



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

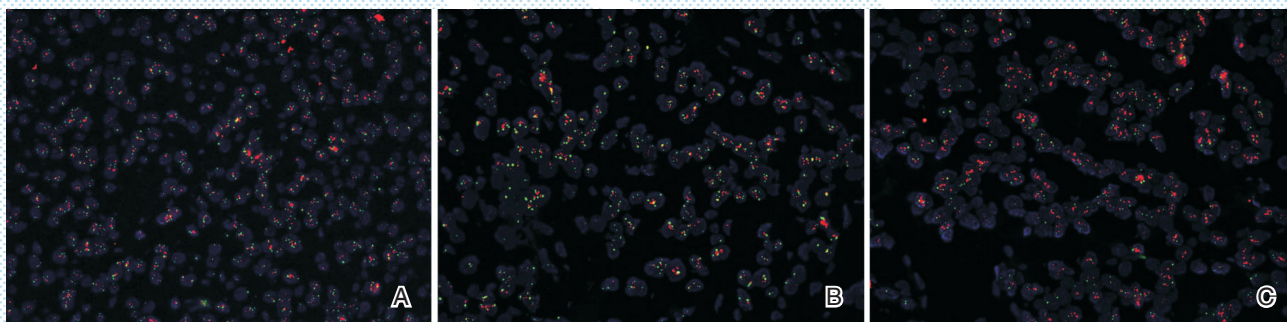
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2016年9月 第8卷 第5期 总第45期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 8 Number 5 September 2016



A: 无扩增(-); B: 不确定(+/-); C: 扩增(+)

图(P311) 乳腺癌中 *HER-2* 基因的 FISH 检测 (FISH, 400×)

Figure(P311) Results of *HER-2* by FISH in breast carcinoma (FISH, 400×)

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

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

吴英松



吴英松,《分子诊断与治疗杂志》第二届、第三届、第四届编辑委员会委员。

1974年3月出生,2001年毕业于第一军医大学,获医学博士学位。

教授,博士生导师。现任南方医科大学抗体工程研究所所长。广东省高等学校“千百十工程”省级培养对象。担任中国医学装备协会检验医学分会委员,广东省医学会检验分会委员,广东省医疗器械设备及器械标准化技术委员会委员,广东省寄生虫学学会理事等。

吴英松教授长期从事分子诊断和新型免疫学检测技术的研究,在稀土元素作为免疫学检测的示踪物方面形成了特色和优势。承担及完成国家、省部级研究课题20余项,其中主持国家重大科技专项(传染病专项)、国家“863”分题、国家自然科学基金(3项)课题共8项。获省部级科技进步二等奖2项(署名均为第三)。发表相关论文150余篇,其中SCI收录48篇(“Oncotarget”,“J Proteomics Research”,“Analytica Chimica Acta”,“RSC Adv”,“Analyst”,“PLoS One”等)。以主编和副主编身份出版《时间分辨荧光免疫技术》和《实验室生物安全》2本专著。主编《定制医疗现曙光-分子诊断技术的应用》科普书籍。副主编《分子诊断学》和《分子诊断学实验指导》2本全国高等医药院校医学检验专业规划教材获得授权专利5项。以第一研制者的身份获国家新药证书3项,医疗器械体外诊断试剂注册证26项。

参与半自动时间分辨荧光免疫分析仪(YY/T 1304.1-2015)及时间分辨荧光免疫分析定量测定试剂(盒)(YY/T 1304.2-2015)行业标准的制定。培养和招收博士后、博士及硕士研究生28名。



分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016 年 9 月 第 8 卷 第 5 期 总第 45 期 Bimonthly Volume 8 Number 5 September 2016

主管 主办	中山大学 《中国家庭医生》杂志社有限公司
顾问 主编 编辑部主任 编辑部 编辑 排版 出版	来茂德 申子瑜 李明 徐伟文 《分子诊断与治疗杂志》编辑部 李晓兰 叶萍萍 李彩珍 钟华安 《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址 电话 传真 电子邮箱 刊号	广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 10~11 楼(510620) (020) 32290177 32290789-206 (020) 32290177 jmdt@vip.163.com ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号 发行单位 发行范围 广告经营许可证 印刷 出版日期 定价	46-283 广东省报刊发行局 国内外公开发行 粤工商广字第 01139 号 广州中大印刷有限公司 2016 年 9 月 18 日 RMB 15.00 元
Responsible Institution Sponsor	Sun Yat-sen University China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.
Consultant Editor in Chief Managing Director Editorial Office Editors Typesetting Editing	LAI Maode SHEN Ziyu LI Ming XU Weiwen <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office LI Xiaolan YE Pingping LI Caizhen ZHONG Huaan China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.
Add Tel Fax E-mail CSSN Printing Publish Date Price	10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620 (020) 32290177 32290789-206 (020) 32290177 jmdt@vip.163.com ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd. 2016.9.18 RMB 15.00

版权归《分子诊断与治疗杂志》所有,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点,除非特别声明。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2016年9月 第8卷 第5期

目次

述评

下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用 邵向阳 徐伟文 (289)

论著

运用全外显子组测序技术诊断非综合征性耳聋基因变异

..... 刘维强 张慧敏 余国就 等 (297)

广西玉林特殊教育学校耳聋相关基因突变分析 李伍高 严提珍 唐宁 等 (303)

非特殊型浸润性乳腺癌HER-2检测方法的对比研究 成玉霞 赫淑倩 董贺 等 (308)

沉默Kin17表达抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖..... 孙振亚 梁琳 何洁婷 等 (316)

云南昆明地区非小细胞肺癌EGFR突变情况研究 苏国苗 杨哲 边莉 等 (321)

河池地区乙型肝炎病毒基因型分布的相关性研究 唐毓凡 韦桂宁 (325)

玉林437例高危型人乳头瘤病毒感染与宫颈上皮内瘤变的分析 李继慧 黎华辉 (328)

11 530例佛山市妊娠晚期妇女B族链球菌感染情况的回顾性分析

..... 庄锡伟 孟霞 杨康 等 (332)

地中海贫血产前遗传筛查流程简化的风险评估 肖奇志 李恋湘 谢建红 等 (336)

维生素D缺乏影响受孕及胚胎发育的小鼠动物模型研究 王波 王雪云 (341)

综述

HBV核苷(酸)类似物耐药突变及其检测技术的临床应用 巢薇 何宝玉 (346)

克雅病的分子诊断 罗生辉 蔡继勇 (352)

新型肿瘤标志物人附睾蛋白4的临床应用 王雅菲 王丽娟 托娅 (356)

专家风采

吴英松 (封二)

实验室巡礼

南方医科大学生物技术学院抗体工程研究所 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 5 September 2016

CONTENTS

COMMENTS

Advances in next-generation sequencing (NGS) technology and their application in cancer research

SHAO Xiangyang, XU Weiwen (289)

ORIGINAL ARTICLES

Identification of gene variations in patients with nonsyndromic deafness by using whole-exome sequencing method

LIU Weiqiang, ZHANG Huimin, YU Guojia, SUN Xiaofang (297)

Analysis of deafness-related gene mutations in hearing loss patients in Yulin special education school of Guangxi

LI Wugao, YAN Tizhen, TANG Ning, LI Zhetao, TANG Xiangrong, YANG Yan, CAI Ren, LI Jingwen (303)

Comparison of different methods for *HER-2* status detection in non-special invasive breast carcinoma

CHENG Yuxia, HE Shuqian, DONG He, SUN Qing (308)

Silencing of *Kin17* inhibits proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells

SUN Zhenya, LIANG Lin, HE Jieting, WANG Lingling, ZENG Tao (316)

Study on mutation of *EGFR* gene in non-small cell lung cancers in Kunming of Yunnan

SU Guomiao, YANG Zhe, BIAN Li, PAN Guoqing (321)

Distribution and correlation research of hepatitis B virus genotypes in Hechi area

TANG Yufan, WEI Guining (325)

Investigation of cervical intraepithelial neoplasia in 437 high-risk human papilloma virus infected patients from Yulin

Li Jihui, Li Huahui (328)

Retrospective analysis of 11 530 cases of group B streptococcus infection in the late pregnancy women in Foshan

ZHUANG Xiwei, MENG xia, YANG Kang, LIANG Weida (332)

The risk assessment of prenatal genetic screening procedure simplified for thalassemias

XIAO Qizhi, LI Lianxiang, XIE Jianhong, LI Lei, WANG Ge, ZHANG Jingwei, LONG Ruoting, ZHOU Yuqiu (336)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 5 September 2016

CONTENTS

Effect of vitamin D deficiency on the pregnancy and embryonic development in mouse model

WANG Bo, WANG XueYun (341)

REVIEWS

Hepatitis B virus nucleos(t)ide analogues drug resistance mutations and the clinical application of
variation loci detection

CHAO Wei, HE Baoyu (346)

The molecular diagnosis of creutzfeldt-jakob disease

LUO Shenghui, CAI Jiyong (352)

The clinical application of the new tumor marker of human epididymis 4

WANG Yafei, WANG Lijuan, TUO Ya (356)

• 述 评 •

下一代测序(NGS)技术的发展及在肿瘤研究的应用

邵向阳 徐伟文*

【摘要】 下一代测序(next-generation sequencing, NGS)由于高灵敏度、高通量、高度自动化等特性,近年来在疾病的研究和诊断治疗中越来越多地被应用。下一代测序技术的发展为肿瘤分子生物学的研究提供了新的手段。本文就下一代测序技术的种类、特点、发展趋势及其在肿瘤研究中的应用作简要的综述。

【关键词】 下一代测序(NGS); 肿瘤; 精准医疗

Advances in next-generation sequencing(NGS) technology and their application in cancer research

SHAO Xiangyang, XU Weiwen*

(School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

【ABSTRACT】 Next-generation sequencing (NGS) platforms have recently evolved to provide an accurate and comprehensive means for the research and diagnosis of diseases. Advancements in next generation sequencing technology have provided a new way for the study of the molecular biology of tumors. In this review, the characteristics and developmental trends of next generation sequencing technology are summarized, and applications in tumor research are discussed.

【KEY WORDS】 Next-generation sequencing (NGS); Tumor; Precision medicine

随着分子生物学技术的不断发展,人类对生命现象和疾病的研究已经不再局限在单个基因位点,而是将目光集中于全基因组方面。Sanger测序法是科学研究和临床实验室里首选的测序金标准技术^[1],人类基因组计划就是依靠Sanger测序法才得以完成的^[2]。随着技术革新,DNA测序技术得到了不断的创新,在保证测序准确度的前提下,逐步优化操作程序,使得测序速度逐渐提高,测序成本也呈下降趋势,下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)就应运而生,并在随后得到突破性进展。《Nature Methods》在2007年评选的生物领域影响力最大的技术中,NGS技术以高票当选^[3]。与Sanger测序技术不同,NGS技术通过反复测序同一区域的DNA

片段,达到更高的灵敏度和准确度,同时通量高、自动化程度高,可在短时间内完成对上百亿碱基的测序^[4],使得在几天内完成人类全基因组测序成为可能^[5-7]。也正因为NGS技术的高准确度、高速度以及低成本,对推动分子生物学的发展起到了重要作用,为肿瘤分子生物学的研究提供了新的手段,尤其在肿瘤分子诊断领域更是占有更重要的地位。

1 二代测序技术简介及特点

2005年世界上首台新一代测序仪问世,并且很快就被应用到了如火如荼的分子生物学领域当中。NGS技术,并不是某种单一的技术,而是一个技术群。不同的NGS平台,在其原理上有所不

基金项目:十二五国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA020205);广州市产学研协同创新重大专项(201508020052)

作者单位:南方医科大学生物技术学院,广东,广州 510515

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

同。基本的原理都是在 DNA 进行 PCR 扩增时,借助一些化学标志物在碱基插入 DNA 链时发出的信号来读取序列信息,信号可以是光信号,也可以是 H^+ 流信号(H ion fluxes)。

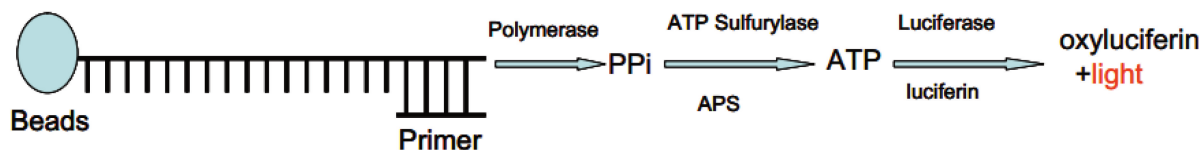


图1 454 测序原理示意图^[8]

Figure 1 Principle of 454 sequencing^[8]

GS FLX 系统的流程概括起来,就是“一个片段=一个磁珠=一条读长(one fragment=one bead=one read)”。“一个片段=一个磁珠”是指长度为 300~800 bp 的 DNA 片段与接头(3'和 5'端具有特异性)连接,带有接头的单链 DNA 片段构成样本文库,特别设计的 DNA 捕获磁珠固定单链 DNA 文库,每一个磁珠只能与一种独特的单链 DNA 片段结合。随后把结合 DNA 片段的磁珠和 PCR 扩增试剂的水溶液注入到矿物油中,形成油包水混合物,这样就形成只包含一个结合 DNA 片段的磁珠和 PCR 扩增试剂的微反应器。乳液 PCR 在各自的微反应器里独立扩增,排除其他污染性和竞争性的影响。每一个片段经扩增后产生几百万个相同的拷贝,乳液混合物被打破后,扩增片段仍结合在磁珠上。“一个磁珠=一条读长”是指将捕获 DNA 的磁珠放入 PTP 板中进行测序反应,PTP 板只能容纳一个磁珠。将 PTP 板放在 GS FLX 中 4 种碱基依次按照 T、A、C、G 的顺序循环进入 PTP 板,每次只进入一个碱基。如果发生碱基配对就会释放一个焦磷酸,这个焦磷酸在 ATP 硫酸化酶(adenosine triphosphate-sulfurylase)和荧光素酶的作用下,经反应,最终把荧光素氧化形成氧化荧光素,同时产生光信号,被电荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)光学系统捕捉一个特异的检测峰值,依据峰值即可读出准确的 DNA 序列信息^[9]。每个磁珠都产生一条读长,通过 GS FLX 系统分析,最后得出样本的 DNA 序列信息。

焦磷酸测序法的准确率在 99% 以上。主要错误类型是插入-缺失,而不是替换,是因为相同碱基的连续插入,没有终止原件阻止单个循环的连续插入,相同碱基的长度需从信号强度中推断出来,

1.1 Roche/454^[5]

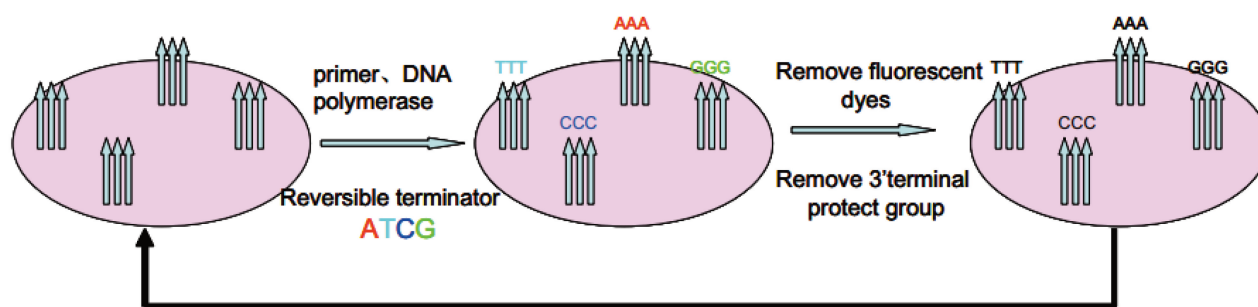
454 公司开创了边合成边测序的先河,后期又推出了 GS FLX 系统,主要采用焦磷酸测序(pyrosequencing)原理(图 1^[8])。

在这过程就可能产生误差。

1.2 Illumina/Solexa^[10]

Illumina 公司的二代测序仪 Genome Analyzer 最早是由 Solexa 公司研发的,其核心专利技术是“DNA 簇”和“可逆性末端终结(reversible terminator)”。其原理(图 2^[8])是:将基因组 DNA 经超声波打断成几百 bp 甚至更小的片段;然后进行末端修复补平加碱基 A;再加上接头(adapter)制备成文库。将样本文库加入到专利的芯片(flowcell)上,芯片表面种植了通过共价键链接 2 种与接头互补的寡核苷酸引物。文库经变性变成单链,其一端与芯片一种引物结合固定,另一端随机与附近的另一个寡核苷酸引物互补固定,形成单链桥状结构;并且以周围的寡核苷酸引物为扩增引物,在芯片上进行扩增,形成 2 条链。双链再次变性成单链,继续上述 PCR 过程扩增,这就是所谓的桥式 PCR 扩增。连续重复上述过程,待测 DNA 数量就会以指数方式增长,形成 DNA 簇。“可逆性末端终结”是指在测序过程中,使用“可逆终止子”进行边合成边测序。“可逆终止子”是带有荧光标记的脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP),但在 3'-羟基端带有可被化学切割的基团,这些基团能够封闭 dNTP 的 3'端黏性,阻止另一个 dNTP 与之相结合。使得每一步反应只能延伸一个碱基,采集完荧光信号,荧光基团去除,封闭基团被去掉,进行下一步反应,每步收集的荧光信号,对应所检测的序列。如此反复,得出片段的精确序列。

Genome Analyzer 测序原理采用稳定的可逆终止法边合成边测序技术,该技术使用 4 种含有末端阻断基团和不同荧光信号的碱基进行模板互补链的合成,不仅确保了测序的高精确性和高顺序性,

图2 Solexa 测序原理示意图^[8]Figure 2 Principle of solexa sequencing^[8]

而且排除了由重复序列和同聚物导致的测序错误。

1.3 Life/SOLiD^[11]

SOLiD 应用连接法测序,同时利用了独特的双碱基编码原理。以连接反应代替了传统的聚合酶连接反应。SOLiD 测序在文库构建和 PCR 扩增方面,与 GS FLX 系统很类似,都是通过磁珠接头捕获待测 DNA 片段,然后进行乳液 PCR。SOLiD 的磁珠只有 1 μm ,比 GS FLX 系统的磁珠小的多。SOLiD 连接反应的底物是长度 8 bp 的特殊单链荧光探针,其 3' 端第 1、2 位构成的碱基对是表征探针染料类型的编码区,5' 末端被标记 4 种荧光染料,因此不同的序列组合就被标记上不同的荧光基团。单向 SOLiD 测序包括 5 轮测序反应,每轮反应由多个连接反应构成,探针与测序引物相邻近的序列杂交,用颜色判断碱基序列,读取信号。然后通过化学方法在第 5 和第 6 位之间切割,把荧光信号淬灭,以进行下个位置的测序。第一次连接反应实际上连接上了 5 个碱基,通过这种方法,每次测序的位置都相差 5 位,即第一次测 1 和 2 位,第 2 次测 6 和 7 位……在测到末尾后,依次类推,进行第 2 轮连接反应;由于第 2 轮测序比第一轮测序往前移动了一个碱基,得到 0~1 位、5~6 位……的荧光信息,5 轮反应后,测出全部位置并且每个位置都被检测了 2 次。

SOLiD 测序技术在测序过程利用了独特的双碱基编码原理,能对测序错误进行校正,减少原始数据错误。以连接反应代替了传统的聚合酶连接反应能明显减少因碱基错配而出现的错误,在测序过程中更换引物也能减少背景噪音和错误率。目前 SOLiD 系统声称其原始碱基数据的准确度大

于 99.94%,而且 SOLiD 4 系统将再度升级。SOLiD 4 HQ package 将使每次运行产生 300 GB 可定位的序列数据,并带来 99.99% 的准确率^[12]。

1.4 Ion Torrent 测序平台

Ion Torrent 的核心技术是使用半导体技术在化学和数字信息之间建立直接的联系。Ion torrent 的基本原理是:把 DNA 链固定在半导体芯片的微孔中,随后依次掺入 ACGT 碱基。随着每个碱基的掺入,释放出氢离子,在它们穿过每个孔底部时能被检测到,通过对 H^+ 的检测,实时判读碱基。具体过程是:将待测 DNA 片段 2 端加上 Ion Torrent 测序接头制备成 DNA 文库。将文库克隆到离子微球颗粒上并进行乳液 PCR 扩增。将含有扩增模板的离子微球颗粒加入到半导体芯片上,测序时一个个碱基连续流过芯片微孔。如果碱基与特定微孔中的 DNA 分子互补,则该碱基被合成到 DNA 分子中,DNA 链每延伸一个碱基时,就会释放一个质子(H^+),导致局部 pH 发生变化。离子传感器检测到 pH 变化后,即刻便从化学信息转变为数字电子信息。如果 DNA 链含有 2 个相同的碱基,则记录电压信号是双倍的。如果碱基不匹配,则无 H^+ 释放,也就没有电压信号的变化。

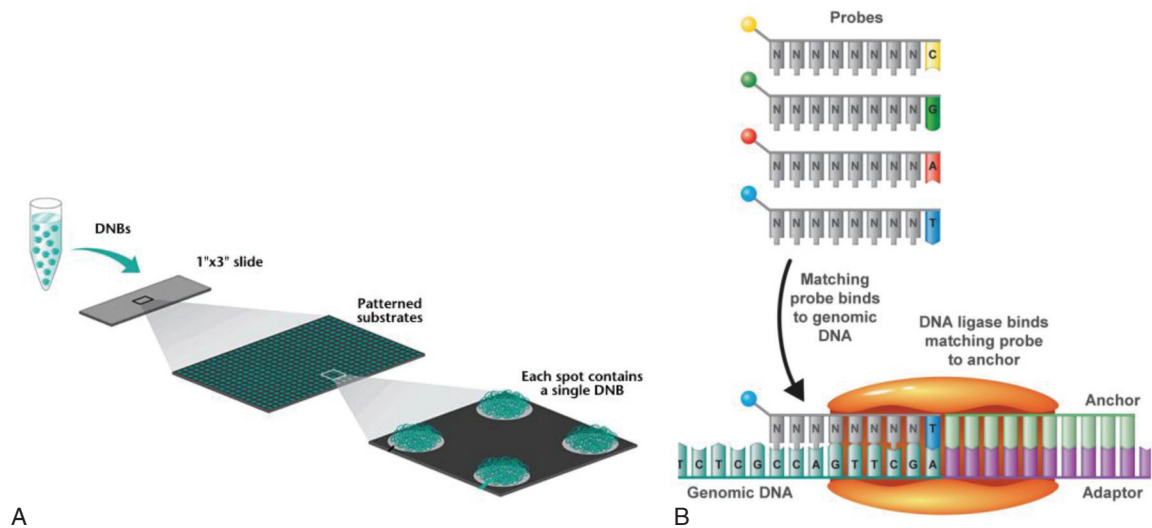
Ion Torrent 测序技术直接检测 DNA 的合成,因少了 CCD 扫描、荧光激发等环节,几秒钟就可检测合成插入的碱基,大大缩短了运行时间。通过对 H^+ 的检测,明显改善碱基判读准确性,测序成本低;该系统无需光学检测和扫描系统,无需标记荧光染料和化学发光的配套试剂,技术的读长相对较短。但若单个碱基连续重复出现多次,会导致一个循环里产生大量的 H^+ ,引起 pH 值的剧烈变化,导致信号不准确。

1.5 华大基因 CG 测序平台^[13-14]

CG 平台拥有 2 种独特的测序相关技术:DNA 纳米球芯片和组合探针锚定连接测序技术。DNA 纳米球芯片制备(图 3A):由 DNA 片段和 2 个接头组成 DNA 文库。测序时接头作为读取起始位点,可从 DNA 与接头连接处每次最多读取 10 个连续碱基,然后单链环状 DNA 分子通过滚环复制,形成一个包含 200 多个拷贝的 DNA 纳米球。将文库得到的 DNA 纳米球采用高密度 DNA 纳米芯片技术,加到芯片上的网状小孔内,每个小孔只能容纳一个 DNA 纳米球,DNA 纳米芯片的占用量超过 90%,每一个制备好的芯片可容纳 1 800 亿个碱基用于成像。组合探针锚定连接法(图 3B):组合探

针锚定连接法利用 4 种不同颜色标记的探针去读取接头附近的碱基,每次最多读取 10 个连续碱基且每次测序是相互独立的,在测序时,加入 anchor 与接头互补配对,然后 DNA 连接酶将 4 种不同颜色标记的探针结合到模板的相应碱基上,通过对荧光基团的成像来判断碱基类型。

CG 平台采用高密度 DNA 纳米芯片技术,在芯片上嵌入 DNA 纳米球,然后用复合探针-锚定分子连接技术来读取碱基序列。由 CG 开创的从头拼接(local *de novo*)技术,可精确检测等位基因杂合子突变,灵敏性高;采用组合探针锚定连接法技术来读取碱基可明显减少探针和酶的浓度。与边合成边测序不同,组合探针锚定连接法每个 cycle



图片引自 <http://bgitech.clhweb.com/science/cat-96-323.html>; 图 A:DNA 纳米球芯片制备; 图 B:复合探针-锚定分子连接

图 3 华大基因 CG 测序平台技术反应图示

Figure 3 Principle of Beijing Genomics Institute complete genomics sequencing

表 1 各测序平台原理和优缺点

Table 1 The principles, advantages and disadvantages of the sequencing platform

测序平台	测序原理	优点	相对局限性
Roche/454	焦磷酸测序法	在第二代中最高读长;比第一代的测序通量大	无法准确测量同聚物的长度
Illumina/Solexa	可逆链终止物和合成测序法	价格低,得到数据量大,通量高	仪器昂贵;用于数据删节和分析的费用较高,测序错误率高
Life/SOLiD	连接测序法	测序准确度高,成本低	测序时间长;读长短,成本高,数据分析困难
Ion Torrent	半导体技术在化学和数字信息之间建立直接联系	更准确,更快速,成本低	读长较短;单个碱基重复导致测序不准确
华大基因 CG 平台	复合探针-锚定分子连接测序技术	碱读取是完全独立,降低碱基错误率,价格低	读长较短

可一次性读取数个碱基,这样消耗的测序试剂和成像时间都大大减少。每次测序都是相互独立的,测序结果不受前一个碱基测序结果的影响,因此不会发生错误累积的现象。

以上5大技术产品平台是目前NGS的主流。它们技术原理不尽相同,各有自己的优缺点(表1),在科研和临床应用中发挥着重要的作用。

2 下一代测序技术在肿瘤研究中的应用

随着人类基因组计划的完成和测序技术的不断发展,NGS技术不仅保持高准确度,而且大大降低了测序成本并极大地提高了测序速度,在医学领域得到广泛应用。尤其在肿瘤分子诊断领域(cancer molecular diagnostics)更是当仁不让的主力军。

2.1 NGS在血液肿瘤中的应用

自Ley等^[15]在2008年首次报道了利用NGS技术对1例正常核型的急性髓细胞性白血病的基因组分析后,NGS就被广泛应用于肿瘤领域。在2012年美国血液学会(American Society of Hematology, ASH)年会上关于测序(sequencing)的文献共有643篇;其中,应用NGS的文章有220篇,涉及到急性白血病、骨髓增殖性疾病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、再生障碍性贫血、止血与血栓疾病等各类血液学疾患。对于一些临床表现非常相似的血液病如免疫缺陷病(severe combined immunodeficient disease, SCID)、血小板功能失调症,诊断变得很困难,传统的细胞学检测可能出现漏诊。鉴于NGS技术的高通量、高灵敏等优势,近几年来被越来越多地用于血液病的临床诊断治疗中。Sanger测序的敏感度只有15%~20%,低于此频率的突变检测不到,而NGS可以检测到低于1%的突变。由此看出,NGS相对于Sanger测序而言,能发现更多低频率的突变。NGS能同时检测多个基因,能更全面地了解肿瘤的分子遗传学特征。对于一个肿瘤个体来讲,其内部存在不同的亚克隆,这些克隆随着疾病的进展及治疗措施的干预会发生动态的变化。研究发现,肿瘤复发时突变的谱型会发生变化,有些是诊断时的主克隆群体产生了新的突变,而这些突变是原来的次要克隆携带的;有的是诊断时的次要克隆演变成主要克隆,此时次要克隆携带的突变变成了频率较高的突变。因此各克隆群体在诊断、治疗后和复发时的变化

带来的突变频率的变化在检测结果上就某一项突变而言,可能并无明显差异,但这种没有差异的表现并不能说明肿瘤内部克隆群体没有发生变化。因此,要综合所有的相关突变,以谱型的变化来判断肿瘤的进展、治疗的疗效及疾病的预后,NGS在这方面变出明显的优势^[16]。

2.2 NGS在循环肿瘤DNA检测中的应用

1948年Mandel和Metais^[17]在人体血液循环中发现游离DNA的存在,称之为“Cell-free DNA”(cfDNA)。随着研究的不断深入,目前研究发现肿瘤患者的外周血中能检测到游离核酸的存在^[18]。这些游离核酸以基因组和线粒体DNA成分为主,也被称为循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)^[19]。肿瘤细胞主要通过被动和主动机制2种途径来产生ctDNA。被动机制是肿瘤细胞坏死或者凋亡后,细胞中的DNA释放进入循环系统,游离地存在于血液中^[20]。主动机制则是指肿瘤细胞能主动释放DNA到外周循环之中;肿瘤细胞分泌的外排体也可以产生ctDNA。研究发现,在人类很多恶性肿瘤中均能检测到ctDNA如前列腺癌^[21]、肺癌^[22]、乳腺癌^[23]、大肠癌^[24]、肝癌^[25]、膀胱癌^[26]、宫颈癌^[27]、胰腺癌^[28]、卵巢癌^[29]等。肿瘤的原发灶和转移灶之间存在遗传学、表观遗传学和转录组学的差异。利用外周血中的ctDNA能更准确、更高效评估肿瘤的进展,如果肿瘤细胞发生某种突变,这些突变可以在ctDNA中反应出来,通过NGS对ctDNA测序获得突变信息,就获得了肿瘤细胞的突变信息。2014年4月在《Nature Medicine》发表的一篇文章指出,将NGS技术应用于血浆ctDNA检测,具有惊人的高特异性和敏感性。作者将此法命名为深度测序肿瘤个体化建档法(cancer personalized profiling by deep sequencing, CAPP-Seq)^[30]。研究者对不同级别的肺癌患者进行了CAPP-Seq验证,发现对II~IV期的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)检测敏感性达100%,I期的NSCLC中敏感性为50%;对各期肺癌的特异性均为96%。以上结果显示CAPP-Seq并不比金标准肿瘤活检的诊断效能差,能够准确测定肺癌的基因型。

研究发现,外周血中出现高频的肿瘤相关基因突变如p53、KRAS和APC等,往往与较高的临床分期有关,也预示着患者较差的预后;与肿瘤靶向

治疗、诊断及预后相关标记如 *K-ras*、*BRAF*、*HER-2*、*p53*、*EGFR*、*APC* 等,通过 NGS 技术对 ctDNA 中这些的标记物进行测序,能够更精确更全面地为肿瘤的靶向治疗、药效检测和患者的预后评估提供依据^[31-32]。

2.3 NGS 在肿瘤风险预测及预防中的应用

NGS 技术可使肿瘤防治措施前移至预防阶段。大量研究表明某些肿瘤的发生与个别关键基因突变有密切关系。乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene, *BRCA*)变异被发现与女性的遗传性乳腺癌和卵巢癌相关^[33-34]。*BRCA1/2* 基因是一类肿瘤抑制基因,可以帮助修复 DNA 损伤并能确保细胞的遗传物质(DNA)的稳定性,防止细胞生长变异。但当 *BRCA1/2* 基因发生变异后,细胞失去了这一保护作用,发生癌变的风险将大大增加,并且还存在家族遗传性。*BRCA2* 基因变异与男性乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌发生同样关系密切^[35]。美国好莱坞女星安吉丽娜·朱莉的案例就是一个应用实例。乳腺癌高危人群基因筛选技术以及肺癌基因检测技术已在临床投入使用,国家肿瘤临床医学研究中心开展的乳腺癌基因检测技术,是利用 NGS 测序技术就 *BRCA1*、*BRCA2* 等 6 个国际公认的乳腺癌易感基因,进行全外显子基因测序检测,用于预测乳腺癌发生的概率;对于遗传性乳腺癌、卵巢癌和其他癌症,2014 版美国国立综合癌症网络指南中明确指出可利用 NGS 技术检测相关的基因突变。

2.4 NGS 在单细胞测序中的应用

2014 年,单细胞测序的应用被列为《自然-方法学》(Nature Methods)年度最重要的方法学进展。2015 基因组学前沿研讨会将单细胞组学单独列为一个单元。常规的测序样品来源大多数是多细胞的混合 DNA,这种方法得到的全基因组序列信息是一群细胞基因信息的平均值,或其中占优势数量的细胞信息,而单个细胞的特性和细胞与细胞之间的异质性则被忽视。单细胞全基因组测序技术是在单细胞水平对全基因组进行扩增与测序的一项新技术。其原理是将分离的单个细胞的微量全基因组 DNA 进行扩增,获得高覆盖率的完整的基因组后进行高通量测序用于揭示细胞群体差异和细胞进化关系。但由于 PCR 扩增时存在偏倚,常导致测序结果的基因组覆盖度很低。2012 年,哈佛大学谢晓亮院士在《Science》发表了单细

胞全基因组扩增新技术(multiple annealing and looping based amplification cycles, MALBAC),即多次退火环状循环扩增技术^[36]。不同于以往的非线性或指数型扩增方法,MALBAC 技术利用特殊引物,使得扩增子的结尾互补而成环,从而很大程度上防止了 DNA 的指数性扩增,从而解决了基因组扩增对微量初始模板过大的扩增偏倚,使得 MALBAC 扩增的 DNA 基因组覆盖度达到 93%,并使基因组测序的模板需求量从 μg 级降至单细胞水平。2012 年,华大基因同样利用单细胞测序技术对单个肾癌细胞的单核苷酸突变特征进行分析,从而在更高的分辨能力上为评价基因改变的复杂性提供了更为优化的方法。2014 年,华大基因又利用该方法在结肠癌中发现了一个新的癌基因 *SLC12A5*^[37]。单细胞测序技术不仅为肿瘤分子分型和个体化治疗提供指导,还将有助于我们理解肿瘤内部的异质性和肿瘤的演进^[38]。单细胞测序技术还能与循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)筛选技术相结合,检测外周血 CTCs 单核苷酸变(single-nucleotide variations, SNV)、CNV 或外显子组插入/缺失突变,为肿瘤诊断及个体化治疗提供一种非侵入性检测手段。

3 展望

个性化医疗是基于基因序列的分子诊断技术的发展而出现的,目前主要应用的技术是基因测序技术。基因测序技术被应用于个性化医疗,是因为个体化医疗是以每个患者的基因组信息为基础决定治疗方针,了解患者的整体遗传信息,对预防、诊断、治疗和用药提供指导性意见。也因此出现了很多靶向治疗药物,这些药物的用药基础依据患者的基因组及分子差异(变异),所以患者的基因组信息尤为重要,Sanger 测序技术,可以用于个体化医疗,但是测序通量小,速度慢,灵敏度较 NGS 低,成本高,此时需要一种简便、快捷、准确,同时成本又不太高的测序诊断技术就是 NGS 技术,凭借自身高灵敏度、高通量等特性被广泛用于肿瘤个体化医疗和基因分子生物学的研究并带来新的变化,在肿瘤分子生物学的研究以及临床应用方面,也显示了多方面的影响并推动了个体肿瘤学发展。NGS 技术,在临床诊断中应用,对肿瘤患者的疾病诊断和治疗都起到巨大作用。近期提出的精准医疗,它是以个体化医疗为基础,以环

境、生活方式、既往病史及诊疗方式等为跟踪对象,搜集全方位、可量化、有前瞻性和时效性的个体数据,通过数据的综合分析、挖掘形成有价值的医学信息,最终设计出针对个体的最优解决方案。在精准诊断方面,对人体了解需要更加深入到基因组、体细胞突变等,这些需要依靠测序技术,通过NGS技术能更精准更全面地了解患者的信息。NGS为个体提供连续基因大数据,是精准医疗的基础和重要实现途径。随着技术的不断革新,测序技术层出不穷。新的测序技术陆续出现,以单分子测序为特点的DNA测序技术已经出现,该测序技术不需要进行PCR扩增,消除了潜在的扩增错误和不均匀,测序长度更长速度更快。最近出现的纳米孔测序技术,相比于前面3类测序技术,该测序技术是真正实现单分子检测和电子传导检测相结合的测序方法,完全摆脱了洗脱和PCR扩增过程。纳米孔测序技术一旦投入市场,将有望在几小时内以几百美元的成本完成全基因组测序。每一项新技术的出现都有超过前代技术的独特之处,但是各代测序均有不足之处,Sanger测序的主要缺陷是低通量和高成本,NGS测序的缺陷是序列长度较短,DNA测序和纳米孔测序在准确率方面尚存在严重缺陷。由于NGS技术面临的短序列缺陷可以通过生物信息学工具在一定程度上进行弥补,因此NGS技术是现今最稳定,应用范围最广泛的测序技术。目前科学家正在通过减缓DNA序列通过纳米孔速度的方式提高新测序的准确度,专家预计10年内新测序的准确度将会显著提升,届时将在保证测序通量的基础上,凭借着超长序列读长的优势将逐步取代NGS测序。随着基因测序通量、准确度的提高和成本的降低,相信测序技术,将在肿瘤分子生物学领域,提高肿瘤的诊断和治疗水平方面发挥重要的作用。

参考文献

- [1] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(12):5463-5467.
- [2] Chu T, Bunce K, Hogge WA, et al. Statistical model for whole genome sequencing and its application to minimally invasive diagnosis of fetal genetic disease[J]. Bioinformatics, 2009, 25(10):1244-1250.
- [3] 王升跃. 新一代高通量测序技术及其临床应用前景[J]. 广东医学, 2010, 31(3):269-272.
- [4] 赵馨, 何天文, 尹爱华. 第二代测序技术与无创产前诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(3):198-203.
- [5] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in open microfabricated high-density picoliter reactors[J]. Nature, 2005, 437(7057):376-380.
- [6] Fedurco M, Romieu A, Williams S. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient of solid-phase amplified DNA colonies[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(3):1818-1822.
- [7] Shendure J. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome[J]. Science, 2005, 309(5741):1728-1732.
- [8] 陈琛, 万海波, 周清华. 新一代基因测序技术及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(2):154-159.
- [9] Droege M, Hill B. The genome sequencer FLX system-longer reads more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets[J]. J Biotechnol, 2008, 136(1-2):3-10.
- [10] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. Nature, 2008, 456(7218):53-59.
- [11] Smith DR, Quinlan AR, Peckham HE, et al. Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies[J]. Genome Res, 2008, 18(10):1638-1642.
- [12] Clark MJ, Homer NO, Connor BD, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line[J]. Plos Genet, 2010, 6(1):e1000832.
- [13] Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability[J]. Nature, 2014, 511(7509):344-347.
- [14] Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism[J]. Nature Genetics, 2013, 45(11):1405-1408.
- [15] Ley TJ, Elaine L, Mardis ER, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome[J]. Nature, 2008, 456(7218):66-72.
- [16] 丁晶, 宋永平. 二代测序在急性髓系白血病中的应用[J]. 白血病·淋巴瘤, 2013, 22(1):8-10.
- [17] Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme[J]. CR Acad Sci Paris, 1948, 142(3/4):241-243.

- [18] Heitzer E, Auer M, Ulz P, et al. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies [J]. *Genome Med*, 2013, 5(8):73.
- [19] 杨超, 程昌明, 杨敏慧, 等. 外周血循环肿瘤 DNA 检测方法及应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(1):60-67.
- [20] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6):426-437.
- [21] Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3):1032-1038.
- [22] Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(1-2):179-188.
- [23] Friel AM, Corcoran C, Crown J, et al. Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(3):613-625.
- [24] Lefebvre B, Charbonnier F, Di Fiore F, et al. Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer [J]. *Ann Surg*, 2010, 251(2):275-280.
- [25] Zhou J, Shi YH, Fan J. Circulating cell-free nucleic acids: promising biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4):440-448.
- [26] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224.
- [27] Javier MG, Sastre-Garau X. Uterine cervix carcinoma: recent biological data and update for improving follow-up and treatment [J]. *Isr Med Assoc J*, 2012, 14(11):700-704.
- [28] Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer [J]. *Cancer*, 2015, doi:10.1002/cncr.29364. [Epub ahead of print].
- [29] Martignetti JA, Camacho-Vanegas O, Friedigkeit N, et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA [J]. *Neoplasia*, 2014, 16(1):97-103.
- [30] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. *Nat Med*, 2014, 20(5):548-554.
- [31] Nygaard AD, Garm Spindler KL, Pallisgaard N, et al. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(3):312-317.
- [32] Talasz A, Mortimer S, Sebisano D, et al. Use of the GUARDANT360 noninvasive tumor sequencing assay on 300 patients across colorectal, melanoma, lung, breast, and prostate cancers and its clinical utility [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(suppl):e22041.
- [33] 陈崇, 温旺荣. BRCA1 基因与乳腺癌的诊断治疗 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(3):145-151.
- [34] Pilgrim SM, Pain SJ, Tischkowitz MD. Opportunities and challenges of next-generation DNA sequencing for breast units [J]. *Br J Surg*, 2014, 101(8):889-898.
- [35] 张蒙, 张青云, 徐国宾. 新一代测序技术在肿瘤临床中的应用 [J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(9):641-646.
- [36] Lu SJ, Zong CZ, Xie XS, et al. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole genome sequencing using MALBAC [J]. *Science*, 2012, 338(6114):1627-1630.
- [37] Yu C, Yu J, Yao X, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6):701-712.
- [38] van Loo P, Voet T. Single cell analysis of cancer genomes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 24:82-91.

· 论 著 ·

运用全外显子组测序技术诊断非综合征性耳聋基因变异

刘维强 张慧敏 余国就 孙筱放*

[摘要] 目的 评价全外显子组测序(whole-exome sequencing, WES)技术在非综合征性耳聋患者基因变异诊断临床应用的可行性。方法 利用Illumina Hiseq2000平台对15例耳聋患者标本进行全外显子捕获测序,重点关注80个耳聋相关基因的序列捕获效率及变异检测情况并运用常规测序验证。结果 目标区域(region of interested, ROI)20X以上平均覆盖度为98%;在15份耳聋患者标本中均发现致病性变异,涉及*GJB2*、*SLC26A4*、*DSPP*、*TECTA*和*CHD7*基因,其中,无义突变2个,移码突变4个,剪切位点变异1个,其余为错义突变。经常规Sanger测序验证,结果一致。结论 全外显子组测序技术可快速可靠诊断非综合征性耳聋患者基因变异。

[关键词] 全外显子组测序;耳聋;变异

Identification of gene variations in patients with nonsyndromic deafness by using whole-exome sequencing method

LIU Weiqiang, ZHANG Huimin, YU Guojiu, SUN Xiaofang*

(Key Laboratory for Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institutes, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510150)

[ABSTRACT] Objective To assess the efficiency of clinical genetic diagnosis of patients with non-syndromic deafness by using whole-exome sequencing (WES) method. Methods WES was performed using the Illumina Hiseq2000 platform in 15 patients with non-syndromic deafness. In this study, we designed a panel containing 80 deafness genes for variant identification. All variants detected by WES were validated by Sanger sequencing. Results The coverage of the region of interest (ROI) over 20X reads was above 98%; pathogenic or likely pathogenic mutations were identified in different genes, such as *GJB2*, *SLC26A4*, *DSPP*, *TECTA* and *CHD7*. Among these variations, 2 were nonsense mutations, 4 were frame shift mutations, 1 was a splice site mutation and the remaining were missense mutations. All variants were validated by Sanger sequencing. Conclusion The whole-exome sequencing method has provided a powerful tool to discover rare variations or novel genes in patients with non-syndromic deafness.

[KEY WORDS] Whole-exome sequencing; Deafness; Variants

耳聋是最常见的人类感觉神经疾病,其在儿童中的发病率可达1/1 000到1/300^[1]。超过50%的遗传性耳聋属于感音性耳聋^[2],其中的70%为非

综合征性耳聋。耳聋是一种遗传异质性非常高的疾病,目前已明确的非综合征和综合征性耳聋基因已超过200个,并且仍有大量遗传性耳聋致病基

基金项目:国家自然科学基金(31171229);广东省医学科研基金(A2015327);广东省科技厅基金(2013B051000087;2014A020212354);广州市科技局基金(201400000004-4;201400000003-4);广州医科大学留学回国人员基金(2013C56)

作者单位:广东省产科重大疾病重点实验室,广东省普通高校生殖与遗传重点实验室,广州医科大学附属第三医院,广东,广州510150

*通讯作者:孙筱放, E-mail: xiaofangsun@gzhmu.edu.cn

因尚不明确。虽然耳聋基因检测并不能对治疗产生直接帮助,但其对明确家系致病位点以及产前诊断都起着非常关键的作用,因此对耳聋致病基因的分子诊断有着重要的意义。

我国常见的耳聋致病基因为 *GJB2*、*SLC26A4* 和 *12SrRNA*, 常见的检测方法有基因芯片、荧光定量 PCR 法及 Sanger 测序等^[3]。这些方法的局限是检测位点少,成本高,检测周期长,阳性率低等。随着下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)在临床的广泛应用,基于全外显子组和目标序列捕获的 NGS 方法已开始应用于耳聋基因变异的检测^[4-7]。本研究对 15 份经常规 9 个热点变异筛查阴性的耳聋患者标本应用全外显子组捕获测序,并设计目标区域重点针对 80 个耳聋相关基因进行变异分析。

1 材料与方法

1.1 对象

15 例病例标本由广州军区广州总医院友好提供。标本经常规 9 个热点变异筛查阴性。标本来自诊断明确的具有听力障碍的患者,其中男 9 例,女 6 例,年龄 1~6 岁,平均年龄(3 ± 1.4)岁。15 例健康人标本作为正常对照。

1.2 试剂和仪器

DNA 提取方法采用 DNeasy Tissue 试剂盒(Qiagen, 德国)。DNA 打断仪为 Covaris S2 系统(Covaris, 美国),文库建立采用美国 Agilent 公司 Sure Select 试剂,文库质检使用 Tape-Stations2200 仪器检测(Agilent, 美国),测序试剂和仪器来自 Illumina, 美国。Sanger 测序使用 Applied Biosystems 3500 基因分析仪(ThermoFisher, 美国)。

1.3 基因组 DNA 质量评估

使用 Nanodrop 仪(ThermoFisher, 美国)检测 DNA 浓度及纯度, -20°C 保存备用。

1.4 文库构建及测序反应

3 μg 基因组 DNA 经 Covaris S2 系统打断为 200~300 bp 大小片段,使用美国 Agilent 公司的 SureSelect 双向测序试剂进行文库富集。750 ng 文库使用美国 Agilent 公司的 SureSelect Human All Exon 50 Mb 试剂进行目标区域的捕获。捕获的文库经加标签混匀后利用美国 Illumina 公司的 HiSeq2000 测序仪 90 个循环全外显子组测序。

1.5 数据分析

数据经 Illumina 测序仪自带软件 CASAVA

(1.8.2 版本)拆分得到原始 FASTQ 文件。原始数据经 Trimmomatic 软件去掉接头和低质量数据,得到的高质量数据用 BWA 软件比对到人参考基因组 hg19 (<http://genome.ucsc.edu/>)上进行初步分析。原始数据转化成 FASTA 文件后导入 NextGeNe 软件(Softgenetics, 美国)及生成 VCF 文件后再导入 wannovar (<http://wannovar.usc.edu/>)网站进行注释分析。

1.6 数据验证

对 NextGeNe 和 wannovar 软件发现的致病性变异利用 Sanger 测序进行验证。对目的基因进行外显子的引物设计,PCR 及产物纯化后上 Applied Biosystems 3500 基因分析仪(ThermoFisher, 美国)进行测序,结果采用 Mutation Surveyor 进行数据分析。

2 结果

2.1 DNA 质量评价

所有 DNA 浓度均介于 150 ng/ μL ~200 ng/ μL 间, A260/A280 比值介于 1.8~2.0 间,质量合格。

2.2 文库质量评价

文库质量经 Tape-Stations 仪器检测,片段大小、浓度均符合要求,所建文库片段大小介于 315 bp 左右。左边峰及最右边峰为标准质量品,大小为 25 bp 和 1 500 bp,中间峰为待检文库片段,平均大小为 315 bp,见图 1。

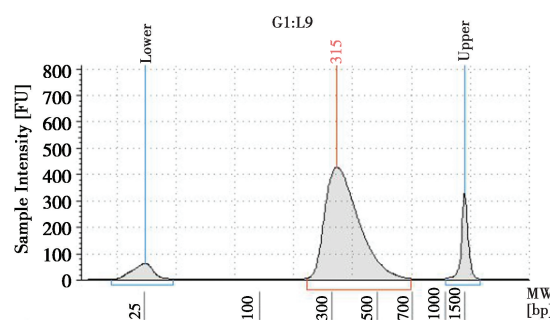


图 1 文库质量检测

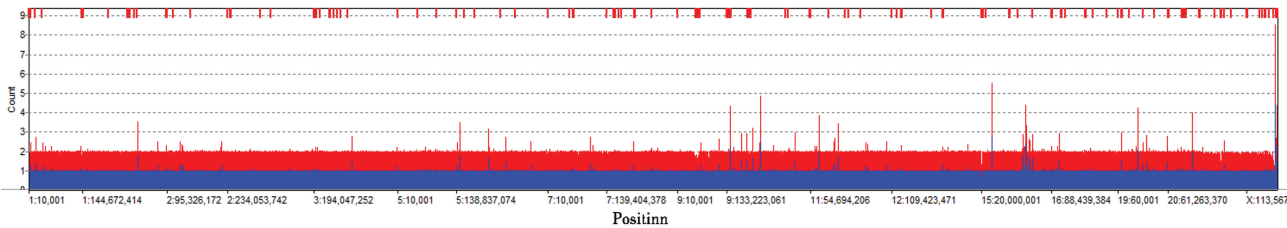
Figure 1 Quality assessment of DNA libraries

2.3 测序数据分析

将原始测序数据经格式转换导入 NextGeNe 软件进行处理,各标本的测序数据经与基因组参考序列比对得到有效读数介于 3 兆到 6 兆。其中 80 个耳聋基因目标区域的有效测序深度及测序覆盖度如表 1 所示。测序数据的分布具有较好的随机性,双向测序数据比接近 1:1,不存在偏倚性(图 2)。

表 1 测序数据一览表
Table 1 Statistic of NGS data

患者 ID	总测序读数	有效读数	平均测序深度	目标区域 20X 覆盖度 (%)	目标区域 5X 覆盖度 (%)
D01	5 849 626	5 426 042	195.45	97.50	98.50
D02	3 361 995	3 077 063	115.98	96.29	98.63
D03	4 790 345	4 466 216	188.95	98.45	98.91
D04	4 845 165	4 464 274	143.30	97.69	98.85
D05	4 186 987	3 868 288	128.07	97.18	98.83
D06	4 605 982	4 144 359	121.24	98.57	98.66
D07	5 316 887	4 941 595	170.42	98.06	98.90
D08	3 967 841	3 709 241	136.40	97.52	98.78
D09	5 540 095	5 124 459	198.37	98.48	98.96
D10	6 314 374	5 817 846	196.78	98.33	98.91
D11	5 097 413	4 746 305	174.24	98.02	98.87
D12	4 042 252	3 768 880	142.10	97.59	98.85
D13	5 729 872	5 284 410	195.65	98.41	98.93
D14	4 482 238	3 803 958	190.93	97.58	98.82
D15	4 473 900	4 132 786	149.35	97.52	98.88



红色代表正向测序数据,蓝色代表反向测序数据

图 2 正反向测序数据
Figure 2 Analysis of paired-end-reads data

2.4 变异检测情况及功能预测

通过软件自动分析及数据过滤,本研究在 15 份耳聋患者标本中均发现致病性变异,除了涉及 *GJB2*、*SLC26A4* 2 个常见基因外,还在 *DSPP*、*TECTA* 和 *CHD7* 3 个基因中发现了变异。在这些变异中含无义突变 2 个,移码突变 4 个,剪切位点变异 1 个,其余为错义突变。变异位点见表 2。对变异可能对蛋白功能产生的影响经 mutationtaster 等在线软件进行预测,结果见表 2、图 3。

2.5 变异验证

Sanger 测序证实全外显子组测序发现的变异结果正确,见图 4。

3 讨论

我国常见的耳聋致病基因为 *GJB2*、*SLC26A4* 和 *12S rRNA*,其中 9 个变异位点是中国人耳聋基

因变异热点,包括 *GJB2* 基因的 4 个变异 c.35delG、c.176del16、c.235delC、c.299-300delAT, *GJB3* 基因的一个变异 c.538C>T, *SLC26A4* 基因的 2 个变异位点 c.IVS7-2A>G、c.2168A>G 和线粒体 mtDNA *12S rRNA* 的 2 个位点 1555A>G、1494C>T。虽然对以上热点变异运用基因芯片等技术可以进行变异的快速筛查,但由于耳聋基因的高度异质性,与耳聋相关的基因目前已超过 200 个,因此这种热点筛查的方法仍可能导致很大一部分耳聋患者不能明确基因变异情况。

近年来 NGS 技术已开始应用于遗传性耳聋致病基因的研究^[5,8-9]。运用 NGS 技术,一些新的耳聋致病基因和位点也不断被发现^[5,10]。目前运用较多的 NGS 测序是目标区域捕获测序或在全外显子水平进行变异位点的检测。目标区域捕获技术可重点关注与耳聋等疾病密切相关的十几个或几十个

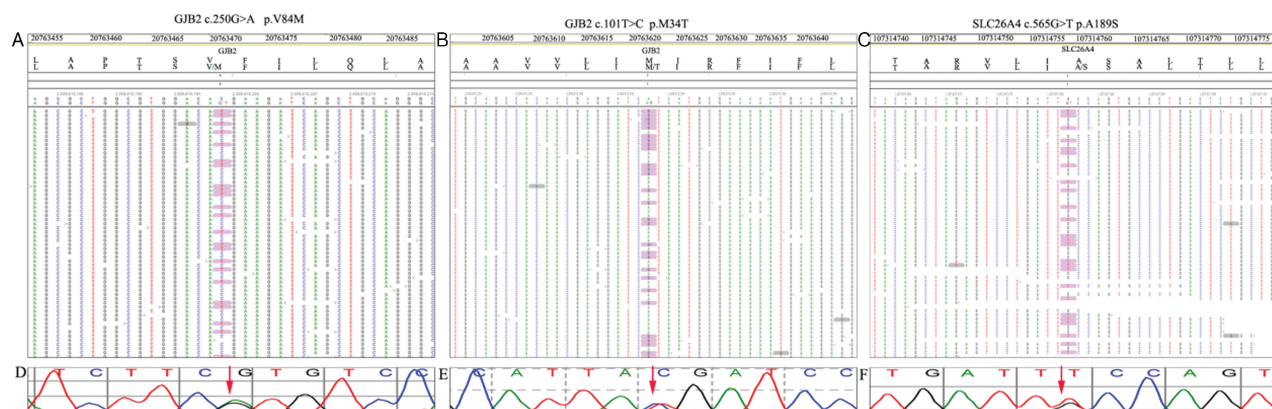
TECTA c.T6280G



A: 对 *TECTA* 基因 c.T6280G 变异发生在高度保守区域; B: 软件预测此变异将对蛋白功能产生破坏, 是致病性变异; C: 对多物种保守序列的分析证实此位点的高度保守性

图3 变异位点功能预测

Figure 3 Functional prediction of a missense variant



A: *GJB2* 基因 c.250G>A 杂合变异; B: *GJB2* 基因 c.101T>C 杂合变异; C: *SLC26A4* 基因 c.565G>T 杂合变异; D、E、F: Sanger 测序验证结果

图4 全外显子组测序鉴定变异及验证

Figure 4 Variants identified by NGS and validated by Sanger sequencing

表2 耳聋基因变异检测情况

Table 2 Functional prediction of the identified variants

患者ID	基因	染色体位置	外显子	转录本	变异类型	碱基变异	氨基酸变异	Mutation Taster 软件预测
D04	<i>DSPP</i>	chr4:88534185	4	NM_014208	无义突变	c.C847T	p.Q283X	致病
	<i>DSPP</i>	chr4:88537212-88537215	5	NM_014208	移码突变	c.3398_3401delGTGA	p.S1133fs	致病
D12	<i>TECTA</i>	chr11:121060502	22	NM_005422	错义突变	c.T6280G	p.C2094G	致病
	<i>TECTA</i>	chr11:120996012	7	NM_005422	错义突变	c.T1205G	p.V402G	致病
D02	<i>GJB2</i>	chr13:20763582	2	NM_004004	无义突变	c.139G>T	p.E47X	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763264	2	NM_004004	错义突变	c.457G>A	p.V153I	致病
D13	<i>GJB2</i>	chr13:20763686	2	NM_004004	移码突变	c.35delG	T6280	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763612	2	NM_004004	错义突变	c.G109A	p.V37I	致病
D05	<i>GJB2</i>	chr13:20763113	2	NM_004004	错义突变	c.608T>C	p.I203T	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763684	2	NM_004004	错义突变	c.G37A	p.V13M	致病
D06	<i>GJB2</i>	chr13:20763471	2	NM_004004	错义突变	c.G250A	p.V84M	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763684	2	NM_004004	错义突变	c.G37A	p.V13M	致病
D08	<i>GJB2</i>	chr13:20763186	2	NM_004004	错义突变	c.G535C	p.D179H	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763612	2	NM_004004	错义突变	c.G109A	p.V37I	致病
D10	<i>GJB2</i>	chr13:20763620	2	NM_004004	错义突变	c.T101C	p.M34T	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763492	2	NM_004004	错义突变	c.T229C	p.W77R	致病
D14	<i>GJB2</i>	chr13:20763686	2	NM_004004	移码突变	c.35delG	/	致病
	<i>GJB2</i>	chr13:20763488	2	NM_004004	错义突变	c.C233T	p.A78V	致病
D01	<i>SLC26A4</i>	chr7:107302171	2	NM_000441	错义突变	c.G85C	p.E29Q	致病
	<i>SLC26A4</i>	chr7:107314674	5	NM_000441	错义突变	c.T481A	p.F161I	致病
D03	<i>SLC26A4</i>	chr7:107323983	8	NM_000441	剪切位点变异	c.1001+1G>A	/	致病
	<i>SLC26A4</i>	chr7:107330570	10	NM_000441	错义突变	c.A1151G	p.E384G	致病
D07	<i>SLC26A4</i>	chr7:107330665	10	NM_000441	错义突变	c.A1246C	p.T416P	致病
	<i>SLC26A4</i>	chr7:107340607	15	NM_000441	错义突变	c.G1694A	p.C565Y	致病
D11	<i>SLC26A4</i>	chr7:107330641	10	NM_000441	移码变异	c.1222delT	p.S408fs	致病
	<i>SLC26A4</i>	chr7:107314758	5	NM_000441	错义突变	c.G565T	p.A189S	致病
D15	<i>SLC26A4</i>	chr7:107323796	7	NM_000441	错义突变	c.915delT	p.I305fs	致病
	<i>SLC26A4</i>	chr7:107329557	9	NM_000441	错义突变	c.T1061C	p.F354S	致病
D09	<i>CHD7</i>	chr8:61654365	2	NM_017780	错义突变	c.374T>G	p.V125G	致病
	<i>CHD7</i>	chr8:61655281	2	NM_017780	错义突变	c.1290G>C	p.M430I	致病

基因,而全外显子组测序则更有助于在所有蛋白编码基因序列及其附近非编码区找到罕见或新发变异。本研究前期对100多份耳聋病例进行了常规变异热点的检测,发现仍有近一半病例未能找到明确的致病变异。对其中15个病例常规检测阴性的标本我们进行了全外显子组测序。虽然从经济成本考虑,目标区域捕获技术相对更有优势,但为了避免遗漏可能的罕见新发变异,本研究尝试运用全外显子组测序技术进行检测。为方便数据分析,本研究设计了80个耳聋相关基因的兴趣区域。

对全外显子组数据分析是发现变异的关键。通常一份标本的全外显子组测序结果一般可发现2万到5万个变异^[11],因此从如此众多的变异中寻找与耳聋密切相关的变异非常困难。本研究首先对数据进行数据过滤,将单核苷酸多态(single

nucleotide polymorphism, SNP)数据库、千人基因组等数据库中已报道的频率大于3%的多态性变异过滤,然后通过查询文献,并重点关注80个耳聋相关基因的兴趣区域进行软件自动查对,再通过生物信息网站如 mutationtaster、SIFT 和 Polyphen-2 对变异进行功能预测^[12-14]。通过以上方法,本研究在 *GJB2*、*SLC26A4*、*DSPP*、*TECTA* 和 *CHD7* 等基因发现变异,除无义突变,移码突变等明确导致疾病的变异外,其他大部分变异均为错义突变。由于对错义突变的预测运用不同的预测软件可以有不一致的结果,有些软件认为变异致病而另一些软件则认为多态性,所以会给数据分析带来一定的困惑。在本研究中,为避免这种情况,我们联合运用前文所述的3种生物功能预测软件来对同一个错义变异进行联合分析。当3种软件均认为是致病或可

能致病时才保留下来进行后续分析。另外对变异是否致病我们同时还对位点的保守性进行评估,当变异发生在高度保守区时则格外关注。

在本研究中,我们发现中国人群耳聋基因变异仍是以 *GJB2*、*SLC26A4* 为主。尽管如此,我们也只在2个病例中发现了常见的35delG变异,并且这2个病例如果运用常规方法只能找到一个杂合变异位点,容易导致诊断错误,另外的大部分变异如果用常规方法不能检出,证实常规热点筛查方法的确存在局限性。本研究发现4号病例 *DSPP* 基因的2个变异,文献报与 *DSPP* 基因变异与遗传性牙本质发育不全相关^[15],而此病也可伴有耳聋表型^[16],考虑到本病例变异一个是无义变异,另一个是移码突变,而这2个变异均可导致蛋白编码提前终止,因此我们认为这2个杂合变异可能为可能致病性变异,但仍需进行后续的功能验证实验。另外对12号病例我们在 *TECTA* 基因发现2个杂合变异,通过检索相关数据库未见明确致病报道,但对其可能影响蛋白的功能预测及保守性分析后我们认为此变异为可能致病性变异。

总之,本研究运用全外显子组测序技术快速诊断出耳聋患者的多个致病变异,证实全外显子组测序技术在耳聋变异诊断中的应用价值。对耳聋致病基因的分子诊断,联合运用热点变异筛查和全外显子或目标区域基因组合测序将有助于发现潜在的致病变异位点。随着NGS在大样本耳聋基因变异检测中的应用,此技术将体现出越发明显的优势。

参考文献

- [1] Mehl AL, Thomson V. The Colorado newborn hearing screening project, 1992–1999: on the threshold of effective population - based universal newborn hearing screening[J]. *Pediatrics*, 2002, 109(1):E7.
- [2] Nance WE, Lim BG, Dodson KM. Importance of congenital cytomegalovirus infections as a cause for pre-lin-gual hearing loss[J]. *J Clin Vird*, 2006, 35(2):221–225.
- [3] Lim BG, Clark RH, Kelleher AS, et al. Utility of ge-netic testing for the detection of late-onset hearing loss in neonates[J]. *American journal of audiology*, 2013, 22(2):209–215.
- [4] Patel K, Giese AP, Grossheim JM, et al. A novel C-terminal CIB2 (calcium and integrin binding protein 2) mutation associated with non-syndromic hearing loss in a hispanic family [J]. *Plos one*, 2015, 10 (10) : e0133082.
- [5] Gao J, Wang Q, Dong C, et al. Whole exome sequenc-ing identified MCM2 as a novel causative gene for auto-somal dominant nonsyndromic deafness in a Chinese family[J]. *Plos one*, 2015, 10(7):e0133522.
- [6] Li-Yang MN, Shen XF, Wei QJ, et al. IVS8+1 DelG, a novel splice site mutation causing DFNA5 deafness in a Chinese family[J]. *Chinese Medical Journal*, 2015, 128(18):2510–2515.
- [7] Chang MY, Kim AR, Kim NK, et al. Identification and clinical implications of novel MYO15A mutations in a non - consanguineous Korean family by targeted exome sequencing[J]. *Molecules and cells*, 2015, 38 (9):781–788.
- [8] Atik T, Bademci G, Diaz - Horta O, et al. Whole - exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss[J]. *Genetics research*, 2015, 97:e4.
- [9] Ammar-Khodja F, Bonnet C, Dahmani M, et al. Di-versity of the causal genes in hearing impaired Algerian individuals identified by whole exome sequencing [J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2015, 3 (3):189–196.
- [10] Liu F, Hu J, Xia W, et al. Exome sequencing identi-fies a mutation in EYA4 as a novel cause of autosomal dominant non - syndromic hearing loss [J]. *Plos one*, 2015, 10(5):e0126602.
- [11] Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, et al. A map of human genome variation from population - scale se-quencing[J]. *Nature*, 2010, 467(7319):1061–1073.
- [12] Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function us-ing the SIFT algorithm[J]. *Nature protocols*, 2009, 4 (7):1073–1081.
- [13] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations [J]. *Nature methods*, 2010, 7(4):248–249.
- [14] Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. Mutation taster2: mutation prediction for the deep-sequencing age [J]. *Nature methods*, 2014, 11(4):361–362.
- [15] Malmgren B, Lindskog S, Elgadi A, et al. Clinical, histopathologic, and genetic investigation in two large families with dentinogenesis imperfecta type II[J]. *Hu-man genetics*, 2004, 114(5):491–498.
- [16] Xiao S, Yu C, Chou X, et al. Dentinogenesis imper-fecta I with or without progressive hearing loss is asso-ciated with distinct mutations in DSPP[J]. *Nature ge-netics*, 2001, 27(2):201–204.

· 论 著 ·

广西玉林特殊教育学校耳聋相关基因突变分析

李伍高^{1,2} 严提珍^{1,2*} 唐宁^{1,2} 李哲涛^{1,2} 唐向荣^{1,3} 杨艳³ 蔡稔^{1,2} 李静文^{1,2}

【摘要】目的 分析广西玉林地区耳聋患者相关致病基因突变,初步了解玉林地区耳聋患者发病的分子机制。**方法** 对玉林地区2个特殊教育学校191例耳聋患者进行分子病因信息采集,对6岁以上患者行纯音测听和声导抗进行听力评估;小于6岁的患儿行40 Hz相关电位、畸变产物耳声发射(distortion product otoacoustic emission, DPOAE)和听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)进行听力评估。采集外周血4 mL并提取基因组DNA,用耳聋基因微阵列芯片技术对4个致聋基因的9个突变位点(*GJB2*基因:c.35delG、c.235delC、c.176del16、c.299delAT; *GJB3*基因:c.538C>T; *SLC26A4*基因:c.919-2A>G、c.2168A>G;线粒体DNA *12SrRNA*基因:m.1494C>T、m.1555A>G)进行基因突变分析。**结果** 在28例耳聋患者中检出*GJB2*、*SLC26A4*和线粒体DNA *12SrRNA*基因突变,总检出率为14.66%(28/191),其中*GJB2*基因c.235delC纯合突变3例,c.176_191del16和c.235delC复合杂合突变1例,c.235delC杂合突变2例,c.299_300delAT杂合突变合并*SLC26A4*基因c.919-2A>G杂合突变1例;*SLC26A4*基因c.919-2A>G纯合突变4例,c.919-2A>G杂合突变13例,c.919-2A>G和c.2168A>G复合杂合突变2例;线粒体DNA *12SrRNA*基因m.1555A>G均质突变2例。**结论** 广西玉林地区耳聋患者热点突变基因以*SLC26A4*基因最为常见。玉林地区耳聋患者的相关基因检出阳性率、*GJB2*基因、*SLC26A4*基因及线粒体DNA *12SrRNA*基因的携带率均低于全国平均水平。

【关键词】 耳聋;基因突变;微阵列芯片技术

Analysis of deafness-related gene mutations in hearing loss patients in Yulin special education school of Guangxi

LI Wugao^{1,2}, YAN Tizhen^{1,2*}, TANG Ning^{1,2}, LI Zhetao^{1,2}, TANG Xiangrong^{1,3}, YANG Yan³, CAI Ren^{1,2}, LI Jingwen^{1,2}

(1. Liuzhou Key Laboratory of Birth Defects Prevention and Control, Liuzhou Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 2. Department of Medical Genetics, Liuzhou Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 3. Hearing Diagnosis Center, Liuzhou Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001)

[ABSTRACT] Objective To identify the deafness-related gene mutations in patients with hearing loss in Yulin, and to explore the molecular pathogenic mechanism. **Methods** Patients' information was collected and blood samples were obtained from 191 patients with hearing loss from a special education school. Patients 6 years of age or older were evaluated by pure tone audiometry and acoustic immittance. Patients less than 6 years old were evaluated by 40 Hz auditory event related potential, distortion product otoacoustic emission

基金项目:国家自然科学基金项目(81360159);广西科技攻关项目(桂科攻14124004-1-20);柳州市科技攻关项目(2014J030401);柳州市科学研究与技术开发计划项目研究成果资助(2014G020404)

作者单位:1. 柳州市妇幼保健院柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室,广西,柳州 545001

2. 柳州市妇幼保健院医学遗传科,广西,柳州 545001

3. 柳州市妇幼保健院听力诊断中心,广西,柳州 545001

*通讯作者:严提珍, E-mail:439078813@qq.com

(DPOAE) and auditory brainstem response (ABR). Genomic DNA samples of 191 deafness patients were extracted from peripheral blood. 9 mutations of 4 genes (including c.35delG, c.235delC, c.176del16, c.299delAT in *GJB2* gene; c.538C>T in *GJB3* gene; c.919-2A>G and c.2168A>G in *SLC26A4* gene; m.1494C>T and m.1555A>G in mtDNA *12SrRNA* gene) were detected with the gene chip technique. **Results** Among 191 patients with hearing loss, 28 cases were found to carry at least one pathogenic gene mutation. The positive detection rate was 14.66% (28/191). In these patients, 7 cases had *GJB2* gene mutations (c.235delC homozygous mutation in 3 cases, c.176_191del16/c.235delC compound heterozygous mutation in 1 case, c.235delC heterozygous mutation in 2 cases, c.299_300delAT/c.919-2A>G compound heterozygous mutation in 1 case); 19 cases had *SLC26A4* gene mutations (c.919-2A>G homozygous mutation in 4 cases, c.919-2A>G heterozygous mutation in 13 cases, c.919-2A>G/c.2168A>G compound heterozygous mutation in 1 case) and 2 cases had mitochondrial DNA *12SrRNA* m.1555A>G mutations. **Conclusion** *SLC26A4* gene mutations are the most common hot spot mutations in deafness patients in the Yulin area. Incidence of *GJB2*, *SLC26A4* and mitochondrial DNA *12SrRNA* gene mutations in the deafness population in Yulin is below the average of the overall Chinese deaf population.

[KEY WORDS] Deafness; Gene mutation; DNA microarray chip

随着现代分子生物学技术和遗传学的发展,尤其是人类基因组图谱的成功绘制和测序技术的自动化都为耳聋基因诊断提供了坚实的基础。耳聋基因诊断技术的出现和发展使诊断耳聋的方法由影像和物理检测听力水平提升至分子检测水平,为越来越多的耳聋患者(特别是儿童患者)揭示了分子病因,也为耳聋基因治疗的基础研究奠定了坚实的基础,是转化医学推动疾病防治的范例。在我国大规模的耳聋致病基因的流行病学调查数据显示,*GJB2*、*SLC26A4*和线粒体基因是导致非综合征性耳聋(non-syndromic hearing loss, NSHL)的3个最常见的致病基因,且不同地区不同人群的基因检出率差异较大^[1-2]。

由于与耳聋相关的致病基因较多,而且相关的致病基因具有极高的遗传异质性,给临床选择何种基因诊断技术检测耳聋基因带来极大困难,因此如何建立一种行之有效的方法检测耳聋致病基因成为临床基因诊断首要解决的问题,基因芯片检测技术是随着基因组计划发展起来的新型的分子生物学技术,其诞生和高速发展为高通量基因突变检测带来了新的曙光^[3]。中国解放军总医院与北京博奥生物技术有限公司共同研发了一款可同时检测中国人常见的4个耳聋相关基因中的9个热点突变的基因诊断芯片^[4],该技术将芯片技术和等位基因特异性引物延伸PCR相结合,可以准确快速地诊断耳聋相关致病基因,而且灵敏度高,从而显示出广阔的临床应用前景。本研究利用耳聋基因诊断芯片对广西玉林地区2个特殊教

育学校开展4个致聋基因(*GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4*和线粒体DNA *12SrRNA*)进行突变分析,为该地区耳聋家庭提供致病基因的携带状况和遗传规律等信息,为耳聋的遗传咨询、产前诊断及出生缺陷预防的临床实践提供理论基础和技术保障,促进聋病三级预防的实现。

1 对象与方法

1.1 研究对象及样本采集

以广西玉林市2个特殊教育学校的耳聋人群作为研究对象,告知并签署知情同意后,采集该人群的相关病史,包括基本信息、出生史、耳聋发病年龄、家族史、个人史(耳聋前传染病史、耳毒性药物使用史、头部外伤史等)、母亲孕产期情况等。经全身及耳鼻咽喉科常规检查,对6岁及6岁以上患者行纯音测听和声导抗进行听力评估;小于6岁的患儿行40 Hz相关电位、畸变产物耳声发射(distortion product otoacoustic emission, DPOAE)和听性脑干反应(auditory brainstem response, ABR)进行听力评估。结合病史排除其他症状和体征,191例患者被诊断为NSHL。其中男性113例,女性78例,年龄4~24岁,平均年龄(8.2±4.5)岁,所有耳聋患者抽取EDTA-Na₂抗凝静脉外周血4 mL。

1.2 基因组DNA提取和浓度测定

取500 μL全血利用全自动磁珠法(福建厦门致善生物技术有限公司)提取外周血基因组DNA。利用ASP2680核酸测定仪(ACTGene,美国)检测提取的基因组DNA浓度和质量。DNA样

本浓度需在 100~200 ng/μL, A₂₆₀/A₂₃₀ 比值应在 1.6~2.0, A₂₆₀/A₂₃₀ 比值需≥2.0。提取的 DNA -20℃保存备用。

1.3 耳聋基因芯片检测

应用北京博奥生物技术有限公司的晶芯®九项遗传性耳聋基因检测试剂盒(微阵列芯片法)对 4 个致聋基因 *GJB2* 基因 (c.35delG、c.176del16、c.235delC、c.299delAT), *GJB3* 基因 (c.538C>T), *SLC26A4* 基因 (c.919-2A>G、c.2168A>G), 线粒体 DNA *12SrRNA* 基因 (m.1494C>T、m.1555A>G) 共 9 个突变位点进行检测。检测设备为美国 ABI 9700PCR 仪、北京博奥生物技术有限公司耳聋基因芯片检测系统: 芯片扫描仪 LuxScan™10K-A 及配套软件、杂交仪 (BioMixer™ II)、芯片洗干仪 (SlideWasher™ 8)。

2 结果

应用微阵列芯片方法, 在 191 例耳聋患者中共有 28 例检测到 *GJB2*、*SLC26A4* 和线粒体 DNA

12SrRNA 基因突变, 检出率为 14.66% (28/191), 见表 1。7 例样本检测出 *GJB2* 基因突变, 包括 c.235delC、c.299delAT 和 c.176del16, 检出率为 3.66% (7/191)。其中 c.235delC 突变 6 例, 检出率为 3.14% (6/191); c.235delC 纯合突变 3 例; c.235delC 单杂合突变 2 例; 复合杂合突变 1 例(基因型为 c.176_191del16/c.235delC)。1 例 c.299delAT 单杂合突变合并 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 单杂合突变, 检出率为 0.52% (1/191)。4 例患者能明确病因, 占总数的 2.09% (4/191), 未发现 c.35delG 突变位点。*SLC26A4* 基因突变有 20 例, 检出率为 10.46% (20/191), 其中 14 例为 c.919-2A>G 单杂合突变(1 例合并 *GJB2* 基因 c.299_300delAT 单杂合突变); 4 例为 c.919-2A>G 纯合突变; 2 例为复合杂合突变(基因型均为 c.919-2A>G/c.2168A>G)。能明确病因的有 6 例, 占总数的 3.14% (6/191)。线粒体 DNA *12SrRNA* m.1555A>G 均质突变检出 2 例, 男女患者各 1 例, 检出率为 1.04% (2/191)。部分阳性病例耳聋基因芯片检测图谱见图 1。

表 1 191 例耳聋患者基因芯片检测结果
Table 1 Detection DNA microarray results of 191 deafness patients

基因	基因型	检出例数(n)	阳性率(%)
<i>GJB2</i>		7	3.66
	c.176_191del16/ c.235delC	1	0.52
	c.235delC/c.235delC	3	1.52
	c.235delC/WT	2	1.04
	c.299_300delAT/WT*	1	0.52
<i>SLC26A4</i>		20	10.46
	c.919-2A>G/c.919-2A>G	4	2.09
	c.919-2A>G/WT**	14	7.33
	c.919-2A>G/ c.2168A>G	2	1.04
mtDNA <i>12SrRNA</i>	m.1555A>G	2	1.04
合计		28	14.66

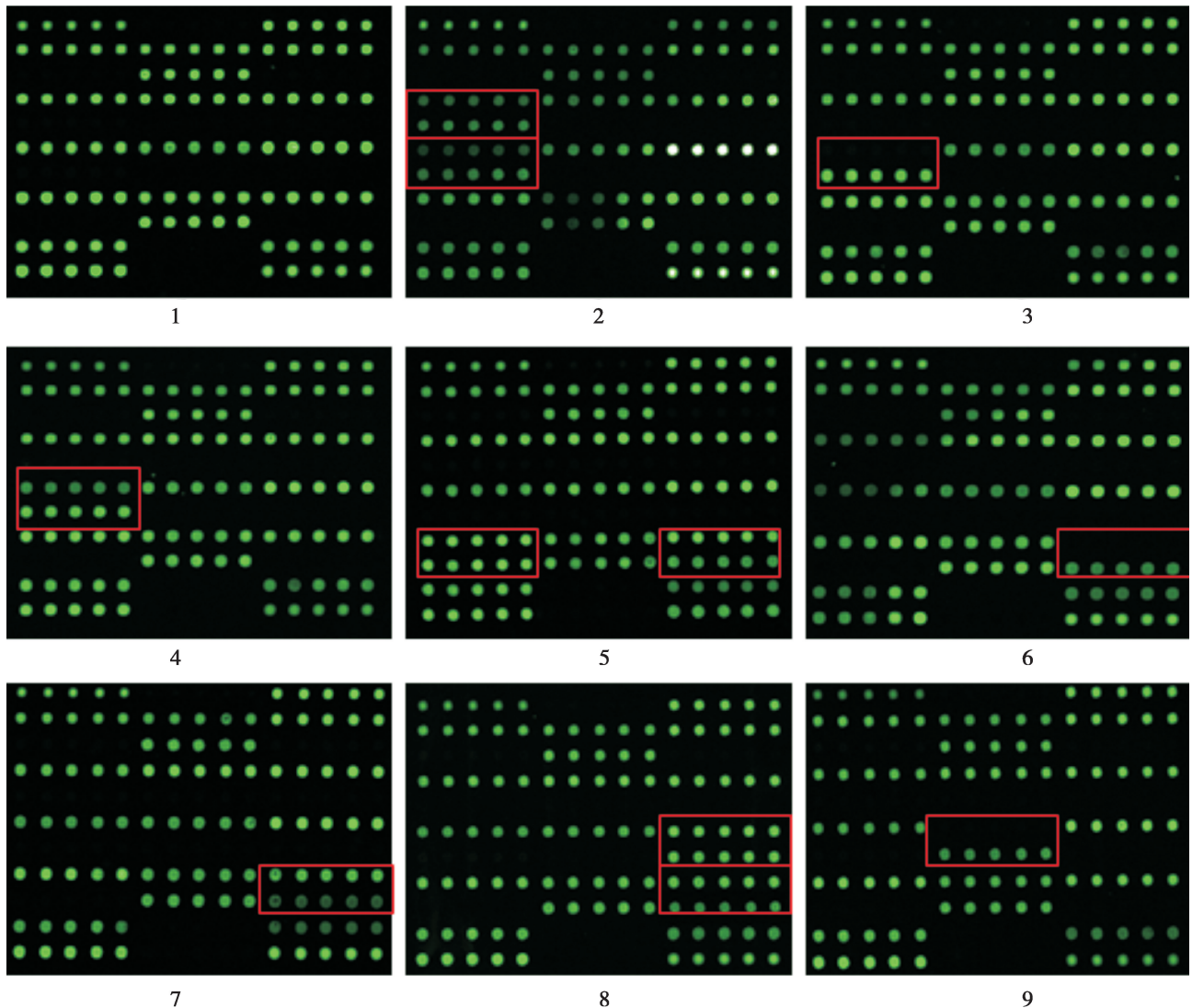
*该病例合并 *SLC26A4* c.919-2A>G 单杂合突变;**其中有 1 例合并 *GJB2* c.235delC 单杂合突变

3 讨论

由耳聋相关的遗传基因突变引起的遗传性耳聋占先天性耳聋的半数以上, 遗传性耳聋分为 2 大类, 综合性耳聋和非综合性耳聋, 临床上无其他器官损害及功能障碍只单一的表现听力损失的

称为非综合性耳聋, 占遗传性耳聋的 60% 左右^[5]。大多数的遗传性耳聋是单基因病, 分为常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传、X 连锁遗传及线粒体遗传, Angeli 等^[6]人通过建立小鼠模型发现至少 64 个基因与耳聋明确相关。

耳聋有众多相关基因, 虽然耳聋相关的致病



红色方框表示突变的杂交信号。1:正常对照; 2: c.176_191del16/c.235delC; 3: c.235delC/c.235delC; 4: c. 235delC/WT; 5: c.299_300del1AT/WT 合并 c.919-2A>G/WT; 6: c.919-2A>G/c.919-2A>G; 7: c.919-2A>G/WT; 8: c.919-2A>G/ c.2168A>G; 9: m.1555A>G 均质突变

图1 部分阳性病例的基因芯片检测图谱

Figure 1 DNA microarray detection map of some positive cases

基因较多,而且具有较强的遗传异质性,但是大多数的耳聋患者是由少数有限的几个基因突变引起的,这为临床开展进行耳聋基因诊断和产前诊断提供了诊断依据基因。中国解放军总医院戴朴教授团队^[7-9]率先在国内进行了大规模耳聋分子流行病学研究调查,其研究结果显示 *GJB2*、*SLC26A4*、线粒体 DNA *12SrRNA* 基因是中国人遗传性耳聋最常见的3个致病基因,人群携带率分别为21%、14.5%、3.4%。王国建等^[10]根据流行病学调查结果开发的芯片能检测出42.41% NSHL患者。本文应用微阵列芯片方法对广西玉林地区的耳聋患者的

检出阳性率为14.66%,其中 *GJB2* 基因突变3.66%, *SLC26A4* 基因突变10.47%,线粒体 DNA *12SrRNA* 基因 m.1555A>G 突变1.04%,研究结果表明玉林地区耳聋患者的相关基因检出阳性率及 *GJB2* 基因、*SLC26A4* 基因和线粒体 DNA *12SrRNA* 基因的携带率均低于全国平均水平。造成这些差异的原因可能包括:(1)相对于传统的酶切及 Sanger 测序等方法,微阵列芯片方法的检出率稍低,未覆盖其他位点突变。(2)中国人耳聋基因在地域上存在差异性。在戴朴教授团队的研究中,他们选择的研究对象65%以上患者来源于北方人

群,南方人群仅局限在广西柳州、广东佛山等几个省市,倾向于反映北方人群耳聋分子流行病学趋势。

导致 NSHL 常见的病因之一 *GJB2* 基因突变, 15%~33% 中国人群中耳聋患者由 *GJB2* 基因突变所致, 广西玉林地区仅有 2.09% (4/191) 的耳聋患者由 *GJB2* 异常引起, 最常见的致病突变位点为 c.235delC, 与国内报道相同^[7, 11]。本文 *GJB2* 突变的 NSHL 患者, 耳蜗神经和听觉中枢完整, 可通过人工耳蜗的植入恢复较好的听力。*SLC26A4* 基因突变可导致 Pendred 综合征及大前庭水管扩大综合征 (enlarged vestibular aqueduct syndrome, EVAS)。我国约 97% 的 EVAS 患者能够检出 *SLC26A4* 基因突变, 其主要突变类型为 c.919-2A>G。本文 9 例大前庭水管扩大患者均携带 *SLC26A4* 基因突变, 4 例为 c.919-2A>G 纯合突变, 2 例为 c.919-2A>G / c.2168A>G 复合杂合突变, 3 例 c.919-2A>G 杂合突变。有 30% 携带 *SLC26A4* 基因单等位基因突变的患者会表现为大前庭水管扩大^[8], 对于杂合突变患者应通过 Sanger 测序进一步检测 *SLC26A4* 基因其他突变位点, 以明确最终的基因型。大前庭水管扩大患者内耳环境比较脆弱, 如头部外伤、感冒发热等任何引起颅内压变化的因素可导致 EVAS 患者听力下降。本文中 3 例 EVAS 患者出生时听力筛查通过, 2 岁后在头部震荡、感冒后出现波动性听力下降, 最后残余听力完全丧失。若能在新生儿时期进行 *SLC26A4* 基因筛查, 不仅能明确病因, 还可以提醒家长注意日常防护, 保护残余听力, 延缓患者听力下降的速度。线粒体 DNA *12SrRNA* 基因 m.1555A>G 突变引发的耳聋与氨基糖甙类药物使用不当有关。突变携带者对氨基糖甙类药物比较敏感。广西玉林地区 NSHL 患者中线粒体 DNA *12SrRNA* 基因 m.1555A>G 突变检出率为 1.04%, 低于全国平均水平 (3.4%)。本文 2 例患者均在应用氨基糖甙类药物后致聋, 这提示在使用耳毒性药物治疗儿童疾病前, 要注意了解患儿耳聋的家族史, 若有条件时应进行线粒体 DNA *12SrRNA* 基因 m.1555A>G 和 m.1494C>T 位点筛查, 避免药物性耳聋的发生。

本研究通过对广西玉林两个特殊教育学校耳聋人群进行耳聋基因突变分析, 结果发现 *SLC26A4*、*GJB2* 和线粒体 DNA *12SrRNA* 基因是该地区耳聋患者最主要的致病基因, 检出率分别为 10.46%、

3.66% 和 1.04%。部分患儿仅仅检出单等位基因杂合突变, 还有将近 85.34% 耳聋患者未检出任何突变, 原因包括: (1) 部分患者可能由于环境因素 (如病毒感染、噪声等) 诱发耳聋; (2) 这与遗传性耳聋基因微阵列芯片覆盖的基因类型和突变位点检测相关, 由于芯片仅检测 4 个致聋基因 9 个突变位点, 其他突变位点没有涵盖, 故存在部分患者漏诊的可能; (3) 部分患者可能是由于其他罕见基因发生突变而引发耳聋。因此, 下一阶段我们将利用其他分子检测手段对这些耳聋患者进行进一步的基因分析。随着 Illumina、SOLiD 等新型测序平台的出现, 短时间内完成几百万甚至更多片段的靶向序列捕获、大规模平行测序将成为现实, 可实现对所有已知耳聋基因的同步检测^[12-14]。这一技术性探索将以较低的成本在大规模人群中检测所有的耳聋基因, 并有望在耳聋的基因诊断中开展更广泛、有效的临床应用^[15-18]。随着高通量测序的普及和检测成本的下降, 高通量测序是未来检测耳聋基因的必然趋势。

参考文献

- [1] 戴朴, 刘新, 于飞, 等. 18 个省市聋校学生非综合征性聋病分子流行病学研究 (I)-*GJB2* 235delC 和线粒体 DNA *12SrRNA* A1555G 突变筛查报告 [J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(1): 1-5.
- [2] 袁永一, 黄莎莎, 王国建, 等. 27 个省市聋校学生基于 *SLC26A4* 基因 IVS7-2 A>G 突变的全序列分析 [J]. 中华耳科学杂志, 2011, 9(1): 17-23.
- [3] 郭奕斌, 梁宇静, 郭东炜. 单基因遗传病基因诊断技术研究进展 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(1): 46-52.
- [4] Li CX, Pan Q, Guo YG, et al. Construction of a multiplex allele-specific PCR-based universal array (ASPUA) and its application to hearing loss screening [J]. Hum Mutat, 2008, 29(2): 306-314.
- [5] Shearer AE, Smith RJ. Genetics: advances in genetic testing for deafness [J]. Curr Opin Pediatr, 2012, 24(6): 679-686.
- [6] Angeli S, Lin X, Liu XZ. Genetics of hearing and deafness [J]. Anat Rec (Hoboken), 2012, 295(11): 1812-1829.
- [7] Dai P, Yu F, Han B, et al. *GJB2* mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment [J]. J Transl Med, 2009, 7: 26.

(下转第 320 页)

· 论 著 ·

非特殊型浸润性乳腺癌 *HER-2* 检测方法的对比研究

成玉霞 赫淑倩 董贺 孙青*

【摘要】目的 应用实时定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, qPCR)检测石蜡包埋非特殊型浸润性乳腺癌标本的 *HER-2* 表达状况,与免疫组织化学技术(immunohistochemistry, IHC)和荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)相应检测结果进行比较,以验证 qPCR 技术检测 *HER-2* 方法的可靠性和实用性。**方法** 采用 FISH 和 qPCR 技术对 IHC 检测结果分别为 *HER-2*(0、1+、2+、3+)的乳腺癌标本各 100 例进行检测,用 *kappa* 检验分析三者的一致性。**结果** 100 例 *HER-2*(0)和 *HER-2*(1+)的标本 FISH 和 qPCR 的检测结果均无扩增,符合率 100%;IHC 检测 *HER-2*(2+)的标本, FISH 和 qPCR 检测结果之间 $k=0.731(P<0.001)$,二者一致性强;IHC 检测 *HER-2*(3+)的标本, FISH 与 qPCR 检测结果 $k=0.634(P<0.001)$,二者具有较好的一致性,与 IHC 检测结果也具有较强的 consistency。三者对乳腺癌患者的临床病理指标反应具有较好的一致性。**结论** qPCR 方法简便、实用、有效,检测乳腺癌 *HER-2* 基因状况可与 FISH 法互为补充。

【关键词】 非特殊型浸润性乳腺癌; *HER-2*; IHC; FISH; qPCR

Comparison of different methods for *HER-2* status detection in non-special invasive breast carcinoma

CHENG Yuxia, HE Shuqian, DONG He, SUN Qing*

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

【ABSTRACT】Objective To compare quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with immunohistochemistry (IHC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for the detection of *HER-2* in non-special invasive breast carcinoma. **Methods** *HER-2* expression levels in carcinoma tissue were detected using IHC, and the *HER-2* gene expression levels were determined by FISH and qPCR. According to IHC results, all patients were divided into 4 groups [*HER-2*(0), *HER-2*(1+), *HER-2*(2+) and *HER-2*(3+)] with 100 cases in each. The *kappa* test was used to measure the consistency among the results of IHC, FISH and qPCR. **Results** In *HER-2*(0) and *HER-2*(1+) groups, there were no differences between the results of qPCR and FISH. In *HER-2*(3+) group, a few discrepancies were found between qPCR and FISH [$k=0.634(P<0.001)$]. In *HER-2*(2+) group, the diagnostic consistency was good between qPCR and FISH [$k=0.731(P<0.001)$]. Using FISH test, there was consistency in correlation between *HER-2* expression and clinicopathological parameters in the results of qPCR, FISH and IHC. **Conclusion** qPCR is a convenient, objective and efficient method, which may be used as an alternative to FISH, for the detection of *HER-2* gene state of non-special invasive breast carcinoma.

【KEY WORDS】 Non-special invasive breast carcinoma; *HER-2*; IHC; FISH; qPCR

近年来,我国乳腺癌的发病率和死亡率逐年上升,且日趋年轻化,成为威胁女性健康的几大恶性肿瘤之一。据文献报道,约 20%~25%的乳腺癌

患者呈人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor 2, *HER-2*)过表达或基因扩增^[1],而 *HER-2* 高表达的浸润性乳腺癌分化低,

基金项目:国家自然科学基金(81272420);山东省自然科学基金(ZR2012HM085)

作者单位:山东省千佛山医院病理科,山东,济南 250014

*通讯作者:孙青, E-mail: qingsw99@163.com

易发生淋巴结转移,且复发早,预后差^[2-3]。2002年,美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准赫赛汀用于HER-2过表达的乳腺癌^[4]。大量临床研究也表明,HER-2高表达的乳腺癌患者使用赫赛汀治疗后,其无病生存率和总生存期大大延长;相反,HER-2低表达患者使用赫赛汀治疗不能获益。因此标准化检测HER-2受体已成为赫赛汀靶向治疗的重要部分^[5]。

目前,美国FDA批准应用于评估HER-2状态的技术为免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)和荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)2种。然随着实时定量PCR技术(quantitative real-time PCR, qPCR)的发展和日趋成熟,RNA水平的HER-2检测变得更加简便、快捷,其能否替代FISH技术作为IHC检测的补充,有待进一步的研究确证^[6-7]。本研究分别用IHC、FISH和qPCR 3种技术检测400例非特殊性浸润性乳腺癌石蜡组织的HER-2状态,将三者结果进行比较,并对比三者结果与患者临床病理特征之间的联系,以验证qPCR技术的可靠性和实用性及其替代FISH技术的可行性。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取2010年1月至2014年6月我院手术切除病理明确诊断的非特殊性浸润性乳腺癌患者的石蜡肿瘤组织,重新切片进行IHC检测,由病理诊断医师重新评估,从中选取HER-2免疫组化结果0、1+、2+和3+各100例分别行FISH基因扩增和qPCR检测。患者均为女性,年龄最小为26岁,最大为83岁,中位年龄53.1岁。回顾入组患者ER、PR及Ki-67的免疫组化结果,并统计分析HER-2结果与各指标表达之间的关系。

1.2 IHC法

肿瘤蜡块切片3~4 μm ,粘附载玻片贴片,常规65℃烘烤过夜,平行加阴阳性对照。使用美国罗氏VENTANA Bench Mark全自动免疫组化染色机和VENTANA抗HER-2蛋白的单克隆抗体,克隆号4b5。IHC标记的操作关键步骤依次为VENTANA脱蜡液EZ 75℃脱蜡4 min;95℃ PH8.0抗原修复30 min;缓冲液中漂洗,过氧化物酶阻滞液中孵育4 min;随后加入HER-2一抗,37℃孵育16 min;二

抗UV HRP孵育8 min;DAB显色8 min,苏木素复染,返蓝液返蓝,最后漂洗封片。

1.3 FISH法

切片准备同IHC,平行加做阴阳性对照。Path-Vysion HER-2 DNA探针试剂盒购自美国Vysis公司,荧光显微镜型号为德国莱卡LeiCa DM4000B。操作步骤:充分脱蜡至水,蒸馏水煮沸20 min,晾干后37℃胃酶消化15 min,漂洗后梯度酒精脱水晾干,加10 μL 杂交液盖片并用蜡胶封边,85℃变性5 min,37℃杂交过夜。第2天将切片置于杂交后洗液(2×SSC,0.3% NP-40)中漂浮盖玻片,组织片入杂交后洗液72℃2 min,再将其放置在暗处室温干燥,滴加10 μL DAPI显色液在组织片靶区域,盖玻片封片,荧光显微镜观察结果。使用德国莱卡Leica CW4000 FISH分析软件进行拍照并计数。

1.4 qPCR法

1.4.1 组织准备

组织进行切片,厚度8~10 μm ,对照相应组织的HE切片选取肿瘤区域进行显微切割,根据癌细胞量多少使用2~3片进行检测,切片后尽快进行RNA的提取,如不能及时提取要存放于-20℃,以减少RNA的降解。

1.4.2 RNA的提取

提取组织总RNA使用的是微量组织总RNA快速提取试剂盒(江苏默乐生物科技有限公司),采用胍盐裂解的柱式离心法从石蜡组织切片中提取。每例吸取2 μL 作为模板进行下游实验,剩余可以放入冰箱-20℃保存。

1.4.3 扩增检测

HER-2核酸检测试剂盒(荧光PCR法)购自江苏默乐生物科技有限公司,采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)结合Taqman荧光探针技术对乳腺癌患者肿瘤组织样本中HER-2基因表达进行鉴别,每个样本同时进行管家基因的检测,实现基因的相对定量,荧光信号的收集定为FAM(HER-2)、HEX(VIC)。同一批次加入阴阳性质控品,仪器为美国ABI公司PCR仪7500。扩增体系为25 μL ,其中包括RT-PCR buffer 18.1 μL ,酶mix 0.4 μL ,引物探针mix 4.5 μL ,RNA(cDNA)模板2.0 μL 。扩增条件为45℃15 min;95℃1 min;然后95℃15 s,58℃1 min扩增40个循环。

1.5 结果判定标准

HER-2 IHC 和 FISH 检测结果判断标准均为 2013 年美国临床肿瘤学会/美国病理学家学会 2007 版乳腺癌 *HER-2* 检测指南基础上的更新版本^[8]以及我国《乳腺癌 *HER-2* 检测指南(2014 版)》^[9]。

qPCR *HER-2* 检测结果判断标准按照试剂盒说明推荐:阳性质控品 $\Delta Ct \geq 23$, 且阴性质控品其突变管与参照管均无 Ct 值, 或未出现典型扩增曲线, 检测样本的 Ct_{HER-2} 和 $Ct_{管家基因}$ 都有典型 S 型扩增曲线, 提示本次检测有效, 否则无效。 $\Delta Ct = 20 - (Ct_{HER-2} - Ct_{管家基因})$, $\Delta Ct \geq 23$, *HER-2* 表达阳性; $\Delta Ct \leq 21$, *HER-2* 表达阴性; $21 < \Delta Ct < 23$, 应重新检测, 若 $\Delta Ct > 21$, 则为 *HER-2* 表达阳性, 否则为阴性。

对于 3 种方法差异显著的病例, 重复进行检测, 确保结果真实可靠。

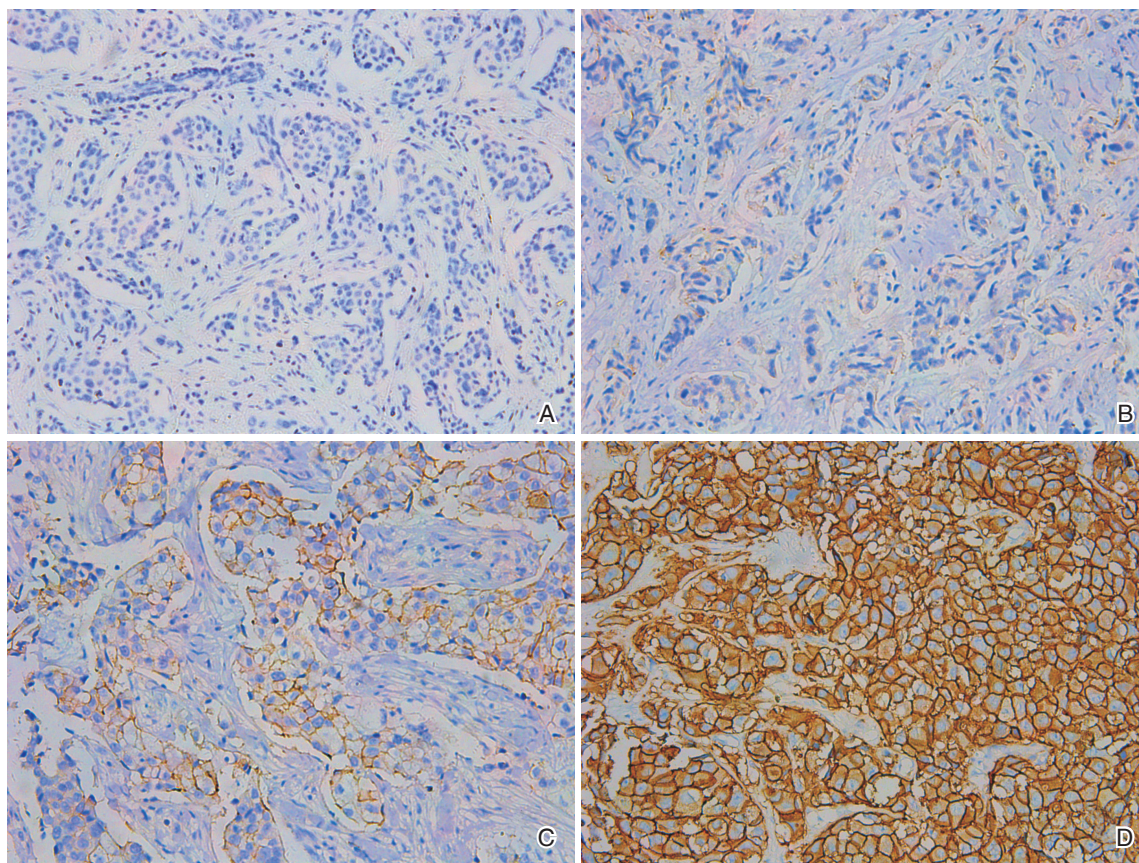
1.6 统计学方法

应用 SPSS 11.5 统计学分析软件, 3 种方法检测结果的一致性采用 *Kappa* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义; 用 χ^2 和 *Fisher's Exact test* 来分析 *HER-2* 结果与患者临床病理特征之间的关系。

2 结果

2.1 乳腺癌患者 *HER-2*、ER、PR、Ki-67 免疫组织化学染色

乳腺癌肿瘤细胞中 ER、PR 和 Ki-67 免疫组织化学染色阳性表达均定位于细胞核, *HER-2* 的表达位于细胞膜(图 1)。患者 ER 表达结果为: 阴性 80 例, 15 例 1+, 45 例 2+, 260 例 3+; PR 表达结果为: 阴性 145 例, 50 例 1+, 60 例 2+, 145 例 3+; Ki-67 表达结果为: $\leq 5\%$ 45 例, $> 5\%$ 且 $\leq 30\%$ 220 例, $> 30\%$ 且 $\leq 50\%$ 70 例, $> 50\%$ 65 例; *HER-2* 结果如表 1 所示。



A: 0; B: 1+; C: 2+; D: 3+

图 1 乳腺癌 *HER-2* IHC 检测结果(IHC, 200 $\times$)

Figure 1 Results of *HER-2* by IHC in breast carcinoma (IHC, 200 $\times$)

表1 浸润性乳腺癌中FISH、qPCR和IHC检测HER-2的结果比较

Table 1 Comparison of HER-2 results by FISH, qPCR and IHC

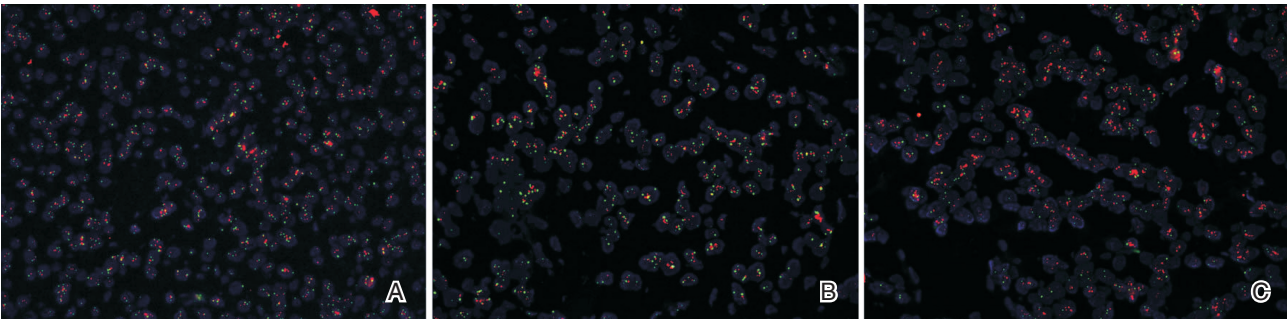
IHC 结果 (例数)	IHC 阳性 [n(%)]	FISH 阳性 [n(%)]	qPCR 阳性 [n(%)]
0(100)	0(0)	0(0)	0(0)
1+(100)	0(0)	0(0)	0(0)
2+(100)	100(100)	20(20)	25(25)
3+(100)	100(100)	92(92)	90(90)
合计	200(50)	112(28)	115(28.75)

2.2 乳腺癌患者HER-2基因扩增的FISH检测结果

400例标本中,FISH检测结果为:HER-2基因扩增112例,扩增率28%(112/400);无HER-2基因扩增者285例,占检测总例数的71.3%(291/400);不能确定者3例,占0.075%(3/400),该3例后经qPCR检测,证实其中2例存在HER-2的扩增,另1例未扩增。肿瘤组织中FISH 3种表达的情况如图2所示。

2.3 乳腺癌患者HER-2基因qPCR检测结果

400例标本中,检测有扩增的115例,扩增率28.8%(115/400),另外285例标本没有扩增,占到检测总例数的71.25%(285/400),见表1。



A: 无扩增(-); B: 不确定(+/-); C: 扩增(+)

图2 乳腺癌中HER-2基因的FISH检测(FISH, 400×)

Figure 2 Results of HER-2 by FISH in breast carcinoma (FISH, 400×)

2.4 乳腺癌患者HER-2基因不同检测方法间的区别与联系

200例IHC检测分别为0/1+的标本中,FISH和qPCR检测无一例扩增,符合率100%;在IHC检测HER-2结果为2+的标本中,FISH的阳性检出率为20%,qPCR的阳性检出率为25%,其中FISH和qPCR结果共同阴性者71例(73%,71/97),FISH和qPCR结果共同阳性者17例(18%,17/97),qPCR阳

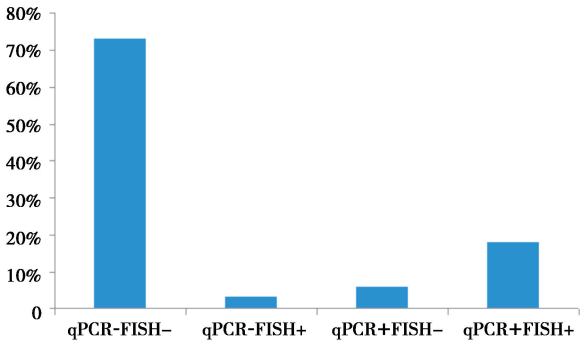


图3 乳腺癌中HER-2表达2+标本qPCR和FISH表达比例

Figure 3 Express ratio of HER-2 by qPCR and FISH in IHC(2+)

表2 乳腺癌中HER-2表达2+标本qPCR和FISH表达结果的比较

Table 2 Comparison of HER-2 results by qPCR and FISH in IHC(2+)

qPCR	FISH			合计	k	P值
	阴性	不确定	阳性			
阴性	71	1	3	75	0.731	0.000
阳性	6	2	17	25		
合计	77	3	20	100		

性而FISH结果阴性的病例6例(6%,6/97),FISH结果阳性而qPCR检测为阴性的有3例(3%,3/97),经Kappa检验,在IHC 2+的乳腺癌中FISH和qPCR的检测结果k=0.731(P<0.000 1)(表2,图3)。

表3 乳腺癌中 HER-2 表达 3+标本 qPCR 和 FISH 表达结果的比较
Table 3 Comparison of *HER-2* results by qPCR and FISH in IHC(3+)

qPCR	FISH		合计	<i>k</i>	<i>P</i> 值
	阴性	阳性			
阴性	6	4	10	0.634	0.000
阳性	2	88	90		
合计	8	92	100		

在 IHC 检测表达为 3+ 的肿瘤组织中, FISH 检测的整体阳性率为 92%, qPCR 的阳性检出率为 90%, 其中 FISH 和 qPCR 结果共同阳性者 88 例(88%, 88/100), FISH 和 qPCR 结果共同阴性者 6 例(6%, 6/100), qPCR 阳性而 FISH 结果阴性的病

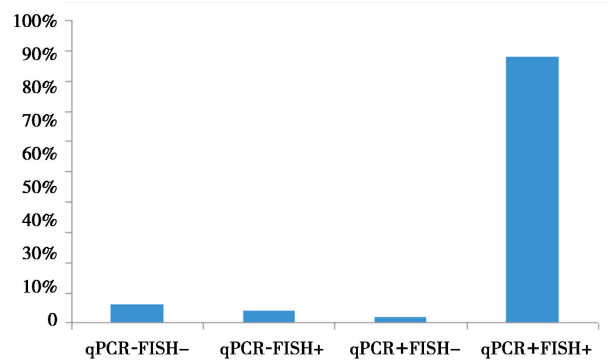


图4 乳腺癌中 HER-2 表达 3+标本 qPCR 和 FISH 表达比例
Figure 4 Express ratio of *HER-2* by qPCR and FISH in IHC(3+)

例 2 例(2%, 62/100), FISH 结果阳性而 qPCR 检测为阴性的有 4 例(4%, 4/100), 经 *Kappa* 检验, 在 IHC 3+ 的乳腺癌中 FISH 和 qPCR 的检测结果 *k*=0.634(*P*<0.000 1)(表 3, 图 4)。

2.5 乳腺癌中 IHC、qPCR 和 FISH 检测 *HER-2* 结果与临床病理特征的联系

病理学分级 I 级的有 40 例, II 级的有 295 例, III 级的有 65 例; 淋巴结转移的有 175 例, 无淋巴结转移的有 225 例; 临床分期 T1 有 180 例, T2 有 175 例, T3 有 20 例, T4 有 25 例。

IHC 和 qPCR 检测的 *HER-2* 结果阳性率均与组织的病理学分级、ER、PR 以及 Ki67 的表达这几个因素密切相关(*P*<0.05), 而与患者年龄、淋巴结转移情况、临床分期关系不密切, 分别见表 4、

表4 用免疫组织化学(IHC)方法检测的 HER-2 表达的结果与临床病理特征
Table 4 Expression of *HER-2* by IHC and clinicopathological parameters

参数	<i>n</i>	IHC		χ^2	<i>P</i> 值
		2+/3+	0/-1		
年龄					
≤60	315	155	160	0.374	0.541
>60	85	45	40		
分级					
I	40	5	35	26.724	0.000
II	295	155	140		
III	65	40	25		
淋巴结					
+	175	85	90	0.254	0.614
-	225	115	110		
分期					
T1	180	100	80	4.508	0.212
T2	175	80	95		
T3	20	10	10		
T4	25	10	15		
ER					
-	80	50	30	30.171	0.000
1+	15	10	5		
2+	45	35	10		
3+	260	105	155		
PR					
-	145	95	50	62.77	0.000
1+	50	40	10		
2+	60	25	35		
3+	145	40	105		
Ki67					
≤5%	45	10	35	40.452	0.000
>5%且≤30%	220	95	125		
>30%且≤50%	70	50	20		
>50%	65	45	20		

表 6; 而 FISH 检测的 *HER-2* 结果阳性率与患者的组织的病理学分级、临床分期、ER、PR 以及 Ki67 的表达这几个因素亦密切相关(*P*<0.05), 而与患者的淋巴结转移情况关系不密切(表 5)。

3 讨论

HER-2/neu 或 *HER-2* 基因定位于人第 17 号染色体的长臂(17q21.1), 其编码的产物 *HER-2* 在乳腺癌组织中有 25%~30% 存在异常高表达^[10]。 *HER-2* 高表达或其基因的扩增与乳腺癌的发生、发展、预

表5 用荧光原位杂交(FISH)方法检测的HER-2表达的结果与临床病理特征

Table 5 Expression of HER-2 by FISH and clinicopathological parameters

参数	n	FISH		χ^2	P 值
		+	-		
年龄					
≤60	313	100	213	13.284	0.087
> 60	84	12	72		
分级					
I	39	6	33	8.092	0.017
II	293	80	213		
III	65	26	39		
淋巴结					
+	174	57	117	2.354	0.129
-	223	55	168		
分期					
T1	180	67	113	11.938	0.000
T2	174	35	139		
T3	19	5	14		
T4	24	5	19		
ER					
-	79	45	34	77.172	0.000
1+	15	10	5		
2+	45	20	25		
3+	258	37	221		
PR					
-	144	80	64	89.623	0.000
1+	50	10	40		
2+	59	5	54		
3+	144	17	127		
Ki67					
≤5%	45	10	35	28.336	0.000
>5%且≤30%	218	45	173		
>30%且≤50%	69	20	49		
>50%	65	35	30		

表6 用实时定量PCR(qPCR)方法检测的HER-2表达的结果与临床病理特征

Table 6 Expression of HER-2 by qPCR and clinicopathological parameters

参数	n	qPCR		χ^2	P 值
		+	-		
年龄					
≤60	315	90	225	0.023	0.879
> 60	85	25	60		
分级					
I	40	0	40	19.58	0.000
II	295	90	205		
III	65	25	40		
淋巴结					
+	175	50	125	0.004 8	0.945
-	225	65	160		
分期					
T1	180	50	130	6.824	0.078
T2	175	45	130		
T3	20	10	10		
T4	25	10	15		
ER					
-	80	40	40	66.621	0.000
1+	15	10	5		
2+	45	25	20		
3+	260	40	220		
PR					
-	145	70	75	58.332	0.000
1+	50	20	30		
2+	60	10	50		
3+	145	15	130		
Ki67					
≤5%	45	10	35	42.442	0.000
>5%且≤30%	220	45	175		
>30%且≤50%	70	20	50		
>50%	65	40	25		

后及治疗等有着重要的联系^[11]。HER-2 基因扩增的乳腺癌患者对内分泌治疗及常规化疗药物不敏感、预后差,而对 HER-2 的靶向药物赫赛汀的敏感性较好。2002 年,赫赛汀已通过美国 FDA 认证,但必须在 IHC 检测 HER-2 (3+)和/或 FISH 法检测结果为阳性时才能使用^[12],自此,HER-2 检测有了巨大的临床价值^[5]。

目前,国内外常用的 HER-2 检测方法有 IHC、FISH、显色原位杂交^[13](chromosome *in situ* hybrid-

ization, CISH)、银染原位杂交(silver *in situ* hybridization, SISH)和 qPCR^[14]等,但 qPCR 尚未作为常规应用。IHC 是目前临床上常用的检测乳腺癌 HER-2 蛋白表达的方法,该方法操作简便、费用低廉、可重复性好。然而由于标记蛋白在组织固定后其抗原活性会下降或消失,从而导致假阴性;抗原修复可提高其敏感性,但修复过度会产生假阳性;另一方面,抗体的差异、结果主观判断差异等原因,均使得 IHC 结果假阳性或假阴性问题无法

避免。全自动免疫组化机的应用,最大程度去除了染色过程中人为因素的影响;但是标本离体时间的长短,之后能否及时有效固定及其标准化的组织处理对于 IHC 检测结果的准确与否至关重要。FISH 是用于检查 17 号染色体着丝粒和 *HER-2/neu* 基因扩增情况的技术,染色体的稳定性比蛋白质好得多,故此技术的敏感性和特异性较高,并可以避免 17 号染色体的非整倍体现象导致的 IHC 结果的假阳性,已被公认为检测 *HER-2* 基因过表达的金标准。但在进行 FISH 检测时也会受到一些因素的影响,比如蛋白消化不当、烤片温度过高等,可使荧光信号减弱或无信号;荧光容易淬灭,需要暗视野观察并计数等,使得结果判定容易受人为因素影响;FISH 方法试剂成本高,操作繁琐,需要配置特殊的荧光显微镜及专门的软件观察等,无疑给检测带来困难。

qPCR^[15]方法是检测 RNA 的最好选择,更接近于 RNA 定量,qPCR 方法敏感可靠。Chariyalertsak 等^[16]的研究显示,qPCR 方法能简单又精确地检测出石蜡组织中的 *HER-2* 表达状况。Barberis 等^[17]认为 qPCR 能有效检测 *HER-2* 且成本较低,Bossard 等^[18]也有类似的发现,与 IHC 相比,qPCR 的敏感性和特异性能达到 87.5% 和 100%,与 FISH 相比,qPCR 的敏感性和特异性能达到 89.5% 和 92%。本次实验中我们用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *HER-2* mRNA 的表达,研究结果表明无论在 *HER-2* (0, 1+) 的乳腺癌患者中,还是 *HER-2* (2+, 3+) 的患者中 qPCR 检测结果和 FISH 基因检测结果都出现较高的一致性, ($k=0.731$, $k=0.634$, P 均 <0.001),由此我们认为 qPCR 检测结果与金标准 FISH 的检测结果一致性好,其他研究也得出过类似的结论^[19-20]。qPCR 方法具有操作简便、经济省时以及可以批量操作的优点,其成本比 IHC 高,但仅为 FISH 成本的 1/4 左右,将来若能应用于临床检测,可为 IHC (2+) 的患者提供更为经济的选择。

本研究中,IHC、FISH 和 qPCR 检测的 *HER-2* 结果阳性率均与组织的病理学分级、ER、PR 以及 Ki67 的表达等因素密切相关 ($P<0.05$),而与患者年龄、淋巴结转移情况、临床分期关系不密切,说明在反应临床病理特征方面三者具有一致性,从侧面证实了 3 种检测方法结果的一致性。Zhu 等^[21]在应用 qPCR 技术在检测胃癌 *HER-2* 也得到

了同样的结论。未来 qPCR 技术有望在乳腺癌 *HER-2* 检测中应用于临床与 FISH 方法互为补充。

本研究中 IHC (2+, 3+) 标本中的阳性率与国内外大多数研究结果一致,但在 IHC (0, 1+) 的标本中未曾检测出阳性,这除了与标本及时充分固定,处理恰当和使用全自动免疫组化染色机染色等因素有关外,还可能与我们使用新的评判标准有关。在我们的研究中应用旧的免疫组化 *HER-2* 判读标准有 1 例判为 1+、更新的判读标准为 2+ 的标本,经 FISH 和 qPCR 检测示均有 *HER-2* 基因扩增,说明更新的判读标准较旧标准避免了漏检,具有更好的参考价值。对于 IHC (3+) 而 FISH (-) 或 qPCR (-) 的患者选择使用赫赛汀靶向药物的疗效尚需进一步大样本的研究和临床随诊验证。

参考文献

- [1] Demonty G, Bernard-Marty C, Puglisi F, et al. Progress and new standards of care in the management of *HER-2* positive breast cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(3):497-509.
- [2] Mandusic V, Dimitrijevic B, Nikolic-Vukosavljevic D, et al. Different associations of estrogen receptor β isoforms, ER β 1 and ER β 2, expression levels with tumor size and survival in early- and late-onset breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2012, 321(1):73-79.
- [3] Berghoff AS, Bago-Horvath Z, Dubsy P, et al. Impact of *HER-2*-targeted therapy on overall survival in patients with *HER-2* positive metastatic breast cancer [J]. *Breast J*, 2013, 19(2):149-155.
- [4] Bayoudh L, Afrit M, Daldoul O, et al. Trastuzumab (herceptin) for the medical treatment of breast cancer [J]. *Tunis Med*, 2012, 90(1):6-12.
- [5] Petersen ER, Srensen PD, Jakobsen EH, et al. Serum *HER-2* predicts response and resistance to trastuzumab treatment in breast cancer [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(7):1483-1492.
- [6] Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, et al. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of *HER2/neu* status in breast cancer [J]. *BMC Clin Pathol*, 2006, 6:2-5.
- [7] Specht K, Richter T, Müller U, et al. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(2):419-429.

- [8] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline update [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31 (31): 3997-4013.
- [9] 《乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版) [J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(4):262-266.
- [10] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer [J]. *Science*, 1989, 244 (4905): 707-712.
- [11] Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-her-2 therapy and personalized medicine [J]. *The Oncologist*, 2009, 14(4):320-368.
- [12] Tariq M, Muniba A, Waseem I, et al. Status of HER-2 amplification, polysomy17 and histopathological features of 425 pakistani breast cancer patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(11):3069-3073.
- [13] Kiyose S, Igarashi H, Nagura K, et al. Chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER2 gene amplification in breast and gastric cancer: comparison with immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. *Pathol Int*, 2012, 62 (11):728-734.
- [14] Garuti A, Rocco I, Cirmena G, et al. Quantitative real time PCR assessment of hormonal receptors and HER2 status on fine-needle aspiration pre-operative specimens from a prospectively accrued cohort of women with suspect breast malignant lesions [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(2):389-396.
- [15] Ma GF, Liu YM, Gao H, et al. HER2 mRNA status contributes to the discrepancy between gene amplification and protein overexpression in gastric cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(2):328-335.
- [16] Chariyalertsak S, Purisa W, Vinyuvat S. Her-2/neu amplification determined by real-time quantitative PCR and its association with clinical outcome of breast cancer in Thailand [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011 (12):1703-1706.
- [17] Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, et al. Quantitative PCR and Her2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(4):563-570.
- [18] Bossard C, Bieche I, Le Doussal V, et al. Real-time RT-PCR: a complementary method to detect Her-2 status in breast carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2005 (25):4679-4683.
- [19] Pazhoomand R, Keyhani E, Banan M, et al. Detection of HER2 status in breast cancer: comparison of current methods with MLPA and real-time RT-PCR [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7621-7628.
- [20] Pu T, Guo P, Qiu Y, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction is an alternative method for the detection of HER-2 amplification in formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015 Sep 1;8(9):10565-10574.
- [21] Zhu GJ, Xu CW, Fang MY, et al. Detection of Her-2/neu expression in gastric cancer: quantitative PCR versus immunohistochemistry [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5):1501-1507.

· 论 著 ·

沉默 *Kin17* 表达抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖孙振亚¹ 梁琳² 何洁婷² 王玲玲² 曾涛^{3,4*}

[摘要] **目的** 探讨沉默 *Kin17* 表达对乳腺癌细胞生长增殖的影响,为评估该分子作为未来药物靶点的潜能提供依据。**方法** 分别用携带 *Kin17* 基因特异性 siRNA 与正常对照 siRNA 的慢病毒重组载体感染 MDA-MB-231 细胞,再用嘌呤霉素进行抗性筛选,然后在荧光显微镜下观察阳性细胞的比例;用 Real-time PCR 与 Western blot 方法检测稳定转染了慢病毒重组载体的 MDA-MB-231 细胞中的 *Kin17* mRNA 与蛋白表达水平;CCK-8 实验检测细胞生长增殖状况。**结果** 通过感染携带 *Kin17* 特异性 siRNA 的病毒重组载体,稳定、明显敲减了 MDA-MB-231 细胞中的 *Kin17* mRNA 与蛋白表达水平,而且显著减缓了该乳腺癌细胞的生长增殖速度。**结论** 沉默 *Kin17* 表达能抑制三阴表型乳腺癌细胞的增殖,并有可能成为一种潜在的乳腺癌治疗新策略。

[关键词] *Kin17*; 基因沉默; 乳腺癌细胞; 细胞增殖; 三阴型

Silencing of *Kin17* inhibits proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cellsSUN Zhenya¹, LIANG Lin², HE Jieting², WANG Lingling², ZENG Tao^{3,4*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Central Hospital of Longhua New District, Shenzhen, Guangdong, China, 518110; 2. The First Clinical Medicine College, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Laboratory Medicine Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 4. School of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China, 523808)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effect of *Kin17* silencing on the proliferation of breast cancer cells, and assess the potential of *Kin17* as a new drug target. **Methods** MDA-MB-231 cells were infected with the lentiviral recombinant vectors carrying *Kin17* siRNA or normal controlled siRNA, and were screened with puromycin. The rates of the positive cells were observed under a fluorescence microscope. Real-time PCR and Western blot assay were performed to detect the mRNA level and protein level of *Kin17* in MDA-MB-231 cells transfected with the lentiviral recombinant vectors. And the CCK-8 assay was used to test the cell proliferation. **Results** The infection of the lentiviral recombinant vector carrying *Kin17* siRNA stably knocked down the mRNA level and protein level of *Kin17*, and slowed down the cell growth significantly in MDA-MB-231 cells. **Conclusion** Our findings indicate that the silence of *Kin17* expression could inhibit the cell proliferation of triple-negative breast cancer cells, and would be a potential therapeutic target for breast cancer.

[KEY WORDS] *Kin17*; Gene silence; Breast cancer cell; Cell proliferation; Triple-negative

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2013622);广东省大学生创新创业训练计划项目(201512121118);东莞市医疗卫生科技计划一般项目(20131051010005);南方医科大学大学生创新创业训练计划项目(201512121245)

作者单位:1. 深圳市龙华新区中心医院检验科,广东,深圳 518110

2. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

3. 南方医科大学南方医院检验医学科,广东,广州 510515

4. 广东医科大学医学检验学院,广东,东莞 523808

*通讯作者:曾涛, E-mail: zengt@smu.edu.cn

乳腺癌是女性的头号肿瘤杀手,严重威胁着女性的生命健康^[1]。早期患者进行肿瘤组织手术切除为较好的选择,而进展期的患者的放化疗效果还不是很理想。目前,分子分型及相应的靶向治疗在乳腺癌中已取得了令人振奋的疗效^[2]。内分泌疗法能明显改善雌激素(estrogen receptor, ER)或孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性的患者的预后生存^[3]。人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)阳性的患者对抗HER-2抗体药物的临床疗效喜人^[4]。而最近发现,这些靶向药物在临床应用中也出现了较多的耐药性。特别是三阴表型(ER⁻PR⁻HER-2⁻)的患者,暂时没有明显有效的靶向药物选择,预后极差^[5]。因此,挖掘更多的药物靶点,对乳腺癌患者的有效治疗非常紧要。

Kin17是一个物种进化中十分保守的蛋白质,在细胞中主要参与DNA复制和DNA修复功能^[6, 7]。最近,多项研究显示,该蛋白与肝癌、结肠癌、肺癌、胶质瘤等多种肿瘤的进展及预后疗效有关^[8-11]。本课题组前期研究发现,Kin17在乳腺癌组织中表达明显升高,很可能参与该肿瘤的发生发展^[12]。本文将探讨沉默*Kin17*表达对三阴表型乳腺癌细胞MDA-MB-231生长增殖的影响,为评估该分子作为未来药物靶点的潜能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MDA-MB-231细胞购自上海中科院细胞库,慢病毒载体GV115与siRNA购自上海吉凯基因有限公司,胎牛血清FBS、Leibovitz-15培养基和Trizol购自美国Invitrogen公司,M-MLV逆转录酶购自美国Promega公司,PrimerSTAR DNA聚合酶购自大连宝生物公司,CCK-8购自于美国sigma公司,鼠抗人Kin17单抗、羊抗鼠IgG-HRP二抗购于美国Santa cruz公司,PCR引物由广州华大基因有限公司合成,其他试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 细胞培养

MDA-MB-231细胞用Leibovitz-15培养基(添加10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)在37℃、含5% CO₂的孵箱中培养。

1.3 稳定转染慢病毒重组载体的细胞株筛选

先针对*Kin17*基因(GenBank number NM_

012311, 1 182 bp)靶序列设计siRNA,然后分别把合成的相应*Kin17*_siRNA和正常对照siRNA双链DNA与慢病毒载体GV115进行定向拼接,形成重组载体GV-siRNA_*Kin17*与GV-siRNA_NC,经测序鉴定正确。重组病毒载体与辅助包装原件质粒用Lipofectamine 2000共转染293T细胞,转染8 h后更换为完全培养基,继续培养48 h,收集细胞上清液,然后进行慢病毒颗粒浓缩与病毒滴度测定。接着,把包装好的病毒感染MDA-MB-231细胞,用嘌呤霉素筛选,在荧光显微镜下观察携带荧光细胞的比例,当阳性感染率达到80%以上时停止抗性筛选,得到稳定转染沉默载体的细胞株MDA-MB-231^{KD}与对照细胞株MDA-MB-231^{NC}(图1)。

1.4 Real-time PCR

根据已知的人*Kin17* cDNA序列自行设计上游引物(5'-CAACTATTGCTGGCTTCA-3')与下游引物(5'-TGTCTCGTCCACTTTGC-3'),PCR产物片段的理论值为243 bp。GAPDH作为内参对照,上游引物(5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3')与下游引物(5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3')的理论上PCR产物片段为121 bp。收集生长状态良好的细胞,先用Trizol抽提总RNA,再用M-MLV逆转录酶把总RNA反转录而获得cDNA,接着配制PCR反应体系,混匀后稍离心,于Takara TP800实时定量PCR仪上进行扩增测定。扩增参数为:95℃预变性30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,共进行40个循环。

1.5 Western blot 分析

收集生长状态较好的细胞,用含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液溶解细胞,离心取上清进行SDS-PAGE电泳分离,随后电转至PVDF膜上。PVDF膜用5%脱脂奶粉于室温封闭1 h,再加入鼠抗人Kin17单抗,GAPDH作为内参。次日,滴加羊抗鼠IgG-HRP二抗孵育45 min,经PBST漂洗后,最后用ECL底物曝光及拍照。

1.6 CCK-8细胞增殖检测

将处于对数生长期的细胞用胰酶消化并收集,再用完全培养基制成细胞悬液(2×10⁴个/mL);按照每孔100 μL种植于96孔板中,每组设置6孔重复;待细胞完全沉降下来后,在显微镜下观察各组的细胞密度与均匀程度适可后,放入细胞培养箱中培养。20 h后,加入10 μL CCK-8试剂于培养

板孔中,无需换液。继续培养4 h后,把96孔板置于振荡器上振荡5 min,再用酶标仪在450 nm波长下检测OD值。本实验重复3次,数值用均值±标准差表示。

1.7 统计学处理

实验数据用SPSS 13.0软件进行统计分析,不同组细胞间的生长曲线用配对T检验来比较分析, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功筛选获得稳转慢病毒载体GV-siRNA_Kin17与GV-siRNA_NC的细胞株

分别将已构建的慢病毒重组载体GV-siRNA_Kin17与GV-siRNA_NC感染MDA-MB-231细胞,用嘌呤霉素进行抗性筛选,携带有绿色荧光载体的阳性细胞比例逐渐增加。当阳性细胞率达到80%以上(图1)及细胞汇合度达到约80%时,我们即得到了稳定转染重组病毒载体的细胞株MDA-MB-231^{KD}与对照细胞株MDA-MB-231^{NC},并把它们作为下一步细胞功能研究的实验材料。

2.2 用GV-siRNA_Kin17载体有效沉默MDA-MB-231细胞的Kin17表达

Real-time PCR检测结果显示,转染了GV-siRNA_Kin17病毒载体的MDA-MB-231^{KD}细胞中的Kin17 mRNA表达水平明显下调,比正常对照细胞

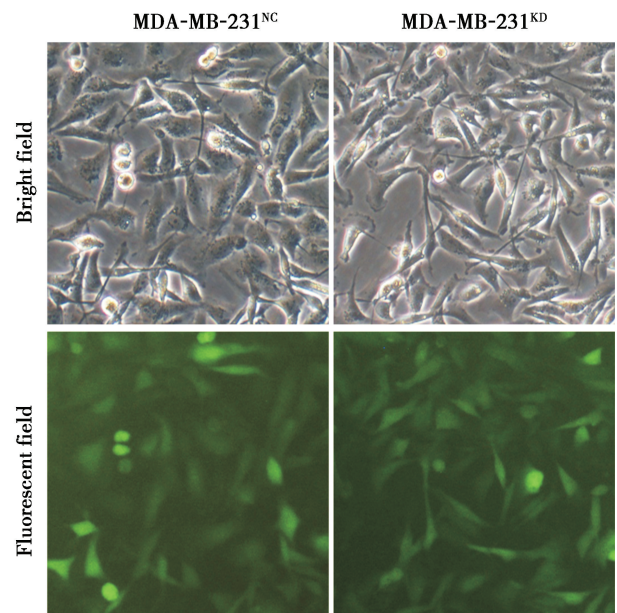
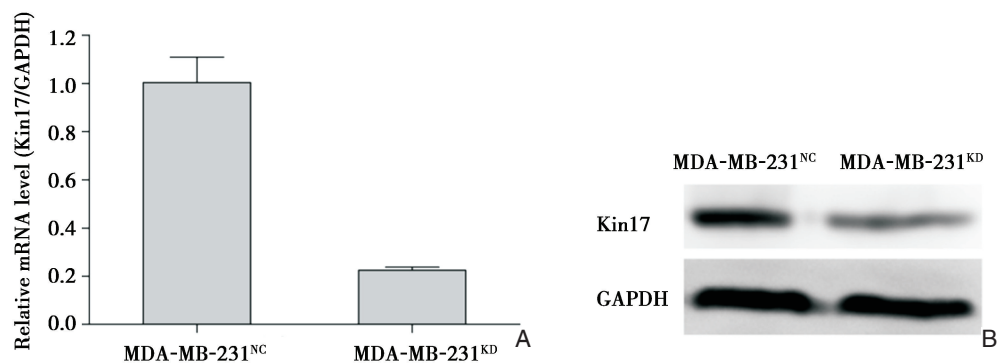


图1 稳定转染慢病毒重组载体的细胞株MDA-MB-231^{NC}与MDA-MB-231^{KD}的形态与荧光特征

Figure 1 Morphological and fluorescent feature in MDA-MB-231^{NC} cells and MDA-MB-231^{KD} cells stably transfected with lentiviral recombinant vectors

MDA-MB-231^{NC}减低了77.5%(图2A)。Western blot实验结果也表明,MDA-MB-231^{KD}细胞中的Kin17蛋白表达水平也比正常对照细胞明显下降(图2B)。这提示该病毒重组载体的基因沉默效果较好。



A: RT-PCR 检测; B: Western blot 检测

图2 MDA-MB-231^{NC}细胞和MDA-MB-231^{KD}细胞中Kin17 mRNA和蛋白表达

Figure 2 mRNA levels and protein levels of Kin17 in MDA-MB-231^{NC} cells and MDA-MB-231^{KD} cells

2.3 沉默Kin17表达对MDA-MB-231细胞增殖的影响

正常对照细胞MDA-MB-231^{NC}的生长状态良

好。而CCK-8实验显示,MDA-MB-231^{KD}细胞的生长增殖速度比对照细胞MDA-MB-231^{NC}要明显减缓, $P = 0.0026 < 0.01$ (图3)。

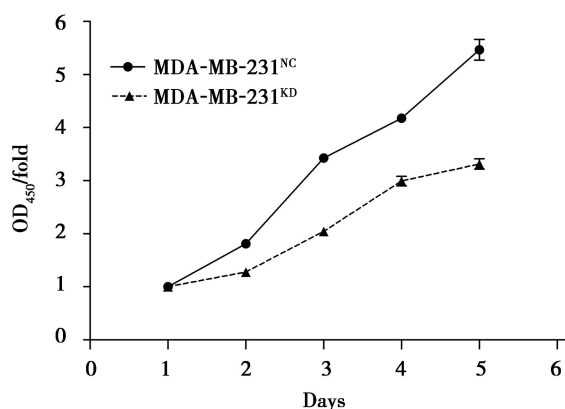


图3 沉默 Kin17 表达对 MDA-MB-231 细胞生长增殖的影响

Figure 3 Influence of Kin17 silencing on cell proliferation of MDA-MB-231 cells

3 讨论

已有多项研究表明, Kin17 是细胞中 DNA 复制复合物的一个重要成员, 用 Kin17 抗体作用于细胞, 会抑制细胞 DNA 复制水平^[6]。紫外线或离子辐射细胞, 能引起该分子的表达上调及定位改变^[7]; 它很像一个 DNA 维持蛋白, 参与晚期的 DNA 修复^[13]。最近研究发现, 该蛋白与一些肿瘤的发生发展密切相关^[8, 14]。上调 Kin17 水平能促进肝癌细胞的生长增殖^[8]。而沉默 Kin17 表达能促进结直肠癌细胞对常用化疗药物的敏感性^[9]。

据报道, Kin17 在机体各种正常组织中普遍低表达^[15]。本课题组研究也显示, Kin17 在乳腺正常上皮细胞 Hs-578Bst 与 MCF-10A 中表达较低, 该蛋白在 MCF-10A 细胞受血清刺激增殖后表达升高; 而且通过转染携带 *Kin17* 基因的重组质粒来上调 Kin17 表达水平, 能明显促进 MCF-10A 细胞的增殖速度^[16]。因此, Kin17 与乳腺上皮细胞的生长增殖密切相关。我们还发现, 该分子在常见乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、BT474、MCF-7、SKBr-3 等) 及临床乳腺癌标本组织中表达明显升高, 提示其很可能在乳腺癌细胞的快速增殖及癌症转化中发挥重要作用^[12]。在本研究中, 通过感染携带特异性 siRNA 的病毒重组载体, 稳定、明显敲减了 MDA-MB-231 细胞中的 *Kin17* 基因与蛋白表达水平, 而且显著抑制了该乳腺癌细胞的生长增殖速度。因此, 沉默 Kin17 很可能是一种潜在的乳腺癌治疗新策略。特别是对于 ER⁺PR⁺HER-2⁻表型的患

者, Kin17 也许是一种潜在的有效靶点。

目前, Kin17 在乳腺癌细胞增殖中的调控机制尚有待阐明^[8]。我们已证实, 上调 Kin17 表达能促进 MCF-10A 细胞的 DNA 复制活性^[16]; 化疗药物阿霉素能诱发 MCF-10A 细胞产生较多的 DNA 损伤, 同时也引起 Kin17 蛋白反应性升高^[12]。因此, Kin17 很可能在乳腺上皮细胞加速增殖中支持其 DNA 复制及损伤修复功能。本前期研究还发现, 上调 Kin17 能促进 MCF-10A 细胞中的 ERK1/2 的磷酸化活性, 提示该蛋白也许参与 EGFR 癌症信号途径^[16]。本课题组还发现, 上调 Kin17 表达能促进 MCF-10A 细胞中的 cyclin D1 的表达水平^[16]。另有学者也证实, 上调 Kin17 能上调肝癌细胞的 cyclin D1 水平^[8]。这充分表明了该蛋白对细胞周期中 G1/S 转换的调控作用。对 Kin17 在乳腺癌细胞中功能及其分子调控机制的深入探究, 将有助于揭示乳腺癌细胞快速增殖及癌症转化的潜在机制, 为乳腺癌治疗新方案的摸索提供有力的科学依据。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(1):7-30.
- [2] Kos Z, Dabbs DJ. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer [J]. Histopathology, 2016, 68(1):70-85.
- [3] Almstedt K, Schmidt M. Targeted therapies overcoming endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer [J]. Breast Care, 2015, 10(3):168-172.
- [4] Zanardi E, Bregni G, de Braud F, et al. Better together: targeted combination therapies in breast cancer [J]. Seminars in Oncology, 2015, 42(6):887-895.
- [5] Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, et al. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions [J]. Breast Cancer (Dove Med Press), 2016, 8:93-107.
- [6] Biard DS, Miccoli L, Despras E, et al. Participation of kin17 protein in replication factories and in other DNA transactions mediated by high molecular weight nuclear complexes [J]. Molecular Cancer Research, 2003, 1(7):519-531.
- [7] Kannouche P, Pinon-Lataillade G, Tissier A, et al. The nuclear concentration of kin17, a mouse protein

- that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(5):781-789.
- [8] Kou WZ, Xu SL, Wang Y, et al. Expression of Kin17 promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. *Oncology Letters*, 2014, 8(3):1190-1194.
- [9] Yu M, Zhang Z, Yu H, et al. KIN enhances stem cell-like properties to promote chemoresistance in colorectal carcinoma [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 448(1):63-69.
- [10] 曾涛, 陆光明. KIN17 在 28 例肺癌标本中的表达分析 [J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(12):1619-1620.
- [11] Ramos A, Gaspar V, Kelmer S, et al. The kin17 protein in murine melanoma cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12):27912-27920.
- [12] Zeng T, Gao H, Yu P, et al. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer [J]. *Plos One*, 2011, 6(9):e25343.
- [13] Masson C, Menaa F, Pinon-Lataillade G, et al. Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(2):616-621.
- [14] 曾涛, 朱正, 郜红艺, 等. 人 Kin17 蛋白的原核表达及纯化 [J]. *生物技术*, 2013, 23(3):28-31.
- [15] Kannouche P, Mauffrey P, Pinon-Lataillade G, et al. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(9):1701-1710.
- [16] 曾涛, 吴坤河. Kin17 表达促进乳腺上皮细胞 MCF-10A 增殖 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(5):457-462.

(上接第 307 页)

- [8] Dai P, Li Q, Huang D, et al. SLC26A4 c.919-2A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss [J]. *Genet Med*, 2008, 10(8):586-592.
- [9] Dai P, Liu X, Han D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families: implication for early detection and prevention of deafness [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1):194-199.
- [10] 王国建, 戴朴, 韩东一, 等. 基因芯片技术在非综合征性耳聋快速基因诊断中的应用研究 [J]. *中华耳科学杂志*, 2008, 6(1):61-66.
- [11] Qing J, Zhou Y, Lai R, et al. Prevalence of mutations in GJB2, SLC26A4, and mtDNA in children with severe or profound sensorineural hearing loss in southwestern China [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19(1):52-58.
- [12] Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, et al. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(49):21104-21109.
- [13] Yang T, Wei X, Chai Y, et al. Genetic etiology study of the non-syndromic deafness in Chinese Hans by targeted next-generation sequencing [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2013, 8:85.
- [14] Vona B, Müller T, Nanda I, et al. Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations [J]. *Genet Med*, 2014, 16(12):945-953.
- [15] 苏钰, 汤文学, 代志瑶, 等. 目标序列捕获及平行测序在临床耳聋基因诊断中的应用 [J]. *中华耳科学杂志*, 2014, 12(1):45-49.
- [16] 袁慧军, 卢宇. 新一代测序技术在遗传性耳聋基因研究及诊断中的应用 [J]. *遗传*, 2014, 36(11):1112-1120.
- [17] Tekin D, Tutar E, Ozturkmen AH, et al. Comprehensive genetic testing can save lives in hereditary hearing loss [J]. *Clin Genet*, 2015, 87(2):190-191.
- [18] Tekin D, Yan D, Bademci G, et al. A next-generation sequencing gene panel (MiamiOtoGenes) for comprehensive analysis of deafness genes [J]. *Hear Res*, 2016, 333:179-184.

• 论 著 •

云南昆明地区非小细胞肺癌 *EGFR* 突变情况研究

苏国苗 杨哲 边莉 潘国庆*

【摘要】目的 研究昆明地区非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers, NSCLCs)表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因突变特点及与临床特征(性别、年龄、吸烟、组织学分型)的相关性。方法 采用突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)检测昆明地区173例非小细胞肺癌*EGFR*基因第18~21号外显子基因突变情况,并分析其突变与临床特征的关系。结果 173例NSCLCs共检测*EGFR*突变38.7%(67/173),其中外显子19和21突变分别占突变总数的58.2%(39/67)和25.4%(17/67);腺癌和腺鳞癌基因突变率分别为44.1%(64/145)和60%(3/5);无吸烟史*EGFR*突变率51.1%(48/94)显著高于有吸烟史患者24.1%(19/79), $P < 0.05$;女性*EGFR*突变率分别为49.4%(44/89)显著高于男性27.4%(23/84), $P < 0.05$ 。结论 云南昆明地区NSCLCs患者*EGFR*基因突变主要以19号外显子缺失突变和21号外显子点突变为主,多见于女性、无吸烟史、腺癌和腺鳞癌患者。

【关键词】非小细胞肺癌;突变扩增阻滞系统;表皮生长因子受体;基因突变

Study on mutation of *EGFR* gene in non-small cell lung cancers in Kunming of Yunnan

SU Guomiao, YANG Zhe, BIAN Li, PAN Guoqing*

(The Department of Pathology of First affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China, 650032)

【ABSTRACT】Objective This study aimed to investigate gene mutations of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and the relation between mutation types and clinical features (gender, age, history of smoking, histology) of NSCLCs in Kunming, Yunnan. Methods Mutations of exons 18, 19, 20 and 21 of *EGFR* in 173 NSCLCs from Kunming were detected by PCR-amplification refractory mutation system, and the correlation between mutations and clinical features of NSCLCs were analyzed. Results Mutations were found in 67 cases of 173 lung cancer samples, with an incidence of 38.7%. Mutations were mainly detected in exon 19 (58.2%, 39/67) and exon 21 (25.4%, 17/67). Mutation frequency in adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma was (41.1%, 64/145) and (60%, 3/5) respectively. Mutations in non-smoking patients (51.1%, 48/94) were higher than those who had a history of smoking (24.1%, 19/79). Mutations in female patients (49.4%, 44/89) were higher than in males (27.4%, 23/84). Conclusion Mutation frequency of *EGFR* in lung cancer from patients in Kunming of Yunnan is more frequently detected in female, non-smoking, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma and the main types of mutation are exon 19 and exon 21 mutations.

【KEY WORDS】Non-small cell lung cancer; Amplification refractory mutation system; Epidermal growth factor receptor; Gene mutation

作者单位:昆明医科大学第一附属医院病理科,云南,昆明 650032

*通讯作者:潘国庆, E-mail: guoqing_pan@163.com

目前,肺癌已经成为我国发病率、死亡率最高的肿瘤,其相关驱动基因研究和个体化治疗也越来越受到临床的关注,而表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是酪氨酸激酶家族成员之一,位于细胞膜,当EGFR被配体激活后将引起细胞内该信号通路的级联激活反应,将信号由胞外传递至胞内,调节相关重要基因的表达,进而影响细胞的增殖、迁移、分化以及凋亡^[1]。多项基础和临床研究结果均证实,EGFR及其信号通路的关键组分发生异常表达或者体细胞突变,将导致肿瘤细胞的增殖和转移,因此针对EGFR及其信号通路的靶标检测和靶向药物治疗成为肿瘤个体化诊疗的重要研究对象^[2]。本次研究检测了云南昆明地区173例NSCLCs患者EGFR基因突变情况,同时对其突变特点及与临床特征关系进行了分析,为临床靶向用药方案的选择提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集昆明医科大学第一附属医院2014年5月至2016年2月经临床手术切除并经病理确诊的昆明地区非小细胞肺癌标本173例,其中男性84例,女性89例;年龄29~79岁,中位年龄54岁;有吸烟史病人79例。按世界卫生组织肺癌组织学标准分型,腺癌145例、鳞癌20例、腺鳞癌5例及其他3例。所有患者均未接受过放化疗和EGFR-TKI治疗等抗肿瘤治疗。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

肿瘤组织病理石蜡切片:由肺癌亚专科病理医师筛片,调取蜡块,由于标本保存时间过长,DNA会降解(组织固定所使用的10%中性福尔马林中的甲醛与组织DNA大分子之间随着储存时间延长会形成广泛的亚甲基交联桥,导致DNA链的脆性增加,从而更容易发生随机断裂),一般选择储存时间在2年以内的蜡块。用刀片剔除多余蜡块,为防止标本间交叉污染,每切一例标本前用75%酒精擦拭刀片和镊子,切片厚度:6~10 μm,数量6~10片,然后用镊子移至干净的1.5 mL离心管中。

1.2.2 DNA提取

将已装有患者组织的离心管置于生物安全柜,使用德国QIAGEN公司的QIAamp DNA FFEP

Tissue Kit(试剂编码:Cat.No.56404)试剂盒并严格按照说明书提取步骤操作,完成后用紫外分光光度计(品牌型号:厦门艾德生物技术有限公司AmoyDx SMA4000)测定DNA浓度。

1.2.3 荧光定量PCR扩增

严格按照人类EGFR突变检测试剂盒(荧光PCR法)(上海源奇生物医药科技有限公司)说明书在生物安全柜中加样,并采用德国ABI公司QPCR仪(型号:Stepone Plus),依据突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)的原理检测EGFR基因外显子18、19、20及21的突变情况。每次实验均设定阴、阳对照及内参照。反应循环参数:42℃,5 min;94℃,3 min;94℃,15 s,60℃,60 s,共40个循环。反应体系为25 μL。在PCR循环的第一步60℃时收集荧光信号。检测通道为:FAM-TAMRA。参比荧光设定为none。

1.2.4 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件对率的数据进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR基因突变特点

在173例非小细胞肺癌标本中,共检出EGFR基因突变67例(38.7%)。其中外显子19检测到突变39例(58.2%);外显子21检测到突变28例(25.4%);未查见外显子19和外显子21的双突变;外显子18检测到突变3例(4.5%);外显子20检测到突变2例(2.9%),外显子18和S768I位点双突变3例(4.5%);外显子21和T790M位点双突变3例(4.5%)。可见云南昆明地区EGFR突变类型主要以19号外显子突变和21号外显子突变为主(表1)。

表1 EGFR基因突变特点($n=67$)

Table 1 Distribution of EGFR gene mutation($n=67$)

外显子或位点	突变数量	突变率(%)
Exon 18	3	4.5
Exon 19	39	58.2
Exon 20	2	2.9
Exon 21	17	25.4
Exon 18和S768I双突变	3	4.5
Exon 21和T790M双突变	3	4.5

2.2 EGFR 基因突变与临床特征分析

在 173 例云南昆明地区 NSCLCs 病例数据统计分析可知:男性患者的 *EGFR* 突变率为 27.4% (23/84), 明显低于女性患者 49.4% (44/89) ($P=0.002$); ≤ 60 岁患者 *EGFR* 突变率为 36.2% (38/105), > 60 岁患者 *EGFR* 突变率为 42.6% (29/68), 两者之间的差异不具有统计学意义 ($P=0.394$); 无吸烟史患者 *EGFR* 基因突变率为 51.1% (48/94), 有吸烟患者为 24.1% (19/79), 二者比较有统计学意义 ($P<0.05$)。在 145 例患者腺癌中 64 例发生突变 (44.1%) 与鳞癌及其他组织类型比较有统计学意义 ($P<0.05$); 在 20 例鳞癌中均未发生突变; 在 5 例腺鳞癌中 3 例发生突变 (60%); 其它组织类型标本未发现 *EGFR* 基因突变 (表 2)。

表 2 *EGFR* 基因突变与临床特征的关系

Table 2 Correlation between <i>EGFR</i> gene mutation and patient clinical characters				
相关临床特征	<i>n</i>	突变例数 [<i>n</i> (%)]	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别			9.319	0.002
男	84	23 (27.4)		
女	89	44 (49.4)		
年龄			0.725	0.394
≤ 60	105	38 (36.2)		
> 60	68	29 (42.6)		
吸烟史			13.199	0.000 3
无	94	48 (51.1)		
有	79	19 (24.1)		
组织学分型				
腺癌	145	64 (44.1)		$< 0.000 1$
鳞癌	20	0 (0)		
腺鳞癌	5	3 (60.0)		
其它	3	0 (0)		

3 讨论

表皮生长因子受体 (EGFR) 是属于酪氨酸激酶 I 型受体家族, 基因定位于人类第 7 号染色体的短臂, 含有 28 个外显子, 广泛分布于各种上皮细胞的细胞膜上, 分为胞外区、跨膜区、胞内区 3 个部分^[3]。*EGFR* 基因突变主要发生在胞内 TK 区域前 4 个外显子上 (18~21)^[4]。位于 *EGFR* 酪氨酸激酶活性区域的 ATP 结合位点, TKI 通过与 ATP 竞争

结合 *EGFR* 信号通路的传导, 最终达到抑制肿瘤的增殖、转移、血管形成等一系列肿瘤细胞生物活动^[5], 进而有效的治疗 *EGFR* 基因突变的肺癌患者。因此, *EGFR* 突变可以作为 NSCLCs 患者 *EGFR*-TKI 治疗敏感性的预测因子, 通过检测 *EGFR* 突变的情况可以指导靶向用药及针对性的个体化治疗。

相关研究资料表明, *EGFR*-TKI 的疗效主要与 *EGFR* 基因外显子 19 和 21 的突变状态有关, 且突变多发生于腺癌、非吸烟和女性肺癌患者^[6]。本次研究对云南昆明地区 173 例 NSCLCs 患者 *EGFR* 18~21 外显子突变特点及与临床特征分别进行了分析, 结果显示: 云南昆明地区 *EGFR* 突变类型主要以 19 号外显子突变和 21 号外显子突变为主, 和目前亚洲人群 *EGFR* 检测突变主要以 19 和 21 外显子为主的相关文献报道一致^[7]; 同时检测到外显子外显子 18 和 S768I 位点双突变 4.5% (3/67) 和外显子 21 和 T790M 位点双突变 4.5% (3/67), 可能与我省地域环境、民族和遗传因素等有相关性, 有待进一步跟踪研究; *EGFR* 突变在不同性别和病理组织学类型等的病例中差异有统计学意义, 女性突变 49.4% (44/89) 高于男性 27.4% (23/84) ($P=0.002$); 无吸烟史 (48/94) 明显高于具有吸烟史患者 (19/79) ($P<0.05$); 腺癌 44.1% (64/145) 和腺鳞癌 60% (3/5) 的突变率高于其它病理组织学类型 ($P<0.05$); 但 *EGFR* 突变与肺癌患者的年龄无明显关系 ($P=0.394$)。综上所述, 云南昆明地区 *EGFR* 基因突变主要以 19 号外显子缺失突变和 21 号外显子点突变为主, 多见于女性、无吸烟史、腺癌和腺鳞癌患者。

肺癌细胞中 *EGFR* 酪氨酸酶基因编码区外显子 19 或 21 突变 (体细胞突变) 的患者, 靶向药物吉非替尼/厄洛替尼的有效率高达 80% 以上。19 号外显子碱基缺失主要发生在 746~750 位的氨基酸; 21 外显子点突变表现为 858 位密码子的亮氨酸转变为精氨酸 (L858R)^[8-9]。此外还有研究表明 *EGFR* 基因外显子 18、20 和 22 的突变, 也与 NSCLCs 对 *EGFR*-TKIs 的治疗敏感性相关, *EGFR* 基因 Exon18 突变型患者对药物敏感性增强, 药效更佳^[10-11]; *EGFR* 基因外显子 Exon20 (常见于 T790M 位点) 突变型患者对药物耐药性增强, 药效差 (但其中 S768I 位点突变目前多考虑对 TKI 治疗具低敏感性)。 *EGFR* 基因 22 号外显子 E884K 突

变型患者对易瑞沙(吉非替尼)敏感,对特罗凯(厄洛替尼)耐药;但当同时伴有21号外显子L858R突变时,患者对吉非替尼和厄洛替尼敏感性都有增加^[12-13]。本研究NSCLCs患者EGFR突变主要发生在19和21号外显子,分别占突变总数的58.2%(39/67)和25.4%(17/67)。

据相关文献报道,中国不同地区EGFR基因突变存在显著的地域差异,台湾地区的EGFR基因的突变主要以外显子21为主^[14],云南和广东地区主要以外显子19为主,而北京、上海地区区域间无明显差异^[15]。本次研究得出云南昆明地区EGFR基因突变主要发生在外显子19和21,同时发现3例外显子18与S768I位点罕见双突变,证实了我国NSCLCs患者EGFR基因突变类型存在着地域差异,其可能与民族、遗传背景、环境等有相关性。

综上所述,云南昆明地区NSCLCs的EGFR基因突变与患者的性别、病理组织学类型有关,主要以19号外显子缺失突变和21号外显子点突变为,多见于女性、无吸烟史、腺癌和腺鳞癌患者,这可为NSCLCs患者个体化诊疗方案的选择提供重要的依据。

参考文献

- [1] Sibilio M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, et al. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis [J]. Differentiation, 2007, 75 (9):770-787.
- [2] 唐艳萍, 张力图, 谭晓玉, 等. 广西南宁地区非小细胞肺癌EGFR基因突变分析[J]. 现代肿瘤学杂志, 2014, 22(5):1067-1069.
- [3] Han X, Dai GH. Research on EGFR in gastric cancer and its significance [J]. Chin Clin Oncol, 2010, 15 (2):173-176.
- [4] Sharmas V, Bell DW, Setteman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3):169-181.
- [5] 尹光浩, 刘伟, 吴勇, 等. 中国人原发性肺腺癌EGFR基因突变分析[J]. 中国老年学杂志, 2009, 4 (290):443-445.
- [6] Lee VH, Tin VP, Choy TS, et al. Association of exon 19 and 21 EGFR mutation patterns with treatment outcome after first-line tyrosine kinase inhibitor in metastatic non-small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(9):1148-1155.
- [7] Song Y, Yang W. Medical treatment of advanced non-small cell lung cancer: progress in 2014 [J]. Med J Chin PLA, 2015, 40(3):10-15.
- [8] 董刚强, 韩宝惠, 黄进肃, 等. 176例非小细胞肺癌的EGFR基因突变分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(9):686-692.
- [9] 王荣, 石冬琴, 谢华, 等. 非小细胞肺癌中EGFR基因突变及靶向药物治疗研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1):22-26.
- [10] Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers [J]. Int J Cancer, 2006, 118(2):257-262.
- [11] Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer [J]. J Chin Oncol, 2006, 11(3):190-198.
- [12] Qin BM, Chen X, Zhu JD, et al. Identification of EGFR kinase domain mutations among lung cancer patients in China: implication for targeted cancer therapy [J]. Cell Res, 2005, 15(3):212-217.
- [13] Cushman-Vokoun AM, Crowley AM, Rapp SA, et al. Comparison study of the performance of the QIAGEN EGFR RGQ and EGFR pyroassays for mutation analysis in non-small cell lung cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2013, 140(1):7.
- [14] Huang SF, Lju HP, Li LH, et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24):8195-8203.
- [15] 陈慧娟, 喻长顺, 李洪波. 广东地区非小细胞肺癌EGFR基因的突变研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1):29-32.

· 论 著 ·

河池地区乙型肝炎病毒基因型分布的相关性研究

唐毓凡^{1*} 韦桂宁²

【摘要】 目的 分析河池地区乙型肝炎病毒基因分型分布情况及与乙型肝炎病毒 DNA 定量、乙型肝炎 E 抗原定量检测的各项指标间的相关性。 方法 对临床 154 例乙型肝炎病毒 DNA 阳性患者,采用 PCR-反向点杂交法检测乙型肝炎病毒基因分型;采用实时荧光定量 PCR 法定量检测乙型肝炎病毒 DNA 载量;采用时间分辨法进行乙型肝炎 E 抗原定量检测;分析彼此间的相关性。 结果 经统计,B 型 83 例,占 53.9%;C 型 68 例,占 44.16%;非 B 非 C 型共 3 例,占 6.2%;男女性患者基因分型的构成比差异无统计学意义。 C 型乙型肝炎病毒 DNA 水平、C 型乙型肝炎 E 抗原定量测定阳性均高于 B 型。 结论 河池地区乙型肝炎病毒基因型以 B 型为主,C 型次之;C 型乙型肝炎病毒 DNA 含量、乙型肝炎 E 抗原定量测定阳性均高于 B 型。

【关键词】 乙型肝炎;基因分型;DNA;乙型肝炎 E 抗原

Distribution and correlation research of hepatitis B virus genotypes in Hechi area

TANG Yufan^{1*}, WEI Guining²

(1. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Du'an, Hechi, Guangxi, China, 530700;

2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, China, 530022)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients with HBV in Hechi area, and explore the relationship of HBV genotype and HBV quantitative analysis. **Methods** HBV genotypes from 154 patients in Hechi area were detected by polymerase chain reaction-reverse dot blot, the level of HBV-DNA by fluorescent quantitative PCR, and the level of HBV E-antigen by time resolved fluoro-immunoassay. **Results** Of all patients with HBV, 53.9% (83/154) were type B, 44.2% (68/154) were type C and 1.6% (3/154) were type B/C. There were no significant differences in the constituent ratio of HBV in gender. The level of DNA, the content of E antigen in genotype C were significantly higher than those in genotype B. **Conclusion** Genotype B, C and B/C of HBV existed in Hechi area. The genotype C was the major genotype, followed by genotype C. The level of DNA in genotype C was significantly higher than that in genotype B.

【KEY WORDS】 Hepatitis B virus; Genotypes; DNA; HBV E-antigen

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种嗜肝 DNA 病毒,可引起人类急、慢性肝炎,是导致肝硬化和肝癌的主要原因之一,严重危害人类健康。根据 HBV 的 S 区基因序列差异或者全基因核

苷酸序列的异质性,HBV 可区分为 A~H 8 种基因型^[1-3]。研究发现,HBV 基因型具有地域分布的特点,且与临床疾病谱、预后判断、疫苗预防及抗病毒治疗效果均有密切相关性^[4-5]。本研究通过对河

基金项目:广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZZJ13-15)

作者单位:1. 都安县人民医院检验科,广西,河池 530700

2. 广西中医药研究院,广西,南宁 530022

*通讯作者:唐毓凡, E-mail:1933730679@QQ.com

池地区 154 例 HBV 感染患者的标本进行基因分型检测、乙型肝炎病毒 DNA 和乙型肝炎两对半定量,分析河池地区 HBV 基因型的分布与各项检测指标之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选择 2014 年 1 至 12 月到都安县人民医院就诊的 154 例 HBV 感染患者,其中男性患者 96 例,女性患者 58 例,年龄 15~65 岁,平均(32.5±1.2)岁,均为河池地区居民,临床诊断参照《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准^[6],入选病例均排除合并甲、丙、丁、戊等其他肝炎病毒感染,且进行 HBV DNA 定量、乙型肝炎 E 抗原定量检测。

1.2 试剂与仪器

乙型肝炎病毒基因分型及 DNA 定量检测试剂购自中山大学达安基因股份有限公司;乙型肝炎 E 抗原定量检测试剂购自广州市达瑞生物技术股份有限公司;所使用的仪器包括美国 ABI 7500 型全自动实时荧光定量 PCR 仪、达安基因全自动核酸分子杂交仪、广州市达瑞生物技术股份有限公司 DR6608 仪。

1.3 观察指标

分析 HBV 基因亚型分布与 HBV DNA 定量、乙型肝炎表面抗原以及乙型肝炎 E 抗原等检测指标之间的相关性。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因分型检测结果

154 例河池地区的乙型肝炎感染患者的样本中,B 基因型 83 例,占 53.9%,C 基因型 68 例,占 44.16%,非 B 或 C 基因型 3 例,占 1.94%。患者 HBV 基因分型构成比差异与性别无相关性($P > 0.05$),见表 1。

2.2 基因分型与 HBV DNA 定量检测分析

对 B 型和 C 型 HBV DNA 定量检测的结果表明,B 型 HBV DNA 在 $(1.09 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^7)$ IU/mL 之间,均值为 3.12×10^5 IU/mL,C 型 HBV DNA 在 $(1.95 \times 10^3 \sim 8.98 \times 10^7)$ IU/mL 之间,均值为 1.51×10^6 IU/mL,HBV DNA 定量与 HBV 基因分型存在一定

表 1 河池地区乙型肝炎感染患者基因亚型分布情况

Table 1 The genotype distributions of HBV patients in Hechi area

性别	n	B 基因型	C 基因型	非 B/C 基因型
男	96	51	43	2
女	58	32	25	1
总数	154	83	68	3
χ^2			0.075	
P 值			0.963	

的相关性。与 B 型 HBV 感染患者相比,河池地区的 C 型 HBV 感染的患者,HBV DNA 定量检测结果均值更高。

2.3 基因分型与乙型肝炎 E 抗原定量检测分析

对 B 型和 C 型乙型肝炎 E 抗原定量检测结果进行统计分析,结果表明,与 B 型 HBV 感染患者相比,C 型 HBV 感染患者的乙型肝炎 E 抗原检测值 ≥ 0.1 PEIU/mL 为主(根据测试试剂盒的标准),差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 B 型和 C 型 HBV 感染患者乙型肝炎 E 抗原定量结果

Table 2 The effect of genotypes B and C HBV in quantitative detection of E antigen

分型	n	HBV E 抗原定量检测结果	
		< 0.1 PEIU/mL	≥ 0.1 PEIU/mL
B 型	83	7	76
C 型	68	0	68
χ^2		6.014	
P 值		0.017	

3 讨论

乙型病毒性肝炎是由 HBV 引起的,以肝脏炎性病变为主。广泛流行于世界各国,部分患者可转化为肝硬化或肝癌。因此,它已成为严重威胁人类健康的世界性疾病,也是我国当前流行最为广泛、危害性最严重的一种疾病。在不同的地区,乙型肝炎病毒基因亚型的分布也不同,在不同人种中的流行及传播方式同样存在很大差异,除了和生活习惯、人体免疫遗传特征等因素明显相关外,与乙型肝炎病毒本身的生物学基因型和基因变异等也呈一定程度的相关性^[7]。我国乙型肝炎病毒以 A、B、C、D 4 种 HBV 基因亚型为主,不同

地区的基因亚型存在较大的差异。北方地区以C型为主,约占86.6%^[8];南方地区则以B型为主,C型则占很小一部分^[9-10]。本次统计结果中,B型HBV感染占53.9%,C基因型68例,占44.16%。

不同基因型的乙型肝炎病毒具有不同的致病性及流行特征,故了解患者乙型肝炎病毒基因分型具有重要的临床意义。本研究结果表明,河池地区C型乙型肝炎病毒DNA定量测定值较B型高,表明该地区C型HBV DNA复制更加活跃。目前,乙型肝炎发病机制中乙型肝炎病毒的复制状态与其基因型之间的关系尚无定论,但乙型肝炎病毒诱导的免疫反应及血清中高拷贝的乙型肝炎病毒是其发病危险因素之一^[11]。文献报道,B型乙型肝炎病毒较C型乙型肝炎病毒更容易通过前C区变异诱导E抗原的转化,转归及预后较C型好^[12]。在本研究中,通过对154例患者乙型肝炎E抗原定量检测显示,C型乙型肝炎E抗原定量测定阳性均高于B型,C型乙型肝炎病毒复制较活跃,易形成持续的病毒血症,但不易发生E抗原的转化。研究表明,抗乙型肝炎病毒的药物疗法,尤其是干扰素治疗的临床疗效与HBV DNA的载量水平直接相关^[13-16]。HBV DNA载量低,则干扰素治疗疗效好;HBV DNA载量高,则干扰素治疗疗效差。

本研究统计分析2014年河池地区乙型肝炎病毒基因型的分布情况及与乙型肝炎病毒DNA定量、表面抗原各项指标的关系,对本地区乙型肝炎病毒各基因型的特点做了初步的研究,对进一步明确乙型肝炎病毒的分子流行病学特点、阐明发病机制和临床治疗的疗效等都具有重要意义。

参考文献

- [1] Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2):434-443.
- [2] Zhang Y, Li C, Zhang Y, et al. Comparative analysis of CpG islands among HBV genotypes [J]. *Plos One*, 2013, 8(2):e56711.
- [3] Farazmandfar T, Haghshenas MR, Janbabai G, et al. A rapid and reliable genotyping method for hepatitis B virus genotypes (A-H) using type-specific primers [J]. *J Virol Methods*, 2012, 181(1):114-116.
- [4] 胡金华,程书权,唐振祥,等.不同基因型HBV感染的慢性乙型肝炎患者临床与病理改变研究[J].*重庆医科大学学报*, 2012, 37(4):355-359.
- [5] 赖翼,张帅,徐锐,等.HBV基因型与中国人临床表现相关性研究[J].*成都医学院学报*, 2013, 8(1):39-42.
- [6] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].*中华肝脏病杂志*, 2011, 27(1):13-24.
- [7] 陈钦艳.乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展[J].*预防医学论坛*, 2014, 20(1):47-49.
- [8] 阎纳新,霍建峰,芦飞,等.石家庄地区乙型肝炎病毒基因分型及P区耐药基因突变分[J].*中国医院药学杂志*, 2015, 35(4):336-339.
- [9] 李雅娟,庄辉,李杰,等.乙型肝炎病毒感染者病毒基因型和亚型分布及其临床意义[J].*中华肝脏病杂志*, 2005, 36(Pt 4):985-990.
- [10] 沈哲式,李香善,张英哲,等.延边地区341例慢性丙型肝炎病毒基因分型的检测临床观察[J].*延边大学医学学报*, 2015, 38(4):313-314.
- [11] 冯体玉,曾东梅.梅州地区乙型肝炎病毒基因分型与临床指标的关系[J].*国际检验医学杂志*, 2013, 34(15):31-33.
- [12] 张勇,石铭,蔡盛麟,等.乙型肝炎病毒携带者病毒基因型与C基因启动子及前C区变异的相关性分析[J].*中国实验诊断学*, 2010, 14(6):929-930.
- [13] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection [J]. *Virology*, 2015, 6822(15):77-82.
- [14] 董淦功.α-干扰素治疗慢性丙型肝炎合并糖尿病患者预后的研究[J].*中国实用医药*, 2015, 10(4):153-154.
- [15] 庄权权,林志航,蒋燕成,等.慢性乙型肝炎病毒感染患者血清免疫调节因子检测的临床意义[J].*中华医院感染学杂志*, 2016, 26(1):1-3.
- [16] 李龙,吴长会,韦嘉.白细胞介素28B基因多态性与乙型肝炎的相关性研究进展[J].*临床肝胆病杂志*, 2015, 11(11):1916-1920.

· 论 著 ·

玉林 437 例高危型人乳头瘤病毒感染与宫颈上皮内瘤变的分析

李继慧* 黎华辉

[摘要] **目的** 调查玉林地区妇女生殖道高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染与宫颈上皮内瘤病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的关系。 **方法** 应用导流杂交基因芯片技术(HybriMax),对妇科门诊就诊的3 317例有性生活史的妇女,采集宫颈脱落细胞进行HPV分型检测,对检查HPV高危型别阳性者进行宫颈活组织检查。 **结果** 自2014年7月至2015年6月期间,共检测我院就诊病例3 317例,检出高危型HPV感染者694例,阳性率为20.92%。对437例进行宫颈活组织检查,CIN 26例,占5.95%(26/437),其中CIN II~III 12例,占2.74%(12/437)。 **结论** 玉林地区妇女高危型HPV感染率及高危型HPV感染者宫颈病变检出率均较高,本地区妇女宫颈上皮内瘤病变常见的高危型HPV类型为HPV16、52、58、18、33。

[关键词] 人乳头瘤病毒;宫颈上皮内瘤病变;导流杂交分型技术

Investigation of cervical intraepithelial neoplasia in 437 high - risk human papilloma virus infected patients from Yulin

Li Jihui*, Li Huahui

(Yulin Maternal and Child Care Service Center, Yulin, Guangxi, China, 537000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationships between women high-risk human papilloma virus (HPV) infection and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in Yulin. **Methods** A total of 3 317 outpatient women with sexual histories were checked for HPV genotyping via DNA flow-through hybridization genotyping technique (HybriMax), and then cervical biopsy had was performed among the women with high-risk HPV infection. **Results** 694 high-risk HPV infections were detected out of 3 317 patients from July 2014 to June 2015, and the positive HPV rate was 20.92%. The cervical biopsy was performed on 437 patients and the proportion of CIN was 5.95% (26/437), including 12 patients with CIN II ~ III (2.74%). **Conclusion** The rate of high-risk HPV infection and proportion of CIN among high-risk HPV infector were higher, and general types of high-risk HPV were HPV16, 52, 58, 18, 33 in Yulin district.

[KEY WORDS] Human papilloma virus; Cervical intraepithelial neoplasia; HybriMax

宫颈癌是世界范围内最常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率在发展中国家尤为明显。已有明确的证据证明,持续的高危型别人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是宫颈癌发生及进展的最主要因素^[1]。目前,根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的数据显示,至

少有13种高危型别的HPV可以导致宫颈癌^[2]。相比其它类型癌症,宫颈癌的筛查具有极高的有效性。目前为止,全世界仍然有超过50万女性受到宫颈癌的危害。在发展中国家,宫颈癌仍然是最为常见的发病率和死亡率较高的妇科恶性肿瘤之一^[3]。因此,针对女性宫颈癌的预防、筛查及监

作者单位:玉林市妇幼保健院,广西,玉林 537000

*通讯作者:李继慧, E-mail:ljhhlc@126.com

控工作就显得尤为关键。然而,值得关注的是经济文化较为落后的地区以及农村人口中由宫颈癌引起的高死亡率尤为突出,所以将宫颈癌筛查的研究立足于偏远地区人群就显示出极为重要的作用^[3-4]。为了解本地区妇女高危型 HPV 感染与宫颈上皮内瘤变的相关性,我们应用导流杂交基因芯片技术(HybriMax),针对妇科门诊就诊妇女进行了 HPV 感染分型的检测,共 3 317 例,并将高危型 HPV 感染者进行宫颈活组织检查。通过筛查分析不同高危 HPV 型别的危害性,进一步指导玉林地区 HPV 检测及宫颈癌筛查的临床检测及诊断。现将结果整理报道如下。

1 材料方法

1.1 临床样本

样本选取自 2014 年 7 月至 2015 年 6 月期间,医院妇科门诊就诊有性生活史的妇女共计 3 317 例,年龄 19~63 岁,平均年龄 40.9 岁,自愿接受 HPV 基因分型检测。6 个月后对 HPV 高危型别阳性者进行回访,其中 437 名妇女愿意接受在阴道镜下定点取宫颈活体组织进行病理学检查,以确定宫颈上皮内瘤病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的程度,并对 CIN 阳性患者再次进行 HPV 基因检测。

1.2 HPV 基因分型检测

1.2.1 仪器与试剂

HybriMax 医用核酸分子快速杂交仪 HHM-2 型(潮州凯普生物科技股份有限公司)、人类乳头瘤状病毒基因分型检测试剂盒(HPV-21 分型检测)(潮州凯普生物化学股份有限公司);DNA 扩增仪(Life Express)(杭州博日科技有限公司)。

1.2.2 样本采集

窥器暴露宫颈,使用无菌棉签擦去宫颈口分泌物,利用潮州凯普生物化学有限公司提供的专用毛刷于宫颈鳞柱状交界处旋转 3~5 圈,取得宫颈管脱落细胞,将取有标本的毛刷放置于对应标号的专用的细胞保存液试管中,4℃保存,2 周内完成检测。

1.2.3 检测方法

提取样本 DNA 后,进行 PCR 扩增,利用核酸分子快速导流杂交技术,使目的产物定向地穿过固定有特异标记探针的低密度基因芯片薄膜上,从而发生快速杂交,通过标记显色,根据芯片上 HPV 分型分布相应点进行判断其感染亚型。实验

同时检测 21 种 HPV 基因型,其中 13 种高危型(high-risk types, HR-HPV),包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68,5 种低危型(low-risk types, LR-HPV),包括 6、11、42、43、44 及 3 种中国人群常见亚型(53、66、CP8304)。具体操作步骤按试剂盒及仪器使用说明进行。

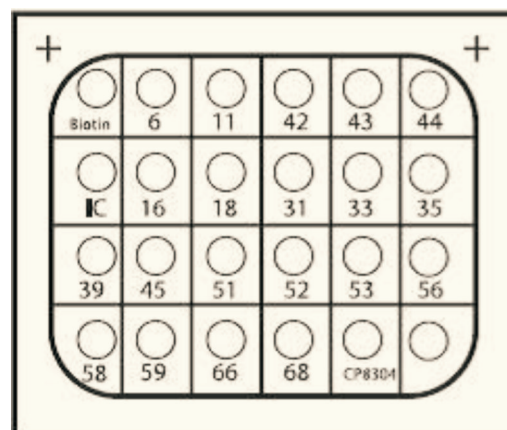
1.3 统计学方法

本报道应用 SPSS 17.0 统计软件,采用 χ^2 检验对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 HPV 亚型的感染情况

利用低密度芯片(图 1)快速导流杂交的方法,本报道 3 317 例样本中,HPV 阳性率为 26.89%(892/3 317),其中高危型 HPV 阳性率为 20.92%(694/3 317)。高危型 HPV 各亚型检出情况,见表 1。



21 种 HPV 型别分布,数字表示不同 HPV 型别,Biotin 表示生物素点,作为杂交实验过程质控点,IC 表示内标,防止假阴性

图 1 低密度基因杂交芯片

Figure 1 Low density hybridization gene chip

上述 HPV 高危型别阳性病例中,有 437 例高危型别回访患者进行了病理学检查及 HPV 核酸检测,其中 CIN 阳性病例共 26 例,CIN 发生率为 5.95%(26/437),其中 CIN II~III 发生率为 2.74%(12/437)。同时,CIN I 的 HPV 阳性感染率为 35.71%(5/14),CIN II~III 的 HPV 阳性感染率为 83.33%(10/12),见表 2。有宫颈上皮内瘤变的病例检出的前 6 种高危型 HPV 基因型为 52、16、58、18、68、33。利用 R×C 列联表分析(表 3),采用 χ^2 检验对数据进行统计分析,结果显示 $P=0.02$,即 CIN 与高危型 HPV 感染密切相关。

表1 高危型 HPV 各亚型检出分布

Table 1 Distribution of high-risk HPV detection

HPV 亚型	总数[n(%)]	单独感染	合并感染
52	182(5.49)	144	38
16	151(4.55)	117	34
58	101(3.04)	76	25
18	53(1.60)	41	12
68	45(1.36)	22	23
33	39(1.18)	26	13
66	32(0.96)	28	4
39	23(0.69)	16	7
31	21(0.63)	16	5
56	18(0.54)	14	4
59	12(0.36)	7	5
35	9(0.27)	6	3
51	8(0.24)	5	3
合计	694(20.91)	518	176

表中 HPV 亚型按检出率降序排序

表2 26例宫颈上皮内瘤变病例 HPV 感染分布

Table 2 Distribution of HPV infection in 26 patients with CIN

宫颈上皮内瘤变情况	HPV 阳性例数	HPV 阴性例数	合计
CIN I	5	9	14
CIN II~CIN III	10	2	12
合计	15	11	26

表3 χ^2 检验统计分析

Table 3 χ^2 test statistics analysis

组别	实际频数				理论频数	
	有效	无效	合计	有效率	有效	无效
A	5	9	14	0.357 143	8.076 923	5.923 077
B	10	2	12	0.833 333	6.923 077	5.076 923
合计	15	11	26	0.576 923	15	11

利用 Fisher 确切概率率算法及查表可知:卡方=6.00,校正卡方=4.21, $P=0.02$

2.2 HPV 复合感染情况

在本次调查中, HPV 复合感染(一个人同时感染 2 个或以上的型别,可以是同时感染高危型,也

可以是高低危型别同时感染),高危型多重感染占 HPV 阳性妇女的 19.73%(176/892),占被筛查妇女的 5.31%。在合并感染中,常见的复合感染类型有 HPV52、16、58、68、18、33 之间的复合感染及与其它亚型的复合感染(表 1)。

2.3 高危型 HPV 感染与年龄的关系

本次调查对象的年龄分布为 19~63 岁,高危型 HPV 感染率在 35 岁以下及 45 岁以上妇女中较高,分别为 23.63%和 21.53%,高危型 HPV 阳性率在 19~35 岁、36~45 岁以及 46~63 岁年龄组间比较,见表 4。

表4 高危型 HPV 感染在不同年龄段妇女中的分布

Table 4 Distribution of high-risk HPV infection in different age periods

年龄组	检查人数	阳性数	阳性率(%)
19~35 岁	1 189	281	23.63
36~45 岁	1 264	227	17.96
46~63 岁	864	186	21.53
合计	3 317	694	20.92

3 讨论

越来越多的证据已经证明,持续的高危型 HPV 感染会导致恶性宫颈癌的发生^[1]。因此, HPV 检测是宫颈癌筛查中必不可少的关键环节。然而,在我国开展的宫颈癌筛查数据显示,宫颈病变的患病率在 2.5%~5.9%,表明在中国宫颈病变仍然是严重的生殖健康问题^[4-13]。根据我国 2015 年公布数据显示,全国约有 2 814 000 例死于癌症,其中女性 1 004 400 例,约占总死亡病例 36%。女性宫颈癌发病人数为 98 900 例,占女性癌症发病总人数 5.6%,死亡病例 30 500 例,占女性癌症死亡总人数 0.3%^[4]。从横向的不同地理区域进行分析,华北地区女性宫颈癌发病人数为 16 700 例,死亡人数 6 100 例,死亡率约 36%;东北地区发病人数 10 500 例,死亡人数 2 400 例,死亡率约 23%;华东地区发病人数 27 600 例,死亡人数 6 700 例,死亡率约 24%;华中地区发病人数 17 400 例,死亡人数 4 100 例,死亡率约 24%;华南地区发病人数 8 100 例,死亡人数 2 300 例,死亡率约 28%;西南地区发病人数 11 300 例,死亡人数 6 200 例,死亡率约

55%;西北地区发病人数7 300例,死亡人数2 600例,死亡率约36%。从纵向的不同行政区域来分析,城镇地区宫颈癌发病人数为53 200例,死亡人数13 600例,死亡率约26%;农村地区为45 700例,死亡人数16 900例,死亡率约40%^[4]。以上数据指出,城镇地区宫颈癌发病率明显高于农村人口,但死亡率则显著低于农村地区。然而,值得关注的是经济文化较为落后的西南地区以及农村人口中由宫颈癌引起的高死亡率尤为突出,所以将宫颈癌筛查的研究立足于农村人群就显示出极为重要的作用。

过去的研究指出,HPV16与HPV18型别感染在宫颈癌患者中最常见^[1-3]。最近的研究则发现,引起宫颈病变包括宫颈癌的高危HPV感染型别在不同地区之间有所差异^[7-8]。有文献指出,相较于HPV16与18型别的感染,在亚洲国家HPV52与58型别感染更常见,在上海有42%的宫颈癌标本存在HPV52与58型别感染^[8]。另一个来自北京的多中心研究中报道,HPV16、58、33、56及31型别感染在宫颈病变中最常见^[11]。一份对广东省潮州市13 750例女性进行HPV筛查的研究发现,感染型别按感染率高低依次为HPV52、16、58、68及33,感染率分别为28%、15%、11%、8%及7%^[7]。在华东区域的研究中显示,HPV16、58、33、52及66在CIN I患者中检出率最高。而在中国西南地区,HPV16、58、18、52及33型别的感染在宫颈癌病例中最普遍^[6]。综上,可以明显发现HPV16和18等型别为中国最常见的高危HPV感染型别。此外,越来越多的研究也表明,中国高危HPV感染分布具有明显的区域性,与生活习惯、年龄、文化水平等因素紧密相关。

本报道中,玉林地区3 317例妇女中宫颈高危型HPV感染率为20.92%,与广东地区20.3%的水平^[14]基本一致,略低于广西其他地区23.78%^[15]。本报道中高危型HPV阳性标本中,病理学诊断CIN II~III检出率为2.74%,相较北京地区2.19%的水平明显增高^[16]。HPV52、16和58型是玉林地区人群最主要的3个高危型HPV亚型,其高危型HPV阳性人群中的百分率依次为5.49%、4.55%和3.04%,其次是18型1.60%、68型1.36%,33型1.18%。此外,高危型别HPV感染与宫颈上皮内瘤变,特别是CIN II及以上呈高度相关,此结果与以往报道基本一致^[7-15](表2)。有宫颈上皮内瘤的病

例检出的前3种高危型HPV基因型为52、16、58,应重视这些感染型别的防治。

本次调查发现高危型HPV阳性人群中176例发生多重感染,高危型多重感染占HPV阳性妇女的19.73%。有报道人群中多种HPV复合感染占总HPV感染人数的20%~30%,和单个HPV感染相比,增加了发生癌前病变的风险^[17]。多种HPV复合感染可以是同时感染不同的HPV类型,也有可能是多次感染导致^[17]。

综上所述,玉林地区高危型HPV检出率相比发达地区明显较高,需要增强科普妇女健康意识与宫颈癌筛查的重要性。其次,感染型别分布与国内其它地区明显不同,其中52、58型别检出率较高,需要对上述型别加以重视与防治。

参考文献

- [1] Arbyn M, Castellsague X, de Sanjose S, et al. World-wide burden of cervical cancer in 2008 [J]. *Annu Oncol*, 2011, 22(12):2675-2686.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Banerjee J, Mishra N, Dhas Y. Metagenomics: A new horizon in cancer research [J]. *Meta Gene*, 2015, 5:84-89.
- [4] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer Statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [5] 王玉丰,林玲,刘春雨,等. 三亚地区妇女人乳头瘤病毒感染的分子流行病学调查[J]. *检验医学*, 2012, 27(8):628-630.
- [6] 孙晔. 586例宫颈疾病患者HPV检测结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(12):1777-1779.
- [7] 李智敏,罗喜平,毛玲芝,等. 广东省潮州市13750例妇女宫颈人乳头瘤病毒感染状况及基因型分析[J]. *中华妇幼临床医学杂志*, 2012, 8(4):357-360.
- [8] Zhang R, Shi TY, Ren Y, et al. Risk factors for human papillomavirus infection in Shanghai suburbs: A population-based study with 10000 women[J]. *J Clin Virol*, 2013, 58(1):144-148.
- [9] Hou R, Xu CY, Zhang SW, et al. Distribution of human papillomavirus genotype and cervical neoplasia among women with abnormal cytology in Beijing, China [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2012, 119(3): 257-261.

(下转第340页)

· 论 著 ·

11 530 例佛山市妊娠晚期妇女 B 族链球菌感染情况的回顾性分析

庄锡伟* 孟霞 杨康 梁伟达

[摘要] **目的** 回顾性分析佛山市妊娠晚期妇女感染 B 族链球菌 (group B streptococcus, GBS) 的相关因素, 为孕妇人群做好 GBS 早期干预治疗提供依据。 **方法** 选取 2015 年我院 11 530 名进行常规产检的妊娠晚期妇女, 采集阴道分泌物标本 11 530 份, 直肠分泌物标本 11 427 份, 采用聚合酶链反应方法测定阴道和直肠分泌物标本中 GBS 特定基因 (CAMP) 以此作为判定 GBS 阳性的标准, 并对检品的来源、检体年龄、检品收集时间等进行回顾性分析, 以评价妊娠晚期 GBS 感染情况。 **结果** 不同标本阳性检出率结果显示, 11 530 份阴道分泌物标本中, GBS 阳性的有 818 例, 阳性率为 7.09%, 11 427 份直肠分泌物标本中, GBS 阳性的有 832 份, 阳性率为 7.28%, 两者阳性检出率无显著性差异 ($P>0.05$); 阴道和直肠分泌物联合检查与单独检查阳性率结果显示, 联合检查的 11 427 份标本中, GBS 阳性标本 1 160 份 (直肠与阴道分泌物同时阳性 482 份, 直肠或阴道分泌物单独阳性 678 份), 阳性率为 10.15%, 与阴道或直肠分泌物单独检查比较有统计学差异 ($P<0.01$)。不同年龄的标本阳性率结果显示, 35~39 岁年龄组的标本阳性率最高, 与其他比较, 差异无显著性 ($P>0.05$)。不同季节检查的标本阳性率结果显示, 夏季收集的标本阳性检出率略高于其他季节, 但各季节间比较无显著差异 ($P>0.05$)。 **结论** 孕妇年龄、标本采集季节因素对妊娠晚期孕妇 GBS 阳性率影响不大, 阴道分泌物和直肠分泌物联合检查更有利于临床及时的诊治。

[关键词] B 族链球菌; 妊娠晚期; 回顾性分析; GBS 检查

Retrospective analysis of 11 530 cases of group B streptococcus infection in the late pregnancy women in Foshan

ZHUANG Xiwei, MENG xia, YANG Kang, LIANG Weida

(Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Foshan Chancheng District, Foshan, Guangdong, China, 528031)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the related factors of group B streptococcus (GBS) infection, and to provide evidence for early intervention treatment of GBS in late pregnancy women in Foshan. **Methods** The samples were obtained from 11 530 vaginal secretions and 11 427 rectal secretions. Polymerase chain reaction method was used to detect the GBS specific gene (CAMP) to diagnose GBS infection in 11 530 women in the third trimester in our hospital in 2015. A retrospective analysis was made on the origin of the samples, the age of the pregnant women and the seasons, to evaluate the GBS infection in the third trimester of pregnancy. **Results** The positive rate of different samples had no significant differences ($P>0.05$), vaginal secretion samples were 7.09% (818/11 530), and rectal secretion samples were 7.28% (832/11 427). Vaginal and rectal secretions joint examination positive rate was 10.15%, higher than either the vaginal or rectal secretions when they were individually examined ($P<0.01$). The positive rate of samples of different ages showed that the positive rate of samples from 35 to 39 years old was the highest, and there were no significant differences ($P>$

作者单位: 佛山市禅城区中心医院检验科, 广东, 佛山 528031

*通讯作者: 庄锡伟, E-mail: zhuang821007@163.com

0.05). The positive rate of sample examination in different seasons showed that summer samples positive rate is slightly higher than other seasons, but the seasons were not significantly different ($P>0.05$). **Conclusion** The age of pregnant women and seasonal factors have little effect on the positive rate of GBS in pregnant women. The combined examination of vaginal and rectal secretions is more favorable for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] Group B streptococcus; Late pregnancy; Retrospective analysis; GBS examination

B族链球菌(group B streptococci, GBS)又称无乳链球菌,属于链球菌属B血清群,为妇女生殖道常见的兼性厌氧菌,感染率达15%~35%,常与念珠菌感染共存,属于条件致病菌,是宫内感染的主要原因^[1-2]。感染率随人种、地域、年龄等的差异而不同,孕妇、新生儿发病率高^[3-5]。新生儿感染GBS可引起新生儿败血症、肺炎等严重疾病,孕妇感染时可引起早产、流产、胎儿发育不良、胎膜早破、绒毛膜羊膜炎及产后子宫内膜炎等^[6],本研究对我院11 530名妊娠晚期妇女的11 530份阴道分泌物和11 427份直肠分泌物标本GBS检验结果进行回顾性分析,为孕妇人群做好GBS早期干预治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

检测试剂盒由泰普生物科学(中国)有限公司提供,目的基因来自美国菌种保藏中心的原始菌株,主要组成成分为反应液(探针、引物、dNTP等)、Taq DNA Polymerase、提取固形物、内参照、清洗液、阴性对照、阳性对照;仪器为美国ABI 7300荧光定量PCR仪。

1.2 方法

1.2.1 研究对象

选取2015年我院11 530名进行常规产检的妊娠晚期妇女(孕34~37周),年龄为15~49岁,平均年龄27.94岁,共收集到11 530份阴道分泌物和11 427份直肠分泌物标本。

1.2.2 标本采集

由资深医师用无菌拭子自受检者生殖道部位1/3处沿壁旋转取得阴道分泌物样本,自肛门括约肌以上约2~5 cm处沿肠壁轻轻旋转取得直肠分泌物;要求受检者取样前1周内未使用任何抗生素,取样部位未使用过栓剂和洗液,取样时不得使用石蜡油。

1.2.3 检验方法

采用荧光定量PCR法,通过聚合酶链式扩增

及荧光标记探针,检测GBS特定基因(*CAMP*),从而判断GBS的存在。严格按照试剂盒说明书进行操作,GBS检测荧光素为FAM,内参照荧光素为Texas Red,反应体积50 μ L,循环参数:37℃ 2 min; 94℃ 2 min; 94℃ 20 s~55℃ 45 s, 10个循环; 94℃ 20 s~55℃ 45 s, 30个循环,收集荧光信号。

1.2.4 结果判断

样本(FAM)Ct值 ≤ 23 ,且有较好的对数增长曲线,判读为阳性;样本(FAM)Ct值 ≥ 30 或“Undet”,内参照(Texas Red)Ct值 < 30 ,且有较好的对数增长曲线,判读为阴性。样本(FAM)23<Ct值 < 30 ,复查或重新采样检测。

1.3 结果分析

采用SPSS 19.0进行统计学分析,采用 χ^2 检验比较各组间样本阳性率差异, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年龄孕妇GBS阳性率比较

妊娠晚期妇女各年龄组GBS阳性率结果显示,35~39岁组最高,与其他组比较差异无显著性($P>0.05$),结果见表1。

2.2 不同季节检查的阳性率比较

在不同季节检查GBS的阳性率结果显示,夏季检出的阳性率最高,秋季的最低各季节组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表2。

2.3 不同标本检查的阳性率比较

11 530例妊娠晚期妇女收集的标本结果显示,阴道分泌物标本11 530份,GBS阳性的标本818份,阳性率为7.09%;直肠分泌物标本11 427份,GBS阳性的标本832份,阳性率为7.28%;两者比较差异无统计学意义(χ^2 值=0.27, $P=0.60$)。

2.4 联合检查与单独检查的阳性率比较

参与检查的孕妇为11 530人中有11 427人同时检查直肠分泌物及阴道分泌物,阳性1 160人

表1 各年龄段妊娠晚期妇女阳性率比较

Table 1 Comparison of positive rate of pregnant women in different age groups

年龄	n	阴道分泌物					直肠分泌物				
		检查例数	阳性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P值	检查例数	阳性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P值
≤24	5 120	2 587	169	6.53	2.80	0.09	2 533	182	7.19	1.77	0.18
25~29	10 501	5 251	377	7.18	1.15	0.28	5 250	380	7.24	1.95	0.16
30~34	5 116	2 568	184	7.17	0.99	0.32	2 548	181	7.10	2.10	0.16
35~39	1 852	935	77	8.24			917	79	8.62		
≥40	368	189	11	5.82	1.36	0.24	179	10	5.59	1.46	0.23
合计	22 957	11 530	818	7.09			11 427	832	7.28		

χ^2 值、P值表示该年龄组与35~39岁组比较的结果

表2 不同季节检查阳性率比较

Table 2 Comparison of positive rates in different seasons

季节	n	阴道分泌物					直肠分泌物				
		检查例数	阳性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P值	检查例数	阳性例数	阳性率(%)	χ^2 值	P值
春季(3月~5月)	4 589	2 336	162	6.93	0.78	0.37	2 253	164	7.28	0.36	0.55
夏季(6月~8月)	5 787	2 902	221	7.62			2 885	224	7.76		
秋季(9月~11月)	7 052	3 527	238	6.75	1.68	0.19	3 525	243	6.89	1.65	0.20
冬季(12月~2月)	5 529	2 765	197	7.12	0.43	0.51	2 764	201	7.27	0.42	0.52
合计	22 957	11 530	818	7.09			11 427	832	7.28		

χ^2 值、P值表示该季节组与夏季组比较的结果

(直肠与阴道分泌物同时阳性 482 人,直肠分泌物单独阳性 350 人,阴道分泌物单独阳性 328 人),阳性率 10.15%,与单独检查直肠或阴道分泌物组比较,有统计学差异($\chi^2=58.80$, $\chi^2=67.72$, $P<0.01$)。

3 讨论

GBS 已经被证实为围产期母婴感染的主要致病菌之一^[7-8],染菌孕妇易发生围生期严重的感染性疾病,且易导致早产、胎儿发育不良、体重轻、胎膜早破、晚期流产、宫内感染及产褥感染等疾病发生,是独立存在的绒毛膜羊膜炎的危险因素,危险性与生殖道染菌程度呈正比。GBS 阳性可引起产妇产后子宫内膜炎、盆腔炎乃至败血症的发生率明显升高。新生儿可通过垂直感染引发肺炎和败血症等急性感染性疾病,且预后较差。因此,有必要将 GBS 筛查纳入妊娠晚期孕妇的常规检验项目,对阳性患者采取积极有效的治疗措施,通过良好的 GBS 管理^[9],有效降低孕妇的感染率,降低早产、宫内感染等产前不良事件发生。通过筛查可

对阳性孕妇的新生儿出生后由新生儿科提早介入,采取主动观察追踪措施,有效降低新生儿急性感染所造成的严重不良后果。

本研究结果显示,35~39 岁受检者阳性率最高(直肠分泌物阳性率 8.62%,阴道分泌物 8.24%),40 岁以上受检者中阳性率最低(直肠分泌物阳性率 5.59%,阴道分泌物 5.82%),结果与黄晓玲等^[10]研究结果一致,这可能与雌激素水平、性活动频次有关;季节对 GBS 的阳性率影响不大,提示 GBS 感染无季节性差异;直肠分泌物标本阳性率稍高于阴道分泌物标本,但两者无统计学差异,提示采样部位对 GBS 阳性率影响不大,GBS 的检出率受到多种因素的影响,例如取材部位、检测方法等,因此有学者建议,应从宫颈、阴道及肛周等多个部位同时取材^[13],本研究结果表明联合检验直肠分泌物及阴道分泌物标本阳性检出率明显高于单独检验直肠分泌物或阴道分泌物标本,提示联合检查在指示临床干预方面优于单项检查。

妊娠妇女 GBS 阳性率在国外不同地区的报道差异很大,如美国为 2.0%~29.0%,韩国为 13.0%^[11]。我国目前孕妇 GBS 检查目前在大部分地区暂未作为常规检查,未见大标本量的流行病学资料报道。GBS 的检验方法有细菌培养、抗原抗体测定、核酸探针检测、荧光原位杂交法、PCR 及革兰染色法等,细菌培养是最经典的检验方法,但检验时间长,操作繁琐,抗原抗体测定虽然快速,但有很高的假阴性率和假阳性率;核酸探针检测、荧光原位杂交法、PCR 等分子生物学检验方法敏感性高,检测时间短,结果准确,特别是荧光定量 PCR 方法已被认为是检测 GBS 的快速、准确性高、敏感性高的方法之一。本研究采用聚合酶链式反应方法,灵敏度高,特异性强,结果显示,佛山市妊娠晚期妇女 GBS 阳性率为 10.15%,明显低于北京,高于秦皇岛、桂林、上海、南京、中山等地^[10,12-16]。

PCR 方法具有快速检测,灵敏度高,特异性强等特点,杨坤祥等^[17]研究表明,荧光 PCR 法的阳性检出率明显高于传统的细菌培养法及显色培养法,同时采用阴道及直肠分泌物标本联合检验方法,明显提高筛查阳性检出率,避免漏诊,可作为妊娠晚期 GBS 筛查检验方法进行推广,为临床早期进行治疗,预防胎膜早破、早产、晚期先兆流产治疗依据,降低不良妊娠发生率,通过加强阳性孕妇新生儿的观察追踪,预防败血症、脑膜炎及肺炎的发生,降低新生儿死亡率。

参考文献

- [1] Revised guidelines from CDC. Prevention of perinatal group B streptococcal disease [R]. MMWR, 2010, 59 (10):1-32.
- [2] 马丹娟,邓文喻,黄瑞玉,等.围产期孕产妇生殖道感染菌群分布及 B 族链球菌的定植分析[J].中国妇幼保健,2016,31(3):565-567.
- [3] 张扬. B 族链球菌对产妇及新生儿的影响概述[J].世界最新医学,2016,15(54):32.
- [4] 刘荃,汤晓忠,韦芳琴.妊娠晚期 B 族链球菌携带对妊娠结局的影响[J].中国妇幼保健,2014,29(21):3411-3413.
- [5] 吴红娟,杨爱婷,黄梅霞.孕妇 B 族溶血性链球菌感染对母婴的影响[J].中国实用医药,2015,10(36):18-19.
- [6] 贺晶,韩秀君. B 族链球菌感染的母婴传播及其预后[J].中国实用妇科与产科杂志,2005,21(6):343-345.
- [7] 黄树峰,朱艳宾,薛凤霞.孕晚期女性感染 B 族链球菌对新生儿影响的研究[J].中国妇幼保健,2014,29(21):3415-3417.
- [8] 陈红波,孟祥莲,王谢桐.围生期 B 族链球菌感染的研究现状[J].现代妇产科进展,2015,24(2):149-151.
- [9] Mukhopadhyay S, Dukhovny D, Mao W, et al. 2010 perinatal GBS prevention guideline and resource utilization[J]. Pediatrics, 2014, 133(2):196-203.
- [10] 黄晓玲,何艳君,林云霞,中山市妊娠晚期妇女 B 族链球菌带菌情况调查[J].实用医学杂志,2015,31(17):2905-2906.
- [11] Park JS, Cho DH, Yang JH, et al. Usefulness of arapid real-time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization [J]. Ann Lab Med, 2013, 33(1):39-44.
- [12] 马延敏,吴连方,黄醒华,等.孕妇 B 族溶血性链球菌带菌与母婴预后的关系[J].中华妇产科杂志,2000,35(1):32-35.
- [13] 孙丹华,王李利,张磊,等.妊娠 35~37 周孕妇 B 族链球菌与妊娠结局[J].中国妇产科临床杂志,2013,14(4):312-314.
- [14] 季修庆,陆根生,胡平,等.荧光定量 PCR 检测南京地区孕晚期妇女生殖道 B 族链球菌的带菌情况[J].检验医学,2014,29(6):628-630.
- [15] 陈慧慧,范建霞,陆庭嫣,等.孕妇 B 族溶血性链球菌感染对母婴的影响[J].上海医学,2009,32(2):128-133.
- [16] 何国才,白清,李高,等.桂林地区孕晚期孕妇 B 族链球菌检测及药敏分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(15):2006-2007.
- [17] 杨坤祥,王芬芳,钟泽艳.应用实时荧光定量 PCR 技术探讨 B 群链球菌与胎膜早破的关系[J].国际检验医学杂志,2016,37(10):1387-1388.

地中海贫血产前遗传筛查流程简化的风险评估

肖奇志 李恋湘 谢建红 李磊 王格 张婧惟 龙若庭 周玉球*

[摘要] 目的 评估全血细胞分析(full blood count, FBC)结合常见地中海贫血(简称地贫)基因检测(简称两步法)取代传统的FBC结合血红蛋白(hemoglobin, Hb)分析和地贫基因检测(简称三步法)用于地贫产前遗传筛查的可行性。方法 采用回顾性分析的方法,对近2年(2014年1月1日至2015年12月31日)珠海市产前门诊6 291名孕妇及其配偶FBC、Hb分析和地贫基因检测的结果采用 χ^2 检验进行统计学分析,比较两步法和三步法在产前地贫遗传筛查中的可靠性及经济性。结果 以经典的三步法作为标准,两步法对孕妇及其配偶地贫检测的灵敏度、特异性、阴性预测值和阳性预测值以及总的诊断效率分别为98.25%、99.52%、85.98%、88.12%、91.23%,两步法对血红蛋白H(hemoglobin H, Hb H)病、轻型 β -地贫、异常Hb和 $\delta\beta$ -地贫/遗传性持续性胎儿血红蛋白综合征(hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH)的漏检率分别为2.59%(2/77)、0.01%(2/1 695)、8.78%(13/148)和48.30%(43/89)。结论 产前地贫遗传筛查流程中采用三步法有其科学性,既可避免Hb H、异常Hb以及 $\delta\beta$ -地贫/HPFH等个体的漏检,还可为地贫DNA诊断指明方向。在未建立覆盖中国人异常Hb病基因谱的分子筛查技术之前,两步法暂不能取而代之。

[关键词] 地中海贫血;遗传筛查;表型-基因型;血红蛋白变异体

The risk assessment of prenatal genetic screening procedure simplified for thalassemias

XIAO Qizhi, LI Lianxiang, XIE Jianhong, LI Lei, WANG Ge, ZHANG Jingwei, LONG Ruoting, ZHOU Yuqiu*

(Zhuhai Institute of Medical Genetics & Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhuhai, Guangdong, China, 519001)

[ABSTRACT] Objectives To evaluate the feasibility of prenatal genetic screening for thalassemias by full blood cell analysis (full blood count, FBC) combined with thalassemia gene detection (hereinafter referred to as the two-step method) instead of the FBC combined with hemoglobin (Hb) analysis and thalassemia gene detection (hereinafter referred to as the three-step method). Methods The results of FBC and Hb analysis as well as molecular diagnosis of thalassemias of 6 291 pregnant women and their spouses from January 1, 2014 to December 31, 2015, at antenatal clinics of Zhuhai City were analyzed retrospectively by χ^2 test. The reliability and economic viability of the two-step method were compared with the three-step method of prenatal genetic screening for thalassemias. Results Taking the classic three-step method as a standard, the sensitivity, specificity, negative predictive value and positive predictive value, and accuracy of the two-step method were 98.25%, 99.52%, 85.98%, 88.12%, 91.23%, respectively. The rate of missed diagnosis of the two-step method to HbH disease, β -thalassemia trait, Hb variants and $\delta\beta$ thalassemia/hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) were 2.59% (2/77), 0.01% (2/1 695), 8.78% (13/148), and 48.30% (43/89) respectively. Conclusions Prenatal genetic screening process of thalassemia with three-step method has its advantages. It can avoid

基金项目:广东省科技计划项目(2009A030301002);珠海市卫生和计划生育局医学科研项目(2014062)

作者单位:珠海市妇幼保健院检验科&珠海市医学遗传研究所,广东,珠海519001

*通讯作者:周玉球, E-mail:zhzhouyq@126.com

failure of detection of not just HbH disease and Hb variants but also $\delta\beta$ -thalassemias/HPFH, and what's more point to clear direction for DNA diagnosis of thalassemias. The three-step method tentatively can't be replaced by the two-step method.

[KEY WORDS] Thalassemia; Genetic screening; Phenotype-genotype; Hemoglobin (Hb) variants

地中海贫血(简称地贫)是一组由于珠蛋白基因缺失或功能障碍导致珠蛋白链缺失或合成不足所引起的遗传性溶血性血液病,为中国南方各区的常见病和多发病^[1],严重类型地贫可致死或致残,该病易防难治,目前已成为热带和亚热带地区一个重大的公共卫生问题。为此,2013年2月珠海市启动了免费地贫干预项目并在具有地贫研究基础和人群预防控制经验^[2]的珠海市妇幼保健院建立了市级地贫筛查管理办公室和市级地贫诊断中心,负责协调、管理、督导全市产前地贫的遗传筛查、接收和检测珠海市其他36家医疗保健机构转送的初筛阳性标本[平均红细胞血红蛋白(mean corpuscular hemoglobin, MCH)小于27 pg或和平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)小于82 fL]并负责严重类型地贫高风险胎儿的产前诊断和跟踪随访。由于地贫遗传筛查的网点多且分散,临床实验室的水平又参差不齐,加之标本转运的环节多和时间长,经常出现送检标本发生溶血现象,严重影响血红蛋白(hemoglobin, Hb)分析的准确度。为此,本研究拟采用全血细胞计数(full blood count, FBC)结合地贫基因诊断(简称“二步法”)替代世界地贫联合会推荐的FBC结合Hb分析和地贫基因诊断^[3-4](简称“三步法”)以简化地贫遗传筛查技术流程,并以三步法作为标准,以评估其可行性和可能存在的技术风险。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集2014年1月1日至2015年12月31日珠海市37家产科服务机构送检的地中海贫血筛查标本共6 291对,排除了仅检测孕妇或配偶一方的未配对标本。所有标本均于抽血当天在全市37家产科服务医疗机构进行血细胞分析。夫妻双方中只要一方红细胞指数异常(MCV < 82 fL或和MCH < 27 pg)即纳入地贫初筛阳性夫妻,填写相关资料并将夫妻双方标本转运至珠海市地贫诊断中心进行统一检测。

1.2 血红蛋白分析

采用美国Bio-Rad生产的仪器、配套试剂和质

控品,按照说明书进行操作,并按照Hb各组分的洗脱时间初步进行异常血红蛋白的鉴定。

1.3 常见 α -地贫突变的检测

所有标本采用单管多重PCR法和反向点杂交法^[5]分别检测中国人4种常见的缺失型(--^{SEA}, - $\alpha^{4.2}$, - $\alpha^{3.7}$, --^{THAI})和3种非缺失型(α^{CS} , α^{QS} 和 α^{WS}) α -地贫突变。 α -地贫基因检测试剂盒分别由深圳益生堂生物企业有限公司和亚能生物技术(深圳)有限公司生产,严格按照其提供的使用说明书进行操作、质量控制和结果判断。PCR仪为Bio-Rad CFX96产品,分子杂交仪则由美国Robbin Scientific公司生产。

1.4 常见 β -地贫点突变的检测

采用反向点杂交法和探针熔解曲线法分别检测中国人常见的17种和23种 β -地贫突变^[6],试剂盒分别由深圳益生堂生物企业有限公司和厦门致善生物科技有限公司生产。所用设备同上。

1.5 少见类型地贫和异常血红蛋白基因检测

对于地贫表型阳性和/或有异常血红蛋白表型但未检出常见地贫型, $\delta\beta$ -地贫和遗传性持续性胎儿血红蛋白(hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH)综合症的孕妇及其配偶,则将其标本送至深圳华大基因公司做进一步DNA测序法以明确诊断。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。对于试验诊断评价指标,以三步法作为标准,分别计算二步法的灵敏度、特异度、阴性预测值和阳性预测值和总的诊断效率,并采用 χ^2 检验比较两组间各诊断指标之差异,以 $\alpha=0.05$ 为水准, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Hb分析的结果

从上述所送检的标本中,Hb分析检测阳性特征性结果中有:快泳带;慢泳带;血红蛋白A₂(Hb A₂) $\geq 3.5\%$ (β -地贫特征);血红蛋白F(Hb F)升高($\geq 2.0\%$)等,分类详见表1。

表1 Hb 分析的结果
Table 1 The results of hemoglobin analysis

Hb 分析结果	性别		合计	占比(%)
	女性	男性		
疑为 α -地贫或正常(Hb A ₂ <3.5%和Hb F<2.0%)	5 178	5 469	10 647	84.62
疑为Hb H病(可见快泳带但Hb A ₂ <3.5%)	49(2)*	35(2)*	84	0.67
β -地贫特征(Hb A ₂ ≥3.5%)	977(11)*	720(7)*	1 697	13.49
中间型 β -地贫(Hb F≥30.0%)	1(1)	0	1	0.01
异常Hb病(可见慢泳带)	64(4)*	84(2)*	148	1.18
$\delta\beta$ 地贫和HPFH(Hb F≥2.0%但Hb A ₂ <3.5%)	62	27	89	0.70
合计	6 291	6 291	12 582	100.00

*括号内的数据为合并Hb F升高的人次

2.2 两步法与三步法检测结果的比较

由于检测和内容方式一样,二步法和三步法对于疑为 α -地贫特征和红细胞指数正常个体的诊断效率均完全相同,但在检测如下3类标本时,则

容易出现漏检:Hb变异体时(包括Hb快泳带和慢泳带);(Hb F≥2.0%但Hb A₂<3.5%)即表型为 $\delta\beta$ -地贫/HPFH和少见类型 β -地贫特征,具体结果详见表2。

表2 二步与三步检测法结果的比较
Table 2 The results of two-step method compared with that of three-step method

三步法检测	n	二步法检测结果		
		阳性	阴性	阳性率(%)
α -地贫基因携带者	3 841	3 841	0	100.00
Hb H病	77	75	2**	97.56
β -地贫基因携带者	1 697(156)*	1 695(156)*	2**	99.88
中间型 β -地贫	1	1	0	1/1
$\delta\beta$ -地贫或HPFH基因携带者	43	0	43	0
异常Hb基因携带者	11(135)*	0(135)*	11	0
未知地贫基因型	0/146***	0	146***	0

*括号内的数据合并地贫的人次;**为有相应表型,而基因型未知;***为有FBC异常而基因检测为阴性

2.3 两步法与三步法检测结果对筛出严重类型高风险胎儿的影响

在上述6 291对孕妇及配偶中,二步法和三步法均筛出146个 α -地贫高风险胎儿,但二步法只检出47个高风险重型 β -地贫胎儿中的46个(97.87%)($\chi^2=1.01$, $P=0.314$),二步法漏检了其中一对夫妻,其中一方为轻型 β -地贫,另一方为HbQ病,为稳妥起见,建议进行产前诊断。

2.4 两步法与三步检测法的成本和时间分析

两步法与三步法相比,省略了Hb分析这一步骤,需要对所有小红细胞症进行 α -和 β -地贫基因诊断,增加 β -地贫基因诊断数量,整体费用和耗时间详见表3。

3 讨论

产前筛查地贫一般遵循三步法原则:FBC是地贫初筛的第一关,Hb分析用于地贫表型初步分

表3 两步法与三步法筛查的总费用与耗费时间比较

Table 3 The total cost and time of two-step method compared with that of three-step method

	FBC(人次)	Hb 分析(人次)	α -地贫基因检测(人次)	β -地贫基因检测(人次)	总费用(%)	耗时比(%)
三步法	12 582	12 582	12 582	1 697	100.00	100.00
二步法	12 582	0	12 582	6 286	89.46	75.00

*以上总费用的计算参考当地物价收费标准

类和检测异常 Hb 区带[包括血红蛋白 H(Hb H)], 而地贫基因诊断是对 Hb 分析后的标本进行针对性地确定诊断或排除诊断, 这也是经典的遗传病诊断模式。地贫仅属于血红蛋白病的一种, 还包括异常 Hb 病和 $\delta\beta$ -地贫及 HPFH 等, 这些突变也影响血红蛋白的合成速率或质量, 其某些类型与地贫复合也可能造成比较严重的影响, 在临床实验室已经引起广泛关注^[1, 7]。

在产前地贫筛查中三步法与两步法的区别在于是否进行 Hb 分析, 它能定量分析 Hb A₂, Hb F, Hb H 和异常 Hb 等成分, 对进一步明确基因诊断方法, 确定表型有指示作用。从 12 582 份标本来看, 有阳性表征(FBC+Hb 分析)的占 58.89%(7 410/12 582), Hb 分析有特征性阳性表征占 16.04%(2 019/12 582), 它能鉴定的主要特征性有: β -地贫、Hb H 病、中间型 β -地贫、异常 Hb 病和 $\delta\beta$ -地贫/HPFH 特征, 各占比为 13.49%、0.67%、0.01%、1.18%和 0.70%。按两步法不进行 Hb 分析, 漏检 HbH 病中的一种少见或罕见突变, 漏检率为 2.44%; 漏检全部异常 Hb 病(包括单纯性 Hb 和合并地贫的异常 Hb); 漏检全部 HPFH 及 $\delta\beta$ -地贫; 上述 3 种表型漏检总和占比为 1.90%, 总漏检率较低。由于地贫基因型检测为相同方法和技术, 所以两步法与三步法差别在于漏检了 2 例 HbH 病中的一种少见或罕见突变和 2 例 β -地贫特征者, 导致最终判断不同。

在地贫遗传中夫妻双方同等重要, 所以漏检分情况来看: 如果漏检个体其配偶 FBC 正常, 也排除携带常见地贫突变类型, 即使有漏检情况发生, 不产生严重后果, 无需产前诊断, 在地贫防控中不影响效果, 本研究中占比为 93.33%; 如果漏检个体其配偶为地贫, 特别是 β -地贫, 考虑到胎儿有机会携带 β -地贫复合异常 Hb 病或复合 HPFH 及 $\delta\beta$ -地贫, 进行产前诊断较为稳妥, 在本次研究中占 6.67%。当然除血红蛋白 E(Hb E)外的其它异常血红蛋白病, 在中

国人群中的携带率很低, 绝大多数合并地贫后很少加重临床表现, 仅有一些个案报道^[8-9]。总的来说 2 种方式的防控效果基本一致。

需要注意的是: 无论是三步法还是二步法, 均无法对表 2 中的 146 例疑似 α -地贫标本进行突变的有效检出, 在排除缺铁性贫血等其它导致小细胞低色素疾病的情况下, 对存在地贫表型的标本进行更进一步检测, 特别是夫妻一方为已知地贫, 另一方有小细胞低色素症但未检测出已知突变, 更要特别留意。

地贫防控作为公共卫生问题, 财政的支付能力也需要考虑, 如果三步法改为两步法, 减少了 Hb 分析, 但需对所有小细胞低色素的个体需要进行常见 β -地贫基因突变检测, 一方面增加了基因检测量, 另一方也能最大限度避免 β -地贫合并 α -地贫个体的漏检。改变后整个预防控制费用下降 10.54%, 从李兵等^[10-11]比较筛查的不同组合形式看, 无论对 α -地贫还是 β -地贫地贫的筛查方案, 传统三步法费用都处于较高水平。另严重溶血标本对 Hb 分析有影响, 而对基因检测没有影响。减少 Hb 分析, 整个操作流程更畅通, 预计整个检测时长下降 25%, 这对临床检测也工作非常重要。

临床上常见类型地贫基因检测技术经过多年的发展, 在方法、技术、仪器和流程上都取得长足进步的时候, 建立了许多高通量、全自动、快速、准确的实用临床应用技术, 将异常 Hb 病和 $\delta\beta$ 地贫及 HPFH 相关基因整合到地贫相关基因突变谱中进行检测是可行的^[12-13]。自动化核酸提取仪的应用助推分子诊断朝快速、高通量、高效的方向发展。

随着对地贫的认识进一步深入、地贫基因检测技术发展和覆盖突变谱的提升、核酸提取仪的广泛使用、高通量基因分析仪的推广和分子诊断试剂价格下降, 为在地贫预防控制与诊断中全面采用分子诊断技术创造了有利条件。中山地区也采用了两步法进行试验^[14], 香港地区的经验也验

证了这一模式的有效性^[15-16]。所以未来在人群防控体系中采用二步法代替三步法是一种节约资源、加快速度、不影响效果的做法。

参考文献

- [1] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 1版. 北京: 人民军医出版社, 2010:34-35.
- [2] 周玉球, 商璇, 尹保民, 等. 1998-2010年珠海市地中海贫血大规模人群的遗传筛查和产前诊断结果分析[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2):90-95.
- [3] Old J, Harteveld CL, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders: volume 2: laboratory protocols [Internet] 2nd edition. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2012.
- [4] Fucharoen S, Weatherall DJ. Progress toward the control and management of the thalassemsias [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2016, 30(2):359-371.
- [5] 周玉球, 李文典, 徐湘民. 用于血红蛋白病遗传筛查的实验室诊断技术[J]. 国际遗传学杂志, 2008, 31(1):17-22, 47.
- [6] 肖奇志, 周玉球, 谢建红, 等. 基于实时荧光PCR的探针熔解曲线分析技术和反向点杂交技术应用于 β -地中海贫血基因诊断与产前诊断的对比研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5):413-417.
- [7] 李莉艳, 常清贤, 靳旺杰, 等. 十个缺失型 β -地中海贫血家系的产前诊断[J]. 中华围产医学杂志, 2011, 15(10):616-618.
- [8] 谢建红, 汪国庆, 肖奇志, 等. Hb H病合并异常Hb Q和 β 地中海贫血一例报道及文献复习[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(9):840-841.
- [9] 莫宗平, 张玲, 胡朝晖, 等. 异常血红蛋白合并遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症患者一例的基因分析[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(2):170-173.
- [10] 李兵, 尹爱华, 骆明勇, 等. 三种 α -地中海贫血产前筛查方案效果比较[J]. 中华围产医学杂志, 2015, 18(7):521-526.
- [11] 李兵, 尹爱华, 骆明勇, 等. 广东省常用的三种 β 地中海贫血产前筛查方案的临床筛查效果比较[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 50(6):434-440.
- [12] 李庆阁, 黄秋英. β -地中海贫血分子诊断进展[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5):390-393.
- [13] 胥顺, 周万军, 牟毅, 等. 基因拷贝数定量检测在缺失型 α -地贫快速诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(7):222-227.
- [14] 陈敬林, 万志丹, 黄湘, 等. 中山市大规模人群地中海贫血基因型调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(14):2419-2421.
- [15] Leung KY, Lee CP, Tang MHY, et al. Cost-effectiveness of prenatal screening for thalassaemia in Hong Kong[J]. Prenat Diagn, 2004, 24(11):899-907.
- [16] Ip HW, So CC. Diagnosis and prevention of thalassaemia[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2013, 50(6):125-141.
- (上接第331页)
- [10] Ding X, Liu Z, Su J, et al. Human papillomavirus type-specific prevalence in women referred for colposcopic examination in Beijing [J]. J Med Virol, 2014, 86(11):1937-1943.
- [11] Li CD, Wu MH, Wang JD, et al. A population-based study on the risks of cervical lesion and human papillomavirus infection among women in Beijing, people's republic of China [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(10):2655-2664.
- [12] Wang L, Dai SZ, Chu HJ, et al. Intergration sites and genotype distributions of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(6):3837-3841.
- [13] Chen Q, Xie LX, Qing ZR, et al. Epidemiologic characterization of human papillomavirus infection in rural Chaozhou, eastern Guangdong province of China [J]. Plos one, 2012, 7(2):e32149.
- [14] 李亚红, 李楠, 张珍, 等. 广东地区2782例妇女高危型人乳头瘤病毒感染阳性率和年龄段的关系[J]. 分子诊断和治疗杂志, 2010, 2(2):112-115.
- [15] 刘继秀, 莫云, 白华, 等. 广西4874例妇女高危型人乳头瘤病毒感染的流行病学现状及其与宫颈上皮内瘤变的关系[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 8(27):596-597.
- [16] 张为远, 武明辉, 张淦文, 等. 2007-2008年北京地区25~54岁已婚妇女宫颈上皮内瘤变流行病学现状调查[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(3):892-897.
- [17] 李继慧, 罗宇迪, 张炬光, 等. 3150例妇女宫颈乳头状瘤病毒感染的调查分析[J]. 广西医学, 2014, 5(36):677-679.

维生素D缺乏影响受孕及胚胎发育的小鼠动物模型研究

王波 王雪云*

〔摘要〕 **目的** 通过建立小鼠模型考察维生素D缺乏对受孕力水平及胚胎发育的影响。 **方法** 采用数字随机法则将雌鼠分为维生素D缺乏组(vitamin D deficiency, VDD组)与对照组(Control组), VDD组采用维生素D低含量饲料喂养, Control组采用标准饲料喂养, 喂养2周后合笼。 **结果** GD13时, VDD组孕鼠的胚胎着床数(9.52 ± 1.75)显著低于Control组的(13.34 ± 2.16) ($P < 0.01$); VDD组孕鼠的胎儿流产率明显上升; VDD组孕鼠的胎盘重量为(0.0587 ± 0.0176)g, 显著低于Control组的(0.0786 ± 0.0143)g ($P < 0.01$); VDD组孕鼠的胎盘海绵体滋养层细胞面积为(86.20 ± 6.06)%, 显著小于Control组的(100.00 ± 4.51)% ($P < 0.01$); GD21时, VDD组孕鼠的血清25(OH)D浓度为(6.32 ± 0.51)nmol/mL, Control组孕鼠的血清25(OH)D浓度为(13.46 ± 0.62)nmol/mL, 组间比较Control组显著更高 ($P < 0.01$), 与Control组比较, VDD组的活胎数、孕鼠孕期增重、胎鼠体重、胎盘重量及胎鼠身长显著降低 ($P < 0.01$), 吸收胎数与死胎数显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 母体维生素D缺乏是导致小鼠受孕力水平降低及妊娠后胚胎发育迟缓的重要影响因素之一, 在孕前及孕期科学补充维生素D对提高育龄期小鼠受孕力水平及保障妊娠后胚胎良性发育具有重要意义。

〔关键词〕 维生素D; 受孕力; 胚胎发育; 动物模型

Effect of vitamin D deficiency on the pregnancy and embryonic development in mouse model

WANG Bo, WANG Xueyun*

(Obstetrics and Gynecology Department, Huai'an First People's Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu, China, 223300)

〔ABSTRACT〕 **Objective** To study the effect of vitamin D deficiency on the potential to conceive and embryonic development through establishing a mouse model. **Methods** Digital random method was used to divide the female mice into the vitamin D deficient (VDD) group and the control group. The individuals of the VDD group were fed with low levels of vitamin D diet, and the Control group received a standard diet. After 2 weeks, the mice were mated. **Results** At GD13, embryo implantation number of pregnant mice of VDD group (9.52 ± 1.75) were significantly lower than that of Control group (13.34 ± 2.16) ($P < 0.01$); abortion rate of pregnant mice of VDD group were significantly increased; placental weight of pregnant mice of VDD group (0.0587 ± 0.0176)g were significantly lower than that of Control group (0.0786 ± 0.0143)g ($P < 0.01$); placental trophoblast cells of corpus cavernosum area in pregnant mice of VDD group were (86.20 ± 6.06)%, significantly lower than that of Control group (100.00 ± 4.51)% ($P < 0.01$). At GD21, serum 25(OH)D concentration of pregnant mice of VDD group was (6.32 ± 0.51) nmol/mL. However, serum 25(OH)D concentration was significantly higher in Control group (13.46 ± 0.62) nmol/mL ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the number of live fetuses, pregnant mouse weight, fetal weight, placental weight and fetal length in VDD group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the number of dead and absorbed fetus were significant increased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).

作者单位: 南京医科大学附属淮安第一医院妇产科, 江苏, 淮安 223300

*通讯作者: 王雪云, E-mail: 365987071@qq.com

respectively). **Conclusion** Maternal vitamin D deficiency is one of the important factors resulting in the reduced pregnancy force level and stunted embryonic development in post-pregnancy mouse. So the supply of vitamin D is essential for the mouse of childbearing age during the pre-pregnancy and pregnancy period, which can significantly increase the potential to conceive and guarantee benign post-pregnancy embryonic development.

[KEY WORDS] Vitamin D; Pregnancy force; Embryonic development; Animal model

受孕率水平与胎儿的宫内生长发育是与生殖健康直接相关的2个非常重要的方面。而当前的一系列研究表明,受多因素影响,人类自然受孕力在近几十年内或将呈现出下降趋势^[1]。同时也有报道显示,宫内生长发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)的全球发生率为11%,我国大概为6.4%,虽然低于全球整体水平,但由于我国出生人口的基数相对更大,故每年出生的IUGR患儿例数保守估计应不低于100万^[2]。IUGR不仅存在导致胎儿宫内死亡的风险,而且即使顺利出生,在此之后的患病与死亡几率也显著高于正常新生儿。因此,科学防控受孕力水平下降与IUGR 2种情况的发生对提高全社会生殖健康水平与人口素质具重要现实意义。

维生素D缺乏与人类健康的关系一直受到临床的普遍关注。早期的研究证实维生素D缺乏是佝偻病与软骨病等疾病的重要诱因之一^[3]。人体所需的维生素D主要来源于皮肤经光照作用由7-脱氢胆固醇转化并贮存在体内的25(OH)D。故随着很大一部分人群其工作模式由过去的户外作业向室内转移,维生素D缺乏也势必更为普遍。最近的一项流行病学调查资料显示,孕期妇女维生素D水平低下[血清25(OH)D浓度 ≤ 30 ng/mL]者约占76.1%,其中严重缺乏[血清25(OH)D浓度 ≤ 20 ng/mL]者甚至高达44.6%。另一项小样本对照研究发现,胚胎停育以及小于胎龄儿其母体孕期维生素D缺乏的发生率较对照组显著更高^[4]。然而,维生素D缺乏是否与女性的受孕力水平及发生IUGR具有直接关联目前尚未探明。鉴于此,本研究特建立维生素D缺乏的小鼠动物模型,旨在揭示维生素D缺乏对受孕力水平及胚胎发育的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级ICR小鼠60只,每组各30只,小鼠及喂养饲料均购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司。小鼠均为8周龄,雄鼠体重31~35 g,雌鼠

体重28~30 g。饲料包括标准饲料(维生素D₃含量 >800 IU/kg)与维生素D低含量饲料(维生素D₃含量25 IU/kg)2种。

1.2 方法

采用数字随机法则将雌鼠分为维生素D缺乏组(VDD组)与对照组(Control组),2组小鼠的毛色、活动度以及本实验之前的饮食状况等基线资料组间比较无统计学意义($P>0.05$)。VDD组采用维生素D低含量饲料喂养,Control组采用标准饲料喂养,2组小鼠均自由饮食。喂养过程中控制环境温度20~25℃,环境相对湿度(50 $\pm$ 5)%,接受一致光照,但对VDD组实施紫外波段过滤。照上述方法喂养2周后于9:00 PM进行雌雄合笼,雌雄比例为4:2,次日7:00 AM检查雌鼠阴栓,若在阴道至子宫颈的腔内有发现白色浆液性物质则视为交配成功,同时将本日定为妊娠0 d(GD0)。

1.3 观察指标

①于GD13各组随机抽取10只孕鼠剖杀,取出子宫及胎盘组织,统计胚胎着床数并称重,另采用苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)法对胎盘组织进行染色,并采用ImageJ软件测量胎盘海绵体滋养层细胞的面积^[5]。②于GD21各组再随机抽取10只孕鼠剖杀,收集2组孕鼠血清,采用放射免疫法检测血清25(OH)D浓度,另分别统计2组的胎数、吸收胎数、死胎数、活胎数、孕期增重、胎鼠体重、胎盘重量、身长、尾长、头围直径以及胸围直径。

1.4 统计学方法

本研所得数据采用SPSS 19.0统计学软件给予处理,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,检验方法为 t 检验,计数资料采用率(%)表示,检验方法采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

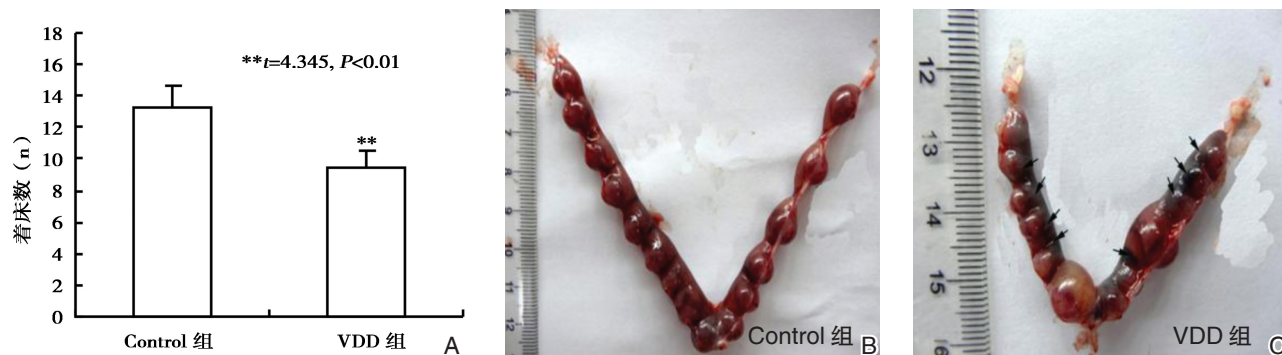
2 结果

2.1 2组孕鼠GD13的受孕情况比较

GD13时,VDD组孕鼠的胚胎着床数(9.52 $\pm$ 1.75),显著低于Control组的(13.34 $\pm$ 2.16)($P<0.01$),

见图1A; VDD组孕鼠的胎儿流产率明显上升, 见图1B; VDD组孕鼠的胎盘重量为 (0.0587 ± 0.0176) g, 显著低于Control组的 (0.0786 ± 0.0143) g ($P <$

0.01), 见图2; VDD组孕鼠的胎盘海绵体滋养层细胞面积为 $(86.20 \pm 6.06)\%$, 显著小于Control组的 $(100.00 \pm 4.51)\%$ ($P < 0.01$), 见图3。



A: 2组孕鼠胚胎着床数比较; B、C: 2组孕鼠胎儿流产率比较

图1 2组孕鼠的胚胎着床数比较

Figure 1 Comparison of embryo implantation number in 2 groups of pregnant mouse

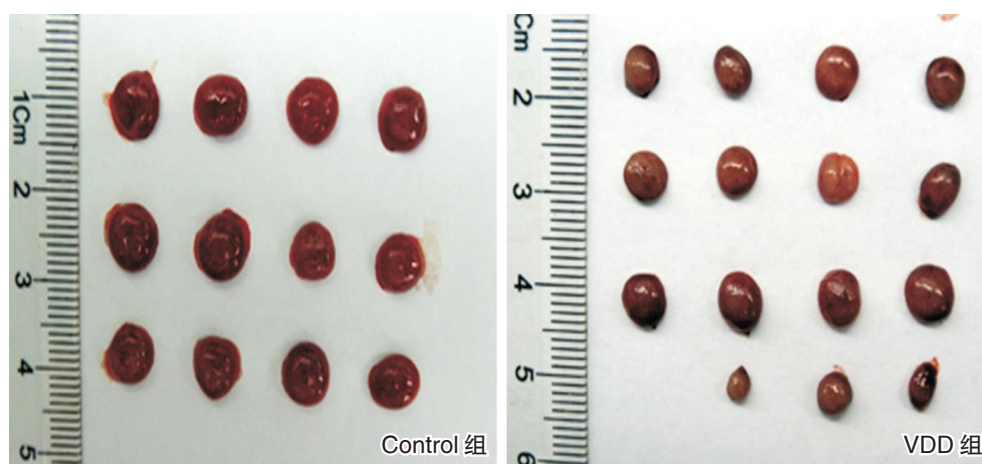


图2 2组孕鼠的胎盘发育情况比较

Figure 2 Comparison of the development of the placenta in 2 groups of pregnant mouse

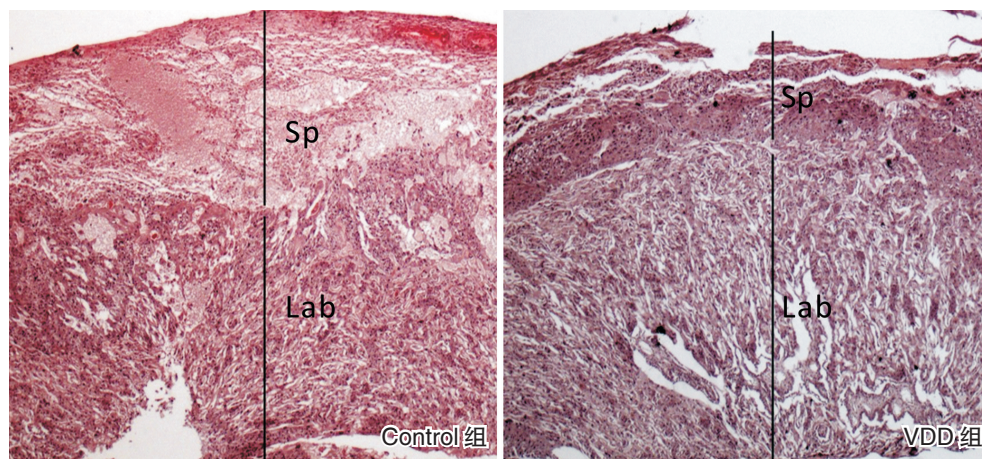


图3 2组孕鼠的胎盘组织结构比较

Figure 3 Comparison of placental tissues in 2 groups of pregnant mouse

2.2 2组孕鼠 GD21 的血清维生素 D 含量比较

GD21 时, VDD 组孕鼠的血清 25(OH)D 浓度为 (6.32 ± 0.51) nmol/mL, Control 组孕鼠的血清 25(OH)D 浓度为 (13.46 ± 0.62) nmol/mL, 组间比较 Control 组显著更高, 有统计学意义 ($t=33.311$, $P<0.01$), 见图 4。

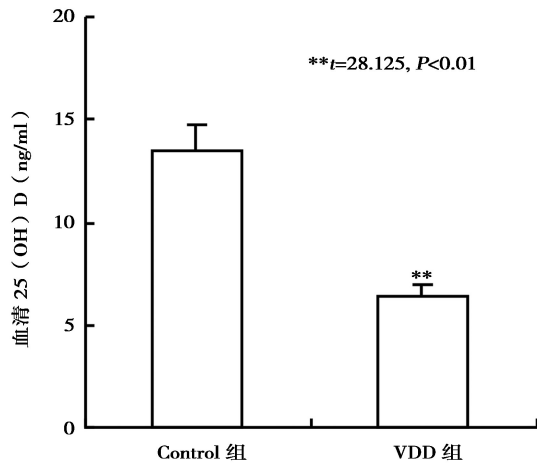


图 4 2组孕鼠的血清维生素 D 含量比较

Figure 4 Comparison of serum vitamin D levels in 2 groups of pregnant mouse

2.3 2组孕鼠 GD21 的胚胎发育及妊娠结局比较

GD21 时, 与 Control 组比较, VDD 组的活胎数、孕鼠孕期增重、胎鼠体重、胎盘重量及胎鼠身长显著降低 ($P<0.01$), 吸收胎数与死胎数显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见表 1、图 5。

表 1 2组孕鼠 GD21 的胚胎发育及妊娠结局比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of embryonic development and pregnancy outcome of 2 groups of pregnant mouse with GD21 ($\bar{x} \pm s$)

测量指标	Control 组	VDD 组	t	P
胎数(只)	13.1±1.3	11.6±2.9	1.493	>0.05
吸收胎数(只)	0.2±0.1	0.3±0.1	2.236	<0.05
死胎数(只)	0.2±0.1	0.9±0.5	4.341	<0.01
活胎数(只)	12.5±0.8	11.0±1.8	2.408	<0.05
孕期增重(g)	110±13	83±18	3.845	<0.01
胎鼠体重(g)	6.1±0.4	4.5±0.5	7.902	<0.01
胎盘重量(g)	0.103±0.002	0.071±0.048	2.106	<0.05
身长(cm)	5.21±0.33	4.59±0.54	3.098	<0.01
尾长(cm)	1.48±0.18	1.40±0.23	0.866	>0.05
头围直径(cm)	0.83±0.13	0.76±0.18	0.997	>0.05
胸围直径(cm)	1.03±0.25	0.95±0.31	0.635	>0.05



图 5 维生素 D 缺乏对胎鼠生长发育的影响

Figure 5 Effect of vitamin D deficiency on the growth and development of fetal mouse

3 讨论

关于孕妇体内需要维持的正常维生素 D 水平目前尚存在一定争议, 但相关权威机构如国际骨质疏松基金会与国际内分泌学会均建议至少应不低于 30 ng/mL^[6-7]。有学者^[8]通过 meta 分析发现, 与正常女性比较, 血清 25(OH)D 水平低于 20 ng/mL 的女性群体其临床受孕率及胎儿活产率均显著降低。一项经美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)注册的随机对照研究显示^[9], 将孕妇的血清 25(OH)D 水平维持在 32 ng/mL 以上几乎可完全避免不良妊娠结局的发生且具良好稳定性。这些结果我们可结合维生素 D 对女性生殖系统功能的影响给予解释。活性维生素 D 在人体内发挥生物作用首先是基于其与维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)的结合。而相关研究发现, VDR 在女性卵巢、子宫内膜、输卵管上皮细胞、胎盘以及蜕膜上均有不同程度表达, 同时其表达量还将伴随妊娠而增加^[10]。与此同时, 在人体骨骼、乳腺、胎盘以及子宫内膜中均发现存在有维生素 D 代谢的关键酶 1 α -羟化酶, 且活性维生素 D 与体内胎盘中催乳素及人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)合成及分泌有关。另有动物实验发现, 在卵巢颗粒细胞中有观察到 VDR mRNA 表达且其表达水平与卵泡发育具关联性, 同时该研究还进一步揭示维生素 D 对颗粒细胞中抗苗勒管激素(评估卵巢储备功能的指标)水平具调节作用^[11]。国外有学者^[12]将小鼠 VDR 受体基因突变使其缺陷后发现, 观察组小鼠的子宫发育完整性显著不及对照组并伴随出现不孕, 提示维生素 D 参与了小鼠子宫的发育及成熟。目前业已证实, HOXA-10 基因在胚胎的着床及分裂过程中发挥有重要作用, 而有研究发现, 活性

维生素D作用于子宫内间质细胞可明显增加 *HOXA-10* mRNA 蛋白表达水平^[13]。综合上述研究,可以认为维生素D可从多途径对女性生殖系统功能产生影响。本研究成功构建了维生素D缺乏小鼠模型,结果显示,在GD13时,与Control组比较,VDD组雌鼠的胚胎着床数显著降低,胎儿流产率明显上升,胎盘海绵体滋养层细胞面积显著减小,组间比较均有统计学意义($P<0.01$),进一步证实孕前母体低维生素D水平可导致受孕力降低。

本研究结果还显示,GD21时,与Control组比较,VDD组的活胎数、孕鼠孕期增重、胎鼠体重、胎盘重量及胎鼠身长显著降低($P<0.01$),吸收胎数与死胎数显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此部分结果反映了维生素D缺乏与IUGR及宫内死亡的发生应存在关联,然而其具体机制目前尚不清楚。结合本次实验中的胎盘情况以及近期多位学者的一系列研究可初步确认,胎儿宫内生长受限原因有:胎儿本身因素(染色体异常、病毒感染等),母体因素(慢性疾病、营养不良、胎盘因素、脐带因素),胎盘发育受损和功能障碍是引起胎儿宫内生长受限的重要原因之一^[14]。胚胎和胎儿生长发育所需的营养(如必需氨基酸、糖和必需脂肪酸等)主要由胎盘转运,而且,胎盘还分泌生长激素或生长因子(如胰岛素样生长因子IGFs等);胎盘还可对母体内一些可损害胚胎和胎儿生长发育的有害物质起到屏障作用。一旦胎盘的发育以及功能受损,胚胎以及胎儿的正常发育必然遭受损害,继而导致胚胎和胎儿宫内生长受限。

一些小小样本研究证明:分娩小于胎龄儿的孕妇血清维生素D水平明显低于分娩正常体重的孕妇,证明维生素D缺乏与早产、流产、胚胎停止发育有关^[15],还有研究结果显示:与单纯1,25(OH)₂D₃培养组相比,对照组VDR mRNA水平并未表现有明显的下降趋势,故认为维生素D缺乏可能并非通过直接作用而可能是通过某种介质间接作用来对胎盘的发育与功能造成损害。关于此方面,目前多方研究证实,炎症因子可能是导致胎盘发育受损和功能障碍的重要原因之一。如有学者^[16]发现,在接受Tbll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)的外源性天然配体-细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理后,孕鼠胎盘组织中的 *tnf-α* 以及 *il-6* 等促炎细胞因子基因的表达将显著上调,胎盘均重降低继而诱发胎儿宫内生长受限。此外,在对体外人胎盘绒毛滋养细胞加入LPS或肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis fac-

tor-α, TNF-α)孵育时,发现滋养细胞对叶酸的吸收能力显著下降。其中,LPS可抑制人胎盘滋养细胞合成和分泌IGF-1;而另一方面,有研究资料证实^[17],TNF-α在炎症介导的胎儿死亡和生长发育迟缓发生过程起关键作用。综上所述,孕鼠血清维生素D缺乏可能并非通过直接抑制胎盘细胞增殖生长,而是增强体内炎症因子表达,增加体内炎症反应继而抑制胎盘滋养细胞增殖,最终导致IUGR发生。

综上所述,本研究所构建的维生素D缺乏小鼠模型提示:母体维生素D缺乏是导致小鼠受孕力水平降低及妊娠后胚胎发育迟缓的重要影响因素之一,在孕前及孕期科学补充维生素D对提高育龄期小鼠受孕力水平及保障妊娠后胚胎良性发育具有重要意义。

参考文献

- [1] Anderson K, Nisenblat V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment-a review[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2010, 50(1):8-20.
- [2] Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(4):288-300.
- [3] Masuyama R. Role of local vitamin D signaling and cellular calcium transport system in bone homeostasis[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32(1):1-9.
- [4] 范雅萍, 朱中平, 吴祥林. 孕妇血镉、铅、钙、铜、锌水平与稽留流产的关联性研究[J]. 广东医学院学报, 2014, 32(4):454-457.
- [5] Chen YH, Zhao M, Chen X, et al. Zinc supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced fetal growth restriction and demise through its anti-inflammatory effect[J]. Immunol, 2012, 189(1):454-463.
- [6] Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults[J]. Osteoporos Int, 2010, 21(7):1151-1154.
- [7] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(7):1911-1930.
- [8] Vanni VS, Vigano' P, Somigliana E, et al. Vitamin D and assisted reproduction technologies: current concepts[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2014, 12:47.

(下转第360页)

HBV 核苷(酸)类似物耐药突变及其检测技术的临床应用

巢薇* 何宝玉

[摘 要] 目前,可供临床应用的抗慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogs, NAs]包括拉米夫定(lamivudine, LAM)、替比夫定(telbivudine, LdT)、阿德福韦酯(adefovir, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)及替诺福韦酯(tenofovir, TDF), NAs 作为病毒逆转录酶抑制剂,可抑制 HBV DNA 复制扩增。由于 HBV 属于高基因变异率病毒, NAs 长期治疗后,选择压力下使耐药病毒株成为优势株,影响治疗效果。因此,为防治 CHB 抗病毒治疗中耐药的发生,弄清楚其耐药机制及变异的监测及诊断十分必要。本文总结了近年来发现的常见突变位点,并比较了几种临床应用的突变监控及检测技术,对耐药突变进行早期、快速检测具有重要临床意义,使慢性 HBV 感染的监测达到最优化。

[关键词] 核苷(酸)类似物; 耐药突变; 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 常见耐药变异; 突变位点检测

Hepatitis B virus nucleos(t)ide analogues drug resistance mutations and the clinical application of variation loci detection

CHAO Wei*, HE Baoyu

(Medical Clinical Laboratory, The Fourth Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi, China, 545005)

[ABSTRACT] At present, nucleos(t)ide analogues (NAs) available for clinical application of Chronic hepatitis B (CHB) include lamivudine (LAM), telbivudine (LdT), adefovir (ADV), entecavir (ETV), and tenofovir (TDF). As virus reverse transcriptase inhibitors, NAs can inhibit HBV DNA replication. Because of the high mutation rate of HBV, long-term treatment with NAs resulting in drug-resistant strains will reduce the effect of NA treatments. Therefore, in order to control the occurrence of drug resistance in CHB antiviral treatment, figuring out the resistance mechanism and monitoring and diagnosis of variation is essential. In this paper, we summarized common mutations discovered in recent years, and compared the clinical application of several technologies monitoring and detecting drug-resistant mutations, which is important for early and rapid mutation detection and optimizing the monitoring of chronic HBV infection.

[KEY WORDS] Nucleos(t)ide analogues; Drug resistance mutations; Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B; Common drug-resistance variation; Variation loci detection

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种高危致病性病毒,慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是 HBV 最常引起的一种慢性疾病,1/3 以上的感染者在中国^[1]。抗病毒治疗是 CHB 的根本治疗措施,核苷(酸)类似物[Nucleos(t)ide ana-

logs, NAs]作为目前临床抗病毒治疗的主流药物,主要包括拉米夫定(lamivudine, LAM)、替比夫定(telbivudine, LdT)、阿德福韦酯(adefovir, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)及替诺福韦酯(tenofovir, TDF)5 种常用药物,它们均可抑制病毒 DNA

基金项目:国家自然科学基金(81160269);柳州市肿瘤疾病防治重点实验室建设(2014G020403)

作者单位:广西医科大学第四附属医院医学检验科,广西,柳州 545005

*通讯作者:巢薇, E-mail:2312969581@qq.com

复制^[2]。但随着应用时间的推移和应用群体的扩大, NAs 耐药问题日趋严重。启动 NAs 抗病毒治疗后, 需定期监控评估 NAs 常见耐药突变位点变异率, 根据应答和耐药情况调整药物和疗程^[3]。这已成为 CHB 抗病毒治疗中的重要监测措施。新突变位点的不断发现及检测方法的不断更新和广泛应用, 将为提高 CHB 抗病毒的治疗疗效提供重要的理论和技术支持。本文综述了近年来报道的基因多位点耐药相关突变, 这有助于临床及时发现乙型肝炎患者是否存在 HBV 耐药。同时, 文章比较了几种临床应用的突变监控及检测技术, 结合其原理及技术发展, 对耐药检测技术的现状进行分析比较, 为临床动态监测 HBV 变异病毒株、指导合理用药奠定了基础。

1 HBV NAs 的耐药机制

HBV 吸附脱壳感染肝细胞后, 在 HBV DNA 聚合酶作用下, 以负链 DNA 为模板修补延长正链, 形成的共价闭合环状的双链 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 进入细胞核^[4-5]。在核内以 cccDNA 为模板转录产生的 mRNA, 含有 HBV 全部遗传信息, 故称为前基因组 RNA。前基因组 RNA 出核后逆转录为负链 DNA, 继续以负链为模板合成正链, 双链环化形成完整的 HBV DNA^[4, 6]。NAs 治疗则通过抑制逆转录酶活性, 阻止前基因组 RNA 逆转录形成新的病毒 DNA, 从而发挥抑制病毒复制的作用。HBV 前基因组 RNA 是以 HBV 的 cccDNA 为模板合成的, 即 NAs 的药效靶点在 cccDNA 的下游, 见图 1。所以 NAs 不能直接清除已经存在的 cccDNA^[7-8], 因此, 为了维持 HBV 的低水平复制, NAs 治疗需很长时间。其次, 由于 HBV DNA 复制过程必需的逆转录酶缺乏 3'-5' 外切活性, 极易导致碱基错配, 病毒基因自发突变频率高。因此, 一旦病毒对长期服用的某种 NAs 药物产生选择压力, 此种药物便失去了疗效, 从而导致耐药的发生。

体内出现耐药变异后, 继续维持相同 NAs 治疗, 野生敏感病毒株被抑制, 变异株加快复制取代野生株成为优势株, 从而导致对 NAs 耐药。随着研究的深入, 耐药机制已由传统的定性研究向精确的定量研究跨越, 随之而来的一系列问题需要研究者继续去探索: 变异株达到病毒群的多少百分比可以称为优势株? 继续使用 NAs 治疗, 变异株积累成优势株, 最后成为耐药株的速率与不同

NAs 的服用剂量有何关系? 优势株占多少比例时会出现病毒学突破? 在检测到耐药突变后, 如何进一步明确患者体内变异株的比率或者变异株的拷贝数与临床的关系? 新突变位点的不断发现及检测方法的不断更新, 将对这些问题的深入研究和探讨提供必要的保障与支持。

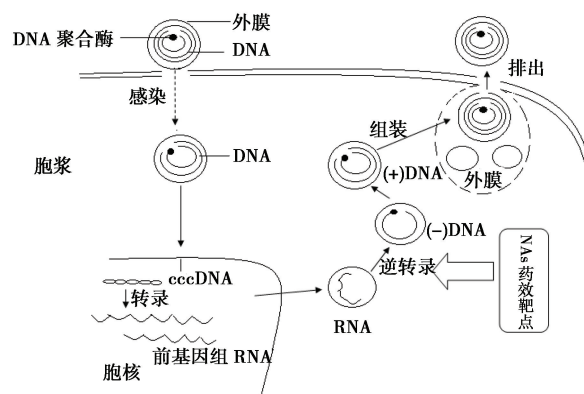


图1 HBV 感染及 NAs 药效靶点示意图

Figure 1 Schematic diagram of HBV infection and NAs target

2 HBV NAs 常见的耐药突变位点

HBV 耐药基因突变发生于病毒逆转录酶基因序列区域。根据 2001 年提议的耐药突变位点命名规则, 将 HBV 耐药变异统一从逆转录酶区 (各基因型均为 344 个氨基酸) 的第一个氨基酸数起并加前缀 rt, 分别为 rt1~rt344 (例如 YMDD 变异被命名为 rtM204V)^[9]。

2.1 LAM 和 LdT 耐药变异位点

LAM 是最早应用于临床的核苷类似物, 迄今仍有 CHB 患者使用 LAM, 因此, 其耐药突变位点最多, 而且耐药发生率以每年约 30% 的速率增加^[10]。LAM 耐药突变主要发生在逆转录酶基因 C 区的保守序列 YMDD 区域, 碱基发生置换时, 第 204 位的蛋氨酸 (M) 变为亮氨酸 (V) 或异亮氨酸 (I) 即为 rtM204V/I/S。在 rtM204V/I 出现后, 若继续维持 LAM 治疗, 则会出现耐药性更强的突变—rtL180V/I/M^[11-12]。rtM204V/I 和 rtL180V/I/M 的患者会进一步引发第 3 个常见的突变位点 rtI73L。近年来报道的 LAM 耐药突变位点还包括 rtA181T 及 rtQ215S。长期的 LAM 治疗通常会致许多组合型耐药突变, rtL180M + rtM204V、rtL180M + rtM204I、rtV173L + rtL180M + rtM204V、rtM204I 是 LAM 耐药变异的主要组合方式^[13]。

LdT和LAM同属于L-核苷,故二者具有交叉耐药突变位点,包括M240及L180^[14]。由于存在交叉耐药,故不可在出现LAM耐药后继续使用LdT治疗^[15]。因此,对于结构相似会出现交叉耐药现象时,需综合考虑耐药位点及相关变异情况,适时进行耐药监控,结合临床症状,选择正确的抗病毒治疗药物。

2.2 ADV耐药变异位点

ADV耐药突变率较LAM低,初治患者(指未用过NAs抗HBV药物者)第1年未见耐药,HBeAg阴性初治患者ADV治疗的基因耐药率前5年分别为0%、3%、7%、8%、11%^[11]。N236T氨基酸置换是ADV标志性耐药变异位点,继续ADV治疗,引起YMDD临近区域的耐药变异rtA181V/T。常见的ADV耐药突变还有C区的rtV214A、D区的rtQ215S、rtI233V及rtL217R等。ADV药物结构与LAM不同,rtN236T变异不会改变LAM的敏感性,但rtA181V/T、rtV214A及rtQ215S变异株会与LAM出现交叉耐药^[16]。

2.3 ETV耐药变异位点

ETV是鸟嘌呤核苷类似物,ETV的耐药位点是在拉米夫定耐药位点(rtL180M+rtM204I/V/S)基础上同时出现A区rtI169T、B区rtT184C/G、rtS202G/I和D区rtM250V等突变。ETV对初治患者基本不发生耐药,1~5年的耐药突变率均为<1%^[17]。而发生拉米夫定耐药患者中,ETV治疗2年的累积基因耐药率为16%,病毒学反弹超过10%,较初治患者明显升高。ETV具有高基因屏障的特点,多位点突变才可能出现耐药现象,这也是ETV耐药发生率低的重要原因。

2.4 TDF耐药变异位点

TDF与ADV结构相似,两者具有类似的抗病毒活性。研究显示,TDF治疗3年后并未出现明确的TDF耐药,有报道第194位丙氨酸至苏氨酸的

替换(rtA194T)与TDF耐药相关,但出现该耐药后仍对ETV敏感^[18]。体外实验发现,rtA181/T或rtN236T ADV耐药株对TDF的敏感性下降3~4倍,推测可能是TDF潜在突变位点^[19]。

耐药位点的提出与确立是一个长期的、需要重复验证的过程。在验证过程中,由于表型耐药检测体系的差别可能会出现结果的不一致。单个变异位点的确定需要结合HBV基因型、全基因组序列及患者的临床指标等各方面因素^[20-21]。此外,我们需要深入了解耐药变异与临床耐药的关系,结合临床症状及个体化因素,综合分析耐药变异引起的临床改变,从而确定准确可靠耐药变异位点。随着研究的不断深入,越来越多的突变位点被发现,表1总结了近几年发现报道的NAs常见的耐药突变位点,可目前应用于临床指导药物选择的位点有限。因此,我们需要在探索新位点的同时,建立更加成熟的突变检测技术,制定合理的抗病毒治疗方案,对患者服用药物的相关耐药突变位点实时监控,及时调整治疗方案。

3 HBV NAs的耐药突变检测

建立准确、灵敏和经济可行的耐药突变检测方法对于慢性HBV感染抗病毒治疗中耐药性的监测和确定具有重要意义。目前已报道的HBV耐药突变的检测方法根据原理的不同大致可分为测序法、反向杂交法及PCR相关技术方法等,这些方法各有利弊。随着临床耐药形势日渐严峻,发展并推广特异性强、灵敏度高及价格适中的检测手段成为当务之急。

3.1 测序法

测序法主要包括经典直接测序法、克隆测序法、焦磷酸测序法、SNaPshot技术等。随着生物科学的迅猛发展,作为最准确的耐药检测方法,测序法不断发展完善。与其他耐药检测方法相比,测

表1 HBV NAs常见的耐药突变位点
Table 1 Common drug resistance mutations of NAs against HBV

	V173	I169	L180	A181	A184	A194	S202	M204	V214	Q215	L217	I233	N238	M250
LAM	★		★					★						
LdT			★					★						
ADV				★					★	★	★	★	★	
ETV	★	★	★		★		★	★						★
TDF				★		★							★	

LAM:拉米夫定;LdT:替比夫定;ADV:阿德福韦酯;ETV:恩替卡韦;TDF:替诺福韦酯;V173表示HBV逆转录酶区域的第173位的亮氨酸,后以此类推

序法精准度和特异性都较高,且能对多个位点同时进行检测。测序法与其他检测手段进行比较,可作为检测功效的衡量标准。

3.1.1 直接测序法(direct sequencing, DS)与 SNaPshot 单核苷酸多态性检测法

DNA 直接测序法一直被认为是检测基因突变的金标准,研究者曾利用 DS 检测出 HBV YMDD 和 rtA181T/V 位点变异^[22]。DS 最大的优势是可检测新发突变位点,DS 的检测结果通常与还可与其他突变检测技术比较,作为检测功效的衡量标准。由于 DS 要求将目标序列进行扩增并连接到载体再行检测,因此无法满足 HBV 快速诊断和大规模检测的要求。另外,对于多种基因型同时存在的病毒群,DS 只能检测 DNA 含量高的优势病毒株。而对于病毒含量低标本,DS 灵敏度不高,可能会漏检低比例($<1\%$)耐药突变^[23]。

SNaPshot 单核苷酸多态性检测法,即微测序法,是在 DNA 直接测序基础上发展出来的一种新的检测方法。该技术依据待检测序列设计特异性引物,在反应体系中加入荧光标记的 ddNTP,依据峰的颜色确定样本的基因型,依据峰的位置确定延伸产物对应的 SNP 位点。Salpini 等^[24]利用 SNaPshot 技术对 204 例 CHB 患者血清检测耐药位点检测,结果与测序结果一致,证实了 SNaPshot 技术高度的准确性。与直接测序法相比该技术操作简便,经济快速。但是此类方法对引物的要求较高,并且一般只可以检测已知突变位点。

3.1.2 焦磷酸深度测序

焦磷酸深度测序技术(pyro-sequencing, PyroS)是近年来临床应用较广的一种实时 DNA 序列分析技术。该技术敏感度较高,最少可检测 0.1% 比例的耐药突变,因此可作为耐药变异的早期检测方法。Ciftci 等^[25]运用该技术对 42 位 CHB 患者的耐药位点进行扫描,发现了 rtL180I、rtQ215P、rtI233Y、rtN238D 和 rtM250S 5 个独立的耐药突变位点,作者进一步研究发现 rtI266G 突变会与 LAM 耐药有关,推测可能是 LAM 潜在的耐药变异位点。目前,以高灵敏度及特异性为特点的焦磷酸深度测序已超越经典普通测序方法,尤其是在早期监控及检测阶段,发挥了重要的作用。

3.2 杂交法

杂交法是使样本的扩增产物与荧光标记探针特异性结合,通过对鉴别不同荧光检测突变位点

的方法。由于扩增产物可同时与多个探针结合,故杂交法可一次性检测多个突变模式。

3.2.1 线性探针技术

线性探针技术用于检测 HBV 耐多药,具有成本低、特异性高等特点,为耐多药突变的早发现、早治疗提供了诊断依据。Yoshida 等^[26]针对 HBV 野生型和已知位点(rtM204V/I)的耐药型毒株基因序列分别设计探针,固定于 PVDF 膜,将待检测样本经 PCR 扩增后杂交,结果在 109 名 CHB 患者中,检出了 90 名 rtM204V/I 突变,检出率为 88.2%。线性探针技术的缺点是只可检测已知突变。近年来,以线性探针为基础发展起来的交联扩增技术(ligation amplification assay, LigAmp)在 YMDD 变异检测时具有较高敏感度,可在 LAM 耐药突变进行早期监控^[27]。

3.2.2 基因芯片技术

基因芯片突变检测技术是将特定的基因片段或寡核苷酸片段以特定顺序密集排列于某种固相载体上(如硅片或玻片),形成基因芯片,与荧光标记样本杂交,通过激光共聚焦系统检测杂交信号强度,读取样本的数量和序列信息。已有研究显示,芯片检测法准确率达 96%,敏感性达 95%,特异性为 100%,对比传统的 DNA 序列分析法(准确率 87%,敏感性 82%,特异性 100%),该技术有较高的检测灵敏度与准确率^[28]。基因芯片技术与传统杂交技术相比,具有检测效率高、系统微型化、能够同时对多个位点同步检测的优势,符合现代分子生物学发展的趋势,但 HBV 的高突变率缩短了寡核苷酸探针的使用寿命,偏差的出现导致一定比例的假阴性,制约了该技术的发展及应用^[29]。

3.3 PCR 相关技术

3.3.1 实时荧光定量 PCR(realtime fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)熔解曲线分析法

RTFQ-PCR 技术利用荧光信号实时积累监控整个 PCR 过程,SYBR Green I 非特异性地嵌入 DNA 双链间,发出强烈荧光信号,若存在其他双链寡核苷酸,便会产生假阳性信号,降低了检测的精确性^[30]。Zeng 等^[31]利用实时荧光 PCR 技术检测 HBV YIDD 耐药突变,与市售优秀 HBV 耐药突变测序检测试剂盒检测结果的完全一致率 91.2%(93/102),部分一致率 8.8%(9/102),未发现完全不一致(0/102),两法一致性好($Kappa=0.676$, $P=0.000$)。克隆测序检测结果与 RTFQ-PCR 完全一致。RTFQ-PCR 检测技术可通过 Ct 数值确定变异

病毒含量及其与野生毒株的比值,具有重复性好、灵敏度高、无扩增后处理等优点,是临床应用时间最长、最成熟的一种分子检测技术,目前已成为临床实验室普遍采用的检测技术。但该方法也有其局限性,如HBV的高突变性导致探针和引物设计出现偏差,出现假阴性。

3.3.2 聚合酶链式反应微板核酸杂交-酶联免疫吸附法(PCR microplate nucleic acid hybridization-enzyme linked immunosorbent assay, PCR-mnh-ELISA)

PCR-mnh-ELISA检测技术将基因扩增、核酸杂交和酶联显色3种诊断技术结合,通过设计特定的组合引物将突变基因和正常基因分辨出来。PCR-mnh增强了核酸杂交的特异性,而与ELISA技术结合后则提高了检测方法的灵敏度。PCR-mnh-ELISA可以检测出已知变异的基因序列,可同时从1 000个正常基因序列中检测出1个变异位点,且检测结果不受正常基因序列干扰。但体系中的非特异性探针杂交及过度敏感的信号放大系统均会导致假阳性的产生。此外,此法操作复杂,需在开放环境中进行,可能会对实验室造成污染。目前该技术仅用于科学研究,临床普及难度大。

3.4 其他检测方法

变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC),也称为温度调节的杂合双链分析技术,是近年来发展起来的一项新的分析技术。该技术利用部分变性条件下同源-异源双链靶DNA解链特征的差异性进行突变位点检测。该检测方法具有快速、高特异性、高灵敏、高通量、廉价省时及操作简单等优点。但是,该技术对待检样本的PCR技术要求很高,对PCR引物设计、体系优化及最适扩增片断等都有较高要求,还需保证PCR产物具有较高的含量和质量。当PCR片段扩增特异性较差时,可能会导致结果假阳性,以致检测结果不准确。

4 展望

随着对NAs耐药机制研究的不断深入,耐药管理的观念也在不断更新。在整个用药期间对患者定期随访、精确监控耐药位点以便第一时间诊断出病毒耐药成为临床最行之有效的耐药管理方案,精确严谨的实验室检测则是上述方案取得成功的有力保证。

随着生物医学的快速发展,越来越多的新技术开始应用于HBV耐药突变的检测。敏感性和特异性越来越高、可检测位点(尤其是未知变异位点)越来越多、样本量越来越大、操作简化、成本低廉,这些特点都是NAs耐药突变检测新技术的发展趋势。经典的直接测序法特异性强、敏感度高,可检测未知变异位点,一直被视为变异位点检测的金标准;荧光定量PCR技术灵敏度较高,而且荧光定量分析仪目前也已普及,价格相对适中,因此目前认为该方法在临床上应用前景最为广泛,适合大标本量检测;以焦磷酸测序技术和SNaPshot为代表的第三代测序技术兼顾了高敏感性、高特异性等特点,高通量的检测又可大幅度降低成本, SNaPshot技术更可直观地检测基因片段碱基序列,但技术尚未成熟,且对引物和实验条件要求较高,临床普及开展难度大,相信未来会有所改善。

参考文献

- [1] Qi FH, Wang ZX, Cai PP. Traditional Chinese medicine and related active compounds: a review of their role on hepatitis B virus infection [J]. Drug Discov Ther, 2013, 7(6):212-224.
- [2] Fan J, Zhang Y, Xiong H, et al. Nucleotide analogue-resistant mutations in hepatitis B viral genomes found in hepatitis B patients [J]. J Gen Virol, 2015, 96(Pt 3):663-670.
- [3] Koumbi L. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection [J]. World J Hepatol, 2015, 7(8):1030-1040.
- [4] Yim HJ, Hwang SG. Options for the management of antiviral resistance during hepatitis B therapy: reflections on battles over a decade [J]. Clin Mol Hepatol, 2013, 19(3):195-209.
- [5] Kim DY, Chang HY, Lim SM, et al. Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B [J]. Gut Liver, 2013, 7(3):329-334.
- [6] Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection [J]. Antiviral Res, 2004, 64(1):1-15.
- [7] Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S, HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation [J]. Hepatol, 2006, 44(3):593-606.
- [8] Gupta N, Goyal M, Catherine T, et al. The molecular

- and structural basis of HBV-resistance to nucleoside analogs[J]. *Clin Transl Hepatol*, 2014, 2(3):202-211.
- [9] Suppiah J, Mohd ZR, Haji NS, et al. Drug-resistance associated mutations in polymerase (p) gene of hepatitis B virus isolated from Malaysian HBV carriers[J]. *Hepat Mon*, 2014, 14(1):e13173.
- [10] Li X, Liu Y, Zhao P, et al. Investigation into drug-resistant mutations of HBV from 845 nucleoside/nucleotide analogue-naïve Chinese patients with chronic HBV infection[J]. *Antivir Ther*, 2015, 20(2):141-147.
- [11] Lei J, Wang Y, Wang LL, et al. Profile of hepatitis B virus resistance mutations against nucleoside/nucleotide analogue treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B[J]. *Virology*, 2013, 10:313.
- [12] Liu Y, Xu ZH, Wang Y, et al. rtM204Q may serve as a novel lamivudine-resistance-associated mutation of hepatitis B virus[J]. *Plos One*, 2014, 9(2):e89015.
- [13] Parvez MK, Arab AH, Al-Dosari MS, et al. Antiviral natural products against chronic hepatitis B: recent developments[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(3):286-293.
- [14] Cai S, Yu T, Jiang Y, et al. Comparison of entecavir monotherapy and de novo lamivudine and adefovir combination therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B with high viral load: 48-week result[J]. *Clin Exp Med*, 2015, Epub ahead of print.
- [15] Pan HY, Chen L, Yang DH, et al. Ten-year follow-up of hepatitis B relapse after cessation of lamivudine or telbivudine treatment in chronic hepatitis B patients[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(12):1123.
- [16] Kim JH, Ko SY, Choe WH, et al. Lamivudine plus adefovir combination therapy for lamivudine resistance in hepatitis-B-related hepatocellular carcinoma patients[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2013, 19(3):273-279.
- [17] Takamatsu Y, Tanaka Y, Kohgo S, et al. 4'-modified nucleoside analogs: potent inhibitors active against entecavir-resistant hepatitis B virus[J]. *Hepatology*, 2015, 62(4):1024-1036.
- [18] Murakami E, Tsuge M, Hiraga N, et al. Effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones[J]. *Infect*, 2016, 72(1):91-102.
- [19] Hann HW, Chae HB, Dunn SR. Tenofovir (TDF) has stronger antiviral effect than adefovir (ADV) against lamivudine (LAM)-resistant hepatitis B virus (HBV)[J]. *Hepatol Int*, 2008, 2(2):244-249.
- [20] Liu C, Lin JP, Chen HJ, et al. Detection of hepatitis B virus genotypic resistance mutations by coamplification at lower denaturation temperature-PCR coupled with sanger sequencing[J]. *Clin Microbiol*, 2014, 52(8):2933-2939.
- [21] Bhattacharya D, Thio CL. Review of hepatitis B therapeutics[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51(10):1201-1208.
- [22] Jardi R, Buti M, Frias FR, et al. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants[J]. *Virology Methods*, 1999, 83(1-2):181-187.
- [23] Lowe CF, Merick L, Harrigan PR, et al. Implementation of next-generation sequencing for hepatitis B virus resistance testing and genotyping in a clinical microbiology laboratory[J]. *Clin Microbiol*, 2016, 54(1):127-133.
- [24] Salpini R, Alteri C, Cento V, et al. Snapshot on drug-resistance rate and profiles in patients with chronic hepatitis B receiving nucleoside analogues in clinical practice[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(6):996-1004.
- [25] Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, et al. Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 79(1):25-30.
- [26] Yoshida S, Hige S, Yoshida M, et al. Quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B[J]. *Ann Clin Biochem*, 2008, 45(Pt 1):59-64.
- [27] Ismail AM, Sachithanandham J, Eapen CE, et al. Performance of LigAmp assay for sensitive detection of drug-resistant hepatitis B virus minor variants in comparison with standard nucleotide sequencing[J]. *Mol Diagn Ther*, 2014, 18(6):655-663.
- [28] Chan K, Yam I, Yuen J, et al. A comprehensive HBV array for the detection of HBV mutants and genotype[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(14-15):1253-1260.
- [29] Hua W, Zhang G, Guo S, et al. Microarray-based genotyping and detection of drug-resistant HBV mutations from 620 Chinese patients with chronic HBV infection[J]. *Braz J Infect Dis*, 2015, 19(3):291-295.
- [30] He X, Wang F, Huang B, et al. Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6):9630-9639.
- [31] Zeng Y, Li D, Wang W, et al. Establishment of real time allele specific locked nucleic acid quantitative PCR for detection of HBV YIDD (ATT) mutation and evaluation of its application[J]. *Plos One*, 2014, 9(2):e90029.

克雅病的分子诊断

罗生辉 蔡继勇*

[摘 要] 克雅病(creutzfeldt-jakob disease, CJD)是一种神经系统退行性疾病,临床少见,其早期诊断较困难。目前诊断CJD的分子手段有3种:免疫组织化学、基因检测及脑蛋白标志物。免疫组织化学法发现异常朊蛋白是确诊的金标准,但是很大部分患者生前无法接受脑组织的免疫组织化学检查;基因检测可对CJD的分型及家族性CJD的诊断提供依据,但不是所有朊蛋白基因突变均会导致CJD;脑蛋白标志物的检测在临床上较实用,但所有脑蛋白标志物均有特异性的缺陷。本文旨在总结CJD在分子水平上的研究结果及进展。

[关键词] 克雅病; 朊蛋白; 朊蛋白基因; 14-3-3 蛋白; Tau 蛋白

The molecular diagnosis of creutzfeldt-jakob disease

LUO Shenghui, CAI Jiyong*

(Department of Neurology, The First Hospital of Fuzhou City (the Affiliated Hospital of Fujian Medical University), Fuzhou, Fujian, China, 350009)

[ABSTRACT] Creutzfeldt-jakob disease (CJD) is a rare neurodegenerative disorder. The diagnosis of it is extremely difficult in its early stages. There are 3 diagnostic methods at the molecular level: immunohistochemistry, gene detection, and measurement of brain protein biomarkers. A definite diagnosis of CJD is obtained following the demonstration of the pathologic prion isoform in brain tissues, but a substantial proportion of the cases are not subjected to neuropathology. Although gene detection can provide a basis for the typing and the diagnosis of CJD, not all of the prion protein gene mutation will lead to CJD. The detections of brain protein biomarkers are relatively practical clinically, but all of the brain protein markers are with specific defects. In this paper, the research results and progress of CJD at the molecular level will be summarized.

[KEY WORDS] Creutzfeldt-jakob disease; Prion protein; Prion protein gene; 14-3-3 protein; Tau protein

克雅病(creutzfeldt-jakob disease, CJD)是人类最常见的朊蛋白病,为神经系统退行性疾病,病理基础是神经细胞的朊蛋白空间构象发生变异,出现一种可自我复制并对蛋白激酶抵抗的异构体。该病临床分为散发性CJD、遗传性CJD、医源性CJD 3种。散发性CJD是最常见的类型,约占人类所有朊蛋白病的85%,年发病率在(1~2)/1 000万^[1]。该病表现为快速进行性的认知功能障碍、肌阵挛、视觉障碍、小脑性共济失调、锥体束和锥体外系征、无动性缄默等。分子水平的检查在CJD

的诊断中起到决定性的作用,脑组织病理检查是确诊的金标准。但是在我国,大部分患者在生前无法接受病理检查,死后家属愿意接受尸检的也很少。朊蛋白基因检测可解释CJD的临床表现及个体对异常朊蛋白的易感性,脑蛋白标志物的检测是临床常用的诊断CJD的依据之一。本文将从蛋白质、蛋白标志物和基因3方面总结CJD在分子水平的诊断进展。

作者单位:福建医科大学附属福州市第一医院神经内科,福建,福州 350009

通讯作者:蔡继勇, E-mail: 15736973@qq.com

1 异常朊蛋白检测

正常脑组织存在少量的朊蛋白(normal cellular isform of the prion protein, PrP^c),是一种单基因编码的膜结合性糖蛋白,呈 α 螺旋结构。异常的朊蛋白(protease-resistant prion protein, PrP^{sc})为朊蛋白的异构体,呈 β 片状结构,CJD是PrP^{sc}在脑内沉积所致^[2]。

1.1 从脑组织中检测

异常朊蛋白主要沉积在患者的脑组织中,取活检或尸检患者的脑组织,匀浆后用蛋白酶K(proteinase K)消化,异常朊蛋白不能被蛋白酶K完全消化,用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)或蛋白免疫印迹杂交(Western blot)等方法检测消化后的产物,若仍有朊蛋白,就可以诊断为朊蛋白病^[3]。有学者^[4]应用构像依赖性免疫测定(conformation-dependent immunoassay, CDI)方法检测CJD患者的异常朊蛋白,发现异常朊蛋白在人体内的分布是不均匀的,并且有可能存在对蛋白酶K敏感的异常朊蛋白。

1.2 从外周组织中检测

外周组织取材较容易,损伤小,因此从外周组织检测异常的朊蛋白是很好的研究方向。Rubenstein等^[5]总结了异常朊蛋白在人体中的分布,发现不论是散发性CJD还是变异性CJD,异常朊蛋白的水平在非中枢神经系统的人体组织(脾,淋巴结,扁桃体)没有显著差异。但是从外周组织中检测朊蛋白的检出率低,应用于临床检测还需进一步研究。

虽然脑组织病理检查是金标准,但是脑组织标本不易获得,临床上很难实行,导致很多患者无法被早期诊断;外周组织虽然容易取材,但诊断的阳性率较低。

1.3 从体液中检测

比外周组织更易获得的是患者的体液或外周组织的刷洗液。在临床上,血液、尿液、唾液、脑脊液等体液较容易获得。如果能利用体液检测异常朊蛋白,可极大的方便CJD的早期诊断,但是异常朊蛋白在这些体液中的含量均很低,利用专统方法检测的敏感性很差,因此很多学者应用许多方法提高检测的敏感性。研究者^[6]运用共聚焦双色荧光关联分光镜法(confocal dual-color fluorescence correlation spectroscopy, dual-color FCS)从

CJD患者脑脊液中检测到了PrP^{sc}。随着技术的发展,各种新的方法也被利用,利用朊蛋白错误折叠循环扩增技术(protein misfolding cyclic amplification, PMCA)可从临床前期的绵羊口腔分泌物中检测出异常的朊蛋白^[7],近几年实时震动诱导转化(real-time quaking-induced conversion, RT-QUIC)技术也显示出很大的应用价值。2011年,Atarashi等^[8]首次报道应用RT-QUIC技术扩增检测异常的朊蛋白,从而提高了应用脑脊液检测异常朊蛋白的敏感性。而后也有研究者^[9]应用该技术获取CJD患者的鼻黏膜刷洗液检测异常的朊蛋白,获得很高的灵敏度及特异度(灵敏度97%,特异度100%)。而Peden等^[10]的研究表明,应用该方法检测散发性CJD患者的脑脊液有很高的敏感性,但是对变异性CJD敏感性不高。

但是,异常朊蛋白在体液中的含量低,利用各种扩增的方法虽然可提高检测的敏感性,但不可避免的会出现假阳性的情况。因此,要将上述检测方法应用到临床尚需经过大宗样本的检测,确定有较好的特异性和可重复性之后方可应用。

2 脑蛋白标志物检测

异常朊蛋白是朊蛋白病的特异性蛋白,临床上检测到异常朊蛋白是确诊朊蛋白病的必要条件。异常朊蛋白的检测较困难,研究者们试图找到可代替异常朊蛋白的脑蛋白标志物。

2.1 14-3-3蛋白和Tau蛋白检测

14-3-3蛋白在神经系统中含量最丰富,约占全部可溶性蛋白质的1%,所有神经细胞的胞液与胞核中都有表达^[11]。Tau蛋白主要在中枢神经系统神经元的轴突表达,存在于星形胶质细胞和少突胶质细胞内,在外周神经系统的神经元轴突也有表达。

1998年的世界卫生组织将14-3-3蛋白列入诊断CJD的标准,但14-3-3蛋白在不同分子亚型中变异很大,129密码子基因型、朊蛋白类型、疾病所在分期、临床亚型均会影响14-3-3蛋白含量和检测的敏感性^[12],且14-3-3蛋白在特异性方面也有缺陷。近年来有许多研究发现Tau蛋白优于14-3-3蛋白,Hamlin^[13]和Tagliapietra等^[14]对MRI、14-3-3蛋白和Tau蛋白的对比发现,Tau蛋白的敏感性和特异性优于14-3-3蛋白。在遗传性CJD的研究中,以色列研究人员^[15]发现,Tau蛋白与14-3-3蛋

白在敏感性方面没有区别,但 Tau 蛋白的特异性更高。中国疾病预防控制中心的研究员曾对 200 例很可能的 CJD 患者的脑脊液分析发现,CJD 患者脑脊液 Tau 蛋白升高,以脑脊液 Tau 蛋白含量 1 400 pg/mL 为分界点,其诊断 CJD 的敏感性是 90%,特异性是 94%^[16]。

2012 年美国的指南仍推荐 14-3-3 蛋白作为散发性 CJD 的诊断标志物^[17],Tau 蛋白是否能取代 14-3-3 的蛋白地位还没有结论,但研究表明联合检测这 2 种标志物可提高敏感性及特异性^[18]。

2.2 胸腺素 β 4 蛋白

研究者^[19]通过检测 21 例病理确诊的 CJD 患者的脑脊液的胸腺素 β 4 蛋白,发现用其诊断 CJD 的灵敏度为 100%、特异度为 98.5%。然而该标志物的应用价值仍需进一步研究。

2.3 其他蛋白标志物

S100 蛋白及神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)等蛋白标志物由于特异性差,已没有研究价值。一些标志物如心型脂联合蛋白(heart-type fatty acid binding, H-FABP)^[20]、细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2)^[21]、泛素(ubiquitin)^[22]有待进一步研究。

脑脊液蛋白标志物的检测是目前 CJD 诊断必要检查,也是曾经研究的热门,但特异性差是该类蛋白标志物共有的缺点,随着外周组织及体液异常朊蛋白检测技术的深入研究,脑脊液蛋白标志物的检测在 CJD 的诊断中的地位也将动摇。

3 基因检测

正常的朊蛋白由位于第 20 号染色体短臂上的朊蛋白基因(prion protein gene, *PRNP*)编码^[23]。脑组织出现 PrP^{Sc}的原因有自身 *PRNP* 突变、*PRNP* 翻译错误或感染了外源的 PrP^{Sc}所致。人类 *PrP* 基因存在着多态性,它影响人类对于散发性、遗传性或是医源性 CJD 的易感性。129 位点纯合子较杂合子更易感染朊蛋白。不同位点的基因突变会导致不同类型的 CJD,其临床表现也不一样。

3.1 散发性 CJD 检测

散发性 CJD 约占人类朊蛋白病的 85%^[1]。散发性 CJD 有不同的临床变异型。在 CJD 的临床症状和体征、异常朊蛋白的物理化学特征、异常朊蛋白在脑内损害的部位和沉积的形式上,不同临床

表型有不同表现,表型的不同在很大程度上取决于 *PrP* 基因 129 密码子位点上甲硫氨酸(methionine, M)和缬氨酸(valine, V)的多态性和异常朊蛋白的分子量。根据朊蛋白的糖基化程度不同可有 2 种分子量:第 1 种分子量为 20(20.5 $\pm$ 0.3) kD,为朊蛋白株 1 型(type 1);第 2 种分子量为 19,(18.7 $\pm$ 0.2) kD 为朊蛋白株 2 型(type 2)。有学者^[24]根据 *PrP* 基因 129 位点密码子的多态性和异常朊蛋白的物理化学特征,把散发性 CJD 分成 6 型。研究表明,219 密码子的多态性与 CJD 无明显作用^[25]。

3.2 遗传性 CJD 检测

遗传性 CJD 占 CJD 的 5%~15%^[1],是常染色体显性遗传病,通常都有 CJD 的遗传史,与 20 号染色体短臂上的 *PrP* 基因突变相关。其中最常见的疾病相关突变是第 102 位密码子和第 200 位密码子突变。目前发现的,国外学者报道的可导致 CJD 的突变位点有 178、129、183、211、180,国内学者有报道 114、180、196、203 密码子突变的家族^[26-29],扩大了 CJD 的 *PRNP* 基因突变谱。

3.3 医源性检测

是由于患者接受了医学治疗后感染异常朊蛋白所致,医源性途径主要有角膜移植、硬脑膜移植、注射人生长因子及促性腺激素以及使用被污染的深部电极等^[30]。在对 41 例因注射受污染的人类生长激素或促性腺激素后患 CJD 的患者进行朊蛋白基因 129 密码子的分析中发现,21 例是 129 密码子甲硫氨酸纯合子,17 例为缬氨酸纯合子,3 例是甲硫氨酸/缬氨酸杂合子;12 例与硬脑膜移植有关的 CJD 病例的 129 密码子全部是甲硫氨酸纯合子^[31]。结果表明,129 密码子是纯合子更易感染异常朊蛋白。

4 小结与展望

由于 CJD 的发病率低,国内神经科医生对 CJD 的了解不足,CJD 的诊断率不高。随着国内神经科医生对该病的认识不断加强,CJD 的诊断率也会增加。在诊断 CJD 的脑脊液神经蛋白质中,14-3-3 蛋白是最有价值的脑神经蛋白;脑组织病理检查及异常朊蛋白的检测敏感性及特异性最好,但取材困难;外周组织及体液取材容易,但检测的敏感性差。随着技术的进步,体液及外周组织的刷洗液的异常朊蛋白检测有可能在 CJD 的早期诊断中起到至关重要的作用。

参考文献

- [1] Araujo AQ. Prionic diseases [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2013, 71(9B): 731-737.
- [2] Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells [J]. *J Cell Biol*, 1990, 110(6): 2117-2132.
- [3] Bennion BJ, Daggett V. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(12): 2105-2114.
- [4] Choi YP, Groner A, Ironside JW, et al. Comparison of the level, distribution and form of disease-associated prion protein in variant and sporadic creutzfeldt-jakob diseased brain using conformation-dependent immunoassay and western blot [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 3): 727-732.
- [5] Rubenstein R, Chang B. Re-assessment of PrP(Sc) distribution in sporadic and variant CJD [J]. *Plos One*, 2013, 8(7): e66352.
- [6] Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Ultra-sensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5468-5673.
- [7] Maddison BC, Rees HC, Baker CA, et al. Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(11): 1672-1676.
- [8] Atarashi R, Satoh K, Sano K, et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion [J]. *Nat Med*, 2011, 17(2): 175-178.
- [9] Orru CD, Bongianni M, Tonoli G, et al. A test for creutzfeldt-jakob disease using nasal brushings [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(6): 519-529.
- [10] Peden AH, McGuire LI, Appleford NE, et al. Sensitive and specific detection of sporadic creutzfeldt-jakob disease brain prion protein using real-time quaking-induced conversion [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 2): 438-449.
- [11] Ferl RJ, Manak MS, Reyes MF. The 14-3-3s [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): REVIEWS3010.
- [12] Gmitterova K, Heinemann U, Bodemer M, et al. 14-3-3 CSF levels in sporadic creutzfeldt-jakob disease differ across molecular subtypes [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(11): 1842-1850.
- [13] Hamlin C, Puoti G, Berri S, et al. A comparison of tau and 14-3-3 protein in the diagnosis of creutzfeldt-jakob disease [J]. *Neurology*, 2012, 79(6): 547-552.
- [14] Tagliapietra M, Zanusso G, Fiorini M, et al. Accuracy of diagnostic criteria for sporadic creutzfeldt-jakob disease among rapidly progressive dementia [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 34(1): 231-238.
- [15] Meiner Z, Kahana E, Baitcher F, et al. Tau and 14-3-3 of genetic and sporadic creutzfeldt-jakob disease patients in Israel [J]. *J Neurol*, 2011, 258(2): 255-262.
- [16] Wang GR, Gao C, Shi Q, et al. Elevated levels of tau protein in cerebrospinal fluid of patients with probable creutzfeldt-jakob disease [J]. *Am J Med Sci*, 2010, 340(4): 291-295.
- [17] Muayqil T, Gronseth G, Camicioli R. Evidence-based guideline: diagnostic accuracy of CSF 14-3-3 protein in sporadic creutzfeldt-jakob disease: report of the guideline development subcommittee of the American academy of neurology [J]. *Neurology*, 2012, 79(14): 1499-1506.
- [18] Bahl JM, Heegaard NH, Falkenhorst G, et al. The diagnostic efficiency of biomarkers in sporadic creutzfeldt-jakob disease compared to Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(11): 1834-1841.
- [19] Le PM, Urso E, Sprovieri T, et al. Contribution of cerebrospinal fluid thymosin beta4 levels to the clinical differentiation of creutzfeldt-jakob disease [J]. *Arch Neurol*, 2012, 69(7): 868-872.
- [20] Matsui Y, Satoh K, Mutsukura K, et al. Development of an ultra-rapid diagnostic method based on heart-type fatty acid binding protein levels in the CSF of CJD patients [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30(7): 991-999.
- [21] Steinacker P, Klafki H, Lehnert S, et al. ERK2 is increased in cerebrospinal fluid of creutzfeldt-jakob disease patients [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 22(1): 119-128.
- [22] Steinacker P, Rist W, Swiatek-de-Lange M, et al. Ubiquitin as potential cerebrospinal fluid marker of creutzfeldt-jakob disease [J]. *Proteomics*, 2010, 10(1): 81-89.
- [23] Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie [J]. *Science*, 1982, 216(4542): 136-144.
- [24] Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic creutzfeldt-jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects [J]. *Ann Neurol*, 1999, 46(2): 224-233.
- [25] Lukic A, Beck J, Joiner S, et al. Heterozygosity at polymorphic codon 219 in variant creutzfeldt-jakob disease [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67(8): 1021-1023.
- [26] Liu Z, Jia L, Piao Y, et al. creutzfeldt-jakob disease with PRNP G114V mutation in a Chinese family [J]. *Acta Neurol Scand*, 2010, 121(6): 377-383.
- [27] Zhang H, Wang M, Wu L, et al. Novel prion protein gene mutation at codon 196 (E196A) in a septuagenarian with creutzfeldt-jakob disease [J]. *J Clin Neurosci*, 2014, 21(1): 175-178.
- [28] Shi Q, Shen X, Zhou W, et al. Rare V180I mutation in PRNP gene of a Chinese patient with Creutzfeldt-Jacob disease [J]. *Prion*, 2014, 8(6): 411-414.
- [29] Shi Q, Chen C, Wang XJ, et al. Rare V203I mutation in the PRNP gene of a Chinese patient with creutzfeldt-jakob disease [J]. *Prion*, 2013, 7(3): 259-262.
- [30] Brown P, Brandel JP, Sato T, et al. Iatrogenic creutzfeldt-jakob disease, final assessment [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(6): 901-907.
- [31] Belay ED. Transmissible spongiform encephalopathies in humans [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 283-314.

新型肿瘤标志物人附睾蛋白4的临床应用

王雅菲 王丽娟 托娅*

[摘 要] 人附睾蛋白4(human epididymis 4, HE4)是近年来新发现的肿瘤标志物。卵巢癌风险评估(risk of ovarian malignancy algorithm, ROMA)模型通过计算HE4和CA125的联合指数,对于卵巢癌的诊断有较高参考价值。目前血清HE4水平作为卵巢癌诊断、疗效评估及预后判断的新指标已经逐渐应用于临床。亦有研究显示HE4在肺癌患者血清和恶性胸腔积液患者胸水中呈现较高水平表达,提示其在肺癌诊断、预后评估方面的良好作用。本文就HE4在卵巢癌及肺癌的研究现状作一综述,以系统展示HE4的生物学诊断价值。

[关键词] HE4; 卵巢癌; 肺癌; 恶性胸腔积液

The clinical application of the new tumor marker of human epididymis 4

WANG Yafei¹, TUO Ya^{2*}, WANG Lijuan¹

(1. Academy of Inner Mongolia Medical University, Huhhot, Inner Mongolia, China, 010059; 2. Department of clinical laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China, 100050)

[ABSTRACT] The human epididymis protein 4 (HE4) is a novel tumor marker which was discovered in recent years. Risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) model by calculating the combination index of HE4 and CA125, has a high reference value for the diagnosis of ovarian cancer. At present, serum HE4 level as a new indicator for the diagnosis, therapeutic evaluation, and prognosis of ovarian cancer has been applied to the clinic gradually. The existing research shows serum HE4 of patients with lung cancer and HE4 in pleural effusion of patients with malignant pleural effusion presented higher levels of expression, suggesting a promising potential in the diagnosis and the prognosis evaluation of lung cancer. In this paper, the research status of HE4 in ovarian cancer and lung cancer will be reviewed to show its value in the diagnosis of HE4 systematically.

[KEY WORDS] HE4; Ovarian cancer; Lung cancer; Malignant pleural effusion

卵巢癌(ovarian cancer)是发病率、死亡率均较高的女性生殖系统肿瘤。由于发病早期临床症状不明显,大多数患者就诊时已处于癌症晚期阶段,预后不良,所以提高卵巢癌早期检出率是改善患者预后的关键。传统用于卵巢癌筛查的主要方法是妇科超声结合血清CA125,但CA125诊断特异度和灵敏度不理想且假阳性率较高^[1],临床应用存在一定的局限性。因此亟待找到更可靠的、可以提高卵巢癌早期检出率的肿瘤标志物。近年来人附睾蛋白4(human

epididymis 4, HE4)作为新型肿瘤标志物被广泛研究,大量研究证实对于早期卵巢癌HE4敏感性高于CA125,被誉为近几十年来第一个能有效的提高卵巢癌早期检出率的肿瘤标志物^[2]。同时,HE4在肺癌、恶性胸腔积液患者诊断、鉴别诊断及预后方面良好作用的相关研究,也将为肺癌的临床诊断及预后评估提供新的血清学指标。现对HE4的生物学特征、组织表达及其在卵巢癌、肺癌的诊断、疗效评估和病情监测等方面的研究现状予以综述。

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0854)

作者单位:1. 内蒙古医科大学研究生学院,内蒙古,呼和浩特 010059

2. 内蒙古医科大学附属医院检验科,内蒙古,呼和浩特 100050

*通讯作者:托娅, E-mail: antuoya@163.com

1 HE4的生物学特性及组织表达

1991年由Kirchhoff等^[3]在人类附睾远端上皮细胞中发现位于人类染色体20q12-13.1上的、包含4个内含子和5个外显子的HE4基因。作为乳清酸蛋白(whey acidic proteins, WAP)家族成员之一, HE4分子结构中包含特征性WAP结构域(8个半胱氨酸残基构成的4-二硫化物核心)。HE4是一种分子量较小的、酸性的、富含半胱氨酸的、显示分泌蛋白特性的多肽,属于蛋白酶抑制剂家族中的一种,在组织免疫系统中发挥着极其重要的作用。

Gao等^[4]发现HE4的表达可诱发细胞凋亡的产生,一方面表明其在调节细胞增殖方面的关键性作用,另一方面显示其在ES-2、SKOV-3和T29细胞系体外生长中的抑制作用。同时,研究者将HE4基因转入癌细胞后,发现其能起到抑制细胞转移和活体内移植瘤形成的作用。此外还可通过WAP结构域基因簇编码的具有高度同源性物质间接体现HE4参与肿瘤形成的作用, Clauss等^[5]发现卵巢癌中与HE4位于同一基因簇的弹力素高表达,且与患者5年生存率负相关,研究发现可能与其激活了参与炎症相关肿瘤形成的核转录因子- κ B(NF- κ B)信号转导通路有关。血清HE4测定受年龄、孕期、吸烟史及肾功能等影响^[6],须统一影响因素后行临床试验以进一步验证其与相关肿瘤发生发展的关系,从而使HE4在肿瘤诊断及病情监测中发挥更准确、更关键的作用。另有研究发现除血清中可检测到HE4外,通过酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)在尿液中亦可检测到,灵敏度与血清平行,特异度高达94.4%^[7],因此通过尿液这种非侵入性检查也可对卵巢癌进行病情评估。

HE4可以在人体正常组织表达,并非肿瘤特异性表达蛋白。研究发现在正常组织中,HE4呈现较高水平表达于唾液腺和呼吸道的上皮细胞中,而卵巢表面上皮HE4阴性表达;在肿瘤组织中,以卵巢浆液性癌阳性表达最高,其次较高水平阳性表达于肺腺癌、乳腺癌、胰腺癌、移行细胞癌,较低水平表达于胃癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌^[8]。此项研究充分说明了HE4对于卵巢癌与肺癌诊断方面的良好作用。HE4自发现以来受到各方的密切关注,随着对其研究的与日俱增,HE4在肿瘤发病、病情进展及预后中所起作用得到进一步阐述,这将为肿瘤的生物诊断开辟新的方法。

2 HE4与卵巢癌

美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)2008年批准血清ELISA检测HE4作为诊断卵巢癌的血清学指标^[9-11]。我国对于HE4认识起步较晚,对卵巢癌与HE4相关的研究近年来逐渐增加,现就近几年卵巢癌与HE4的研究进行总结如下。

有回顾性研究利用免疫组织化学技术检测在上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)和卵巢交界性肿瘤组织标本的基因表达^[12]。研究显示EOC I型和II型HE4表达方面存在显著性差异。不同临床病理特征之间的I型和II型EOC表明两级EOC系统合理可靠。HE4会成为一个强大的生物标志物来区分交界性肿瘤II型EOC,但它在I型EOC的作用是有限的。大多数晚期卵巢癌患者经过主要治疗后复发,预后极差。随访患者的血清标志物水平的监测对于早期发现复发是必不可少的。研究发现HE4在前6个月复发风险评估工具中是较为敏感的指标^[13]。化疗耐药是上皮性卵巢癌患者的一个难题,研究显示肿瘤化疗耐药对治疗的反应和生存的影响与卵巢癌生物标志物HE4升高的血清水平相关^[14]。通过MTS检测和Western印迹等来评估HE4表达SKOV3、OVCAR8克隆对顺铂和紫杉醇耐药。结果证实HE4的过度表达促进侧支耐顺铂和紫杉醇,并下调HE4部分逆转这种耐药。多种因素可能参与介导耐药HE4,包括MAPK信号放松管制,以及微管蛋白水平或稳定性的改变。另有学者^[15]通过电化学发光免疫分析法测定158人血清HE4, CA125及卵巢癌风险评估(risk of ovarian malignancy algorithm, ROMA)指数,其中包括64例卵巢癌、64例卵巢良性肿瘤和30例健康人。结果显示在卵巢良性肿瘤组与正常对照组比较,血清CA125水平明显升高($P < 0.05$)而HE4水平在2组相似。在卵巢癌组,ROMA指数、HE4和CA125的受试者工作特征曲线下面积分别为0.994、0.990和0.941。在绝经前卵巢癌组HE4的特异性和阳性预测值分别为98.36和95%。结果表明,血清HE4水平和ROMA指数在提高卵巢癌诊断效率是非常有价值的。

ROMA模型是2008年Moore等^[16]首次提出,通过计算HE4和CA125的联合指数,用于预测绝经前后女性罹患卵巢癌的可能性。ROMA指数已于

2011年通过了美国FDA的批准,用于临床卵巢癌风险评估^[17]。评估公式如下[预测指数(predictive index, PI);自然对数(natural logarithm, LN);指数函数(exponential function, Exp)]:绝经前妇女: $PI = -12.0 + 2.38 \times \ln[HE4] + 0.0626 \times \ln[CA125]$;绝经后妇女: $PI = -8.09 + 1.04 \times \ln[HE4] + 0.732 \times \ln[CA125]$;预测罹患卵巢癌的可能性:ROMA(预测可能性%) = $\text{Exp}(PI) / [1 + \text{Exp}(PI)] \times 100$ 。刘静等^[18]通过检索国内外已发表的12篇关于ROMA指数在卵巢癌诊断中临床价值的相关文献,应用循证医学的方法,随机效应模型综合分析效应量,对ROMA指数进行Meta分析,得出ROMA指数在卵巢癌的诊断中的敏感性为89%,特异性为79%,阳性预测值67%,阴性预测值91%,进一步证实了ROMA指数对于卵巢癌的诊断有较高的价值。多位学者^[19-21]回顾性分析卵巢癌患者与健康女性的血清水平,计算ROMA指数综合评价卵巢癌的风险性,其结果均证明ROMA指数在卵巢癌的诊断与鉴别诊断方面的灵敏度和特异度比单一检测HE4或CA125要高。目前亚太地区以有多个ROMA多中心实验研究基地,基于中国人群的ROMA多中心研究也已开展,2013年5月西安检验会发布的数据显示,ROMA对存在盆腔肿块的妇女进行危险分层,其敏感性为86%,阴性预测值可达93%^[22],ROMA指数有临床应用价值。相信ROMA指数的临床应用,会使更多的中国女性从中获益。

3 HE4与肺癌

肺癌为人类健康的主要杀手之一,其发病率和死亡率近年来逐年递增^[23]。除目前广泛应用于临床的影像学、病理学诊断方法外,血清肿瘤标志物的检测亦极为重要。血清癌胚抗原、细胞角蛋白片段19、神经元特异性烯醇化酶等用于检测肺癌的肿瘤标志物已广泛投入临床应用,但这些肿瘤标志物敏感性不高,常在肿瘤负荷较重时才明显升高,因此,积极寻找敏感度和特异度相对较高的肿瘤标志物成为目前提高肺癌早期诊断率亟待解决的问题。

HE4表达于大部分肺癌,局部表达于小细胞肺癌和大细胞肺癌,在肺鳞癌表达却是少数^[24],表明肺癌发生与HE4组织表达存在一定相关性。Yamashita等^[25]用免疫组化法确定HE4的表达,临床病理因素和生存率比较结果显示,免疫组化HE4表达与临床病理因素无明确相关性,但腺癌亚型与HE4表达呈显著相关。免疫组化HE4阳性组

(44.6%)5年生存率与阴性对照组存在明显差异(82.3%, $P=0.001$),HE4阳性组5年总生存率是60.1%,相比之下,HE4阴性组为90.8%($P=0.001$)。除此之外,淋巴结状态也具有重要参考价值。Iwahori等^[26]用ELISA法对49例肺癌患者和18例卵巢癌患者血清HE4水平进行测定,当临界值设为262.4 pmol/L时,敏感度为89.8%,特异性为100%,血清HE4 ROC曲线下面积(area under the ROC curve, AUC)为0.988,肺癌患者和健康对照组存在显著差异。血清HE4浓度在非小细胞肺癌、小细胞肺癌和卵巢癌患者较健康对照组均显著增高。另外该研究还评估了24例化疗后肺癌患者的血清HE4水平与总体生存率之间的关系,表明化疗后血清HE4的高水平表达(7.5 ng/mL)与治疗总体生存率密切相关。Tokuishi等^[27]发现HE4-V3与肺癌患者预后密切相关,HE4-V3高表达组5年无病生存期与低表达组相比,预后良好,差异具有显著性($P=0.002$),HE4-V3高表达组5年总生存率较低表达组显著增高($P=0.008$)。这些数据显示:HE4-V3的高水平表达与肺腺癌的良好预后有关。

我国学者也做了肺癌与HE4方面研究。于飞等^[28]通过研究表明,肺癌的病理类型及TNM分期对患者HE4血清浓度影响较小。实验通过ELISA方法检测肺癌患者血清HE4、癌胚抗原(cancer embryo antigen, CEA)、细胞角蛋白19片段(carbohydrate antigen 211, CA211)、神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enzyme, NSE)、鳞状细胞癌相关抗原(squamous cell carcinoma associated antigen, SCC)浓度,发现HE4参与的联合检测的诊断阳性率可提升到89.72%。肺腺癌CEA和CA211联合检测阳性率为68.46%,而HE4参与的联合检测阳性率则明显提升(82.31%)^[29],血清HE4浓度可作为判断肺癌患者预后的独立指标^[30]。通过综述国内外研究结果表明,血清HE4浓度与肺癌临床分期、癌组织分化程度及淋巴结转移等关系仍存在争议,相信通过后续更多大样本前瞻性研究,会进一步明确HE4在肺癌诊断及预后评估方面的应用前景。

4 HE4与胸腔积液

胸腔积液由胸腔内部肿瘤直接侵犯或胸外肿瘤转移至胸膜而致,恶性胸腔积液最常见的病变为肺部肿瘤。研究者^[31]将88例胸腔积液患者分为3组,分别为漏出性胸腔积液患者22例,非恶性渗出

性胸腔积液患者 32 例,恶性胸腔积液患者 34 例,采用免疫法测定血清 HE4 浓度,结果显示:恶性胸腔积液患者血清 HE4 水平和胸腔积液 HE4 水平较漏出性或非恶性渗出性胸腔积液患者显著增高。当胸腔积液临界值为 1 675 pmol/L, HE4 预测恶性胸腔积液的敏感性为 85.3%,特异性为 90.7%。表明 HE4 具有作为诊断恶性胸腔积液生物标志物的潜在效能。另有学者^[32]对胸腔积液蛋白质谱进行研究显示与可溶性间皮素相关蛋白(soluble mesothelin-related proteins, SMRP)相比,HE4 在诊断恶性胸膜间皮瘤方面并没有发挥更大作用。目前 HE4 与良恶性胸腔积液鉴别诊断的相关研究还相对甚少,有待我们进行更进一步的研究考证,从而明确其在胸水性质鉴别应用中的价值。

5 前景展望

目前一些国家已将 HE4 作为辅助诊断卵巢癌的生物医学依据应用于临床。以往研究对象主要集中于欧美人群,如在我国进行广泛的临床推广,还需基于中国人群进一步开展临床试验,以明确 HE4 的应用价值。另外 HE4 与肿瘤分期、分级、淋巴结转移及参考值设置仍存在争议,相信随着对 HE4 更多大样本研究的与日俱增,也将促使 HE4 生物学诊断价值得到充分的论证。且利用罗氏公司开发的电化学发光法检测 HE4,实现了自动化及智能化,使临床需求得到更好的满足。HE4 的检测作为一种诊断效能较好的非侵入性检查,结合临床、其他血清学指标及影像学检查,将在实际应用中发挥更好的作用。

参考文献

- [1] Hellstrom I, Hellstrom KE. fTwo novel biomarkers, mesothelin and HE4, for diagnosis of ovarian carcinoma[J]. Expert Opin Med Diagn, 2011, 5(3): 227-240.
- [2] Barbieri RL. In women who have a pelvic mass have you tried this new ovarian Cabiomarker? [J]. OBG Management, 2010, 22(4):8-12.
- [3] Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors [J]. Biol Reprod, 1991, 45(2):350-357.
- [4] Gao L, Cheng HY, Dong L, et al. The role of HE4 in ovarian cancer: inhibiting tumour cell proliferation and metastasis [J]. J IntMed Res, 2011, 39(5): 1645-1660.
- [5] Clauss A, Ng V, Liu J, et al. Over expression of elafin in ovarian carcinoma is driven by genomic gains and activation of the nuclear factor kappa B pathway and is associated with poor overall survival [J]. Neoplasia, 2010, 12(2):161-172.
- [6] Karlens NS, Karlens MA, Hogdall CK, et al. HE4 tissue expression and serum HE4 levels in healthy individuals and patients with benign or malignant tumors: a systematic review [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers, 2014, 23(11):2285-2295.
- [7] Hellstrom I, Heagerty PJ, Swisher EM, et al. Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms[J]. Cancer Lett, 2010, 296(1):43-48.
- [8] Galgano MT, Hampton GM, Jr FH. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues[J]. Mod Pathol, 2006, 19(6):847-853.
- [9] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2):402-408.
- [10] Holcomb K, Vucetic Z, Miller MC, et al. Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in premenopausal women [J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 205(4):358-366.
- [11] Karlsen MA, Sandhu N, Hogdall C, et al. Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2012, 127(2):379-383.
- [12] Jiang J, Bo D, Chang X, et al. Discrepant clinicopathologic characteristics and HE4 performance in type I and type II epithelial ovarian cancer [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):21303-21310.
- [13] Steffensen KD, Waldstrøm M, Brandslund I, et al. Identification of high-risk patients by human epididymis protein 4 levels during follow-up of ovarian cancer [J]. Oncology Letters, 2016, 11(6):3967-3974.
- [14] Ribeiro JR, Schorl C, Yano N, et al. HE4 promotes collateral resistance to cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer cells[J]. J Ovarian Res, 2016, 9(1):28.
- [15] Wei SU, Li H, Zhang B, The diagnostic value of serum HE4 and CA125 and ROMA index in ovarian cancer[J]. Biomed Rep, 2016, 5(1):41-44.
- [16] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiplenovel tumor biomarkers for the detection of

- ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(2):402-408.
- [17] Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass [J]. *Obstet Gynecol*, 2011, 118(2):280-288.
- [18] 刘静, 曲芃芃. ROMA 指数在卵巢癌诊断中临床价值的 Meta 分析 [J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(3):209-213.
- [19] 王坤, 玉萍, 郭亚琼. ROMA 指数在卵巢恶性肿瘤诊断中的应用价值 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(7):666-668.
- [20] 高岚, 许浚实, 张福明. 血清 HE4、CA125 及 ROMA 指数在卵巢癌诊断中的价值评价 [J]. *医药论坛杂志*, 2015, 36(9):8-9.
- [21] 邓拥军, 郭秋霞. HE4、CA125、ROMA 联合应用诊断卵巢良性与恶性肿瘤的作用 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(1):102-104.
- [22] 雅培. 中国人群卵巢癌风险评估进展 [R]. 全国检验医师大会, 2013.
- [23] Jemal A, Siegel R, Xu J. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5):277-300.
- [24] Bingle L, Cross SS, High AS, et al. WFDC2 (HE4): A potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung [J]. *Espir Res*, 2006, 7(5):61.
- [25] Yamashita S, Tokuishi K, Hashimoto T, et al. Prognostic significance of HE4 expression in pulmonary adenocarcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(2):265-271.
- [26] Iwahori K, Suzuki H, Kishi Y, et al. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(4):1141-1149.
- [27] Tokuishi K, Yamashita S, Ohbo K, et al. Splice variant HE4-V3 expression is associated with favorable prognosis in pulmonary adenocarcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(1):103-109.
- [28] 于飞, 王倩, 钟殿胜, 等. 血清人附睾蛋白 4 检测对肺癌的诊断意义 [J]. *天津医药*, 2014, 42(2):116-118.
- [29] 肖然, 胡昊昀, 王瑞, 等. 血清肿瘤标志物 HE4 检测在肺癌诊断中的应用价值探讨 [J]. *检验医学*, 2014, 29(9):893-896.
- [30] 薛霞, 杨凡, 单咏梅, 等. 血清人附睾蛋白 4 检测在肺癌诊断中的意义 [J]. *实用检验医师杂志*, 2013, 5(2):96-98.
- [31] Elsammak MY, Attia A, Hassan HA, et al. Evaluation of pleural fluid human epididymis 4 (HE4) as a marker of malignant pleural effusion [J]. *Tumor Biol*, 2012, 33(5):1701-1707.
- [32] Hegmans JP, Veltman JD, Fung ET, et al. Protein profiling of pleural effusions to identify malignant pleural mesothelioma using SELDI-TOF MS [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2009, 8(5):323-332.

(上接第 345 页)

- [9] Hollis BW, Johnson D, Hulsey TC, et al. Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(10):2341-2357.
- [10] Zarnani AH, Shabbazi M, Salek-Moghaddam A, et al. Vitamin D3 receptor is expressed in the endometrium of cycling mice throughout the estrous cycle [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8):2738-2743.
- [11] Wojtusik J, Johnson PA. Vitamin D regulates antimüllerian hormone expression in granulosa cells of the hen [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(3):91.
- [12] Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation uterine hypoplasia and growth retardation after weaning [J]. *Nat Genet*, 1997, 16(4):391-396.
- [13] Du H, Daftary GS, Lalwani SI, et al. Direct regulation of HOXA10 by 1, 25-(OH)2D3 in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(9):2222-2233.
- [14] Conroy AL, Silver KL, Zhong K, et al. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(2):215-226.
- [15] Ota K, Dambaeva S, Han AR, et al. Vitamin D deficiency may be a risk factor for recurrent pregnancy loss by increasing cellular immunity and autoimmunity [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(2):208-219.
- [16] Zhao M, Chen YH, Dong XT, et al. Folic acid protects against lipopolysaccharide-induced preterm delivery and intrauterine growth restriction through its anti-inflammatory effect in mice [J]. *Plos One*, 2013, 8(12):e82713.
- [17] 范雅萍, 朱中平, 吴祥林. 孕妇血镉、铅、钙、铜、锌水平与稽留流产的关联性研究 [J]. *广东医学院学报*, 2014, 32(4):454-457.

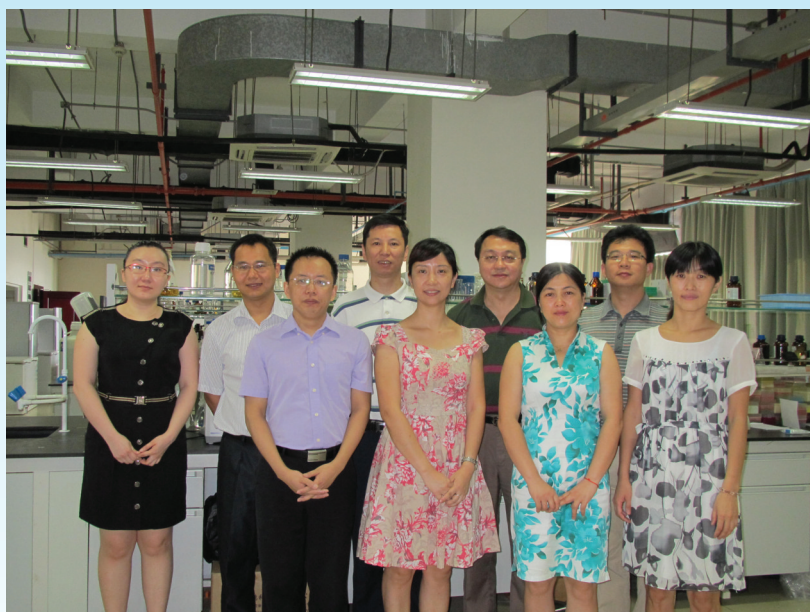
南方医科大学生物技术学院抗体工程研究所

南方医科大学生物技术学院抗体工程研究所位于广州市广州大道北1838号,前身为第一军医大学热带军队卫生学系热带病研究室,是广东省高等学校科研型重点实验室,器官衰竭国家重点实验室组成单位,广东省热带病研究重点实验室、广东省体外诊断协同创新中心。现有科研教学人员11人,其中高级职称9人,博士生导师3名,硕士生导师5名,客座教授1名。拥有教学、科研场所1314 m²,其中达到万级和百级净化实验区300 m²。配备了一批从基因工程、抗体工程、蛋白质工程、分子诊断等研究的成套设备,合计约1500万元。

经过多年的发展建设,实验室形成了抗体工程、分子诊断、蛋白质组学及病原体免疫等优势技术领域,已建立了高通量抗原/抗体制备、抗体应用、疾病靶标发现和表位分析、各种分子的标记技术、分子诊断试剂盒研制等技术平台,初步形成了以抗体工程为主要研究方向的特色科研创新体系,其中关键技术被Nature、Nature Biotechnology等期刊专文评述。在实验室研究用抗体产品、体外诊断抗体产品、基于抗体的生物芯片和治疗性抗体产品等几个层次上开发应用性强、国内外市场前景广阔的系列抗体产品。

2010年以来研究所承担国家重大科技专项(传染病专项)、国家“863”计划项目、国家973计划项目、国家自然科学基金,广东省及广州市科技计划基金等40余项,总经费达2000余万元。获军队科技进步二等奖、广东省科技进步二等奖、广东省科技进步三等奖等3项。累计发表科研论文320篇、教学论文23篇。其中SCI收录论文100余篇,累计影响因子达300分(单篇IF>10)。主编、副主编专著及科普书籍5部。获得授权专利7项。参与制定行业标准2项。培养和招收博士后、博士及硕士研究生68名。

学科带头人李明教授长期从事分子诊断、抗体工程与应用技术研究,在生物标志物发现与鉴定、分子诊断等方面特色和优势,部分论文发表在Hepatology、J Proteome Res、Mol Cell Proteomics等杂志上。



学科带头人吴英松教授从事分子诊断和新型免疫学检测技术研究,在稀土元素作为免疫学检测的示踪物方面形成了特色和优势。部分论文发表在Oncotarget、Analytica Chimica Acta、Analyst等杂志上。

→ 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