

感性和特异性,现对两种方法进行比较,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 9~11 月在本院妇科门诊就诊的 BV 患者 110 例为研究对象,年龄 18~55 岁,中位年龄 35 岁,除外月经期、近期使用抗生素、3 d 内阴道用药、24 h 内同房及阴道冲洗者,阴道分泌物标本显微镜下发现滴虫、真菌或革兰阴性双球菌者亦排除。

1.2 方法 按 Amsel 诊断标准进行 BV 筛查,统一观察、取材。(1)氨试验:10%KOH 1~2 滴加在有阴道液的载玻片上,如释放氨气味为阳性。(2)将精密 pH 试纸(pH3.8~5.4)贴附于阴道侧壁上 1/3 段 0.5 s,30 s 后读取 pH 值,pH>4.5 为阳性。(3)白带均质稀薄并伴有鱼腥味为阳性。以上 3 项至少 2 项阳性者,再做以下步骤。采集阴道侧壁上 1/3 段分泌物作 1 张涂片,待涂片干后,行革兰染色;同时用宫颈刷收集宫颈及颈管细胞,将收集的细胞洗入细胞保存液中,经美国 Cytoc 公司液基细胞处理器程序化处理制成直径 2 cm 的薄层细胞片,95%乙醇固定,HE 染色;两种方法均在 400 倍显微镜下观察线索细胞,以线索细胞数量大于或等于 20% 为阳性。

1.3 统计学处理 差异性分析采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 线索细胞形态特点 线索细胞系大量加得纳菌附着于鳞状上皮细胞表面,如一层细沙均匀覆盖,它不同于乳酸杆菌吸附在阴道脱落鳞状上皮细胞表面,区别主要在于细胞边缘的清晰度,线索细胞呈斑点状、锯齿状且外观边缘模糊不清。TCT 制片 HE 染色上皮细胞胞浆染成红色,细菌染成淡紫色,背景清晰,线索细胞在镜下更加易于辨认。

2.2 灵敏度及特异度比较 110 例阴道涂片革兰染色检出线索细胞阳性 88 例,占 80.00%;TCT 制片 HE 染色线索细胞阳性 86 例,占 78.18%。两者均阳性者 84 例,占 76.36%;均为阴性者 20 例,占 18.18%。TCT 制片 HE 染色 BV 的敏感性为 95.45%,特异性为 90.91%,阳性预测值为 97.67%,阴性预测值为 83.33%,两种方法镜检线索细胞阳性率比较差异无

• 检验技术与方法 •

肺癌线粒体 HV1 基因突变的初步研究

李永红,居军,杨卫国,王彦,徐辉

(甘肃省人民医院临床检验中心,兰州 730000)

摘要:目的 探讨线粒体 HV1 基因突变与肺癌的相关性,同时评价痰液中检测 HV1 基因突变的诊断学意义。方法 从 38 例肺癌患者的蜡块组织及痰液中提取 DNA,同时以 31 例非肺癌(炎症或结核)患者的蜡块组织作为对照,采用聚合酶链反应产物单链构象多态性(PCR-SSCP)方法分析 HV1 基因突变。结果 38 例肺癌患者的蜡块组织中发现 21 例存在异常迁移带,其中中央型肺癌 16 例,周围型肺癌 5 例;31 例对照组织中发现 8 例存在异常迁移带;组织中存在异常迁移带的 21 例肺癌患者痰液中发现 14 例存在与组织相同的异常迁移带,中央型肺癌 13 例,周围型肺癌 1 例;16 例中央型肺癌患者按肿瘤细胞分化程度分高、中、低分化 3 组,3 组患者痰液中 HV1 基因突变阳性率分别为 33.3%(1/3)、80%(4/5)和 100%(8/8)。结论 线粒体 HV1 基因突变与肺癌之间存在一定的相关性;肺癌患者痰液中 HV1 基因突变阳性率达 66.7%(14/21),同时中央型肺癌患者痰液中 HV1 基因突变阳性率明显高于周围型,并且与肿瘤细胞的恶性程度呈正相关。

关键词:肺肿瘤; 基因; 突变; 痰液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)09-0988-03

肿瘤的发生是多种致癌因素的积累结果,多年以来对肿瘤分子学领域的研究集中于对核基因的研究。线粒体 DNA

统计学意义($\chi^2=2.16, P>0.05$)。

3 讨 论

BV 是生殖道感染(RTI)中最为普遍和常见的一种。BV 在非孕妇女中可引起子宫内膜炎和盆腔炎;妊娠期 BV 可导致绒毛膜羊膜炎和胎膜早破^[1]。Amsel 标准中,异常性状的阴道分泌物、氨试验、pH 值及线索细胞 4 项指标中 3 项阳性即可诊断 BV 阳性,其中线索细胞阳性是诊断 BV 最具特征性的指标^[2]。目前,由于 BV 检测的操作复杂或是费用过高,许多实验室不作为常规检查项目开展,只在患者有相应症状时才检测,然而 10%~40% 的患者可无症状。TCT 制片因其在预防宫颈癌方面具有重要作用,已成为常规检查,可作为提示 BV 的诊断方法之一。在子宫颈癌检查的 TBS 报告中,提示 BV 的诊断标准为:小球杆菌的朦胧背景很明显,具有线索细胞,明显缺少乳酸杆菌^[3]。本研究采用宫颈刷收集宫颈及颈管细胞,并将其洗入细胞保存液中,经细胞处理器程序化处理制成直径 2 cm 的薄层细胞片,滤除了绝大部分的黏液、白细胞、红细胞等杂质,使得 TCT 制片背景清晰,经 HE 染色后,线索细胞在显微镜下更加易于辨认。

阴道涂片革兰染色显微镜下找线索细胞的准确性已得到证实,有研究发现,取自子宫颈的样本与来自阴道的样本在 BV 的诊断方面具有良好的一致性^[4]。

参 考 文 献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 241.
- [2] 王光超. 皮肤性病学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 379.
- [3] Solomon D, Nayar R. 宫宫颈细胞学 Bethesda 报告系统[M]. 黄受方, 张长淮, 余小蒙, 译. 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2009: 17.
- [4] Michelle G D, Jose A S, Rita G A, et al. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criteron for the diagnosis of bacterial vaginosis in papanicolaou cervical smears[J]. Diagn Cytopathol, 2006, 34(4): 272-276.

(收稿日期:2011-02-14)

(mtDNA) 是真核细胞中独立于核基因之外的双链闭环超螺旋 DNA, 长 16 589 bp, 编码区包括 13 个多肽基因, 编码与氧化磷

酸化有关的复合体 I 的 7 个亚单位、复合体 III 的细胞色素 b 亚基和复合体 IV 的 3 个亚单位;非编码区拥有 mtDNA 的复制起始位点和转录启动子,对 mtDNA 复制和转录具有调控作用^[1]。mtDNA 结构及功能异常可能导致细胞氧化磷酸化作用的失常,产生有利于细胞恶变的环境^[2]。本研究通过检测肺癌患者组织及痰液中 mtDNA 非编码区 HV1 基因突变,探讨 mtDNA 突变与肺癌的相关性,同时研究痰液中检测 mtDNA 突变的敏感性,探寻一种新的有价值的肿瘤标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机收集 2003~2004 年间在兰州大学第一医院及甘肃省人民医院确诊肺癌患者蜡块组织以及手术前痰液标本 38 例为肺癌组,其中男性 23 例,女性 15 例,年龄 29~71 岁;鳞状细胞癌 22 例、腺癌 9 例、小细胞癌 7 例;按影像学分类中央型肺癌 26 例、周围型肺癌 12 例;高、中、低分化肺癌患者分别为 10 例、11 例、17 例;对照组 31 例,其中肺部炎症 23 例、肺结核 8 例。

1.2 DNA 提取

1.2.1 组织 将石蜡包埋的肿瘤组织切成 5~10 μm 厚的薄片,加入二甲苯浸泡摇洗 3 次,总时间 12 h,随后依次用 100%、90%、50%、25% 的乙醇梯度水化,每次 20 μL ,间隔 30 min,再用枸橼酸钠缓冲液 (SSC) 浸泡摇洗 1 次,时间 30 min,弃去上清,将肿瘤组织研磨成悬液,用经典酚-氯仿抽提法提取 DNA^[3]。

1.2.2 痰液 取 0.5 mL 痰标本,加入 0.5 mL 液化剂,室温下水平震荡 25 min,然后加入 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) 1 mL 平衡酸碱度,然后采用经典酚-氯仿抽提法提取 DNA^[3]。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 引物由上海生工生物公司合成。引物 1:5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3';引物 2:5'-TGA TTT CAC GGA TGG TG-3'。扩增体系为:引物 1、2 各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTP) 200 $\mu\text{mol/L}$, 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , DNA 模板 5 μL , 总体积 50 μL ;50 μL 石蜡油覆盖后,95 °C 变性 10 min,加 Taq 酶 2 U;95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环;最后 72 °C 保温 10 min^[2,4]。

1.2.4 SSCP 分析 取扩增产物、十二烷基磺酸钠 (SDS) 变性剂及上样缓冲液各 5 μL ,混匀,沸水中静置 5 min 后立即冰浴 5 min,离心数秒,置冰上^[5]。常规制备 8% 聚丙烯酰胺凝胶,20 mV 垂直电泳 6 h,置于 0.5 mg/mL 溴化乙锭中染色 15 min,300 nm 波长紫外灯下观察结果。与对照组电泳条带数目及位置有差异的认为 HV1 基因发生了突变。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验及费歇尔精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤组织中 HV1 基因突变的意义 用 PCR-SSCP 法分析了 38 例肺癌患者及 31 例对照组蜡块组织的 HV1 基因突变情况,21 例肺癌患者及 8 例对照组发现 HV1 基因突变,突变率分别为 55.3% 和 25.8%,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$);21 例肺癌患者肿瘤组织 HV1 基因突变与肺癌的组织学分型及细胞分化程度无相关性。

2.2 肺癌患者痰液中 HV1 基因突变的意义 对 21 例组织中存在 HV1 基因突变的肺癌患者痰液进行 SSCP 分析发现 14 例存在与组织相同的异常条带,阳性率达 66.7%;按影像学将 21 例组织中存在 HV1 基因突变的肺癌患者分为中央型和周围型肺癌,两组痰液中 HV1 基因突变阳性率分别为 81.9%

(13/16) 和 20%(1/5),差异有统计学意义 ($P < 0.05$);中央型肺癌患者痰液中 HV1 基因突变阳性率与肿瘤恶性程度呈正相关。

3 讨 论

mtDNA 作为核基因之外的遗传物质,无组织蛋白保护,直接暴露于氧化磷酸化过程中产生的高氧环境中,易受到氧化损伤而发生变异^[6]。HV1 基因位于 mtDNA 非编码区起始端,对 mtDNA 复制及转录起重要的调控作用;同时 HV1 基因是核基因与线粒体基因信号传导的枢纽, HV1 基因的异常有可能导致整个线粒体基因复制转录以及核基因与线粒体基因信号传导的紊乱,最终可能引起细胞的恶变^[7];其次, HV1 基因存在于 mtDNA 与线粒体内膜相接触的位点,更易受到过氧化物的损伤而发生变异^[8]。目前已有关于 HV1 基因突变与胃、膀胱恶性肿瘤明显相关的报道^[9]。在本研究中,38 例肺癌组织中发现 21 例存在 HV1 基因突变,同时 31 例对照组中 8 例出现异常迁移带,其原因可能是:(1) HV1 基因突变并非肿瘤组织特异性突变,有研究者在癌旁组织中发现 mtDNA 突变^[10];(2) mtDNA 具有较高的多态性,出现异常迁移带可能是 HV1 基因多态性改变的原因。因此,在进行 SSCP 分析 mtDNA 改变时,应以患者自身外周血白细胞 mtDNA 序列作为参照(白血病患者除外)排除多态性改变^[5],但是由于标本收集困难较大,在本研究中,所谓“HV1 突变”实质包括了多态性改变,这可能是本研究实验结果中突变率高于相关报道的原因。

近年来,研究证明在肿瘤患者体液中能够检测到肿瘤细胞的 DNA 物质,此发现对于肿瘤的早期诊断具有举足轻重的作用。目前,已有关于肿瘤患者体液中检测到核基因突变的报道,如 P53、K-ras、PCNA 等,但由于细胞中核基因拷贝数较少,进入体液后被正常核基因稀释,敏感性都比较低^[11]。mtDNA 缺乏有效的损伤修复系统,可能会先于核基因而受到环境中致突变因子的影响发生变异。同时 mtDNA 拷贝数大,在相同技术条件下,其检测敏感性应该比核基因高,在肿瘤的早期诊断中具有潜在的优势。已有学者在胃癌患者的胃液、膀胱癌患者的尿液及肺癌患者肺泡灌洗液中发现了 HV1 基因突变^[12]。随着分子生物学检测技术的提高及肿瘤分子学研究的深入,体液中检测 mtHV1 基因突变有可能成为一种肿瘤早期筛选或预后评价的方法应用于临床。

参考文献

- 立彦,王自正.线粒体 DNA 的研究现状[J].国际检验医学杂志,2006,27(7):636-638.
- 李伟文,陆松敏,刘建仓,等.线粒体 DNA 提取方法的比较[J].国外医学分子生物学分册,2003,25(3):191-193.
- Tamura G, Joshi B, Li L, et al. Mutations in mitochondrial control region DNA in Gastric tumours of Japanese patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(2):316-319.
- 朱敏,吕红斌,周刚,等. PCR-SSCP 分析线粒体 DNA 突变的方法学进展[J].中国运动医学杂志,2000,1(3):291-293.
- Suzuki M, Toyooka S, Miyajima K, et al. Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(15):5636-5641.
- Penta JS, Johnson FM, Wschsman JT, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. Cancer Res, 2001, 61(2):119-133.
- Hofhaus G, Attardi G. Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial

- ND4 gene product[J]. EMBO Journal, 1993, 12(8): 3034-3048.
- [8] Blanc H, Adams CW. Different nucleotide changes in the large rRNA gene of the mitochondrial DNA confer chloramphenicol resistance on two human cell lines[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(12): 5785-5795.
- [9] Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, et al. Mitochondrial DNA alteration in esophageal cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 92(3): 319-321.
- [10] Wang LG, Lueth M, Lin XN, et al. Detection of mitochondrial DNA

• 检验技术与方法 •

循环酶法测定总胆汁酸试剂交叉污染及预防措施

朱武军, 郊 飞, 邵燕丽, 程艳琳

(贵州省贵阳市第六人民医院检验科 550005)

摘要: 目的 探讨如何消除试剂携带污染对循环酶法测定血清总胆汁酸(TBA)的干扰。方法 分别测定高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、总胆固醇(TC)、肌酐(Cr)、三酰甘油(TG)等 26 个项目对 TBA 结果的影响及持续时间。结果 HDL-C、TC、Cr 和 TG 试剂对 TBA 测定存在明显的正干扰, 与对照组相比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 但各试剂的干扰持续时间不同, 其由长至短依次为 HDL-C、TC、Cr、TG; 其他试剂没有干扰($P > 0.05$)。采取改进措施后, 干扰现象消除。结论 合理安排 TBA 与其他干扰项目的检测顺序, 可以有效地消除试剂携带污染对 TBA 测定的影响。

关键词: 指示剂和试剂; 总胆汁酸; 全自动生化分析仪; 交叉污染

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.033

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2011)09-0990-01

全自动生化分析仪开创了生化检验技术的自动化和微量化的广泛应用, 不仅提高了实验室的效率, 而且检测结果重复性和稳定性较好。近年来, 关于全自动生化分析仪试剂间交叉污染的报道也随之出现^[1-7]。作者在实际工作中注意到部分样本血清总胆汁酸(TBA)测定结果与临床明显不符, 疑为试剂的交叉污染所致, 因此研究了 26 个常用生化项目试剂对 TBA 测定的干扰现象, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1) 检测标本: 收集无溶血、无黄疸、无脂血的混合血清标本 20 份。(2) 仪器: BS-300 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产)。(3) 试剂: 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、淀粉酶(AMY)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GGT)、总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、尿酸(UA)、尿素(URE)、肌酐(Cr)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 A₁(Apo A₁)、载脂蛋白 B(Apo B)、脂蛋白(a)[LP(a)]、葡萄糖(GLU)、无机磷(Pi)以及总胆汁酸(TBA)试剂, 均由深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司提供; β -羟丁酸(D3H)试剂由宁波美康生物科技有限公司提供; 胆碱酯酶(ChE)试剂由温州东瓯津玛生物科技有限公司提供。

1.2 方法 (1) 各试剂对 TBA 的干扰程度: 先将 20 份混合血清单独测定 TBA, 以此作为对照, 再将该血清分别按先测定 ALT 紧接着测 TBA 的顺序, 各测定 1 次。然后把 ALT 试剂分别换成 TC、Cr 和 TG 等余下的 25 种试剂, 同上方法进行测定。(2) 各试剂携带污染对 TBA 结果影响的持续时间: 将 20 份混合血清各测定 TBA 1 次, 以此作为对照, 先测定 HDL-C 5 次后, 再连续测定混合血清中 TBA 10 次。然后把 HDL-C 试剂分别换成 TC、Cr 和 TG, 同上方法进行测定。各检测项目严

mutation in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patient[J]. Cancer Res, 2003, 63(14): 3866-3871.

[11] Fliss MS, Usadel H, Otabil L, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids[J]. Science, 2000, 28(7): 2017-2019.

[12] 余果宇, 陈仲, 田兴亚. 人肿瘤中线粒体 DNA 的缺陷[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 324-326.

(收稿日期: 2011-01-04)

格按照仪器使用手册及试剂说明书进行。(3) 对 TBA 的检测顺序进行了适当调整, 使其优先测定, 按照上述方法重新测定 TBA。

1.3 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 HDL-C、TC、Cr、TG 等 26 种试剂对 TBA 的干扰程度 HDL-C、TC、Cr 和 TG 试剂对 TBA 测定有明显正干扰, 与对照组比较差异均有统计学意义($t = 54.367, P < 0.01, t = 43.782, P < 0.01, t = 37.173, P < 0.01, t = 22.545, P < 0.01$)。虽然上述四种试剂对 TBA 测定均有影响, 但其影响程度是不一样的, 其影响大小依次为 HDL-C > TC > Cr > TG。其余 22 种试剂对 TBA 测定没有干扰($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 26 种试剂对 TBA 测定结果的影响

试剂	TBA($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)	<i>t</i> 值
HDL-C	187.60 \pm 14.98	54.367*
TC	111.93 \pm 10.86	43.782*
Cr	48.92 \pm 5.18	37.173*
TG	24.12 \pm 3.64	22.545*
ALT	5.37 \pm 1.14	0.500
AST	5.33 \pm 1.13	0.389
TP	5.76 \pm 1.12	1.729
ALB	5.82 \pm 1.19	1.844
DBIL	5.63 \pm 1.06	1.378
ALP	5.67 \pm 1.05	1.497
γ -GGT	5.69 \pm 1.05	1.565
TBIL	5.29 \pm 0.91	0.307
LDH	5.26 \pm 0.93	0.204
ChE	5.58 \pm 0.87	1.327
GLU	5.66 \pm 0.98	1.533

(下转插 II)