

确的得出 ACR 结果,便于临床诊断。

## 参考文献

- [1] 毕艳. 中国糖尿病慢性并发症的流行病学研究现状[J]. 中华糖尿病杂志, 2015, 7(8): 467-469.
- [2] 李娜, 李显文, 李思成. 糖尿病的代谢综合征患者血清抵抗素水平的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(8): 1249-1252.
- [3] 黄佑群, 付平, 刘芳. 糖尿病肾脏疾病预后影响因素研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(2): 159-164.
- [4] 李健, 李显文. 血清胱抑素 C、尿微量白蛋白/尿肌酐比值联合测定在老年 2 型糖尿病早期肾病诊断的价值[J]. 中国医学创新, 2015, 26(1): 4-6.
- [5] 周肇魁. 血清 HCY、CysC 检测在老年 2 型糖尿病肾病患者的作

用[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(19): 3828-3829.

- [6] 刘颖, 朱海燕, 晏燕. 血清胱抑素 C 及同型半胱氨酸联合检测在糖尿病早期肾损害诊断中的应用价值[J]. 中国临床研究, 2012, 25(2): 140-141.
- [7] 林明相, 赵玲敏. 3 项指标联合检测在 2 型糖尿病早期肾损害的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2012, 18(22): 2315-2317.
- [8] 王慧. 尿微量白蛋白与肌酐比值对社区糖尿病患者早期肾病的诊断价值[J]. 上海医药, 2015, 2(1): 35-36.
- [9] 刘德贝, 曹艳林, 吴建华, 等. 随机尿蛋白与尿肌酐比值测定临床分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(4): 293-294.

(收稿日期: 2015-11-15)

# 非小细胞肺癌患者胸水与外周血检测 EGFR 基因突变的比较

刘根贤<sup>1</sup>, 慕进勇<sup>2</sup>, 张守翠<sup>3</sup>

(1. 山东省日照市妇幼保健院检验科, 山东日照 276826; 2. 山东省荣成市石岛人民医院检验科, 山东荣成 264309; 3. 山东省日照市中医院骨科, 山东日照 276800)

**摘要:**目的 比较外周血和胸水两种样本检测 EGFR 基因突变的情况,为临床选取合适的送检标本提供参考。方法 选取非小细胞肺癌(NSCLC)合并恶性胸腔积液病例 65 例,收集血液和胸水标本,分别抽取 DNA,使用巢式 PCR 扩增检测。采用 SPSS19.0 软件进行数据处理。结果 65 例 NSCLC 患者中有吸烟史的患者占 44.6%。病理类型为腺癌的有 53 例,占 81.5%;非腺癌 12 例,占 18.5%。NSCLC 分期为 III b 期者有 34 例,占 52.3%;IV 31 例,占 47.7%。胸水总检出率(36.9%)高于血清总检出率(18.5%),两种样本中 19 号外显子突变检出率均高于 21 号外显子的。19 号外显子的突变类型为删除突变,即 DelE746-A750、DelE746-T751,胸水中多出一种 DelL747-P753 insS。21 号外显子的突变类型为点突变,即 L858R 和 L861Q。结论 虽然外周血中的 EGFR 基因突变的检出率低于胸水中的,但是 19 和 21 外显子的突变情况在外周血和胸水标本中基本一致,循环 DNA 可以反映组织中 DNA 的变化。

**关键词:**非小细胞肺癌; 胸水; 外周血; EGFR 基因突变

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.051

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2016)07-0985-03

非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的 80%,恶性程度高,发现时多数已经处于晚期。传统的治疗办法,如化疗、放疗和手术的疗效不尽如人意。随着对肺癌生物标志物的深入研究和致病机理的逐步阐明,分子靶向治疗已经成为肺癌综合治疗中的最新模式,受到广泛关注。目前 NSCLC 治疗的重要方向之一即以肿瘤细胞分化增殖相关的酶为靶点,其中以表皮生长因子受体(EGFR)为靶点的分子靶向治疗取得了较广泛的临床应用。EGFR 基因突变主要发生在 18~21 外显子,其中 19 和 21 外显子突变占据约 90%。大量临床研究显示检测 EGFR 基因突变可以筛查对靶向药敏感的患者,从而实现靶向个体化治疗<sup>[1-3]</sup>。但是 EGFR 基因突变样本往往由组织取样获得,创伤大,操作繁琐。近年来,NSCLC 患者的外周血循环 DNA 分析可一定程度反映肿瘤情况,其检测得到了广泛关注<sup>[4]</sup>。胸水中可直接收集肿瘤脱落细胞,也是 EGFR 基因突变检测的常见样本来源<sup>[5]</sup>。本文比较了外周血和胸水两种样本检测 EGFR 基因突变的情况,为临床选取合适的送检标本提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 NSCLC 合并恶性胸腔积液病例 65 例,其中男 35 例,女 30 例,年龄 37~79 岁,平均年龄 62 岁。所有血液样本均使用 EDTA-K<sub>2</sub> 真空采血管收集。采血后及时离心(3 500 r/min, 10 min)分离血浆,取上清,获得无血细胞成分的血浆,用 1.5 mL 离心管分装。每例抽取胸水 250~500 mL。

## 1.2 DNA 抽提及巢式 PCR 扩增检测

**1.2.1 外周血样本使用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) 试剂盒抽提。**胸水脱落细胞经石蜡包埋后,使用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) 试剂盒抽提。抽提步骤按照试剂盒说明书进行。

**1.2.2 巢式 PCR 扩增目的片段为 EGFR 基因 19 和 21 号外显子。**引物参考文献设计<sup>[6]</sup>,引物合成及测序由上海生工生物工程公司完成。反应条件为:94 °C, 5 min; 94 °C, 40 s, 58 °C, 45 s, 72 °C, 1 min; 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 DR01(北京艾德莱生物科技有限公司)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理,计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 入选患者临床资料** 选取 NSCLC 合并恶性胸腔积液病例 65 例,男 35 例(阳性率 71.4%),女 30 例(阳性率 28.6%);年龄 37~79 岁,平均年龄 62 岁。有吸烟史的患者占 44.6%。病理类型为腺癌的有 53 例,占 81.5%;非腺癌 12 例,占 18.5%。NSCLC 分期为 III b 期有 34 例,占 52.3%;IV 期 31 例,占 47.7%。

**2.2 19 和 21 外显子突变检出情况** 65 例 NSCLC 患者同时检测血清样本和胸水样本中的 EGFR 基因突变情况,胸水总

检出率(36.9%)高于血清总检出率(18.5%),两者相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。两种样本中 19 号外显子突变检出率均高于 21 号外显子的。19 号外显子的突变类型为删除突变,即 DelE746-A750、DelE746-T751,胸水中多出一种,即 DelL747-P753 insS。19 号外显子的突变类型为点突变, L858R、L861Q。

表 1 目的基因及引物序列

目的基因	引物序列	扩增长度 (bp)
19 外显子	外侧 5'-AAATAATCAGTGTGATTCGTGGAG -3'(上游)	493
	5'-GAGGCCAGTGTCTCTCTAAGG-3'(下游)	
	内侧 5'-GTGCATCGCTGGTAACATCC -3'(上游)	296
	5'-GAGGCCAGTGTCTCTCTAAGG-3'(下游)	
21 外显子	外侧 5'-GCAGCGGGTTACATCTTCTTC -3'(上游)	342
	5'-CAGCTCTGGCTCACACTACCAG-3'(下游)	
	内侧 5'-GCTCAGAGCCTGGCATGAA-3'(上游)	310
	5'-CATCTCCCCTGCATGTGT -3'(下游)	

表 2 血清和胸水标本 EGFR 突变检出情况比较

样本	突变检出率(%)	突变类型
血清	18.5	
19 外显子	10.8	DelE746-A750;DelE746-T751
21 外显子	7.7	L858R;L861Q
胸水	36.9	
19 外显子	23.1	DelE746-A750;DelE746-T751; DelL747-P753 insS
21 外显子	13.8	L858R;L861Q

### 3 讨论

EGFR 属于受体酪氨酸激酶,存在于大部分正常上皮和部分间叶细胞,多种肿瘤组织中有过度表达,是肿瘤细胞增殖、浸润转移、血管生成等生物行为的重要调节因素。EGFR 在正常肺组织中不表达或低表达,而在非小细胞肺癌中高表达,主要原因为过表达和基因扩增等,其表达与高分期、生存期缩短、淋巴结转移等相关。病理状态下,EGFR 通路异常激活,EGFR 酪氨酸激酶活性增强,下游信号通路随之激活,细胞生长无法抑制,造成肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等生物学特性得以强化。由于 EGFR 酪氨酸激酶是信号传递的必要条件之一,因而成为 NSCLC 治疗的重要靶分子,阻断 EGFR 信号传递通路可以抑制肿瘤生长,使细胞停留在 G1 期,诱导肿瘤细胞凋亡。EGFR 基因突变导致细胞内酪氨酸激酶区改变,使得治疗用药(小分子酪氨酸激酶抑制剂)更容易结合,从而增加药物的敏感性<sup>[7]</sup>。大量研究表明,酪氨酸激酶编码区的基因突变主要是 19 外显子的缺失和 21 外显子的 L858R 点突变<sup>[8-10]</sup>。因此,检测 EGFR 基因的 19 和 21 外显子的突变情况可以从 NSCLC 患者中筛选出合适的治疗对象进行有针对性的治疗,有助于提高药物疗效。

本研究发现,外周血中 19 号外显子的删除突变是由于第

2 236~2 250 核苷酸缺失或者第 2 236~2 253 核苷酸缺失,分别导致 746 位谷氨酸至 750 位丙氨酸缺失(DelE746-A750)或者 746 位谷氨酸至 751 位苏氨酸缺失(DelE746-T751)。胸水中 19 号外显子还发现另外一种,即第 2 240~2 257 核苷酸缺失,导致 747 位亮氨酸至 753 位苯丙氨酸缺失,并插入丝氨酸(DelL747-P753 insS)。外周血和胸水中的 21 号外显子突变情况相同,即第 858 位密码子出现 T/G 转换,导致编码产物由亮氨酸变为精氨酸(L858R)和第 861 位密码子出现 T/A 转换,导致编码产物由亮氨酸变为谷氨酰胺(L861Q)。

循环 DNA 来源于细胞凋亡(正常人群,长度 185~200 bp)和细胞坏死(肿瘤患者,以长链 DNA 片段为主)。肺癌在演化的不同阶段会伴随特定基因的改变,这些改变了的 DNA 片段会进入循环中。因此循环 DNA 检测对于肿瘤的早期诊断和预防有重要意义。大量研究表明,循环 DNA 与肿瘤组织 DNA 的基因变化一致性较好,因此,国内外学者尝试对 NSCLC 外周血循环 DNA 分析发现肿瘤特异性标志物。为了寻找易获得的标本进行 EGFR 基因突变检测,近年来国内外研究者将注意力集中在了胸水和外周血上。恶性胸腔积液是晚期 NSCLC 患者的常见并发症,采用胸水标本有操作风险小、检出率高、与组织标本高度一致等优点。但是对于 NSCLC 早期 EGFR 基因突变检测,仍有待于进一步研究。外周血循环 DNA 是存在于血浆等体液中的游离 DNA,NSCLC 患者的肿瘤组织可通过细胞坏死、凋亡等方式释放出,其含量与肿瘤的进展、治疗及预后相关<sup>[2-3,11]</sup>。本研究对 65 例 NSCLC 患者的 EGFR 基因突变情况作一比较,发现外周血中的 EGFR 基因突变的检出率低于胸水中的,差异有统计学意义。但是 19 和 21 外显子的突变情况在外周血和胸水标本中基本一致,循环 DNA 可以反映组织中 DNA 的变化。随着外周血循环 DNA 检测技术的不断进步,检出率的不断提升,将更加便于临床的开展和实施,这将对肺癌患者的诊断、筛查、治疗和随访有重要的意义,为临床检测提供方便有效的诊断方法,便于临床的开展和实施,具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] 高云,陈嘉昌,朱振宇,等. 基因突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2011,3(1):51-56.
- [2] 姜北,李晶,巩平. 非小细胞肺癌患者血清 EGFR 基因突变循环 DNA 检测[J]. 中华肿瘤防治杂志,2014,21(1):29-33.
- [3] 周小昀,李龙芸,崔巍,等. 检测肺癌患者血清游离 DNA 的 EGFR 基因点突变与 EGFR-TKI 疗效的相关性分析[J]. 癌症进展,2011,9(1):13-18.
- [4] 王开云,熊敏,徐城林,等. 非小细胞肺癌患者血清 EGFR 基因突变循环 DNA 检测的临床研究[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(3):332-334.
- [5] Yeo CD, Kim JW, Kim KH, et al. Detection and comparison of EGFR mutations in matched tumor tissues, cell blocks, pleural effusions, and sera from patients with NSCLC with malignant pleural effusion, by PNA clamping and direct sequencing[J]. Lung Cancer, 2013, 81(2):207-212.
- [6] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21):2129-2139.
- [7] Li N, Li H, Su F, et al. Relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and serum cyclooxygenase-2 Level, and the synergistic effect of celecoxib and gefitinib on EG-

FR expression in non-small cell lung cancer cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(80): 9010-9020.

[8] Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24): 7242-7251.

[9] Bar J, Onn A. Overcoming molecular mechanisms of resistance to first-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors[J]. Clin Lung Cancer, 2012, 13(4): 267-279.

[10] Pallis A, Briasoulis E, Linardou H, et al. Mechanisms of resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small-cell lung cancer: clinical and molecular considerations[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(11): 1613-1628.

[11] Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer[J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 112-123.

(收稿日期: 2015-10-24)

• 临床研究 •

## 2 007 例乙肝标志物、HBV-DNA 及 ALT 检测结果分析及临床价值

成克铭<sup>1</sup>, 闵 瑶<sup>2△</sup>

(1. 四川省泸州市人民医院检验科, 四川泸州 646000; 2. 重庆市东华医院检验科, 重庆 400032)

**摘要:**目的 通过联合检测乙肝患者血清学标志物(HBV-M)、乙型肝炎病毒核酸(HBV-DNA)和丙氨酸氨基转移酶(ALT),探讨3项检测指标在乙肝诊治中的临床意义。方法 对2 007例标本采用连续监测速率法检测血清中的ALT;实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测HBV-DNA;时间分辨免疫荧光分析法(IFMA)检测HBV-M。结果 HBV-DNA>100 IU/mL的患者为1 098例(54.71%),其中,HBV-M检测Ⅰ组[HBsAg 阳性(+),HBeAg 阳性(+),HBcAb 阳性(+)]和Ⅱ组[HBsAg 阳性(+),HBeAg 阳性(+)]的HBV-DNA 阳性率、ALT 阳性率明显高于Ⅲ组[HBsAg 阳性(+),HBeAb 阳性(+),HBcAb 阳性(+)]、Ⅳ组[HBsAg 阳性(+),HBcAb 阳性(+)]和Ⅴ组[HBsAg 阳性(+),HBeAb 阳性(+)],差异有统计学意义( $P<0.05$ );HBV-DNA 为阳性的患者中,HBV-DNA 含量与 ALT 水平成正相关,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结论 联合检测 HBV-M、HBV-DNA 载量和 ALT 水平,能全面了解 HBV 感染、复制以及传染性状态。在判断病情转归、肝功能损害情况和疗效观察方面具有重要意义。

**关键词:**HBV; ALT; HBV-DNA; HBV-M

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.052

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2016)07-0987-03

乙型肝炎(下称乙肝)病毒(HBV)是引起病毒性肝炎的最常见病原体,可通过血液、性接触、母婴垂直传播感染他人。虽然乙肝疫苗的应用有效地减少了HBV的传播,但它仍是一种严重危害人类健康的世界性传染病,感染呈全世界流行,全球大约20亿人已经感染HBV,其中的3.5亿转变成慢性感染,慢性乙肝患者有发展成为肝硬化、肝功能失代偿和肝癌的风险。我国是高流行区,一般人群乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性率为9.09%<sup>[1]</sup>,成为严重影响整个民族的健康素质的传染性疾病,也给社会带来沉重的经济负担,是我国目前最突出的公共卫生问题之一。因此,乙型肝炎的诊断、治疗和预后判断是广大医务人员和患者普遍关注的问题。目前临床上主要通过血清学标志物(HBV-M)、肝功能指标以及近年兴起的实时荧光定量PCR技术等方法进行检查,采取上述3种方法对乙肝感染患者进行监测以及评定其病情、疗效均具有重要临床价值。尤其是实时荧光定量PCR技术的发展和运用,对患者进行HBV-DNA定量测定更能准确反映其体内病毒复制以及活跃状态。本文通过3种方法检测2 007例乙肝样本,以探讨不同检验指标在乙肝患者诊断和治疗中的临床意义,现将检测结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择2013年1月至2014年12月在本院门诊或住院的乙肝患者2 007例,其中男936例,女1 071例,年龄14~65岁,平均36.6岁。排除合并肝癌、HIV、HAV、HCV、HEV感染及伴有其他严重肝脏疾病,所有样本均于空腹静脉采血分离血清进行检测。其中Ⅰ组[HBsAg 阳性(+),

HBeAg 阳性(+),HBcAb 阳性(+)]636例(31.69%);Ⅱ组[HBsAg 阳性(+),HBeAg 阳性(+)]279例(13.90%);Ⅲ组[HBsAg 阳性(+),HBeAb 阳性(+),HBcAb 阳性(+)]858例(42.75%);Ⅳ组[HBsAg 阳性(+),HBcAb 阳性(+)]174例(8.67%);Ⅴ组[HBsAg 阳性(+),HBeAb 阳性(+)]60例(2.99%)。

**1.2 主要仪器** 新波SYM-BIO时间分辨免疫荧光分析仪(苏州新波生物技术有限公司)、DA7600荧光定量PCR分析仪(广州达安公司)、日立7180全自动生化分析仪(日本日立公司)。

**1.3 检测指标及方法** (1)乙肝血清标志物定量检测:采用时间分辨免疫荧光分析法(IFMA),阳性标准:HBsAg>0.2 ng/mL;HBsAb>10 mIU/mL;HBeAg>0.5 PEIU/mL;HBeAb>0.2 PEIU/mL;HBcAb>0.9 PEIU/mL。(2)HBV-DNA含量:采用实时荧光定量分析法(FQ-PCR),严格按试剂说明书操作。HBV-DNA<1.0×10<sup>2</sup> IU/mL者为阴性,HBV-DNA>1.0×10<sup>2</sup> IU/mL者为阳性。(3)ALT采用全自动生化分析仪测定,ALT>40 U/L为阳性。

**1.4 统计学处理** 数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,将HBV-DNA(copy/mL)转化为对数,计数资料以率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验;当 $P<0.05$ 时,表示差异具有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 不同HBV-DNA载量乙型肝炎患者ALT测定结果**,见表1。患者ALT在HBV-DNA阴性组与阳性各组间比较,差

△ 通讯作者, E-mail: ml1187036845@126.com.