ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号：46-283

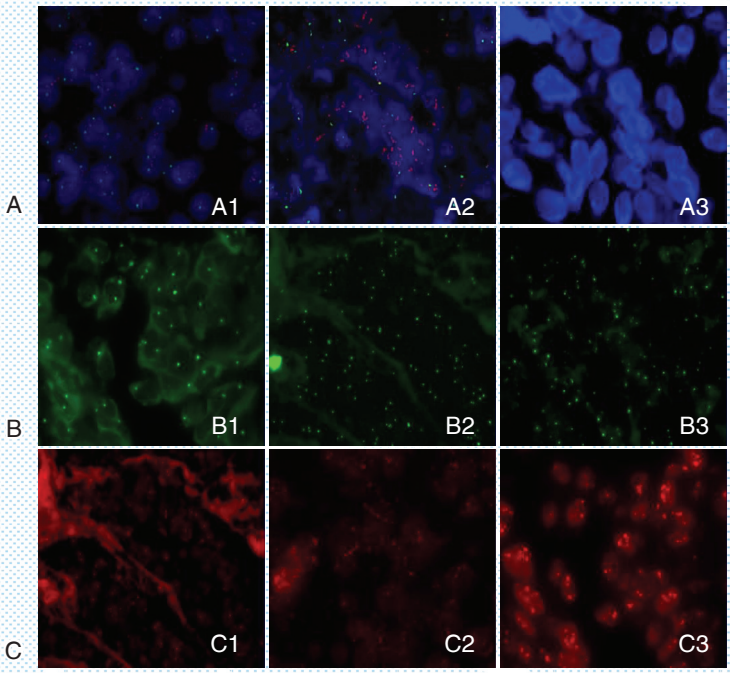
分子诊断与治疗杂志

FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2018 年 3 月　第 10 卷　第 2 期　总第 54 期

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 10　Number 2　March 2018



A：DAPI 轮廓；B：红色信号强度；C：绿色信号强度。其中，A1、B1、C1 为消化严重过度，A2、B2、C2 为消化过度，A3、B3、C3 为消化适中。

图（P112）　FISH 背景及信号强度检测结果

Figure（P112）　FISH test of background and signal intensity results

中山大学　主管

中国科技核心期刊（中国科技论文统计源期刊）
中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊
中国期刊全文数据库全文必录期刊
中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊
中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊
中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929
9 771674 692099 03>

分子诊断与治疗杂志
二〇一八年三月
第十卷　第二期
中山大学

刘万里

刘万里，男，1968年1月20日出生。2003年毕业于重庆医科大学和军事医学科学院，获分子生物学硕士和临床检验诊断学博士。

主任检验技师，硕士生导师。现任中山大学肿瘤防治中心检验科主任。担任广东省医学会检验学会常委，广东省医师学会检验学会常委，广东健康学会检验分会副主委，中国检验医师学会精准检测与精准诊断学会常委，中国教育协会肺部肿瘤专委会检验分会副主任委员，广东抗癌学会分子诊断学会候任主委。

主要研究方向肿瘤早期筛查标志物的筛选，肿瘤标志物检测新方法建立和检测试剂盒研制，肿瘤标志物在肿瘤筛查和预后判断中临床价值评价。首次发现和命名模式识别受体LSECtin；提出VCA-IgA和EBNA1-IgA组合模型是鼻咽癌早期筛查的最佳指标；通过血清蛋白质组技术发现食管癌患者血清中CDC25B和BMI-1自身抗体，可作为食管癌的诊断标志物；采用RNA测序和生物信息学技术建立了血清标志物诊断食管癌数学模型。主持和参加多项国家自然科学基金和国家重大科研计划项目，在Gastroenterology，J Virol，JBC，Biosens Bioelectron等杂志发表30余篇SCI论文。《分子诊断学-基础与临床》副主编，《临床肿瘤学》编委。培养硕士研究生6名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2018 年 3 月 第 10 卷 第 2 期 总第 54 期 Bimonthly Volume 10 Number 2 March 2018

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	来茂德　申子瑜
主编	李明
编辑部主任	郝芬
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰　叶萍萍　李彩珍　黄文珊
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 10~11 楼（510620）
电话	（020）32290177　32290789-206
传真	（020）32290177
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
广告经营许可证	粤工商广字第 01139 号
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2018 年 3 月 18 日
定价	RMB 15.00 元
Responsible Institution	*Sun Yat-sen University*
Sponsor	*China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.*
Organizer	*DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University*
Consultant	*LAI Maode　SHEN Ziyu*
Editor in Chief	*LI Ming*
Managing Director	*HAO Fen*
Editorial Office	*<JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office*
Editors	*LI Xiaolan　YE Pingping　LI Caizhen　HUANG Wenshan*
Editing	*China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.*
Add	*10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620*
Tel	*（020）32290177　32290789-206*
Fax	*（020）32290177*
E-mail	*jmdt@vip.163.com*
CSSN	*ISSN 1674-6929* *CN 44-1656/R*
Printing	*TianYi Yofus Technology Co., Ltd.*
Publish Date	*2018.3.18*
Price	*RMB 15.00*

分子诊断与治疗杂志

双月刊　2018年3月　第10卷　第2期

目　　次

述　评

论　著

综　述

专家风采

实验室巡礼

JOURNAL OF
MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 2 March 2018

CONTENTS

COMMENTS

ORIGINAL ARTICLES

·述　评·

高通量测序背景下的单基因遗传病分子诊断进展

蔡奥捷　薛淑文　孔祥东*

［摘　要］ 单基因遗传病(monogenic disease)指由单个或单对等位基因突变导致的疾病,一般遵循孟德尔遗传规律,传统的单基因遗传病诊断通常依赖于系谱分析、生化、影像等手段。近年来,分子诊断技术特别是高通量测序技术已经成为单基因遗传病的主要诊断手段,对单基因遗传病的明确诊断、预防和指导治疗发挥着越来越重要的作用。本文对40多年来单基因遗传病分子诊断技术的发展进行回顾,介绍其最新进展,并展望其在单基因遗传病未来的研究进展。

［关键词］ 单基因遗传病; 分子诊断; 高通量测序

Advances in genetic diagnosis of monogenic diseases under high-throughput sequencing

CAI Aojie, XUE Shuwen, KONG Xiangdong*
(Center of Prenatal Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

[ABSTRACT] Monogenic diseases refer to diseases caused by a single gene or a single allele mutation that can be readily explained by mendelian inheritance. Traditional genetic diagnosis of monogenic diseases usually depends on pedigree analysis, biochemical, imaging, etc. In recent years, molecular diagnostic techniques, especially high-throughput sequencing technology, have become the primary diagnostic tool for monogenic diseases. These molecular techniques play an increasingly significant role in the diagnosis, prevention and treatment of monogenic diseases. In this review, the developments of molecular diagnostic techniques over the past 40 years in the context of monogenic diseases will be discussed, and the latest progress and its prospect on future research will be introduced.

[KEY WORDS] Monogenic disease; Molecular diagnostics; High-throughput sequencing

单基因遗传病(monogenic disease)指由单个或单对等位基因突变导致的疾病,一般遵循孟德尔遗传规律。目前,人类已知的单基因病已经超过10 000种,尽管单个病种的发病率很低,通常被称为罕见病,但是因种类多,在人群中仍有着大约1/100的总体发病率[1],因此罕见病其实并不罕见。很长一段时间里,受技术所限,单基因病既不能防,也不能治。随着分子生物学技术的发展,越来越多的单基因病可以预防,有的也可以治疗,甚至基因治疗。而基因诊断或称分子诊断成为单基因遗传病防治的主要前提手段之一。

分子诊断是当代医学发展的重要前沿领域之一,其核心技术是基因诊断。最早的分子诊断技术是Southern[2]于1975年发明的DNA印迹技术。1976年,美籍华裔科学家简悦威成功应用液相DNA分子杂交技术实现了镰形细胞贫血症的基因诊断[3],是人类遗传病诊断开始进入分子诊断时代的重要里程碑。随着高通量测序技术的发展,适

基金项目:2016年度河南省产学研合作项目(162107000017)
作者单位:郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心,河南,郑州 450052
*通讯作者:孔祥东, E-mail:kongxd@263.net

用于单基因遗传病的临床分子诊断技术得到迅速发展。本文回顾了传统的单基因遗传病基因诊断方法和以高通量测序为代表的分子诊断方法的研究进展，以期为临床遗传病诊断工作提供一些有益的参考。

1 单基因遗传病分子诊断的应用

目前分子诊断在单基因遗传病临床工作中的主要应用包括6个方面：①临床确诊诊断，通过分子诊断鉴定或鉴别单基因病已成为临床常规工作，最常见的是小儿内科、神经内科、内分泌科、肾病科等，分子诊断在一定程度上已经可以取代常规的诊断，例如脊肌萎缩症（spinal muscular atrophy，SMA）的基因诊断，杜氏肌营养不良症（Duchenne muscular dystrophy，DMD）的基因诊断都已经成为了一线诊断。②症状前遗传学诊断，某些遗传代谢病或迟发性遗传病如果早发现、早治疗，对于避免致病、致残十分重要。例如肝豆状核变性（hepatolenticular degeneration，HLD）家庭，患者如果早期发现并及时进行驱铜治疗则可以避免发病，而通过分子诊断可以实现早期诊断，有助治疗。③新生儿遗传代谢病筛查，大多数新生儿疾病为单基因遗传病，但这些严重遗传病的表型大多相似，难以通过常规方法鉴定或鉴别，通过新生儿遗传代谢病或先天性免疫缺陷症的分子诊断，可以及时诊断遗传病，让医生和家属少走弯路，并且可对下次妊娠提供科学咨询。④产前诊断，通过孕早、中期的胎儿绒毛、胎儿羊水的DNA的分子诊断，可以明确胎儿是否为遗传病患者。⑤胚胎植入前遗传学诊断，单基因遗传病家系在孕妇进行胚胎植入前，对胚胎进行分子诊断来选择健康的胚胎进行植入，可避免孕中期产前诊断时如确诊为患胎时所带来的治疗性流产的痛苦选择。⑥孕前或群体单基因遗传病筛查，隐性遗传病具有生育突发性、隐蔽性的风险，孕前进行夫妇双方的隐性遗传病携带者筛查，可使隐性遗传病携带者夫妇避免生育隐性遗传病患儿。

2 常规单基因遗传病分子诊断技术

2.1 Southern印迹技术（Southern blot）

Southern于1975年发明了DNA印迹技术。Southern blot是最为经典的DNA分子检测方法，曾广泛运用于各种基因突变的检测，包括缺失、插入、易位等，因步骤繁琐、电离辐射等缺点逐步退出了主流的检测领域，但其对面肩肱肌营养不良的基因诊断尚不能被替代[4]，除此之外，近年来很少见到有其他单基因遗传病应用Southern印迹技术进行诊断的报道。

2.2 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）

PCR技术由美国PE Cetus公司的Kary Mullis在1985年建立[5]，已经成为核酸分子扩增检测最常用的方法。在单基因遗传病分子诊断中，有些基因突变如大片段缺失可直接采用PCR技术进行检测，例如*DMD*基因大片段缺失的男性患者可直接经PCR扩增后采用琼脂糖电泳检测技术进行*DMD*的分子诊断[6]。目前PCR技术主要作为常规基因诊断的前期必要步骤，如多重连接探针扩增技术（multiplex ligation-dependent probe amplification，MLPA）、Sanger测序、芯片杂交等的基础步骤，因此PCR是许多分子诊断技术的基础方法，目前是分子诊断实验室的主流技术之一。

2.3 多重连接探针扩增技术（MLPA）

MLPA技术于2002年由Schouten等[7]首先报道，是一种能够在同一反应管内检测多达50个核苷酸序列的拷贝数变化的方法。其具有特异性高、精确度高、重复性好、操作简便、高通量等优点。MLPA技术可检测出若干人类基因拷贝数的变异，也可检出已知点突变，现已广泛应用于存在基因缺失/重复突变、点突变的人类遗传疾病的分子诊断，如DMD/BMD、SMA、迪格奥尔格综合征（Di George's syndrome）等[8-10]。但MLPA对DNA浓度和纯度要求高，只能检测基因或染色体数目的异常或已知点突变，不能筛查未知点突变和平衡易位等，另外MLPA技术的开展必须要求毛细管电泳设备。

2.4 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术（polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP）

PCR-RFLP技术主要是针对PCR产物，选择特异的限制性内切酶进行酶切，然后采用琼脂糖电泳或聚丙烯凝胶电泳技术分离酶切片段，目前临床上主要用于具有突变热点的基因检测，如SMA致病基因*SMN*基因的突变热点Exon7缺失的检测，*FGFR3*基因突变热点cll38A>G位点的突变检测等[11-12]。

2.5 三引物PCR（triplet repeat primed PCR，TP-PCR）

TP-PCR是采用一对引物和一条随机结合的中间引物共3条引物进行PCR扩增的方法。此方法常用于动态突变遗传病三核苷酸拷贝数变异的检测，TP-PCR产物经毛细管电泳检测形成范围超过一定碱基数（例如50 CTG×3）的连续毛刺状峰，提示为患者。TP-PCR反应需要设计合理的中间引物，要注意保证引物的浓度比例以及采用高特异的DNA聚合酶。目前临床上使用较多的是脆性X染色体综合征致病基因*FMR1*基因动态突变及强直性肌营养不良致病基因*DM1*基因的动态突变的检测[13-14]。

2.6 巢式PCR扩增技术

LR-PCR是指扩增长度大于5 kb片段的PCR。LR-PCR反应需要选用高保真的DNA聚合酶，这类酶除了具有高保真性，同时具有优良的延伸性和高效的扩增效率。巢式PCR是以前次PCR产物为模板，设计引物扩增多个或单个小的PCR片断。对于存在高度同源序列的基因（如*PKD1*、*GBA*、*SMN1*、*CYP21A2*基因）的序列突变分析，为了避免同源序列（假基因）的干扰，通常利用基于LR-PCR的巢式PCR扩增技术。首先，比对目标基因与同源序列，寻找差异性位点，设计长片段特异性引物，确保LR-PCR扩增的特异性；其次，以LR-PCR产物为模板，以内部巢氏PCR引物，采用常规PCR扩增目标基因特定目标区域。

2.7 倒位PCR技术（inversion-PCR，I-PCR）

I-PCR是针对血友病A（hemophilia A，HA）的一种检测技术，HA是一种X连锁隐性遗传病，由*F8*基因突变导致。*F8*基因的Inv22和Inv1分别占重型HA的40%~50%和2%~3%[15]，对Inv22和Inv1的检测手段包括Southern blot、长片段PCR（long distance PCR，LD-PCR）和I-PCR。目前对intron 22重组检测的常用方法主要为LD-PCR和I-PCR 2种。LD-PCR片段大于10 kb，不能确定intron 22重组的亚型，并且扩增片段GC含量较高，对DNA质量和试剂要求较高，成功率较低。I-PCR包括酶切、环化和引物扩增等3个步骤。I-PCR有产物片段大小特定、片段比较小、GC含量较低等优点，因此能快速检测Inv22-I、Dup22和Del22的患者、携带者和正常人。

2.8 DNA芯片技术

DNA芯片原理是在固定支持物上合成大量寡核苷酸作为DNA探针与待测的核酸片段杂交，对杂交后的信息进行分析，从而得到靶片段的基因序列、表达情况等信息。该技术检测信息高通量，自动化程度高，一次可检测众多突变位点，可用于疾病临床早期诊断和批量筛选、基因表达谱测定、多态性分析等，但由于芯片技术只能检测已知突变位点，随着高通量测序技术的快速进展，DNA芯片在单基因遗传病基因诊断中的应用受到了一定限制，在国内DNA芯片的单基因病诊断应用主要为耳聋DNA芯片的检测。

3 以高通量测序为中心的单基因病分子诊断策略

3.1 Panel靶向测序

以Panel为基础的靶向高通量测序可分为单个基因靶向捕获高通量测序和多个基因靶向捕获高通量测序。单个基因靶向Panel高通量测序的设计理论基础是针对片段较长的基因，如*DMD*基因、结节性硬化（tuberous sclerosis complex，TSC）*TSC1/2*基因等的检测采用特异基因Panel检测效率远优于Sanger测序，另外一种多基因靶向捕获Panel高通量测序是针对于遗传异质性较强的疾病，如癫痫、痉挛性截瘫、遗传性肌病、非综合征型遗传性耳聋等疾病，对于给定样本中的多个致病基因同时进行测序分析，具有快速高效的特点，但也存在一定局限性，如随着新的致病基因的不断发现，需要对多个基因靶向捕获高通量测序panel进行不断的更新，但更新速度一般落后于新致病基因被发现的速度，使得panel存在一定的滞后性。

3.2 全外显子组测序（whole exome sequencing，WES）

WES就是利用杂交捕获技术获取、富集基因组中所有具有蛋白编码功能的外显子区域DNA序列，并对后者进行高通量测序的分析方法。人类的全基因组中有多达180 000个外显子，占整个基因组的1%左右[16]，通过高通量测序技术进行外显子组测序，是发现或鉴定引起疾病的遗传变异的有效途径。

2009年，Ng等[16]在世界上首次证实外显子组测序在确定罕见致病基因方面具有可行性和应用

价值，并于2010年首次成功地利用WES技术鉴定了米勒综合征（Miller syndrome）的致病基因*DHODH*[17]。全外显子组测序技术所需样本数量少、通量高、耗费低，大大推进了人类单基因遗传病的分子诊断。

外显子组测序能够更快地确定致病基因及突变位点[18]，有助于加速筛选发现单基因疾病、癌症等复杂疾病的致病基因和易感基因等。但是外显子组测序只能捕获集中于外显子区域的测序，不能获得完整的基因组信息且不适用于DNA结构变异和高度同源区变异体的检测。

3.3 全基因组测序（whole genome sequencing，WGS）

WGS是对已知标准基因组序列的个体进行全基因组的重测序。WES（外显子组测序）对于外显子以外的区域不能有效地进行基因检测，通过WGS可进行全基因组检测[18-20]。因为人类基因组过于庞大，一次单端全基因组测序很难达到所需要的测序深度，需要重复测序或双端测序。因此，WGS成本昂贵且由于不能达到足够的测序深度，结果准确性会降低，目前难以大规模应用于临床。

3.4 高通量测序用于单基因遗传病的局限性

虽然高通量测序有高通量和相对低成本的特点，但对于单基因病基因诊断仍有其局限性，首先是高通量测序的结果必须经过Sanger测序验证，通常高通量测序的结果不能直接用于诊断；其次高通量测序不能解决一些特殊的单基因病基因突变的检测，包括基因的倒位突变，如血友病A基因有长片段倒位存在，如SMA、肾上腺皮质发育不良、成人型多囊肾等存在假基因的疾病的基因诊断，通过高通量测序往往不能得到满意结果；再次，由于受种族差异、数据库及基因突变功能验证等的影响，大量的高通量测序结果不能得到很好的解读，也制约了高通量测序在单基因遗传病分子诊断中的应用。

4 以高通量测序为基础的无创产前分子诊断（non-invasive prenatal diagnosis，NIPD）

4.1 胎儿游离核酸无创单基因病产前诊断

利用无创产前检测诊断胎儿单基因病的基本原理是在母体血浆总游离DNA（cell-free DNA，cfDNA）中通过检测出胎儿是否携带来自父母的致病基因或致病基因突变。对于常染色体显性遗传病，通过检测孕妇本人的血浆游离DNA是否携带致病位点（父源突变、新发突变）来判断胎儿是否发病，目前应用最多的是检测软骨发育不全（achondroplasia）[21]。对于常染色体隐性遗传病，若父母同时携带不同的杂合突变（先证者为复合杂合突变），如果在孕妇外周血中检测到父源突变，那么胎儿有50%的发病风险，应进一步行侵入性产前诊断明确胎儿是否患病；如未检出父源突变，那么胎儿最多为携带者，孕妇无需接受侵入性产前诊断，避免了50%的孕产妇进行有创性产前诊断，从而减少了不良妊娠结局的发生[22]。若父母携带相同致病杂合突变，则需要通过大规模平行测序或数字PCR技术等精确定量胎儿游离DNA（cell-free fetal DNA，cffDNA）浓度，以此来分辨出突变来自父源或母源[23]。目前利用无创产前检测可能诊断的单基因病包括软骨发育不全、先天性肾上腺皮质增生（congenital adrenalhyperplasia，CAH）、DMD、枫糖尿病（maple syrup urine disease）、β地中海贫血（β-mediterranean anemia）和SMA等[21, 24-28]。目前最新的进展是通过无创产前DNA检测解决新发突变（*de novo* mutation），未来可以通过NIPD进行胎儿的群体筛查，包括遗传性（inheredited）的突变和新发突变都可以通过该方法进行产前筛查。

4.2 循环胎儿细胞无创单基因病产前诊断

在孕早期的母血中存在微量的胎儿有核红细胞（nucleated red blood cell，NRBC），因其单核、含有完整胎儿遗传信息且细胞周期短，更适合全基因组分析，被认为是实施NIPD较理想的靶点。但母血中的胎儿细胞非常少，限制了其应用的发展。目前临床上研究多针对改进细胞的分离方法，有研究成功利用基于红细胞微流控技术的富集和负向富集的两级富集法分离出循环胎儿细胞并完成性别鉴定[29]。循环胎儿细胞在无创产前检测领域具有巨大的潜能，相信随着技术进一步的发展，利用循环胎儿细胞进行单基因病的NIPD或将成为新的研究热点。

4.3 子宫颈滋养层细胞无创单基因病产前诊断

孕妇宫颈粘液中也存在胎儿脱落的绒毛细胞，且数量不受胎龄、孕妇体重以及孕妇年龄的影响[30]，该发现为无创单基因病诊断提供了新的思路。有研究成功利用从宫颈脱落细胞中分离的胎

儿细胞诊断地中海贫血和/或HbS突变[31]。该技术有着良好的应用前景,但标本母体细胞污染的问题可造成较高的假阳性率,是目前面临的主要挑战。

5 小结与展望

分子诊断已经深入到单基因遗传病诊断、产前诊断、新生儿筛查中。以PCR、Southern杂交为主的一些经典分子诊断技术将会保留。但越来越先进和精确的分子诊断技术将会不断建立和发展,特别是随着高通量测序的快速发展,以高通量测序,包括第三代测序为基础的单基因遗传病的分子诊断方法将得到更广泛的应用。除此之外,越来越先进的分子诊断技术的建立和发展也对相关研究人员和临床医师的使用、解读和咨询提出了更高的要求。

参考文献

[1] World Health Organization. Genes and humandisease [EB/OL]. http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html.2016-08-19/2017-09-28.

[2] Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis[J]. J Mol Biol, 1975, 98(3):503-517.

[3] WY Kan, MS Golbus, AM Dozy, et al. Prenatal diagnosis of α-thalassemia: clinical application of molecular hybridization[J]. N Engl J Med, 1976, 295(21): 1165-1167.

[4] Jones TI, Yan C, Sapp PC, et al. Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing[J]. Clin Epigenetics, 2014, 6(1):23.

[5] Shampo MA, Kyle RA. Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA[J]. Mayo Clin Proc, 2002, 77(7):606.

[6] 李双, 白莹, 赵振华. 81例假肥大型肌营养不良症患者基因突变分析[J]. 中华医学遗传杂志. 2016, 33(6):762-767.

[7] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(12):e57.

[8] Bello L, Pegoraro E. Genetic diagnosis as a tool for personalized treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. Acta Myol, 2016, 35(3):122-127.

[9] Hwang H, Lee JH, Choi YC. Clinical characteristics of spinal muscular atrophy in korea confirmed by genetic analysis[J]. Yonsei Med J, 2017, 58(5):1051-1054.

[10] Liborio S, Ivana A, Giandomenico P, et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(3):3245-3276.

[11] van der Steege G, Grootscholten PM, van der Vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy [J]. Lancet, 1995, 345(8955):985-986.

[12] Kotysova L, Mattosova S, Chandoga J. Improvement of molecular-genetic diagnostics of the most common skeletal dysplasias[J]. Bratisl Lek Listy, 2015, 116 (8):465-468.

[13] Rajan-Babu IS, Chong SS. Molecular correlates and recent advancements in the diagnosis and screening of FMR1-related disorders[J]. Genes (Basel), 2016, 7 (10):E87.

[14] Botta A, Rossi G, Marcaurelio M, et al. Identification and characterization of 5' CCG interruptions in complex DMPK expanded alleles[J]. Eur J Hum Genet, 2017, 25(2):257-261.

[15] Bai N, Zhu X, Zhao Z, et al. Factor VIII mutation spectrum in haemophilia A patients in the population of Henan, China [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2017. [Epub ahead of print].

[16] Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes[J]. Nature, 2009, 461(7261):272-276.

[17] Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder [J]. Nat Genet, 2010, 42(1):30-35.

[18] Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 (45):19096-19101.

[19] Dewey FE, Grove ME, Pan CP, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing [J]. JAMA, 2014, 311(10):1035-1045.

[20] Lau TK, Cheung SW, Lo PSS, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center[J]. Ultrasound Obst Gyn, 2014, 43 (3):254-264.

(下转第84页)

·论 著·

PD-1及PD-L1在宫颈上皮内瘤变及鳞癌中表达差异性的临床研究

杨雯[1] 康佳蕊[2] 金贻铎[2] 王宏伟[2*]

［摘 要］ **目的** 探讨程序性细胞死亡分子-1(programmed death-1,PD-1)及程序性细胞死亡分子配体-1(programmed death ligand-1,PD-L1)表达对宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia,CIN)和宫颈鳞癌(cervical squamous carcinoma,CSC)进展及预后的评估价值。 **方法** 收集CIN患者40例,根据病理诊断与高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)检测结果,分为CIN 0 HPV(−)组、CIN 0 HPV(+)组、CIN Ⅰ HPV(+)组及CIN Ⅱ-Ⅲ HPV(+)组,每组10例;CSC并行根治手术患者20例,分为盆腔淋巴结非转移组和转移组,每组10例。采用荧光定量PCR方法进行高危型HPV亚型检测,免疫组化方法检测PD-1、PD-L1及细胞增殖周期调控蛋白p16INK4a表达并作对比。 **结果** 在CIN和CSC患者中HPV16和HPV18亚型感染率最高;PD-1和PD-L1表达水平与HPV阳性、CIN级别升高及肿瘤转移呈正相关,同时伴随细胞增殖周期调控蛋白p16INK4a表达上调。 **结论** PD-1和PD-L1表达水平可以作为评估CIN和宫颈鳞癌进展和预后的临床检测指标。

［关键词］ 人乳头瘤病毒;宫颈上皮内瘤变;宫颈鳞癌;程序性细胞死亡分子-1;程序性细胞死亡分子配体-1

Clinical study on the different expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous carcinoma

YANG Wen[1], KANG Jiarui[2], JIN Yiduo[2], WANG Hongwei[2*]

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing, China, 100853; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of People's Liberation Army, Beijing, China, 100048)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression levels of programmed death-1(PD-1) and its ligand, programmed death ligand-1(PD-L1) , in order to evaluate the progression and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical squamous carcinoma (CSC). **Methods** 40 patients with CIN were collected and divided into group CIN 0 HPV (−), CIN 0 HPV (+), CIN I HPV (+), and CIN Ⅱ−Ⅲ HPV (+) , with 10 cases in each group, according to results of pathological diagnosis and high-risk human papillomavirus (HPV) detection; 20 cases of CSC were selected and divided into metastasis (−) and metastasis (+) groups (n=10). The presence of high-risk HPV types were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Expressions of PD-L1, PD-1 and p16INK4a were detected using immunohistochemistry methods. **Results** The most common HPV subtypes in these patients were HPV16 and HPV18. The expression of PD-1 and PD-L1 were positively correlated with HPV positivity, advanced CIN grading and tumor metastasis, and

基金项目:国家自然科学基金(81302538)

作者单位:1. 中国人民解放军总医院妇产科,北京 100853

2. 中国人民解放军总医院第一附属医院病理科,北京 100048

*通讯作者:王宏伟,E-mail:whw6626@sina.com

increased expression was also associated with increased expression of p16INK4a. Conclusions PD-L1 and PD-1 expression could be used as clinical prognostic biomarkers for evaluating CIN and cervical squamous cancer.

[KEY WORDS] Human papillomavirus; Cervical intraepithelial neoplasia; Cervical squamous carcinoma; Programmed death-1; Programmed death ligand-1

宫颈癌是全球妇女第二大常见恶性肿瘤，在正常宫颈上皮发生宫颈上皮内瘤变（cervical intraepithelial neoplasia，CIN）至宫颈癌这一进展过程中，人乳头瘤病毒（human papillomavirus，HPV）感染扮演着重要的角色[1]。高危型HPV持续感染导致宫颈粘膜细胞免疫障碍，是诱导CIN和宫颈癌发生的重要机制[2-3]。程序性细胞死亡分子-1/程序性细胞死亡分子配体-1（programmed death-1/programmed death ligand-1，PD-1/PD-L1）抑制途径能够降低抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）和T淋巴细胞对肿瘤的免疫清除，促进肿瘤的发生和发展。然而，HPV感染是否会影响宫颈上皮细胞的PD-L1表达及对肿瘤进展的影响仍未阐明。本研究通过对比不同程度CIN和宫颈鳞癌（cervical squamous carcinoma，CSC）患者的PD-1和PD-L1表达差异，探讨二者在CIN和宫颈鳞癌进展中的评估意义和临床价值，为宫颈癌的预后判断及治疗寻找新的靶点。

1　材料与方法

1.1　病例收集及分组

收集来自中国人民解放军总医院第一附属医院的两组患者，第一组病例患者进行了子宫颈活检或锥切，根据病理诊断和高危型HPV检测结果，分为CIN 0 HPV（－）、CIN 0 HPV（＋）、CIN Ⅰ HPV（＋）、CIN Ⅱ－Ⅲ HPV（＋）小组，每小组10例；患者年龄从28至45岁，平均年龄为35.7岁，各小组间年龄无显著差异（P>0.05）。第二组病例患者行宫颈鳞癌根治手术，分为原发浸润性CSC患者不伴盆腔淋巴结转移的CSC转移（－）组和伴有盆腔淋巴结转移的CSC转移（＋）组，每组10例，其中转移组根据肿瘤部位不同分为原发灶、淋巴管癌栓和淋巴结转移灶，患者年龄从39至63岁，平均年龄为51岁，各组间年龄无显著差异（P>0.05）。以上患者的排除标准包括：性传播疾病、生殖道感染性疾病、免疫缺陷病、妊娠、经免疫抑制剂治疗等。

1.2　病理学检查及高危型HPV亚型检测

宫颈组织标本用4%中性甲醛固定24~48 h，经脱水、石蜡包埋、切片及常规苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色，光镜观察。由2名高年资病理医师对病变进行形态学观察并作出病理诊断。宫颈标本经蛋白酶K处理，提取组织DNA。采用导流杂交基因芯片技术和荧光定量PCR方法进行HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59和66亚型检测。β-*Globin*和蒸馏水分别作为内参和阴性对照。

1.3　免疫组织化学标记及评分

石蜡包埋组织标本经常规脱蜡及梯度酒精脱水处理。利用罗氏Ventana自动免疫组化仪进行抗原修复、抗体标记及DAB染色。标记的一抗包括：小鼠抗人PD-1（北京中杉金桥生物技术有限公司）、小鼠抗人p16INK4a（北京中杉金桥生物技术有限公司）和小鼠抗人PD-L1（Abcam，美国）。二抗检测试剂盒购自罗氏诊断试剂公司。以蒸馏水代替一抗作为阴性对照。利用Allred评分系统对免疫组化标记结果进行判读，具体标准如下：比例评分：0分-无，1分-<1/100，2分-1/100~1/10，3分-1/10~1/3，4分-1/3~2/3，5分->2/3；强度评分：1分-弱，2分-中等，3分-强[4]。每张切片观察10个高倍视野，计算比例和强度分值之和（0~8分）的平均值。

1.4　统计学处理

本研究数据结果以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用SPSS 15.0软件对各比较组进行非参数Kruskal-Wallis检验统计学分析。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

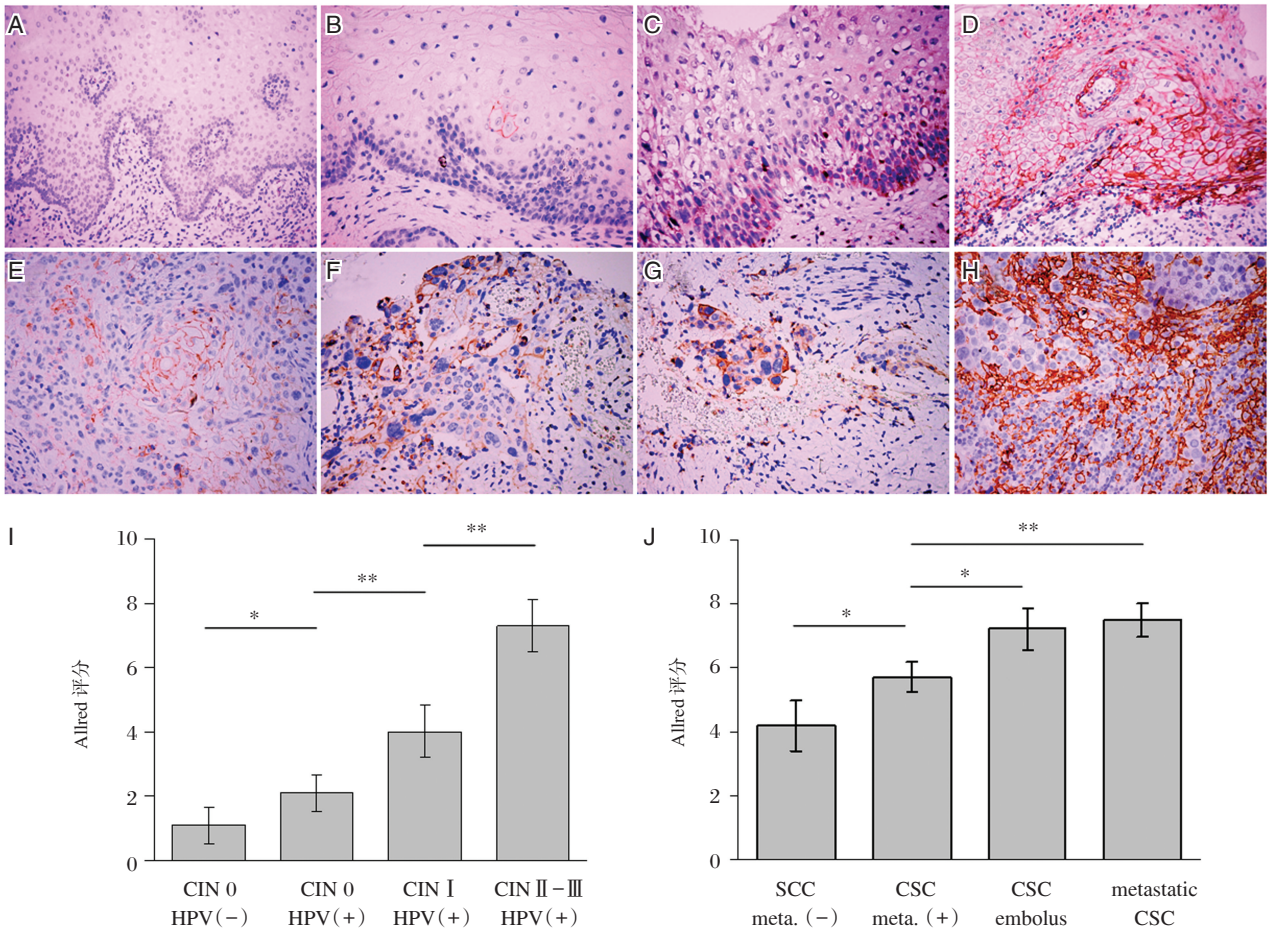
2.1　高危型HPV亚型检测结果

第一组检测的30名HPV阳性患者中，HPV16和HPV18是感染率最高的亚型，感染率均为33.3%（10/30），其次为HPV58和33亚型，感染率分别为16.7%（5/30）和13.3%（4/30），单一亚型感

染率为73.3%(22/30),多重亚型感染率为26.7%(8/30)。第二组20名患者HPV检测均为阳性,HPV16感染率最高,感染率为45%(9/20),随后为HPV18,感染率为20%(4/20),HPV51、52和58亚型,感染率均为10%(2/20),单一亚型感染率为75%(15/20),多重亚型感染率为25%(5/20)。

2.2 PD-L1免疫组化标记结果

PD-L1标记阳性细胞为胞膜有棕黄色物质沉积。第一组病例中,PD-L1主要表达于CIN病变的上皮细胞(图1A~1D),CIN 0 HPV(+)组显著高于CIN 0 HPV(−)组($P<0.05$);同时在HPV(+)组之间,PD-L1的表达随着CIN的级别上升而显著升高,即CIN Ⅰ组显著高于CIN 0组($P<0.01$),CIN Ⅱ−Ⅲ组显著高于CIN Ⅰ组($P<0.01$)(图1I)。第二组病例中,PD-L1主要表达于鳞癌细胞(图1E~1H),CSC转移(+)组原发灶显著高于CSC转移(−)组原发灶($P<0.05$),而且CSC转移(+)组的淋巴管癌栓和淋巴结转移灶较其原发灶表达显著升高($P<0.05$和$P<0.01$)(图1J)。



A:CIN 0 HPV(−)组(免疫组化,×400);B:CIN 0 HPV(+)组(免疫组化,×400);C:CIN Ⅰ HPV(+)组(免疫组化,×400);D:CIN Ⅱ−Ⅲ HPV(+)组(免疫组化,×400);E:CSC转移(−)组(免疫组化,×400);F:CSC转移(+)组原发灶(免疫组化,×400);G:CSC转移(+)组淋巴管癌栓(CSC embolus)(免疫组化,×400);H:CSC转移(+)组淋巴结转移灶(metastatic CSC)(免疫组化,×400);I:CIN组PD-L1蛋白Allred评分统计分析柱状图;J:CSC组PD-L1蛋白Allred评分统计分析柱状图;*$P<0.05$,**$P<0.01$。

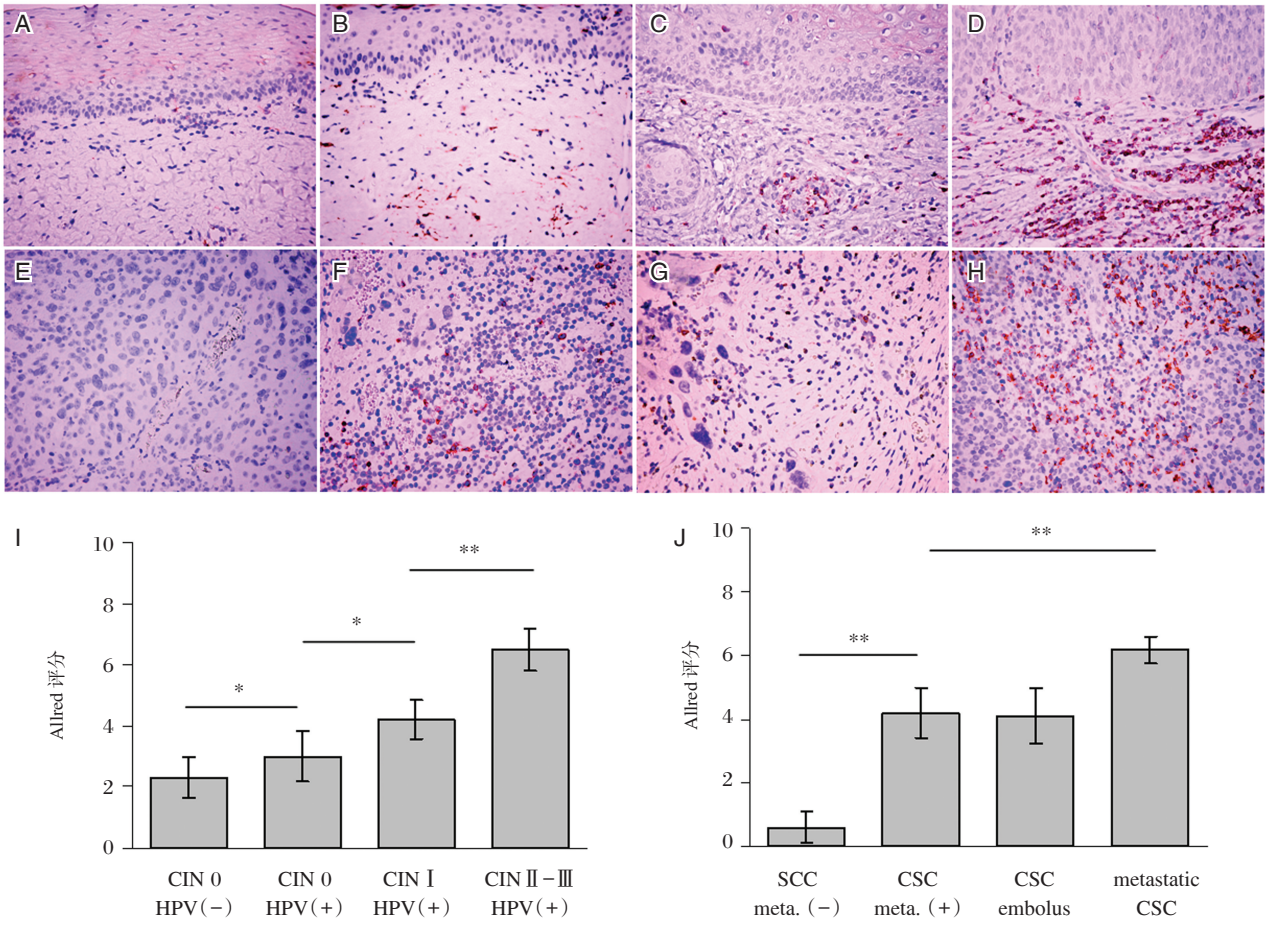
图1 PD-L1蛋白表达及变化

Figure 1 Changes of PD-L1 protein expression

2.3 PD-1免疫组化标记结果

PD-1标记阳性细胞主要为肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages,TAMs)和肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes,TILs),阳性细胞的胞膜和胞浆有棕黄色物质沉积。第一组病例中,PD-1阳性细胞主要分布在CIN病变的鳞

状上皮下的间质纤维中(图2A~2D),CIN 0 HPV(+)组的PD-1表达显著高于CIN 0 HPV(−)组($P<0.05$);同时在HPV(+)组之间,PD-1的表达随着CIN的级别升高而增加,即CIN Ⅰ组显著高于CIN 0组($P<0.05$),CIN Ⅱ-Ⅲ组显著高于CIN Ⅰ组($P<0.01$)(图2I)。第二组病例中,PD-1阳性细胞分布在鳞癌细胞之间(图2E~2H),CSC转移(+)组原发灶的PD-1表达显著高于CSC转移(−)组原发灶($P<0.01$),在CSC转移(+)组淋巴结转移灶的PD-1表达显著高于其原发灶($P<0.01$),但淋巴管癌栓的PD-1表达与其原发灶相比差异无统计学意义($P>0.05$)(图2J)。



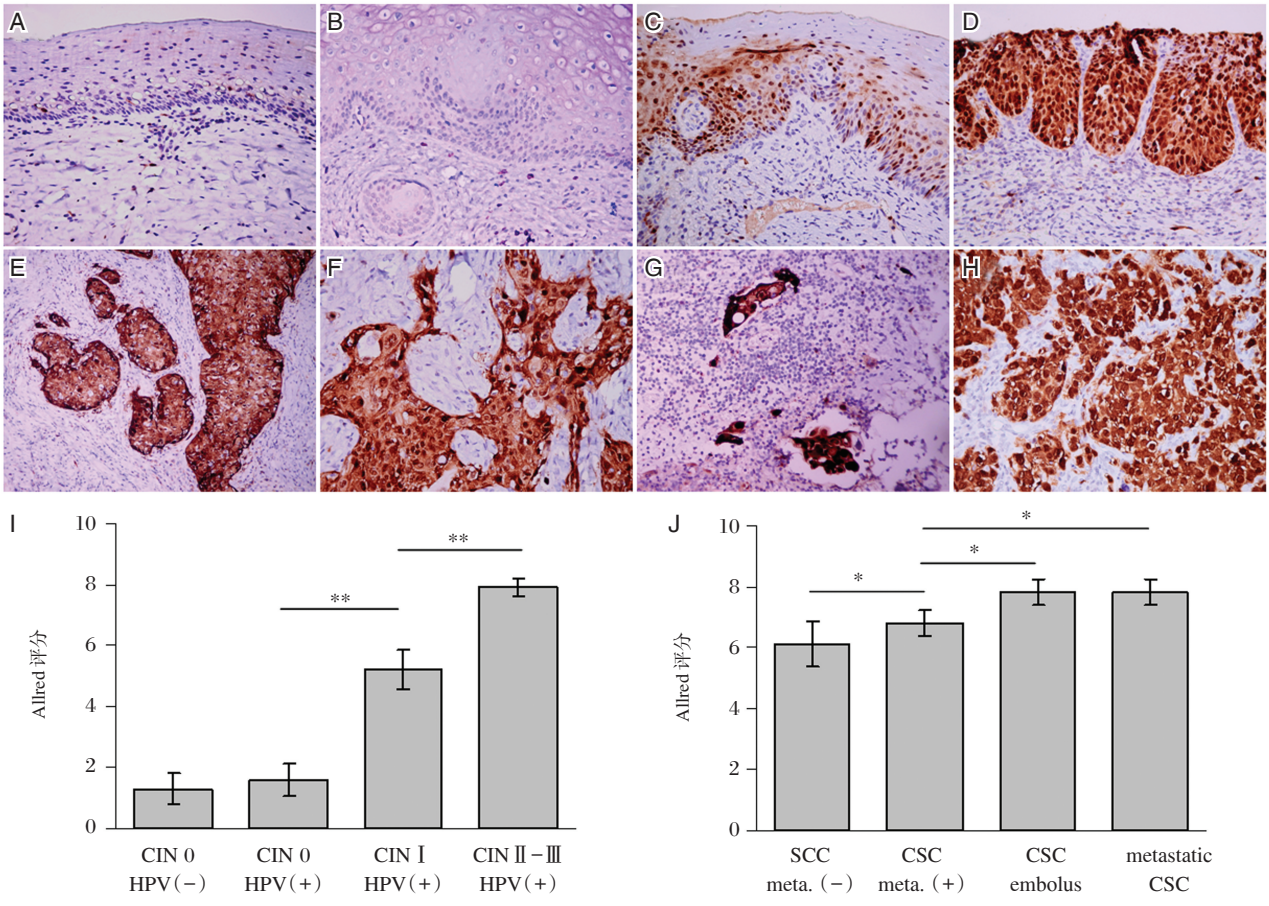
A:CIN 0 HPV(−)组(免疫组化,×400);B:CIN 0 HPV(+)组(免疫组化,×400);C:CIN Ⅰ HPV(+)组(免疫组化,×400);D:CIN Ⅱ-Ⅲ HPV(+)组(免疫组化,×400);E:CSC转移(−)组(免疫组化,×400);F:CSC转移(+)组原发灶(免疫组化,×400);G:CSC转移(+)组淋巴管癌栓(CSC embolus)(免疫组化,×400);H:CSC转移(+)组淋巴结转移灶(metastatic CSC)(免疫组化,×400);I:CIN组PD-1蛋白Allred评分统计分析柱状图;J:CSC组PD-1蛋白Allred评分统计分析柱状图;*$P<0.05$,**$P<0.01$。

图2　PD-1蛋白表达及变化

Figure 2　Changes of PD-1 protein expression

2.4　p16INK4a免疫组化标记结果

p16INK4a标记阳性细胞的胞核及胞浆有棕黄色物质沉积。在第一组病例中,p16INK4a主要表达在CIN病变的上皮细胞(图3A~3D),CIN 0 HPV(−)组和CIN 0 HPV(+)组均低表达p16INK4a,二者之间无统计学差异($P>0.05$),但CIN Ⅰ HPV(+)组p16INK4a的表达显著高于CIN 0 HPV(+)组($P<0.01$),并且CIN II~III组显著高于CIN Ⅰ组($P<0.01$)(图3I)。在第二组病例中,p16INK4a在鳞癌细胞中弥漫性高表达(图3E~3H),CSC转移(+)组原发灶的p16INK4a表达显著高于CSC转移(−)组原发灶($P<0.05$),在CSC转移(+)组淋巴管癌栓及淋巴结转移灶的p16INK4a表达均显著高于其原发灶($P<0.05$)(图3J)。



A：CIN 0 HPV(−)组(免疫组化，×400)；B：CIN 0 HPV(+)组(免疫组化，×400)；C：CIN Ⅰ HPV(+)组(免疫组化，×400)；D：CIN Ⅱ−Ⅲ HPV(+)组(免疫组化，×400)；E：CSC转移(−)组(免疫组化，×400)；F：CSC转移(+)组原发灶(免疫组化，×400)；G：CSC转移(+)组淋巴管癌栓(CSC embolus)(免疫组化，×400)；H：CSC转移(+)组淋巴结转移灶(metastatic CSC)(免疫组化，×400)；I：CIN组p16INK4a蛋白Allred评分统计分析柱状图；J：CSC组p16INK4a蛋白Allred评分统计分析柱状图。*P<0.05，**P<0.01。

图3 p16INK4a蛋白表达及变化

Figure 3 Changes of p16INK4a protein expression

3 讨论

PD-L1是新近发现的一种负性共刺激分子，广泛表达于APC、活化的T、B细胞、巨噬细胞和胸腺皮质上皮细胞等[5]。PD-L1的受体为CD28家族成员PD-1，主要表达于T淋巴细胞[6]。PD-1与PD-L1特异性结合诱导T淋巴细胞无能性分化或凋亡，抑制肿瘤免疫反应，促使病毒感染细胞或肿瘤细胞逃逸机体免疫清除[7-8]。我们的前期临床研究结果表明，高危型HPV阳性CIN患者宫颈T淋巴细胞的PD-1和树突细胞的PD-L1表达随着CIN级别的升高而明显上调[9]。相关研究也表明，肿瘤细胞及肿瘤微环境能够通过上调PD-L1表达与肿瘤特异性$CD8^+$ T淋巴细胞PD-1蛋白的IgV样结构域结合，磷酸化PD-1胞浆区的免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif，ITIM)使下游的效应分子去磷酸化，如磷脂酰肌醇激酶3(phosphoinositide 3-kinase，PI3K)，从而抑制T细胞凋亡抑制基因*Bcl-xl*的转录，促进T细胞凋亡，发挥负向免疫调节作用，降低机体免疫应答[10]。本研究进一步发现PD-L1除表达在APC外，高危型HPV感染可以使宫颈鳞状上皮的PD-L1表达和TAMs、TILs的PD-1表达亦明显升高，同时二者表达与CIN的级别呈正相关，表明PD-1/PD-L1参与了宫颈细胞免疫的负性调节，并与HPV感染和CIN进展密切相关。

肿瘤浸润淋巴细胞是肿瘤免疫微环境的重要组成部分，其数量及功能间接反映了机体抗肿瘤免疫应答的强弱[11]。恶性肿瘤细胞异常表达

PD-L1，通过激活PD-L1/PD-1途径抑制T细胞增殖和细胞因子分泌，逃避机体免疫应答，促进肿瘤进展和转移。相关研究证实，肾癌细胞PD-L1表达水平及PD-1阳性肿瘤浸润淋巴细胞数量均与患者预后呈负相关[12]。针对卵巢肿瘤的研究也发现，依据PD-L1表达水平以及肿瘤浸润$CD8^+$ T细胞数量可以预测卵巢癌患者的预后[13]。本研究结果表明，宫颈癌原发灶PD-L1和PD-1的表达在发生转移患者中显著高于未发生转移患者，并且发生转移患者的淋巴管癌栓和淋巴结转移灶较其原发灶表达亦显著升高，提示PD-L1和PD-1表达水平与宫颈癌的预后密切相关，二者高表达预示PD-L1/PD-1途径激活，负性调控机体的抗肿瘤免疫应答功能，进而促进肿瘤逃逸机体免疫清除，容易发生局部进展和远处转移。

p16INK4a是细胞周期调节蛋白-依赖酶抑制剂，也是肿瘤抑癌基因的产物，其编码的蛋白能特异性抑制CDK4活性，阻止细胞由G1期进入S期，导致细胞周期停滞于G1期，干扰或抑制细胞的过度增殖。相关研究证实，p16INK4a蛋白表达上调是结直肠癌的重要免疫表型特征，且无淋巴结或远处转移者表达高于有淋巴结或远处转移者，可作为结直肠癌诊断及转移能力评估的重要分子靶标[14]。研究证实，p16INK4a在CIN及宫颈癌的表达显著升高，临床上p16INK4a是判断CIN和宫颈癌预后的指标，本研究结果表明CIN级别升高及宫颈癌发生转移时，p16INK4a表达显著上升，这与以往报道的结果相符[15]。新近研究发现，虽然HPV感染的上皮细胞能被宫颈免疫系统识别，但仍然能够逃逸机体的免疫清除，这与HPV感染导致的宫颈局部细胞免疫障碍密切相关[16]。在多种慢性病毒感染性疾病中，PD-1 /PD-L1信号途径被激活并发挥负性免疫调节作用，能够抑制细胞毒性T淋巴细胞增殖、活化及建立有效的免疫应答反应，从而导致细胞免疫对病毒感染细胞的免疫耐受或无应答[17]。本研究进一步发现，p16INK4a表达变化与宫颈PD-L1和PD-1的表达变化存在相关性和一致性，即随着CIN级别升高及肿瘤转移而表达上调，提示p16INK4a基因在宫颈高危型HPV感染相关CIN及宫颈癌中参与了抗肿瘤过程中的负性免疫应答反应，其高水平表达提示机体免疫清除能力下降，与CIN及宫颈癌的免疫逃逸及肿瘤进展密切相关。

总之，本研究结果表明PD-L1和PD-1表达升高与宫颈HPV阳性、CIN级别升高和肿瘤转移呈正相关。PD-1/PD-L1途径的活化同时伴随着p16INK4a表达上调，提示机体抗肿瘤免疫能力下降和肿瘤进展。因此，PD-L1和PD-1表达水平可以作为CIN和宫颈癌临床预后指标，阻断PD-L1/PD-1通路的治疗有望成为宫颈癌免疫治疗的有效靶点。

参考文献

[1] Dahlström LA, Ylitalo N, Sundström K, et al. Prospective study of human papillomavirus and risk of cervical carcinoma[J]. Int J Cancer, 2010, 127(8): 1923-1930.

[2] Sheu BC, Chang WC, Lin HH, et al. Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2007, 33(2): 103-113.

[3] Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity[J]. Rev Med Virol, 2006, 16(2): 83-97.

[4] Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA, et al. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer[J]. Cancer Res, 1994, 54(14): 3752-3757.

[5] Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses[J]. Immunity, 2007, 27(1): 111-122.

[6] Folkl A1, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 134(1-2): 33-38.

[7] Li Y, Wang Q, Mariuzza RA. Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6[J]. J Exp Med, 2011, 208(4): 703-714.

[8] Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection[J]. Nat Med, 2010, 16(4): 452-459.

[9] Yang W, Song Y, Lu YL, et al. Increased expression of PD-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in high-risk HPV-related cervi-

cal intraepithelial neoplasia[J]. Immunology, 2013, 139(4):513-522.

[10] Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J]. Immunol Rev, 2010, 236(7):219-242.

[11] Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 157(1):9-19.

[12] Thompson RH, Dong H, Lohse CM, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6):1757-1761.

[13] Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating $CD8^+$ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(9):3360-3365.

[14] 黄小钟，郭睿，黄莺，等. p16INK4a蛋白在结直肠癌中表达及临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2016，30(12):1227-1229.

[15] Liu HQ, Wang YH, Wang LL, et al. p16INK4a and survivin: Diagnostic and prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(1):44-49.

[16] Guzmán-Olea E, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Molecular mechanism and potential targets for blocking HPV-Induced lesion development [J]. J Oncol, 2012, 2012: 278312.

[17] Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 451694.

(上接第77页)

[21] Orhant L, Anselem O, Fradin M, et al. Droplet digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the noninvasive prenatal diagnosis of achondroplasia[J]. Prenat Diagn, 2016, 36(5):397-406.

[22] Hill M, Barrett AN, White H, et al. Uses of cell free fetal DNA in maternal circulation[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012, 26(5):639-654.

[23] Everett TR, Chitty LS. Cell-free fetal DNA: the new tool in fetal medicine[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015,45(5):499-507.

[24] Kazmi D, Bailey J, Yau M, et al. New developments in prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016, 165: 121-123.

[25] Parks M, Court S, Cleary S, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage[J]. Prenat Diagn, 2016,36(4):312-320.

[26] You Y, Sun Y, Li X, et al. Integration of targeted sequencing and NIPT into clinical practice in a Chinese family with maple syrup urine disease [J]. Genet Med, 2014,16(8):594-600.

[27] Ramezanzadeh M, Salehi M, Farajzadegan Z, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for b-thalassemia in maternal plasma using simple fetal DNA enrichment protocol with or without whole genome amplification: an accuracy assessment [J]. J Matern-Fetal Neonatal Med, 2016, 29(16): 2645-2649.

[28] Parks M, Court S, Bowns B, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by relative haplotype dosage [J]. Eur J Hum Genet, 2017, 25 (4):416-422.

[29] Byeon Y, Ki CS, Han KH. Isolation of nucleated red blood cells in maternal blood for Non-invasive prenatal diagnosis [J]. Biomedical Microdevices, 2015, 17 (6):118.

[30] Fritz R, Kohanghadr HR, Sacher A, et al. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) is unaffected by early gestational age or maternal obesity [J]. Prenatal Diagnosis, 2016, 35(12):1218-1222.

[31] Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, et al. Assessment of quantitative fluorescent multiplex PCR performed on single cells[J]. Annals of Human Genetics, 1998, 62(Pt 1):9-23.

·论　著·

*RASSF1A*基因甲基化和SCC联合检测在非小细胞肺癌转移监测中的应用

张洪彬*　张满娥　黄文滨　卢志华

［摘　要］ **目的**　探讨Ras相关结构域蛋白家族1A（ras association domain family 1A，*RASSF1A*）基因甲基化和鳞状上皮细胞癌抗原（squamous cell carcinoma antigen，SCC）联合检测对非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）患者术后转移评价的价值。　**方法**　选择2014年1月至2015年6月在龙岩市第二医院就诊的57例NSCLC患者，测定患者术前血浆*RASSF1A*基因甲基化、血清SCC水平，同时检测患者术后肿瘤组织*RASSF1A*基因甲基化水平。出院后随访12个月，根据随访结果分为转移组和非转移组，分析两组血浆及组织*RASSF1A*基因甲基化阳性率、术前血清SCC水平与术后转移的关系。　**结果**　发生转移的患者术前血清SCC水平、术后组织和术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率均高于未发生转移的患者，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。根据肿瘤组织*RASSF1A*基因甲基化、术前血清SCC水平对NSCLC患者术后转移判定的ROC曲线，NSCLC患者肿瘤组织*RASSF1A*基因甲基化、术前血清SCC水平符合预测NSCLC术后转移的条件。将SCC水平4.05 ng/mL、*RASSF1A*甲基化阳性作为危险分层界值，绘制Kaplan-Meier生存曲线显示，高危组与低危组两组术后转移比较差异具有统计学意义（$P<0.05$）。　**结论**　NSCLC患者肿瘤组织*RASSF1A*基因甲基化、术前血清SCC水平越高，发生术后转移的风险越高，检测NSCLC患者肿瘤组织*RASSF1A*基因甲基化、术前血清SCC水平对NSCLC患者危险分层及术后转移评估具有一定的临床价值。

［关键词］　非小细胞肺癌；*RASSF1A*基因甲基化；鳞状上皮细胞癌抗原；肿瘤转移

Application of combined detection of DNA methylation of *RASSF1A* and SCC in metastatic monitoring of non-small cell lung cancer

ZHANG Hongbin*, ZHANG Man'e, HUANG Wenbin, LU Zhihua
(Molecular Biology Lab, the Second Hospital of Longyan, Longyan, Fujian, China, 364000)

[ABSTRACT]　**Objective**　To explore the prognostic value of combined analysis of squamous cell carcinoma antigen (SCC) and DNA methylation of ras association domain family 1A (*RASSF1A*) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).　**Methods**　A total of 57 NSCLC patients treated in the second hospital of Longyan from January 2014 to June 2015 were enrolled. DNA methylation of *RASSF1A* in plasma, serum levels of SCC before operation, and DNA methylation of *RASSF1A* in tissue after the operation were determined. The patients were all followed up for 12 months and divided into 2 groups, the metastatic group and the non-metastatic group. The relationships among the levels of SCC, DNA methylation of *RASSF1A* and metastasis events were analyzed.　**Results**　Compared with the non-metastatic group, the levels of SCC and DNA methylation of *RASSF1A* were significantly increased in the metastatic group. According to ROC curve analysis, the serum levels of SCC and DNA methylation of *RASSF1A* matched up to the prognostic condition for the metastasis events. The SCC level was 4.05 ng/mL, DNA methylation of *RASSF1A* in tissue was positive as the cut-off point for risk stratification, the Kaplan-Meier survival curve revealed that there was a significant difference be-

作者单位：龙岩市第二医院分子生物实验室，福建，龙岩 364000
*通讯作者：张洪彬，E-mail: hbzhang-328@163.com

tween high risk and low risk patients for metastasis events occurrence in NSCLC patients ($P<0.05$). **Conclusion** The higher the level of serum SCC and DNA methylation of *RASSF1A* in the tumor tissue of NSCLC patients, the higher the risk of postoperative metastasis. Increased levels of SCC and DNA methylation of *RASSF1A* could predict the prognosis at certain degree for NSCLC patients.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer; Methylation of ras association domain family 1A; Squamous cell carcinoma antigen; Tumor metastasis

肺癌是否发生转移对于术后的治疗方式和预后有重要的影响，但是目前缺乏可早期、动态监测肺癌转移的标志物。目前多项研究表明，抑癌基因—*Ras* 相关结构域蛋白家族 1A（ras association domain family 1A，*RASSF1A*）的编码基因启动子区的甲基化与肺癌相关[1-3]。因此 *RASSF1A* 基因甲基化有可能作为动态监测肺癌转移的标志物。同时，近几年对于循环肿瘤 DNA 的研究显示，肿瘤患者血液中游离 DNA 与相应的原发肿瘤细胞基因变异相一致[2]。因此，循环血中的 *RASSF1A* 基因甲基化水平检测也可能成为一种非侵入性的肿瘤诊断手段[3]。鳞状上皮细胞癌抗原（squamous cell carcinoma antigen，SCC）是一种传统的肺癌标志物，可辅助诊断肺鳞癌，配合癌抗原 125（cancer antigen 125，CA125）、细胞角蛋白 19 片段（cytokeratin-19-fragment，CYFRA21-1）、癌胚抗原（carcino embryonic antigen，CEA）联合检测可提高肺癌患者诊断的灵敏性[4]，其水平与肿瘤的进展程度相关，但是单独检测灵敏度不高[5-6]。本研究通过随访观察非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）患者，采用甲基化特异性 PCR（methylation specific PCR，MSP）技术对 NSCLC 患者肿瘤组织及对应术前血浆标本中 *RASSF1A* 甲基化水平进行检测，并同时检测上述病例术前血清 SCC 水平，旨在探讨 *RASSF1A* 甲基化水平和 SCC 联合检测在 NSCLC 患者危险分层及术后转移评估中的价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2014 年 1 月至 2015 年 6 月在龙岩市第二医院就诊的 57 例 NSCLC 患者，其中男性 25 例，年龄 35~72 岁，平均年龄（65.8±3.9）岁；女性 32 例，年龄 30~70 岁，平均年龄（59.5±5.6）岁。入选标准：①病理诊断为 NSCLC，符合美国国家综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）2015 年 NSCLC 临床指南[7]。②未经任何放化疗等治疗。③无其他肿瘤病史。

1.2 方法

在施行手术前采集患者外周静脉血液标本 5 mL，其中 2 mL 分离血清，3 mL 置于经过 EDTA-Na 处理的抗凝管中，3 000 r/min 离心 15 min，分离血浆。取 5~10 g 肿瘤组织，肿瘤组织需取自肿块中心且未发生坏死的部分，术后均经病理医生确诊为 NSCLC。组织获取均征得患者及家属知情同意，并经医院伦理委员会同意，分别于 1 个月、3 个月、6 个月、12 个月随访患者因肺癌转移再次入院情况。

1.2.1 血清 SCC 水平测定

血清 SCC 水平测定采用电化学发光法，试剂和检测仪器购自美国罗氏公司。实验步骤按照说明书操作。血清 SCC 水平正常值为：<1.5 ng/mL。

1.2.2 MSP 法检测 *RASSF1A* 甲基化水平

DNA 提取及修饰：取 50 mg 组织，使用蛋白酶 K 消化法提取组织 DNA，采用 DNA 纯化试剂盒（QIAGEN，德国）提取血浆样本中的基因组 DNA，按试剂盒说明书操作。提取后的 DNA 用紫外分光光度计（岛津 UV-1750，日本）测定浓度及纯度。DNA 甲基化修饰使用 The Intergen CpGenome DNA Modification Kit（QIAGEN，德国），取 DNA 1 μg 用 3 mol/L NaOH 处理变性后，再通过亚硫酸氢钠修饰，50℃避光水浴过夜，修饰后的 DNA 用乙醇沉淀回收并用去离子水重悬，即可用于 MSP 的检测。

MSP 检测：针对 *RASSF1A* 基因启动子的转录调控区域，根据参考文献[3]合成基因的各 PCR 引物，甲基化引物对的上游引物序列为 5′-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3′，下游引物序列为 5′-AACCCCGCGAACTAAAAACGA-3′；非甲基化引物对的上游引物序列为 5′-TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTGT-3′，下游引物序列为 5′-CAAACCCCACAAACTAAAAACAA-3′。

PCR反应体系如下：10×PCR缓冲液2.5 μL，10 mol/L dNTP 4 μL，25 mol/L $MgCl_2$ 4 μL，上、下游引物各1 μL，已修饰的DNA模板10 μL，Taq酶0.5 μL，去离子水补充体积至50 μL。扩增条件如下：94℃预变性5 min；94℃ 1 min，58℃ 1 min，72℃ 1 min，共35个循环。同时分别选取经甲基化酶M.SssⅠ（NEB，美国）处理和未经处理的正常人外周血淋巴细胞DNA作为甲基化、非甲基化阳性对照，去离子水作空白对照。取5 μL反应产物进行3%琼脂糖凝胶电泳，用凝胶成像仪（BIORAD，美国）拍照分析。甲基化引物扩增出条带的样品，判定为甲基化阳性；未甲基化引物扩增出条带、甲基化引物扩增不出条带的样品，判定为甲基化阴性；2种引物均扩增出条带的样品，判定为甲基化阳性。

1.3　统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。用χ^2检验分别比较不同病理分期患者、鳞癌和非鳞癌患者、发生转移和未发生转移患者组织和血浆中*RASSF1A*基因甲基化阳性率；*t*检验分别比较鳞癌和非鳞癌患者、发生转移和未发生转移患者术前血清SCC水平。单因素方差分析法比较不同病理分期患者术前血清SCC水平差异。通过绘制受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve，ROC）制定实验数据的截断点，采用Kaplan-Meier进行生存分析，生存曲线比较采用Log Rank检验。以上统计学分析以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　患者总体病理分期及组织学类型

57例NSCLC患者，总体病理分期及组织学类型分布见表1。其中26例（45.6%）因肺癌转移再次入院，为转移组。其余31例未发生转移为未转移组。

表1　患者总体病理分期及组织学类型

Table 1　The overall pathological stage and histological type of the patient

病理分期	细支气管肺泡癌	腺癌	鳞癌	大细胞癌	腺鳞癌	总计
Ⅰ期	0/2（9.5%）	0/9（42.9%）	0/8（38.1%）	0/1（4.8%）	0/1（4.8%）	0/21
Ⅱ期	0/1（5.3%）	5/7（36.8%）	4/8（42.1%）	0/2（10.5%）	0/1（5.3%）	9/19
Ⅲ期	1/1（5.9%）	6/6（35.3%）	8/8（47.1%）	1/1（5.9%）	1/1（5.9%）	17/17
总计	1/4（7%）	11/22（38.6%）	12/24（42.1%）	1/4（7%）	1/3（5.3%）	26/57

表中的数据，分子为转移病例数，分母为对应分期及组织类型病例数（包含了转移病例数和未转移病例数之和），括号内为各相应组织类型病例数占对应分期总病例数的百分比。

2.2　不同分组患者术前血清SCC水平、术后组织和术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率比较

比较不同病理分期患者术前血清SCC、术后组织和术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率，Ⅲ期均高于Ⅱ期、Ⅱ期高于Ⅰ期，3组间术前血清SCC水平、术后组织*RASSF1A*甲基化阳性率差异均有统计学意义（$P<0.05$），术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率差异无统计学意义（$P>0.05$）。鳞癌（包括鳞癌和腺鳞癌）患者术前血清SCC水平高于非鳞癌患者，差异有统计学意义（$P<0.05$），组织、术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率差异均无统计学意义（$P>0.05$）。发生转移的患者术前血清SCC水平、术后组织和术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率均高于未发生转移的患者，差异均有统计学意义（$P<0.05$），具体数据见表2。

2.3　血清SCC水平、组织和血浆*RASSF1A*甲基化阳性率评估患者术后转移的价值

根据出院后12个月NSCLC患者随访的转移情况，绘制血清SCC水平、组织和血浆*RASSF1A*甲基化阳性率对NSCLC患者术后转移判定的ROC曲线，血清SCC水平、组织和血浆*RASSF1A*甲基化阳性率曲线下面积分别为0.681、0.785、0.647，检验*P*值分别为0.019、0.000、0.058。以上结果表明血清SCC和组织*RASSF1A*甲基化阳性率面积有统计学意义，血清SCC和组织*RASSF1A*甲基化阳性率均符合预测NSCLC术后转移的条件，见图1。

表2 不同分组患者术前血清SCC水平、术后组织和术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率比较

Table 2 Comparison of preoperative serum SCC level, positive rate of *RASSF1A* methylation in postoperative tissue and preoperative plasma among different groups

分组	术前血清SCC平均值（$\bar{x}\pm s$，ng/mL）	术后组织*RASSF1A*甲基化阳性率（%）	术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率（%）
Ⅰ期(n=21)	2.26±1.19	28.57	19.05
Ⅱ期(n=19)	3.22±1.92	31.58	21.05
Ⅲ期(n=17)	3.94±2.85	70.59	41.18
F值或χ^2值	3.253	8.100	2.780
P值	0.046	0.017	0.249
鳞癌(n=27)	4.58±2.18	48.15	37.04
非鳞癌(n=30)	1.73±0.67	36.67	16.67
t值或χ^2值	−6.812	0.039	1.208
P值	0.000	0.843	0.205
未转移(n=31)	2.31±1.1	16.13	12.90
转移(n=26)	4±2.65	73.08	42.31
t值或χ^2值	−3.04	18.812	6.305
P值	0.002	0.000	0.012

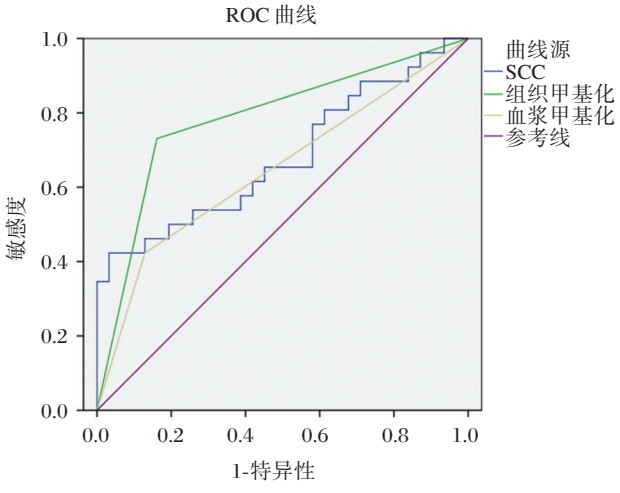


图1 血清SCC水平、术后组织和术前血浆*RASSF1A*甲基化阳性率预测NSCLC术后转移的ROC曲线

Figure 1 The ROC curves of serum SCC level, positive rate of *RASSF1A* methylation in postoperative tissue and preoperative plasma that used to predict NSCLC postoperative metastasis

2.4 生存曲线分析

结合血清SCC水平、组织*RASSF1A*甲基化阳性率对NSCLC患者的术后转移判定的ROC曲线的坐标点，血清SCC水平≥4.05 ng/mL预测NSCLC患者发生转移的敏感性和特异性分别为42.3%和96.8%，约登（Youden）指数为0.391；*RASSF1A*甲基化阳性预测NSCLC患者发生转移的敏感性和特异性分别为73.1%和83.9%，Youden指数为0.569。以血清SCC、组织*RASSF1A*甲基化水平越高，发生转移的风险越高进行危险分层。将血清SCC为4.05 ng/mL、组织*RASSF1A*发生甲基化（赋值为1）作为危险分层界值绘制Kaplan-Meier生存曲线，将入选的NSCLC患者分为高危组（血清SCC水平≥4.05 ng/mL和/或组织*RASSF1A*发生甲基化，共24例）、低危组（血清SCC水平<4.05 ng/mL和/或组织*RASSF1A*未发生甲基化，共33例）。Log Rank（Mantel-Cox）检验显示，高危组与低危组患者生存时间差别具有统计学意义（P=0.011，P<0.05），见图2。

3 讨论

由于非小细胞肺癌易复发和转移，因此判断临床病情的严重程度、危险分层和术后转移给患

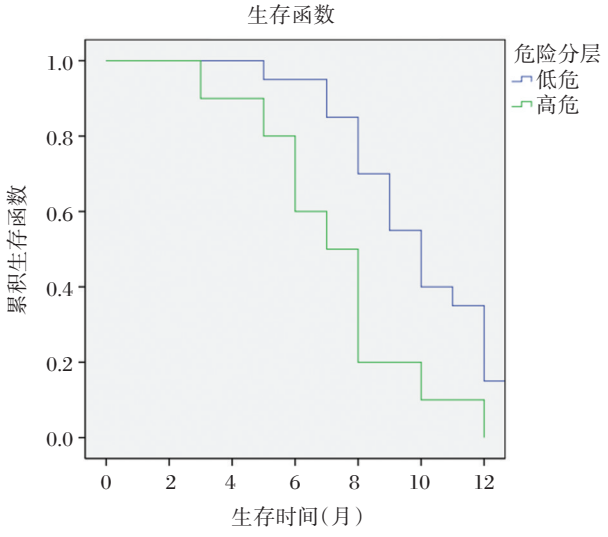


图2　不同危险分层的Kaplan-Meier生存曲线

Figure 2　Kaplan-Meier survival curves of different risk stratification

者带来了很大的困难。在非小细胞肺癌的研究中，主要依靠病理分期、生物标志物和患者的临床特征来预测预后。寻找非小细胞肺癌转移标志物是肺癌研究领域的热点之一。近年来，CA125、CYFRA21-1、CEA等生物标志物已被确定在非小细胞肺癌的发生和发展中有重要作用。同时，还为非小细胞肺癌的诊断、危险分层、疗效评价和术后转移提供了有力的支持。

在本研究中使用的SCC是一种常用的肿瘤标志物，其在子宫、肺、头部和颈部等鳞癌中均有表达。大量的临床研究表明，检测SCC有助于判断非小细胞肺癌患者的术后转移，尤其是在肺鳞状细胞癌患者中[4-6]。在非小细胞肺癌患者中，血清SCC的升高可能提示转移或预后差。本研究结果显示，越后期的病理分期，术前血清SCC水平越高，可以辅助病理分期的诊断；同时，鳞癌患者SCC水平可以作为肺鳞状细胞癌的鉴别诊断指标；高水平SCC转移率较高与国内外SCC对于NSCLC术后转移评价的研究结果一致[4-6]。

在NSCLC标志物的研究中，通过检测可预测化疗疗效和预后的分子标记物，可以识别出可从化疗中受益的早期患者。*RASSF1A*是一个抑癌基因，多项研究表明其启动子区异常的高甲基化会导致其丧失抑癌功能[8-9]。另外，有研究指出，肿瘤细胞在坏死的过程中，可释放DNA进入循环血中，与相应的原发肿瘤细胞在分子层面的变异相一致[10-11]。但是NSCLC的基因甲基化研究仅局限于组织方面，仅有少数检测循环血中的研究[12]。针对河北地区人群的相关性研究表明，血浆中甲基化*RASSF1A*基因的检出率与NSCLC的分化程度有关[13]。也有研究指出，肺癌组织和血浆*RASSF1A*基因甲基化检出率与患者分化程度、淋巴结转移有关[14]，非小细胞肺癌患者的淋巴结有更高比例的*RASSF1A*基因甲基化检出率[15]。这与本研究的结果具有一致性。本实验通过检测NSCLC患者术后组织和血浆*RASSF1A*甲基化水平，并对患者进行12个月的随访，随访期间发生转移的患者组织和血浆*RASSF1A*甲基化阳性率均高于未发生转移的患者，差异有统计学意义（$P<0.05$）。这表明*RASSF1A*甲基化与NSCLC患者术后转移相关，有望作为NSCLC术后转移预测的新型标志物。另外，病理分期越晚，组织*RASSF1A*甲基化阳性率越高，可作为病理分期的辅助标志物[16-17]。

本文研究结果表明，血清SCC和组织*RASSF1A*甲基化阳性率均可作为NSCLC术后转移的标志物，但分别使用的正确诊断指数（约登指数）并不高。Log Rank（Mantel-Cox）检验显示，血清SCC、组织*RASSF1A*甲基化水平高与水平低的患者生存时间差异具有统计学意义（$P<0.05$）。血清SCC、组织*RASSF1A*甲基化水平都与NSCLC的危险分层有关，且水平越高发生转移事件的风险越大。综上所述，血清SCC、血浆和组织*RASSF1A*甲基化水平在NSCLC患者危险分层及术后转移评估中有一定的临床意义。

本研究数据仅限于龙岩地区，样本量不够大；此外，本研究以无转移的NSCLC患者为对照组，未建立良性肺病对照组、小细胞肺癌对照组，随访持续时间仅为一年。以上是本研究的不足之处。因不同的标志物有各自独特的生物学特性和代谢过程，在NSCLC的发展过程中协同或单独发挥作用，如果能对NSCLC患者血清SCC、血浆*RASSF1A*甲基化水平联合并持续检测，同时结合影像学等其他诊断手段，将有利于对NSCLC术后转移不良患者的监测和干预，对延缓病情进展、延长患者的生存时间有重要意义。

参考文献

[1] Su Y, Fang HB, Jiang F. Integrating DNA methylation and microRNA biomarkers in sputum for lung cancer detection[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8(1):109.

[2] 王柳倩, 马为. 肿瘤标志物在肺癌的早期诊断及预后评估中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(12):3004-3007.

[3] 亢春彦, 周慧聪, 汤少鹏, 等. 血浆中检测FHIT、p16、MGMT和RASSF1A基因甲基化在肺癌诊断中的价值[J]. 肿瘤, 2011, 31(8):729-734.

[4] 时君, 徐风亮, 许祯杰, 等. 血清肿瘤标记物联合动态检测在肺癌诊断和监控治疗中的应用[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(12):48-50.

[5] Fiala O, Pesek M, Finek J, et al. Prognostic significance of serum tumor markers in patients with advanced-stage NSCLC treated with pemetrexed-based chemotherapy[J]. Anticancer Res, 2016, 36(36): 461-466.

[6] Jiang R, Wang X, Li K. Predictive and prognostic value of preoperative serum tumor markers is EGFR mutation-specific in resectable non-small-cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(18):26823-26836.

[7] Ettinger D, Borghaei H, Akerley W. NCCN clinical practice guidelines in oncology - non-small cell lung cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 2(2):94-123.

[8] Pastuszak-Lewandoska D, Kordiak J, Migdalska-Sęk M, et al. Quantitative analysis of mRNA expression levels and DNA methylation profiles of three neighboring genes: FUS1, NPRL2/G21 and RASSF1A in non-small cell lung cancer patients[J]. Respir Res, 2015, 16(1):1-13.

[9] Liu B, Song J, Luan J, et al. Promoter methylation status of tumor suppressor genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241(14):1531-1539.

[10] 戴五敏, 韩晓红, 石远凯. 循环肿瘤DNA在肿瘤临床应用中的进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21):2456-2461.

[11] 徐婷, 徐国宾, 贾淑芹, 等. 循环肿瘤DNA检测在恶性肿瘤诊治中的应用进展与问题思考[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(2):81-88.

[12] Ma Y, Bai Y, Mao H, et al. A panel of promoter methylation markers for invasive and noninvasive early detection of NSCLC using a quantum dots-based FRET approach[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 85: 641-648.

[13] 曹丽, 孙阳阳, 曹若琼, 等. 非小细胞肺癌患者血浆RUNX3、RASSF1A、3-OST-2、DAPK、PTPRO基因甲基化状态观察[J]. 山东医药, 2016, 56(43): 84-87.

[14] 王培培, 张翠英. 内蒙古地区RASSF 1A、P16、DAPK、RUNX3基因甲基化在非小细胞肺癌中的研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2016, 38(2):98-102.

[15] Millares L, Serra M, Andreo F, et al. Assessment of methylation status of locoregional lymph nodes in lung cancer using EBUS-NA[J]. Clin Exp Metastasis, 2015, 32(7):637.

[16] Monsó E, Montuenga LM, Sánchez de Cos J, et al. Biological marker analysis as part of the CIBERESRTIC cancer-SEPAR strategic project on lung cancer[J]. Arch Bronconeumol, 2015, 51(9):462-467.

[17] Millares L, Serra M, Andreo F, et al. Assessment of methylation status of locoregional lymph nodes in lung cancer using EBUS-NA[J]. Clin Exp Metastasis, 2015, 32(7):637-646.

·论　著·

生殖系统CT、UU、NG三种病原体感染现状分析

王敬仁　陈杏园　罗世强　许泽辉　蔡鹏飞　覃肖　唐宁*

［摘　要］ **目的**　了解柳州地区沙眼衣原体(CT)、解脲脲原体(UU)和淋球菌(NG)3种主要生殖系统疾病病原体的感染现状,为临床防治提供依据。　**方法**　对2014年1月至2016年12月来我院就诊的47 618例患者样本,采用实时荧光定量PCR技术检测CT、UU及NG 3种病原体,并对检测结果进行统计分析。　**结果**　3种病原体中,UU的阳性率最高(61.50%),NG和CT的阳性率均较低(3.29%、10.90%)。在不同性别中,女性患者CT、UU和NG的阳性率均高于男性患者(P<0.05)。男性和女性患者均为15~20岁年龄组CT阳性率较高。男性患者各年龄组间UU阳性率差异无统计学意义,女性患者15~20岁年龄组UU阳性率较高。男性高NG阳性感染者主要集中于21~40岁年龄段,女性患者51岁以上年龄组NG阳性率较高。在女性患者中,诊断为生殖系统炎症或不孕症的患者CT、UU、NG的阳性检出率均高于整体的平均检出率,体检、婚检女性人群3种病原体阳性检出率均接近于平均检出率。此外,CT在夏季的阳性检出率最高,而UU和NG各季节间比较差异无统计学意义。　**结论**　CT、UU、NG感染均与生殖系统疾病和不孕症密切相关,应注意个人防护及重视体检,积极防治。

［关键词］　沙眼衣原体;解脲脲原体;淋球菌;实时荧光定量PCR

Analysis of the prevalence of CT, UU and NG in reproductive system

WANG Jingren, CHEN Xingyuan, LUO Shiqiang, XU Zehui, CAI Pengfei, QIN Xiao, TANG Ning*
(Department of Medical Genetics, Liuzhou Maternal and Child Health Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001)

[ABSTRACT]　**Objective**　To learn about the infection status of 3 common sexually transmitted diseases (STD) pathogens of *Neisseria gonococcus* (NG), Chlamydia trachomatis (CT) and Ureaplasma urealyticum (UU) in Liuzhou city and provide evidence for the prevention and treatment of these STDs.　**Methods**　CT, UU and NG samples were taken routinely from 47 168 patients admitted to our hospital from January 2014 to December 2016, and determined by quantitative real-time PCR (qPCR) as contrast.　**Results**　Among 47 618 patients, the detection rate of UU was the highest (61.50%), the detection rates of NG and CT were lower (3.29%, 10.90% respectively). The detection rates of CT, UU and NG were all lower in males than in females (P<0.05). The CT detection rate of patients aged 15 to 20 was the highest in both males and females. There were no significant differences among the results of the infection rate of UU in males, and in females, the highest positive rate of UU was in the 15 to 20 age group. The highest positive infection rate of NG in males was predominantly in the 21 to 40 age group, while the detection rate of NG in ≥51 years old females was the highest. In female patients, the diagnosis of reproductive system inflammation and infertility accounted for a larger proportion, and the detection rates of CT, UU and NG were all higher than the overall detection rates, detection rates of the examination group are close to the total detection rates. The detection rate of CT was the highest in summer. There were no significant differences among the results of UU and NG in different sea-

基金项目:柳州市科学研究与技术开发计划项目研究成果(2014G020404)
作者单位:广西柳州市妇幼保健院医学遗传科,广西,柳州 545001
*通讯作者:唐宁, E-mail: tn825@126.com

sons. Conclusion The infection of CT, UU and NG are closely related to the diagnosis of reproductive system inflammation or infertile patients. We should pay attention to personal protection and physical examination.

[KEY WORDS] Chlamydia trachomatis; Ureaplasma urealyticum; *Neisseria gonococcus*; Quantitative real-time PCR

性传播疾病(sexually transmitted diseases, STD)是目前世界流行最广的一类传染病,在性病病原体中,沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis, CT)、解脲脲原体(Ureaplasma urealyticum, UU)和淋球菌(*Neisseria gonococcus*, NG)是STD的主要病原体,CT、UU、NG这3种病原体所致的泌尿生殖系统感染已成为我国各地区主要的STD,其感染情况较为复杂,且感染率高、复发率高,虽然致死率很低,但严重影响患者身心健康[1-2]。其临床症状通常表现为各种生殖系统炎症并继发不孕,而且在孕期、围产期均可使胎儿或新生儿感染,造成胎儿畸形、死胎流产和早产等病理性妊娠,严重危害生殖健康[3-4]。本研究为了解柳州地区3种主要性传播疾病病原体的检出情况并分析其流行特征,对2014年1月至2016年12月于柳州市妇幼保健院就诊的患者、体检及婚检人员生殖系统CT、UU、NG 3种病原体感染情况进行统计分析,报道如下。

1 资料和方法

1.1 对象

本研究对象为2014年1月至2016年12月于柳州市妇幼保健院进行CT、UU和NG检测的生殖系统炎症、不孕症患者以及体检、婚检人员,共47 618例,其中男性3 084例,女性44 534例,男女比例约为1∶14.4,年龄15~78岁,平均年龄(37.2±4.2)岁,所有待检者采集生殖道分泌物的前一周内无生殖道及全身用药史。

1.2 标本采集

女性分泌物标本采集:用无菌拭子于宫颈口内1~1.5 cm处采集宫颈分泌物;男性分泌物标本采集:用无菌拭子于尿道口内约2 cm处取生殖道分泌物。采集的分泌物置于预先盛有1 mL 0.9%氯化钠注射液的无菌管中,1 h内送检。

1.3 检测方法

生殖道分泌物拭子加入约1 mL 0.9%氯化钠注射液充分震荡混匀,将漂洗液置入1.5 mL的离心管中。12 000 r/min离心5 min,弃上清液,沉淀中加入50 μL DNA提取液后充分混匀,100℃金属浴裂解10 min,12 000 r/min离心5 min,取上清液2 μL加入PCR反应管中,同时做阴阳性对照各一管,置入全自动PCR仪中进行扩增,操作严格按说明书进行。实时荧光定量PCR检测试剂盒(CT:国械注准20163401027;UU:国械注准20153401995;NG:国械注准20163400962)及扩增仪均由广州中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行数据处理分析,检出率用百分率(%)表示,组间资料采用χ^2检验进行分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2014至2016年3种常见病原体阳性率分析

从2014年到2016年,CT、UU、NG 3种病原体的检出情况见表1。3种病原体均有一定的阳性检出率,表现为UU阳性检出率最高,CT次之,NG检出率最低。CT检出率在2015年上升后在2016年有明显下降;UU检出率最高且呈稳步缓慢下降趋势;NG检出率较低,2015年下降较明显,但2016年有上升趋势。

表1 2014至2016年CT、UU、NG检测结果

Table 1 The detection results of CT, UU and NG from 2014 to 2016

病原体	2014年(*n*)		2015年(*n*)		2016年(*n*)		2014-2016年(*n*)	
	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)
CT	9 631	1 095(11.37)	9 511	1 114(11.71)	9 985	965(9.66)	29 127	3 174(10.90)
UU	3 438	2 158(62.77)	2 933	1 792(61.10)	4 072	2 472(60.71)	10 443	6 422(61.50)
NG	2 283	86(3.77)	2 761	84(3.04)	3 004	96(3.20)	8 048	266(3.29)

2.2　不同性别3种病原体检测结果

女性的3种病原体检出率均高于男性，差异有统计学意义（$P<0.05$），男性和女性患者中均为UU和CT阳性检出率较高，见表2。

表2　不同性别CT、UU、NG的检测结果

Table 2　The detection results of CT, UU and NG in different genders

病原体	男性（n）		女性（n）		χ^2	P
	例数	阳性（%）	例数	阳性（%）		
CT	1 462	145(9.92)	27 665	3 375(12.20)	6.804	0.009
UU	1 013	501(49.46)	9 430	6 032(63.97)	82.211	0.000
NG	609	7(1.15)	7439	258(3.47)	9.505	0.002

2.3　不同性别受检者检出情况的年龄构成分析

男性和女性患者均为15~20岁年龄组CT阳性检出率较高。男性患者各年龄组UU阳性检出率差异无统计学意义，女性患者15~20岁年龄组UU阳性检出率较高。男性高NG阳性感染者主要集中在21~40岁年龄段，女性患者51岁及以上年龄组NG阳性检出率较高，见表3。

表3　不同性别受检者CT、UU、NG检出情况的年龄构成

Table 3　The detection results of CT, UU and NG in different ages and different genders

年龄（岁）	CT				UU				NG			
	男性（n）		女性（n）		男性（n）		女性（n）		男性（n）		女性（n）	
	例数	阳性（%）	例数	阳性（%）	例数	阳性（%）	例数	阳性（%）	例数	阳性（%）	例数	阳性（%）
15~20	29	7(25.55)	996	298(29.82)	5	2(40.00)	487	335(68.82)	5	0(0)	490	28(5.71)
21~30	620	66(10.73)	14 420	1 970(13.73)	424	215(50.71)	4 629	3 034(65.56)	279	301(1.08)	4 185	139(3.32)
31~40	658	56(8.49)	9 895	884(8.93)	514	250(48.64)	3 707	2 272(61.29)	291	40(1.37)	2 095	70(3.34)
41~50	143	18(12.50)	2 057	188(9.14)	64	31(48.43)	522	342(65.52)	28	0(0)	601	16(2.66)
≥51	12	2(16.67)	297	26(8.75)	6	2(33.33)	85	48(56.47)	6	0(0)	68	5(7.35)
χ^2	9.780		441.541		1.229		24.045		–		11.985	
P	0.044		0.000		0.873		0.000		–		0.017	

2.4　不同临床症状的女性患者检出情况分析

不同临床症状的女性患者检出情况见表4。诊断为生殖系统炎症或不孕症的女性患者CT、UU、NG 3种病原体的检出率均高于女性的平均检出率，其中3种病原体的检出率均为诊断为生殖系统炎症的女性患者最高。体检、婚检女性人群3种病原体检出率均接近于平均检出率，各组检出率的差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.5　不同季节感染情况分析

CT、UU、NG不同季节的阳性检出结果见表5。根据季节划分及柳州地区气候变化将3、4、5月划分为春季，6、7、8月划分为夏季，9、10、11月划分为秋季，12、1、2月划分为冬季。从表5中看出，CT阳性率在夏季最高（$P<0.05$），UU和NG不同季节的阳性率差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3　讨论

STD是主要通过性行为传播的传染性疾病，主要病变发生在生殖器部位，而CT、UU和NG为STD的主要病原菌。这些病原体的感染严重危害生殖健康，其中21~40岁年龄段人群为其主要传染源和高危人群[5]。CT可通过细菌滤器，专性寄生在活细胞内，可引发感染，且感染常呈隐性感染，更容易造成感染传播[6]。UU是人类生殖系统感

表4 不同临床症状的女性患者检测结果

Table 4 The detection results in females patients with different clinical symptoms

临床症状	CT(*n*)		UU(*n*)		NG(*n*)	
	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)
女性总数	27 665	3 375(12.20)	9 430	6 032(63.97)	7 439	258(3.47)
生殖系统炎症	10 262	1 351(13.17)	3 939	2 753(69.89)	2 782	109(3.92)
不孕症	1 639	210(12.81)	887	570(64.26)	696	27(3.88)
体检婚检	1 4326	1 659(11.58)	3 773	2 273(60.24)	3 351	113(3.37)
其他	1 438	155(10.78)	831	446(53.67)	610	9(1.48)
χ^2	17.344		379.797		9.361	
P	0.001		0.000		0.025	

表5 不同季节CT、UU、NG的检测结果

Table 5 The detection results of CT, UU and NG indifferent seasons

病原体	春季(*n*)		夏季(*n*)		秋季(*n*)		冬季(*n*)		χ^2	*P*
	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)	例数	阳性(%)		
CT	9 036	1 005(11.12)	8 605	996(11.57)	6 365	692(10.87)	5 121	481(9.39)	16.481	0.001
UU	3 002	1 858(61.89)	3 014	1 892(62.77)	2 541	1 531(60.25)	1 886	1 141(60.50)	4.731	0.193
NG	2 031	68(3.35)	2 071	72(3.48)	2 431	81(3.33)	1 515	45(2.97)	0.739	0.864

染的常见病原体，也是目前所知能独立生活和自行繁殖的最小原核细胞微生物，寄居于人类泌尿生殖道系统常引起男、女性生殖系统感染等[7]。此外，UU可黏附并阻碍精子运动，通过产生神经氨酸酶样物质使男性患者的精液质量下降阻碍与卵子的结合而致不孕[8]。NG也是常见的STD病原体之一，主要通过性接触或其它方式传播，引起泌尿生殖系统化脓性感染。人类作为其唯一的天然宿主，可引起淋菌性尿道炎、盆腔炎、播散性淋病等相关疾病[9]。

CT、UU、NG的感染情况复杂，CT、UU、NG阳性率在不同地区有较大差异[10]。相关研究报道，北京地区CT、UU、NG病原体总感染率分别为7.49%、42.92%、3.11%[11]；广州CT、UU、NG病原体的阳性率分别为8.0%、45.4%、3.0%[12]；本研究显示CT、UU、NG的阳性感染率相对较高，分别为10.90%、61.50%和3.29%，出现此种结果差异可能与各地区气候、风俗文化、教育程度、医疗条件等多种因素相关。CT、UU、NG易感染播散，易复发，且耐药性强，不易根治[13]。柳州地处华南，春季潮湿，夏季炎热，病原体容易滋生及传播，为CT、UU、NG的防控与治疗增加了一定的难度，应针对地区特点予以重视并积极治疗。

CT、UU、NG阳性检出率在不同性别及不同年龄阶段均表现出较大差异。在本研究中女性CT、UU、NG的阳性检出率高于男性，这与马晓慧等[15]报道的男性患者性病病原体阳性感染率高于女性患者的结果不一致。出现以上结果的原因可能与本次研究中所纳入的男、女样本量比例相差悬殊有关，也有可能与妇幼保健院和综合医院就诊群体差异相关。此外，基于性别生理结构差异及相应的社会学、流行病学等因素，妇女是生殖道感染的弱势人群，即所谓的“性病的生物学性别歧视”，生殖道感染对女性的身心可造成严重的伤害，不仅限于女性本身，也会严重影响下一代的健康[14]。同时本次研究发现男、女性中3种病原体的高发年龄段也有所差异，男性和女性患者均为15~20岁年龄组CT阳性率较高；女性患者15~20岁年龄组UU阳性率较高，而男性患者各年龄阶段UU阳性率差异并无统计学意义；男性高NG阳性感染者集中在21~40岁年龄段，为性活跃阶段，51岁及以上年龄段为女性NG的高发年龄段。以上阳性检出患者大多集中在低年龄阶段，究其原因可能为大部分青少年缺乏相应的保护意识。以上不同于相关文献报道的男性均为20岁以下人群的CT、NG、UU阳性率相对高于其他年龄阶段的报

道[16]，此结果可能与本次研究对象年龄主要集中于21~50岁，而分布于<20岁和≥51岁年龄段患者人数较少有关，有待进一步改善研究。

CT、UU、NG感染与生殖系统炎症、育龄妇女流产、异位妊娠、早产等疾病发生有密切的关系，严重影响女性生殖健康[17]。本研究中，诊断为生殖系统炎症或不孕症的女性患者CT、UU、NG检出率明显高于平均检出率。女性生殖道CT、UU、NG感染与不孕症的发生具有非常密切的关系，尤其是继发性不孕症，临床上可将UU、CT、NG检测作为不孕症的常规项目[18]。此外，本研究中体检和婚检女性人群中CT、UU、NG检出率接近于平均检出率，很多人仍表现出隐匿性感染。据世界卫生组织公报指出，CT、UU感染但无症状比例高达60%~70%。相关研究显示，无症状女性中未检出NG感染者，CT及UU检出率分别为4.81%和38.50%，这种隐匿性感染更容易引起传播[19]。因此需要我国相关部门针对相应人群进行健康引导和知识教育，重视个人卫生和体检，一旦确认其感染，应积极治疗，有效控制STD的感染和传播，以减少不孕症及妇科疾病的发生。

CT、UU、NG的感染与季节变化的相关性鲜有报道。相关文献报道指出，不同季节各病原体阳性率各有差异，以UU差异为最大[20]。本研究显示UU、NG阳性率各季节差异无统计学意义，而CT阳性率各季节差异有统计学意义，夏季阳性率最高，可能与天气较热容易引起女性生殖道菌群失调有关。CT、UU、NG的感染是否与季节变化有关仍需进一步研究。

综上所述，CT、UU、NG的感染情况仍非常严峻，对个体身心健康影响大，应予以重视，其感染有地域、性别差异及好发年龄较集中等特点，应针对高发人群加强宣教，重视体检，积极防治，减少性传播疾病的发生，关注生殖健康。

参考文献

[1] Workowski KA, Berman SM. Centers for disease control and prevention sexually transmitted disease treatment guidelines[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(3): S59-63.

[2] Kim Y, Kim J, Lee KA. Analytical performance of multiplex real-time PCR for six sexually transmitted pathogens[J]. Clin Lab, 2015, 61(11): 1749-1754.

[3] 彭端亮，李永文，赵鹃. 淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、解脲脲支原体感染与女性不孕症的关系[J]. 中华医院感染学杂志，2015，(23): 5494-5496.

[4] Hae-Sun Chung, Miae Lee. Comparative evaluation of multiplex real-time PCR assays for six pathogens of sexually transmitted infections[J]. Ann Clin Microbiol, 2017, 20(1): 1-6.

[5] 李会平，霍新年. 不孕不育夫妇生殖道解脲支原体、沙眼衣原体感染及抗精子抗体、抗子宫内膜抗体关系探讨[J]. 中国优生与遗传杂志，2014，22(1): 108-109, 53.

[6] 张欠欠，仵恒立，胡军婷，等. 388例非淋菌性尿道炎患者Uu、CT感染情况分析[J]. 中国微生态学杂志，2016，28(9): 1069-1071.

[7] 朱春兰，王世俊，朱立军，等. 解脲脲原体感染调查及药物敏感性分析[J]. 中国卫生检验杂志，2017，27(8): 1176-1178.

[8] 白玮，郝娜，连建华，等. 解脲支原体感染对男女不育不孕的临床影响研究[J]. 中国性科学，2017，26(5): 147-149.

[9] 范雪娇，吕敏仪，孙茜，等. 妇科疾病和不孕症患者泌尿生殖道感染情况分析[J]. 国际检验医学杂志，2017，38(10): 1324-1326.

[10] Jalal H, Delaney A, Bentley N, Sonnex C, Carne CA. Molecular epidemiology of selected sexually transmitted infections[J]. Int J Mol Epidemiol Genet, 2013, 4(3): 167-174.

[11] 张静，王海滨，时宇. STD门诊患者沙眼衣原体、解脲支原体、淋球菌与人乳头瘤病毒感染情况分析[J]. 标记免疫分析与临床，2015，22(8): 725-728.

[12] 周小剑，唐湘，李玉华. 某院3种性传播疾病的流行病学分析[J]. 现代诊断与治疗，2016，27(21): 4085-4086.

[13] 卢大乔，熊冰，周长春，等. 泌尿生殖道性病感染病原体分布与耐药性分析[J/OL]. 中华医院感染学杂志，2016，26(2): 363-365.

[14] 张红杰. 妇女生殖道感染及其危害[J]. 中国计划生育学杂志，2001，9(6): 372-374.

[15] 马晓慧. 612例泌尿系统感染患者检测CT+NG+UU感染情况分析[J]. 中国实用医药，2016，11(18): 48-49.

[16] 肖秀美，高爽，杨旭，等. 2998例男性患者解脲脲原体、淋病奈瑟菌和沙眼衣原体感染调查分析[J]. 中国男科学杂志，2016，30(1): 21-24.

（下转第102页）

·论 著·

胎儿染色体非整倍体无创检测在产前诊断中的应用价值

张丽科[1] 余学高[2*] 黄彬[2] 刘集鸿[1]

［摘 要］ **目的** 探讨胎儿染色体非整倍体无创检测在产前诊断中的应用价值。 **方法** 汇总2016年1月至12月在广州中山大学附属第一医院行无创产前检测(non-invasive prenatal testing,NIPT)的1 207例孕妇的检测结果及生育前后追踪随访结果,回顾性分析孕妇行NIPT的指征构成比以及评价NIPT分析性能。 **结果** 中山大学附属第一医院临床选择NIPT的指征主要是高龄妊娠(62.55%),其次是血清学筛查异常(25.85%)和不良孕产史(17.23%)。1 207例标本经基因测序检出胎儿染色体非整倍体异常高风险20例,其中21-三体综合征(21-trisomy syndrome,T21)高风险8例,18-三体综合征(18-trisomy syndrome,T18)高风险7例;经染色体核型分析确诊为T21和T18的例数分别为7例和5例。NIPT检测T21的平均Z值为6.710±2.122,95%置信区间(95% confidence interval,95% *CI*)为4.936~8.484;检测灵敏度为100%(7/7)、特异度为99.92%(1 199/1 200)、漏诊率为0(0/7)、误诊率为0.08%(1/1 200)、诊断准确度为99.92%(1 206/1 207)、阳性预测值为87.5%(7/8)、阴性预测值为100%(1 199/1 199)。检测T18的平均Z值为6.593±2.352,95% *CI*为4.418~8.768;检测灵敏度为100%(5/5)、特异度为99.83%(1 200/1 202)、漏诊率为0(0/5)、误诊率为0.17%(2/1 202)、诊断准确度为99.83%(1 205/1 207)、阳性预测值为71.43%(5/7)、阴性预测值为100%(1 200/1 200)。 **结论** NIPT检测胎儿染色体非整倍体异常快速、安全、准确,与染色体核型分析技术具有较高的一致性,在产前诊断中具有良好的临床应用价值。

［关键词］ 无创性产前检测技术;胎儿染色体非整倍体异常;下一代测序;胎儿游离DNA

Clinical value of non-invasive prenatal test in detecting chromosome aneuploidy

ZHANG Like[1], YU Xuegao[2*], HUANG Bin[2], LIU Jihong[1]

(1. Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Huizhou, Huizhou, Guangdong, China, 516000; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the clinical value of non-invasive prenatal testing (NIPT) in detecting chromosome aneuploidy. **Method** A total of 1 207 pregnant women enrolled in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University who accepted NIPT for chromosomes 21, 18 and 13 from January to December 2016 were analyzed and followed up with around childbirth retrospectively. Invasive prenatal diagnosis followed by fetal chromosome karyotype analysis was recommended in high-risk women following NIPT. The clinical indications and analysis capability of NIPT were examined. **Results** The most common indication for NIPT was advanced maternal age (62.55%), followed by serological screening abnormality (25.85%) and negative reproductive history (17.23%). 20 of 1 207 cases were detected with high-risk fetal abnormal chromo-

作者单位:1.惠州市第一人民医院检验科,广东,惠州516000
2.中山大学附属第一医院医学检验科,广东,广州510080
*通讯作者:余学高,E-mail:946931554@qq.com

some aneuploidy, including 8 cases with 21-trisomy syndrome (T21), 7 cases with 18-trisomy syndrome (T18). 20 cases received amniotic cavity puncture karyotype analysis, the result showed 7 cases with T21 and 5 cases with T18. Comparing the results of NIPT and karyotype analysis, the average Z value for diagnosing T21 was 6.710±2.122, 95% confidence interval (95% *CI*) was 4.936~8.484, the sensitivity was 100% (7/7), the specificity was 99.92% (1 199/1 200), the missed diagnosis rate was 0 (0/7), the misdiagnosis rate was 0.08% (1/1 200), the accuracy rate was 99.92% (1 206/1 207), the positive predictive value was 87.5% (7/8) and the negative predictive value was 100% (1 199/1 199). The average Z value for diagnosing T18 was 6.593±2.352, 95%*CI* was 4.418~8.768, the sensitivity was 100% (5/5), the specificity was 99.83% (1 200/1 202), the missed diagnosis rate was 0 (0/5) , the misdiagnosis rate was 0.17% (2/1 202), the accuracy rate was 99.83% (1 205/1 207), the positive predictive value was 71.43%(5/7) and the negative predictive value was 100% (1 200/1 200). Conclusions　NIPT had the advantage of speed, safety and high accuracy. It was consistent with karyotype analysis and has value in prenatal diagnosis.

[KEY WORDS]　Non-invasive prenatal testing; Fetal abnormal chromosomal aneuploidy; Next-generation sequencing; Cell-free fetal DNA

自1997年Lo团队发现了孕妇外周血中存在胎儿游离DNA（cell-free fetal DNA，cffDNA）以来，基于cffDNA进行胎儿疾病的研究迅速成为热点[1]。产前诊断也逐渐由介入性产前诊断向无创性产前检测（non-invasive prenatal testing，NIPT）进展。随着以高通量、自动化为显著特征的下一代测序（next-generation sequencing，NGS）技术的诞生，胎儿染色体非整倍体无创检测技术已面向临床[2]。但大部分的医疗机构都是收集标本后送往具有资质的第三方基因检测机构进行检测，仅有很少一部分医疗机构运用测序平台自主检测，对于NIPT在实验室检测过程中可能存在的问题报道较少。本文对中山大学附属第一医院自主检测的1 207例标本进行回顾性分析，总结NIPT检测的指征构成比及分析性能，分析NIPT在实验室检测过程中存在的问题，进而探讨NIPT在胎儿非整倍体异常诊断中的临床应用价值。

1　对象与方法

1.1　研究对象

选取2016年1月至12月在中山大学附属第一医院接受NIPT检查的孕妇1 207例。孕妇年龄17~51岁，平均年龄（36.70±4.59）岁；孕周9~34周，平均20.5周。NIPT指征：血清学筛查高风险、超声提示胎儿结构异常、超声软指标异常、染色体非整倍体生育史、无明确遗传学诊断的不良生育史家族史、高龄（预产年龄≥35岁）。另外，部分孕妇虽无上述指征，但要求行NIPT检测，则采用统一知情同意书，充分告知孕妇NIPT的临床适应征、检测范围、局限性及可能存在的风险[3-4]，由孕妇自愿选择并签署知情同意书。所有对象均行B超检查。

1.2　方法

1.2.1　标本采集及处理

①采用EDTA抗凝管收集孕妇外周血6 mL，8 h内依次以4℃ 2 890 r/min离心10 min，13 000 r/min离心10 min进行血浆分离，每管650 μL分装后80℃保存。②应用DNA提取试剂盒，磁珠分离法抽提样品DNA（QIAGEN，德国）。③所提取的血浆DNA应用T4DNA聚合酶（T4 DNApolymerase）、T4多聚核苷酸激酶（T4 PNK）、克列诺酶（Klenow enzyme）进行末端补平。在3′末端加碱基“A”，在DNA片段末端加上特定接头，通过PCR技术扩增两端带有接头的DNA片段，最终获得对应样本的DNA文库。将所得样本DNA文库进行质量检测，最后上机测序。

1.2.2　高通量基因测序产前筛查检测

采用Illumina Nextseq500二代测序仪进行测序。获得不低于400 M的有效reads数，平均每个样本不低于4 M的reads。运行序列比对软件BWA map将测序所得序列与人类基因组参考序列图谱比对。使用广州万德基因医学科技有限公司NIPT分析系统针对比对结果进行每条染色体序列个数统计。采用生物信息学对数据进行分析，计算Z值，利用Z值来评估胎儿患病风险（cut off：|Z|=3）。Z>3代表该染色体可能是三倍体，Z<-3代表该染色体可能是单倍体或者存在缺失。对NIPT高风险孕妇建议行介入性产前诊断及胎儿染色体核型分析。

1.2.3 结果验证及随访

对检测结果为高风险的孕妇，建议行介入性穿刺及胎儿染色体核型分析。对检测结果为低风险的孕妇进行生育前后随访。

1.2.4 统计学分析

统计学处理采用SPSS 22.0进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示；计数资料采用描述性分析，用频数和频率表示，组间比较采用χ^2检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1 207例NIPT检测的孕妇信息分析结果

1 207例选择NIPT的孕妇，包括双胎妊娠35例，单胎妊娠1 172例；高龄妊娠755例(62.55%)，低龄妊娠452例(37.45%)；不良孕产史208例(17.23%)；孕妇无指征但要求检测165例(13.67%)。443例有行血清学筛查试验(36.70%)，其中21-三体综合征(21-trisomy syndrome，T21)临界风险与高风险共291例，18-三体综合征(18-trisomy syndrome，T18)临界风险与高风险共21例，异常率为25.85%。B超检查结果显示：正常1 183例，异常24例，异常率为1.99%，主要表现为颈部透明带(nuchal translucency，NT)或颈部褶皱(nuchal fold，NF)增厚、鼻骨不清、双肾盂分离、单脐动脉、心脏室间隔膜缺失、脐膨出、羊水偏少、胎儿生长受限、胎率低、胎儿偏小等，数据见表1。

2.2 NIPT检测结果

1 207例临床标本中经基因测序检出高风险样本共20例，异常率为1.66%(20/1 207)，其中T21高风险8例(0.66%，8/1 207)，T18高风险7例(0.58%，7/1 207)，21-单体或缺失高风险3例，18-单体或缺失高风险1例和13-单体或缺失高风险1例。20例高风险病例经染色体核型分析确诊异常的有12例，其中高龄孕妇10例，占83.33%，见表2。

2.2.1 T21检测结果

8例高风险病例行羊水穿刺染色体核型分析，结果显示7例为T21核型，1例为正常核型，结果见表3。

NIPT检测T21的灵敏度为100%(7/7)、特异度为99.92%(1 199/1 200)、漏诊率为0(0/7)、误诊率为0.08%(1/1 200)、诊断准确度为99.92%

表1 1 207例入选NIPT的孕妇信息

Table 1 Basic characteristics of the 1 207 pregnant women of NIPT

类别	分布特征	n	构成比(%)
年龄(岁)	≤20	4	0.33
	20~24	24	1.99
	25~29	161	13.34
	30~34	263	21.79
	35~39	612	50.70
	40~44	134	11.10
	≥45	9	0.75
孕周(周+天数)	9+0~9+6	2	0.17
	10+0~10+6	6	0.50
	11+0~11+6	64	5.30
	12+0~12+6	155	12.84
	13+0~13+6	128	10.60
	14+0~14+6	125	10.36
	15+0~15+6	110	9.11
	16+0~16+6	164	13.59
	17+0~17+6	116	9.61
	18+0~18+6	86	7.13
	19+0~19+6	73	6.05
	20+0~20+6	40	3.31
	21+0~21+6	28	2.32
	22+0~22+6	28	2.32
	23+0~23+6	12	0.99
	24+0~24+6	14	1.16
	25+0~25+6	14	1.16
	26+0~26+6	8	0.66
	27+0~27+6	1	0.08
	28+0~28+6	4	0.33
	29+0~29+6	4	0.33
	30+0~30+6	5	0.41
	31+0~31+6	5	0.41
	32+0~32+6	2	0.17
	33+0~33+6	3	0.25
	34+0~34+6	1	0.08
	未知	9	0.75
超声	正常单胎	1 151	95.36
	正常双胎	32	2.65
	NT/NF增厚	10	0.83
	鼻骨不清	1	0.08
	单脐动脉	2	0.17
	心脏室间隔膜缺失	1	0.08
	胎儿脐膨出	1	0.08
	双肾盂分离	1	0.08
	胎儿生长受限	3	0.25
	胎率小	1	0.08
	其他	4	0.33

表2　20例NIPT阳性病历资料

Table 2　Details of the 20 NIPT positive cases

编号	年龄（岁）	孕周	血清学检查		产前超声	NIPT		羊水核型	结局
			21	18		Z值	判断		
1	41	14	未做	未做	未见异常	T21:8.883	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
2	34	13	未做	未做	未见异常	T21:5.190	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
3	36	15	未做	未做	未见异常	T21:9.858	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
4	37	11	未做	未做	未见异常	T21:7.44	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
5	38	12	未做	未做	未见异常	T21:4.963	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
6	37	14	未做	未做	未见异常	T21:5.281	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
7	44	16	1:5	1:307	未见异常	T21:8.036	T21高危	47,XN,+21	终止妊娠
8	39	15	1:50	1:90	未见异常	T18:8.763	T18高危	47,XN,+18	自发流产
9	41	14	未做	未做	未见异常	T18:5.932	T18高危	47,XN,+18	自发流产
10	41	13	未做	未做	未见异常	T18:7.257	T18高危	47,XN,+18	终止妊娠
11	39	12	未做	未做	未见异常	T18:7.737	T18高危	47,XN,+18	终止妊娠
12	23	17	1:560	>1:10	未见异常	T18:9.368	T18高危	47,XN,+18	终止妊娠
13	27	17	1:6 700	1:8 600	未见异常	T21:4.029	T21高危	46,XN	继续妊娠
14	34	30	1:577	1:37 037	未见异常	T18:3.437	T18高危	46,XN	继续妊娠
15	35	15	未做	未做	未见异常	T18:3.656	T18高危	46,XN	继续妊娠
16	39	15	未做	未做	未见异常	T21:−3.478	21单体高危	46,XN	继续妊娠
17	37	16	1:5 968	1:100 000	未见异常	T21:−3.053	21单体高危	46,XN	继续妊娠
18	37	16	未做	未做	未见异常	T21:−3.017	21单体高危	46,XN	继续妊娠
19	32	15	未做	未做	未见异常	T18:−3.294	18单体高危	46,XN	继续妊娠
20	37	19	未做	未做	未见异常	T13:−3.330	13单体高危	46,XN	继续妊娠

（1 206/1 207）、阳性预测值为87.5%（7/8）、阴性预测值为100%（1 199/1 199）。

8例T21高风险的样本Z值范围为4.029~9.858，平均Z值为6.710±2.122，95%置信区间（95% confidence interval，95% *CI*）为4.936~8.484。

表3　T21的NIPT与染色体核型分析结果比较

Table 3　Comparison results of NIPT for T21 and karyotype analysis

NIPT结果	染色体核型分析结果		合计
	T21	非T21	
T21	7	1	8
非T21	0	1 199	1 199
合计	7	1 200	1 207

2.2.2　T18检测结果

7例高风险病例经羊水穿刺染色体核型分析确证T18核型5例，正常核型2例，结果见表4。

NIPT检测T18的灵敏度为100%（5/5）、特异度为99.83%（1 200/1 202）、漏诊率为0（0/5）、误诊率为0.17%（2/1 202）、诊断准确度为99.83%（1 205/1 207）、阳性预测值为71.43%（5/7）、阴性预测值为100%（1 200/1 200）。

表4　T18的NIPT与染色体核型分析结果比较

Table 4　Comparison results of NIPT for T18 and karyotype analysis

NIPT	染色体核型分析		合计
	T18	非T18	
T18	5	2	7
非T18	0	1 200	1 200
合计	5	1 202	1 207

7例T18高风险的样本Z值范围为3.437~9.368，平均Z值为6.593±2.352，95% *CI*为4.418~8.768。

2.2.3 单体或缺失疾病检测结果

5例染色体单体或缺失病例经染色体核型分析均为正常核型。

2.2.4 临界风险结果

使用高通量基因测序技术对1 207例临床标本进行NIPT检测，有30例标本|Z|值处于临界风险，结果见表5。30例标本经复查，结果全为低风险。

30例临界风险标本初查|Z|值范围为3.014~4.407，平均|Z|值为3.360±0.378；复查|Z|值范围为0.069~2.997，平均|Z|值为1.404±0.803；两组数据进行配对 t 检验，t=12.052，P<0.05，可认为两组结果差异有统计学意义。

表5 30例临界阳性标本复查结果

Table 5 Review results of 30 critical positive specimens

序号	年龄	孕周	血清学(风险率)		B超	NIPT结果	
			T21	T18		初查	复查
1	34	16	1:8 100	1:100 000	胎儿未见异常	T21:4.407	T2:0.195
2	29	23	低风险	低风险	胎儿未见异常	T18:3.017	T18:0.711
3	31	26	正常	正常	胎儿未见异常	T18:3.026	T18:1.073
4	31	28	低风险	低风险	胎儿未见异常	T18:3.434	T18:2.84
5	29	22	1:670	低风险	胎儿未见异常	T18:3.244,	T18:1.706
6	26	17	高风险	低风险	胎儿未见异常	T18:4.282	T18:1.9
7	38	15	高风险	低风险	胎儿未见异常	T18:3.635	T18:0.79
8	37	13	1:3 400	1:10 000	胎儿未见异常	T18:3.38	T18:1.208
9	36	15	1:1 100	1:14 000	胎儿未见异常	T13:3.845	T13:0.144
10	36	16	1:5 900	1:36 000	胎儿未见异常	T13:3.298	T13:0.82
11	37	20	未做	未做	胎儿未见异常	T13:3.023	T13:−1.019
12	37	12	无	无	胎儿未见异常	T21:−3.014	T21:−1.423
13	34	12	无	无	胎儿未见异常	T21:−3.776	T21:−1.959
14	37	13	1:460	1:100 000	胎儿未见异常	T21:−3.637	T21:−1.37
15	38	12	未做	未做	胎儿未见异常	T21:−3.043	T21:0.069
16	36	16	无	无	胎儿未见异常	T21:−3.053	T21:−1.305
17	36	18	低风险	低风险	胎儿未见异常	T21:−3.015	T21:−1.08
18	21	23	未做	未做	胎儿未见异常	T21:−3.25	T21:−2.31
19	38	13	未做	未做	胎儿未见异常	T21:−3.187	T21:−2.87
20	37	20	未做	未做	胎儿未见异常	T21:−3.696	T21:−2.568
21	36	16	1:2 900	1:100 000	胎儿未见异常	T21:−3.661	T21:−0.92
22	28	17	1:168	1:18 521	胎儿未见异常	T21:−3.125	T21:−1.625
23	41	15	未做	未做	胎儿未见异常	T21:−3.23	T21:−2.997
24	35	19	1:7 300	1:100 000	胎儿未见异常	T13:−3.558	T13:−1.94
25	40	10	无	无	胎儿未见异常	T13:−3.596	T13:−1.572
26	37	13	无	无	胎儿未见异常	T13:−3.074	T13:−1.716
27	36	14	无	无	胎儿未见异常	T13:−3.052	T13:0.332
28	40	16	无	无	胎儿未见异常	T13:−3.097	T13:0.94
29	26	23	1:410	1:50 756	胎儿未见异常	T13:−3.055	T13:−0.808
30	35	11	未做	未做	胎儿未见异常	T13:−3.083	T13:−1.912

3 讨论

NIPT是近年来兴起的一种新型检测手段，主要针对21、18和13号染色体进行检测。关于NIPT对胎儿染色体非整倍体异常的诊断效能评价，Yao、Norton和张玢等[5-7]报道NIPT对T21的阳性预测值可达90%以上，Wang等[8]报道NIPT对T18的阳性预测值为64%。Zhang等[9]的研究认为NIPT对T21、T18和T13的检测灵敏度分别为99.17%、98.24%和100%，特异度分别为99.95%、99.95%和99.96%。Qiang等[10]的研究显示NIPT对T21和T18的检测灵敏度分别为100%和100%，特异度分别为100%和99.86%。本文研究结果与Qiang等的研究结果类似。胎儿T13的发病率低，约为1∶25 000[11]，本文研究标本数量有限，因此关于T13筛查的临床应用数据有待进一步积累。

美国医学遗传学与基因组学学会（the American College of Medical Genetics and Genomics，ACMG）指南建议，对于不同年龄阶段非肥胖的孕妇，在孕9~10周后可选择无创产前筛查（non-invasive prenatal screening，NIPS）来替代传统的血清学筛查进行T21、T18和T13的筛查[12]。在我国，现阶段NIPT的检测成本较为昂贵，且具有资质的检测机构有限，所以暂未被列为常规产前筛查项目，无法在适用人群中大面积普及和推广，因此临床产前筛查策略倾向于序贯检查。随着生活水平的提高和优生优育意识的加强，孕妇依据其个人目标与意愿选择诊断性或者筛查性技术的比例日益增大。一些血清学筛查低风险的孕妇因担心漏诊而进一步选择NIPT，也有部分经济条件较好的孕妇放弃血清学筛查直接行NIPT[13]。

虽然NIPT被认为是一种精准的产前筛查，但不可否认NIPT存在检测假阳性和假阴性的问题，尽管发生概率极低，所以不能称之为诊断，更不能取代有创的羊水或胎盘绒毛膜穿刺[14]。段红蕾等[13]的研究显示，NIPT报告高风险者中，部分胎儿染色体核型分析未见异常，即NIPT存在部分假阳性结果。本研究20例高风险孕妇中有8例胎儿染色体核型分析正常，也说明了存在假阳性问题。引起假阳性的主要原因有母体基因组中拷贝数变异、限制性胎盘嵌合、母体染色体嵌合、双胎中一胎停育、母体存在恶性肿瘤[15]。因此，临床中须强调NIPT高风险不能作为引产指征，必须通过染色体核型分析确诊。

在20例NIPT高风险病例中，经染色体核型分析确诊异常的有12例，其中高龄孕妇10例，占83.33%，表明高龄是发生胎儿非整倍体疾病的一个重要危险因素。

有研究认为超声显示胎儿结构异常者，染色体异常发生率为10.1%，但其中T21、T18和T13合计仅占染色体异常的64.4%，其余约1/3的染色体异常不在NIPT的检测范围内[16]。本文24例B超显示胎儿结构异常者的NIPT结果均为低风险；12例确诊胎儿染色体整倍体畸形者的B超结果均为正常。提示B超结果与NIPT结果不相平行，两种筛查方法不可相互替代。B超对于胎儿非整倍体疾病的检出能力有限，对于结果正常者也应根据孕妇的其他危险因素酌情选择NIPT。而NIPT低风险人群并不能完全排除异常妊娠[17-18]，而仍需利用B超及时发现先天性心脏病、畸形儿等异常。

本研究中有30例标本初查结果为临界风险，经相同方法复查，均为低风险。两次的结果存在明显差异，原因可能为测序和数据分析存在随机误差。30例对象经随访自述结果均无异常。这提示NIPT在诊断临界值处的结果重现性欠佳。实验室对于临界风险结果的分析和判断应谨慎。研究发现当胎儿发生非整倍体疾病时，平均Z值会超过诊断阈值的2倍以上，若以95% *CI*判断，可提高诊断的准确度。另外，本研究从1 207例临床标本中检出21、18和13单体或缺失高风险5例。5例经染色体核型分析均为正常核型。提示NIPT在21、18和13单体或缺失疾病中的应用有待进一步研究。

综上所述，与传统筛查方法相比，NIPT具有灵敏度高、特异性佳、漏诊率低的优势，同时检测通量高、周期短，安全无创，可避免穿刺取样术带来的胎儿丢失、宫内感染等风险，是一种更加精确的胎儿染色体非整倍体产前筛查技术，是对现有出生缺陷三级预防体系的有效补充和完善。随着高通量测序技术的不断发展与更新，NIPT在临床的应用将会更加广泛。

参考文献

[1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076):485-487.

[2] 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.

[3] American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545：noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy [J]. Obstet Gynecol，2012，120(6)：1532-1534.

[4] Shaw SW，Hsiao CH，Chen CY，et al. Noninvasive prenatal testing for whole fetal chromosomal aneuploidies：a multicenter prospective cohort trial in Taiwan [J]. Fetal Diagn Ther，2014，35(1)：13-17.

[5] Yao H，Jiang F，Hu H，et al. Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA：initial experience in a Chinese hospital [J]. Ultrasound Obstet Gynecol，2014，44(1)：17-24.

[6] Norton ME，Jacobsson B，Swamy GK，et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy[J]. N Engl J Med，2015，372(17)：1589-1597.

[7] 张玢，刘建兵，张晓青，等．高通量基因测序产前筛查技术(NIPT)在常州地区的临床应用经验总结[J]．中国产前诊断杂志(电子版)，2016，8(3)：25-30.

[8] Wang JC，Sahoo T，Schonberg S，et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results：a study of 109 consecutive cases [J]. Genet Med，2015，17(3)：234-236.

[9] Zhang H，Gao Y，Jiang F，et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21，18 and 13：clinical experience from 146，958 pregnancies [J]. Ultrasound Obstet Gynecol，2015，45(5)：530-538.

[10] Qiang R，Cai N，Wang X，et al. Detection of trisomies 13，18 and 21 using non-invasive prenatal testing [J]. Exp Ther Med，2017，13(5)：2304-2310.

[11] Ke WL，Zhao WH，Wang XY. Detection of fetal cell-free DNA in maternal plasma for Down syndrome，Edward syndrome and Patau syndrome of high risk fetus [J]. Int J Clin Exp Med，2015，8(6)：9525-9530.

[12] Gregg AR，Skotko BG，Benkendorf JL，et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy，2016 update：a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics [J]. Genet Med，2016，18(10)：1056-1065.

[13] 段红蕾，李洁，薛源，等．江苏省13041例无创产前检测的指征及结果分析[J]．中华围产医学杂志，2014，17(12)：813-816.

[14] Taylor-Phillips S，Freeman K，Geppert J，et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down，Edwards and Patau syndromes：a systematic review and meta-analysis [J]. BMJ Open，2016，6(1)：e010002.

[15] Hartwig TS，Ambye L，Sørensen S，et al. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT)-a systematic review[J]. Prenat Diagn，2017，37(6)：527-539.

[16] 段红蕾，胡娅莉，李洁，等．从胎儿染色体核型异常分布推测无创性产前检测的临床适应证[J]．中华围产医学杂志，2014，17(1)：42-44.

[17] Norton ME，Brar H，Weiss J，et al. Non-invasive chromosomal evaluation (NICE) study：results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18[J]. Am J Obstet Gynecol，2012，207(2)：137.e1-137.e8.

[18] Palomaki GE，Deciu C，Kloza EM，et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome：an international collaborative study[J]. Genet Med，2012，14(3)：296-305.

(上接第95页)

[17] 赵桂红．妇女淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、解脲脲原体感染与不孕症的关系[J]．中国妇幼保健，2016，31(13)：2702-2704.

[18] 沈秀珍，李兰芳．女性生殖道支原体、衣原体及淋球菌感染与不孕症的相关性分析[J]．中国妇幼保健，2016，31(6)：1236-1237.

[19] 赵超，刘畅，张果，等．妇科门诊生殖道感染患者及无症状女性淋球菌、沙眼衣原体及解脲脲原体感染情况分析[J]．中国妇幼保健，2014，29(16)：2549-2552.

[20] 韩素云，张蓉，张莉，等．女性生殖道NG、CT及UU感染的临床检测分析[J]．中国优生与遗传杂志，2005，(4)：104-105.

·论　著·

不同方法学测定乙型肝炎病毒核心抗体的阳性率及其定量检测意义的研究

王红翠[1]　林健聪[1]　吴英松[2]　董志宁[1]　李志雄[1*]

［摘　要］ **目的**　对比分析不同方法学检测乙型肝炎病毒核心抗体（anti-HBc）的阳性率并探讨其定量检测的意义。 **方法**　临床随机收集健康查体者的标本400例，使用化学发光法和酶联免疫吸附测定法的anti-HBc试剂盒进行检测，对比分析其检测anti-HBc的阳性率。另外，对97例临床慢性乙型病毒性肝炎（chronic hepatitis B，CHB）患者跟踪随访，收集其药物治疗前后的血清标本并检测anti-HBc浓度，根据治疗前anti-HBc的浓度水平分成高低浓度两组，分析评价抗病毒治疗后不同浓度anti-HBc分组间患者乙型肝炎病毒e抗原（hepatitis B virus e antigen，HBeAg）的浓度变化。 **结果**　化学发光法的两种anti-HBc试剂盒检测健康查体者的anti-HBc的阳性率均为42.0%；酶联免疫吸附测定法anti-HBc检测试剂盒检测健康查体者标本，1∶30稀释后anti-HBc的阳性率为15.0%，原倍检测anti-HBc的阳性率为79.0%。高浓度组（≥9 000 IU/mL）治疗后HBeAg转阴率为20.83%；anti-HBc低浓度组（<9 000 IU/mL）治疗后HBeAg转阴率为2.04%。经卡方检验，anti-HBc高浓度组HBeAg转阴率比anti-HBc低浓度组HBeAg转阴率明显增高，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。 **结论**　化学发光法测定anti-HBc的性能优于酶联免疫吸附测定法，可降低酶联免疫吸附测定法测定不稀释标本时的假阳性率和测定稀释标本时的漏检率。通过测定anti HBc的浓度水平，可预测慢性乙肝患者进行药物治疗的效果。

［关键词］　乙型肝炎病毒核心抗体；定量检测；HBeAg血清学转化；抗病毒药物治疗

Analysis of the positive rate of different methodologies hepatitis B virus core antibody and study on its quantitative detection significance

WANG Hongcui[1], LIN Jiancong[1], WU Yingsong[2], DONG Zhining[1], LI Zhixiong[1*]

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

[ABSTRACT]　Objective　To analyze the positive rate of anti-HBc detected by using different methodologies and to study on its quantitative detection significance.　Methods　400 normal samples and 194 pre- and post-treatment serum specimens from 97 patients with chronic hepatitis B infection (CHB) were collected randomly, measured by chemiluminescence immunoassay (CLIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) anti-HBc detection kits, and the anti-HBc positive rate was analyzed statistically. Then, according to the baseline of anti-HBc titers, CHB patients were divided into high and low concentration groups, and the HbeAg seroconversion was examined in post-treatment patients receiving antiviral drug treatment.　Results　The anti-HBc positive rate of healthy individuals was 42.0% measured by chemiluminescence immunoassay from two anti-HBc kits, and it was 15.0% and 79.0% measured by ELISA kit from following 1∶30 dilution and without dilution respectively. The HBeAg seroconversion rates were 20.83% and 2.04% in the patients with high base-

基金项目：广州市科技计划项目（201504291007307）

作者单位：1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司，广东，广州 510665
2. 南方医科大学检验与生物技术学院，广东，广州 510515
*通讯作者：李志雄，E-mail：paullee_0113@21cn.com

line anti-HBc titers (≥9 000 IU/mL) and low baseline anti-HBc titers (<9 000 IU/mL) respectively. According to Chi-square test, the HBeAg seroconversion rates were significantly different between the 2 groups (P<0.05). Conclusion The anti-HBc positive rate of healthy individuals measured by chemiluminescence immunoassay anti-HBc kits, was lower than that of undiluted samples by ELISA, and the diluted specimens had great influence on the measure of anti-HBc positive rate by ELISA. The CHB patients with high baseline anti-HBc titers (≥9 000 IU/mL) had a greater HBeAg seroconversion rate than those with low baseline anti-HBc titers (<9 000 IU/mL).

[KEY WORDS] Anti-HBc; Quantitative detection; HbeAg seroconversion; Antiviral drug treatment

人体感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)后最先产生的抗体为乙型肝炎病毒核心抗体(hepatitis B virus core antibody, anti-HBc),在HBV感染早期即可在血清中检测到,常持续存在终身[1]。目前,anti-HBc常用的检测方法有酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、时间分辨免疫分析法、化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)等。其中,传统的ELISA方法,通常会将不稀释样本的检测结果作为流行病学调查,而将标本稀释检测的结果用于临床诊断,但据张碧莹等[2]的研究显示,ELISA稀释法检测低浓度anti-HBc时,易呈假阴性。据文献的报道可知,不同地区的正常人群中,anti-HBc的阳性率不一样,且普遍呈现阳性率高的状况[3-4]。仅从定性方面检测anti-HBc并不能很好的解释它的临床意义。有研究显示,早期(30岁之前)发生HBeAg血清转换且HBV DNA持续检测不到的慢性乙肝患者,临床症状得到显著改善,肝纤维化可以逆转[5]。

本研究选用临床检测性能较好的CLIA试剂盒作为对比试剂,与ELISA试剂盒的稀释法、不稀释法同步测定标本的anti-HBc浓度,分析不同方法学测定anti-HBc的阳性率,以探讨anti-HBc检测试剂的性能。同时从定量角度探讨其不同浓度水平的临床意义,通过对HBeAg阳性慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者的anti-HBc、HBeAg浓度水平进行跟踪研究,以探讨anti-HBc定量测定的临床意义,并期望对乙型肝炎的治疗、预后观察有一定的参考意义。

1 对象与方法

1.1 对象

随机选取健康查体者的病例400例,年龄在20~60(32±11.54)岁之间,男性272例,女性128例,采集血清标本,共400例标本。另外选取97例CHB患者(anti-HBc、HBeAg、HBsAg临床检测均为阳性的患者,即大三阳患者),年龄在15~73(39±13.62)岁之间,男性69例,女性28例,采集其抗乙肝病毒治疗前后的血清标本,共194例有效标本。所有标本均来源于福建福州传染病医院。

1.2 仪器与试剂

雅培贸易(上海)有限公司(以下简称"雅培公司")的全自动免疫分析仪ARCHITECT i2000sr及配套的anti-HBc测定试剂盒、校准品和专用质控品。厦门优迈科医学仪器有限公司的全自动化学发光免疫分析仪Caris200,配套广州市达瑞生物技术股份有限公司(以下简称"达瑞公司")的anti-HBc测定试剂盒和HBeAg测定试剂盒及专用的质控品。上海科华生物工程股份有限公司(以下简称"科华公司")的anti-HBc检测试剂盒及质控品,配套BIO-RAD公司的酶标仪PR 4100。

1.3 方法

1.3.1 试剂定标

根据雅培公司和达瑞公司的anti-HBc测定试剂盒的要求,使用定标品进行定标,定标合格后,再进行下一步的检测操作。每天进行测试前先测定质控品浓度,保证定标曲线的可靠性。科华公司的anti-HBc检测试剂盒,根据说明书的要求,每次实验使用对照品进行定标,并测定质控品,以保证实验的可靠性。

1.3.2 标本采集

对于随机抽取的400例健康查体者,经其本人同意将体检检测的剩余标本用于科研研究后,采集检测剩余的血清标本2 mL,于2~8℃短期保存,-20℃长期储存。将在医院进行抗病毒治疗的CHB患者纳入研究,在获得病人同意的情况下,采集药物治疗前检测剩余的血清标本2 mL,经3个月治疗后,再次采集检测剩余的血清标本2 mL,其中排除除了抗病毒药物治疗还进行其他治疗的患者、标本采集相隔时间不是3个月的患者、未取得

知情同意的患者后，共有97例CHB患者，共194份标本，于2~8℃短期保存，-20℃长期储存。

1.3.3　标本检测

分别采用雅培公司、达瑞公司和科华公司的anti-HBc试剂盒对400例健康查体者的标本进行同步测定，统计分析各试剂盒检测anti-HBc的阳性率。

使用雅培公司、达瑞公司和科华公司的anti-HBc试剂盒和达瑞公司的HBeAg测定试剂盒，对97例临床CHB患者药物治疗前后收集的共194份血清标本进行检测，并分析评价药物治疗前后anti-HBc和HBeAg的浓度变化。

所有实验操作过程，严格按照各公司试剂盒的说明书进行。

1.4　统计分析

采用SPSS 18.0统计软件进行数据处理与统计分析，计数资料以百分率表示；CHB患者在药物治疗前后anti-HBc浓度变化的比较，采用配对t检验统计分析；评价不同anti-HBc浓度水平治疗前后HBeAg的血清学转换率，采用卡方检验统计分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　不同厂家试剂检测anti-HBc的阳性率比较

对于CHB患者在治疗前后收集的共194份血清标本，达瑞公司与其他两家公司的anti-HBc试剂盒检测结果均为阳性，其阴阳性符合率为100.0%，统计结果详见表1。

表1　CHB患者治疗前后anti-HBc的阴阳性结果统计表（n）

Table 1　The results of anti-HBc before and after treatment of CHB patients（n）

试验		达瑞结果		科华生物结果（标本1∶30稀释）		科华生物结果（原倍检测）		合计
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	
雅培结果	阳性	194	0	194	0	194	0	194
	阴性	0	0	0	0	0	0	0
合计		194	0	194	0	194	0	194

科华生物anti-HBc的检测试剂盒说明书中，标本以1∶30检测标本，则代表anti-HBc的临床意义，标本原倍检测为流行病学调查。

对随机选取400例健康查体者标本进行anti-HBc检测，达瑞公司与雅培公司的阴阳性符合率为100.0%；科华生物（标本1∶30稀释）与雅培公司的阳性符合率为35.71%，阴性符合率为100.0%，总符合率为73.0%；科华生物（原倍检测）与雅培公司的阳性符合率为100.0%，阴性符合率为63.21%，总符合率为63.0%，统计结果见表2。不同厂家之间的符合率结果详见表3。

表2　健康查体者的anti-HBc阴阳性结果统计表（n）

Table 2　The statistics of anti-HBc results of healthy testing groups（n）

试验		达瑞公司结果		科华公司结果（标本1∶30稀释）		科华公司结果（原倍检测）		合计
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	
雅培公司结果	阳性	168	0	60	108	168	0	168
	阴性	0	232	0	232	148	84	232
合计		168	232	60	340	316	84	400

2.2　抗病毒治疗中的anti-HBc水平及其预测意义

2.2.1　CHB患者治疗前后的anti-HBc浓度变化

采用达瑞anti-HBc测定试剂盒对97例CHB患者抗病毒治疗前后的标本进行测定，并对CHB患者治疗前后的anti-HBc浓度水平进行配对t检验，检验结果见表4。结果显示在抗病毒治疗前后，CHB患者的anti-HBc浓度无显著性差异（$P>0.05$）。

表3 健康查体者的anti-HBc检测符合率统计表

Table 3 The coincidence rate of anti-HBc results of healthy testing groups

参比试剂		雅培公司		
		阴性符合率(%)	阳性符合率(%)	总符合率(%)
达瑞公司		100.00	100.00	100.00
科华公司	标本1:30稀释	100.00	35.71	73.00
	标本不稀释	63.21	100.00	63.00

表4 CHB患者治疗前后anti-HBc浓度变化配对*t*检验

Table 4 The result of t-test pairs of anti-HBc before and after treatment of CHB patients

	配对差异							
	均值	标准差	均值的标准差	95%的置信区间		系数T	自由度	双侧显著性
				下限	上限			
达瑞anti-HBc治疗前-治疗后	−70.728 45	9 219.537 88	936.102 24	−1 928.88	1 787.420	−0.076	96	0.940

2.2.2 CHB患者治疗前后的HBeAg阳性率变化

采用达瑞HBeAg测定试剂盒对97例CHB患者在抗病毒治疗前后的标本进行测定，统计分析结果见表5。结果显示，97例HBeAg阳性的CHB患者经过治疗后，有11例患者发生了HBeAg血清学转换，即HBeAg变为阴性，血清学转换率为11.34%。

表5 CHB患者治疗前后HBeAg阴阳性的变化情况

Table 5 The results of HBeAg before and after treatment of CHB patients

	阴性	阳性	合计
治疗前	0	97	97
治疗后	11	86	97
合计	11	183	194

2.2.3 不同anti-HBc浓度水平的患者在治疗前后HBeAg阳性率的变化

根据达瑞anti-HBc定量试剂盒测定CHB患者治疗前标本的anti-HBc浓度水平，将97例CHB患者标本分成anti-HBc高浓度(≥9 000 IU/mL)和anti-HBc低浓度(<9 000 IU/mL)两组，对比两组患者的HBeAg血清学转换率，结果显示anti-HBc高浓度组(≥9 000 IU/m)的患者经过治疗后，其HBeAg血清学转换率为20.83%；anti-HBc低浓度组(<9 000 IU/mL)的患者经过治疗后，其HBeAg血清学转换率为2.04%。经卡方检验，anti-HBc高浓度组HBeAg血清学转换率比anti-HBc低浓度组的明显增高，具有统计学意义($P<0.05$)。结果详见表6、表7所示。

表6 anti-HBc高低浓度组间治疗前后HBeAg发生血清学转换的统计

Table 6 The results of HBeAg seroconversion between high and low anti-HBc concentration groups

anti-HBc浓度(IU/mL)	总例数	治疗前HBeAg阴性例数	治疗后HBeAg阴性例数	治疗前后HBeAg转阴率(%)	*P*值
高浓度组(≥9 000 IU/mL)	48	0	10	20.83	0.004
低浓度组(<9 000 IU/mL)	49	0	1	2.04	
总计	97	0	11	11.34	

3 讨论

HBcAg主要存在于肝细胞内和血清Dana颗粒中，与anti-HBc具有很强的亲和力，能迅速结合形成免疫复合物，故难以在血清中测得游离的HBcAg，所以临床上以检测anti-HBc来间接反映HBcAg的水平[6]。由于HBcAg较HBV表面抗原有更高的免疫原性，故anti-HBc较其他HBV抗体更早

表7　anti-HBc高低浓度组间治疗前后HBeAg血清学转换的卡方检验

Table 7　The chi-square test of HBeAg seroconversion between high and low anti-HBc concentration groups

	*P*值	自由度	渐进显著性(双侧)	精确显著性(双侧)	精确显著性(单侧)
Pearson卡方	8.517[b]	1	0.004		
连续校正[a]	6.750	1	0.009		
似然比	9.702	1	0.002		
Fisher的精确检验				0.004	0.003
线性和线性组合	8.429	1	0.004		
有效案例中的N	97				

a. 仅对2×2表计算；b. 0单元格(.0%)的期望计数少于5。最小期望计数为5.00。

产生，并且有更高的血清水平，以及更长久的存在时间，无论肝病是否存在或病毒已否消除，anti-HBc可持续存在数十年，因此anti-HBc成为了临床诊断HBV与流行病学调查最有价值的血清标志物之一[7]。作为流行病学调查的标志物之一，不同地区、不同年龄段的人群，其anti-HBc检测的阳性率均有所差异，此外检测的方法学和试剂，也是影响其检测阳性率的重要因素[8-9]。

在本次研究中，使用两种CLIA的检测试剂盒、一种ELISA的检测试剂盒，对400例健康查体者的标本进行了anti-HBc检测，其中达瑞公司与雅培公司的阳性率均为42.0%，阴阳性符合率为100.0%，说明两家公司anti-HBc试剂盒的检测结果符合率高，具有很高的一致性。另外，本研究的实验结果显示，科华公司的ELISA法anti-HBc检测试剂盒，其测定不稀释的健康查体者标本时，anti-HBc的阳性率为79.0%，比CLIA试剂盒的更高，而测定经过稀释的健康查体者标本时，其阳性率为15.0%，比CLIA试剂盒的低，该结果与陆盈[10]、汪咏新等[11]等的研究结果一致。以雅培公司的检测结果作为测定anti-HBc的金标准，则达瑞公司的检测结果与雅培公司一致，ELISA试剂盒测定不稀释的标本时，假阳性率较高，测定稀释标本时，出现漏检率较高。对于该情况，李金明[12]教授提出一种理论，认为anti-HBc的假阳性，可能是由血清(浆)中存在交叉反应性抗体或干扰物质导致的，如前母B淋巴细胞的非特异激活，导致未感染HBV的IgA或IgM相关分子的产生，可能会导致anti-HBc假阳性。在这种情况下，使用还原剂，如二硫苏糖醇、重亚硫酸钾和半胱氨酸等预处理血清标本将明显改善anti-HBc检测的特异性。其中雅培公司、达瑞公司的anti-HBc测定试剂盒，均需要对标本进行预处理，本研究中使用其测定健康查体者的阳性率均为42.0%，明显低于无预处理的ELISA anti-HBc试剂盒测定不稀释标本的79.0%，高于测定稀释标本的15.0%。由于雅培公司的检测结果更受国内外市场的认可，故临床上建议选用与雅培公司测值符合率较高的国产CLIA anti-HBc试剂盒，以降低ELISA anti-HBc试剂盒测定不稀释标本的假阳性率和测定稀释标本的漏检率。

根据《慢性乙型肝炎防治指南》(2015年版)[13]的指导意见，HBeAg阳性患者，药物治疗的满意终点是停药后获得持续的病毒性应答，谷丙转氨酶复常，并伴有HBeAg血清学转换，故本研究对97例CHB患者的anti-HBc水平和HBeAg水平进行了跟踪检测，结果显示在抗病毒治疗前后，CHB患者的anti-HBc浓度无显著性差异($P>0.05$)；97例HBeAg阳性的CHB患者经过治疗后，HBeAg血清学转换率为11.34%，anti-HBc高浓度(≥9 000 IU/mL)组的HBeAg血清学转换率为20.83%，明显高于anti-HBc低浓度(<9 000 IU/mL)组的2.04%，该差异具有统计学意义($P<0.05$)。故通过测定HBeAg阳性CHB患者的anti HBc水平，可预测患者抗病毒药物治疗的效果，anti-HBc浓度高(≥9 000 IU/mL)的患者，其HBeAg血清学转化率高，抗病毒药物的治疗效果更好；而低浓度anti-HBc(<9 000 IU/mL)的患者，HBeAg血清学转化率低，对治疗不敏感。据袁权、Fan等[1,14-16]的报道，在接受ADV和PegIFN治疗的HBeAg阳性病人中，基线anti-HBc水平能有效预测治疗后HBeAg血清学转换应答情况，基线anti-HBc水平高的病人(ADV治疗病人≥29 000 IU/mL；PegIFN治疗病人≥9 000 IU/mL)较基线anti-HBc水平低者治疗后(随访终点)HBeAg血清学转换率更高。该研 (下转第114页)

·论 著·

广东省*HER-2*基因检测室间质控存在的问题分析

李淑华[1] 郑晓克[1] 王芳[2] 李丽[3] 孙世珺[4] 何丹[5] 彭燕[6] 周建文[1] 何琼[1]
朱宇辛[1] 王连唐[1*] 柯尊富[1*]

［摘 要］ **目的** 依托广东省临床病理质量控制中心分子病理组对广东省内医院开展的荧光原位杂交（fluorescence *in situ* hybridization，FISH）方法检测*HER-2*基因进行室间质控，全面了解*HER-2*基因检测的标准操作程序（standard operating procedure，SOP）的关键节点，以更好地指导乳腺癌靶向治疗。 **方法** 选择*HER-2*不同阳性模式的石蜡切片作为质控片，同一表达模式病例采取连续切片，首尾2张各做FISH检测以确保质控片质量的一致性。各参加实验室采用各自的荧光原位杂交法，根据实际情况选择相应的探针和消化酶等。质控结果由质控小组成员采取双盲形式进行结果判读。 **结果** 从我省参与*HER-2*基因检测质控的26家实验室汇报的结果来看，各实验室使用的试剂均为国家食品药品监督管理总局批准的试剂，3种试剂探针本身对质控结果的影响无明显差异；个别实验室仍存在一些细节操作及判读的问题，其中标本①结果吻合率96.15%，一家单位误判为簇状扩增，标本②结果吻合率84.62%，标本③结果吻合率100%；消化液使用了胃蛋白酶和蛋白酶K，2种酶的消化效果无特别明显差异，对质控片进行镜下观察发现有2家单位4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）通道下轮廓显示不清，提示存在消化过度的问题。 **结论** 各实验室应严格按照各实验室操作流程，保证染色过程中的温度、缓冲液及清洗液的浓度和pH值、探针的配置等参数准确。只有通过不断健全室间质控系统，科学设计基础与临床实验流程步骤和评价标准，配合孰知各项实验内容的检测团队，定期进行监查活动，才能确保提高我省*HER-2*检测的准确性和一致性。

［关键词］ 室间质控；*HER-2*；荧光原位杂交；乳腺癌

Analysis of the problems existed in the quality control of *HER-2* gene testing in Guangdong Province

LI Shuhua[1], ZHENG Xiaoke[1], WANG Fang[2], LI li[3], SUN Shijun[4], HE Dan[5], PENG Yan[6], ZHOU Jianwen[1], HE Qiong[1], ZHU Yuxin[1], WANG Liantang[1*], KE Zunfu[1*]

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Molecular Diagnostics, Sun Yat-Sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510060; 3. Department of Pathology, Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong, China, 518115; 4. Division of Clinical Laboratory, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528403; 5. Department of Pathology, the Third Af-

基金项目：国家自然科学基金（30900650/H1615，81372501/H1615，81572260/H1615，81172232/H1615，81172564/H162，81773299/H1614）；广东省自然科学基金（2011B031800025，S2012010008378，S2012010008270，S2013010015327，2013B021800126，2015A020214010，2016A020215055，201704020094，2013B021800259）；高校基本业务青年重点培育（2015ykzd07）

作者单位：1. 中山大学附属第一医院病理科，广东，广州 510080
2. 中山大学附属肿瘤医院分子诊断科，广东，广州 510060
3. 中国医学科学院肿瘤医院病理科，广东，深圳 518115
4. 中山市人民医院分子诊断中心，广东，中山 528403
5. 中山大学附属第三医院病理科，广东，广州 510630
6. 广东省中医院病理科，广东，广州 510405
*通讯作者：王连唐，E-mail：wanglt@mail.sysu.edu.cn
柯尊富，E-mail：kezunfu@126.com

filiated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630; 6. Department of Pathology, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510405)

[ABSTRACT] Objective Relying on the molecular pathology group of Guangdong province clinical quality control center to carry out the external quality control for *HER-2* gene detection by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methods in Guangdong province hospitals, in order to understand the standard operating procedure (SOP) key node of *HER-2* gene detection entirely and better guide the targeted therapy of breast cancer. Methods The paraffin sections with different positive patterns of *HER-2* were selected as the quality control tablets, and the cases of the same expression pattern were performed consecutively, and the first and last 2 pieces were tested to ensure the consistency of quality control tablets. Each participating laboratories adopted the FISH methods of their own work and selected the corresponding probes and digestive enzymes according to the actual situation. The quality control results were interpreted by quality control team members in a double-blind manner. Results From the results of 26 laboratories participating in the quality control of *HER-2* gene detection, all reagents used in the laboratories were approved by China Food and Drug Administration, and had no significant effect of these 3 probes on the quality control results. There were still some details of operation and interpretation in some individual laboratories. As a unit mistaken for cluster amplification, the self-agreement results of specimen ① was 96.15%, specimen ② was 84.62%, and the consistency of specimen ③ was up to 100%. The specimens were digested with Pepsin and proteinase K, and there were no obvious difference between the 2 kinds of enzyme digestion. Meanwhile, microscopic examinations showed that DAPI staining were unclear in 2 units, it suggested the existence of excessive digestion. Conclusion Each laboratory should strictly follow the operating procedures of each laboratory to ensure that the temperature, buffer and cleaning liquid concentration and pH value, and probe configuration are accurate in the dyeing process. Only by constantly improving the external quality control system, the scientific design basis and clinical experiment process steps and evaluation standards, cooperating with the inspection team who knows the content, and regularly monitoring activities, the accuracy and consistency of *HER-2* detection can be ensured in our province.

[KEY WORDS] External quality control; *HER-2*; Fluorescence *in situ* hybridization; Breast cancer

乳腺癌是严重威胁女性健康的最常见的恶性肿瘤，尽管现有的研究已经取得一定进展，其发病率和死亡率仍逐年上升[1-3]。在乳腺癌中，*HER-2*基因的表达与肿瘤的侵袭转移、预后和整体生存率密切相关[4-7]，对于接受传统的化疗与内分泌治疗方法耐受或耐药的患者[8-9]，针对*HER-2*基因的靶向药物赫赛汀（Herceptin）更是为其治疗提供了新思路。研究表明20%~30%的浸润性乳腺癌患者尤其是浸润性导管癌患者中发现*HER-2*基因的扩增和/或HER-2蛋白的过表达[10-11]，因此正确检测和评价乳腺癌*HER-2*状态至关重要。美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）准许临床上进行*HER-2*检测的荧光原位杂交（fluoresecence *in situ* hybridization，FISH）检测用于检查17号染色体着丝粒（CEP17）和*HER-2*基因扩增情况，FISH的敏感性和特异性较高，是目前国际公认的*HER-2*基因检测的“金标准”[10]。

开展*HER-2*室间质控的目的是为了实现各检测实验室对同一病例检测结果保持一致性和可重复性，进而反映患者*HER-2*基因的真实表达情况。乳腺癌靶向药物赫赛汀主要应用于*HER-2*基因过表达的乳腺癌患者，因此患者用药前必须测定肿瘤组织中的*HER-2*基因状态，只有通过严格的标准化检测，乳腺癌患者的靶向治疗才能达到最佳效果。

广东省的三甲医院已相继运用FISH技术开展临床上乳腺癌*HER-2*基因的检测，为了对我省*HER-2*基因检测的基本情况进行摸底，发现和解决各实验室检测中存在的共性及个性的问题，保证不同实验室间检测的一致性，广东省病理质控中心2015年6月举行了广东省*HER-2*室间质控项目（external quality assessment，EQA），对我省广州、深圳、汕头等市的26家医院及检测机构进行了评估，本文将对本次质控的情况及存在的问题进行总结。

1 材料与方法

1.1 材料

此次质控使用的样本为甲醛固定的乳腺癌石

蜡包埋的手术样本，选择 *HER-2* 不同阳性模式的石蜡切片作为质控片标本，共设立3个质控品，样本①、②为 *HER-2* 基因扩增阳性样本，样本③为 *HER-2* 基因扩增阴性样本。此次供片单位分别为中山大学附属第一医院、中山大学附属肿瘤医院、广东省中医院3家单位。每家供片单位提供1个样本，该样本提供90张切片，切片厚度均为3~5 μm，保证参与质控的各实验室每个样本有3张玻片，一张用于组织学染色，一张用于 *HER-2* 检测，一张备用，供片单位将同一病例的首尾2张各做FISH检测以确保质控片质量的一致性。供片单位于质控活动正式开展15日前将切片及参考结果上交广东省临床病理医疗质量控制中心分子病理质控小组，供片单位提供的质控品在发放前需由一家分子病理质控小组成员确定的医院再次检测验证。质控结果由质控小组成员采取双盲形式进行结果判读。质控样本统一寄发给各参与实验室，每家参评单位在收到质控玻片一个月内完成检测后，将“室间质评活动回报表”和检测的原始玻片在低温状态下快递邮寄到省临床病理医疗质量控制中心，质评成绩在实验室上报结果2周后下发。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

本次质控各实验室采用荧光原位杂交（FISH）检测方法。基本程序包括组织切片、脱蜡至水化、预处理、酶消化、脱水、变性和杂交、洗涤复染、复染阅片。操作流程按照每家单位临床检测的标准操作程序（standard operating procedure，SOP）进行。主要步骤如下：室温下进行组织切片，切片厚度为4 μm；100%乙醇、85%乙醇、70%乙醇梯度酒精进行脱水，然后将玻片放至去离子水中；将玻片放入（95±5）℃的去离子水中煮片20~30 min或者将玻片放入80℃的预处理试剂中，恒温处理10 min；将组织切片用蛋白酶K或胃蛋白酶工作液中浸泡或滴染消化；依次置于70%乙醇、85%乙醇和100%乙醇中进行脱水；自然干燥或置45~50℃烤片机上干燥玻片，加探针后盖上盖玻片并用封片胶密封后放于原位杂交仪中变性杂交，也可利用水浴箱等设定好的温度条件进行人工变性杂交，变性温度一般为73~83℃，变性5 min，杂交温度为37℃或42℃，杂交时间16~20 h；杂交完成后移去盖玻片，按照试剂盒说明书中要求的NP40及2×SSC的浓度进行杂交后洗涤；70%乙醇处理5 min，玻片自然干燥后滴加4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）复染封片，避光荧光显微镜下进行阅片。

1.2.2 判读标准

判读标准按照《乳腺癌 *HER-2* 检测指南（2014版）》，选择细胞核大小一致、核边界完整、DAPI染色均一、细胞核无重叠、信号清晰的细胞。随机计数至少20个浸润癌细胞核中的双色信号，判读标准：①当 *HER-2*/CEP17比值≥2.0时，为 *HER-2* 阳性；*HER-2*/CEP17比值<2.0，但平均 *HER-2* 拷贝数/细胞≥6.0时也为 *HER-2* 阳性。②*HER-2*/CEPl7比值<2.0且平均 *HER-2* 拷贝数/细胞<4.0时为 *HER-2* 阴性。③*HER-2*/CEP17比值<2.0且平均 *HER-2* 拷贝数/细胞<6.0，但 *HER-2* 拷贝数/细胞>4.0时 *HER-2* 为结果不确定[12]。

1.2.3 质评考核参数

根据各参评单位上交的资料，质控小组各成员从检测试剂的种类、消化液种类、消化液的浓度及消化时间、红绿信号比值、检测玻片的背景及信号强度、浸润癌所占的细胞比例、玻片是否水煮及水煮时间、变性及杂交的温度及时间、是否有异质性等参数进行结果评定。

2 结果

2.1 检测试剂种类

本次参控单位使用的检测试剂共有雅培（美国）、北京金菩嘉医疗科技有限公司、广州安必平医药科技股份有限公司3家公司的试剂，从汇报的结果看，3种试剂探针本身对质控结果的影响无明显差异。

2.2 消化液种类及时间

本次质控中，消化液使用了胃蛋白酶和蛋白酶K 2种消化酶，12家使用了蛋白酶K，其中11家使用的蛋白酶K浓度为200 μg/mL，消化时间为0.5~19 min，1家医院使用的蛋白酶K浓度为150 μg/mL，消化时间为10 min。14家使用了胃蛋白酶，浓度为4 mg/mL，消化时间为5~40 min。通过镜下观察信号杂交情况，2种酶的消化效果无特别明显差异。

2.3 其它参数情况

26家参评单位，除3家未采用水煮的处理方式之外，其余23家均进行了水煮的步骤，水煮时间17~30 min，其中1家用EDTA修复液进行水煮，其余均采用双蒸水水煮。总体变性温度为73~85℃，变性时间5~8 min；杂交温度37~42℃，杂交时间

12~20 h。在本次质控中，标本①有2家医院的检测报告中提及标本存在肿瘤异质性问题，标本②有1家医院检测报告提及异质性问题。

2.4　结果吻合率

乳腺癌标本①结果吻合率96.15%，*HER-2*/CEP17比值介于3.29~8.52，*HER-2*/CEP17平均值为4.12（图1），有1家单位结果报成簇状扩增，镜下观察其玻片的红色背景下存在非特异杂交信号，簇状扩增应为误判；乳腺癌标本②结果吻合率84.62%，4家实验室报点扩增，*HER-2*/ CEP17比值介于7.49~10.27，其余实验室均报*HER-2*基因红色信号点成簇（图2）；标本③结果吻合率100%。*HER-2*/CEP17比值介于1.00~1.79，*HER-2*/CEP17平均值为1.18（图3）。

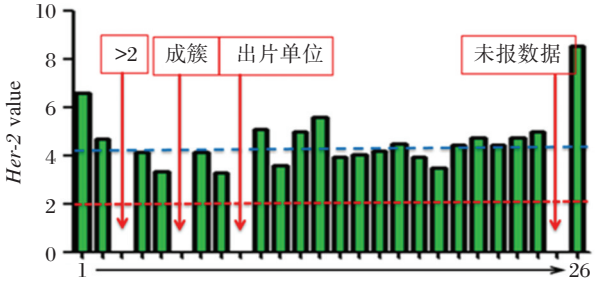


图1　各参评实验室标本①的*HER-2*/CEP17比值情况

Figure 1　The *HER-2*/CEP17 ratio of specimen ① in each participating laboratory

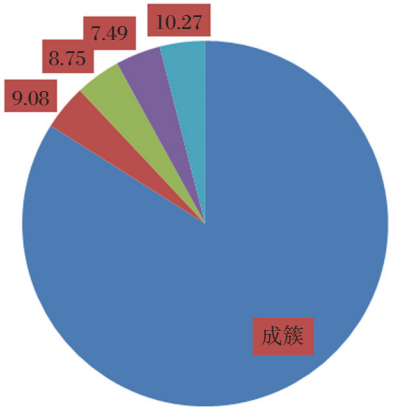


图2　各参评实验室标本②的*HER-2*/CEP17比值情况

Figure 2　The *HER-2*/CEP17 ratio of specimen ② in each participating laboratory

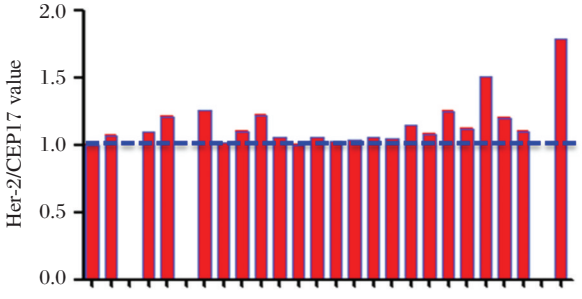


图3　各参评实验室标本③的*HER-2*/CEP17比值情况

Figure 3　The *HER-2*/CEP17 ratio of specimen ③ in each participating laboratory

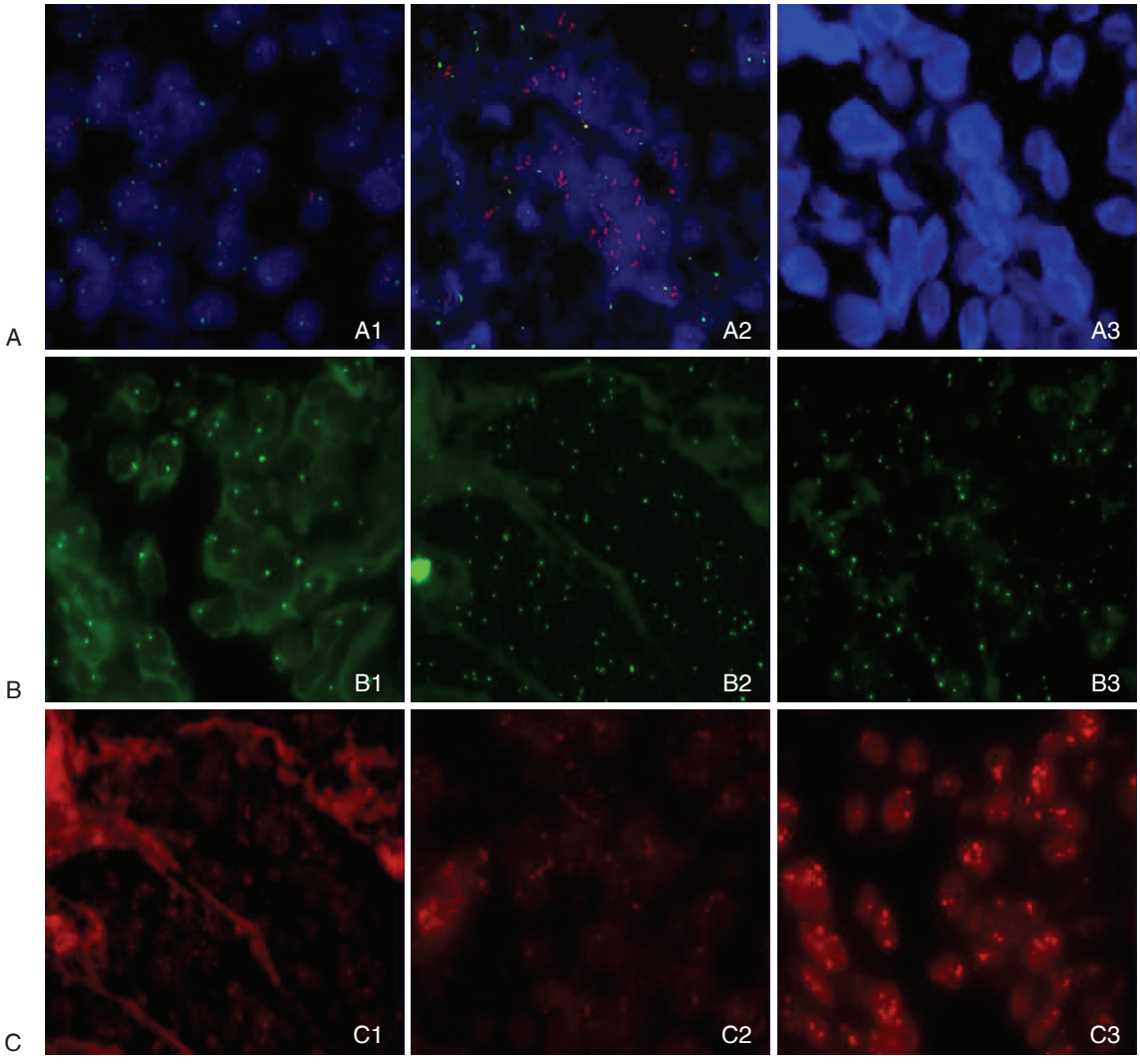
2.5　背景及信号强度

在荧光显微镜下观察26家参评单位的玻片，DAPI通道下观察轮廓消化过度的有2家，红色信号强度较弱有2家，绿色信号强度较弱有1家。背景及信号强度结果不合格者与规范实例的典型对照如图4，该图像是使用OLYMPUS BX51荧光显微镜在100×油镜下观察FISH检测的玻片后采集并合成的。参评单位中有2家单位DAPI轮廓显示不清，甚至可见红色与绿色信号定位于细胞外（图4A_1，4A_2）。红色信号强度较弱者2家（图4B_1，4B_2），绿色信号强度较弱者1家（图4C_1，4C_2），通过改进和完善制片方法可以避免类似结果发生。

3　讨论

FISH技术操作中影响染色质量的因素较多，如果实验过程中操作不当会严重影响最终染色结果，因此只有准确地检测*HER-2*基因的表达才能确保患者可以从靶向治疗中获益。笔者结合本次质控中存在的问题及实验室在实际检验中的情况，针对在FISH操作过程中一些关键操作步骤进行探讨。

FISH操作对组织的前期处理要求比较严格，要求标本尽量在离体0.5 h内用10%中性甲醛进行及时、有效的固定，由于甲醛可以使DNA或蛋白质的氨基团间形成亚甲基网桥，这种交联作用使细胞质或细胞核内的各种生物大分子形成网络，利于维持细胞结构和组织形态，但这样会影响细胞膜的通透性，阻碍核酸探针的掺入[13]。为了解石蜡组织标本经甲醛固定后蛋白质分子发生交联造成的抗原封闭问题，目前参加质评的各实验室采用了高温预处理的方法，常见的预处理的方式主要包括水煮法、硫氢化钠法、亚硫酸氢钠法等。在上述操作过程中水煮法最为简便易行，本次质控中88%的医院采用了水煮的处理方式，该步骤主要通过高温或化学处理消除甲醛固定所致的蛋白交联，



A:DAPI轮廓；B:红色信号强度；C:绿色信号强度。其中，A1、B1、C1为消化严重过度，A2、B2、C2为消化过度，A3、B3、C3为消化适中。

图4 FISH背景及信号强度检测结果

Figure 4 FISH test of background and signal intensity results

水煮的液体可以是去离子水、超纯水或者双蒸馏水，时间一般为15~30 min。临床检测中，对于一些软组织肉瘤等类型的标本及一些抗原封闭严重不利于探针杂交的组织可以尝试用柠檬酸（pH 6.0）或EDTA（pH 9.0）抗原修复液进行煮沸或高压修复。在实际操作中应结合实验室使用的试剂盒、不同的组织标本及探针类型采取不同的处理方式来摸索合适的高温预处理条件。

在FISH操作中，为了增加组织的通透性，使探针更好地与组织内的DNA进行杂交，一般采用酶消化的方法以去掉包围靶核酸的蛋白质。之前研究报道，一般脱落细胞用胃蛋白酶消化，活检组织用蛋白酶K，且所有标本在摸索条件之前应该在显微镜下确定其标本和形态类型以便灵活掌握酶的消化程度[14]。但在实际操作中，也有很多试剂盒推荐用胃酶来消化组织，胃酶比较温和，用于消化组织也可以起到很好的效果。酶消化的时间会因酶种类的不同而有所改变，且由于标本固定、组织结构、性质不同，即便在相同的热水浴预处理、酶消化时间条件下，其组织细胞消化的程度也不一致，产生的背景荧光、信号荧光强度也不同，即信噪比也会不同[15]。此次质控中，由于各实验室酶的储存及效价不同，还有酶的消化方式不同，有些单位将玻片放入考普林瓶用浸泡法进行消化，有些单位将消化液滴在玻片的组织上进行消化，因此同种类且同浓度的酶在不同医院间存在消化时间上的差

异。为避免本次质控中一些实验室出现消化过度的问题，可在玻片消化后置于荧光显微镜下的DAPI通道观察细胞核是否清晰完整来判定消化效果，如果消化不足，镜下细胞边缘呈云雾状，会影响杂交效率使信号降低甚至无法完成正常杂交造成无信号；但如果消化过度，镜下观察细胞核内出现空洞、核膜不完整甚至消失，引起靶核酸减少使杂交效率降低甚至无法杂交。

乳腺癌是一种典型存在异质性的肿瘤，并且肿瘤的组织学和遗传特性都具有异质性[16-17]，因此，现有临床数据表明并不是所有的*HER-2*阳性患者都能从抗*HER-2*靶向治疗中获益[18]。肿瘤异质性是影响靶向药物疗效和复发的重要因素，靶向药物选择性杀伤依赖靶分子的肿瘤细胞，采用曲妥珠单抗治疗后，如果肿瘤主要由*HER-2*高表达的肿瘤这类型细胞组成，靶向药物杀灭大多数肿瘤细胞，获得较好的短期疗效，但不依赖此途径的肿瘤细胞则可能存活而逐渐形成耐药细胞群[19]。在日常检测中，为避免异质性的问题一定要规范地阅片，病理医生在对至少20个细胞计数之前应该扫描整张玻片，如果存在第二群细胞有更高的*HER-2*信号数/细胞，并且这群细胞由切片上超过10%的肿瘤细胞组成，应另对这群细胞中至少20个不重叠的细胞进行计数并报告，同时要对该群细胞占所有浸润性肿瘤细胞的比例进行报告[20]。此次质控中出现参评单位的结果存在对异质性的报告不统一、报告中红绿信号比例不同以及浸润癌占肿瘤细胞比例不同的问题，分析原因一方面是因为石蜡质控标本在连续切片过程中，随着切片数量的增加，组织中的肿瘤细胞含量及结构发生变化所致，一方面是该质控样本的确本身存在异质性问题，如选择不同区域阅片会存在差异。因此，在临床检测中，一旦发现肿瘤异质性，应规范地在报告中指出。

综上所述，要保证*HER-2*检测的准确性和可重复性，实验室应严格按照各实验室操作流程，保证染色过程中的温度、缓冲液及清洗液的浓度和pH值、探针的配制等参数准确，确保样本处理、各检测流程及判读等各个步骤均规范化操作，只有通过不断健全室间质控系统，科学设计基础与临床实验流程步骤和评价标准，配合孰知各项实验内容的检测团队，定期进行监查活动，才能确保临床乳腺癌*HER-2*基因的检测持续准确、可靠，从而更好地为临床诊疗服务。

参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(1):5-29.

[2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2014,64(1):9-29.

[3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(2):87-108.

[4] Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, et al. Changes over time of extracellular domain of HER2 (ECD/HER2) serum levels have prognostic value in metastatic breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 114(3):503-511.

[5] Cheng HT, Huang T, Wang W, et al. Clinicopathological features of breast cancer with different molecular subtypes in Chinese women[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013,33(1):117-121.

[6] Kong Y, Dai S, Xie X, et al. High serum HER2 extracellular domain levels: correlation with a worse disease-free survival and overall survival in primary operable breast cancer patients[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012,138(2):275-284.

[7] Papila C, Uzun H, Balci H, et al. Clinical significance and prognostic value of serums HER-2/neu levels in patients with solid tumors[J]. Med Oncol, 2009,26(2):151-156.

[8] Leung YK, Lee MT, Lam HM, et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice[J]. Steroids, 2012,77(7):727-737.

[9] Wu X, Zhang X, Zhang H, et al. Progesterone receptor downregulates breast cancer resistance protein expression via binding to the progesterone response element in breast cancer[J]. Cancer Sci, 2012,103(5): 959-967.

[10] Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens[J]. J Clin Oncol, 2002,20(14):3095-3105.

[11] 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.

[12] 《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):262-267.

[13] Chin SF, Daigo Y, Huang HE, et al. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays of paraffin wax

embedded tumor samples[J]. Mol Pathol, 2003, 56(5):275-279.

[14] Yang JL, Zhou XY. The apply fluorescence of situhybridization technique on paraffin-embedded tissues of cartilage cancer[J]. Chinese Journal of Clinic and Experimental Pathology, 2006,22(3):373-374.

[15] 陈慧,陈淳,王华,等. 相差显微镜观察FISH检测石蜡包埋组织切片的理想酶消化程度[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013,29(7):809-811.

[16] Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer[J]. Cancer research, 1997, 57(8):1597-1604.

[17] Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, et al. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization[J]. Cancer genetics and cytogenetics, 1999, 110(2):94-102.

[18] Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(3):719-726.

[19] 薛丽, 白玉杰. 乳腺癌肿瘤异质性及靶向药物治疗[J]. 广东医学, 2012,33(16):2529-2531.

[20] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update[J]. J Clin Oncol, 2013,31(31):3997-4013.

(上接第107页)

究结果与本研究的发现一致,本研究进一步验证了anti-HBc这一经典HBV血清学指标的定量检测,对HBeAg阳性CHB患者的药物治疗效果有预测作用,对anti-HBc的进一步临床应用、CHB患者的治疗和预后观察有着重大的意义。

参考文献

[1] 袁权. 隐匿性HBV感染中的HBsAg变异株研究及Anti-HBc定量水平的临床新意义探索[D]. 厦门: 厦门大学, 2012.

[2] 张碧莹, 邢延芳, 王珍珠, 等. 血清稀释与否对检测乙型肝炎核心抗体结果的影响[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(3):428-430.

[3] 范殿英, 于素芳, 韩风文等. 乙型肝炎核心抗体在正常人群中的分布及其传染源作用[J]. 天津医药, 1985(6): 331-334.

[4] 张晓琍, 王金龙, 林光华等. 免疫人群乙肝抗体阳性率调查及乙肝核心抗体检测方法探讨[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 289-292.

[5] Hui CK, Leung N, Shek TW, et al. Sustained disease remission after spontaneous HBeAg seroconversion is associated with reduction in fibrosis progression in chronic hepatitis B Chinese patients. Hepatology, 2007, 46: 690-698.

[6] 陈冲, 张毅, 卓其斌, 等. 乙型肝炎核心抗体定量检测的研究进展[J]. 肝脏, 2016, 21(9):781-784.

[7] 何宗忠, 裘宇容. 乙型肝炎病毒生物标志物检测的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(2):135-140.

[8] 马海芳. 1783例乙型肝炎病毒血清学标志物检测结果分析[J]. 医学综述, 2010, 16(22):3516-3517.

[9] 张晓琍, 王金龙, 林光华, 等. 免疫人群乙肝抗体阳性率调查及乙肝核心抗体检测方法探讨[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 289-292.

[10] 陆盈. 单项乙型肝炎病毒核心抗体阳性的原因及其临床意义[J]. 海南医学, 2013, 24(11):1636-1638.

[11] 汪咏新, 刘军. 乙型肝炎病毒核心抗体原倍血清与不同稀释比例对实验结果的影响[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(4):53-54.

[12] 李金明. 乙型肝炎病毒血清标志物测定及结果解释的若干问题[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 385-389.

[13] 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. 中国肝脏病杂志:电子版, 2015, 19(5):1-19.

[14] 袁权, 宋浏伟, 周文彬, 等. Anti-HBc定量检测方法及其在监控慢性乙肝患者病情发展和预测治疗疗效中的用途: 中国, 103217533[P]. 2013-07-24.

[15] Fan R, Sun J, Yuan Q, et al. Baseline quantitative hepatitis B core antibody titre alone strongly predicts HBeAg seroconversion across chronic hepatitis B patients treated with peginterferon or nucleos(t)ide analogues[J]. Gut, 2016, 65(2):313-320.

[16] Yuan Q, Song LW, Cavallone D, et al. Total hepatitis B core antigen antibody, a quantitative non-invasive marker of hepatitis B virus induced liver disease[J]. PLoS One, 2015, 26,10(6):e0130209.

·论　著·

γ-干扰素释放实验在结核病诊断中的应用价值分析

王甲甲*　唐义斌　张玲英　洪华　谭泰昌　王智斌

［摘　要］ **目的**　回顾性分析γ-干扰素释放实验（interferon-gamma release assays，IGRA）在结核病诊断中的应用价值。 **方法**　采用结核IGRA（Tuberculosis-IGRA，TB-IGRA）法分别检测111例结核病患者（包括97例肺结核和14例肺外结核）和98例非结核病患者的γ-干扰素释放量，并以临床诊断为标准，评价TB-IGRA诊断结核病（包含涂阴肺结核和肺外结核）的敏感度、特异度、阴性预测值、阳性预测值、诊断准确度；同时对TB-DNA、TB-IgG、结核杆菌培养实验间的一致性进行评价。 **结果**　TB-IGRA诊断结核病的敏感度为89.2%，显著高于TB-IgG（35.6%）、结核杆菌培养（40.6%）及结核涂片实验（18.3%）（P均<0.05）；而TB-IGRA诊断结核病的特异度（76.5%）低于TB-IgG（96%）、结核杆菌培养（95%）及结核涂片实验（100%）（P均<0.05）；TB-IGRA法诊断涂阴肺结核的敏感度（89.6%）高于TB-IgG（32.9%）及结核杆菌培养法（33.3%），而特异度（76.4%）低于TB-IgG（97.9%）及结核杆菌培养法（97.2%）（P均<0.05）；且TB-IGRA与TB-IgG、结核杆菌培养实验的诊断结果有差异，且差异有统计学意义（P均<0.05）；TB-IGRA与TB-DNA诊断结果的差异无统计学意义（P>0.05）。 **结论**　TB-IGRA具有很高的敏感度，阴性预测值显著高于TB-IgG、结核杆菌培养和结核涂片实验，在结核病的诊断方面具有很高的阴性预测价值。

［关键词］　γ-干扰素释放试验；结核病；涂阴肺结核

Application value of interferon-gamma release assays in the diagnosis of tuberculosis

WANG Jiajia*, TANG Yibin, ZHANG Lingying, HONG Hua, TAN Taichang, WANG Zhibin
(Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences&Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610072)

[ABSTRACT]　Objective　To retrospectively analyze the application value of interferon-gamma release assays (IGRA) in the diagnosis of tuberculosis.　Methods　The interferon-γ release levels of 111 cases of tuberculosis patients (including 97 cases of pulmonary tuberculosis and 14 cases of extrapulmonary tuberculosis) and 98 non-tuberculosis patients were detected by TB-IGRA assay. The clinical diagnosis was used as the standard, to evaluate the sensitivity, specificity, negative predictive value, positive predictive value and accuracy of TB-IGRA in the diagnosis of tuberculosis (including smear negative pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis). Furthermore, TB-DNA, TB-IgG, mycobacterium tuberculosis culture experiment were carried on a portion of the patients to evaluate the consistency among the above experiments.　Results　The sensitivity of TB-IGRA in the diagnosis of tuberculosis was 89.2%, significantly higher than that of TB-IgG (35.6%, P<0.05), mycobacterium tuberculosis culture (40.6%, P<0.05) and tuberculosis smear (18.3%, P<0.05). The specificity of TB-IGRA (76.5%) in the diagnosis of tuberculosis was less than that of TB-IgG (96%), mycobacterium tuberculosis culture (95%), and tuberculosis smear (100%) (all P<0.05). The sensitivity of TB-IGRA in the diagnosis of smear-negative tuberculosis was 89.6%, significantly higher than that of TB-IgG (32.9%), mycobacterium tuberculosis culture (33.3%), and the specificity of TB-IGRA (76.4%) was less than that of

作者单位：四川省医学科学院·四川省人民医院检验科，四川，成都 610072
*通讯作者：王甲甲，E-mail：xywjj08@163.com

TB-IgG (97.9%), mycobacterium tuberculosis culture(97.2%) (all $P<0.05$). TB-IGRA can increase the sensitivity of diagnosis for extrapulmonary tuberculosis. The difference in the diagnosis of tuberculosis between TB-IGRA and TB-IgG, mycobacterium tuberculosis culture were statiscally significant ($P<0.05$); but the comparison between TB-IGRA and TB-DNA revealed no statistical significance ($P>0.05$). Conclusion TB-IGRA has high sensitivity, and higher negative predictive significance than TB-IgG, tuberculosis culture and smear, thus TB-IGRA has a high negative predictive value in the diagnosis of tuberculosis.

[KEY WORDS] Interferon-γ release assays; Tuberculosis; Smear negative pulmonary tuberculosis

结核病是严重威胁人类健康的重大传染病之一，随着结核杆菌多重耐药株的增多、结核合并HIV感染以及人口流动增大等问题的出现，使得结核病防控形势变得异常严峻，更凸显出了对结核病进行快速、有效诊断的重要性[1]。近年来，以T细胞免疫为基础的体外γ-干扰素释放试验（interferon-gamma release assays，IGRA）被证实在结核分枝杆菌感染检测中有较好的敏感性和特异性，但目前围绕结核IGRA（Tuberculosis-IGRA，TB-IGRA）开展的研究均集中在结核低流行区的各发达国家进行，而诸如中国在内的发展中国家作为结核的高流行区，存在庞大的非活动性结核感染人群。TB-IGRA作为单独指标在临床上对结核病的诊断价值仍不明确，在我国结核病诊断中的临床应用价值也有待评估[2]。本研究将对TB-IGRA在结核病诊断方面的价值进行评估，并对其与其他结核相关检测方法的一致性进行探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究为回顾性研究，选取209例疑似结核病并于2014年11月至2016年3月间在四川省人民医院接受住院治疗的患者。其中男性138例，女性71例；年龄4~90岁，平均年龄48.04岁。经住院治疗后，最终根据《肺结核诊断和治疗指南》[3]临床诊断为肺结核的患者97例，肺外结核的患者14例（包括结核性腹膜炎、结核性胸膜炎、结核性胸水、淋巴结结核，肾结核等）；通过临床表现和其他辅助诊断，最终临床诊断为非结核病的患者98例（包括肺炎、肺气肿、肺癌、肺间质病、类风湿性关节炎、炎性关节炎、泌尿系统感染等）。以确诊结核病患者为实验组，排除结核患者为对照组，实验组中男性76例（年龄介于6~81岁，平均年龄44.50岁），女性35例（年龄介于10~79岁，平均年龄47.92岁）；对照组中男性62例（年龄介于7~90岁，平均年龄42.10岁），女性36例（年龄介于4~86岁，平均年龄50.2岁）。两组患者年龄、性别差异无统计学意义（$P>0.05$）。所有患者均行IGRA检测，患者行结核分枝杆菌DNA检测、结核杆菌IgG抗体检测、结核杆菌快速培养及结核涂片染色。

1.2 仪器与试剂

γ-干扰素释放试验（IGRA）试剂盒（批号：TR20161004）购自北京万泰生物药业股份有限公司，检测仪器为山东烟台艾德康公司流水线式全自动酶免工作站，型号：ADC ELISA 180。结核分枝杆菌DNA检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司（批号：2016003），检测仪器为美国ABI公司Prism 7500型PCR仪。抗酸染色试剂购自珠海贝索生物技术有限公司（冷染法）（批号：410011）。结核杆菌快速培养法：使用珠海贝索生物技术有限公司的罗氏培养管，仪器为生物梅里埃中国有限公司Bact/ALERT 3D培养仪。结核杆菌IgG抗体（TB-IgG）法的试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司（批号：TB20160903），检测仪器为山东烟台艾德康公司流水线式全自动酶免工作站。

1.3 研究步骤

首先，使用肝素抗凝采血管（美国BD公司）采集全血3 mL，采集到的全血分别加入3种不同的培养管（1 mL/管）（本底对照培养管、结核特异性抗原测试培养管、非特异刺激抗原阳性对照培养管），马上轻柔地颠倒混匀3次以上，使抗凝剂充分溶解。新鲜全血经刺激培养（22±2）h后，（1 080~3 130）×g离心10 min，收集上清液于新的EP管中。其次，用双抗体夹心法定量检测上清液中γ干扰素（interferon-γ，IFN-γ）的含量，根据刺激培养系统中特异性升高的IFN-γ的量，来判定是否为结核分枝杆菌感染阳性。

1.4　统计学分析

数据整理及分析均使用SSPS 17.0软件完成统计学分析，TB-IGRA与TB-DNA、TB-IgG、结核杆菌培养、结核涂片实验诊断效能差异的两两比较，采用四格表配对χ^2检验，即McNemar假设检验，敏感度、特异度、准确度及阴阳性预测值均采用均值及95%可信区间表示，$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　不同方法诊断结核病的敏感度、特异度、准确度及预测值

在本研究的209例患者中，结核病患者111例，非结核病患者98例。所有病例均做了TB-IGRA检测，行TB-IgG、结核杆菌培养、结核涂片检查的病例数分别为155、136、166。以临床诊断为金标准，TB-IGRA、TB-IgG、结核杆菌培养、结核涂片检验方法诊断结核病的敏感度、特异度、准确度及预测值见表1，结果发现，TB-IGRA实验诊断结核病的敏感度明显优于其他检测方法，而特异度却低于其他方法。

2.2　TB-IGRA诊断痰涂片阴性肺结核的敏感度、特异度、准确度及预测值

在本研究中，共有166例患者做了结核涂片检查，该组患者均做了TB-IGRA检查（包括涂阴肺结核77例，其他肺部疾病89例），同时行TB-IgG检查的病例共120例（包括涂阴肺结核73例，其他肺部疾病47例），行结核杆菌培养的病例共105例（包括涂阴肺结核69例，其他肺部疾病36例）。以临床诊断为金标准，TB-IGRA、TB-IgG及结核杆菌培养法诊断涂阴肺结核的敏感度、特异度、准确度及预测值见表2，结果可见，TB-IGRA法诊断涂阴肺结核的敏感度高于TB-IgG及结核杆菌培养法，而特异度低于TB-IgG及结核杆菌培养法。

表1　不同方法诊断结核病的敏感度、特异度、准确度及预测值

Table 1　Sensitivity, specificity, accuracy and predictive value of different methods in diagnosis of tuberculosis

	结核病（n）	非结核病（n）	敏感度（%）	特异度（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）	诊断准确度（%）
TB-IGRA							
阳性	99	23	89.2（83.5~94.9）	76.5（68.1~84.9）	81.1（74.2~88.0）	86.2（80.0~93.4）	82.5（77.3~87.7）
阴性	12	75					
TB-IgG							
阳性	36	2	35.6（26.3~44.9）	96.0（90.8~100.0）	94.7（82~99）	44.4（35.5~53）	56.8（49.0~64.6）
阴性	65	52					
结核杆菌培养							
阳性	39	2	40.6（30.8~50.4）	95.0（88.2~100.0）	95.1（88.5~100.0）	40.0（30.1~49.9）	30.1（22.4~37.8）
阴性	57	38					
结核涂片							
阳性	20	0	18.3（11.0~25.6）	100.0	100.0	39.0（31.1~46.9）	46.4（38.8~54.0）
阴性	89	57					

数据表示均采用均值及95%可信区间。

2.3　TB-IGRA诊断肺外结核的敏感度

纳入本研究的肺外结核病例仅有14例，与肺结核组相比，例数差异较大，因此，计算特异性、预测值没有太大的说服力。本研究仅对TB-IGRA诊断肺外结核的敏感度进行统计，结果见表3，可以看出，与TB-IgG、结核杆菌培养法相比，TB-IGRA法能显著提高对肺外结核的诊断敏感度。

2.4　不同检验方法在诊断结核病方面的差异

2.4.1　TB-IGRA与TB-IgG

在本研究的病例中，同时行TB-IGRA和TB-IgG检查的病例数有154例，其中结核病患者101例，非结核病患者53例。对101例结核病患者和53例非结核病患者的TB-IGRA和TB-IgG检验结果进行比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）（表4）。

表2 不同方法诊断涂阴肺结核的敏感度、特异度、准确度及预测值

Table 2 Sensitivity, specificity, accuracy and predictive value of different methods in diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis

	涂阴肺结核（n）	其他肺部疾病（n）	敏感度（%）	特异度（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）	诊断准确度（%）
TB-IGRA							
阳性	69	21	89.6（82.8~96.4）	76.4（66.9~85.9）	76.7（68.0~85.4）	89.5（82.7~96.3）	82.5（76.7~88.3）
阴性	8	68					
TB-IgG							
阳性	24	1	32.9（22.1~-43.7）	97.9（93.8~100.0）	96.0（88.3~100.0）	48.4（38.4~58.4）	58.3（49.5~67.1）
阴性	49	46					
结核杆菌培养							
阳性	23	1	33.3（22.0~44.1）	97.2（91.8~100.0）	95.8（87.8~100.0）	43.2（32.4~54.0）	55.2（45.7~64.7）
阴性	46	35					

数据表示均采用均值及95%可信区间。

表3 TB-IGRA诊断肺外结核的敏感度

Table 3 Sensitivity of TB-IGRA in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis

方法	总例数	阳性例数	敏感度(%)
TB-IGRA	14	11	78.6
TB-IgG	10	3	30.0
结核杆菌培养	10	4	40.0

表4 TB-IGRA与TB-IgG在诊断结核病方面的差异

Table 4 Difference of TB-IGRA and TB-IgG in the diagnosis of tuberculosis

类别	合计	TB-IGRA阳性	TB-IGRA阴性	*k*	*P*
总患者					
TB-IgG阳性	38	32	6	0.159	0.000
TB-IgG阴性	116	69	47		
合计	154	101	53		
结核患者					
TB-IgG阳性	36	4	32	-0.03	0.000
TB-IgG阴性	65	7	58		
合计	101	11	90		
非结核患者					
TB-IgG阳性	2	2	0	0.022	0.021
TB-IgG阴性	51	40	11		
合计	53	42	11		

2.4.2 TB-IGRA与结核杆菌培养

在本研究的病例中，同时行TB-IGRA和结核杆菌培养的病例数有124例，其中结核病患者95例，非结核病患者29例。对95例结核病患者的TB-IGRA和结核杆菌培养检查结果进行分析，差异有统计学意义（$P<0.05$）（表5）。在29例非结核患者中，有1例非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria，NTM）感染的患者，其结核杆菌培养为阳性，IGRA为阴性，说明IGRA对NTM有一定区分能力。

表5 TB-IGRA与结核杆菌培养在诊断结核病方面的差异

Table 5 Difference of TB-IGRA and mycobacterium tuberculosis culture in the diagnosis of tuberculosis

类别	合计	TB-IGRA阳性	TB-IGRA阴性	*k*	*P*
总患者					
结核杆菌培养阳性	39	33	6	0.120	0.000
结核杆菌培养阴性	85	58	27		
合计	124	91	33		
结核患者					
结核杆菌培养阳性	38	33	5	-0.036	0.000
结核杆菌培养阴性	57	52	5		
合计	95	85	10		
非结核患者					
结核杆菌培养阳性	1	0	1	-0.063	0.125
结核杆菌培养阴性	28	6	22		
合计	29	6	23		

2.4.3 TB-IGRA与TB-DNA

对133例（107例结核病，26例非结核病）患者的TB-IGRA、TB-DNA检查结果的一致性进行统计，2种检验方法无统计学差异（$P>0.05$）（表6）。

表6　TB-IGRA与TB-DNA在诊断结核病方面的差异

Table 6　Difference of TB-IGRA and TB-DNA in the diagnosis of tuberculosis

类别	合计	TB-IGRA阳性	TB-IGRA阴性	*k*	*P*
总患者					
DNA阳性	108	88	20	0.266	0.296
DNA阴性	25	13	12		
合计	133	101	32		
结核患者					
DNA阳性	97	86	11	−0.120	0.173
DNA阴性	10	9	1		
合计	107	97	12		
非结核患者					
DNA阳性	11	2	9	−0.090	0.267
DNA阴性	15	4	11		
合计	26	6	20		

3　讨论

结核病的早期发现与治疗，可以显著遏制结核病的发展和传播，是目前控制结核病最有效的措施。TB-IGRA法是辅助诊断结核病的新方法，且能排除卡介苗和NTM对结果的干扰，具有很高的临床应用价值。

本研究结果显示，TB-IGRA诊断结核病的敏感度为89.2%，阳性预测值为81.1%，阴性预测值为86.2%，这与国内[4]和国外[5]的研究数据相符；特异度为76.5%，低于国外研究报道[6]。其可能原因是，国外对特异度的研究主要针对低风险人群，在高收入国家的低感染率地区，IGRA的总体特异性在88%左右；而我国是高结核负担国家，人群中潜伏性结核感染率高，理论上导致了IGRA的特异度降低。

与其他实验的比较显示，TB-IgG（35.6%）、结核杆菌培养（40.6%）和结核涂片实验（18.3%）的诊断敏感度均显著低于IGRA。在过去，结核杆菌培养阳性常作为评价其他诊断方法的金标准[7-8]；但由于取材和培养条件限制等原因，很多结核患者并不能获得阳性的结核杆菌培养结果，特别是肺外结核和涂阴肺结核，获取病原菌相当困难，因此病原学证据并不能成为结核诊断的金标准。同时，结核杆菌培养也可因NTM感染而导致假阳性结果，本研究即有1例最终排除为结核分枝杆菌感染的患者，其结核杆菌培养为阳性，IGRA为阴性，说明IGRA对NTM有一定区分能力，这一结论也与其他研究相符合[5]。在本研究中，IGRA对结核病和涂阴肺结核的诊断价值无明显差异，而结核培养的敏感度明显下降，凸显了IGRA在此类患者中的诊断优势。此结论也与黄其俊等人[9]的研究结果相符合。

与TB-IgG、结核杆菌培养和结核涂片法相比较，IGRA诊断结核病的阴性预测值显著高于TB-IgG（44.4%）、结核杆菌培养（40.0%）和结核涂片实验（39.0%）；在我国高结核感染率的环境下，IGRA阴性结果对于排除结核病的诊断具有重要意义。而在特异度、阳性预测值上，IGRA显著低于TB-IgG、结核杆菌培养和结核涂片结果，说明在检查结果冲突的情况下，后三者的阳性结果更支持结核诊断的确立。此外，IGRA与TB-DNA在诊断结核病方面，并没有统计学差异，这表明TB-DNA对于结核病的诊断也不失为可选择的诊断方法[10]，TB-IGRA与TB-DNA联合辅助诊断结核病的效能评价也将成为未来研究的热点之一。

综上所述，TB-IGRA作为一项新的结核病辅助诊断技术，具有很高的敏感度及阴性预测值，在我国高结核发病率的背景下，对结核病的诊断具有很高的应用价值。

参考文献

[1]　Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosisInfection[J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(1): 3-20.

[2]　Liu Y, Ou M, He S, et al. Evaluation of a domestic interferon-gamma release assay for detecting Mycobacterium tuberculosis infection in China[J]. Tuberculosis (Edinb), 2015, 95(4):523-526.

[3]　中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2013, 20(2):7-10.

[4]　赵茜, 傅潺潺, 夏强, 等. γ-干扰素释放试验在肺内结核和肺外结核中的诊断价值[J]. 浙预防医学, 2014, 26(10):990-997.

[5]　Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur Respir J, 2011, 37(1):100-111.

（下转第137页）

·综 述·

长链非编码RNA在口腔鳞状细胞癌中的研究进展

黄佳欣 邵婷如 陈跃川 吕晓智*

［摘 要］ 近年研究发现，多种长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）参与了生物学过程且发挥了重要的调控功能，如胚胎发育、细胞周期调控、干细胞多能性分化、免疫监视等，其异常调节可导致各类疾病包括肿瘤的发生发展，对于多种恶性肿瘤的早期诊断、治疗和预后判断有非常重要的价值。但到目前为止，lncRNA在口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma，OSCC）中的研究报道还较少，本文将结合国内外最新报道对与OSCC相关的lncRNAs的表达及意义和调控机制作一综述，为OSCC的基因诊断和治疗提供新的思路。

［关键词］ 长链非编码RNA；口腔鳞状细胞癌；肿瘤标志物

The progress of lncRNAs in oral squamous cell carcinoma

HUANG Jiaxin, SHAO Tingru, CHEN Yuechuan, LV Xiaozhi*
(Department of Oral & Head and Neck Surgery of Nanfang Hospital, Affiliated to Southern Medical Univesity, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Recently, research has shown that long non-coding RNA (lncRNA) play a critical regulatory role in a variety of biological processes, such as modulation of apoptosis, invasion, metastasis, ect. Dysregulation of these lncRNAs can lead to a variety of human diseases, especially cancer. lncRNAs have been confirmed to be valuable for early diagnosis, treatment and prognosis for various types of cancer. However, there has still not been any comprehensive studies on oral squamous cell carcinoma (OSCC). In this paper, the expression and meaning of lncRNAs related to OSCC as well as their regulatory mechanism from the latest articles both domestic and abroad to provide new insights into genetic diagnosis and treatment of OSCC will be reviewed.

[KEY WORDS] Long non-coding RNAs; Oral squamous cell carcinoma; Tumor marker

口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma，OSCC）是常见的恶性肿瘤，不仅恶性程度高、易发生局部侵袭及颈部淋巴结转移，还影响颜面形态和咀嚼、发音等功能，导致患者生存率和生活质量受到严重影响。近年来，长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）在肿瘤的发生发展方面的研究受到广泛关注，一些lncRNA在疾病的早期诊断、治疗和预后判断方面已发挥了重要的作用[1]。为给OSCC的基因诊断和治疗提供新的研究思路，本文将结合国内外最新报道对lncRNA在OSCC中的表达情况及调控机制作一综述。

1 lncRNA的概述

lncRNA是一类位于细胞核或细胞质内、长度大于200个核苷酸且不具有可读框的转录本。研究发现lncRNA可在表观遗传学水平、转录水平和转录后水平等多个层面上，通过介导染色质重塑、组蛋白修饰、X染色体失活、基因组印迹、转录、剪接、

基金项目：国家自然科学基金（81472536）；广东省科技计划项目（2014A020212440）；2013年南方医院新业务新技术课题（2013015）

作者单位：南方医科大学南方医院口腔-头颈外科，广东，广州 510515
*通讯作者：吕晓智，E-mail：lxzsurgeon@126.com

翻译、降解和转运等多种途径调控基因的表达，从而影响细胞分化、生长、新陈代谢过程及疾病的发生发展[1]。

目前已知lncRNA有调控基因转录、参与基因转录后调控和参与调控蛋白质翻译及翻译后修饰等功能[2]。此外，*lncRNA*还广泛与DNA损伤修复，细胞周期调控细胞凋亡等生理或病理过程调控肿瘤的发生发展。

2 lncRNA与OSCC

近年研究发现多种lncRNAs在OSCC组织中异常表达，这些lncRNAs在OSCC的发生发展过程中起至关重要的作用，其表达水平的变化影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力，并与患者的预后密切相关，可作为OSCC早期诊断和治疗的靶标[3]。

2.1 HOX转录反义RNA（HOX transcript antisense RNA，HOTAIR）

2.1.1 HOTAIR在OSCC中的表达及意义

*HOX*基因是生物体中一类专门调控生物形体的基因，在胚胎发育过程中起着关键作用。根据序列的相似性和在染色体上的位置可分为HOXA（7号染色体）、HOXB（17号染色体）、HOXC（12号染色体）和HOXD（2号染色体）4簇。Rinn等人[4]利用高分辨率芯片技术鉴定分析了HOX基因簇转录而来的数百条非编码RNA，并在位于12号染色体的HOXC基因位点发现了HOTAIR。研究发现[5]，相比正常组织，OSCC组织及其转移组织样本中HOTAIR表达上调，其上调程度与肿瘤分期及组织分化程度密切相关——肿瘤分期越差和组织分化程度越低，则HOTAIR表达上调越高。同时HOTAIR在OSCC中表达上调预示着更差的预后，高表达者的5年生存率较低表达者低40%左右；在OSCC细胞系中抑制HOTAIR表达，能减少肿瘤细胞的增殖克隆和侵袭迁移，诱导细胞凋亡。此外，尽管在OSCC患者的循环血液中，HOTAIR的表达水平与正常人无明显差异[6]，但在其唾液，尤其是伴有淋巴结转移的患者唾液中可检测到HOTAIR表达。这些研究表明，HOTAIR可能是OSCC的潜在标志物，对OSCC患者进行唾液lncRNA检测可能成为一种早期且快速的无创诊断工具。

2.1.2 HOTAIR在OSCC中的调控机制

在肿瘤细胞中HOTAIR可与哺乳动物多疏抑制复合体2（polycomb repressive complex2，PRC2）共同作用使组蛋白H3第27位赖氨酸（histone H3 lysine k27，H3K27）三甲基化[7]，导致目的基因表达下调，从而调控WNT同源基因/β连环蛋白（Wnt/β-catenin）、磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3 kinase，PI-3K）等信号通路，并可与miRNA相互作用逃避生长抑制、抵抗细胞凋亡等而影响肿瘤的侵袭转移[8]。①HOTAIR在恶性肿瘤中表达上调可诱导PRC2复合物的重定位，增加了H3K27甲基化程度，从而使Wnt/β-catenin信号通路的一个关键抑制因子——*WIF-1*基因沉默[9]，导致Wnt通路激活，破坏胞质中β-catenin APC/Axin1降解复合物，细胞核内β-catenin增多从而诱导肿瘤血管的形成、促进侵袭与迁移及逃避了生长抑制。②HOTAIR可抑制人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因（phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10，*PTEN*）的表达从而激活Akt通路[10]。Akt通路的活化，一方面可通过上调下游的基质金属蛋白酶9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）而下调Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 Associated X Protein，BAX），促进肿瘤细胞的侵袭和转移并减少其凋亡；另一方面也可影响肿瘤的恶性表型，从而使肿瘤细胞的侵袭、转移和凋亡受影响。③激活Akt通路而使Akt蛋白活化后，p53蛋白的活性受到抑制，Bcl-2表达上调而Bax表达下调，从而减少肿瘤细胞凋亡[11]；HOTAIR也可通过Akt及p53，上调促血管生成因子的同时下调抗血管生成因子，从而促进肿瘤血管生成[12]。此外，活化的Akt蛋白还可下调p21[13]，从而活化一系列Cyclin-CDK复合物，促进肿瘤细胞的生长增殖。④HOTAIR作为miRNA海绵，与miR-331-3p或miR-124结合[8]，上调人表皮生长因子受体-2（human epidermal growth factor receptor-2，*HER2*）等基因表达，使Akt信号通路活化而促进肿瘤细胞增殖和侵袭转移。HOTAIR也可与miR-130a结合并使其下调，从而抑制抑癌基因*PTEN*等的表达，使Akt信号通路活化而影响肿瘤的恶性表型[14]。⑤HOTAIR通过减少EZH2（enhancer of zeste homolog 2）和H3K27me3与*E-cadherin*启动子的结合，从而抑制*E-cadherin*的表达。通过这种机制，下调HOTAIR能促进上皮细胞间质化转变（epithelial-mesenchymal transition，EMT）[15]。以上研究证实，HOTAIR在OSCC中表达上调，而上调HOTAIR可通过多种机制促进OSCC的生长、侵袭和转移。

2.2 尿路上皮癌抗原1(urothelial carcinoma antigen 1, UCA1)

2.2.1 UCA1在OSCC中的表达及意义

Fang等人[16]通过检测94对舌鳞癌(tongue squamous cell carcinoma,TSCC)患者癌组织和癌旁正常组织中UCA1的表达情况,发现在肿瘤组织中UCA1的表达水平显著高于癌旁组织。与没有淋巴结转移的TSCC患者相比,UCA1在有淋巴结转移的TSCC患者的肿瘤组织中表达显著上调,且在转移的淋巴结中UCA1表达水平比在原发舌癌组织中更高。此外,在体外实验中还发现增加UCA1的表达可促进TSCC细胞发生迁移,但对细胞的增殖几乎没有产生影响,由此表明,UCA1主要作用可能是促进TSCC的转移,但其确切机制有待进一步研究。

2.2.2 UCA1在OSCC中的调控机制

UCA1在TSCC中可能通过以下机制进行调控:①通过PI3K/Akt通路调控环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)的活性和表达水平,进而影响细胞周期,促进肿瘤细胞的生长增殖[17]。②有抗细胞凋亡功能的转录因子Est2可直接结合到UCA1启动子区,从而激发其活性、调节其表达水平,使UCA1参与Akt信号传导通路,进而调控细胞凋亡[18]。③可通过mTOR-STAT3/microRNA143-HK2级联放大途径,调节肿瘤细胞中的糖代谢过程,进而促进肿瘤细胞的糖酵解作用[19]。④CAPERα/TBX3抑制复合物可抑制细胞衰老而UCA1是其直接作用对象,它们构成了协同增强的机制从而调控CDKN2A-p16INK转录、维持mRNA的稳定性,使细胞衰老受抑制,促进了肿瘤的发生发展[20]。以上研究提示,UCA1以非常复杂的机制参与了TSCC的发生发展进程。

2.3 *FOXC1*启动子上游转录体(FOXC1 promoter upstream transcript, *FOXCUT*)

2.3.1 *FOXCUT*在OSCC中的表达及意义

大量报道已证实叉头框基因C1(Forkhead box C1,*FOXC1*)通过影响细胞周期、上皮间质化及细胞迁移等方式参与恶性肿瘤的发生发展过程并可作为恶性肿瘤组织的分子标志物[21]。但*FOXC1*作为转录因子通常不能独立发挥功能,而是通过与靶基因的启动子或其他转录因子相互作用方可激活转录。Kong等人[22]在GenBank中进行生物信息学分析时发现,在*FOXC1*基因启动子的上游有lncRNA FOXCUT,并采用实时定量PCR(quantitative real-time PCR,qPCR)技术分析其在OSCC中的功能。研究结果显示,FOXCUT在OSCC组织内呈高表达并与FOXC1的表达呈正相关;FOXCUT表达下调后抑制Tca8113和SCC-9细胞的增殖和迁移侵袭能力。该研究结果表明,FOXCUT和FOXC1可能成为OSCC潜在的诊断标志和治疗靶点。

2.3.2 FOXCUT在OSCC中的调控机制

2008年Wang等[23]发现细胞周期蛋白D1(cyclin D1,*CCND1*)启动子上游的lncRNA过度招募RNA结合蛋白(translocated in liposarcoma,TLS),导致蛋白乙酰转移酶(CREB-binding protein,CBP)和P300的活性受抑制,从而沉默了*CCND1*的转录。结果表明了lncRNA调控邻近编码蛋白基因的表达可能取决于其与靶标的物理位置,这是最早关于lncRNA与mRNA相互作用的报道。近年来研究发现,FOXCUT距离FOXC1启动子小于10 kb且与其同方向转录,同时目前的研究表明lncRNA生物学功能广泛,提示FOXCUT在OSCC中的进程可能类似转录因子FOXC1或与之相互作用而参与OSCC的进程[22]。

2.4 肺腺癌转移相关转录因子1(metastasis-associated lungadenocarcinoma transcript 1, MALAT1)

2.4.1 MALAT1在OSCC中的表达及意义

Liu等人[24]通过实时逆转录PCR技术(real-time reverse transcription PCR,RT-qPCR)在OSCC及正常口腔黏膜组织和细胞中检测MALAT1的表达,发现MALAT1在OSCC组织中的表达水平显著高于正常组织,而且进一步研究发现,下调MALAT1可抑制OSCC细胞的增殖与迁移。以上结果表明,MALAT1在OSCC发生发展方面发挥了重要的调控作用。

2.4.2 MALAT1在OSCC中的调控机制

EMT是指细胞上皮表型在特定的生理及病理情况下向间质转化的现象,其参与调控OSCC原发浸润和继发转移的生理过程[25]。Liu等[24]研究发现,在采用划痕实验和Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力中,下调MALAT1的表达水平后抑制了OSCC细胞的迁移、侵袭能力,穿过Transwell小室的细胞数量较前显著减少,划痕愈合减慢,从而证明了MALAT1可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。在蛋白质印迹法检测细胞EMT相关蛋白表达的实验中发现,敲低MALAT1在OSCC中的表达

后，促进了肿瘤细胞EMT相关蛋白E-cadherin的表达，而显著抑制了N-cadherin、MMP-2和MMP-9的表达。在免疫荧光法检测细胞相关蛋白（E-cadherin、N-cadherin）水平变化的实验中发现，下调MALAT1的表达水平后，OSCC细胞中E-cadherin的荧光强度增大而N-cadherin的荧光强度明显减弱，以上结果表明MALAT1可能通过诱导EMT过程从而促进OSCC细胞的侵袭和转移。此外，在最新的研究中也证实了MALAT1可诱导TSCC细胞EMT，并通过Wnt/β-catenin通路抑制TSCC细胞凋亡，促进TSCC的发生发展[26]。

2.5 母系表达基因3（materally expressed gene 3，MEG3）

2.5.1 MEG-3在OSCC中的表达及意义

Jia等人[27]研究表明，MEG-3在TSCC组织中的表达明显下调，并且过表达的MEG-3能够抑制TSCC细胞的增殖，促进细胞凋亡，同时也证实了MEG3的低表达是TSCC患者预后不良的独立危险因素。该研究表明，MEG-3在TSCC的发生中起重要的抗肿瘤作用，可作为判断TSCC患者预后的独立生物标志物。

2.5.2 MEG-3在OSCC中的调控机制

研究发现，miR-26a可通过降低TSCC中DNA甲基转移酶3B（DNA methyltransferase 3B，DNMT3B）的表达水平而增加MEG-3的表达[27]。DNMT3B的表达与miR-26a和MEG-3的表达水平呈负相关。高表达的miR-26a或MEG-3抑制TSCC细胞增殖、细胞周期进程，同时促进细胞凋亡。表明TSCC发病可能存在的机制是miR-26a的沉默促进了DNMT3的表达，进而导致MEG-3表达下调，促进TSCC的发生发展。

2.6 肌动蛋白纤维相关蛋白1-反义RNA1（Actin Filament Associated Protein 1-Antisense 1，AFAP1-AS1）

2.6.1 AFAP1-AS1在OSCC中的表达及意义

付从等[28]通过RT-qPCR法检测75例OSCC组织及其配对癌旁正常组织中AFAP1-AS1的表达情况，结果显示AFAP1-AS1在OSCC组织中的相对表达水平是癌旁组织的5.16倍，且其表达与临床分期、分化程度及淋巴结转移显著相关。该实验结果说明了AFAP1-AS1在OSCC中的表达上调可能与OSCC的发生发展有关。

2.6.2 AFAP1-AS1在OSCC中的调控机制

关于AFAP1-AS1致癌作用的具体机制尚处于起步研究阶段，最新研究发现，AFAP1-AS1可通过调节肌动蛋白纤维结构完整性从而促进肿瘤的发生发展[29]，而肌动蛋白纤维结构改变与OSCC细胞侵袭和转移有关[30]。因此可推测，AFAP1-AS1高表达影响肿瘤细胞微丝结构改变可能是导致OSCC发生发展的重要原因。

3 总结与展望

lncRNA在OSCC的发生发展过程中起重要的作用，对其进一步的研究一方面有助于阐明OSCC的癌变机制，为OSCC的预防和早期诊断提供帮助；同时也可作为监测肿瘤复发、转移及判断疾病预后的分子靶标，指导临床治疗。但目前对lncRNA在OSCC中的作用及机制的研究报导尚不多见，如何采用简便、微创、甚至无创的方法检测lncRNA在OSCC中的表达情况，并根据其表达水平准确判断OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力，以及通过判断OSCC预后情况而制定出合理化、个体化的治疗方案是今后的研究方向。

参考文献

[1] Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long noncoding RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(14): 6391-6400.

[2] 屠欣怡，宋瑾，贺福初，等. 长链非编码RNA功能的研究进展及其与癌症的关系[J]. 生物物理学报，2015，4,31(2):79-89.

[3] 韩奕能. 长链非编码RNA与口腔癌研究进展[J]. 临床与病理杂志，2016，36(9):1450-1456.

[4] Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. Cell, 2007, 129(7):1311-1323.

[5] Wu Y, Zhang L, Zhang L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2015, 46(6):2586-2594.

[6] Fayda M, Isin M, Tambas M, et al. Do circulating long non-coding RNAs (lncRNAs) (LincRNA-p21, GAS 5, HOTAIR) predict the treatment response in patients with head and neck cancer treated with chemoradiotherapy[J]. Tumor Biol, 2016, 37(3): 3969-3978.

[7] Guo F, Parker Kerrigan BC, Yang D, et al. Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7:19.

[8] Liu XH, Sun M, Nie FQ, et al. LncRNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by Sponging miR-331-3p in gastric cancer[J]. Mol Cancer, 2014, 13:92.

[9] Ge XS, Ma HJ, Zheng XH, et al. HOTAIR, a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma, inhibits WIF-1 expression and activates Wnt pathway [J]. Cancer Sci, 2013, 104(12):1675-1682.

[10] Li D, Feng J, Wu T, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Am J Pathol, 2013, 182(1):64-70.

[11] Xiong W, Wu X, Starnes S, et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potentialnovel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma[J]. Blood, 2008, 112 (10):4235-4246.

[12] Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome[J]. J Mol Med (Berl), 2007, 85(11): 1175-1186.

[13] Liu Z, Sun M, Lu K, et al. The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregulation of p21 (WAF1/CIP1) expression[J]. Plos One, 2013,8(10): e77293.

[14] Ma MZ, Li CX, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA HOTAIR, a c-Myc activated driver of malignancy, negatively regulates miRNA-130a in gallbladder cancer[J]. Mol Cancer, 2014, 13:156.

[15] Wu Y, Zhang L, Zhang L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2015, 46 (6):2586-2594.

[16] Fang Z, Wu L, Wang L, et al. Increased expression of the long non-coding RNA UCA1 in tongue squamous cell carcinomas: a possible correlation with cancer metastasis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014, 117(1):89-95.

[17] Yang C, Li X, Wang Y, et al. Long non-coding RNA UCA1 regulated cell cycle distribution via CREB through PI3-K dependent pathway in bladder carcinoma cells[J]. Gene, 2012, 496(1):8-16.

[18] Wu W, Zhang S, Li X, et al. Ets2 regulates cell apoptosis via the Akt pathway, through the regulation of urothelial cancer associated 1, a long non-coding RNA, in bladder cancer cells[J]. Plos One, 2013, 8(9): e73920.

[19] Li Z, Li X, Wu S, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes glycolysis by upregulating hexokinase 2 through the mTORSTAT3/microRNA143 pathway[J]. Cancer Sci, 2014, 105(8):951-955.

[20] Kumar PP, Emechebe U, Smith R, et al. Coordinated control of senescence by lncRNA and a novel T-box3 corepressor complex[J]. Elife, 2014, 3:e02805.

[21] Chen S, Jiao S, Jia Y, et al. Effects of targeted silencing of FOXC1 gene on proliferation and in vitro migration of human non-small-cell lung carcinoma cells[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(8):3309-3318.

[22] Kong XP, Yao J, Luo W, et al. The expression and functional role of a FOXC1 related mRNA-lncRNA pair in oral squamous cell carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 394(1-2):177-186.

[23] Wang X, Arai S, Song X, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA binding proteins in cis to inhibit transcription[J]. Nature, 2008, 454(7200):126-130.

[24] Liu S, Zhou X, Wang XF, et al. Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 modulates oral squamous cell carcinoma invasion in vitro and in vivo[J]. Chin J Clin Oncol, 2015, 42(9):460-465.

[25] Wang B, Zhang CP, Zhang S, et al. Epithelial-mesenchymal transformation-mediated lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma and its mechanism[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2012, 39(23): 1877-1880.

[26] Liang J, Liang L, Ouyang K, et al. MALAT1 induces tongue cancer cells' EMT and inhibits apoptosis through Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Journal of Oral Pathology &Medicine, 2017, 46(2):98-105.

[27] Jia LF, Wei SB, Gan YH, et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2014, 135(10): 2282-2293.

[28] 付从, 张行炜. 长链非编码RNA AFAP1-AS1在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(9):983-986.

[29] Wu W, Bhagat TD, Yang X, et al. Hypomethylation of non-coding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, AFAP1-AS1, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. Gastroenterology, 2013, 144(5):956-966.

[30] Suzuki T, Kasamatsu A, Miyamoto I, et al. Overexpression of TMOD1 is associated with enhanced regional lymph node metastasis in human oral cancer[J]. Int J Oncol, 2016, 48(2):607-612.

·综　述·

环境胁迫下细菌非编码小RNA对基因表达的调控

何宇婷[1]　陈茶[2]　黄彬[1*]

［摘　要］ 细菌非编码小RNA（sRNA）是长度约为50~500个核苷酸的RNA分子，其编码基因位于基因间区域，在细菌基因组中可被转录但不被翻译为蛋白质。随着生物信息学和RNA测序技术的发展，sRNA功能受到广泛关注。在不断变化的环境中，细菌遇到各种各样的生存压力，sRNA通过感应环境变化调节相应基因的表达，在细菌适应环境的过程中发挥了重要作用。本文对环境胁迫下细菌sRNA的表达变化和其对基因的表达调控进行综述，揭示sRNA对细菌基因转录后调控、生物适应性进化等生命过程的重要意义。

［关键词］ 细菌；非编码小RNA；基因表达

The regulation of bacterial small non-coding RNA on gene expression under environmental stress

HE Yuting[1], CHEN Cha[2], HUANG Bin[1*]

（1. Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Laboratory Medicine, Tradition Chinese Medicine University Hospital, 510120）

[ABSTRACT] Bacterial small non-coding RNA (sRNA) is a type of RNA molecule withlength ranging from 50 to 500 nucleotides and located in the intergenic regions. In the bacterial genome, sRNA can be transcribed but cannot be translated into protein. With the development of bioinformatics and RNA sequencing technology, more and more attention have been paid to sRNA's function. In the changing environment, bacteria will encounter different types of survival pressure. sRNA plays an important role in the adaptation to different biological and environmental pressures. In this paper, the regulation of bacterial small non-coding RNA on gene expression under environmental stress will be reviewed, which is of great importance to reveal the bacterial gene post-transcriptional regulation and biological adaptive evolution.

[KEY WORDS] Bacteria; Small non-coding RNA; Gene expression

在不断变化的环境中，细菌遇到各种各样的生存压力，如温度、pH、抗生素、需氧和厌氧环境、离子浓度及营养等。为了适应环境变化，细菌通过复杂的调控网络调节基因表达来对环境变化做出反应。近年来，通过高密度平铺矩阵和RNA测序等技术对基因表达进行研究，发现分布在细菌基因组中的非编码小RNA（small non-coding RNA，sRNA）发挥了重要作用[1]。sRNA作为具有独特特性和功能的一类RNA可帮助细菌快速地对环境变化做出应答，相对于蛋白质的调控作用更加经济有效。本文对sRNA的分类、作用机制和环境胁迫下sRNA对基因的表达调控进行综

基金项目：国家自然科学基金（81572058，81672081，81772249）；广东省自然科学基金（2014A030313143）；教育部留学回国人员科研启动基金资助项目［教外司留（2015）311号］

作者单位：1. 中山大学附属第一医院检验医学部，广东，广州 510080
2. 广东省中医院检验医学部，广东，广州 510120
*通讯作者：黄彬，E-mail：hb906@163.com

述，以期对细菌sRNA提供全面认识，有助于进一步揭示基因转录后调控和生物适应性进化等生命过程。

1 *sRNA*的分类

细菌sRNA的长度约为50~500个核苷酸，其编码基因位于基因间区域，约2%~12%的基因间区域编码sRNA[2]。亲缘关系较近的菌属成员之间sRNA序列具有保守性，sRNA开始于一段能折叠成稳定茎环结构的序列，终止于不依赖Rho的转录终止子[3]。sRNA的茎环结构有利于维持分子稳定性，使sRNA比mRNA更加稳定。

根据sRNA生物学功能和作用机制的不同，可将其分为3类：①具有看家功能的sRNA；②影响蛋白质功能的sRNA；③调控基因表达的sRNA。根据sRNA与靶标的位置关系可将其分为顺式编码的sRNA和反式编码的sRNA。顺式编码的sRNA与靶标基因重叠而反式编码的sRNA与靶标基因分离，同时顺式编码的sRNA与转录本之间有良好的碱基配对而反式编码的sRNA通常与转录本之间不存在良好的碱基配对[4]。根据sRNA对RNA分子伴侣Hfq蛋白的依赖与否，分为依赖Hfq的sRNA（如单核细胞增生李斯特菌的LhrA、LhrB和LhrC）和非依赖Hfq的sRNA（如单核细胞增生李斯特菌的RliA、RliB、rnpB和ssrS等）。

2 sRNA的作用机制

多数情况下sRNA通过与靶mRNA配对调控基因表达。sRNA与靶mRNA结合后，可通过如下机制对靶基因进行调控：①sRNA与目标mRNA通过不完全的碱基配对结合，阻碍其与核糖体结合而抑制翻译；②sRNA结合在mRNA的3′端，稳定mRNA的结构；③sRNA结合在mRNA的茎环结构上，打开茎环结构促进翻译[5-6]。sRNA能抑制或激活目的mRNA翻译，一种sRNA可与多种mRNA相互作用，同时sRNA与目的mRNA频繁结合会导致mRNA被RNases快速降解[7]。

3 环境胁迫下sRNA对基因表达的调控

细菌sRNA通过感应外界环境条件变化，如温度、铁离子浓度、pH、氧和抗生素作用等，参与转录后基因的表达调控。

3.1 温度的变化

细菌需要时刻监测温度变化，通过复杂的信号传导系统对外界环境温度的变化做出反应。相比于信号传导系统，RNA介导的反馈通路可以更快地对温度变化做出反应，其只需要改变调节区域的结构即可。这个结构可变的区域称为RNA温度计，属于顺式编码sRNA。

通常RNA温度计位于mRNA的5′端非编码区（5′-untranslated region，5′-UTR），在低温下形成阻止夏因-达尔加诺（Shine-Dalgarno，SD）序列与30S核糖体亚单位结合的构象，随着温度升高，其二级结构的稳定性被破坏，进而形成翻译起始复合物[8]。最常见的RNA温度计是热休克表达抑制（repression of the heat shock expression，ROSE）元件，一段位于5′-UTR的热反应RNA，其5′端的发夹环结构在热休克环境中保持稳定，而3′端包含SD序列的发夹环结构只在低温下保持稳定。随着温度升高，ROSE元件3′端RNA的茎环结构被破坏，进而促进核糖体与SD序列结合，启动mRNA翻译[9]。

另一类RNA温度计是4个U序列，最早在沙门菌的AgsA mRNA中发现。研究发现，AgsA蛋白的表达受温度调控。在低温下，4个U序列温度计在一条链上形成发夹结构，通过与SD序列互补配对阻碍其与核糖体的结合。在热休克条件下，4个U-SD螺旋结构稳定性被破坏，从而解除阻止，同时4个U序列在沙门菌其他几个热休克蛋白和毒力基因中被发现[9]。RNA温度调控计在冷休克反应中也很重要。冷休克蛋白是一种RNA伴侣蛋白分子，可与RNA单链结合，在低温下阻止二级结构形成，作为转录的抵抗因子在冷休克条件下促进转录和翻译。*CspA*基因的表达受到*CspA* mRNA 5′-UTR的RNA温度计调控，在低温下维持*CspA* mRNA的稳定，从而保证转录的进行[10]。因此，温度的变化通过改变RNA温度计的结构从而达到促进或抑制翻译的作用。

DsrA sRNA，在低温下高表达的反式编码sRNA，可作为RNA温度调控计和压力诱导因子*RpoS*的促进因子。在大肠埃希菌中，DsrA sRNA有F和T这2种构型，不同温度下2种构型的比例不一样，高温下T构型多而低温下F构型多。F构型的5′端与*RpoS* mRNA前部碱基互补配对，改变5′-UTR的二级结构，保护*RpoS* mRNA免受RNA

酶的降解作用，从而促进RpoS蛋白的合成[11]。DsrA sRNA也参与*mreB*转录后的调控。*mreB*是大肠埃希菌合成细胞壁、维持其杆状形态的关键因子[12]。在环境诱导的低生长率情况下，在低温或者静止期，*mreB*的下调有赖于*DsrA*的调节。在Hfq伴侣蛋白的帮助下，DsrA sRNA与*mreB* mRNA 5′端结合，影响*mreB*的稳定性及其翻译。DsrA sRNA也可通过σ^s和类核相关蛋白H-NS这2个转录调节因子负向调节*mreB* mRNA的表达[13]。sRNA通过与靶基因mRNA结合，影响其稳定性及翻译从而达到调节靶基因表达的目的。

3.2 Fe^{2+}的浓度

铁离子是细胞生长必须的元素，参与调控许多生物学功能，但过高浓度会产生毒性作用。因此，细菌体内铁离子浓度受到严格调控。在多数细菌中，铁摄入调控因子（ferric uptake regulator，Fur）是主要的铁离子稳态感受器。在铁离子充足的情况下，Fur的表达受抑制。当细胞内铁离子浓度降低时，Fur的表达上调。

RfrA和RfrB这2种sRNA对伤寒沙门菌在巨噬细胞中的复制非常重要。Fur因子可抑制这2种sRNA的表达，从而影响伤寒沙门菌在人巨噬细胞中的复制。从含铁细胞、Fe^{3+}螯合物的量及Fur因子的表达来看，*RfrA*或*RfrB*缺失都可形成独特的伤寒沙门菌表型，细菌复制能力显著下降，提示*RfrA*和*RfrB*在铁离子的调控中具有一定的作用[14]。

研究发现，在铁离子缺乏条件下大肠埃希菌表达RyhB sRNA。*RyhB*在转录水平受到Fur-Fe^{2+}复合体的调控，其表达可导致*sdhCDAB*、*acnA*、*fumA*、*bfr*、*acnA*和*sodB*等6个铁缺乏相关基因mRNA转录下调[15]。RyhB sRNA也可与*shiA* mRNA的5′-UTR端配对，取代封闭核糖体结合位点的内部抑制结构，从而促进转录起始复合物的形成，提高莽草酸乙酯通透酶mRNA的转录，而莽草酸乙酯通透酶对铁离子高亲和性含铁细胞的生成是必须的[16]。RyhB sRNA也可调节编码Fe-S簇形成蛋白质的操纵子iscRSUA。在铁缺乏的情况下，RyhB sRNA通过与iscRSUA转录本*iscR*与*iscS* mRNA之间区域的不完全互补配对，在*iscR* mRNA的3′-UTR形成稳定的二级结构，保护其不被降解，*iscR*转录的增加激活编码Fe-S簇形成蛋白质的suf操纵子[17]。铁离子缺乏条件下，相关sRNA可通过与靶mRNA互补配对，解除核糖体结合位点的抑制或提高靶mRNA的稳定性从而调节靶基因的转录与翻译，增强细菌对环境的适应性。

NrrF sRNA是在脑膜炎奈瑟菌中检测到的sRNA。NrrF sRNA可对环境中的铁离子做出反应，或受到Fur因子的调节[18]。在脑膜炎奈瑟菌中，Fur因子通过抑制*NrrF*直接激活相关基因的表达。NrrF sRNA能够结合到*sdh*转录本中有限的互补区域，下调编码琥珀酸脱氢酶复合体亚单位*sdhA*和*sdhC*基因的表达。NrrF sRNA对*sdhA*和*sdhC*基因的调节不需要伴侣蛋白Hfq，而大肠埃希菌中RyhB sRNA介导的铁离子调节需要与Hfq结合才能发挥作用[19]。

3.3 氧化应激的作用

许多病原菌入侵细胞的时候都会遭遇氧化应激反应。在感染的最初阶段，细菌利用多种sRNA对氧化应激做出反应。当结核分枝杆菌暴露于H_2O_2的环境中时，B11、B55、F6和ASpks sRNA会被诱导表达升高[20]。与此同时，ASpks sRNA的表达与*pks8*、*pks12*及*pks15* mRNA下调一致。

Li等[21]发现，OxyS这种LysR型转录因子可作为结核分枝杆菌氧化应激中的调节因子。过表达的OxyS可降低过氧化物酶*KatG*基因的表达。OxyS可直接与*KatG*基因的启动子区域结合，结合位点的中心是一段富含GC的T-N（11）A基序，并且OxyS与*KatG*基因结合的活性受到H_2O_2的抑制。Daugherty等[22]检测了对Ub2抗菌肽敏感性增高的耻垢分枝杆菌转座子突变株，发现过表达*OxyS*可抑制*ahpCD*基因的转录，RoxY sRNA可抑制*OxyS*，而*ahpCD*基因参与过氧化物解毒系统的编码，提示RoxY sRNA在耻垢分枝杆菌的氧化应激中发挥一定的作用。在伤寒沙门菌感染的巨噬细胞中，伤寒沙门菌编码的IsrC sRNA与IsrN sRNA可表现出与*OxyS*在氧化应激中相似的表达变化，提示*IsrC*与*IsrN*在氧化应激中发挥重要作用。另外，Calderon等[23]发现，在伤寒沙门菌中，由*OxyR*调控的RyhB-1及RyhB-2 sRNA在氧化应激中发挥重要作用。多种sRNA的参与帮助细菌在氧化应激中生存下来，进而提高其感染机体的能力。

3.4 pH的刺激

肠道内细菌对抗胃内极度酸性的能力对其在肠道的生长和繁殖非常重要。在一些革兰阳性细菌和革兰阴性细菌中，谷氨酸盐依赖的耐酸性系

统在保护细胞免受高浓度的H^+伤害中至关重要。*GadA*和*GadB*以谷氨酸盐为底物，编码催化产生γ-氨基丁酸的谷氨酸脱羧酶；*GadC*是参与γ-氨基丁酸与外界谷氨酸盐交换的转运蛋白。*GadE*、*GadX*、*GadW*、*CRP*、类核蛋白H-NS和σ^S可通过一系列途径对这些谷氨酸盐依赖的耐酸性系统中的蛋白进行调节[24]。

Gaida等[25]发现σ^S激活因子DsrA sRNA、RprA sRNA与ArcZ sRNA同时过表达可将大肠埃希菌抗酸性提高8 500倍以上，保护其免受酸性环境的伤害。这3种sRNA主要通过上调RpoS蛋白水平，进而影响RpoS-H-NS调控网络来提高大肠埃希菌的抗酸能力。

在高pH环境中，细菌通过产生脱氨酶、糖酵解和改变细胞膜性质等途径增加酸性物质，以应对高pH环境。有研究发现，*alx* mRNA的5′-UTR可作为pH反应性RNA区域即PRE核糖开关（PRE riboswitch，pH responsive RNA element）。在中性环境中，PRE通过形成无活性的转录结构N封闭*alx* mRNA的SD序列及发夹环中间的翻译起始密码子。在高碱性环境中，PRE可形成有活性的H结构，核糖体30S亚基可与*alx* mRNA的SD段结合，进而促进*alx*的翻译[26]。过高或过低的pH环境使得多数细菌难以生存，细菌通过表达多种sRNA提高其对酸或碱的抵抗力，以适应环境变化。

3.5 有氧或无氧环境的变化

在有氧或无氧条件下，细菌通过2个调节因子——延胡索酸盐和硝酸盐还原调节蛋白（fumarate and nitrate reduction regulatory protein，FNR）和有氧呼吸双组分系统（aerobic respiratory control two-component system，Arc）调节相关基因的表达。Arc系统由ArcA调节因子和ArcB激酶组成。在乏氧情况下，FNR通过$[4Fe\text{-}4S]^{2+}$感受氧的缺乏，ArcA/B通过氧化醌量的变化来感受氧的缺乏，随后ArcB激酶自身磷酸化，ArcA调节因子被激活[27]。FNR蛋白可抑制与需氧功能相关的基因，促进无氧条件下相关酶基因的表达，而ArcA的生物学作用与FNR相反。

从有氧环境转到无氧环境中，*FnrS*基因被FNR与ArcA激活，Hfq依赖的FnrS sRNA被合成，从而抑制一系列有氧环境中代谢酶的合成。FnrS sRNA 5′端区域可与*sodB*、*folE*及*folX* mRNA结合，从而抑制其表达。FnrS sRNA中心区域可与*maeA*及*gpmA* mRNA结合，从而对无氧环境中的代谢进行调节。σ^S可对多种压力做出反应，并通过激活一系列基因来帮助细菌适应环境变化。在乏氧条件下，大肠埃希菌σ^S激活因子*ArcZ*的表达被抑制，从而增强ArcA-ArcB的转录调控作用。*ArcZ*可直接抑制*ArcB*的转录，从而在ArcA-ArcB调控中形成负反馈调控机制[28]。

乏氧环境下，在奈瑟菌属中发现AniS sRNA，*AniS*可被FNR激活。通过全基因组分析发现，AniS sRNA通过与编码PrlC寡聚肽的*NMB0214* mRNA和脂蛋白的*NMB1468* mRNA结合发挥作用。AniS sRNA与其他Hfq依赖的sRNA不同，在Hfq蛋白存在的情况下，AniS sRNA的稳定性下降，尽管Hfq蛋白可促进AniS sRNA与靶mRNA结合[29]。有氧环境到无氧环境的转变或乏氧条件下，细菌表达一系列的sRNA与靶mRNA结合，进而参与多种细菌代谢调控网络，增加其对环境的适应，维持其生存。

3.6 抗生素的暴露

近年来的研究发现，细菌sRNA与抗生素暴露密切有关。分别用4种抗生素（万古霉素、利奈唑胺、头孢吡肟和替加环素）处理金黄色葡萄球菌，可发现36种sRNA的表达发生变化，其中sRNA 101、sRNA 117、sRNA 322、sRNA 339 、sRNA 242及sRNA 126等表达下调，而sRNA 124、sRNA 113、sRNA 128、sRNA 160及sRNA 217等表达上调[30]，提示sRNA与细菌耐药性密切相关。

微生物的细胞壁对维持细胞的完整性非常重要。同时，细胞壁可以限制有害物质进入细胞。对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究发现，在万古霉素和头孢托洛存在的情况下，sRNA10的表达下调，并且下调的sRNA10与*mecA*基因是反义的。*mecA*基因可编码青霉素结合蛋白PBP2a，后者可诱导细菌产生高水平β-内酰胺类抗生素耐药性，提示sRNA10在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性中发挥了一定作用[30]。最近，在金黄色葡萄球菌中发现SprX sRNA，其可抑制SpoVG蛋白的合成。SpoVG蛋白由yabJ-spoVG操纵子编码，可影响金黄色葡萄球菌对糖肽和苯唑西林的耐药性[31]。

脂多糖是革兰阴性细菌细胞壁的组成成分，可阻碍疏水性抗生素进入细菌。PhoP/PhoQ双组

分系统能够激活多种修饰脂多糖的基因，从而调节细菌的耐药性。在大肠埃希菌中，MicA sRNA与GcvB sRNA可作为*phoPQ* mRNA的调控因子，间接调控脂多糖的表达，从而对抗生素进入细菌进行调节[32]。另外，ArcZ sRNA可直接调节乙醇胺转移酶的表达，对脂多糖进行修饰，阻碍抗菌药物进入细菌[33]。改变外膜蛋白（outer membrane proteins，Omp）的组成也是细菌对抗生素耐药的一种机制。MicF sRNA与MicC sRNA可分别靶向作用于膜孔蛋白OmpF与OmpC，导致细菌对抗生素耐药。InvR、MicA、OmrA/B、RseX与RybB这几种sRNA被鉴定为Omp的调节因子，调节革兰阴性细菌外膜流动性和渗透性[34]。

革兰阴性细菌的外膜可限制抗菌药物进入细菌体内，主动外排系统可主动将进入膜内尚未发生作用的抗菌药物或其他物质选择性或非选择性地排出菌体外，降低菌体内药物的浓度。MtrCDE外排泵和内膜蛋白可帮助淋病奈瑟菌抵抗青霉素和红霉素等多种疏水性抗生素，而NrrF sRNA可抑制*MtrF* mRNA的表达，降低MtrF蛋白水平[35]。研究发现，DsrA sRNA作为σ^s的正向调控因子，可诱导大肠埃希菌多重耐药性的产生。DsrA sRNA可促进编码MdtEF多药物外排泵基因的表达，进而影响细菌对抗生素的易感性[36]。同理，其他的sRNAs如ArcZ、RprA及OxyS，都可对σ^s进行调控，这些sRNA也可参与对MdtEF多药物外排泵表达的调节。同样，RyhB sRNA可激活编码感应和转运大肠菌素的*CirA* mRNA。正常情况下*CirA* mRNA的SD序列被封闭，在铁离子缺乏的条件下，RyhB sRNA可与*CirA* mRNA的SD序列结合，促进其翻译。因此，RyhB sRNA可通过影响*CirA*的表达来调节细菌对大肠菌素的敏感性[37]。

细菌不断增长的耐药性已引起人们的广泛关注，细菌耐药机制也成为近年来的研究热点。细菌通过转录一系列的sRNA影响细菌细胞壁的成分、脂多糖的合成或主动外排系统来增加细菌对多种抗生素的耐药性，这种新颖的耐药机制有待深入研究。

4 细菌sRNA与毒力的变化

Hfq和CsrA蛋白在细菌的毒力和代谢中发挥关键作用，细菌多种sRNA通过与这2种蛋白结合而发挥作用。RNA结合蛋白CsrA在许多致病菌的毒力表达中发挥了非常重要的作用。*CsrA*在大肠埃希菌中作为糖原合成调控因子，其同源物已经在1 500多种细菌中被注释。CsrA结合区在mRNA富含GGA的区域，其结合通常可导致核糖体结合的减弱及mRNA的降解，CsrA主要的活性调节因子是CsrB样的sRNA[38]。

通过全基因组平铺矩阵分析发现了单核李斯特菌Rli27 sRNA。在细胞内感染周期，Rli27 sRNA调节细胞壁相关蛋白Lmo0514的表达；*Lmo0514*基因上游的不同靶点在感受到环境中的信号后，可形成具有不同5′-UTR长度的Lmo0514转录本亚型；这2个亚型在其5′-UTR包含不同的作用靶位，并且细胞内的表达不同。在细胞内感染周期中，含有长5′-UTR的亚型表达Rli27结合位点，两者结合后，SD序列的封闭作用解除，Lmo0514蛋白的合成增加[39]。

在肠道鼠伤寒沙门菌中，AmgR sRNA由*mgtC*与*mgtB* 2个基因间区的启动子转录而来，位于*mgtCBR*操纵子的反义链，可与其多顺反子mRNA 5′端互补[40]。*mgtCBR*操纵子可编码影响细菌毒力和维持Mg^{2+}稳态的MgtC蛋白；MgtR通过FtsH激酶介导MgtC的降解。AmgR sRNA可抑制MgtC与MgtB蛋白质的水平，促进MgtR与MgtC结合，降解MgtC。在肠道鼠伤寒沙门菌，*AmgR*可降低由MgtC蛋白介导的毒力[41]。同样，在肠道鼠伤寒沙门菌中，发现了由pSLT毒力质粒编码的lesR-1 sRNA[42]。在成纤维细胞的定植中，*lesR-1*偏向于在细菌休眠期表达；*lesR-1*缺失影响肠道鼠伤寒沙门菌在成纤维细胞中的生长，并且可降低小鼠感染模型的毒力。作为与PSLT047转录本有重叠的sRNA，lesR-1 sRNA通过与RNA 3′端的相互作用引起PSLT047蛋白水平的改变，进而对毒力进行调节。另外，有研究报道，在肠道鼠伤寒沙门菌毒力岛（*Salmonella* pathogenicity island，SPI）中发现了一个sRNA依赖的组织特异性毒力调控机制[43]。IsrM sRNA可在体外模拟肠道感染的环境中表达，并且研究结果显示*IsrM*在回肠中高表达，提示其在沙门菌的致病中发挥了一定作用。*IsrM*可靶向作用于SPI的效应基因*SopA*及*HilE*基因。*HilE*是沙门菌毒力的主要调节因子，*IsrM*通过与*HilE*及*SopA* mRNA的5′-UTR结合，掩盖其附近的SD序列，进而阻止2种蛋白的产生，从而调节肠道鼠伤寒沙门菌毒力。

在布氏杆菌感染小鼠中，*AbcR1* 与 *AbcR2* 对其在巨噬细胞中的生存非常重要[44]。AbcR1 sRNA 与 AbcR2 sRNA 中单个突变并不影响其在细胞中的生长；而 AbcR1 sRNA 与 AbcR2 sRNA 同时突变菌株对小鼠的感染性明显改变。在被感染的巨噬细胞中，2 个 sRNA 分别表达过剩，但发挥着互补的调节功能，功能性冗余的 RNA 分子可保证在细菌致病的生命周期中所需基因得以表达。细菌毒力的高低对其感染宿主至关重要。在感染过程中，细菌通过表达多种 sRNA 增加其毒力，发挥其致病性。对毒力相关的细菌 sRNA 的研究可为控制细菌的致病性提供新思路。

5 总结与展望

由于高通量测序与生物信息学技术的发展，在细菌调控网络中发挥作用的 sRNA 不断被发现。尽管目前在细菌中发现上百种 sRNA，但大部分 sRNA 的生物学功能并未得到完全的阐释。sRNA 作为原核生物中新发现的一类基因表达调控因子，可通过感应外界环境条件变化参与不同的调节途径，帮助细菌适应环境。本文对环境胁迫下细菌 sRNA 的表达变化及其对基因的表达调控进行综述，对揭示细菌基因转录后调控和生物适应性进化等生命过程具有重要意义。同时，深入挖掘 sRNA 在细菌生物学和致病过程中的作用并探讨 sRNA 在毒力和宿主免疫方面的功能将成为研究趋势，可为研发新的诊断标志物和以 sRNA 为作用靶点的新一代抗菌药物提供参考依据。

参考文献

[1] Gomez-Lozano M, Marvig RL, Molin S, et al. Identification of bacterial small RNAs by RNA sequencing [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1149:433-456.

[2] Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria[J]. Cell, 2009, 136(4):615-628.

[3] Mcneil BA, Zimmerly S. Novel RNA structural features of an alternatively splicing group II intron from Clostridium tetani[J]. RNA, 2014, 20(6):855-866.

[4] Brantl S. Acting antisense: plasmid- and chromosome-encoded sRNAs from Gram-positive bacteria[J]. Future Microbiol, 2012, 7(7):853-871.

[5] Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers[J]. Mol Cell, 2011, 43(6):880-891.

[6] Rice JB, Balasubramanian D, Vanderpool CK. Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(40):E2691-E2698.

[7] Saramago M, Barria C, Dos SR, et al. The role of RNases in the regulation of small RNAs[J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 18:105-115.

[8] Kortmann J, Narberhaus F. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(4):255-265.

[9] Pesingi PK, Kumawat M, Behera P, et al. Protein-L-Isoaspartyl Methyltransferase (PIMT) is required for survival of Salmonella Typhimurium at 42 degrees C and contributes to the virulence in poultry[J]. Front Microbiol, 2017, 8:361.

[10] Rennella E, Sara T, Juen M, et al. RNA binding and chaperone activity of the E. coli cold-shock protein CspA[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(7):4255-4268.

[11] Hammerle H, Vecerek B, Resch A, et al. Duplex formation between the sRNA DsrA and rpoS mRNA is not sufficient for efficient RpoS synthesis at low temperature[J]. RNA Biol, 2013, 10(12):1834-1841.

[12] White CL, Gober JW. MreB: pilot or passenger of cell wall synthesis?[J]. Trends Microbiol, 2012, 20(2):74-79.

[13] Cayrol B, Fortas E, Martret C, et al. Riboregulation of the bacterial actin-homolog MreB by DsrA small noncoding RNA[J]. Integr Biol (Camb), 2015,7(1):128-141.

[14] Leclerc JM, Dozois CM, Daigle F. Role of the Salmonella enterica serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt 3):591-602.

[15] Porcheron G, Dozois CM. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity [J]. Vet Microbiol, 2015, 179(1-2):2-14.

[16] Sheng H, Stauffer WT, Hussein R, et al. Nucleoid and cytoplasmic localization of small RNAs in Escherichia coli [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(5):2919-2934.

[17] Mandin P, Chareyre S, Barras F. A regulatory circuit composed of a transcription factor, IscR, and a regulatory RNA, RyhB, controls Fe-S cluster delivery[J]. MBio, 2016, 7(5):e00966-16.

[18] Pannekoek Y, Huis In't Veld RA, Schipper K, et al. Neisseria meningitidis uses sibling small regulatory RNAs to switch from cataplerotic to anaplerotic metabolism[J]. MBio, 2017, 8(2):e02293-16.

[19] Huis In't Veld RAG, Kramer G, van der Ende A, et al. The Hfq regulon of Neisseria meningitidis [J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(6):777-788.

[20] Haning K, Cho SH, Contreras LM. Small RNAs in mycobacteria: an unfolding story [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4:96.

[21] Li Y, He ZG. The mycobacterial LysR-type regulator OxyS responds to oxidative stress and negatively regulates expression of the catalase-peroxidase gene [J]. PLoS One, 2012, 7(1):e30186.

[22] Daugherty A, Powers KM, Standley MS, et al. Mycobacterium smegmatis RoxY is a repressor of oxyS and contributes to resistance to oxidative stress and bactericidal ubiquitin-derived peptides[J]. J Bacteriol, 2011, 193(24):6824-6833.

[23] Calderon IL, Morales EH, Collao B, et al. Role of salmonella typhimurium small RNAs RyhB-1 and RyhB-2 in the oxidative stress response[J]. Res Microbiol, 2014, 165(1):30-40.

[24] Seo SW, Kim D, O'Brien EJ, et al. Decoding genome-wide GadEWX-transcriptional regulatory networks reveals multifaceted cellular responses to acid stress in Escherichia coli[J]. Nat Commun, 2015, 6:7970.

[25] Gaida SM, Al-Hinai MA, Indurthi DC, et al. Synthetic tolerance: three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(18):8726-8737.

[26] Nechooshtan G, Elgrably-Weiss M, Altuvia S. Changes in transcriptional pausing modify the folding dynamics of the pH-responsive RNA element[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(1):622-630.

[27] Crack JC, Green J, Thomson AJ, et al. Iron-sulfur cluster sensor-regulators [J]. Curr Opin Chem Biol, 2012, 16(1-2):35-44.

[28] Mandin P, Gottesman S. Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA[J]. EMBO J, 2010, 29(18):3094-3107.

[29] Fantappie L, Oriente F, Muzzi A, et al. A novel Hfq-dependent sRNA that is under FNR control and is synthesized in oxygen limitation in Neisseria meningitidis [J]. Mol Microbiol, 2011, 80(2):507-523.

[30] Howden BP, Beaume M, Harrison PF, et al. Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant Staphylococcus aureus after antimicrobial exposure [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(8):3864-3874.

[31] Eyraud A, Tattevin P, Chabelskaya S, et al. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in Staphylococcus aureus[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(8):4892-4905.

[32] Coornaert A, Chiaruttini C, Springer M, et al. Post-transcriptional control of the Escherichia coli PhoQ-PhoP two-component system by multiple sRNAs involves a novel pairing region of GcvB[J]. PLoS Genet, 2013, 9(1):e1003156.

[33] Moon K, Six DA, Lee HJ, et al. Complex transcriptional and post-transcriptional regulation of an enzyme for lipopolysaccharide modification [J]. Mol Microbiol, 2013, 89(1):52-64.

[34] Van Puyvelde S, Steenackers HP, Vanderleyden J. Small RNAs regulating biofilm formation and outer membrane homeostasis[J]. RNA Biol, 2013, 10(2):185-191.

[35] Jackson LA, Pan JC, Day MW, et al. Control of RNA stability by NrrF, an iron-regulated small RNA in Neisseria gonorrhoeae [J]. J Bacteriol, 2013, 195(22):5166-5173.

[36] Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, et al. Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in Escherichia coli[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(2):291-296.

[37] Salvail H, Caron MP, Belanger J, et al. Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin [J]. EMBO J, 2013, 32(20):2764-2778.

[38] Chao Y, Papenfort K, Reinhardt R, et al. An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3′ UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs [J]. EMBO J, 2012, 31(20):4005-4019.

[39] Quereda JJ, Ortega AD, Pucciarelli MG, et al. The listeria small RNA Rli27 regulates a cell wall protein inside eukaryotic cells by targeting a long 5′-UTR variant[J]. PLoS Genet, 2014, 10(10):e1004765.

[40] Lau CH, Fraud S, Jones M, et al. Mutational activation of the AmgRS two-component system in aminoglycoside-resistant Pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(5):2243-2251.

(下转第144页)

·综 述·

14-3-3σ影响肿瘤发生发展和治疗的细胞及分子机制

谢蕴灵[1] 罗海丹[2] 杨惠玲[2*]

［摘 要］ 14-3-3σ是14-3-3蛋白家族的重要成员之一，在多种肿瘤中低表达。作为肿瘤抑制蛋白，14-3-3σ的低表达或活性降低可致癌细胞的过度增殖和凋亡不足，进而促进肿瘤的发生发展、侵袭、转移，甚至影响肿瘤的预后和疗效。本文主要综述和总结14-3-3σ与肿瘤临床生物学特性的关系、肿瘤细胞和患者癌组织14-3-3σ蛋白表达异常的原因、14-3-3σ对肿瘤细胞增殖和凋亡及其信号转导的影响，旨在揭示14-3-3σ的抑癌作用及细胞和分子机制，为临床肿瘤诊疗提供新的药物靶点和肿瘤标志物。

［关键词］ 14-3-3σ；肿瘤抑制蛋白；肿瘤

The cellular and molecular mechanism of 14-3-3σ's influence on the development and treatment of tumors

XIE Yunling[1], LUO Haidan[2], YANG Huiling[2*]

(1. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080)

[ABSTRACT] 14-3-3σ is an important member of 14-3-3 protein family. As a tumor suppressor protein, low expression or activity of 14-3-3σ can lead to over-proliferation and insufficient apoptosis of cells, which stimulates initiation, development, invasion, and metastasis of the tumors and can even impact its prognosis and curative effect. This review highlights the relationship between 14-3-3σ and clinicopathologic features of tumors, illuminates the reason why the expression or activity of the 14-3-3σ protein is abnormal in cancer cells and patients' tissues, and states the impact of 14-3-3σ on cancer cells'proliferation, apoptosis and signal transduction, trying to figure out the inhibition effect on cancer and the cellular and molecular mechanism by 14-3-3σ and provide a new target and biomarker for clinical diagnosis and therapy of tumor.

[KEY WORDS] 14-3-3σ; Tumor suppressor protein; Tumor

14-3-3是一个稳定存在于真核细胞中，高度保守、广泛表达的蛋白家族。此家族包含β、ε、γ、ζ、σ、η和τ等亚型，它们通过与丝氨酸/苏氨酸磷酸化的蛋白结合而发挥多样的生物学功能。14-3-3σ被认为是一种肿瘤抑制蛋白，它稳定存在于上皮组织细胞中，具有调控细胞增殖、凋亡与分化等作用，与肿瘤密切相关。以下将从整体、细胞和分子水平综述和总结14-3-3σ与肿瘤的关系。

1 14-3-3σ与肿瘤临床生物学特性相关

1.1 14-3-3σ抑制肿瘤的发生发展

14-3-3σ在多种肿瘤中呈低表达并促进肿瘤的

基金项目：国家自然科学基金项目(81372410，81071837，30670627)；广东省科技计划项目(国际科技合作计划)(2004B50301003)；广州市科技计划项目(国际科技合作计划)(2004J1-I0041)

作者单位：1. 中山大学公共卫生学院，广东，广州 510080

2. 中山大学中山医学院病理生理学教研室，广东，广州 510080

*通讯作者：杨惠玲，E-mail：yanghl@mail.sysu.edu.cn

发生与发展。如Yang等[1]发现原发性乳腺癌患者癌组织中14-3-3σ低表达，Akt高表达，二者呈负相关，体外细胞实验证实14-3-3σ低表达可致Akt高表达，表明14-3-3σ低表达与Akt介导的乳腺癌发生过程密切相关；通过体内外实验发现转染病毒14-3-3σ重组体可抑制鼻咽癌CNE1及CNE2细胞生长和Akt过表达，抑制Rat1-Akt细胞的活性及增殖和其在裸鼠中的成瘤性及生长，同时证实14-3-3σ是通过调控Akt-p27信号转导通路，干预细胞凋亡和细胞周期，而发挥抑癌作用[2-3]；其他学者研究也表明14-3-3σ在多种肿瘤（如口腔鳞癌、原发性膀胱癌、外阴鳞癌、肝细胞癌、结直肠癌及胃癌细胞）均呈现低表达并促进肿瘤的发生发展[4]。Winter等[5]利用小鼠模型研究发现14-3-3σ可抑制化学因素诱发皮肤癌的发生。这些结果提示14-3-3σ为抑癌蛋白，其低表达促进肿瘤的发生与发展。但也有相反的研究结果，如在胰腺癌组织中14-3-3σ呈高表达状态[4]。

1.2 14-3-3σ抑制肿瘤的侵袭转移

14-3-3σ可抑制肿瘤的侵袭与转移，Shao等[6]研究发现在结直肠癌细胞中LASP-1蛋白可使14-3-3σ表达下调，进而激活PI3K/Akt信号转导通路，促进癌细胞的侵袭。Raychaudhuri等[7]在研究人结肠癌细胞HCT116时发现，14-3-3σ缺失促使c-Jun蛋白在细胞核内稳定地聚集，上调上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）相关转录因子的表达，以利于肿瘤细胞侵袭及转移。Suárez-Bonnet等[8]在狗的膀胱移行细胞癌模型中发现，14-3-3σ在高浸润性肿瘤细胞中的低表达与癌细胞的侵袭特性有关，且狗的移行细胞癌模型与人泌尿道上皮癌模型密切相关，提示14-3-3σ低表达在人泌尿道上皮癌发展与转移的过程中可能起到一定作用。但也有相反的报道，如王瑾等[9]采用免疫组织化学技术检测乳腺癌石蜡标本中14-3-3σ的表达，发现胞浆中14-3-3σ高表达与乳腺癌淋巴结转移和临床分期呈正相关。Wu等[10]指出，在肝细胞癌中14-3-3σ通过诱导HSF-1α和HSP70表达而增强癌细胞侵袭与转移的能力。

1.3 14-3-3σ抑癌和提高放化疗疗效

14-3-3σ作为抑癌蛋白既可单独应用发挥抑癌作用，又可与其他药物联合影响肿瘤放化疗的敏感性，是肿瘤治疗中重要的靶分子。如Yang等[1-2, 12]发现通过转染病毒14-3-3σ重组体可抑制鼻咽癌CNE1及CNE2细胞、乳腺癌MDA-MB-361细胞和过表达Akt的Rat1-Akt细胞的活性及增殖能力和成瘤率；同时发现14-3-3σ与抗肿瘤药2-巯基乙醇（2-Mercaptoethanol，2-ME）联合应用发挥协同作用可促进鼻咽癌细胞、原发性乳腺癌组织细胞凋亡而增强抑瘤效应[2, 12]。Peng等[13]发现14-3-3σ过表达可通过正调控GSK3β蛋白水平抑制β-catenin信号通路，增强具有多重耐药性的舌癌细胞对化疗药物的敏感性。Zheng等[14]在对5-氟尿嘧啶（5-fluoracil，5-FU）耐药的MCF-7乳腺癌细胞（MCF-7/5-FU）的研究中发现，过表达14-3-3σ可增强MCF-7/5-FU细胞对化疗药5-FU和顺铂（cisplatin，CDDP）的敏感性。Li等[15]发现去甲基化药物5-氮杂-2′-脱氧胞苷（5-Aza-2′-deoxycytidine，5-Aza-CdR）通过上调14-3-3σ蛋白水平诱导骨肉瘤细胞停滞于G2/M期，增强骨肉瘤细胞的放疗敏感性。但也有相反的报道，如在胰腺导管腺癌[16]及食管鳞状细胞癌[17]中14-3-3σ促进肿瘤化疗抵抗。

2 肿瘤中14-3-3σ蛋白异常的原因

14-3-3σ异常发生于多种肿瘤中，提示14-3-3σ与肿瘤的发生发展相关。14-3-3σ异常包括14-3-3σ蛋白量的减少和蛋白活性降低或失活。

2.1 14-3-3σ蛋白量的减少

14-3-3σ蛋白量的稳定取决于14-3-3σ蛋白合成和降解之间的平衡，14-3-3σ蛋白合成减少或降解增强可致14-3-3σ蛋白水平下调。

2.1.1 14-3-3σ合成减少

14-3-3σ合成减少主要与基因表达下调相关。虽然诱发基因表达下调的因素是多样的，包括基因编码序列的缺失、转录过程中调节蛋白与特异DNA序列相互作用障碍以及翻译过程中mRNA稳定性异常等，但14-3-3σ表达下调主要是由编码14-3-3σ蛋白的*Sfn*基因启动子高甲基化引起的。研究表明，DNA甲基转移酶（DNA methyltransferases，DNMTs）的过度表达、组蛋白甲基化及RNA干扰（RNA interference，RNAi）介导的转录后沉默都可导致*Sfn*基因启动子高甲基化[4]。如Lodygin等[18]发现RNAi介导的14-3-3σ表达下调削弱了前列腺癌细胞在DNA受损时诱导的G2/M细胞周期检查点功能，并导致细胞染色体向多倍体化发

展。在结肠癌、肝癌、前列腺癌、乳腺癌和透明细胞型卵巢癌等细胞中，均可见14-3-3σ蛋白由于*Sfn*基因CpG岛高甲基化而表达下调。在乳腺癌中*Sfn*基因启动子的高甲基化是比癌症相关病理变化更早出现的标志[4]。Molin等[19]在研究小鼠角质化细胞模型时发现，IKK-alpha低表达通过诱导*sfn*基因启动子高甲基化抑制14-3-3σ蛋白的生成，继而诱导基底细胞癌的发生。

2.1.2 14-3-3σ降解增强

关于14-3-3σ蛋白的降解多围绕泛素化途径进行研究，如Choi等[20]发现COP1-CSN6介导14-3-3σ发生泛素化降解，CSN6过表达可使14-3-3σ水平下调，进而激活Akt促进细胞存活。陈平等[21]发现雌激素反应性指蛋白（estrogen-responsive finger protein，Efp）通过泛素蛋白酶体途径介导14-3-3σ降解，进而导致雌激素受体（estrogen receptor，ER）阳性乳腺癌患者内分泌治疗耐受。

2.2 14-3-3σ活性降低

14-3-3σ的活性既取决于自身的活化，又受体内其他因子调控。当14-3-3σ蛋白结构出现异常时，可影响其功能的发挥。如Winter等[5]发现在反复脱毛的小鼠模型中，*14-3-3σ*基因发生无义突变后，14-3-3σ蛋白因失去核输出信号和部分磷酸化结合位点而活性降低，进而导致小鼠表皮过度增生，甚至出现乳头状瘤和鳞状上皮细胞癌等病理特征。

同时，在14-3-3σ蛋白发挥抑癌作用的过程中存在着协同因子或拮抗因子。14-3-3σ是p53的靶分子，由p53诱导表达。Yang等[2]研究发现p53正常发挥功能是保证14-3-3σ活性的关键。在肺癌细胞A549中，野生型p53可诱导14-3-3σ蛋白量增加以应对化疗药导致的DNA损伤，而在2种不同分化程度的鼻咽癌细胞CNE1和CNE2中，*p53*基因突变导致DNA损伤时靶分子14-3-3σ表达水平无明显变化。此外，亦有研究发现在口腔上皮鳞状细胞癌、基底细胞癌和前列腺癌中，*p53*突变与14-3-3σ活性降低相关[4]。然而*p53*基因家族的另一成员*p63*却发挥着截然相反的作用。Li等[22]发现p63和14-3-3σ在皮肤癌的发生发展过程中相互拮抗，p63的积累促进14-3-3σ突变诱导的乳头状瘤和鳞状上皮细胞癌的发生。

3 14-3-3σ与癌细胞的增殖和凋亡相关

肿瘤是各种致癌因素作用引起局部细胞增殖过度和死亡不足而致细胞失控性生长的结果，14-3-3σ与细胞增殖和死亡尤其是细胞凋亡密切相关。

3.1 14-3-3σ对癌细胞增殖的影响

3.1.1 细胞活性

Yang等[1-2, 12]采用反映细胞活性的四甲基偶氮唑盐（methylthiazolyl tetrazolium，MTT）比色法检测发现，转染病毒14-3-3σ重组体可使鼻咽癌CNE1及CNE2细胞、乳腺癌MDA-MB-361细胞和过表达Akt的Rat1-Akt细胞生长速率明显减慢，提示过表达14-3-3σ可降低癌细胞活性。

3.1.2 细胞增殖能力

Yang等[1-2, 12]用反映细胞增殖能力的琼脂糖克隆形成实验检测发现，转染病毒14-3-3σ重组体可使鼻咽癌CNE1和CNE2细胞、乳腺癌MDA-MB-361细胞和Rat1-Akt细胞的集落形成减少。Zou等[23]研究发现14-3-3σ与KCMF1相互作用阻止结肠癌干细胞集落形成，抑制结肠癌干细胞增殖。提示过表达14-3-3σ可削弱癌细胞和癌干细胞的增殖能力。

3.1.3 细胞周期时限分布

许多研究表明过表达14-3-3σ可改变细胞周期时限的分布，主要表现为G1/S期和G2/M期阻滞，尤其是后者。如Yang等[1-2, 12]通过转染病毒14-3-3σ重组体提高了鼻咽癌CNE1及CNE2细胞、乳腺癌MDA-MB-361细胞和过表达Akt的Rat1-Akt细胞中G2/M期的百分率，并证实当DNA损伤时过表达的14-3-3σ通过结合Akt蛋白以抑制其活性，而使细胞发生G2/M期阻滞。Aprelikova等[24]发现乳腺癌细胞中BRCA1通过诱导14-3-3σ表达而影响细胞周期G2/M的进程。其他研究表明14-3-3σ在黑色素瘤[25]、结肠癌[4]细胞中发挥G2/M细胞周期检查点的功能。另外，14-3-3σ还参与G1/S阻滞过程。如Laronga等[26]研究发现过表达14-3-3σ可阻止乳腺癌MCF7、HER-18和MDA-MB-361细胞进入S期，抑制细胞增殖。Huang等[27]研究发现EB病毒的即刻早期蛋白Rta介导p21和14-3-3σ活化，抑制CDK1和CDK2入核，使细胞阻滞于G1/S交界处。这些结果提示14-3-3σ是一类重要的细胞周期负调控分子。

3.2 14-3-3σ对癌细胞凋亡的影响

多数研究证实14-3-3σ具有促进细胞凋亡的

作用，如Yang等[1-2, 12]研究发现转染病毒14-3-3σ重组体可使14-3-3σ过表达，后者通过诱导乳腺癌MDA-MB-361细胞、鼻咽癌CNE1及CNE2细胞和过表达Akt的Rat1-Akt细胞凋亡而发挥抑制肿瘤的作用。此外，Lodygin等[4]研究发现14-3-3σ与磷酸化的Bad蛋白结合，使Bad蛋白失去了结合并抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的能力，从而促进细胞凋亡。但也有相反的研究结果，如Qin等[16]发现14-3-3σ抑制胰腺导管腺癌细胞凋亡。

3.3 其他

14-3-3σ也涉及细胞分化和代谢等相关过程，如Medina等[28]发现14-3-3σ是角化细胞分化过程中的重要标志，角化细胞分泌的14-3-3σ可促使真皮层成纤维细胞内基质金属蛋白酶增多，后者可降解细胞外基质，在创伤修复过程中发挥重要作用。Sambandam等[29]在研究反复脱毛的小鼠模型时发现，*14-3-3σ*基因突变导致YAP定位于细胞核内，进而使小鼠角质化细胞增殖而不分化。Phan等[30]研究发现14-3-3σ参与调控肿瘤细胞代谢机制的重塑过程，并抑制细胞发生恶性转化。Phan等[30]发现14-3-3σ通过增强c-Myc的多聚泛素化降解过程，抑制癌细胞糖酵解、谷氨酰胺代谢和线粒体生物合成等重要的肿瘤代谢机制。

4 14-3-3σ与肿瘤细胞增殖和凋亡相关的分子机制

14-3-3σ低表达和活性降低通过干预细胞周期和凋亡等影响肿瘤的发生发展、转移、预后及治疗。低水平和低活性的14-3-3σ与肿瘤细胞的永生性相关，其分子机制尚未完全阐明。迄今14-3-3σ蛋白调控细胞增殖和凋亡等的分子机制涉及较多的分子及其信号转导通路，其中14-3-3σ与p53和MDM2、14-3-3σ与Akt和p27备受关注。

4.1 14-3-3σ与p53和MDM2

14-3-3σ与p53和MDM2之间的正反馈调节环在细胞周期调控中发挥重要作用。14-3-3σ由p53诱导表达并协助其完成细胞周期调控等功能，如Yang等[2]研究发现采用化疗药处理可提高含有野生型p53的肺癌A549细胞14-3-3σ水平，而含有突变型p53的鼻咽癌CNE1和CNE2细胞中的14-3-3σ水平则没有明显的变化。同时14-3-3σ与p53结合可抑制p53与MDM2的相互作用，增强p53的稳定性，促进p53在核内聚集和转录。如Huang等[31]研究发现在小鼠全腹部接受放射处理后，阿米斯丁（Amifostine）通过诱导14-3-3σ表达并促使14-3-3σ与p53相互作用，抑制MDM2介导的p53降解，促进p53在核内聚集与转录，最终减少小肠的损伤而发挥药效。Lee等[32]研究发现14-3-3σ可与p53结合增强其稳定性和转录活性，使乳腺癌细胞发生G2/M期阻滞，同时激活p53依赖性的信号转导通路诱导凋亡。此外Yang等[33]研究发现14-3-3σ可结合MDM2并促进其泛素化降解，进而抑制MDM2介导的p53出核、p53类泛素化降解及RB降解等活动，增强p53、RB蛋白的抑癌作用。

4.2 14-3-3σ与Akt和p27

Yang等[12]研究发现14-3-3σ作为抑癌基因可直接抑制Akt的表达和活性，从而增强p27对细胞周期的负调控作用，尤其是通过增加p27蛋白的稳定性，阻滞p27蛋白出核发生降解而发挥作用。如在转染病毒14-3-3σ重组体处理Akt过表达的Rat1-Akt细胞实验中，可观测到过表达的14-3-3σ通过降低Akt激酶促使p27磷酸化的活性，阻断Akt介导的p27核浆错位，抑制Rat1-Akt细胞增殖[34]。

4.3 其他分子通路

Su等[35-36]研究发现DNA损伤时，14-3-3σ通过结合磷酸化的COP1并促进其在胞质中的积累，增强COP1自身泛素化降解的活性，从而抑制COP1介导的p53泛素化降解。此外，邓绮文等[37]通过反向蛋白质阵列检测和比较转染病毒14-3-3σ重组体鼻咽癌CNE1和CNE2细胞前后特定蛋白质表达量的变化，结果发现14-3-3σ对鼻咽癌CNE-2细胞生长抑制的作用机制涉及4条通路，包括Akt通路、MAPK通路、JAK-STAT通路及Rb-E2f通路，至于确切的机制有待深入探讨。

5 小结

作为14-3-3蛋白家族的重要成员，14-3-3σ具有广泛的生物学功能，尤其与肿瘤细胞增殖、凋亡及分化等功能密切相关。14-3-3σ在肿瘤中多呈低表达状态或活性降低，主要与基因启动子高甲基化和泛素化降解增强引起的蛋白量减少、自身活性调控因子异常引起的活性改变相关。14-3-3σ

可通过多条信号通路抑制肿瘤细胞的增殖和促进凋亡等,从而抑制肿瘤的发生发展和侵袭转移。作为抑癌蛋白的14-3-3σ可单独发挥抑癌作用,且可提高放化疗疗效。然而,由于14-3-3σ的生物学功能广泛及其调控因子众多,涉及调控机制复杂,在某些肿瘤呈现相反的结果,因此深入探讨14-3-3σ在不同肿瘤组织和细胞内的不同定位及其通过调控肿瘤细胞生物学特性而影响肿瘤临床特征的相关分子机制,可望为肿瘤防治提供新的药物靶点和肿瘤标志物。

参考文献

[1] Yang H, Wen YY, Zhao R, et al. DNA damage-induced protein 14-3-3 sigma inhibits protein kinase B/Akt activation and suppresses Akt-activated cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(6):3096-3105.

[2] Yang H, Zhao R, Lee MH. 14-3-3sigma, a p53 regulator, suppresses tumor growth of nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(2):253-260.

[3] 夏洪平,杨惠玲,夏云飞, 等. 14-3-3σ负调控Akt抑制Rat1-Akt细胞成瘤性[J]. 中国病理生理杂志, 2006(12):2368-2371.

[4] Lodygin D, Hermeking H. The role of epigenetic inactivation of 14-3-3sigma in human cancer[J]. Cell Res, 2005, 15(4):237-246.

[5] Winter M, Lodygin D, Verdoodt B, et al. Deletion of 14-3-3sigma sensitizes mice to DMBA/TPA-induced papillomatosis[J]. Oncotarget, 2016, 7(30):46862-46870.

[6] Shao Z, Cai Y, Xu L, et al. Loss of the 14-3-3sigma is essential for LASP1-mediated colorectal cancer progression via activating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6:25631.

[7] Raychaudhuri K, Chaudhary N, Gurjar M, et al. 14-3-3sigma gene loss leads to activation of the epithelial to mesenchymal transition due to the stabilization of c-Jun protein[J]. J Biol Chem, 2016, 291(31):16068-16081.

[8] Suarez-Bonnet A, Herraez P, Aguirre M, et al. Expression of cell cycle regulators, 14-3-3sigma and p53 proteins, and vimentin in canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. Urol Oncol, 2015, 33(7):331-332.

[9] 王瑾, 郑芹, 杨惠玲. 乳腺癌细胞肿瘤标记物表达及其与临床病理特征相关性研究[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2011, 1(1):74-80.

[10] Wu YJ, Jan YJ, Ko BS, et al. Involvement of 14-3-3 proteins in regulating tumor progression of hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2015,7(2):1022-1036.

[11] Zhang Y, Li Y, Lin C, et al. Aberrant up regulation of 14-3-3sigma and EZH2 expression serves as an inferior prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9(9):e107251.

[12] Yang H, Zhang Y, Zhao R, et al. Negative cell cycle regulator 14-3-3sigma stabilizes p27 Kip1 by inhibiting the activity of PKB/Akt[J]. Oncogene, 2006,25(33):4585-4594.

[13] Peng C, Jia X, Xiong Y, et al. The 14-3-3sigma/GSK3beta/beta-catenin/ZEB1 regulatory loop modulates chemo-sensitivity in human tongue cancer[J]. Oncotarget, 2015,6(24):20177-20189.

[14] Zheng G, Peng F, Ding R, et al. Identification of proteins responsible for the multiple drug resistance in 5-fluorouracil-induced breast cancer cell using proteomics analysis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(10):1477-1488.

[15] Li Y, Geng P, Jiang W, et al. Enhancement of radiosensitivity by 5-Aza-CdR through activation of G2/M checkpoint response and apoptosis in osteosarcoma cells[J]. Tumour Biol, 2014, 35(5):4831-4839.

[16] Qin L, Dong Z, Zhang JT. Reversible epigenetic regulation of 14-3-3sigma expression in acquired gemcitabine resistance by uhrf1 and DNA methyltransferase 1 [J]. Mol Pharmacol, 2014, 86(5):561-569.

[17] Lai KK, Chan KT, Choi MY, et al. 14-3-3sigma confers cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma cells via regulating DNA repair molecules [J]. Tumour Biol, 2016, 37(2):2127-2136.

[18] Lodygin D, Diebold J, Hermeking H. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression [J]. Oncogene, 2004, 23(56):9034-9041.

[19] Molin SC, Grgic M, Ruzicka T, et al. Silencing of the cell cycle checkpoint gene 14-3-3sigma in basal cell carcinomas correlates with reduced expression of IKK-alpha[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(8):1113-1116.

[20] Choi HH, Gully C, Su CH, et al. COP9 signalosome subunit 6 stabilizes COP1, which functions as an E3 ubiquitin ligase for 14-3-3sigma[J]. Oncogene, 2011, 30(48):4791-4801.

[21] 陈平. 雌激素反应性指蛋白Efp对Polo样激酶3作用的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.

[22] Li Q, Sambandam SA, Lu HJ, et al. 14-3-3sigma and p63 play opposing roles in epidermal tumorigenesis [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(12):1782-1788.

[23] Zou J, Mi L, Yu XF, et al. Interaction of 14-3-3sigma with KCMF1 suppresses the proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(24):3770-3780.

[24] Aprelikova O, Pace A J, Fang B, et al. BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 sigma gene transcription in mouse embryonic stem cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(28):25647-25650.

[25] Schultz J, Ibrahim SM, Vera J, et al. 14-3-3sigma gene silencing during melanoma progression and its role in cell cycle control and cellular senescence [J]. Mol Cancer, 2009, 8:53.

[26] Laronga C, Yang HY, Neal C, et al. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression [J]. J Biol Chem, 2000, 275(30):23106-23112.

[27] Huang SY, Hsieh MJ, Chen CY, et al. Epstein-Barr virus Rta-mediated transactivation of p21 and 14-3-3sigma arrests cells at the G1/S transition by reducing cyclin E/CDK2 activity [J]. J Gen Virol, 2012, 93(Pt 1):139-149.

[28] Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, et al. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 305(1-2):255-264.

[29] Sambandam SA, Kasetti RB, Xue L, et al. 14-3-3sigma regulates keratinocyte proliferation and differentiation by modulating Yap1 cellular localization [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(6):1621-1628.

[30] Phan L, Chou PC, Velazquez-Torres G, et al. The cell cycle regulator 14-3-3sigma opposes and reverses cancer metabolic reprogramming [J]. Nat Commun, 2015, 6:7530.

[31] Huang EY, Wang FS, Chen YM, et al. Amifostine alleviates radiation-induced lethal small bowel damage via promotion of 14-3-3sigma-mediated nuclear p53 accumulation [J]. Oncotarget, 2014, 5(20):9756-9769.

[32] Lee MH, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins [J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(3):225-234.

[33] Yang HY, Wen YY, Lin YI, et al. Roles for negative cell regulator 14-3-3sigma in control of MDM2 activities [J]. Oncogene, 2007, 26(52):7355-7362.

[34] 杨惠玲,夏洪平,赵睿颖,等. 14-3-3σ 调控 p27 抑制 Rat1-Akt 细胞增殖[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(10):2035-2038.

[35] Su CH, Zhao R, Velazquez-Torres G, et al. Nuclear export regulation of COP1 by 14-3-3sigma in response to DNA damage [J]. Mol Cancer, 2010, 9:243.

[36] Su CH, Zhao R, Zhang F, et al. 14-3-3sigma exerts tumor-suppressor activity mediated by regulation of COP1 stability [J]. Cancer Res, 2011, 71(3):884-894.

[37] 邓绮文, 丁宇, 唐开宇, 等. 14-3-3σ 基因影响人低分化鼻咽癌细胞 CNE-2 的信号通路[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(1):10-14.

(上接第 119 页)

[6] Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assaysimprove the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence oftuberculosis [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(3):322-328.

[7] Barreto LB, Lourenço MC, Rolla VC, et al. Use of amplified Mycobacterium tuberculosis direct test in respiratory samples from HIV-infected patients in Brazil [J]. J Bras Pneumol, 2014, 40(2):148-154.

[8] Sharma K, Ashkin D, Fiorella P, et al. Evaluation of multiplex polymerase chain reaction utilising multiple targets in Mycobacterium tuberculosis direct test negative but culture positive cases: A potential method for enhancing the diagnosis of tuberculosis [J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31(4):370-373.

[9] 黄其俊, 宋大伟, 吴坚敏, 等. 外周血结核 T 细胞检测在肺结核涂阴患者中的临床研究[J]. 检验医学, 2015, 53(28):99-102.

[10] 王宗义, 胡爱荣, 蒋素文. T-SPOT.TB、痰涂片和 TB-DNA 平行检测在结核病中的诊断评价[J]. 中国预防医学杂志, 2014, 15(5): 249-252.

·综 述·

新型环介导等温扩增技术开发与应用研究进展

张亚平* 郑志高 简保磊 朱巍巍

［摘 要］ 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)是一种成熟的、应用广泛的检测技术。目前LAMP技术已经经历了十余年的研究和发展,开发了多种新型环介导等温扩增技术。其技术改进主要体现在提高检测特异性、加快反应速度、简化样本处理、实现多重扩增以及应用于现场检测平台等方面。本文从免疫环介导等温扩增、微流体环介导等温扩增、电化学发光环介导等温扩增、分子信标指示环介导等温扩增、多重实时环介导等温扩增、结合FTA卡的环介导等温扩增等新型技术,以及环介导等温扩增技术在简单化、快速化与产物检测特异化等方面的改进进行了综述,为环介导等温扩增技术的进一步发展和实际应用提供依据。

［关键词］ 环介导等温扩增技术; 免疫环介导等温扩增技术; 电化学发光; 分子信标

Recent progress in technology development and application of loop-mediated isothermal amplification

ZHANG Yaping*, ZHENG Zhigao, JIAN Baolei, ZHU Weiwei
(Taicang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Taicang, Jiangsu, China, 215400)

[ABSTRACT] Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an established technology that continues to attract the attention of researchers in many fields. Research and development efforts on LAMP technology have made much progress, focusing on many different aspects such as improving specificity and reaction speed, simplifying sample processing, realizing multiple amplification, and application on the field platform. In this review, an overview of new LAMP technologies will be provided including immuno-LAMP detection, LAMP methods in microfluidic devices, electrochemiluminescence mediated LAMP, molecular beacon LAMP, multiplex real-time LAMP, FTA-LAMP, and technology improvements in simplification and rapidity and product detection specificity. The aim of this review is to provide the basis for further LAMP technology development and practical applications.

[KEY WORDS] Loop-mediated isothermal amplification; Immuno-LAMP; Electrochemiluminescence; Molecular beacons

传统的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)由于需要3个不同的热循环,还需要对反应产物进行电泳或荧光标记等多种操作,大大限制了其在口岸检测和产地检测等现场平台上的应用。随着技术发展,已经开发了更加方便的等温扩增技术如核酸序列基础扩增(nucleic acid sequence-based amplification,NASBA)、旋转聚合酶扩增(rotational polymerase amplification,RPA)、解旋酶依赖扩增(helicase dependent amplification,HDA)、聚合酶螺旋扩增(polymerase spiral amplification,PSR)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP),其中LAMP技术是最具有代表性的等温(60~65℃)核酸扩增程序。该技术通过使用一种具有链置换活性的DNA聚合

基金项目:小鼠转基因及MHV检测技术研究(2017KJ11)
作者单位:太仓出入境检验检疫局,江苏,太仓 215400
*通讯作者:张亚平, E-mail:337363830@qq.com

酶(*Bst* DNA polymerase)和一套共4条引物进行扩增反应。

环介导等温扩增技术首次报道于2000年,目前已经经历了十余年的研究和发展,广泛用于单核苷酸多态性、病毒和病原体检测[1]。随着越来越多的科学家研究LAMP技术,使得此技术使用范围不再局限于病原微生物的检测和定量,LAMP技术也应用于寄生虫和胚胎鉴定领域。Yeeling等[2]介绍了LAMP技术检测弓形虫。最近,用于检测寄生虫的LAMP试剂已经被商业化。Zoheir等[3]使用LAMP方法用于牛胚胎性别鉴定。同时,研究人员也在寻找一些其他能够与LAMP结合使用的技术,使检测技术更加优化。例如,Wang等[4]开发了环介导等温扩增-横向流动试纸条技术(loop-mediated isothermal amplification - lateral flow dipstick, LAMP-LFD)用于检测转基因大豆,这种新的方法结合了免疫层析和LAMP技术,成功地把LAMP技术应用于转基因食品的检测。另外,根据实际检测需求,研究人员对此技术进行大量改进,主要集中在提高特异性、加快反应速度、简化样本处理、实现多重扩增以及应用于现场检测平台等方面。本综述回顾了近年对LAMP技术本身简单化、快速化和产物检测特异化等方面的改进所进行的研究,同时总结了近期开发应用的新型LAMP检测技术,为环介导等温扩增技术的发展和实际应用提供依据。

1 环介导等温扩增技术的基本原理及优势

LAMP体系的反应温度之所以在60~65℃范围内,一是因为*Bst* DNA聚合酶在此温度下才具有活性,二是因为这是双链DNA发生复性和延伸的中间温度,DNA会呈现一种动态平衡的状态,其中任何一条引物与DNA结合并发生扩增时,另一条链会自动脱落形成单链,在酶的作用下不断发生链置换反应,不断自我循环[5]。LAMP反应被人为地划分成2个扩增阶段:第一阶段为起始阶段,主要为了形成第二阶段循环的起始复合物—"颈环结构";第二阶段是扩增循环阶段,以"颈环结构"作为第二阶段扩增反应的模板,启动新一轮链置换反应,最终获得含有不同数量的颈环结构、不同长度的DNA混合物,且产物是对靶序列的交替反应扩增的重复序列[6]。

LAMP是一种新的检测技术,具有明显的优势。第一,与传统的检测方法相比,LAMP检测的特异性高。4条引物分别用来扩增6个不同靶区域,一旦任何一个引物不能准确匹配,将会导致反应不能发生,也就是说理论上将显著降低非特异扩增的发生[7]。第二,LAMP的灵敏度比传统PCR扩增检测高10~100倍,其检测限达到10个拷贝或者更低。换言之,LAMP技术可以在很早期阶段,或者在临床症状不明阶段,检测到疾病的发生[8]。第三,检测时间比传统PCR扩增检测缩短很多。LAMP具有高度的扩增有效性,其主要归因于无需复杂的变温条件和不同的反应程序。LAMP技术能够在15~60 min内,使DNA扩增10^9~10^{10}倍,故与传统PCR扩增相比检测时间能够缩短1 h左右[9]。最后,LAMP技术最大的优势是操作简单和可视化检测[10]。例如,当运用LAMP技术检测病原微生物时,可以直接通过动物疾病组织的核酸进行扩增检测,而不需要进行单独的细菌培养和复杂的核酸提取步骤。同时,LAMP反应仅需一台恒温设备如水浴锅或恒温箱就能满足对实验的基本需求,其反应设备简单。另外,LAMP反应合成大量核酸分子的过程中,会产生大量的焦磷酸离子,与反应液中Mg^{2+}结合生成不溶于水的焦磷酸镁,经过离心后可以通过肉眼观察是否有白色沉淀生成从而鉴定是否发生核酸扩增,也可以在体系中加入适量颜色指示剂如钙黄绿素、羟基萘酚蓝、SYBR Green I等,通过相应的颜色变化直接呈现出扩增的结果。

2 环介导等温扩增技术改进

2.1 操作简单化与快速化

LAMP技术相较于基础PCR检测技术最具特色的优点是简单、快速。目前,LAMP技术的改进主要集中在进一步增强和发挥这2方面的优势。

LAMP反应简单化目标之一是简化加热方法。因为LAMP技术是一个等温扩增方法,LAMP可以通过一个简单的加热器如加热盒和水浴槽来进行。因此,非电力依赖的加热系统使LAMP能够在任何时间和任何地方进行。LaBarre等[11]最近设计了一个非电力依赖的水浴系统,利用一个变相材料,使用化学产热。Curtis等[12]同样开发了一个相似的化学加热器,并成功用于HIV病毒检测。另外,Hatano等[13]凭借一个可任意使用的口袋取暖器利用LAMP技术成功检测炭疽,并验证他们的系统是一个快速、可靠的检测方法。

Nkouawa 等[14]使用一个保温的热水瓶进行了LAMP分析，并报道此系统能够成功用于检测人类粪便样品中的链状带绦虫。这些都是简化LAMP技术加热步骤的方法。

最近，新英格兰生物实验室开发一个新DNA聚合酶，叫做 *Bst* 2.0 或 *WarmStart Bst* 2.0。Tanner 等[15]评估了这些新的聚合酶在LAMP检测中的应用，发现 *Bst* 2.0 与野生的 *Bst DNA* 聚合酶相比，能够催化更快的LAMP反应速度。这些发现表明，开发新的DNA聚合酶是改进LAMP技术快速化的关键因素。

超速提取（procedure for the ultra-rapid extraction，PURE）方法是一种从新鲜唾液中直接提取结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，TB）细胞的技术[16]。该技术通过使用一种吸附粉末来移除样品中的DNA抑制剂，从而保护样品中的DNA。并且，此技术无需复杂的设备如离心机，可以在发展中国家落后的地区使用。Nakauchi 等[17]研究了一个方便使用的检测流感病毒的提取试剂，把咽喉或鼻拭子在此试剂中搅拌几次，即可提取流感病毒基因组RNA，同时还能消除RNA抑制剂。与其他实验室所进行的前处理方法相比，这一技术无需加热和离心。目前，这一提取试剂仅限于流感病毒的提取。Aydin-Schmidt 等[18]开发了高通量DNA提取系统的环介导等温扩增技术（high throughput DNA extraction system for loop mediated isothermal amplification，HTP-LAMP），用于检测无症状人群疟原虫，通过商品化的和计算机控制的高通量DNA提取系统能够同时提取96个样品，其提取液可直接用于LAMP检测，并在2 h内获得检测结果。与传统PCR检测结果相比，HTP-LAMP检测灵敏度为40.8%（95% *CI*：27.0~55.8），特异性为99.9%（95% *CI*：99.8~100）[18]。超速提取方法能够大大缩短样品中核酸的提取时间，从而提高LAMP的检测速度，适合在大样本检测中使用。

2.2 检测特异化

目前，通过简单的目视检测技术来判断LAMP扩增反应结果已经有很大发展[19-20]。然而，近年来已经开始关注不同的判断方法[21]。在LAMP反应体系中加入荧光标记探针，反应完成后，再加入低分子量的阳离子多聚物乙烯亚胺（polyethylenimine，PEI），产生PEI-DNA-probe复合物沉淀，在紫外灯下通过观察颜色变化即可实现特异性检测[22]。Seetang-Nun 等[23]将纳米金颗粒标记的DNA探针与LAMP相结合，建立了通过肉眼观察鉴定白斑综合征病毒（white spot syndrome virus，WSSV）的LAMP方法，此方法灵敏度可达200个拷贝，还可以用紫外可见光光谱进行定量。Nagatani 等[24]最早将电化学方法应用于实时监测LAMP反应，他们将丝网印刷碳电极浸入离心管中并用亚甲基蓝作为杂交指示剂，扩增产物与亚甲基蓝结合后向电极表面缓慢弥散，引起峰电流的降低，从而进行半实时定量。Satoh 等[25]报告了一个通过电化学活性嵌入剂检测特异DNA序列的方法，这一技术用于临床检测人乳头状瘤病毒（human papillomavirus，HPV），命名为“Clinichip HPV”。Siddique 等[26]开发了一种基于 *groEL* 基因的遗传标记的LAMP检测技术，用于检测受污染海鲜和水体中副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*），其检测限为100 fg/μL，高于PCR检测的100倍。以上这些方法都能显著提高LAMP技术检测的特异性。

3 新型环介导等温扩增技术

对蛋白生物标志物的高灵敏度和特异性检测，在临床疾病诊断和治疗预后中显得非常重要。粘蛋白1（mucin 1 protein），作为一种肿瘤标志物，存在于许多恶性肿瘤中，如结直肠癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌等[27-29]。粘蛋白1在人正常上皮细胞表达非常低，因此对其进行灵敏度和特异性检测在早期肿瘤诊断中就显得非常必要。最近，Joo 等[30]报道了不同的免疫环介导等温扩增（immuno-LAMP）平台用于检测蛋白质。免疫环介导等温扩增技术包含2个主要步骤，信号扩增和超敏检测。为了提高蛋白检测的特异性和灵敏度，使用亲和配体用于靶蛋白分子的识别[31-32]。配体为系列合成的DNA或RNA分子，具有高特异性和高亲和性。Cao 等[33]通过高亲和粘蛋白1配体，开发出一种配体介导的免疫环介导等温扩增技术，用于定量检测人血清样品中粘蛋白1。其重要步骤为，生物素标记的粘蛋白1固定在链霉亲和素磁珠上，与粘蛋白1配体孵育；游离的粘蛋白1配体通过磁珠分离，蛋白结合的配体结构通过加热后解离；最后，解离的配体作为F3引物，通过real-time immuno-LAMP技术进行定量。因此，immuno-LAMP核酸扩增信号等同于F3引物的量，并

且间接反映粘蛋白1的量。此种方法检测限可达120个分子。

由于食物来源病原体微生物能够引起严重的疾病，并可能导致巨大的经济损失，因此通过分子检测技术检测食物来源病原体来预防严重损失是非常必要的[34-35]。Seo等[36]研究开发了一种高通量、微型离心装置、基于比色法的食品来源病原体的检测方法。开发的离心微型装置包括一个样品容器，一个螺旋形样品注射微通道，24个腔室（每个2.5 μL），交叉毛细管阀门和24个反应室。装载样品后行850 r/min离心，使得样品溶液分布到24个等体积的腔室内。然后，腔室内的样品可以被注射到反应室内，5 000 r/min离心，离心装置放置于66℃温箱中进行靶基因的扩增。对于基因扩增方法，使用LAMP技术对3种食物来源病原体（大肠杆菌O157：H7，鼠伤寒沙门氏菌和副溶血性弧菌）进行检测。通过铬黑T（eriochrome black T，EBT）介导的颜色变化（从紫色到天蓝色）来确定病原体的存在，通过绿/红（G/R）和蓝/红（B/R）比值来区分阳性结果和阴性结果，整个分析过程在1 h内完成。DNA的检测限为500个拷贝，细菌的检测限为100个细菌数。因此，这种设计简单和制造容易的微型装置通过自动控制2次不同转速的离心，在60 min内进行基因等温扩增，并且通过肉眼进行比色法判断结果的方法，为食品工业提供了一种理想的病原体检测方法。

电化学发光（electrochemiluminescence，ECL）是一种敏感性检测方式，其在电极表面产生高能状态并且促进电子转移，这种电子转移现象能够通过激发光而作为一种强度信号被检测[37]。$[Ru(bpy)^3]Cl_2$是一种常用的ECL发光体。各种ECL生物传感器需要核酸表面固化。最近，有研究报道了一种无需固化的ECL技术，通过设计2个辅助探针进行micro-RNA检测[38]。Roy等[39]研究了LAMP联合ECL技术对DNA检测和定量分析，经由LAMP反应扩增的目的DNA，通过静电作用与碳电极表面的$[Ru(bpy)^3]^{+2}$结合，再通过三丙胺（TPrA）触发ECL反应从而发出荧光。他们把这种新技术用于检测不同物种肉中特异序列的DNA水平。例如，从野猪肉中检测到1 pg/μL（3.43×10^{-1} copies/μL）的靶DNA。对枯草杆菌（*Bacillus subtilis*）DNA样品的检测限为10 pg/μL（2.2×10^3 copies/μL）。因此，这种方法的优势是快速检测、最低限度的仪器使用以及更少的试剂使用。把具有高敏感性和特异性的ECL技术与LAMP快速扩增技术结合起来成为一种有效的定量核酸检测技术，这种技术满足现代核酸检测中快速、敏感性、特异性、易于操作以及设备微型化的要求。

目前LAMP技术主要的缺点是结果评估的间接性，其扩增产物通过电泳、SYBR Green I染色、沉淀、羟基萘酚蓝染色、浊度法、钙黄绿素/Mn^{2+}染色以及探针法等方法进行确认。这些都不能很好区分阳性产物和非特异性扩增产物，从而导致假阳性。分子信标（molecular beacons）具有只与目的DNA片段结合后才产生荧光信号的特点，因此作为一种直接的扩增产物指示剂，能够避免假阳性的问题。Liu等[40]研究了一种新型的分子信标指示的环介导等温扩增方法（molecular beacon loop-mediated isothermal amplification method，MB-LAMP），明确了LAMP技术中分子信标作为评估工具的最优条件：长度为25~45 bp，浓度为0.6~1 pmol/μL，反应温度为60~65℃，并且MB-LAMP检测灵敏度能够达到1×10^{-6} ng/μL。使用分子信标指示的LAMP技术有效降低了检测结果假阳性率。

在食品工业中，快速检测食品来源病原体对阻止污染食物中病原体扩散具有重要意义。Liu等[41]开发了一种多重实时环介导等温扩增方法（multiplex real-time loop-mediated isothermal amplification，ml-LAMP），在一个反应体系中同时检测沙门氏菌（*Salmonella*）和副溶血弧菌DNA。在65℃扩增60 min后，通过不同的熔解温度（Tm）来区分扩增产物。使用19种已知的菌株验证多重LAMP技术特异性，发现此方法能够100%地区分不同菌株，其检测限与多重PCR相似。因此，多重LAMP技术在食品工业检测中具有明显的优势，能够同时检测多种病原菌，节约了大量时间和成本。

现场血液样本的采集、运输、保存等常受到一些条件的限制，尤其是当采集样本数较多时，因此亟需探索易于运输、保存、又利于病原体核酸提取的样本采集方法或措施。FTA卡（flinders technology associates，FTA）是由特制的滤纸经强力变性剂、螯合剂浸泡而成，细胞与FTA卡接触后被裂解，其核酸与纤维基质结合，维持样品中核酸的完整性，保护核酸免于降解，从而起到保存作用。

Peng 等[42]开发了一种联合 FTA 技术的 LAMP 检测方法，用于植物来源的北方根节线虫（*Meloidogyne hapla*）检测，其检测限是普通 PCR 检测的 100 倍。Wu 等[43]同样运用结合 FTA 技术的 LAMP 检测方法检测了田鼠巴贝虫（*Babesia microti*）感染情况，其检出限为 0.687 fg/μL，而传统的 PCR 最低检测限为 0.687 pg/μL，且 20 份样品的阳性符合率为 100%，说明此方法特异性强、灵敏度高、简便、快速，适用于现场检测。近年新型环介导等温扩增技术总结见表 1。

表 1 近年新型环介导等温扩增技术

Table 1 Summary of new loop-mediated isothermal amplification technology in recent years

新型环介导等温扩增技术	技术优势	应用	参考文献
免疫环介导等温扩增技术	高灵敏度和特异性蛋白检测	临床疾病诊断和治疗预后	Cao，et al[29]
微流体环介导等温扩增技术	高通量、检测装置微型化	食物来源病原体微生物检测	Seo，et al[36]
电化学发光环介导等温扩增技术	高灵敏度和特异性	核酸定量检测	Roy，et al[39]
分子信标指示的环介导等温扩增技术	扩增产物直接检出	降低假阳性率	Liu，et al[40]
多重环介导等温扩增技术	多种病原菌同时检测	食品工业检测	Liu，et al[41]
结合 FTA 的环介导等温扩增技术	有效解决大样本采集、运输和保存	适用于现场检测	Peng，et al[42] Wu，et al[43]

4 展望

LAMP 技术是一种创新性基因扩增方法，用来取代热循环中的高端设备，其链置换反应在等温条件即可完成。由于其诸多优势已被广泛用于核酸检测的各个领域，因此 LAMP 技术逐步发展成为成熟、可靠的分子生物学诊断分析技术。另外，LAMP 技术在蛋白生物标志物检测、食物来源病原体微生物检测和转基因产品检测方面的发展，使其作为一个简单、快速的检测方法在许多国家，特别是发展中国家广泛应用。然而，LAMP 技术也有一些不容忽视缺点，比如反应过程易受污染、检测特异性不高，容易出现假阳性，因此 LAMP 技术的优化道路还很漫长。在未来的技术开发中，需要进一步的研究来降低假阳性率，提高检测的准确性和可重复性，使得以 LAMP 技术为基础的核酸检测具有更广的应用前景。

参考文献

[1] Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development [J]. J Infect Chemother, 2013, 19(3):404-411.

[2] Yeeling L, Meganathan P, Sonaimuthu P, et al. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients [J]. JClinMicrobiol, 2010, 48(10):3698-3702.

[3] Zoheir KMA, Allam AA. A rapid method for sexing the bovine embryo [J]. Animal Reproduction Sci, 2010, 119(1-2):92-96.

[4] Wang X, Teng D, Guan Q, et al. Detection of roundup ready soybean by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick [J]. Food control, 2013, 29(1):213-220.

[5] Liu A, Guan G, Du P, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese Babesia bovis and B. Bigemina [J]. ParasitolInt, 2012, 61(4):658-663.

[6] Li Y, Fan P, Zhou S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107(3):54-61.

[7] Sheet OH, Grabowski NT, Klein G, et al. Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Staphylococcus aureus, in bovine mastitis milk samples [J]. MolCellProbes, 2016, 30(5):320-325.

[8] Nzelu CO, Caceres AG, Guerrero-Quincho S, et al. A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isother-

mal amplification (LAMP) combined with and FIA card as a direct sampling tool[J]. Acta Trop, 2016, 153:116-119.

[9] Zhao X, Li Y, Wang L, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection Escherichia coli O157 strains from food samples[J]. MolBiolRep, 2010, 37(5):2183-2188.

[10] Zhao X, Wang L, Chu J, et al. Rapid detection of Vibrio parahaemolyticus, strains and virulent factors by loop-mediated isothermal amplification assays[J]. Food SciBiotechnol, 2010, 19(5):1191-1197.

[11] LaBarre P, Hawkins KR, Gerlach J, et al. A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity: toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings[J]. Plos One, 2011, 6(5):e19738.

[12] Curtis KA, Rudolph DL, Nejad I, et al. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1[J]. Plos One, 2012, 7(2):e31432.

[13] Hatano B, Maki T, Obara T, et al. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for antibioterrorism[J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(1):36-40.

[14] Nkouawa A, Sako Y, Li T, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of Taenia tapeworms from human: application to a field survey[J]. Parasitol Int, 2012, 61(4):723-725.

[15] Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification[J]. Biotechniques, 2012, 53(2):81-89.

[16] Mitarai S, Okumura M, Toyota E, et al. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(9):1211-1217.

[17] Nakauchi M, Yoshkawa T, Nakai H, et al. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus[J]. J Med Virol, 2011, 83(1):10-15.

[18] Aydin-Schmidt B, Morris U, Ding XC, et al. Field evaluation of a high throughput loop mediated isothermal amplification test for the detection of asymptomatic plasmodium infections in Zanzibar[J]. Plos One, 2017, 1(12):1-14.

[19] Martineau RL, Murray SA, Ci S, et al. Improved performance of loop-mediated isothermal amplification assay via swarm priming[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(1):625-632.

[20] Zhou H, Zhao M, Li X, et al. Clinical evaluation of the isothermal amplification assays for the detection of four common respiratory viruses in children with pneumonia[J]. Arch Virol, 2017, 162(5):1311-1318.

[21] Pillai DR, Labarre P, Burton R, et al. Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia[J]. Malaria Journal, 2015, 14(1):44.

[22] Reddy G, Rao PV, Sharma S, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by NS1 specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay in patients presenting to a tertiary care hospital in Hyderabad, India[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 211(4):22-31.

[23] Seetang-Nun Y, Jaroenram W, Sriurairatana S, et al. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification[J]. Mol Cell Probes, 2013, 27(2):71-79.

[24] Nagatani N, Yamanaka K, Saito M, et al. Semi-real time electrochemical monitoring for influenza virus RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification using a USB powered portable potentiostat[J]. Analyst, 2011, 136(24):5143-5150.

[25] Satoh T, Matsumoto K, Fujii T, et al. Rapid genotyping of carcinogenic human papillomavirus by loop-mediated isothermal amplification using a new automated DNA test (Clinichip HPV™)[J]. J Virol Methods, 2012, 188(1-2):83-89.

[26] Siddique MP, Jang WJ, Lee JM, et al. groEL is a suitable genetic marker for detecting Vibrio parahaemolyticus by loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Lett Appl Microbiol, 2017, 2(65):106-113.

[27] Raina D, Kosugi M, Ahmad R, et al. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells[J]. MolCancer Ther, 2011, 10(5):806-816.

[28] Cao H, Fang X, Liu P, et al. Magnetic-immuno-loop-mediated isothermal amplification based on DNA encapsulating liposome for the ultrasensitive detection of P-glycoprotein[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):9312.

[29] Cao H, Fang X, Li H, et al. Ultrasensitive detection of mucin 1 biomarker by immune-loop-mediated isothermal amplification[J]. Talanta, 2017, 164: 588-592.

[30] Pourhassan-Moghaddam M, Rahmati-Yamchi M, Akbarzadeh A, et al. Protein detection through different platforms of immune-loop-mediated isothermal amplification[J]. Nanoscale ResLett, 2013, 8(1):485.

[31] Bernard ED, Nguyen KC, Derosa MC, et al. Development of a bead-based aptamer/antibody detection system for C-reactive protein[J]. AnalBiochem, 2015, 472:67-74.

[32] Li Q, Wang Y, Shen G, et al. Split aptamer mediated endonuclease amplification for small-molecule detection[J]. ChemCommun, 2015, 51(20):4196-4199.

[33] Cao H, Ye D, Zhao Q, et al. A novel aptasensor based on MUC-1 conjugated CNSs for ultrasensitive detection of tumor cells[J]. Analyst, 2014, 139(19): 4917-4923.

[34] Liu CY, Song HQ, Zhang RL, et al. Specific detection of Angiostrongylus cantonesis in the snail Achatina fulica using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay[J]. Mol Cell Probes, 2011, 25(4):164-167.

[35] Safavieh M, Ahmed MU, Tolba M, et al. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of Escherichia coli[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 31(1):523-528.

[36] Seo JH, Park BH, Oh SJ, et al. Development of a high-throughput centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for multiplex foodborn pathogenic bacteria detection[J]. Sensor and Actuators B, 2017, 246:146-153.

[37] Su M, Wei W, Liu SQ. Analytical applications of the electrochemiluminescence of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) coupled to capillary/microchip electrophoresis: A review[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 704(1-2):16-32.

[38] Liu T, Chen X, Hong CY, et al. Label-free and ultrasensitive electrochemiluminescence detection of microRNA based on long-range self-assembled DNA nanostructures[J]. Microhimica Acta, 2014, 181(7): 731-736.

[39] Roy S, Rahman IA, Ahmed MU. Paper-based rapid detection of pork and chicken using LAMP-magnetic bead aggregates[J]. Analytical Methods, 2016, 8(11):2391-2399.

[40] Liu W, Huang S, Liu N, et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Sci Rep, 2017, 7:40125.

[41] Liu N, Zou D, Dong D, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of Salmonella spp. and Vibrio parahaemolyticus[J]. Sci Rep, 2017,7:45601.

[42] Peng H, Long H, Huang W, et al. Rapid, simple and direct detection of Meloidogyne hapla from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology[J]. Sci Rep, 2017, 7:44853.

[43] Wu F, Cai Y, Qin Z, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay combined with FTA card for detecting Babesia microti[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(5):435-441.

(上接第131页)

[41] Lee JW, Lee EJ. Regulation and function of the Salmonella MgtC virulence protein[J]. J Microbiol, 2015, 53(10):667-672.

[42] Gonzalo-Asensio J, Ortega AD, Rico-Perez G, et al. A novel antisense RNA from the Salmonella virulence plasmid pSLT expressed by non-growing bacteria inside eukaryotic cells[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77939.

[43] Gong H, Vu GP, Bai Y, et al. A Salmonella small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(9): e1002120.

[44] Caswell CC, Gaines JM, Roop RN. The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in Brucella abortus 2308[J]. J Bacteriol, 2012, 194(1):3-14.

JOURNAL OF
MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 10 Number 2 March 2018

CONTENTS

中山大学附属肿瘤医院检验科

中山大学附属肿瘤医院检验科位于广州市东风东路651号，创立于1964年，50多年来经过几代人努力，如今已发展成为一个拥有近1 500张病床、2 000多名职工、面积近18万平方米、拥有超过5亿元医疗设备的国内一流肿瘤专科医院。

科室是一个集医、教、研于一体的临床实验室，现有职工38人，其中博士后1人，博士4人，硕士12人，主任技师2人，副主任技师6人，主管技师17人，博士生导师1人，硕士生导师1人，行政办事员1人。

科室设有临床检验、生化检验、免疫检验、微生物检验（兼管分子生物学检验、流式细胞学检验）共4个专业组，开展300多项检查项目。实验用房约900平方米。科室拥有一批先进的检验仪器，主要有：日立008/7600/7080全自动生化分析仪、德国西门子特种蛋白仪、罗氏全自动生化免疫分析仪Cobas 8000/Cobas601/Cobas 702、雅培I2000发光分析仪、法国梅里埃BACTEC alert 3D血培养仪、美国BD公司FACSCantoII流式细胞仪、美国DIGENE公司DNA杂交捕获仪、日本京都公司AX-4280全自动尿液分析仪、美国IRIS公司IQ200尿沉渣分析仪、日本sysmexCS-5100纤溶/凝血分析仪、日本sysmex XN 2000/XN 9000血细胞分析仪、法国Sebia全自动电泳分析仪、罗氏RSA Pro EC样本前处理、瑞士EVOlyzer150/8和FAME全自动酶免分析仪等设备。

检验科全面执行ISO15189质量体系管理，全面开展了各检测项目的室内质控工作和实验室间比对，并积极参加广东省、卫生部的室间质评、卫生部的正确度验证、国际实验室比对；参加的项目有常规生化、酶类、血脂、电解质、特种蛋白、临床免疫、肿瘤标志物、内分泌、传染性标志物、血细胞计数、凝血试验、尿液化学分析、临床微生物学、淋巴细胞亚群等，98%以上的项目室间质评成绩达到100%。

检验科科研小组主要研究方向是肿瘤早期筛查标志物的筛选，肿瘤标志物检测新方法建立和检测试剂盒研制，肿瘤标志物在肿瘤筛查和预后判断中临床价值评价。鼻咽癌筛查和早期诊断水平居国内之首，率先开展血清低分子量蛋白组技术用于肿瘤靶向药和化疗药疗效预测，全面开展淋巴瘤和白血病免疫分型和微小残留量检测，开发和建立量子点流式细胞检测技术和血清外泌体快速检测技术，通过新技术的应用提高科室肿瘤诊疗水平。科室主持国家自然科学基金4项，参加973和国家重点研发计划2项，近3年发表SCI论文26篇，国家发明专利1项，编写论著一部。

学科带头人刘万里、戴淑琴和张静萍带领科室研究小组，致力于肿瘤早期筛查和诊断，肿瘤治疗监测和预后判断标志物的研究。

分享成长价值

To share is to enjoy

达安基因
DAAN GENE

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