及身高等基本临床资料差异无统计学意义($P>0.05$)。排除标准:患者肝脏、肾脏等重要器官衰竭;糖尿病或先天性肾上腺皮质增生等病因导致糖脂分泌紊乱的患者。

1.2 方法

1.2.1 试剂及仪器

无水酒精购自上海翔圣化工有限公司;DNA提取试剂盒购自北京宜科思源科技有限公司;促

黄体生成素(luteinizing hormone, LH)试剂盒及胰岛素(fasting insulin, FINS)购自上海沪震生物科技有限公司;空腹血糖(fasting blood glucose, FPG)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、促卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)试剂盒购自上海慧颖生物科技有限公司;Allegra X-15R台式冷冻离心机购自美国贝克曼公司;MyCycler PCR仪购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;BK-400全自动生化分析仪购自北京博科生物公司;CH1006超级恒温水浴槽购自上海庚庚仪器设备有限公司。

1.2.2 生化指标检测

所有研究对象均空腹静脉采血6 mL,经EDTA抗凝后,以1 200 r/min离心收集血清,采用自动生化分析仪检测检测糖脂代谢指标,包括空腹血糖(FPG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),同时采用酶联免疫吸附反应(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)实验检测促黄体生成素(LH)、空腹胰岛素(FINS)、促卵泡刺激素(FSH)。

1.2.3 基因多态性分析

采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测*IGF-1*基因多态性,按照DNA提取试剂盒说明书(北京天为时代公司)提取总DNA。采用Prime5.0软件设计*IGF-1*基因的G201A位点和T455C位点引物:G201A位点上游引物:5'-GTCCTGACATC-GACTGCACGC-3',下游引物:5'-GACTGCAC-GTCCACTGACGAC-3';T455C位点上游引物:5'-GTGCCGTACGTGACCACTA-3',下游引物:5'-CACTGGTGTCACTGTGC-3'。设置PCR反应体系为:去离子水5 μL, 15 ng/μL的DNA模板2.5

μL, 10×Taqman-MGB 探针 1.5 μL, 2×MastAPN Mix 6 μL, 共 15 μL。设置 PCR 反应步骤: 95℃预变性 5 min; 92℃变性 15 s, 56℃退火 30 s, 70℃延伸 60 s, 从变性到延伸经 32 个循环后 92℃ 1 min。反应结束后经 E-Gel Imager 凝胶成像系统成像, 利用 Cross checker 指纹图谱分析软件检测位点的基因分型。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 分析数据, 计量资料以平均数 ± 标准差表示, 采用 *t* 检验。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示数据差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组基本临床资料分析

病例组患者 BMI、LDL-C、FPG、FINS、LH 高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 病例组患者 HDL-C 及 FSH 低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

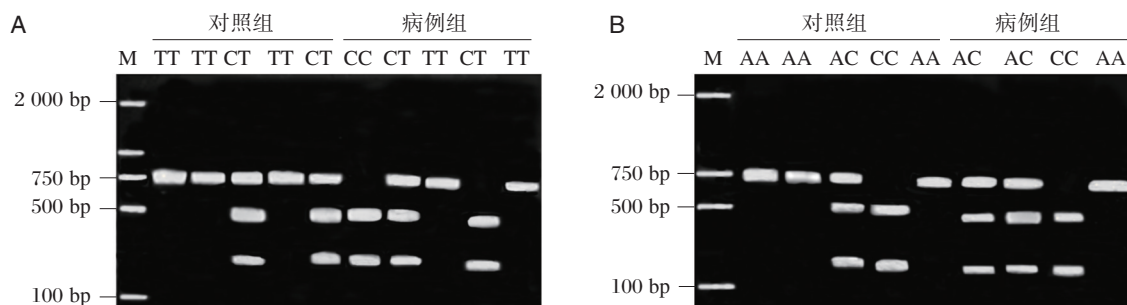
2.2 2组 IGF-1 基因多态性分析

病例组 T455C 位点 TT 基因型为 71 例, CT 基

表 1 2组基本临床资料分析
Table 1 Analysis of basic clinical data of the 2 group

组别	对照组 (n=250)	病例组 (n=274)	<i>t</i> 值	<i>P</i>
年龄(岁)	25.34±4.25	26.59±2.64	2.159	0.126
BMI(kg/m ²)	21.27±3.16	24.63±3.71	6.274	0.034
FPG(mmol/L)	4.76±0.37	5.43±0.64	5.267	0.037
HDL-C(mmol/L)	1.74±0.16	1.39±0.21	6.492	0.029
LDL-C(mmol/L)	2.15±0.47	2.23±0.38	5.317	0.042
FINS(mIU/L)	5.94±1.21	9.35±1.96	7.215	0.023
FSH(IU/L)	6.43 ±1.32	5.68±1.14	5.246	0.046
LH(IU/L)	4.15±0.84	6.49±1.23	6.582	0.026

因型 86 例, CC 基因型 117 例, CC 基因型频率最高, 可达 42.7%, 其中 C 等位基因比例为 58.4%, 2 组基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。病例组的 G201A 位点 AA 基因型为 72 例, AC 基因型 167 例, CC 基因型 35 例, AC 基因型频率最高, 可达 60.9%, 其中 A 等位基因比例为 56.8%, 2 组基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2、表 3。



A: 2组 IGF-1 基因 T455C 位点电泳结果; B: 2组 IGF-1 基因 G201A 位点电泳结果。

图 1 2组 IGF-1 基因的 PCR-RFLP 电泳结果

Figure 1 PCR-RFLP electrophoresis results of 2 groups of IGF-1 gene

表 2 IGF-1 的 T455C 位点基因型及等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequencies of T455C locus in IGF-1

基因位点	分类	对照组(n=250)	病例组(n=274)	χ^2	<i>P</i>
T455C	基因型频率			5.213	0.028
	TT	86(34.4%)	71(25.9%)		
	CT	97(39.8%)	86(31.4%)		
	CC	67(26.8%)	117(42.7%)		
	等位基因频率			4.954	0.032
	T	269(53.8%)	228(41.6%)		
C	231(46.2%)	320(58.4%)			

表3 IGF-1的G201A位点基因型及等位基因频率
Table 3 Genotype and allele frequencies of G201A in IGF-1

基因位点	分类	对照组(n=250)	病例组(n=274)	χ^2	P
G201A	基因型频率			4.843	0.028
	AA	107(42.8%)	72(26.3%)		
	AC	92(36.8%)	167(60.9%)		
	CC	51(20.4%)	35(12.8%)		
	等位基因频率			5.142	0.021
	A	306(61.2%)	311(56.8%)		
	C	194(38.8%)	237(43.2%)		

2.3 PCOS的多因素Logistic回归分析

以PCOS是否发生为因变量,将单因素分析有差异的指标,包括BMI、LDL-C、FPG、FINS、LH、HDL-C、FSH、IGF-1基因的G201A位点类型和

T455C位点类型,均纳入多因素Logistic回归分析回,发现血清中高水平FINS、G201A位点多态性和T455C位点多态性是PCOS的危险因素($P<0.05$),见表4。

表4 PCOS的多因素Logistic回归分析
Table 4 Multiple factor Logistic regression analysis of PCOS

变量	β	SE	Wald值	OR	95%CI	P
FINS	0.316	0.016	5.124	1.627	1.143~2.167	0.029
G201A位点	0.412	0.024	5.217	1.763	1.248~2.524	0.026
T455C位点	0.216	0.013	4.621	1.267	0.764~1.743	0.032

3 讨论

PCOS患者因内分泌失调易伴发肥胖、糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗等代谢疾病。有研究发现PCOS患者肥胖发生率可达42%~53%,糖脂代谢紊乱的发生率可达56%~64%^[6]。本研究发现与对照组比较,PCOS组患者体内内分泌激素(如FINS、LH、FSH、身体质量指数(body mass index, BMI)、LDL-C、FPG、LH显著升高,HDL-C及FSH降低($P<0.05$),这提示PCOS患者体内性激素分泌异常,需通过探寻可有效缓解患者代谢紊乱的途径。IGF-1蛋白是人体新陈代谢的重要调控因子,可促进女性卵泡的成熟^[7]。有研究IGF-1可刺激卵巢分泌孕激素等,以维持卵巢的正常生理功能,同时性激素水平变化可反馈调节IGF-1的分泌^[8]。IGF-1基因的多态性可促使妇女体内的内分泌稳态发生失衡,导致性激素相关的代谢发生障碍,并导致体内Hcy水平上升,刺激妇女发生PCOS^[9]。Tomlinson

等^[10]通过雌鼠建立PCOS模型,发现对PCOS雌鼠补充适量的IGF-1可有效缓解PCOS症状,并促进体内卵泡发育。因此,讨论IGF-1基因的多态性对治疗PCOS有重要的临床价值。

Greenwood等^[11]研究发现IGF-1基因上游979 bp处突变率较高,导致IGF-1的生理活性不稳定。有研究发现IGF-1基因T455C位点的基因型与妇女PCOS发生率有一定关联,并刺激患者体内的血清Hcy水平上升^[12]。胡婷等^[13]研究发现IGF-1基因多态性与PCOS患者FINS水平有密切关系,且LDL-C、FPG等水平异于健康者。因此检测女性IGF-1基因多态性有助于筛选PCOS的高危人群。本研究发现病例组的IGF-1的T455C及G201A位点基因型和等位基因分布与对照组差异有统计学意义($P<0.05$),这提示IGF-1的T455C、G201A位点突变与PCOS密切相关,该基因位点的突变可导致IGF-1活性下降,促使体内糖脂代谢发生紊乱,最终导致患者体内性激素分泌失调。

有发现 52 例 PCOS 患者的 *IGF-1* 中的 T455C 和 G201A 位点单独突变未明显增加 PCOS 的发生率, 这与本研究不一致^[14]。这可能是由于 IGF-1 活性受多种条件制约(包括蛋白的转录后修饰、患者体内的盐离子水平等因素), 也与研究对象的数量有一定关系。多因素 Logistic 回归分析发现血清中高水平 FINS、T455C 位点及 G201A 位点的多态性是 PCOS 的危险因素($P < 0.05$)。FINS 水平直接影响体内糖脂代谢水平, 并可促进 PCOS 患者临床症状的加重^[15]。Zhou 等^[16]研究发现 PCOS 患者 *IGF-1* 的 T455C 位点的突变率较高, 并导致体内性激素水平异常, 这与本研究一致。本研究结果表明可以检测 *IGF-1* 的 G201A 及 T455C 位点的多态性评估妇女的 PCOS 发生风险, 并依此提供合理的治疗方案。

综上所述, *IGF-1* 的 G201A 及 T455C 位点多态性与 PCOS 发病密切相关, 对该基因及时筛查有助于提高对 PCOS 的治疗水平。

参考文献

- [1] 王婷婷, 付翰林, 陈立章, 等. 中国多囊卵巢综合征患者妊娠并发症发生率的 Meta 分析[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(11):1300-1310.
- [2] Dąbrowski R, Szczubiał M, Kostro K, et al. Serum insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein concentrations before and after ovariectomy in bitches with pyometra[J]. Theriogenology, 2015, 83(4):474-477.
- [3] Fraissinet A, Robin G, Pigny P, et al. Use of the serum anti - müllerian hormone assay as a surrogate for polycystic ovarian morphology: impact on diagnosis and phenotypic classification of polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2017, 32(8):1716-1722.
- [4] 吴京. 达英-35 和二甲双胍治疗多囊卵巢综合征的疗效及其对患者内分泌和代谢水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(21):5237-5239.
- [5] Quinn MM, Kao CN, Ahmad A, et al. Raising threshold for diagnosis of polycystic ovary syndrome excludes population of patients with metabolic risk[J]. Fertil Steril, 2016, 106(5):1244-1251.
- [6] Fraissinet A, Robin G, Pigny P, et al. Use of the sAP-Num anti - müllerian hormone assay as a surrogate for polycystic ovarian morphology: impact on diagnosis and phenotypic classification of polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2017, 32(8):1716-1722.
- [7] 汪丹妮, 邓宇傲, 刘新琼, 等. 多囊卵巢综合征妊娠患者的产科结局及其影响因素[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2017, 8(4):39-41.
- [8] Ji SY, Liu XM, Li BT, et al. The polycystic ovary syndrome-associated gene Yap1 is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse[J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(10):698-707.
- [9] 韦娟冰. 来曲唑用于多囊卵巢综合征患者促排卵的临床疗效及安全性评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(19):1928-1930.
- [10] Tomlinson J, Pinkney J, Adams L, et al. The diagnosis and lived experience of polycystic ovary syndrome: A qualitative study[J]. J Adv Nurs, 2017, 73(10):2318-2326.
- [11] Greenwood EA, Noel MW, Kao CN, et al. Vigorous exercise is associated with superior metabolic profiles in polycystic ovary syndrome independent of total exercise expenditure[J]. Fertil Steril, 2016, 105(2):486-493.
- [12] 纵艳艳. 氯米芬联合人绝经期促性腺激素对多囊卵巢综合征患者促排卵的效果分析[J]. 中华全科医学, 2017, 15(5):820-822.
- [13] 胡婷, 徐克惠. 多囊卵巢综合征的病因研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2016, 12(3):360-363.
- [14] Cheng F, Zhao L, Wu Y, et al. Serum vascular endothelial growth factor B is elevated in women with polycystic ovary syndrome and can be decreased with metformin treatment[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2016, 84(3):386-393.
- [15] 方宝平, 高雅琼, 李伟莉. 多囊卵巢综合征所致不孕症临床研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(10):1489-1492.
- [16] Zhou X, Yang Q, Xie Y, et al. Tetrahydrostilbene glucoside extends mouse life span via upregulating neural klotho and downregulating neural insulin or insulin-like growth factor 1[J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(3):1462-1470.

尿酸联合糖化血红蛋白早期检测对高龄孕妇妊娠期糖尿病发病的预测

李华¹ 殷红梅² 李英^{2*}

【摘要】目的 探讨尿酸联合糖化血红蛋白在高龄孕妇妊娠期糖尿病中的预测效果。**方法** 回顾性收集2016年6月至2017年6月胜利油田中心医院产科门诊诊断妊娠糖尿病患者120例,设为实验组;选取同期产检的健康高龄孕妇120例,设为对照组,于12~16周完善相关检查,包括:BMI、孕周等;采用酶联比色法测定2组血糖水平;采用高效液相法测定2组糖化血红蛋白水平;采用X7全自动生化分析仪检测2组尿酸水平;采用多因素 Logistic 对妊娠期糖尿病患者与尿酸、糖化血红蛋白水平进行多因素分析。**结果** 实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者 BMI、FPG、糖化血红蛋白水平,均高于对照组($P < 0.05$),实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者尿酸水平偏高,但与对照组比较无明显差异($P > 0.05$);尿酸与糖化血红蛋白单一指标用于高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度比较无统计学意义($P > 0.05$);尿酸联合糖化血红蛋白用于高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度,均高于单一尿酸、糖化血红蛋白($P < 0.05$);多因素 Logistic 分析结果表明:妊娠期糖尿病患者妊娠结局与糖化血红蛋白、尿酸水平具有统计学意义($P < 0.05$);ROC 曲线可以看出:尿酸联合糖化血红蛋白诊断时曲线下面积最大,其次为糖化血红蛋白,最后为尿酸;实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者不良妊娠结局发生率为 10.00%,高于对照组 5.00%($P < 0.05$)。**结论** 将尿酸联合糖化血红蛋白用于高龄孕妇妊娠期糖尿病发病中效果理想,能反应患者疾病严重程度,为临床治疗提供依据和参考,值得推广应用。

【关键词】 尿酸;糖化血红蛋白;高龄孕妇妊娠期糖尿病

Early detection of uric acid combined with glycosylated hemoglobin for predicting the incidence of gestational diabetes in elderly pregnant women

LI Hua¹, YIN Hongmei², LI Ying^{2*}

(1. Diabetes Department, Shengli Oilfield Headquarters Hospital, Dongying, Shandong, China, 257000;

2. Obstetrics Department, Shengli Oilfield Central Hospital, Dongying, Shandong, China, 257000)

【ABSTRACT】Objective To investigate the predictive effect of uric acid combined with glycosylated hemoglobin in gestational diabetes in elderly pregnant women. **Methods** A retrospective collection of 120 cases of gestational diabetes mellitus diagnosed in the obstetrics outpatient department of Shengli Oilfield Central Hospital from June 2016 to June 2017 was set as the experimental group, while 120 healthy pregnant women were selected as the control group at the same time. The relevant examinations were completed in 12~16 weeks, including: BMI, gestational age, etc.; blood glucose levels were measured by enzyme-linked colorimetry; the levels of glycosylated hemoglobin were measured by high performance liquid phase method; uric acid levels were detected by X7 automatic biochemical analyzer; multivariate analysis of uric acid and glycosylated hemoglobin levels in pregnant women with GDM was performed by multivariate Logistic analysis.

作者单位:1. 胜利油田机关医院糖尿病科,山东,东营 257000

2. 胜利油田中心医院产科,山东,东营 257000

*通讯作者:李英, E-mail: 13561018292@163.com

Results In the experimental group, the levels of BMI, FPG and glycosylated hemoglobin in pregnant women with gestational diabetes were higher than those in the control group ($P<0.05$). In the experimental group, the uric acid level of pregnant women with gestational diabetes was higher, but there was no significant difference between the 2 groups ($P>0.05$). There was no significant difference in the sensitivity and specificity of uric acid and glycosylated hemoglobin in the diagnosis of gestational diabetes in elderly women ($P>0.05$). Uric acid combined with glycosylated hemoglobin was used in the pregnancy of pregnant women. The sensitivity and specificity of diabetes were higher than that of single uric acid and glycosylated hemoglobin ($P<0.05$). Multivariate logistic analysis showed that the pregnancy outcome and glycosylated hemoglobin and uric acid levels in gestational diabetes patients were statistically significant ($P<0.05$). The area under the ROC curve of uric acid combined with glycosylated hemoglobin is the largest, followed by glycated hemoglobin, and finally uric acid; the incidence of adverse pregnancy outcome in pregnant women with gestational diabetes in the experimental group is 10.00%, which is higher than 5.00% in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The combination of uric acid and glycated hemoglobin is effective in the pathogenesis of gestational diabetes in elderly women and it can reflect the severity of the disease and provide a basis and reference for clinical treatment.

[KEY WORDS] Uric acid; Glycosylated hemoglobin; Gestational age of pregnant

妊娠期糖尿病(gestational diabetes, GDM)是临床上常见的疾病,是指在妊娠期首次发生或首次识别的糖代谢异常,属于妊娠期发病率较高的并发症,发病早期如果得不到及时有效的诊断、治疗,将会危害母婴健康^[1]。同时,妊娠期糖尿病孕妇由于机体内胰岛素发生抵抗或缺乏,将会造成机体内分泌代谢发生异常,容易增加巨大儿发生率^[2-3]。因此,加强高龄孕妇妊娠期糖尿病早期诊断,尽早进行饮食控制、运动干预对改善预后具有重要的意义。国内学者^[4]研究表明:将尿酸联合糖化血红蛋白早期检测用于高龄孕妇妊娠期糖尿病中效果理想,能帮助患者早期确诊,有助于改善患者妊娠结局,但是不同学者对于其诊断效能差异性较大。本课题以2016年6月至2017年6月胜利油田中心医院产科门诊高龄孕妇妊娠期糖尿病患者120例及健康高龄孕妇120例作为回顾性研究,探讨尿酸联合糖化血红蛋白在高龄孕妇妊娠期糖尿病中的预测价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性收集2016年6月至2017年6月胜利油田中心医院产科门诊诊断妊娠糖尿病患者120例,设为实验组;选取同期产检的健康高龄孕妇120例,设为对照组,实验组年龄35~42岁,平均(38.63±3.51)岁,孕次1~4次,平均(2.31±0.58)次,产次1~2次,平均(1.32±0.41)次,孕周12~16周,平

均(15.61±1.31)周。对照组年龄36~43岁,平均(39.07±3.54)岁,孕次1~3次,平均(2.04±0.52)次,产次1~3次,平均(1.40±0.44)次,孕周12~16周,平均(15.05±1.27)周。本课题均得到医院伦理委员会同意,2组年龄、孕周、产次比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:①符合中华医学会制定的关于妊娠期糖尿病临床诊断标准者^[5],妊娠24周后空腹血糖 >5.1 mmol/L,餐后1 h血糖 >10.0 mmol/L,餐后2 h血糖 >8.5 mmol/L,对于上述有一项符合即可确诊;②实验组孕妇最终均确诊为妊娠期糖尿病;③均能遵循医嘱完成相关检查、治疗者。

排除标准:①合并精神异常、恶性肿瘤者;②合并妊娠期高血压、精神异常者;③服用影响血糖水平药物或已经确诊为糖尿病者。

1.3 方法

1.3.1 仪器与设备

X7全自动生化分析仪(西门子,德国);酶联比色法试剂盒(北京九强生物技术股份有限公司);高效液相法试剂盒(强生,日本)。

1.3.2 临床资料检查

2组患者12~16周建立保健卡,完善相关检查,并且由专业人员完成孕妇身高、体重的测量,计算并检测身体质量指数(body mass index, BMI),BMI=体重(kg)/身高(m²)、空腹血糖(fasting blood glucose, FPG)等水平。

1.3.3 标本采集

实验组高龄妊娠期糖尿病患者入院次日早晨空腹抽取静脉血 3 mL, 对照组高龄孕妇常规孕检当天空腹抽取静脉血 3 mL, 25 min 离心, 速度 5 000 r/min, 完成血清分离后放置在 -4℃ 冰箱中, 备用^[6]。

1.3.4 检测方法

采用酶联比色法测定 2 组血糖水平; 采用高效液相法测定 2 组糖化血红蛋白水平; 采用 X7 全自动生化分析仪检测 2 组尿酸水平, 有关操作严格遵循试剂盒、仪器操作说明书完成。

1.3.5 诊断效能

绘制受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, 简称 ROC 曲线), 分析糖化血红蛋白、尿酸在妊娠期糖尿病患者中的诊断灵敏度、特异度, 而糖化血红蛋白联合尿酸通过 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 进行判断, 分析其诊断灵敏度、特异度, 采用多因素 Logistic 对妊娠期糖尿病患者与尿酸、糖化血红蛋白水平进行多因素分析。

1.3.6 不良妊娠结局

2 组妊娠结束后记录 2 组早产、子痫及胎膜早破不良妊娠结局情况。

1.4 观察指标

1.4.1 生化指标

观察 2 组 BMI、FPG、尿酸、糖化血红蛋白水平情况。

1.4.2 诊断特异度、灵敏度

观察 FPG、尿酸、糖化血红蛋白水平用于高龄

孕妇妊娠期糖尿病患者中诊断灵敏度及特异度情况。

1.4.3 妊娠结局

观察 2 组早产、子痫及胎膜早破不良妊娠结局情况。

1.5 统计分析

采用 SPSS 18.0 软件处理, 计数资料行 χ^2 检验, 采用 $n(\%)$ 表示, 计量资料行 t 检验, 采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 BMI、FPG、尿酸、糖化血红蛋白水平比较

实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者 BMI、FPG、糖化血红蛋白水平, 均高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者尿酸水平偏高, 但与对照组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 尿酸联合糖化血红蛋白在高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度比较

尿酸与糖化血红蛋白单一指标用于高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度比较无统计学意义 ($P > 0.05$); 尿酸联合糖化血红蛋白用于高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度, 均高于单一尿酸、糖化血红蛋白 ($P < 0.05$), 见表 2。

从 ROC 曲线可以看出: 尿酸联合糖化血红蛋白诊断时曲线下面积最大, 其次为糖化血红蛋白, 最后为尿酸, 见图 1。

表 1 2 组 BMI、FPG、尿酸、糖化血红蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of BMI, FPG, uric acid, glycated hemoglobin levels in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BMI(kg/m ²)	FPG(mmol/L)	尿酸(μmol/L)	糖化血红蛋白(%)
实验组	120	23.41±3.21	4.26±0.41	245.47±11.32	7.61±1.25
对照组	120	21.09±2.16	3.91±0.34	239.31±10.29	5.09±0.85
<i>t</i>	/	16.926	12.391	1.042	13.481
<i>P</i>	/	0.031	0.019	0.185	0.044

2.3 妊娠期糖尿病患者与尿酸、糖化血红蛋白水平进行多因素分析

多因素 Logistic 分析结果表明: 妊娠期糖尿病患者妊娠结局与糖化血红蛋白、尿酸水平具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 2 组分娩后对其进行随访比较妊娠不良妊娠结局

实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者不良妊娠结局发生率为 10.00%, 高于对照组 5.00% ($P < 0.05$), 见表 4。

表2 尿酸联合糖化血红蛋白在高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度比较

Table 2 Comparison of sensitivity and specificity of uric acid combined with glycated hemoglobin in gestational diabetes in older pregnant women

检测变量	AUC	诊断截断值	最大 Youden 指数	95%可信区间		灵敏度	特异度
				下限	上限		
CEA	0.892	23.215	0.223	0.823	0.893	0.426	0.784
P53 蛋白	0.706	21.841	0.219	0.712	0.842	0.441	0.789
联合检测	0.931	4.951	0.310	0.846	0.912	0.574	0.791

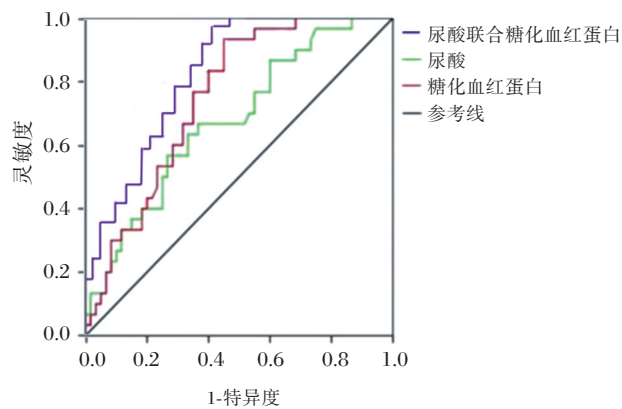


图1 尿酸联合糖化血红蛋白在高龄孕妇妊娠期糖尿病诊断 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of uric acid combined with glycated hemoglobin in gestational diabetes in older pregnant women

3 讨论

妊娠期糖尿病是临床上常见的合并症,发病早期如果得不到及时有效的诊断、治疗,将会危及母婴健康^[7]。文献报道显示^[8]:妊娠能使得隐性糖尿病显性化,使得无糖尿病患者发生妊娠期糖尿病,也能使得有糖尿病患者病情加重。高龄孕妇妊娠期糖尿病发病机制复杂,且对于孕前采用胰岛素治疗者如果不及时完成胰岛素用量的调整,将会增加低血糖发生率,严重者甚至会造成酮症酸中毒、低血糖昏迷等^[9]。

近年来,尿酸联合糖化血红蛋白在妊娠期糖尿病患者中得到应用,且效果理想。本研究中,实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者 BMI、FPG、糖化血红蛋白水平,均高于对照组 ($P < 0.05$),由此看

表3 妊娠期糖尿病患者与尿酸、糖化血红蛋白水平进行多因素分析

Table 3 Multivariate analysis of uric acid and glycated hemoglobin levels in patients with gestational diabetes

多因素	β 值	S.E	Wald	P 值	OR 值	95%CI
尿酸	1.395	0.426	14.592	0.036	1.593	3.492~8.831
糖化血红蛋白	1.231	0.495	10.385	0.031	1.241	3.213~9.085
常数项	1.115	0.331	11.241	0.044	1.005	2.394~7.514

表4 2组分娩后对其进行随访比较妊娠不良妊娠结局 [n(%)]

Table 4 Comparison of follow-up of 2 components and their adverse pregnancy outcomes [n(%)]

组别	n	胎儿宫内生长受限	羊水过少	妊娠合并高血压	新生儿高胆红素血症	发生率
实验组	120	5(4.17)	2(1.67)	3(4.17)	2(1.67)	12(10.00)
对照组	120	1(0.83)	1(0.83)	1(0.83)	0(0.00)	3(2.50)
χ^2	/					5.395
P	/					0.032

出:高龄孕妇妊娠期糖尿病患者发病后常伴有BMI、血糖水平升高,加强患者尿酸、糖化血红蛋白水平测定能为临床诊疗提供依据和参考。国内学者^[10]以妊娠期糖尿病高龄孕妇252例作为研究组,选择同期入院孕检的健康高龄孕妇作为对照组,测定2组糖化血红蛋白、血清尿酸、胆固醇及尿微量蛋白,结果表明:研究组糖化血红蛋白、血清尿酸、胆固醇及尿微量蛋白水平,均高于对照组。有关文献报道^[11]显示:高尿酸血症是II型糖尿病发生的独立危险因素。Laughon等^[12]研究发现,妊娠早期尿酸水平最高组(3.6~8.3 mg/dL)中约有46.6%的孕妇发展为GDM,调整体质指数及年龄后,其发生GDM的风险是尿酸水平最低组(0.9~2.5 mg/dL)的3.25倍。本研究中实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者尿酸水平偏高,但与对照组比较无明显差异($P>0.05$),提示:妊娠早中期尿酸水平与GDM发生有一定关系。高龄孕妇妊娠期糖尿病患者机体内血脂水平、体内尿酸水平升高,妊娠晚期孕妇尿酸水平改变更加明显,均属于正常的生理现象,但是当超过一定范围时,将会导致机体血管内皮细胞受损,加剧胰岛素抵抗发生率。高龄孕妇妊娠期糖尿病患者由于长期血糖波动,将会造成血脂代谢异常,且表达水平与子痫前期的发生、发展有关,将会增加围产期并发症发生率。因此对于高龄孕妇GDM高危人群及早检测血尿酸水平,发现尿酸水平异常者可及时制定合理饮食和生活方式,加强孕期管理,早期干预GDM的发生,以降低母婴并发症,改善妊娠结局。

目前,临床上对于高龄孕妇妊娠期糖尿病以口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)法诊断为主,但是,由于随着年龄的增加,肥胖及代谢的变化,高龄孕妇妊娠期糖尿病发病率及孕周提前,且完成OGTT检查需要多次抽血,临床依从性及可重复性差^[13]。文献报道显示^[14]:糖化血红蛋白是葡萄糖与血红蛋白相互结合的产生,其产生是一个相对缓慢、连续且不可逆的非酶促反应过程,加强糖化血红蛋白水平测定能反应患者疾病严重程度,有助于指导临床治疗。同时,糖化血红蛋白水平的测定与患者近2~3个月血糖水平有关,其检测水平与患者的抽血时间、是否空腹、是否使用胰岛素等因素无关,该指标相对稳定。临床上,将尿酸联合糖化血红蛋白用于高龄孕妇妊娠期糖尿病发病中效果理想,能发挥不同

检测指标优势,达到优势互补,能获得较高的诊断灵敏度和特异度^[15]。本研究中,多因素Logistic分析结果表明:妊娠期糖尿病患者妊娠结局与糖化血红蛋白、尿酸水平具有统计学意义($P<0.05$);尿酸联合糖化血红蛋白用于高龄孕妇妊娠期糖尿病灵敏度及特异度,均高于单一尿酸、糖化血红蛋白($P<0.05$);ROC曲线可以看出:尿酸联合糖化血红蛋白诊断时曲线下面积最大,其次为糖化血红蛋白,最后为尿酸。由此看出:不同指标的联合测定能帮助患者早期确诊,能获得较高的诊断灵敏度、特异度。因此,临床上对于确诊的高龄孕妇妊娠期糖尿病患者应及时采取有效的措施进行干预,加强患者饮食干预,善于根据患者恢复情况正确指导患者运动锻炼,积极控制患者血糖水平。对于血糖持续升高难以有效控制者,则需要给予胰岛素注射治疗,改善妊娠结局,促进母婴健康。本研究中,实验组高龄孕妇妊娠期糖尿病患者不良妊娠结局发生率为10.00%,高于对照组5.00%($P<0.05$),提示加强高龄孕妇妊娠期糖尿病干预能改善妊娠结局。治疗过程中加强患者尿酸、糖化血红蛋白测定能评估患者预后,指导临床治疗,使得患者的干预更具科学性。但是,本研究中尚存在诸多不足,一方面试验中纳入的病例数相对较多,尚需要大样本量验证;另一方面,试验中对患者数据进行分析、处理时存在较大的人为误差,均需要进一步研究与探讨。

综上所述,将尿酸联合糖化血红蛋白用于高龄孕妇妊娠期糖尿病发病中效果理想,能反应患者疾病严重程度,为临床治疗提供依据和参考,值得推广应用。

参考文献

- [1] 李英,殷红梅,李华. 糖化血红蛋白、血清尿酸、胆固醇和尿微量蛋白检查在筛查高龄孕妇妊娠期糖尿病中应用的意义[J]. 中国急救医学, 2016, 36(z1): 241-242.
- [2] Koivusalo SB, Rönö K, Stach-Lempinen B, et al. Response to comment on koivusalo et al. gestational diabetes mellitus can be prevented by lifestyle intervention: the finnish gestational diabetes prevention study (RADIEL): a randomized controlled trial. diabetes care[J]. Diabetes Care, 2016, 39(8): e126-127.
- [3] 岑立微. 孕早期体质指数、空腹血糖和糖化血红蛋白联合检测预测妊娠期糖尿病的价值[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(19): 3120-3122.

- [4] 李巧. 糖化血红蛋白联合空腹血糖检测在妊娠期糖尿病筛查中的应用价值[J]. 河北医学, 2017, 23(1):4-6.
- [5] 李晏. 糖化血红蛋白早期预测妊娠期糖尿病的临床效果和应用价值[J]. 糖尿病新世界, 2016, 19(17): 105-106.
- [6] 刘倩倩, 李婷, 苏秀娟. 妊娠早期母体一般特征联合多项指标预测妊娠期糖尿病发生的可行性[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(6):418-421.
- [7] 马永萍, 李娟, 马小云. 妊娠期糖尿病孕妇糖化血红蛋白水平与母婴结局的关系[J]. 现代妇产科进展, 2016, 25(2):127-130.
- [8] 雷国勤, 徐欢, 黄畅晓, 等. 重庆地区孕妇HbA1c及早中孕空腹血糖正常参考区间的建立以及联合诊断妊娠期糖尿病的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(6):413-417.
- [9] Pimenta WP, Calderon I M, Cruz NS, et al. Subclinical abnormalities of glucose metabolism in Brazilian women with a history of gestational diabetes mellitus [J]. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica, 2015, 83(12):1152-1158.
- [10] 王泓, 王霞, 崔亚利, 等. 妊娠期妇女HbA1c水平测定及其在妊娠期糖尿病的早期筛查及诊断应用[J]. 重庆医学, 2016, 45(13):1770-1772.
- [11] 朱庆霞. 血清C反应蛋白、25-羟基维生素D₃在妊娠期糖尿病发病中的意义[J]. 山东医药, 2016, 56(14):55-56.
- [12] 陈广树, 冯烈. 不同肾小球滤过率的2型糖尿病患者血尿酸与糖化血红蛋白的相关性[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(9):1458-1460.
- [13] 李宁, 尹倩, 王艳, 等. 妊娠中期血尿酸水平与妊娠期糖尿病的相关性[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(12):1977-1979.
- [14] Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, et al. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2008, 31(2):361-362.
- [15] Laughon SK, Catov J, Provins T, et al. Elevated first trimester uric acid concentrations are associated with the development of gestational diabetes [J]. Am J Obstet Gynecol, 2009, 201(4):402.

(上接第394页)

- [8] 路新利, 赵宏儒, 李巧敏, 等. HIV/AIDS患者病毒载量与CD4细胞数相关性研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38(20):4256-4257.
- [9] 孙纪新, 刘晓霞, 李张. 147例艾滋病病毒感染者高效抗逆转录病毒治疗疗效分析[J]. 中外医学研究, 2014, 12(29):71-72.
- [10] 李育芬, 申峰. HIV感染者和AIDS病人CD4⁺T淋巴细胞的临床意义[J]. 中国公共卫生管理, 2011, 27(6):630-631.
- [11] Re MC, Vitone F, Biagetti C, et al. HIV-1 DNA proviral load in treated and untreated HIV-1 seropositive patients [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(6):640-646.
- [12] 陈霞, 郑煜煌, 加路, 等. 艾滋病抗病毒治疗中外周血细胞病毒库的动态变化及其意义[J]. 中南大学学报:医学版, 2013, 38(5) 537-544.
- [13] 陈霞, 郑煜煌, Diallo MA, 等. 经长期HAART治疗的中国HIV-AIDS患者外周血细胞内HIV-1前病毒DNA的检测及其意义[J]. 中国医师杂志, 2012, 14(9):1179-1183.
- [14] 岳永松, 李太生. HIV感染者体内DNA储存库的临床研究进展[J]. 中华内科杂志, 2017, 56(7):529-531.
- [15] Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study [J]. Plos Pathog, 2013, 9(3):e1003211.

前列地尔联合左卡尼汀对ESDN患者肾功能、炎症因子的影响

李昌艳 刘娟* 顾芳 熊朝磊

[摘要] **目的** 探讨前列地尔联合左卡尼汀对终末期糖尿病肾病(ESDN)患者肾功能、血清Toll样受体-4(TLR-4)、白介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的影响。**方法** 将2015年1月至2018年1月间收治的88例ESDN患者采用随机数表法分为观察组($n=44$)和对照组($n=44$)。2组均应用前列地尔,观察组在此基础上联合左卡尼汀。评估治疗前、治疗4周后2组患者肾功能[血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、肾小球滤过率(eGFR)]、炎症因子(TLR-4、IL-18、TNF- α)、血生化指标[血红蛋白(Hb)、血白蛋白(ALB)、胆固醇(TC)],记录2组透析不良反应发生率。**结果** ①治疗4周后,2组SCr、BUN水平均低于治疗前($P<0.05$),观察组降幅大于对照组($P<0.05$);2组治疗前后及组间eGFR对比,差异均无统计学意义($P>0.05$);②治疗4周后,2组TLR-4、IL-18、TNF- α 指标水平均低于治疗前($P<0.05$),观察组降幅大于对照组($P<0.05$);③治疗4周后,2组Hb、ALB指标水平均高于治疗前($P<0.05$),2组TC指标水平均低于治疗前($P<0.05$),观察组变动幅度均大于对照组($P<0.05$);④观察组不良反应发生率低于对照组($P<0.05$)。**结论** 前列地尔联合左卡尼汀有利于降低炎症因子水平,保护患者肾功能,并能降低其不良反应发生风险。

[关键词] 终末期糖尿病肾病;前列地尔;左卡尼汀;肾功能

Effects of alprostadil combined with levocarnitine on renal function and inflammatory factors in patients with ESDN

LI Changyan, LIU Juan*, GU Fang, XIONG Chaolei

(Department of Nephrology, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 611130)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effects of alprostadil combined with levocarnitine on renal function and serum levels of toll-like receptor-4 (TLR-4), interleukin-18 (IL-18) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with end-stage diabetic nephropathy (ESDN). **Methods** 88 cases of patients with ESDN admitted between January 2015 and January 2018 were divided into observation group ($n=44$) and control group ($n=44$) according to the random number table method. Alprostadil was applied to both groups, and the observation group was combined with levocarnitine. Renal function [serum creatinine (SCr), urea nitrogen (BUN), glomerular filtration rate (eGFR)], inflammatory factors (TLR-4, IL-18, TNF- α) and blood biochemical indicators [hemoglobin (Hb), serum albumin (ALB), cholesterol (TC)] were evaluated before treatment and after 4 weeks of treatment. And the incidence rate of dialysis adverse reactions was recorded in the 2 groups. **Results** After 4 weeks of treatment, the levels of SCr and BUN in the 2 groups were lower than those before treatment ($P<0.05$), and the decrease in observation group was greater than that in control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the eGFR within-groups before and after treatment and between-groups ($P>0.05$). After 4 weeks of treatment, the levels of TLR-4, IL-18 and TNF- α

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ574)

作者单位:成都市第五人民医院肾内科,四川,成都 611130

*通讯作者:刘娟, E-mail: kuitian20117284@sina.com

in the 2 groups were lower than those before treatment ($P<0.05$), and the decrease in observation group was greater than that in control group ($P<0.05$). After 4 weeks of treatment, the levels of Hb and ALB in the 2 groups were higher than those before treatment ($P<0.05$) while the TC level in the 2 groups was lower than that before treatment ($P<0.05$), and the changes in observation group were greater than those in control group ($P<0.05$). The incidence rate of adverse reactions in observation group was lower than that in control group ($P<0.05$). **Conclusions** Alprostadi combined with levocarnitine is beneficial to reduce the levels of inflammatory factors, protect patients' renal function, and reduce the risk of adverse reactions.

[KEY WORDS] End-stage diabetic nephropathy; Alprostadi; Levocarnitine; Renal function

在各种病因所致终末期肾病中,终末期糖尿病肾病(end-stage diabetic nephropathy, ESDN)发生率占比位列第2位,仅次于肾小球肾炎所致终末期肾病^[1]。ESDN患者由于肾功能急剧减退,导致无尿或少尿,使体内大量毒素类物质或者消化终产物无法排出体外,因此常规以血液透析、腹膜透析等进行治疗^[2]。相关研究显示,血液透析患者感染性疾病和恶性肿瘤发病率呈上升趋势,血液透析等治疗有利于改善患者临床症状、延长其生存期,但无法彻底改善患者的免疫功能^[3],对机体微炎症状态作用有限,因此辅用药物对患者免疫功能及炎症因子进行干预十分重要。目前对于糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)患者机体微炎症的干预药物包括免疫抑制剂、噻唑烷二酮类及他汀类多种抗炎药物^[4]。但由于ESDN患者免疫功能紊乱受疾病、透析、营养状态等多种因素影响,单一机制调节难以取得良好效果。左卡尼汀是一种水溶性小分子氨基酸盐,能抑制外周血中单核细胞活化,具有抗炎、抗氧化的作用,并能有效调节患者血压及营养状态^[5]。前列地尔能起到良好抗凝作用,有利于保护ESDN患者肾功能,而左卡尼汀或能从多途径调节ESDN患者免疫功能及炎症因子水平。有研究指出,左卡尼汀应用于终末期肾病维持血透患者具有增强机体细胞免疫功能的作

用^[6]。目前已有不同研究论述左卡尼汀对炎症指标及肾病相关生化指标的作用^[7-8],但一方面左卡尼汀和前列地尔联合方案研究仍较少,另一方面同类研究关注对象多为DN患者,而较少关注ESDN患者。基于此,本研究纳入88例ESDN患者作为研究对象,以探究前列地尔联合左卡尼汀治疗ESDN的效果,为寻求ESDN更佳辅助药物方案提供思路,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入2015年1月至2018年1月间收治的88例ESDN患者作为研究对象。纳入标准:符合ESDN诊断标准^[9];年龄>18岁者;近期末使用免疫调节剂者;均行规律透析治疗6个月以上者;预计生存期6个月以上;患者均知情同意且签署知情同意书;经我院伦理委员会审核通过。排除标准:严重心肝等脏器功能障碍、恶性肿瘤者;系统性红斑狼疮、血管炎等导致的肾衰竭者;近期感染、手术、创伤者;半年内使用左卡尼汀者;有明确本组药物禁忌症者;因各种原因未完成4周治疗者。采用随机数表法分为观察组($n=44$)和对照组($n=44$)。2组一般资料对比,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 2组一般资料对比 [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

Table 1 Comparison of general data in the 2 groups [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

组别	<i>n</i>	男女比	年龄(岁)	体重(kg)	平均动脉压(mmHg)	平均尿量(mL)
观察组	44	25/19	57.06±9.01	61.22±5.91	107.76±11.80	1022.52±255.74
对照组	44	26/18	58.07±7.05	60.40±6.54	110.65±10.14	1010.64±264.76
χ^2/t	-	0.047	0.586	0.617	1.232	0.214
<i>P</i>	-	0.829	0.560	0.539	0.221	0.831

1 mmHg=0.133 kPa

1.2 治疗方法

2组均应用前列地尔(生产企业:北京泰德制药股份有限公司,规格:1 mL:5 μg,批准文号:国药准字 H10980023)1 mL药液溶于0.9%生理盐水10 mL缓慢泵入,qd,观察组在此基础上联合左卡尼汀(生产企业:哈尔滨誉衡药业股份有限公司,规格:5 mL:1 g,批准文号:国药准字 H20113429)5 mL药液加入0.9%生理盐水250 mL静脉滴注,qd,2组均持续治疗4周。

1.3 评估方法

治疗前、治疗4周后均采集患者外周静脉血,使用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血肌酐(serum creatinine, SCr)、尿素氮(urea nitrogen, BUN),使用慢性肾脏病流行病学合作研究的CKD-EPI公式估算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR);使用ELISA测定Toll样受体-4(toll-like receptor-4, TLR-4)、白介素-18(interleukin-18, IL-18)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、总胆固醇(total cholesterol, TC);使用放

射免疫法测定血红蛋白(hemoglobin, Hb)、白蛋白(albumin, ALB)。

1.4 观察指标

评估治疗前、治疗4周后2组患者肾功能(SCr、BUN、GFR)、炎症因子(TLR-4、IL-18、TNF-α)、血生化指标(Hb、ALB、TC),记录2组透析不良反应发生率。

1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验,计数数据以n(%)表示,行 χ^2 检验或Fisher精确概率检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组肾功能对比

本研究4周疗程中,未有患者脱落。治疗4周后,2组SCr、BUN水平均低于治疗前($P < 0.05$),观察组降幅大于对照组($P < 0.05$);2组治疗前后及组间eGFR对比,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 2组肾功能对比($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of renal function in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别		n	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	eGFR[mL/(min×1.73m ²)]
观察组	治疗前	44	826.59±82.60	29.42±9.42	11.17±1.45
	治疗4周后	44	669.12±138.15 ^{ab}	22.17±6.75 ^{ab}	10.64±1.08
t	-	-	6.489	4.150	1.944
P	-	-	0.000	0.000	0.055
对照组	治疗前	44	828.87±83.52	29.65±9.90	11.08±1.86
	治疗4周后	44	753.30±129.54 ^b	25.45±7.18 ^b	10.43±1.16
t	-	-	3.252	2.278	1.967
P	-	-	0.002	0.025	0.052

与同期对照组对比, ^a $P < 0.05$;与同组治疗前对比, ^b $P < 0.05$ 。

2.2 2组炎症因子对比

治疗4周后,2组TLR-4、IL-18、TNF-α指标水平均低于治疗前($P < 0.05$),观察组降幅大于对照组($P < 0.05$),见表3。

2.3 2组血生化指标水平对比

治疗4周后,2组Hb、ALB指标水平均高于治疗前($P < 0.05$),2组TC指标水平均低于治疗前($P < 0.05$),观察组变动幅度均大于对照组($P < 0.05$),见表4。

2.4 2组透析不良反应发生率对比

观察组出血1例、低血压2例、感染2例,总发生率11.36%(5/44);对照组出血2例、感染6例、低血压6例,总发生率31.82%(14/44),观察组不良反应发生率低于对照组($\chi^2=5.437, P=0.020$)。

3 讨论

DN患者常存在高凝状态,凝血功能变化是DN病情进展的机制之一,且高凝状态引起血栓形

表3 2组炎症因子指标水平对比 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of levels of inflammatory factors in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别		<i>n</i>	TLR-4 (pg/mL)	IL-18 (ng/mL)	TNF- α (pg/mL)
观察组	治疗前	44	6.53 \pm 0.93	156.52 \pm 23.37	28.41 \pm 6.74
	治疗4周后	44	4.89 \pm 0.84 ^{ab}	116.92 \pm 19.62 ^{ab}	14.24 \pm 4.91 ^{ab}
<i>t</i>	-	-	8.681	8.608	11.272
<i>P</i>	-	-	0.000	0.000	0.000
对照组	治疗前	44	6.49 \pm 0.92	157.70 \pm 28.56	28.75 \pm 6.14
	治疗4周后	44	5.53 \pm 0.85 ^b	132.46 \pm 16.06 ^b	19.81 \pm 5.83 ^b
<i>t</i>	-	-	5.084	5.110	7.004
<i>P</i>	-	-	0.000	0.000	0.000

与同期对照组对比, ^a*P*<0.05; 与同组治疗前对比, ^b*P*<0.05。

表4 2组血生化指标水平对比 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of blood biochemical indicators in the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别		<i>n</i>	Hb (g/L)	ALB (g/L)	TC (mmol/L)
观察组	治疗前	44	64.57 \pm 13.99	25.15 \pm 5.73	5.86 \pm 1.40
	治疗4周后	44	94.25 \pm 14.35 ^{ab}	41.09 \pm 5.55 ^{ab}	3.25 \pm 1.08 ^{ab}
<i>t</i>	-	-	9.824	13.255	9.791
<i>P</i>	-	-	0.000	0.000	0.000
对照组	治疗前	44	65.19 \pm 12.87	25.73 \pm 5.61	5.64 \pm 1.36
	治疗4周后	44	86.57 \pm 16.09 ^b	34.82 \pm 4.85 ^b	4.50 \pm 1.28 ^b
<i>t</i>	-	-	6.883	8.131	4.049
<i>P</i>	-	-	0.000	0.000	0.000

与同期对照组对比, ^a*P*<0.05; 与同组治疗前对比, ^b*P*<0.05。

成是DN患者发生心脑血管事件的关键^[10]。前列地尔的主要成分是前列腺素E,能改善机体凝血状态和肾血流动力学,有利于保护肾功能,相关研究显示前列地尔单独应用或联合用药治疗DN均可能产生显著效果^[11]。ESDN需长期应用血液透析以保证肾功能,但长期血透病人血浆和组织中天然左卡尼汀水平显著下降,影响患者代谢和营养状况^[12]。目前已有部分研究显示,前列地尔联合左卡尼汀治疗有利于提高DN患者临床疗效、控制血糖和改善肾功能^[13],但既往研究较少关注ESDN患者。因此本研究应用前列地尔和左卡尼汀联合方案,探讨其对ESDN患者肾功能、炎性因子和血生化指标的影响。

有文献指出,ESDN接受透析治疗者无论在生存率还是生存质量方面均低于非DN的终末期肾

病患者,这种不良预后可能与心血管疾病、血流动力学不稳定、动静脉内瘘问题、更易感染等多种因素有关^[14]。因此对ESDN患者,应更注重调节患者免疫力,预防感染等并发症的发生。ESDN患者受到内毒素和免疫复合物等物质的刺激,激活机体内巨噬细胞系统,进而释放出多种促炎性因子,最终形成微炎症反应^[15]。陈松锦等^[16]学者的研究结果显示,TLR4高表达激活TLR4信号通路,对糖尿病肾病的发生发展产生影响,因此ESDN患者TLR4处于高水平状态。

本研究结果显示,治疗后TLR-4、IL-18、TNF- α 指标水平均降低,且观察组降幅明显大于对照组,这说明前列地尔联合左卡尼汀有利于控制ESDN患者机体炎性因子水平。前列地尔可通过扩张肾脏微循环血管,抑制细胞因子生成和活性,缓解肾

脏缺血、缺氧等来降低机体炎症水平^[17]。而左卡尼汀是广泛存在于体内的一种常见氨基酸——左旋肉毒碱,是脂肪氧化过程中的重要分子,具有一定的抗炎和抗氧化作用,可抑制氨基末端激酶及体内磷酸化蛋白的活性,从而抑制炎症因子的分泌^[18]。故两药联合作用于抗氧化和抗炎,综合改善ESDN患者机体炎症状态。余伍中等^[19]学者的一项研究显示,在常规用药的基础上仅增加左卡尼汀也有利于改善患者营养状态和微炎症状况,与本研究结论一致。本研究受限于样本量,仅分为2组,无法对比左卡尼汀单独用药及左卡尼汀、前列地尔联合用药的差异,期待未来多中心、大样本量研究以探讨更多不同左卡尼汀用药方案对ESDN患者的疗效,以指导临床用药。

ESDN患者主要症状体征在于肾功能的急剧减退,致使体内大量毒素类物质或者消化终产物无法及时排除体外^[20]。终末期肾病患者由于低蛋白饮食导致内源性合成左卡尼汀量显著降低,加之左卡尼汀分子量小,透析期间能够将其大量清除,致使机体组织和血浆中左卡尼汀浓度明显减少^[21]。补充外源性左卡尼汀,一方面有助于控制ESDN患者机体炎症状态,降低炎症反应对患者肾功能的损伤。另一方面有文献报道,左卡尼汀抑制肾脏中金属蛋白酶的活性,对糖基化早期产物朝着终产物转化的路径具有较强的抑制性效果,从而对肾功能产生保护性作用^[22]。本研究结果也显示,观察组SCr、BUN水平均低于对照组,与上述结论相一致。回顾既往研究,左卡尼汀联合前列地尔方案相关研究对象以早中期DN患者为主,研究显示联合方案肾功能改善显著的结论^[23],这说明左卡尼汀联合方案对不同疾病程度DN患者均有效。但不同研究之间纳入对象、基础用药方案不同,上述结论参考意义有限。本组血生化数据也表明,观察组Hb、ALB、TC指标水平得到改善,这也降低了ESDN患者并发心血管疾病的风险。在治疗过程中,观察组不良反应发生率明显低于对照组,与黄娟^[24]等学者结论相似。

综上所述,前列地尔联合左卡尼汀应用于ESDN有利于保护患者肾功能,降低机体炎症因子水平,调节胆固醇等生化指标水平,并控制透析不良反应发生率。

参考文献

- [1] 陈国光. 腹膜透析治疗终末期糖尿病肾病的综合评价[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(7):1022-1023.
- [2] 毕艳. 中国糖尿病慢性并发症的流行病学研究现状[J]. 中华糖尿病杂志, 2015, 7(8):467-469.
- [3] 袁江红, 王文兵. ESDN腹膜透析与血液透析患者临床分析及预后比较[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(9):821-823.
- [4] 黄乙芸, 王欣, 张月莉, 等. 糖尿病肾病微炎症与营养不良的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(11):1247-1249.
- [5] 江波, 王晓斐, 江华, 等. 左卡尼汀辅助不同血液透析方式在终末期糖尿病肾病中的应用价值[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(b10):47-49.
- [6] 王天生, 王盛琴, 王东红, 等. 终末期肾病维持血液透析患者应用左卡尼汀治疗对T淋巴细胞亚群和可溶性白细胞介素2受体的影响[J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(2):144-146.
- [7] 刘新荪. 左卡尼汀对慢性肾衰竭非透析患者蛋白质能量消耗的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(4):340-341.
- [8] 赵建明, 朱小华, 牟爱华. 血液灌流联合血液透析与左卡尼汀对慢性肾衰竭患者贫血和钙磷代谢及炎症因子的影响[J]. 中国临床研究, 2018, 31(7):914-917.
- [9] 童国玉, 朱大龙. 糖尿病肾病国内外临床指南和专家共识解读[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(3):211-216.
- [10] 张倩, 田凤胜. 糖尿病肾病凝血功能变化与心脑血管疾病关系的研究进展[J]. 微循环学杂志, 2016, 26(1):69-71.
- [11] 石冰青, 孙广东. 前列地尔在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(12):2709-2716.
- [12] 苏真, 陈建梅. 左卡尼汀对糖尿病肾病透析病人炎症因子与红细胞免疫的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2017, 42(10):1349-1352.
- [13] 王晓茹, 周秀岚, 马惠红. 左卡尼汀联合前列地尔治疗糖尿病肾病的临床疗效及其安全性[J]. 药物评价研究, 2017, 40(10):1481-1484.
- [14] 王思静. 终末期糖尿病肾病的肾脏替代治疗研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2017, 37(4):623-626.
- [15] 冯云生, 赵亚娟, 张宝红, 等. 血液透析联合血液灌流对终末期糖尿病肾病患者血清炎症因子水平及营养不良的影响[J]. 河北医学, 2016, 22(7):1114-1116.
- [16] 陈松锦. 外周血单核细胞Toll样受体2及Toll样受体4表达与糖尿病肾病的相关性[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(12):1747-1748.

黑豆汁制何首乌中大豆苷元含量测定

邓青* 李霓冰

【摘要】 目的 通过测定黑豆汁制何首乌中大豆苷元的含量对其质量进行评价。方法 采用薄层色谱法对黑豆汁制何首乌、生何首乌、清蒸制何首乌及对照品中的大豆苷元进行定性分析;采用高效液相色谱法对其大豆苷元含量进行定量分析。结果 黑豆汁制何首乌薄层色谱中的荧光斑点与大豆苷元对照品色谱的荧光斑点位置对应;而生何首乌、清蒸制何首乌色谱中,与大豆苷元对照品相应的位置上不显相同颜色的荧光斑点。通过高效液相色谱测定得到大豆苷元进样量 $X(\mu\text{g})$ 与其对应的峰面积值 Y 的回归方程为: $Y=12.647X+197.35(r=0.9999)$, 线性范围为 $1.65\sim 16.56\mu\text{g}$, 平均回收率 98.72% ($n=5, \text{RSD}=1.54\%$)。黑豆汁制何首乌大豆苷元含量为 $(12.34\pm 1.26)\text{mg/g}$; 在生何首乌、清蒸制何首乌中未检测出大豆苷元。结论 通过对黑豆汁制何首乌中大豆苷元的鉴定,可有效区分黑豆制何首乌与其它炮制品,从而达到对制何首乌质量评价及鉴别的目的。

【关键词】 黑豆汁; 大豆苷元; 何首乌

Study on the content of Daidzein in *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice

DENG Qing*, LI Nibing

(Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510405)

【ABSTRACT】 Objective To investigate daidzein content in *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice and to evaluate the quality of *Radix Polygoni Multiflori* preparata. Methods The daidzein in *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice was qualitatively analyzed by thin-layer chromatography (TLC). The daidzein content in *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice was carried out by the high performance liquid chromatography (HPLC). Results During TLC, the fluorescent spots of *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice could be observed in the corresponding position of daidzein control, while fluorescent spots could not found in the corresponding position on TLC of raw *Polygonum multiflorum* and steamed *Radix Polygoni Multiflori*. The regression equation of X daidzein injection volume $X(\mu\text{g})$ determined by HPLC with its corresponding peak area value Y was obtained, which was $Y=12.647X+197.35, r=0.999$. The linear range was $1.65\mu\text{g}\sim 16.56\mu\text{g}$, and the average recovery rate was 98.72% ($n=5, \text{RSD}=1.54\%$). The content of daidzein was $12.34\pm 1.26\text{mg/g}$ in *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice, while daidzein was not detected in raw *Polygonum multiflorum* Thunb and steamed *Radix Polygoni multiflori*. Conclusion The identification of daidzein in *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice can be used to identify *Polygonum multiflorum* Thunb with black bean juice from other processed products of *Polygonum multiflorum* Thunb effectively, so as to evaluate the quality of *Radix Polygoni Multiflori* preparata.

【KEY WORDS】 Black bean juice; Daidzein; *Polygonum multiflorum* Thunb

作者单位: 广州中医药大学第一附属医院药学部, 广东, 广州 510405

*通讯作者: 邓青, E-mail: deng87305@163.com

根据相关研究表明,何首乌中蒽醌类化合物对人的肝功能影响较大^[1]。近年来国内外均有大量文献报道何首乌是否规范炮制与人体的肝脏损伤性直接相关^[2]。目前市场上存在不法商人采用添加色素对何首乌进行加工,其色素本身可对人体造成危害;抑或将不合格品掺于正品中或是直接销售不合格品;更有不少企业没有按照药典要求进行炮制,其内在质量与中华人民共和国药典标准相差甚远^[3]。何首乌的炮制方法种类较多,主要的炮制方法是通过与黑豆共蒸并要求“忌铁”。目前研究人员主要采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测二苯乙烯苷类和蒽醌类含量变化制首乌的质量,但这几类物质在制何首乌生产过程中含量不稳定,易发生挥发或分解,因此,测定这些成分来判断制首乌的质量并不完善^[4]。为此本研究通过测定黑豆制何首乌中大豆苷元的含量以鉴定何首乌是否规范炮制,为生产合格黑豆制何首乌提供参考,同时有助于淘汰黑豆制何首乌的伪劣产品。

1 材料和方法

1.1 仪器/试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪购自美国沃特斯公司;Direct-Q™ 5 超纯水仪购自美国 Millipore 公司;FA1004B 电子分析天平购自美国奥豪斯仪器(上海)有限公司;KQC-5B 超声波清洗器购自济宁科强超声检测仪器有限公司;旋转蒸发器购自上海越众仪器设备有限公司;ZK-82B 型真空干燥箱购自上海姚氏仪器设备厂;乙醇购自上海化工厂;乙腈(色谱纯,批号 133425)购自美国 TEDIA 天地试剂公司;甲醇(色谱级)购自德国 Merck 公司;生何首乌对照药材(批号 941825501)购自南京鹿江中药厂。

1.2 黑豆汁制何首乌的制备

取黑豆 2 kg,加水 24 kg 浸泡 12 h,煮制 4 h,得滤液约 3 kg。豆渣加水 5 kg,煎煮 3 h,得滤液约 2 kg,合并滤液,备用。按质量比 4:1 分别称取何首乌和黑豆汁均匀搅拌,置于坐水锅中隔水炖制 24 h。取出,干燥备用。

1.3 清蒸何首乌的制备

称取 100.0 g 干燥后生何首乌,置于非铁质容器内,密闭,坐水锅中隔水炖制 24 h。干燥备用。

1.4 大豆苷元薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)定性分析

1.4.1 对照品溶液的制备

精密称取 10 mg 大豆苷元对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品储备液,备用。

1.4.2 供试品溶液的制备

用天平称量黑豆汁制何首乌、生何首乌、清蒸制何首乌各 2 g,然后过 3 号筛,移入回流提取器中,向提取器中加入无水乙醇盐酸混合溶液(按照体积比 4:1 混合)40 mL,加热 1 h 后将混合液滤过,通过旋转蒸发器将滤液蒸干,然后残渣加水 20 mL 溶解,摇晃 5 min;采用适量乙酸乙酯振摇萃取 3 次,合并乙酸乙酯液;旋转蒸发器蒸干后加水 4 mL 溶解,将该溶液过聚酰胺柱后收集洗脱液,45℃以下减压蒸干,采用甲醇 2 mL 溶解残渣,作为供试品溶液。另取黑豆对照药材粉末 0.5 g,同法制成对照药材溶液。

1.4.3 薄层色谱法鉴别

吸取黑豆汁制何首乌、生何首乌、清蒸制何首乌及黑豆对照供试品溶液各 2 μL,对照品溶液 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙醇(10:1.2)为展开剂,展开,取出,晾干,将薄层板放在紫外光灯(365 nm)下观察。

1.5 HPLC 测定大豆苷元含量

1.5.1 对照品溶液的制备

取大豆苷元对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的大豆苷元对照品溶液。

1.5.2 供试品溶液的制备

用天平称量黑豆汁制何首乌、生何首乌、清蒸制何首乌各 1 g,然后过 3 号筛,移入回流提取器中,向提取器中加入无水乙醇盐酸混合溶液(按照体积比 4:1 混合)40 mL,加热 1 h 后将混合液滤过,通过旋转蒸发器将滤液蒸干;然后残渣加水 20 mL 溶解,摇晃 5 min,采用适量乙酸乙酯振摇萃取 3 次,合并萃取液体;最后通过旋转蒸发器将滤液蒸干,采用 10 mL 容量瓶用甲醇定容,滤过,完成供试品溶液的制备。

1.5.3 色谱条件及相关实验步骤

Diamonsil C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:25℃;流动相:甲醇-0.2%磷酸溶液-乙腈(2:6:2);测定波长:254 nm。大豆苷元色谱实验对流速、进样体积 2 个关键参数依次优化,对分别

考察了在流速为6、8、10 mL/min时大豆苷元的分离效果,发现流速为8 mL/min时分离效果最好;同时分析进样体积为5、10、15、20 μL 时大豆苷元的分离效果,发现进样量为15 μL 时分离效果最好。因此,在流速8 mL/min,进样体积15 μL 条件下进行洗脱程序,在此条件下得到制何首乌制备液相色谱图吸取大豆苷元对照品试液(起始浓度为5 mg/mL)0.1 mL、0.2 mL、0.8 mL、1.6 mL、3.2 mL,采用流动相将其稀释为69.6, 139.4, 278.8, 557.6, 1115.2 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度,经0.45 μm 滤膜过滤,进行色谱分析。通过进样针进样15 μL ,分析大豆苷元色谱峰面积,制作标准曲线,同时采用最小二乘法计算大豆苷元进样量 $X(\mu\text{g})$ 与其对应的峰面积值 Y 的线性关系。

1.5.3.1 重复性实验

精密称取黑豆汁制何首乌粉末0.100 g,共5份。按照“1.5.2”项下方法平行制备成供试品溶液,分别进样15 μL 进行重复性实验。

1.5.3.2 稳定性实验

精密吸取制备的供试品溶液15 μL ,分别在0.2、4、8、16 h后进样,进行稳定性实验。

1.5.3.3 精密度实验

精密吸取大豆苷元对照溶液及相关样本供试液各15 μL ,连续进样5次进行高效液相色谱法分析,进行精密度实验。

1.5.3.4 加样回收率实验

精确称量各样本100 mg,置于锥形瓶中,精密移入分别加入低、中、高3种浓度的大豆苷元对照液,应用色谱进行含量测定,计算回收率。相对标准偏差(RSD)计算公式: $\text{RSD} = \text{标准偏差}(\text{SD}) / \text{计算结果的算术平均值}(\bar{X}) \times 100\%$ 。

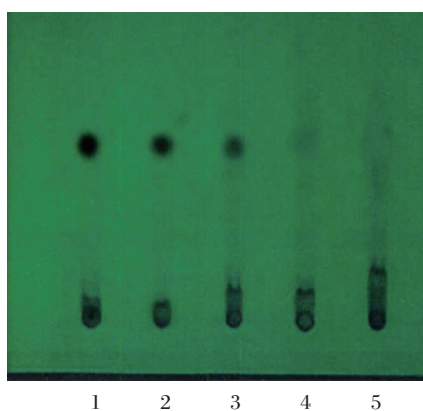
2 结果

2.1 大豆苷元薄层色谱法鉴别分析

本实验中采用了乙醇提取后再用乙酸乙酯萃取,减少了葱醌类成分的背景干扰,获得较为清晰的结果。黑豆汁制何首乌色谱中,与大豆苷元对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点;生何首乌、清蒸制何首乌色谱中,在与大豆苷元对照品相应的位置上不显相同颜色的荧光斑点。见图1。

2.2 线性关系考察结果

探究大豆苷元进样量 $X(\mu\text{g})$ 与其对应的峰面积值 Y 的线性关系,发现大豆苷元进样量 X 在



1: 大豆苷元对照品; 2: 黑豆对照; 3: 黑豆汁制何首乌; 4: 生何首乌药材; 5: 清蒸制何首乌。

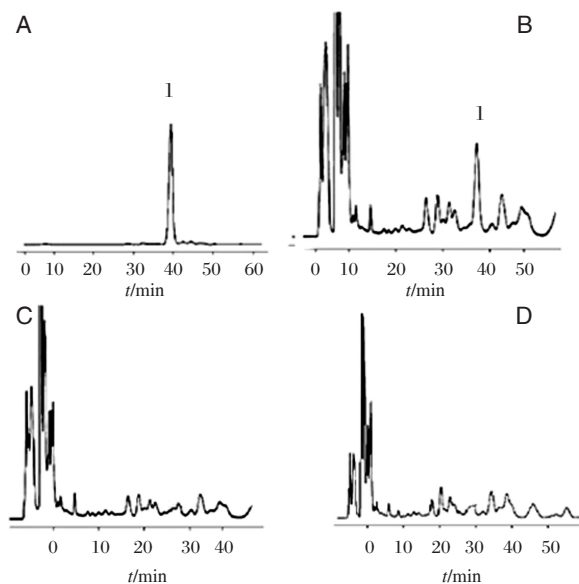
图1 大豆苷元 TLC 鉴别分析

Figure 1 Differential analysis of Daidzein by TLC method

1.657~16.56 μg 范围内与峰面积 Y 呈线性,其回归方程为: $Y=12.647X+197.35(r=0.9999)$ 。

2.3 标准品和样品色谱图

对照品大豆苷元的相对保留时间为39 min,以该峰为参照,黑豆汁制何首乌供试品色谱中在39 min出现该特征峰,而在生何首乌药材供试品和清蒸制何首乌供试品色谱中未出现该峰,说明后两者中不存在大豆苷元。分析大豆苷元的色谱峰面积值,计算大豆苷元的含量,其平均值为 $(12.34 \pm 1.26) \text{mg/g} (n=5)$,见图2、表1。



A: 大豆苷元对照品; B: 黑豆汁制何首乌; C: 生何首乌; D: 清蒸制何首乌。

图2 大豆苷元标准品和样品色谱图

Figure 2 Chromatogram of daidzein standard and sample

表1 大豆苷元含量的检测结果
Table 1 Results of daidzein content

组别	黑豆汁制何首乌	生何首乌	清蒸制何首乌
大豆苷元含量(mg/g)	12.34±1.26	0.00	0.00

2.4 高效液相色谱的精密度实验

本研究发​​现精密度实验 RSD 为 2.18%, 表明本法的重复性好, 见表 2。

表2 精密度实验结果

Table 2 Experimental results of precision

样本序号	1	2	3	4	5
大豆苷元对照品峰面积	255	258	261	259	251
黑豆汁制何首乌峰面积	249	253	254	254	257
生何首乌峰面积	253	252	251	257	253
清蒸制何首乌峰面积	248	254	256	258	255
RSD(%)	2.18				

2.5 高效液相色谱的重复性实验结果

本研究发​​现重复性实验 RSD 为 2.97%, 表明本法的重复性好, 见表 3。

表3 重复性实验结果

Table 3 Repeatability experimental results

样本序号	1	2	3	4	5
峰面积	252	256	257	252	258
RSD(%)	2.97				

2.6 高效液相色谱的稳定性实验

本研究发​​现稳定性实验相对标准偏差 RSD 为 1.33%, 说明制备的供试品溶液中大豆苷元在 16 h 内具有良好的化学稳定性, 见表 4。

表4 稳定性实验结果

Table 4 Stability test results

时间(h)	0	2	4	8	16
峰面积	257	254	256	257	254
RSD(%)	1.33				

2.7 加样回收率实验

本研究样本的平均回收率为 99.21%, 相对标准偏差 RSD 为 2.06%, 见表 5。

表5 加样回收率实验结果

Table 5 Test results of sample recovery

样本序号	样品称样量(mg)	样本中大豆苷元含量(mg)	加入的对照品量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	100.00	1.06	1.12	2.17	97.21	99.21	2.06
2	100.00	1.11	1.12	2.25	102.11		
3	100.00	1.09	1.12	2.07	96.97		
4	100.00	1.05	1.52	2.53	98.44		
5	100.00	1.01	1.52	2.58	101.98		
6	100.00	1.03	1.52	2.52	98.82		
7	100.00	1.02	1.92	2.91	98.98		
8	100.00	1.04	1.92	2.90	97.96		
9	100.00	1.06	1.92	2.92	97.99		

3 讨论

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 2015 年版中国药典制何首乌项下记载了其炮制材料: 每 100 kg 何首乌片

(块), 用黑豆 10 kg, 何首乌经黑豆汁制后能增强和改变疗效^[5]。但是市场中存在的何首乌及其相关制品质量不一, 由其引发的安全问题时有发生, 对人们的健康构成一定的威胁^[6]。有研究利用 HPLC 测定二苯乙烯苷和蒽醌含量评估制首乌的

质量,结果发现不同工艺炮制一段时间后,二苯乙烯苷和总蒽醌含量炮制一段时间后发现二苯乙烯苷含量一直降低,对判断制首乌的质量的可靠性产生影响^[7]。为保障何首乌制品的用药安全,需要加强对产品的质量监管。大豆苷元是黑豆的主要指标成分,通过检测制何首乌中的大豆苷元成分,可对制何首乌进行质量控制,从而达到对黑豆制何首乌与其它炮制品进行有效鉴别的目的^[8]。有研究认为,经过黑豆汁炮制后的制何首乌会含有黑豆中的大豆苷元成分,可作为鉴别何首乌经规范化炮制的有效手段^[9]。因此,只需要测定通过检测制何首乌中的大豆苷元成分,对制何首乌进行质量控制,从而达到对黑豆制何首乌与其它炮制品进行有效鉴别的目的。因此,本课题拟通过薄层色谱法鉴定及 HPLC 测定黑豆制何首乌和清蒸制何首乌及生何首乌中是否含有大豆苷元成分,确定其是否经过黑豆汁的规范化炮制^[10-11]。本实验中采用了乙醇提取后再用乙酸乙酯萃取,减少了蒽醌类成分的背景干扰,获得较为清晰的结果。在制备何首乌样品液过程中加入适量乙酸乙酯浸泡,可提高大豆苷元的萃取率,并减少杂质对试验的干扰,这可能是由于大豆苷元在乙酸乙酯的溶解度较高。黑豆汁制何首乌色谱中,与大豆苷元对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点;生何首乌、清蒸制何首乌色谱中,与大豆苷元对照品相应的位置上不显相同颜色的荧光斑点,提示黑豆制何首乌中大豆苷元含量较高,可以通过检测大豆苷元含量鉴别黑豆制何首乌。有研究采用薄层色谱法检测黑豆制何首乌中大豆苷元含量效果较差,这可能是由于其在实验过程中选用甲醇做萃取剂,对大豆苷元的萃取效果不佳^[12]。有研究发现在提取制何首乌中的大豆苷元时,加入 25% 的盐酸,这样有利于黑豆中的大豆苷水解成大豆苷元,一定程度上增加了大豆苷元的含量,可提高检测效果^[13]。黑豆制何首乌中大豆苷元含量较低,同时含有酚类及蒽醌类化合物,本实验通过优化萃取条件,取得较好的分离效果,避免因样本杂质较多导致色谱实验失败。通过薄层色谱法较为直观地发现不同何首乌样本的斑点深度有一定差异,这表明不同何首乌制品的大豆苷元的含量差异较为明显,但不能精确评估大豆苷元含量的差异程度。本研究通过采用高效液相色谱法检测,发现黑豆汁制何首

乌供试品色谱中 19 min 出现该特征峰,而在生何首乌药材供试品和清蒸制何首乌供试品色谱中未出现该峰,说明后两者中未存在大豆苷元。这表明可以通过检测大豆苷元鉴别黑豆汁制何首乌与其它何首乌的区别。本实验采用甲醇-0.2%磷酸溶液-乙腈为流动相,弱酸性条件可有效减轻或消除峰拖尾的现象,使大豆苷元的色谱峰较为清晰。从色谱图中可以发现黑豆制何首乌中大豆苷元的保留时间与其它物质有明显差异,这说明流动相的洗脱效果较高,使不同极性的物质的保留时间和峰面积发生差异,有利于鉴别不同性质的物质。四级杆-飞行时间质谱技术可通过分析制何首乌分二苯乙烯苷及蒽醌类成分进行鉴定,实验结果较为准确、重复性好,但该方法对设备要求较高,难以推广应用,通过高效液相色谱法鉴别大豆苷元的实验表明色谱基线比较稳定,出峰时间适当,因而本鉴定方法有较好的应用价值。本研究结果表明高效液相色谱对检测黑豆制何首乌中大豆苷元含量具有较高的可靠性,在检测大豆苷元的含量时需严格控制样本的进样量水平,低于或高于参考进样量可导致实验结果的精度降低。

综上所述,本研究通过高效液相色谱实验发现黑豆汁制何首乌具有较高的大豆苷元含量,可以通过测定黑豆汁制何首乌大豆苷元含量,以达到区分何首乌是否经规范炮制,为有效、并可靠地规范何首乌生产提供有效方法。

参考文献

- [1] Chennupati P, Seguin P, Chamoun R, et al. Effects of high-temperature stress on soybean isoflavone concentration and expression of key genes involved in isoflavone synthesis [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 60 (51):421-427.
- [2] Xiao X, Yin Y, Hu Y, et al. Microwave-assisted extraction coupled with single drop microextraction and high-performance column liquid chromatography for the determination of trace estrogen adulterants in soybean isoflavone dietary supplements [J]. *J AOAC Int*, 2014, 93(3):849-854.
- [3] Stefanuto PH, Perrault KA, Dubois LM, et al. Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 73(17):803-808.

- [4] Wu Z, Li L, Li N, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of fatty acids in seeds of *brucea javanica* (L.) merr. from different sources and simultaneous analysis using high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection [J]. *Molecules*, 2017, 22(6):931-937.
- [5] Sairkar PK, Sharma A, Shukla NP. Estimation of guggulsterone E and Z in the guggulbased commercial formulations using high-performance thin-layer chromatography [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2017, 9(1):1-7.
- [6] Han T, Cao X, Xu J, et al. Separation of the potential G-quadruplex ligands from the butanol extract of *zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. by countercurrent chromatography and preparative high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 65(15):497-502.
- [7] Schwaiger M, Rampler E, Hermann G. Anion-exchange chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: a powerful tool for merging targeted and non-targeted metabolomics [J]. *Anal Chem*, 2017, 26(12):142-146.
- [8] Medriano CAD, Na J, Lim KM, et al. Liquid chromatography mass spectrometry-based metabolite pathway analyses of myeloma and non-hodgkin's lymphoma patients [J]. *Cell J*, 2017, 35(2):44-52.
- [9] Qu H, Qu B, Wang X, et al. Rapid, sensitive separation of the three main isoflavones in soybean using immunoaffinity chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(6):1196-1201.
- [10] Jervis J, Kastl C, Hildreth SB, et al. Metabolite profiling of soybean seed extracts from near-isogenic low and normal phytate lines using orthogonal separation strategies [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(44):879-887.
- [11] Dabas PC, Bancora P, Vescina CM, et al. Optimized separation conditions of soy isoflavonoids in urine by capillary zone electrophoresis [J]. *J Capill Electrophor Microchip Technol*, 2013, 8(4):53-58.
- [12] Ganzera M. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 122(23):364-369.
- [13] Cao Y, Xing H, Yang Q, et al. Separation of soybean isoflavone aglycone homologues by ionic liquid-based extraction [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(13):3432-3440.

(上接第421页)

- [17] 权泽威, 孔天宇, 哈利, 等. 前列地尔对老年糖尿病肾病病人氧化应激、炎性因子及血管内皮因子的影响 [J]. *实用老年医学*, 2018, 32(6):572-576.
- [18] 杨芦荟, 杨林, 宋志霞, 等. 左卡尼汀对糖尿病腹膜透析患者外周血 T 细胞亚群及炎症因子的影响 [J]. *中国药房*, 2017, 28(20):2837-2840.
- [19] 余伍中, 高国胜. 左卡尼汀对维持性血液透析患者营养指标及炎症状态的影响 [J]. *华西医学*, 2016, 31(1):25-28.
- [20] 史军海, 周麟. 腹膜透析治疗终末期糖尿病肾病的临床疗效 [J]. *江苏医药*, 2018, 44(5):501-504.
- [21] 金刚, 董倩兰, 梁衍, 等. 左卡尼汀联合血液透析对终末期肾病患者临床疗效及安全性评价 [J]. *西部医学*, 2018, 30(2):197-200, 204.
- [22] 胡跃玲, 陈明. 左卡尼汀在心血管疾病中的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2018, 39(3):426-429.
- [23] 夏朝霞, 路伟, 汪代杰, 等. 左卡尼汀联合前列地尔治疗糖尿病肾病的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(13):1172-1174.
- [24] 黄娟, 胡维, 熊丹. 左卡尼汀联合前列地尔治疗糖尿病肾病的疗效及其对患者血清 Cys C 及 RBP 水平的影响 [J]. *海南医学*, 2018, 29(2):183-186.

手足口病实验室检测方法的研究进展

欧晓燕 许彬*

[摘要] 手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)是由多种人肠道病毒引起的儿童常见传染病,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要症状,少数患者出现严重的神经后遗症,个别重症患儿病情进展快可导致死亡。了解手足口病病毒和可能与疾病发展相关病毒的病原学检测方法有利于进一步了解手足口病的传播模式和分子流行病学研究进展,有助于临床的对症治疗及预防控制该疾病的蔓延。本文就手足口病实验室检测方法的研究进展进行综述,为一线工作人员在临床实践过程中选择合适的 HFMD 检测方法提供参考。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A16 型; 病毒核酸检测方法

Research advances of laboratory detection methods for hand, foot and mouth disease

OU Xiaoyan, XU Bin*

(Clinical Laboratory of Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650100)

[ABSTRACT] Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) is an infectious disease common in children which is caused by various human enteroviruses. HFMD presents with a fever and rash or herpes on the hands, feet and mouth. A small number of patients have severe neurological sequelae, with a few severe cases of speedy development leading to death. Therefore, understanding detection methods for HFMD will not only help to understand further the modes of transmission and the molecular epidemiology of HFMD, but also will improve precise clinical treatment, prevention and control of the disease. In this paper, the research progress of research into laboratory testing methods for hand-foot-and-mouth disease will be reviewed, to provide a reference for frontline staff to select appropriate HFMD detection methods in clinical practice.

[KEY WORDS] Hand foot mouth disease; Enterovirus 71; Coxsackie virus A16; Viral nucleic acid detection methods

手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)是由多种肠道病毒(enterovirus, EVs)引起的一种流行性疾病,它可以通过各种传播途径进行传播,包括直接接触、胃肠道和呼吸道。根据世界卫生组织的报告,2010年内西太平洋多个地区已经报告了广泛的手足口病流行^[1-2]。在中国,每年有100多万人感染手足口病,这对儿童的健康构成了严重的威胁^[3-4]。

目前现有的EV71疫苗也尚未能为导致HFMD的所有EVs类型提供交叉保护^[5],因此选择合适的EVs检测方法明确患者感染类型对诊断HFMD进而采取最佳预防措施,对于有效控制HFMD的传播并有效控制其暴发至关重要。HFMD的临床诊断参照《手足口病诊疗指南(2018年版)》执行^[6],临床工作者常常通过采集患者的临床标本,进行病毒分离与鉴

作者单位:昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650100

*通讯作者:许彬, E-mail: 13708477759@163.com

定。目前临床上常用的实验室检测方法包括病毒分离培养法、血清学分析法、病毒核酸检测方法等。

本文拟对 HFMD 实验室检测方法进行综述,旨在为一线科研工作者在临床实践过程中选择合适的 HFMD 检测方法提供参考。

1 病毒分离培养法

病毒分离培养法是鉴定病毒感染性疾病的金标准^[7],其关键在于根据不同时期、不同地区流行株的不同选择对病毒敏感性不同的细胞系进行病毒培养。常用的实验室培养细胞有对柯萨奇病毒 A16 型(coxsackie virus A16, CVA16)和肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)敏感的人横纹肌肉瘤细胞(rhabdomyosarcoma cell, RD cell)、对柯萨奇 B 组病毒敏感的人喉癌上皮细胞(human Laryngeal carcinoma Hep-2 cell)、对 EV71 敏感的非洲绿猴肾细胞(kidney epithelial cells from African green monkey, Vero cell)等^[8-13]。病毒分离培养法通过采集患者粪便、肛拭子、咽拭子、咽喉洗液或疱疹液等制成悬液后接种于敏感细胞中进行培养,一般需要 7~14 天^[8, 13]。病毒分离培养在诊断 HFMD 上虽然精确,但该方法在诊断某些 EV 血清型的敏感性不足,且该方法所需的分离培养时间长,不利于 HFMD 的早期诊断^[7]。此外,该方法病毒培养过程繁琐,对病毒分离培养人员的操作技能要求较高,需要耗费大量的人力物力,无法满足流行地区大样本的检测,限制了它的临床应用。

2 血清学分析法

血清学分析法常用的包括中和抗体检测法、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、补体结合试验(complement fixation test, CF)等。

EV 入侵机体后可诱导机体产生免疫应答并在机体内产生较高水平的 IgG,抗体水平可保持 2 个月^[14]。中和抗体检测法通过对急性期和恢复期血清标本的病毒特异性抗体进行检测以作出诊断。Yang 和 Mao 等^[15-16]的研究证实,患者在感染 EV71 及 CVA16 后可通过中和试验检测到特异性中和抗体水平均有不同程度的明显增长,这就表明通过测定特异性抗体水平可以进行不

同病原体的鉴别诊断。但该方法存在观察时间较长、抗原漂移、出现交叉免疫反应等造成结果的不确定性,而且患者感染病毒后免疫应答产生抗体尚需一定时间,不适用于 HFMD 的早期诊断。

ELISA 也是通过抗原抗体的特异性结合反应进行不同病原的鉴别诊断。ELISA 可检测患者血清中的 IgM 和 IgG 抗体。该方法主要应用于快速诊断,操作简便、对实验操作人员无特殊要求,而且对于检测设备的要求也不高,普通的酶标仪即可满足需求,非常适合在基层医院的推广应用^[17-18]。然而,有研究显示,ELISA 检测 EV71-IgM、CVA16-IgM 抗体存在交叉反应,假阳性率可达 31.1%和 27.5%^[11],且 IgM 特异性抗体在患者体内持续时间长,根据 ELISA 的阳性检测结果也无法判断疾病是既往感染还是近期感染。

CF 通过感染期检测补体结合抗体可以区分既往感染和新近感染。然而该方法的特异性不高,常在不同肠道病毒的抗原之间存在交叉反应,使得检测结果假阳性率过高,不利于对 HFMD 的准确诊断^[19]。

3 病毒核酸检测方法

鉴于病毒培养法及血清学检测方法都存在一定的局限性,随着分子生物学技术的迅猛发展,核酸检测逐渐发展成为 EV 病原学检测新的“金标准”。核酸检测相较于传统的血清学检测方法具有快速、特异、敏感的优点。目前,常用的 HFMD 病原鉴定的核酸检测技术主要包括基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)原理的逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)、实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative RT-PCR, qRT-PCR)及以核酸杂交技术为基础的基因芯片技术(microarray)等分子诊断方法^[20]。

常规 RT-PCR 即在扩增时需首先进行逆转录将 RNA 转录成 cDNA,然后再进行特异 DNA 序列的扩增和检测的方法。引起 HFMD 的病毒主要为小 RNA 病毒科 EV 属成员^[21],其病毒核酸为 RNA,因此,RT-PCR 方法常用于 HFMD 的检测。RT-PCR 法通常针对高度保守的 5'非编码区(5'-un-

translated region, 5'-UTR)设计特异性引物进行扩增。引起 HFMD 的常见病毒之一 EV71,其衣壳蛋白由 VP1、VP2、VP3、VP4 4种外壳蛋白构成,其中 VP1 为主要的抗原决定簇,其核苷酸序列信息是 EV71 病毒分型的主要依据。有研究显示采用 EV71 和 CVA16 的 VP1 区的保守序列设计的引物对 101 份 HFMD 临床分离物进行检测,检出率均达到 100%^[22],表明 RT-PCR 用于检测 HFMD 的灵敏度非常高。然而后续有研究显示 VP1 也是病毒变异最大的结构片断,可以导致 EV71 的鉴定失败,这也促进了更多改良的 RT-PCR 检测技术的诞生。Jiang 等^[12]即针对 VP1 区多变的特性,选择了多个保守区域进行引物设计建立了多重 RT-PCR 技术,取得了良好的结果,但是多重 RT-PCR 容易存在交叉反应,且各对引物之间存在扩增效率不一致等问题。综合以上研究结果表明,RT-PCR 技术相较于传统的病毒分离培养法及血清学分析方法确实取得了里程碑式的进展,因为其不仅简化了实验操作流程,更重要的是在灵敏度和特异性上有了极大的提高,已成为 EV 感染快速诊断的重要手段。但由于病毒变异速度快,需要针对不同的片段设计引物,多重 RT-PCR 的交叉反应、扩增效率不一致问题,也成在一定程度上限制了其临床应用,qRT-PCR 检测技术应运而生。

qRT-PCR 在普通 RT-PCR 的基础上增加了荧光标记的特异性探针,可通过 PCR 循环阈值 (cycle threshold, CT) 和标准曲线对样本进行定性和定量分析。引起 HFMD 的病毒种类中最常见的为 EV71 和 CVA16^[23],因此,有研究首先针对 EV71 和 CVA16 VP1 基因设计了相应的引物和探针进行 EV71、CVA16 的检测,检测结果显示未有 2 种病毒以外的其他病毒被检测到^[24],表明该检测方法的特异性良好;而另一研究其检出阳性率达到 69.48% (148/213),远高于病毒分离培养法 34.74% (74/213) 和常规 RT-PCR 方法 47.42% (101/213)^[25],则表明 qRT-PCR 方法的灵敏度高于传统的检测方法。qRT-PCR 具有灵敏度高、特异性好的优点,常用于 EV71、CVA16 及 EV 的检测,有研究还发现选取咽拭子和疱疹液类型样本进行检测,可提高检出率^[26]。由于 HFMD 为全球性流行病,不同时期、不同地区其病毒株或许存在差异,因此,研究

者们还建立了相应的特异性检测技术,如巢式逆转录聚合酶链式反应 (nest RT-PCR)、逆转录环介导等温扩增 (reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 技术等^[19]。有研究对常用的几种 RT-PCR 方法进行了对比分析^[27-28],结果显示常规 RT-PCR 适用于检测病毒载量高的样本;巢式 RT-PCR 及 qRT-PCR 则适用于病毒载量低的临床样本;且常规 RT-PCR、巢式 RT-PCR 后续还需要进行电泳鉴定,操作繁琐,易污染;而 qRT-PCR 不需要后续步骤,结果直观,不易出现假阳性,临床上可以根据不同的需求来选择不同的检测方法。不可否认的是,这些技术的建立与优化使得 HFMD 的检测方法更加全面、准确,为 HFMD 的诊断提供了便利。

随着近几年 HFMD 的大规模暴发流行,临床病原学检测技术也在逐步向高通量、精准化发展。基因组测序的完成、数据的增长,基因芯片作为一种能够获得大量基因表达图谱的高通量技术迅速得到广泛应用。基因芯片技术是通过将特异的 DNA 片段高密度固化到特殊载体表面,与特殊荧光标记的样品分子进行杂交后通过扫描技术收集信号,并利用专门的生物信息软件进行分析,从而获得样品的信息情况^[29]。该法同时采用多组探针联合检测,规模大、通量高,尤其适用于暴发流行的 HFMD 病原检测,但是基因芯片相对血清学检测、PCR 方法对实验室仪器、人员都有较高要求,且该检测方法所使用的仪器、试剂均比较昂贵,这些硬性条件限制了其在临床上的推广应用。

由于非 EV71 型和非 CVA16 型肠道病毒的频繁出现,以及某些 HFMD 相关病原体检测呈阴性的病例的增加,使得 HFMD 监管困难,给 HFMD 的诊疗带来了新的挑战。随着分子诊断技术的飞跃,下一代测序技术 (next-generation sequencing, NGS) 从一种新兴技术变成了主流检测技术并被逐渐应用于临床诊断。与基因芯片技术不同,它不依赖于已知的序列信息,能对某一生境中的所有微生物的核酸序列进行并行测序与深入细致全基因组分析,具有通量高、速度快、效率高等优势,尤其适用于 HFMD 暴发流行的复杂病原检测分析,为疫情控制的提供了有效手段,也给病原生物诊断研究带来了重大变革。Wang 等^[30-32]的研究表

明 NGS 技术不仅能够为 HFMD 患者感染的病毒变异和进化提供序列依据、全面分析 HFMD 样本中的病原构成,也具有 HFMD 临床检测的可行性,且自 2008 年以来,随着 NGS 技术的不断革新,全基因组测序费用呈指数级下降,测序时间也降至 3 天,都为 NGS 在病原学临床检测的迅速推广应用创造了有利条件。

4 展望

近年来, HFMD 在我国呈现持续性的广泛散发或暴发流行状态,且越来越多患者感染非 EV71、非 CVA16 等以往不常见的其他肠道病毒,使得 HFMD 的监管越加艰难。快速地诊断 HFMD,明确感染病毒类型显得越加重要。传统的病毒分离培养、血清学分析法对人员、设备要求低,可在社区基层医院实现;基于 PCR 原理的病毒核酸检测方法则具有简便快捷且具有一定的灵敏度、特异度能够为 HFMD 的快速诊断提供依据;基因芯片及 NGS 技术则具有通量大、信息全面的优势,能够为新发病例提供全面的基因信息。

自 2015 年奥巴马提出了“精准医学计划”(precision medicine initiative)之后,“精准医疗”便成为全球健康领域的热门话题,这直接推动了基因测序以及建立在其基础上的分子诊断领域的发展。尤其是在 2015 年 10 月份 Pacific Biosciences 推出小型化的三代单分子测序仪 Sequel 更是标志三代测序时代的来临。但目前三代测序尚处于实验室研究阶段,临床应用尚不成熟,在三代基因测序技术突破之前,NGS 较现行技术有高通量、高准确性、成本适应当前消费端的优势,在中短期内,NGS 将成为临床基因测序领域的主力军。

分子生物学检测技术的不断发展, HFMD 的检测方法也日渐丰富,且不同的检测方法有不同的优、缺点。临床实验室应该具体情况具体分析,选择合适的检测方法,在必要的时候进行联合检测,为 HFMD 的全面、准确诊断提供可靠依据,为 HFMD 的个体化防治发挥作用。

参考文献

[1] Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(3):391-398.

[2] Koh W M, Bogich T, Siegel K, et al. The Epidemiology of Hand, Foot and Mouth Disease in Asia: A Systematic Review and Analysis [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2016, 35(10):e285-e300.

[3] 王春荣. 多种肠道病毒在手足口病流行中扮演的角色及演变趋势 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016(29):4029-4039.

[4] Wang C, Li X, Zhang Y, et al. Spatiotemporal Cluster Patterns of Hand, Foot, and Mouth Disease at the County Level in Mainland China, 2008-2012 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e147532.

[5] Chan J H, Law C K, Hamblion E, et al. Best practices to prevent transmission and control outbreaks of hand, foot, and mouth disease in childcare facilities: a systematic review [J]. *Hong Kong Med J*, 2017, 23(2):177-190.

[6] 《临床医学研究与实践》编辑部. 手足口病诊疗指南(2018 年版) [J]. *临床医学研究与实践*, 2018(17):201.

[7] 李斌, 欧维琳. 手足口病病原学及检测方法研究进展 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016(6):477-480.

[8] Luo S T, Chiang P S, Chung W Y, et al. Reemergence of enterovirus 71 epidemic in northern Taiwan, 2012 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e116322.

[9] Chiang P S, Huang M L, Luo S T, et al. Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients [J]. *Plos One*, 2012, 7(10):e48269.

[10] Hyeon J Y, Hwang S, Kim H, et al. Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8):1268-1275.

[11] Yu N, Guo M, He S J, et al. Evaluation of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 specific immunoglobulin M antibodies for diagnosis of hand-foot-and-mouth disease [J]. *Virology*, 2012, 9:12.

[12] Jiang B, Zhang J, You X, et al. Diagnosis of hand, foot, and mouth disease caused by EV71 and other enteroviruses by a one-step, single tube, duplex RT-PCR [J]. *J Med Virol*, 2012, 84(11):1803-1808.

[13] Wang C, You A, Tian X, et al. Analysis and solution of false-positives when testing CVA16 sera using an antibody assay against the EV71 virus [J]. *Virus Res*, 2013, 176(1-2):33-36.

[14] Gao F, Wang Y P, Mao Q Y, et al. Enterovirus 71 viral capsid protein linear epitopes: identification and characterization [J]. *Virology*, 2012, 9:26.

- [15] Yang C, Deng C, Wan J, et al. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications [J]. *Virology*, 2011, 8:306.
- [16] Mao Q, Wang Y, Yao X, et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(2):360-367.
- [17] Sarma N. Hand, foot, and mouth disease: current scenario and Indian perspective [J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2013, 79(2):165-175.
- [18] 潘锦华, 罗建辉, 杨国清, 等. 肠道病毒 71 型 IgM 抗体在手足口病诊断中的临床应用价值研究 [J]. *实验与检验医学*, 2015(1):72-74.
- [19] 王春花. 二代测序技术应用于手足口病病原谱的研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2017.
- [20] 王晓. 手足口病常见病原体的核酸检测技术研究进展 [J]. *华夏医学*, 2014(6):162-165.
- [21] Harvala H, Broberg E, Benschop K, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe [J]. *J Clin Virol*, 2018, 101:11-17.
- [22] Yan J J, Su I J, Chen P F, et al. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR [J]. *J Med Virol*, 2001, 65(2):331-339.
- [23] Wang B, Li J, Wang Y, et al. Understanding the epidemiological characteristics of EV71 and CVA16 infection to aid the diagnosis and treatment of hand, foot, and mouth disease [J]. *J Med Virol*, 2018. [Epub ahead of print]
- [24] Tan E L, Chow V T, Quak S H, et al. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61(3):294-301.
- [25] Cui A, Xu C, Tan X, et al. The development and application of the two real-time RT-PCR assays to detect the pathogen of HFMD [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e61451.
- [26] 张桂花. 荧光定量 PCR 法对手足口病病原学诊断价值 [J]. *辽宁医学杂志*, 2015(3):202-203.
- [27] 张龙, 袁青, 郑雅萍. 不同分子生物学方法在手足口病标本检测中的应用 [J]. *智慧健康*, 2017(12):102-103.
- [28] 关桂英, 王凤朝. 不同分子生物学方法检测手足口病标本的应用分析 [J]. *当代医学*, 2014(22):133-134.
- [29] 郭根柱. 手足口病的实验室检测及辅助诊断方法 [J]. *中国社区医师*, 2015(25):114-115.
- [30] Wang C, Zhou S, Xue W, et al. Comprehensive virome analysis reveals the complexity and diversity of the viral spectrum in pediatric patients diagnosed with severe and mild hand-foot-and-mouth disease [J]. *Virology*, 2018, 518:116-125.
- [31] Xu Y, Sun Y, Ma J, et al. A novel Enterovirus 96 circulating in China causes hand, foot, and mouth disease [J]. *Virus Genes*, 2017, 53(3):352-356.
- [32] Wang C H, Nie K, Zhang Y, et al. An Improved Bar-coded Oligonucleotide Primers-based Next-generation Sequencing Approach for Direct Identification of Viral Pathogens in Clinical Specimens [J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(1):22-34.

2018年第10卷中文总目录

述评&专家讲座

- 无创性结直肠癌生物标志物概要 梁媛紫 徐军发 黄华艺(1)
- 高通量测序背景下的单基因遗传病分子诊断进展 蔡奥捷 薛淑文 孔祥东(73)
- 血清表面抗原检测可能并非评价直接抗乙病毒药物临床效果的最好指标 鲁凤民(145)
- 肝豆状核变性的分子诊断与治疗 程楠 韩咏竹(217)
- 微流控技术在临床检测中的应用 沈韧 万凉 贾艳伟(289)
- 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用 朱娟娟 唐吉斌(361)

论 著

- GeXP多重分析技术检测肝癌组织长链非编码RNA表达的实验研究 史俊英 王晔 陈文 等(9)
- 红河州 HIV/HCV 合并感染者 HCV 基因亚型多样性及种系进化研究 杨兰辉 陈梅 霍松 等(17)
- 2014-2016年惠州市手足口病住院患儿流行病学研究 杨坤祥 陈剑虹 贺海林 等(25)
- 高危型 HPV 基因型在门诊就诊人群中的分布特征 严鸣光 殷卫兵(30)
- 广东省潮州地区献血者乙肝感染血清学和分子生物学特征 卢玉香 周筠(34)
- 结直肠癌患者血浆中可溶性血栓调节蛋白的水平及其临床意义 白驹 杨力芳(38)
- 老年原发免疫性血小板减少症患者治疗前后 T 淋巴细胞亚群的变化及意义 萨仁娜 托娅 白丽杰 等(43)
- 乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价 林健聪 王红翠 吴英松 等(47)
- PD-1 及 PD-L1 在宫颈上皮内瘤变及鳞癌中表达差异性的临床研究 杨雯 康佳蕊 金贻铎 等(78)
- RASSF1A 基因甲基化和 SCC 联合检测在非小细胞肺癌转移监测中的应用 张洪彬 张满娥 黄文滨 等(85)
- 生殖系统 CT、UU、NG 三种病原体感染现状分析 王敬仁 陈杏园 罗世强 等(91)
- 胎儿染色体非整倍体无创检测在产前诊断中的应用价值 张丽科 余学高 黄彬 等(96)
- 不同方法学测定乙型肝炎病毒核心抗体的阳性率及其定量检测意义的研究 王红翠 林健聪 吴英松 等(103)
- 广东省 HER-2 基因检测室内质控存在的问题分析 李淑华 郑晓克 王芳 等(108)
- γ -干扰素释放实验在结核病诊断中的应用价值分析 王甲甲 唐义斌 张玲英 等(115)
- 2016年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析 陈静宜 廖飞 冯磊(148)
- 沉渣包埋法在卵巢肿瘤手术盆腔冲洗液细胞学诊断中的应用 谭丽珊 陈玉英 余健华 等(153)
- 新型多重不对称 PCR-电化学芯片法检测甲型流感病毒 蒋析文 黄桃生 黄志文 等(158)
- G6PD 活性、UGT1A1、SLCO1B1、ABCC2 基因多态性和新生儿高胆红素血症的关系研究 肖奇志 郭洪创 李恋湘 等(163)
- 两种无义突变 p.Gln263X 和 p.Tyr351X 导致的遗传性凝血因子 XI 缺陷症家系分析 翁妙珊 林芬 章金灿 等(169)
- RNA 干扰沉默 SOX9 对肾细胞癌 786-O 细胞体外增殖、凋亡及裸鼠成瘤能力的影响 楚广民 张建波 孙森森(174)
- 25-羟维生素 D3 与 IL-10 在系统性红斑狼疮中的临床应用研究 张韶斌 陈斯亮 符青松 等(180)
- 微量元素对标准型 α 地中海贫血孕妇妊娠结局影响的研究 刘建雷 曾赤佳 王文 等(184)
- 氨氯地平阿托伐他汀钙片对冠心病患者 QT 离散度与冠脉病变程度的影响 姚朝阳 金凤(189)
- 广东江门地区 13 725 例新生儿遗传性耳聋基因筛查结果分析 唐佳 曾钦龙 李秋丽 等(222)
- 1 610 例湘潭地区孕妇耳聋基因突变位点筛查及临床意义 李春成 谢月英 周旭丽 等(228)
- 不同时序 HAART 结合抗 HCV 治疗对 HIV 合并 HCV 感染患者肝功能的影响 胡锡坤(235)
- 乳腺癌患者血清 PPAR- γ 基因甲基化 qPCR 检测及临床意义 韦美德 董家书 周格琛 等(241)

BRAF^{T790A}在甲状腺乳头状癌患者外周血中的表达及其临床意义 潘在兴 蒋翡翎 姚敏 等(246)

5-Aza-CdR对MDA-MB-231细胞*PPAR-γ*基因甲基化的影响 董家书 韦美德 周格琛 等(252)

PCR荧光探针法在Y染色体微缺失检测中的应用 陈晴晴 李少英 冼嘉嘉 等(257)

HR-HPV合并UU感染状况及与宫颈上皮内瘤变的相关性研究 何江耀 赵任龙 果海娜(262)

长期递增负荷运动对大鼠胸腺上皮和胸腺激素表达的影响 任超学 郝选明 金艳平(268)

2型糖尿病周围神经病变相关因素分析 李长岭 张东铭 王崇贤 等(274)

中山市孕中期产前筛查指标中位数的建立及临床价值研究 李冬秀 吴学威 黄湘 等(278)

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

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

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

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

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

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

耐碳青霉烯类雷氏普罗威登斯菌耐药机制研究 贾琴妹 孙乐 满宝华(332)

2014-2017年玉林市手足口病监测结果分析 谭烈明 邓艺燕(337)

拉米夫定对乙肝合并肺结核患者免疫功能及肝功能的影响 韩美玉(342)

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

血清LDL与2型糖尿病周围神经病变的相关性研究 黄娟 胡维 熊丹(352)

人乳头状瘤病毒少见亚型在宫颈病变患者分布状况的研究 李娇 李娜 赵静妮 等(367)

脊髓背角NMDA受体NR2B亚基对舒芬太尼耐受形成的影响研究 郑孝振 毛珊珊 任益锋 等(372)

非小细胞肺癌*EGFR*、*ALK*和*ROS1*基因联合检测及突变共存分析 李晓锋 张冠军 汪园园 等(378)

沙眼衣原体、单纯疱疹病毒2型、人乳头瘤病毒16型多重荧光定量PCR检测方法的建立及其应用
..... 胡天 卓永光 樊祖茜 等(385)

HAART过程HIV/AIDS患者PBMC中HIV-1前病毒DNA的动态变化及其意义 陈伟烈 何瑞英 雷华丽 等(390)

吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者CD8⁺T细胞的影响 刁鑫 兀威 张进召(395)

联合检测抗苗勒管激素和性激素对卵巢储备功能评估的临床价值 郑建波 李艳 夏尊恩(400)

胰岛素样生长因子1基因多态性与多囊卵巢综合征相关性研究 马龙飞 李娟 冯庚(406)

尿酸联合糖化血红蛋白早期检测对高龄孕妇妊娠期糖尿病发病的预测 李华 殷红梅 李英(411)

前列地尔联合左卡尼汀对ESDN患者肾功能、炎性因子的影响 李昌艳 刘娟 顾芳 等(417)

黑豆汁制何首乌中大豆苷元含量测定 邓青 李霓冰(422)

综述

高通量测序技术在检测循环肿瘤细胞中的应用 许芳 赵阳 武其文(56)

长链非编码RNA在乳腺癌中的研究进展 许家瑞 胡剑 刘冬冬 等(61)

人类微生物组学与健康及其临床检验的需求 王庆忠 范云 沈祁焯(67)

长链非编码RNA在口腔鳞状细胞癌中的研究进展 黄佳欣 邵婷如 陈跃川 等(120)

环境胁迫下细菌非编码小RNA对基因表达的调控 何宇婷 陈茶 黄彬(125)

14-3-3σ影响肿瘤发生发展和治疗的细胞及分子机制 谢蕴灵 罗海丹 杨惠玲(132)

新型环介导等温扩增技术开发与应用研究进展 张亚平 郑志高 简保磊 等(138)

登革热检测技术应用及发展 蒋力云 狄飏 杨智聪(196)

地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展 李继慧 覃运荣 梁毅(202)

CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展 张庆颜 董小玉 臧乃亮 等(206)
过氧化物还原酶6在中枢神经系统疾病中的研究现状 唐建巍 肖广庆 陈慧珍 等(212)
分子诊断技术在心房颤动临床诊疗中的应用 张维贞 向丽 黄山(283)
细胞外囊泡与红细胞生成及相关制品的研究进展 孙士鹏 安成 刘贵建 等(356)
手足口病实验室检测方法的研究进展 欧晓燕 许彬(428)

专家风采

周强 (封二)
刘万里 (封二)
耿燕 (封二)
韩咏竹 (封二)
贾艳伟 (封二)
肖昕 (封二)

实验室巡礼

广州医科大学附属第二医院检验科 (封三)
中山大学附属肿瘤医院检验科 (封三)
西安交通大学第二附属医院医学检验科 (封三)
安徽中医药大学神经病学研究所附属医院实验中心 (封三)
澳门大学 AMSV 微流控实验室 (封三)
中山大学附属第六医院遗传代谢病实验室 (封三)

Total Contents (Volume 10, 2018)

COMMENTS

- A summary of biomarkers for colorectal cancer noninvasive detection
LIANG Yuanzi, XU Junfa, HUANG Huayi (1)
- Advances in genetic diagnosis of monogenic diseases under high-throughput sequencing
CAI Aojie, XUE Shuwen, KONG Xiangdong (73)
- Molecular diagnosis and therapy of hepatolenticular degeneration
CHENG Nan, HAN Yongzhu (217)
- Applications of microfluidic technology in clinical diagnosis
SHEN Ren, WAN Liang, JIA Yanwei (289)
- Clinical application of polymorphism analysis in the methylenetetrahydrofolate reductase gene
ZHU Juanjuan, TANG Jibin (361)

ORIGINAL ARTICLES

- Development of a GeXP-based multiplex RT-PCR assay for detection of long non-coding RNA in hepatocellular carcinoma
SHI Junying, WANG Ye, CHEN Wen, LIU Chengyu, MU Xiaofeng (9)
- Genotypes diversity and phylogenetic analysis of HCV in HIV/HCV co-infection patients in Honghe
YANG Lanhui, CHEN Mei, HUO Song, MA Xingli, LI Qiongfeng (17)
- Epidemiologic study of pediatric inpatients with hand foot and mouth disease in Huizhou during 2014-2016
YANG Kunxiang, CHEN Jianhong, HE Hailin, ZHONG Zeyan (25)
- Infection status of high risk-human papillomavirus and its genotype distribution in outpatients
YAN Mingguang, YIN Weibing (30)
- The serological and molecular characterization of hepatitis B virus infection in blood donors in Chaozhou, Guangdong province
LU Yuxiang, ZHOU Yun (34)
- The level and clinical significance of plasma soluble thrombomodulin in patients with colorectal cancer
BAI Ju, YANG Lifang (38)
- Changes and significance of T lymphocyte subsets before and after treatment in elderly patients with primary immune thrombocytopenia
SA Renma, TUO Ya, BAI Lijie, NIU Yudong (43)
- The performance verification and clinical application evaluation of the quantitative kit for Hepatitis B Virus Markers
LIN Jiancong, WANG Hongcui, WU Yingsong, DONG Zhining, LI Zhixiong (47)
- Clinical study on the different expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous carcinoma
YANG Wen, KANG Jiarui, JIN Yiduo, WANG Hongwei (78)
- Application of combined detection of DNA methylation of *RASSF1A* and *SCC* in metastatic monitoring of non-small cell lung cancer
ZHANG Hongbin, ZHANG Man, HUANG Wenbin, LU Zhihua (85)
- Analysis of the prevalence of CT, UU and NG in reproductive system
WANG Jingren, CHEN Xingyuan, LUO Shiqiang, XU Zehui, CAI Pengfei, QIN Xiao, TANG Ning (91)
- Clinical value of non-invasive prenatal test in detecting chromosome aneuploidy
ZHANG Like, YU Xuegao, HUANG Bin, LIU Jihong (96)
- Analysis of the positive rate of hepatitis B virus core antibody and study on its quantitative detection significance
WANG Hongcui, LIN Jiancong, WU Yingsong, DONG Zhining, LI Zhixiong (103)
- Analysis of the problems existed in the quality control of *HER-2* gene testing in Guangdong Province
LI Shuhua, ZHENG Xiaoke, WANG Fang, LI Li, SUN Shijun, HE Dan, PENG Yan, ZHOU Jianwen, HE Qiong,
ZHU Yuxin, WANG Liantang, KE Zunfu (108)
- Application value of interferon-gamma release assays in the diagnosis of tuberculosis
WANG Jiajia, TANG Yibin, ZHANG Lingying, HONG Hua, TAN Taichang, WANG Zhibin (115)
- Distribution and drug resistance of bacterial flora in children with lower respiratory tract infections in a hospital at Yuxi, Yunnan in 2016
CHEN Jingyi, LIAO Fei, FENG Lei (148)
- Application of sediment embedding method in cytological diagnosis of pelvic lavage fluid in ovarian tumors
TAN Lishan, CHEN Yuying, YU Jianhua, CHEN Zhihui, GUO Hui (153)
- Detection of influenza A virus by multiplex asymmetric PCR-electrochemical chip
JIANG Xiwen, HUANG Taosheng, HUANG Zhiwen, ZHANG Xianpeng, YIN Sanhong (158)
- The relationship between G6PD activity, *UGT1A1*, *SLCO1B1*, *ABCC2* gene polymorphisms and neonatal hyperbilirubinemia
XIAO Qizhi, GUO Hongchuang, Li Lianxiang, WANG Zhaoqing, LI Lei, KUANG Wenyong, ZHOU Yuqiu (163)

Analysis of hereditary coagulation factor XI deficiency pedigree induced by two kinds of nonsense mutations, p.Gln263X and p.Tyr351X WENG Miaoshan, LIN Fen, ZHANG Jincan, WU Jiaoren, XING Shaoyi, YANG Liye	(169)
Effect of silencing <i>SOX9</i> by RNA interference on proliferation and apoptosis of renal cancer 786-O cells in vitro and tumorigenicity in nude mice CHU Guangmin, ZHANG Jianbo, SUN Miaomiao	(174)
The study of clinical application of 25-hydroxy vitamin D3 and IL-10 in systemic lupus erythematosus ZHANG Shaobin, CHEN Siliang, FU Qingsong, LUO Guanchao, HUANG Wangxiang	(180)
Effect of trace elements on pregnancy outcome of pregnant women with standard alpha thalassemia LIU Jianlei, ZENG Chijia, WANG Wen, YU Junjian, XU Xiangjuan	(184)
Effect of amlodipine besylate and atorvastatin calcium tablets on the QT dispersion and coronary artery disease degree of patients with coronary heart disease YAO Zhaoyang, JIN Feng	(189)
Analysis of genetic screening of 13 725 neonatal hereditary deafness in Jiangmen district, Guangdong province TANG Jia, ZENG Qinlong, LI Qiuli, FENG Jianjiang, GUAN Cuiliu, RONG Liyu, RONG Linhui, WU Yuyu, DENG Choufen, SUN Shuxiang, SUN Tielan, LI Zhiming, TAN Shuming, TAN Jieliang, LUO Liangping	(222)
Clinical significance and screening of deafness gene mutation sites in 1 610 pregnant women from Xiangtan area LI Chuncheng, XIE Yueying, ZHOU Xuli, LIU Wei, XIE Lanhong	(228)
Effect of different timing highly active antiretroviral therapy combined with anti-HCV therapy on the liver function in patients with HIV/HCV co-infection HU Xikun	(235)
Detection and clinical significance of serum <i>PPAR-γ</i> gene methylation in patient with breast cancer WEI Meide, DONG Jiashu, ZHOU Gechen, DENG Kaifeng, DAI Shengming	(241)
Expression and clinical significance of <i>BRAF^{G1799A}</i> in peripheral blood of patients with papillary thyroid carcinoma PAN Zaixing, JIANG Feiling, YAO Min, WEI Xiaobin, YE Fangli	(246)
Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on methylation of <i>PPAR-γ</i> gene in MDA-MB-231 cell DONG Jiashu, WEI Meide, ZHOU Gechen, DENG Kaifeng, DAI Shengming	(252)
Application of PCR fluorescence probe in detection of Y chromosome microdeletion CHEN Qingqing, LI Shaoying, XIAN Jiajia, WANG Yanchao, LI Qing	(257)
Study on the relationship between high-risk humanpapilloma virus with ureaplasma urealyticum infection and cervical intraepithelial neoplasia HE Jiangyao, ZHAO Renlong, GUO Haina	(262)
Effect of long-term incremental exercise on thymus epithelial and thymus hormone expression in rats REN Chaoxue, HAO Xuanming, JIN Yanping	(268)
Analysis of the related factors of peripheral neuropathy in type 2 diabetes LI Changling, ZHANG Dongming, WANG Chongxian, FU Yanqin	(274)
The establishment and clinical value of the median of screening serum-markers for second-trimester pregnant women in Zhongshan LI Dongxiu, WU Xuwei, HUANG Xiang, ZHONG Yuheng, LIANG rui	(278)
The clinical and pathological characteristics of primary breast diffuse large B-cell lymphoma WANG Yuanyuan, YANG Zhe, DENG Yuan, CHANG Hongyun, LI Xiaofeng, ZHANG Guanjun, LIU Xi	(295)
Detection of methylation of <i>SOX1</i> and <i>VIM</i> promoters in tumor tissues and serum from patients with endometrial carcinoma and its clinical significance SHU Xinhong, FAN Hongli, LI Xiaoyan	(301)
Quantitative determination of free β human chorionic gonadotropin: establishment and performance evaluation of chemiluminescence immunoassay WU Huaying, WANG Xiaoyan, LI Zhixiong, DONG Zhining, WU Yingsong, XU Weiwen	(307)
Quality analysis of human <i>EGFR</i> gene mutation detection kits in 2017 SUN Nan, YU Ting, HUANG Jie, QU Shoufang	(315)
Establishment and clinical evaluation of a rapid real-time RT-PCR for detection of rotavirus A Chen Feng, Tang Xiaoyu, QiuBaofeng, LiLinzhong, Yan Hui	(320)
The value of C- reactive protein, serum amylase A protein and neutrophil surface antigen CD64 in the early diagnosis of neonatal infectious diseases WU Yubin, KUI Liyue, ZHAO Xiaofen, LI Yangfang, CUI Shan, DU Kun	(327)
Study on the drug resistance mechanism of carbapenem-resistant <i>Providencia rettgeri</i> JIA Qinmei, SUN Le, MAN Baohua	(332)
Analysis of the surveillance results of hand, foot and mouth disease in Yulin City in 2014-2017 TAN Lieming, DENG Yiyan	(337)
Effect of lamivudine on immune function and liver function in patients with hepatitis B complicated with pulmonary tuberculosis HAN Meiyu	(342)

Changes of serum hs-CRP level in elderly patients with severe pneumonia and its clinical significance <i>SUN Chunrong, HUANG Linna, CUI Xiaoyang, YANG Ji</i>	(347)
Correlation between serum LDL and peripheral neuropathy in type 2 diabetes <i>HUANG Juan, HU Wei, XIONG Dan</i>	(352)
Study on the distribution of rare human papillomavirus subtypes in patients with cervical lesions <i>LI Jiao, LI Na, ZHAO Jingni, LI Yanqing, ZHAO Siyu, LIU Yufeng, LI Yuwei, NIU Jing, WANG Yawen</i>	(367)
Effect of NMDA receptor NR2B subunit on the tolerance of sufentanil in spinal dorsal horn <i>ZHENG Xiaozhen, MAO Shanshan, REN Yifeng, HAN Xiaodi, SONG Junjie</i>	(372)
Combined detection and coexistent genetic mutation analysis of <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> and <i>ROS1</i> in non-small cell lung cancer <i>LI Xiaofeng, ZHANG Guanjun, WANG Yuanyuan, YANG Zhe, LIU Xi</i>	(378)
Application of multiplex fluorescence quantitative PCR assay for detection of Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus type 2 and human papillomavirus type 16 <i>HU Tian, ZHUO Yongguang, FAN Zuqian, HUANG Yongxia</i>	(385)
Dynamic change of HIV-1 proviral DNA in PBMC from HIV/AIDS patients during highly active antiretroviral therapy and its significance <i>CHEN Weilie, HE Ruiying, LEI Huali, YUAN Xiaozhen, HU Fengyu, LI Linghua</i>	(390)
Effect of smoking on CD8 ⁺ T cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease <i>DIAO Xin, WU Wei, ZHANG Jinzhao</i>	(395)
Clinical significance of combined detection of anti-mullerian hormone and sex hormone on ovarian reserve function <i>ZHENG Jianbo, LI Yan, XIA Zunen</i>	(400)
Association between insulin-like growth factor 1 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome <i>MA Longfei, LI Juan, FENG Geng</i>	(406)
Early detection of uric acid combined with glycosylated hemoglobin for predicting the incidence of gestational diabetes in elderly pregnant women <i>LI Hua, YIN Hongmei, LI Ying</i>	(411)
Effect of alprostadil combined with levocarnitine on renal function and inflammatory factors in patients with ESDN <i>LI Changyan, LIU Juan, GU Fang, XIONG Chaolei</i>	(417)
Study on the content of Daidzein in Polygonum multiflorum Thunb with black bean juice <i>DENG Qing, LI Nibing</i>	(422)

REVIEWS

Application of high throughput sequencing technology in detection of circulating tumor cells <i>XU Fang, ZHAO Yang, WU Qiwen</i>	(56)
Progress of Long Non-coding RNA in Human Breast Cancer <i>XU Jiarui, HU Jian, LIU Dongdong, LI Youqiang, LIN Li, LIU Dan, XU Jianhua</i>	(61)
Human microbiome related with human health and its requirement for clinical diagnosis <i>WANG Qingzhong, FAN Yun, SHEN Qiye</i>	(67)
The progress of lncRNAs in oral squamous cell carcinoma <i>HUANG Jiaxin, SHAO Tingru, CHEN Yuechuan, LV Xiaozhi</i>	(120)
The regulation of bacterial small non-coding RNA on gene expression under environmental stress <i>HE Yuting, CHEN Cha, HUANG Bin</i>	(125)
The cellular and molecular mechanism of 14-3-3 σ influence on the development and treatment of tumors <i>XIE Yunling, LUO Haidan, YANG Huiling</i>	(132)
Recent progress in technology development and application of loop-mediated isothermal amplification <i>ZHANG Yaping, ZHENG Zhigao, JIAN Baolei, ZHU Weiwei</i>	(138)
Application and development of dengue fever detection <i>JIANG Liyun, DI biao, YANG Zhicong</i>	(196)
Advances of laboratory molecular diagnostic techniques for thalassemia <i>LI Jihui, QIN Yunrong, LIANG Yi</i>	(202)
Advances in research and application of CRISPR/Cas9 system in human diseases <i>ZHANG Qingyan, DONG Xiaoyu, ZANG Nailiang, XU Weiwen</i>	(206)
The research progress of peroxiredoxin 6 in central nervous system diseases <i>TANG Jianwei, XIAO Guangqing, CHEN Huiizhen, LI Aimin</i>	(212)
The application of molecular diagnostic technique in the diagnosis and treatment of atrial fibrillation <i>ZHANG Weizhen, XIANG Li, HUANG Shan</i>	(283)
Advances in research on extracellular vesicles and erythropoiesis and related products <i>SUN Shipeng, AN Cheng, LIU Guijian, WU Zhikui</i>	(356)
Research advances of laboratory detection methods for hand, foot and mouth disease <i>OU Xiaoyan, XU Bin</i>	(428)

2018年第10卷作者索引(按汉语拼音字母顺序排列)

- A**
安成(5):356
- B**
白驹(1):38
白丽杰(1):43
- C**
蔡奥捷(2):73
蔡鹏飞(2):91
常红云(5):295
陈茶(2):125
陈峰(5):320
陈慧珍(3):212
陈剑虹(1):25
陈静宜(3):148
陈梅(1):17
陈晴晴(4):257
陈斯亮(3):180
陈伟烈(6):390
陈文(1):9
陈杏园(2):91
陈玉英(3):153
陈跃川(2):120
陈智慧(3):153
程楠(4):217
楚广民(3):174
崔珊(5):327
崔晓阳(5):347
- D**
戴盛明(4):241
(4):252
邓筹芬(4):222
邓开凤(4):241
(4):252
邓青(6):422
邓艺燕(5):337
邓元(5):295
狄飏(3):196
刁鑫(6):395
董家书(4):241
(4):252
董小玉(3):206
董志宁(1):47
(2):103
(5):307
杜琨(5):327
- F**
樊祖茜(6):385
范红莉(5):301
范云(1):67
冯庚(6):406
冯建江(4):222
冯磊(3):148
符青松(3):180
付艳琴(4):274
- G**
顾芳(6):417
关翠柳(4):222
郭洪创(3):163
郭慧(3):153
果海娜(4):262
- H**
韩美玉(5):342
韩箫笛(6):372
韩咏竹(4):217
郝选明(4):268
何丹(2):108
何江耀(4):262
何琼(2):108
何瑞英(6):390
何宇婷(2):125
贺海林(1):25
洪华(2):115
胡凤玉(6):390
胡剑(1):61
胡天(6):385
胡维(5):352
胡锡坤(4):235
黄彬(2):96
(2):125
黄华艺(1):1
黄佳欣(2):120
黄杰(5):315
黄娟(5):352
黄琳娜(5):347
黄山(4):283
黄桃生(3):158
黄望香(3):180
黄文滨(2):85
黄湘(4):278
黄永霞(6):385
黄志文(3):158
霍松(1):17
- J**
贾琴妹(5):332
贾艳伟(5):289
简保磊(2):138
蒋翡翎(4):246
蒋力云(3):196
蒋析文(3):158
金凤(3):189
金艳平(4):268
金贻铎(2):78
- K**
康佳蕊(2):78
柯尊富(2):108
孔祥东(2):73
邝文英(3):163
奎莉越(5):327
- L**
雷华丽(6):390
黎青(4):257
李爱民(3):212
李长岭(4):274
李昌艳(6):417
李春成(4):228
李冬秀(4):278
李华(6):411
李继慧(3):202
李娇(6):367
李娟(6):406
李磊(3):163
李丽(2):108
李恋湘(3):163
李林中(5):320
李凌华(6):390
李娜(6):367
李霓冰(6):422
李琼芬(1):17
李秋丽(4):222
李少英(4):257
李淑华(2):108
李小燕(5):301
李晓锋(5):295
(6):378
李琰清(6):367
李艳(6):400
李杨方(5):327
李英(6):411
李有强(1):61
李雨薇(6):367
李志雄(1):47
(2):103
(5):307
李智明(4):222
梁睿(4):278
梁毅(3):202
梁媛紫(1):1
廖飞(3):148
林芬(3):169
林健聪(1):47
(2):103
林莉(1):61
刘成玉(1):9
刘丹(1):61
刘冬冬(1):61
刘贵建(5):356
刘集鸿(2):96
刘建雷(3):184
刘伟(4):228
刘希(6):378
刘宇峰(6):367
卢玉香(1):34
卢志华(2):85
罗莞超(3):180
罗海丹(2):132
罗良平(4):222
罗世强(2):91
- 吕晓智(2):120
- M**
马龙飞(6):406
马兴丽(1):17
满宝华(5):332
毛珊珊(6):372
牟晓峰(1):9
- N**
牛婧(6):367
牛誉栋(1):43
- O**
欧晓燕(6):428
- P**
潘在兴(4):246
彭燕(2):108
- Q**
仇保丰(5):320
覃肖(2):91
覃运荣(3):202
曲守方(5):315
- S**
萨仁娜(1):43
邵婷如(2):120
沈祁焯(1):67
沈韧(5):289
史俊英(1):9
舒新红(5):301
宋俊杰(6):372
孙春荣(5):347
孙乐(5):332
孙森森(3):174
孙楠(5):315
孙士鹏(5):356
孙世珺(2):108
孙淑湘(4):222
孙铁兰(4):222
- T**
谭洁亮(4):222
谭丽珊(3):153
谭烈明(5):337
谭淑明(4):222
谭泰昌(2):115
唐吉斌(6):361
唐佳(4):222
唐建巍(3):212
唐宁(2):91
唐晓宇(5):320
唐义斌(2):115
托娅(1):43
- W**
万谅(5):289
汪园园(5):295
(6):378
- 王崇贤(4):274
王芳(2):108
王红翠(1):47
(2):103
王宏伟(2):78
王甲甲(2):115
王敬仁(2):91
王连唐(2):108
王庆忠(1):67
王文(3):184
王小艳(5):307
王亚文(6):367
王燕超(4):257
王晔(1):9
王昭晴(3):163
王智斌(2):115
韦美德(4):241
(4):252
魏小斌(4):246
翁妙珊(3):169
吴教仁(3):169
吴学威(4):278
吴英松(1):47
(2):103
(5):307
吴玉芹(5):327
吴玉宇(4):222
吴志奎(5):356
伍华颖(5):307
武其文(1):56
兀威(6):395
- X**
夏尊恩(6):400
冼嘉嘉(4):257
向丽(4):283
肖广庆(3):212
肖奇志(3):163
谢兰红(4):228
谢月英(4):228
谢蕴灵(2):132
邢少宜(3):169
熊朝磊(6):417
熊丹(5):352
徐建华(1):61
徐军发(1):1
徐伟文(3):206
(5):307
徐向娟(3):184
许彬(6):428
许芳(1):56
许家瑞(1):61
许泽辉(2):91
薛淑文(2):73
- Y**
严辉(5):320
严鸣光(1):30
杨惠玲(2):132
杨霁(5):347
- 杨坤祥(1):25
杨兰辉(1):17
杨力芳(1):38
杨立业(3):169
杨雯(2):78
杨喆(5):295
(6):378
杨智聪(3):196
姚朝阳(3):189
姚敏(4):246
叶芳丽(4):246
殷红梅(6):411
殷三鸿(3):158
殷卫兵(1):30
于婷(5):315
余健华(3):153
余俊健(3):184
余学高(2):96
袁小珍(6):390
- Z**
臧乃亮(3):206
曾赤佳(3):184
曾钦龙(4):222
张东铭(4):274
张冠军(5):295
(6):378
张洪彬(2):85
张建波(3):174
张进召(6):395
张丽科(2):96
张玲英(2):115
张满娥(2):85
张庆颜(3):206
张韶斌(3):180
张维贞(4):283
张险朋(3):158
张亚平(2):138
章金灿(3):169
赵静妮(6):367
赵任龙(4):262
赵思雨(4):367
赵晓芬(5):327
赵阳(1):56
郑建波(6):400
郑晓克(2):108
郑孝振(6):372
郑志高(2):138
钟裕恒(4):278
钟泽艳(1):25
周格琛(4):241
(4):252
周建文(2):108
周筠(1):34
周旭丽(4):228
周玉球(3):163
朱娟娟(6):361
朱巍巍(2):138
朱宇辛(2):108
卓永光(6):385

2018年第10卷主题词索引(按汉语拼音字母顺序排列)

14-3-3 σ (2):132
 2型糖尿病(4):274
 (5):352
 25-羟维生素 D3(3):180
 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(6):361
 5-Aza-CdR(4):252
 786-O 细胞(3):174
 沉淀包埋法(3):153
ATP7B 基因(4):217
 A 组轮状病毒(5):320
BRAP^{WT/90A}(4):246
 CD8⁺T 细胞(6):395
 CRISPR/Cas9 系统(3):206
 C-ros 原癌基因 1-受体酪氨酸激酶(6):378
 C-反应蛋白(5):327
 DNA 甲基化(5):301
EGFR(5):315
 G6PD 缺乏症(3):163
 GeXP 系统(1):9
GJB2(4):228
GJB3(4):228
 HBeAg 血清学转化(2):103
HER-2(2):108
 HPV 少见亚型(6):367
 IL-10(3):180
 LncRNA(1):9
 MDA-MB-231 细胞(4):252
mtDNA 12S rRNA(4):228
MTHFR A1298C(6):361
MTHFR C677T(6):361
MYC 基因重排(5):295
 NR2B 亚基(6):372
 PCR 反向斑点杂交法(4):222
 PCR 荧光探针法(4):257
PPAR- γ (4):241
 (4):252
 qPCR(1):9
 QT 离散度(3):189
RASSF1A 基因甲基化(2):85
 ROC 曲线(6):400
SLC26A4(4):228
SOX9(3):174
 T 淋巴细胞亚群(1):43
 TNM 分期(1):38
 Wilson 病(4):217
 Y 染色体微缺失(4):257
 α -地中海贫血(3):202
 β -地中海贫血(3):202
 γ -干扰素释放试验(2):115

A
 吡啶盐(5):307
 氨氯地平阿托伐他汀钙片(3):189

B
 标准型 α -地中海贫血(3):184
 表观遗传学(1):1
 表皮生长因子受体(6):378
 丙型肝炎(1):17
 丙型肝炎病毒(4):235
 病毒分离(3):196
 病毒核酸检测方法(6):428
 波形蛋白(5):301
 不对称 PCR(3):158

C
 产前筛查(4):278

肠道病毒(1):25
 (5):337
 肠道病毒 71 型(6):428
 常规细胞涂片法(3):153
 长链非编码 RNA(1):61
 (2):120
 超敏 C-反应蛋白(5):347
 沉渣包埋法(3):153
 程序性细胞死亡分子-1(2):78
 程序性细胞死亡分子配体-1(2):78
 磁微球(5):307

D
 大豆苷元(6):422
 单纯疱疹病毒 2 型(6):385
 单核苷酸多态性(3):163
 (6):361
 单基因遗传病(2):73
 登革热(3):196
 地中海贫血(3):202
 递增负荷运动(4):268
 电化学发光(2):138
 电化学芯片(3):158
 定量测定(1):47
 定量检测(2):103
 对比研究(1):47
 多囊卵巢综合征(6):406
 多重 RT-PCR(1):9
 多重荧光定量 PCR(6):385

E
 耳聋基因筛查(4):222

F
 非编码 RNA(5):356
 非编码小 RNA(2):125
 非小细胞肺癌(2):85
 (6):378
 肺结核(5):342
 分析性能验证(1):47
 分子信标(2):138
 分子诊断(2):73
 分子诊断技术(3):202
 (4):283

G
 肝豆状核变性(4):217
 肝功能(5):342
 肝细胞癌(1):9
 感染性疾病(5):327
 高胆红素血症(3):163
 高龄孕妇妊娠期糖尿病(6):411
 高通量测序(1):56
 (1):67
 (2):73
 高效逆转录病毒治疗(4):235
 (6):390
 宫颈癌(1):30
 (6):367
 宫颈病变(6):367
 宫颈鳞癌(2):78
 宫颈上皮内瘤变(2):78
 (4):262
 共存突变(6):378
 冠脉病变程度(3):189
 冠心病(3):189
 过氧化氢还原酶(3):212

H
 何首乌(6):422
 核酸检测(3):196
 黑豆汁(6):422
 红细胞生成(5):356
 红细胞制品(5):356
 化学发光法(1):47
 化学发光免疫分析(5):307
 环介导等温扩增技术(2):138

J
 基因(1):61
 基因编辑(3):206
 基因表达(2):125
 基因多态性(6):406
 基因分析(4):257
 基因分型(1):30
 基因突变(3):169
 (4):246
 基因型(1):17
 基因亚型(1):17
 基因诊断(4):217
 基因治疗(4):217
 基因组分析(1):56
 极速实时荧光 RT-PCR(5):320
 脊髓角(6):372
 家系分析(3):169
 甲基化(4):241
 (4):252
 甲型流感病毒(3):158
 甲状腺乳头状癌(4):246
 间变性淋巴瘤激酶(6):378
 检测试剂盒(5):315
 检测限(5):315
 结核病(2):115
 结直肠癌(1):1
 (1):38
 解脲脲原体(2):91
 解脲支原体(4):262
 聚合酶链反应(5):337
 菌群分布(3):148

K
 抗病毒药物治疗(2):103
 抗苗勒管激素(6):400
 抗体检测(3):196
 抗原检测(3):196
 柯萨奇病毒 A16 型(6):428
 可溶性血拴调节蛋白(1):38
 口腔鳞状细胞癌(2):120

L
 拉米夫定(5):342
 雷氏普罗威登斯菌(5):332
 临床病理(5):295
 临床检测(5):289
 临床检验(1):67
 临床应用(4):283
 淋球菌(2):91
 鳞状上皮细胞癌抗原(2):85
 流行病学(1):25
 颅脑损伤(3):212
 卵巢储备功能减退(6):400
 卵巢肿瘤(3):153

裸鼠成瘤(3):174

M
 慢性阻塞性肺疾病(6):395
 酶联免疫反应(5):347
 弥漫大 B 细胞淋巴瘤(5):295
 免疫(4):268
 免疫表型(5):295
 免疫功能(1):43
 (5):342
 免疫环介导等温扩增技术(2):138

N
 耐药基因(5):332
 耐药性分析(3):148
 脑肿瘤(3):212
 尿酸(6):411
 凝血因子 XI(3):169

Q
 前病毒 DNA(6):390
 前列地尔(6):417
 缺血再灌注损伤(3):212

R
 人类疾病(3):206
 人类免疫缺陷病毒 1 型(6):390
 人类微生物组(1):67
 人免疫缺陷病毒(4):235
 人乳头瘤病毒(1):30
 (2):78
 (4):262
 人乳头瘤病毒 16 型(6):385
 妊娠结局(3):184
 乳腺(5):295
 乳腺癌(1):61
 (2):108
 (4):241

S
 沙眼衣原体(2):91
 (6):385
 神经退行性疾病(3):212
 肾功能(6):417
 生物标志物(1):1
 生物信息学(1):67
 实时荧光定量 PCR(2):91
 室间质控(2):108
 手足口病(1):25
 (5):337
 (6):428
 舒芬太尼耐受(6):372

W
 外周血(4):246(6):395
 外周血单个核细胞(6):390
 微量元素(3):184
 微流控(5):289
 无创性产前检测技术(2):96
 无精子症因子(4):257

X
 吸烟(6):395
 系统性红斑狼疮(3):180
 细胞外囊泡(5):356
 细菌(2):125
 下呼吸道感染(3):148
 下一代测序(2):96
 献血者(1):34
 相关因素(4):274
 小干扰 RNA(3):174
 心房颤动(4):283
 芯片实验室(5):289
 新生儿(3):163
 (4):222
 (5):327
 性别决定区 Y 框蛋白 1(5):301
 性激素(6):400
 性能评价(5):320
 胸腺(4):268
 胸腺激素(4):268
 胸腺上皮细胞(4):268
 血管内皮细胞(1):38
 血清低密度脂蛋白(5):352
 血清淀粉酶 A(5):327
 血清学(1):34
 循环肿瘤细胞(1):56

Y
 胰岛素样生长因子 1(6):406
 乙肝标志物(1):47
 乙肝病毒基因型(1):34
 乙型肝炎(5):342
 乙型肝炎病毒(1):34
 乙型肝炎病毒核心抗体(2):103
 荧光原位杂交(2):108
 游离 β 人绒毛膜促性腺激素(5):307
 原发性免疫性血小板减少症(1):43
 孕中期(4):278
 运动性免疫抑制(4):268

Z
 质量分析(5):315
 质量控制(4):278
 中性粒细胞表面抗原 64(5):327
 终末期糖尿病肾病(6):417
 肿瘤(1):56
 (2):132
 肿瘤标志物(2):120
 肿瘤筛查(1):1
 肿瘤抑制蛋白(2):132
 肿瘤转移(2):85
 种系进化分析(1):17
 重症肺炎(5):347
 周围神经病变(4):274
 准确性(5):315
 子宫内膜癌(5):301
 左卡尼汀(6):417

中山大学附属第六医院遗传代谢病实验室

中山大学附属第六医院遗传代谢病实验室位于广州市天河区员村二横路26号,于2010年建立,隶属于中山大学胃肠病研究所,是利用质谱技术进行遗传代谢病诊断分析,建立以气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)技术、液相色谱串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术及高通量测序技术为主的遗传代谢病诊断平台。

实验室与全球最顶尖的遗传代谢病研究机构日本松本生命科学研究院缔结了共同组建遗传代谢病实验室的协议,把日本的先进技术尿素酶预处理-气相色谱-质谱法(GC/MS)直接引进中国。通过GC/MS技术可以从100 μ L的尿液样本分析250种代谢产物,进行142种遗传代谢病诊断,该技术检测水平在国内外处于领先水平。实验室LC-MS/MS技术可通过新生儿筛查的血斑点标本分析71种代谢产物,诊断52种遗传代谢病。实验室在2014年之前就自主研发了新生儿遗传代谢病(inherited metabolic diseases, IMD)质谱分析系统,该系统能够大批量完成串联质谱波谱数据化、质谱检测数据全自动导入、异常代谢产物算法和人工智能算法,自动诊断分析新生儿常见遗传代谢病,构建了可以存储百万级质谱检测数据的数据库。通过该自主分析系统的运用,能为临床应用提供规范的、可靠的遗传代谢病诊断,大大降低串联质谱的使用门槛,使得一些偏远地区和医疗不发达地区也可以通过国产化的诊断分析软件快速进行遗传代谢病的诊断,做到早诊断、早治疗。对于一些疑难病例,可以通过软件自带的专家会诊平台进行专家会诊分析,结合染色体分析、特定基因分析、医学外显子测序、全外显子测序、全基因组测序进行确诊,很好地促进了遗传代谢病的临床诊断和治疗。

实验室与中山大学相关实验室进行技术合作,利用高通量测序和芯片平台,构建省内外遗传性疾病的资源网络,探索疾病与遗传因素的关系,针对遗传多态性发掘本地人群的遗传特征,建立中国华南地区遗传代谢病基因位点数据库,拓展遗传性疾病的病种,寻求植入前诊断和产前诊断少见遗传性疾病的技术和方法。

目前实验室已积累十几万例新生儿血样MS-MS检测结果、一万多例尿样GC-MS检测结果及300多例基因检测结果,这些大样本数据的积累为国内遗传代谢病的临床诊断提供了可靠的依据。实验室承担了多项国家级和省级重大科研项目,包括国家自然科学基金、广州市健康医疗协同创新重大专项(700万)、广东省科技计划项目、广州市科技计划项目等,在研经费超过1000万元。在多项实验研究的基础上,实验室不断完善遗传代谢病诊断的关键技术和早产儿代谢组学技术。在国内外核心期刊发表论文100多篇。主编《新生儿机械通气治疗学》《新生儿危重症监护治疗学》《实用新生儿重症医学》和《实用儿童重症医学》等多部专著,培养博士4名,硕士60余名。

学科带头人肖昕为中山大学附属第六医院儿科主任,遗传代谢病实验室主任,同时担任中国医师协会新生儿专业委员会内分泌及遗传代谢病专业委员会副主任委员,海峡两岸医药卫生交流协会理事兼新生儿专业委员会副主任委员,广东省医师协会儿科专业委员会副主任委员等学术职务。从事儿科临床工作近30年,致力于研究小儿遗传代谢性疾病及新生儿疾病的诊断与治疗。



→ 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