



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

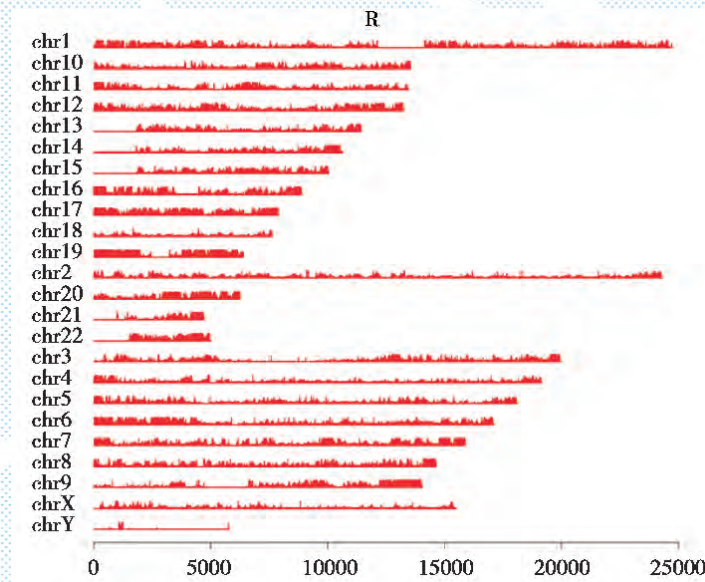
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2015年7月 第7卷 第4期 总第38期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 7 Number 4 July 2015



图(P225) CNE-2R与CNE-2细胞MeDIP-Seq测序reads在全基因组染色体上分布位置的差异
 Figure (P225) The different distribution of MeDIP-Seq reads on each chromosome between CNE-2R and CNE-2

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



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

分子诊断与治疗杂志

二〇一五年七月

第七卷 第四期

中山大学

王 哲



王哲，1970年1月出生。1993年毕业于第四军医大学。医学博士学位。美国明尼苏达大学博士后。曾赴美国佛蒙特大学、美国佛罗里达奥兰多佛罗里达医院、美国佛罗里达奥兰多地区医院、香港伊利沙伯医院进修外科病理诊断。

教授，博士生导师。现任第四军医大学病理学与病理生理学教研室暨西京医院病理科主任。并担任中华医学会病理学分会青年委员会副主任委员、中华医学会病理学分会淋巴造血病理学组委员、中华医学会病理学分会泌尿生殖病理学组委员、中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会常委、中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会病理组委员、陕西省抗癌协会淋巴瘤专业委员会副主任委员、陕西省抗癌协会

肿瘤标志物专业委员会副主任委员、中央军委保健委员会会诊专家、美国加拿大病理学会会员、国际泌尿病理学会会员、肿瘤生物学国家重点实验室生物信息学单元负责人、《诊断病理学杂志》编委、“Apoptosis” “Cancer Biomarker” “APMIS” “Breast Cancer Research Treatment” “Histopathology”等9种国际杂志审稿人等学术职务。

王哲主要从事外科病理诊断以及临床病理研究，擅长淋巴造血系统、软组织和男性泌尿生殖系统病理诊断。在病理诊断工作中发现、命名并报道了新的软组织肿瘤类型 Inflammatory Monomorphic Undifferentiated Sarcoma；在国际杂志中报道了多种罕见的肿瘤和病例，包括异位室管膜瘤、移植后卵巢浆液性囊腺瘤、伴有明显鳞化的胰腺粘液性囊腺瘤、发生于胃的钙化性纤维假瘤、先天性淋巴管瘤伴有巨指畸形等；在研究中发现药物诱导白血病凋亡途径中溶酶体蛋白酶 Cathepsin D 的转位是连接溶酶体与线粒体凋亡途径之间的重要分子；发现乳腺癌的新辅助化疗可以影响肿瘤 Her-2 免疫组化状态的改变，但不影响其基因扩增的变化；还发现了核糖体蛋白激酶 RSK4 是肾细胞癌独立的预后预测因子。以第一申请人获得国家自然科学基金项目5项。获军队“育才奖”银奖。共发表由SCI收录的论文40余篇，其中以第一作者及通讯作者在“Gastroenterology” “Int J Cancer” “Mol Cancer Ther” “Apoptosis” “Am J Med Genet”等杂志发表论文18篇（均由SCI收录）。主编专著《生物信息学概论》，主译《外科病理取材图解指南》，参编教材2部。培养硕士研究生4名，博士研究生4名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2015年7月 第7卷 第4期 总第38期 Bimonthly Volume 7 Number 4 July 2015

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司

总编辑 黄绮生
执行主编 李明
编辑部主任 徐伟文
编辑部执行主任 邓子华
编辑 李晓兰 谭舜菁
排版 钟华安
编辑出版 《中国家庭医生》杂志社有限公司

地址 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话 (020) 32290177 32290789-206
传真 (020) 32290177
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发行
广告经营许可证 粤工商广字第01139号
印刷 广州中大印刷有限公司
出版日期 2015年7月18日
定价 RMB 15.00元

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

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

Add 10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020)32290177 32290789-206
Fax (020)32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.
Publish Date 2015.7.18
Price RMB 15.00

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2015年7月 第7卷 第4期

目次

述 评

疾病诊断新标志物挖掘转化中产业化链思考 徐伟文 (217)

论 著

鼻咽癌细胞 MeDIP-Seq 测序 reads 在染色体上分布差异的研究
..... 林伟达 王冬辉 罗海丹 等 (222)

响应面优化黄皮叶中的活性因子超声提取工艺及其抗氧化活性研究
..... 苏志鹏 孔繁晟 方宇洪 等 (227)

2004年~2013年肺癌患病风险基因相关临床研究文献的计量学分析
..... 邹建军 苏珊 张贤兰 等 (236)

人乳头瘤病毒 52 型 E2 和 E6/E7 在宫颈病变中的表达及其意义
..... 李岳军 周妙姬 邱峰 (241)

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

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

代谢综合征与肿瘤相关性流行病学调查 赵思文 吴君洁 冯焯 等 (257)

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

综 述

核酸适配子及其在阿尔茨海默病研究中的应用 寇哲文 王家鹏 张兴梅 (266)

miR-451 与肿瘤的相关性 李莎 白育庭 (271)

人类白细胞抗原 B27 的实验室诊断 杨霄鹏 惠玲 (276)

分子生物学检测在 α -地中海贫血中的应用 郭柳薇 (281)

讲 座

《体外诊断试剂注册管理办法》解读 杨勇 雷孝锋 李尔华 等 (286)

专家风采

王哲 (封二)

实验室巡礼

肿瘤生物学国家重点实验室病理单元暨第四军医大学病理学与病理生理学教研室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 4 July 2015

CONTENTS

COMMENTS

How to build networks on the way of translational medicine about new biomarkers for diagnosis

XU Weiwēn (217)

ORIGINAL ARTICLES

Research on different distributions of MeDIP-Seq reads in chromosomes of nasopharyngeal carcinoma cells

LIN Weida, WANG Donghui, LUO Haidan, SU Bojin, ZHAO Cunyou, YANG Huiling (222)

Optimization of extraction technology from *Clausena lansium* leaves by response surface and their antioxidant activity study

SU Zhipeng, KONG Fansheng, FANG Yuhong, YANG Miaoting, LIU Xin, CHEN Zedan (227)

Bibliometrics analysis of clinical research literature on lung cancer predisposing genes from 2004 to 2013

ZOU Jianjun, SU Shan, ZHANG Xianlan, HAUNG Huiyi, CEN Wenchang (236)

Expression of E2 and E6/E7 of human papillomavirus-52 and its significance in cervical lesions

LI Yuejun, ZHOU Miaoji, QIU Feng (241)

Study on the homology of *Acinetobacter baumannii* by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction

WEN Haifeng, QIN Jin, YU Wenjing, FENG Yanrui, FENG Zhongjun (247)

Analysis on influenza surveillance in sentinel hospitals in Chaozhou from 2009 to 2014

SU Xueluan, XIE Bizhu, CHEN Aimiao, ZENG Shuquan, LIU Jie, LIN Songyan, YANG Huitian, LIN Min (253)

Epidemiological study of relationship between metabolic syndrome and cancers

ZHAO Siwen, WU Junjie, FENG Chuo, ZHANG Xiaoming (257)

The analysis of serum carcinoembryonic in neuroendocrine differentiation of lung adenocarcinoma

HUANG Yujun, YUAN Runqiang, CHEN Yingzhi, YUAN Xiaoling, MIAO Zhuofeng, ZHUANG Chuxuan (261)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 4 July 2015

CONTENTS

REVIEWS

Nucleic acid aptamers and its applications in diagnosis and therapy of Alzheimer's diseases

KOU Zhewen, WANG Jiapeng, ZHANG Xingmei (266)

The relation between miR-451 and tumor

LI Sha, BAI Yuting (271)

Laboratory diagnosis of human leukocyte antigen B27

YANG Xiaopeng, HUI Lin (276)

Molecular biological detection of alpha-thalassemia

GUO Liuwei (281)

疾病诊断新标志物挖掘转化中产业化链思考

徐伟文*

[摘要] 利用生物标志物精准的检测开展“早期发现、早期诊断及有效个体化治疗”是重大疾病防控的关键和重要途径之一。基因组学、蛋白质组学等经过一二十年的发展,已经发现了数百个潜在的疾病标志物,但目前可用于临床的标志物尚屈指可数。标志物挖掘转化中的大漏斗现象凸显存在,已成为转化医学平台中的瓶颈,也是生物产业领域期待突破的关口。本文从标志物研究转化现状、产业化技术平台、转化模式、体外诊断试剂注册法规等方面对疾病诊断用新标志物挖掘转化中的产业化链建设进行了思考。

[关键词] 疾病标志物; 转化; 产业链

How to build networks on the way of translational medicine about new biomarkers for diagnosis

XU Weiwen*

(Biological Technology Institute, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Accurate detection with biomarkers special for diseases' early stage or individual therapy is one of the key ways to prevent and control the major and critical diseases. Hundreds of potential biomarkers have been discovered by genomics and proteomics during the past twenty years. Regretfully, only few have been validated and translated forward to clinical use. The great gap is observably existed between academia and industry, and become the bottleneck on the way of successful translation. In this issue, the status and effective network models of new diagnostic biomarkers on the way of translational research are discussed constructively.

[KEY WORDS] Biomarker; Translational medicine; Network

2014年2月3日世界卫生组织下属的国际癌症研究机构在位于法国里昂的总部发表了《2014年世界癌症报告》。该报告显示,全球癌症负担目前正在以惊人的速度不断加重:2012年,全球新增癌症病例达到1400多万例,并预计在未来20年达到每年2200万的水平,逐年递增至2025年的1900万人,到2035年将达到2400万人;同期癌症死亡人数也将从每年820万飙升至1300万,平均每8个死亡病例中就有1人死于癌症^[1]。新增癌症病例有近一半出现在亚洲,其中大部分在中国,中国新增癌症病例高居第一位。在肝、食道、胃和肺等4种恶性肿瘤中,中国新增病例和死亡人数均居世界首位。如何有效遏制癌症危机的蔓延,一如其他心血

管、代谢等重大慢性疾病,已成为重大健康战略目标^[2]。其中,疾病标志物的挖掘应用,被认为是一个富有潜能的领域,在疾病的早期发现、个体化诊疗、疗效评估和监测等方面发挥越来越重要的作用^[3-4]。但标志物挖掘转化中的大漏斗现象显突地存在,已成为转化医学平台中的瓶颈,也是生物产业领域期待突破的关口^[5-7]。如何快速地将这些潜在标志物在临床得以验证和应用,获得自主知识产权的新产品,是转化医学和国家科技部863计划积极推进的重大课题,也是各大联盟体在积极开展的工作,这同样也是一个战机和商机的问题^[8]。结合我们承担开展的相关863课题工作,我们对疾病诊断用新标志物挖掘转化中的产业化链建设进行了思考和实

基金项目:十二五国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA020205);广东省重大科技专项(2012A080203012)

作者单位:南方医科大学生物技术学院,广东,广州 510515

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

践,在此与大家探讨分享。

1 疾病标志物研究转化现状

人类约有 100~150 种重要疾病,每种疾病有 10 个左右相关基因,每个基因相关的蛋白质有 3~10 个,据此估计,人类蛋白质将有约 3 000~15 000 个靶标。目前已知的靶标仅约为 300~500 个,尚有大量的潜在靶标有待发掘。在目前人类已发现近 500 种药靶中,75%是受体、酶等蛋白质,已应用于临床的多种药品中有 85%针对这 483 种药靶作用。人类基因组、蛋白质组等计划实施后,国际上开始充分利用组学技术从庞大的基因组数据中发现药物靶标/诊断靶标,加速药物的创新和诊断前移。据估计人类基因组中可能含有 5 000~10 000 个新靶标,是现今已知靶标数目的 10~20 倍。新的诊断靶标的发掘与验证,并进一步转化为临床应用,是发展趋势与热点。大量信息表明:近 20 年来,随着基因组学、蛋白质组学等的蓬勃开展,生物标志物用于肿瘤等重大疾病的管理已被日益期待和关注。美国国家标准与技术研究院早在 1999 年就提出了“癌症生物标志物验证:标准和程序”。美国健康与人类服务部 2006 年发布了“肿瘤学生物标记认证计划”,与美国食品和药物管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA)、隶属于美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 的国家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 以及医疗保险与医疗补助服务中心共同发起。NIH 也设立了标志物验证项目“Development and Validation of Disease Biomarkers”,参与机构主要有:NCI,美国国家糖尿病、消化系统病和肾病研究所,美国国家酒精滥用与酒精中毒研究所,美国国立护理医学研究所,膳食补充剂办公室等。而 NCI 本身也设立了许多标志物验证计划,其中“疾病早期检测研究网络”是全球最大规模的标志物验证计划,包括了美国许多肿瘤研究所、大学、医院和药厂。德国 2009 年发布“BioTag”三年计划进行标志物验证,加拿大发布了 Canadian Cancer and Biomarker Cohort (I-HELP-PREVENT-CANCER Project)。FDA 在 2010 年批准了一种卵巢肿瘤的分流方法 OVA1™,成为蛋白标记物从实验室走向临床的新里程碑^[9-10]。而随着个体化医疗认识的逐步深入,针对药品和搭配诊断产品合并研发与合并审批的监管蓝图已成为 FDA 个

体化医学策略的一个核心组成部分,这也成为新标志物和/或标志物新用途挖掘转化的新突破口^[11]。2013 年有许多药物配合着相应的诊断先后被 FDA 批准。比如 2013 年 5 月 FDA 批准了可以与 Genentech 公司生产的非小细胞肺癌的药物 Tarceva 配合使用的诊断方法——Genentech 的 cobas EGFR 变异测试方法;来自勃林格殷格翰的酪氨酸激酶抑制剂 Gilotrif,被批准用于治疗表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 特异性变异的 (肿瘤) 转移性疾病,这种 EGFR 特异性变异占非小细胞肺癌病人数的 10%,这个药物被批准与 Qiagen 公司的 EGFR RGO PCR 筛选试剂盒配合使用;通过与法国 bioMerieux of Grenoble 公司的 THxID BRAF PCR 检测配合使用,伦敦 GlaxoSmithKline 公司生产的用来治疗 DNA 样品中 V600E 变异的转移型或不可切除型黑色素瘤的两种新的小分子药物——Tafinlar 和 Mekinist 获得了批准。上述情况表明,具有生物标志物以及具有与之相关的诊断方法,将成为加快新药批准的先决条件^[12]。同时,FDA 也致力于生物标识物的确认工作以及如何将生物标志物与常规的审查标准整合在一起,包括参与了一些联盟并资助了一些活动,并取得了不错的成绩。

我国疾病标志物研究在国家“十五”、“十一五”和“十二五”科技计划的资助下,在“国际人类肝脏蛋白质组计划”、“中国人类肝脏蛋白质组计划”、“我国重大疾病的分子分型和个体化治疗”等项目的牵引下,获得了一批有重要功能的蛋白质和潜在的生物标志物和药物靶标^[13-15]。转化医学也一直在被关注,成立了多个转化医学中心以期促进基础研究朝临床应用的转化。但新的疾病标志物转化是一个漫长而高投入的历程,目前成功转化的鲜有报道。王红阳院士团队研究开发的 GPC3 免疫组化检测试剂盒在 2014 年 8 月 12 日获得国家食品药品监督管理总局 (China Food and Drug Administration, CFDA) 的批准,是我国拥有自主知识产权的新标志物开发的标志之一。

2 体外诊断标志物产业化技术平台的选择

现阶段体外诊断用疾病标志物主要在肿瘤/遗传性疾病/心血管等慢性病的风险评估、早期诊断、肿瘤分型、肿瘤生物学行为预测、预后、药物筛

选、监测等方面发挥作用。将该类标志物开发为体外诊断试剂或伴随诊断试剂的常用产业化技术平台根据标志物自身性质和特点,基本上可以从基因、蛋白、细胞和组织等不同的层面选择相应的技术平台,同时也可能包含基于生物医学数据整合挖掘和算法的诊断/风险评估软件^[16-17]。

目前用于标志物检测的技术非常之多,一些高精尖技术的前沿性和先进性也值得期待。如基因突变和单核苷酸多态的检测技术主要包括了低通量的DNA测序法、限制性酶切片长度多态性、单链构象多态性、变性高压液相色谱,中低通量的实时荧光PCR技术(Scorpion ARMS、TaqMan-ARMS、TaqMan-PCR)、高温连接酶检测反应技术、LightScanner高分辨熔解曲线基因突变检测/分型系统,中高通量的ABI SNIPlex™ Assay、贝克曼库尔特SNP stream、Affymetrix的基因芯片技术、液相芯片技术和Sequenom的MassARRAY-IPLEX等。在蛋白质检测中,血清(体液)标志物检测技术以酶联免疫法、放射免疫、(电)化学发光法、时间分辨免疫法、均相发光法、蛋白芯片等为代表;组织细胞学标志物检测技术以免疫组化为代表;组织块培养法、生物荧光肿瘤药敏检测技术和胶原凝胶三维培养药物敏感测试技术是国际上主要采用基于表型分析(Bio-assay)的三大肿瘤体外药敏试验方法,也正在逐步走向临床。在标志物的科学性和临床价值确认之后,在众多的技术中选择何种技术平台进行有效转化,是目前研究团队和产业化团队需要共同考虑并达成一致的必要环节,尤其是科研团队必须走出一些误区。以下因素和原则建议考虑:

(1)技术的先进性需要由相对完善的生产工艺来保障和呈现有效的产品。一般来说,研发团队会比较关注技术的先进性,但生产企业,更多关注如何将该技术精确、稳定地呈现出来,也就是我们常常说的生产工艺。在目前的转化过程中,由研发团队发起的转化流向,比较少考虑到工艺研究的环节所带来的难度。其中最关键的指标当然是在准确度基础上的精密度和稳定性。比如,一个检测试剂产品,如果有效期只有3个月甚至更短(在科研阶段,我们会有现配现用这样的情况),这样的产品,考虑到生产质检周期和运输周期、申购周期、待用时长等,生产完毕达到用户手上就很快达到无效期,产品的性能就会大打折扣,产业化的可能性也就降低。至于精确度,

对于临床检测的重要性,就更是不言而喻了。当然,鉴于临床患者的多样性以及标本内容物的复杂性,干扰因素的研究和产品的抗干扰能力,也是必须考虑的。因此,准确性、灵敏度、特异度、精密度、抗干扰性以及稳定性等指标,是体外诊断试剂必须评估的分析性能指标,也是注册法规所要求的。

(2)技术的先进性也要适配临床应用的可操作性。临床检验目前越来越有朝两极分化的趋势发展。根据临床检测的需求,一方面朝规模化、自动化的大集成发展,另一方面,则朝简易快捷的床边诊断模式发展。在保障分析灵敏度和准(精)确度的基础上,操作的简便性、自动化程度、培训难易程度等,都是需要考虑和权衡的主要因素。

(3)成本核算和市场效益也是产业化需要考虑的一个因素。对于市场的需求是最原始的驱动力,如何引导和孵育市场,却是转化医学中下游环节必须考虑的。因此,市场调查、优劣势分析(Strengths Weakness Opportunity Threats, SWOT)等功课,是产业链团队需要共同完成的。基于这样理性分析和合理选择下的平台,才有可能比较顺利的走向产业化出口——市场应用。

(4)新标志物或新技术的标准化与溯源性,也是产业化过程中需要攻克的难点。这点我们将在下面注册法规中进行解读分享。

3 体外诊断标志物产业化注册法规的研读

作为诊断用标志物,产业化为临床应用的体外诊断试剂,还必须经过食品药品监督管理局的严格管理和审批流程^[18-19]。因此,关注、了解并熟悉体外诊断试剂注册相关的法规要求,也是十分必要的。对于研发团队,早期了解并在设计之初就考虑一些因素,甚至在相对早时间段与下游产业化企业对接,可以避免走一些弯路和一些无效的重复劳动。对于体外诊断试剂的注册管理,十多年来已经经历了3次重大变革。2007年以前,体外诊断试剂的注册管理,没有独立的法规。根据《关于体外诊断试剂实施分类管理的公告》(国药监办[2002]324号),将体外生物诊断试剂按药品进行管理,体外化学及生化诊断试剂等其他类别的诊断试剂均按医疗器械进行管理,体内诊断试剂一律按药品管理。到2007年6月1日,开始执行《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》(国食药监械

[2007]229号), 国家法定用于血源筛查的体外诊断试剂、采用放射性核素标记的体外诊断试剂不属于本办法的管理范围(按药品管理)。2014年10月1日起, 执行《体外诊断试剂注册管理办法》(国家食品药品监督管理总局令第5号)。在转化过程中, 我们需要深入了解体外诊断试剂的注册要求和注册流程, 以便在实践工作中可以得到更好的指导和科学合理的设计及安排。为鼓励创新和产品的研发, 新法规第九条“国家鼓励体外诊断试剂的研究与创新, 对创新体外诊断试剂实行特别审批, 促进体外诊断试剂新技术的推广与应用, 推动医疗器械产业的发展”、第八十七条“体外诊断试剂的应急审批和创新特别审批按照国家食品药品监督管理总局制定的医疗器械应急审批程序和创新医疗器械特别审批程序执行”给予了明确规定。但不管如何, 以下三个方面的问题, 对于新标志物或新技术的开发, 必须加以注意和科学解决。

(1) 产品质量标准的设立: 产品技术要求主要包括体外诊断试剂成品的性能指标和检验方法, 其中性能指标是指可进行客观判定的成品的功能性、安全性指标以及与质量控制相关的其他指标。局令5号第二十二条: 申请人或者备案人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下, 根据产品研制、临床评价等结果, 依据国家标准、行业标准及有关文献资料, 拟订产品技术要求。

(2) 标准品的溯源性: 溯源性解决的是测定结果的正确性问题, 即测定均值与真值的一致程度。国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)对溯源性的定义如下: 测量结果或标准量值的属性, 它使测量结果或标准量值通过连续的比较链与给定的标准联系起来, 给定的标准通常是国家或国际标准, 比较链中的每一步比较都有给定的不确定度。欧盟关于体外诊断用品导则《Directive 98/79/EC》中一项关键内容是对体外诊断用品的溯源性要求: “校准物质和/或质控物质定值的溯源性必须通过已有的高一级的参考方法和/或参考物质予以保证”, 上升到法律高度。据此, 我国中国药品生物制品检定所(现中国食品药品检定研究院, 简称中检院)早在2008年3月就曾发布了《体外诊断试剂校准品、质控品研究技术指导原则》^[20]。在产业化过程中, 必须结合现行法规要求并咨询中检院相关专业人士, 对产品标准的溯源性进行确认。

(3) 临床试验的开展: 体外诊断试剂的临床研究是指在相应的临床环境中, 通过临床文献资料、临床经验数据、临床试验等信息对产品是否满足使用要求或者预期用途进行系统性研究和确认的过程。局令5号第五章第二十八条到第四十条对此有明确要求。《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》(国食药监械[2007]240号)和国食药监械[2007]609号文件附件7《肿瘤标志物类定量检测试剂注册申报资料指导原则》做了较为详细的说明。其中“新诊断试剂产品的临床研究”, 由于缺乏同类参考, 在实施过程中有着较大的难度。建议邀请专业人士(包括生物统计专家)进行科学的临床方案设计、在临床药理基地管理下严格的临床试验实施和科学合理的结果分析。必要时请专业注册队伍办理。

4 体外诊断标志物产业化转化/合作模式的选择

在分工越来越细、跨平台跨学科跨单位的合作日益盛行、知识产权越来越被重视的当今, 选择一种怎样的合作模式, 往往也成为转化医学路上的一个大问题, 有时甚至因为合作意向与条款的不认同, 而导致一个项目的搁置或者失败, 甚至也可能导致日后的产权纠纷与利益矛盾。在体外诊断标志物产业化链条上, 有许多的人口可以启动转化, 不同时间的转化, 合作模式和权益分配就会不同。这在国际上已经有无数成功的案例可以借鉴。但国内由于科研院所的产权归属和开发孵化管理的非一体化, 导致实施和管理的分体与脱节, 也常常成为转化链断档的因素之一。大体来说, 常见的转化节点有:

(1) 上游单位完成大样本临床验证, 结论为诊断靶/伴随诊断靶; 由下游研发单位从头开发检测试剂;

(2) 上游单位完成大样本验证, 并已获核心生物原料(如抗原蛋白表达系统、单克隆抗体等); 下游研发单位可以直接从试剂研发起步;

(3) 上游单位完成大样本验证, 并已研制实验室水平的检测试剂/诊断模式(软件); 下游单位从工艺优化、开发规模化生产(中试水平)研究着手进行。

根据上述不同的转化节点, 上下游单位在转化链上, 大致的责权益可能是: 上游单位(出让方)在相应的转让节点提供符合转让标准的新标志物或新技术(知识产权), 在项目后续实施过程中提供必要的技术支持; 下游单位(受让方)负责受让

技术的产品化(包括后续的CFDA注册,产品的市场销售)。上下游单位协议分享技术成果所形成的收益,一般会分阶段实施。比如在实现阶段性目标时,上游单位获得下游单位部分转化经费;在产品销售时,上下游单位分配收益等。当然,上下游单位也可以结成产业化联盟体,向政府申请一些产业化基金经费。

产业化转化是一个漫长而艰巨的路程。在国家政策创导资金支持、产学研用单位有着共同目标导向和分享成长价值的理念下,强强联合、优势资源互通、合作共赢的模式会不断被探索和实践,相信这转化的步伐会迈得更加稳健和有速度,转化链也会越来越顺畅,更多的研究成果被用到临床,给生命健康产业带来重大的社会和经济价值^[21-25]。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014,64(1):9-29.
- [2] 中华人民共和国国务院.《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006-2020年)》[EB/OL]. <http://www.most.gov.cn/kjgh/>, 2006-02-09/2015-04-08.
- [3] 银一臻,徐伟文.转化医学模式下疾病标志物的挖掘[J].分子诊断与治疗杂志,2014,6(2):127-133.
- [4] Dunn BK, Jegalian K, Greenwald P. Biomarkers for early detection and as surrogate endpoints in cancer prevention trials: issues and opportunities [J]. Recent Results Cancer Res, 2011,188:21-47.
- [5] Butler D. Translational research: crossing the valley of death[J]. Nature, 2008,453(7197):840-842.
- [6] Boja ES, Jortani SA, Ritchie J, et al. The journey to regulation of protein-based multiplex quantitative assays [J]. Clin Chem, 2011,57(4):560-567.
- [7] Whiteley G. Bringing diagnostic technologies to the clinical laboratory: rigor, regulation, and reality [J]. Proteomics Clin Appl, 2008,2(10-11):1378-1385.
- [8] Sturgeon C. Perspectives in clinical proteomics conference: translating clinical proteomics into clinical practice[J]. Expert Rev Proteomics, 2010,7(4):469-471.
- [9] Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, et al. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer[J]. Tumor Biol, 31(2010):113-119.
- [10] Fung ET. A recipe for proteomics diagnostic test development: the OVA1 test, from biomarker discovery to FDA clearance[J]. Clin Chem, 2010,56(2):327-329.
- [11] Hamburg MA, Collins FS. The path to personalized medicine[J]. N Engl J Med, 2010,363(4):301-304.
- [12] 医药观察家.从FDA审批看新药研发的趋势 [J/OL]. 2014;<http://www.bioon.com/biopharm/594314.shtml>, 2014-04-11/2015-04-08.
- [13] Li N, Xu Z, Zhai L, et al. Rapid development of proteomics in China: from the perspective of the human liver proteome project and technology development[J]. Sci China Life Sci, 2014,57(12):1162-1171.
- [14] Gao X, Zhang X, Zheng J, et al. Proteomics in China: ready for prime time[J]. Sci China Life Sci, 2010,53(1):22-33.
- [15] 赵红梅,盛敏杰,于靖.蛋白质组学研究中生物标志物的验证[J].同济大学学报(医学版),2010,31(3):137-140.
- [16] Pencina MJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Statistical methods for assessment of added usefulness of new biomarkers [J]. Clin Chem Lab Med, 2010,48(12):1703-1711.
- [17] Wang J, Willumsen N, Zheng Q, et al. Bringing cancer serological diagnosis to a new level: focusing on HER2, protein ectodomain shedding and neoepitope technology[J]. Future Oncol, 2013,9(1):35-44.
- [18] Woosley RL. The translational path includes the FDA's critical path [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2008,1(3):188-189.
- [19] 国家食品药品监督管理总局.《体外诊断试剂注册管理办法》[EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0053/103757.html>, 2014-07-30/2015-04-08.
- [20] 中国药品生物制品检定所.《体外诊断试剂校准品、质控品研究技术指导原则》[EB/OL]. <http://www.nicpbp.org.cn/CL0001/>, 2008-03-25/2015-04-08.
- [21] Adams JU. Building the bridge from bench to bedside [J]. Nat Rev Drug Discov, 2008,7(6):463-464.
- [22] 李建芳,朱正纲,刘炳亚.以肿瘤分子标志物为基础的转化医学研究进展[J].上海交通大学学报(医学版),2012,32(8):1088-1091.
- [23] Sturgeon C, Hill R, Hortin GL, et al. Taking a new biomarker into routine use—a perspective from the routine clinical biochemistry laboratory[J]. Proteomics Clin Appl, 2010,4(12):892-903.
- [24] Horvath AR, Lord SJ, StJohn A, et al. From biomarkers to medical tests: the changing landscape of test evaluation[J]. Clin Chim Acta, 2014,427:49-57.
- [25] Staratschek-Jox A, Schultze JL. Re-overcoming barriers in translating biomarkers to clinical practice [J]. Expert Opin Med Diagn, 2010,4(2):103-112.

鼻咽癌细胞 MeDIP-Seq 测序 reads 在染色体上分布差异的研究

林伟达^{1,2,3} 王冬辉¹ 罗海丹^{1,3} 苏箔金¹ 赵存友⁴ 杨惠玲^{1*}

[摘要] **目的** 探讨同源不同辐射抗拒鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)细胞 DNA 甲基化差异,期望从表观遗传学角度阐述人鼻咽癌辐射抗拒的发生机制。 **方法** 采用 MeDIP-Seq 测序法对 CNE2R/CNE2 细胞进行测序,分析比较 DNA 甲基化水平差异区间的分布。 **结果** CNE-2R 和 CNE-2 细胞甲基化分布差异主要集中在第 5、6、7、9、13、17 号染色体上,其中第 5、6、13、17 号染色体上为甲基化上调区间的密集区域,第 7、9 号染色体上为甲基化下调的密集区域。 **结论** 同源不同辐射抗拒鼻咽癌细胞 CNE-2R 和 CNE-2 细胞的甲基化水平存在差异;差异甲基化水平可能与辐射抗拒相关。

[关键词] 鼻咽癌;甲基化;辐射抗拒

Research on different distributions of MeDIP-Seq reads in chromosomes of nasopharyngeal carcinoma cells

LIN Weida^{1,2,3}, WANG Donghui¹, LUO Haidan^{1,3}, SU Bojin¹, ZHAO Cunyou⁴, YANG Huiling^{1*}

(1. Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Gastrointestinal Institute, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510655; 3. Clinical Medicine of Five-year Education, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 4. Department of Medical Genetics, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] **Objective** To expound the pathogenetic mechanism of radiation resistance of NPC from an epigenetics perspective by discussing the differences of the DNA methylation levels of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells in the same genetic background but different radiation resistances. **Methods** MeDIP-Seq was performed to sequence the CNE-2 and CNE-2R cells. The distribution of different intervals of DNA methylation level was analyzed to detect the association between the DNA methylation and radiation resistance. **Results** The differences mostly centralized in 5, 6, 7, 9, 13 and 17 chromosomes, which were up-regulated in 5, 6, 13 and 17 chromosomes and down-regulated in 7 and 9 chromosomes, respectively. **Conclusion** The DNA methylation levels between NPC cells in the same genetic background but different radiation resistances(CNE-2 and CNE-2R cells) were quite different, indicating that DNA methylation may be associated with NPC radioresistance.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal carcinoma; Methylation; Radiation-resistance

基金项目:国家自然科学基金(81071837);广东省自然科学基金重点项目(92510089 01000005);2013 年和 2012 年国家大学生创新训练计划项目(201310558074,201210558076);2013 年广东省大学生创新训练项目(1055813171)

作者单位:1. 中山大学中山医学院病理生理学教研室,广东,广州 510080
2. 中山大学附属第六医院胃肠研究所,广东,广州 510655
3. 中山大学中山医学院临床医学五年制,广东,广州 510080
4. 南方医科大学基础医学院医学遗传学教研室,广东,广州 510515

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

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是源自于人鼻咽部上皮组织的恶性肿瘤,为我国最常见的头颈部恶性肿瘤之一^[1]。目前放疗仍为NPC首选疗法,但由于放疗过程中辐射抗拒的产生,严重制约NPC病人5年生存率的提高^[2]。DNA甲基化是研究最早且较深入的表观遗传学标志之一,其介导的表观遗传学调控在肿瘤发生、发展和肿瘤治疗中起了重要作用。已有研究报道DNA甲基化能够影响肿瘤的放化疗敏感性,如Kim等发现*SERPINB5*和*SI00A6*基因CpG岛的高甲基化能降低基因的表达,从而增加非小细胞肺癌的辐射抗拒^[3];Brieger等人发现利用5-氮杂胞苷使头颈部鳞癌细胞去甲基化,可以增加癌细胞的放疗敏感性^[4]。另外也有研究提示NPC辐射抗拒与DNA甲基化有密切的关系^[5-6]。本课题组已通过MeDIP Sequencing方法检测并比较CNE2R/CNE2细胞全基因组甲基化水平及甲基化区域的差异,结果表明不同NPC细胞之间总体甲基化水平及基因甲基化水平存在明显差异,考虑与其辐射抗拒相关。本研究拟进一步分析CNE-2R和CNE-2细胞甲基化区域在全基因组每条染色体上分布的差异,寻找出差异基因富集的区域,初步地从表观遗传学角度寻找甲基化与辐射抗拒的关系,为阐明NPC辐射抗拒机制、确立预测和逆转NPC辐射抗拒新标记物和靶点提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及仪器

人低分化鼻咽癌细胞株CNE-2由中山大学肿瘤防治中心提供,CNE-2R细胞是本实验室在CNE2细胞基础上采用爬坡式放疗诱导生成的对放疗抵抗的细胞株。

Paired-End DNA Sample Prep Kit购自美国Illumina公司,Agnetic Methylated DNA Immunoprecipitation Kit购自比利时Diagenode公司。Covaris Sonication System超声波反应器为美国Covaris公司产品,PCR Thermal Cycler基因扩增仪为美国Applied Biosystems I公司产品,NanoDrop 1000分光光度计为美国Thermo Fisher Scientific公司产品,Agilent 2100生物分析仪为美国Agilent公司产品,Qubit核酸/蛋白定量系统为美国Invitrogen公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

胰酶消化对数生长期CNE-2R和CNE-2细胞,用含10%灭活牛胎儿血清、 1×10^5 U/L青霉素、 1×10^5 U/L链霉素的RPMI-1640培养液稀释细胞为 2×10^8 cells/L的细胞悬液,接种于10 mL的培养皿,每皿 2×10^6 ,并置于37℃、5% CO₂和饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 CNE-2R/CNE-2细胞基因组DNA的制备和提取

48 h后弃上清,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗2次,每皿加1 mL Trizol使细胞裂解,转移至微量离心管中,加入200 μL PBS,吹打重悬。随后清除RNA,加入4 μL 100 mg/mL RNase A,旋涡混匀后室温(15℃~25℃)放置2 min;再加入20 μL蛋白酶K,旋涡混匀;加入200 μL样品裂解液B,旋涡混匀后70℃孵育10 min。加入200 μL无水乙醇,旋涡混匀后将所得混合物加入到DNA纯化柱内,8 000 r/min离心1 min。倒弃废液收集管内液体,加入500 μL洗涤液I,8 000 r/min离心1 min。倒弃废液收集管内液体。加入600 μL洗涤液II,14 000 r/min离心1 min。倒弃废液收集管内液体。进行以上离心步骤前需将纯化柱置于废液收集管上,倒弃废液后回收废液收集管。再14 000 r/min离心1 min,以去除残留的乙醇。将DNA纯化柱置于一洁净的1.5 mL离心管上,加入50 μL~200 μL洗脱液。室温放置1 min~3 min。14 000 r/min离心1 min,所得液体即为纯化得到的总DNA。洗脱液需要直接加至纯化柱管内柱面中央,使液体被纯化柱吸收。对提取的DNA采用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 MeDIP-Seq测序

该部分实验由华大基因科技有限公司完成。采用Agnetic Methylated DNA Immunoprecipitation Kit对基因组DNA进行甲基化处理,利用超声波反应器将基因组DNA超声打断至100 bp~500 bp片段,DNA片段末端修复、3'端加A碱基,连接测序接头,双链DNA变性成单链DNA。采用5-mC抗体对基因组进行沉淀富集,实时荧光定量核酸扩增检测系统(real-time quantitative polymerase chain reaction detecting system, QPCR)对抗体富集结果进行验证。PCR扩增后行琼脂糖凝胶电泳,切

割凝胶并纯化,进行DNA片段大小选择,切取220 bp~320 bp的片段回收,并用Agilent 2100 Analyzer定量,合格的文库用于上机测序。将MeDIP-Seq序列与参考基因组进行比对,每条read(一次测序中仪器读取的核苷酸长度)最多容许2个碱基的错配,可唯一比对的序列信息用于后续标准信息分析及个性化分析。

1.2.4 统计 reads 在全基因组每条染色体上的分布及差异

reads 不是基因在基因组中的组成,实际是一小段短的测序片段,是高通量测序仪产生的测序数据。应用华大基因工程自制软件将全基因组每条染色体等分成长度为10 kb的窗口,统计各个窗口上 reads 的分布并比较CNE-2R和CNE-2细胞的差异,同时找出各染色体上差异的密集区间。

2 结果

2.1 CNE-2R/CNE-2 MeDIP-Seq 测序 reads 在全基因组每条染色体上的分布

以10 kb为窗口对基因组每条染色体进行扫描,计算每个窗口的 reads 覆盖深度,并对每个窗口的 reads 采用如下公式进行标准化:特定10 kb窗口中 reads 个数 * 1000000/唯一比对 reads 数,以代表CNE-2或CNE-2R细胞MeDIP-Seq测序reads在全基因组每条染色体上分布(图1,图2)。通过 reads 的高低观察每个窗口的甲基化水平,可获得CNE-2或CNE-2R细胞各染色体甲基化区域的分布情况。

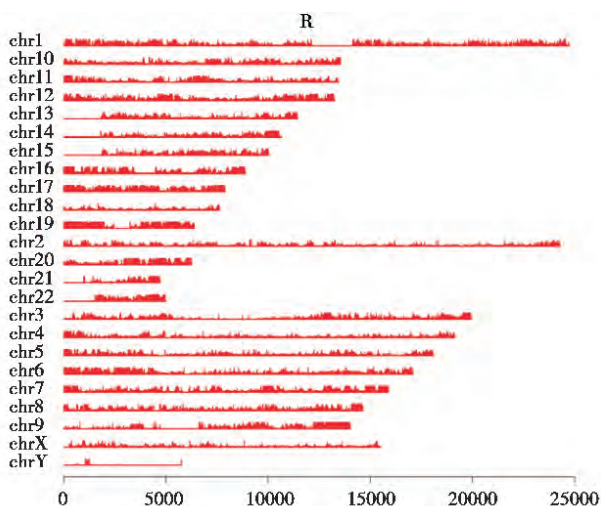


图1 CNE-2R细胞MeDIP-Seq测序reads在全基因组每条染色体上的分布

Figure 1 The distribution of MeDIP-Seq reads in each chromosome in CNE-2R

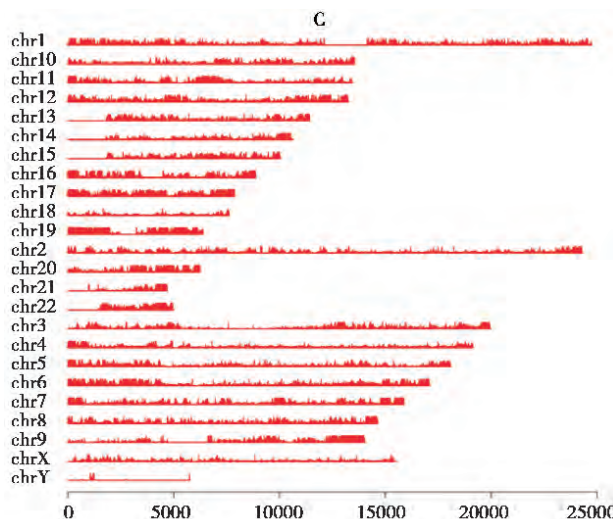


图2 CNE-2细胞MeDIP-Seq测序reads在全基因组每条染色体上的分布

Figure 2 The distribution of MeDIP-Seq reads in each chromosome in CNE-2

2.2 CNE-2R和CNE-2 MeDIP-Seq 测序 reads 在全基因组每条染色体上的分布的差异

统计每个窗口的 reads 数。归一化两样品的数据量后,对两样品中每窗口其中一个样品最少200 reads,两样品 reads 数差异2倍的 reads 数做卡方检验,以 $P < 0.01$ 作为筛选条件,挑出差异区间(表1)。这样的差异区间共有236个,其中,甲基化上调的差异区间有148个,甲基化下调的差异区间有88个。以每条染色体每10 kb窗口为横轴坐标,区间中甲基化上调 r 值 = CNE-2样品 reads 数 / CNE-2R样品 reads, 区间中甲基化下调 r 值 = CNE-2R样品 reads 数 / CNE-2样品 reads(图3)。从表1和图3我们可以发现差异区间分布较为密集的区域位于第5、6、7、9、13、17号染色体上,其中第5、6、13、17号染色体上为甲基化上调区间的密集区域,第7、9号染色体上为甲基化下调的密集区域。

3 讨论

目前制约鼻咽癌预后的主要因素是辐射抗拒,故阐明NPC辐射抗拒产生的机制尤为迫切。表观遗传学是当前生命医学研究的热点之一,其机制主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰及mi-croRNA调控^[7]。本研究通过MeDIP-Seq分析CNE-2R和CNE-2细胞的甲基化水平,观察测序

表 1 差异区间的分布

Table 1 The distribution of different intervals

染色体	上调区间	下调区间	差异区间
1	0	3	3
2	14	2	16
3	1	7	8
4	1	2	3
5	38	6	44
6	11	1	12
7	4	17	21
8	2	4	6
9	0	9	9
10	0	3	3
11	6	8	14
12	3	1	4
13	29	0	29
14	1	3	4
15	1	2	3
16	0	2	2
17	35	2	37
18	0	2	2
19	1	1	2
20	0	3	3
21	0	1	1
22	1	1	2
x	0	4	4
y	0	4	4
合计	148	88	236

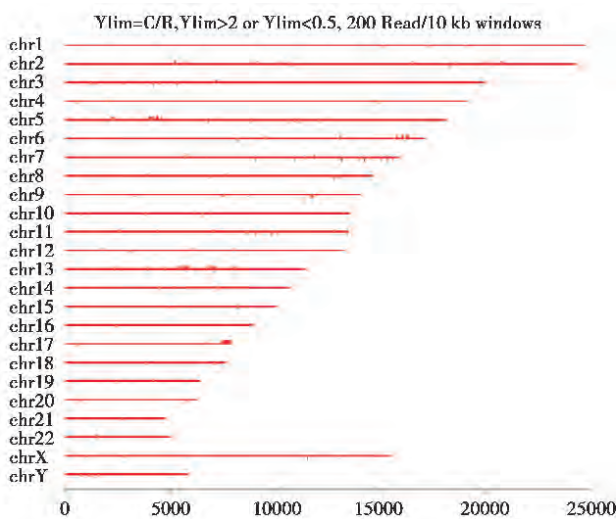


图 3 CNE-2R 与 CNE-2 细胞 MeDIP-Seq 测序 reads 在全基因组染色体上分布位置的差异

Figure 3 The different distribution of MeDIP-Seq reads in each chromosome between CNE-2R and CNE-2

reads在全基因组每条染色体上分布,并比较 CNE-2R 和 CNE-2 细胞的差异。结果发现,CNE-2R 和 CNE-2 细胞总体甲基化水平有约 30% 的差异,提示 DNA 甲基化与 NPC 辐射抗拒相关(另文发表)。两细胞株间甲基化差异区间有 236 个,上调区间明显多于下调区间,提示产生辐射抗拒的 CNE-2R 细胞基因甲基化水平更高。另外,这些差异区间有集中分布的趋势,其中第 5、6、13、17 号染色体以上调为主,第 7、9 号染色体以下调为主。因此,我们推测 CNE-2R 和 CNE-2 细胞染色体甲基化水平存在的这种明显差异可能与 NPC 辐射抗拒的产生有关。

大量的研究证实 DNA 甲基化在肿瘤发生发展中起着非常重要的作用^[8-10]。头颈部鳞癌中抑癌基因因高甲基化而失活非常普遍,科学家们认为其更倾向于一个表观遗传学疾病^[11-12]。另外也有研究提示 NPC 是一种 CpG 岛甲基化频率非常高的肿瘤^[13-14]。肿瘤细胞甲基化程度与预测预后也有密切的关系^[15],如 Asuthkar 等发现 miRNA-211 的低甲基化与 MMP-9 的高表达有关,是多形性成胶质细胞瘤对放化疗不敏感的一个重要原因^[16]; CHFR 的甲基化程度可以作为判断胃癌对化疗敏感性的一个指标,MLH1 的甲基化能导致卵巢癌、胃癌对放疗的敏感性降低^[17-18]; CTNNA1、TP53、CDKN2A、RBI、MEN1、ZNF3、DAXX、TERT、MED12 等多种基因的异常甲基化可以影响肾上腺皮质癌的预后^[19-21]。但是 DNA 甲基化是否也能够用于预测 NPC 预后仍不清楚。另外,不同肿瘤甲基化水平差异也有集中分布的趋势,如子宫内膜癌中 X 染色体上就存在大范围的去甲基化,并伴随着 XIST 基因的低表达^[22]; Zhang 提出 3 号染色体上 RASSF1A、BLU、FHIT、CRBP1 等抑癌基因的高甲基化与肝癌有密切的关系^[23]。由于 CNE-2R 和 CNE-2 细胞的甲基化差异以差异区间为单位进行统计,难以体现具体基因的甲基化水平差异,故本课题组也将展开进一步研究,获得具体某些基因的甲基化水平差异并分析。

在本研究中,不同辐射抗拒的 NPC 细胞甲基化水平存在着明显的差异,表明除了缺失和突变之外甲基化状态同样是 NPC 辐射抗拒产生的重要原因之一,这也意味着 NPC 细胞甲基化状态对其预后有着直接影响,尽管 DNA 甲基化和肿瘤辐射抗拒的研究已取得许多进展,但对于两者之间联系

的影响仍是一个新发现,其对综合评价肿瘤的预后具有一定的意义。实验研究的最终目的是服务于临床,由于甲基化在NPC辐射抗拒产生中的重要作用,将其应用到肿瘤风险评估判断肿瘤复发情况、预测肿瘤疗效和预后、开发特异新靶点药物等方面具有很大的潜力。至于其确切作用及机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Xiao J, Tan Y, Pan Y, et al. A new cyclooxygenase-2 inhibitor, (1E, 4E)-1, 5-bis(2-bromophenyl)penta-1, 4-dien-3-one (GL63) suppresses cyclooxygenase-2 gene expression in human lung epithelial cancer cells: coupled mRNA stabilization and posttranscriptional inhibition[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(7):1170–1175.
- [2] Qin HD, Shugart YY, Bei JX, et al. Comprehensive pathway-based association study of DNA repair gene variants and the risk of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8):3000–3008.
- [3] Kim EH, Park AK, Dong SM, et al. Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines[J]. *Oncogene*, 2010, 29(33):4725–4731.
- [4] Brieger J, Mann SA, Pongsapich W, et al. Pharmacological genome demethylation increases radiosensitivity of head and neck squamous carcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(3):505–509.
- [5] Wang S, Zhang R, Claret FX, et al. Involvement of microRNA-24 and DNA methylation in resistance of nasopharyngeal carcinoma to ionizing radiation[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(12):3163–3174.
- [6] Cai MY, Tong ZT, Zhu W, et al. H3K27me3 protein is a promising predictive biomarker of patients' survival and chemoradioresistance in human nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Med*, 2011, 17(11–12):1137–1145.
- [7] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10):1057–1068.
- [8] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(21):2042–2054.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646–674.
- [10] Lee CJ, Evans J, Kim K, et al. Determining the effect of DNA methylation on gene expression in cancer cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1101:161–178.
- [11] Laytragoon-Lewin N, Chen F, Castro J, et al. DNA content and methylation of p16, DAPK and RASSF1A gene in tumour and distant, normal mucosal tissue of head and neck squamous cell carcinoma patients[J]. *Anti-cancer Res*, 2010, 30(11):4643–4648.
- [12] Tong JH, Ng DC, Chau SL, et al. Putative tumour-suppressor gene DAB2 is frequently down regulated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:253.
- [13] Tao Q, Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2007, 9(12):1–24.
- [14] He D, Zeng Q, Ren G, et al. Protocadherin8 is a functional tumor suppressor frequently inactivated by promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2012, 21(6):569–575.
- [15] Chan KC, Jiang P, Chan CW, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47):18761–18768.
- [16] Asuthkar S, Velpula KK, Chetty C, et al. Epigenetic regulation of miRNA-211 by MMP-9 governs glioma cell apoptosis, chemosensitivity and radiosensitivity[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(11):1439–1454.
- [17] Li Y, Yang Y, Lu Y, et al. Predictive value of CHFR and MLH1 methylation in human gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2014, 18(2):280–287.
- [18] Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, et al. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer[J]. *Oncogene*, 1999, 18(14):2335–2341.
- [19] Soon PS, Sidhu SB. Molecular basis of adrenocortical carcinomas[J]. *Minerva Endocrinol*, 2009, 34(2):137–147.
- [20] Wandoloski M, Bussey KJ, Demeure MJ. Adrenocortical cancer[J]. *Surg Clin North Am*, 2009, 89(5):1255–1267.
- [21] Assie G, Letouze E, Fassnacht M, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(6):607–612.
- [22] Zhang B, Xing X, Li J, et al. Comparative DNA methylome analysis of endometrial carcinoma reveals complex and distinct deregulation of cancer promoters and enhancers[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):868.
- [23] Zhang X, Li HM, Liu Z, et al. Loss of heterozygosity and methylation of multiple tumor suppressor genes on chromosome 3 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(1):132–143.

响应面优化黄皮叶中的活性因子超声提取工艺及其抗氧化活性研究

苏志鹏 孔繁晟* 方宇洪 杨妙婷 刘欣 陈泽丹

[摘要] 目的 优化黄皮叶中活性因子总黄酮的超声提取工艺条件,并测定其抗氧化活性。

方法 以乙醇体积分数、超声时间及料液比为影响因子,以黄皮叶总黄酮得率为评价指标,在单因素试验基础上,采用响应面法优选黄皮叶总黄酮超声提取工艺,并测定黄皮叶总黄酮体外清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-1-picryl hydrazyl, DPPH)自由基、羟自由基和总抗氧化的活性。
结果 黄皮叶总黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇体积分数18%、超声时间73 min、料液比31:1(mL/g)。在此条件下,黄皮叶总黄酮得率达到了 $(1.300 \pm 0.006)\%$ 。黄皮叶总黄酮得率大小的主次因素为乙醇体积分数>超声时间>料液比,其中超声时间与料液比因素之间的交互作用显著。黄皮叶总黄酮体外清除DPPH和羟自由基的 IC_{50} 值分别为0.282 mg/mL、1.152 mg/mL,用三价铁还原抗氧化能力(ferric-reducing antioxidant power, FRAP)法测得1 mg/mL黄酮的FRAP值为533.3 μ mol/L。
结论 该所选工艺合理、可行,可用于黄皮叶总黄酮的超声提取;三种测定方法均说明黄皮叶总黄酮在一定浓度下有抗氧化活性。

[关键词] 响应面分析法;提取;总黄酮;黄皮叶;抗氧化活性

Optimization of extraction technology from *Clausena lansium* leaves by response surface and their antioxidant activity study

SU Zhipeng, KONG Fansheng*, FANG Yuhong, YANG Miaoting, LIU Xin, CHEN Zedan

(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the extraction of active factors of total flavonoid from *Clausena lansium* leaves by ultrasound and the antioxidant activity of flavonoid. Methods Compounds in *Clausena lansium* leaves were extracted by ultrasound under different levels of factors, such as alcohol concentration, ultrasonic time and ratio between solid and solvent. Total flavonoids in the compounds were tested. Extraction was optimized by response surface. The antioxidant activity against 1,1-diphenyl-1-picryl hydrazyl(DPPH), the antioxidant activity against hydroxyl radical, and the total antioxidant activity were investigated. Results The optimum extraction conditions were 18% volume fraction of ethanol, 73 minutes of ultrasonic time and 31:1 of solid-to-solvent ratio(mL/g). Under these conditions, the yield of total flavonoid was $(1.300 \pm 0.006)\%$. The order for the factors of the yield of total flavonoid were volume fraction of ethanol, ultrasonic time and solid-to-solvent ratio. The interaction between the ultrasonic time and solid-to-solvent ratio was significant. The IC_{50} of the obtained total flavonoid against DPPH and the ion of hydroxyl were 0.282 mg/mL and 1.152 mg/mL, respectively. The ferric-reducing antioxidant power(FRAP) value of 1 mg/mL flavonoid was 533.3 μ mol/L. Conclusion Optimization of extraction technology by

基金项目:2014广东省大学生创新创业训练计划项目·广东药学院创新强校工程资助项目(201410573024)

作者单位:广东药学院药科学院,广东,广州 510000

*通讯作者:孔繁晟, E-mail: kmkfs@163.com

response surface is convenient and feasible. In some certain concentration of total flavonoids, all of the three methods have showed the antioxidant activity of total flavonoids extracted from the *Clausena lansium* leaves.

[KEY WORDS] Response surface methodology; Extraction; Total flavonoids; *Clausena lansium* (Lour.) Skeels leaves; Antioxidant activity

黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 是芸香科黄皮属植物, 主要化学成分有香豆素类、卡巴唑和酰胺生物碱类、黄酮等。黄皮叶, 性味属辛、苦、平, 可疏风解表, 除痰行气, 有治疗温病身热、咳嗽哮喘、气胀腹痛、黄肿、疟疾、小便不利、热毒疥癩等功效, 在民间常用于治疗急性黄疸型肝炎、感冒、胃痛、疝气、牛膝胀、哮喘、高血脂等病症^[1]。此外, 黄小桃等^[2]研究发现, 黄皮叶有明显的治疗 2 型糖尿病的作用, 能促进胰岛 β 细胞的修复和生长增殖, 增加胰岛素分泌, 对受损的胰岛功能具有一定的改善作用, 可以缓解由于胰岛 β 细胞受损而引起的高血糖症状。广东地区是黄皮的一个较大产地, 而目前对黄皮叶中黄酮类化合物的研究鲜见报道。从原料的易获得性和对资源综合利用的角度出发, 本实验选择广东阳春地区的黄皮叶为研究对象, 旨在探讨乙醇-水浸提黄皮叶总黄酮的提取工艺, 并采用响应面法优化工艺条件, 同时采用体外实验测定其抗氧化活性, 以期为合理开发和利用黄皮叶的功能性价值提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

黄皮叶, 于 2014 年 6 月份采集于广东阳春市双滘镇的种植园, 经我校中药学院腾希峰博士鉴定为黄皮叶 [*Leaves of Clausena lansium* (Lour.) Skeels], 样品经干燥、粉碎处理; 芦丁对照品 (批号 12040302, 纯度 $\geq 98\%$), 购自成都曼思特生物科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1, 1-diphenyl-1-picryl hydrazyl, DPPH) (批号 A1415038)、三吡啶三吡嗪 [2, 4, 6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ] (批号 K1319026), 分析纯, 购自上海 Sigma 公司; 硫酸亚铁、氯化钠、氯化钾、30% 过氧化氢溶液、水杨酸、亚硝酸钠、无水乙醇等均为市售分析纯。752N 型紫外可见分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司); JA2003 型电子分析天平 (上海恒平科学仪器有限公司); 移液器 (大龙兴创实验仪器 (北京) 有限公司); PHS-3D 型 pH 计 (上海精密科学仪

器有限公司); KQ-400DB 型台式数控超声波清洗机 (东莞市科桥超声波设备有限公司); 粉碎机 (温岭市林大机械有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 黄皮叶总黄酮的测定

1.2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取 25.0 mg 芦丁对照品, 加入 70% 乙醇定容至 100 mL, 得到浓度为 0.25 mg/mL 芦丁标准溶液, 作为对照品储备液。

1.2.1.2 供试品溶液的制备 称取黄皮叶粉末样品 1.0 g, 置锥形瓶中, 固定提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 料液比为 40:1 (mL/g), 提取时间 70 min, 超声功率 360 W, 乙醇体积分数 30%, 超声提取后再进行减压过滤, 得到的滤液用 30% 乙醇定容至 50 mL, 即得。

1.2.1.3 测定方法及方法学考察^[3] 精密吸取芦丁对照品储备液适量于 25 mL 容量瓶中, 加入 70% 乙醇至 10.0 mL, 再加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL, 再加入 70% 乙醇定容至刻度线, 摇匀, 放置 15 min, 于 510 nm 下测定各浓度样品液的吸光度值 (absorbance, A), 计算。样品中黄酮含量测定: 准确移取 3.0 mL 的样品液于 25 mL 的容量瓶中, 按照上述方法测定吸光度。根据标准曲线回归方程计算总黄酮质量。总黄酮得率计算公式为:

黄酮得率/% = $CV/M \times 100\%$ (C 为提取液浓度, g/mL; V 为提取液原始体积, mL; M 为黄皮叶质量)

1.2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取芦丁对照储备液 0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL、6.0 mL 于 25 mL 容量瓶, 按 1.2.1.3 项的测定方法操作, 以各样品液的浓度为横坐标, 对应各样品液的吸光度值为纵坐标制定标准曲线。

1.2.1.5 稳定性试验 取 1.2.1.2 项的供试品溶液, 按 1.2.1.3 项方法于 1 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 时测定吸光度。并计算其相对标准偏差。

1.2.1.6 重现性试验 准确称取黄皮叶 1.0 g, 共

5份,按 1.2.1.2 项制备的供试品液,精密吸取 3.0 mL 于 25 mL 的容量瓶中,按 1.2.1.3 项方法操作,平行试验,于 510 nm 波长处测定。

1.2.1.7 加样回收试验 准确称取丁对照品 100.0 mg,置于 100 mL 容量瓶中,以 30%乙醇超声、溶解,并稀释至刻度,摇匀,得芦丁贮备液。准确称取黄皮叶粉末 1.0 g 各 5 份,置于锥形瓶瓶中,准确加入上述芦丁贮备液 10.0 mL,按 1.2.1.1 项方法操作,精密量取 3.0 mL 按 1.2.1.3 项处理,于 510 nm 波长处测定吸光度,计算回收率。

1.2.2 黄皮叶总黄酮提取工艺流程

取干燥的黄皮叶于粉碎机中粉碎,将各试验量与所需量溶剂混合,在不同条件下超声提取,然后过滤浓缩。

1.2.3 黄皮叶总黄酮提取条件单因素试验

1.2.3.1 乙醇体积分数 准确称取黄皮叶 1.0 g (经预实验黄皮叶取量为 1.0 g~2.0 g 时,所测定的样品溶液吸光度在 0.2~0.8 之间,为便于实验的操作与数据的处理分析等选用质量 1.0 g 的黄皮叶粉末) 固定提取温度 50 °C,料液比为 30:1(mL/g),超声提取时间 60 min,超声功率 360 W,考察乙醇体积分数为 10%、20%、30%、40%、50%条件下黄皮叶总黄酮得率。

1.2.3.2 提取温度 准确称取黄皮叶 1.0 g,乙醇体积分数用 1.2.3.1 中的最优结果,固定料液比为 30:1(mL/g),超声提取时间 60 min,超声功率 360 W,考察提取温度为 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C条件下黄皮叶总黄酮得率。

1.2.3.3 料液比 准确称取黄皮叶 1.0 g,乙醇体积分数用 1.2.3.1 中的最优结果,提取温度用 1.2.3.2 中的最优结果,固定提取时间 60 min,超声功率 360 W,考察料液比(mL/g)为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 条件下黄皮叶总黄酮得率。

1.2.3.4 提取时间 准确称取黄皮叶 1.0 g,乙醇体积分数用 1.2.3.1 中的最优结果,提取温度用 1.2.3.2 中的最优结果,料液比(mL/g)用 1.2.3.3 中挑选的结果,超声功率 360 W,考察提取时间为 40 min、50 min、60 min、70 min、80 min 条件下考察黄皮叶总黄酮得率。

1.2.3.5 超声功率 准确称取黄皮叶 1.0 g,乙醇体积分数用 1.2.3.1 中的最优结果,提取温度用 1.2.3.2 中的最优结果,料液比(mL/g)用 1.2.3.3 中

的最优结果,提取时间用 1.2.3.4 中的最优结果,考察超声功率为 200 W、240 W、280 W、320 W、360 W 条件下考察黄皮叶总黄酮得率。

1.2.4 响应面法优化总黄酮提取工艺条件的确定^[4]

在单因素的试验的结果基础上,考虑单因素对总黄酮得率影响的显著性和实验条件的可行性,固定总黄酮得率最高的温度(70 °C)和超声功率(320 W),选择乙醇体积分数、超声时间、料液比为考察因素,分别用 X_1 、 X_2 、 X_3 表示(下文同),并且每个因素选择 3 个水平。根据中心组合试验设计原理,采用三因素三水平的三元二次响应面分析方法,优化黄皮叶中总黄酮的提取工艺。试验水平分别以 -1, 0, 1 进行编码,各因素与各水平编码结果见表 1。

表 1 试验设计因素和水平

Table 1 Factors and levels of experiment design

因素	编码水平		
	-1	0	1
X_1 (乙醇体积分数/%)	10	20	30
X_2 (超声时间/min)	60	70	80
X_3 (料液比/mL/g)	25:1	30:1	35:1

1.2.5 黄皮叶总黄酮的抗氧化活性试验

按照响应面分析确定的黄皮叶总黄酮提取最佳条件进行提取最佳条件进行提取,提取液浓缩后经苯乙烯型弱极性共聚体的大孔树脂纯化,乙醇洗脱(体积分数 50%),所得洗脱液旋转蒸发浓缩低温烘干得黄皮叶总黄酮粗品。配制适宜质量浓度溶液进行抗氧化活性实验。

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率活性的测定^[5] 配制 DPPH 自由基溶液 0.20 mmol/L 及具有一定浓度梯度 (0.12 mg/mL, 0.24 mg/mL, 0.36 mg/mL, 0.48 mg/mL, 0.60 mg/mL) 的黄皮叶总黄酮样品液。取 2.0 mL 各浓度样品液于试管中,再各加入 2.0 mL DPPH 乙醇溶液(浓度为 0.20 mmol/L),混合均匀,避光放置 30 min,用分光光度计在 517 nm 处测定其吸光度 A_i ; 同时在相同实验条件下测定 2.0 mL DPPH 溶液与 2.0 mL 蒸馏水混合后的吸光度 A_0 及 2.0 mL 各浓度样品液与 2.0 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_j ,按下式计算清除率:

清除率(%) = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$

用软件 SPSS 19.0 计算出其清除率的 IC₅₀, 即自由基被清除一半时所需的样品溶液的浓度。

1.2.5.2 羟自由基(·OH)清除活性的测定 参照张黎明等^[6]的方法。在 10 mL 试管中依次加入 6.0 mmol/L FeSO₄ 溶液 2.0 mL、不同质量浓度的总黄酮样品液 2.0 mL、6.0 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 2.0 mL, 摇匀静置 10 min, 再加入 6.0 mmol/L 的水杨酸溶液 2.0 mL, 摇匀, 静置 30 min 后于 510 nm 处测其吸光度 A, 用软件 SPSS 19.0 计算出其清除率的 IC₅₀。清除率计算公式为:

清除率 Y/% = $[1 - (D_i - D_j) / D_0] \times 100$ (D₀ 为空白对照; D_i 为某质量浓度黄酮类组分的吸光度; D_j 为无水杨酸时的吸光度)

1.2.5.3 三价铁还原抗氧化能力 (ferric-reducing antioxidant power, FRAP) 值法总抗氧化能力的测定^[7-8] 标准曲线制作: 将醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH=3.6, 300 mmol/L)、10 mmol/L TPTZ (40 mmol/L HCL 溶液配制) 和 20 mmol/L FeCl₃ 溶液按体积 10:1:1 配制而成 FRAP 试剂。取浓度 0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L FeSO₄ 溶液各 150 μL, 分别加入 4.5 mL FRAP 试剂, 混匀后 37 °C 水浴条件下反应 10 min, 测定 593 nm 处吸光值, 制作标准曲线。

不同活性物质还原力的测定: 经预实验, 配黄酮浓度为 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 各取 150 μL 按上述方法分析测定, 由标准曲线查得相同吸光值处对应的 FeSO₄ 浓度, 还原力用对应的 FeSO₄ 浓度 μmol/L 表示。双蒸水作为空白对照, 样品抗氧化能力 (μmol/L) FeSO₄ = 样品抗氧化能力 - 空白抗氧化能力。

2 结果

2.1 方法学的考察

2.1.1 标准曲线的制备

由试验结果得到总黄酮标准曲线方程为: $Y = 11.50X - 0.0097$, $r = 0.9998$, 其中 Y 为样品液的吸光度值, X 为样品液的浓度, r 为相关系数 (correlation coefficient)。结果表明芦丁含量在 10 μg/mL ~ 60 μg/mL 范围内与吸收值线性关系良好。

2.1.2 稳定性试验

试验结果的吸光度的相对标准偏差 (relative

standard deviation, RSD) = 1.040%。表明样品显色后 48 h 内稳定性良好。

2.1.3 重现性试验

试验结果测得总黄酮的平均含量为 12.1 mg/g (RSD=0.670%), 表明本方法重现性良好。

2.1.4 加样回收试验

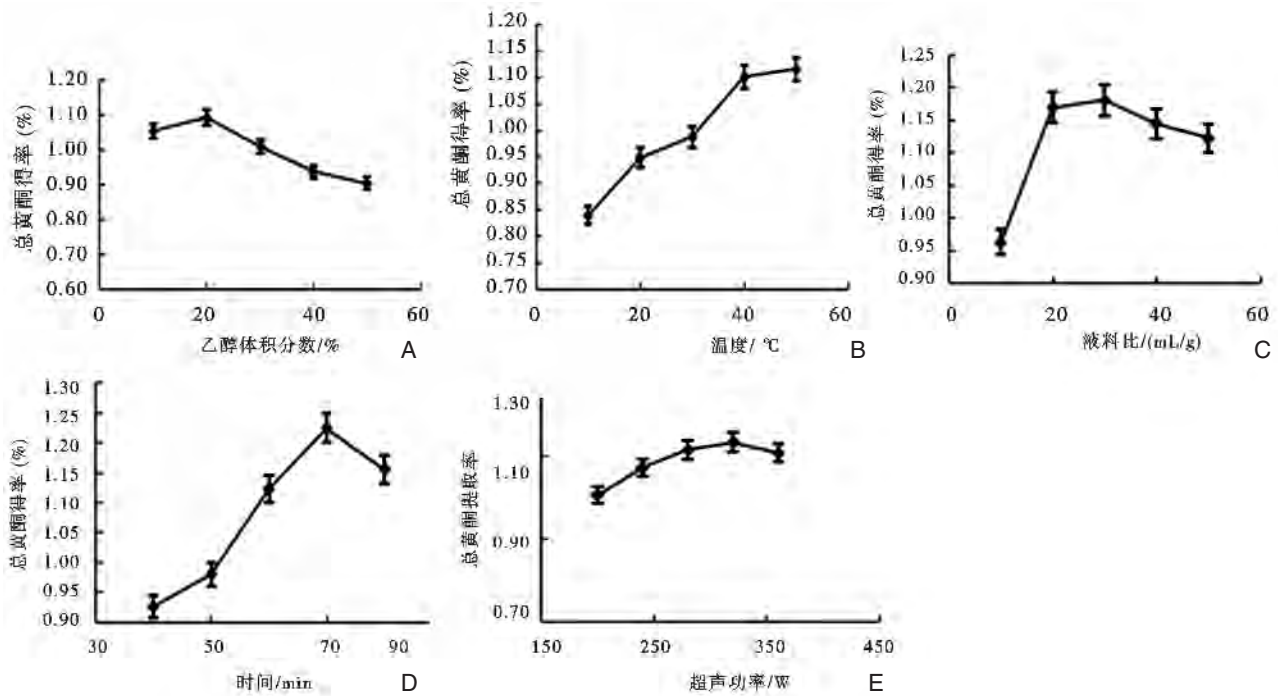
试验结果的平均回收率为 98% (RSD = 1.160%), 说明本测定法可行。

2.2 乙醇-水提取条件选择

乙醇体积分数, 提取温度, 料液比, 提取时间, 超声功率对黄皮叶总黄酮得率影响的结果分别如图 1 所示。由图 1(A) 知, 随乙醇体积分数的增大, 黄皮叶总黄酮得率呈先升后降的趋势。当乙醇体积分数为 20% 时, 总黄酮得率最高。说明黄皮叶中黄酮苷类等水溶性较好的黄酮类物质含量较高。由图 1(B) 知, 当温度从 30 °C 升至 70 °C 时, 总黄酮得率显著增加, 在 70 °C 达到最大值, 其可能与升高温度, 加快黄皮叶中总黄酮的溶出有关。由图 1(C) 知, 当料液比从 10:1 增加至 30:1 (mL/g) 时, 总黄酮得率增加, 在 30:1 时达到最大值。继续升高料液比, 总黄酮得率反而下降, 可能是料液比增加使杂质溶出增多和影响超声效果, 从而降低黄皮叶中总黄酮的溶出与扩散。由图 1(D) 可知, 在 70 min 内, 总黄酮的得率随提取时间的延长而增加, 提取时间为 70 min 时, 总黄酮得率最大。继续延长提取时间, 黄酮得率下降。可能是过长时间的加热使黄皮叶中总黄酮氧化变性。超声功率对黄皮叶中总黄酮的得率影响见图 1(E), 320 W 内, 超声功率升高, 黄皮叶中总黄酮得率升高。超声功率为 320 W 时, 总黄酮得率最高, 继续升高超声功率, 总黄酮得率下降, 可能与过高的功率导致黄酮苷类化合物苷键断裂等有关。综合以上因素, 确定进行响应面分析的各因素考察范围为乙醇体积分数 10%~30%, 料液比为 25:1~35:1 (mL/g), 超声时间 60 min~80 min。固定提取温度 70 °C, 超声功率 320 W。

2.3 黄皮叶总黄酮提取工艺优化

根据单因素试验结果, 采用 3 因素 3 水平设计 Box-Behnken 试验中心组合试验, 响应面分析方案及结果见表 2。利用 Design-Expert V8.0.6 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合, 得到总黄酮得率响应值的回归方程为: $Y = 1.30 - 0.022X_1 +$



A: 乙醇体积分数; B: 提取温度; C: 料液比; D: 提取时间; E: 超声功率

图 1 各因素对总黄酮得率的影响

Figure 1 Effects of the factors on the extraction yield of total flavonoids

表 2 黄皮叶总黄酮得率响应面方案及结果

Table 2 Designs and results of the extraction of total flavonoids

试验 编号	实际值			Y(总黄酮 得率/%)
	X ₁ (乙醇体 积分数/%)	X ₂ (超声 时间/min)	X ₃ (料液比/ mL:g)	
1	10	80	30:1	1.24
2	30	80	30:1	1.21
3	20	60	25:1	1.19
4	20	70	30:1	1.29
5	10	70	25:1	1.18
6	20	80	25:1	1.19
7	20	70	30:1	1.31
8	30	70	35:1	1.18
9	20	70	30:1	1.30
10	10	70	35:1	1.25
11	20	70	30:1	1.29
12	20	80	35:1	1.24
13	10	60	30:1	1.21
14	30	60	30:1	1.16
15	30	70	25:1	1.15
16	20	70	30:1	1.29
17	20	60	35:1	1.17

$$0.019X_2 + 0.016X_3 + (5.00 \times 10^{-3})X_1X_2 - 0.010X_1X_3 + 0.018X_2X_3 - 0.049X_1^2 - 0.042X_2^2 - 0.057X_3^2$$

上述回归方程的方差分析结果见表 3。由表 3 可知:模型 $P < 0.0001$ (显著), 失拟项 $P = 0.1717 > 0.05$ (不显著), 说明方程对实验有较好的拟合性, 实验误差较小。相关系数 $r = 0.9892$ 和调整系数 (adjustment coefficient, Adj) $R^2 = 0.9510$ 也表明模型拟合程度较好。变异系数 (coefficient of variation, CV) 为 0.9700%, 说明模型的重现性很好, 该模型可用于黄皮叶总黄酮提取的工艺条件。从上表各因素显著性水平可知, 对黄皮叶总黄酮得率的影响次序为: 乙醇体积分数 $X_1 >$ 超声时间 $X_2 >$ 料液比 X_3 。且乙醇体积分数 X_1 的二次项, 料液比 X_3 的二次项对总黄酮得率的影响极显著 ($P < 0.001$); 乙醇体积分数 X_1 , 超声时间 X_2 , 料液比 X_3 , 超声时间的二次项对总黄酮得率的影响均显著 ($P < 0.010$); 超声时间 X_2 和料液比 X_3 的交互项 (X_2X_3) 对总黄酮得率的影响具有统计学意义 ($P < 0.050$)。

根据回归方程得出不同因子的响应面和等高线结果见图 2。图 2(A) 表示乙醇体积分数和超声时间的交互作用对黄皮叶总黄酮得率的影响。从

表3 回归统计分析结果
Table 3 Results of regression analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.045	9	5.044×10^{-3}	35.48	< 0.0001	***
X ₁	4.050×10^{-3}	1	4.050×10^{-3}	28.49	0.0011	**
X ₂	2.813×10^{-3}	1	2.813×10^{-3}	19.79	0.0030	**
X ₃	2.113×10^{-3}	1	2.113×10^{-3}	14.86	0.0063	**
X ₁ X ₂	1.000×10^{-4}	1	1.000×10^{-4}	0.70	0.4293	
X ₁ X ₃	4.000×10^{-4}	1	4.000×10^{-4}	2.81	0.1373	
X ₂ X ₃	1.225×10^{-3}	1	1.225×10^{-3}	8.62	0.0218	*
X ₁ ²	0.010	1	0.010	71.85	< 0.0001	***
X ₂ ²	7.339×10^{-3}	1	7.339×10^{-3}	51.63	0.0002	**
X ₃ ²	0.014	1	0.014	95.40	< 0.0001	****
残差	9.950×10^{-4}	7	1.421×10^{-4}			
失拟项	6.750×10^{-4}	3	2.250×10^{-4}	2.81	0.1717	
纯误差	3.200×10^{-4}	4	8.000×10^{-5}			
总和	0.046	16				
	R ² = 0.9786	Adj.R ² = 0.9510				
		CV% = 0.970				

*:表示 $P < 0.050$; **:表示 $P < 0.010$; ***:表示 $P < 0.001$

图 2(A)可以看出,乙醇体积分数、超声时间对得率的影响都是明显的,但它们的交互作用并不明显($P=0.4293$);图 2(B)表示乙醇体积分数和料液比的交互作用对得率的影响。其响应面图曲面陡峭,等高线图呈椭圆形。由此可知,乙醇体积分数和料液比对得率的影响是明显的;图 2(C)表示超声时间和料液比的交互作用对得率的影响。从图 2(C)可以看出,超声时间和料液比对得率的影响明显,且超声时间和料液比的交互作用显著。当超声时间较低时,得率随料液比的提高变化不大;当超声时间在 70 min~73 min 时,得率随料液比的增加变化明显,且能达到最大值。

通过软件 Design-Expert V8.0.6 软件分析得黄皮叶总黄酮的最佳提取条件:当乙醇体积分数为 17.63%、超声时间 72.53 min、液料比 31.01:1(mL/g)、提取温度 70℃、超声功率 320W 时,黄皮叶总黄酮得率预测可达到最大值 1.302%。考虑到实际操作的可行性,将上述最优提取条件修正为乙醇体积分数为 18%、超声时间 73 min、料液比 31:1(mL/g)、超声功率 320W。以此同取黄皮叶粉末 1.0 g,进行 3 次重复试验,黄皮叶总黄酮得率平均值为(1.300±0.006)%,与预测值 1.302%基本一致,

说明了此响应面法得到的回归模型具有较好的可靠性。

2.4 黄皮叶总黄酮的抗氧化活性分析

2.4.1 对 DPPH 自由基的清除效果

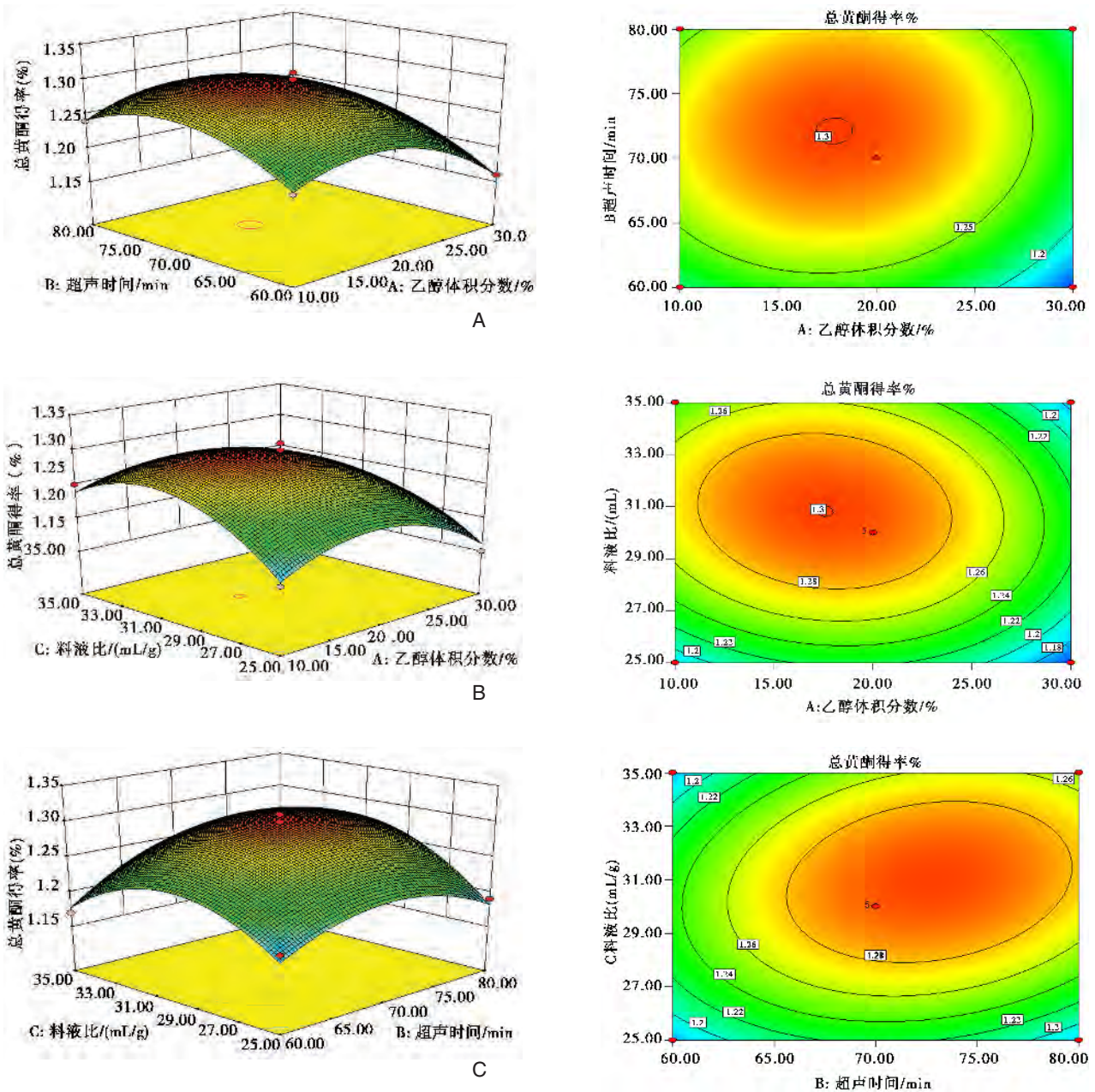
不同浓度下黄酮、对 DPPH 自由基的清除率如表 4 所示,可知随着黄酮浓度的增加,对自由基的清除率逐渐增大,当浓度为 0.60 mg/mL 时,其清除率为 78.97%;总黄酮提取物的 IC₅₀ 为 0.28 mg/mL,说明黄皮叶总黄酮类在一定浓度条件下对 DPPH 自由基具有一定的清除能力。

2.4.2 对·OH 自由基的清除效果

不同浓度下黄酮对·OH 的清除率如图 4 所示,随着黄皮叶总黄酮质量浓度的增加,对·OH 的清除率均逐渐增大,其 IC₅₀ 为 1.152 mg/mL,说明黄皮叶中的黄酮类成分在一定浓度条件下对·OH 的清除具有清除能力。

2.4.3 FRAP 值法总抗氧化能力的测定

由试验结果求得三价铁还原抗氧化能力的线性回归方程 $y=0.0006x-0.0143$,相关系数 $r=0.9986$ 。其表明 FeSO₄ 浓度在 0 μmol/L~1 200 μmol/L 范围内与吸光度有良好的线性关系。不同浓度黄酮的还原能力如表 5 所示,由图 5 可知,随着浓度的



A: 超声时间和乙醇体积分数; B: 乙醇体积分数和料液比; C: 超声时间和料液比

图2 各因素对得率的响应面分析

Figure 2 Interactive effects of the factors on respond surface method analysis

表4 DPPH法测定黄皮叶总黄酮抗氧化能力

Table 4 DPPH assay for estimating antioxidant capacity from the flavonoids of *Clausena lansium* leaves

浓度(mg/mL)	0.12	0.24	0.36	0.48	0.60
清除率(%)	20.87	41.17	59.15	71.51	78.97
IC ₅₀ (mg/mL)	0.2820				

逐渐增加,FRAP值越高,即其还原能力也逐渐增加^[9],并呈现出一定的相关性($r=0.9987$)。

3 讨论

黄酮是一类在植物界中分布广泛、具有多种生物活性的化合物,经研究发现,天然来源的生物黄酮具有分子量小,能被人体迅速吸收,有明显的

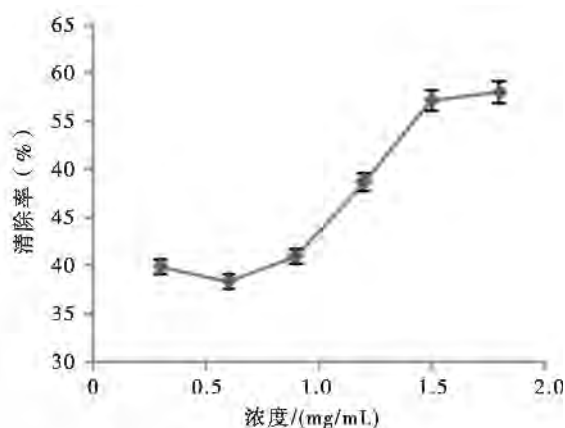


图4 黄皮叶总黄酮对羟自由基的清除效果

Figure 4 Scavenging capacity of total flavonoids extracted from *Clausena lansium* leaves for hydroxyl free radicals

表5 黄皮叶总黄酮 FRAP 法还原能力的测定结果

Table 5 Determination of total flavonoids in *Clausena lansium* leaves FRAP reduction ability

浓度(mg/mL)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
吸光度	0.26	0.41	0.60	0.81	0.99
FRAP 值($\mu\text{mol/L}$)	283.3	533.3	845.0	1183.0	1500.0

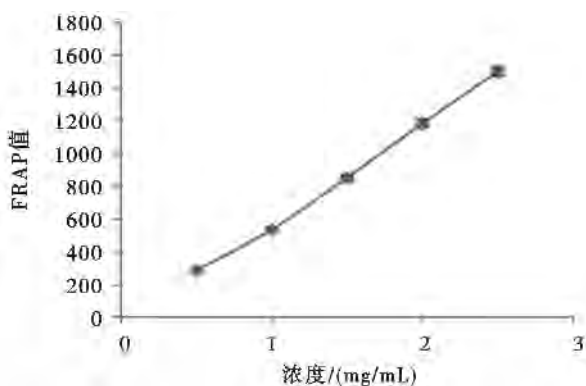


图5 黄皮叶总黄酮浓度与还原能力的相关性

Figure 5 Relevance between total flavonoid extracted from *Clausena lansium* leaves and reducing ability

抗衰老、抗菌抗氧化、降血脂、降血糖、抗癌防癌及调节免疫功能的作用^[10-11]。黄酮含量的测定方法有紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法等。本实验采用了紫外-可见分光光度法,该法线性、重现性和稳定性良好,操作简便、可行。响应面法作为一种有效的试验设计方法,近年来不断地应用于中药提取工艺的优化^[12]。因它可进行多因素、多水

平以及各因素的交互作用研究,并根据综合指标得到最优化的工艺结果,所以这种方法显示出较其他设计方法有明显的优势。本实验采用响应面法优化超声辅助提取黄皮叶总黄酮的工艺,以总黄酮提取率为指标,考察提取过程中乙醇体积分数,超声时间,和料液比对指标的影响。其中超声时间与料液比因素之间的交互作用显著。利用响应面法得到的黄皮叶总黄酮提取工艺参数真实、可靠,具有实用价值。

由实验结果可知,黄皮叶总黄酮在一定浓度条件下对·OH,DPPH 自由基均具有清除作用,其清除率随质量浓度的增加而增大、具有一定的量效关系,所得的 IC₅₀ 分别为 1.152 mg/mL,0.282 mg/mL,甚至比名贵中药,如:铁皮石斛多酚和黄铜的抗氧化性要好^[13](氯仿层提取物的·OH,DPPH 自由基的 IC₅₀ 分别为 1.589 mg/mL,0.394 mg/mL)。抗氧化物质的抗氧化活性主要表现在抑制脂质氧化降解、清除自由基、抑制促氧化剂(如螯合过渡金属)、还原性或者促进机体产生内源性抗氧化物质[如抗超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),触媒(cata-lase, CAT),谷胱甘肽(Glutataione, GSH)]等几方面^[14-15]。用化学反应法测定抗氧化活性的方法有很多,大多数方法仅是对某一种自由基的清除活。铁离子还原法(FRAP)法利用 Fe³⁺被还原成 Fe²⁺,从而使其与三吡啶三吡嗪[2, 4, 6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ]形成的复合物吸光度发生变化这一原理来测定样品的抗氧化活性,不是针对某一种自由基的清除活性,而是反映总的抗氧化活性。黄小桃等^[2]研究发现黄皮叶具有治疗糖尿病的作用,并能有效提高糖尿病大鼠血清的抗氧化作用,改善活性氧自由基代谢紊乱。而 Ma 等^[16]研究发现黄皮叶具有降血糖、抗氧化活性,同时张福平等^[17]也发现黄皮叶中黄酮具有良好抗氧化活性。因此根据本试验结果提示这可能与黄皮叶中黄酮有关,值得进一步深入研究,如对黄皮叶总黄酮提取物进行纯化和分离,进一步确定其中的抗氧化有效成分结构,进行体内活性试验等。

现有研究表明,黄皮叶主要化学成分为氨基酸、多糖及多种黄酮类等化合物。所以,研究黄皮叶中黄酮类化合物的提取工艺及活性的作用,对充分、综合利用该物具有积极意义,且黄皮叶原料较丰富、总黄酮含量较高、黄皮叶总黄酮类清除自

由基能力较强、黄酮化合物又具有多种生理活性功能,值得深入开发利用研究。

参考文献

- 覃国忠,廖曼云. 黄皮叶降血脂作用的实验研究[J]. 广西植物, 1987,7(2):155-158.
- [1] 黄小桃,李颖仪,郑侠,等. 黄皮叶对链脉佐菌素诱导的糖尿病大鼠作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(6):651-656.
- [2] 张黎明,李春莲. 大孔吸附树脂分离纯化山楂叶总黄酮的研究[J]. 林产化学与工业, 2006,26(1):87-90.
- [3] 杨静,李爽,钱芳,等. 应面法优选黄蜀葵花多糖的提取工艺[J]. 中国药房, 2013,24(39):3688-3690.
- [4] 丰永红,于淑娟,李国基. DPPH 法测甘蔗提取物抗氧化活性研究[J]. 甘蔗糖业, 2003, (1):31-33.
- [5] 张黎明,李瑞超,郝利民,等. 响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2014,30(4):233-239.
- [6] Benzie I, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay [J]. Analytical biochemistry, 1996,23 (9): 70-76.
- [7] Xu JR, Zhang MW, Zhang RF, et al. Correlation between antioxidation and the content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions [J]. Agricultural Sciences in China, 2007,6(2):150-158.
- [8] 赵文恩,李茜倩. FRAP 法测定大枣皮红色素的总抗氧化能力[J]. 郑州大学学报, 2011,32(3):29-30.
- [9] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003,23(12):2241-2247.
- [10] Tao Y, Zhang Y, Cheng Y, et al. Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR [J]. Biomedical Chromatography, 2013,27(2):148-155.
- [11] 徐金龙,张红梅,徐秀泉. 响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房, 2011,22(27):2536.
- [12] 黄琴,沈阳霞,张成静,等. 铁皮石斛多酚黄酮含量及与抗氧化活性的相关性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(3):438-442.
- [13] Zhi NX, Zheng XG. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in south-china honeysuckle [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, (41):1189-1203.
- [14] Yu HH, Liu XG, Xing RE, et al. In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jelly fish rhopilema esculentum [J]. Food Chemistry, 2006,148(95): 123-130.
- [15] Ma N, Wu K, Huang L. An elegant synthesis of zeta-clausenamide [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43(4):893-896.
- [16] 张福平,汤艳姬,刘晓珍,等. 黄皮叶黄酮类化合物的抗氧化性研究[J]. 南方农业报, 2013,44(8):1343-1346.
- [17]

·论 著·

2004年~2013年肺癌患病风险基因相关临床研究文献的计量学分析

邹建军 苏珊* 张贤兰 黄惠怡 岑文昌

[摘要] 目的 掌握近10年来国内外肺癌患病风险基因相关临床研究动态。方法 以Embase、Pubmed为文献检索数据库(2004年1月至2013年12月),分别对纳入文献的出版年、国家、期刊、研究机构、作者及所研究基因进行计量学分析。结果 该领域年发文量一直较多,2004年到2008年缓慢增长,2008年后则趋向平缓;发文量最多的国家、期刊、机构及作者分别为美国、《Lung Cancer》(肺癌)、MD Anderson Cancer Center(美国MD安德森癌症中心)、Park JY;该领域共统计出相关基因312个,其中以p53和CDKN1A基因研究最多。结论 肺癌患病风险基因相关临床研究仍受广大研究员关注,且涉及基因种类繁多,寻找有特异性和敏感性的基因至关重要。

[关键词] 肺癌;患病风险基因;文献计量学

Bibliometrics analysis of clinical research literature on lung cancer predisposing genes from 2004 to 2013

ZOU Jianjun, SU Shan*, ZHANG Xianlan, HAUNG Huiyi, CEN Wenchang

(The Oncology Department of Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511095)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the status of clinical research literatures on lung cancer predisposing genes in recent 10 years. **Methods** The clinical trails related to lung cancer predisposing genes were searched through Embase, and Pubmed database between January 2004 and December 2013. The publication years, origin of countries, journals, institutions, authors and genes of the eligible bibliometric were analyzed. **Results** A total of 674 publications were included. The numbers of publications was always high, increased slowly in the first five years, and were stable in the second five years. The origin of countries, journals, institutions and authors with the largest number of publications was United States, *Lung Cancer*, MD Anderson Cancer Center, Park, J.Y, respectively. The publications included 312 genes in this field, with p53 and CDKN1A gene being the most. **Conclusion** Lung cancer predisposing genes are still under the researchers' attention, and involved a wide variety of genes. Searching for more sensitive and specific genes will be an important target in the future researches.

[KEY WORDS] Lung cancer; Predisposing genes; Bibliometric

肺癌是世界范围内最常见的癌症,近50多年来,世界各国特别是工业发达国家肺癌的发病率和病死率均迅速上升。1955年~2005年我国肺癌发病率以每年1.63%的速度增长,至2005年我国肺癌新发病例数为536 407人,死亡病例数475 768人^[1]。根据中国癌症中心登记数据显示,2010

年中国肺癌发病率为46.08/100 000,在所有肿瘤里面其发病率是最高的^[2]。美国2010年新发肿瘤患者150多万,其中肺癌患者22万多例,约占总数的15%,也是居各类癌症之首^[3]。吸烟一直被认为是肺癌的主要危险因素,但是一些长期吸烟的人从未罹患肺癌,而一些不吸烟的人反而罹患肺

基金项目:广东省医学科研基金(A2013527);广州市医药卫生科技资助项目(20131A011078)

作者单位:广州市胸科医院肿瘤科,广东,广州 511095

*通讯作者:苏珊, E-mail: susan705@126.com

癌,说明个体对肺癌的患病风险存在差异。因此有必要寻找肺癌的易感基因,为肺癌的防治提供参考。为了更好地掌握肺癌患病风险相关基因的研究动态和发展趋势,我们运用文献计量的方法,对有关肺癌易感性基因的研究文献进行了分析与评价。

1 材料与方法

1.1 文献检索

选取目前全球最大最具权威性的生物医学与药理学文献数据库,位于荷兰的 Embase 数据库和美国的 Medline/Pubmed 数据库,2 个收录范围既有交叉又有区别的权威数据库进行检索。为提高文献的查准率,Embase 数据库进行 Emtree (主题检索)扩展检索,辅以自由词的题目及摘要字段的检索;Medline/Pubmed 数据库进行 MeSH(主题检索)检索,辅以自由词的题目及摘要字段的检索。拟定的检索词为肺癌风险、肺癌、风险及基因。肺癌的英文检索词包括 (1)MeSH 词 lung neoplasm (肺癌), (2)EMtree 词 lung cancer(肺癌), (3)自由词检索使用 lung cancer(肺癌)、lung tumor * (肺部肿瘤)、lung neoplasm * (肺癌)、lung carcinoma * (肺癌)、Pulmonary neoplasm * (肺癌)。风险的英文检索词包括 (1)MeSH 词 risk(风险), (2)EMtree 词检索使用 risk, (3)自由词检索使用 lung cancer risk * (肺癌风险)、risk * of lung cancer(肺癌风险)。

基因的英文检索词为 gene * (基因)。检索时间限定为 2004 年 1 月至 2013 年 12 月,物种限定为人类,语种不限。

1.2 文献纳入与排除标准

(1)全部与研究疾病发生风险有关基因及基因产物的临床研究; (2)meta 分析或系统评价文献; (3)纳入文献能提供足够信息的摘要或可以获取全文资料。个案研究(病例报道)不纳入分析。数据库来源不同,但作者、题目及出版年相同的文献按 1 篇统计。纳入与排除的过程由 2 名研究人员独立进行并交叉核对,若有不同意见则与临床医生(主任医师)、专业研究员等组成的小组讨论决定。

1.3 文献计量分析

对最终纳入文献的出版年 (when)、作者 (who)、国家(where)、研究机构(where)、发表期刊(where)、对涉及的基因(what)及其产物进行计量学分析。

2 结果

2.1 检索结果

Embase 数据库检出文献 2 058 篇, Medline/Pubmed 数据库检出文献 1 185 篇。去重后,两库共检出文献 2 311 篇,人工筛选后共纳入 674 篇文献。

2.2 计量学分析结果

2.2.1 文献发表年限分析

2004 年 1 月至 2013 年 12 月肺癌患病风险相关基因临床研究文献分布如图 1。该领域每年发文量均在 45 篇以上。2008 年前文献数量增长较为缓慢,至 2008 年达到最高(104 篇)。2008 年后发文量开始下降,发文量基本在 60 篇上下波动。

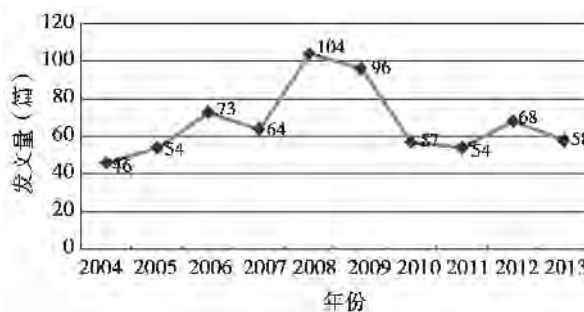


图 1 2004 年~2013 年发表肺癌患病风险相关文献年份分布
Figure 1 The distribution of literatures about lung cancer risk from 2004 to 2013

2.2.2 世界各国研究文献发文章量分析

统计发现进行该领域研究的国家和地区达 42 个,发文章量前 10 名国家分布如图 2 所示。美国在此领域发文章量最多,达 162 篇,中国次之。同时可见发文章量前 10 名的国家中,大多数为发达国家。

2.2.3 期刊分析

纳入的研究的文献发表在 168 种生物医学期刊上,平均每刊发文 4.01 篇。发文章量排前 10 名的期刊分布如表 1 所示。英文期刊《Lung Cancer》(肺癌)发文章量最多,《Carcinogenesis》(癌症)次之。2004 年~2013 年发表的肺癌患病风险相关基因研究文章排前 10 名期刊占总发表论文数的 56.4%,提示该领域文献刊登的期刊数目繁多,但仍有一定的集中性。

2.2.4 文献发表的研究机构

为避免产生重复数据,仅统计了通讯作者的机构。对 674 文献的研究机构进行统计分析,共统

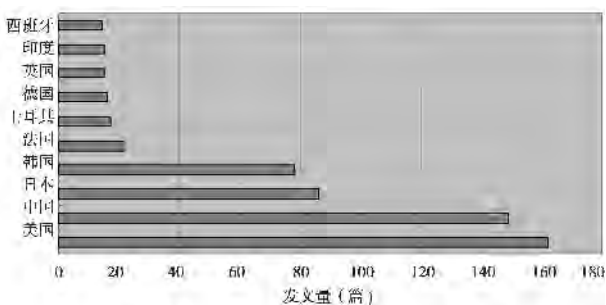


图 2 2004~2013 年发文章量排名前 10 名的国家
Figure 2 The amount of published literatures of the top 10 countries from 2004 to 2013

计出 280 个研究机构进行患肺癌风险相关基因方面研究,发文章量排名前 10 名的机构见表 2。其中以美国的 MD Anderson Cancer Center(MD 安德森癌症

中心)发文章量最多,而韩国的 Kyungpook National University(庆北国立大学)次之;国内以中国医学科学院及南京医科大学研究比较多。

2.2.5 文献发文章量超过 4 篇的作者及研究机构

根据洛特卡和普赖斯对科学家的生产率 and 活动规律的研究^[4],发表论文为 N 篇以上的作者为该学科的杰出科学家,即核心作者,其中 $N = 0.749 \times (\eta_{max})^{1/2}$, 式中 η_{max} 为发文章量最多的作者发表的论文数量。本研究发文章量发现韩国的 Park 在 10 年间发文章量最大(8 篇),为该领域作出了巨大贡献。由此可知 $\eta_{max} = 8$,代入上述公式得到 $N = 2$,即发文章量 > 2 篇的作者为核心作者。统计发现 592 第一作者中,核心作者共有 28 个。其中发文章量 > 2 作者详见表 3。

表 1 2004 年~2013 年发文章量前 10 名的期刊
Table 1 The amount of published literatures of the top 10 journals from 2004 to 2013

期刊名称(英文)	期刊名称(中文)	发文章量
Lung Cancer	肺癌	70
Carcinogenesis	癌症	54
International journal of cancer	国际癌症杂志	44
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	癌症流行病学,生物标记物 & 预防	37
cancer research	癌症研究	36
Cancer Letters	癌症快报	21
Clin Cancer Research	临床癌症研究	20
Cancer Genet Cytogenet	癌症遗传学细胞遗传学	16
Oncogene	癌症	16
Anticancer Research	抗癌研究	15
Mol Carcinog	分子肿瘤	15
British Journal of Cancer	英国癌症杂志	12
Cancer	癌症	12
Mutat Research	突变研究	12

2.2.6 文献中涉及的患肺癌风险相关基因分析

674 篇肺癌患病风险相关基因研究文献共涉及相关基因 312 个,发文章量排名前 10 名的基因见表 4。从 2004 年 1 月至 2013 年 12 月,文献研究最多的肺癌患病风险基因为 :p53, CDKN1A, GSTM1 等,说明这些基因是肺癌患病风险基因研究领域的热点,未来仍然是研究的重点。

3 讨论

本文对 2004 年~2013 年 Embase、Pubmed 数据库中肺癌患病风险基因相关临床研究的文献进行

了计量学分析,发现肺癌患病风险相关基因方面的研究目前正处于稳定发展阶段,多个国家已经开展了这方面的研究。该领域每年发表的文献均在 45 篇以上,2004 年至 2008 年期间持续增长,此后略有下降并保持稳定。这说明科研工作人员对该领域的研究在 2008 年前后已经达到比较成熟阶段。2008 年开始有所下降,可能是由于近年来欧美国国家重视肺癌的预防,尤其是美国控烟工作的完善,吸烟率下降明显,而使得肺癌的发病率下降。

我们发现,该研究领域发文章量排名前十的国家多为发达国家,这可能是因为基因相关临床研

表2 2004年~2013年该领域发文量前10名的机构

Table 2 The amount of published literatures of the top 10 institutions from 2004 to 2013

单位名称(英文)	单位名称(中文)	国家	发文量
MD Anderson Cancer Center	美国安德森肿瘤中心	美国	33
Kyungpook National University	韩国庆北国立大学	韩国	31
Chinese Academy of Medical Sciences	中国医学科学院	中国	23
Harvard School of Public Health	哈佛大学公共卫生学院	美国	22
National Cancer Institute	美国国立癌症研究所	美国	19
University of Pittsburgh	匹兹堡大学	美国	13
Nanjing Medical University	南京医科大学	中国	11
National Cancer Center Research Institute	国家癌症中心研究所	日本	11
University of Texas	德克萨斯大学	美国	11
Aichi Cancer Center	爱知县癌症中心	日本	10

表3 2004年~2013年该领域研究的核心作者

Table 3 The core authors in this field from 2004 to 2013

作者	机构	国家	发文量
Park JY	Kyungpook National University	韩国	8
Hu Z	Cancer Research Center of Nanjing Medical University	中国	7
Yin J	Shenyang Medical College	中国	7
Sobti RC	Panjab University	印度	6
Keohavong P	University of Pittsburgh	美国	5
Zhou W	Harvard School of Public Health	美国	5
Lee SH	Catholic University of Korea	韩国	4
Lin D	Chinese Academy of Medical Sciences	中国	4
Shimizu K	Kinki University	日本	4
Sorensen M	Danish Cancer Society	丹麦	4
Toyooka S	University of Texas	美国	4
Wu X	MD Anderson Cancer Center	美国	4

表4 2004年~2013年发文量前10名的基因

Table 4 The top 10 genes in this field from 2004 to 2013

基因名	基因通用名	基因认证号(ID)	发文量
<i>p53</i>	<i>Tp53</i>	7157	59
<i>P21</i>	<i>CDKN1A</i>	1026	54
<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1</i>	2944	41
<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1A1</i>	1543	37
<i>XRCC1</i>	<i>XRCC1</i>	7515	36
<i>ERCC2</i>	<i>ERCC2</i>	2068	29
<i>KRAS</i>	<i>KRAS</i>	3845	22
<i>RASSF1A</i>	<i>RASSF1A</i>	11186	22
<i>EGFR</i>	<i>EGFR</i>	1956	19
<i>MGMT</i>	<i>MGMT</i>	4255	19
<i>myeloperoxidase</i>	<i>MPO</i>	4353	17
<i>hOGG1</i>	<i>OGG1</i>	4968	16
<i>RAR(beta)</i>	<i>RARB</i>	5915	16

究使用的检测基因或蛋白的方法成本较高,需要一定的经济实力支撑才能开展。此外,我们对发文量较多的作者、单位和期刊进行了分析和汇总,从而为研究员快速了解该领域研究动态提供了一定的参考的指引作用。

在肺癌患病风险基因研究中,其中研究 *p53* 的最多, *CDKN1A* 次之。 *p53* 是一种肿瘤抑制基因, Lane 和 Crawford^[5]于1979年发现了一种编码蛋白质为53 KD的基因,故命名为 *p53* 基因。有研究^[6]表明,突变型 *p53* 蛋白在非小细胞肺癌中的阳性表达率为30%~65%。在小细胞肺癌中的阳性表达率为44%~80%。 *p53* 基因突变是肺癌发生的重要关键基因之一, Rafnar等^[7]研究发现在 *p53* 上15q15.2发生突变,肺癌患病风险明显增加。在一

些回顾性研究^[8-9]中发现 *p53* 基因 codon 72 多态性能够提示肺癌高危性。Liu^[10]等对 15 篇文章中 1 770 肺癌病人进行 meta 分析, 发现吸烟病人中 *p53* 突变的概率是不吸烟病人的 2.7 倍, 提示吸烟患者中 *p53* 突变更高, 同时提示患肺癌风险更高。多项研究^[11-13]还表明, *p53* 基因 codon 72 多态性是肺癌易感性一个重要因素, 但具体机制尚未明确, 这可能是未来肺癌易感性研究的方向之一。*CDKN1A* 基因定位于人第 6 号染色体短臂的 2 带 1 区 (6p21.2), 其为单拷贝基因, 是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员。*CDKN1A* 既与肿瘤抑制作用密切相关, 又能通过抑制周期素依赖激酶复合物活性, 协调细胞周期、DNA 复制与修复之间的关系, 从而将肿瘤抑制作用与细胞周期控制过程紧密相连。Ma 等^[14]研究显示 *CDKN1A* 突变可成为预测肿瘤患病风险潜在指标。而在肺癌的研究中, Choi^[15]发现 *CDKN1A* 如果出现 3 个位点突变, 提示患肺癌风险更大。

根据本研究结果, 我们提出未来研究方向: 在单一基因的分析中, 可以发现一些基因与肺癌患病风险之间有关联的阳性结果, 大多是一些抑癌基因突变或多态性与肺癌患病风险增加的关联, 如 *p53*、*CDKN1A* 等。但未找到明确的关键基因或瓶颈基因, 其特异性及敏感性仍有待进一步研究。由于肺癌患病过程的复杂性, 单一基因的改变往往与其相关性较小, 未来可以关注多个基因联合检测。联合其他基因共同预测来提高预测效能也是一种较可靠的方法, 然后再进一步证实它们各自的作用权限。总的来说, 随着越来越多的肺癌患病风险基因的发现, 相关研究也会越来越具体化, 其作用机制及应用也会更加明确。这将有助于发现肺癌发病过程中的致病通路, 找到其中的关键基因, 更好地预测肺癌的患病风险, 寻找肺癌新的治疗靶点。

参考文献

- [1] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5):4488-4493.
- [2] Zhou C. Lung cancer molecular epidemiology in China: recent[J]. Trends Transl Lung Cancer Res, 2014, 3(5): 270-279.
- [3] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer Journal for Clinicians, 2010, 60(5): 277-300.
- [4] 刘婧. 文献作者分布规律研究[J]. 情报科学, 2004, 22(1):123-128.
- [5] Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells[J]. Nature, 1979, 278(5701):261-263.
- [6] Paik KH, Park YH, Ryoo BY, et al. Prognostic value of immunohistochemical staining of p53, bcl-2, and Ki-67 in small lung cancer[J]. J Korean Med Sci, 2006, 21(1):35-39.
- [7] Rafnar T, Sulem P, Besenbacher S, et al. Genome-wide significant association between a sequence variant at 15q15.2 and lung cancer risk [J]. Cancer Res, 2011, 71(4):1356-1361.
- [8] Ye XH, Bu ZB, Feng J, et al. Association between the p53 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(1):373-385.
- [9] Mosaid MS, Ahmed MU, Islam MS, et al. Lung cancer risk in relation to p53 codon 47 and codon 72 polymorphism in Bangladeshi population[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10):10309-10317.
- [10] Liu X, Lin XJ, Wang CP, et al. Association between smoking and p53 mutation in lung cancer: a meta-analysis[J]. Clin Oncol, 2014, 26(1):18-24.
- [11] Fernández Rubio A, López-Cima MF, González-Arriaga P, et al. The p53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer risk in a population of Northern Spain[J]. Lung Cancer, 2008, 61(3):309-316.
- [12] Popanda O, Edler L, Waas P, et al. Elevated risk of squamous-cell carcinoma of the lung in heavy smokers carrying the variant alleles of the p53 Arg72Pro and p21 Ser31Arg polymorphisms[J]. Lung Cancer, 2007, 55(1):25-34.
- [13] Andujar P, Páiron JC, Renier A, et al. Differential mutation profiles and similar intronic p53 polymorphisms in asbestos-related lung cancer and pleural mesothelioma[J]. Mutagenesis, 2013, 28(3):323-331.
- [14] Ma H, Zhou Z, Wei S, et al. Association between p21 Ser31Arg polymorphism and cancer risk: A meta-analysis[J]. Chinese Journal of Cancer, 2011, 30(4):254-263.
- [15] Choi YY, Kang HK, Choi JE, et al. Comprehensive assessment of P21 polymorphisms and lung cancer risk [J]. Journal of Human Genetics, 2008, 53(1):87-95.

人乳头瘤病毒 52 型 E2 和 E6/E7 在宫颈病变中的表达及其意义

李岳军¹ 周妙姬² 邱峰^{1*}

[摘要] 目的 观察人乳头瘤病毒 52 型(human papillomavirus 52, HPV52) E2 及 E6/E7mRNA 在宫颈癌及癌前病变组织中的表达以及高危型 HPV 分布情况, 探讨 HPV52 感染及 E2、E6/E7 表达在宫颈癌发生发展中的临床意义。方法 收集 512 例高危型 HPV 阳性病例, 依据病理学诊断归入非典型鳞状上皮细胞病变组(atypical squamous cell lesions, ASC)、低度鳞状上皮内病变组(low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL 组)、高度鳞状上皮内病变组(high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)以及鳞状细胞癌组(squamous cell carcinoma, SCC)。以实时荧光定量 PCR 方法检测 124 例 HPV52 阳性样本 E2 及 E6/E7 mRNA, 并进行卡方检验及 Spearman 相关性分析。结果 HPV52 型 E2 与 E6/E7mRNA 呈负相关, $r_s = -0.98$, $P < 0.01$, 两者检出率在组间有统计学差异($P < 0.05$)。在 13 种高危型 HPV 中, 检出率最高前三位为 HPV52(24.2%)、HPV58(20.5%)、HPV16(11.7%)。结论 HPV52 型 E2 缺失、E6/E7 表达过度是宫颈癌变的关键环节, E2、E6/E7 水平在评估宫颈病变程度中具有参考价值。同时, HPV52 型在宫颈癌的发展其作用值得进一步研究。

[关键词] 人乳头瘤病毒 52 型(HPV52 型); E2; E6/E7; 宫颈癌

Expression of E2 and E6/E7 of human papillomavirus-52 and its significance in cervical lesions

LI Yuejun¹, ZHOU Miaojij², QIU Feng^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China, 510120; 2. HybriBio Limited, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

[ABSTRACT] Objective To explore the clinical significance on expressions of E2 and E6/E7 in human papillomavirus 52 in the development of cervical cancer. Methods Based on the pathological features, 512 HR HPV-positive samples were classified into 4 groups which were atypical squamous cell lesions (ASC), low grade squamous intraepithelial lesion(LSIL), high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and squamous cell carcinoma (SCC). E2 and E6/E7 mRNA were detected among 124 HPV52-positive samples. The statistics were analyzed by Chi-squared test and Spearman correlation method. Results There was negative correlation between expressions of E2 and E6/E7 ($r_s = -0.98$, $P < 0.01$), and there were significantly different positive rates among groups. Among all the 13 common types of HPV, the positive rate of HPV52 was the highest (24.2%), followed by HPV58(20.5%) and HPV16 (11.7%). Conclusion The deletion of HPV52 E2 or over expression of E6/E7 is the key link of cervical cancer, which produce reference value in evaluating the degree of cervical lesions. HPV52 may play a vital role in cervical carcinogenesis, which is worth for further study.

[KEY WORDS] Human papillomavirus 52(HPV52); E2; E6/E7; Cervical carcinoma

基金项目:广东省人口和计划生育委员会科研项目(20133061)

作者单位:1. 广东省中医院检验科, 广东, 广州 510120

2. 凯普生物科技有限公司, 广东, 潮州 521000

*通讯作者:邱峰, E-mail: qfsfl@126.com

持续的高危型人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染在宫颈癌发生发展中起关键作用, 高危型 HPV 可从 90% 以上宫颈癌组织中分离得到, 且近年来检出率有上升趋势^[1]。在大量已有研究中, HPV16 型及 HPV18 型因其在宫颈癌组织中的高检出率, 被认为有高致癌风险, 与宫颈癌的发生及发展密切相关, 成为研究热点^[2]。近几年有研究发现 HPV52 型在亚洲地区检出率有所上升, 研究统计得出其检出率在世界范围仅次于 HPV16 及 HPV18 型^[3-4]。在部分地区, HPV52 型在宫颈病变中检出率在常见高危型 HPV 中位居第一^[5]。已知病毒基因整合人宿主基因, 在肿瘤进展中起重要作用, 在 HPV DNA 中存在 L1、L2、E1、E2、E4、E5、E6、E7、LR9, 共 9 个基因区段, 分别编码相应产物^[6]。其中 E2 编码 E2 蛋白, 后者起调节稳定复制、转录作用。下调 E6 和 E7 表达, 阻碍肿瘤发生发展的进程。HPV 基因整合可导致 E2 基因断裂, 使 E2 表达下降^[7]。有研究表明 E2 与 E6、E7 表达水平, 能用于判断宫颈病变程度及治疗效果^[8]。目前市面上预防宫颈癌疫苗仅针对的高危型仅有 HPV16 及 HPV18 型。结合目前 HPV52 型检出率居高并有攀升趋势, 本实验旨在初步探讨 HPV52 型 E2 及 E6、E7 表达情况, 并分析医院近期高危型 HPV 检出情况, 或为后续实验寻找新型治疗靶点作依据。

1 材料和方法

1.1 病例资料

样本来源为 2013 年 10 月至 2014 年 1 月期间, 广东省中医院妇科门诊行 HPV 高危亚型感染检查并行新柏氏液基细胞学检测 (thinprep cytologic test, TCT) 检查的女性患者, 有性生活史, 年龄为 20 至 60 岁。挑选出 HPV 高危型阳性病例, 依据 Bethesda 系统病理学分型结果^[9], 将患者归入非典型鳞状上皮细胞病变组 (atypical squamous cell lesions, ASC)、低度鳞状上皮内病变组 (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL 组)、高度鳞状上皮内病变组 (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 以及鳞状细胞癌组 (squamous cell carcinoma, SCC)。从中选取 HPV 52 型阳性的病例作为研究对象, 检测 HPV 52 型 E2 及 E6/E7mRNA。

1.2 主要试剂

高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒、14 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 荧光 PCR 试剂盒均购自中国凯普生物科技有限公司。实验所需引物、探针由上海英俊公司合成。

1.3 主要仪器

瑞士罗氏 Roche Lightcycler480 荧光定量 PCR 仪。

1.4 方法

1.4.1 标本采集及处理

用棉拭子将宫颈过多的分泌物擦去。将锥形刷在宫颈口处轻轻旋转 3~5 圈, 以取得足量宫颈脱落细胞, 将锥形刷置入盛有 4 mL 细胞保存液的样本管中, 旋紧管盖, 做好样品标识, 立即送检。将样本涡旋振荡 10 min 使锥形刷上粘附的细胞充分脱落。弃去刷子。

1.4.2 筛查 HPV 高危型

按照高危型人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒说明, 对所有样本进行 HPV 16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68 共 13 种高危型筛查。剩余宫颈脱落细胞液置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.4.3 HPV E2 及 E6/E7 检测

选取 HPV 52 型阳性原始备用样本, 在 14 种高危型 HPV E6/E7 mRNA 荧光 PCR 试剂盒基础上改进, 进行 HPV52 型 E2、E6/E7mRNA 检测。PCR Mix 由实验室自行配备, 内参考为 GAPDH, 每批检测设立阳性、阴性对照。Ct 值 ≤ 36 者为阳性。具体引物及探针序列如表 1 所示。

1.4.4 数据分析

用 SPSS 19.0 对数据进行卡方检验及 Fisher 精确检验, 两两比较 HPV 52 型 E2、E6/E7 mRNA 检出率在各病理分型组之间的差异, 当 P 值 < 0.05 时, 判断为阳性率在组间的差异有统计学意义, 并进行 Spearman 相关性分析。对 13 种 HPV 高危型检出率分布作分析。

2 结果

2.1 HPV 高危型筛查结果

2013 年 10 月至 2014 年 3 月期间, 通过筛查, 共得 512 例 HPV 高危型阳性结果, 其中 ASC126 例、LSIL 组 124 例、HSIL233 例、SCC 组 29 例。在

表1 HPV E2 E6/E7 mRNA 及内参考物 GAPDH 引物序列
Table 1 The sequences of HPV E2 E6/E7 mRNA and GAPDH primers

目标基因	序列	报告荧光	检测通道
E2	上游引物:GCCACAAACGGTCACGAG	-	-
	下游引物:TGCGGAAGCATTTCAGAGTGT	-	-
	探针序列:CTAACCTCCGTGGCGTCTCTCCTG	FAM	FAM
E6/E7	上游引物:GGAGACAAAGCAACCATA	-	-
	下游引物:GTCCACACCATCTGTATC	-	-
	探针序列:AAACAACCTGACCTACACTGCTATGA	FAM	FAM
GAPDH	上游引物:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	-	-
	下游引物:AGGGGCCATCCACAGTCTTC	-	-
	探针序列:GCGAGCCTGGCATTGCCCTCAACGACCACGCTCGC	HEX	HEX

512例样本结果中, 检出率最高的 HPV 型从高到低依次为 HPV52 (22.8%)、HPV58 (19.3%)、HPV16 (11.0%)、HPV18 (9.2%)、HPV33 (6.1%)。在所有样本中, 双重病毒感染率为 6.3% (32/512), 未发现 3 种或以上病毒共同感染病例。13 种高危型 HPV 检出结果如表 2 所示。经 SPSS 进行统计学分析, 发现 HPV16、HPV18、HPV52 型检出率在各组间有统计学差异 ($P < 0.05$), HPV16 型检出率在 ASC 与 SCC、LSIL 与 SCC、HSIL 与 SCC 组间 P 值分别为 0.001、0.001、0.006; HPV18

型检出率在 ASC 与 SCC、LSIL 与 SCC 组间 P 值均为 0.009; HPV52 型检出率在 LSIL 与 SCC、HSIL 与 SCC 组间 P 值分别为 0.043、0.034。其中, HPV16 阳性病例中, SCC 组/HSIL 组 OR = 3.4, 95% CI = 1.5 ~ 8.1; HPV18 阳性病例中, SCC 组/HSIL 组 OR = 2.4, 95% CI = 0.9 ~ 6.2; HPV52 阳性病例中, HSIL/SCC 组 OR = 4.6, 95% CI = 1.1 ~ 19.8。检出率分布见图 1。

2.2 HPV52 E2 及 E6/E7 检测结果

通过 RT-PCR 检测 E2 mRNA、E6/E7 mRNA

表2 高危型 HPV 检出结果
Table 2 The results of high-risk HPV detection

HPV	检出例数 (检出率%)				总检出数 (检出率%)
	ASC (N=126)	LSIL (N=124)	HSIL (N=233)	SCC (N=29)	
双重感染	3(2.4%)	7(5.6%)	20(8.6%)	2(6.9%)	32(6.3%)
HPV16	9(7.0%)	10(7.6%)	31(12.3%)	10(32.3%)	60(11.0%)
HPV52	33(25.6%)	30(22.9%)	59(23.3%)	2(6.5%)	124(22.8%)
HPV58	24(18.6%)	29(22.1%)	48(19.0%)	4(12.9%)	105(19.3%)
HPV18	8(6.2%)	8(6.1%)	27(10.7%)	7(22.6%)	50(9.2%)
HPV33	7(5.4%)	6(4.6%)	16(6.3%)	4(12.9%)	33(6.1%)
HPV35	6(4.7%)	5(3.8%)	13(5.1%)	1(3.2%)	25(4.6%)
HPV39	8(6.2%)	10(7.6%)	5(2.0%)	0(0.0%)	23(4.2%)
HPV45	5(3.9%)	7(5.3%)	5(2.0%)	0(0.0%)	17(3.1%)
HPV51	6(4.7%)	5(3.8%)	13(5.1%)	0(0.0%)	24(4.4%)
HPV56	2(1.6%)	2(1.5%)	10(4.0%)	0(0.0%)	14(2.6%)
HPV59	8(6.2%)	7(5.3%)	9(3.6%)	1(3.2%)	25(4.6%)
HPV68	7(5.4%)	6(4.6%)	9(3.6%)	1(3.2%)	23(4.2%)
HPV31	6(4.7%)	6(4.6%)	8(3.2%)	1(3.2%)	21(3.9%)

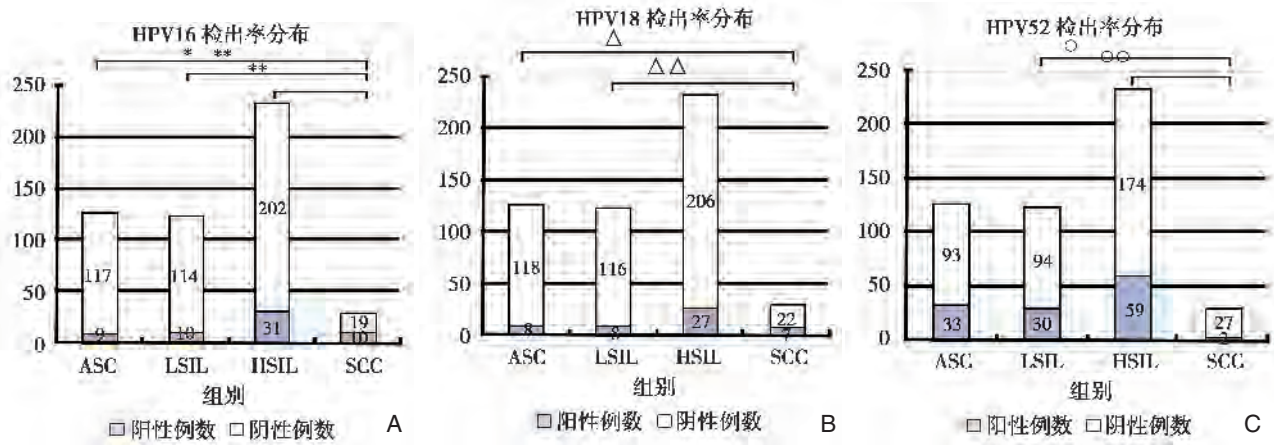


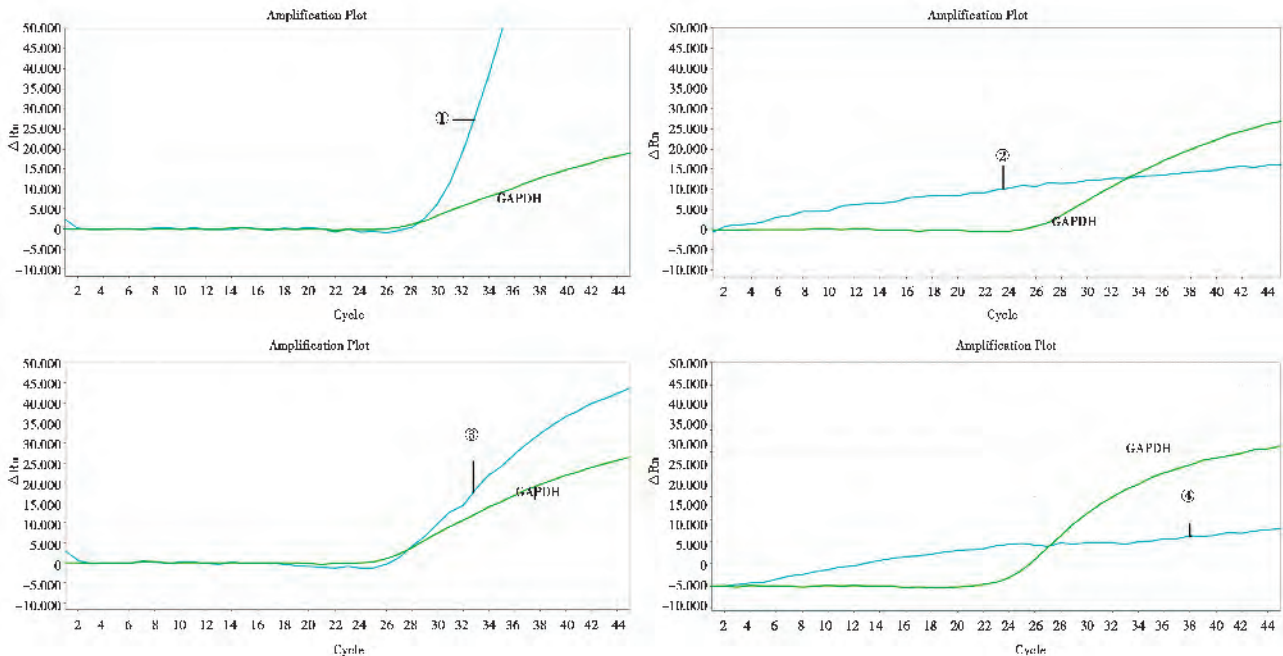
图 A: * 表示 ASC 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.01$; ** 表示 LSIL 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.01$; *** 表示 HSIL 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.01$ 。图 B: Δ 表示 ASC 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 表示 LSIL 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.01$ 。图 C: \circ 表示 LSIL 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.05$; $\circ\circ$ 表示 HSIL 组与 SCC 组之间检出率有统计学差异, $P < 0.05$

图 1 HPV 检出率在各组间的分布

Figure 1 The distribution of positive rates of HPV among different groups

水平,检出率在 LSIL 与 SCC 组、ASC 与 SCC 组、LSIL 与 HSIL 组、ASC 与 HSIL 组间均有统计学差异 ($P < 0.05$), 且 E2 mRNA 与 E6/E7 mRNA 表达

呈显著负相关关系。部分荧光定量 PCR 扩增结果如图 2 所示。E2 mRNA 及 E6/E7 mRNA 检出结果如表 3 所示。



Ct ≤ 36 判定标准下, ①②分别为 E2 检测阳性、阴性结果, ③④分别为 E6/E7 检测阳性、阴性结果

图 2 部分荧光定量 PCR 扩增图

Figure 2 Several amplification plot results of fluorescence quantitative PCR

表3 HPV52 E2 mRNA 和 E6/E7 mRNA 检出结果

Table 3 The detection results of HPV52 E2 mRNA and E6/E7 mRNA

检测基因	检出例数(检出率%)			
	ASC (N = 33)	LSIL (N = 30)	HSIL (N = 59)	SCC (N = 2)
E2	31(94.0%)	28(93.3%)	27(45%)	0(0.0%)
E6/E7	1(3.0%)	2(6.7%)	33(55%)	2(100%)

表4 HPV52 E2 mRNA 和 E6/E7 mRNA 之间相关性

Table 4 Correlation between HPV 52 E2 and E6/E7 mRNA

分组	例数	E2		E6/E7	
		E2+/E6E7+	E2+/E6E7-	E2-/E6E7+	E2-/E6E7-
ASC	33	0(0.0%)	31(94.0%)	1(3.0%)	1(3.0%)
LSIL	30	1(3.3%)	27(90.0%)	1(3.3%)	1(3.3%)
HSIL	59	4(6.8%)	23(39.0%)	29(49.2%)	3(5.1%)
SCC	2	0(0.0%)	0(0.0%)	2(100.0%)	0(0.0%)
合计	124	5(4.0%)	81(65.3%)	33(26.6%)	5(4.0%)

E2 mRNA 和 E6/E7 mRNA 表达呈显著负相关($r_s = -0.98, P < 0.01$)

率仅次于 HPV16 及 HPV18 型,并且有升高趋势^[3-5]。

本实验对 512 例样本进行 13 种 HPV 高危型筛查,并经过统计学分析,在所有病例中,双重 HPV 型别感染占 6.3%,双重感染率在各组间无统计学差异($P > 0.05$)。值得注意的是 SCC 组 2 例双重感染均有 HPV52 型参与,HSIL 组 20 例双重感染中,有 13 例有 HPV52 型参与。在所有病例中,检出率最高的为 HPV52 型,占总数 22.8%,经卡方检验,各组检出率在 LSIL 与 SCC 间、HSIL 与 SCC 两组间有统计学差异($P < 0.05$),通过 OR 值计算发现 HPV52 型检出率在 LSIL 及 HSIL 组中显著高于 SCC 组。可见 HPV52 型在致癌危险性低于 HPV16、HPV18 型,其主要造成宫颈上皮的中度至高度病变,导致宫颈癌的几率较低。此发现与笔者前期研究结论相符:HPV52 亚型在中国,特别是广州地区,是 HPV 感染的优势型别^[10]。HPV52 型尽管在总检出率中高居第一位,但在宫颈癌组中仅检出 2 例(10.5%),且检出率随宫颈病变的严重程度的升高而降低,在 CIN II 和 CIN III 组间比较有差异。说明感染 HPV52 型后,进一步进展为高级别病变和宫颈癌的可能性比 HPV16 型低^[10-11]。

3 讨论

高危型 HPV 持续感染已被证实宫颈癌发生发展中起着重要作用,大量统计研究发现,在世界各地中最流行的为 HPV16 型和 HPV18 型,其余流行的亚型包括 HPV33、HPV52、HPV58、HPV45 型等,其中以 HPV16 和 HPV18 型致癌风险最大^[2]。但各型的流行情况在各地区中有所差异。近年来有研究通过大量的统计学分析发现 HPV52 型检出

刘冬等对广州某三甲医院的 HPV 基因型与宫颈病变的关系研究中也得出相似结论:CIN1 组和 CIN2/3 组的 HPV52 感染率均高于宫颈正常/炎症组(均 $P < 0.05$),但是 CIN2/3 组 HPV52 感染率低于 CIN1 组,且宫颈癌中 HPV52 未见感染^[12]。这提示感染 HPV52 型后,CIN 自然转归的可能性大,发展为宫颈癌的可能性小。由此可见,HPV52 型与宫颈病变的相关致病机制的研究将会对宫颈癌的预防起到指导性作用。

目前市面上已有的宫颈癌疫苗针对的高危型仅包含 HPV16 及 HPV18 型,治疗靶点为编码 E6/E7 的基因。已有研究表明,E2 蛋白可稳定 p53,在复制和转录中起调节、稳定作用,识别编码 E6/E7 启动序列,抑制转录,从而下调 E6/E7 水平,诱导细胞凋亡,抑制肿瘤形成^[7]。HPV DNA 整合进入宿主将导致多种基因断裂,其中编码 E2 蛋白的基因遭到破坏,E2 蛋白的减少或缺失可导致 E6 及 E7 表达水平上升,抑制 p53,从而使宫颈病变进一步向癌变恶化^[13-14]。本实验中,实时荧光定量 PCR 检测 E2 mRNA、E6/E7 mRNA 水平,检出率在 LSIL 与 SCC、ASC 与 SCC、LSIL 与 HSIL、ASC 与

HSIL组间有统计学差异($P<0.05$),结果显示随着宫颈上皮病变的严重程度上升,E2 mRNA 下降,E6/E7 mRNA 升高,E2 与 E6/E7 表达呈显著负相关关系,与相关研究相符^[15]。随着感染时间和程度的增加,HPV52 基因整合人宿主基因更频繁而导致 E2 表达水平下降,从而推动宫颈癌变。结合 HPV52 型主要引起中度至高度宫颈病变的特点,且 E2 表达水平在早期可作为癌变风险的指标,值得作进一步研究,成为新型疫苗的作用靶点。

参考文献

- [1] Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication[J]. International Journal of Cancer, 2011,128(4):927-935.
- [2] de Sanjose S, Quint W, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study [J]. The Lancet Oncology, 2010,11(11):1048-1056.
- [3] Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings[J]. The Journal of infectious diseases, 2010,202(12):1789-1799.
- [4] Jing L, Zhong X, Huang W, et al. HPV genotypes and associated cervical cytological abnormalities in women from the pearl river delta region of Guangdong province, China: a cross-sectional study[J]. BMC Infectious Diseases, 2014,14(1):388.
- [5] Meloni A, Pillia R, Campagna M, et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus Infection in Italian women with cervical cytological abnormalities[J]. J Public Health Res, 2014,3(1):157.
- [6] Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells.[J]. Nature, 1985,314(6006):111-114.
- [7] Bellanger S, Tan CL, Xue YZ, et al. Tumor suppressor or oncogene A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression[J]. American Journal of Cancer Research, 2011,1 (3):373-389.
- [8] Kahla S, Kochbati L, Maalej M, et al. Situation of HPV16 E2 gene status during radiotherapy treatment of cervical carcinoma [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014,15(6):2869-2873.
- [9] Luff RD. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda workshop. The Bethesda system editorial committee[J]. Human Pathology, 1992,23(7):719-721.
- [10] 邱峰,晁艳,袁丽娜,等. 流式荧光杂交法检测 26 种 HPV 亚型在不同程度宫颈病变中的分布规律[J]. 临床检验杂志, 2012,30(12):957-959.
- [11] 邱峰,李岳军,晁艳,等. 保妇康栓对人乳头瘤病毒不同亚型感染的临床疗效观察. 新中医, 2014,46(2):125-160.
- [12] 刘冬,叶敏娟,杨越波. HPV 基因型与宫颈病变的关系探讨[J]. 中国肿瘤临床, 2013,40(24):1531-1534
- [13] Brown C, Kowalczyk AM, Taylor ER, et al. P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein[J]. Virology Journal, 2008,5(1): 5.
- [14] Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis [J]. Journal of Biosciences, 2009,34(1):113-123.
- [15] 黄卓敏,王楚莹,古衍,等. HPV18 病毒 E2 与 E6 在宫颈病变中的表达与意义[J]. 国际医药卫生导报, 2012,18 (7):896-899.

应用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应对鲍曼不动杆菌进行同源性分析

闻海丰¹ 秦瑾² 于文静³ 冯彦蕊¹ 冯忠军^{1*}

[摘要] 目的 了解临床不同来源的鲍曼不动杆菌是否存在同源性,判断其是否存在耐药菌株的克隆播散,追踪其在医院交叉感染的可能途径,以便有效防控鲍曼不动杆菌在医院中传播。方法 收集2012年10月至2013年6月临床分离的73株多重耐药鲍曼不动杆菌,用肠杆菌科基因间重复序列-聚合酶链反应(enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR)对菌株进行同源性分析。结果 73株多重耐药鲍曼不动杆菌经ERIC-PCR分型分为8个基因型,分别用A、B、C、D、E、F、G、H表示,其中A型31株,B型15株,C型12株,D型8株,E型3株,F型2株,G和H型各为1株。A型为主要的流行株,分布在多个不同的科室。重症监护室(intensive care unit, ICU)分离的菌株存在6个基因型;骨科系统病区存在4个基因型;急诊科有5个基因型;内科发现有6个基因型;外科发现3个基因型。ICU病房环境物体表面共分离出4株鲍曼不动杆菌,其中9号和10号菌株来自于不同患者的床旁,12号和13号来自于护理站电脑键盘。结论 临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌存在多个基因型。多重耐药鲍曼不动杆菌存在时间和空间的聚集性。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;多重耐药性;肠杆菌科基因间重复序列-聚合酶链反应;同源性

Study on the homology of *Acinetobacter baumannii* by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction

WEN Haifeng¹, QIN Jin², YU Wenjing³, FENG Yanrui¹, FENG Zhongjun^{1*}

(1. Department of Laboratory Medicine, The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050051; 2. Department of Nosocomial Infection Control, The Third Hospital of Hebei Medical University, Hebei, China, 050051; 3. Department of Laboratory Medicine, Children's Hospital of Hebei Province, Hebei, China, 05005)

[ABSTRACT] Objective To investigate the homology of clinical isolated *Acinetobacter baumannii* and the epidemiology of the possible transmission routes. Methods 73 isolates of non-repetitive multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* were collected from October 2012 to June 2013. Epidemiological typing was performed by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Results

The 73 isolates of *Acinetobacter baumannii* were classified into 8 distinct patterns by ERIC-PCR, including 31 of genotype A, 15 of genotype B, 12 of genotype C, 8 of genotype D, 3 of genotype E, 2 of genotype F, 1 of genotype G, and 1 of genotype H. Genotype A was the dominating clone and distributed in different wards. There were 6 genotypes in ICU unit, 4 genotypes in the department of orthopedics, 5 genotypes in emergency department, 6 genotypes in internal medicine and 3 genotypes in surgical department, respectively. There were 4 isolates of *Acinetobacter baumannii* on the surface of ICU unit. No. 9 and No. 10 isolates were

基金项目:河北省卫生厅重点科技研究计划(20110099)

作者单位:1. 河北医科大学第三医院检验科,河北,石家庄 050051

2. 河北医科大学第三医院感控科,河北,石家庄 050051

3. 河北省儿童医院检验科,河北,石家庄 050031

*通讯作者:冯忠军, E-mail: fz702@sina.com

isolated from the bedsides of different patients, and No. 12 and No. 13 were isolated from the computer keyboard in nurses' station. **Conclusion** The isolates of *Acinetobacter baumannii* in our hospital have multiple genotypes. There were temporal and spatial aggregations in the infection of *Acinetobacter baumannii* in our hospital.

[KEY WORDS] *Acinetobacter baumannii*; Multidrug resistant; ERIC-PCR; Homology

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, ABA)是一种非发酵革兰阴性球杆菌,具有较强的耐干燥能力,极易形成生物膜,可在医院环境中长期存活。鲍曼不动杆菌已经成为引起医院感染的重要病原菌,因此必须采取有效的消毒隔离措施,防止或减少鲍曼不动杆菌在医院环境中的定植和传播。本文采用分子分型方法检测不同来源的鲍曼不动杆菌的同源性,判断其是否存在耐药菌株的克隆播散,追踪其在医院交叉感染的可能途径,以便控制鲍曼不动杆菌在医院中传播。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

收集 2012 年 10 月至 2013 年 6 月河北医科大学第三医院临床标本中分离的鲍曼不动杆菌 73 株,排除同一患者住院期间检出的重复菌株,其中男 50 例,女 19 例;菌株来源主要为:痰液 37 株、伤口分泌物 22 株、血液 5 株、重症监护室(intensive care unit, ICU)环境表面分离 4 株,尿液、咽拭子、导管、腹水和脑脊液各 1 株(见表 1)。全部菌株均符合多重耐药菌的标准,经 ID32E 鉴定试剂卡鉴定后,采用滤纸保存法,冻存于 -80°C 备用。

1.2 主要试剂与仪器

肠杆菌科鉴定试剂盒(ID32E 鉴定试剂卡)为梅里埃诊断产品(上海)有限公司产品,细菌基因组 DNA 提取试剂盒及 DNA Marker 为北京康为世纪生物科技有限公司提供,PCR 扩增体系为加拿大富酶泰斯 Fermentas 公司产品。API7300 型荧光定量 PCR 检测仪为美国应用生物系统公司 Applied Biosystems 产品,凝胶成像系统为美国 Bio-rad 公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种复活及鉴定

将保存菌株的 eppendorf 管从 -80°C 冰箱中取出,平衡至室温后加入 2 mL 营养肉汤, 35°C 培养箱中孵育过夜,将菌悬液分区划线接种至哥伦比

亚血琼脂培养基上, 35°C 培养 18 h~24 h 后,挑选 3 个~5 个典型的单个菌落经 ID32E 鉴定试剂卡鉴定为鲍曼不动杆菌。

1.3.2 抗菌药物敏感性实验

采用 K-B 琼脂纸片扩散法测定 13 种抗菌药物的敏感性,包括哌拉西林(piperacillin, PIP)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、亚胺培南(imipenem, IPM)、头孢哌酮(cefoperazone, CFP)、头孢曲松(ceftriaxone, CRO)、庆大霉素(gentamicin, GM)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、阿米卡星(amikacin, AMK)、哌拉西林/他唑巴坦(piperacillin/ tazobactam, TZP)、头孢吡肟(cefepime, FEP)、头孢哌酮/舒巴坦(cefoperazone / sulbactam, SCF)、左氧氟沙星(levofloxacin, LVX)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(trimethoprim / sulfamethoxazole, SXT)。根据美国实验室标准化研究所(clinicaland laboratory standards institute, CLSI)2012 年版进行抗菌药物敏感性判断。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.3.3 细菌 DNA 模板的制备

严格按照细菌 DNA 提取试剂盒说明要求操作,提取实验菌株基因组 DNA。

1.3.4 引物的配制

根据文献查阅,合成 ERIC-PCR 引物^[1-2],把稀释引物至浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 备用。引物序列为:ERIC1:5'-ATGTAAGCTCCTGGGGA TTCAC-3'; ERIC2:5'-AAGTAAGTGACTGGGGT GAGCG-3'。

1.3.5 同源性分析

采用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应(enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR)对菌株进行同源性分析。

反应体系:ERIC1($10\ \mu\text{M}$) $2\ \mu\text{L}$ 、ERIC2($10\ \mu\text{M}$) $2\ \mu\text{L}$ 、DNA 模板 $5\ \mu\text{L}$ 、水 $16\ \mu\text{L}$ 、Master Mix $25\ \mu\text{L}$,总反应体积为 $50\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应参数: 95°C 预变性 60 s; 95°C 变性 30s, 52°C 30 s, 72°C 60 s,进行 35 个循环; 72°C 最后延伸 10 min。取 $5\ \mu\text{L}$ 扩

增产物进行电泳,电压为110 V,电泳时间为45 min。电泳结束后用凝胶成像仪观察,并与DNA Marker 进行对比。

1.3.6 聚类分析

采用SPSS 13.0 统计软件进行聚类分析,用1代表条带存在,用0代表条带不存在,各菌株条带数据收集起来组成原始数据矩阵,进行样本聚类分析,获得菌株间的亲缘性关系^[3]。

2 结果

2.1 鲍曼不动杆菌的药敏试验结果

73株多重耐药鲍曼不动杆菌除对头孢哌酮/舒巴坦耐药性较低(43.84%)外,对其它12种临床常用抗菌药物的耐药性普遍较强,其耐药率分别为:哌拉西林97.26%、头孢他啶95.89%、亚胺培南94.52%、头孢哌酮97.26%、头孢曲松95.89%、庆大霉素94.52%、环丙沙星95.89%、阿米卡星94.52%、哌拉西林/他唑巴坦95.89%、头孢吡肟95.89%、左氧氟沙星86.30%、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑95.89%(见表2)。

表1 73株鲍曼不动杆菌标本来源

Table 1 The sources of the specimen of 73 isolates

标本	数量	百分比(%)
痰	37	50.68
伤口分泌物	22	30.14
血	5	6.85
物体表面	4	5.48
尿	1	1.37
咽拭子	1	1.37
导管	1	1.37
腹水	1	1.37
脑脊液	1	1.37

2.2 ERIC-PCR 基因分型结果及菌株同源性分析

73株多重耐药鲍曼不动杆菌经ERIC-PCR反应,电泳条带长度在100~2 000 bp之间,根据电泳图谱差异进行同源性分析,73株菌株被分为8个基因型,用A、B、C、D、E、F、G、H表示(见图1,2)。其中A型31株,B型15株,C型12株,D型8株,E型3株,F型2株,G和H型各为1株。A型为主要的流行株,分布在多个不同的科室。ICU病房分离的菌株存在6个基因型,分别是A(10株)、

B(7株)、C(5株)、D(5株)、F(1株)、G(1株)。骨科系统病区存在A(10株)、B(4株)、C(5株)、D(1株)4个基因型;急诊科有A(3株)、B(1株)、C(1株)、D(1株)、E(1株)5个基因型;内科系统病区发现有A型5株,B型3株,C、E、F、H各1株;

表2 73株鲍曼不动杆菌对13中抗生素药敏试验结果

Table 2 The results of drug sensitivity test of 73 isolates of

Acinetobacter baumannii

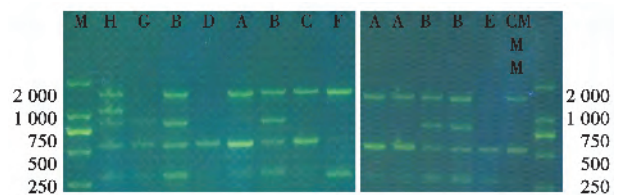
抗生素	耐药(%)	中介(%)	敏感(%)
PIP	71(97.26)	0(0.00)	2(2.74)
CAZ	70(95.89)	0(0.00)	3(4.11)
IPM	69(94.52)	0(0.00)	4(5.48)
CFP	71(97.26)	0(0.00)	2(2.74)
CRO	70(95.89)	2(2.74)	1(1.37)
GM	69(94.52)	1(1.37)	3(4.11)
CIP	70(95.89)	0(0.00)	3(4.11)
AMK	69(94.52)	1(1.37)	3(4.11)
TZP	70(95.89)	0(0.00)	3(4.11)
FEP	70(95.89)	0(0.00)	3(4.11)
SCF	32(43.84)	25(34.25)	16(21.91)
LVX	63(86.30)	6(8.22)	4(5.48)
SXT	70(95.89)	0(00.00)	3(4.11)

表3 鲍曼不动杆菌基因分型结果

Table 3 The results of genotyping of isolates of

Acinetobacter baumannii

科室	A	B	C	D	E	F	G	H
ICU	10	7	5	5	0	1	1	0
骨科	10	4	5	1	0	0	0	0
急诊	3	1	1	1	1	0	0	0
内科	5	3	1	0	1	1	0	1
外科	3	0	0	1	1	0	0	0
合计	31	15	12	8	3	2	1	1



M: Marker; A、B、C、D、E、F、G、H 分别代表不同的基因型

图1 ERIC-PCR 基因分型结果

Figure 1 The results of genotyping by using ERIC-PCR method

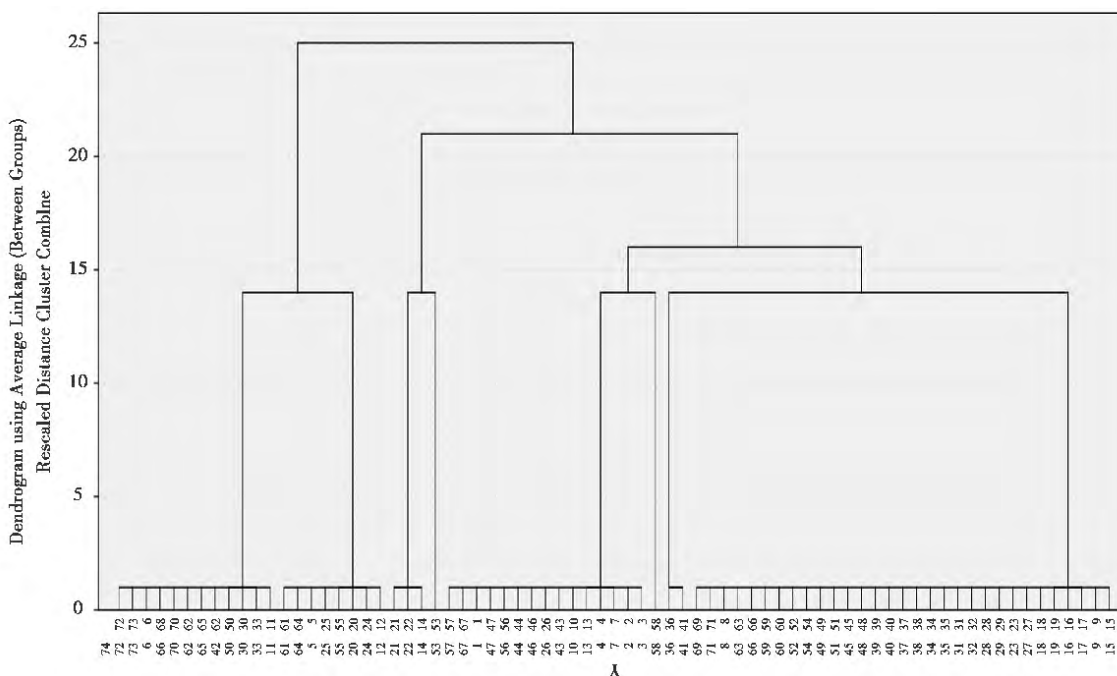


图2 73株鲍曼不动杆菌基因分型聚类分析

Figure 2 Cluster analysis on 73 isolates of *Acinetobacter baumannii*

外科系统病区发现 A 型 3 株, D、E 各 1 株 (见表 3)。对 ICU 环境生物学物体表面监测, 共分离出 4 株鲍曼不动杆菌, 菌株编号分别为 9(A 型)、10(B 型)、12(D 型键盘)和 13(B 型键盘), 其中 9 号和 10 号菌株来自于不同患者的床旁, 12 号和 13 号来自于护理站电脑键盘。

3 讨论

鲍曼不动杆菌是不动杆菌属中临床分离率最高的细菌, 为非发酵、革兰阴性球杆菌, 在自然界中分布广泛。近几年来, 鲍曼不动杆菌被认为是与医院相关的机会性多重耐药病原菌^[4-5], 主要引起呼吸机相关性肺炎、留置导尿管引起的尿路感染、中心静脉导管所致的血流感染和伤口感染, 还可引起心内膜炎、骨髓炎和腹膜透析相关性感染。鲍曼不动杆菌造成的医院相关性感染通常与患者接受侵入性操作(如手术、机械通气、留置导管)和免疫功能低下有关。

为了探索鲍曼不动杆菌的流行特点和传播方式, 国内外学者多对鲍曼不动杆菌进行分型和同源性分析。目前国内外常用的病原菌分子生物学水平的分型方法主要有脉冲场凝胶电泳(pulsed-

field gel electrophoresis, PFGE)技术^[6]、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)^[7]和以 PCR 为基础的分型方法, 包括随机引物 PCR (random amplified polymorphic polymerase chain reaction, AP-PCR)^[8]、重复序列 PCR 和扩增限制性片段长度多态性分析 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)^[9]等。重复序列 PCR 技术又分为基因外重复回文序列 (repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction, REP-PCR)^[10]和肠杆菌科基因间重复序列 (enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction, ERIC-PCR)^[11] 2 种。PFGE 通过对细菌的全部基因组 DNA 进行消化切割, 将产物在动态变换角度的电场中电泳, 依据消化产物的大小及构象不同而分离出指纹图谱进行分型。现今 PFGE 被国内外分子流行病学者普遍认同为病原菌分子生物分型的“金标准”方法。ERIC 是由 Sharples 等^[11]在大肠埃希菌中首先发现, 在 ERIC 的中心有一段长约 44 bp 的保守性很强的反向重复序列, Versalovic^[12]根据这一重复序列发展了 ERIC-PCR 技术。ERIC 在不同种属甚至同一种的不同菌株之间的拷贝数和定位都不同, 被用于细菌基因分型

的研究。有研究表明 ERIC-PCR 与 PFGE 分型结果一致性非常高^[13], 相对于 PFGE 分型方法, ERIC-PCR 操作简便、实验周期短、结果可靠, 更适合于大批量菌株的分类和鉴定。

本研究采用 ERIC-PCR 技术并通过同源性分析, 将临床分离的 73 株鲍曼不动杆菌分为 8 个基因型, 其中 A 型和 B 型为主要流行株, 主要分布在 ICU 病房、急诊 ICU 病房和骨科病区。研究结果显示本院多重耐药鲍曼不动杆菌感染具有四个显著特点: (1) 同一病房(病区)内存在多个基因型菌株同时流行, 如 ICU 病房中就被检出 A、B、C、D 和 G 多个基因型; (2) 同一病房(病区)内存在相同基因型的菌株传播流行。2012 年 11 月在骨科 a 区的临床标本中分离出 3 株 A 型菌株, 2013 年 1 月急诊科共分离出 7 株菌, 其中 3 株为 A 型, 2013 年 3 月在老年病房分离出 2 株 A 型菌株, 同一病区短时间集中出现相同菌株的感染, 高度怀疑这些感染之间存在院内交叉感染; (3) 不同病区内存在相同基因型的菌株同时传播流行。2012 年 11 月分离的菌株中 A 型有 8 株, 分别是 ICU 2 株、骨科 a 区 3 株, 骨科 b 区、骨科 c 区和外科某病区各 1 株; (4) 在某一时间段出现多重耐药鲍曼不动杆菌集中暴发流行。2012 年 10 月共分离出 6 株菌, 2012 年 18 株菌, 2012 年 12 月 5 株菌, 2013 年 1 月 14 株菌, 2013 年 2 月 1 株菌, 2013 年 3 月 9 株菌, 2013 年 4 月 6 株菌, 2013 年 5 月 4 株菌, 2013 年 6 月 10 株菌。可见在 2012 年 11 月至 2013 年 1 月分离出的鲍曼不动杆菌株数较多, 虽然可能与气候寒冷、住院患者较多、部分患者病情较严重等原因有关, 但是依然高度怀疑与医院病区清洁、消毒、隔离等工作存在疏漏导致院内感染增多有关。总体来说, 多重耐药鲍曼不动杆菌在我院的感染和科室分布情况表现出了一定的时间和空间的聚集性。

鲍曼不动杆菌生存能力极强, 能够在医院环境中长期存活。有研究^[14]表明当感染的患者出院 9 天后, 仍然能从患者病床上分离出鲍曼不动杆菌。另一研究^[15]表明从干燥环境中分离的鲍曼不动杆菌的生存率高于从湿润环境中分离的菌株。鲍曼不动杆菌最常见的传播途径是接触传播, 被鲍曼不动杆菌感染的病人(皮肤、体液)、器械和周围环境, 甚至体内存在菌株定植的健康人群都可能成

为鲍曼不动杆菌的传染源。本研究中, 一名患者从 ICU 转到外科病区, 之后在该患者的脑脊液中分离出与流行在 ICU 病房菌株基因型相同的鲍曼不动杆菌, 推断该菌株可能在患者进行科室转换交接时未彻底清洁消毒而造成一定程度的传播。2012 年 11 月对 ICU 病房环境进行细菌监测, 共分离出 4 株鲍曼不动杆菌, 菌株编号分别为 9 号(床旁)、10 号(床旁)、12 号(键盘)和 13 号(键盘)。其中 9 号菌株为 A 型, 之后在 ICU 病房中又分离出多株与 9 号菌株基因型相同的菌株。12 号菌株为 D 型, 10 号菌株、13 号菌株和从这名患者的痰液标本中分离的菌株(7 号菌株)均属于 B 型。2012 年 12 月至 2013 年 1 月, 从 ICU 一名患者(25 号菌株)的痰液中连续多次分离出基因型相同的菌株, 均属于 D 型, 表明当时 ICU 环境可能已经被同一株鲍曼不动杆菌污染。病房中的各种器械、设备, 如心肺复苏机、呼吸机、吸痰器、输注泵、洗脸盆、床栏杆、床头桌、枕头、床垫、绷带和手推车等可能会被鲍曼不动杆菌污染, 医护人员工作中经常触摸这些东西, 很可通过污染的手将病原菌传播给患者, 医护人员手和医疗设备是鲍曼不动杆菌传播的最主要媒介。本研究所分离的菌株主要分布在 ICU 病房、急诊科 ICU 病房和骨科病房, 这些病区患者免疫力低下, 多数接受过侵入性操作(如有创手术和气管插管等), 也反映了鲍曼不动杆菌多通过接触途径在医院内流行传播。

我院在 2012 年 10 月到 2013 年 6 月分离的大多数鲍曼不动杆菌, 除对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率为 43.83%, 对其它抗菌药物的耐药率高达 86.30% ~ 97.26%。对几乎所有的临床常用药物耐药, 包括对 β -内酰胺类、氨基糖苷类和喹诺酮类等多类抗生素同时耐药, 可见临床分离的鲍曼不动杆菌的耐药情况严重。根据《中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识》和《多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南》, 当感染的菌株表现为多重耐药时, 其造成的感染将很难治疗。所以通过对医院内多重耐药鲍曼不动杆菌进行同源性分析, 对其做流行病学调查和防控, 不论是对于院感工作还是对于临床治疗工作都具有重要的意义和价值。鲍曼不动杆菌的耐药机制复杂且多种耐药机制共同发挥作用: 产生 β -内酰胺类水解酶、药物外排泵机制、膜孔道蛋白缺失或减少、青霉素结合蛋白

(penicillin-binding protein, PBP)改变、表达氨基糖苷类修饰酶、对喹诺酮类药物作用靶位突变等^[16]。由于鲍曼不动杆菌可以通过基因突变或获得外源性基因元件等方式获得耐药机制使其成为多重耐药菌株甚至全耐药菌株^[16],这就使得通过流行病学防控来阻断鲍曼不动杆菌菌株间耐药基因的传递可能比阻断院内感染发生显得更为重要。

参考文献

- [1] Fouad M, Attia AS, Tawakkol WM, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013,17(12):e1252-1254.
- [2] Eser OK, Ergin A, Tunckanat F, et al. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter* spp[J]. *The New Microbiologica*, 2008,31(4):535-542.
- [3] Ferreira AE, Marchetti DP, Cunha GR, et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* spp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil[J]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011,44(6):725-730.
- [4] Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003, 24(4):284-295.
- [5] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008,21(3):538-582.
- [6] Abdalhamid B, Hassan H, Itbaileh A, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia[J]. *The New Microbiologica*, 2014,37(1):65-73.
- [7] Aly M, Tayeb HT, Al Johani SM, et al. Genetic diversity of OXA-51-like genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014,33(7): 1223-1228.
- [8] Nowak J, Pacholczyk A, Petroniec V, et al. The results of molecular epidemiological investigations in patients infected with strains of the genus *Acinetobacter* [J]. *Pneumonologiai Alergologia Polska*, 2010,78 (6):386-391.
- [9] Petersen K, Cannegieter SC, van der Reijden TJ, et al. Diversity and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection at a military medical center[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2011,49(1):159-166.
- [10] Pasanen T, Koskela S, Mero S, et al. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in hospital district of Helsinki and Uusimaa[J]. *Plos One*, 2014,9(1):e85854.
- [11] Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990,18(22): 6503-6508.
- [12] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991,19(24):6823-6831.
- [13] 孙晶,常军霞,刘巍. ERIC-PCR 与 PFGE 检测铜绿假单胞菌同源性的方法学比较[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 4(38):297-302.
- [14] Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases [J]. *The Journal of Hospital Infection*, 1999,42(1):27-35.
- [15] Wendt C, Dietze B, Dietz E, et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997,35(6):1394-1397.
- [16] Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, et al. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012,3:148.

潮州市哨点医院 2009 年~2014 年流感监测分析

苏雪奎¹ 谢璧珠¹ 陈爱苗¹ 曾树权¹ 刘杰¹ 林松炎¹ 杨惠钿² 林敏^{2*}

[摘要] **目的** 监测潮州市 2009 年~2014 年间流感流行情况,掌握季节性流感病毒优势毒株的变化及流行特征,为流感防控提供科学依据。**方法** 对潮州市 2009 年~2014 年流感样病例(influenza-like illness, ILI)报告数据,病原学监测数据及流感/ILI 暴发疫情报告情况进行分析。**结果** 在受理的 3 619 份流感样病例标本中,流感病毒核酸阳性标本约占 19.45%。流感病毒的优势毒株每年都发生型别变化,优势型别交替出现。病毒感染率以 5 岁~14 岁组和 15 岁~24 岁组较高,与其它组比较存在统计学差异($P < 0.05$)。**结论** 2009 年后潮州市虽然没有发生流感大流行,但流感监测工作仍不能放松,特别是需要警惕新型流感毒株的出现,同时加强学校等聚集性场所疫情监测。

[关键词] 流行性感冒;流感病毒;监测

Analysis on influenza surveillance in sentinel hospitals in Chaozhou from 2009 to 2014

SU Xueluan¹, XIE Bizhu¹, CHEN Aimiao¹, ZENG Shuquan¹, LIU Jie¹, LIN Songyan¹, YANG Huitian², LIN Min^{2*}

(1. Department of Chaozhou Center for Disease Control and Prevention, Chaozhou, Guangdong, China, 521011; 2. Central Lab, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521000)

[ABSTRACT] **Objective** To provide basic data for control and prevention of influenza virus. **Methods** Data were collected from Influenza-like illness (ILI) report, pathogen surveillance and influenza outbreak reports from 2009 to 2014 in Chaozhou city. **Results** Among 3 619 ILI cases, 19.45% were RNA positive for influenza virus. The predominant strain changed every year, and appeared alternately. People at the age of 5~14 and 15~24 years old are at higher risk of infection, compared with those in the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Although no influenza pandemic has taken place in Chaozhou after 2009, surveillance on influenza still can't be ignored. More attention should be paid to occurrence of new influenza viruses and enhancing the school influenza outbreaks.

[KEY WORDS] Epidemic influenza; Influenza virus; Surveillance

流感病毒的基因组经常发生突变而产生抗原变异。开展流感监测,掌握发病现状,可及时发现流感优势毒株的变化和变异情况^[1]。每年,全球约 10% 的人口患流感,流感是我国和世界高发的传染病之一,也是第一个实行全球监测的传染病^[2]。本文对 2009

年 6 月至 2014 年 4 月潮州哨点医院的流感实验监测结果分析如下。

1 材料与方法

1.1 病例定义

基金项目:潮州市卫生和计划生育局科研项目(潮卫科研 201494 号)

作者单位:1. 潮州市疾病预防控制中心检验科,广东,潮州 521011

2. 南方医科大学附属潮州市中心医院中心实验室,广东,潮州 521000

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

流感样病例(influenza-like illness, ILI)定义:发热(体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$),伴咳嗽或咽痛之一者,缺乏其它实验室确定诊断的可疑病例。ILI占门急诊病例就诊总数的比例即ILI%,通常在流感监测中反映监测点的ILI发病水平^[3]。

1.2 资料和仪器

咽拭子样本采自发病3d以内的ILI患者和暴发疫情中的暴发病例。标本采集后,放入含采样液3 mL~4 mL的采样管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。监测资料来源于流感哨点监测医院,病原学检测数据来源于潮州市疾病预防控制中心(Center for Disease Control and Prevention, CDC)流感监测实验室。仪器:DA7600型荧光定量PCR仪(中山大学达安基因股份有限公司,广州),制冷高速离心机GL-16G-C(安亭科学仪器厂,上海),生物安全柜3H-1000 II A/B3(苏州安泰空气技术有限公司,江苏),高速台式离心机TGL-20B-C(安亭科学仪器厂,上海)。

1.3 病原监测

每周于定点的哨点医院随机采集5份~20份ILI标本,48 h内送流感检测实验室用实时荧光PCR对流感病毒进行核酸检测。

1.4 统计学分析

使用SPSS 19.0进行统计分析。

2 结果

2.1 ILI 时间分布

2009年~2014年,潮州市CDC流感实验室采集各类ILI咽拭子标本共3 619份,检出流感病毒704份,阳性率为19.45%。荧光定量PCR检测结果见图1。我们可以发现,在阳性样本中新甲型

H1N1流感病毒、季节性流感病毒H1亚型、季节性流感病毒H3亚型、甲型未分型流感病毒、乙型流感病毒的构成分别为40.20%(283/704)、0.28%(2/704)、14.20%(100/704)、20.60%(145/704)和24.72%(174/704),详细信息见表1和图2。6个年份的流感病毒阳性率不全相同,差异有统计学意义($\chi^2=106.00, P<0.001$)。

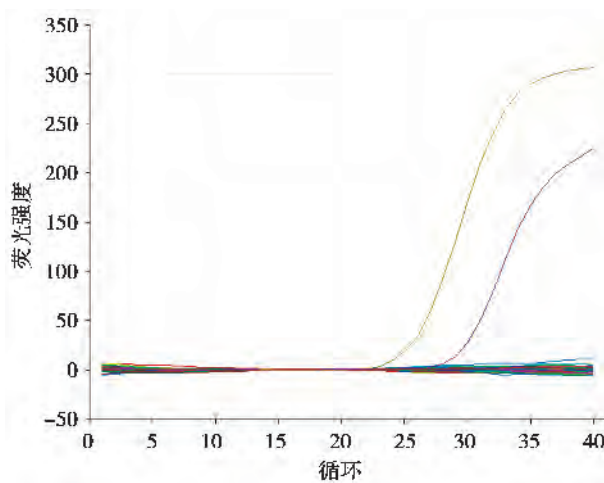


图1 荧光定量PCR检测流感病毒

Figure 1 Detection for influenza virus by real-time PCR

2.2 ILI 年龄分布

根据年龄不同,把患者分为0岁~4岁、5岁~14岁、15岁~24岁、25岁~59岁、 ≥ 60 岁5个组。2009~2014年各组的流感阳性率分别为9.86%, 32.44%, 28.60%, 11.67%, 10.29%。5个年龄组间流感阳性率不全相同,差异有统计学意义($\chi^2=243.87, P<0.0001$),其中5岁~14岁组阳性率最高,0岁~4岁组最低,详细信息见表2。

表1 2009年~2014年潮州市流感病原学检测结果

Table 1 Etiological test of influenza in Chaozhou from 2009 to 2014

年份	ILI (n)	阳性 (n)	阳性%	H1N1 (n)	H1 (n)	H3 (n)	甲型未分型 (n)	乙型 (n)
2009	844	291	34.48	149	2	39	86	15
2010	753	160	21.25	51	0	12	42	55
2011	444	53	11.94	10	0	2	13	28
2012	378	60	15.87	0	0	27	4	29
2013	830	53	6.38	26	0	12	0	15
2014	370	87	23.51	47	0	8	0	32
合计	3619	704	19.45	283	2	100	145	174

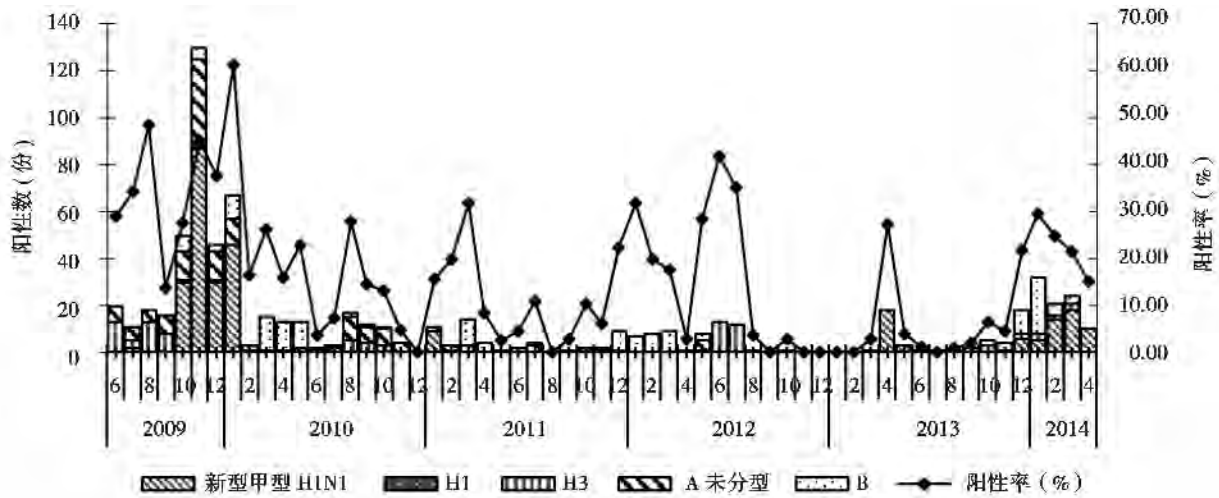


图 2 2009年~2014年流感病原学检测

Figure 2 Epidemiological and virological surveillance from 2009 to 2014

表 2 2009年~2014年潮州市各年龄组流感样病例检测结果

Table 2 Results of Influenza-like Illness base on age in Chaozhou from 2009 to 2014

		2009	2010	2011	2012	2013	2014	合计
0岁~4岁组	ILI (n)	83	213	79	98	458	103	1034
	阳性 (n)	13	29	5	11	19	35	102
	阳性%	15.66	13.62	6.33	11.22	4.15	24.27	9.86
5岁~14岁组	ILI (n)	400	235	87	79	170	71	1042
	阳性 (n)	183	67	22	16	24	26	338
	阳性%	45.75	28.51	25.29	20.25	14.12	36.62	32.44
15岁~24岁组	ILI (n)	182	105	55	51	58	49	500
	阳性 (n)	67	39	16	7	2	12	143
	阳性%	36.81	37.14	29.09	13.73	3.45	24.49	28.60
25岁~59岁组	ILI (n)	170	176	159	95	121	127	848
	阳性 (n)	27	22	4	18	8	20	99
	阳性%	15.88	12.50	2.52	18.95	6.61	15.75	11.67
≥60岁组	ILI (n)	9	24	73	55	23	20	204
	阳性 (n)	1	3	5	8	0	4	21
	阳性%	11.11	12.50	6.85	14.55	0	20.00	10.29

3 讨论

新甲型 H1N1 流感病毒是 2009 年出现的一种新型流感病毒, 包含有禽流感、猪流感和人流感 3 种流感病毒的 RNA 片段^[4-5]。与一些地方的监测结果相一致^[6-9], 受全球新甲型 H1N1 流感疫情暴发的影响, 2009 年潮州市流感疫情活动性增强, 流感病毒阳性率明显攀升, 高于平均感染水平。

我们的监测结果显示: (1) 2009~2013 年潮州市流感核酸阳性率逐年下降, 这与实行流感监测, 加大流感预防知识宣传, 促使人们增强流感预防意识, 进行疫苗的接种有关。2014 年阳性率有所增加, 说明流感疫情活动性增强, 病毒检测的阳性率与辖区流感流行的强度有关, 流行强度增加时毒株分离率增高, 反之则降低, 流感流行趋势与全国一致; (2) 潮州市流感病毒的优势毒株每年都发生

型别的变化, 主要以新甲型 H1N1 流感病毒为主; 季节性 H1 流感在 2009 年后未检出, 与浙江省^[10]和天津市^[11]报道相似。从各年监测曲线看, 潮州市 ILI 高发时段主要集中在夏季和冬季, 符合我国南方地区流感全年流行情况^[11-12], 但与北方的检测结果存在差异^[13]; (3) 2009 年~2014 年潮州市共有 12 起暴发疫情报告, 均发生于中小学校。同时, 病原学特征显示流感易感人群主要为 5 岁~14 岁组和 15 岁~24 岁组, 这可能是儿童与青少年是处于相对集中的学校环境, 通风不好, 容易交叉感染有关。此两个年龄阶段的人群是我市流感防控的重点人群^[14-17], 需要相关部门的重视并加强学校、工厂等人群密集地方的人员卫生知识宣传及健康教育, 实施有效疫苗接种, 从而减轻流感的危害。

总而言之, 流感的监测是防控流感的关键策略和措施之一, 也是确定流感流行株、推荐疫苗组份、进行流感疫情预测和预警的基础。根据中国流感监测信息系统对潮州市 2009 年~2014 年的流感情况进行综合分析, 继续加强本地区的流感检测工作, 提高流感病毒的检测水平, 在流感流行季节前做好人群的流感疫苗接种, 提高人群免疫水平, 在一定程度上可预防本地区流感暴发或流行。

参考文献

- [1] 于秋燕, 徐淑慧. 2009-2010 年度济南市流感监测结果分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2011,6(1):49-54.
- [2] 郭元吉, 程晓雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 三峡出版社, 1997.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 卫生部办公厅关于印发《全国流感监测方案(2010 年版)》的通知[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/jkj/s3577/201009/3fa356d0f4834d408fde6c1289lab6482.shtml>. 2010,2010-09-10/2015-04-13.
- [4] 寇铮, 胡松年, 李天宪. 甲型 H1N1 流感病毒流行株基因组进化分析[J]. 科学通报, 2009, 54(12):1652-1656.
- [5] 杨婷婷, 杨宇, 刘晓琳, 等. 青岛地区 2005-2011 年流感病毒病原学监测分析[J]. 青岛大学医报, 2012,48(5):408-409.
- [6] 王宇路, 刘侗, 宋绍霞, 等. 山东省 2010 年-2011 年流感病原学监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2012,22(3):557-558.
- [7] 雷永良, 叶灵, 王晓光. 2009-2012 年丽水市流行性感冒监测网络实验室分析结果[J]. 中国病原生物学杂志, 2013,238(11):1017-1028.
- [8] 丁韧, 王保安, 童晶, 等. 2005-2012 年徐州市流感病原学监测结果分析[J]. 中国校医, 2012,26(12):909-910.
- [9] 葛爱华, 鲍倡俊, 祁贤, 等. 2009-2012 年流感监测结果分析[J]. 中华病症控制杂志, 2014,18(2):123-126.
- [10] 余昭, 方琼珊, 周敏, 等. 2008-2012 年浙江省流行性感冒监测系统运行状况及监测质量评价[J]. 疾病监测, 2012,27(9):689-693.
- [11] Zhang Y, Li L, Dong X, et al. Influenza surveillance and incidence in a rural area in China during the 2009/2010 influenza pandemic [J]. Plos One, 2014,9(12):e115347.
- [12] Chen JF, Sun BC, Yuan J, et al. Surveillance of influenza virus during 2010-2012 in Changsha, China[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2014,45(2):319-325.
- [13] 查兵, 詹圣伟, 曹多志, 等. 2006-2013 年马鞍山市流行性感冒监测分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2015,19(1):46-49.
- [14] Chen JF, Sun BC, Yuan J, et al. Surveillance of influenza virus during 2010-2012 in Changsha, China[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2014,45(2):319-325.
- [15] 袁洁, 苏良, 叶文, 等. 长沙市流行性感冒病毒病原学检测结果分析[J]. 实用预防医学, 2006,13(4):917-918.
- [16] Cowling BJ, Chan KH, Feng S, et al. The effectiveness of influenza vaccination in preventing hospitalizations in children in Hong Kong, 2009-2013 [J]. Vaccine, 2014,32(41):5278-5284.
- [17] 白云, 郭舫茹, 朱倩, 等. 2011-2012 年流行性感冒监测与分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013,23(14):3441-3445.

代谢综合征与肿瘤相关性流行病学调查

赵思文* 吴君洁 冯焯 张小明

[摘要] 目的 筛查恶性肿瘤,为其病因、发病机制和预防提供科学依据。方法 从2013年1月至2014年12月期间在我院体检人群中随机抽取6 050例,年龄在20岁~80岁之间,平均年龄(53.0±3.4)岁。其中男3 826例,女2 224例,男女比为1.7:1。按代谢综合征(metabolic syndrome, MS)诊断标准分为MS组与非MS组,MS组再分为肿瘤组与非肿瘤组,比较两对应组间MS各组分的数据,分析MS各组分与肿瘤发生的相关性。结果 符合MS诊断标准986人,患病率为16.3%(986/6 050)。发现肿瘤患者43人,占MS人群4.36%(43/986)。肿瘤组MS各组分明显高于非肿瘤组($P<0.05$)。腰围、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)与肿瘤相关($P<0.01$),其中腰围、TG、和FPG是肿瘤的危险因素,HDL-C是保护因素。结论 伴发MS组分可能与肿瘤发展相关。

[关键词] 代谢综合征; 肿瘤; 流行病学调查

Epidemiological study of relationship between metabolic syndrome and cancers

ZHAO Siwen*, WU Junjie, FENG Chuo, ZHANG Xiaoming

(Physical Examination Center, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510260)

[ABSTRACT] Objective To provide scientific basis for pathogenesis, mechanism and prevention of related cancers by screening cancers among MS patients. Methods 6 050 physical examination persons [ranged from 20 to 80 in age (mean 53.0±3.4 years old)] were selected randomly in our physical examination center from January 2013 to December 2014. Cases were divided into MS group and non-MS group at random according to the criterion of MS. The MS group was divided into cancer group and non-cancer group. MS components in MS group and non-MS group, cancer group and non-cancer group were compared, respectively. And the correlation between cancers and components of MS was evaluated by linear logistic regression analysis. Results 986 persons among 6 050 physical examination persons were diagnosed with MS, with the morbidity of 16.3% (986/6 050). 43 persons were diagnosed with cancer, with the morbidity in MS patients of 4.36% (43/986). The measured values of each component in MS group were higher than those in non-MS group ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that waist circumference, triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and fasting plasma glucose (FPG) were correlated with cancers. Waist circumference, TG, and FPG were risk factors for cancer, while HDL-C was a protective factor. Conclusion Concomitant MS components maybe associated with the development of cancers.

[KEY WORDS] Metabolic syndrome; Cancer; Epidemiological studies

基金项目:广州市卫生局科研资助项目(20151A010100)

作者单位:广州医科大学附属第二医院健康体检中心,广东,广州 510260

*通讯作者:赵思文, E-mail:13710730507@163.com

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是一组以胰岛素抵抗为核心,表现为中心性肥胖、高血压、高血脂、高血糖的综合性疾病。流行病学资料表明 MS 在健康人群中具有极高的发病率,达到 19.5%^[1],芬兰对老年人群开展调查发现 MS 患病率男性为 35.2%,女性为 33.1%^[2],而中国则分别为 16.5%和 15.8%^[3]。

近年来大量流行病学调查显示 MS 不仅增加了心脑血管疾病的风险^[4],而且与消化、泌尿、生殖系统等多种恶性肿瘤发生、发展密切相关。本文运用流行病学调查方法,在我院开展体检人群 MS 与肿瘤相关的筛查工作,旨在探讨两者间的关系,为病因、发病机制和预防提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

从 2013 年 1 月至 2014 年 12 月期间在我院体检人群中随机抽取 6 050 例为研究对象,年龄在 20 岁~80 岁之间,平均年龄(53.0±3.4)岁。其中男 3 826 例,女 2 224 例,男女比为 1.7:1。排除近期内呼吸道感染、胃肠道感染、发热、患有慢性消耗性疾病者、近 2 周内应用抗生素或抗病毒药物者。

1.2 研究方法

1.2.1 人体基本参数测定

所有体检者均禁食水 12 h,按标准办法测定身高、体重、血压(收缩压 systolic blood pressure, SBP)/舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、腰围。询问并记录一般情况、既往史、家族史、烟酒嗜好、职业、受教育水平及近半年的服药情况。

1.2.2 生化指标测定

隔夜禁食 12 h 以上,采用日立 7170A 全自动生化分析仪(日本株式会社)和中生生化试剂(中生北控生物科技股份有限公司),检验丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、总胆固醇、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、尿酸、肌酐、尿素氮等。采用瑞士罗氏公司的 ELECSYS2010 电化学发光仪检测各项肿瘤指标,

包括甲胎蛋白(alpha fetal protein)、癌胚抗原(carcino-embryonic antigen)、肿瘤糖抗原 199(carbohydrate antigen 199)、肿瘤糖抗原 125(carbohydrate antigen 125)、肿瘤糖抗原 153(carbohydrate antigen 153)、EB 病毒抗体(epstein-barr virus antibody)、前列腺相关抗原(prostate-specific antigen)、神经元特异性烯醇化酶(neurone specific enolase)。

1.2.3 辅助检查

使用超声多普勒(意大利 Technos MPxDU8 型彩色多普勒超声诊断仪),胸片,纤维胃十二指肠镜(日本株式会社奥林巴斯 GIF-XP260 电子胃镜),电子肠镜(日本株式会社奥林巴斯 CF-V 电子肠镜)进行检查。

1.2.4 诊断

采用中华医学会糖尿病学分会(the Chinese Diabetes Society, CDS)(2007)标准^[5]:(1)向心性肥胖:男性腰围>90cm,女性腰围>85 cm;(2)TG≥1.7 mmol/L,或 HDL-C<1.04 mmol/L;(3)FPG≥6.1 mmol/L,和(或)2 小时血糖(2 hour plasma glucose, 2hPG)≥7.8 mmol/L,和(或)有糖尿病史;(4)SBP/DBP≥130/85 mmHg。具有 3 项或以上者即可诊断为 MS。

1.2.5 结局变量定义

本研究仅分析队列中病例数≥5 例的恶性肿瘤。

1.3 统计学分析

所有资料输入 Excel 表中,采用 SPSS 16.0 软件包,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,应用二分类多因素 Logistic 回归进行相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征比较

符合 MS 诊断标准 986 人,患病率为 16.3%。MS 组腰围、SBP、TG 及 FPG 值较非 MS 组高($P<0.05$),HDL-C 较非 MS 组低($P<0.01$),有统计学意义,见表 1。

2.2 MS 组肿瘤与非肿瘤比较

MS 组中发现肿瘤患者 43 人,患病率为 4.36%(43/986),肿瘤组 MS 各组明显高于非肿瘤组,有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表1 MS组与非MS组间各MS组分的比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparisons of MS components in MS group and non-MS group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别(男/女)	腰围(cm)	SBP(mmHg)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	FPG(mmol/L)
MS组	986	525/461	94 ± 12.6	138 ± 17.8	2.44 ± 0.2	0.97 ± 0.7	6.38 ± 1.0
非MS组	5 064	3 020/2 040	84 ± 7.3	127 ± 10.1	1.54 ± 0.8	1.43 ± 0.5	5.69 ± 1.2
<i>t</i> 值			2.116	2.183	4.116	4.82	2.822
<i>P</i> 值			0.038	0.033	0.000	0.000	0.004

表2 肿瘤组与非肿瘤间各MS组分比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparisons of MS components in cancer group and non-cancer group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	腰围(cm)	SBP(mmHg)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	FPG(mmol/L)
肿瘤组	43	96.4 ± 7.6	141.8 ± 15.3	2.75 ± 0.8	0.81 ± 0.6	6.50 ± 1.5
非肿瘤组	943	93.6 ± 5.5	136.5 ± 10.3	2.39 ± 0.6	1.01 ± 0.8	6.30 ± 1.2
<i>t</i> 值		1.977	2.113	2.372	3.281	2.330
<i>P</i> 值		0.048	0.035	0.027	0.001	0.020

2.3 影响肿瘤发生的MS各项指标 Logistic 回归分析

MS组发现肝癌13例,乳腺癌10例,甲状腺癌7例,前列腺癌5例,结肠癌8例。经多因素 Logistic 回归分析显示除SBP外,腰围、TG、HDL-C和FPG与肿瘤相关($P < 0.01$),其中腰围、TG、和FPG是肿瘤的危险因素,HDL-C是保护因素,见表3。

3 讨论

进入21世纪,关于MS各组分与恶性肿瘤相关性的研究日益增多。本研究入选的6 050人中符合MS诊断标准986人,患病率为16.3%。其中肿瘤患者43人,占MS人群4.36%,肿瘤组MS各组分明显高于非肿瘤组,表明MS组分在肿瘤群体中的分布非常集中。各危险因素之间互相作用,产生一系列细胞因子和内环境的变化,在肿瘤细胞的形成及恶性转换过程中发挥相关作用。胰岛素抵抗继发于MS发病中心环节,胰岛素受体在特殊情况下可过表达2~6倍,胰岛素信号通路某些环节的改变、过度表达或者基因突变都有可能导导致细胞增殖、凋亡异常,导致肿瘤的发生^[6]。世界癌症研究基金会及美国癌症研究学会系统回顾了体重指数(body mass index, BMI) > 30 kg/m²的患者,发现肥胖能显著增加某种类型癌症的发病风险,包

括乳腺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌、肠癌等^[7]。而肿瘤细胞唯一的能量来源葡萄糖作为营养基促进了肿瘤细胞的生长,统计分析显示糖尿病为癌症发展的潜在风险因素,与乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌及非霍奇金淋巴瘤的发病密切相关^[8-9]。高脂血症也是MS的主要危险因素^[10],可诱导多种肿瘤的发生。

本项研究结果显示肝癌与腰围的相关性较大,提示向心性肥胖可增加肝癌的发病风险,这与近期一篇前瞻性研究的Meta分析相符^[11]。据最新一份调查显示乳腺癌在中老年女性的发生率为32.43人/10万人^[12],本研究多因素Cox回归模型分析可见乳腺癌与腰围及血脂的相关性较大,考虑是由于肥胖对雌激素生物活性的影响及脂肪组织成为内源性雌二醇的主要来源,而雌激素暴露恰好是乳腺癌最根本的致病因素^[13]。Schmid等^[14]通过meta分析对甲状腺癌进行研究发现糖尿病的相对风险为1.17(95%CI:0.99~1.39),糖尿病核心环节胰岛素通过促进甲状腺滤泡上皮细胞的增殖而促进甲状腺体积的增大及结节的形成,从而导致甲状腺癌的发生。在MS各因素中,前列腺癌与肥胖间的关系倍受关注,肥胖者性激素结合蛋白减少,导致睾酮清除加快激素水平下降;肥胖者脂肪组织中芳香化酶促使睾酮转变为雌二醇,加重睾酮水平的降低,导致前列腺癌发病率增加^[15]。

表3 配对肿瘤的MS相关因素的Logistic回归
Table 3 Logistic regression analysis of MS components for cancer

自变量	偏回归系数(β)	标准误(S.E.)	Wald	自由度(df)	Sig	优势比(OR)
腰围						
肝癌	1.74	0.48	13.06	1	0.02	5.68
乳腺癌	1.55	0.41	14.17	1	0.01	4.74
甲状腺癌	1.24	0.63	3.83	1	0.01	3.45
前列腺癌	1.21	0.74	2.68	1	0.01	3.36
肠癌	1.81	0.53	11.69	1	0.01	6.13
SBP						
肝癌	0.02	0.02	1.23	1	0.23	1.02
乳腺癌	0.07	0.78	0.01	1	0.1	1.07
甲状腺癌	0.15	0.63	0.05	1	0.22	1.16
前列腺癌	0.28	0.65	0.18	1	0.42	1.32
肠癌	0.01	0.49	0.001	1	0.33	1.01
TG						
肝癌	0.84	0.55	2.30	1	0.02	2.32
乳腺癌	1.48	0.76	3.78	1	0.01	4.40
甲状腺癌	1.12	0.48	5.34	1	0.01	3.05
前列腺癌	1.09	0.37	8.88	1	0.02	2.99
肠癌	1.33	0.59	5.11	1	0.02	3.77
HDL-C						
肝癌	-0.93	0.81	1.31	1	0.01	0.39
乳腺癌	-3.54	1.92	3.40	1	0.01	0.03
甲状腺癌	-0.85	0.99	0.74	1	0.01	0.43
前列腺癌	-2.78	1.11	6.29	1	0.01	0.06
肠癌	-3.15	1.85	2.90	1	0.01	0.04
FPG						
肝癌	0.016	0.015	1.227	1	0.10	1.01
乳腺癌	0.55	0.45	1.48	1	0.02	1.72
甲状腺癌	1.56	0.59	6.81	1	0.01	4.76
前列腺癌	0.16	2.06	0.006	1	0.01	1.86
肠癌	0.35	1.28	0.073	1	0.01	1.41

目前关于肠癌与肥胖的研究文献较多,本调查进行多元 Logistic 回归分析发现腰围和血脂均为肠癌发病的高危因素,其作用机制被假设为增加的胰岛素和胰岛素样生长因子发出了诱导癌细胞生长和繁殖的信号^[16],使肠癌的风险增加 30%~70%。

本次调查的样本量较少,病种较为单一,而肿瘤的发生机制是复杂而微妙的,因此仍需要继续对其进一步深入研究,并结合广州居民的生活、工作、饮食特点,统计肿瘤的发病率及类型,在代谢

紊乱中筛查恶性肿瘤。这不仅为制定干预策略提供客观、科学的依据,还对今后提高人群的整体健康水平、工作效率及生活质量具有重大的意义。

参考文献

- [1] Zhou HC, Lai YX, Shan ZY, et al. Effectiveness of different waist circumference cut-off values in predicting metabolic syndrome prevalence and risk factors in adults in China[J]. Biomed Environ Sci, 2014,27(5): 325-334.

(下转第 265 页)

伴神经内分泌分化肺腺癌血清癌胚抗原水平的分析

黄宇筠* 袁润强 陈应智 袁小玲 缪卓峰 庄楚璇

[摘要] 目的 探讨伴神经内分泌分化(neuroendocrine differentiation, ND)的肺腺癌血清癌胚抗原(carcinoembryonic, CEA)水平及其与ND的关系。方法 对160例确诊肺腺癌肺组织标本(包括手术切除及经纤支镜活检取得)采用免疫组化S-P法检测神经内分泌标志物的表达。治疗前抽取患者静脉血,用化学发光法检测血清CEA水平。结果 160例肺腺癌中具有ND的共19例(10.61%),其中突触素(synaptophysin, Syn)阳性5例(26.32%)、嗜铬颗粒蛋白(chromogranin, CgA)阳性7例(36.84%)、神经元特异性烯醇酶(neuron specific enolase, NSE)阳性1例(5.26%)、Syn和CgA同时阳性6例(31.58%)。伴ND的及不伴ND的肺腺癌组血清CEA水平分别为[16.54(2.5-89.92)]ng/mL和[2.71(1.56-4.97)]ng/mL,两者比较有统计学差异($P<0.05$)。在伴ND的肺腺癌中Syn阳性组、CgA阳性组、Syn+CgA阳性组血清CEA水平分别为[49.36(4.05-181.71)]ng/mL、[2.5(2.1-28.02)]ng/mL和[87.7(16.54-171.25)]ng/mL。Syn阳性组与CgA阳性组、Syn阳性组与Syn+CgA阳性组比较均无统计学差异(P 分别为0.198和0.462)。CgA阳性组与Syn+CgA阳性组比较有统计学差异($P=0.044$)。Syn与血清CEA水平有相关性。以不伴ND的肺腺癌为对照组,诊断伴ND的肺腺癌的血清CEA的最佳折点为15.89ng/mL,敏感性44.4%,特异性90.6%,曲线下面积为0.76。结论 血清CEA可能是预测肺腺癌伴ND的一个简单有效的指标。

[关键词] 神经内分泌分化; 肺腺癌; 癌胚抗原

The analysis of serum carcinoembryonic in neuroendocrine differentiation of lung adenocarcinoma
HUANG Yujun*, YUAN Runqiang, CHEN Yingzhi, YUAN Xiaoling, MIAO Zhuofeng, ZHUANG Chuxuan
(Department of Respiratory Medicine, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China, 528403)

[ABSTRACT] Objective To explore the levels of carcinoembryonic antigen (CEA) and the correlation between CEA and neuroendocrine differentiation (ND) in patients with lung adenocarcinoma of neuroendocrine. Methods 160 lung tissue samples with lung adenocarcinoma (including surgical resection and biopsy by bronchoscopy) were taken in. The levels of neuroendocrine markers were detected by immunohistochemical S-P method. And the levels of serum CEA were detected by chemiluminescence before treatment. Results There were 19 lung adenocarcinomas (10.61%) with neuroendocrine differentiation in the 160 cases of lung adenocarcinomas. Among the 19 cases, 5 cases (26.32%) were positive of synaptophysin (Syn), 7 cases (36.84%) were positive of chromogranin (CgA), 1 case (5.26%) was positive of neuron specific enolase (NSE), and 6 cases (31.58%) were positive of both Syn and CgA. The levels of serum CEA in lung adenocarcinoma with ND and non-neuroendocrine differentiation were [16.54 (2.5-89.92)] ng/mL and [2.71 (1.56-4.97)] ng/mL, respectively. And there was a significant difference in the levels of serum CEA between the two groups ($P<0.05$). In the lung adenocarcinoma with ND, the levels of serum CEA in group positive of Syn, group positive of CgA and group positive of Syn and CgA were [49.36 (4.05-181.71)] ng/mL, [2.5 (2.1-28.02)] ng/mL and [87.7 (16.54-171.25)] ng/mL, respectively.

作者单位: 中山市人民医院呼吸内科, 广东, 中山 528403

*通讯作者: 黄宇筠, E-mail: sxhyj@126.com

There were no significant differences in the levels of serum CEA between the group positive of CgA, either between the group positive of Syn and the group positive of both Syn and CgA ($P=0.198$ and $P=0.462$, respectively). There was a significant difference in the levels of serum CEA ($P=0.044$) between the group positive of CgA and the group positive of both Syn and CgA. And there was a correlation between Syn and the levels of serum CEA. Taking the lung adenocarcinoma with non-neuroendocrine differentiation as a control group, the cut-off of serum CEA to distinguish lung adenocarcinoma with ND was 15.89 ng/mL, while the sensitivity, specificity and the area under curve were 44.4%, 90.6% and 0.76, respectively. Conclusion The serum CEA is possibly a simple and effective marker to predict the lung adenocarcinoma with ND.

[KEY WORDS] Neuroendocrine differentiation; Lung adenocarcinoma; Carcinoembryonic antigen(CEA)

据 2008 年我国 36 个肿瘤登记点发布数据显示,肺癌新发病例数约 52.2 万, 占有恶性肿瘤病例数 18.5%。肺癌死亡病例数约 45.3 万, 占有恶性肿瘤死亡例数的 23.1%。肺癌的发病率和死亡率均居所有恶性肿瘤之首^[1]。肺癌分小细胞肺癌与非小细胞肺癌。研究发现^[2]不同类型的非小细胞肺癌具有神经内分泌分化, 尤其多见于腺癌^[3]。Dong^[4]报道神经内分泌分化与肺腺癌复发有关, 有可能成为腺癌转移的指标, 突触素 (synaptophysin, Syn) 阳性者预后差。癌胚抗原 (carcinoembryonic, CEA) 是一种人类胚胎抗原特异性指标, 对腺癌具有较高的敏感性。本研究探讨伴神经内分泌分化的肺腺癌血清 CEA 水平及其与神经内分泌分化的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 1 月至 2013 年 9 月广东省中山市人民医院病理科确诊为肺腺癌的肺组织标本 (包括手术切除和经纤支镜取得) 160 例。年龄 (59.07 ± 10.18) 岁, 其中男性 77 例 (48.13%), 女性 83 例 (51.87%)。所有病例均未接受过任何治疗。病理标本由两名病理医师采取双盲法进行阅片, 标本的组织分型按照 2004 年世界卫生组织标准进行分类^[5]。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色

对所有标本采用 S-P 法检测 Syn、嗜铬颗粒蛋白 (chromogranin, CgA) 及神经元特异性烯醇酶 (neuron specific enolase, NSE) 的表达情况。采用美国全自动免疫组化染色仪 (型号 Ventana Ben ChniarkxT), 试剂盒为项目配套原装试剂。PBS 缓

冲液代替第一抗体作为空白对照, 细胞浆内含棕色颗粒为阳性细胞。阳性癌细胞数小于 5% 为阴性, 阳性癌细胞数大于或等于 5% 为阳性, 其中阳性癌细胞 5% ~ 10% 为 (+), 10% ~ 20% 为 (++) , 20% ~ 50% 为 (+++) , > 50% 为 (++++)。有下述情况之一者确定为神经内分泌分化: 有 1 种神经内分泌标志物表达为 +++ 以上, 或至少有 2 种标志物表达为 + ~ ++ (指 1 至 2 个+)。

1.2.2 化学发光法

采用化学发光法检测血清 CEA 水平。仪器为瑞士 Roche E601 电化学发光分析仪, 试剂盒为项目配套原装试剂, 严格按使用说明操作。

1.3 统计学方法

统计分析使用 SPSS 13.0 软件进行。正态分布资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布资料用中位数 (四分位间距) 表示, 比较采用秩和检验分析, 相关性采用直线相关性分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

160 例肺腺癌中具有神经内分泌分化的共 19 例 (10.61%)。其中: Syn 阳性 5 例, 阳性率 26.32%; CgA 阳性 7 例, 阳性率 36.84%; NES 阳性 1 例, 阳性率 5.26%; Syn 和 CgA 同时阳性 6 例, 阳性率 31.58%。伴神经内分泌分化 (neuroendocrine differentiation, ND) 的肺腺癌组血清 CEA 为 [16.54 (2.5-89.15)] ng/mL, 不伴 ND 的肺腺癌组血清 CEA 为 [2.71 (1.56-4.97)] ng/mL, 两者比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。伴 ND 的肺腺癌中各组血清 CEA 水平见表 1, 各组血清 CEA 水平的比较见表 2。Syn 阳性组与 CgA 阳性组、Syn 阳性组与 Syn + CgA 阳性组比较均无统计学差异 (P 分别为 0.198 和 0.462)。CgA 阳性组与 Syn + CgA 阳性组比较

有统计学差异($P = 0.044$)。Syn 阳性与血清 CEA 水平有相关性。以不伴 ND 的肺腺癌为对照组, 诊断伴 ND 的肺腺癌血清 CEA 的最佳折点为 15.89 ng/mL, 敏感性 44.4%, 特异性 90.6%, 曲线下面积 0.76, 受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线见图 1。

3 讨论

1999 年在肺与胸膜肿瘤组织病理学分类标准中新增加了非小细胞癌伴神经内分泌分化(non-small cell lung cancer-neuroendocrine differentiation)的概念, 指在光镜下不具有神经内分泌形态特征, 但免疫组化和电镜证明有神经内分泌分化的 CgA 或 Syn 呈阳性表达, 其与肺神经内分泌癌是不同的概念。肺神经内分泌癌是由支气管粘膜上皮及粘膜下腺体中的神经内分泌细胞(kulchitsky cell)发生的肿瘤^[6], 而肺肿瘤伴 ND 是指至少

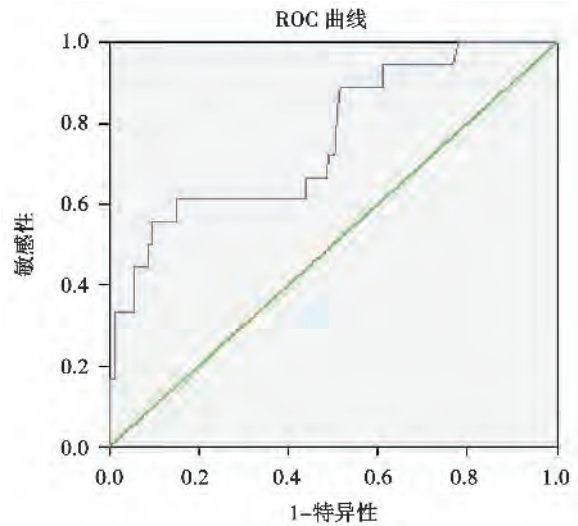


图 1 血清 CEA 诊断伴神经内分泌分化的肺腺癌的 ROC 曲线

Figure 1 The ROC curve of serum CEA in diagnosing lung adenocarcinoma with ND

表 1 各组血清 CEA 水平 (ng/mL)

Table 1 The levels of serum CEA in each group (ng/mL)

	Syn 阳性组	CgA 阳性组	(Syn + CgA) 阳性组
血清 CEA 水平 (ng/mL)	49.36 (40.5-181.71)	2.5 (2.1-28.02)	87.7 (16.54-171.25)

表 2 各组血清 CEA 水平比较

Table 2 Comparison of the serum CEA in each group

Z/P	Syn 阳性组	CgA 阳性组	(Syn + CgA) 阳性组
Syn 阳性组	-	-0.1287/0.198	-7.35/0.462
CgA 阳性组	-1.287/0.198	-	-2.018/0.044
(Syn + CgA) 阳性组	-7.35/0.462	-2.018/0.044	-

有 50% 的肿瘤细胞被确认同时伴有神经内分泌分化, 而且这些细胞往往显示出个别不同的细胞形态或排列方式^[7]。免疫组化标记是检测神经内分泌较好的方法。国内外文献报道 CgA、Syn 和 NSE 是一组特异性和敏感性较好的神经内分泌分化共同标志。有研究者认为, 在不同组织的非小细胞肺癌 (nonsmall-cell lung cancer, NSCLC) 中腺癌更易出现 ND。在张军等^[8] 对 206 例 NSCLC 的 ND 进行的研究中, ND 发生率 39.8%, Syn 阳性率 44.2%, CgA 阳性率 25.7%, NSE 阳性率 50.5%。除 CgA 阳性率外, 均高于本研究结果。此可能原因是: (1) 两者所

研究的对象不一样。张军等研究的是 NSCLC, 本研究研究的是肺腺癌。(2) 检测方法不一样。张军等所用的是 Envision 二步法, 采用即用型鼠抗人 Syn、CgA 和 NSE 单克隆抗体, 试剂盒均由丹麦 DAKU 公司提供。而本研究所用的是 S-P 法, 使用美国全自动免疫组合染色仪, 试剂盒为原装配套试剂。(3) 标本来源不完全一致。张军等的标本是由外科手术切除所得。而本研究的标本除通过手术切除外, 还有通过纤维支气管镜活检取得。

国外学者研究表明伴 ND 的肺腺癌患者存活率比无 ND 的肺腺癌患者低 ($P < 0.0005$)^[7]。国内

学者研究则显示肺腺癌中 ND 与术后复发转移相关^[9]。可见伴 ND 是肺腺癌预后不好的一个指标。此可能是伴 ND 的肿瘤细胞能通过多种方式产生活性物质, 这些活性物质能刺激周边肿瘤细胞的生长, 加强肿瘤细胞繁殖和抗凋亡的能力, 从而导致预后不良^[10-11]。本研究中, 伴 ND 的肺腺癌血清 CEA 水平高于不伴 ND 的肺腺癌的血清 CEA 水平, Syn 与血清 CEA 水平有相关性。我们推测: 血清 CEA 可能是上述众多活性物质之一。黎春艳等^[12]研究指出血清 CEA 过表达, 促进肺腺癌 A549 细胞的迁移和侵袭, 支持这一推论。CEA 属于细胞表面的糖蛋白家族, 存在于细胞膜上, 为免疫球蛋白超家族成员中的细胞粘附分子, 具有同嗜和异嗜粘附功能, 其通过破坏细胞的极性抑制细胞的凋亡, 抑制细胞分化而导致肿瘤的发生^[13-14], 在肿瘤转移中可能起着重要的作用^[15]。相关研究显示在肺癌患者血清中 CEA 水平要明显高于正常人或良性肿块患者, 且在肺腺癌中表达率最高达 70%^[16-17]。CEA 与肺腺癌生存率密切相关^[18]。在神经内分泌化的肺腺癌中, 血清 CEA 水平 Syn + CgA 阳性组 > Syn 阳性组 > CgA 阳性组, Syn 阳性与 CgA 阳性组、Syn 阳性与 Syn + CgA 阳性组血清 CEA 水平比较无统计学差异, 而 CgA 阳性与 Syn + CgA 阳性组血清 CEA 水平比较有统计学差异, 结合 Dong 等^[4]研究示 ND 与肺腺癌生物行为有关, 且闵晓红等^[19]发现结肠腺癌伴 ND 与 CEA 表达具有相关性 ($P < 0.05$), 由此我们推测: 伴 ND 的肿瘤细胞可分泌活性物质 CEA, Syn、CgA 可能参与整个过程, 但 Syn 作用强于 CgA, CgA 可能在此过程中只起协同作用, 加强 Syn 参与产生 CEA 过程的作用。此待进一步研究证实。

本研究以不伴 ND 的肺腺癌为对照组, 诊断 ND 的肺腺癌血清 CEA 的特异性为 90.6%, 提示 CEA 可能是预测肺腺癌伴神经内分泌分化的一个简单有效的指标, 但其敏感性低 (仅 44.4%), 建议联合其它的指标来判断。CEA 对肺腺癌是否伴神经内分泌分化的判断意义, 尚待大型前瞻性研究进一步明确。

综上所述, 伴 ND 的肺腺癌血清 CEA 水平高于不伴 ND 的肺腺癌。Syn 与血清 CEA 成正相关。血清 CEA 水平可能是预测肺腺癌伴 ND 的一个简单有效的指标。

参考文献

- [1] 昌盛,代敏,任建松,等. 中国 2008 年肺癌发病、死亡和患者情况的统计及预测[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(4):391-394.
- [2] Segawa Y, Takata S, Fujii M, et al. Immunohistochemical detection of neuroendocrine differentiation in non-small-cell lung cancer and its clinical implication [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2009,135(8):1055-1059.
- [3] Monica V, Scagliotti GV, Ceppi P, et al. Differential thymidylate synthase expression in different variants of large-cell carcinoma of the lung [J]. *Clin Cancer Res*, 2009,15(24):7547-7552.
- [4] Dong YH, Sun LN, Sun BC, et al. Clinical relevance of neuroendocrine differentiation in lung adenocarcinoma[J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2012,2(11):76-79.
- [5] Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 world health organization classification of lung tumors [J]. *Semin Roentgenol*, 2005,40(2):90-97.
- [6] Chong S, Lee KS, Chung MJ, et al. Neuroendocrine tumors of the lung: clinical, pathologic, and imaging findings[J]. *Radiographics*, 2006,26(1):41-57.
- [7] Hiroshima K, Iyoda A, Shibaya K, et al. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in adenocarcinoma of the lung[J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(6):1732-1735.
- [8] 张军,郑镔,郭燕,等. 非小细胞肺癌神经内分泌分化与其生物学特性及预后关系的研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2010,13(9):873-876.
- [9] 郭燕,孙曹娜,栾焕玲,等. 肺腺癌神经内分泌分化与其生物学行为及预后的相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2010,37(6):323-324.
- [10] Federico GA, Nicolás MM, María CP, et al. Prognostic significance of synaptophysin in stage I of squamous carcinoma and adenocarcinoma of the lung[J]. *Cancer*, 2007,110(8):1776-1781.
- [11] Ionescu DN, Treaba D, Gilks CB, et al. Nonsmall cell lung carcinoma with neuroendocrine differentiation-an entity of no clinical or prognostic significance[J]. *Am J Surg Pathol*, 2007,31(1):26-32.
- [12] 黎春艳,赵妍妍,汪小鹏,等. IL-1 β 诱导 A549 细胞 CEA 过表达对其浸润迁移的影响[J]. 2013,20(9):1028-1031.
- [13] Ordóñez C, Screaton RA, Ilantzis C, et al. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis[J]. *Cancer Res*, 2000,60(13):3419-

- 3424.
- [14] Screaton RA, Penn LZ, Stanners CP, et al. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation[J]. *Cell Biol*, 1997,137(4):939-952.
- [15] Salgia R, Harpole D, Herndon JE, et al. Role of serum tumor markers CA125 and CEA in non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2001,21(2B):1241-1246.
- [16] Shoenfeld Y, Szyper-kravitz M, Witte T, et al. Autoantibodies against protective molecules-C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein AI: prevalence in systemic lupus erythematosus[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007,1108(1):227-239.
- [17] Park Y, Kim Y, Lee JH, et al. Usefulness of serum anti-P53 antibody assay for lung cancer diagnosis [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011,135(12):1570-1575.
- [18] 任开明,石文君. 血清 CEA 水平与肺腺癌 TNM 分期、治疗方法及生存率的相关性分析[J]. *山东医药*, 2011, 51(42):73-74.
- [19] 闵晓红,陆建波,宋精玲. 结肠腺癌伴神经内分泌分化的临床病理学意义[J]. *昆明医科大学学报*, 2013,3(34):67-72.

(上接第 260 页)

- [2] Saukkonen T, Jokelainen J, Timonen M, et al. Prevalence of metabolic syndrome components among the elderly using three different definitions: a cohort study in Finland[J]. *Scand J Prim Health Care*, 2012,30(1): 29-34.
- [3] 嵇红,黄建萍,杨自力,等. 应用不同诊断标准诊断代谢综合征的一致性比较[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2008,16(6):586-589.
- [4] Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms[J]. *J Endocrinol*, 2014,220(2):T1-T23.
- [5] 中国成人血脂异常防治指南制定联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. *中华心血管杂志*, 2007,35(5): 390-419.
- [6] Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer[J]. *Clin Sci*, 2010,118(5):315-332.
- [7] Byers T, Sedjo RL. Does intentional weight loss reduce cancer risk?[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011,13(12): 1063-1072.
- [8] Tseng CH. Diabetes and non-hodgkin's lymphoma: analyses of prevalence and annual incidence in 2005 using the national health insurance database in Taiwan[J]. *Ann Oncol*, 2012,23(1):153-158.
- [9] Tseng CH. Diabetes and risk of prostate cancer:a study using the national health insurance[J]. *Diabetes Care*, 2011,34(3):616-621.
- [10] 宋巧巧,庞荣清,阮光萍,等. 代谢综合征动物模型的研究进展[J]. *医学综述*, 2012,18(23):4018-4020.
- [11] Chen Y, Wang X, Wang J, et al. Excess body weight and the risk of primary liver cancer: an updated meta-analysis of prospective studies[J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(14):2137-2145.
- [12] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2014,26(1):48-58.
- [13] Wang Q, Li H, Tao P, et al. Soy isoflavones, CYP1A1, CYP1B1, and COMT polymorphisms, and breast cancer: a case-control study in southwestern China[J]. *DNA Cell Biol*, 2011,30(8):585-595.
- [14] Schmid D, Behrens G, Joehem C, et al. Physical activity, diabetes, and risk of thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Epidemiol*, 2013,28(12):945-958.
- [15] Kim JM, Song PH, Kim HT, et al. Effect of obesity on prostate-specific antigen, prostate volume, and international prostate symptom score in patients with benign prostatic hyperplasia[J]. *Korean J Urol*, 2011,52(6):401-405.
- [16] Bardou M, Barkun AN, Martel M. Republished: obesity and colorectal cancer[J]. *Postgrad Med J*, 2013,89(1055): 519-533.

核酸适配子及其在阿尔茨海默病研究中的应用

寇哲文¹ 王家鹏² 张兴梅^{1*}

[摘要] 核酸适配子是一类寡核苷酸分子,它可由指数级富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选寡核苷酸文库而获得。适配子通过与靶分子特异结合,可起到识别或抑制靶分子生物学活性的作用。近年来,越来越多的适配子不断被应用于阿尔茨海默病等中枢神经系统疾病的研究。本文将对近年来核酸适配子在阿尔茨海默病诊断和治疗的研究进展作一综述。

[关键词] 阿尔茨海默病;核酸适配子;指数级富集配体系统进化

Nucleic acid aptamers and its applications in diagnosis and therapy of Alzheimer's diseases

KOU Zhewen¹, WANG Jiapeng², ZHANG Xingmei^{1*}

(1. Key Laboratory of Psychiatric Disorders of Guangdong Province, Department of Neurobiology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. The First Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Nucleic acid aptamers are a kind of oligonucleotides which generated by the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) process. Aptamers can recognize or inhibit the activity of their targets by specifically binding to their targets. In recent years, aptamers have been extensively studied and used for diagnostics and therapeutics in the central nervous system including Alzheimer's diseases. In this paper, the current progresses of aptamer-based Alzheimer's diseases diagnosis and aptamer-mediated active targeting for Alzheimer's diseases therapy will be reviewed.

[KEY WORDS] Alzheimer's disease; Nucleic acid aptamer; Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性的中枢神经系统退行性疾病,临床表现主要为记忆力衰退、认知功能障碍、人格异常等^[1]。由于人口老龄化和诊断率提高,AD患者的发病人数逐年增加,已成为日益严重的社会问题。全世界AD患者的发病人数在2010年为3600万,据预测,该数据将在2050年增至3倍^[2]。AD晚期患者生活不能自理,给患者家庭及社会带来巨大的经济负担。仅2010年全球AD治疗费用约达6040

亿美元。AD已经成为严重的世界医疗问题,寻找新的致病原因和新的诊断和治疗方法非常紧迫。

AD的特征性病理表现是神经元细胞丢失、老年斑(senile plaque, SP)、神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)等。AD的发病原因尚不清楚,目前认为淀粉样前体蛋白、淀粉样蛋白(amyloid β , A β)的聚积和tau蛋白的过度磷酸化是AD发病的重要原因。另外认为RNA结合蛋白TDP-43、 α 突触核蛋白(α -synuclein)、载脂蛋白E4

基金项目:国家自然科学基金(81471388);广东省自然科学基金(2014A30313351)

作者单位:1. 南方医科大学神经生物学教研室,广东省重大精神疾病研究重点实验室,广东,广州 510515

2. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

*通讯作者:张兴梅, E-mail: zxmray@hotmail.com

(apolipoprotein E4, apoE4)及组蛋白去乙酰化酶 2 (histone deacetylase 2, HDAC2)等相互作用也可能参与 AD 的发病^[3]。对于 AD 目前尚无有效的根治方法,临床常用的治疗 AD 的 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)拮抗剂和乙酰胆碱酯酶抑制剂等药物只能暂时缓解 AD 的症状。

核酸类适配子具有分子小、细胞渗透性强、结构稳定、无毒性和免疫原性等特性,更适合穿过血脑屏障作用于中枢神经系统疾病。由于其独特的特性,适配子有望媲美抗体作为药物运输载体、分子探针或抑制剂等在 AD 的诊断和治疗中发挥作用。本文对近年来核酸适配子在阿尔茨海默病的诊断和治疗研究中的应用进行综述。

1 适配子概述

人们认识到核酸的主要功能不仅仅是携带遗传信息,例如:一些单链核酸分子具有执行各种各样细胞功能的能力。1990年 Tuerk 等^[4]和 Ellington 等^[5]分别报道了应用指数级富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选到能与噬菌体 T₄DNA 聚合酶和有机染料特异性结合的 RNA 片段,并命名为“适配子”或“适体”。核酸适配子由寡核苷酸(DNA 或 RNA)组成,能以高特异性及高亲和力与靶标结合并调节靶分子或靶细胞的活性^[6]。适配子可用作治疗疾病的诊断和治疗试剂,还具有运载药物等功能,所以从被发明起就引起广泛关注。

核酸类适配子结合靶分子的主要机制是单链 RNA 或 DNA 可形成多种热力学稳定的三维空间结构,如口袋、发夹、凸环、假结和 G-四聚体等,这些空间结构与靶分子间通过范德华力、氢键等相互作用形成稳定的复合物。由于能够与靶分子紧密且特异地结合,适配子被人们看作一种体外合成的“抗体”,有些适配子的亲和力和特异性甚至优于抗体。

与抗体相比,适配子表现出多种优点:(1)分子量小、细胞渗透性强、结构稳定,可以抵抗还原条件。(2)无免疫原性和毒性,可作为疾病诊断和治疗的工具。(3)靶分子广泛并且结合靶分子的亲和力高、特异性强。(4)易于体外合成和修饰,可短

期内批量生产,重复性好等^[7]。

随着人们对适配子功能和应用研究的深入,适配子已成为在疾病的诊断及治疗方面一个引人注目研究的手段。适配子应用于疾病的主要作用包括:抗肿瘤、抗凝血、抗病毒、抗增生、抗炎及免疫调节等^[8]。近年来,适配子也越来越多地应用于中枢神经系统疾病的诊断与治疗,包括 AD、脑肿瘤、肌蛋白病及重症肌无力等疾病。

2009年,研究者发现人工合成的 XNA(xeno-nucleic acids)分子在许多关键功能上可替代 DNA 和 RNA^[9]。这些 XNA 分子能与互补的 RNA 或 DNA 相结合,并且不受 DNA 酶和 RNA 酶的作用。他们还设计了可从一个 DNA 模板来合成 XNA 的多聚酶和可以反向将 XNA 转录成 DNA 的多聚酶。这一系统使得由 XNA 编码的信息得以复制,以及储存并遗传。2012年成功筛选到能形成特定分子结构并能与靶分子特异结合的 XNA 适配子^[10]。对于寡核苷酸适配子,这将是一种新的研究方向。例如:其磷酸与核糖(或脱氧核糖)骨架的修饰和改变可能促进核酸类适配子的生物利用度和药物动力学,这对适配子的临床应用具有积极促进作用。

2 适配子的筛选技术——SELEX

SELEX 是一种能获取与靶分子高选择、高亲和力结合的寡核苷酸的筛选技术。大多数适配子是通过 SELEX 技术从化学随机合成的文库容量约为 10^{14} ~ 10^{16} 的寡核苷酸文库中筛选得到的。SELEX 技术通过数轮或数十轮重复筛选,最后得到特异结合靶分子的寡核苷酸序列。每一轮筛选包括 3 个主要步骤:(1)结合:将靶分子与随机寡核苷酸文库进行孵育;(2)分离:形成寡核苷酸-靶标复合物与未结合的寡核苷酸分离;(3)扩增:结合的寡核苷酸序列经 PCR 扩增,并可制备新的筛选寡核苷酸亚库。一般经过十几轮筛选即可得到理想的具备高特异性和亲和力的适配子。随着筛选轮数的增加,可逐渐富集到与靶分子的结合亲和力逐步增加的寡核苷酸,最后进行克隆测序即可得到核酸适配子^[11]。

SELEX 技术具有非常广泛的靶分子,这些靶物质包括蛋白、小分子有机物、核酸、多肽、多糖类、细菌、金属离子、病毒颗粒、活细胞及组织等^[12]。近

年来传统的 SELEX 技术经过了许多改进,将亲和层析法^[13]、磁性分离技术^[14]、动力学毛细管电泳^[15]、微流体^[16]等技术方法应用到了其中。这些新方法有利于 SELEX 筛选中提高获得适配子的功能、增加筛选效率、减低对靶标的要求等,对促进 SELEX 技术的发展具有重要意义。

3 适配子在 AD 的治疗和诊断中的应用

3.1 适配子在 AD 治疗中的应用

淀粉样蛋白来源于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)。APP 共有 2 条水解途径:一是被 α -分泌酶水解,生成可溶性无毒性的分泌型 APP (sAPP);二是被 β -分泌酶和 γ -分泌酶连续作用分解 APP 产生 $A\beta$ 。由于 γ -分泌酶有多个不同水解位点,可产生多种不同氨基酸长度的 $A\beta$ 。其中 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 是 2 种主要的 $A\beta$ 单体。 $A\beta_{40}$ 是人体内大脑皮质老年斑的主要组成部分, $A\beta_{42}$ 虽只占 $A\beta$ 总数的 10%,但有更强的毒性和聚积能力。

在 2009 年筛选得到能与 $A\beta_{40}$ 结合并抑制其聚合的 RNA 适配子。以与胶体金毫微粒共轭的 $A\beta_{40}$ 作为靶分子筛选出了两个适配子 N2 和 E2^[17]。通过酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和电镜观察结果显示,适配子能够有效结合 $A\beta_{40}$ 并且抑制 $A\beta_{40}$ 的聚集。通过偶联 N2 适配子和姜黄素-聚乳酸聚乙醇酸(lactic-co-glycolic acid-PLGA)分子,成功构造 N2 适配子-姜黄素-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒子(N2-curcumin-PLGA)以增强适配子对淀粉样蛋白的结合能力^[18]。结果表明 N2 适配子-姜黄素-聚乳酸聚乙醇酸纳米粒子能够有效促进淀粉样蛋白的解聚。同时纳米粒子修饰可以作为一个潜在的工具来加强适配子与靶分子的结合能力,为适配子治疗 AD 的研究提供了新的方法。

将 Ru(II)(多吡啶;4,4'-二甲基-2,2'-联吡啶;4,4'-二羧酸-2,2'-联吡啶,吩嗪;二吡啶吩嗪)化合物与有效结合 $A\beta$ 单体 RNA 适配子进行连接,形成适配子-Ru(II)复合物^[19]。当荧光标记的适配子-Ru(II)的复合物与 $A\beta$ 单体共同孵育时,研究人员们发现复合物的发光强度会降低,表明此复合物可用于 AD 患者的早期检测。同时还发现适配子-Ru(II)复合物能有效降低 $A\beta$ 的聚集和纤

维状缠结,所以适配子-Ru(II)复合物将有可能被运用于 AD 的治疗。

除了 $A\beta$ 以外, β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 也是 AD 治疗的重要靶标。 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1),也称 β -分泌酶 1(β -secretase 1),是脑内最主要的 β -分泌酶,是 $A\beta$ 产生过程中的限速酶。目前已发现在 AD 病人尸检脑组织中,BACE1 的表达和活性增高。抑制 BACE1 活性可减轻小鼠脑内的 $A\beta$ 含量。因此 BACE1 是治疗 AD 的重要靶标。BACE1 的酶活性位于胞外结构域,其中有一个短小的胞质尾区 B1-CT(BACE1 cytoplasmic tail)。B1-CT 为两种蛋白质提供了结合位点,其中包括 CCS 蛋白结合位点(copper chaperone for superoxide dismutase-1, CCS)、GGA1 结合位点(golgi-localized, g-ear-containing, ADP ribosylation factor-binding, GGA1) 以及一个磷酸结合位点,其中 GGA1 和磷酸结合位点控制 BACE1 的运输。2006 年成功筛选得到能与 B1-CT 位点结合的 RNA 适配子^[20]。适配子可特异性地干扰了 CCS 的补充,但仍允许 GGA1 的正常结合和磷酸位点的正常磷酸化。因此 RNA 适配子只抑制 B1-CT 的活性而不影响 BACE1 在细胞间的运输,对促进 B1-CT 位点对 AD 的作用机制的研究,并有可能有潜在的治疗作用。

筛选针对 AD 发病机制中重要蛋白的适配子可对 AD 的发病机制及其治疗提供有用的工具。适配子本身分子小、穿透能力强、易修饰和合成等特点使得适配子有可能被开发成治疗 AD 的先导药物。近年来随着适配子纳米修饰等技术的进展,进一步推动了适配子的临床应用研究。

3.2 适配子在 AD 诊断中的应用

传统检测 AD 的方法包括利用脑部正电子发射型计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET)和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等影像学技术,也可运用脑脊液分析技术等蛋白质组学分析技术。已经筛选得到的适配子可特异性结合 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 等多种分子,所以适配子也可应用于 AD 患者的诊断检测。

至今已有大量文献报道利用影像学方法诊断 AD 的方法。这些方法依赖于小分子标记物或者荧

光标记蛋白做显像剂。荧光标记的抗体也可以作为显像剂, 但因其具有免疫原性从而易引起生物学反应, 影响显像水平, 所以并不是最理想的显像剂。寡核苷酸适配子具有分子量小、靶向性好、易合成、无免疫原性等特点, 为基于适配子的显像剂的发展提供了潜在可能性。2013年, 研究者利用 SELEX 技术构造了一个可特异性结合 $A\beta$ 的荧光标记的 RNA 适配子 $\beta 55^{[21]}$ 。 $\beta 55$ 可结合 AD 患者和 APP / PS1 转基因小鼠的脑组织 $A\beta$ 。荧光标记的 $\beta 55$ 可有助于显示 $A\beta$ 低聚物的定位, 此显像剂可用于 AD 的 PET 或 MRI 检测。

蛋白质组学检测脑脊液成分的方法也可应用于检测 AD。但是因其取样难度高, 费用昂贵, 样品用量多而受到限制。2014年, 有学者^[22]将适配子应用到生物芯片中, 并且成功将检测样品由脑脊液换成血浆。结果表明, 利用适配子的蛋白质组化检测技术通过血浆样品来检测 AD, 其灵敏度可达 90.1%, 特异性可达 84.2%。这项技术若能用于临床, 将有助于降低 AD 的检测成本、减轻测试者痛苦、提高 AD 检测的准确率。

α -突触核蛋白是一种在中枢神经系统突触前及核周表达的可溶性蛋白质, 它与帕金森病的发病机制和相关功能障碍密切相关, 是路易小体的主要成分。研究发现 α -突触核蛋白正常、错误折叠及其寡聚化之间存在平衡关系, 当这种平衡被打破后原纤维迅速聚集成大分子、不溶性的细纤维。2012年利用凝胶迁移阻滞法与竞争筛选法成功得到能与 α -突触核蛋白寡聚物结合的 DNA 适配子^[23]。在筛选适配子的过程中, 研究人员将寡聚体态、单体态以及纤维态的 α -突触核蛋白固定在硝酸纤维膜上, 并让 DNA 文库与各种状态的 α -突触核蛋白结合, 最终获得能与寡聚体态的 α -突触核蛋白结合的 DNA 适配子。结果显示被筛选出来的 DNA 适配子也能与 $A\beta_{40}$ 寡聚物结合, 有可能被运用到 AD 疾病的诊断和治疗。

适配子作为可与抗体相媲美的小分子物质, 还具有某些优于抗体的特性, 比如: 体外筛选即可得到, 不需要进行动物免疫; 免疫原性低; 毒性低; 分子小; 易于合成、修饰和储存; 有毒分子也可筛选得到适配子等。这些特点有利于适配子在疾病 (包括 AD 等) 诊断方面会有越来越多的应用。

4 总结和展望

适配子作为药物和诊断试剂具有分子小、特异性高、亲和力高和无毒、细胞穿透力强、无免疫原性等特点, 适用于中枢神经系统疾病尤其是 AD 的诊断和治疗。从适配子被发现至今, 相关技术发展迅猛, 相关的研究成果很多。可以预言, 基于适配子的诊断和治疗技术可能会与抗体一样成为重要的生物技术之一。然而目前适配子作为临床药物制剂在体内的作用仍存在靶标筛选方法自动化低、体内药物稳定性等问题; 作为诊断试剂, 其准确度和灵敏度还有待进一步提高。相信随着适配子研究的深入, 适配子将会在 AD 等神经退行性疾病的诊断与治疗方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Peri A, Serio M. Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2008,41(5):251-261.
- [2] Prince M, Bryce R, Albanese E, et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis [J]. *Alzheimer's & Dementia: the Journal of the Alzheimer's Association*, 2013,9(1):63-75.
- [3] Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2013,501(7465):45-51.
- [4] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. *Science*, 1990,249(4968):505-510.
- [5] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990,346(6287):818-822.
- [6] Wandtke T, Wozniak J, Kopinski P. Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections[J]. *Viruses*, 2015,7(2):751-780.
- [7] Liao J, Liu B, Liu J, et al. Cell-specific aptamers and their conjugation with nanomaterials for targeted drug delivery[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2015,12(3):493-506.
- [8] Xiang D, Shigdar S, Qiao G, et al. Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: the next generation of cancer medicine [J]. *Theranostics*, 2015,5(1):23-42.
- [9] Herdewijn P, Marliere P. Toward safe genetically modified organisms through the chemical diversification of

- nucleic acids[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2009,6(6): 791–808.
- [10] Pinheiro VB, Taylor AI, Cozens C, et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution [J]. *Science*, 2012,336(6079):341–344.
- [11] Radom F, Jurek PM, Mazurek MP, et al. Aptamers: molecules of great potential[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8):1260–1274..
- [12] Lee SJ, Kwon YS, Lee JE, et al. Detection of VR-2332 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type II using an aptamer-based sandwich-type assay[J]. *Analytical chemistry*, 2013,85(1):66–74.
- [13] Kowalska E, Bartnicki F, Pels K, et al. The impact of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resins on DNA aptamer selection [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014,406(22):5495–5499.
- [14] Peng Z, Ling M, Ning Y, et al. Rapid fluorescent detection of escherichia coli K88 based on DNA aptamer library as direct and specific reporter combined with immuno-magnetic separation [J]. *Journal of Fluorescence*, 2014,24 (4):1159–1168.
- [15] Ashley J, Li SF. Three-dimensional selection of leptin aptamers using capillary electrophoresis and implications for clone validation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 434(1):146–152.
- [16] Ryckelynck M, Baudrey S, Rick C, et al. Using droplet-based microfluidics to improve the catalytic properties of RNA under multiple-turnover conditions[J]. *RNA*, 2015,21(3):458–469.
- [17] Takahashi T, Tada K, Mihara H. RNA aptamers selected against amyloid beta-peptide (Abeta) inhibit the aggregation of Abeta[J]. *Molecular Biosystems*, 2009,5 (9): 986–991.
- [18] Mathew A, Fukuda T, Nagaoka Y, et al. Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease[J]. *Plos One*, 2012,7(3):e32616.
- [19] Babu E, Muthu MP, Sathish V, et al. Sensing and inhibition of amyloid-beta based on the simple luminescent aptamer-ruthenium complex system[J]. *Talanta*, 2015, 134:348–353.
- [20] Rentmeister A, Bill A, Wahle T, et al. RNA aptamers selectively modulate protein recruitment to the cytoplasmic domain of beta-secretase BACE1 in vitro[J]. *RNA*, 2006,12 (9):1650–1660.
- [21] Farrar CT, William CM, Hudry E, et al. RNA aptamer probes as optical imaging agents for the detection of amyloid plaques[J]. *Plos One*, 2014,9(2):e89901.
- [22] Zhao X, Lejnine S, Spond J, et al. A candidate plasma protein classifier to identify Alzheimer's disease [J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2015,43(2):549–563.
- [23] Tsukakoshi K, Abe K, Sode K, et al. Selection of DNA aptamers that recognize alpha'synuclein oligomers using a competitive screening method [J]. *Analytical Chemistry*, 2012,84(13):5542–5547.

miR-451 与肿瘤的相关性

李莎¹ 白育庭^{2*}

[摘要] miRNAs 是一类参与个体发育、细胞增殖、分化和凋亡等生物学过程并与许多疾病如癌症等的发生和发展密切相关的小分子非编码 RNA。miR-451 在造血细胞分化成熟过程中起着关键性作用。近年来研究发现其在一些肿瘤如胃肠癌、乳腺癌、肺癌、胶质瘤等中也起着重要的作用。本文主要对 miR-451 与肿瘤发生发展的相关研究进展作一综述。

[关键词] miRNAs; miR-451; 肿瘤; 研究

The relation between miR-451 and tumor

LI Sha¹, BAI Yuting^{2*}

(1. Department of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei, China, 437100;

2. Department of Clinical, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei, China, 437100)

[ABSTRACT] MicroRNAs are a group of small non-coding RNAs that participate in a wide range of biological processes include individual development, proliferation, differentiation, apoptosis and closely related to the occurrence and development of many diseases such as cancer. MiR-451 plays important roles in promoting erythroid differentiation and maturation and also in some tumors such as gastrointestinal cancer, breast cancer, lung cancer, and glioma. In this paper, the recent advances in the roles of miR-451 in tumor development are reviewed.

[KEY WORDS] MiRNAs; MiR-451; Tumor; Study

microRNA(miRNA)是真核细胞内广泛存在的一类约由 20~22 个碱基组成的小分子非编码 RNA。miRNA 主要通过与其靶 mRNA 的 3'-UTR 互补配对,其参与个体发育、细胞增殖、分化和凋亡等生物学过程,并与许多疾病如癌症等的发生发展密切相关。近年来 miRNA 以其对生命活动独特且重要的调控作用而备受关注。肿瘤是目前严重威胁人类生命健康的一类疾病,研究发现 miRNA 介导了肿瘤(如白血病、肺癌、胶质瘤、乳腺癌、胃肠癌等)的形成、发生与发展等过程。miR-451 最早是由 Altuvia 等在 2005 年由人脑垂体 RNA 中

提取并命名,位于染色体 17q11.2,与原癌基因 ERBB2(v-evb-B2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, ERBB2)区域相邻^[1]。miR-451 在造血系统,血液系统疾病等方面都有重要作用,并且在白血病、肺癌、胶质瘤、乳腺癌等肿瘤组织中低表达。上调 miR-451,可以增加肿瘤的凋亡率。

1 miR-451 与白血病

白血病是造血系统中常见的恶性肿瘤,在儿童和青壮年恶性肿瘤中发病率居首位,然而目前

基金项目:湖北省自然科学基金重点项目(2011CDA064)

作者单位:1. 湖北科技学院药学院,湖北,咸宁 437100

2. 湖北科技学院临床医学院,湖北,咸宁 437100

*通讯作者:白育庭, E-mail:xybyt0628@163.com

发病机制及病因还不清楚^[2]。对 40 例儿童早前 B 急性淋巴细胞白血病 (B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, pre-B-ALL) 和 8 例正常标本进行的研究发现, 在儿童 pre-B-ALL 中 miR-451 的表达明显低于正常对照组, 表明 miR-451 在 pre-B-ALL 的发展中起着重要作用^[3]。Lopotova^[4] 等对慢性髓细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) 患者与正常人进行研究, 发现 miR-451 在 CML 患者体内明显低表达, 而且 miR-451 与 BCR-ABL 的表达相互抑制, 故推测 miR-451 与 BCR-ABL 由同一个环路调节。BCR-ABL 原癌基因与 BCR 基因形成的融合基因, 可引起蛋白激酶持续性激活, 从而使白细胞过分增殖故而出现慢性髓细胞白血病。由此推测, BCR-ABL 与 miR-451 可能成为慢性髓细胞白血病基因治疗的一个新靶点^[4]。

2 miR-451 与肺癌

肺癌是本世纪发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[5]。近年来, 肺癌的发病率在一些国家特别是发达国家逐年增高, 严重威胁了人类的生命健康。肺癌可分为小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non small cell carcinoma, NSCLC), 其中非小细胞肺癌较常见。miRNA 几乎参与了肺癌癌变发展的每一个阶段。在对非小细胞肺癌中 miRNA 的表达谱进行分析时发现 miR-451 在肺小细胞肺癌组织中表达是下调的并且下调程度最大, 进一步的研究发现 miR-451 异常表达可显著抑制和降低 RAB14 蛋白表达, RAB14 蛋白表达恢复可部分抑制 NSCLC 细胞中 miR-451 肿瘤抑制功能, 提示 miR-451 调节肺癌细胞的存活部分是通过下调 RAB14 实现的^[6]。因此, miR-451/RAB14 相互作用的靶向性对 NSCLC 患者可成为一个新的治疗应用。此外, 在对 30 个 NSCLC 术后放疗患者依据预后及复发率所分的放疗敏感组和放疗抵抗组中的 miRNA 的表达进行检测时, 发现 miR-451 在放疗敏感患者是上调的, 结果提示 miR-451 可能增强了 NSCLC 细胞的放疗敏感度^[7]。Bian 等另外研究发现, miR-451 在 NSCLC 细胞系 A549 中的异位表达不仅抑制了细胞增殖而且也增加了 A549 对顺铂的化疗敏感性, 推测其作用机制可能是 miR-451 抑制了 Akt 信号通路, 逆转了 Bax/

Bcl-2 比值, 故 miR-451 有望和肺癌化疗药物联合使用来治疗肺癌^[8]。

3 miR-451 与胶质瘤

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤, 具有易复发、无控性增殖、侵袭性生长的特点。胶质瘤本质是一种常伴有原癌基因过表达和抑癌基因突变缺失的多基因异常疾病。因此, 从基因水平探讨胶质瘤已成为医学研究领域的热点。近年来, 越来越多的研究表明 miR-451 的异常表达与胶质瘤的发生发展密切相关。研究证实 miR-451 影响胶质瘤的增殖、迁移等能力, 并且在胶质瘤细胞迁徙性分析中, miR-451 的表达水平是降低的^[9]。胶质瘤是一种生长非常迅速的肿瘤, 在其快速生长的同时对葡萄糖和氧等营养成分的需求量也在增加, 当这些供给不足时就会产生酸化、缺氧等, 从而使得胶质瘤细胞的微环境不断地改变。AMPK (AMP-activated protein kinase) 是一种主要的能量利用细胞感受器, 通过代谢应激被激活, 用以提升糖的摄取和能量的储存, 这种路径激活可以是使细胞适应低能量利用率时期, 从而避免细胞的死亡^[10]。当细胞微环境中葡萄糖充足时 miR-451 高表达, 抑制了 AMPK 信号通路, 进一步抑制了细胞的迁徙和侵袭性; 当葡萄糖不足时 miR-451 的表达水平受到抑制, 并激活 AMPK 路径, 增加了细胞的存活和迁徙; 同时也提出 miR-451 的表达水平高时, 抑制了 AMPK 信号通路, 从而使得肿瘤细胞保持一定的增值率^[11]。另外也有研究表明, 增加 miRNA-451 的表达, 可以降低肿瘤细胞的生长, 阻滞 G0/G1 期, 并且增加肿瘤细胞的凋亡, 降低其侵袭性; 此外 miR-451 的高表达降低了 Akt1 的活性, 并且 CyclinD1、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 及 Bcl-2 的表达也降低, 而 p27 的表达是增加的, 表明 miR-451 可能是通过作用于 AKT 信号传导通路而诱导细胞凋亡的^[12]。Yuan 等也分析证实 CAB39 是 miR-451 的一个直接靶基因, miR-451 通过直接抑制 CAB39 靶基因, 间接抑制了 PI3K/AKT 通路来影响胶质瘤的增殖、迁移等^[13]。

4 miR-451 与乳腺癌

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤, 且发病

率呈逐年上升的趋势,miR-451可能参与了乳腺癌的发生发展。miR-451在细胞间质和乳腺癌组织中高表达并且乳腺癌细胞MCF-7可向外分泌miR-451,提示miR-451有望成为乳腺癌诊断的指标之一^[14]。乳腺癌易出现耐药性,而它的耐药性是导致其治疗失败的主要原因之一^[15]。研究发现miRNA与乳腺癌的耐药性也密切相关,P糖蛋白是造成乳腺癌多药耐药的最重要的耐药蛋白之一,而miR-451能造成乳腺癌多药耐药细胞系中P糖蛋白的过表达,使得细胞耐药性增强^[16]。miR-451在乳腺癌耐阿霉素细胞MCF-7/DOX中低表达,可见miR-451与乳腺癌耐药细胞的多药耐药基因的表达呈负相关^[17]。并且在他莫昔芬治疗乳腺癌时所产生的乳腺癌内分泌治疗耐药,是通过上调14-3-3 ζ 而导致的,其机制是通过下调miR-451,从而造成14-3-3 ζ 过表达^[18]。

5 miR-451与胃肠道肿瘤

胃癌是全球高发恶性肿瘤之一,胃肠道肿瘤也严重威胁着人类的生命健康。miR-451在胃肠道肿瘤中的作用逐渐被认识,其在胃癌细胞中是下调的,并且它的下调与预后差相关^[19]。Konishi^[20]等也验证了miR-451在胃癌组织细胞中的表达与正常的组织细胞的相比是明显降低的,同时也发现miR-451在术后胃癌患者血浆中表达比在术前胃癌患者血浆中明显降低,并且在胃癌患者血浆中的表达比在正常人血浆中的表达明显升高。miR-451在胃癌组织细胞中的表达跟在血浆中的表达趋势为什么不一样,目前还不清楚,但是因miR-451在胃癌血浆中的显著的异常表达,有望成为胃癌患者的血液生物标志物用于监测肿瘤的动态变化^[20]。研究者对40例结直肠癌患者癌组织及8种结肠癌细胞株中miR-451的表达水平进行检测,与正常组织相比,miR-451在结直肠癌患者癌组织及结肠癌细胞株中均呈明显的低表达^[21]。Li等将miR-451模拟物通过脂质体2000转染至结肠癌细胞SW620中,结果发现miR-451表达的增加抑制了癌细胞的生长,并且可能是通过下调PI3/AKT通道而产生抑制作用的^[22]。

6 miR-451与肝癌

肝癌包括转移性肝癌和原发性肝癌2种,其

中原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,我们日常所说的肝癌多指原发性肝癌,原发性肝癌的发病率居全球第五位^[23],其侵袭力强、死亡率高。患者通常在早期没有特异症状,一旦出现症状多数已到了晚期,此时缺少有效的治疗方法,预后比较差,故早发现早治疗对肝癌预后尤其重要。随着miRNA在肿瘤方面的广泛研究,miRNA在肝癌发生发展中的作用逐渐被认识。研究发现,与正常肝上皮细胞和相邻的非癌组织相比,miR-451在肝癌组织与细胞中的表达明显下调;进一步的实验表明miR-451下调促进肝癌细胞的生长,上调则抑制肝癌细胞的生长,通过生物信息学确认IKK- β 是miR-451的一个直接靶蛋白,并且miR-451可能是通过直接抑制IKK- β 来抑制肝癌细胞的增殖^[24]。另有研究也证明miR-451抑制了肝癌的发展,并且主要是通过调节转录激活因子2的表达来抑制肝癌细胞迁移^[25]。

7 miR-451与骨肉瘤

骨肉瘤多源于长骨的干骺端,是威胁儿童和青少年生命的最常见的恶性骨肿瘤,其转移力和病死率较高,随着科学的发展,治疗技术的不断提高,骨肉瘤患者的短暂生存率得到了显著的提高,但发生肺转移的患者的病死率仍然较高^[26]。随着miRNA在肿瘤方面的广泛研究,miRNA在骨肉瘤中的作用也逐渐被关注。研究表明miR-451在骨肉瘤细胞中是下调的,并且miR-451上调可以抑制骨肉瘤细胞的增殖,这种抑制作用可能是通过调节PGE2和CCND1的表达来实现的^[27]。另外, Jones等通过将化疗敏感和不敏感的骨肉瘤中miRNA的表达谱进行比较,发现miR-451在化疗不敏感的骨肉瘤中的表达明显下降,提示miR-451可能与骨肉瘤的化疗性相关^[28]。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶1(apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1)是哺乳动物中最主要的核酸内切酶,具有DNA损伤修复活性和氧化还原功能,在骨肉瘤放疗抵抗中发挥着核心调节作用,抑制APE1能明显增强骨肉瘤放疗敏感性。研究发现在APE1敲低的骨肉瘤细胞中,miR-451的表达是显著上调的,推测APE1可能通过作用于miR-451,影响miR-451对其靶基因MDR1的调控,从而介导骨肉瘤肿瘤细胞的化疗抵抗^[29]。

8 miR-451 与其他肿瘤

最近研究发现,miR-451 在卵巢癌患者血清中是明显的异常表达,有望成为卵巢癌诊断潜在的血清生物标志物^[30]。研究者还发现 miR-451 在卵巢癌耐药细胞株中的表达是上调的,分别用不同浓度的化疗药羟基脲(不通过 P-gp 介导)和长春碱(通过 P-gp 介导)处理用 miR-451 抑制剂转染过的卵巢癌耐药细胞株,发现卵巢癌耐药细胞株对长春碱的敏感性增加,而对羟基脲的敏感性并没有得到明显提高,提示 miR-451 是通过 MDR1/P-gp 介导而参与卵巢癌耐药的^[31]。学者在对肾癌组织中 miRNA 进行检测时,发现 miR-451 在肾癌转移组织和非转移组织存在着显著的差异表达,并且在对肾细胞癌患者血清中 miR-451 进行检测时发现 miR-451 水平是下调的,提示 miR-451 可能成为肾细胞癌分子标志物^[32]。Hui 等研究发现头颈部鳞癌未复发患者与复发者相比,miR-451 上调了 4.7 倍,提示 miR-451 与头颈鳞癌的进展有关^[33]。另外,miR-451 也参与食管癌并且上调 miR-451 可抑制食管癌 EC9706 细胞增殖和侵袭,促进细胞凋亡,推测该作用可能是通过 PI3K/Akt 信号传导通路实现的^[34]。

9 小结

综上所述,miR-451 在肺癌、胃肠道癌、乳腺癌、胶质瘤、肝癌等肿瘤中都起着重要的作用,参与了肿瘤的发生、发展、侵袭和转移等过程,并且在肿瘤诊断及药物耐药性等方面扮演者一定的角色。miR-451 是一种癌增殖的调节子,并且可抑制多种肿瘤细胞的增殖、分化并促进肿瘤细胞的凋亡。在多种肿瘤组织中 miR-451 表达是下调的。上调 miR-451,可以增加肿瘤细胞的凋亡率。miR-451 在肿瘤病人的血浆中显著上调或下调,有望成为肿瘤血液生物标志物用于监测肿瘤的动态变化及肿瘤的诊断与治疗。目前,虽然对 miR-451 在各种肿瘤中都有所研究,但是这些研究都还处于初级阶段,对于其在肿瘤中的各种作用机制都还不是很清楚,深入透彻地了解 miR-451 在特定癌症中的作用、分子机制和调控网络有助于更好地了解癌症的发病机制,并能更好地找出相应的治疗方法。

参考文献

- [1] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33(8):2697-2706.
- [2] Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, et al. Children's oncology group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2013, 60(6):957-963.
- [3] Li D, Ju X, Shi Q, et al. Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 26(1):1-10.
- [4] Lopotova T, Zackovfi M, Klamova H, et al. MicroRNA-451 in chronic myeloid leukemia: miR-451-BCR-ABL regulatory loop[J]. *Leuk Res*, 2011,35(7):974-977.
- [5] Siegel R, Naishadham D, Jenal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013,63(1):11-30.
- [6] Wang R, Wang ZX, Yang JS, et al. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14(RAB14) [J]. *Oncogene*, 2011,30(23):2644-2658.
- [7] Wang XC, Du LQ, Tian LL, et al. Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2011,72(1)92-99.
- [8] Bian HB, Pan X, Yang JS, et al. Upregulation of micrRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line(A549)[J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2011,30(1):1-11.
- [9] Jakub G, Agnieszka B, Michal O, et al. MicroRNA-451 A conditional switch controlling glioma cell proliferation and migration [J]. *Cell Cycle*, 2010,9 (14):2742-2748.
- [10] Yangjin K, Soyeon R, Sean L, et al. MiR-451 and AMPK mutual antagonism in glioma cell migration and proliferation:A mathematical model[J]. *Plos One*, 2011, 6(12):e28293.
- [11] Godlewski J, Michal O, Nowicki MO, et al. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells[J]. *Molecular Cell*, 2011,37(5):620-632.
- [12] Nan Y, Han L, Zhang A, et al. MiR-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cell [J]. *Brain Res*, 2010,1359:14-21.
- [13] Yuan T, Yang N, Lei H, et al. MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma[J]. *International Journal of Oncology*, 2012,40(4):1105-1111.

- [14] Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells[J]. *Plos One*, 2010,5(10):13515.
- [15] Tian W, Chen J, He H, et al. MicroRNAs and drug resistance of breast cancer: basic evidence and clinical applications[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013,15(5):335–342.
- [16] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Role of microRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008,76(3):582–588.
- [17] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008,7(7):2152–2159.
- [18] Bergamaschi A, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen downregulation of miR-451 increases 14-3-3 ζ and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance[J]. *Oncogene*, 2012,31(1):39–47.
- [19] Eva B, Nerea B, Fernando A, et al. MicroRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells [J]. *Human Cancer Biology*, 2009,15(7):2281–2290.
- [20] Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma [J]. *British Journal of Cancer*, 2012,106(4):740–747.
- [21] 刘博, 田延锋, 赵增仁, 等. microRNA-451 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(4):447–451.
- [22] Li HY, Zhang Y, Cai JH, et al. MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via down-regulation of PI3k/Akt pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013,14(6):3631–3634.
- [23] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011,61(2):69–90.
- [24] Li HP, Zeng XC, Zhang B, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK- β [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(11):2443–2451.
- [25] Lv G, Hu Z, Tie Y, et al. MicroRNA-451 regulates activating transcription factor 2 expression and inhibits liver cancer cell migration[J]. *Oncol Rep*, 2014,32(3):1021–1028.
- [26] Savage SA, Mirabello L. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology[J]. *Sarcoma*, 2011,2011:548151.
- [27] Xu Y, Mei Q, Shi L, et al. Tumor-suppressing effects of miR451 in human osteosarcoma[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014,69(1):163–168.
- [28] Jones KB, Salah Z, Del MS, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma[J]. *Cancer Res*, 2012,72(7):1865–1877.
- [29] Dai N, Zhong ZY, Cun YP, et al. Alteration of the microRNA expression profile in human osteosarcoma cells transfected with APE1 siRNA [J]. *Neoplasma*, 2013,60(4):384–394.
- [30] Ji T, Zheng GZ, Wang FM, et al. Differential microRNA expression by solexa sequencing in the sera of ovarian cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014,15(4):1739–1743.
- [31] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Role of microRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008,76(5):582–588.
- [32] Martina R, Alexandr P, Jana N, et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2012,10(1):55.
- [33] Hui LM, Krushel T, et al. Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Human Cancer Biology*, 2010,16(4):1129–1139.
- [34] Wang T, Zang WQ, Li M, et al. Effect of miR-451 on the Biological Behavior of the Esophageal Carcinoma Cell Line EC9706[J]. *Dig Dis Sci*, 2013,58(3):706–714.

人类白细胞抗原 B27 的实验室诊断

杨霄鹏* 惠玲

[摘要] 强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是临床常见的一种自身免疫性疾病。90%~95%的 AS 患者有人类白细胞抗原 B27(human leucocyte antigen B27, HLA-B27)基因的表达,说明 HLA-B27 与 AS 有高度关联性。因此,HLA-27 的检测在 AS 的诊断中有很重要的诊断价值和临床意义。目前用于检测 HLA-B27 的实验室方法主要有微量细胞毒法(microlymphocytotoxic test, MLCT)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、流式细胞仪法(flow cytometry instrument method, FCM)、PCR 等。本文将对 AS 的这些实验室诊断方法及其优缺点予以概述,为实验室根据自身条件选择合适的方法检测 AS 提供一个参考依据。

[关键词] 强直性脊柱炎;人类白细胞抗原 B27;实验室诊断

Laboratory diagnosis of human leukocyte antigen B27

YANG Xiaopeng*, HUI Lin

(Experimental Center of Medicine, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou, Gansu, China, 730050)

[ABSTRACT] Ankylosing spondylitis(AS) is a common clinical autoimmune disease. There are 90%~95% of the patients with AS showed the expression of HLA-B27 gene, which suggest that HLA-B27 is strongly associated with AS. Therefore, the detection of HLA-27 has very important diagnostic value and clinical significance for the diagnosis of AS. Nowadays, the methods used for detecting the HLA-B27 include microlymphocytotoxic test(MLCT), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), flow cytometry assay(FCM) and PCR. In this paper, the current methods for the laboratory diagnosis of AS will be reviewed to provide a reference for laboratory to select the appropriate method based on the detection of AS according to its own conditions.

[KEY WORDS] Ankylosing spondylitis(AS); HLA-B27; Laboratory diagnosis

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一类主要累及骶髂关节和脊柱关节的慢性炎症性疾病,为血清阴性脊柱关节病的原型,目前发病机制尚不明确。AS 的临床诊断通常采用纽约标准或 1984 年纽约修订标准,但二者对影像学依赖较大,要求有肯定的骶髂关节炎。临床上满足其条件的 AS 病人病程均已进入中期,对治疗很不利,这是造成 AS 伤残率高的原因之一。早期诊断成为争取良好预后的关键。1973 年 Brewerton 突破性地发现

了与本病高度相关的人类主要组织相容性抗原 HLA-B27 抗原(human leucocyte antigen B27, HLA-B27)^[1]。HLA-B27 是人类主要组织相容性复合体的表达产物之一,位于人体第 6 号染色体的短臂上,在机体所有有核细胞上表达,尤其是淋巴细胞的表面表达较高。HLA-B27 抗原阳性与 AS 呈高度相关^[2],国内学者也通过对国内不同地域、不同民族的 AS 患者检测 HLA-B27,证实 AS 患者中 90%以上 HLA-B27 抗原为阳性,而正常人群只

作者单位:兰州军区兰州总医院医学实验中心,甘肃,兰州 730050

*通讯作者:杨霄鹏, E-mail: yxp917@163.com

有5%~10%的个体表达HLA-B27抗原^[3-8]。由于HLA-B27在正常人群中也有表达,因此,HLA-B27阳性在AS诊断上既非必要也非充分条件。即便如此,HLA-B27对还未发展为放射学骶髂关节炎的AS患者仍然有很高的辅助诊断价值。当患者诊断为AS的可能性为50%,若患者HLA-B27为阳性,则诊断AS的概率可提高到95%左右;若该患者HLA-B27为阴性,则患AS的概率降至3%左右^[9]。

HLA-B27表达与强直性脊柱炎密切相关,检测外周血HLA-B27的表达是辅助诊断强直性脊柱炎的重要手段。HLA-B27的检测方法随科学技术的发展不断进步,目前常用检测HLA-B27的方法有微量淋巴细胞毒法(microlymphocytotoxic test, MLCT)、酶联免疫吸附剂测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、流式细胞仪法(flow cytometry instrument method, FCM)、PCR等。

1 MLCT

MLCT法基本原理为:人类淋巴细胞表面HLA-B27抗原能与试剂中的相应抗体结合,在补体参与下,细胞膜被损害打孔,造成细胞死亡,死亡细胞能被伊红透过而染色。HLA-B27阴性的细胞完整不着色,用倒置显微镜观察,计数着色细胞的百分比,死细胞>40%为阳性,死细胞<20%为阴性,20%~40%为可疑。MLCT法检测HLA-B27阳性率各实验有所不同,有报道阳性率达91%、敏感性为80%^[10-11],也有报道其阳性率为65%、敏感性仅为13.3%^[12]。大多数文献报道认为MLCT法的阳性率只能到85%左右,敏感性为74%^[13-15]。造成如此大的差异主要是MLCT法需纯化和分离新鲜外周血淋巴细胞,且操作人员镜下计数时有个人主观因素,同时由于难以获得高效价的单价血清,加之HLA高度多态性影响,易出现漏检或假阳性。且MLCT方法可能会因感染等因素使细胞膜表面的B27分子的数量或结构改变以及混入红细胞而出现假阴性或假阳性的结果。但由于MLCT法所需仪器简单,试剂价格低廉,仍是许多医院的首选。

2 ELISA

ELISA法采用酶标记多克隆抗体定量检测血

清中HLA-B27抗原,具有快速、简单等优点。有报道其阳性率达95%,敏感性为80.1%,特异性更是达到98.9%^[16],其指标远高于MLCT法,甚至可以和流式细胞法和PCR法相媲美;但多数报道ELISA法检测HLA-B27的阳性率为87.5%,敏感性75%,特异性90%^[17-18]。由于ELISA法采用的是多克隆抗体,易与血清中的其它物质发生交叉反应,而HLA-B27的亚型又多达105种,其抗原的结合位点也不尽相同。尽管如此,用ELISA法检测HLA-B27操作简便、快速,且标本可长期冻存。若能解决其抗体效价低、重复性差等问题,并进一步降低试剂成本,特别适合于基层医院使用。

3 FCM

随着HLA-B27单克隆抗体的出现、FCM的普及,以及检测的简便、快速等优点,HLA-B27的FCM检测法开始广泛应用。目前HLA-B27检测常用的FCM试剂有2种:美国Beckman Coulter公司的HLA-B27/B7组合试剂和美国BD Bioscience公司的HLA-B27/CD3组合试剂。FCM检测HLA-B27其灵敏度为96.8%,特异度为93.5%,阳性预测值89.0%,阴性预测值为98.1%^[19]。

3.1 HLA-B27/B7组合试剂的主要原理

HLA-B27单克隆抗体与HLA-B7存在交叉反应,而HLA-B7相应的单抗为HLA-B7所特有,因此用HLA-B27和HLA-B7双抗体对淋巴细胞表面HLA-B27表达进行分析。HLA-B27/B7试剂检测AS患者的阳性率在91%~95%,敏感度为94%,特异度为91%^[20-22]。

3.2 HLA-B27/CD3组合试剂的主要原理

多数AS患者的CD3⁺T淋巴细胞上可出现HLA-B27的高表达。利用荧光标记的CD3抗体识别CD3⁺T淋巴细胞,再用另一种荧光标记的HLA-B27抗体分析CD3⁺T淋巴细胞HLA-B27的表达。结果判定:根据试剂盒自带的荧光微球确定不同批号的阳性值^[23-24],由于与HLA-B7存在交叉反应,临界值±10以内的标本有假阳性的可能。研究显示HLA-B27/CD3组合试剂检测HLA-B27误差率为5%,其中部分原因就是HLA-B7抗原阳性的患者,可能会给HLA-B27的判断造成误差^[25]。但是也有国内学者认为此试剂盒阳性值设置过高,与国内临床不符,建议下调10左右

为好^[26]。因为,FCM 检测 HLA-B27 时,在应用原临界值 ≥ 147 时,敏感度为 81%,特异度为 95%,当把临界值调整为 ≥ 140 时,其灵敏度提高到 92%,而特异度降低也不多^[27]。由于早期诊断 AS 有助于早期干预治疗并改善其预后,所以,尽管调整临界值为 ≥ 140 后,损失了一部分特异性,但有助于 AS 患者的早期诊断,有更大的临床意义。同时,调整临界值后,非 AS 组 HLA-B27 阳性率未见明显提高,仅为 10.18%,与多数报道相符^[28]。目前 HLA-B27/CD3 组合试剂检测 AS 患者的阳性率为 94 ~ 97%, 敏感度 88%, 特异性 96%, 阳性预测值 100%, 阴性预测值 86.8%^[29-31]。

4 PCR 法

4.1 PCR 方法

等位基因序列分析表明 HLA-B27 的高度多态性主要位于外显子 2 和 3 上^[32]。针对 HLA-B27 外显子 2 和 3 基因上的寡核苷酸序列多对特异性引物或探针被设计合成,可用于 B27 及其亚型的检测。沈静等采用 PCR 技术对 100 例 AS 病人进行了 HLA-B27 检测,其灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值达到了 97.6%、100%、100%、98.3%^[33]。

HLA-B27 亚型在不同的种族和地区中分布情况不同。B2705 亚型可见于所有人种,而 B2704 亚型则是中国汉族人的优势亚型。另外 HLA-B27 同一亚型在不同人群中与 AS 的关联也可不同。2705、2704、2702 亚型与 AS 的发生呈正相关,而 2703、2708、2709、2707 与 AS 的发生呈负相关^[34-35]。PCR 扩增时引物能否延伸主要取决于引物 3' 端的 1~2 个碱基是否与模板配对,若不配对则引物不能延伸,因而从理论上说设计适当的等位基因特异性引物,即可区分不同的 HLA-B27 亚型,但 HLA-B27 亚型的数目已由 1994 年的 7 个增加到现在的 105 个,面对如此快速增加的 HLA-B27 等位基因,临床使用 PCR 法进行如此庞大的 HLA-B27 基因亚型测定无论从人力和物力上都不现实。更有研究表明 AS 的发病机制可能与 HLA-B27 的各亚型的共有序列有关,而不是与各亚型特异序列有关^[36-37]。

4.2 HLA-B27 mRNA 的检测

通过 DNA 序列检测 HLA-B27 可能无法有效区分强直性脊柱炎患者和正常人,采用定量 PCR 检测 HLA-B27 mRNA 表达可以弥补这一缺陷。

Liu^[38]等对 15 例 AS 患者、30 例 HLA-B27 阳性未发病家族成员以及 20 例 HLA-B27 呈阳性的正常人进行了相关研究,他们采用反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术对 3 组对象进行 HLA-B27 mRNA 表达水平的检测,实验结果显示 AS 患者显著高于其他 2 组,并通过治疗前后比较证实了 HLA-B27 mRNA 表达水平与强直性脊柱炎疾病活动指数密切相关。而后有其它学者也证实了此结论^[39-40]。徐冉行^[41]对 482 例 AS 患者和 100 例健康人群分别用 FCM 法和 RT-PCR 进行了对比,定量 PCR 法检测 FCM 法表达为阳性组、阴性组的阳性率分别为 100%、0.83%,FCM 阳性患者其 PCR 也均为阳性扩增,拷贝数均在 $10^3 \sim 10^5$,在 80 例 FCM 临界区内,定量 PCR 检测 73 例阳性,阳性率为 91.25%,且 PCR 的阳性拷贝数均在 $10^3 \sim 10^5$,其他 7 例却为 0 拷贝,和 FCM 相比较,FCM 在临界区内表现为不确定性,是否有 B7 或其他抗原的干扰,FCM 无法确定,而定量 PCR 结果却一目了然,与临床症状基本相关。

从检测方法的敏感性、特异性等指标来看,PCR 是临床检测 HLA-B27 首选的方法,且 PCR 法是目前卫生部唯一开展室内质评的方法,但此方法耗时较长,需要特定的实验仪器和严格的实验条件,需省级以上卫生行政部门组织专家进行技术验收,检测人员也需要取得基因扩增技术上岗证方可参加检测工作,因此,在临床普遍开展此技术有一定的难度。

HLA-B27 阳性强弱对 AS 的病程发展有无影响,一直有争论。AS 发病与 HLA-B27 有剂量依存关系,即纯合子 HLA-B27 的人发病的危险性高,发病后病情重^[36]。段萃娟等^[42]认为 HLA-B27 抗原表达强弱与 AS 病程的发展并非完全一致。但此结论是建立在同一时间、不同 AS 患者之间 HLA-B27 阳性强弱的比较,缺乏同一患者时间上的纵向比较,因此其结论的可靠性值得商榷。陈睿等^[43]对 HLA-B27 强阳性、阳性、弱阳性、阴性病人进行 2 年~20 年随访,认为 HLA-B27 强阳性及阳性病人多见于男性,病情发展快,难以控制病情,且 HLA-B27 强阳性患者致残率高,而 HLA-B27 弱阳性患者多见于女性,症状一般较轻,易于控制。HLA-B27 阴性病情发展慢,且易于

控制发展。因此,认为 HLA-B27 检测虽不能作为普查项目,但作为 AS 的筛选项目能提高诊断的准确性。

5 总结

当前实验室针对 HLA-B27 检测常用的几种方法各有优劣:MLCT 法使用设备简单,但敏感性较差;ELISA 法因抗体效价问题,使其结果的重复性不高;FCM 法敏感性高,操作简便,但其高昂的仪器价格、试剂成本限制了基层医院的使用;PCR 法特异性高,标本可以长期保存,但检测环境要求严格。笔者认为,为了进一步提高 AS 诊断的准确性,可以利用 FCM 法的高敏感性进行筛选性检测,对接近临界值或临床症状明显的标本再用 PCR 法的高特异性加以确认。对无力购置流式细胞仪的基层医院可以采用 MLCT 法来检测,对疑似标本冻存,统一送有能力使用 PCR 法的医院进行检测。

随着各种相关细胞因子以及遗传学方面对 AS 发生、发展的深入研究,寻找出高特异性和高敏感性的相关指标是一个十分重要的研究方向,这将对 AS 的诊断、病情监测具有重大意义。

参考文献

- [1] Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27 [J]. *Lancet*, 1973,1(7809):904-907.
- [2] Rostom S, Dougados M, Gossec L, et al. New tools for diagnosing spondyloarthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2010,77(2):108-114.
- [3] 宋建玲. HLA-B27 阴性与阳性强直性脊柱炎患者的临床比较[J]. *中国医药指南*, 2013,32(11):132-133.
- [4] 刘潮坚. 广东潮州地区强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的检测与临床相关性研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013,2(5):77-80.
- [5] 张小芳,张运刚,李守霞,等. HLA-B27 与强直性脊柱炎的相关性研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2013,36(23):56-58.
- [6] 张志坚,袁方,梁飞,等. 中国北方汉族人群中 HLA-B27 基因多态性与强直性脊柱炎的关联研究[J]. *中国输血杂志*, 2012,25(3):213-216.
- [7] 托娅. 内蒙古地区疑似强直性脊柱炎患者 HLA-B27 抗原阳性率观察[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2013,5(5):311-314.
- [8] 鱼惠霞. 强直性脊柱炎 HLA-B27 抗原表达与临床的相关性分析[J]. *宁夏医学杂志*, 2013,10(35):901-903.
- [9] Wei JC, Tsai WC, Lin HS, et al. HLA2B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA2B272 negative Taiwan Chinese patients [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2004,43(7):8392-842.
- [10] 张红旗,龙永梅. 人类白细胞抗原 B27 在强直性脊柱炎诊断中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2009,6(3):197-198.
- [11] 董桂香. HLA-B27 与强直性脊柱炎之间的关系[J]. *中外医疗*, 2011,15(30):117-118.
- [12] 丛贤滋. 微量淋巴细胞毒技术与核酸扩增荧光技术检测 HLA-B27 的对比[J]. *解放军医学院学报*, 2014,35(3):280-282.
- [13] 刘宏毅. HLA-B27 的检测及其临床应用[J]. *层医学论坛*, 2009,13(9):819-820.
- [14] 杨国强,戚洞鹏. 人类白细胞抗原 27 两种检测方法的比较[J]. *医学检验*, 2011,18(4):74-75.
- [15] 李清,李元媛. 流式细胞术与微量淋巴毒法检测 HLA-B27 的对比[J]. *现代医药卫生*, 2010,26(23):3575-3576.
- [16] 高凤云. HLA-B27 检测应用于强直性脊柱炎的临床意义[J]. *吉林医学*, 2012,6(33):1164-1164.
- [17] 褚丽. 两种方法检测人类白细胞抗原 B27 的比较[J]. *检验医学与临床*, 2009,2(6):141-141.
- [18] 赵晓君,薛鸾. 三种方法检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的效果比较[J]. *山东医药*, 2011,43(51):48-49.
- [19] 杨新春. 流式细胞术检测 1150 例 HLA[J]. *中国保健营养*, 2013,8(23):696-696.
- [20] 金明威,陈哲,陈颖,等. 流式细胞术检测 HLA-B27 及其临床意义[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011,5(19):35-36.
- [21] 洪俊,饶永彩. 流式 HLA-B27 测定法在强直性脊柱炎诊断中的临床价值[J]. *职业与健康*, 2012,6(28):693-695.
- [22] 胡晓舟,苑腾,王小林,等. 流式细胞术与定量 PCR 法检测 HLA-B27 的对比[J]. *中国实验诊断学*, 2009,6(13):754-756.
- [23] Reynolds WE, Evans PR, Wilson PJ, et al. Automated routine HLA-B27 typing by flow cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 1996,197(1-2):1-5.
- [24] Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, et al. Optimisation of HLA-B27 testing by association of flow cytometry and DNA typing[J]. *Clin Rheumatol*, 1999,18(1):23-27.

- [25] Macardle PJ, McEvoy R, Jovanovich S, et al. HLA-B27 expression by flow cytometry: an analysis of 7 years quality assurance data [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 243(1-2):51-57.
- [26] 周文英. 流式细胞术检测 HLA-B27 临界值的设置[J]. *中国实验诊断学*, 2009,13(6):732-743.
- [27] 刘红, 贾红英. 流式细胞术检测 HLA-B27 诊断强直性脊柱炎临界值设置的探讨分析[J]. *医学检验与临床*, 2011,6(22):42-44.
- [28] 王丽, 刘红, 夏蔚珉, 等. 流式细胞术检测 HLA-B27 诊断强直性脊柱炎临界值设置的探讨分析[J]. *中华医学研究杂志*, 2009,10(9):31-33.
- [29] 赵晓君, 薛鸾, 陈云飞, 等. 三种方法检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的效果比较 [J]. *山东医药*, 2011,43(51):48-49.
- [30] 赵建强, 李世荣. 应用流式细胞仪检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 抗原的表达及临床应用价值[J]. *齐鲁医学检验*, 2005,5(16):8-9.
- [31] 刘波. 两种方法检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的应用比较[J]. *中华全科医学*, 2012,5(10):789-790.
- [32] Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules[J]. *Annu Rev Biochem*, 1990,59:253-288.
- [33] 沈静, 张肖, 俞刚, 等. SSP-PCR 法与流式细胞仪检测 HLA-B27 的相关性比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 1(35):70-74.
- [34] Mou Y, Wu Z, GU J, et al. HLA-B27 polymorphism in patients with juvenile and adult-onset ankylosing spondylitis in Southern China [J]. *Tissue Antigens*, 2010,75(1):56-60.
- [35] 黄宝英, 杨菁, 富显果, 等. HLA-B27 基因亚型分型检测 [J]. *中国实验诊断学*, 2013,17(6):983-985.
- [36] Feltkamp TE. Factors involved in the pathogenesis of HLA-B27 associated arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 1995,101(Suppl):213-217.
- [37] 沈玉娥, 施海玲. 强直性脊柱炎遗传病因机制研究进展[J]. *海军医学杂志*, 2012,32(6):425-427.
- [38] Liu SQ, Yu HC, Gong YZ, et al. Quantitative measurement of HLA-B27 mRNA in patients with ankylosing spondylitis-correlation with clinical activity [J]. *J Rheumatol*, 2006,33(6):1128-1132.
- [39] Cho SY, Lee KG, Park SY, et al. Utility of in-house PCR for HLA-B27 typing: comparison of concordance rate between PCR kit and in-house PCR [J]. *Korean J Lab Med*, 2008,28(3):239-243.
- [40] Alaez C, Gazit E, Ibarrola B, et al. Distribution of HLA-B27 Sub-types in Ankylosing Spondylitis in an Israeli Population [J]. *Arch Med Res*, 2007,38(4):452-455.
- [41] 徐冉行, 李宇宁, 姚亚萍, 等. 定量荧光 PCR 法验证流式细胞术测定人类白细胞抗原 B27 临界值标本的研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2013,9(23):2255-2257.
- [42] 段萃娟. HLA-B27 基因及抗原检测在强直性脊柱炎诊断中的意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014,6(35):779-780.
- [43] 陈睿, 宋恒平, 倪凤民, 等. HLA-B27 阳性的强弱对血清阴性脊柱关节病的影响评估 [J]. *颈腰痛杂志*, 2013, 4(34):333-335.

分子生物学检测在 α -地中海贫血中的应用

郭柳薇*

[摘要] α -地中海贫血是一组由于 α -珠蛋白基因缺失或功能障碍导致 α -珠蛋白链完全缺失或合成不足所引起的遗传性溶血性疾病,是我国长江以南各省发病率最高、影响最大的遗传病之一。目前对 α -地中海贫血尚无理想的治疗方法。通过加强人群、婚前、产前筛查及基因诊断,防止重型地贫儿出生,是最有效的预防措施。因此快速实用、准确有效的基因诊断技术是人群、婚前、产前筛查及诊断的有力保障。本文对 α -地中海贫血的分子机制、生物学检测及应用等方面进行综述。

[关键词] α -地中海贫血; 分子机制; 基因诊断; 应用

Molecular biological detection of alpha-thalassemia

GUO Liuwei*

(Clinical Laboratory, The Seventh Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Gongren Hospital of Wuzhou, Wuzhou, Guangxi, China, 543001)

[ABSTRACT] Alpha-thalassemia is a group of genetic and hemolytic disease which is caused by alpha globin chain synthesis insufficient or absent due to a group of alpha globin gene deletion or dysfunction. As one of the largest genetic diseases, alpha-thalassemia is prevalent in south of the Yangtze River provinces in China. Currently, there are still lack of ideal treatment to the alpha-thalassemia. Strengthening on screening and diagnosing to the gene before marriage and childbirth is the best measure to prevent severe thalassemia births. Therefore, fast, accurate and effective gene diagnosis technology is a powerful guarantee for population, premarital and prenatal screening as well as diagnosis. In this paper, molecular mechanism, biological detection and application for alpha-thalassemia are summarized.

[KEY WORDS] Alpha thalassemia; Molecular mechanism; Gene diagnosis; Application

α -地中海贫血(简称 α -地贫)是由于 α -珠蛋白基因的缺失或突变导致 α -珠蛋白肽链的合成减少或缺乏所致的遗传性溶血性疾病^[1]。 α -地贫主要是因为 α -珠蛋白基因的大片段缺失引起(缺失型 --SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$),少数类型为小片段碱基插入、缺失或点突变所致(非缺失型 α^{WS} 、 α^{CS} 、 α^{QS})。 α -地贫最大的危害是严重影响生命质量的血红蛋白 H (hemoglobin H, HbH) 病和致死的血红蛋白 (hemoglobin, Hb) Bart's 胎儿水肿综合征。据 WHO 估计,全球有接近 5 亿的人携带血红蛋白病突变基

因,占全球总人数 7%^[2],其中约有 2.6 亿人是 α -地中海贫血基因携带者,主要集中分布在非洲、地中海、东南亚等地区;我国长江以南的广大地域为地中海贫血高发区,其中尤以广西、广东和海南三省(区)为甚。广西自治区 2010 年的地贫流行病学调查显示 α -地贫的人群携带率高达 17.55%^[2],广东省 2004 年的地贫流行病学抽样调查显示 α -地贫的人群携带率为 8.53%^[2],对人类健康和人口质量构成严重威胁。目前对 α -地中海贫血尚无理想的治疗方法。通过加强人群、婚前、产前筛查及基因诊断,防

作者单位:广西医科大学第七附属医院梧州市工人医院检验科,广西,梧州 543001

*通讯作者:郭柳薇, E-mail: guolw510@163.com

止重型地贫儿出生,是最有效的预防措施。因此快速实用、准确有效的基因诊断技术是人群筛查、婚前、产前诊断的有力保障。本文对 α -地中海贫血的分子机制、生物学检测及应用等方面综述如下。

1 α -地中海贫血分子遗传机制

地中海贫血 1925 年由 Cooley 和 Lee 首先描述,最早发现于地中海地区的人群,故称为地中海贫血,又被称为海洋性贫血或珠蛋白生成障碍性贫血,其致病基因为人类珠蛋白基因。20 世纪 70 年代末, α -珠蛋白基因被定位,随后发现人类珠蛋白基因以基因簇的形式存在, α -珠蛋白基因簇定位于 16 号染色体 16p13.3 位点。

如图 1 所示, α -珠蛋白基因簇上含有 1 个胚胎期表达基因 (ζ),2 个胎儿期和成人期表达基因 (α_2 和 α_1),2 个假基因 ($\Psi\zeta$ 和 $\Psi\alpha_1$) 和 2 个疑似珠蛋白基因 ($\Psi\alpha_2$ 和 θ)。基因在基因簇上的排列顺序为 5'- ζ - $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha_2$ - $\Psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ -3'。在 ζ -基因上游 40kb 处,存在 1 个影响 α -珠蛋白表达的重要调控位点 HS-40。正常人每条 16 号染色体上有 2 个高度同源的 α -珠蛋白基因,即 α_1 和 α_2 ,每对染色体上共有 4 个 α -基因,基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ^[3]。 α_1 和 α_2 基因表达同一种产物,即 α -珠蛋白链,它们在人的一生从发育到 6 周后即持续高水平表达,参与合成胚胎($\alpha_2\varepsilon_2$)、胎儿($\alpha_2\gamma_2$)、和成人($\alpha_2\delta_2$ 和 $\alpha_2\beta_2$)4 种血红蛋白。

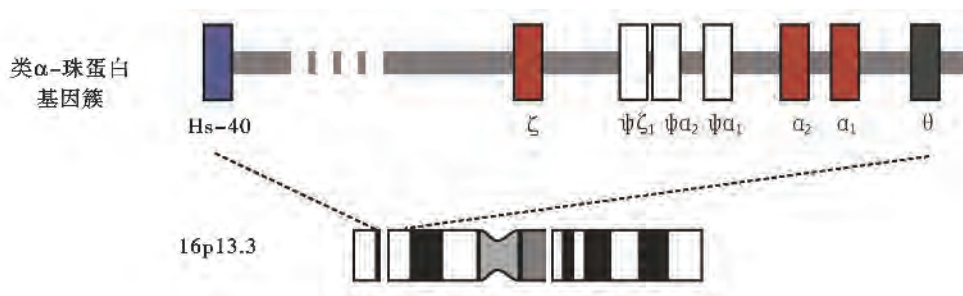


图 1 人体 α -珠蛋白基因簇的染色体定位和基因结构

Figure 1 Chromosomal localization and gene structure of human alpha globin gene cluster

α -珠蛋白基因的突变可分为缺失型和非缺失型两种类型。对于缺失型而言,如果缺失了 1 个 α -基因,则该基因功能丧失, α -珠蛋白链的产量减少,如($-\alpha^{3.7}/-$)($-\alpha^{4.2}/-$)等,其杂合子由于还保留 3 个 α -基因,表现为静止型 α -地中海贫血,称为 α^+ -地中海贫血。($-\alpha^{3.7}/-$)($-\alpha^{4.2}/-$)缺失是中国人最常见的 α^+ -地中海贫血,广西地区人群的携带者频率分别约为 4.78% 和 1.61%^[2]。如果同一条染色体缺失了 2 个 α -基因,则该条染色体完全不能合成 α -珠蛋白链,称为 α^0 -地中海贫血,如($--^{SEA}/-$)($--^{THAI}/-$)等,其杂合子表现为典型的轻型 α -地中海贫血。如果同一对染色体缺失了 3 个 α -基因(基因型为 $--/\alpha$),仅剩 1 个正常的 α -基因,称为血红蛋白 H 病,临床表型轻重不一,贫血程度有很大的差异,轻者只有轻度的地中海贫血表征,没有明显的临床症状,重者则需要定期输血,出现肝脾肿大等明显的地中海贫血特征。

如果同对染色体缺失了 4 个 α -基因(基因型为 $--/--$),称为重型 α -地中海贫血(血红蛋白 Bart's 胎儿水肿综合征),临床表现是胎儿宫内死亡或早产后数小时死亡。目前全球已鉴定的 α -地中海贫血缺失超过 20 种,中国人最常见的是($--^{SEA}/-$),在广西地区该突变的携带者频率高达 7.84%^[2]。对于非缺失地中海贫血而言,可因点突变、核苷酸缺失或插入而引起,以 α^T 表示累及的基因,目前发现至少有 68 种 α -珠蛋白基因点突变可导致 α -地中海贫血的发生,在广西最常见是 $\alpha^{WS}\alpha/$ 、 $\alpha^{CS}\alpha/$ 、 $\alpha^{OS}\alpha/$ 点突变,在人群中该基因发生率为 1.55%、1.21%、0.36%^[2]。由于非缺失型比缺失型导致更严重的 α -珠蛋白链合成的减少,因此,非缺失型的临床表现和血液学改变均比缺失型重,非缺失型血红蛋白 H 患者(基因型为 $--/\alpha\alpha^T$)血红蛋白可低于 60 g/L,需定期输血维持生命^[4]。

2 α -地中海贫血分子生物学诊断及应用

α -地中海贫血的分子生物学诊断可采用 PCR 技术、等位基因特异的寡核苷酸探针斑点杂交 (allele specific oligonucleotide probe hybridization, ASO) 和近年来日趋成熟的有重大影响的基因芯片技术等方法进行基因突变类型的分析。

2.1 Southern blotting 技术

Southern 技术是研究 DNA 图谱的基本技术,在分析 PCR 产物和遗传疾病诊断分析等方面有重要价值。本方法用一种或多种限制性内切酶消化基因组 DNA,用琼脂糖凝胶电泳分离酶解片段,将这些分离好的酶片段大小次序不变地转移至硝酸纤维素膜或尼龙膜上的相应位置,然后与放射性同位素标记的 DNA 或 RNA 探针杂交,经放射性自显影确定与探针杂交的酶解片段的大小及位置。它被认为是分析 α -珠蛋白基因缺陷的金标准。但该技术操作繁琐费时,且需要质高、量多的基因组 DNA,并使用放射性同位素,因而限制了其在常规诊断中的应用,但常作为其他 DNA 诊断方法和基于 PCR 产前诊断结果的确证试验。

2.2 缺口 PCR(gap-PCR)是目前检测缺失型 α -地中海贫血的最常用的方法

gap-PCR 技术是设计与缺失序列两侧序列互补的引物,缺失使本来在正常 DNA 序列中相距很远的这对引物之间的距离因断端连接而靠近,并能扩增出特定长度的片段,再通过琼脂糖凝胶电泳,根据电泳片段大小检测样品的基因型。Chong 等^[5]报道运用单管多重 PCR 技术检测 6 种 α -地贫缺失型。刘敬忠等^[6]在优化单管多重 PCR 技术的基础上成功的检出中国人常见的(--^{SEA}/)、(- $\alpha^{3.7}$ /)、(- $\alpha^{4.2}$ /)3 种缺失型地中海贫血,具有简便、快速、准确实用而又经济等特点,非常适合于我国以预防为目的而开展的大人群 α -地贫的分子筛查和临床样品的基因诊断。郭柳薇、徐卫华^[7-10]等亦应用该技术用于大样本人群中的 α -地中海贫血基因分型及频率的研究。

2.3 反向点杂交(reverse dot, RDB)技术

RDB 技术是目前检测非缺失 α -地中海贫血点突变的一种首选技术。它与传统等位基因特异寡核苷酸探针点杂交的不同是将膜上固定探针取代了固定靶 DNA 方式,从而改变了传统杂交法

一次只能检测一种突变的方式。用固化了多种特异性探针的膜条与扩增靶序列杂交,使一次杂交即可同时筛查出被检 DNA 中多种突变。李莉艳等^[11]建立的反向点杂交检测体系证明了 RDB 技术可用于快速诊断中国人非缺失型 α -地中海贫血点突变。该方法也成为目前国内许多省市人群筛查、产前诊断非缺失型 α -地中海贫血快速有效的方法^[12-14]。而肖奇志等^[15]在采用反向点杂交检测非缺失型 α -地贫过程中,发现该技术既可准确检出常见非缺失 α -地贫突变类型,还可以验证单管多重 PCR 检测严重类型 α -地贫基因的可靠性,这种相互验证检测结果的方法,对于无条件开展 MLPA 和其他 DNA 诊断方法的实验室,不失为一种有效的质量控制的替代方法,可保证产前诊断的准确性,值得在临床遗传诊断实验室中推广应用。曾赤佳等^[16]报道运用 PCR-RBD 结合导流技术在同一芯片上同时检测缺失型和非缺失型 α -地贫用于育龄妇女地贫诊断,缩短了检测时间,降低检测成本,减少了复合地贫漏诊,非常适合基层实验室用于常规地贫基因的筛查及诊断。

2.4 基因芯片法

自 1997 年 Affymetrix 公司开始将 DNA 芯片技术用于诊断地中海贫血,芯片技术成为了 20 世纪 90 年代中期以来影响深远的重大科技进展。其基本原理是用 2 种不同荧光染料标记的靶序列同时与同 1 个 cDNA 芯片杂交,通过不同颜色的荧光信号强度分析即可反映出基因表达的变化。由于用该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析,从而解决了传统 PCR、核酸印迹杂交等检测项目单一,低通量、费用昂贵等不足。具有快速、高效、敏感、平行化和自动化等特点,能快速、准确地从分子水平诊断疾病。钟华敏等^[15]建立的基因芯片快速诊断技术,由 Cy5 荧光标记的引物扩增得到的 PCR 产物无需琼脂糖凝胶电泳,将产物与包含不同类型基因探针的芯片杂交后,应用计算机根据芯片上不同位置出现荧光信号有无及强弱来判断结果,可同时检测中国地区最常见的- $\alpha^{3.7}$ 、- $\alpha^{4.2}$ 和 --^{SEA} 三种缺失型及 2 种非缺失型(HbCS、HbQS) α -地贫。其检测结果与 Southern blotting 分析或直接测序结果一致,能快速、准确地用于人群中 α -地贫基因的筛查及胎儿 α -地贫基因产前诊

断。

2.5 实时荧光定量 PCR 结合融解曲线 (dissociation curve, DC) 分析技术

实时荧光定量 PCR 结合 DC 分析技术为一种不需要凝胶电泳技术及特异性探针的应用于快速检测缺失型地中海贫血的技术。闫梅等^[16]运用 SYBR-Green 和 ABI 7000 热循环仪分别进行 3 个实时荧光定量聚合酶链反应,同时进行 DC 和 Tm 值分析,根据特定 Tm 值对应的 DC 峰值判定基因型,灵敏、准确的检测我国 3 种缺失型及非缺失型的 α -珠蛋白等位基因。该技术全部操作均由仪器自动完成,具有自动化程度高、不需荧光标记探针、不需电泳、成本低、易质控、防污染、高通量等优点,适用于进行 α -地中海贫血缺失型的产前诊断,具有很好的应用前景。袁晓文等^[17]采用双重 TaqMan 实时荧光嵌套 PCR 技术,于同一检测体系同时检测各标本 α -地贫 SEA 缺失截短序列及缺失范围内正常序列,根据荧光 PCR 阳性扩增结果结合其 Ct 值差异诊断受检个体的 α -地贫 SEA 缺失基因型。同时采用检测 α -地贫 SEA 缺失的常规 gap-PCR 法,以 PCR 扩增结合产物凝胶电泳分析各标本 α -地贫 SEA 缺失基因型,以验证及对比分析新方法的准确性与实用性。结果显示该方法不但能实现其快速分子诊断,而且能准确判断受检标本中的外源性污染,从而有效避免假阴性或假阳性误诊。表明双重 TaqMan 实时荧光嵌套 PCR 可以快速准确检测 α -地贫 SEA 缺失,操作简单实用,适合大规模人群筛查和常规分子诊断。

2.6 多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)

2002 年由荷兰学者 Schouten 等^[20]首先报道、MLPA 技术是近几年发展起来的一种针对待测核酸中靶序列进行定性和定量分析的新技术。其原理是经过探针的杂交、连接、PCR 扩增及毛细管电泳,根据各靶序列的扩增产物量进行相对定量分析,从而可以检出目的序列内几乎所有的基因缺陷。叶国永等^[21]应用 MLPA 技术联合基因测序技术平台,提高了地中海贫血基因缺陷检测的准确率,为地贫家系成员的遗传咨询和产前基因诊断提供准确的依据。而陈亚军等^[22]应用常规 gap-PCR 联合 MLPA 技术可防止 α -地贫基因的漏诊及产前诊断中的假阳性和假阴性。由于 MLPA 操作相

对繁琐、仪器设备条件要求较高,不适合大规模常规应用,但以其高灵敏性及目的序列相对定量的优势,可作为当前 α -地贫基因缺失检测方法上的有效补充。

2.7 DNA 测序分析技术

对一个目的基因或某一片段进行分析的最精确方法之一就是获得其核苷酸序列。DNA 测序分析可以鉴定未知突变,是分析点突变的金标准。目前此方法已达到自动化。随着国内经济实力的提升,以前这种主要用于科研机构研究用的技术已经在很多医疗单位逐渐开展起来。

3 小结

随着分子生物学检验技术的迅猛发展, α -地中海贫血基因诊断技术亦随之提高,大量的新技术、新方法被应用于 α -地中海贫血的诊断中,在 α -地中海贫血人群筛查、遗传咨询、产前诊断等方面起到了非常重要的作用。但是如何减少误诊和漏诊,是目前 α -地中海贫血分子检测所面临的难题。因此,在方法学上突破原有的分子诊断模式,建立高通量、操作简单、费用低廉、结果准确、安全省时的基因诊断技术仍然是人们翘首以待的事情。在地贫基因诊断技术方面还须要精益求精,不断发展和完善更简便、精确易于推广的诊断技术。

参考文献

- [1] Yu XY, Chen P, Chen WQ, et al. The genotyping research on 200 children with hemoglobin h disease in guangxi province[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2011,28(3):365-368.
- [2] Xu XM. Mediterranean anemia prevention and control guidelines [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011:25-28.
- [3] Sun SP, Wu ZK, Liu GJ. Research progress of molecular mechanism of the mediterranean anemia and it's related microRNA regulation of expression[J]. Journal of Medical Research, 2014,43(1):135-137.
- [4] Zhang ZN, Shen T. Standard of diagnosis and curative effect of blood disease [M]. Beijing: Science Press, 2007:29-35.
- [5] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletion determinants of alpha-thalassemia[J]. Blood, 2000,95(1):360-362.

- [6] Liu JZ, Ou CY, Wang LR, et al. Detection of three common, deletion alpha-thalassemia determinants in southern china by a single-tube multiplex polymerase chain reaction method[J]. Hemoglobin, 2004,28(1):39-44.
- [7] Guo LW, Huang Y, Li YL. The incidence and genetic diagnosis of β -thalassemia compound α -thalassemia in the border area of guangdong and guangxi [J]. Chongqing Medicine, 2010,39(14):1827-1828.
- [8] Xu WH, Cen XQ, Li XJ, et al. Genotyping and frequency of thalassemia in hainan province [J]. China Tropical Medicine, 2013,13(7):804-806.
- [9] Ruan LM, Zhou YJ, Zhu ML, et al. Application of single tube multiplex PCR deletion α -thalassemia diagnosis [J]. Chine J Birth Health & Heredity, 2013,13(7):804-806.
- [10] Li GF, Hu M, Xu Y, et al. Gene diagnosis of α -thalassemia in guizhou[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2011,26(11):1667-1669.
- [11] Li LY, Mo QH, Xu XM. Rapid diagnosis of non-deletion α -thalassemias by reverse dot blot [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2003,20(4):345-347.
- [12] Pan GH, Shen YZ, Huang Y, et al. Molecular epidemiological investigation of nondeletion alpha thalassemia in nanhai area of guangdong[J]. Int J Lab Med, 2014, 35(1):56-57.
- [13] Tu ZH, Huang CD, Wen YM, et al. Gene analysis of mediterranean anemia in haikou area[J]. Chine J Birth Health & Heredity, 2013,21(10):28-29.
- [14] Ma XW, Xu Y, Dai W, et al. Analysis of the results of screening and genetic diagnosis of thalassemia for 1143 pregnant women from Guiyang region[J]. Chongqing Medicine, 2013,42(17):1990-1991.
- [15] Xiao QZ, Zhou YQ, Zhang YL, et al. Application of single-tube multiplex PCR combined with reverse dot blot technology for the prenatal diagnosis of α -thalassemia[J]. Int J Lab Med, 2012,33(3):271-273.
- [16] Zeng CJ, Liu JL, Zhuang XW, et al. Application of PCR combined with flow-through hybridization technique for alpha and beta thalassemia diagnosis in women of childbearing age [J]. J Mol Diagn Ther, 2014,6 (2):93-96.
- [17] Zhong HM, OU XB, Luo MY. Study on microarray technique for rapid genetic diagnosis of α -thalassemia [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2011,9 (3):23-24.
- [18] Yan M, Liang Y, Wang LR, et al. Application of real-time polymerase chain reaction with SYBR-Green I combined with dissociation curve analysis in molecular diagnosis of α -thalassemia [J]. J Appl Clin Pediatr, 2008,23(15):1181-1182.
- [19] Yuan XW, Liu YK, Huang Q, et al. The establishment and application of double TaqMam real-time fluorescence nested PCR method for rapid detection of α -thalassemia SEA deletion [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2011,34(8):681-685.
- [20] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijjer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Nucleic Acids Res, 2002,30:e57.
- [21] Ye GY, Zang L, Huang GZ, et al. Analysis of the drawback of the combination of MLPA and gene sequencing technology in detecting thalassemia genes [J]. China Modern Medicine, 2012,19(24):90-91.
- [22] Chen YJ, Yang XH, Zeng XQ, et al. The application of multiplex ligation-dependent probe amplification technology in diagnosis and Prenatal diagnosis of α -thalassemia [J]. Chin J Hematol, 2013,34(7):591-594.

《体外诊断试剂注册管理办法》解读

杨勇 雷孝锋 李尔华 高旭年*

2007年发布实施的《体外诊断试剂注册管理办法(试行)》(下称原《办法》)对于规范体外诊断试剂的研制、生产、使用及监督管理发挥了重要作用。随着我国医疗器械行业的快速发展,医疗器械消费水平的快速提升,器械监督力度的不断加大,原《办法》在实施执行过程中出现了一些不适用新形势的问题,在一定程度制约了行业的发展。2014年6月,新修订的《医疗器械监督管理条例》(下称新《条例》)实施,国家食品药品监督管理总局(下称国家局)在新《条例》的基础上,将原《办法》修订更新为《体外诊断试剂注册管理办法》(下称新《办法》),并于2014年10月1日正式实施。新《办法》共分12章90条,明确了体外诊断试剂的定义、注册和备案的含义、申请人/备案人的基本条件、产品技术要求和注册检验、临床评价、产品注册、注册变更、延续注册、产品备案、监督管理、法律责任等事项。作为我国未来若干年体外诊断试剂注册管理的主要依据,其必然对我国体外诊断试剂整个行业的发展产生深远影响。本文从法规修订的角度对注册管理办法中几个主要变化内容做探讨,希望有助于医疗器械企业、行业从业人员对法规的正确理解并加强自律。

1 体外诊断试剂风险分类以及差异化分级管理

新《办法》规定了体外诊断试剂的定义,所有按医疗器械管理的体外诊断试剂根据其风险大小分为三类,可依据《体外诊断分类子目录》

对产品类别进行判定。国家局根据以往的管理经验,对目录进行相应的调整,这过程存在高类别调整为低类别以及低类别调整为高类别两种情况。对于类别不明确的产品,可以直接按第三类进行申报或者进行分类界定判定类别后再申报。依据产品目录进行类别判定降低了类别界定的难度,避免了许多重复工作,这既有助于企业合理高效进行注册工作整体规划,降低因产品类别不清晰而延缓注册工作进度甚至退审的风险,也使各级监管部门的市场监督管理和管理更加具有针对性和有效性,有助于整个产业良性发展。差异化分级管理呈现一松一紧两极化趋势,对于风险级别较大的第二、三类体外诊断试剂,采取注册制度,其中境内第三类以及进口第二、三类产品,仍旧属国家局直接管理和审批;境内第二类产品由企业所在省级食药监管机构负责审批。根据新《条例》对风险判定及其对应管理级别,对于高(中)风险产品,国家(省)局作为医疗器械进入市场前的把关机构,可发挥市场裁判员的角色,和市场的参与者—医疗器械生产厂家合力保障其进入市场的安全性、有效性和稳定性,特别是新时代医患关系矛盾频发、体外诊断试剂临床检验结果在疾病的诊断、治疗、预防等方面发挥着重要作用的背景下,这既是对医疗器械企业的一种保护,也是对患者、医务人员生命和健康的尊重。而第一类体外诊断试剂则采取备案制度,备案手续较之注册手续简化,且可现场办理。若符合要求,当时给予备案凭证。境内第一类体外诊断试剂备案由设区的

基金项目:“863”计划重点项目(2011AA02A101);广州市科技计划(2014Y2-00220)

作者单位:中山大学达安基因股份有限公司产品注册与知识产权部,广东,广州 510065

*通讯作者:高旭年, E-mail: gaouxnian@126.com

市级食品药品监督管理部门办理,进口第一类体外诊断试剂则由国家局办理。备案制度根据行业发展的实际状况出发而推出,第一类体外诊断试剂因风险相对较低,通过常规管理就可保障其安全、有效。备案制度强调了企业遵守法规的自主性、自律性和使命感,但并不意味着门槛的降低。第一类体外诊断试剂的备案主要是通过备案存档信息收集,并开展后续监督检查。从监管角度,新《条例》也规定食品药品监督管理部门应该对体外诊断试剂的备案、生产经营、使用活动加强监督检查。因此,第一类由过去的注册审批改为直接备案,从要求上来讲,无论是对企业的要求,还是对监管部门的要求,都没有降低。

第二、三类审批以及一类产品备案由各级食品药品监督管理机构执行相应的审批操作规范和备案办法。

2 关于产品技术要求以及注册检验前置

新《办法》中采用“产品技术要求”替代原《办法》中的“产品标准”。产品技术要求的内容针对性更强,主体为产品的性能指标和相应的检验方法,删除了检验规则、产品标签和说明书要求等内容,并制定了相应的产品技术要求编写指导原则,且明确了第三类体外诊断试剂的产品技术要求中应当以附录形式明确主要原材料、生产工艺及半成品要求。考虑到体外诊断试剂产品种类繁多,预期用途及方法学各异,即使是同类产品,不同的生产企业在原料的选择及制备、生产工艺及半成品检定方面也可能存在较大差异,国家局审评中心对第三类体外诊断试剂技术要求附录的编写内容做出了规定,提出规范化要求,有利于加快试剂的审评审批。在注册检验过程中,也明确了国家标准品、参考品的优先使用权和必要性。

新《办法》明确规定了注册检验合格后方可进行临床试验。产品上市前,需对安全性和有效性进行相应的评估。从注册管理的终极目的而言,注册检验前置于临床试验更加符合逻辑;从体外诊断试剂的定义以及管理范畴而言,体外诊断试剂是按医疗器械管理,根据《医疗器械注册管理办法》和新《条例》,体外诊断试剂注册流程变更,

由先临床后注册检验变更为先注册检验后临床,与仪器类医疗器械注册流程保持一致,体现法规的同一性和协调性;从体外诊断试剂适用仪器而言,许多采用先进技术、检测方法的体外诊断试剂需要配套使用专用的体外诊断设备。根据法规,产品上市前都需获得医疗器械注册证书,组合使用的新体外诊断试剂和体外诊断设备做完注册检验后,可系统的进行临床评价,发挥资源协同效应,也有助于审评人员综合、全面评价体外诊断系统的安全性和有效性,特别是封闭式的体外诊断系统,比单一临床评价体外诊断试剂或者体外诊断设备更加科学、合理。从医疗器械企业经营的角度而言,投入市场的封闭式体外诊断系统因具有排他性,极大地增强产品的竞争力和客户依存度,从国外行业发展的历史经验来看,国际体外诊断试剂巨头基本都是仪器与试剂共同发展的模式,占据着体外诊断行业的高端地位。体外诊断试剂的注册检验前置,结合创新医疗器械特别审批程序,有助于国内企业加快研发注册创新性体外诊断系统,提升行业竞争力,形成自身优势。

3 关于临床评价的概念和实施

依据新《条例》,体外诊断试剂的临床性能验证由单纯的临床试验扩展为临床评价,包括临床文献、临床经验数据和临床试验等信息。体外诊断试剂性能验证包括分析性能验证和临床性能验证,随着体外诊断试剂行业的发展,临床试验相关数据以及审评机构经验的积累,对于作用原理明确、设计定型、生产工艺成熟、已上市的同品种体外诊断试剂临床应用多年且无严重不良事件记录、不改变常规用途、且申请人能够提供与已上市产品等效性评价数据的、或者通过对涵盖预期用途及干扰因素的临床样本的评价能够证明该体外诊断试剂安全、有效的产品,通过非临床试验的临床评价方式来对产品的临床应用安全性及有效性进行有效评估,充分利用经验数据,在不降低标准和要求的前提下,有助于节约医院、企业、审评机构三方资源,更好的优化资源配置。对于需进行临床试验的产品,法规要求临床试验必须在取得资质的临床试验机构开展,这种要求凸显了审评机构评估产品临床应用的安

全性和有效性更为严格、严谨、规范。此外新《办法》还规定开展体外诊断试剂临床的备案要求,应当向申请人所在地省级食品药品监管部门备案。

4 关于体系核查后置

新《办法》中提出境内申请人注册申请前不需要申请体系核查,而是在技术审评过程中,由食品药品监督管理部门组织对申请人进行与产品研发、生产有关的质量管理体系核查,体系核查启动由注册申请人变为食品药品监督管理部门,境内第二类、第三类体外诊断试剂体系核查由省级食品药品监督管理部门开展,其中境内第三类体外诊断试剂由国家局技术审评机构通知相应的省局开展体系核查,必要时参与核查,且须在30个工作日内完成。这有助于技术审评人员对产品的理解和整体把握,对企业而言,有利于发挥质量管理体系在企业经营过程中的枢纽作用,落到实处,而不仅仅是一道摆设,从而使产品的立项、研发、生产均在有效合理规范化质量管理体系下运行,持续符合法定要求,保障产品的安全性和有效性。

5 审评过程资料补充时间延长为1年

新《办法》中提出,技术审评过程中需要申请人补正资料的,申请人应当在1年内按照补正通知的要求一次提供补充资料,即资料补充时间由60个工作日延长为1年,且仅有一次补充机会。如果注册申请人未能在规定的时限内按照要求补充资料或者补充资料仍不符合要求的,则予以退审。补充资料时间的延长,提高了企业产品注册的时间成本和经济成本,会极大延缓注册获证的时间。同时迫使企业提高注册申报材料的质量,倒逼企业优化筛选注册产品品种以及科学、合理制定注册工作计划,也将会促使产品注册经验不丰富的中小型企业寻求专业医疗器械咨询公司进行业务注册业务合作。

6 关于延续注册与变更

新《办法》中“延续注册”代替了之前的“重新注册”,更加准确地反映出产品的延续性。同时延续注册申请必须在注册证有效期届满前6个月前提交,而不是有效期届满前6个月内,逾期不予延续。延续注册不涉及到产品变化;若有变化,则按变更注册办理。如果不符合延续和变更的要求,则一律按新产品首次注册办理。食品药品监管部门接到延续注册申请应当在注册证有效期届满前做出决定,逾期未作决定的,则视为准予延续,此条款确保了产品上市的连续性和一致性。变更注册则包括登记事项变更和许可事项变更,相比原《办法》,境内生产地址变更由原来的许可事项变更改为登记事项变更。

7 总结

随着新《条例》的出台,一系列配套相关的办法、细则、操作规范陆续出台,我国的医疗器械行业将进入一个“高标准时代”。作为医疗器械管理的体外诊断试剂,其注册管理政策要求也不是一成不变,而是与时俱进。新办法中部分条款较多地延续了原办法的相关要求,但根据行业发展现状和趋势、过往器械管理经验以及新时代下的监管需求,注入了一些新理念和新要求,这对企业而言,既是机遇,也是挑战。新《办法》依据风险程度对体外诊断试剂实行分类管理,以风险管理作为重要基础,进一步强化了监管的科学性;此外,在保证产品安全有效的前提下,以风险高低为依据,坚持管放结合、宽严有别,给高风险产品的生产企业加压,给低风险产品生产企业松绑,促进体外诊断试剂行业做大做强;再者,适当减少事前许可,重点强化过程监管和日常监管,提高体外诊断试剂监管的有效性。总体而言,新《办法》更为科学合理、符合行业发展,突出强调企业自主性、自律性和责任感,食品药品监管部门管理也趋于严格,但不失灵活。

肿瘤生物学国家重点实验室病理单元暨第四军医大学病理学与病理生理学教研室

肿瘤生物学国家重点实验室病理单元暨第四军医大学病理学与病理生理学教研室位于陕西省西安市长乐西路 169 号，以第四军医大学病理学与病理生理学教研室为主体，成立于 1954 年。1986 年成为博士学位授权学科。该学科免疫细胞化学实验室列为全军首批医学重点建设实验室，1996 年确定为“211 工程”重点建设学科，1999 年确定为首批“长江学者奖励计划”特聘教授设岗单位，2001 年学科被评为国家重点学科，2005 年成为肿瘤生物学国家重点实验室的重要组成学科。病理学课程获评教育部“全国双语教学示范课程”和总后优质课程。现有人员中博士学位获得者占 90% 以上。该教研室现拥有分子病理学、分子免疫病理学、分子肿瘤学、分子诊断病理学、信号传导、分子生物学、免疫基因诊治、肿瘤耐药研究、动物房和尸检室等 13 个实验室，科研用房面积约 1 500 m²。拥有激光显微切割系统、多通道生理信号记录系统、离体血管灌流系统、实时定量 PCR 系统、DNA 测序仪等大型实验仪器 42 台，设备总值约 1 200 万元。

由该教研室负责的西京医院病理科，每年完成常规病理诊断 5 万余例，冰冻诊断 8 000 余例，疑难病理会诊 6 000 余例，细胞学诊断 20 000 余例，现已实现病理诊断专科化。同时还开展了淋巴瘤的基因重排分析、多种肿瘤基因变异的 FISH 诊断，以及 C-kit、K-ras、B-raf、EGFR 突变等分子诊断项目。

该教研室目前的主要研究方向为：（1）肿瘤生物治疗；（2）肿瘤的发生与转移；（3）流行性出血热的防治；（4）肺损伤研究。完成和承担国家“863”课题 2 项，国家新药创制重大专项 1 项，国家教育部重点科技专项 1 项，国家自然科学基金面上项目 60 余项，军队科学基金重点项目 1 项等各类基金项目共近 70 项，科研经费总额 2000 万余元。获国家科技进步二等奖 2 项，军队科技进步一等奖 1 项，军队科技进步二等奖 1 项，陕西省科技进步一、二等奖共 4 项。获国家发明专利 6 项。发表 SCI 收录研究论文 143 篇。主编专著 12 部，副主编和参编专著 15 部。培养了一大批全国和全军病理学界的领军人物，例如解放军总医院原病理科主任李维华、第二军医大学病理科主任朱明华、北京军区总医院病理科主任丁华野、兰州军区总医院病理科主任刘斌、济南军区总医院病理科主任耿明等等。

学科带头人王哲主要从事外科病理诊断以及临床病理研究，擅长淋巴造血系统、软组织和男性泌尿生殖系统病理诊断。



→ 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