

少、缺失或突变,药物外排泵的形成,药物作用靶位的改变,整合子等耐药基因转移元素的参与等 5 个方面形成。此菌所引起的感染治疗非常困难,病死率高,有报道表明大剂量的头孢哌酮-舒巴坦联合米诺环素,粘菌素或多粘菌素 B 是可选择的治疗方案<sup>[10-11]</sup>。目前本院未发现铜绿假单胞菌泛耐药株。

本组中,葡萄球菌、肠杆菌属细菌对万古霉素、利奈唑胺保持着高度敏感。MRSA 的检出率为 24.00%,低于中国 CHINET 监测网数据 51.70%。这应该是归功于严格院感的监控,各科医护人员的无菌操作的严格要求。另外,本院微生物室也要加强 MRSA 的监测。MRSA 的耐药机制主要是葡萄球菌获得 mecA 基因所致,该基因编码青霉素结合蛋白 2a。近年来发现编码 PBP2a 的 mecA 基因不是独立存在的,而是以基因岛的形式存在的,可使 MRS 耐药性不断积累,而呈现多重耐药。肠球菌属未出现有耐万古霉素株,但对大环内酯类和喹诺酮类都出现了高耐状态,对克林霉素达到了 100.00% 的耐药。这要加强抗菌药物使用的管理以及医院感染控制措施,能有效控制和降低 VRE 的暴发流行<sup>[12]</sup>。由于本室的设备条件关系,肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的阳性率很低,希望今后工作中,能有机会提高这方面的缺陷。

总之,本院虽然只是二级医院,重症的患者不多见,特殊用药也较少,但是,各菌对抗菌药物的耐药率也不低,也出现了多株多重耐药的菌株,应当引起足够的重视,加强合理使用抗菌药物的监督和管理,积极有效地控制医院感染的暴发流行,努力遏制细菌耐药性的上升,是每个医护人员的责任。

参考文献

[1] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(5): 321-329.  
 [2] 汤瑾,李卿,蒋燕群,等. 对肺炎克雷伯氏菌碳青霉烯酶的研究进

展[J]. 检验医学, 2010, 1(1): 63-66.  
 [3] 陈炫,吕晓菊,范昕建. 超广谱 β-内酰胺酶的分类与分子进化研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(3): 188-192.  
 [4] 欧阳范献,陈允凤,卜平凤,等. 年中海口地区产超广谱 β-内酰胺酶阳性菌检测及其耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1): 85-88.  
 [5] Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.  
 [6] Yang Q, Wang H, Sun H, et al. Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 573-577.  
 [7] 朱任媛,张小江,赵颖,等. CHINET 2011 年北京协和医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(6): 428-434.  
 [8] 时东彦,魏宏莲. 5 年间耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性监测及耐药机制探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(12): 1654-1656.  
 [9] 崔国辉,梁陶,林湛,等. 2008~2010 年我院致病菌株耐药性分析[J]. 广东医学院学报, 2011, 29(4): 416-418.  
 [10] 廉婕,麦丽文,余治健,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的临床分离及耐药机制分析[J]. 中国医药导报, 2011, 8(35): 92-94.  
 [11] 陶真,阴晴,成静,等. ICU 病房 29 株铜绿假单胞菌的耐药表型及基因型分析[J]. 江苏医药, 2012, 38(17): 2021-2023.  
 [12] Ozorowski T, Kawalec M, Zaleska M, et al. The effect of an antibiotic policy on the resistance patterns of bacteria isolated from the blood of patients in a hematology unit[J]. Pol Arch Med Wewn, 2009, 119(11): 712-718.

(收稿日期: 2013-01-18)

• 经验交流 •

## 非小细胞肺癌血清 DKK3 基因启动子甲基化的临床意义

雷艳荣,张静琼,王 纯<sup>△</sup>

(武汉市中心医院肿瘤科,湖北武汉 430024)

**摘要:**目的 研究非小细胞肺癌(NSCLC)血清 DKK3 基因启动子甲基化的临床意义。方法 采用甲基化特异性 PCR 检测 NSCLC 患者及健康人血清 DKK3 基因启动子甲基化,比较两者间的差异并分析其与临床病理因素的关系。结果 NSCLC 患者血清 DKK-3 基因启动子甲基化率显著高于健康人( $P < 0.05$ )。NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化在肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期中的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),肿瘤大、淋巴结分期晚、有远处转移及 TNM 分期晚 DKK3 甲基化率显著高于肿瘤小、淋巴结分期早、无远处转移及 TNM 分期早患者( $P < 0.05$ )。结论 NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化与临床病理因素密切相关,可作为 NSCLC 的病情及预后评估的标志物。

**关键词:**非小细胞肺癌; DKK3; 甲基化; 临床意义

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.052

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)11-1450-03

肺癌的发生、发展及转归与表观遗传学改变密切相关,其中基因的甲基化引起表观遗传学是最主要的发病机制,目前报道的相关基因包括 Dickkopf 3 (DKK3) 和维甲酸受体 β (RARβ) 等<sup>[1-2]</sup>。DKK3 属于 Dickkopf 家族成员,具有抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡作用,在非小细胞肺癌(NSCLC)呈低表达状态<sup>[3]</sup>。本研究采用甲基化特异性 PCR 检测 NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化,分析其与临床病理因素

的关系,研究其在 NSCLC 中的临床意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 研究对象为 2010 年 1 月至 2012 年 12 月本科诊治的 NSCLC 患者,入选标准: (1) 均经症状体征、临床表现、影像学检查和病理组织学检查确诊; (2) 既往未接受放射治疗; (3) 一般状况尚可,无严重肝肾疾病。共计 75 例患者入选,其中男 45 例,女 30 例; 年龄 30~80 岁,平均(48.2±10.6)

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: chuwang@sohu.com.

岁;有吸烟史 40 例,无吸烟史 35 例;病理组织学类型包括鳞状细胞癌 35 例,腺癌 28 例,大细胞癌 12 例;TNM 分期 I 期 12 例,II 期 25 例,III 期 30 例,IV 期 8 例。另以门诊健康体检的 75 例健康人为对照,其中男 42 例,女 33 例;年龄 30~80 岁,平均(48.1±11.5)岁;有吸烟史 41 例,无吸烟史 34 例。两组研究对象在性别和年龄方面具有可比性,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**1.2 方法** 取患者肘静脉血,离心后取血清。根据基因组

DNA 试剂盒操作说明进行,提取研究对象血清总 DNA。根据甲基化试剂盒说明书采用重亚硫酸盐将提取的 DNA 未甲基化 C 转化为 U,转化后的样本进行 PCR 扩增。引物采用 MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)设计,序列见表 1,PCR 反应体系为 25 $\mu$ L,循环条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环,最后一轮 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳后显影检测。

**表 1 RASSF1A 基因 MSP 引物序列**

| 引物   | 甲基化引物(M)                        | 非甲基化引物(U)                         |
|------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 正向引物 | 5'-GTTTCGGTTGGTTAATGGTC-3'      | 5'-TTTGGTTGGTTAATGGTTGG-3'        |
| 反向引物 | 5'-GCCGAACACTACGAATACAAATACG-3' | 5'-CACCAAACACTACAAATACAAATACAA-3' |

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 进行数据处理和统计分析。计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验。计数资料采用  $\chi^2$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 DKK3 基因启动子甲基化结果** 75 例 NSCLC 患者有 40 例患者血清 DKK3 基因启动子检测到甲基化,DKK3 基因启动子甲基化率为 53.3%,健康人中有 3 例患者血清 DKK3 基因启动子检测到甲基化,DKK3 基因启动子甲基化率为 4.0%,NSCLC 患者血清 DKK-3 基因启动子甲基化率显著高于健康人( $P<0.05$ )。

**2.2 DKK3 启动子甲基化与临床病理因素关系** NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化在性别、年龄、吸烟史、病理组织学类型及肿瘤大体类型中的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),在肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期中的差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),肿瘤大、淋巴结分期晚、有远处转移及 TNM 分期晚 DKK3 甲基化率显著高于肿瘤小、淋巴结分期早、无远处转移及 TNM 分期早患者( $P<0.05$ ),见表 2。

**表 2 NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化与临床病理因素关系**

| 临床病理因素 | <i>n</i> | Dkk3 基因启动子甲基化          |                         | $\chi^2$ | <i>P</i> |       |
|--------|----------|------------------------|-------------------------|----------|----------|-------|
|        |          | 甲基化<br>[ <i>n</i> (%)] | 未甲基化<br>[ <i>n</i> (%)] |          |          |       |
| 性别     | 男        | 45                     | 24(53.3)                | 21(46.7) | 0.056    | 0.813 |
|        | 女        | 30                     | 16(53.3)                | 14(46.7) |          |       |
| 年龄     | <50 岁    | 43                     | 23(53.5)                | 20(46.5) | 0.041    | 0.839 |
|        | ≥50 岁    | 32                     | 17(53.1)                | 15(46.9) |          |       |
| 吸烟史    | 有        | 40                     | 23(56.0)                | 17(44.0) | 0.293    | 0.588 |
|        | 无        | 35                     | 17(48.6)                | 18(51.4) |          |       |
| 肿瘤大小   | T1~T2    | 33                     | 12(36.4)                | 21(63.6) | 5.655    | 0.017 |
|        | T3~T4    | 42                     | 28(66.7)                | 14(33.3) |          |       |
| 淋巴结转移  | N0~N1    | 30                     | 11(36.7)                | 19(63.3) | 4.520    | 0.033 |
|        | N2~N3    | 45                     | 29(64.4)                | 16(35.6) |          |       |
| 远处转移   | M0       | 67                     | 32(47.8)                | 35(52.2) | —        | 0.006 |
|        | M1       | 8                      | 8(100.0)                | 0(0.0)   |          |       |

**续表 2 NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化与临床病理因素关系**

| 临床病理因素  | <i>n</i> | Dkk3 基因启动子甲基化          |                         | $\chi^2$ | <i>P</i> |       |
|---------|----------|------------------------|-------------------------|----------|----------|-------|
|         |          | 甲基化<br>[ <i>n</i> (%)] | 未甲基化<br>[ <i>n</i> (%)] |          |          |       |
| TNM 分期  | I        | 12                     | 4(33.3)                 | 8(66.7)  | 11.250   | 0.010 |
|         | II       | 25                     | 10(40.0)                | 15(60.0) |          |       |
|         | III      | 30                     | 18(60.0)                | 12(40.0) |          |       |
|         | IV       | 8                      | 8(100.0)                | 0(0.0)   |          |       |
| 病理组织学类型 | 鳞状细胞癌    | 35                     | 19(54.3)                | 16(45.7) | 0.067    | 0.967 |
|         | 腺癌       | 28                     | 15(53.6)                | 13(46.7) |          |       |
|         | 大细胞癌     | 12                     | 6(50.0)                 | 6(50.0)  |          |       |
| 肿瘤大体类型  | 中央型      | 40                     | 22(55.0)                | 18(45.0) | 0.006    | 0.938 |
|         | 周围型      | 35                     | 18(51.4)                | 17(48.6) |          |       |

—:无数据。

**3 讨 论**

目前对 NSCLC 的发病机制尚未完全清楚,研究表明其与基因突变、单核苷酸多态性和表观遗传学改变有关,表观遗传学因素在其中占有重要比例,其中启动子甲基化是表观遗传学最重要及最常见的转录前调控机制,与肿瘤的发生、发展及转归密切相关<sup>[4]</sup>。甲基化指的是不改变基因序列的 C 连接甲基形成 mC,自身或结合甲基结合蛋白后引起 DNA 空间构象改变,阻遏转录因子与基因启动子结合而抑制基因表达<sup>[5]</sup>。研究表明,基因甲基化与肺癌的发病机制、病情及预后评估密切相关,随着分子生物学发展,越来越多的基因可作为肺癌的标志物,与传统的蛋白质水平标志物相比,基因水平的标志物具有更高的特异性及灵敏度<sup>[6]</sup>。

Dkk3 基因位于染色体 11p15.2 上,属于 Dickkopf 家族成员,具有抑制肿瘤细胞增殖及促进其凋亡的作用,与肿瘤的发生、发展及转移紧密相关<sup>[7-10]</sup>。研究表明,Dkk-3 在 NSCLC 中呈表达抑制状态。Nozaki 等<sup>[1]</sup>采用实时定量 PCR 检测 NSCLC 患者肿瘤组织和癌旁组织 Dkk-3 基因 mRNA 表达,表明 NSCLC 肿瘤组织 Dkk-3 基因 mRNA 表达显著低于癌旁组织。蔡敏等<sup>[3]</sup>发现 DKK3 在 NSCLC 中仅 52% 发生甲基化,而在肺良性组织中高达 85% 发生甲基化。基于基因 DNA 与 mRNA 的关系,DKK3 低表达可能与 DNA 改变有关。本研究中,采用 MSP 检测 NSCLC 患者血清 DKK3 甲基化,NSCLC

患者血清 DKK-3 基因启动子甲基化率显著高于健康人 ( $P < 0.05$ ), 这些结果证实 NSCLC 患者血清 DKK3 存在高甲基化状态。本研究中, NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化在性别、年龄、吸烟史、病理组织学类型及肿瘤大体类型中的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 在肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期中的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 肿瘤大、淋巴结分期晚、有远处转移及 TNM 分期晚 DKK3 甲基化率显著高于肿瘤小、淋巴结分期早、无远处转移及 TNM 分期早患者 ( $P < 0.05$ ), 结果表明 DKK3 基因启动子甲基化与 NSCLC 病情及预后的关系。TNM 分期对 NSCLC 患者的治疗方法及预后具有决定意义, 在临床上受到广泛应用。

综上所述, NSCLC 患者血清 DKK3 基因启动子甲基化与肿瘤的肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期密切相关, 可反映 NSCLC 的病情及预后, 可作为生物标志物, 随着分子生物学的发展, 在临床上的应用会越来越广泛。

**参考文献**

[1] Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, et al. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer[J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 117-121.  
 [2] 谭聪, 金永堂, 徐鹤云, 等. 非小细胞肺癌 RAR $\beta$  基因启动子 CpG 岛甲基化与 P53 基因突变的关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(2): 131-136.

[3] 蔡敏, 罗成刚, 熊维宁, 等. Dickkopf-3 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(5): 528-530.  
 [4] Walter K, Holcomb T, Januario T, et al. DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(8): 2360-2373.  
 [5] Yu Y, Yin D, Hoque MO, et al. AKT signaling pathway activated by HIN-1 methylation in non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2012, 33(2): 307-314.  
 [6] Moran A, Fernandez-Marcelo T, Carro J, et al. Methylation profiling in non-small cell lung cancer: clinical implications[J]. Int J Oncol, 2012, 40(3): 739-746.  
 [7] Jung IL, Kang HJ, Kim KC, et al. Knockdown of the Dickkopf 3 gene induces apoptosis in a lung adenocarcinoma[J]. Int J Mol Med, 2010, 26(1): 33-38.  
 [8] Meng X, Lu P, Zhang Y, et al. A regulatory network for human adenocarcinoma[J]. African J Biotech, 2012, 11(21): 4884-4892.  
 [9] Mizobuchi Y, Matsuzaki K, Kuwayama K, et al. REIC/Dkk-3 induces cell death in human malignant glioma[J]. Neuro Oncol, 2008, 10(3): 244-253.  
 [10] Nakamura REI, Hackam AS. Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors[J]. Growth Factors, 2010, 28(4): 232-242.

(收稿日期: 2012-11-08)

• 经验交流 •

## 中山市暂时屏蔽的献血者随访检测结果分析

廖艳婷, 孙爱农, 林惠燕

(中山市红十字中心血站, 广东中山 528403)

**摘要:**目的 通过分析中山市暂时屏蔽的献血者随访检测结果, 提高实验室检测水平, 合理引导合适献血者重新归队。方法 对 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP 单试剂和 ALT 单、双试剂检测不合格献血者, 6 个月后抽血用两个厂家试剂进行复查。结果 548 例随访者, 总合格率为 57.85%, 原 ATL 不合格者合格率为 42.59%, ELISA 单试剂阳性者合格率为 77.26%。其中有 72 例仍为单试剂阳性; 有 4 例转为 HBsAg 双试剂阳性。结论 通过对暂时屏蔽的献血者随访检测, 可确保血液安全, 减少血源流失。

**关键词:**暂时屏蔽; 献血者; 随访复检; 酶联免疫吸附测定; ALT

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.053

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)11-1452-02

“血荒”的现象已经引起广大群众的关注, 给采供血机构带来很大的压力。为了防止宝贵血源的流失, 同时确保血液的安全, 本站对 ELISA 单试剂阳性和 ALT 不合格献血者进行随访, 追踪检测合格者可以凭反馈结果重新加入无偿献血队伍, 而不合格者建议咨询临床医生。通过对复查结果的分析, 探讨有效引导暂时屏蔽的献血者回归的方法, 同时对献血者结果更负责。本站对暂时屏蔽的献血者随访追踪检测结果情况如下。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 中山市无偿献血者中, HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP 单试剂和 ALT 单、双试剂检测不合格者接受随访检测共 548 例。

**1.2 试剂与仪器** HBsAg 试剂盒(雅培、梅里埃和新创生物工程公司); 抗-HCV 试剂盒(丽珠和万泰生物工程公司); 抗-HIV 试剂盒(伯乐和万泰生物工程公司); 抗-TP 试剂盒(丽珠和新创生物工程公司); ALT 速率法试剂盒(利德曼和长征生物工程公司), 所有试剂均为中国药品生物制品检定所批检合

格, 所有试剂均在有效期内使用, 并严格按照试剂说明书进行操作。采用瑞士生产的 ML-STAR 全自动加样仪和瑞士生产的 LISA 全自动加样仪; 瑞士生产的 FAME 全自动酶标分析系统; 迈瑞 BS-420 全自动生化分析仪、PHOMO 酶标仪。仪器设备按要求进行定期维护和校准。

**1.3 方法** 548 例随访 6 月后抽血按原不合格项目分类, 用两个不同生产试剂进行检测。HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP、抗-HCV 的检测用 ML-STAR 和 LISA 全自动加样仪加样, 用 FAME 全自动酶标分析系统进行孵育、洗板、加试剂、比色的后处理。用迈瑞 BS-420 全自动生化分析仪进行 ALT 检测。ELISAS 检测抗-TP 阳性标本用 TPPA 确认。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1** ELISA 单试剂阳性或者 ALT 不合格者随访结果 随访检测共 548 例, 合格 325 例, 总合格率 57.85%(325/548), 见表