

## 参考文献

- [1] 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2009;428-448.
- [2] 王秋伟,虞斌,许培箴. HPV-DNA HCII 检测在宫颈病变筛查中的应用[M].山东医药,2009,49(1):44-46.
- [3] Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract[J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2006, 14(400):40470-40474.
- [4] Agorassatos T, Chatzigeorgiou K, Brotherton JM, et al. Safety of human papillo-mavirus (hpv) vaccines: A review of the international experience so far[J]. Vaccine, 2009, 27(52):7270.
- [5] 田杰,高原.液基薄层细胞学(TCT)检测在宫颈病变诊断中的应用分析[J].齐齐哈尔医学院学报,2008,29(4):425-426.
- [6] De Villiers EM, Gunst K, Stein H, et al. E-sophageal Squamous cell cancer in patients with head and neck cancer prevalence of human papillomavirus DNA sequences[J]. Int J Cancer, 2004, 109(2):253.
- [7] 罗招云,林春萍,杨立业,等.潮州地区女性宫颈人乳头瘤病毒基因型与宫颈病变的关系[J].分子诊断与治疗杂志,2012,4(2):95-99.
- [8] Sellors JW, Mahony LB, Kaczorowski J, et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group[J]. CMAJ, 2000, 163(5):503.
- [9] 徐伟莉.病理学检查在宫颈上皮内瘤变诊断中的应用体会[J].中国实用医药,2010,5(1):106-108.
- [10] 梁雯.高危型人乳头瘤病毒 DNA 载量在宫颈病变中的应用[J].临床合理用药,2009,2(1):22-24.
- [11] 张秀卿,王晓兰.高危型人乳头瘤病毒检测及 TCT 检测在宫颈病变筛查中的应用[J].临床医药实践,2012,21(3):176-177.
- [12] Moscarini M, Lukic A, Franco C. Anti human papillomavirus vaccine: the checkmate to human papillomavirus[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2004, 25(2):151-156.
- [13] 钟奇志.第二代捕获杂交法(HC-II)检测 HPV-DNA 在宫颈癌筛查中应用[J].中国妇幼保健,2008,23(7):974-975.
- [14] Confortini M, Bondi A, Cariggi MP, et al. Inter laboratory reproducibility of liquid based equivocal cervical cytology with in a randomized controlled trial frame work[J]. Diagn Cytopathol, 2007, 35(5):541-544.
- [15] 李华,高国兰. HPV 与宫颈癌的研究进展[J].实用癌症杂志,2007,22(4):420.
- [16] Cohen Y, Singer G, Lavie O, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(28):2981.
- [17] Coutant C, Barranger E, Cortez A, et al. Frequency and prognostic significance of HPV DNA in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer[J]. Ann Onco, 2007, 18(15):1513.
- [18] 秦积龙,古力娜尔·库尔班,顾霞,等.FHIT 和 HPV 与宫颈癌的研究进展[J].解剖科学进展,2009,15(2):233.
- [19] Cattani P, Siddhu A, Donghia S, et al. RNA (E6 and E7) assay vs DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human Papilloma virus[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(21):2136-2141.
- [20] 赵普,曾萍,林德伟.人乳头状瘤病毒高危型检测联合液基细胞学检测在宫颈病变筛查和随访中的意义[J].中国妇幼保健,2012,14(6):822-824.
- [21] Ye J, Cheng X, Chen X, et al. Prevalence and risk profile of cervical human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study[J]. Virol J, 2010, 7(1):66.
- [22] 赵银铃,耿晓星.高危 HPV 检测在宫颈癌筛查防治及判断预后的意义[J].实用肿瘤学杂志,2008,22(5):497.
- [23] 刘光明,许廷贵. HPV 感染与宫颈癌[J]. Chinese Medical Science & Health, 2007, 4(1):65.

(收稿日期:2014-12-20)

## · 综述 ·

# 尿液雌激素和代谢产物检测方法学比较及临床应用

陈春 综述,于嘉屏 审校

(上海迪安医学检验所功能医学实验室,上海 200433)

**关键词:**雌激素; 代谢产物; 尿液**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.045**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)07-0969-05

雌激素的主要来源是卵泡,每天可分泌 70~500 mg 雌二醇(E2),雌二醇主要转变成雌酮(E1)和少量雌三醇(E3),E1 在循环中的比例大致与 E2 相似。绝经后,大多数内源性雌激素是雄烯二酮转变而来的。雄烯二酮由肾上腺皮质分泌,并在周围组织中转变成 E1。因此,E1(尤其是其硫酸酯形式)是绝经后妇女循环中含量最高的雌激素。虽然循环雌激素存在代谢转换的动态平衡,但 E2 是主要的人体细胞内雌激素,它对受体的作用能力比 E1 或 E3 更强。

## 1 雌激素代谢<sup>[1-3]</sup>

雌激素的代谢转化主要在肝脏中进行,但也可在局部靶组织转化。复杂的代谢过程可使循环中结合和非结合型雌激素达

到动态平衡,彼此不断地相互转化,尤其是 E1 与 E2 之间和酯化与非酯化形式之间。循环中的雌激素主要为硫酸结合型,尤其是硫酸雌酮,它是循环中转化成各种活性雌激素的储备池。有相当部分的雌激素排入胆汁,然后从小肠再吸收,并通过门静脉系统回到肝脏。通过肝肠循环,雌激素脱硫酸和再硫酸化,降解转化为活性较小的雌激素如 E3 等,氧化生成非雌激素物质如儿茶酚雌激素,与葡萄糖醛酸结合从而迅速排入尿中。雌激素的代谢产物仍然具有非常高的生物活性,至于如何影响人体健康则由如何在肝脏与肠道代谢、有何代谢产物来决定<sup>[4-8]</sup>。

## 2 肝脏第 1 阶段雌激素代谢物

这一阶段把脂溶性雌激素经由特殊的酶转变成“水溶性中

间产物”。这一群特殊酶称为“细胞色素 P450 酶系统”(P450s)。P450s 所催化的代谢反应为羟基化反应。细胞色素 P450 酶将脂溶性 E1、E2 转变为 2-羟雌酮(2-OHE1)、16 $\alpha$ -羟雌酮(16 $\alpha$ -OHE1)和少量 4-羟雌酮(4-OHE1), 2-OHE1 仍具有微弱的雌激素活性,一般认为是“好”的雌激素代谢物。相反的,16 $\alpha$ -OHE1 与 4-OHE1 仍具有相当强的雌激素活性并会促进组织增生作用,一般认为是具有“发炎性”的雌激素。许多文献报道指出,如果 4-OHE1、16 $\alpha$ -OHE1 大量超过 2-OHE1,则有诱发乳腺癌的危险<sup>[9-11]</sup>。

**2.1 2-OHE1** 尿液中雌激素的代谢物(约 80% 来自 E1, 20% 来自 E2 及 E3),可以表现出雌激素的代谢是否朝向较有益于身体的方向进行。正常的 2-OHE1 含量显示一种平衡的代谢反应,可降低发生乳癌、子宫颈细胞变性及骨质缺少的危险性。2-OHE1 含量会随着饮食改变或其他原因影响雌激素代谢因子。对于服用避孕药、激素补充疗法、饮食或运动控制的女性,需要追踪监督其雌激素状态时,2-OHE1 含量的改变更加重要。

**2.2 4-OHE1** 4-OHE1 是致癌性雌激素代谢产物,与雌激素受体相对亲和力大于 E1 和 E2。4-OHE1 可在乳房组织、卵巢、肾上腺、子宫中发现,同时在乳癌组织可发现,显示与癌症的形成有关。4-OHE1 会进一步代谢成醌/半醌代谢产物,此过程会产生自由基,造成脂质、蛋白质和 DNA 氧化损伤。

**2.3 16 $\alpha$ -OHE1** 正常或较低的 16 $\alpha$ -OHE1 含量一般视为临幊上对身体有利,因为高浓度的 16 $\alpha$ -OHE1 可能和狼疮、乳腺癌及肥胖等状况有关。运动及摄取十字花科蔬菜、大豆制品、鱼油都有助于提高 2-OHE1 的浓度,同时也可降低 16 $\alpha$ -OHE1 的含量。

**2.4 2-OHE1/16 $\alpha$ -OHE1** 此比值对于管控雌激素代谢是有用的,若比值较低可能会增加罹患与雌激素有关疾病,如:乳腺癌、狼疮、前列腺癌等的危险。比值若高于 2.0 一般认为反映出健康的雌激素代谢,有许多的营养素可以改变此比值,主要的作用是在改变 2-OHE1 的浓度。

### 3 肝脏第 2 阶段雌激素代谢物<sup>[12]</sup>

第 2 阶段是把“水溶性中间产物”,转变成“水溶性终端产物”,从胆汁中排出,进入肠道,被食物中的纤维质吸附,变成粪便排出。也可进入血液,循环到肾脏,从尿液中排出<sup>[13-16]</sup>。

**3.1 代谢反应** 肝脏第 2 阶段主要由 2 种代谢反应:甲基化反应和葡萄糖苷酸化反应。

**3.1.1 甲基化反应** 2-OHE1、4-OHE1 和 16 $\alpha$ -OHE1 代谢产物是儿茶酚雌激素。特别是 4-OHE1 会很快被氧化成苯醌,苯醌是一种非常不稳定的分子,非常具有攻击性,它可以破坏 DNA 和通过产生活性氧(ROS),直接的或非直接地促进肿瘤生长。这个有害途径可以由肝脏第 2 阶段的甲基化反应和抗氧化物将儿茶酚雌激素解毒并排除出去,这个过程需要儿茶酚氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)参与。甲基化反应需要维生素 B<sub>12</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、叶酸、甲硫氨酸、三甲基甘氨酸等营养素参与。COMT 在大多数组织中都存在,并把儿茶酚转化成其相应的更易溶于水的甲基酯代谢物。最近的数据显示,4-OHE1 的甲基化作用致使这种有害的代谢物明显地降低活性,而 2-甲基雌酮可能显示出抑制乳腺癌的有效特性。因此,支持甲基化这种途径可以促进雌激素的解毒并提供更多有益的雌激素代谢物。

**3.1.2 葡萄糖苷酸化作用** 是肝脏第 2 阶段解毒机制之一,形成葡萄糖苷酸化雌激素,而排出体外。一些肠内的细菌(多

数是致病性的)支配着一种酶——β-葡萄糖苷酸酶。这种酶在大肠内把欲排泄出来的雌激素和葡萄糖醛酸分开,使得雌激素能重新进入到循环(肠肝再循环)当中。过量的 β-葡萄糖苷酸酶与患癌风险的增加有关。当膳食中的含脂肪量高而含纤维量少的时候,β-葡萄糖苷酸酶的活性就会增加。人们可以通过摄入植物食物含量高的膳食和在膳食中补充一些有益的细菌,例如,嗜酸的乳酸菌和婴儿双歧杆菌,从而建立一个适当的菌群,这时 β-葡萄糖苷酸酶的活性就会减低,增强肝脏醛糖酸化排毒反应。

### 3.2 代谢产物及比值<sup>[17]</sup>

**3.2.1 2-甲氧基雌酮(2-MeOE1)<sup>[18]</sup> 和 4-甲氧基雌酮(4-MeOE1)** 2-OHE1、4-OHE1 在肝脏第 2 阶段雌激素解毒过程中经 COMT 作用转换成 2-MeOE1 和 4-MeOE1。甲基化可消减雌激素活性,并阻断经由氧化作用所产生醌/半醌代谢物的自由基伤害。因此,第 1 阶段的羟基雌激素与第 2 阶段甲氧基雌激素代谢产物间的平衡在维持雌激素健康方面扮演重要的角色。

**3.2.2 2-MeOE1/2-OHE1 和 4-MeOE1/4-OHE1** 这 2 个比值提供了一个衡量肝脏第 2 阶段甲基化功能的指针。2-OHE1 及 4-OHE1 代谢物通常被认为是可预防乳腺癌的物质,但是,只有在被甲基化转成 2-MeOE1 及 4-MeOE1 形式时才具有保护作用。2-MeOE1/2-OHE1 比值及 4-MeOE1/4-OHE1 比值若偏低,显示甲基化反应不足。原因可能为:COMT 先天基因缺陷;甲基化反应所需的营养素不足;压力太大时产生过多的儿茶酚胺消减了雌激素甲基化。建议摄取足够的蛋白质,并确保足够的维生素 B 群、叶酸、甜菜碱、甲硫氨酸、镁等营养素的摄取以加强肝脏解毒作用能力。

### 3.2.3 雌激素代谢物百分比

**3.2.3.1 “保护性”雌激素代谢物** “保护性”雌激素代谢物是指对身体有利的雌激素代谢物在总雌激素代谢物中所占比例,比例越高对健康越有利。“保护性”的雌激素有:2-OHE1,可降低癌症的生长;2-MeOE1,具抗肿瘤效应;4-MeOE1,无致癌性。若比例偏低,则建议摄取足够的蛋白质,并确保足够的维生素 B 群、叶酸、甜菜碱、甲硫氨酸、镁等营养素的摄取加强肝脏解毒作用能力。

**3.2.3.2 “致癌性”雌激素代谢物** “致癌性”雌激素代谢物是指对身体不利的雌激素代谢物在总雌激素代谢物中所占比例。比例越高对健康越不利。“致癌性”雌激素代谢物有:4-羟雌酮(4-OHE1),可导致 DNA 损伤;16 $\alpha$ -羟雌酮(16 $\alpha$ -OHE1),促进肿瘤的发展。“致癌性”雌激素代谢物会增加乳腺癌和前列腺癌的风险。高比例原因有:高雌激素(E1 与 E2 水平偏高)、第 1 阶段代谢旺盛,第 2 阶段解毒无法有效清除代谢物;第 1 阶段解毒正常,但第 2 阶段解毒能力不佳,可能原因有 COMT 先天基因缺陷或 COMT 甲基化反应所需的营养素不足、压力太大时产生过多的儿茶酚胺消减了雌激素甲基化作用。建议摄取足够的蛋白质,并确保足够的维生素 B 群、叶酸、甜菜碱(betaine)、甲硫氨酸、镁等营养素的摄取加强肝脏解毒作用能力。

### 4 检测方法

尿液中的雌激素及其代谢物的结构很相似,以免疫学为原理的各种技术,例如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附法(ELISA),均不能同时检测以上雌激素和代谢物,目前最佳检测方法是采用高效液相色谱-串联质谱联用技术(HPLC-MS/MS)<sup>[8]</sup>。有研究报道,LC-MS/MS 的组内相关系数更高(≥

99.6%), 变异系数更低( $\leqslant 9.4\%$ ), 相对于 ELISA 方法( $\geqslant 97.2\%$  和  $\leqslant 14.2\%$ )和 RIA( $\geqslant 95.2\%$  和  $\leqslant 17.8\%$ )而言<sup>[19]</sup>。

RIA 和 ELISA 检测尿液雌激素代谢与 LC-MS/MS 相关性尚可, 尤其在绝经前女性。但是, 在绝经后女性, RIA 和 ELISA 检测结果与 LC-MS/MS 检测结果之间的关联性则相当微弱。用 RIA 和 ELISA 方法测得的绝对浓度值也比用 LC-MS/MS 测得的结果值要明显高很多, 在测定绝经后女性的 E2、2-OHE1、16 $\alpha$ -OHE1 时, 这种差异性尤其明显。原因在于, 这些被广泛接受和应用的 ELISA 法和 RIA 法检测时, 会与其他雌激素代谢产物存在一些非特异性交叉反应, 从而导致报告的雌激素代谢浓度的整体水平偏高<sup>[19-22]</sup>。

我们还需要重新审视当前雌激素代谢产物的检测阈值或参考值范围, 因为 LC-MS/MS 对于雌激素代谢产物浓度值的报告一致以来就比 ELISA 和 RIA 方法学的要低。实际上, LC-MS/MS 方法对于每一个雌激素代谢产物的测定都是非常特异的, 每一个代谢物都会产生一个明晰的可测的信号。这一特异结果导致每个雌激素代谢产物的绝对浓度较低<sup>[22]</sup>。LC-MS/MS 检测也可用于治疗或干预性研究, 因为对于这类研究, 对于雌激素代谢产物的变化, 有必要进行更精确的量化测定, 尤其是对绝经后的女性<sup>[19]</sup>。

2-OHE1/16 $\alpha$ -OHE1 的比值是被假定可用来可作为乳腺癌的风险标志物<sup>[23]</sup>。但是用 ELISA 法测得的值(1.3~1.5)则比用 LC-MS/MS 方法测得的值(2.1~2.4)要明显低很多, 在绝经后女性中, 这些比值的关联性也不大。有研究表明, 较之用 ELISA 法检测 2-OHE1 和 16 $\alpha$ -OHE1<sup>[4]</sup>, 用 LC-MS/MS 来进一步检测 2-OHE1 和 16 $\alpha$ -OHE1 的比值与乳腺癌之间的风险, 会得到非常不同的解释。针对乳腺癌患者, 有必要设计一个未来的研究课题, 用 ELISA 以及 LC-MS/MS 方法, 前瞻性采集的尿液, 检测 2-OHE1 和 16 $\alpha$ -OHE1, 分别检验其风险评估的差异性<sup>[19]</sup>。

## 5 研究现状和发展方向<sup>[24-25]</sup>

血清中雌激素水平的临床检测通常用于监测低剂量雌激素替代治疗(HRT)以及评估绝经后妇女骨折的风险。绝经前妇女的雌激素水平监测可以用来评估卵巢状态, 包括卵泡发育, 以辅助确定生殖方案, 如体外受精。雌激素也可用于促进早熟以及延迟女性青春期, 可结合促黄体激素(LH)进行检测, 作为雌激素替代疗法的一部分用于监测绝经前妇女的性腺机能减退状况。雌激素水平测定也同样用于激素依赖型乳腺癌患者的芳香酶抑制剂治疗中。一些雌激素的代谢产物会影响到病情发展, 如使男性和女性血压的收缩压增加。代谢产物一般比雌激素本身的半衰期更长, 因而有人有意将其作为疾病的生物标记物。有充分证据表明, 乳腺以及子宫内膜等激素敏感型组织器官癌变与其受雌激素过度刺激之间有明确的联系。研究表明, 一部分具有细胞色素 P450 酶特定单体型的女性, 罹患乳腺癌的风险有所增加。雌激素的邻苯二酚类代谢产物被认为是雌激素诱导癌变的中间体, 它们的作用机制可能会诱导生成脱氧核(糖核)苷加合物。E2 凭借其生成邻苯二酚类代谢产物过程中过氧化物依赖性的羟基化作用, 可有效预防氧化性神经退行性疾病。另外, E2 和其代谢产物——2-OHE1 和 16-OHE1 同样也被认为可以减少氧化应激反应, 从而降低动脉硬化的风险。利用雌激素代谢物作为生物标记物需要在超低浓度水平上具备可靠的检测能力。

当前, 对低浓度雌激素及其邻苯二酚类代谢产物的测定需求日益增长。传统的免疫法不能满足对选择性的要求, LC-

MS-MS 方法, 作为目前生物分析的行业标准, 但是在分离干扰组分和某些内源化合物的定量灵敏度上尚有一定不足。用气相色谱负化学电离源串联质谱平台(GC-NCI-MS-MS)分析或可成为监测作为生物标记物的内源化合物浓度的主要手段。对衍生物的高度选择性, GC 的分离性能, NCI 模式对卤化衍生物的响应以及使用 SRM 分析消除基质干扰, 均为生物标记物的检测方法开发提供了所需性能。

## 参考文献

- Lord RS, Bongiovanni B, Bralley JA. Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites[J]. Altern Med Rev, 2002, 7(2):112-129.
- May FE. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer[J]. Cancer Manag Res, 2014, 23(2):225-226.
- Frank A, Brown LM, Clegg DJ. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation [J]. Front Neuroendocrinol, 2014, 29(1):25-27.
- Kabat GC, O'Leary ES, Gammon MD, et al. Estrogen metabolism and breast cancer[J]. Epidemiology, 2006, 17(1):80-88.
- Blair IA. Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future[J]. Steroids, 2010, 75(4-5):297-306.
- Ziegler RG, Faupel-Badger JM, Sue LY, et al. A new approach to measuring estrogen exposure and metabolism in epidemiologic studies[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 121(3-5):538-545.
- Dallal CM, Stone RA, Cauley JA, et al. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a combined analysis of individual level data [J]. Int J Biol Markers, 2013, 28(1):13-16.
- Zhao Y, Boyd JM, Sawyer MB, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of free and conjugated estrogens in breast cancer patients before and after exemestane treatment[J]. Anal Chim Acta, 2014, 806(17):172-179.
- Ursin G, London S, Stanczyk FZ, et al. A pilot study of urinary estrogen metabolites (16 $\alpha$ -OHE1 and 2-OHE1) in postmenopausal women with and without breast cancer[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105(3):601-605.
- Ursin G, London S, Yang D, et al. Urinary 2-hydroxyestrone/16 $\alpha$ -hydroxyestrone ratio and family history of breast cancer in premenopausal women[J]. Breast Cancer Res Treat, 2002, 72(2):139-143.
- Bentz AT, Schneider CM, Westerlind KC. The relationship between physical activity and 2-hydroxyestrone, 16 $\alpha$ -hydroxyestrone, and the 2/16 ratio in premenopausal women (United States)[J]. Cancer Causes Control, 2005, 16(4):455-461.
- Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, et al. Catechol-O-methyltransferase(COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms[J]. Cancer Res, 2001, 15(61):6716-6722.
- Ho PW, Tse ZH, Liu HF, et al. Assessment of cellular estrogenic activity based on estrogen receptor-mediated reduction of soluble-form catechol-O-methyltransferase (COMT) expression in an ELISA-based system[J]. PLoS One, 2013, 8(700):74065-74072.
- Kohen P1, Henriquez S, Rojas C, et al. 2-Methoxyestradiol in the human corpus luteum throughout the luteal phase and its influence on lutein cell steroidogenesis and angiogenic activity[J]. Fertil Steril, 2013, 100(13):1397-1404.

- [15] Cordts EB, Santos MC, Peluso C, et al. COMT polymorphism influences decrease of ovarian follicles and emerges as a predictive factor for premature ovarian insufficiency[J]. J Ovarian Res, 2014, 7(1):47-53.
- [16] Paracchini V1, Pedotti P, Raimondi S, et al. A common CYP1B1 polymorphism is associated with 2-OHE1/16-OHE1 urinary estrone ratio[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(7):702-706.
- [17] Stabelius A, Erlandsson MC, Islander U. Immunomodulation by the estrogen metabolite 2-methoxyestradiol[J]. Clin Immunol, 2014, 153(1):40-42.
- [18] Faupel-Badger JM, Fuhrman BJ, Xu X, et al. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(2):292-300.
- [19] Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, et al. Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(36):3791-3797.
- [20] Santen RJ, Demers L, Ohorodnik S, et al. Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy[J]. Steroids, 2007, 72(6):666-671.
- [21] Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(16):1713-1719.
- [22] Kabat GC, O'Leary ES, Gammon MD, et al. Estrogen metabolism and breast cancer[J]. Epidemiology, 2006, 17(1):80-82.
- [23] Li J, Kang Y, Wei L, et al. Tyrosine Phosphatase Shp2 Mediates the Estrogen Biological Action in Breast Cancer via Interaction with the Estrogen Extranuclear Receptor[J]. PLoS One, 2014, 9(7):e102847.
- [24] Smith AJ, Phipps WR, Thomas W, et al. The effects of aerobic exercise on estrogen metabolism in healthy premenopausal women[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(5):756-764.
- [25] Huang HJ1, Chiang PH, Chen SH. Quantitative analysis of estrogens and estrogen metabolites in endogenous MCF-7 breast cancer cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(20):1748-1756.

(收稿日期:2014-11-10)

## · 综述 ·

恒温扩增技术在病原体检测中的应用<sup>\*</sup>

罗茗月 综述, 熊礼宽 审校

(深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518000)

**关键词:** 恒温扩增技术; 病原体; 感染性疾病**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.046**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2015)07-0973-03

感染性疾病是最重要的公共健康卫生问题之一,据世界卫生组织统计,全世界每年有 1 300 万以上的人群死于感染性疾病<sup>[1]</sup>。感染性疾病主要由细菌和病毒引起,其次是真菌和寄生虫。某些不同的病原体感染可引起临床症状相似,但致病机制、发病进程完全不同,需要采取不同治疗方法。早期及时确定感染原因,合理使用抗菌药物可使严重感染的生存率下降 5 倍<sup>[2]</sup>。因此,对于发病率和病死率非常高的感染性疾病,早期明确诊断十分重要,不仅指导临床有效用药,还阻止耐药病原体蔓延,所以建立快速、准确、敏感且低廉的病原体诊断方法颇为重要。

直接涂片染色显微镜检查、培养是病原体检查的传统方法,其操作简单、费用低,但敏感性差,耗时长。血清学方法与培养方法同样敏感差,检测过程长,易导致延误治疗。核酸扩增技术特异性和敏感度虽比传统方法有了很大的提高,操作简单,易于标准化且快速,可直接分析病原体的基因序列,进行耐药性、毒力标志以及特异性分型,还可以进行定量。PCR 是最早的应用扩增技术,其发明者 Kary Mullis 也因此获得了 1993 年的诺贝尔化学奖<sup>[1]</sup>。虽然 PCR 方法在临床实验室已经广泛应用,但也存在一些不足,如标本中抑制物导致扩增失败,容易污染,所需设备昂贵,反应复杂且需要专业技术人员,限制了其在很多领域尤其是偏远地区的应用<sup>[3]</sup>。所以,急需研发能克服

这些缺陷的简单、快速、成本低廉且易携性好的新型分子诊断技术。

近年来,随着对体内 DNA、RNA 合成过程和一些辅助蛋白作用机制的不断深入,在恒温下扩增目的片段的技术应运而生,且表现出极大的优势。PCR 反应严格的热循环温度需要专用设备,而恒温扩增反应所需要的扩增温度由水浴锅、金属恒温器或保温箱即可提供,成本低廉;对标本要求低,血液、尿液、痰液和分泌物拭子等标本可能含有抑制 PCR 反应的多种杂质,但恒温扩增技术可以耐受这些抑制剂,标本无需经过复杂的核酸提取过程即可进行扩增;敏感性和特异性与 PCR 相当,甚至高于 PCR;此外,无需经过温度变化的时间间隔,反应快。

根据不同反应酶和引物、反应方式及原理,恒温扩增方法可分为核酸序列依赖的恒温扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、环介导的恒稳扩增(loop-mediated amplification, LAMP)、依赖解旋酶的恒温扩增技术(helicase-dependent amplification, HDA)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)和转录介导的扩增(transcription mediated amplification, TMA)等。其中 NASBA 和 TMA 基于 RNA 的转录, LAMP 和 RCA 基于 DNA 聚合酶的链置换活性, HAD 则是基于解旋酶的解链功能。不同类型的恒温扩增各具特点,目前已

\* 基金项目:深圳市知识创新计划基础研究项目(JC20140302120929)。 作者简介:罗茗月,女,检验技师,主要从事常见病原体的快速诊断技术及临床应用研究。 △ 通讯作者, E-mail: xionglik@sina.cn。