



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

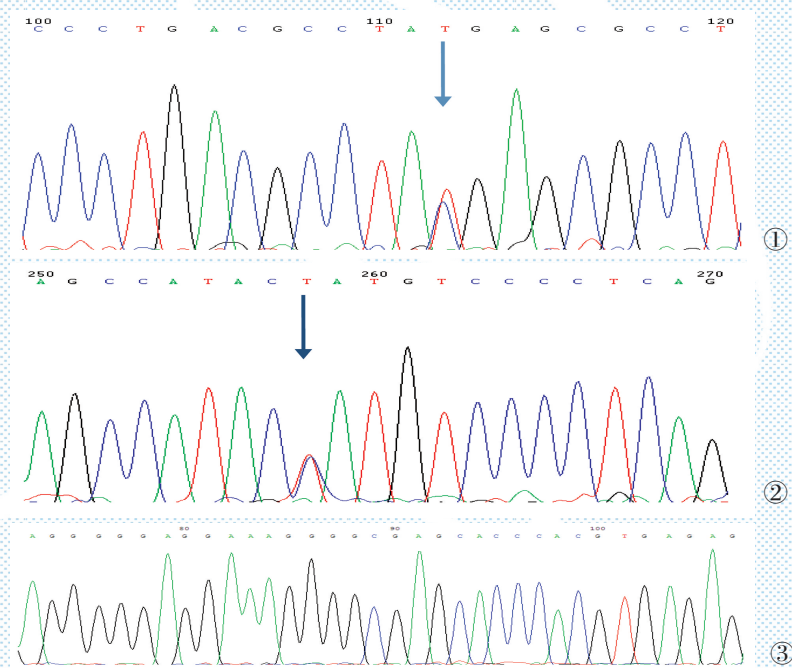
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2016年3月 第8卷 第2期 总第42期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 8 Number 2 March 2016



①、②分别为c.1311C>T和IVS-11 93T>C测序图,箭头示突变位点;③为3'-UTR测序图

图(P80) G6PD基因突变测序图

Figure(P80) Sequencing map of G6PD gene mutation

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



9 771674 692099

03>

中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

中国期刊全文数据库全文必录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

中文生物医学期刊文献数据库CMCC收录期刊

中国生物医学期刊引文数据库CMCI收录期刊

中国学术期刊影响因子年报统计源期刊



陶爱林

陶爱林，广州医科大学教授，博士生导师。现任广东省过敏反应与免疫重点实验室主任，并担任呼吸疾病国家重点实验室PI、变态反应国家临床重点专科（广医二院）副主任及学科科教带头人、国家转基因安全评价委员会继任委员、广东省医学会变态反应分会常委、广东省医学会医学实验室建设与管理分会常委、广东省医院协会医学实验室建设与管理学分会副主任委员、广东省转基因安全评价委员会委员。2012年入选国际生命科学学会蛋白质过敏原性技术委员会（ILSI Protein Allergenicity Technical Committee）委员，为整个亚洲区唯一代表。

陶爱林教授主要从事变态反应及临床免疫研究，专注于过敏疾病诊治、过敏原的生物信息学及食品药品过敏原性的医学评价与改良。在变态反应及免疫耐受形成机理、慢性炎症形成与调控、食品药品过敏原性评价与改良等领域有较多积累。提出了“代表性过敏原”“免疫毒素的过敏原性弱化”及“广谱性免疫调节剂”等学术新概念和“抗原平衡刺激”的理论假设；开发了过敏原生物信息学判别软件SORTALLER（<http://sortaller.gzhmu.edu.cn>），该软件准确性、灵敏度、特异性国际同行业中排名第一，已经被美、加、英、德、印、日、意等全球30多个国家和香港、台湾等国内20个省市多家单位的研究者使用，涵盖2100多个IP地址。组建的过敏原数据库ALLERGENIA（<http://allergeniazhmu.edu.cn>）在过敏原覆盖面、非冗余度、收敛性、准确性及分析功能等5个方面均具明显国际优势，国际浏览量正在逐步攀升。

陶爱林教授近年以通讯作者在专业国际期刊发表SCI论文12篇。主编英文书籍Allergy Bioinformatics在Springer公司出版。近年主持、指导国家重大科技专项等国家级课题项目8项，作为主持人负责的任务完成出色获评优秀第一。以第一发明人获得国家发明专利2项，计算机软件著作权登记证书1件。以第一完成人获得广东省科学技术二等奖和广州市科技进步一等奖各1项。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2016 年 3 月 第 8 卷 第 2 期 总第 42 期 Bimonthly Volume 8 Number 2 March 2016

主管 主办	中山大学 《中国家庭医生》杂志社有限公司
顾问 主编 编辑部主任 编辑部 编辑 排版 出版	来茂德 申子瑜 李明 徐伟文 《分子诊断与治疗杂志》编辑部 邓子华 李晓兰 谭舜菁 钟华安 《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址 电话 传真 电子邮箱 刊号 邮发代号 发行单位 发行范围 广告经营许可证 印刷 出版日期 定价	广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 10~11 楼(510620) (020) 32290177 32290789-206 (020) 32290177 jmdt@vip.163.com ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R 46-283 广东省报刊发行局 国内外公开发行 粤工商广字第 01139 号 广州中大印刷有限公司 2016 年 3 月 18 日 RMB 15.00 元
Responsible Institution Sponsor	Sun Yat-sen University China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.
Consultant Editor in Chief Managing Director Editorial Office Editors Typesetting Editing	LAI Maode SHEN Ziyu LI Ming XU Weiwen <JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY> Editorial Office DENG Zihua LI Xiaolan TAN Shunjing ZHONG Huaan China Family Doctors Magazine Publisher Co. Ltd.
Add Tel Fax E-mail CSSN Printing Publish Date Price	10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620 (020) 32290177 32290789-206 (020) 32290177 jmdt@vip.163.com ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd. 2016.3.18 RMB 15.00

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2016年3月 第8卷 第2期

目次

述评

我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分布特征和基因突变 林芬 杨辉 杨立业(73)

论著

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)c.1311C>T/IVS-1193T>C与3'-UTR的多态性探讨
..... 林芬 杨辉 吴教仁 等(78)

应用微阵列比较基因组杂交技术检测乳腺癌患者共有拷贝数变异的初步研究
..... 周慧 何丹 杨学习 等(82)

高效hCu, Zn-SOD-PTD融合蛋白的表达及其穿膜功能的研究
..... 王晓勋 杞少华 李瑞明 等(88)

广西壮族儿童肥胖与黑素皮质素受体基因rs17782313位点多态性的关系
..... 唐宁 陈艺丹 曾婷 等(94)

2 638例细胞DNA定量分析法筛查宫颈癌的意义 刘国生 王晓亮 郑建琼 等(99)

Hsa-miR-21的生物学信息分析 陈晓华 曹小龙 黎秀月 等(104)

靶向c-myc基因的siRNA基因干扰对大肠癌Lovo细胞增殖与凋亡的影响
..... 刘集鸿 蒋楠楠 张丽科(109)

细胞蜡块宫颈液基细胞P16在检测宫颈肿瘤中的作用 刘镜文 陈莉 吴秋良(114)

胰腺浆液性微囊性腺瘤临床诊治观察 原玉芬 张新莲 张静芳(119)

综述

口腔鳞状细胞癌肿瘤标记物的研究 邵婷如 赵萌 吕晓智(123)

Toll样受体4与结直肠癌的相关性 赵祥梅 戴盛明(130)

遗传性结直肠癌基因检测及其在临床上的应用规范化问题
..... 姜烈君 陆晓旭 黄华艺(135)

讲座

《创新医疗器械特别审批程序(试行)》解读 杨勇 雷孝锋 李尔华 等(142)

专家风采

陶爱林 (封二)

实验室巡礼

广东省过敏反应与免疫重点实验室 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 2 March 2016

CONTENTS

COMMENTS

The distribution characterization and gene mutation of Glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency in China

LIN Fen, YANG Hui, YANG Liye..... (73)

ORIGINAL ARTICLES

The investigation of polymorphism on G6PD c.1311C>T/IVS-1193T>C and 3' -UTR (untranslated regions)

LIN Fen, YANG Hui, WU Jiaoren, YANG Liye..... (78)

Preliminary study of common copy number variations of breast cancer patients detected by
array-based comparative genomic hybridization technology

ZHOU Hui, HE Dan, YANG Xuexi, LI Fenxia (82)

Study on expression and trans-membrane activity of human Cu, Zn-SOD-PTD

WANG Xiaoxun, QI Shaohua, LI Ruimin, LIANG Qingle (88)

Relationship between SNP rs17782313 variation in *MC4R* gene and obesity in zhuang nationality children

*TANG Ning, CHEN Yidan, ZENG Ting, QIN Zhengxue, YAN Tizhen, LUO Shiqiang, LI Wugao,
LI Jingwen, WANG Qiuhua, LI Zhetao* (94)

The significance of the DNA quantitative analysis in screening of 2 638 cervical cancer patients

LIU Guosheng, WANG Xiaoliang, ZHENG Jianqiong, ZENG Shoukui, ZHOU Wei (99)

Analysis on biological information of hsa-miR-21

CHEN Xiaohua, CAO Xiaolong, LI Xiuyue, HE Jingcai, ZHANG Xiaona, LUO Rongcheng (104)

The effect of the interference on the siRNA with targeted *c-myc* gene on the proliferation and
apoptosis of colorectal cancer Lovo cell

LIU Jihong, JIANG Nannan, ZHANG Like, DENG Ning (109)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 8 Number 2 March 2016

CONTENTS

The detection of P16 in cervical tumor saved in wax block by cervical fluid cytology

LIU Jingwen, CHEN Li, WU Qiuling (114)

Observation of clinical diagnosis and treatment of serous microcystic adenoma of pancreas

YUAN Yufen, ZHANG XinLian, ZHANG Jingfang (119)

REVIEWS

Investigation on the tumor markers of oral squamous cell carcinoma

SHAO Tingru, ZHAO Meng, LV Xiaozhi (123)

The relationship of toll-like receptor 4 and colorectal cancer

ZHAO Xiangmei, DAI Shengming (130)

Genetic testing of inherited colorectal cancer and its laboratory standards in clinical application

JIANG Liejun, LU Xiaoxu, HUANG Huayi (135)

·述 评·

我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分布特征和基因突变

林芬 杨辉 杨立业*

[摘要] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症是最常见的遗传性酶缺陷疾病,可导致急性溶血性贫血、新生儿高胆红素血症和慢性非球形红细胞溶血性贫血等疾病,其发生率和基因突变类型有明显的地域和种族特异性,本文主要综述了中国不同民族和地区 G6PD 缺乏症的分布特点和基因突变。

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症;发病率;基因突变

The distribution characterization and gene mutation of Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase deficiency in China

LIN Fen, YANG Hui, YANG Liye*

(Central Laboratory of Chaozhou Central Hospital, Nanfang Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521021)

[ABSTRACT] Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a common inherited disorder worldwide. It may cause a large spectrum of diseases including neonatal jaundice, acute hemolysis, and severe chronic non-spherocytic hemolytic anemia. The frequency and gene mutation type of G6PD deficiency showed specific characteristics among widely varied regions and ethnic groups. This article characterizes the distribution and gene mutation G6PD deficiency among the different regions and ethnics groups in China.

[KEY WORDS] Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency; Frequency; Gene mutation

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症在全世界分布广泛,罹患患者达4亿多人^[1],主要见于地中海沿岸、亚洲、非洲、南美洲及太平洋诸岛等热带和亚热带地区。我国也是该病的高发区,主要分布在长江以南的广大区域。深入研究 G6PD 缺乏症的分布特点和基因突变类型,对提高我国的人口素质和健康起到重要作用,也为研究我国各民族的起源及变迁提供重要的人类学资料。

1 G6PD 缺乏症的发病机制

G6PD 缺乏症经典的机制主要是 G6PD 基因发生突变导致其基因表达下降或酶结构发生改变,从而使 G6PD 酶活性降低,红细胞受氧化损伤而遭到破坏,引起溶血性贫血。近年来,随着分子生物学研究手段的进展,在 G6PD 缺乏症发病机制研究的许多方面有了新的发现,可能导致 G6PD 缺乏症新的分子病理机制有 DNA 甲基化、外显子剪接沉

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2014902,B2013444),潮州市科技计划项目(2014S08),广东省临床重点专科建设项目(检验科)(2012)

作者单位:潮州南方医科大学附属医院中心医院中心实验室,广东,潮州 521021

*通讯作者:杨立业, E-mail: yangleeyee@sina.com

默子对于 G6PD mRNA 表达的调节和转录调节因子的调节,以及部分特殊位点的碱基变异导致的 G6PD 酶活性改变^[1]。这些分子病理学发病机制不仅丰富了 G6PD 缺乏症的病因学,为临床诊治和遗传咨询提供帮助,也为其它部分发病机制不明的疾病的研究带来了新的研究思路。

2 G6PD 缺乏症的分布与发生率

G6PD 缺乏症在我国呈“南高北低”的分布特点,以海南、广东、广西、云南、贵州、四川、台湾和香港等省和地区为高,部分省份人群的基因携带率高达 16%^[2],随着纬度北移,发生率呈现下降趋势,长江以北省市罕有报道。据北京国家临床实验中心 2013 年 196 个实验室上报的 30 000 万新生儿筛查结果, G6PD 的发生率为 1:44^[3]。Chien 等^[4]筛查了台湾 1996 年~2005 年 1 211 632 例中国新生儿,结果显示 G6PD 缺乏症的发生率为 1.82%,香港的发生率为 4.5%^[5],而新加坡、夏威夷等因移民原因成为高发地区。中国人群 G6PD 缺乏发生率具体见表 1。

表 1 我国各地区 G6PD 缺乏发生率

Table 1 The prevalence of G6PD deficiency in various regions of China

省份	地区	样本量	发生率(%)	出处
广东	广州	11 437	4.2	Jiang J, et al ^[6]
	梅州	64 260	6.0	黄烁丹,等 ^[7]
	潮州	2 500	2.68	Yang H, et al ^[8]
	东莞	16 464	4.08	Peng Q, et al ^[9]
广西	南宁	1 720	11.34	黄作群,等 ^[10]
	平南	22 929	8.02	赵卫新,等 ^[11]
云南	昆明	29 527	0.6	章红印,等 ^[12]
	两边境	4 939	4.1	忽丽莎,等 ^[13]
海南		184 880	3.17	赵振东,等 ^[14]
西藏	林芝	1 208	1.74	张再兴,等 ^[15]
四川	成都	11 085	6.1	韦永琼,等 ^[16]
山东	泰安	161 337	0	尹峰,等 ^[17]
贵州	贵阳	11 491	1.21	厉勇,等 ^[18]
上海		217 447	0.18	郭静,等 ^[19]
江西	南昌	10 792	1.20	徐小兰,等 ^[20]
重庆		3 000	3.77	蔡中才,等 ^[21]

由上表可见,我国不同地区人群 G6PD 缺乏症的发生率相差甚远,关于这种地域差异有几种解释:自然选择、遗传漂变和人群渊源不同^[22]。

G6PD 缺乏症和疟疾的地理分布高度一致,流行病学调查也证实了两者之间的相关性,即疟疾对人类的自然选择。我国的海南、广东、广西、云南是历史上有名的疟疾重灾区,G6PD 缺乏者较多是长期自然选择的结果,其中南方客家人是“疟疾选择学说”的典型例子。史料中记载客家人先民多是中原汉人,由于战乱,饥荒和政权更换自中原历经 5 次大迁移迁居南方,也即是历史上所谓的“黎庶走南疆”“衣冠南渡”和“湖广填川”等事件,后来客家人分布在福建、广东、广西、台湾一带并吸收南方少数民族尤其是畲族的一些成份^[23]。中原一带无疟疾流行记载,G6PD 缺乏也几无报道,迁移至南方的客家人高频率的 G6PD 缺乏正是对疟疾抗性选择的结果。而同为云南地区,位于滇西南高疟区的勐腊县、德宏州傣族 G6PD 缺乏症发生率为 16.6%和 16.3%,处于滇西北疟疾低发区的大理市白族和中甸的发生率仅为 1.19%和 0.3%^[24]。遗传漂变也是造成 G6PD 缺乏地域差异的可能原因,如海南南元门翁村苗族人群 G6PD 缺乏率高达 44.83%^[22],福建穆水畲族则为 13.61%^[25],这 2 个地区皆因地理环境闭塞、习惯族内通婚而造成 G6PD 缺乏高发,福建青水畲族 G6PD 缺乏率为 6.07%,因为该族群相对开放且主张畲汉通婚^[25]。此外,同一民族不同群体 G6PD 缺乏发生率显著不同,瑶族在广东和广西的发生率分别为 0.31%和 6.24%,广西那坡县壮族的发生率为 5.2%,而广东连山县壮族的发生率为 18.2%^[26],这提示同一民族不同群体渊源不同,可具有不同遗传特性。我国不同民族 G6PD 缺乏发生率见表 2。

多年来,我国学者对于 G6PD 缺乏症的研究大多来自南方各省,但随着经济、交通高度发达,南北人群交流日益频繁,各地区 G6PD 缺乏症的发生率可能会发生改变,在北方人群进行筛查和预防宣传也有必要。

3 G6PD 缺乏症的基因突变

人类的起源和迁移进化过程历史久远,规模宏大,在人群漫长的迁移过程中会产生和积累很多有意义的基因突变,这些突变的多态性及地理分布有助于揭示基因突变的起源和进化顺序。G6PD 缺乏症是最常见的遗传性酶缺陷疾病,我们可以从其突变多态性上去寻找一些人群迁移的证据。

表2 我国各民族 G6PD 缺乏症发生率
Table 2 The prevalence of G6PD deficiency among
different ethnic population in China

民族	地区	样本量	发生率 (%)	出处
汉	广东	133 752	4.21	Jiang W, et al ^[27]
	海南	128 737	2.83	赵振东, 等 ^[114]
	云南	5 807	3.39	李鸿斌, 等 ^[28]
	广西	3 027	8.23	Yan T, et al ^[29]
瑶	广东	3 056	1.77	Jiang W, et al ^[27]
	云南	5 807	6.99	李鸿斌, 等 ^[28]
	贵州	586	7.68	吴昌学, 等 ^[30]
	广西	22 929	11.05	赵卫新, 等 ^[11]
黎	海南(保亭县)	256	7.03	王政, 等 ^[31]
	海南(五指山市)	362	9.94	王政, 等 ^[31]
壮	广西	1 528	7.66	Yan T, et al ^[29]
傣	云南	812	9.73	詹小芬, 等 ^[32]
彝	云南	5 807	2.41	李鸿斌, 等 ^[28]
苗	贵州	890	6.5	何燕, 等 ^[33]
土家	贵州	227	7.49	吴昌学, 等 ^[34]
侗	贵州	524	6.49	齐晓岚, 等 ^[35]
畲	福建	764	13.61	刘鹏, 等 ^[25]

3.1 我国 G6PD 基因突变的研究

随着现代分子生物学技术的发展和突变检测技术的提高,人们已从基因水平检测 G6PD 基因突变,目前世界范围内已报道 160 多种 G6PD 基因突变类型^[1]。在我国,进行 G6PD 变异型的分子生物学鉴定研究有二十多年历史,1993 年杜传书等^[36]首先报道了中国人常见的 2 种突变类型 G6PD Kaiping (c.1388 G>A) 和 G6PD Canton (c.1376 G>T),以后陆续发现 G6PD Gaohe (c.95 A>G) 等,迄今为止我国已发现超过 35 种的 G6PD 基因突变类型。

3.2 中国人群 G6PD 缺乏症基因突变类型

G6PD 变异有明显的地域或群体特异性,即某个群体或部族主要以某几种突变为主。如地中海沿岸国家以 G6PD Mediterranean (c.563 C>T) 为主,非洲国家以 G6PDA⁻ (c.202 G>A/c.376 A>G) 最为常见,而老挝、柬埔寨等基本上是 G6PD Viangchan (c.871 G>A/ c.1311 C>T),印尼安汶人则多数是 G6PD Vanua Lava (c.383 T>C)^[37],以上这些突变可能是较古老的突变。在中国人群,G6PD Kaiping (c.1388 G>A)、G6PD Canton (c.1376 G>T) 和 G6PD

Gaohe (c.95 A>G) 是最常见的 3 种 G6PD 基因突变类型,这 3 种突变频率之和占 70% 以上^[37],且仅在华人中存在,世界其他民族未见报道,这也揭示中华民族起源于共同的祖先。中国人群 G6PD 基因突变类型见表 3。

G6PD 基因突变型与种族起源的关系一直是研究的热点,从其分布情况可以粗略地判断某些族群的亲缘关系及历史上的迁移情况。如广西壮族与泰族共同起源于古代百越民族中的西瓯和骆越,其中部份迁徙到现泰国北部,受不同文化影响最终形成壮、泰 2 个民族^[38]。G6PD Viangchan (c.871 G>A / c.1311 C>T) 在泰国、老挝和马来西亚等东南亚国家是最常见的变异型,而该变异型被列为广西 G6PD 基因突变型第 4 位,为这一研究理论增加了遗传学证据^[39];G6PD Mahidol (c.487 G>A) 是云南阿昌族主要聚集地德宏州最主要的突变类型,占 84.2%,且所有 G6PD Mahidol 突变的个体均与多态性位点 IVS5-612 (G>C) 相连锁^[40]。德宏州与缅甸接壤,这一地理位置便于阿昌族群众与缅甸人民进行贸易和民间交往,而 c.487 G>A 突变型是缅甸人群中最常见突变型,占 91.3%^[40],这提示阿昌族与缅甸人群之间可能发生过广泛的基因交流;我国贵州从江县侗族中 c.592 C>T 突变型发生率高达 52.94%^[35],成为该民族 G6PD 的主要突变类型,也和种族起源关系密切。最早迁入该地的居民较多具有该突变,而贵州山多,交通不便,且当地少数民族有不与外族通婚的特点,因此形成长期的隔离群体而导致该民族的高 c.592 C>T 突变率,这一点也可以说明贵州从江县侗族是一个高隔离度的群体。

这样的例子尚有不少,我国是一个多民族国家,在 G6PD 基因上存在着多种类型的突变,研究这些突变对我国群体遗传学、人类学、民族源流和变迁提供新的思路和佐证。

4 展望

随着研究的深入,学者们不断尝试从遗传学、地理和人群迁徙的各个角度去分析 G6PD 缺乏的发生率、基因型和所在地区、民系以及疾病之间的关系,也取得了一定成果。然而,G6PD 缺陷还有很多问题有待进一步的解答,例如女性杂合子常规生化检查无法确认,能否研究一种在基因水平上经济、快速地检出女性杂合子的方法? 类如 c.1311C>T/ IVS-11 93T>C 的基因多态性位点是否

表3 中国人群 G6PD 基因突变类型

Table 3 The genotypes of G6PD deficiency in Chinese population

位置	类型	突变/SNP	氨基酸置换	生化型
Exon2	II	c.95 A>G	His32Arg	Gaohe(高鹤)
	II	c.473G>A	Cys158Tyr	Shenzhen(深圳)
Exon4	未知	c.196 T>A	Phe66Ile	Songklanagarind
	III	c.202 G>A	Val68Met	Asahi
	III	c.131 C>G	Ala44Gly	Orissa
Exon5	III	c.274 C>T	Pro92Ser	NR
	未知	c.371 A>G	His124Arg	未知
	III	c.383 T>C	Leu128Pro	Vanua Lava
	III	c.392 G>T	Gly131Val	Qingyuan(清远)
	II	c.406 C>T	Arg136Cys	未知
	未知	c.442 G>A	Glu148Lys	Liuzhou(柳州)
Intro5		IVS-5 636/637T del		
		IVS-5 C134T		
Exon6	III	c.487 G>A	Gly163Ser	Mahidol(玛希敦)
	II	c.493 A>G	Asn165Asp	Taipei(台北)
	III	c.517 T>C	Phe173Leu	Nankang(南港)
	III	c.519 C>T	Phe173Leu	Miaoli(苗栗)
	II	c.563 C>T	Ser188Phe	Mediterranean(地中海)
	II	c.592 C>T	Arg198Cys	Shunde(顺德)
Exon7		c.612 C>G(SNP)		
	未知	c.691 G>C	Ala231Pro	未知
	未知	c.703 C>T	Leu235Phe	Nanning(南宁)
Exon8	未知	c.835 A>G	Thr279Ala	Haikou(海口)
	II	c.835 A>T	Thr279Ser	Chinese-1
		c.855 T>G(SNP)		
Exon9	III	c.871 G>A	Val291Met	Jammu(查谟)
	III	c.871 G>A /c.1311 C>T	Val291Met/Tyr437Tyr	Viangchan(文昌)
	II	c.1004 C>T	Ala335Asp	Fushan(佛山)
Exon10	III	c.1024 C>T	Leu342Phe	Chinese-5
	I	c.1159 C>T	Arg387Cys	Guadalajara
	未知	c.1160 G>A	Arg387His	Beverly Hills
Exon11	未知	c.1225 C>T	Pro409Ser	未知
		c.1311 C>T(SNP)	Tyr437Tyr	
	I	c.1339 G>A	Gly447Arg	Santiago de Cuba
Exon11	未知	c.1340 G>T	Gly 447Val	未知
	II	c.1360 C>T	Arg454Cys	Chinese-2/Union
Intron11		IVS-11 93T>C (SNP)		
Exon12	II	c.1376 G>T	Arg459Leu	Canton(广东)
	III	c.1381 G>A	Thr461Ala	Yunnan(云南)
	III	c.1387 C>T	Arg463Cys	Keelung(基隆)
	II	c.1388 G>A	Arg463His	Kaiping(开平)
	未知	c.1414 A>C	Leu472Iso	Laibin(来宾)
	未知	c.202 G>A/c.871 G>A	Val68Met/Val291Met	Hechi

导致 G6PD 酶活性降低? 其机制是什么? G6PD 缺乏症与许多疾病的发生都有一定关系, 这些疾病的 G6PD 缺陷机制和基因突变情况如何等问题都值得研究、探讨。

参考文献

- [1] 张力佳, 熊符. G6PD 缺乏症的分子病理学新机制[J]. 国际遗传学杂志, 2011, 34(5):271-276.
- [2] 刘晗, 蒋玮莹. 人类葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的分子生物学研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2009, 32(1):18-22.
- [3] Zhong K, Wang W, He F, et al. The status of neonatal screening in China, 2013[J]. J Med Screen, 2015, pii: 0969141315597715. [Epub ahead of print].
- [4] Chien YH, Lee NC, Wu ST, et al. Changes in incidence and sex ratio of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by population drift in Taiwan[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2008, 39(1): 154-161.
- [5] Lam ST, Cheng ML. Neonatal screening in Hong Kong and Macau [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003, 34(1):73-75.
- [6] Jiang J, Li B, Cao W, et al. Screening and prevention of neonatal glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency in Guangzhou, China[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2):4272-4279.
- [7] 黄烁丹, 吴德永, 宋春雪, 等. 广东省梅州市新生儿疾病筛查效果分析[J]. 广东医学, 2009, 30:1231-1232.
- [8] Yang H, Wang Q, Zheng L, et al. Incidence and molecular characterization of glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency among neonates for newborn screening in Chaozhou, China[J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37(3):410-419.
- [9] Peng Q, Li S, Ma K, et al. Large cohort screening of G6PD deficiency and the mutational spectrum in the Dongguan district in Southern China [J]. Plos One, 2015, 10(3):e0120683.
- [10] 黄作群, 唐萍, 覃桂芳, 等. 1720 例新生儿脐血 G6PD 筛查报告[J]. 广西医学, 2007, 29(8):1185-1186.
- [11] 赵卫新, 徐庆萍. 22929 例全血标本 G6PD 定量检测报告[J]. 右江医学, 2012, 40(4):530-531.
- [12] 章印红, 朱妹, 李利, 等. 昆明地区 29527 例新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶水平分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(23):1810-1813.
- [13] 忽丽莎, 邹团标, 刘锦桃, 等. 云南两边境州 6 民族 0~6 岁儿童 G6PD 缺乏症的流行病学调查研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(11):133-135.
- [14] 赵振东, 王洁, 温英梅, 等. 2007~2010 年海南省新生儿 G6PD 缺乏症筛查结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(33):5493-5494.
- [15] 张再兴, 周红宁, 赵晓涛, 等. 西藏林芝地区墨脱县疟疾流行情况调查[J]. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 2008, 26(5):343-348.
- [16] 韦永琼, 郭健玉. 成都市新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24):3366-3367.
- [17] 尹峰. 泰安地区 2010~2012 年度新生儿疾病筛查(四病)的结果分析[J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(12): 862-863.
- [18] 厉勇, 杨明, 菲肖琨. 贵阳地区新生儿 G6PD 酶筛查结果分析[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(7):1171-1172.
- [19] 郭静, 许洪平, 姚静, 等. 上海市新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查及临界值确立[J]. 上海交通大学学报, 2015, 35(4):618-621.
- [20] 徐小兰, 王枫, 杨蓉. 南昌地区 10792 例新生儿 G6PD 缺乏症筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(8):85.
- [21] 蔡中才. 重庆地区 G6PD 缺乏症的产前筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(7):53.
- [22] 许延康, 曾瑞萍, 刘良斌, 等. 我国 7 个省(自治区)9 个民族人群红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因频率调查[J]. 遗传与疾病, 1985, 2(2):67-71.
- [23] 李辉, 潘悟云, 文波, 等. 客家人起源的遗传学分析[J]. 遗传学报, 2003, 30:873-880.
- [24] 蒋玮莹, 杜传书, 段山, 等. 云南省四个少数民族中所见的 G6PD 基因突变类型[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(3):149-152.
- [25] 刘鹏, 蒋玮莹, 张希希, 等. 福建畲族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变型[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(10): 612-615.
- [26] 刘家明, 卢桂森. 我国少数民族 G6PD 缺乏症基因突变的研究[J]. 华夏医学, 2001, 14(4):560-562.
- [27] Jiang W, Yu G, Liu P, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population [J]. Hum Genet, 2006, 119(5): 463-478.
- [28] 李鸿斌, 朱进, 车英, 等. 西双版纳州高疟区少数民族 G6PD 筛查[J]. 中国热带医学, 2012, 12(2):137-138.
- [29] Yan T, Cai R, Mo O, et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations [J]. Haematologica, 2006, 91(10): 1321-1328.

(下转第 98 页)

· 论 著 ·

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)c.1311C>T/IVS-1193T>C与3'-UTR的多态性探讨

林芬 杨辉 吴教仁 杨立业*

【摘要】目的 对中国人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenas, G6PD) c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性与3'-非翻译区(3'-untranslated regions, 3'-UTR)的多态连锁相关性进行研究。同时了解粤东、华北地区健康人群中该突变基因的携带情况。**方法** 应用全自动生化仪速率法测定G6PD活性,基因测序检测G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性。根据G6PD基因UTR区设计特异性引物,测序确证携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性的G6PD缺乏标本是否连锁有UTR单个碱基上的变异(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点的变异。**结果** 华南地区有39例G6PD缺乏样本检测到携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变,其3'-UTR和5'-UTR端没有检测到SNP位点的变异。同时,我们研究发现G6PD酶活性正常的人群中也携带有c.1311C>T/IVS-11 93T>C变异,其在潮州、梅州各100名正常人群中发生率分别为15.7%和12%,在郑州和石家庄各50名正常人群中发生率分别为2%和8%。该变异在中国南方与北方的正常人群之间相比较有统计学差异。粤东地区G6PD缺乏者中携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变的样本并未发现连锁有UTR SNP位点突变。**结论** 关于G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变与G6PD缺乏之间的相关性值得进一步探讨。

【关键词】 G6PD缺乏症;基因突变;UTR

The investigation of polymorphism on G6PD c.1311C>T/IVS-1193T>C and 3'-UTR (untranslated regions)

LIN Fen, YANG Hui, WU Jiaoren, YANG Liye*

(Central Laboratory, Affiliated Chaozhou Central Hospital, southern Medical University, Chaozhou, Guangdong, China, 521021)

【ABSTRACT】Objective To explore the linkage relationship of G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C polymorphism with the 3'-UTR polymorphism in the Chinese population, and investigate the frequency of c.1311C>T/IVS-11 93T>C polymorphism in healthy individuals in the eastern Guangdong province and northern China. **Methods** The activity of G6PD enzyme was analyzed through Auto-bioanalyzer, and the G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C gene polymorphism was detected by DNA sequencing. Specific primers were designed for amplification of the 5' and 3'-UTR of the G6PD gene. **Results** 39 cases of G6PD deficiency were detected with c.1311C>T/IVS-1193T>C polymorphism in the northern China. However, no variation in the 3' and 5'-UTR regions was found among those samples. At the same time, c.1311C>T/IVS-1193T>C polymorphism was also detected in individuals with normal G6PD activity. The frequencies of c.1311C>T/IVS-1193T>C polymorphism in healthy individuals of Chaozhou and Meizhou area were 15.7% and 12%, respectively. Furthermore, the frequency of the polymorphism in healthy individuals of Zhengzhou and Shijiazhuang were 2% and 8% respectively. The frequencies of the polymorphism in healthy individuals were statistically significant in the North and the

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2014902,B2013444);广东省临床重点专科建设项目(检验科)(2012);潮州市科技计划项目(2014S08)

作者单位:南方医科大学附属潮州市中心医院中心实验室,广东,潮州 521021

*通讯作者:杨立业, E-mail: yangleeyee@sina.com

South. **Conclusion** The UTR SNP variations were not found among G6PD deficiency samples detected with c.1311C>T/IVS-1193T>C gene polymorphism in the eastern Guangdong province. The relationship of G6PD c.1311C>T/IVS-1193T>C polymorphism with G6PD deficiency requires further study.

[KEY WORDS] G6PD deficiency; Gene mutation; Untranslated regions

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症的发病原因主要是G6PD基因突变,导致G6PD酶活性降低,红细胞受氧化损伤而遭到破坏,引起溶血性贫血。临床表现高度异质性,其溶血的严重程度与剩余酶的功能呈负相关^[1-3]。我们在临床研究发现,粤东地区G6PD缺乏的病例中常发现2种静止突变,外显子c.1311C>T和IVS-11 93T>C显示出强连锁,而这种病例未发现其它外显子的突变。不久前,国外研究者指出c.1311C>T和IVS-11 93T>C2种静止突变与其下游非转录区的一个单个碱基上的变异(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点连锁,这个位点的基因突变导致了基因表达(mRNA)降低^[4],从而引起G6PD缺乏。中国人群中携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变的G6PD缺乏者是否也连锁有SNP位点的变异?目前无文献报告。另外,也有少数研究报道在G6PD正常的人群中也存在c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性^[5-7],但是关于其在中国正常人群中的具体发生频率鲜见报道。针对以上2个方面,我们作了如下研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2014年6月至12月从广东省梅县妇幼保健院、平远县人民医院和兴宁县人民医院、揭阳普宁妇幼保健院以及潮州市中心医院体检中心收集的G6PD缺乏全血样本进行基因检测,并对其中39例携带有c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性的样本进行非翻译区(untranslated regions, UTR)SNP位点检测。同时,我们收集南方潮州和梅县、北方郑州和石家庄(样本由上海凯普生物有限公司提供)G6PD正常人群全血样本进行G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性检测。

1.2 方法

1.2.1 G6PD活性测定

参照《全国临床检验操作规程》介绍方法^[8],应用全自动生化仪速率法进行G6PD活性缺乏的筛查,酶活性低于5.3 U/L的样本诊断为G6PD缺乏。

1.2.2 DNA提取

采用深圳亚能生物科技有限公司生产的DNA提取试剂盒提取DNA。

1.2.3 c.1311C>T以及IVS-11 93T>C分型检测

膜反向斑点杂交法采用深圳亚能生物技术有限公司试剂盒,设计10对引物用于2号~13号外显子(包括外显子和外显子-内含子接合区)的扩增及基因测序。其中11号~12号外显子引物序列为:上游引物5'GCAGTGGCATCAGCAAGA;下游引物3'AGTGACGGGTGGAGGAGA。PCR反应条件:预变性95℃ 3 min;扩增94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 35 s,共35个循环。

1.2.4 5'-UTR和3'-UTR区域的扩增和测序

针对G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变样本,设计4对引物用于5'-UTR和3'-UTR区域的扩增和测序,分别是3'-UTR1引物:1F(GCAGACGAGCTGATGAAGA)和1R(GGAGTGGGACAAGGAA GTG)(738 bp);3'-UTR2引物:2F(TCACTCCAGCCCAACAGA)2R(GGTC CT-CAGGGAAGCAAA)(397 bp);5'-UTR1引物:1F(AGGCGGGGAAACCGGACAGT)和1R(GTC CCCTTCGCTCTCGGGGT)(574 bp);5'-UTR2引物:2F(ACCCCGAGAGCGAAG GGG AC)和2R(CGGCTGGGCATTGGGGAGTG)(330 bp)。

1.2.5 测序结果分析

将测序序列用BLAST进行比对,同时对测序图谱应用Chromas软件直接分析,从而鉴定基因突变类型。DNA序列比对数据库:NCBI BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

1.2.6 统计学分析

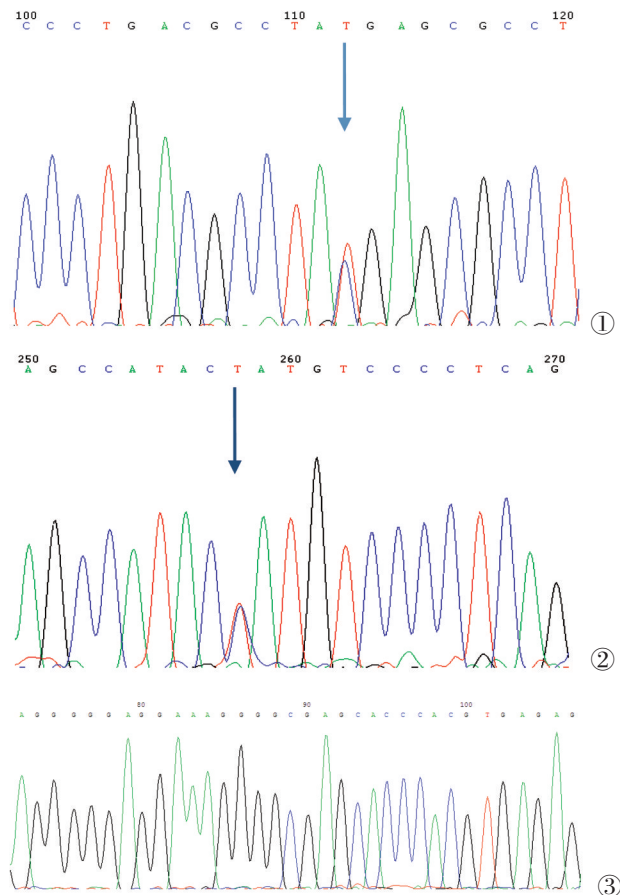
G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性在中国南方与北方正常人群之间的比较采用SPSS 16.0专业版软件做 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 c.1311C>T/IVS-11 93T>C的UTR区检测

我们对粤东地区人群进行G6PD缺乏症的流

行病学调查研究^[9],此次选取了广东省潮州、揭阳普宁、梅县、平远、兴宁所检测出的39例携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性的G6PD缺乏样本,针对3'-UTR和5'-UTR的SNP位点设计引物并进行PCR扩增、测序,这些样本并未检测到SNP位点的变异,c.1311C>T/IVS-11 93T>C和3'-UTR测序图见图1。



①、②分别为c.1311C>T和IVS-11 93T>C测序图,箭头示突变位点;③为3'-UTR测序图

图1 G6PD基因突变测序图

Figure 1 Sequencing map of G6PD gene mutation

2.2 G6PD正常人群的c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性

我们分别对南方(潮州和梅州)和北方(郑州和石家庄)G6PD正常人群的c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因多态性进行调查,在潮州100名健康人群中检出15例(男6例,女9例),发生率为15%;在梅州100名健康人群中检出12例(男5例,女7例),发生率为12%。在郑州50名健康人群中仅发现1例,为男性,发生率是2%;而在石家庄50名健康人群中

发现4例,均为女性,发生率是8%。经SPSS16.0专业版软件 χ^2 检验分析,南方正常人群c.1311C>T/IVS-11 93T>C发生率和北方正常人群相比较有统计学意义($P=0.025$)。人类基因组计划组中有G6PDc.1311C>T在不同国家正常人群中的分布频率(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),其中欧洲、美国、非洲国家的分布频率分别为7.16%、12.39%和21.71%,但没有c.1311C>T合并IVS-11 93T>C基因多态性的数据。中国部分地区正常人群中G6PDc.1311C>T/IVS-11 93T>C的发生率见表1。

表1 中国部分地区正常人群G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C的发生率

Table 1 The frequency of G6PD c.1311C>T/IVS-11 93T>C among healthy people in some parts of China

地区	样本量	c.1311C>T/IVS-11 93T>C(例数)	发生率(%)
海南黎族(男性)	50	12	24
云南彝族	67	20	29.9
广西(男性)	64	6	9.4
广东(潮州)	100	15	15
广东(梅州)	100	12	12
河北(石家庄)	50	4	8
河南(郑州)	50	1	2

3 讨论

目前,世界范围内已报道190多种G6PD基因突变类型,中国人群中报道发现30多种^[5],几乎所有的突变都位于G6PD基因的编码区,且绝大部分为单个碱基置换的错义突变,但是仍有一些病例无法从经典的分子病理学知识中得到解答。

1989年,研究员^[10]发现G6PD c.1311C>T突变是一个同义突变,不会造成G6PD氨基酸的替换,常与其它突变共存,在欧洲人中G6PD地中海型c.563 C>T突变伴发c.1311C>T,日本人中G6PD c.1264G>A伴发c.1311C>T。于国龙等^[10]对广东省G6PD缺乏症的研究中发现,广东的G6PD缺乏症患者c.1311C>T突变常伴发IVS-11 93T>C突变,推测由于c.1311C>T和IVS-11 93T>C 2个位点相距较近,可能导致核内不均一RNA(heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)在形成成熟的mRNA

过程中,核内的小核RNA (small nuclear RNA, snRNA)与11内含子的结合引起构象改变致使剪切位点改变,从而引起G6PD酶活性降低。我们在临床研究发现,粤东地区的G6PD缺乏病例中c.1311C>T和IVS-11 93T>C这2种静止突变也常同时出现,而这种病例并没有发现其它外显子的突变。

国外有研究者对马来西亚原住民人群Negrito的G6PD缺乏者的分子机制进行研究,在这些病例中发现了G6PD基因3'-UTR 3个位点的单核苷酸多态性(SNPs),包括rs112950723、rs111485003和rs1050757,单倍型c.1311C>T/IVS-11 93T>C与rs1050757G强相关,推论rs1050757通过影响mRNA的稳定性和转录或者miRNA的调节过程,导致G6PD mRNA降解发生变化,从而致使G6PD缺乏^[4]。我们推测中国人群中携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变的G6PD缺乏者也可能连锁有SNP位点的变异,因此,我们将在广东、广西收集的39例携带有c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变的G6PD缺乏标本作为研究对象,针对3'-UTR和5'-UTR的SNP位点设计引物并进行PCR扩增、测序。通过检测,39例携带c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变基因的G6PD缺乏者没有检测到UTR SNP位点的变异。c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变基因3'端rs1050757位点A到G转变在马来西亚原住民人群Negrito中导致酶缺乏有可能局限于本地,与Negrito系东南亚古老居民,长期相对封闭的原始生活环境有关。

c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变在G6PD正常和缺乏的样本中均存在,在中国人群G6PD缺乏症患者中c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变的发生率约为5.1%~11.1%,在G6PD正常人群的发生率约为9.4%~18.4%^[6]。王颖等^[7]对海南黎族人群的研究中发现,在海南黎族男性G6PD缺乏和正常组中c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变发生频率分别为6.0%和24%。何永蜀等^[5]研究显示云南彝族G6PD缺乏症患者和健康对照组c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变频率分别为18.3%和29.9%。我们此次在潮州和梅州G6PD正常人群中检测出的c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变的发生率分别为15%和12%,与以往文献的研究基本一致,由此可见c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变在粤东地区正常人群中普遍存在。多年来,我国学者对于G6PD缺乏

症的研究大多来自南方各省,北方正常人群中是否也存在c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变没有文献报道。我们收集了石家庄、郑州各50名健康人群样本进行检测,发现4例c.1311C>T/IVS-11 93T>C突变基因,由此可见该突变点在北方正常人群中也存在,只是发生率明显降低。

c.1311C>T/IVS-11 93T>C为一古老突变,它可能在长期的群体传递过程中与其它G6PD突变基因发生交叉,我们认为不完全排除该突变点多态性变异与酶缺陷有关的可能,粤东地区c.1311C>T/IVS-11 93T>C基因突变的G6PD缺乏样本是否还受其他影响酶活性表达的基因调控?我们将对此进一步研究和分析。

参考文献

- [1] Sukumar S, Mukherjee MB, Colah RB. Two distinct Indian G6PD variants G6PD mnagar and G6PD Rohini caused by the same 949 G-->A mutation [J]. Blood Cells Mol Dis, 2005, 35(2): 193-195.
- [2] Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency [J]. Am Fam Physician, 2005, 72(7): 1277-1282.
- [3] Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype - phenotype association [J]. Blood Rev, 2007, 21(5): 267-283.
- [4] Amini F, Ismail E. 3'-UTR variations and G6PD deficiency [J]. J Hum Genet, 2013, 58(4): 189-194.
- [5] 何永蜀,李清,杨芳,等. 云南彝族人群 G6PD 基因 C1311T 突变及单体型研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(18): 16-20.
- [6] 蔡稔,朱东林,梁昕,等. 广西地区 G6PD 缺乏基因型与表型关系的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(12): 17-19.
- [7] 王颖,杜杰,蔡望伟. 海南黎族人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 C1311T 多态性分析 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(6): 722-724.
- [8] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 第3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 175-178.
- [9] Yang H, Wang Q, Zheng L. Incidence and molecular characterization of Glucose - 6 - Phosphate Dehydrogenase deficiency among neonates for newborn screening in Chaozhou, China [J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37(3): 410-419.
- [10] 于国龙,蒋玮莹,杜传书,等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 cDNA 1311 C→T 复合 11 内含子 93T→C 突变 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25: 610-612.

· 论 著 ·

应用微阵列比较基因组杂交技术检测乳腺癌患者共有拷贝数变异的初步研究

周慧¹ 何丹² 杨学习¹ 李粉霞^{2*}

【摘要】目的 探讨乳腺癌患者基因组中共有的拷贝数变异与乳腺癌发生发展的关系,为乳腺癌的预防、治疗和预后提供基本依据。**方法** 使用微阵列比较基因组杂交技术检测样本基因组DNA的拷贝数变异。将得到的拷贝数变异在人类基因组变异数据库和孟德尔遗传数据库进行变异分析,寻找样本共有的拷贝数变异并分析其与乳腺癌的关系。**结果** 发现1q21、8p11、8p12、8q11、14q32、14q32.33(其中包含2个片段),20q13和22q11共9个共有拷贝数变异,其中4个拷贝数变异通过人类基因组变异数据库证实为正常多态性拷贝数变异。有5个拷贝数变异在人类基因组变异数据库中不存在相似片段并且在孟德尔遗传数据库中有致病基因,包括4个扩增片段和1个缺失片段。**结论** 1q21.1q42.2、8q21.12q23.3和20q13.2q13.31 3个片段的扩增及8p12p11.23的缺失与乳腺癌的发生和发展有一定联系,但8q11.22q11.23的扩增与乳腺癌的发生、发展的相关性尚有待于进一步验证。

【关键词】 乳腺癌;拷贝数变异;微阵列比较基因组杂交

Preliminary study of common copy number variations of breast cancer patients detected by array-based comparative genomic hybridization technology

ZHOU Hui¹, HE Dan², YANG Xuexi¹, LI Fenxia^{2*}

(1. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515;

2. Guangzhou Darui Biotechnology Co. LTD, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

[ABSTRACT] Objective To explore associations between the common copy number variations (CNVs) in breast cancer patients and the occurrence and development of breast cancer, which may provide the foundation to study the prevention, treatment and prognosis of breast cancer. **Methods** CNVs of genomic DNA were obtained by array-based comparative genomic hybridization techniques. Then the CNVs were analyzed in terms of the Database of Genomic Variants and Online Mendelian Inheritance in Man, revealing a relationship between common CNVs and breast cancer. **Results** In 4 breast cancer samples, 9 common copy number variations 1q21, 8p11, 8p12, 8q11, 14q32, 14q32.33(including 2 CNVs), 20q13 and 22q11 were selected out. And 4 of them were confirmed as normal polymorphism copy number variations. While the remaining 5 CNVs were, including 4 amplification and 1 loss, could not be identified through the Database of Genomic Variants and Online Mendelian Inheritance in Man. **Conclusion** Amplified 1q21.1q42.2, 8q21.12q23.3, 20q13.2q13.31 and loss of 8p12p11.23 may be associated with the occurrence and development of breast cancer. The connections between amplifications of 8q11.22 q11.23 and breast cancer still needs further verification.

[KEY WORDS] Breast cancer; Copy number variation; Array-based comparative genomichybridization

基金项目:国家自然科学基金(81302327);广州市科技计划攻关项目(2060404)

作者单位:1.南方医科大学生物技术学院,广东,广州 510515

2.广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

*通讯作者:李粉霞, E-mail: lifenxia123@gmail.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球呈明显的上升趋势,严重危害着广大妇女的身体健康。尽管我国女性乳腺癌总体发病率在世界范围处于中低水平^[1],但随着工业化的发展、人们生活方式的变化,乳腺癌总发病率在不断提高,特别是在较发达城市如北京、上海、天津、广州等,乳腺癌已成为妇女发病率最高的恶性肿瘤^[2]。据世界卫生组织国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)统计,2008年中国女性乳腺癌标化发病率为21.6/100 000,在全球184个有统计资料的国家中位列第99位,标化死亡率为5.7/100 000,位列第145位,均显著低于世界平均水平^[2]。但是由于人口基数大,却占世界新诊断乳腺癌的12.2%,死亡例数占世界乳腺癌死亡人数的9.6%^[3]。如何进行早期预防并降低乳腺癌发病率已经成为乳腺肿瘤研究中的重大现实课题。

乳腺癌是一种遗传异质性肿瘤,临床上根据免疫组化检测*ER*、*PR*、*HER2*和*Ki67*的结果,将乳腺癌划分为Luminal A型、Luminal B型、*HER-2*阳性和三阴性乳腺癌。各亚型与乳腺癌的疾病转归、患者预后和治疗反应密切相关。不同亚型的乳腺癌在总生存期和无复发生存期上存在显著差异,其中Luminal A型的预后较好,而三阴性乳腺癌的预后较差。但目前临床上免疫组化检测没有统一的检测和评估规范,很难确切的进行分子分型。早在2000年,Perou等^[4]就尝试采用基因芯片的方式将乳腺癌分成不同的亚型。根据基因表达谱,可以把乳腺癌分为Luminal A型、Luminal B型、*HER-2*阳性和基底样乳腺癌。其中大部分基底样乳腺癌是三阴性乳腺癌。基于芯片表达谱的分子分型更易进行标准化检测和评估。除此以外,芯片还可以检测到其他癌基因或者抑癌基因的拷贝数变异(copy number variation, CNVs)。这些在人类基因组中广泛存在的缺失、插入、重复和复杂位点的变异,长度为1 kb以上,其突变率远高于单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)。这些特异的变异可以成为潜在的治疗靶标。例如,*AKT1*和*FGFR1*在乳腺癌变异和扩增的频率分别为4%和10%,对特定的抑制剂靶向治疗敏感^[5-6]。对这些靶向变异位点的扫描可以帮助我们找到靶向治疗的特定受益人群。微阵列比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybrid-

ization, aCGH)用DNA探针取代了细胞中期染色体,可以检测基因组DNA在相应的序列或基因上的拷贝数变异^[7],一次检测相当于对基因组同时进行了成千上万个独立的荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)。然而,aCGH无法检测不导致CNVs的染色体畸变,如点突变、平衡易位和倒位等^[7]。Pollack^[8]用aCGH的方法在乳腺癌中不仅证实了比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)探测到的17q和20q上的扩增区域,而且新发现了1q、8q、11q和15q扩增区域,3p、6q、9p、10q和Xq缺失区域^[9]。这些片段上含有很多与乳腺癌相关的基因。

本实验拟用aCGH检测中国人群乳腺癌患者的全基因组DNA,寻找与分析乳腺癌共有的CNVs并探讨这些CNVs与中国人群乳腺癌发生发展的关系,期望为乳腺癌的预防、治疗和预后提供基本检测方法和依据。

1 材料和方法

1.1 病例资料

样本为南方医科大学南方医院乳腺中心收治的4名汉族女性患者,年龄分别为40岁、57岁、56岁、59岁,平均年龄为53岁。样本均为左侧乳腺浸润性导管癌,根据乳腺癌淋巴结转移(tumor node metastasis, TNM)分期,原发肿瘤体积不大于5 cm,除3号样本无区域淋巴结转移之外,其他均有一定程度区域淋巴结侵犯。所有样本均无远处转移。

1.2 芯片检测共有CNVs

安捷伦aCGH试剂盒购自美国Agilent公司,1×TE (pH 8.0)、Molecular grade来自美国Promega公司,SureScan Microarray Scanner、Hybridization Oven、CytoGenomix和CytoGenomics Edition分析软件来自美国Agilent公司。

使用QIAamp DNA Mini Kit提取组织中的基因组DNA,用Thermo NanoDrop2000C紫外/可见分光光度计测量提取DNA的浓度和纯度。要求 $2.0>260/280>1.8$, $260/230>1.0$ 。分别取0.5 μg样本DNA量和reference量到反应管中,加水至13 μL。加入随机引物2.5 μL,然后进行片段化和单链化。随后冰上配制Cy3和Cy5 2种染料的标记混合液,每管加入9.5 μL的标记控制混合液后孵

育标记。用纯化柱子对标记后的 DNA 进行纯化,然后使用 NanoDrop 2000 UV-VIS 分光光度计来检测并计算产量与比活度。制备 Hybridization Master Mix,将标记的被测和对照样品混匀加 29 μL 到每管混合物后孵育。使垫圈滑片和杂交室底部磨合和对齐,将杂交样本混合液 40 μL 放在垫圈的中央,放上有活性的芯片,后封闭杂交室。将杂交室放入杂交箱,配平,20 rpm,67 $^{\circ}\text{C}$,24 h。从杂交箱拿出杂交盒,取出芯片进行洗涤。

1.3 芯片扫描和数据分析

芯片用 SureScan Microarray Scanner 进行扫描,用 Agilent CytoGenomics Edition 进行分析得到 CNVs。得到所有样本全部 CNVs 后,筛选 4 例样本共有 CNVs,通过查询 DGV (database of genomic variants) 数据库、线上《人类孟德尔遗传》(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库和查找相关文献对实验所得片段进行研究。

2 结果

2.1 乳腺癌共有 CNVs

4 个乳腺癌样本共发现 CNVs 总数为 295 个,其中 2 号样本有 82 个,1 号、3 号和 4 号样本均为 71 个(图 1)。发现 9 个共有 CNVs,包括 2 个纯和扩增(8p11.23p11.22 和 22q11.22),6 个杂合扩增(1q21.1q42.2,8q11.22q11.23,8q21.12q23.3,14q32.33 中的 2 个片段和 20q13.2q13.31)和 1 个杂合缺失(8p12p11.23),片段变异范围为 117 kb~84 684 kb,包含基因个数为 1 个~152 个基因。

2.2 数据库查找结果

通过查询 DGV 数据库、OMIM 数据库和相关文献检索对实验所得片段进行分析。在发现的 9 个共有 CNVs 中,4 个共有 CNVs 为正常多态性 CNVs,为无关 CNVs;5 个共有 CNVs 是致病性 CNV,包括 1q21.1q42.2、8q11.22q11.23、8q21.12q23.3、20q13.2q13.31 这 4 个片段的扩增和 8p12p11.23 的缺失(表 1)。

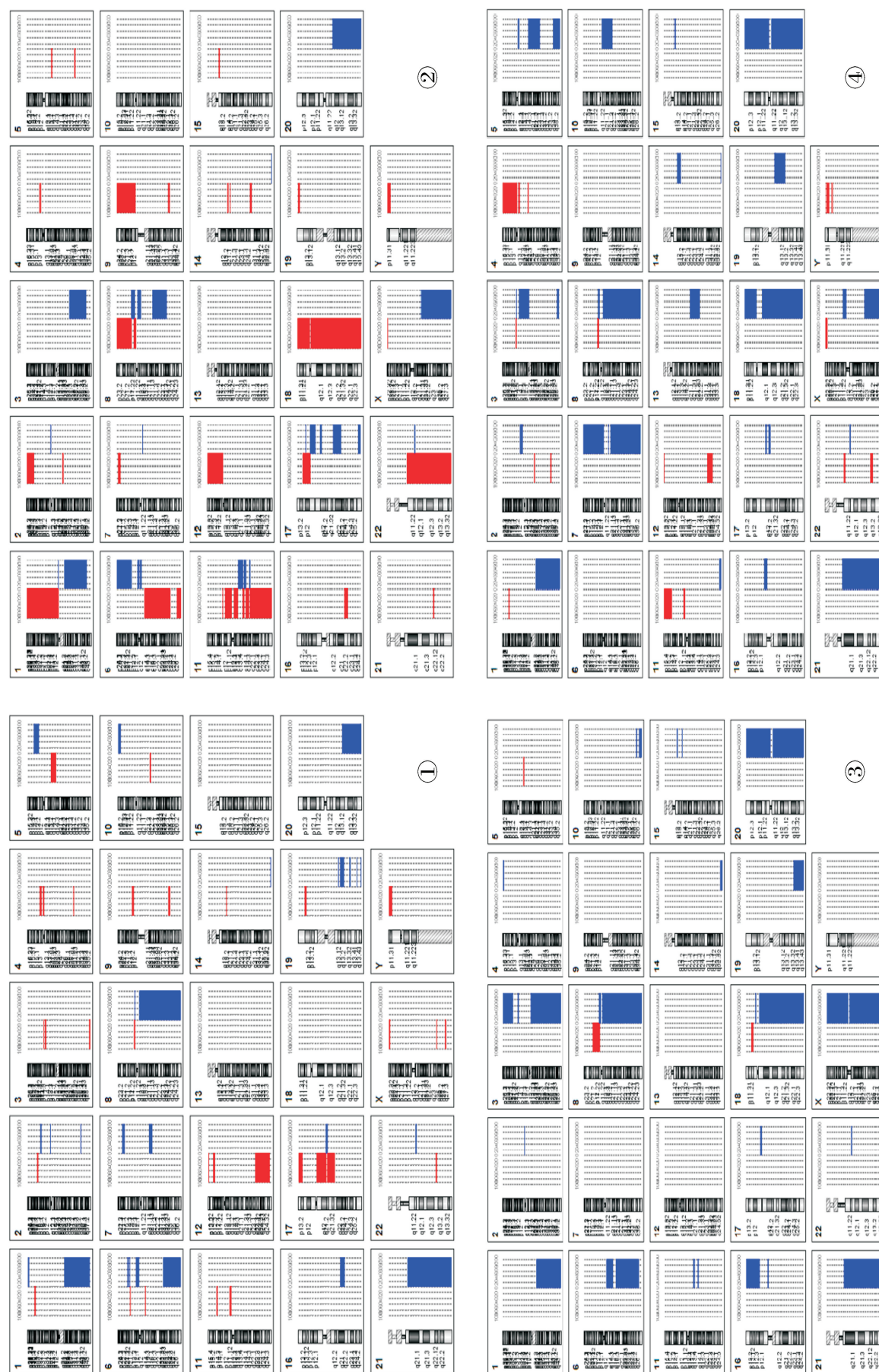
3 讨论

随着乳腺癌发病率的持续增长,人们对乳腺癌发生发展机制的研究愈发迫切。在众多发病因素当中,基因拷贝数的变异是重要致病因素之一,通过对基因拷贝数的检测可了解基因状态以及研

究一些未知的机制。本实验用 aCGH 的方法一次检测整个基因组基因的拷贝数变异,得到整个基因组所有的拷贝数变异片段后,寻找 4 个样本共有的 CNVs,通过数据库查询和利用收集的资料对这些片段进行分析。

实验结果发现 4 例样本的共有 CNVs 9 个,其中:8p11.23p11.22、14q32.33 中的 2 个片段和 22q11.22 在 DGV 数据库中存在相似片段,是正常多态性 CNVs,可判断为无关 CNVs。在 DGV 数据库中没有相似片段的 CNVs 有 1q21.1q42.2、8q11.22q11.23、8q21.12q23.3、20q13.2q13.31 这 4 个片段的扩增和 8p12p11.23 的缺失,共 5 个 CNVs,并且所有这些片段在 OMIM 数据库中都存在致病基因。

片段 1q21.1q42.2 里共包含的基因有 572 个,其中包括了 3 个 1qETS(*E-twenty six*)家族。ETS 是转录因子家族中的最大的家族之一,是后生动物所特有的。ETS 家族有很多功能,包括细胞分化的调控、细胞周期的调控、细胞迁移、细胞增殖、细胞凋亡、血管生成等。许多 ETS 都被证实与癌症有关,基因拷贝数增加是一种致癌基因激活的替代机制。经研究表明,在乳腺癌当中,1q 扩增是最常见的拷贝数变异^[10]。Mesquita 等^[10]通过染色体 CGH 评估 141 乳腺癌全基因组拷贝数变异,显示 1q21 和 1q32 是 2 个基因拷贝数增加最频繁的染色体带。他们通过 FISH 证实了 1q 扩增,展示了基因拷贝数增加的 ETS 基因:ETV3(位于 1q21q23),ELF3 和 ELK4(两者都位于 1q32)。用实时定量 PCR 评估 3 个 1qETS 基因表达水平以及其靶基因 MYC 和 CRISP3,展示乳腺癌 1q21 和 1q32 的基因拷贝数扩增与 ETS 转录因子 ETV3 和 ELF3 在这些位点过表达有关。3 个 ETS 基因中,ELF3 与乳腺癌发生相关,可能是导致 1q 拷贝数增加的效应因子^[10]。利用包括 CGH 的传统细胞学技术,可以识别乳腺癌细胞系和肿瘤的拷贝数变异常发生的区域。这些 CNVs 当中,包含已知的或候选的癌基因、一些肿瘤抑制基因以及相关基因,如 1q、8q22 的扩增和 8p 的缺失^[8]。Yang 等^[11]研究也表明在乳腺癌中发现 8q24、20q13、11q12 和 8p12-p11 基因区域扩增。绝大多数的乳腺癌(80%)1q、8q 单独扩增或两者兼而有之,也可能出现 3 种变化(+1q,+8q 或-13q),占肿瘤的 91%^[12]。本实验所得到的共有 CNV 中,8p12p11.23 的缺失和 8q21.12q23.3



红色为缺失片段,蓝色代表重复片段
图1 乳腺癌样本全基因组范围内 CNV 分布图
Figure 1 The CNVs distribution of breast cancer samples in the genome-wide

表 1 乳腺癌样本共有 CNVs
Table 1 The common CNVs in the breast cancer samples

染色体区段	大小(kb)	变异类型	基因数(个)	DGV 中是否存在	OMIM 中是否致病	判断 CNV 类型
1q21.1q42.2	84684	重复	572	否	是	致病性 CNV
8p12p11.23	1019	缺失	27	否	是	致病性 CNV
8p11.23p11.22	127	重复	2	是	-	正常多态性 CNV
8q11.22q11.23	4069	重复	18	否	是	致病性 CNV
8q21.12q23.3	33414	重复	138	否	是	致病性 CNV
14q32.33	117	重复	2	是	-	正常多态性 CNV
14q32.33	293	重复	2	是	-	正常多态性 CNV
20q13.2q13.31	18488	重复	18	否	是	致病性 CNV
22q11.22	134	重复	1	是	-	正常多态性 CNV

“-”情况不详

的扩增与以上研究报道的结果一致,因此我们推断这 2 个片段的拷贝数变异与乳腺癌的发生发展有关。

在目前报道的拷贝数变异与乳腺癌相关关系的研究中,较少提及 8q11.22q11.23 片段。但我们查找 OMIM 数据库发现这个片段内有一个致病基因存在:视网膜母细胞瘤基因 1 诱导卷曲蛋白(*RB1-inducible coiled-coil 1, RB1CC1*) 基因。*RB1CC1* 基因作用在细胞周期进程,和 *TSC1-TSC2* 形成肿瘤抑制复合体。*RB1CC1* 可能是 *RB1* 表达的上游调节器,在乳腺癌中是一个抑癌基因,它的纯合失活可能参与乳腺癌肿瘤发生^[13]。Chano 等^[13]研究发现,20%的原发性乳腺癌中检测到 *RB1CC1* 基因存在突变。在有 *RB1CC1* 突变的癌症患者中,野生型 *RB1CC1* 和 *RB1* 缺失或少于正常,在没有发生该类突变的癌症患者中却比较富余^[13]。因此我们推测实验样本中 *RB1CC1* 基因未发生突变,野生型 *RB1CC1* 比正常多。所以片段 8q11.22q11.23 的扩增与乳腺癌发生发展也许有一定关系,具体关系的阐明有待进一步研究。

实验得到的 20q13.2q13.31 片段中包含 18 个基因,其中包含了锌指蛋白 217(*zinc finger protein 217, ZNF217*) 基因。*ZNF217* 编码选择性剪接 Kruppel 样 DNA 转录因子、DNA 结合域组成成分和脯氨酸转录激活结构域,被普遍认为是参与乳腺癌肿瘤发生的癌基因。锌指蛋白是一类具有手指状结构域的转录因子,由于其自身的结构特点,

可以选择性的结合特异的靶结构,使锌指蛋白在转录和翻译水平上调控基因的表达,在细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。当 *ZNF217* 过表达时能使人乳腺表皮细胞无限增殖。

20q13.2 区域的扩增是乳腺癌的一个早期事件,与侵略性的肿瘤行为、永生化和基因组不稳定性有关^[14]。用 CGH 的方法检测到的 20 号染色体长臂的扩增,共有出现在浸润性导管癌(*invasive ductal carcinoma, IDC*)和淋巴结转移中^[15]。Werner 等^[14]人的研究首次描述了一个扩增的染色体区域 20q13,这个片段里包含公认的致癌基因出现在管内增生(*intraduct hyperplasia, IH*)的进程中。在同样本中非典型导管增生(*atypical duct hyperplasia, ADH*)、原位管癌(*ductal carcinoma in situ, DCIS*)和浸润性导管癌(*invasive ductal carcinoma, IDC*)中也出现 20q13 扩增,暗示 IH 和 IDC 的相关联系^[14]。20q13.2 区域的扩增可能会刺激正常上皮以加速细胞增殖和导管增生,加上基因变化,包括 20 q13.2 从低扩增向高扩增的转换,从而促进肿瘤形成,即 20q13 扩增促进从肿瘤初期(IH)到后阶段(DCIS, IDC)的致癌作用^[14]。本实验的样本全取自左侧乳腺浸润性导管癌患者的癌组织,扫描后所得结果显示 20q13 扩增出现频率为 100%。

通过芯片扫描结果、数据库查询和相关文献检索,1q21.1q42.2、8q21.12q23.3、20q13.2q13.31 这 3 个片段的扩增以及 8p12p11.23 的缺失与乳腺癌的发生和发展可能有一定联系,8q11.22q11.23 的

扩增与乳腺癌发生发展的关系尚有待一进一步验证。由于本研究样品较少,后续需要加大样本量对结果进行验证。

参考文献

- [1] 黄哲宙,陈万青,吴春晓,等.中国女性乳腺癌的发病和死亡现状——全国32个肿瘤登记点2003–2007年资料分析报告[J].肿瘤,2012,32(6):435–439.
- [2] 郑莹,吴春晓,张敏璐.乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J].中国癌症杂志,2013,18(8):561–569.
- [3] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China [J]. The Lancet Oncology, 2014, 15 (7) : e279–289.
- [4] Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours [J]. Nature, 2000, 406 (6797):747–752.
- [5] carpten JD, Faber AL, Horn C, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer [J]. Nature, 2007, 448 (7152):439–444.
- [6] Andre F, Bachelot T, Campone M, et al. Targeting EGFR with dovinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19 (13):3693–3702.
- [7] 张艳亮,涂植光,戴勇.微阵列比较基因组杂交技术及其在遗传性疾病中的应用[J].中华检验医学杂志,2009,32(10):1188–1190.
- [8] Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99 (20):12963–12968.
- [9] 吴英娟,孟令新.array-CGH技术及其在肿瘤学中的应用和意义[J].实用肿瘤学杂志,2004,19(5):389–392.
- [10] Mesquita B, Lopes P, Rodrigues A, et al. Frequent copy number gains at 1q21 and 1q32 are associated with overexpression of the ETS transcription factors ETV3 and ELF3 in breast cancer irrespective of molecular subtypes [J]. Breast cancer research and treatment, 2013, 138(1):37–45.
- [11] Yang ZQ, Streicher KL, Ray ME, et al. Multiple interacting oncogenes on the 8p11–p12 amplicon in human breast cancer [J]. Cancer research, 2006, 66 (24) : 11632–11643.
- [12] Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, et al. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH [J]. Genes, Chromosomes & Cancer, 1998, 21 (3) : 177–184.
- [13] Chano T, Kontani K, Teramoto K, et al. Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer [J]. Nature genetics, 2002, 31(3):285–288.
- [14] Werner M, Mattis A, Aubele M, et al. 20q13.2 amplification in intraductal hyperplasia adjacent to in situ and invasive ductal carcinoma of the breast [J]. VirchowsArchiv, 1999, 435(5):469–472.
- [15] Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, et al. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization [J]. Cancer genetics and cytogenetics, 1999, 110(2):94–102.

· 论 著 ·

高效 hCu, Zn-SOD-PTD 融合蛋白的表达及其穿膜功能的研究

王晓勋^{1*} 杞少华¹ 李瑞明² 梁清乐¹

[摘要] **目的** 探讨 hCu, Zn-SOD-PTD 融合蛋白的表达及其穿膜功能。 **方法** 首先,人工设计合成蛋白转导域序列(protein transduction domain, PTD),以人胚肝组织的总 RNA 为模板,逆转录扩增得人铜锌超氧化物歧化酶全长 cDNA 序列。其次,将此序列及人工合成 PTD 序列定向插入 pET16b 载体;测序鉴定后,将构建成功的重组载体导入 *E. coli* BL21 菌株,异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)诱导表达,经镍柱纯化,洗脱液经 SDS-PAGE 检测。最后,将纯化产物与食管癌细胞(EC9706)共孵育,用激光共聚焦和流式细胞仪的方法检测蛋白穿膜能力及活性。 **结果** 测序结果与人铜锌超氧化物歧化酶全长 cDNA 序列相符;SDS-PAGE 结果出现 18.6 kd 和 20 kd 的目的条带;激光共聚焦和流式细胞仪的方法显示蛋白可穿膜且保持活性。 **结论** 本实验成功构建了 PET16b/hCu, Zn-SOD-PTD 原核表达质粒,可在大肠杆菌中稳定表达融合蛋白,融合蛋白具有穿膜且保持活性。

[关键词] 蛋白转导域;人铜锌超氧化物歧化酶;生物膜;原核表达载体;内化作用

Study on expression and trans-membrane activity of human Cu, Zn-SOD-PTD

WANG Xiaoxun^{1*}, QI Shaohua¹, LI Ruiming², LIANG Qingle¹

(1. Inspection Department of Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, 442000;

2. Biomedical Institute of Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, 442000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the expression and trans-membrane activity of human Cu, Zn-SOD-PTD. **Methods** First, protein transduction domain (PTD) sequence was designed and synthesized. Human Cu, Zn-SOD was amplified by reverse transcription PCR using the complete RNA of human embryonic liver as a template. Second, hCu, Zn-SOD gene and PTD sequence were inserted into pET16b plasmid. Then the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 after sequencing identification. After being induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG), the fusion proteins were purified by nitrilotriacetic acid sepharose and the results were determined by SDS-PAGE. Third, the fusion proteins were co-cultured with the EC9706 cells and the trans-membrane activity was tested by laser scanning confocal microscopy and flow cytometer. **Results** The sequencing results were consistent with the full length cDNA sequence of hCu, Zn-SOD, and the results of SDS-PAGE showed 18.6 kd and 20 kd bands. The results of laser scanning confocal microscopy and flow cytometer showed that the fusion proteins could be transduced into EC9706 cells and were enzymatically active. **Conclusion** Recombinant PET16b plasmids containing hCu, Zn-SOD-PTD gene were constructed successfully and fusion hCu, Zn-SOD-PTD proteins could be transduced into the cell membrane efficiently without the loss of enzymatic activity.

[KEY WORDS] Protein transduction domain (PTD); Human Cu, Zn-SOD; Biomembrane; Prokaryotic expression vector; Internalization

基金项目:国家自然科学基金(81171783)

作者单位:1. 湖北医药学院附属太和医院检验部,湖北十堰 442000

2. 湖北医药学院附属太和医院生物医学研究所,湖北十堰 442000

*通讯作者:王晓勋, E-mail:524910@qq.com

人铜锌超氧化物歧化酶(human Cu/Zn-superoxide dismutase, hCu, Zn-SOD)是人体内清除超氧阴离子自由基的专一高效的酶类,能保护细胞和组织免受氧应激反应的损伤,具有抗衰老、抗辐射、抗癌和抗炎作用。但是人铜锌超氧化物歧化酶属于大分子蛋白,在哺乳动物细胞膜和皮肤上没有专一受体^[1],所以外源性的人铜锌超氧化物歧化酶难以进入细胞和组织内发挥生物学作用,限制了其在疾病预防、治疗或美容等多领域的应用。

蛋白转导现象的发现为外源性人铜锌超氧化物歧化酶的临床应用开拓了广泛的前景。此现象最初在对人类免疫缺陷型病毒的 HIV-1 反式激活蛋白研究中发现。1988, Green 等^[2-3]首次报道了 HIV-1 的反式激活蛋白 TAT 具有内化功能。从 HIV-1 病毒体内分离的 TAT 调控基因编码 32 个~57 个氨基酸的中心区域和碱性氨基酸富集区可以有效地穿越细胞膜。随后发现, TAT 蛋白真正具有转导作用的是其序列中的 47~57 这 11 个氨基酸残基,称之为蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)^[4]。进一步研究发现蛋白转导结构域不仅存在于 HIV-1 反式激活蛋白中,如单纯疱疹病毒和果蝇 VP22 转录因子的同源框转录蛋白触足的研究中也发现有富含精氨酸残基 PTD 序列^[5]。近年来随着生物信息技术和 PTD 跨膜转运机制研究的发展,许多国内外研究者对人工设计比天然 PTD 具有更高转导效率的蛋白转导活性肽进行了探索。由国外科学家设计的 9 个精氨酸或 9 个赖氨酸残基构成的基序,显示出了比 TAT 更强的蛋白转导活性^[6];研究人员通过优化空间结构和表面的电子分布也设计出了多种具有更强跨膜活性的蛋白转导域^[7]。随着对 PTD 分子作用机制深入,人们利用此项技术合成更多具有穿膜活性的融合蛋白分子来解决大分子蛋白不能跨越生物膜来发挥其生物活性这一难题^[5, 7-10]。本文依据上述文献中的原理、参考文献设计出高效蛋白质转导域用于本实验。

本研究旨在构建具有高效转导域的 PET16b/hCu, Zn-SOD-PTD 原核表达载体,在大肠杆菌表达、制备和纯化蛋白 hCu, Zn-SOD-PTD 融合蛋白,并检测目的蛋白穿透哺乳动物细胞的能力,为外源性的人铜锌超氧化物歧化酶的临床应用奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种、细胞和动物

PGEM-T 载体购自美国 Promaga 公司;pET-16b、*E. coli* BL21(DE3)购于德国 Novagen 公司;食管癌细胞株(EC9706)、JM109 菌株皆由太和医院生命科学研究所保存。

1.1.2 主要试剂

Trazol 试剂购自美国 Gibicol 公司;逆转录试剂盒购自芬兰 Finnzymes 公司;限制性内切酶购自美国 New England 公司;T4 连接酶、高保真 Taq 酶、普通 Taq 酶购自美国 Stratagene 公司;质粒提取试剂盒与胶回收纯化试剂盒购自美国 Promaga 公司;荧光探针 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)购自上海碧云天生物技术有限公司;异丙基-β-d-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-d-thiogalactoside, IPTG)购自荷兰 Duchefa 公司;兔抗组氨酸抗体购自美国 Sigma 公司;层析柱购自德国 Qiagen 公司;其余试剂均进口或国产分析纯级。

1.1.3 PCR 引物

从 GenBank 中查取序列号为 X02317^[1]的人铜锌 SOD 全长编码序列(coding sequence, CDS)设计扩增人铜锌 SOD 全长 CDS 引物,引物 1:5'-CCGCTC GAGGCGACGAAGGCCGTGTGCGTG-3'(含 XhoI 酶切位点),引物 2:5'-CGGGATCCTATTATTGGG CGATCCCAATTAC-3'(含 BamHI 酶切位点);PTD 的寡核苷酸序列为:5'-TATGACCTATGCGCGT GCGGCAGCGCGTCAGGCTCGTGCCC-3', 5'-TC GAGGGGCACGAGCCTGACGCGCTGCCGCACG CGCATAGGTCA-3'(含 NdeI、XhoI 限制性内切酶位点)。以上序列均委托上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PTD 序列的设计

根据 PTD 多肽跨膜结构域的特点,并参考文献^[7-9],利用软件设计具有高效跨膜活性的蛋白结构域:YARAAARQARAL,并设计简并寡核苷酸序列:5'-TATGACCTATGCGCGTGCGGCAGCGC GTCAGGCTCGTGCCC-3', 5'-TCGAGGGGCAC GAGCCTGACGCGCTGCCGCACGCGCATAGGT CA-3'。

1.2.2 人铜锌SOD全长cDNA序列的获得及鉴定

提取人胚胎肝脏组织的总RNA,以其为模板用于人铜锌SOD全长CDS的逆向转录和扩增,将获得的人铜锌SOD全长CDS片段,加腺嘌呤(A)处理纯化后插PGEM-T载体,以获得PGEM-hCu/Zn-SOD克隆载体。

1.2.3 PET/hCu, Zn-SOD原核表达载体的构建

用限制性内切酶 *XhoI*、*BamHI* 双酶切上面获得的pGEM-hCu/Zn-SOD载体,获得两端带有粘性末端的双链全长hCu/Zn-SOD CDS片段,同时用同样的酶对pET-16b空载体进行双酶切。胶回收两端带有粘性末端的线性载体及hCu/Zn-SOD全长CDS片段,将hCu/Zn-SOD CDS片段定向插入经酶切回收的大片段PET-16b空载体,以获得PET/hCu, Zn-SOD原核表达载体。

1.2.4 PET/hCu, Zn-SOD-PTD原核表达载体的构建

对上述获得的PET/hCu, Zn-SOD原核表达载体用限制性内切酶 *NdeI*、*XhoI* 进行特异性酶切,胶回收获得胶回收两端带有粘性末端的线性载体。对根据PTD设计的2条简并寡核苷酸序列进行高特异性退火杂交,选择逐渐降温的实验方法获得人工合成的两端带有 *NdeI*、*XhoI* 限制性内切酶粘性末端的小片段简并双链DNA序列,插入PET-16b上述线性载体,以获得PET/hCu, Zn-SOD-PTD原核表达载体。用T7引物对载体克隆域测序,测序结果与GENEBANK X02317 CDS进行比对,鉴定插入片段与上叙片段的一致性。

1.2.5 目的蛋白的诱导表达与纯化

PET-hCu, Zn-SOD原核表达载体与PET-PTD-hCu, Zn-SOD原核表达载体分别导入感受态 *E.coli* BL21(DE3)中,挑选阳性克隆至50 mL含氨苄青霉素(100 mg/L)的Luria-Bertani培养液中(LB培养基),于37℃扩增培养。当细菌生长至OD₆₀₀为0.6时,加入0.1 mol/L IPTG至终浓度1 mmol/L,置25℃诱导培养过夜。然后收集菌体,超声裂菌,获得上清。把上清缓慢通过Ni²⁺亲和层析柱对目的蛋白进行纯化,分别得到His-Tag-hCu, Zn-SOD和His-Tag-hCu, Zn-SOD-PTD 2种融合蛋白,纯化蛋白经SDS-PAGE鉴定。蛋白定量后,储存于70℃冰箱内。

1.2.6 hCu, Zn-SOD-PTD蛋白穿透细胞膜能力实验

EC9706细胞用含10%小牛血清(fetal bovine

serum, FBS)的RPMI 1640培养液(添加链霉素和青霉素的终浓度均为1 000 U/mL)于5% CO₂、37℃培养。细胞接种于6孔板中,在含10% FBS的1640培养基中培养48 h后,再在6孔中分别加入2 mmol/L的hCu, Zn-SOD 20 μL, 2 mmol/L的hCu, Zn-SOD-PTD 5 μL、10 μL、15 μL、20 μL及不含血清的1640培养基20 μL, 37℃放置15 min后,每孔各加入荧光探针DCFH-DA作用5 min,然后用PBS洗涤3次,立即置于荧光相差显微镜观察结果,或胰酶消化后悬浮于PBS中进行流式细胞荧光检测。

1.2.7 统计学方法

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用Graph-Pad Prism 5的单因素方差分析(one way ANOVA),比较多个样本组份的均数, $P < 0.05$ 认为有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 重组PET/hCu, Zn-SOD-PTD原核表达载体的构建及鉴定

PET/hCu, Zn-SOD-PTD载体克隆区经T7引物测序部分结果见图1,结果显示插入片段与上述GENEBANK X02317 CDS片段一致、未发现变异。重组原核表达载体的鉴定中,hCu, Zn-SOD-PTD质粒经 *NdeI*/BamH双酶切后电泳图见图2。

2.2 表达后细菌的蛋白提取物和融合蛋白纯化后的SDS-Page分析

PET/hCu, Zn-SOD-PTD和PET/hCu, Zn-SOD重组质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3)后,在IPTG诱导下产生目的融合蛋白,目的蛋白再经镍柱纯化。以融合蛋白纯化后产物进行SDS-PAGE分析,结果显示分别在18.6 kd和20 kd出现目标表达条带,与hCu, Zn-SOD-PTD和hCu, Zn-SOD融合蛋白的分子量相符,结果见图3。SDS-PAGE的结果表明本实验所构建的原核表达载体在大肠杆菌中能够稳定而高效地分别表达hCu, Zn-SOD和hCu, Zn-SOD-PTD融合蛋白(图4)。

2.3 hCu, Zn-SOD-PTD融合蛋白作用于人食管癌细胞EC9706

将hCu, Zn-SOD-PTD、hCu, Zn-SOD与食管癌细胞共孵育15 min后,再加入荧光探针DCFH-DA,用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测细胞内的DCF的荧光。由图5至图8可见,与空白对照组相比,hCu, Zn-SOD组的荧光强度无明显变

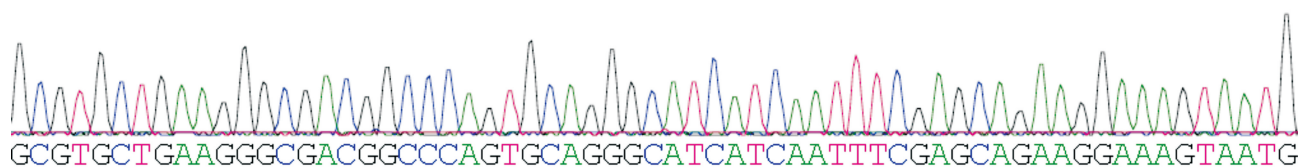
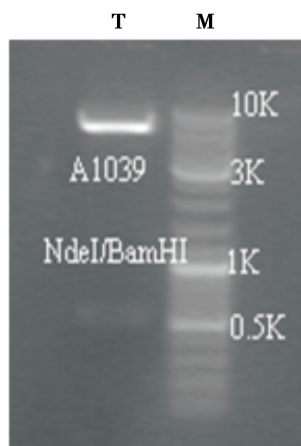
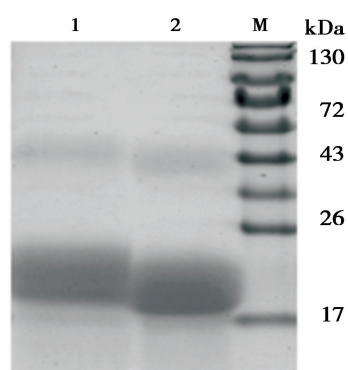


图1 PET/hCu,Zn-SOD-PTD 克隆表达载体 T7 引物测序结果

Figure 1 Sequencing data of the cloned area of PET/hCu,Zn-SOD-PTD expression vector with T7

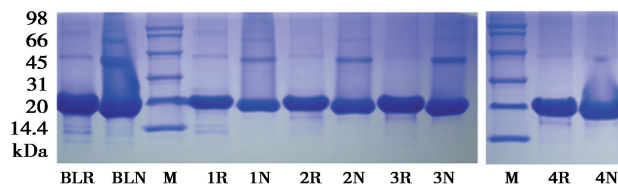
T 为 PET16B-hCu/Zn-SOD 被 *NdeI/BamHI* 酶切后电泳图, M 为 DNA 分子量 marker图2 PET16B-hCu/Zn-SOD 被 *NdeI/BamHI* 酶切后电泳图结果Figure 2 Electrophoretogram of PET16B-hCu/Zn-SOD after digestion by *NdeI/BamHI* enzyme

1、2、M 分别代表 PTD4-h Cu/Zn-SOD、h-Cu/Zn-SOD 和蛋白质分子量 marker

图3 纯化后的 hSOD 和 hCu,Zn-SOD-PTD 融合蛋白聚丙烯凝胶电泳结果

Figure 3 Polypropylene gel electrophoresis results of purified hCu,Zn-SOD-PTD protein

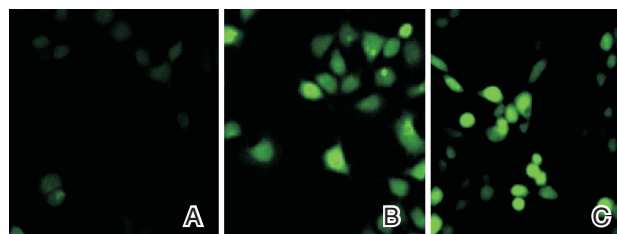
化($P \geq 0.05$), 而 hCu,Zn-SOD-PTD 融合蛋白组的荧光强度明显减弱, 组间 $P < 0.05$, hCu,Zn-SOD-PTD 融合蛋白不同浓度组间比较 $P < 0.05$, 不同浓



BLR: 装量诱导前; BLN: 装量非诱导前; M: 蛋白标准品; 1R: 诱导条件下洗脱标本 1; 1N: 非诱导条件下洗脱标本 1; 2R: 诱导条件下洗脱标本 2; 2N: 非诱导条件下洗脱标本 2; 3R: 诱导条件下洗脱标本 3; 3N: 非诱导条件下洗脱标本 3; 4R: 诱导条件下洗脱标本 4; 4N: 非诱导条件下洗脱标本

图4 重组质粒经 IPTG 诱导表达的融合蛋白纯化后不同洗脱液里 hCu, Zn-SOD 含量的变化

Figure 4 The changes of hCu, Zn-SOD in different elution buffers after induced by IPTG



A: hCu/Zn-SOD-PTD 组; B: hCu/Zn-SOD 组; C: 空白对照

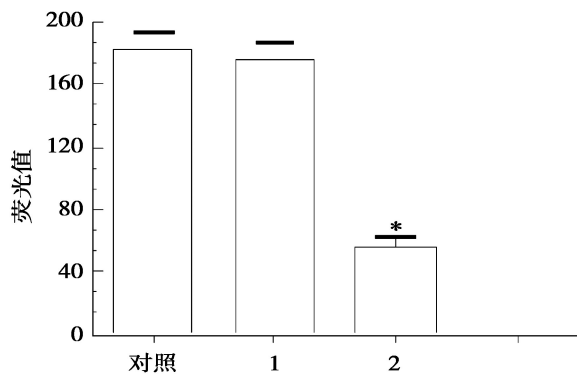
图5 EC9706 细胞分别与 20 MM hCu/Zn-SOD-PTD、hCu/Zn-SOD 共孵育后加入荧光 DCFH-DA 探针的荧光图片

Figure 5 Fluorescence microscopy analysis of EC9706 cells add with DCFH-DA fluorescence probe after co-cultured with 20 MM hCu/Zn SOD-PTD and hCu/Zn-SOD, respectively

度 hCu,Zn-SOD-PTD 组间荧光值均数随浓度的增加而减少。有明显的浓度依赖性, 间接提示 hCu,Zn-SOD-PTD 融合蛋白可穿透细胞膜且保持生物学活性。

3 讨论

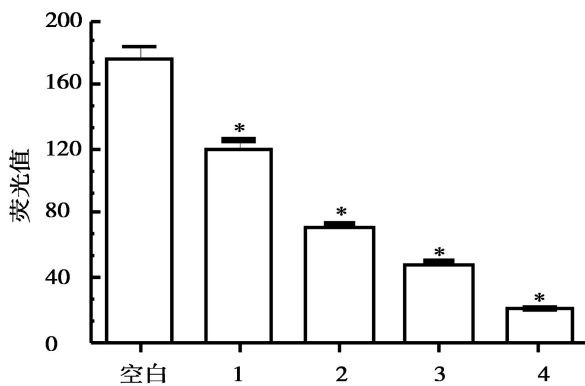
人铜锌超氧化物歧化酶是细胞内一种重要的防御氧化应激的蛋白酶, 它不但在家族性肌萎缩性侧索硬化症、帕金森病、登革热、癌症、白内障和多种神经紊乱综合征中具有重要的生理学意义和治疗潜力, 而且在食品和化妆品业中也具有广阔



*与对照组或组1比较, $P < 0.05$ 。从左到右分别为对照组、hCu, Zn-SOD组、hCu, Zn-SOD-PTD组。不加任何融合蛋白设置为对照组, 加入SOD组融合蛋白设置为组1, 加入20 MM浓度的PTD-SOD融合蛋白标记为组2, 每组3例。对照组和hCu, Zn-SOD组比较 $P < 0.05$, 显示无显著性差异, 20MM hCu, Zn-PTD-SOD组与对照组和hCu, Zn-SOD组比较 $P < 0.01$, 显示有极显著性差异

图6 不同浓度的融合蛋白hCu, Zn-SOD和hCu, Zn-SOD-PTD与EC9706共孵育后荧光强度比较

Figure 6 Comparison of fluorescence intensity between hCu, Zn-SOD-PTD and hCu, Zn-SOD after co-cultured with EC9706 cells



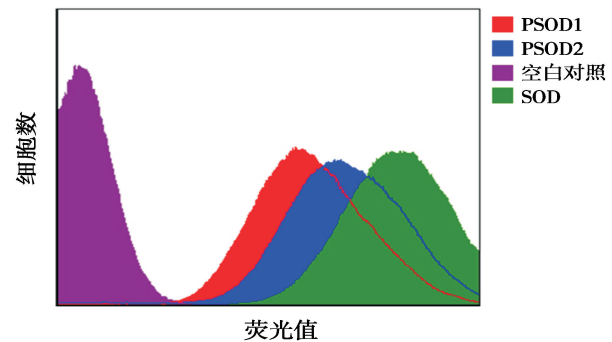
*与对照组比较, $P < 0.05$ 。从左向右1、2、3、4依次为空白对照、4MM、10MM、20MM、40MM的hCu, Zn-SOD-PTD。每组3个样本, 计算平均值, 各组间两两比较 $P < 0.05$, 5组间有显著性差异, 比较5组均数, 显示荧光值随hCu, Zn-SOD-PTD浓度增加而减少

图7 不同浓度的hCu/Zn-SOD-PTD融合蛋白作用与EC9706细胞后的荧光强度差异显著性比较

Figure 7 Comparison of fluorescence intensity of EC9706 cells co-cultured with hCu, Zn-SOD-PTD protein of various concentrations

的前景^[10]。但是外源性的人铜锌超氧化物歧化酶难以被人体吸收, 使之在应用方面收到了很大限制。本实验中采用了一种新的方法来解决这一问题, 即在人铜锌超氧化物歧化酶的多肽链前添加一段具有跨膜转送功能的短肽——PTD。

研究表明, PTD含丰富的碱性和疏水氨基酸



PSOD1为5 MM的hCu, Zn-SOD-PTD; PSOD2为10 MM的hCu, Zn-SOD-PTD, hCu, Zn-SOD作为对照; 未加DCFH-DA荧光探针的EC9706细胞为空白对照

图8 hCu, Zn-SOD-PTD、hCu/Zn-SOD穿膜功能的流式细胞仪结果

Figure 8 Results of flow cytometer of trans-membrane activity of hCu, Zn-SOD-PTD and hCu, Zn-SOD

的序列, 其跨膜运转的能力的大小与碱性氨基酸的序列和疏水氨基酸比例及其排列的空间构像和多肽表面正电子的分布有关^[11-13]。因此在TAT-PTD的基础上, 通过改变碱性氨基酸的分布与序列, 就可以使得融合蛋白的转导效率显著提高。利用这些携带有PTD和效应蛋白表达融合蛋白解决了大分子蛋白无法穿透细胞膜而发挥正常的生物活性这一难题, 这一技术已经是用于多种蛋白的跨膜实验中^[4-9]。现代蛋白结构分析软件为模拟、筛选蛋白转导域序列提供了便捷的工具。如Ho等^[12]就应用生物信息学软件, 通过改变结构域中疏水氨基酸和碱性氨基酸的种类和分布、优化表面电子分布, 人工设计出比TAT-PTD具有更高效率的穿膜活性的PTD分子。在该研究中, 利用软件设计新的PTD序列, 由11个氨基酸组成, 序列为YARAAARQAR(Q)A, 根据软件计算, 此序列的穿膜效率是天然TAT-PTD的33倍^[12]。

本研究利用基因工程的方法得到了hCu, Zn-SOD-PTD融合蛋白。首先构建PET16b/hCu, Zn-SOD和PET16b/hCu, Zn-SOD-PTD 2种重组原核表达载体。在人工设计合成的PTD序列的末端加上NdeI酶切位点的序列, 与此同时通过双酶切反应在人铜锌超氧化物歧化酶全长cDNA序列的末端也得到一个NdeI酶切位点的序列, 两者通过连接酶连接, 就得到hCu, Zn-SOD-PTD的全长cDNA序列。由于选用了PET16b作为原核表达载体, 使表达的2种蛋白的N段含有连续的10个his

标签融合序列,就可方便快捷利用 Ni^{2+} 柱层析进行纯化。纯化后洗脱液的SDS-PAGE结果表明,2种载体可以高效稳定表达2种蛋白。

荧光探针DCFH-DA是进行活性氧检测的有效方法。DCFH-DA本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,且被细胞内的活性氢氧化为有荧光的2',7'-二氯荧光黄(dichlorofluorescein, DCF)。检测DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。

本实验为检测目的融合蛋白透过细胞膜的能力,将hCu, Zn-SOD-PTD、hCu, Zn-SOD与食管癌细胞共孵育15 min,用DCF法检测了细胞内的荧光强度,荧光强度越弱,说明细胞内SOD的活性越强。荧光共聚焦显微镜和流式细胞仪的检测结果显示,与空白对照组相比,经过hCu, Zn-SOD蛋白处理的细胞内荧光值无明显变化 $P>0.05$,而hCu, Zn-SOD-PTD蛋白处理组的细胞内荧光强度明显减弱组间 $P>0.05$ 。与对照组hCu, Zn-SOD荧光值比较 $P>0.01$ 。这就间接提示hCu, Zn-SOD-PTD蛋白能有效快捷地穿过EC9706细胞膜清除氧自由基保持生物学活性,在特定浓度范围内,融合蛋白浓度与细胞内荧光强度成反比。本实验所设计并添加在目的蛋白前的PTD序列不仅可帮助蛋白跨膜转运,而且不影响目的蛋白发挥生物学活性。而hCu, Zn-SOD蛋白处理组由于细胞表面缺乏SOD特异性受体,外源性SOD无法进入细胞内,其荧光强度值与空白对照没有明显的变化。此外,用不同浓度的hCu, Zn-SOD-PTD融合蛋白处理细胞相同时间后,细胞内的荧光强度均值随着浓度的增加而减少,显示hCu, Zn-SOD-PTD融合蛋白透过细胞膜及清除氧自由基的作用具有浓度依赖性。

本研究依赖于生物信息学蛋白结构和跨膜蛋白结构的原理设计合成理论上具有高效穿膜活性的PTD结构和hCu, Zn-SOD-PTD融合表达,经过实验显示良好的穿膜能力,进一步提高了PTD分子的内化作用。为建立一种高效的PTD分子打下了良好的基础,建立了一种成本低、且能稳定表达的原核表达载体。由于PTD分子的高效穿膜活性使得细胞表面没有受体的hCu, Zn-SOD-PTD能更有效率的进入细胞内发挥其应有的生物学活性,也预示可以通过优化PTD结构把缺少穿越细胞膜的蛋白高效率的穿越细胞生物膜来发挥其生物学活性。

参考文献

- [1] Hallewell RA, Masiaz FR, Najarian RC. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesising high levels of active or inactive enzyme from an expression library [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13(6):2017-2034.
- [2] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein [J]. Cell, 1988, 55(6):1179-1188.
- [3] van den Berg A, Dowdy SF. Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules [J]. Curr Opin Biotechnol, 2011, 12(6):888-893.
- [4] Gu Q, Feng T, Cao H, et al. HIV-TAT mediated protein transduction of Cu/Zn - superoxide dismutase - 1 (SOD1) protects skin cells from ionizing radiation [J]. Radiat Oncol, 2013, 8:253.
- [5] Liu J, Hou J, Xia ZY, et al. Recombinant PTD-Cu/Zn SOD attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes [J]. Free Radic Res, 2013, 47(5):386-393.
- [6] Park J, Ryu J, Jin LH. 9-Polylysine Protein Transduction Domain: Enhanced Penetration Efficiency of Superoxide Dismutase into Mammalian Cells and Skin [J]. Mol Cells, 2002, 13(2):202-208.
- [7] Ni Y, Yu J, Xu JP, et al. Enhanced delivery of human growth hormone across cell membrane by Tat-PTD [J]. Endocrine, 2014, 46(1):138-147.
- [8] Wadia J, Eguchi A, Dowdy SF, et al. DNA delivery into mammalian cells using bacteriophage displaying the TAT transduction domain [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2013, 7:283-287.
- [9] Presente A, Dowdy SF. PTD/CPP peptide-mediated delivery of siRNAs [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(16):2943-2947.
- [10] 方允中, 李文杰. 自由基与酶(2版) [M]. 北京:科学出版社, 1996:125.
- [11] Zhang S, Cao Y, Xie L, et al. Effect of superoxide dismutase entrapped liposomes and protein transduction domains superoxide dismutase on human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4):1427-1433.
- [12] Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, et al. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Research, 2001, 61(2):474-477.
- [13] Leifert JA, Lindsay WJ. "Translocatory protein" and "protein transduction domain": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms [J]. Mol Therapy, 2003, 8(1):13-20.

· 论 著 ·

广西壮族儿童肥胖与黑素皮质素受体基因 rs17782313 位点多态性的关系

唐宁¹ 陈艺丹² 曾婷³ 覃正学⁴ 严提珍¹ 罗世强¹ 李伍高¹ 李静文¹ 王秋华¹
李哲涛^{1*}

【摘要】目的 探讨黑素皮质素基因 *MC4R* 单核苷酸多态性位点 rs17782313 与壮族儿童单纯性肥胖的相关性。**方法** 利用 SNaPshot 技术分析收集到的 285 儿童(151 例广西柳州壮族单纯性肥胖儿童和 134 例健康对照儿童) *MC4R* 基因 rs17782313 位点的基因型,记录身高体重,并测定空腹血糖(serum fasting glucose, FBG)、胆固醇(cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C)及低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C)。**结果** 正常对照组和肥胖组 *MC4R* 基因 CC 型、CT 型及 TT 型基因型频率分别为 1.49%、26.11%、72.39% 和 3.31%、32.45%、64.24%,两组最小等位基因(C 等位基因)频率分别为 14.55% 和 19.54%,经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,其等位基因在病例组及对照人群中的分布符合遗传平衡,说明样本具有群体代表性。两组基因型与等位基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$);rs17782313 位点各基因型间代谢指标(FBG、TC、TG、HDL-C 和 LDL-C)无显著差异。**结论** *MC4R* 基因 rs17782313 位点多态性与广西壮族儿童单纯性肥胖无关。

【关键词】 黑素皮质素;基因多态性;单纯性肥胖;壮族

Relationship between SNP rs17782313 variation in *MC4R* gene and obesity in zhuang nationality children

TANG Ning¹, CHEN Yidan², ZENG Ting³, QIN Zhengxue⁴, YAN Tizhen¹, LUO Shiqiang¹, LI Wugao¹, LI Jingwen¹, WANG Qiuhua¹, LI Zhetao^{1*}

(1. Department of Medical Genetics, Liuzhou Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 2. Clinical Laboratory, Liuzhou Red Cross hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 3. Department of Child Health, Liuzhou Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou, Guangxi, China, 545001; 4. Department Of Medical Examination, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi, China, 545002)

【ABSTRACT】Objective To explore the relationship between the single nucleotide polymorphisms (SNP) rs17782313 of the *MC4R* gene and simple obesity in children of the Zhuang nationality. **Methods** 285 children (151 cases of simple obese children and 134 healthy control children) in Liuzhou were enrolled. Height and bodyweight were measured. Serum fasting glucose (FBG), cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL - C) and low - density lipoprotein (LDL - C) were measured, and SNP rs17782313 single

基金项目:中国疾病预防控制中心妇幼保健中心合生元母婴营养与健康研究项目(2012FY009);广西壮族自治区卫生厅自筹课题(Z2013602)

作者单位:1. 广西柳州市妇幼保健院医学遗传科,广西,柳州 545001

2. 柳州市红十字会医院检验科,广西,柳州 545001

3. 广西柳州市妇幼保健院儿保科,广西,柳州 545001

4. 广西科技大学第一附属医院体检科,广西,柳州 545002

*通讯作者:李哲涛, E-mail:48217306@qq.com

nucleotide polymorphisms of *MC4R* gene were detected by SNaPshot assay. **Results** The CC, CT and TT genotype frequencies of rs17782313 polymorphism in normal control group and simple obesity group were 1.49%, 26.11%, 72.39% and 3.31%, 32.45%, 64.24%, respectively. Minor allele frequencies (C allelic frequency) in the simple obesity group and the normal control group were 14.55%, and 19.54%, respectively. SNP rs17782313 of the *MC4R* gene were found in Hardy - Weinberg equilibrium. The genotype and allelic frequencies of rs17782313 and metabolic parameters (FBG, TC, TG, HDL-C and VDL-C) in simple obese children were not significantly different from those in controls ($P>0.05$). **Conclusions** rs17782313 polymorphisms of *MC4R* gene are not associated with simple obesity in Chinese Zhuang preschool children in Liuzhou of Guangxi province.

[KEY WORDS] *MC4R*; Genetic polymorphism; Simple obesity; Zhuang nationality

儿童肥胖现象愈发严重,已逐渐成为社会关注的健康问题。流行病学研究发现,我国儿童单纯性肥胖率高达 7.2%,接近欧美发达国家水平^[1]。肥胖是由环境和遗传因素共同作用而发生的,但目前越来越多的证据表明,遗传因素在肥胖的发生发展中起着重要的作用^[2]。肥胖发生的机制主要是由于体内能量失衡所导致的,*MC4R* 基因编码的蛋白在调节体内能量平衡上发挥着重要作用^[3],并且被认为与体重指数(body mass index, BMI)密切相关^[4],2008 年全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)发现 *MC4R* 基因多态性位点 rs17782313 与成人和儿童肥胖有明显的关联^[2]。基于以上结论,本文以广西壮族儿童为研究对象,探讨黑素皮质素基因 *MC4R* 基因 rs17782313 位点多态性与广西壮族儿童肥胖及其代谢指标的关系,旨在从分子生物学角度探讨肥胖在广西壮族人群中的遗传机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2014 年 4 月~2014 年 12 月选取柳州市中小学壮族儿童 285 人,儿童单纯性肥胖诊断标准:超过同身高同性别参照人群标准体质量的 20% 者定为单纯性肥胖儿童^[1]。肥胖组 151 例,其中男性 111 例,女性 40 例,平均年龄 13.31 ± 4.13 岁;健康对照组 134 例,其中男性 63 例,女性 71 例,平均年龄 13.20 ± 2.57 岁。两组儿童均未服用激素与影响脂代谢的药物。本研究经得研究对象父母同意,并获得医院医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 BMI 及代谢指标测定

两组儿童于相同条件下按照标准方法测量身

高和体重,根据公式 $BMI=W(kg)/H(m^2)$ 计算 BMI,其中 W 代表体重,单位为 kg, H 代表身高,单位为 m。抽取所有研究对象清晨空腹静脉血,分离血清,测定空腹血糖 (serum fasting glucose, FBG),胆固醇 (cholesterol, TC),甘油三酯 (triglyceride, TG),高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL-C) 及低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL-C),以上测定都在全自动生化分析以上进行。全部测定由专人负责在固定的仪器上进行,并进行质控。同时抽取 2 mL 静脉血予乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na_2) 抗凝,酚氯仿法提取全基因组 DNA,标本 $-80^\circ C$ 保存,用于基因分析。

1.2.2 基因多态性检测

使用 SNaPshot 技术,在 ABI3730XL 型 DNA 序列检测仪 (ABI, 美国) 平台上,结合软件 GeneMapper 4.0 分析完成对 *MC4R* 基因 rs17782313 位点单核苷酸多态性的基因分型检测。该位点 PCR 扩增正向引物为 F: 5' AGGCTCTGCTCTGTGTCTCTT 3', 反向引物为 R: 5' CTTCTGGAGGCAGGTTCTGT3'。SNaPshot 反应过程中延伸引物序列为: 5' tttttttttttttttttttttttttttttttTAAAGCAGGAGAGATTGT ATCC 3', PCR 反应体系为 20 μL , 包括 10 $\times$ PCR 缓冲液 (Mg^{2+} free, invitrogen, 美国) 2 μL , dNTP 混合物 0.5 μL (10 mmol/L, Takara, 日本), 0.8 μL $MgCl_2$ (50 mmol/L, invitrogen, 美国), Platinum Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (5U, invitrogen, 美国), PCR 正向和反向引物 (10 pmol/L) 各 0.5 μL 和 1 μL DNA 模板 (20 mg/L)。PCR 反应程序: 95 $^\circ C$ 变性 2 min; 94 $^\circ C$ 变性 20 s, 56 $^\circ C$ 退火 30 s, 72 $^\circ C$ 延伸 40 s, 33 个循环; 最后 72 $^\circ C$ 延伸 5 min, 结束后 4 $^\circ C$ 保存。PCR 产物经过纯化处理后,在 ABI3730XL 型 DNA 序列检测仪上进行毛细管电泳,运行 GeneMapper 4.0 软件分析实验结果。

1.2.3 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用 t 检验, 样本间率的比较用 χ^2 检验。采用 SPSS 13.0 进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

肥胖组 151 例, 其中男性 111 例, 女性 40 例, 平均年龄 13.31 ± 4.13 岁, 平均 BMI 值 27.48 ± 4.03

kg/m²; 正常组 134 例, 其中男性 63 例, 女性 71 例, 平均年龄 13.20 ± 2.57 岁, 平均 BMI 值 18.88 ± 2.50 kg/m²。BMI 值在组间的差异有统计学意义 ($t = 31.471, P < 0.05$), 以肥胖组的 BMI 为高。肥胖组与正常组间男女人数的构成比有统计学差异 ($P < 0.05$), 肥胖组中的男性明显多于正常组, 女性明显少于正常组, 在该年龄段人群中男性肥胖率为 63.79% (111/174), 女性为 36.04% (40/111), 结果见表 1。

表 1 研究对象的一般情况

Table 1 The general condition of the research object

组别	例数	性别		年龄	身高	体重	BMI
		男性	女性				
正常组	134	63	71	13.20 ± 2.57	154.61 ± 11.60	45.63 ± 9.48	18.88 ± 2.50
肥胖组	151	111	40	13.31 ± 4.13	154.53 ± 18.36	67.73 ± 20.99	27.48 ± 4.03
χ^2 值		20.96	t 值	-0.27	0.04	-11.66	-21.91
P 值		0.000	P 值	0.785	0.968	0.000	0.000

在代谢参数上, 血糖、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白各指标在组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 肥胖组与对照组代谢指标的比较

Table 2 The metabolism indices between the obesity group and the control group

指标	正常组 ($n=134$)	肥胖组 ($n=151$)	t 值	P 值
血糖	4.24 ± 0.39	4.57 ± 0.75	-4.62	0.000
总胆固醇	4.09 ± 0.74	4.40 ± 0.86	-3.23	0.001
甘油三酯	0.85 ± 0.35	1.17 ± 0.88	-4.20	0.000
高密度脂蛋白	1.56 ± 0.32	1.33 ± 0.30	6.33	0.000
低密度脂蛋白	2.24 ± 0.65	2.69 ± 0.67	-5.73	0.000

2.2 MC4R 基因 rs17782313 位点基因型及等位基因型频率在肥胖组和正常对照组的比较

健康对照组和肥胖组 MC4R 基因 rs17782313 CC 型、CT 型及 TT 型基因型频率分别为 1.49%、26.11%、72.39% 和 3.31%、32.45%、64.24%, 等位基因 C、T 频率分别为 14.55%、85.45% 和 19.54%、80.46%, 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验, 其等位基因在病例组及对照组中的分布符合遗传平衡, 说明样本具有群体代表性。肥胖组的 BMI 显著高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 然而引起这一差异的原因与 MC4R 基因 rs17782313 位点多态性没有关联 ($P > 0.05$)。具体结果见表 3。

表 3 肥胖组和对照组 MC4R 基因 rs17782313 位点基因型和等位基因频率 n (%)

Table 3 The frequencies of genotype and allele of MC4R gene rs17782313 in the obesity group and the control group [n(%)]

组别	n	基因型			等位基因		Hardy-Weinberg 平衡检验	
		CC	CT	TT	C	T	χ^2	P
正常组	134	2(1.49)	35(26.11)	97(72.39)	39(14.55)	229(85.45)	0.339	0.884
肥胖组	151	5(3.31)	49(32.45)	97(64.24)	59(19.54)	243(80.46)	0.156	0.925
χ^2			2.614			2.478		
P			0.271			0.115		

2.3 *MC4R* 基因 rs17782313 位点多态性与肥胖代谢指标间的相关性

MC4R 基因 rs17782313 位点 CC、CT、TT 基因

型与各代谢参数血糖、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白间的差异无统计学意义(表4)。

表4 *MC4R* SNP rs17782313 位点不同基因型肥胖相关代谢组分比较

Table 4 Analysis genotype and metabolism indices at the SNP rs17782313 of gene *MC4R*

代谢参数	基因型			<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	TT	TC	CC		
BMI	23.33±5.50	23.60±5.43	24.46±6.09	0.193	0.824
血糖	4.39±0.59	4.49±0.64	4.21±1.10	1.137	0.322
总胆固醇	4.21±0.80	4.33±0.79	4.86±1.45	2.696	0.069
甘油三酯	1.06±0.79	0.91±0.42	1.37±0.78	2.209	0.112
高密度脂蛋白	1.43±0.29	1.49±0.41	1.32±0.37	1.496	0.226
低密度脂蛋白	2.46±0.69	2.51±0.63	2.91±1.27	1.592	0.205

3 讨论

MC4R 基因是黑素皮质素受体家族成员之一,由下丘脑腹侧核分泌,是一个调节能量平衡的重要信号分子,在控制饮食和机体质量稳态中起关键作用^[5]。*MC4R* 基因定位于人类基因组第18号染色体长臂(18q22),至全基因组关联分析发现*MC4R* 基因 rs17782313 多态性位点与肥胖密切相关以后,近年来国内外有很多关于该位点与肥胖关系的研究。Renstrom 等^[6]在对4 923例瑞典北部成年人的GWAS研究中再一次证明了rs17782313位点与肥胖相关联。然而在随后的研究中却出现了不一致的结论。Ng 等^[7]科学家在对7 705个中国人12个易感基因的14个多态性位点发现*MC4R* 基因的rs17782313位点与肥胖并无显著相关性。而同一年Cheung 等^[8]科学家报告了该多态性位点与肥胖显著相关。日本科学家Katsuura-Kamano 等^[9]在2 035例日本人队列研究中也证明了*MC4R* 基因的rs17782313位点与肥胖无显性关系。本研究在利用SNaPshot技术分析的基础上,分别分析了广西壮族儿童肥胖组和对照组*MC4R* 基因rs17782313位点基因型,结果发现*MC4R* 基因rs17782313多态性位点基因型CC、CT、TT的构成比以及等位基因频率在肥胖组和健康对照组中均无显著差异($P>0.05$),结果与与日本科学家一致。在代谢指标的研究中,各基因型组的血糖、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白及低密度脂蛋白之间并没有显著差异($P>0.05$),说明*MC4R* 基因

rs17782313位点多态性与机体代谢无直接联系。而这一结论也得到了Yilmaz 等^[10]科学家的证实, Ho-Urriola 等^[11]科学家也得出了相同的结论,*MC4R* 基因 rs17782313 多态性位点在对于儿童肥胖的贡献上主要是通过影响情绪,食欲以及进食缺少饥饿感等行为上去影响肥胖的发生。本次研究发现肥胖组中男女比例与对照组中男女比例存在着很大的差异($P<0.05$),肥胖组中男性儿童青少年明显高于正常组,而女性少于正常组。肥胖在男性中的比率明显高于女性,呈现出男高女低的特点,这一特点与国内研究一致^[12],但其产生的原因尚不完全清楚。*MC4R* 基因 rs17782313 位点多态性在肥胖组与正常组中差异无统计学意义,考虑为青少年儿童正处于身体发育阶段,随着年龄的增长差异会越发显著,此外环境的因素也可能掩盖或减弱基因的作用。不同地域,不同人群,不同饮食习惯上都存在着差异也影响着研究结果。

综上所述,本研究中显示*MC4R* 基因 rs17782313 位点多态性位点与广西壮族儿童肥胖及各代谢指标无显著联系。分析可能原因主要是基因多态性位点存在着种族和地域的差异,肥胖的发生发展是众多易感基因及环境因素相互作用的结果。基因的多态性与肥胖的关系还参杂着环境因素和生活行为等因素的交互作用,某个位点变异的效应可能被其他基因或环境效应所修饰,这些都需要通过扩大样本规模提高检验效能才能得出的更有意义的结论。

参考文献

- [1] 全国儿童期单纯肥胖症研究协作组, 中国疾病预防控制中心妇幼保健中心. 全国0~6岁儿童单纯性肥胖流行病学研究[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(3): 179-184.
- [2] Loos RJ, Lindgren CM, Li S, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity[J]. Nat Genet, 2008, 40(6): 768-775.
- [3] Balthasar N, Dalgard LT, Lee CE, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure[J]. Cell, 2005, 123(3): 493-505.
- [4] Corella D, Ortega-Azorin C, Sorli JV, et al. Statistical and biological gene-lifestyle interactions of MC4R and FTO with diet and physical activity on obesity: new effects on alcohol consumption[J]. Plos One, 2012, 7(12): e52344.
- [5] Pott W, Albayrak O, Hinney A, et al. Successful treatment with atomoxetine of an adolescent boy with attention deficit/hyperactivity disorder, extreme obesity, and reduced melanocortin 4 receptor function[J]. Obes Facts, 2013, 6(1): 109-115.
- [6] Renstrom F, Payne F, Nordstrom A, et al. Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(8): 1489-1496.
- [7] Ng MC, Tam CH, So WY, et al. Implication of genetic variants near NEGR1, SEC16B, TMEM18, ETV5/DGKG, GNPDA2, LIN7C/BDNF, MTCH2, BC-DIN3D/FAIM2, SH2B1, FTO, MC4R, and KCTD15 with obesity and type 2 diabetes in 7705 Chinese[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(5): 2418-2425.
- [8] Cheung CY, Tso AW, Cheung BM, et al. Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies: implications in a chinese population[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(3): 1395-1403.
- [9] Katsuura-Kamano S, Uemura H, Arisawa K, et al. A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study[J]. Endocrine, 2014, 47(1): 81-89.
- [10] Yilmaz Z, Davis C, Loxton NJ, et al. Association between MC4R rs17782313 polymorphism and overeating behaviors[J]. Int J Obes (Lond), 2015, 39(1): 114-120.
- [11] Ho-Urriola J, Guzman-Guzman IP, Smalley SV, et al. Melanocortin-4 receptor polymorphism rs17782313: association with obesity and eating in the absence of hunger in Chilean children[J]. Nutrition, 2014, 30(2): 145-149.
- [12] 罗飞宏, 沈飞仙, 屠月珍, 等. 上海市6~18岁少儿肥胖患病率调查[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(6): 427-429.

(上接第77页)

- [30] 吴昌学, 何燕, 单可人, 等. 贵州省荔波县瑶族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷症基因突变研究[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 25(4): 402-404.
- [31] 王政, 江渊, 蔡苗. 海南省保亭县、五指山市黎族G6PD缺乏症调查[J]. 海南医学, 2006, 17(12): 121.
- [32] 詹小芬, 张芹, 周露, 等. 云南省西双版纳州傣族G6PD缺陷症发生率及突变谱研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(2): 83-86.
- [33] 何燕, 单可人, 修瑾, 等. 贵州西江苗族G6PD脱氢酶基因突变分析[J]. 中国地方病学杂志, 2004, 23(4): 327-329.
- [34] 吴昌学, 单可人, 何燕, 等. 贵州省江口县土家族G6PD基因突变分析[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(4): 415-417.
- [35] 齐晓岚, 单可人, 谢渊, 等. 贵州省从江县侗族人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变型的检测[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 25(3): 283-285.
- [36] 杜传书, 王菁, 陈路明, 等. 中国人中所见的六种葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的点突变[J]. 中华血液学杂志, 1993, 14: 395-398.
- [37] 潘尚领. 东亚及东南亚地区G6PD缺陷的地域分布以及疟疾的正选择作用[J]. 中国优生优育现代人类学通讯, 2007, 13(1): 42-52.
- [38] 覃圣敏. 壮泰民族传统文化比较研究[M]. 南宁: 广西人民出版社, 2004, 5(1): 3115-3144.
- [39] 罗建明, 李慕军, 唐霞, 等. 变性高效液相联合测序及酶切检测广西葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的基因型[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(10): 607-611.
- [40] 杨银峰, 朱月春, 李丹怡, 等. 中国西南阿昌族G6PD缺陷的特征及新单体型487G>A/IVS5-612(G>C)的鉴定[J]. 中国科学, 2007, 37(4): 460-465.

• 论 著 •

2 638例细胞DNA定量分析法筛查宫颈癌的意义

刘国生 王晓亮 郑建琼 曾守遂 周维*

【摘要】 目的 通过DNA定量分析法筛查恩施地区社区妇女宫颈病变的发病情况,明确其在筛查及预防宫颈癌变的作用。 **方法** 对2013年12月至2014年11月在湖北民族学院附属民大医院自愿免费参加宫颈疾病普查的恩施州社区妇女,采用宫颈刮片采集宫颈脱落细胞样本进行分析。 **结果** 2 638例普查者中,发现异倍体细胞和异倍体细胞峰以及细胞异常增生共131例,占4.97%,经病理确诊为宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasias, CIN)45例,细胞DNA定量分析阳性患病率34.35%。 **结论** 采用细胞DNA定量分析法能及早发现宫颈癌前病变,通过妇女宫颈癌及癌前病变筛查可提高宫颈病变检出率。

【关键词】 细胞DNA定量分析; 筛查; 宫颈病变

The significance of the DNA quantitative analysis in screening of 2 638 cervical cancer patients

LIU Guosheng, WANG Xiaoliang, ZHENG Jianqiong, ZENG Shoukui, ZHOU Wei*

(Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei, China, 445000)

【ABSTRACT】 Objective To screen for the incidence of cervical lesions in women in Enshi by DNA quantitative cytology, and to investigate its effects in screening and preventing of cervical lesions. **Methods** DNA quantitative cytology and pathology were used in the medical examination of women who volunteered in the census of cervical disease in Affiliated Hospital of Hubei University for Nationalities from December, 2013 to November, 2014. **Results** A total of 131 cases of heteroploid cell, aneuploid peaks and abnormal proliferation were found, with an incidence of 4.97% in 2 638 cases. 45 cases of cervical intraepithelial neoplasias (CIN) were diagnosed by DNA quantitative cytology, with the positive prevalence rate of 34.35%. **Conclusion** DNA quantitative cytology is an effective way to detect CIN betimes, and cervical cancer and precancerous lesions screening may improve the detection rate of cervical lesions.

【KEY WORDS】 DNA quantitative cytology; Screening; Cervical lesions

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌^[1]。而在我国,其发生率和病死率明显高于西方发达国家,究其原因,与缺乏对适龄妇女宫颈癌前病变的早期筛查和及时正确的进行医学干预有着十分密切的关系。原位癌的高发年龄约为30岁~35岁,浸润癌约为45岁~55岁,近年来宫颈癌发病有年轻化的趋势^[2]。大量的研究与实

践表明,严重危害妇女健康的宫颈癌,是唯一一种可采用医学干预手段使其发病率和死亡率下降的人类恶性肿瘤^[1-2]。随着宫颈癌的细胞学检测技术和方法不断提高与发展,宫颈癌检出率有明显提高。DNA异倍体细胞的改变,是诊断宫颈癌及癌前病变的一个客观、早期、敏感、特异性的指标^[2]。伴随着近些年来宫颈细胞学筛查的普遍使用,宫

基金项目:湖北省恩施州农业与社会发展科技指导性计划项目(恩施科业[2013]9号)

作者单位:湖北民族学院附属民大医院医学检验科,湖北,恩施 445000

*通讯作者:周维, E-mail: zw200811@163.com

颈癌和癌前病变的二级预防早发现、早治疗落实得越来越好,宫颈癌的发病率和死亡率已经明显降低^[3]。为探讨细胞DNA含量及特征分析对筛查宫颈病变的价值,本研究选择2 638例行宫颈癌筛查的受试者,行细胞DNA倍体分析,并对异常者进行病理学检测,以期及早发现宫颈癌前病变,提高检出率。现将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象

选择恩施州2013年12月至2014年11月自愿免费来湖北民族学院附属民大医院参加宫颈疾病筛查的社区妇女2 638例,年龄20岁~83岁,平均年龄44岁。其中30岁以下169例,平均年龄28.5岁;31岁~40岁854例,平均年龄35.5岁;41岁~50岁918例,平均年龄46.5岁;51岁~60岁629例,平均年龄54岁;61岁及以上者68例,平均年龄63.5岁。

1.1.2 仪器与试剂

武汉兰丁医学高科技有限公司提供的全自动细胞DNA定量分析仪(兰丁细胞CT)、全自动细胞图象分析系统、宫颈刷和配套试剂富尔根(Feulgen)DNA染液。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集方法

采用宫颈刷采集宫颈脱落细胞样本,将样本浸泡在样本收集瓶固定液内,旋紧瓶盖后震荡摇晃,贴上条码标签,于常温及时送医学实验室。

1.2.2 制片与染色

玻片经粘附剂处理,取沉渣加悬浮液震荡混匀,混匀后滴片,制片后用富尔根(Feulgen)DNA染色,然后上机做细胞DNA定量分析诊断。

1.2.3 细胞DNA定量分析

所有Feulgen染色片用武汉兰丁全自动细胞图象分析系统进行扫描处理,并由定量分析诊断软件自行进行结果判定。

1.2.4 病理学检查

筛查中凡细胞DNA定量分析结果建议活检的对象,均进行阴道镜检查并对可疑部分进行4点以上的组织取材,送重庆金域医学检验公司进行病理学检测。

2 结果

2.1 宫颈上皮细胞DNA定量分析图

经武汉兰丁细胞DNA定量分析系统对2 638例患者标本进行检测后,可生成3种不同的细胞DNA定量分析检测图:(1)未见异倍体细胞、异倍体细胞峰及异常细胞增生,大多数细胞DNA指数(DNA index, DI)DI=1,个别细胞DI=2,且没有DI>2.5的细胞,建议定期进行正常筛查(2~3年)(图1A)。(2)可见个别DNA倍体异常细胞,即DI>2.5,或可见少量细胞增殖比例在5%~10%,但不包括10%,大多数细胞DNA指数依然等于1,建议4~6个月进行复查,以明确原因(图1B)。(3)可见≥3个细胞DI>2.5,或可见异常增生细胞≥10%及细胞异倍体峰,建议行阴道镜检查并对可疑组织进行取材,行病理学检查(图1C)。

2.2 2 638例妇女宫颈脱落细胞DNA倍体筛查结果

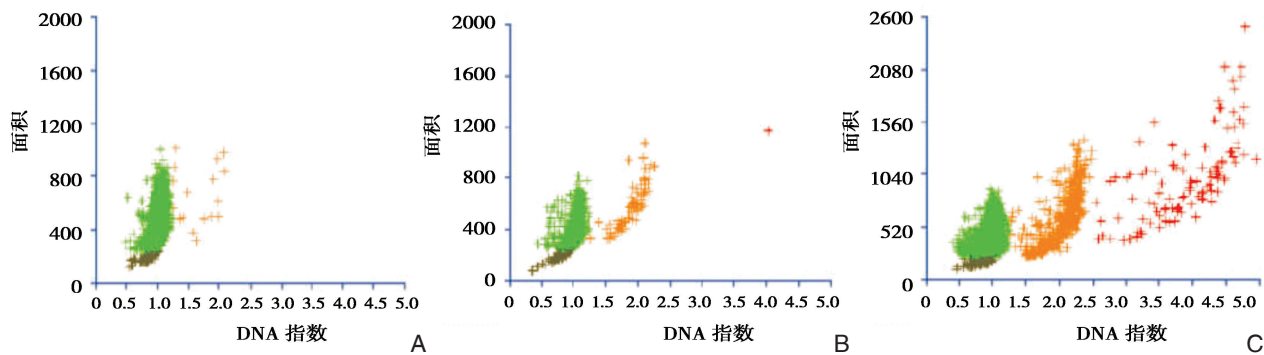
本研究共筛查2 638例,正常结果2 236例,占84.76%;建议复查271例,占10.27%;建议活检131例,占4.97%。具体结果见表1。

2.3 131例妇女宫颈脱落细胞活检后病理结果

在本组筛查数据中,共有131例经细胞DNA定量分析呈阳性者,行阴道镜检查并对可疑组织进行取材,经专家切片、病理学检测,发现轻度异型增生(mild cervical intraepithelial neoplasias, CIN-I)(图2B)、中度异型增生(moderate cervical intraepithelial neoplasias, CIN-II)(图2C)和重度异型增生(severe cervical intraepithelial neoplasias, CIN-III)(图2D)患者共45例,包括癌前病变者42例,鳞状细胞癌或腺癌(图2E)病变者3例,阳性检出率为34.35%。结果见表2。

3 讨论

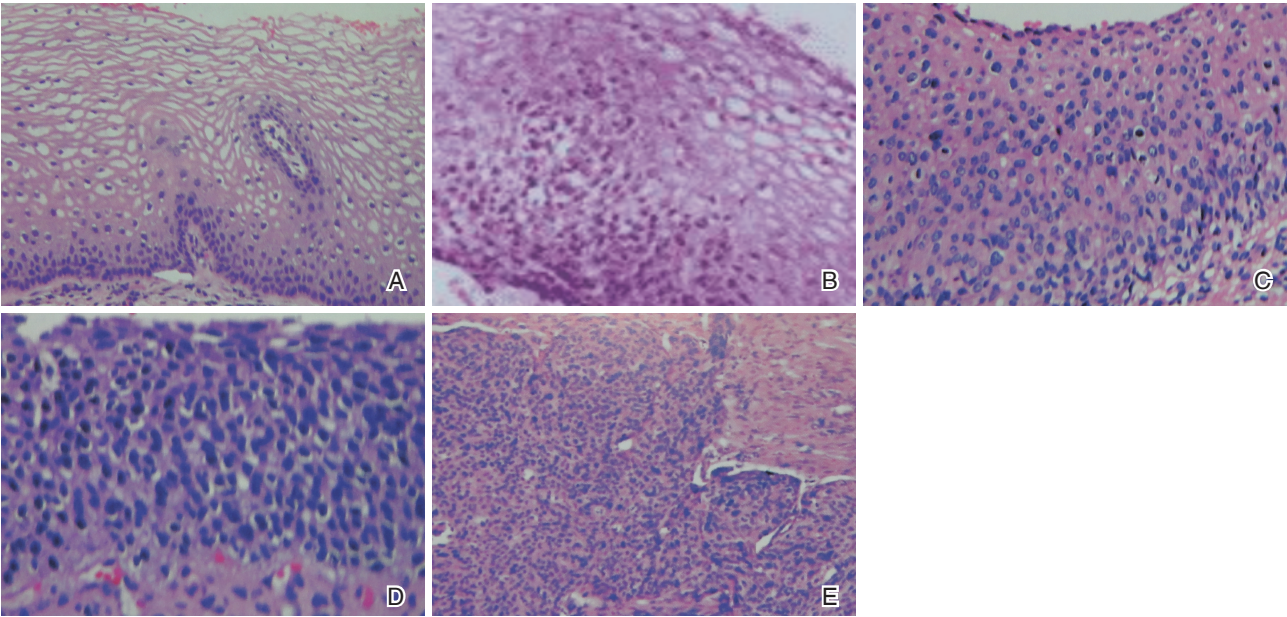
宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,主要是因持续感染人乳头瘤状病毒(human papilloma virus, HPV)引起,最常感染的HPV亚型是HPV6、HPV11和HPV51^[4]。宫颈癌是目前惟一病因明确、可以有效筛查阻止其发生的肿瘤。随着社会的发展,人们对宫颈癌二级预防的意识不断增强,自行宫颈癌筛查的受试者日益增多^[5]。细胞形态学检查虽是宫颈癌与宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasias, CIN)筛查的主要方法



A:正常宫颈上皮细胞; B:疑似宫颈上皮细胞; C:阳性宫颈上皮细胞

图1 宫颈上皮细胞不同病理状态下的DNA定量分布示意图

Figure 1 The distribution of DNA quantitative analysis in different cervical epithelial cells



A:正常宫颈上皮细胞; B:轻度异型增生(CIN-I); C:中度异型增生(CIN-II); D:重度异型增生(CIN-III); E:非角化型鳞状细胞癌

图2 不同宫颈上皮细胞的病理学表现

Figure 2 The biopsy pathologic results of different cervical epithelial cells

表1 2 638例妇女宫颈脱落细胞DNA倍体筛查结果(n)

Table 1 The DNA ploidy screening results of cervical exfoliated cells in the 2 638 cases (n)

年龄组	患者数	建议复查	复查率(%)	建议活检数	活检率(%)
30岁以下	169	5	0.19	4	0.15
31岁~40岁	854	71	2.69	32	1.21
41岁~50岁	918	126	4.78	65	2.47
51岁~60岁	629	66	2.50	27	1.03
60岁以上	68	3	0.11	3	0.11
合计	2 638	271	10.27	131	4.97

表2 131例妇女宫颈脱落细胞活检后病理结果(n)

Table 2 The biopsy pathologic results of cervical exfoliated cells in the 131 cases(n)

年龄组	活检例数	CIN I	CIN II	CIN III	鳞癌或腺癌	阳性率(%)
30岁以下	4	0	1	0	0	0.76
31岁~40岁	32	2	4	4	0	7.63
41岁~50岁	65	3	6	13	2	18.33
51岁~60岁	27	2	2	5	1	7.63
60岁以上	3	0	0	0	0	0
合计	131	7	13	22	3	34.35

之一,但因形态学检查所具有的局限性,和长时间阅片导致的视觉疲劳问题,造成敏感性相对较低,重复性较差以及较多意义不明的判片结果^[6]。细胞DNA定量分析检测宫颈癌及癌前病变的诊断在国外有大量的文献报道,国内使用细胞DNA定量分析检测方法和诊断已在开展。DNA异倍体的出现,是染色体异常的表现,也是细胞癌变和癌前病变的特征指标^[7-11]。细胞DNA定量分析检测是在液基薄层制片的基础上,进行Feulgen染色,通过全自动扫描系统进行细胞DNA定量分析,测定细胞DNA倍体是否异常。因细胞恶变过程中出现DNA含量的改变较形态学改变早,因此细胞DNA定量分析检测不仅能识别宫颈脱落细胞中的DNA异倍体细胞,还能识别异常增生细胞。通过DNA定量分析来掌握肿瘤细胞遗传基因变异过程,可作为一种评估癌前病变的指标^[12]。这种方法的敏感性高,能早期检测到宫颈癌及癌前病变,并且可以检测到肉眼不能观察到的细胞微小的改变,这种改变往往是癌前病变的表现,有利于早期治疗。

多项研究和理论都证实,DNA倍体异常细胞的出现是细胞癌变的一个特征^[7-11]。在宫颈癌的发生发展过程中,细胞核内染色体的异常要早于细胞形态上的异常改变,因此采用细胞核内DNA定量分析技术较常规细胞形态学检测宫颈癌变更敏感^[7-12]。本组筛查数据中共发现131例建议活检者,经重庆金域医学检验公司病理学专家确定为CIN 45例,建议活检者阳性检出率为34.35%,筛查后明显地提高了病变检出的针对性和有效率。由表2可见,41岁~50岁之间发病率最高,其次为31岁~40岁和51岁~60岁年龄段,这与郎景和等^[13]研究的结果相一致。宫颈异倍体细胞和细胞异常增

生的出现象征着细胞染色体结构和数量出现异常的变化,最终发展至浸润性宫颈癌。目前普遍认为宫颈癌是逐渐形成的,从CIN I至CIN II至CIN III,而后进展为浸润性癌,估计从CIN进展为癌大约需要10年以上的时间。传统上认为:更多CIN I和CIN II会消退,大约10%的CIN I、20%的CIN II会进展为CIN III,12%的CIN III会进展为浸润性癌^[14]。因此,正确及时地进行医学干预,有利于降低宫颈癌的发病率和死亡率^[15-16]。根据郎景和^[13]研究资料显示,宫颈浸润癌的好发年龄在50岁左右,符合从宫颈上皮内瘤变到宫颈癌大约10~20年的演变过程,这是一个可以采用医学干预手段加以阻断的最好时期,是癌瘤早期防治的重要阶段。

本次筛查结果表明,利用细胞DNA定量分析的方法能及时发现宫颈癌前病变,对及时采用预防和治疗措施、防止癌变发生可提供有益指导和方向。这种方法,可明确提高标本质量,提高癌变检出率,与病理学诊断符合率高。黄卫彤等^[17]报道,意义未明的不典型鳞状细胞(atypical squamous cells of unknown significance, ASCUS)在描述性诊断报告中很常见,其特点是检查结果重复性差,即可是良性病变,也可不同级别的CIN,甚至是早期浸润癌,但宫颈浸润癌检出率低,病变转归差异明显。细胞DNA倍体分析可辅助用于ASCUS的分流诊断,对ASCUS患者结合DNA定量分析进行有选择性的活检,可明显提高CIN的检出率、降低宫颈癌的漏诊。陈志香等^[18]报道,在宫颈癌的发生和发展过程中,病变细胞核内染色体的异常和DNA含量的改变要明显早于细胞形态学的异常改变。所以,相比较常规细胞形态学检测而言,DNA定量分析技术的敏感度更高,可有

效地降低漏诊率,提高检测的阳性率。

综上所述,通过对细胞DNA定量分析,进行有选择性的活检,既可以提高宫颈上皮细胞癌变和癌前病变的阳性检出率,又可以避免漏诊和资源的浪费。尤其是在湖北恩施州地区经济发展相对落后的山区,使用细胞DNA定量分析检测,不仅可以有效地解决经济落后地区大规模妇女宫颈疾病的筛查,还可以有效地解决经济落后地区病理学专家人力资源不足和工作压力相对过大的局面。该方法敏感性高、成本相对较低、是宫颈疾病筛查和诊断的有效方法。

参考文献

- [1] 田红菊,梁亚芳,陈建林.细胞DNA倍体分析联合阴道镜检查对宫颈病变的诊断价值[J].中国实用医药,2013,8(2):71-72.
- [2] Peirson L, Fitzpatrick - Lewis D, Ciliska D, et al. Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Syst Rev, 2013,2(1):35.
- [3] Randel A. ACOG releases guidelines on cervical cancer screening[J]. Am Fam Physician, 2013,88(11):776-777.
- [4] Paesi S, Correa L, Tregnago MC, et al. Human papillomavirus among women with atypical squamous cells of undetermined significance in southern Brazil[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2015,128(1):23-26.
- [5] Smith RA, Brooks D, Cokkinides V, et al. Cancer screening in the United States, 2013: a review of current American cancer society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(2):88-105.
- [6] Siebers AG, van der Laak JA, Huberts-Manders R, et al. Accurate assessment of cell density in low cellular liquid - based cervical cytology [J]. Cytopathology, 2013,24(4):216-221.
- [7] 田玉旺,刘光,周建,等.细胞DNA定量分析技术在宫颈癌及癌前病变早期筛查中的应用价值[J].诊断病理学杂志,2013,20(7):425-428.
- [8] Bollmann R, Mdhes G, Torka R, et al. Determination of features indicaring progression in atypical squamous cells with undetermined signiflcance[J]. Cancer, 2003, 99(2):113-117.
- [9] 潘秀荣,韩萍,臧静.宫颈细胞DNA定量分析在筛查宫颈病变中价值[J].中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(4):413-414.
- [10] Demirel D, Akyurek N, Ramzy I. Diagnostic and prognostic significance of image cytometric DNA ploidy measurement in cytological samples of cervical squamous intraepithelial lesions [J]. Cytopathology, 2013, 24(2):105-112.
- [11] 李永红,毕晓芳,李晶.细胞DNA倍体分析法对宫颈病变的临床诊断价值[J].宁夏医科大学学报,2013,35(7):821-823.
- [12] 孟芝兰,程雪梅,朱晨雁,等.全自动DNA定量分析系统在宫颈癌及癌前病变筛查中的应用价值[J].诊断病理学杂志,2012,19(1):15-18.
- [13] 郎景和.重视女性生殖道癌前病变及交界性肿瘤的诊断与治疗[J].中国实用妇科与产科杂志,2003,19(8):449.
- [14] Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review [J]. Tnt J Gynecol pathol, 1993,12(2):186-192.
- [15] 李峥嵘,李沛隆.宫颈癌发病情况及细胞DNA定量分析技术应用于宫颈癌筛查的临床研究[J].临床医学,2014,34(6):94-96.
- [16] 曾一芹,左江成,曾玉荣,等.细胞DNA定量检测在宫颈癌筛查中的应用[J].国际检验医学杂志,2013,34(2):199-200.
- [17] 黄卫彤,黄燕,黄宏思,等.宫颈不典型鳞状上皮细胞DNA倍体分析的临床意义[J].中国实验诊断学,2010,14(5):773-774.
- [18] 陈志香,王楠,李芳.DNA定量分析技术与宫颈液基细胞学检查的对比和联合在宫颈癌筛查中的应用价值[J].中国妇幼保健,2015,30(14):2283-2286.

• 论 著 •

Hsa-miR-21 的生物学信息分析

陈晓华* 曹小龙¹ 黎秀月¹ 何静彩² 张晓娜² 罗荣城²

【摘要】目的 对 hsa-microRNA-21 (hsa-miR-21) 的生物学信息进行分析。**方法** 运用 OMIM、UCSC、Ensembl 及 pantherdb 在线软件分析 hsa-miR-21 在人类基因组中的位置及其序列,同时采用 9 种靶基因分析软件对其靶基因进行预测分析。**结果** hsa-miR-21 定位于人 17 号染色体 59 841 266~59 841 337,共预测 5 203 个靶基因,其中为 DIANA-microT、miRnada、miRwalk、PiTar、TargetScan 共同预测的靶基因有 15 个。**结论** hsa-miR-21 在多种疾病及肿瘤中发挥重要作用,其生物学信息预示可能成为肿瘤治疗的新靶标。

【关键词】 微小 RNA; hsa-miR-21; 肿瘤; 生物学信息

Analysis on biological information of hsa-miR-21

CHEN Xiaohua^{1*}, CAO Xiaolong¹, LI Xiuyue¹, HE Jingcai², ZHANG Xiaona², LUO Rongcheng²

(1. Department of Oncology, Panyu Central Hospital, Oncology Research Institute, Guangzhou, Guangdong, China 511400; 2. Hospital of Integrated Traditional Chinese Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

【ABSTRACT】Objective To perform a biological information analysis for hsa-microRNA-21 (hsa-miR-21) through a software approach. **Methods** OMIM, UCSC, Ensembl and pantherdb were used to predict the genome and location of hsa-miR-21 in human and nine target predicted softwares were used to predict the target genes. **Results** Hsa-miR-21 was located in chromosome 17 of the region between 59 841 266 to 59 841 337. There were 5 203 target genes predicted and fifteen of them were strongly predicted by the softwares of DIANA-microT, miRnada, miRwalk, PiTar, and Target Scan. **Conclusion** Hsa-miR-21 plays an important role in many disease and tumor and may become a new target in cancer treatment.

【KEY WORDS】 MicroRNA; Hsa-miR-21; Tumor; Biological information

miRNA (microRNA) 是广泛存在的大小约为 21 个~25 个碱基的非编码微小 RNA,通过与靶基因的 3'-非翻译区 (3'-untranslated Regions, 3'-UTR) 区完全或不完全互补结合,引起靶基因 mRNA 降解或翻译抑制,从而发挥负性调控作用。以往的研究表明 miRNA 与细胞的增殖、分化、凋亡、基因调控及疾病发生,尤其是肿瘤的发生发展密切相关^[1-6]。hsa-miR-21 是目前发现的唯一一种在多种实体瘤 (如肝癌、肺癌、食管癌、头颈部肿瘤等) 及

非实体瘤 (如慢性淋巴细胞白血病、B 细胞淋巴瘤等) 过表达的 miRNA,可能与多种恶性肿瘤的生长、侵袭、转移等密切相关^[7-8]。由于 miRNA 的生物学特性及其在多种疾病中的作用为国内外学者所发现,近年来 miRNA 的生物信息学分析日渐成为研究热点,但 hsa-miR-21 的生物学信息目前研究仍较少。本研究通过多种生物学软件对 hsa-miR-21 进行生物学信息分析,以期进一步明确 hsa-miR-21 的靶基因及其调控作用。

基金项目:广州市番禺区科技计划项目珠江新星专项 (2013-专 15-6.10)

作者单位:1. 广州市番禺区中心医院肿瘤科,广州市番禺区肿瘤研究所,广东,广州 511400

2. 南方医科大学中西医结合医院,广东,广州 510200

*通讯作者:陈晓华, E-mail: cxh0663@aliyun.com

1 方法

1.1 hsa-miR-21 基因组信息分析

基因组信息分析用软件及相关数据库: OMIM(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), Ensembl(<http://asia.ensembl.org>), UCSC(<http://genome.ucsc.edu>), Panther(<http://www.pantherdb.org/>)。

1.2 hsa-miR-21 靶基因预测

靶基因预测用9种主流软件: DIANA-microT(<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools>), miRnada(<http://www.microrna.org>), miRDB(<http://www.mirdb.org/miRDB/>), miRwalk(<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), RNAhybrid(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>), PiTar(<http://pictar.bio.nyu.edu/>), PITA(http://gene.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html)

RNA22(<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>)及 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)。

2 结果

2.1 hsa-miR-21 基因组信息分析

采用上述4种在线数据库对 hsa-miR-21 进行分析, 结果可见 hsa-miR-21 定位于人17号染色体59 841 266~59 841 337 之间, 长72 bp(见图1), 其成熟单链RNA序列为5'-UAGCUUAUCAGACUG AUGUUGA-3'(hsa-miR-21-5p, MIMAT0000076), 5'-CAACACCAGUCGAUGGGCUGU-3'(hsa-miR-21-3p MIMAT0004494)。

2.2 hsa-miR-21 基因序列保守性分析

采用UCSC数据库对 hsa-miR-21 进行基因保守性分析, 结果可见, hsa-miR-21 成熟序列在人、恒河猴、鼠、狗、大象、鸡等脊椎动物中高度保守(图2)。

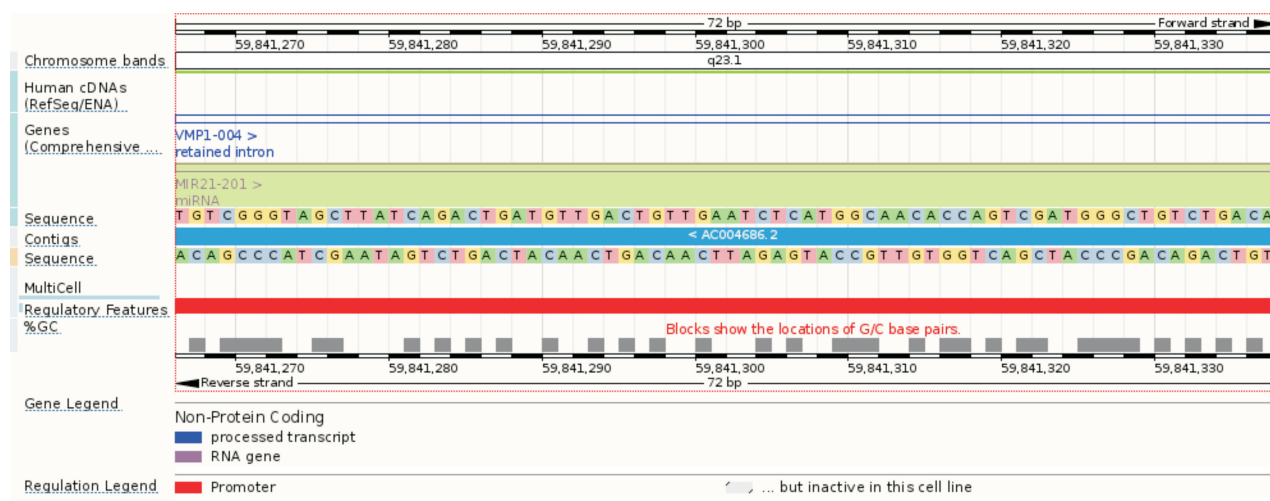


图1 Hsa-miR-21 在人类基因组中的位置

Figure 1 Location of hsa-miR-21 in human genomes

2.3 Hsa-miR-21 靶基因分析

我们采用上述软件进行 hsa-miR-21 靶基因预测, 其靶基因共有5 203个, 其中为 DIANA-microT、miRnada、miRwalk、PiTar、TargetScan 共同预测的靶基因有15个(表1)。同时, 我们采用 miRnada 对靶基因的结合位点进行预测, 结果见表2。

3 讨论

目前研究认为, miRNA 能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对而发挥对靶基因的调节作用, 从而调控多种疾病及肿瘤的发生发展^[1-6]。研究

表明, miRNA 与多种疾病及肿瘤的发生、转移、侵袭、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)等密切相关^[1-6, 14]。比如: 有学者^[15]发现, miR-155 可通过作用于 RhoA 来参与调节 TGF- β 诱导 EMT 的发生, 并进一步促进肿瘤转移。人为敲除乳腺癌细胞中的 miR-155 能显著抑制 TGF- β 诱导的 EMT 发生, 大大降低肿瘤细胞转移率; 增加 miR-155 水平会减少 RhoA 蛋白的表达并使细胞间的紧密连接瓦解, 促进肿瘤转移。

Hsa-miR-21 是第一个在不同的细胞株中作为细胞调节抑制基因而被记录下来。目前研究表

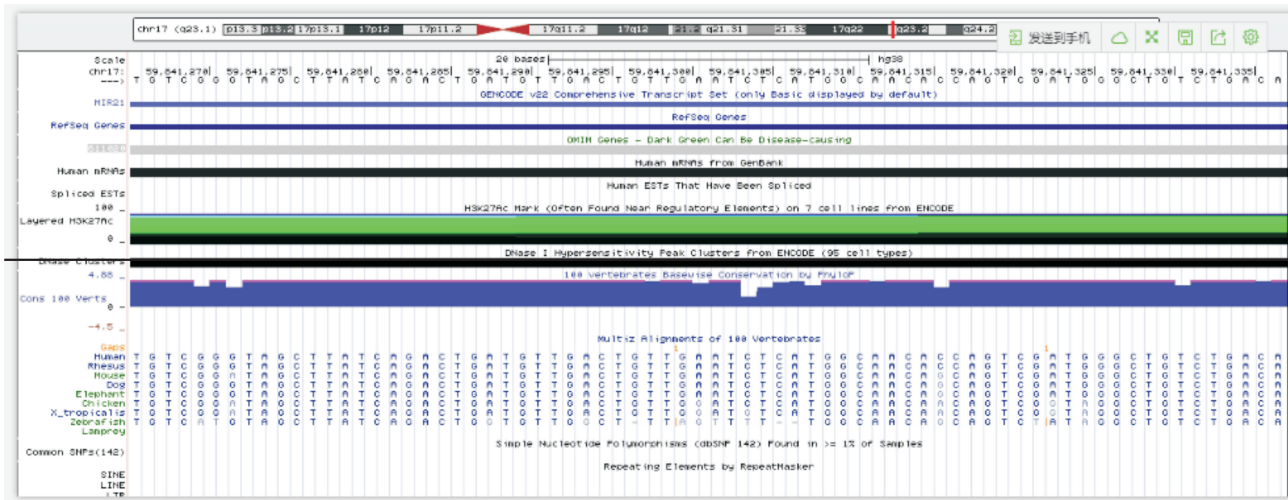


图2 hsa-miR-21 前体 pre-hsa-miR-21 在不同物种中的保守性分析

Figure 2 Sequence conservation analysis of pre-hsa-miR-21 in different species

表1 DIANA-microT、miRnada、miRwalk、PiTar、TargetScan 共同预测的 hsa-miR-21 靶基因

Table 1 The target gene predicted by the software of DIANA-microT, miRnada, miRwalk, PiTar and TargetScan

基因 ID	基因名称	基因描述	生物学验证情况
NM_000214	JAG1	Jagged1 基因。	验证 ^[9]
NM_000251	MSH2	DNA 错配修复同族体 2, 结肠癌, 非息肉病性 1 型(大肠杆菌)。	验证 ^[10]
NM_002345	LUM	基膜聚糖。	否
NM_002890	RASA1	RAS p21 蛋白激活剂(GTPase 激活蛋白)1。	验证 ^[11]
NM_005832	KCNMB2	大电导钾钙离子激发通道, 亚族 M, β 2 成员。	否
NM_005904	SMAD7	SMAD 家庭成员 7。	验证 ^[12]
NM_006874	ELF2	ELF2 E74-like 因子 2(ets 域转录因子)。	否
NM_007013	WWP1	WW 域包含 E3 泛素蛋白连接酶 1。	验证 ^[13]
NM_014577	BRD1	溴区包含蛋白 1。	否
NM_015678	NBEA	蛋白激酶锚定蛋白抗体。	否
NM_017672	TRPM7	转化受体电位阳离子通道, 亚家族 M, 成员 7。	否
NM_017780	CHD7	解旋酶 DNA 结合蛋白 7。	否
NM_024052	C17orf39	17 号染色体开放阅读框 39。	否
NM_175854	PAN3	PAN3 多聚腺苷酸特定核糖核酸酶亚基同族体(酵母)。	否
NM_178140	PDZD2	PDZ 域包含 2。	否

明, hsa-miR-21 在肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌等实体肿瘤中均过表达, 可能与多种实体瘤发生及浸润、转移相关^[16-21]。Wang 等^[17]研究发现, hsa-miR-21 在胃癌组织中的表达显著升高, 并与患者总生存相关。Winther 等^[18]发现, hsa-miR-21 在食管癌组织中表达亦显著升高, 并且与疾病特异生存时间相关, 随着 hsa-

miR-21 升高其疾病特异生存时间减少。Asangani 等^[19]发现结肠癌细胞系 cob206 hsa-miR-21 与 PDCD4 呈负相关, 通过抑制 PDCD4 的表达影响肿瘤细胞的浸润转移。Meng^[20]等发现 hsa-miR-21 是通过下调肝癌 PTEN 的表达, 进而影响 P13K 通路而触发细胞增殖转移等恶性行为。Song 等^[21]认为, hsa-miR-21 与乳腺癌 TIPM3 蛋白水平表达负

表 2 miRnada 预测的 hsa-miR-21 靶基因结合位点
Table 2 The target site of hsa-miR-21 target gene

Gene Name (基因名称)	Biding site of hsa-miR-21 (miR-21 结合位点)	Gene Name (基因名称)	Biding site of hsa-miR-21 (miR-21 结合位点)
TRPM7	3' agUUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 :: 1239:5' aaGGCAAGAG-AUGAUAGCUg 3' TRPM7	MSH2	3' agUUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : : 19:5' ugAAGGUAUAUUGAUAGCUa 3' MSH2
CHD7	3' aguUGUAG-UCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : :	BRD1	3' aguUGUAGUCA-GACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 :
RASA1	3' aguUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 :	LUM	3' aguUGUAGU-CAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : : :
C17orf39	3' aguUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : 228:5' ucuuCACCGUUU-UUAAGCUa 3' C17orf39	PAN3	3' aguuguagucAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : 1503:5' ucuguccacuUUUUUAAGCUu 3' PAN3
KCNMB	3' agUUGUA-GUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : 589:5' cuAAUUUCCAAAU-AUAAGCUg 3' KCNMB2	SMAD7	3' aguUGUA-GUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21
WWP1	3' aguUGU-AGUCAGA-CUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : 58:5' ugcACAGAUAGUGUAUAUAAGCUg 3' WWP1		3' agUUGUAGUCAGACUAU-UCGAu 5' hsa-miR-21 : : : : 285:5' guGGCUCUAGUUUUUAAGAGCUc 3' WWP1
JAG1	3' aguUGUAGUCA--GAC---UAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : :		3' aguUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : 1220:5' uagggAGUAUUCUAAUAAGCUa 3' JAG1
ELF2	3' aguUGUAGUCAGAC-UAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : : 586:5' uauAUUCAUAUAGCUUAAGCUg 3' ELF2		3' aguuguAGUCAG-AC--UAUUCGAu 5' hsa-miR-21
PDZD2	3' agUUGUAGU-CAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : 740:5' agAAUAGCACUUCUGAUAGCUg 3' PDZD2	NBEA	3' aguUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5' hsa-miR-21 : : 1631:5' gauAUAAAUUCCUUAAGCUa 3' NBEA

相关,认为 hsa-miR-21 可能通过负调控其靶基因 TIPM3 来促进癌细胞的侵袭转移。

综上所述,miRNA 是通过调控其靶基因发挥其调控作用,hsa-miR-21 与多种肿瘤的发生密切相关,并通过调控相关的基因而发挥作用。因此,明确 miRNA 的生物学信息有着极为重要的意义。目前,研究证实靶基因预测软件对已知的 miRNA 靶

基因有较好的预测敏感性和特异性,综合多种预测软件的靶基因交集对靶基因预测假阳性率较低。本研究中,我们采用多种靶基因预测软件对 hsa-miR-21 的生物学信息进行预测分析,发现 hsa-miR-21 定位于人 17 号染色体 59 841 266~59 841 337,采用 9 种靶基因预测软件对 hsa-miR-21 的靶基因进行预测,共预测 5 203 个靶基因,其中为 DIANA-

microT、miRnada、miRwalk、PiTar、TargetScan 共同预测的靶基因有 15 个(JAG1, MSH2, LUM, RASA1, KCNMB2, SMAD7, ELF2, WWP1, BRD1, NBEA, TRPM7, CHD7, C17orf39, PAN3, PDZD2), 其中部分靶基因已有学者进行了验证。明确其靶基因将为 hsa-miR-21 成为新的肿瘤分子靶向治疗靶标提供更好的研发方向和依据。当然, hsa-miR-21 在多种实体瘤中的具体作用及调控机制仍需多种研究手段进一步研究验证。

参考文献

- [1] Wu WK, Lee CW, Cho CH, et al. MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game [J]. *Oncogene*, 2010, 29(43):5761-5771.
- [2] Ciafrè SA, Galardi S. MicroRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer [J]. *RNA Biol*, 2013, 10(6):935-942.
- [3] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9):597-610.
- [4] Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, et al. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation [J]. *RNA*, 2009, 15(1):21-32.
- [5] Frixa T, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic microRNAs: key players in malignant transformation [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(4):2466-2485.
- [6] Danielson LS, Menendez S, Attolini CS, et al. A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(2):908-917.
- [7] Rask L, Fregil M, Høgdall E, et al. Development of a metastatic fluorescent lewis lung carcinoma mouse model: identification of mRNAs and microRNAs involved in tumor invasion [J]. *Gene*, 2013, 517(1):72-81.
- [8] Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis [J]. *Cell Res*, 2008, 18(3):350-359.
- [9] Selcuklu SD, Donoghue MT, Kerin MJ, et al. Regulatory interplay between miR-21, JAG1 and 17beta-estradiol (E2) in breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 29;423(2):234-239.
- [10] Bhandari A, Gordon W, Dizon D, Hopkin AS et al. The Grainyhead transcription factor Grhl3/Get1 suppresses miR-21 expression and tumorigenesis in skin: modulation of the miR-21 target MSH2 by RNA-binding protein DND1 [J]. *Oncogene*, 2013, 32(12):1497-1507.
- [11] Gong B1, Liu WW1, Nie WJ, et al. MiR-21/RASA1 axis affects malignancy of colon cancer cells via RAS pathways [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(5):1488-1497.
- [12] Wang JY, Gao YB, Zhang N, et al. miR-21 overexpression enhances TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 392(1-2):163-172.
- [13] Yang S, Banerjee S, Freitas Ad et al. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(6):L521-L529.
- [14] Sisic L, Vallböhmer D, Stoecklein NH, et al. Serum microRNA profiles as prognostic or predictive markers in the multimodality treatment of patients with gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2):869-874.
- [15] Yokobori T, Suzuki S, Tanaka N, et al. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1 [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(1):48-54.
- [16] Cao J, Liu J2, Xu R, et al. MicroRNA-21 stimulates epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis in clear cell renal cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 13. doi: 10.3892/mmr.2015.4568. [Epub ahead of print]
- [17] Wang D, Fan Z, Liu F, et al. Hsa-miR-21 and hsa-mir-29 in tissue as potential diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4):1454-1462.
- [18] Winther M, Alsner J, Tramm T, et al. Evaluation of miR-21 and miR-375 as prognostic biomarkers in esophageal cancer [J]. *Acta Oncol*, 2015, 54(9):1582-1591.
- [19] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(15):2128-2136.
- [20] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2):647-658.
- [21] Song B, Wang C, Liu J, et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29:29.

• 论 著 •

靶向 *c-myc* 基因的 siRNA 基因干扰对大肠癌 Lovo 细胞增殖与凋亡的影响刘集鸿^{1*} 蒋楠楠¹ 张丽科¹ 邓宁²

【摘要】 目的 阐述靶向 *c-myc* 基因的 siRNA 基因转染干扰对大肠癌 Lovo 细胞增殖与凋亡的影响作用。 方法 将靶向 *c-myc* 基因的 siRNA 片段转染入大肠癌 Lovo 细胞, 特异沉默 *c-myc* 基因, 通过实时荧光定量 PCR 法检测 *c-myc* mRNA 表达水平, 原位末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 检测肿瘤细胞凋亡情况及噻唑蓝法 [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 检测细胞的增殖能力。 结果 经过转染的 Lovo 细胞组与未转染的对照组 *c-myc* mRNA 表达量比率为 0.22:1, *c-myc* mRNA 表达量比例有统计学差异 ($P<0.05$)。经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组的凋亡指数分别为 32.4% 与 65.4%, 具有显著性统计学差异 ($P<0.01$)。MTT 检测经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组的细胞增值率, 分别为 79.28% 与 38.32%, 具有极其显著性统计学差异 ($P<0.001$)。 结论 将靶向 *c-myc* 基因的 siRNA 片段转染入大肠癌 Lovo 细胞, 特异沉默 *c-myc* 基因, 从而证实 *c-myc* 抑制大肠癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡的作用, 从而为大肠癌的基因治疗寻求更多的治疗靶点。

【关键词】 Survivin; *hTERT*; *c-myc*; 大肠癌; Lovo 细胞; 转染; 凋亡

The effect of the interference on the siRNA with targeted *c-myc* gene on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer Lovo cell

LIU Jihong^{1*}, JIANG Nannan¹, ZHANG Like¹, DENG Ning²

(1. Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Huizhou City, Huizhou, Guangdong, China, 516001;

2. Guangdong Key Laboratories on Molecular Immune Antibody Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510632)

【ABSTRACT】 Objective To study the effects that interference of the siRNA with targeted *c-myc* gene has on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer Lovo cell. Methods The siRNA clips with targeted *c-myc* gene was transfected into the colorectal cancer Lovo cells, then the specific *c-myc* gene was specifically silenced. The *c-myc* mRNA expression level was detected using realtime-fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), and the apoptosis of the tumor cell was detected through the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method, while the proliferation of the tumor cell was detected through the 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) method. Results The rate of the expression of the *c-myc* mRNA of the transfected Lovo cell group and non-transfected group was 0.22:1, which was statistically significant ($P<0.05$). The indices of apoptosis of the transfected Lovo cell group and non-transfected group were 32.4% and 65.4%, respectively, which was also statistically significant ($P<0.01$). The rates of the cell proliferation detected by MTT of the transfected Lovo cell

基金项目: 惠州市 2012 年科技计划 (2012Y056)

作者单位: 1. 惠州市第一人民医院检验科, 广东, 惠州 516001

2. 暨南大学广东省分子免疫与抗体工程重点实验室, 广东, 广州 510632

*通讯作者: 刘集鸿, E-mail: liujihong251@163.com

group and non-transfected group were 79.28% and 38.32%, respectively, which was extremely statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion** After being targeted with the siRNA, and transfected into the colorectal cancer Lovo cells and silenced specifically, the *c-myc* gene inhibits the proliferation and induces the apoptosis of colorectal cancer cells, and could provide more therapeutic targets for gene therapy of colorectal cancer.

[KEY WORDS] *Survivin*; *hTERT*; *c-myc*; Colorectal cancer; Lovo cells; Transfection; Apoptosis

大肠癌是严重威胁人类生命健康的常见肿瘤之一,我国大肠癌的发病率呈逐年上升的趋势,尽管采用手术、放疗、化疗等综合治疗的方法,但是疗效并不乐观,而基因免疫治疗有其独特的优势。相关研究推测,*c-myc*、*Survivin*及*hTERT*等基因在大肠癌的发生发展中起协同作用^[1]。*c-myc*癌基因属核蛋白基因,具有转化细胞的能力,并具有与染色体DNA结合的特性,在调节细胞生长、分化及恶性转化中发挥作用。现有研究证实,*c-myc*在大肠癌发生发展中发挥重要的调控作用^[2]。研究提示*Survivin*可能参与*c-myc*激活,从而上调*hTERT*,而相关研究推测*c-myc*可能是*Survivin*的上游调控基因,*Survivin*、*hTERT*、*c-myc*致大肠癌细胞凋亡的分子机制目前尚未完全阐明^[3]。

现有研究证实,*Survivin*、*hTERT*、*c-myc*在大肠癌组织中均有阳性表达,并且三者的阳性表达呈正相关,提示原癌基因*c-myc*激活、*Survivin*表达上调及端粒酶活性的增强,可能在大肠癌发生机制中起协同作用^[4-5]。本课题将靶向*c-myc*基因的siRNA片段转染入大肠癌Lovo细胞,特异沉默*c-myc*基因,验证*c-myc*抑制大肠癌细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用,并探讨促使细胞凋亡的分子机制,从而为大肠癌的基因治疗寻求更多的治疗靶点。现报告如下:

1 材料和方法

1.1 研究对象

体外培养大肠癌Lovo细胞,细胞株由暨南大学广东省分子免疫与抗体工程重点实验室提供。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要试剂与耗材

RP-1640培养液(GBICO,美国);新生牛血清(GBICO,美国);转染试剂Lipofectamine2000(Invitrogen,美国);miScriptReverseTranscriptionkit(QIAGEN,德国);TRIzol(Invitrogen,美国);胰酶(GBICO,美国);蛋白裂解液(上海碧云天生物技

术有限公司);Zx蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司);*c-myc*引物序列为:上游引物5'-TAT AGA CTC GAG CGG AGT CAT GGG-3',下游引物5'-AAG TCA GGA AGG CAG TGA TCG CAA-3'生工生物工程(上海)股份有限公司,上海];TaqMan探针:FAM-TTT TCG TCC GAC TCC CCG TAG GCC GTA TAC GGC-TEMRA(FAM、TEMRA为荧光素);PCR试剂盒(ABI,美国)RNA上样缓冲液(上海杰美基因医药科技有限公司);RNA电泳液(Amresco,美国);二甲基亚砷(Sigma,美国);6孔、96孔细胞培养板(GBICO,美国);1.5 mL、0.5 mL EP管;1 mL、0.2 mL、10 μ L移液枪头(Eppendorf,德国);0.2 μ m, 20 $\times$ 20 cm PVDF膜(Bio-Rad,美国)。

1.2.2 主要仪器

VD650超净工作台(苏州净化工作台设备有限公司),1 mL、0.2 mL、10 μ L移液枪(Eppendorf,德国),CFX96 TouchReal-time PCR仪(Bio-Rad,美国),MCO-20AICCO₂细胞培养箱(Sanyo,日本),5804R低温高速离心机(Eppendorf,德国),ECP3000电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),Multiskan FC酶标仪(Thermo,美国),IX71倒置显微镜(OLYMPUS,日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

Lovo细胞株用含10%新生牛血清RPMI1640培养液置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱内培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况,传代培养。

1.3.2 构建siRNA片段并转染入Lovo细胞

首先在GeneBank中查的*c-myc*基因的全序列,用siRNA设计软件初筛6对GC比在40%~50%之间的siRNA,把所得序列挑选1条交生工生物工程(上海)股份有限公司,体外合成靶向*c-myc*基因的siRNA和1条阴性对照siRNA。序列如下:*c-myc*-siRNA正义链:5'-AACAGGCUUGGUCCACUGC-3'对照-siRNA正义链:5'-GGUAGCAUUGCU-AUGGGCG-3'采用Invitrogen公司介导的脂质体

转染技术转染。转染前 24 h 把 Lovo 细胞消化并接种适量于 6 孔板上 1640 培养基培养, 24 h 后把 siRNA 和 Lipofectamine2000 以合适计量加入每孔细胞, 混匀, 37℃ 培养 24 h 后, 弃去培养液, 换用含 10% 新生牛血清的 1640 培养基继续培养 48 h 后, 观察效果。本实验在暨南大学广东省分子免疫与抗体工程重点实验室进行。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 法 (realtime-fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 *c-myc* mRNA 表达水平

依据 PCR 试剂盒说明书, 按照说明书步骤操作进行, 按照文献^[6] RT-PCR 方法检测。用 Trizol 试剂提取培养的转染的细胞, 提取未转染的细胞作为对照组, 提取总 RNA, 加入 Trizol 1 mL, 氯仿 0.2 mL, 离心取上清加入 0.4 mL 异丙醇, 离心弃上清, 70% 乙醇沉淀, 凝胶电泳仪测 RNA 浓度, 分光光度计检测纯度^[6]。未转染的细胞与转染的细胞分别设 5 个重复组, 通过用 PCR 仪, 制备 cDNA, 具体反应体系和时间为: 10 μ L RNA, 20 μ L 反应液, 37℃ 1 h, 95℃ 3 min。RT-PCR 实验反应体系: 5 $\times$ 缓冲液 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 探针 1 μ L, 核苷 1 μ L, Taq 酶 1 μ L, cDNA 5 μ L, 三蒸水 30 μ L, 总体积 50 μ L。反应时间为: 93℃ 预变性 5 min; 93℃ 45 s, 55℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 5 min; 4℃ 终止。

样本中 *c-myc* mRNA 模板拷贝数。设定大于 40 个循环仍无荧光信号明显增加的样本, *c-myc* mRNA 表达为阴性, 数值以“0”计入统计资料。分析溶解曲线, 确定阴阳性结果。

1.3.4 细胞检测方法

采用原位末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 检测肿瘤细胞凋亡情况以及噻唑蓝法 [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 检测细胞的增殖能力。

转染培养的 Lovo 细胞消化后, TUNEL 法检测肿瘤细胞, 按照厂家提供的 TUNEL 试剂盒说明完成操作, 以未转染细胞作为阴性对照, 阴性对照以稀释液代替酶溶液。凋亡细胞形态可见细胞完整, 体积缩小, 固缩成团, 随机选个视野, 高倍镜下计数凋亡细胞占肿瘤细胞的比例, 即为凋亡指数 (apoptosis index, AI)。

转染培养的 Lovo 细胞消化后, 加入 20 μ L MTT, 孵育 30 min 后加入二甲基亚砷 (dimethyl

sulphoxide, DMSO) 终止反应, 酶标仪测定结果, 以未转染细胞作为阴性对照。本实验在暨南大学广东省分子免疫与抗体工程重点实验室进行。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计描述和分析, 符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间的比较采用 *student-t* 检验。若方差不齐, 则组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染培养的 Lovo 细胞

如图 1 所示, 转染培养的 Lovo 细胞在显微镜下显示 ($\times 500$), 细胞生长状况良好。

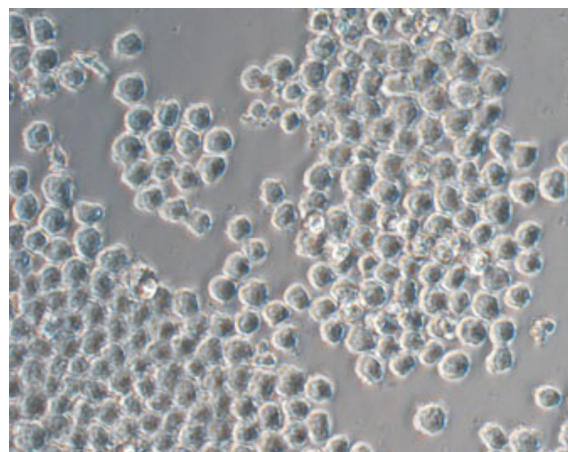


图 1 Lovo 细胞 (倒置显微镜, $\times 500$)

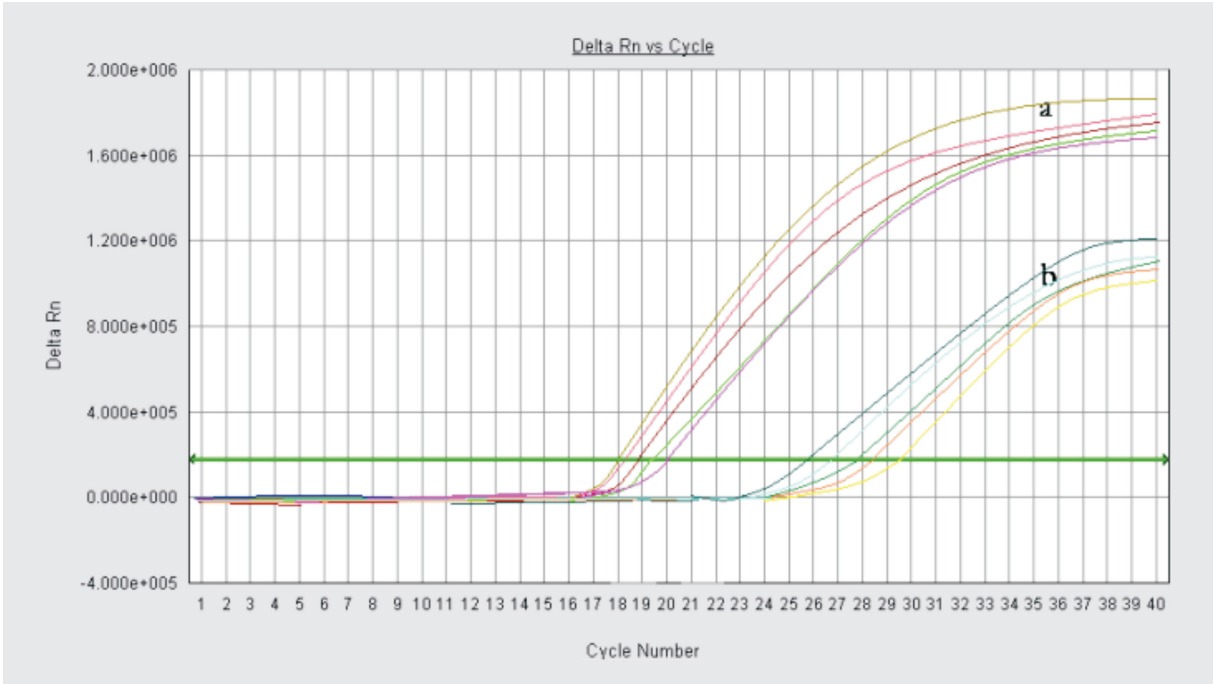
Figure 1 Lovo cell (inverted microscope, $\times 500$)

2.2 *c-myc* mRNA 表达水平

RT-PCR 结果如下图 2 所示。作为对照的未转染的 Lovo 细胞, *c-myc* 溶解曲线呈现 S 型扩增曲线, 结果显示为阳性, 转染的 Lovo 细胞 *c-myc* 结果为阴性。由各自的 Ct 值算出对照组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为 1, 转染组为 0.22 (表 1), 显示转染组的 *c-myc* mRNA 的表达量是对照组的 0.22 倍, 说明转染组的 *c-myc* 表达量比未转染的表达量显著降低, 结果指示靶向 *c-myc* mRNA 的 siRNA 片段基因干扰成功。

2.3 转染与未转染 Lovo 细胞 *c-myc* mRNA 表达情况

经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组 *c-myc* mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比值为 0.22:1, $P = 0.012$, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 指示靶向 *c-myc* mRNA 的



a: 未转染细胞; b: 转染细胞
图2 Lovo 细胞 *c-myc* mRNA RT-PCR 结果

Figure 2 *c-myc* mRNA were dectectd by RT-PCR in Lovo cells

siRNA 片段构建并转染成功。经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组的凋亡指数分别为 32.4%与 65.4%, 转染的细胞与未转染的细胞凋亡指数相比, $P=0.012$, 具有显著性统计学差异 ($P<0.01$), 指示靶向 *c-myc* mRNA 的 siRNA 片段基因干扰成功, *c-myc* 基因具有诱导细胞凋亡的作用。MTT 检测经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组的细

胞增值率, 分别为 79.28%与 38.32%, 转染的细胞与未转染的细胞增值率相比, $P=0.009$, 具有极其显著性统计学差异 ($P<0.001$), 指示靶向 *c-myc* mRNA 的 siRNA 片段基因干扰成功, *c-myc* 基因具有抑制细胞增殖的作用。转染与未转染 Lovo 细胞 *c-myc* mRNA 的拷贝数、凋亡指数、增值率都具有统计学意义(表 1)。

表 1 转染与未转染 Lovo 细胞 *c-myc* mRNA 表达情况
Table 1 The expression statuses of *c-myc* mRNA in the transfection and non-transfection Lovo cells

Lovo 细胞	检测数	2- $\Delta\Delta C_t$	凋亡指数(%)	增值率(%)
转染	5	0.22 [*]	32.4 ^{***}	79.28 ^{***}
未转染	5	1	65.4%	38.32
<i>P</i>		0.012	0.0012	0.0009

^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$

3 讨论

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤, 严重威胁人类的生命健康。随着我国国民生活水平的提高, 饮食结构的改变, 大肠癌的发病率呈逐年升高趋势, 我国大肠癌发病率位于恶性肿瘤的第 3 位, 而病死率位于第 5 位^[7]。近年来随着吻合器的广

泛应用及各种新式化疗药物的出现, 国际上很多学者建议采用在手术治疗的基础上辅助以化疗、放疗、同步放化疗、生物治疗和中医药治疗等在内的一系列综合治疗手段, 明显地提高了大肠癌治疗效果^[8]。
c-myc 基因目前是公认的癌基因, 在多种恶性肿瘤中 *c-myc* 都呈高表达。有研究表明, *c-myc* 和

EGFR 基因在鼻咽癌中不仅存在过度表达,而且有拷贝数增加,并认为 8q24 的 *c-myc* 基因是鼻咽癌中最初被激活的靶基因^[9-10]。因此,特异性下调 *c-myc* 基因的过度表达在对抗鼻咽癌的过程中可能是一个潜在的治疗性策略。Li 等^[11]研究发现大肠癌中 *c-myc* 表达明显高于大肠腺瘤和正常组织。陶凯雄等^[12]用葡聚糖磁性纳米微粒作为基因载体,进行磁控靶向 RNA 干扰抑制大肠癌细胞癌基因 *c-myc* 表达的研究,牛朝霞等^[13]用构建好的小干扰 RNA 载体,转染细胞后研究抑制内源性原癌基因 *c-myc* 表达对鼻咽癌细胞 5-8F 的影响。本实验使用的是 siRNA 直接转染沉默 *c-myc* 基因,与之前的构载体的基因治疗方法相比,有着强大的优势,微量的 siRNA 即可使其编码致病基因产物的含量下降 90% 以上^[14]。尽管注入细胞的 siRNA 的浓度远低于体内同源 mRNA 的水平,却足以产生强大的干扰效应^[15]。siRNA 干扰方法减少了传统基因治疗方法大剂量用药带来的毒副作用及免疫效应,为癌症的治疗带来了新的希望^[16]。本研究结果显示,转染与未转染 Lovo 细胞 *c-myc* mRNA 的 2- $\Delta\Delta C_t$ 表达比值、凋亡指数、增值率都具有统计学意义。经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组 *c-myc* mRNA 表达量相比显著降低,说明靶向 *c-myc* mRNA 的 siRNA 片段构建并转染成功。经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组的凋亡指数相比显著降低,说明靶向 *c-myc* mRNA 的 siRNA 片段基因干扰成功,并且验证了 *c-myc* 基因的诱导细胞凋亡的作用。MTT 检测经过转染的 Lovo 细胞与未转染的对照组的细胞增值率相比显著升高,说明靶向 *c-myc* mRNA 的 siRNA 片段基因干扰成功,并且验证了 *c-myc* 基因的抑制细胞增殖的作用。本研究特异沉默 *c-myc* 基因,从而证实 *c-myc* 具有抑制大肠癌细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用。通过基因沉默与干扰的方式,可以抑制大肠癌细胞的生长,从而为大肠癌的基因治疗寻求更多的治疗靶点。

21 世纪以来,临床多学科工作团队(multidisciplinary team, MDT)逐渐成为国际上肿瘤治疗的主流模式。MDT 是建立在循证医学基础上的由多个相关学科、相对固定的专家组成工作组,针对某一器官或系统疾病,通过定期、定时、定址的会议形式,提出适合患者病情的最优治疗方案,继而由相关学科单独执行或多学科联合执行治疗方

案,其不但能够提供给患者个体化的治疗,而且能够更加高效地治疗肿瘤患者^[17]。日本国立癌症中心,“Tumor Board”与 MDT 相似,由各相关学科医生组成团队,经团队讨论后并由其提供治疗方案,将基础研究与肿瘤多学科治疗联系起来,并提升临床研究质量,使大肠癌治疗效果能够更上一层楼^[18]。临床与科研与多学科的联合治疗,是未来治疗肿瘤的主流模式,也是我们致力的方向。

目前相继报道有小分子 Aurora-A 抑制剂,实验发现它们具有抗肿瘤活性,Aurora-A 有可能成为肿瘤治疗的一个新靶点^[19]。本研究特将靶向 *c-myc* 基因的 siRNA 片段转染入大肠癌 Lovo 细胞,特异沉默 *c-myc* 基因,从而证实 *c-myc* 抑制大肠癌细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用,从而为大肠癌的基因治疗寻求更多的治疗靶点。*c-myc*、*Survivin* 及 *hTERT* 等基因在大肠癌的发生发展中起协同作用作用机制本实验室仍然在研究,在未来的研究中,我们会注重协同作用机制方面的内容的研究,争取在大肠癌的基因治疗征程上寻求更多的治疗靶点。

参考文献

- [1] 赵佳. *Survivin* 与 β -catenin 在大肠腺癌中的表达及意义[D]. 辽宁医学院, 2014, 1-47.
- [2] Woo S, Krzyzanski W, Jusko WJ. Pharmacodynamic model for chemotherapy - induced anemia in rats [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(1): 123-133.
- [3] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. *Survivin* initiates procaspase-3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, 19(10): 1346.
- [4] Han-seong K, Katsuya S, Suang-hye P. Expression of *Survivin* in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(2A): 805-808.
- [5] Yu J, Leung WK, Ebert MP, et al. Increased expression of *survivin* in gastric cancer patient and in first degree relative [J]. *Br J Cancer*, 2002, 81(1): 91.
- [6] 刘集鸿, 李旭艳, 钟选芳, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应检测大肠癌生存素基因 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 7(31): 634-638.
- [7] 宋天强. 结直肠癌肝转移的治疗进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(4): 183-186.

(下转第 118 页)

· 论 著 ·

细胞蜡块宫颈液基细胞 P16 在检测宫颈肿瘤中的作用

刘镜文^{1*} 陈莉² 吴秋良³

【摘要】目的 探讨细胞蜡块 P16 检测在宫颈液基细胞学中的应用价值。**方法** 采用标准化病人(standardized patient, SP)免疫组织化学的方法对 180 例细胞学标本进行 P16 检测。**结果** P16 在未见上皮内病变细胞(negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM)、未明确诊断意义的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cell of undetermined significance, ASC-US)、不除外高度病变的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cells, cannot exclude a high-grade squamous intraepithelial lesion, ASC-H)、低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)、高度鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)和鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)中的阳性率分别为 0%、5.63%、60.00%、30.23%、100.00% 和 100.00%。在 180 例患者中,只有 73 例有组织活检的结果,其中 P16 阳性的为 48 例,宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)CINII 级及以上病变患者为 33 例;P16 阴性的有 25 例,无 CINII 级及以上病变。**结论** 利用细胞蜡块 P16 免疫组织化学染色,显示 P16 的表达与宫颈癌的发生和发展相关,因此可用于宫颈癌的病变分级,也可作为辅助诊断指标应用于宫颈病变的筛查。

【关键词】 宫颈肿瘤;液基细胞学;免疫组织化学;细胞蜡块;P16

The detection of P16 in cervical tumor saved in wax block by cervical fluid cytology

LIU Jingwen^{1*}, CHEN Li², WU Qiuliang³

(1. Department of Pathology, the First Maternal and Child Health Hospital of Huizhou, Huizhou, Guangdong, China, 516000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Humen Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523900; 3. Department of Cancer Prevention and Control, Sun Yat-Sen university, Guangzhou, Guangdong, China, 510060)

[ABSTRACT] Objective To evaluate the significance of the expression of P16 in cellular wax block liquid based cytology of cervical screening. **Methods** Standardized patient (SP) immunohistochemistry detection of protein P16 was performed on 180 specimens. **Results** The positive rates of P16 in negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM), atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US), atypical squamous cells, cannot exclude a high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and squamous cell carcinoma (SCC) were 0%, 5.63%, 60.00%, 30.23%, 100.00% and 100.00%, respectively. There were only 73 patients who received the results of the biopsy, including 48 positive cases of P16 [with 33 cases of cervical intraepithelial neoplasia II (CIN II) or above] and 15 negative cases of P16 (with no CIN II or above). **Conclusion** Cellular wax block P16 immunohistochemistry staining revealed that the expression of P16 protein was connected with the occurrence and development of cervical cancer, which may be used in the lesion classification of cervical cancer, and used as the auxiliary diagnostic indexes in the screening of cervical lesions.

[KEY WORDS] Cervical tumor; Liquid based cytology; Immunohistochemistry; Cellular wax block; P16

作者单位:1. 广东省惠州市第一妇幼保健院病理科,广东,惠州 516000

2. 广东省东莞市虎门医院妇产科,广东,东莞 523900

3. 广东省广州市中山大学肿瘤防治中心病理科,广东,广州 510060

*通讯作者:刘镜文, E-mail:6615151@qq.com

液基细胞学检测相比较传统的巴氏涂片法,具有细胞结构清晰、背景干净的优点,但由于人工阅片,受人为因素制约,同时常常存在不明确意义的非典型鳞状上皮细胞等不明确的诊断,所以存在一定的假阳性和漏诊率^[1]。目前主张实行联合筛查方案,即人乳头瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)检测及液基细胞学检测同时应用进行宫颈癌的筛查。HPV是引起宫颈癌和癌前病变的主要原因,HPV通过合成一系列致癌蛋白干扰正常的细胞调控,如致癌蛋白E7引起的细胞周期调节蛋白PRb功能失活,破坏了PRb与肿瘤抑制因子P16之间的反馈环,使P16的特异性过度表达,从而导致细胞增生异常、遗传变异和转化。P16基因是继P53之后后发现的另一个抑癌基因,目前认为P16的抑癌作用较P53更为直接^[2]。该基因的失调可导致细胞可无限制地扩增、生长,从而最终向肿瘤细胞转化。国内外大量研究表明:在正常宫颈组织中,P16蛋白表达为阴性,而在宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)CINI、CINII、CINIII、浸润癌组均有表达,且随着病变组织学分级的增加,阳性表达率及染色强度呈升高趋势^[3]。目前该基因大量应用于宫颈活检组织中,用于鉴别宫颈上皮病变及萎缩等良性病变。本研究结合细胞蜡块的技术方法,旨在探讨P16蛋白表达的指标作为宫颈液基细胞学筛查辅助的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2013年11月至2014年11月期间在广东省惠州市第一妇幼保健院门诊就诊的180例宫颈病变患者,用一次性标本采集刷在宫颈口旋转采集,将刷头放入装有10 mL固定保存液的小瓶中。经TIB-AutoPrep1800沉降式全自动液基薄层细胞制片染色系统程序化处理,制成直径为1 cm的液基薄层细胞涂片。上述病变经宫颈细胞学诊断为非典型鳞状细胞(atypical squamous cells, ASC)及以上病变,或经免疫细胞学诊断为鳞状上皮内病变(squamous intraepithelial lesion, SIL)及炎症,均通过病理医师采用美国Cytic公司的thingpath2000技术,巴氏染色,并按照2001年版Bethesda分级系统(the Bethesda system, TBS)诊断为标准确诊。上述诊断结果由2位高年资病理医

师双盲复诊阅片,并做出一致的诊断。SIL指子宫内皮在增生过程中出现的异常上皮细胞增长。患者年龄为22岁~63岁,平均年龄为(40±4)岁。所有病例均无宫颈锥切和子宫切除史及其他慢性消耗性疾病。

1.2 方法

1.2.1 宫颈细胞学收集方法

采用Thinprep液集基细胞学检测法(thinprep cytologic test, TCT),用专用细胞刷采集宫颈上皮细胞刷入TCT保存液,经Thinprep2000系统,制成直径为1 cm的薄层细胞学涂片,95%酒精固定,巴氏染色。

1.2.2 细胞学诊断

用ThinPrep液基薄层细胞学检测系统来筛查宫颈病变,由细胞学专职人员阅片,采用TBS诊断分级系统(2001年修订)^[4]。

1.2.3 P16免疫组化检测

先收集脱落细胞,利用离心沉淀、蛋白固定的方法,使细胞成块,经过脱水、包埋程序制作成片,用宫颈HELA细胞作为阳性对照,采用的P16抗体来自福州迈新生物技术开发有限公司。在光学显微镜下对涂片染色进行评估。光镜下P16阳性物质位于细胞核内和(或)细胞质中,以细胞核或者细胞质染成粉色或棕黑色为阳性。根据异型细胞是否着色和着色细胞数来判断P16蛋白的表达:1张涂片中至少5个异型细胞显示胞核着色(不伴或伴有包浆着色)判读为阳性;异型细胞主要表现在核浆比增大,胞核占整个细胞大小的一半以上;染色质异常,胞核淡染或深染,染色质分布不均成块状或颗粒状;胞核形状不规则,呈锯齿状或有较大凸起或凹陷;细胞聚集排列成条索状、片状,大小、形态不一。反之,着色的异型细胞数少于5个或没有异型细胞着色判读为阴性。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分比表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TBS分类结果

按TBS分类,可将所采集的180例细胞学标本分为6大类:未见上皮内病变细胞(negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM)21例、未

明确诊断意义的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cell of undetermined significance, ASC-US)71例、不排除高度病变的非典型鳞状上皮细胞(atypical squamous cells, cannot exclude a high-grade squamous intraepithelial lesion, ASC-H)5例、低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL)43例、高度鳞状上皮内病变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)38例和鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)2例。

2.2 宫颈脱落细胞中 P16 的表达

免疫组化实验后光学显微镜下对涂片染色进行评估,结果显示在 NILM、ASC-US、ASC-H、LSIL、HSIL 和 SCC 中的阳性率分别为 0、5.63%、60.00%、30.23%、100.00%和 100.00%(表 1)。P16 在 HSIL 中的阳性表达率达到 100.00%,远大于其在 LSIL 中的阳性表达率 30.23%,两者差异有统计学意义($P=0.00756<0.01$)。ASC-H 的阳性率明显高于 ASC-US 组($P=0.000342<0.01$)。ASC 和

表 1 宫颈脱落细胞中 P16 的表达情况(n, %)

Table 1 The expression of P16 in cervical cells(n, %)

细胞学诊断	P16 的表达		
	总例数	阳性例数	百分率(%)
NILM	21	0	0
ASC-US	71	4	5.63
ASC-H	5	3	60.00
LSIL	43	13	30.23
HSIL	38	38	100.00
SCC	2	2	100.00

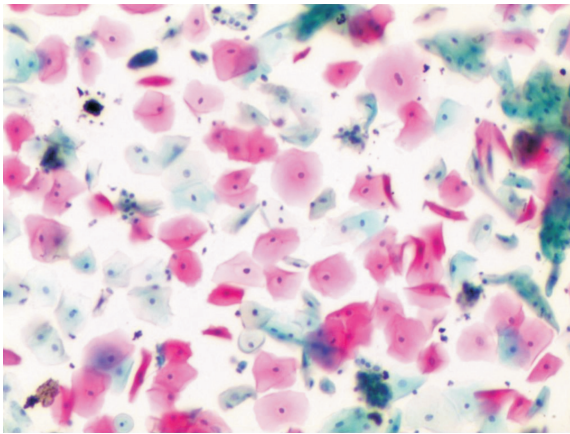


图1 NILM 中 P16 的表达(光学显微镜, 10×10)
Figure 1 The expression of P16 in NILM (light microscope, 10×10)

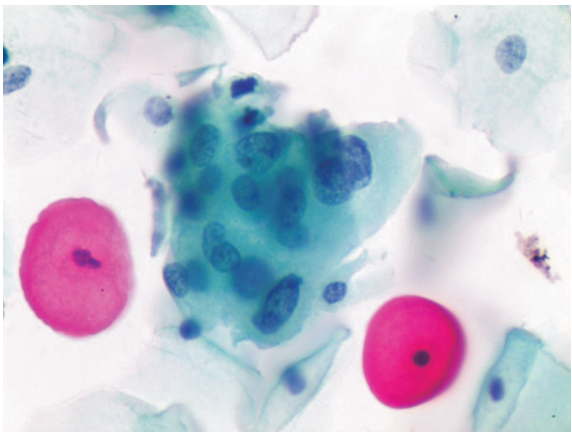


图2 ASC-US 中 P16 的表达(光学显微镜, 10×40)
Figure 2 The expression of P16 in ASC-US (light microscope, 10×40)

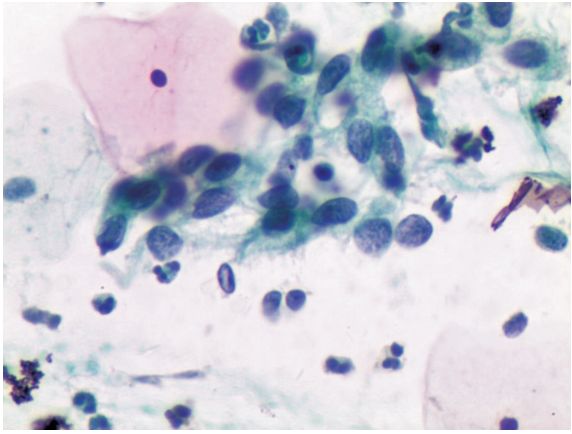


图3 HSIL 中 P16 的表达(光学显微镜, 10×10)
Figure 3 The expression of P16 in HSIL (light microscope, 10×10)

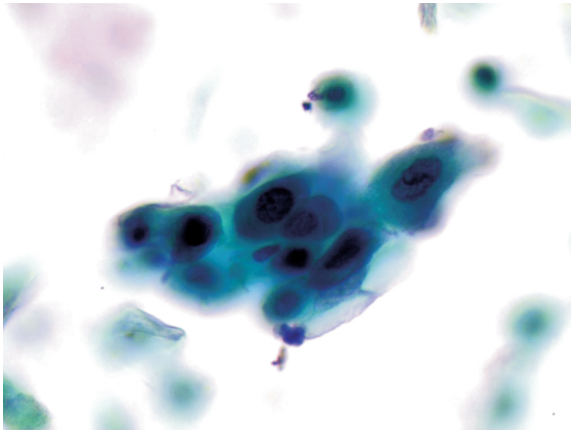


图4 ASC-H 中 P16 的表达(光学显微镜, 10×40)
Figure 4 The expression of P16 in ASC-H (light microscope, 10×40)

LSIL 细胞着色明显弱于 HSIL, P16 在 LSIL 中散在阳性, 而在 HSIL 中弥漫表达, 且在胞核和胞质均着色, 染色强度也随着宫颈病变程度的加重而增强, 表达强度与病变级别呈正相关(图 1~图 4)。

2.3 组织学与细胞学标本诊断的比较

在 180 例宫颈液基细胞学涂片中, 只有 73 例有组织活检的结果, 其中液基细胞学涂片免疫组化染色 P16 蛋白阳性的为 48 例, 其中 33 例组织学检测结果为 CINII 级及以上病变; P16 阴性的有 25 例, 无 CINII 级及以上病变。

而这 73 例有组织活检的结果中: 液基细胞学诊断为 ASC-US 而组织学诊断为 CINII 级及以上病变的有 8 例, 其中 6 例可见 P16 蛋白阳性染色的异型细胞; 液基细胞学诊断为 LSIL 而组织学诊断为 CINII 级及以上病变的有 13 例, 其中 7 例为非典型细胞 P16 蛋白阳性染色; 液基细胞学诊断为 ASC-H, 而组织学诊断为 CINII 级及以上病变的有 5 例, 其中 3 例可见 P16 蛋白阳性染色, 余 2 例 P16 蛋白染色为阴性; 细胞诊断为 HSIL 组织学诊断为 CINII 级及以上的病变 5 例, 其中 2 例可见 P16 蛋白染色的异型细胞; 液基细胞学诊断为 SCC 组织学诊断为 CINII 级及以上病变为 2 例, 具体结果见表 2。

表 2 P16 阳性病例的细胞学和组织学诊断对比
Table 2 The comparison of detection on P16 in positive cases by cytology and histology

细胞学诊断	合计	组织学诊断			
		炎症	CIN 1	CIN2	CIN3
ASC-US	16	0	8	5	3
LISIL	17	0	4	8	5
ASC-H	5	0	0	3	2
HSIL	8	0	3	3	2
SCC	2	0	0	1	1
总数	48	0	15	20	13

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 发病率在女性恶性肿瘤中居第 2 位, 仅次于乳腺癌^[5-6]。据世界范围统计, 每年估计有 46.6 万的宫颈癌新发病例, 其中 80% 发生在资源欠缺的发展中国家, 其中亚洲占 23.5 万, 中国估计有近 10 万新发病例, 约占世界新发病例总数的 1/5^[7]。需要指出

的是, 每年新发的近 50 万宫颈癌病例还只是冰山一角, 据估计全球宫颈癌高度癌前病变的妇女有 1 000 万例, 低度子宫病变的有 3 000 万例^[7]。我国大部分城市妇女由于缺乏有组织的筛查计划和医学知识, 同样也面临着宫颈癌的严重威胁。特别是我国中西部农村, 由于缺乏资金和医疗技术, 宫颈癌是妇女的主要卫生问题之一。我国每年约有 3 万名妇女死于宫颈癌^[8]。目前我国花了大量的人力物力进行宫颈癌的筛查, 我们东莞市从 2012 年开始也由政府出巨资免费为 35 岁~59 岁的适龄妇女进行宫颈癌和乳腺癌的筛查, 但是, 目前的筛查方案确诊一个宫颈癌的患者需要做 4 个检查, 3 次取材, 确诊周期较长, 共需要检查费用 1 000 多元, 因此探讨宫颈癌筛查的更佳方案显得尤为重要。

研究发现, P16 在 CIN 和宫颈癌中过量表达, 更有实验证明随着病变加重 P16 的表达呈动态变化^[8]。近年来关于多种癌抑制基因的研究表明, *P16INK4A* 基因参加细胞周期调控, 与肿瘤形成和发展直接相关, 所以认为 P16 蛋白表达虽然尚不能替代高危型人乳头状瘤病毒检测, 但仍可作为宫颈癌病变程度的指标, 为筛查和预后治疗提供依据^[9-10]。它作为辅助的生物学标志物, 检测方法简单、易于操作、且费用较低, 具有广阔的应用前景^[11]。

本文利用细胞蜡块及免疫组化技术的优势, 检测宫颈液基薄层细胞学阳性标本中 P16 蛋白的表达, 行 P16 检测的同时, 患者仍然按目前宫颈癌筛查步骤进一步检测、确诊。由本文实验结果可见, 从 ASC-UC 到 HSIL 的各级别病变中, P16 的阳性率逐步增高, 在 ASC-H 和 HSIL 的阳性表达率极高, 且大多呈强阳性的表达, P16 的着色强度随病变的严重度而递增, 而 ASC-H 和 HSIL 多为弥漫整片细胞表达, 且在胞核和胞质均着色, 染色强度也随着宫颈病变程度的加重而增强, 可见 P16 蛋白的表达与 CINII 级及以上病变具有较高的相关性, 即将 P16 蛋白的表达指标作为宫颈液基细胞学筛查辅助具有一定的可行性。因此显示出 P16 可以辅助宫颈病变的分级诊断, 从而使不同医师的诊断有一致性, 为临床提供更可靠的依据, 而且通过上述结果更证实了 P16 对宫颈癌前的高度病变和宫颈癌有较高的敏感性。该技术的应用让病理医生能获取更多的诊断信息, 特别对于基层医院病理医生较少的单位尤其适用^[12]。另外, 细胞块切片可以清晰见到组织碎片, 可以帮助判断宫颈病变

的严重程度。因此,我们认为其预测结果与宫颈活检这个金标准来对比,判断该预测结果的可靠程度,可以作为宫颈癌筛查的辅助诊断指标。

参考文献

- [1] Darragh TM, Colgan TJ, Thomas CJ, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of American pathologists and the American society for colposcopy and cervical pathology [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2013, 32(1):76-115.
- [2] 克拉姆. 妇产科诊断病理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007:310-312.
- [3] 黄惠英, 钱德英, 岑坚敏. 免疫组化 P16 蛋白在不同级别宫颈病变中表达差异的研究[J]. *现代医院*, 2008, 8(3):14-15.
- [4] Okadome M, Saito T, Tanaka H, et al. Potential impact of combined high- and low-risk human papilloma-virus infection on the progression of cervical intraepithelial neoplasia 2 [J]. *Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(2):561-569.
- [5] 乔友林, 李静. 子宫颈癌筛查方法新进展[J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(11):3-4.
- [6] 顾依群, 高子芬, 汪颖南, 等. 人乳头状瘤病毒、p16INK4A 在宫颈鳞状上皮病变中的意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2008, 15(4):315-319.
- [7] 梅平, 刘艳辉, 庄恒国, 等. p16INK4a 在宫颈细胞学鳞状上皮内瘤变中的意义[J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(8):521-523.
- [8] Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A. Functional bio-markers in cervical precancer: an overview [J]. *Diagn Cytopathol*, 2010, 38(8):618-623.
- [9] 尚士宣, 赵晓丹, 肖月英. 细胞块切片免疫组化染色在肿瘤细胞学诊断中的应用[J]. *肿瘤基础与临床*, 2010, 23(6):514-515.
- [10] 牟伟. 液基细胞学联合 P16 用于早期宫颈病变诊断的研究进展[J]. *山东医学高等专科学校学报*, 2012, 34(1):69-72.
- [11] 黎哲斌, 魏换娣. TCT、HPV-PCR 和阴道镜在宫颈癌疾病诊断中的应用研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(6):406-409.
- [12] 黄敬皓, 刘争进. TERC/MYC 联合检测在宫颈癌筛查中的临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(5):312-316.
- [8] 崔恒官, 曹秀峰. 手术为主的大肠癌综合治疗[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(16):1774-1780.
- [9] Zhou W, Feng X, Ren C, et al. Over-expression of BCAT1, a c-myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1):53-63.
- [10] Zhang P, Wu SK, Wang Y, et al. p53, MDM2, eIF4E and EGFR expression in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with clinicopathological characteristics and prognosis: a retrospective study [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(1):113-118.
- [11] Li N, Wang J, Shen S, et al. Expression of p53, Ki-67 and c-myc proteins is predictive of the surgical molecular margin in colorectal carcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17(3):479-487.
- [12] 陶凯雄, 夏泽锋, 王国斌, 等. 磁控靶向 RNA 干扰抑制结直肠癌中 Myc 基因表达的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 11(23):1343-1344.
- [13] 牛朝霞, 李宜培, 陈洁, 等. 小干扰 RNA 抑制内源性原癌基因 c-myc 表达对鼻咽癌细胞 5-8F 的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2015, 7(32):614-618.
- [14] Hanari N, Matsubara H, Hoshino I, et al. Combinatorial gene therapy with electrotransfer of midkine promoter-HSV-TK and interleukin-21 [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(4B):2305-2310.
- [15] Schmitz V, Vilanueva H, Raskopf E, et al. Increased VEGF levels induced by anti-VEGF treatment are independent of tumor burden in colorectal carcinomas in mice [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(16):1198-1205.
- [16] Kanagawa N, Niwa M, Hatanaka Y, et al. CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(9):2013-2022.
- [17] Wille-Jørgensen P, Sparre P, Glenthøj A, et al. Result of the implementation of multidisciplinary teams in rectal cancer [J]. *Colorectal Dis*, 2013, 15(4):410-413.
- [18] Hotta T. National cancer center hospital annual report [R]. 2013, 30-37.
- [19] Wu JM, Chen CT, Mohane SC, et al. Aurora kinase inhibitors reveal mechanisms of HURP in nucleation of centrosomal and kinetochore microtubules [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(19):1779-1787.

(上接第 113 页)

• 论 著 •

胰腺浆液性微囊性腺瘤临床诊治观察

原玉芬¹ 张新莲² 张静芳^{1*}

【摘要】目的 分析胰腺浆液性微囊性腺瘤(serous microcystic adenoma of pancreas, SMAP)的临床病理表现,提高诊治率。**方法** 对4例患者临床病史及辅助检查等进行回顾性分析。**结果** 实验室检查显示肿瘤标记物值在正常范围,2例患者血糖值高于正常。肿物大体蜂窝状,镜下可见粗大的纤维组织将其分隔为大小不等的囊腔,囊壁衬覆单层立方上皮。免疫组织化学标记上皮细胞显示EMA、CK7、CK19、CKL和inhibin均为阳性,而HMB45、CgA、MelanA和Vimentin均为阴性。随访时长2到10个月,1例无复发及转移,1例因胰漏等并发症去世,2例失访。**结论** SMAP是发生于胰腺外分泌部的少见肿瘤,临床表现无特异性,结合临床影像学、病理组织学和免疫表型有助于诊断及鉴别诊断。手术切除肿瘤为最有效的治疗方法,但应预防并发症。

【关键词】 胰腺;浆液性微囊性腺瘤;诊断;治疗;病理

Observation of clinical diagnosis and treatment of serous microcystic adenoma of pancreas

YUAN Yufen¹, ZHANG Xinlian², ZHANG Jingfang^{1*}

(1. Department of Pathology, Anyang Tumor Hospital, Anyang, Henan, China, 455000; 2. Department of Dermatology and Venerology, Anyang County Hospital of Traditional Chinese, Anyang, Henan, China, 455000)

【ABSTRACT】Objective To study the clinicopathologic characteristics and diagnosis of serous microcystic adenoma of pancreas (SMAP), and to improve the rate of its diagnosis and treatment. **Methods** Immunohistochemical study was carried out, and the clinical and pathologic features were evaluated in 4 cases. **Results** Laboratory tests indicated that the values of tumor markers were all in normal range, and the blood glucose level was higher than normal in 2 patients. The form of a honeycomb was observed, and fibers divided the tumor into multiple small cysts lined by simple layer cells. The tumor cells were positive for EMA, CK7, CK19, CKL and inhibin, and negative for HMB45, CgA, MelanA and Vimentin. In the follow up from 2 to 10 months, 1 cases had no recurrence or metastasis, 1 case died of pancreatic leakage, and 2 case did not follow up. **Conclusion** SMAP is a rare tumor of the exocrine pancreas which has no special clinical manifestations. Histopathological and immunohistochemical features combined with clinical history, radiological imaging was helpful in making a serous microcystic adenoma diagnosis. Surgical removal is the most effective treatment of SMAP.

【KEY WORDS】 Pancreas; Serous microcystic adenoma; Diagnosis; Treatment; Pathology

胰腺浆液性微囊性腺瘤(serous microcystic adenoma of pancreas, SMAP)是一种少见的胰腺外分泌良性肿瘤,好发于中老年女性,通常为单发,最常见于胰腺体尾部^[1]。临床症状为非特异性,以腹痛最为多见,少数无症状,于体检发现^[2]。镜下见

SMAP主要由大小不等的小囊组成,囊内壁衬覆单层立方或扁平上皮细胞,胞质透亮,细胞异型性小^[3-4]。因其罕见且良恶性鉴别较困难,所以对其诊治仍存在争议。本文现报道4例SMAP,并复习相关文献,总结其临床特点及辅助检查特点,特别

作者单位:1. 安阳市肿瘤医院病理中心,河南,安阳 455000

2. 安阳县中医院皮肤性病科,河南,安阳 455000

*通讯作者:张静芳, E-mail: 809222100@qq.com

是临床病理学特征、免疫表型,以加深对其认识,提高诊治率。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集安阳肿瘤医院2008年10月~2015年8月手术治疗的4例胰腺SMAP。4例SMAP患者中,女性3例,男性1例,年龄分别为51岁、58岁、65岁和67岁,平均60岁。肿瘤位于胰体尾1例,胰头1例,胰尾1例,胰头颈交界处1例。其中1例为门诊病例,其余3例均以腹胀伴不同程度腹痛或纳差为主诉就诊。

1.2 方法

标本经10%中性缓冲福尔马林固定,石蜡包埋,常规制片。免疫组化染色采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(streptavidin-peroxidase, SP法),所用一抗有inhibin、CK19、CK7、CKL、EMA、HMB45、CgA、MelanA、Vimentin,均购于福州迈新生物技术开发有限公司,胞质或胞膜棕色的细胞为阳性染色,以瘤周正常组织为对照。

2 结果

2.1 临床随访及影像学检查

所有患者均行手术治疗,肿物完全切除,1例伴发肝囊肿和肾囊肿。随访2~10个月1例为门诊患者术后失访,1例随访2月后失访,1例因胰漏去世,1例无复发及转移,仅表现为胶冻样便,按肠炎治疗效果理想。3例住院患者术前检测血清肿瘤指标均在正常范围。3例行电子计算机X射线断层扫描技术(computed tomography, CT)检查,1例行磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检查。CT扫描显示胰腺占位。MRI显示T1低信号及T2高信号。

2.2 病理检查

2.2.1 大体检查

4例肿瘤均为单个边界清楚的结节,最大径3.5 cm~7.0 cm,平均4.5 cm。切面呈海绵状或蜂窝样,由众多小囊(直径0.2 cm~1.0 cm)组成,囊内含清亮液体。病灶中心均可见星芒状瘢痕。

2.2.2 镜下检查

所有病例组织形态学相似,瘤体与周围胰腺组织分界尚清,可见纤维性假包膜;肿瘤组织由无数大小不等、形态多样的囊腔构成,呈海绵样排列,囊内含清亮液体,囊壁内衬单层扁平或立方上皮细

胞,胞质透明,部分嗜酸性细胞核居中,圆形或卵圆形,大小一致,核仁不明显,缺乏核分裂,细胞无异型性。囊腔之间为宽窄不一的小梁状或片块状的玻璃样变的纤维间隔,少数伴陈旧性出血、黏液样变性,其间可见残存的胰岛、胰腺导管或腺泡(图1)。

2.3 免疫组织化学

仅有1例患者行免疫组织化学染色,可见囊壁内衬上皮细胞inhibin、CK19、CK7、CKL和EMA均为阳性,HMB45、CgA、MelanA和Vimentin均为阴性。

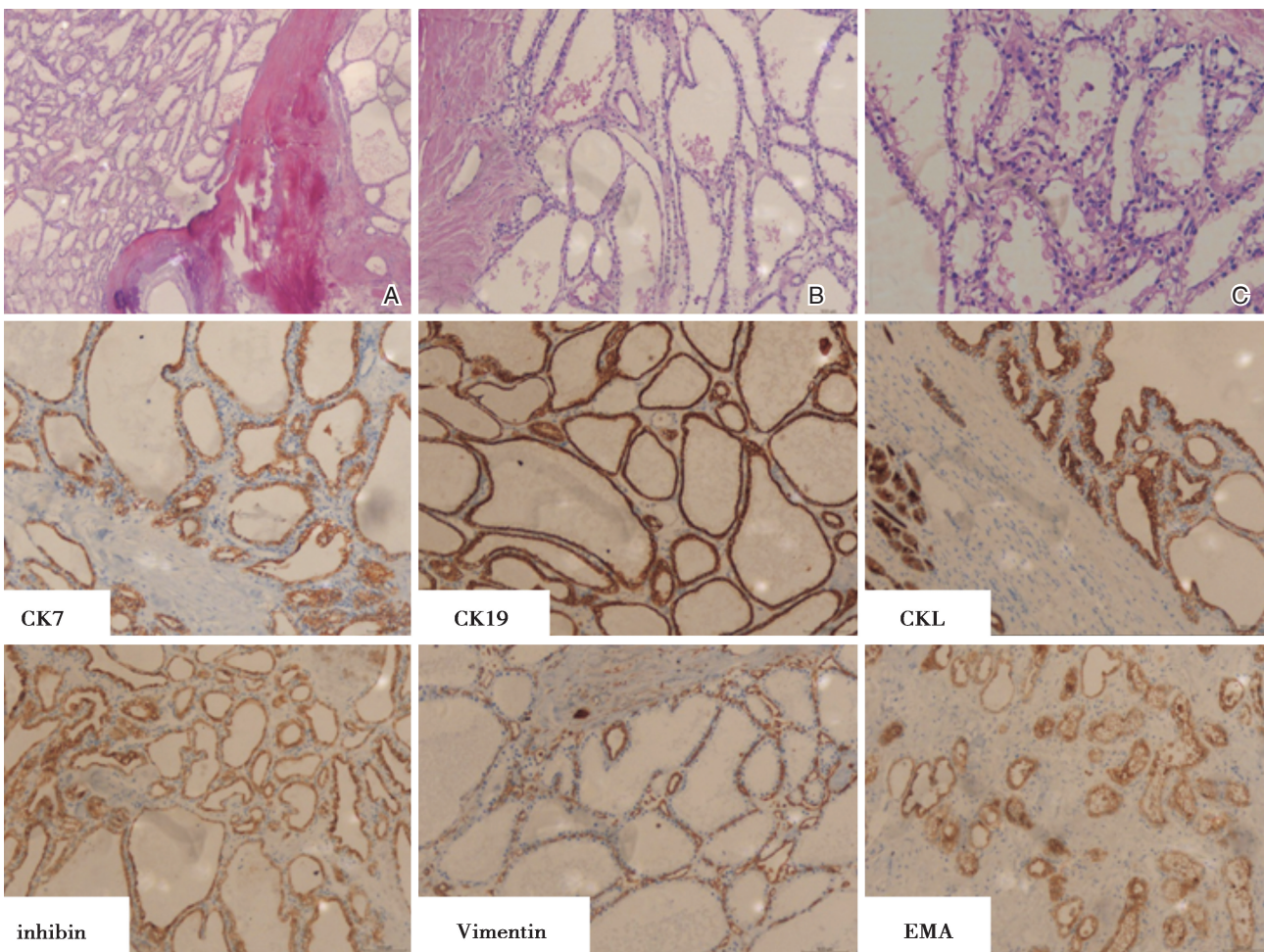
3 讨论

结合临床病史、影像学检查、病理检查及免疫表型等综合分析,4例均为SMAP。

胰腺囊腺瘤分为浆液性和粘液性2大类。胰腺浆液性囊腺瘤现多分为3类,即浆液性微囊性腺瘤、浆液性寡囊性腺瘤及实性浆液性囊腺瘤,其中浆液性微囊性腺瘤较常见,浆液性寡囊性腺瘤次之,而实性浆液性囊腺瘤较少见^[5]。

胰腺浆液性囊腺瘤多发生于中老年女性,通常单发^[1],本组病例与其吻合。SMAP是一种囊性上皮性肿瘤,由富于糖原的导管型上皮细胞组成,免疫组化标记提示肿瘤可能起源于泡心细胞或闰管系统^[6],组中免疫组化显示上皮细胞inhibin阳性,提示其发生是否与卵巢性索间质肿瘤相关,尚有待进一步研究。对于SMAP有无糖尿病史的说法文献报道不一,组中2例患者伴有糖尿病。Turcotte^[7]对55例Von Hippel-Lindau患者进行分析,10例最终诊断为实性浆液性囊腺瘤,查阅组中3例住院患者病史及随访结果显示均无Von Hippel-Lindau病,Von Hippel-Lindau病与SMAP是否具有相关性,仍需更长时间的随访及进一步进行相关基因的检测证实。

多数学者认为血、尿淀粉酶、肝与肾功能、血糖及血清肿瘤指标CA19-9、CA125、CEA和AFP,均在正常范围内,也有文献报道弥漫性变胰腺浆液性囊腺瘤患者可有肝功能等血清生化异常^[2]。组中1例患者术前合并肝囊肿、肾囊肿、肝硬化及脾功能亢进,血、尿淀粉酶均高于正常值,且于术后并发胰漏,血淀粉酶及引流液持续处于高水平,6月后于外院行二次手术,术后伤口不愈合,2月后去世。与文献报道的胰漏发生率较低一致^[7]。B型超声和CT是术前诊断的主要检查手段^[8]。组中3例住院患者CT示胰腺占位,考虑囊腺瘤仅1例,准确诊断率仅为33.3%。



A (×40)、B (×100)、C (×200)为苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)图片, CK7(×100)、CK19(×100)、CKL(×100)、inhibin(×100)、Vimentin(×100)、EMA(×200)为免疫组织化学图片

图1 胰腺浆液性微囊性腺瘤的病理学形态

Figure 1 Pathological features of serous microcystic adenoma of pancreas

SMAP可发生在胰腺任何部位,以胰体或胰尾部最常见(50%~70%),其次为胰头,多灶性、巨大病变或累及全胰腺者罕见^[2, 9]。大体多为单发、界清肿物,可有纤维性假包膜,常可见微囊围绕中央星状瘢痕排列^[3, 9]。镜下示多房囊腔,囊内衬覆产生浆液的立方上皮,核小而圆,居中且异型小。囊腔之间为梁状、片状、厚薄不等的纤维间隔,多伴玻璃样变、黏液变等。组中患者在瘤组织增生的纤维组织内可见残存的胰岛细胞巢、胰腺导管或腺泡。合并其他器官囊肿的病例,在组织病理学、免疫表型及组织化学上,与未合并其他病变的胰腺SMAP特点一致^[4, 10]。其中伴发肝囊肿或肾囊肿的SMAP有1例(33.3%)。

鉴别诊断在CT图像上,胰腺浆液性囊腺瘤参考值与假性囊肿、粘液性囊性肿瘤、胰腺导管内乳头状黏液肿瘤(intraductal papillary mucinous neo-

plasm, IPMN)相比衰减较高;与胰岛素瘤参考值相比较低,然而,在浆液性囊腺瘤和胰腺癌的衰减有重叠^[8]。作为确诊依据,上述病变在病理组织形态及免疫组化等方面存在差异,具体如下:(1)胰腺浆液性囊腺瘤:组织学形态与良性SMAP几乎完全相同,二者很难鉴别;胰腺浆液性囊腺瘤表现出细胞异型性、邻近组织侵犯及远处转移可资鉴别,因此需对患者进行长期随访。(2)浆液性寡囊性腺瘤:其切面见单个或数个相对较大的囊腔,直径1 cm~2 cm,SMAP由小囊组成,囊腔直径0.1 cm~0.5 cm。(3)假性囊肿:多有胰腺炎症等病史,囊壁无上皮细胞被覆,囊壁厚薄不均。(4)粘液性囊腺瘤:囊内衬覆柱状上皮细胞,囊腔内含粘液,淀粉酶消化后过碘酸雪夫(periodic acid-schiff, PAS)染色及阿尔辛蓝染色阳性。间质为致

密的富于细胞的卵巢样间质。粘液性囊腺瘤恶性潜能非常高^[11]。(5)转移性囊性肾透明细胞癌:其特征为明显、纤细的血管结构围绕腺泡状排列的透明细胞,细胞核小而深染且有异型,部分区域瘤细胞可形小管状或假乳头状结构,免疫组化标记vimentin、CD10阳性可资鉴别。综上所述,CT、MRI及超声可做为SMAP初步鉴别依据,而病理诊断则是其确诊依据,但因手术切除适应症为病灶大于4 cm,而直径较小和(或)影像学有蜂窝样特征者多采用随访等保守治疗,所以在鉴别时应注意综合分析。目前,有学者提出对囊液分析、二代测序、基于穿刺针的共聚焦激光显微内镜等方法进一步提高术前诊断率^[2, 12-13]。

美国放射科指南建议:对于无症状的患者,病变小于2 cm 1年随访一次,如果患者仍无症状,无需进一步的后续随访。若病灶介于2 cm与3 cm之间,则随访间隔取决于病变特征,粘液性病变半年随访一次,浆液性囊腺瘤非典型病变一年随访一次,其余病变2年随访一次。对于病变大于3 cm,应考虑手术^[14]。最近发表的胰腺囊性治疗指南中建议切除可应用于以下患者:所有有症状的病人,囊肿大于4 cm,在壁结节存在的情况下,主胰管扩张大于6 mm,血清糖类抗原(CA19-9)升高,或肿瘤体积快速增长情况下^[2, 6]。另外有部分病人在影像学上呈类似实性结节图像,为降低漏诊率,临床医生倾向于手术^[5, 8]。组中4例肿瘤最大径3.5 cm~7.0 cm,均为手术适应症,仅有一例去世,其原因为胰漏等并发症或伴发疾病(糖尿病或脏器囊肿),有待进一步探讨。有手术适应症者应考虑是否可以选择腹腔镜或保脾手术,其优劣有待更多临床病例验证。

总之,SMAP是一种生长缓慢、预后好、恶变少的肿瘤,诊断需结合临床病史及影像、超声及病理等综合分析。但因术前对胰腺囊性肿瘤的恶性潜能难以判断,对SMAP的治疗存在较大的争议。目前对于症状较重或瘤体较大者治疗以手术治疗为主,而无症状且体积较小者则以保守治疗为主,同时应预防术后胰漏等并发症的发生,注意手术方式个体化选择并长期随访。

参考文献

- [1] Compagno J, Oertel JE. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas with overt and latent malignancy (cystadenocarcinoma and cystadenoma). A clinicopathologic study of 41 cases[J]. Am J Clin Pathol, 1978, 69(6): 573-578.
- [2] Al - Jiffry BO, Rayzah F, Khayat SH. A disseminated variant of pancreatic serous cystadenoma causing obstructive jaundice, a very rare entity: a case report and review of the literature[J]. BMC Res Notes, 2014, 7: 749.
- [3] Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. WHO classification of tumours of the digestive system [M]. Lyon: IARC Press, 2010, 296-299.
- [4] Farrell JJ. Prevalence, diagnosis and management of pancreatic cystic neoplasms: current status and future directions[J]. Gut Live, 2015, 9(5): 571-589.
- [5] Yasuda A, Sawai H, Ochi N, et al. Solid variant of serous cystadenoma of the pancreas [J]. Arch Med Sci, 2011, 7(2): 353-355.
- [6] Brugge WR. Diagnosis and management of cystic lesions of the pancreas[J]. J Gastrointest Oncol, 2015, 6(4): 375-388.
- [7] Turcotte S, Turkbey B, Barak S, et al. Von Hippel-Lindau disease-associated solid microcystic serous adenomas masquerading as pancreatic neuroendocrine tumors[J]. Surgery, 2012, 152(6): 1106-1117.
- [8] Chu LC, Singhi AD, Hruban RH, et al. Characterization of pancreatic serous cystadenoma on dual-phase multidetector computed tomography [J]. J Comput Assist Tomogr, 2014, 38(2): 258-263.
- [9] Dikmen K, Bostanci H, Yildirim AC, et al. Giant serous microcystic pancreas adenoma [J]. Rare Tumors, 2012, 4(4): e56.
- [10] 林生明, 张声, 陈余朋, 等. 胰腺浆液性微囊性腺瘤13例临床病理分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(7): 72-75.
- [11] Goh BK. International guidelines for the management of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms [J]. World J Gastroentero, 2015, 21(34): 9833-9837.
- [12] Kadiyala V, Lee LS. Endosonography in the diagnosis and management of pancreatic cysts [J]. World J Gastrointest Endosc, 2015, 7(3): 213-223.
- [13] Napoleon B, Lemaistre AI, Pujol B, et al. In vivo characterization of pancreatic cystic lesions by needle-based confocal laser endomicroscopy (nCLE): proposition of a comprehensive nCLE classification confirmed by an external retrospective evaluation [J]. Surg Endosc, 2015. [Epub ahead of print].
- [14] Berland LL, Silverman SG, Gore RM, et al. Managing incidental findings on abdominal CT: white paper of the ACR incidental findings committee [J]. J Am Coll Radiol, 2010, 7(10): 754-773.

• 综 述 •

口腔鳞状细胞癌肿瘤标记物的研究

邵婷如 赵萌 吕晓智*

【摘 要】 口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)不仅危及患者的生命,还影响其美观和生存质量。虽然以手术、放疗和化疗为主的综合序列治疗方法不断完善,晚期 OSCC 的 5 年生存率只有 40%~50%,但是早期患者的 5 年生存率高达 85.4%。因此,OSCC 的早期诊断对提高其疗效至关重要。研究证实,肿瘤标记物(tumor markers, TM)对于多种恶性肿瘤的早期诊断和监测非常有价值,但关于 OSCC 的 TM 研究,文献报道较少,如果能找出特异性的 TM,将对 OSCC 患者的早期诊断,治疗和预后判断提供帮助。本文就此做一综述。

【关键词】 口腔; 鳞状细胞癌; 肿瘤标记物

Investigation on the tumor markers of oral squamous cell carcinoma

SHAO Tingru, ZHAO Meng, LV Xiaozhi*

(Department of Oral & Head and Neck Surgery of Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

【ABSTRACT】 Oral squamous cell carcinoma (OSCC) not only endangers patients' lives, but also effects their cosmetic appearances, and quality of lives. Despite improvements in therapeutic approaches such as comprehensive therapies with operation, radiotherapy, and chemotherapy, the 5-year overall survival rates for patients with late-stage tumors are between 40% and 50%. However, for patients with early-stage tumors, the 5-year overall survival rates rise to 85.4%. Accordingly, early detection of OSCC is sorely needed to improve patients' outcomes. It is confirmed that suitable tumor markers (TM) are essential for early diagnostic and monitoring of malignant tumors in early stages. However, there are few literature reported. In this paper, specific tumor markers which are helpful for early diagnosis, treatment and prognosis in patients with OSCC will be discussed.

【KEY WORDS】 Oral cavity; Squamous cell carcinoma; Tumor marker

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是全球最常见的十大癌症之一,是最常见的口腔肿瘤,占比约达 90%以上,每年约有 500 000 新增 OSCC 病例^[1],且近年来仍呈上升趋势。OSCC 不仅危及患者的生命,还影响其美观和外形,以及患者的咀嚼、语音、吞咽等生存质量。尽管目前有包括手术治疗、放化疗、生物治疗、基因靶向治疗等在内的综合序列治疗法,但是 OSCC

的长期治疗效果仍不理想^[2]。据文献报道,约有 2/3 的 OSCC 患者被诊断时已处于癌症晚期,而在过去的 30 年中,晚期 OSCC 的 5 年生存率只有 40%~50%^[3]。此外,晚期患者经历手术、放疗和化疗等综合治疗后,面部外形严重破坏,生存质量明显降低。但是,对于早期的 OSCC 患者 5 年生存率高达 85.4%^[4],早期患者治疗后生存质量也显著提高。因此,OSCC 的早期诊断对提高患者生存预后

基金项目:国家自然科学基金(81472536);广东省自然科学基金(S2011010003852);广东省科技计划(2012B031800139);

广东省医学科研基金(A2012362);2013 年南方医院新业务新技术课题(2013015)

作者单位:南方医科大学南方医院口腔-头颈外科,广东,广州 510515

*通讯作者:吕晓智, E-mail: lxzsurgeon@126.com

至关重要^[5-6]。对于 OSCC 分子生物学的更深入的认识可以为疾病的研究提供新的视角,包括血清中不同的标记物在肿瘤早期诊断和监测上的应用。特异性和敏感度高的标记物能对 OSCC 患者的早期诊断,治疗和预后判断提供很大的帮助。本文就 OSCC 和其相关的血清学标记物做一综述。

1 肿瘤标记物(tumor markers, TM)的发展历史及价值

TM 的概念 1978 年由 Herberman 首次提出,是指肿瘤细胞产生和释放的某种物质,常以抗原、酶、激素等代谢产物的形式存在于肿瘤细胞内或者患者血液、体液及组织中,临床上可通过生化或免疫监测手段检测这些特异性物质而辅助诊断相关的肿瘤。目前,TM 的检测已被广泛应用于临床,在肿瘤的辅助诊断、疗效评价、复发或转移检测、预后判断方面有重要的临床意义^[7]。

至今可供临床应用的 TM 有近 200 种,可分为细胞表面肿瘤标记物、肿瘤的血清标记物以及癌基因标记物。例如:在胚胎期表达,健康成人不表达,随着肿瘤发生又重新表达的胚胎抗原如甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)及癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA);与肿瘤相关的糖蛋白如癌抗原 50 (cancer antigen 50, CA50)、癌抗原 125 (cancer antigen 125, CA125)、鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCC-Ag)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor, EGFR)等;在正常组织中有表达,但因肿瘤细胞分裂破溃时释放的抗原过渡表达,如 β -人绒毛膜促性腺激素(β -human chorionic gonadotrophin, β -HCG)、甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)、前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、组织多肽特异性抗原(tissue polypeptide specific antigen, TPS)、细胞角蛋白 19 片段(cytokeratin-19 fragments, CYFRA21-1)等。还有像血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)等与肿瘤细胞增殖分化有关。但是,应用于临床的特异性强、敏感度高的 TM 尚非常少。

CEA 是目前应用最广泛的 TM 之一,虽然 CEA 对诊断结直肠癌(colorectal cancer, CRC)无特异性,但由于 CRC 患者血清中 CEA 阳性率较高,因此 CEA 阳性患者的检测对肿瘤的早期发现、疗效及预后判断意义重大^[8]。AFP 一直被认为是诊断原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的特异性标记物,一般认为 AFP 持续>400 pcg/L 1 个月以上、或 200 pcg/L 2 个月以上,并排除妊娠、活动性肝炎及生殖腺胚胎性肿瘤等,便可确诊原发性肝癌。AFP 有助于对肝癌的早期诊断和病情监测^[9]。NSE 目前已作为检测小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)的首选标志物^[10],并用于与其它非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的鉴别诊断,临床上可监测 SCLC 放化疗后的治疗效果和预后的评估。

2 OSCC 相关的 TM

OSCC 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,占比约达 90% 以上^[11]。其生物学特性主要表现为局部浸润生长及颈部淋巴结转移。OSCC 患者易发生早期颈淋巴结转移。在 OSCC 患者血清中有许多潜在的抗原物质,如能找到相关 TM,便能为 OSCC 的早期诊断、治疗和预后判断提供帮助。

2.1 SCC-Ag

SCC-Ag 是 1977 年由 Kato 等^[11]从宫颈上皮细胞癌分离出的一种分子量约为 48 000 的肿瘤相关蛋白,是 T4-A 的一个亚片段,其基因位于染色体 18q21.3 上,包括 SCC1 和 SCC2 2 个基因,分别编码 SCC-Ag1 和 SCC-Ag2 糖蛋白,其中 SCC-Ag1 可增强肿瘤细胞抗程序性死亡能力,SCC-Ag2 可抵抗糜蛋白酶样蛋白激酶介导的炎症反应^[12]。

SCC-Ag 在正常人血清中含量较低,但在宫颈癌、头颈癌、食道癌及肺癌中均可见升高,目前 SCC-Ag 在肿瘤细胞中的作用机制尚不明确。研究发现,SCC-Ag 有可能通过抑制 NK 细胞向肿瘤迁移,从而抑制肿瘤细胞凋亡以及肿瘤细胞逃避宿主的免疫系统来参与恶性生物学过程^[13]。

作为鳞状细胞癌的重要标志,SCC-Ag 的表达水平与鳞癌患者的生存及预后密切相关。SCC-Ag 常用于宫颈鳞癌(squamous carcinoma of the cervix, SCC)的监测。文献报道,SCC-Ag 不仅可以早期发现 SCC 的复发,还能早期提示 SCC 对治疗

是否有反应^[14-15]。研究证实, SCC 患者的血清中 SCC-Ag 初始浓度有意义的升高, 且初始浓度升高水平在 3 个化疗疗程中均没有降至临界参考值以下, 可以考虑不用继续化疗^[16-17]。在鼻咽癌中的研究发现, 血清中 SCC-Ag 水平与鼻咽癌肿瘤大小、淋巴结转移和临床分期有关, 且检测的敏感度随 TNM 分级和临床分期而升高^[18]。在头颈部肿瘤中的研究发现患者血清 SCC-Ag 水平和 TNM 分期相关; 对于口咽部的肿瘤, SCC-Ag 的表达水平与患者生存率呈负相关, 提示 SCC-Ag 是影响患者总生存率的一个危险因素^[19]。

目前已有许多研究证实, 血清中 SCC-Ag 水平和 OSCC 患者的预后呈负相关。文献证实, OSCC 患者在行肿瘤根治术后, 术前异常升高的 SCC-Ag 水平可在术后 72 h 内迅速降至正常水平, 但姑息性切除术后 SCC-Ag 水平可暂时下降, 但多数仍高于正常; 同时, OSCC 治疗后复发时 SCC-Ag 水平明显升高^[20-22], 提示 SCC-Ag 是 OSCC 一个特异性的标记物。但是, 并非所有晚期预后不佳的患者都有血清中 SCC-Ag 水平升高, 这也提示了 SCC-Ag 并不是 OSCC 的唯一标志物; 此外, 早期肿瘤患者血清中 SCC-Ag 很少升高, 因此不适用于鳞状上皮癌的筛查和早期诊断^[23-24]。不同的学者对 OSCC 患者血清中 SCC-Ag 进行研究, 发现其特异性相对较高, 为 60.0%~93.0%; 敏感度为 15.0%~45.0%^[22, 25, 33, 39, 49] (表 1)。以上研究结果, 证实 SCC-Ag 是 OSCC 一个有价值的 TM, 可用于 OSCC 疗效预测和预后判断。

2.2 SCC-Ag 与其他 TM 的联合应用

由于肿瘤生物学十分复杂, 且表达的抗原呈多态性, 单靠某一种标记物的测定难以作出对肿瘤的确切诊断。在治疗前肿瘤标记物为阴性的患者中也有可能存在肿瘤标记物抗原的表达, 所以有必要进行血清中 2 种或多种 TM 的联合检测, 以提高诊断的敏感性。目前临床上常的 TM 的联合检测有: AFP+CEA 联合检测肝癌^[9]、CEA+NSE+CYFRA21-1 联合检测肺癌^[10]、CEA+CA199+CA242+CA50 联合检测胃癌^[26]、CEA+CA199+CA242+CA125 联合检测胰腺癌^[28]、CEA+ β -HCG+SCC-Ag 联合检测宫颈癌^[16, 28]、CEA+SCC-Ag+EBV 联合检测鼻咽癌^[18]、CEA+SCC-Ag 联合检测食道癌^[29]等。近年来, 有一些学者报导了在 OSCC 中 SCC-Ag 与其他 TM 的联合检测, 在 OSCC 患者治

疗前后联合检测患者血清中多种标记物的表达水平可能作为 OSCC 患者疗效评价和复发及生存率监测的重要标志^[22, 24]。

细胞角蛋白是与上皮分化相关的标记物, 在上皮细胞恶变过程中, 被激活的蛋白酶加速降解, 大量的角蛋白片段释放入血, CYFRA21-1 是细胞角蛋白降解片段之一。CYFRA21-1 目前被认为主要用于检测肺癌, 尤其是 NSCLC^[30]。此外, CYFRA21-1 在头颈部、乳腺、宫颈、消化道肿瘤均有一定的阳性率。最早由 Cerus 等^[31]提出 CYFRA21-1 在 OSCC 诊断中的应用, 发现患者血清中 CYFRA21-1 有显著升高。随后更多研究发现, OSCC 患者血清中 CYFRA21-1 水平较高的患者一般预后较差, 而且治疗初期的血清中 CYFRA21-1 的变化与预后相关^[31-32], 而且术后 CYFRA21-1 血清浓度与术前相比显著下降, CYFRA21-1 可作为一个独立判断的重要指标之一, 联合检测 CYFRA21-1 及 SCC-Ag 对于判断肿瘤的复发和转移具有重要的临床意义^[33-34]。

C 反应蛋白 (C-reaction protein, CRP) 在 1930 年由 Tillet 和 Francis^[35]发现, 因能与 C-多糖反应而得名。CRP 是典型的急性期蛋白, 血清中 CRP 水平的升高常伴随组织损伤、局部缺血、急性感染与炎症反应, 临床主要应用于疾病评估及疗效监控。CRP 升高的程度反应炎症组织的活动性, CRP 值的升高滞后于炎症活动变化 12 h 左右, 但是比临床症状的变化要早出现。对于肿瘤患者, 已升高和正在升高的 CRP 水平提示肿瘤发生转移或是并发感染, 预后不佳^[21-22]。目前, 血清中 SCC-Ag 与 CRP 水平已被证明与肿瘤侵袭、淋巴结转移、肿瘤分期和患者生存率有关, 并被成功地用于原发 OSCC 的危险分级; OSCC 复发时患者血清中同时存在高水平的 SCC-Ag (≥ 2 ng/mL) 和 CRP (≥ 5 mg/L) 被认为是重要的危险因素, 与复发肿瘤分期、有无远处转移和患者总体生存率显著相关, 预示更差的预后^[19, 22]。提示 SCC-Ag 与 CRP 联合检测对 OSCC 预后判断更有价值。

CEA 在 1965 年由 Gold 等^[36]发现, 因最初发现于结肠癌和胎儿肠组织中, 故名癌胚抗原。正常的肠组织分泌 CEA 进入胃肠道, 在血清中也可有微量 CEA 的存在; 而失去极性的癌细胞分泌的 CEA 则进入血液和淋巴。在大肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌等患者血清中常有 CEA 水平的升高, 尤

其发现与大肠癌的分期有明确关系,越晚期的病变,CEA 浓度越高。CEA 有助于对肿瘤的疗效判断、病情监测和预后估计,但其特异性和敏感性均不高^[26-27],其它非肿瘤性疾病如肠道炎症、肾功能不全、肝硬化等,或是大量吸烟、妊娠等,血清中 CEA 都可有一定的升高,因此,CEA 常与血清中其它标记物的联合检测,以提高检测的敏感度和特异性。

研究发现,早在肿瘤复发前几个月,患者血清中已有 SCC-Ag 和 CEA 水平的同时升高^[37]。通过比较原发性 OSCC 患者血清中多种标记物的检测发现,患者血清中 CEA、SCC-Ag、CYFRA21-1 及整合素相关蛋白(integrin associated protein, IAP)的阳性表达对 OSCC 患者具有诊断价值;而且这 4 种标记物联合检测的敏感度和特异性明显高于单个标记物检

表 1 单独或联合检测 TM 对 OSCC 诊断的敏感度和特异性

Table 1 Single or combination assays for diagnostic sensitivity and specificity of TM in OSCC

肿瘤标记物	敏感度(%)	特异性(%)	参考文献
SCC-Ag	15.0~45.0	60.0~93.0	Chen et al. ^[22] Hoffmann et al. ^[25] Zhong et al. ^[33] Kurokawa et al. ^[39] Feng et al. ^[48]
SCC-Ag + CEA + CYFRA21-1 + IAP	81.0	73.3	Kurokawa et al. ^[39]
SCC-Ag + EGFR + CyclinD1	97.2	93.5	Feng et al. ^[48]
SCC-Ag + CEA + VEGF + TSGF	76.92	77.42	He et al. ^[41]

测(见表 1),可被用于 OSCC 的筛查^[38-39]。

恶性肿瘤特异性生长因子(tumor supplied group of factors, TSGF)是目前公认的数种与恶性肿瘤形成和生长相关的糖类物质和代谢物的统称。1989 年首次发现在恶性肿瘤病人血液中存在 TSGF^[40]。肿瘤的生长和转移需要血管增生以提供营养,TSGF 作用于恶性肿瘤血管,是肿瘤及其周边毛细血管大量增生的物质基础,随着肿瘤生长而逐渐释放入血,在恶性肿瘤形成早期即可明显升高^[27, 40]。TSGF 仅对恶性肿瘤的血管新生发挥作用,而非肿瘤血管新生无明显关系。经研究证实,肿瘤组患者血清中 TSGF 水平明显高于正常对照组,而非恶性肿瘤组与恶性肿瘤根治组并无明显差异^[41-42]。联合检测 OSCC 患者血清中 TSGF、SCC-Ag 和 Cyfra21-1,对于 OSCC 的诊断,其敏感度和特异性均较单个标记物检测明显升高^[41](表 1)。血清中的 TSGF 和 CEA 一样,并非 OSCC 特异性的标记物,但 TSGF 作为恶性肿瘤的特异性标记物,在病变早期血清中其它肿瘤标记物浓度不高时,患者血清中 TSGF 即可出现明显升高,如果将 TSGF 与 SCC-Ag 等 OSCC 特异性标记物联合检测,对于 OSCC 的筛查和早期诊断具有

重要意义^[27, 42-43]。

以上研究提示,SCC-Ag 联合其他 TM 检测在 OSCC 的早期诊断、治疗和预后判断方面较单独 SCC-Ag 检测更有应用前景。

3 特殊的标记物——VEGF

VEGF 为 1989 年由 Gospodarowicz 等^[44]从牛垂体滤泡细胞培养液中分离出的一类能选择性促进血管内皮细胞分裂的糖蛋白,可由血管内皮细胞、巨噬细胞、纤维母细胞、平滑肌细胞等组织细胞以及各种肿瘤细胞分泌。VEGF 有 6 个亚型,VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)。其中,VEGF-A 和 VEGF-C 在头颈部鳞癌的转移过程中发挥了重要作用^[45]。研究发现,VEGF 在正常人多种组织中不表达或少量表达,在低度恶性的肿瘤中不表达或表达很低,而在恶性程度较高的肿瘤中表达较强^[45-46]。VEGF 可以自分泌或旁分泌作用于血管内皮细胞,促进细胞生长和扩散;同时肿瘤内相对缺氧的环境可通过刺激 VEGF 分泌,促进血管生成,因而与多种肿瘤的转移、预后及复发相关^[7, 43]。研究证实 OSCC 患者血清 VEGF 表

达阳性与区域淋巴结转移和患者临床分期密切相关,OSCC中VEGF的表达上调可能与肿瘤血管生成和疾病的严重程度相关,对OSCC进展有一定的预测作用^[45-46]。

EGFR是人表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor, HER)家族成员之一,广泛存在于各种组织中,主要在上皮细胞表达。研究表明,EGFR在90%以上的头颈鳞癌患者中都有过度表达,EGFR的表达与肿瘤进程相关,并预示更差的预后,且检测出EGFR阳性的患者预后明显差于EGFR表达阴性患者^[47]。EGFR可通过调节VEGF水平影响肿瘤血管生成促进肿瘤的转移,而淋巴内皮细胞的生长与血管内皮细胞相似,均受HER调控,因此可以推断EGFR通过促进淋巴管上皮细胞增生与淋巴结转移相关,用于对OSCC患者预后的判断,但是其确切的机制尚不清楚。

在对血清中多种标记物联合检测的研究中发现,OSCC患者血清SCC-Ag、EGFR和CyclinD1水平明显高于健康对照组。在单独检测时,EGFR的敏感度和特异性最高(表1);任何2个标记物联合检测时,EGFR和CyclinD1联合检测的敏感度、特异性和准确性最高(表1),而增加检测SCC-Ag并不能提高检出率。因此,EGFR和CyclinD1可作为潜在的OSCC的TM,两者联合检测对OSCC有一定的辅助诊断价值,而血清中SCC-Ag虽然敏感度不高(表1),但是术后血清中水平显著下降,提示SCC-Ag水平变化可用于OSCC的动态监测^[48]。在检测OSCC患者血清中SCC-Ag、CEA、VEGF和TSGF水平时,又发现其敏感度和特异性分别为76.92%和77.42%^[41](表1)。多种标记物联合检测的特异性虽然有一定降低,但其敏感度升高。目前还未发现特异性和敏感度均十分理想的TM,因此,在临床工作中,可以分别单独和联合检测TM,先用特异性较高的TM进行初筛,再通过多种TM的联合检测提高检测敏感度,协助诊断。

4 问题与展望

以肿瘤相关抗原作为TM,通过血清学对肿瘤进行早期检测一直是研究的热点,并在其他一些肿瘤中取得了显著的效果。OSCC特异性的TM,一方面有助于早期诊断OSCC,从而及时对肿瘤进行治疗,大大提高患者的疗效;另一方面,通过定

期检测各种TM的动态变化,从而为监测肿瘤的复发和转移及判断预后提供依据。在OSCC中,有关TM应用的报道很少,OSCC特异性的TM也不明确。因此,需要进一步的研究去寻找和筛选OSCC特异性的TM。

参考文献

- [1] Sho M, Kei-ichi M, Ayako N, et al. Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo-and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2014,3(2):349-361.
- [2] Sun W, Gaykalova DA, Ochs MF, et al. Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 2014,74(4):1091-1104.
- [3] Takahashi H, Yanamoto S, Yamada S, et al. Effects of postoperative chemotherapy and radiotherapy on patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and multiple regional lymph node metastases[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2014,43(6):680-685.
- [4] Nobuharu Y, Kazumichi S, Tomohiro Y, et al. A 5-year activity report from the oral cancer center, Tokyo dental college[J]. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2013,54(4):265-273.
- [5] Bredell M, Rordorf T, Studer G. Treatment concepts of oral cancer[J]. *SADJ*, 2012,67(10):574-576.
- [6] Çankaya H, Güneri P, Epstein JB. Adjunctive methods and devices for clinical detection of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Health Prev Dent*, 2015,13(1):29-39.
- [7] Hana P, Martina R, Jaromir G, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers[J]. *Oral Oncology*, 2014,50(3):168-177.
- [8] Bhatti I, Patel M, Dennison AR, et al. Utility of post-operative CEA for surveillance of recurrence after resection of primary colorectal cancer[J]. *Int J Surg*, 2015,16(Pt A):123-128.
- [9] Snarska J, Szajda SD, Puchalski Z, et al. Usefulness of examination of some tumor markers in diagnostics of liver cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2006, 53(68):271-274.
- [10] Wang B, He YJ, Tian RN, et al. Clinical utility of haptoglobin in combination with CEA, NSE and CY-FRA21-1 for diagnosis of lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014,15(22):9611-9614.
- [11] Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1977,40(4):1621-1628.

- [12] Uemura Y, Pak SC, Luke, et al. Circulating serpin tumor markers SCCA1 and SCCA2 are not actively secreted but reside in the cytosol of squamous carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(4):368-377.
- [13] Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, et al. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5):1776-1780.
- [14] Jeong BK, Huh SJ, Choi DH, et al. Prognostic value of different patterns of squamous cell carcinoma antigen level for the recurrent cervical cancer [J]. *Cancer Res Treat*, 2013, 45(1):48-54.
- [15] Li J, Cheng H, Zhang P, et al. Prognostic value of combined serum biomarkers in predicting outcomes in cervical cancer patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424:292-297.
- [16] Chmura A, Woicieszek A, Mrochem J, et al. Usefulness of SCC, CEA, CYFRA21-1, and CRP markers for the diagnosis and monitoring of cervical squamous cell carcinoma [J]. *Ginekol Pol*, 2009, 80(5):361-366.
- [17] Hashimoto K, Yonemori K, Katsumata N, et al. Use of squamous cell carcinoma antigen as a biomarker of chemotherapy response in patients with metastatic cervical carcinoma [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 159(2):394-398.
- [18] Ao R, Fu R, Dong D, et al. Discerning primary tumors from metastases in synchronous nasopharyngeal squamous cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma: A case report and review of the literature [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(5):1391-1394.
- [19] Imai R, Takenaka Y, Yasui T, et al. Prognostic significance of serum squamous cell carcinoma antigen in patients with head and neck cancer [J]. *Acta Otolaryngol*, 2015, 135(3):295-301.
- [20] Lin WH, Chen IH, Wei FC, et al. Clinical significance of preoperative squamous cell carcinoma antigen in oral cavity squamous cell carcinoma [J]. *Laryngoscope*, 2011, 121(5):971-977.
- [21] Huang SF, Wei FC, Liao CT, et al. Risk stratification in oral cavity squamous cell carcinoma by preoperative CRP and SCC antigen levels [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(12):3856-3864.
- [22] Chen IH, Liao CT, Wang HM, et al. Using SCC antigen and CRP levels as prognostic biomarkers in recurrent oral cavity squamous cell carcinoma [J]. *Plos One*, 2014, 9(7):e103265.
- [23] Kimura Y, Fujieda S, Takabayashi T, et al. Conventional tumor markers are prognostic indicators in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2000, 55(2):163.
- [24] Li HR, Zhang J, Wu L, et al. The effects of changes of serum SCC-Ag levels on prognosis of oral cavity squamous cell carcinoma [J]. *Stomatology*, 2014, 34(5):350-352.
- [25] Hoffmann J, Munz A, Krimmel M, et al. Intraoperative and postoperative kinetics of serum tumor markers in patients with oral carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998, 56(12):1390-1393.
- [26] Tian SB, Yu JC, Kang WM, et al. Combined detection of CEA, CA199, CA242 and CA50 in the diagnosis and prognosis of resectable gastric cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15):6295-6300.
- [27] Zhou G, Niu L, Chiu D, et al. Changes in the expression of serum markers CA242, CA199, CA125, CEA, TNF- α and TSGF after cryosurgery in pancreatic cancer patients [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(7):1235-1241.
- [28] Kinugasa M, Nishimura R, Hasegawa K, et al. Assessment of urinary beta-core fragment of hCG as a tumor marker of cervical cancer [J]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1992, 44(2):188-194.
- [29] Zhang J, Zhu Z, Liu Y, et al. Diagnostic value of multiple tumor markers for patients with esophageal carcinoma [J]. *Plos One*, 2015, 10(2):e0116951.
- [30] Zissimopoulos A, Stellos K, Pemevopoulou V, et al. The importance of the tumor marker CYFRA 21-1 in patients with lung cancer after surgery or chemotherapy [J]. *Hell J Nucl Med*, 2007, 10(1):62-66.
- [31] Cerus P, Rabilloud M, Charrie A, et al. Study of cyfra21-1, a tumor marker, in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2005, 114(10):768-776.
- [32] Wang YX, Hu D, Yan X. Diagnostic accuracy of Cyfra21-1 for head and neck squamous cell carcinoma: a meta analysis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(17):2383-2389.
- [33] Zhong LP, Zhu HG, Zhang CP, et al. Detection of serum Cyfra 21-1 in patients with primary oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2007, 36(3):230-234.
- [34] Rajkumar K, Ramya R, Nandhini G, et al. Salivary and serum level of CYFRA 21-1 in oral precancer and

- oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Dis*, 2015, 21(1):90-96.
- [35] Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of the pneumococcus[J]. *J Exp Med*, 1930, 52(4):561-571.
- [36] Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor specific antigen in human colonic carcinoma by immunologic tolerance and absorption techniques [J]. *J Exp Med*, 1965, 121(3):439-462.
- [37] Lordick F, Krauss J, Jager D. Tumor markers and biomarkers in squamous cell cancer of head and neck[J]. *HNO*, 2008, 56(9):881-885.
- [38] Kurokawa H, Tsuru S, Okada M, et al. Evaluation of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma in the oral cavity [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1993, 22(1):35-38.
- [39] Kurokawa H, Yamashita Y, Tokudome S, et al. Combination assay for tumor markers in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 1997, 55(9):964-966.
- [40] Jiang JT, Wu CP, Deng HF. Serum level of TSGF, CA242 and CA199 in pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(11):1675-1677.
- [41] He HB, Zhang ZW, Xie L, et al. Significance of the examination of blood serum VEGF, TSGF, SCCA and CEA in the diagnosis of oral cancer [J]. *J Pract Stomatol*, 2011, 27(5):707-709.
- [42] Liang YR, Wan DS, Chen G, et al. Detection of serum tumor supplied group of factors and its clinical significance [J]. *CJC*, 2002, 21(11):1251-1253.
- [43] Pho CF, Zhang L, Anderson DW et al. Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients [J]. *Clin Cancer Res* 2006, 12(22):6716-6722.
- [44] Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(19):7311-7315.
- [45] O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis [J]. *Cancer* 2001, 92(3):556-568.
- [46] Shang ZJ, Li JR, Li ZB. Upregulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2007, 65(1):17-21.
- [47] Ang KK, Berkey BA, Tu X. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24):7350-7356.
- [48] Feng XY, Li JH, Li JZ, et al. Serum SCCA, Cyfra21-1, EGFR and CyclinD1 levels in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Biol Markers*, 2010, 25(2):93-98.

Toll样受体4与结直肠癌的相关性

赵祥梅 戴盛明*

[摘要] Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)在炎症诱发的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中的作用日益受到关注。活化的TLR4通过髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)激活核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)产生大量炎症介质并募集炎症细胞形成肿瘤微环境,从而成为炎症与肿瘤的纽带贯穿于CRC发生、发展的整个过程中。本文着重对TLR4信号通路参与CRC的起始、进展、转移、遗传变异和表观遗传调控进行了讨论。尤其,文章中强调了TLR4在CRC发展和发病机制中的角色,并提出调节TLR4信号通路可能为CRC的治疗带来新的前景。

[关键词] Toll样受体4; 结直肠癌; 发生; 发展

The relationship of toll-like receptor 4 and colorectal cancer

ZHAO Xiangmei, DAI Shengming*

(Liuzhou Key Laboratory of Tumor Diseases and Prevention, Clinical Laboratory, Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi, China, 545005)

[ABSTRACT] The purpose of this article is to study the role that toll-like receptor 4 (TLR4) plays in colitis associated colorectal cancer (CRC). The activated TLR4 activates nuclear factor- κ B (NF- κ B) by myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which produces inflammatory mediators and recruits inflammatory cells to form the tumor microenvironment. TLR4 becomes a link between inflammation and cancer throughout the whole process of the occurrence and development of CRC. In this paper, a comprehensive review on the involvement of the TLR4 pathway in the initiation, progression, metastasis, inherited genetic variation, and epigenetic regulation of CRC will be discussed. In particular, the physiological role of TLR4 in the development and pathogenesis of CRC, and promising approaches for the therapy of CRC by TLR4 will be proposed.

[KEY WORDS] Toll-like receptor 4 (TLR4); Colorectal cancer; Occurrence; Development

众所周知, Toll样受体(toll like receptor, TLRs)是重要的细胞表面受体家族,参与机体对外源性生物体的识别和免疫应答,且与肿瘤的发生、浸润和转移密切相关。研究证实,它属于模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),可识别病原相关分子模式(pathogen associated molecule pattern, PAMPs),进而引发一系列的信号转导^[1]。Toll样受体4(toll-like receptor-4, TLR4)是TLRs家族成员之一,近年来发现,慢性炎症在炎症诱发的结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发展中扮

演重要角色,而TLR4介导炎症与CRC的生物学行为密切相关,成为近年来的研究热点之一。本文将对TLR4信号通路参与CRC的起始、进展、转移、遗传变异和表观遗传调控等进行讨论。

1 TLR4分子结构及信号通路

TLR4是一种单次跨膜蛋白,由胞外区、跨膜区和胞内区3部分构成,胞外区由22个富含亮氨酸重复序列组成马蹄形结构域,跨膜区由21个氨基酸螺旋连接而成,胞内区是由200个氨基酸组成

基金项目:国家自然科学基金(81160269)

作者单位:广西医科大学第四附属医院医学检验科,柳州市肿瘤疾病与防治重点实验室,广西,柳州 545005

*通讯作者:戴盛明, E-mail: Daishm@sina.com

的包含一个 Toll/IL-1 受体(Toll/IL-1 receptor, TIR)结构域的保守区。TLR4 识别相应病原体 PAMPs 及其内源性配体后,通过与胞浆内不同受体接头蛋白结合进行信号转导,根据接头蛋白的不同可分为髓系分化蛋白(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖性和非 MyD88 依赖性途径^[2]。在炎症诱发的 CRC 中糖蛋白 CD14 转运细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与 TLR4 和髓样分化蛋白-2(myeloid differential protein-2, MD-2)形成多聚体细菌脂多糖/Toll 样受体 4/髓样分化蛋白-2(lipopolysaccharide/toll-like receptor-4/myeloid differentiation factor 88, LPS/TLR4/MD-2)^[3],使活化的 TLR4 胞内区通过与 MyD88 适配样蛋白(myD88 adaptor-like, Mal)和 MyD88 各自结构域相互作用并导致其自身磷酸化,产生一系列级联反应最终使核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)激活释放并转移至细胞核内,然后与其特异性结合位点结合,启动相关基因转录和翻译,导致大量的细胞因子和炎症介质释放,如白介素-6(interleukin-6, IL-6)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)等^[4-7]。TLR4 的独特结构使得其在炎症相关的各信号通路中发挥了重要的作用,成为肿瘤治疗的又一关键分子。

2 TLR4 在 CRC 中的表达情况及影响

在肿瘤组织中,肿瘤的发生是一个循序渐进的慢性过程,从青少年息肉、错构瘤、腺瘤到腺癌组织中,TLR4 的表达水平随着疾病的进展而明显增高,并且腺癌组织中 TLR4 的表达呈弥漫性或颗粒性分布,定位在细胞膜或细胞质中^[8]。癌组织中 TLR4 表达明显高于癌旁组织,TLR4 通过参与肿瘤免疫逃逸、凋亡抵抗、诱导免疫抑制因子和趋化因子的表达而诱导 CRC 肝转移及腹膜转移。CRC 的发生率与 TLR4 的表达水平呈正相关,且随着 TLR4 表达水平的增高,其分期越晚;当 TLR4/MyD88 共同高表达时则患者 5 年无病生存时间(disease-free survival, DFS)和总体生存时间(overall survival, OS)明显缩短^[9]。对肿瘤微环境研究发现,结肠癌细胞中表达 TLR4 及氮氧化物酶(nox enzymes, Nox),进一步形成细菌脂多糖-氮氧化物酶 1(lipopolysaccharide-Nox enzymes1, LPS-Nox1)氧化还原信号轴,从而促进结肠癌的远处转移^[10]。且由大量的上皮细胞、基质细胞(如成纤

维细胞)、内皮细胞和浸润的炎症细胞等构成的肿瘤微环境中,各种细胞 TLR4 的表达水平与 CRC 的分化、分期、化疗后复发率及生存期密切相关^[11-14]。相应地,在癌前病变-腺瘤-结肠癌发展过程中肠上皮细胞 TLR4 表达水平逐渐升高^[15],组成性激活上皮细胞中 TLR4,促进了炎症介质环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX2)及前列腺素 E-2(prostaglandin E2, PGE2)的表达及中性粒细胞的浸润,从而促进 CRC 的形成^[16],且分期越晚则肠上皮细胞中 TLR4 表达水平越高^[13]。同时基质成纤维细胞中 TLR4 的表达与患者肿瘤高复发率及短的生存时间明显相关,是 CRC 的一个独立预后因素^[12]。Cammarota 等^[14]研究也发现内皮细胞及炎性细胞(巨噬细胞)TLR4 表达增加的趋势与肿瘤进展相一致,尤其是腺瘤和腺癌中 TLR4 的表达明显高于健康组织中。肿瘤组织细胞及微环境 2 大水平均证实了 TLR4 的高表达,说明 TLR4 的表达与肿瘤的发生密切相关。

3 TLR4 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)与 CRC 之间的相关性

3.1 TLR4 基因突变与 CRC 的发生

TLR4 基因位于第 9 号染色体(9q32-q33),TLR4 基因的突变与对 LPS 的反应具有明显差别,如在蛋白水平 Asp299Gly 多态性(D299G)和 Thr399Ile 多态性(T399I)影响 TLR4 蛋白细胞外结构^[17]。TLR4 基因突变改变了肠黏膜先天性免疫细胞和肠上皮 TLR4 分子结构,使机体的免疫系统失去正常处理肠腔内大量细菌产物如 LPS 等的的能力,持续激活下游信号通路,进而使肠黏膜在其长期刺激下产生感染、炎症、过敏、易激乃至癌变^[18],或 TLR4 基因突变间接或直接地调节内源性几丁质酶 1(chitinase 3-like 1, CHI3L1)等表达,从而导致组织重构、血管生成和肿瘤进展^[19]。譬如 TLR3 rs11721827 与直肠癌发生相关,TLR3 rs3775292 和 TLR4 rs11536898 与结肠癌发生相关,且在 TLR2 和 TLR4 中多个 SNPs 与结肠癌的生存期相关^[20],说明 TLR4 基因突变与 CRC 的发生密切相关,其突变增加了 CRC 发生的可能性。

3.2 TLR4 基因多态性与罹患 CRC 风险性

在最近十年,深入研究 SNP 对肿瘤风险的影响成为了研究热点。不同种族之间 TLR4 的不同

基因位点对CRC的影响不同,在俄罗斯人群中IL1B_1473G/C和TLR4_896A/G SNPs与直肠癌的发生密切相关^[21],在高加索人群中纯合型的TLR2+597CC使CRC风险降低5倍,纯合型TLR4 299Gly则增加了3倍发生CRC的风险,且研究显示纯合型TLR4 299Gly在超重个体中发生CRC的风险更高^[22]。此外,TLR4基因多态性不仅与CRC发生风险相关,而且与CRC的恶性程度也密切相关^[20]。在突尼斯人群中TLR4 Asp299Gly(D299G)和Thr399Ile(T399I)与CRC分化程度、临床分期、淋巴结转移呈正相关^[23]。然而最近国内研究显示TLR4基因中Asp299Gly多态性的等位点G显著增加了罹患胃癌的风险,并未发现其与总体消化道肿瘤以及CRC的发生有明显的相关性,并且Thr399Ile的多态性等位点T与总体的消化道肿瘤及胃癌、CRC未见明显相关性^[24]。可见TLR4受种族、基因位点等诸多因素的影响,还需要更多的研究数据来明确其与CRC的关系。

4 TLR4与CRC的发生、发展

流行病学资料表明慢性炎症是发生CRC的一个危险因素,患慢性炎症性肠病如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、克罗恩病通常与CRC发病率增长有关,超出20%的UC患者发展成CRC^[25-26]。在炎症诱导的CRC组织中促炎介质白介素-8(interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等明显升高,抑炎介质白介素-4(interleukin-4, IL-4)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)水平则明显降低^[25-26]。越来越多的证据支持促炎介质COX-2、PGE2、IL-6、CXC趋化因子受体2(CXC chemokine receptor 2, CXCR2)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)等在CRC的发病机制中起着关键作用^[27-31]。研究发现NF- κ B/IL-6信号通路对CRC的发展起到桥梁作用,并且贯穿于CRC的启动、促进和发展整个时期^[27]。在CRC中COX2来源的PGE2通过沉默某些肿瘤抑癌基因或DNA修复基因促进肿瘤的生长^[31];CXCR2通过募集骨髓来源的抑制细胞到肿瘤微环境中,从而加速结肠炎症和CRC的发生^[28]。炎症浸润产生的ROS促进结肠上皮的增生^[29]。有趣的是TLR4在人类或小鼠CRC中过表达,活化的TLR4信号通路促进大量炎性介质的产生,相应地TLR4基因敲除(toll-

like receptor-4 gene knockout, TLR4^{-/-})小鼠阻止了CRC的发生^[30]。在炎症恢复期给予TLR4^{-/-}小鼠补充PGE2促进了CRC的发生,其机制为补充PGE2重新诱导粘膜双调蛋白(amphiregulin, AR)、COX-2的表达和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的激活^[31]。此外,TLR4、MD-2和CXC趋化因子受体7(chemotaxis chemokine receptor 7, CXCR7)明显高于正常组织,且与CRC的肿瘤大小、淋巴结转移和远处转移密切相关^[3];暴露于LPS的CRC细胞株中,CXCR7表达明显升高,TLR4、MD-2及CXCR7共表达促进了癌细胞株的增殖和迁移。最近发现通过TLR4/PI3K相互作用肿瘤来源的透明质酸(hyaluronan, HA)启动中性粒细胞的激活,激活的中性细胞主要集中在癌旁基质和癌巢中,并通过接触依赖机制上调恶性细胞的转移潜能,产生TNF- α 、IL-1 β 等炎性介质,最终促进CRC的发生和疾病的进展^[32]。以上结果表明了TLR4通过多条炎症调节轴反复产生大量炎性因子和炎性介质,进而促进了CRC的发生、发展。

5 TLR4与CRC的转移

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是肿瘤远处转移的关键因素,一个相对高数量的CTCs与疾病的进展和预后不良密切相关。自然杀伤(natural killer cells, NK)细胞中TLR4表达强度明显下降,导致NK细胞识别肿瘤特异性抗原的能力下降,从而导致CTCs细胞免疫逃逸而发生远处迁移^[33]。然而CTCs粘附是CRC转移级联步骤中关键的一步,TLR4信号通过MyD88通路激活NF- κ B,激活的NF- κ B导致ROS释放^[10],ROS进一步调节Wnt/ β -catenin转移信号通路^[15],促进CRC细胞粘附,增加了成功转移的风险。

6 调节TLR4信号通路对CRC预防和治疗

研究表明LPS/TLR4/NF- κ B信号通路的激活释放大量的炎症因子及炎症介质,促进CRC的发生和转移^[2, 4-5]。因此,将TLR4信号通路作为CRC的防治和药物开发成为了研究重点。最近国内体外试验发现富士山苹果酸(modified Fuji apple polysaccharide, MAP)竞争性抑制LPS与TLR4的作用,从而抑制了LPS诱导的NF- κ B的表达及COX2、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloprotei-

dase 2, MMP2)、诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及PGE2等炎症物质的表达,并且促进了细胞质中NF- κ B p65和 κ B抑制因子(inhibitor of κ B, I κ B)的表达^[34]。同样国外Panaro等^[35]研究发现植物萃取物白藜芦醇竞争性抑制LPS与TLR4的作用,进一步抑制I κ B的下调和NF- κ B的激活,从而抑制LPS诱导IL-1 β 、TNF- α 促炎介质和COX-2、iNOS等促炎氧化酶激活物的产生。这些研究均不同程度抑制了LPS/TLR4/NF- κ B信号转导通路所致的炎症反应,从而抑制了CRC的增殖和转移。而在APC^(Min/+)小鼠模型中通过组成性激活上皮细胞中的TLR4的研究中,结果导致CRC肿瘤负荷明显降低,并且Cox-2蛋白明显减少,干扰素- β (interferon β , IFN- β)表达增加,Caspase-3活性明显增强^[36]。由此可见,TLR4作为一个复杂的信号网络,其与CRC的发生、发展密切相关。而预防和治疗CRC有待于其机制的进一步研究。

7 展望

TLR4受体不仅在炎症肠炎到CRC的演变过程中表达明显升高,而且其表达水平、基因多态性影响了CRC的分级、分期及预后。TLR4受体通过LPS/TLR4/MD-2/Mal/MyD88通路启动NF- κ B诱导的炎症反应,从而影响CRC的发生、发展。调节TLR4信号通路可抑制CRC的增殖和转移。基于TLR4的表达水平与CRC的发生、发展密切相关,是否可将TLR4的表达水平作为动态监测指标有待于研究。由于TLR4的基因多态性具有种族特异性,可进一步对我国患者TLR4基因型进行测序以明确其高危基因位点,从而达到对CRC进行早期干预和预防作用。尽管TLR4在CRC中扮演的角色研究已取得了一些成果,但是TLR4作为一个错综复杂的信号通路中的一个重要分子,其分子机制和干预治疗需要进一步的研究。建立理想的结直肠癌相关的CRC动物模型,深入探索和早期干预TLR4信号通路,可以为CRC的预防或治疗提供新的策略。

参考文献

- [1] Kigerl KA, de Rivero VJP, Dietrich WD, et al. Pattern recognition receptors and central nervous system repair[J]. *Exp Neurol*, 2014, 258(1):5-16.
- [2] Plóciennikowska A, Hromada - Judycka A, Borzęcka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3):557-581.
- [3] Xu H, Wu Q, Dang S, et al. Alteration of CXCR7 expression mediated by TLR4 promotes tumor cell proliferation and migration in human colorectal carcinoma [J]. *Plos One*, 2011, 6(12):e27399.
- [4] Aviello G, Corr SC, Johnston DG, et al. MyD88 adaptor-like (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(9):769-778.
- [5] Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll like receptors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(4):396-401.
- [6] Oblak A, Jerala R. Toll-like receptor 4 activation in cancer progression and therapy [J]. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011, 18(1):184-186.
- [7] Aviello G, Corr SC, Johnston DG, et al. MyD88 adaptor-like (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(9):769-778.
- [8] Zhang D, Li YH, Mi M, et al. Modified apple polysaccharides suppress the migration and invasion of colorectal cancer cells induced by lipopolysaccharide [J]. *Nutr Res*, 2013, 33(10):839-848.
- [9] Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, et al. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(5):908-915.
- [10] O'Leary DP, Bhatt L, Woolley JF, et al. TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF- κ B mediated transcriptional up-regulation of Nox-1 [J]. *Plos One*, 2012, 7(10):e44176.
- [11] Santos MF, Mannam VK, Craft BS, et al. Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(3):367-374.
- [12] Eiró N, González L, González LO, et al. Toll-like receptor-4 expression by stromal fibroblasts is associated with poor prognosis in colorectal cancer [J]. *J Immunother*, 2013, 36(6):342-349.
- [13] Sussman DA, Santaolalla R, Bejarano PA, et al. In silico and ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(3):45-57.
- [14] Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal

- TLR-4 expression as a potential prognostic marker[J]. *J Transl Med*, 2010, 8(1):112.
- [15] Santaolalla R, Sussman DA, Ruiz JR, et al. TLR4 activates the β -catenin pathway to cause intestinal neoplasia [J]. *Plos One*, 2013, 8(5):e63298.
- [16] Fukata M, Shang L, Santaolalla R, et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(7): 1464-1473.
- [17] Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms [J]. *Mol Med*, 2008, 14(6):346-352.
- [18] Eyking A, Ey B, Rünzi M, et al. Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(6):2154-2165.
- [19] Kamba A, Lee IA, Mizoguchi E. Potential association between TLR4 and chitinase 3-like 1 (CHI3L1/YKL-40) signaling on colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer [J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13(7):1110-1121.
- [20] Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, et al. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(12):2974-2980.
- [21] Kutikhin AG, Yuzhalin AE, Volkov AN, et al. Correlation between genetic polymorphisms within IL-1 β and TLR4 genes and cancer risk in a Russian population: a case-control study [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(5): 4821-4830.
- [22] Pimentel-Nunes P, Teixeira AL, Pereira C, et al. Functional polymorphisms of toll-like receptors 2 and 4 alter the risk for colorectal carcinoma in Europeans [J]. *Dig Liver Dis*, 2013, 45(1):63-69.
- [23] Omrane I, Baroudi O, Kourda N, et al. Positive link between variant toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ile) and colorectal cancer patients with advanced stage and lymph node metastasis [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(1):545-551.
- [24] Zhao X, Kang S, Liu L, et al. Correlation of Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in toll-like receptor 4 gene with digestive cancer risk: a meta-analysis [J]. *Biomedical Reports*, 2013, 1(2):294-302.
- [25] Strus M, Gosiewski T, Fyderek K, et al. A role of hydrogen peroxide producing commensal bacteria present in colon of adolescents with inflammatory bowel disease in perpetuation of the inflammatory process [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(6):49-54.
- [26] Basavaraju U, Shebl FM, Palmer AJ, et al. Cytokine gene polymorphisms, cytokine levels and the risk of colorectal neoplasia in a screened population of North-east Scotland [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2010, 59(1):44-45.
- [27] Yang H, Qi H, Ren J, et al. Involvement of NF- κ B/IL-6 pathway in the processing of colorectal carcinogenesis in colitis mice [J]. *Int J Inflamm*, 2014, 13(9):81-88.
- [28] Dubois RN. Role of inflammation and inflammatory mediators in colorectal cancer [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2014, 125(1):358-372.
- [29] Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(2):235-241.
- [30] Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(6):1869-1881.
- [31] Hernandez Y, Sotolongo J, Breglio K, et al. The role of prostaglandin E2 (PGE 2) in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated colitis-associated neoplasia [J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10(4):82.
- [32] Wu Y, Zhao Q, Peng C, et al. Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan-mediated TLR4/PI3K activation loop [J]. *J Pathol*, 2011, 225(3):438-447.
- [33] Martinez J, Huang X, Yang Y. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection [J]. *Plos Pathog*, 2010, 6(3):1005-1007.
- [34] Zhang D, Li YH, Mi M, et al. Modified apple polysaccharides suppress the migration and invasion of colorectal cancer cells induced by lipopolysaccharide [J]. *Nutr Res*, 2013, 33(10):839-848.
- [35] Panaro MA, Carofiglio V, Acquafredda A, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells [J]. *Br J Nutr*, 2012, 108(9):1623-1632.
- [36] Li Y, Teo WL, Low MJ, et al. Constitutive TLR4 signalling in intestinal epithelium reduces tumor load by increasing apoptosis in APC (Min/+) mice [J]. *Oncogene*, 2014, 33(3):369-377.

• 综 述 •

遗传性结直肠癌基因检测及其在临床上的应用规范化问题

姜烈君¹ 陆晓旭¹ 黄华艺^{1,2*}

[摘 要] 遗传性结直肠癌是一类多因素遗传特征家族性疾病,包括 Lynch 综合征、家族结直肠腺瘤性息肉和 MYH 相关性息肉,约占所有结直肠癌的 5%。Lynch 综合征(又称遗传性非息肉性结直肠癌)是因无效的错配修复(mismatch repair, MMR)而导致微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)的一系列相关癌症,常由 MMR 基因(*MLH1*、*MSH2*、*MSH6* 和 *PMS2*)突变引起。家族性结直肠腺瘤性息肉(familial adenomatous polyposis, FAP)是 *APC* 基因突变引起的广泛性结肠息肉病。而 *MUTYH* 基因突变可引起 MYH 相关性息肉(MYH-associated polyposis, MAP)。为了规范对遗传性结直肠癌的分子诊断技术流程,美国医学遗传学和基因组学会制定检测大纲以供各相关实验室参考。本文对该大纲进行归纳并结合我国的大纲进行讨论。

[关键词] 遗传性结直肠癌; 家族性腺瘤样息肉; Lynch 综合征; MYH 相关性息肉; 基因检测

Genetic testing of inherited colorectal cancer and its laboratory standards in clinical application

JIANG Liejun¹, LU Xiaoxu¹, HUANG Huayi^{1,2*}

(1. Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China, 530021; 2. Department of Surgical Oncology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA, 14263)

[ABSTRACTS] Inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and mut Y homolog (MYH)-associated polyposis) is a type of multifactor inherited familial diseases which accounts for about 5% of all colorectal cancers. Lynch syndrome is typically recognized as an assemblage of associated cancers characterized by defective mismatch repair (MMR) leading to microsatellite instability (MSI) usually caused by the mutation of the MMR gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*). Familial adenomatous polyposis (FAP) is caused by mutations in the *APC* gene while MYH-associated polyposis (MAP) is caused by mutations in the *MUTYH* gene. In order to assist clinical laboratories to develop and validate testing for this group of inherited colorectal cancers in China, this paper discusses the technical standards and guidelines for genetic testing of inherited colorectal cancer established by China's peers in reference to the standards and guidelines developed by American College of Medical Genetics and Genomics.

[KEY WORDS] Inherited colorectal cancer; Familial adenomatous polyposis; Lynch syndrome; MYH-associated polyposis; Genetic testing

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)可分为散发性、家族性或遗传性几种特征。约 20%~30% CRC 为多因素遗传特征家族性疾病,因遗传获得的高

度外显率单基因突变约占所有 CRC 的 5%。Lynch 综合征、家族结直肠腺瘤性息肉(familial adenomatous polyposis, FAP)和 MYH 相关性息肉(MYH-

作者单位:1. 广西壮族自治区人民医院检验科,广西,南宁 530021

2. 美国罗斯威尔帕克癌症研究所肿瘤外科,纽约,布法罗 14263

*通讯作者:黄华艺, E-mail:Huayi.Huang@Roswellpark.org

associated polyposis, MAP) 为 3 种常见遗传性 CRC, 约占所有 CRC 的 5%。随着分子诊断技术水平的发展和测序成本的降低, 遗传性 CRC 基因的临床检测发展迅速。为帮助临床发现和确诊遗传性 CRC 患者群体, 美国医学遗传和基因组学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 与美国病理学家学会 (College of American Pathologists, CAP) 于 2014 年发布了遗传性结直肠癌基因诊断技术标准和大纲^[1]。本文就指南中遗传性 CRC 突变基因的检测策略、方法、结果解释进行概括, 并结合我国的相关标准进行讨论。

1 Lynch 综合症的基因检测

Lynch 综合征为遗传性 CRC 的常见类型, 占所有 CRC 的 3%, 常伴其他肿瘤且 80% 的病例可发展成 CRC, 平均发病年龄为 61 岁, 为常染色体显性遗传。多数患者自父母获得某个突变的错误配对修复基因 (mismatch repair, MMR)^[2]。MMR 蛋白在细胞周期调控和遗传物质维护中发挥重要作用, MMR 缺失或缺陷导致组织特异性肿瘤的易感性大大增加。MMR 基因 (*MLH1*、*MSH2*、*MSH6* 和 *PMS2*) 突变为常见的 4 种致病基因, 其他基因 (*PMS1*、*TGFBR2*、*MLH3*、*EpCAM*、*BRAF*) 突变也可见, 任何一种 MMR 基因缺失均可导致 Lynch 综合征。在肿瘤组织中, MMRs 基因突变导致高频微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI)^[3]。但有 MMR 基因突变的易感个体, 可能终身都不会患 CRC。

MMR 基因突变可发生于任何种族, 4 种基因中有多达 2 000 多种不同突变类型, 其中 *MLH1* 基因 875 个、*MSH2* 基因 860 个、*MSH6* 基因 290 个、*PMS2* 基因 111 个。突变类型有错义、无义、剪接位点或调节类型。大片段缺失分别占 *MLH1* 和 *MSH2* 突变的 5%~10% 和 17%~50%。鲜见 *MSH6* 和 *PMS2* 大片段缺失和重复, 未发现突变热点。我国对 MMR 基因的突变情况也有报道。聂辰等^[4]对北京地区 94 例结直肠癌患者的组织标本研究发现遗传性非息肉病性结直肠癌 (Lynch 综合征) 的发病率为 13.83%, *MSH2* 基因突变所占比例达 84.62%, 与遗传性非息肉病性结直肠癌国际合作组织提供的数据 (40%) 相比高于世界每年新发病例的水平, 且 *MSH2* 基因突变致病尤为突出。刘晓红等^[5]对 100 例连续的结直肠癌患者进行 Lynch

综合征的初步筛查, 结果发现 9% 的病例出现 MMR 蛋白缺失表达, 以 *MLH1* 和 *MSH2* 蛋白缺失表达为主, 1 例患者存在 *BRAF* 突变。

1.1 检测标准

ACMG 制定的检测标准为符合以下任何一项者, 需进行 MSI 检测: (1) 50 岁以下 CRC 患者; (2) 同时或异时 CRC 或有其它遗传性非息肉 CRC 相关肿瘤; (3) 60 岁以下 CRC 患者, 伴肿瘤浸润淋巴细胞; (4) CRC 及一代亲属中有 50 岁以下 CRC 或遗传性非息肉病变 CRC 相关肿瘤诊断史; (5) CRC 且 2 个一代或二代亲属中有 50 岁以下 CRC 或遗传性非息肉病变 CRC 相关肿瘤诊断史。我国于 2004 年发布了中国人遗传性大肠癌的筛检标准^[6]: 家系中至少有 2 例组织病理学明确诊断的 CRC, 其中的 2 例为父母与子女或同胞兄弟姐妹的关系, 并且符合以下一条: (1) 至少 1 例为多发性大肠癌患者 (包括腺瘤); (2) 至少 1 例大肠癌发病早于 50 岁; (3) 家系中至少 1 人患遗传性非息肉病性结直肠癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 相关肠外恶性肿瘤 (包括胃癌、子宫内膜癌、小肠癌、输尿管或肾盂癌、卵巢癌、肝胆系统癌)。相比之下, ACMG 的筛检范围更广泛, 减少漏诊的可能性。

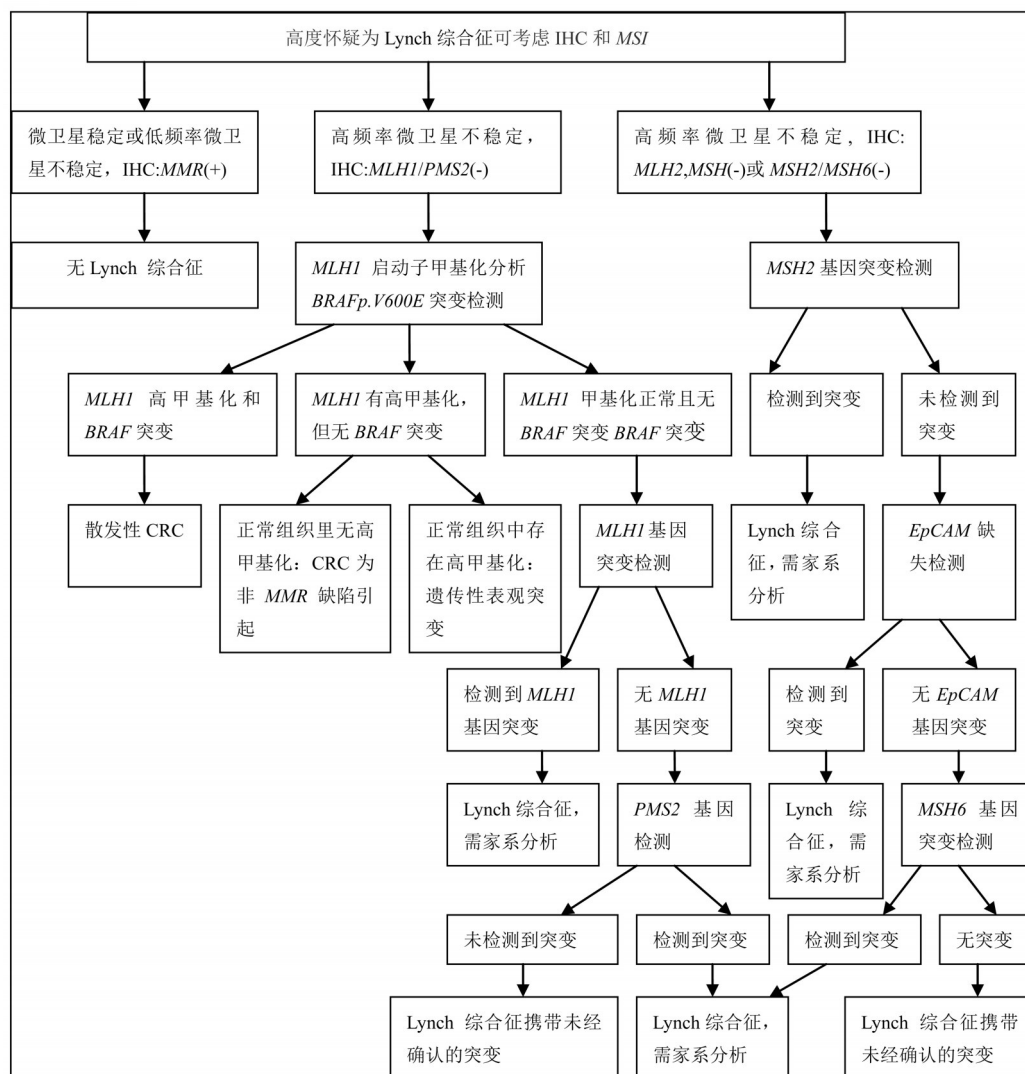
1.2 检测策略

2004 年我国遗传性大肠癌协作组制定的筛查策略制定了中国人 HNPCC 家系筛查标准^[6]: 在实验室条件允许的情况下, 符合中国人 HNPCC 筛检标准的家系均应该进行 *hMLH1*、*hMSH2* 基因的免疫组织化学研究和 MSI 检测。两者均阴性者, 可无需进行突变检测分析; 两者之一为阳性者, 则需进入下一步的 *hMLH1* 和 *hMSH2* 基因种系突变 (germline mutation) 检测分析。而 ACMG 推荐的检测策略更为详细、实用, 流程如图 1^[1]所示。

ACMG 推荐, 高度怀疑为 Lynch 综合症患者需做 MMR 蛋白免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 染色和 MSI 分析。

(1) 如果检测结果提示微卫星稳定或低频率微卫星不稳定, 且 IHC 检测结果为有 MMR 蛋白表达, 则无 Lynch 综合征。

(2) 如果检测结果提示高频率微卫星不稳定, IHC 结果为 *MLH1* 或 *PMS2* 缺失, 则进行 *MLH1* 启动子“C 区”的甲基化分析与 *BRAF* 基因突变 p.V600E 检测^[7]。*BRAF* 基因突变 p.V600E 多见于散

图1 分子检测判断Lynch综合征流程图^[1]Figure 1 The flow chart of testing for Lynch syndrome^[1]

发性CRC, 罕见于Lynch综合征肿瘤患者^[8]。因此, 如检测到 $MLH1$ 高甲基化和 $BRAF$ 突变, 则认为是散发性CRC, 无需家系分析。如检测结果提示 $MLH1$ 有高甲基化, 但无 $BRAF$ 突变, 正常组织里无高甲基化, 则CRC为非 MMR 缺陷引起; 如果正常组织中存在高甲基化, 则为遗传性表现突变。如检测结果提示 $MLH1$ 甲基化正常且无 $BRAF$ 突变, 进一步进行 $MLH1$ 基因突变检测, 如检测到突变则为Lynch综合征, 需进行家系分析; 如无 $MLH1$ 基因突变, 则再进行 $PMS2$ 基因检测, 有突变则为Lynch综合征, 需家系分析, 无突变则为Lynch综合征携带未经确认的突变。

(3) 如果检测结果提示高频率微卫星不稳定, IHC结果提示 $MLH2$ 缺失, 或 $MSH6$ 单一缺失或

$MSH2/MSH6$ 双缺失, 则进一步进行 $MSH2$ 基因突变检测, 如有突变则为Lynch综合征, 需家系分析; 如无突变则进行 $EpCAM$ 缺失检测, 如有突变则为Lynch综合征, 需家系分析; 无突变者则再进行 $MSH6$ 基因突变检测, 如有突变则为Lynch综合征, 需家系分析; 无突变则为Lynch综合征携带未经确认的突变。

1.3 MMR基因突变检测方法

ACMG规定, 检测样本应同时包含肿瘤和正常组织, 新鲜冰冻或石蜡包埋的组织均适用。组织切片先行H&E染色以辨别正常和肿瘤组织的边界再进行IHC检测。肿瘤组织提取的DNA用于 MSI 检测, 血液中提取的DNA可作为正常对照。除 $PMS2$ 基因外, 可用石蜡包埋的组织提取的

DNA 进行 *MMR* 基因突变分析。从病人血液中提取的 DNA 用于测序分析。

1.3.1 *MMR* 蛋白 IHC 检测

IHC 适用于所有 4 种 *MMR* 基因表达产物分析并应同时对其进行检测。观察 *MMR* 基因蛋白在细胞核和邻近非肿瘤组织中的表达情况,结果以 *MMR* 基因蛋白存在(阳性)或缺失(阴性)表示。这与我国的标准模式不同,即把缺失表达 *MMR* 蛋白的定为阳性结果,正常表达 *MMR* 蛋白的定为阴性结果。

1.3.2 *MSI* 检测方法

用 PCR 检测 *MSI*,可使用美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)的微卫星重复序列组套 BAT25、BAT26、D2S123、D17S250 和 D5S346。不建议用 BAT26 评估 Lynch 综合征高危人群,因为 BAT26 稳定性也见于 Lynch 综合征微卫星不稳定性肿瘤中,特别是大片段 *MSH2* 缺失。BAT25 和 BAT26 可在同一基因座上呈多态性,因此归类为 *MSI* 阳性并不正确。

1.3.3 *MMR* 基因的突变检测

MMR 基因突变分子检测为 Lynch 综合征的确诊方法。

我国 2004 年大纲推荐用聚合酶链反应单链构象多态(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)或变性高效液相色谱分析(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)法,或直接进行 DNA 序列测定。如上述方法检测结果阴性,需考虑大片段缺失的检测。

ACMG 推荐 PCR 法检测 *MMR* 点突变,数套引物、PCR 条件以及分离检测方法详见文献^[1]。dbSNP 数据库建立 135 及 1000 基因组突变数据库定期更新人类基因组 SNPs。实验室应每年在最低引物量的情况下检测 SNPs 的出现情况。

用靶向突变检测技术检测 *BRAF* 基因 p.V600E 错义突变,如限制酶切技术、等位基因特异性引物延伸技术,或实时荧光定量 PCR。用改良重亚硫酸盐处理结合甲基化特异荧光定量 PCR,分析 *MLH1* 启动子 C 区甲基化,检测甲基化和非甲基化基因座。

Sanger 测序是对 *MMR* 基因的所有编码外显子进行突变检测的金标准,在 *PMS2* 突变检测时可用功能基因特异引物长链 PCR 来克服假基因的干扰。下一代测序(next generation sequencing, NGS)

可高通量、低成本地对 CRC 相关基因进行测序,但 *PMS2* 因假基因存在不能用 NGS 测序。NGS 无法检测所有目的区(如外显子缺失或重复),只能用 Sanger 测序和其它方法弥补。对 NGS 中临床意义未明的序列变异,遵循 ACMG 对序列变异的解释。家系研究可阐明错义突变属病理性或良性特征。

检测大片段缺失的主要方法为 Southern blot 和多重连接依赖的探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)。MLPA 可有效检测 2 个或多个连续外显子缺失,通过一个缺失外显子可推断其他外显子缺失。若 MLPA 是初始方法,则 Southern blot 或实时定量 PCR 法作为确认方法。其它检测大基因重排的方法包括多重扩增探针杂交法和实时定量 PCR。

基因靶向的基于阵列比较基因组杂交技术(array-base comparative genomic hybridization, aCGH)检测单个或多个外显子缺失和重复:aCGH 使用多重探针,灵敏度极高,克服了 MLPA 法中因 SNPs 引起的基因座信号丢失的缺点。假阳性结果可由引物、探针或限制性核酸内切酶消化位点引起的 SNP 造成。证实真阳性通常需使用另一种缺失检测方法,可用 Southern blot 和 MLPA 对同一基因进行缺失分析,也可用定量 PCR 分析。搜索 GenBank dbSNP 数据库和选择无 SNP 的引物及探针位点可消除假阳性。通过测序可容易地检测到该外显子的 SNP。对于单一外显子缺失,可通过第 2 种方法使用相同引物,检测另一区域的序列来证实,如实时定量 PCR 可作确证方法。

EpCAM 基因缺失:常见 *EpCAM* 基因的 3' 端缺失,缺失引起 *MSH2* 基因体细胞超甲基化,因为这 2 个基因在 2 号染色体上毗邻。由 *EpCAM* 基因缺失引起的肿瘤,IHC 分析证实有高频 *MSI* 和 *MSH2* 或 *MSH6* 缺失。对 IHC 发现的 *MSH2* 或 *MSH6* 缺失,可用 Southern blot、MLPA 和基因靶向的 aCGH 检测 *EpCAM* 基因的 3' 端缺失。

1.4 结果解释

1.4.1 IHC 结果

MMR 蛋白(*MLH1*、*MSH2*、*MSH6* 和 *PMS2*)染色结果报告为“某某蛋白存在(阳性)”、“某某蛋白缺失(阴性)”、“无法解释”。“无法解释”是指作为内标用的阳性对照品不染色(阳性对照物显阴性结果)的阴性结果的肿瘤标本。不推荐定量解释。

1.4.2 PCR法检测 MSI

报告应包括微卫星分析板的分析结果和每个基因座的结果。若 MSI 不稳定重复序列大于或等于 40% 则报告为: 高频微卫星不稳定性 (high frequency of micro-satellite instability, MSI-H); 若 MSI 不稳定重复序列小于 40% 则报告为: 低频微卫星不稳定性 (low frequency of micro-satellite instability, MSI-L); 未检测到不稳定重复序列则报告为微卫星稳定 (micro-satellite stable, MSS)。MSI-H 提示 Lynch 综合征易感。

1.4.3 MMR 基因的突变检测

报告应包括基因名、突变(核苷酸位置)、氨基酸改变、缺失或插入, 以及转录产物数量。如有改变应注明: 有害(病理性的)、良性或结果未明的改变。

2 家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)基因检测

FAP 易转化成 CRC, 占有 CRC 的 1%。该病以大量结直肠腺瘤息肉(>100 颗)为特征, 平均发病年龄 16 岁, 为染色体显性遗传病。FAP 曾被认为是 Gardner 综合征。渐弱型腺瘤息肉病(attenuated adenomatous polyposis, AFAP)以结肠息肉少(平均 30 颗)和发病时间晚(平均发病年龄为 40 岁)为特征。FAP、AFAP 和 Gardner 综合征均由腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)的种系突变引起。APC 为抑癌基因, 正常 APC 蛋白与细胞粘附和微管聚合有关。APC 功能丧失导致癌基因 *c-myc*、*cyclin-D* 和其它靶基因的异常转录。无论被检者父母、同胞是否患该病, 若继承 2 种隐性遗传 *MUTYH* 突变基因, 其可患腺瘤性息肉。

APC 基因种系突变达 1 500 多种。大部分为点突变, 包括核苷酸置换、缺失或插入, 多数 APC 突变可产生终止密码, 翻译出无功能的“截短蛋白”。少数突变为错义突变, 诱导 FAP 发生。约 20% 种系突变包含大范围缺失、插入和复杂的基因重排。APC 基因突变存在民族差异, 我国珠珠^[9]等对云南 5 个 FAP 家系 APC 基因突变研究, 用 DNA 测序法查出 1 个家系的 APC 基因密码子 1196S > SX 突变, 云南省少数民族家系 APC 基因的突变率不高。

FAP 新突变率已高达 20%, 突变检测可评估遗传风险, 但不能明确特定突变与临床表型的关系,

无法指导 FAP 临床诊疗。APC 基因的 p.I1307K 错义突变可增加 CRC 的易感性(10%~20%)^[10], 建议存在此突变的个体进行早期筛查。p.E1317Q 错义突变可能与结直肠腺瘤及 CRC 易感性相关。

2.1 检测标准

ACMG 的检测标准为: (1) 小于 40 岁诊断为 CRC 的患者; (2) 一级亲属诊断为 CRC 的患者; (3) 其他的腺瘤或肿瘤患者。FAP 测试: ≥100 颗显性遗传腺瘤性息肉; AFAP 测试: 10~100 颗显性遗传腺瘤性息肉。我国遗传性大肠癌协作组制定的检测指征: 大肠内弥漫腺瘤性息肉, 100 颗以上; 或腺瘤性息肉不足 100 颗者, 伴有家族史或先天性视网膜色素上皮肥厚。ACMG 的检测标准更为宽泛。

2.2 检测策略

2004 年我国遗传性大肠癌协作组制定的检测策略^[6]: 被诊为 FAP 者应进行 APC 基因的突变检测。ACMG 推荐 FAP/AFAP 综合征检测的方案如图 2^[1]所示: 使用 APC 基因全序列检测 FAP。若突变检测阳性, 诊断为 FAP/AFAP; 对于高危家庭成员, 可提供遗传咨询。若突变检测阴性, 则进行大片段基因重排检测。可能存在所采用的检测方法未能检测到患者的 APC 基因突变, 应考虑 MAP 测试(对无或弱的 FHx 以及较少息肉的患者很重要)。

2.3 检测方法

2.3.1 点突变检测

涉及 PCR 法、引物设计、PCR 产物、基因筛查、Sanger 测序和 NGS。大部分 APC 基因突变是点突变, 直接测序法灵敏度最高, 大部分实验室把 DNA 直接测序(Sanger 和 NGS)列为标准方法。

2.3.2 大范围突变检测

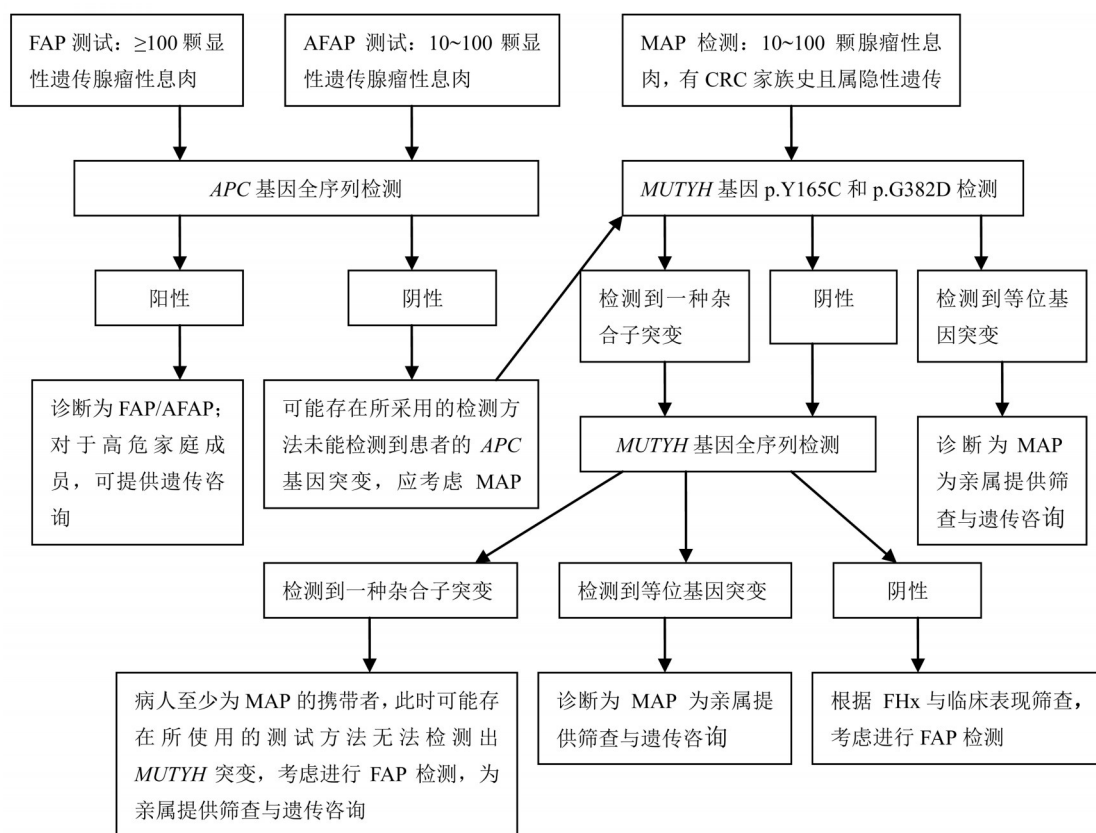
可用基因靶向 aCGH 分析方法。

2.4 结果解释

约 80% FAP 发生基因突变, FAP 基因突变检测阳性结果可诊断 CRC。APC 基因突变检测用于疾病诊断和发病前期的筛查, 外显率 100%。用于产前诊断要求有患病家族史, 样品为羊水细胞和绒毛膜。

3 MYH 相关的结直肠息肉(MYH-associated polyposis, MAP)基因检测

MYH 相关息肉是由 *MUTYH* 基因的双等位基因突变引起, 这种突变的个体 60 岁时患 CRC 的外

图2 FAP/AFAP/MAP分子诊断技术流程^[1]Figure 2 The flow chart of FAP/AFAP/MAP molecular diagnosis^[1]

显率高但不全是CRC,为常染色体隐性遗传,通常无确切家族史。MAP引起的CRC约占所有CRC的0.7%,占家族性或早发CRC(息肉数量<15~20颗)的2%。MAP患者息肉数量不固定,双等位基因突变在息肉数15~100颗的患者中占30%,在息肉数大于100的患者中达7%,双等位基因突变也见于无息肉患者。由于MAP家族史不显著,AFAP、FAP新突变的发生率高,多腺瘤息肉患者应同时检测MUTYH和APC基因突变。

MUTYH是碱基切除修复基因,在DNA复制时,MUTYH通过切除与8-羟鸟嘌呤错配的腺嘌呤残基修复DNA。含MUTYH等位基因突变的肿瘤组织有大量的APC基因体细胞突变。MUTYH基因突变见于多数种族中,特定种族存在若干主要突变,如p.Y90X和p.E499X,国内尚未见有报道。目前已知100多种MUTYH基因突变,约有1%~2%普通人群携带MUTYH基因突变^[11]。

3.1 检测标准

(1)诊断为CRC,年龄在40岁以下;(2)息肉数

量10颗以上,且APC基因突变检测阴性;(3)有CRC家族史且属隐性遗传,包括伴随息肉和无息肉的CRC。

3.2 检测策略

MAP综合征的推荐检测方案如图2^[1]所示:建议在进行MUTYH基因全序列检测前先进行p.Y165C和p.G382D检测。若检测到等位基因突变,可诊断为MAP,为后代和亲属提供测试以确定携带者。若2种突变检测均阴性,则根据临床表现及家族史决定是否行MUTYH基因全序列检测。若检测到一种杂合子突变,下一步则进行MUTYH基因全序列检测。如检测到等位基因突变可诊断为MAP;如检测到一种杂合子突变,病人至少为MAP的携带者,此时可能存在所使用的测试方法无法检测出MUTYH突变,考虑进行FAP检测,为亲属提供筛查与遗传咨询;如阴性,根据FHx与临床表现筛查,考虑进行FAP检测。

3.3 检测方法

大部分MUTYH基因突变为点突变,包括无义、

错义和小片段插入或缺失。在 *MUTYH* 基因中未见大的缺失或复制被报道。

用 PCR 法检测点突变。限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 是检测 p.Y165C 和 p.G382D 突变最常用的方法。高压液相色谱、焦磷酸测序和等位基因特异引物伸展等技术也可用于 p.Y165C 和 p.G382D 突变检测。多数靶向方法对 *MUTYH* 基因突变的检测率非常灵敏, 可达 99%。意义未明的 SNPs 与突变极为相似, 可导致结果假阴性。也可用 Sanger 测序和 NGS 检测点突变。*MUTYH* 基因全序列检测可检出高达 99% 的突变, Sanger 测序法不适用于检测杂合子单个外显子以及多个外显子缺失和重复。

3.4 结果解释

MUTYH 基因突变检测用于疾病确诊及携带者检查。对于杂合子若共同突变中只有一项阳性, 或突变检测阴性, 则行 *MUTYH* 基因测序。

4 报告格式和其它

分子遗传学测试报告应该提供如下信息: 病人和医生的信息、测试操作者、测试结果和解释、进一步的建议和补充信息。理想的报告模板, 应该包含基因名字、突变的核苷酸位置、氨基酸的改变、缺失或插入和转录物数量等, 还要注明所发现的改变属病理性、无害或目前无法解释。设计分子遗传学测试报告模板, 旨在提高临床决策, 让实验室和开单临床医师之间更有效地沟通, 并评估使用该模板生成的分子检测报告的实用性和有效性。

5 小结

对于可疑的遗传性结直肠癌家系来说最好的方法是通过分子遗传学检测证实这个家族中是否具有遗传性结直肠癌胚系突变, 然后将家系资料交给肿瘤遗传学专家和相关人员进行远期评价, 一旦遗传性结直肠癌得到确诊, 家族中患病高危人群应该得到重视, 予以早期、连续监测和早期手术有重要意义。而对已有临床症状体征的患者, 进行分子遗传学检测对诊断起确定作用。虽然我国遗传性大肠癌协作组制定了遗传性 CRC 筛检标准的实施方案, 但不够全面和详细, ACMG 关于遗传性结直肠癌的分子遗传学检测的指南, 对检测策略和检测方法进行了详细讨论。尽管遗传性结直肠癌筛查

检测的临床实施关键的问题已经解决, 但是, 测试方法无法检测出来的突变及携带未经确认的突变的具体临床应用还需要研究者们进一步交流完善。

参考文献

- [1] Madhuri H, Mathew F, Rong M, et al. A working group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) laboratory quality assurance committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis) [J]. *Genetics in Medicine*, 2014, 16(1):101-116.
- [2] Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(25):2449-2460.
- [3] Lynch PM. The hMSH2 and hMLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2009, 18(4):611-624.
- [4] 聂辰, 李月廷, 赵保健, 等. 遗传性非息肉病性结直肠癌的分子病理研究 [J]. *中国医药导报*, 2014, 30(10):23-25.
- [5] 刘晓红, 曹永成, 王翠翠, 等. Lynch 综合征相关直肠癌患者的初步筛查 [J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(6):394-398.
- [6] 全国遗传性大肠癌协作组. 中国人遗传性大肠癌筛检标准的实施方案 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(3):191-192.
- [7] Kim YH, Kakar S, Cun L, et al. Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(11):2587-2593.
- [8] Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer [J]. *Fam Cancer*, 2007, 6(3):301-310.
- [9] 珠珠, 黄鉴, 董坚, 等. 5 个家族性腺瘤性息肉病家系 APC 基因突变研究 [J]. *西部医学*, 2012, 24(9):1654-1657.
- [10] Goodenberger M, Lindor NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45(6):488-500.
- [11] Colebatch A, Hitchins M, Williams R, et al. The role of MYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(9):1239-1243.

《创新医疗器械特别审批程序(试行)》解读

杨勇 雷孝锋 李尔华 高旭年*

当前,我国医疗器械行业已进入快速发展期,2014年的市场规模已达到3 000亿元人民币,已经占到药品市场的17%。在中国医药进出口总额里,医疗器械所占比重接近38%,这证明医疗器械在我国医药进出口中表现得非常活跃。我国现有1.5万多家医疗器械企业,仍以“多、小、散、低”为主。无论在国内还是国际市场,我国中低端医疗器械都占有很大的地位;而在高端医疗器械市场,国产产品的比重不高,归根结底主要是因为我国医疗器械行业的创新水平偏低。长期以来,由于技术储备、创业环境、资金受限等因素制约,从而造成国内企业创新活跃度、驱动力不足。

针对创新体制问题,国务院新颁布的《医疗器械监督管理条例》(下称《新条例》)第五条明确体现了国家鼓励医疗器械的创新和新技术的推广应用,并在《新条例》总则中体现,足见国家对医疗器械创新的重视。早在《新条例》颁布之前,国家食品药品监督管理总局(下称“总局”)已于2014年2月7日发布(食药监械管〔2014〕13号)公告,制定并颁布了《创新医疗器械特别审批程序(试行)》(下称《特批程序》)。该程序是在确保上市产品安全、有效的前提下,针对创新医疗器械设置的审批通道,也是食品药品监督管理部门为促进医疗器械创新发展而推出的重要措施。《特批程序》为鼓励医疗器械的研究与创新,促进医疗器械新技术的推广和应用,推动医疗器械产业发展起到积极作用;同时从医疗器械监督

和审评审批机制方面进行制度改革,扫除制度障碍。

1 创新医疗器械的定义

依据《特批程序》第二条规定,创新医疗器械须同时符合以下3个条件,缺一不可。

(1)申请人在中国依法拥有产品核心技术发明专利权或者核心技术发明专利已由国务院专利行政部门公开。

(2)主要工作原理/作用机理为国内首创,产品性能或者安全性与同类产品比较有根本性改进,技术国际领先,并且具有显著临床应用价值。

(3)产品完成前期研究并具基本定型产品,研究过程真实、受控,研究数据完整、可溯源。

从创新医疗器械的定义可以看出,创新的关键在于专利,其专利要求体现在“技术重要性、专利类型、专利合法性、专利地域性”4个方面,专利要求的关键在于申请人必须拥有产品的核心技术发明专利。国内申请人必须在中国合法拥有产品核心技术的发明专利权,或者通过受让取得在中国的产品核心技术的发明专利权或其使用权;而进口器械申请人须在中国申请该产品的核心技术发明专利或者通过专利合作条约(patent cooperation treaty, PCT)途径进入中国国家阶段。也即专利文本须符合以下5种情况之一:(1)取得授权发明专利证书;(2)《发明专利申请公布通知书》;(3)《发明专利申请公布及进入实质审查阶段通知

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:gaoxunian@126.com

书》;(4)《授予发明专利权通知书》;(5)《国际申请进入中国国家阶段通知书》。2014年全年,总局医疗器械技术审评中心共收到136项“创新医疗器械特批审批申请”,最终通过审查的仅有18个国内产品,国产通过率仅为18.1%。其中,未通过审查的产品最主要原因就是专利问题,占30%,主要问题有:专利文件不全、专利人和专利内容与项目不符或不是核心专利等(数据来源:总局器械技术审评中心)。申请人需合理安排产品专利的申请及相关文件的准备,否则将面临创新审查未通过而延误整个产品注册时间。需要特别指出的是,申请人必须在专利问题上特别重视并做好充足的资料准备,因为现阶段创新资料受理后,在总局审查阶段未设补充资料环节,即申请人没有补充资料或者与审查专家进行沟通的机会。

创新器械的定义条件(2)由3部分组成:(1)“国内首创”——总局创新医疗器械审查办公室界定的依据为:境内产品申报时,国内企业没有拿到同类产品注册证;对于进口产品则为在中国境内没有同类产品注册证。(2)对于“国际领先”概念的界定则较为宽泛,总局主要在专项会上通过《查新报告》由专家评估;(3)“显著的的临床应用价值”——即产品的安全性、有效性甚至价格等比同类产品有显著的优势。申请人可从国内外同类产品上市情况及其分析比较、公开发表于核心刊物的能充分说明产品临床应用价值的学术论文、专著及文件综述等方面提供材料证明其显著的临床应用价值。

根据《特批程序》,对于申请创新的产品要求主要是基本定型,但是对申请创新的时间没有明确规定,对于申请创新的产品是否已经进行注册检验、临床试验并未明确限制。对于申请创新的产品是否已经进行注册检验、临床试验并未明确限制。理论上,只要产品未最终定型,就仍需要对一些重要的技术安全性问题进行沟通,因此无论是否完成注册检验,还是临床试验已经开展,都可以申请创新。如果是已经受理,进入技术审批阶段,产品的设计和技术已经定型,若产品存在重大技术缺陷和安全技术问题,则极有可能导致整个申请被退审。此外,根据创新医疗器械的审评工作流程与时限以及非创新特批产品的审评流程审批与时限,产品注册受理后再申请创新,并未能明

显缩短注册周期。因此对于申请人而言,申请创新特批,应结合自身产品的研制情况,适时申请,宜早不宜晚。

2 原则与优惠

对于经审查同意按特别程序审批的创新医疗器械,各级食品药品监督管理部门及相关技术机构将根据各自职责和程序规定,按照早期介入、专人负责、科学审批的原则,在标准不降低、程序不减少的前提下,对创新医疗器械予以优先办理,并加强与申请人沟通交流。

创新产品上市大体可分为创新特别审批申请阶段和创新医疗器械注册申请审批阶段。在创新特别审批申请阶段,《特批程序》给予申请最大的优待政策就是在产品注册申请受理前以及技术审评过程中指定专人,应申请人的要求,及时沟通指导,共同讨论重大技术性与安全性问题、临床试验方案、阶段性临床试验结果的总结与评价等相关问题,给创新产品的后续研究、评价以及审评审批提供工作参考和依据,有助于申请人与各级食品药品监督管理部门的技术审评机构就产品的创新达成共识,避免盲目申报,同时有助于加快器械创新公示后的审评审批进度,提高效率。

在创新医疗器械注册申请阶段,医疗器械检测机构、食品药品监督管理部门及行政受理中心对于创新器械在注册申请的每一环节都是专人负责、优先办理。对于受理注册申报的创新医疗器械,食品药品监管总局将优先进行审评、审批。对于境内企业申请,对于国产创新医疗器械,如产品被界定为第二类医疗器械,由相应的省级食品药品监督管理部门参照本程序进行后续审评审批。

3 审查流程及时限

根据《特批程序》,境内创新医疗器械特别审批工作流程分为初审、受理、审查、签发4个阶段;境外创新医疗器械特别审批工作流程分为受理、审查、签发3个阶段。

境内申请人向其所在地的省级食品药品监督管理部门提出创新医疗器械特别审批申请后,省级食品药品监督管理部门应当在20个工作日内完

成初审。对于完成初审的,省食品药品监督管理局将申报材料和初审意见报送食品药品监管总局行政受理服务中心,食品药品监管总局受理创新医疗器械特别审批申请后,由创新医疗器械审查办公室组织专家进行审查,并于受理后40个工作日内出具审查意见。经审查,对拟进行特审的申请项目,则在食品药品监管总局医疗器械技术审评中心网站予以公示,时间不少于10个工作日。对于公示有异议的,应当对相关意见研究后作出最终审查决定。

境外申请人则直接向总局提出创新医疗器械特别审批申请,总局行政受理服务中心对申报资料进行形式审查,对符合规定要求的予以受理,受理及后续的工作流程和时限与境内申请人相同。根据审查流程,如果没有问题,境内创新医疗器械特别申请应在70个工作日内获得审查结果,境内创新医疗器械特别申请应在不到50个工作日内获得审查结果。如考虑到申请人提供信息不周全需补充材料的情况以及资料受理和流转时间,申请创新到获得创新批示的具体情况还需根据实际工

作情况而定。

4 总结

创新《特批程序》出台,为国内和国外进口创新医疗器械上市建立了一条快速通道,同时为创新医疗器械注册申请人与医疗器械检测机构、各级食品药品监督管理局、技术审评中心之间提供了一种及时有效的沟通机制。创新医疗器械申报过程中,食品药品监督管理局就产品安全性和技术性问题与申请人的提前沟通、指定专人负责,有助于企业节约成本与资源、完善产品技术并提高临床应用的安全性和有效性。从2014年3月到2015年6月上旬,经过专家评审,进入创新医疗器械特别审批申请审查结果公示的创新医疗器械共计31个,其中国产医疗器械30个,进口医疗器械1个。这31种产品均以临床需求为导向,技术上体现国际创新,提高了我国上市医疗器械的创新水平。但从申请创新医疗器械的通过率而言,我国医疗器械创新水平依然整体不高,医疗器械的创新之路任重而道远。

广东省过敏反应与免疫重点实验室

广东省过敏反应与免疫重点实验室是广州医科大学更名后建设的首个省级重点实验室，主要依托于广州医科大学附属第二医院，前身是1979年组建的“广医二院临床变态反应研究室”及20世纪末期的“广州市教委重点扶持实验室”，其最初的学科支撑为变态反应科。经过30余年的建设和实践，目前已发展到由广医二院、广医一院、广州Hoffmann免疫研究所等相关临床与基础研究力量组成的系统性实验室。2009年成为呼吸疾病国家重点实验室变态反应研究室，2011年成为广州市重点实验室，2013年成为广东省重点实验室。

2015年得到广州市科创委进一步支持并建立“广州市过敏反应转化医学研究中心”，是广州医科大学广东省高水平大学重点建设免疫学专业的支撑单位。

实验室涵盖于广州医科大学临床一级学科博士学位授予权框架内，学术氛围浓郁，对外交流频繁。除了有来自加州大学圣地亚哥分校（University Of California San Diego, UCSD）的Eyal Raz教授和长江学者何韶衡教授、钟南山院士等担纲的学术委员会外，还聘任数名外籍著名教授作为特聘教授和客座教授进行合作教学与科研，是有志青年进修学习与科研的理想场所。除培养进修生、对口帮扶社区医院和下级医院等实践教学内容外，还通过课堂教学培养本校的本专科生、硕士生、博士生、博士后乃至千百十人才培养对象等不同层次的人才，联合培养数十名来自其他211高校等单位的客座硕士生博士生，从而形成教学系统全面、教学平台开放、教学内容精专、教学效果良好的特色实验室。实验室硬件配置齐全，仪器设备总值超过2000万元。目前，实验室已获得国家重大科技专项课题等数十项课题的资助，近5年获得的可支配的纵向研究经费达3000多万元。

实验室形成了具有鲜明特色的过敏原性医学评测与改良的技术平台。自主开发了过敏原生物信息学判别软件SORTALLER (<http://sortaller.gzhmc.edu.cn>)，准确性国际领先，正被来自美国在内的30多个国家的研究者持续应用。近年获得国家发明专利2项、计算机软件著作权1项，申请国际发明专利1项及多项国家发明专利。获广东省科技进步二等奖和广州市科学技术一等奖各1项。发表相关论文近百篇。在Springer出版国际第一本变态反应生物信息学专著《Allergy Bioinformatics》。

实验室主任陶爱林教授是广州医科大学博士生导师，广医二院变态反应国家临床重点专科副主任、学科科教带头人，是SCI期刊Journal of Immunotherapy Applications及英文期刊World Journal of Respiratory编委以及多本SCI杂志的资深审稿人。近年研究专注于过敏疾病诊治、过敏原的生物信息学及食品药品过敏原性的医学评价与改良。



广东省过敏反应与免疫重点实验室



科技进步奖

→ 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