

- [5] 赵小丽,郭玉荣.成分输血在新生儿患儿中的应用[J].甘肃医药,2015,8(7):505-508.
- [6] 邹丽华,刘晋萍,冯正义,等.低于 15 公斤患儿心脏手术围体外循环期改良节约用血策略的安全性分析[J].中国体外循环杂志,2015,6(2):99-104.
- [7] 郭芳,朱进秋,罗维真,等.挤压脐带胎盘输血方法对极低出生体质量儿的影响[J].临床儿科杂志,2015,33(3):211-213.
- [8] 王亮,陈贝贝,崔洁,等.185 例新生儿围术期输血回顾性分析[J].中国输血杂志,2014,27(12):1329-1332.
- [9] 雷丽明,王华,彭兰.新生儿 ABO 血型正反定型及其交叉配血实验结果分析[J].国际检验医学杂志,2014,35• 临床研究 •

(20):2751-2753.

- [10] 刘峰,李归宁,王寒旭,等.微柱凝胶技术在 ABO 新生儿溶血病患儿输血前检验中的应用研究[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2013,12(1):76-79.
- [11] 黄晨艳,沈敏祥,刘辉,等.Rh 系新生儿溶血病患病种类变迁及管理策略研究[J].中国妇幼保健,2011,14(34):5287-5290.
- [12] 张长虹,周俊.新生儿输血进展与输血安全[J].中国输血杂志,2010,23(7):491-494.

(收稿日期:2017-01-11 修回日期:2017-02-11)

# 全血中 EB 病毒 DNA 定量检测在鼻咽癌患者预后中的临床意义

李勤琴,唱 凯,邓少丽<sup>△</sup>,陈 鸣

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042)

**摘 要:**目的 探讨鼻咽癌(NPC)患者全血中 EB 病毒(EBV)DNA 定量检测对 NPC 的治疗及预后的评估价值。方法 收集 2015 年 1—12 月在本院初诊的 NPC 患者 168 例(初诊 NPC 组),NPC 放疗患者 142 例(NPC 放疗组),NPC 伴转移患者 28 例(NPC 伴转移组),以及 NPC 治愈后复查患者 86 例,分别采集全血标本,采用实时荧光定量 PCR 方法检测标本中 EBV DNA 含量,计算各组 EBV 阳性率及平均拷贝数,并分析 NPC 患病率与 EBV 感染率之间的关系,比较各组间 EBV DNA 拷贝数对数之间的差异。结果 各组 EBV DNA 阳性检出率分别为初诊 NPC 组 89.3%(150/168),NPC 放疗组 55.0%(78/142),NPC 伴转移组 100.0%(28/28),前 3 组明显高于 NPC 治愈后复查组 6.9%(6/86);另外,各组 EBV DNA 平均拷贝数分别是初诊 NPC 组  $3.52 \times 10^4$ ,NPC 放疗组  $1.12 \times 10^2$ ,NPC 伴转移组  $8.68 \times 10^4$ ,NPC 治愈后复查组  $2.21 \times 10$ 。结论 EBV DNA 检测不仅是诊断 NPC 的一个重要因素,而且是评估患者治疗效果,疾病进展和预后的重要因素。

**关键词:**EB 病毒; DNA; 鼻咽癌; 实时荧光定量 PCR; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)08-1109-03

鼻咽癌(NPC)是我国常见的恶性肿瘤之一,特别是在我国南方地区<sup>[1]</sup>。EB 病毒(EBV)是 1964 年 Epstein 和 Barr 在肿瘤细胞中发现的,属于疱疹病毒<sup>[2]</sup>,在人体中主要以潜伏感染形式存在,因此在全血中存在 EBV 的基因产物。EBV 与 NPC 的发生密切相关,对 NPC 的诊断具有重大的临床意义,目前检测血液中 EBV 基因的方法主要有常规聚合酶链反应、半定量巢式 PCR 和实时荧光定量 PCR,后者的灵敏度高,所以本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 NPC 患者不同时期全血中的 EBV DNA。目前 NPC 患者在治疗过程中反复检测全血中 EBV DNA 含量,目的就是为监测治疗效果,NPC 虽然对放疗敏感,但是根治治疗后的远处转移及局部复发仍然是治疗失败的主要原因<sup>[3]</sup>。本研究揭示了 EBV DNA 检测不仅是诊断 NPC 的一个重要因素,而且是评估患者治疗效果,疾病进展和预后的重要因素,为进一步研究 EBV 与 NPC 的关系提供依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2015 年 1—12 月在第三军医大学大坪医院检查的患者共 424 例,其中初诊 NPC 患者 168 例(初诊 NPC 组),NPC 放疗后患者 142 例(NPC 放疗组),NPC 伴转移患者 28 例(NPC 伴转移组),以及 NPC 治愈后复查组 86 例,其中男 275(64.8%)例,女 149(35.2%)例;年龄 35~78 岁,平均(56.0±10.5)岁;分别采集全血标本并收集全血,采用实时荧光定量 PCR 方法检测标本中 EBV DNA 含量。

## 1.2 方法

**1.2.1 样本采集** EBV DNA 检测用乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2$ )抗凝,且每个研究对象采集 3 mL 外周血,放于一 20℃ 冻存。所有标本采集后送往第三军医大学大坪医院分子生物实验室进行检测。

**1.2.2 DNA 提取与基因扩增** 使用核酸提取试剂盒(试剂盒由上海百傲科技股份有限公司提供,产品编号:BST01051)提取每一个标本中的 DNA;用 nanodrop 紫外分光光度计检测核酸的  $OD_{260/280}$ (最佳范围在 1.80~2.00)和  $OD_{230/260}$  的比值,评估提取核酸的浓度和纯度。基因扩增的引物和探针等试剂由湖南圣湘生物技术有限公司提供(产品标准 YZB/国 1636-2015); $\beta$ -actin 基因作为实验的内参基因,用于提示标本核酸提取是否成功,其中 5'端标记荧光发光集团 FAM(6-carboxy fluorescein);且每批 PCR 均用双蒸水作阴性对照;PCR 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$  体系,其中含有预混缓冲液 38  $\mu\text{L}$ ,Taq 聚合酶 2  $\mu\text{L}$ ,模板 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应在 BIO-RAD 公司 CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行,PCR 程序为变性 93℃ 2 min,再设置 93℃ 45 s、55℃ 1 min,40 个循环。进行扩增并收集荧光。

**1.3 实时荧光定量 PCR 测定结果判读** 实时荧光定量 PCR 测定时,样本的相对荧光强度随着 PCR 循环次数增加。将第 1~15 个循环中的平均相对荧光强度乘 10 倍标准差设为基线,恰好达到此基线时所经历的循环数称为循环阈值( $C_t$ )。模版 DNA 拷贝量的对数与  $C_t$  呈线性关系,即随着模版 DNA 拷贝数量的对数值增加, $C_t$  值呈比例下降。在实际操作中,获得  $C_t$  值后,根据值大小来判断所测标本的阳性与否,再通过标准

<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:dengshaoli@tmmu.edu.cn。

曲线对未知模版进行定量分析,算出该样本的 DNA 含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件分析数据,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内多组比较采用方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,计数资料采用频数和率表示,多组间比较用行  $\times$  列  $\chi^2$  检验,进一步两两比较,采用 Fisher 精确检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组患者全血中 EBV DNA 的检出率及拷贝数对数值比较 初诊 NPC 组 EBV DNA 的检出率为 89.3%,NPC 伴转移组患者 EBV DNA 的检出率为 100.0%,NPC 放疗组患者 EBV DNA 的检出率为 55.0%,NPC 治愈组患者 EBV DNA 的检出率为 6.9%,4 组间 EBV DNA 的检出率差异具有统计学意义 ( $P = 0.033$ );根据样本的 PCR 结果进行统计学分析,初诊 NPC 组 EBV DNA 的平均拷贝数为  $3.52 \times 10^4$ ,其对数值为 4.55;NPC 伴转移组患者 EBV DNA 的平均拷贝数为  $8.68 \times 10^4$ ,其对数值为 4.94;NPC 放疗组患者 EBV DNA 的平均拷贝数为  $1.12 \times 10^2$ ,其对数值为 2.04;NPC 治愈组患者 EBV DNA 的平均拷贝数为  $2.21 \times 10$ ,其对数值为 1.34;初诊 NPC 组、NPC 放疗组、NPC 伴转移组与 NPC 治愈组患者全血中 EBV DNA 拷贝数的对数值差异具有统计学意义 ( $P = 0.013$ ),见表 1。该统计学结果显示 NPC 患者治愈后 EBV 基本被消除,虽然还有患者全血中检测出 EBV DNA,但其的拷贝数是基本可以忽略,可以进一步采取治疗措施对 EBV DNA 阳性的治愈患者进行后续治疗。

表 1 4 组患者全血中 EBV DNA 检出率及拷贝数对数值比较

组别	<i>n</i>	EBV DNA 检出率 [ <i>n</i> (%) ]	EBV DNA 平均 拷贝数的对数值
初诊 NPC 组	168	150(89.3)	4.55
NPC 伴转移组	28	28(100.0)	4.94
NPC 放疗组	142	78(55.0)	2.04
NPC 治愈组	86	6(6.9)	1.34
<i>P</i>		0.033	0.013

2.2 各组间两两比较 初诊 NPC 组与 NPC 放疗组患者 EBV DNA 的检出率进行比较,采用 Fisher 精确检验,初诊 NPC 组患者全血中 EBV DNA 的检出率(89.3%)明显高于 NPC 放疗组(55.0%),但差异无统计学意义 ( $P > 0.0083$ );两组 EBV DNA 平均拷贝数经对数校正后,两组间对数值差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。初诊 NPC 组与 NPC 伴转移组患者 EBV DNA 的检出率进行比较,NPC 伴转移组患者全血中 EBV DNA 的检出率(100.0%)高于初诊 NPC 组(89.3%),但差异无统计学意义 ( $P > 0.0083$ );两组 EBV DNA 平均拷贝数经对数校正后,两组间对数值差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

3 讨 论

EBV 被国际癌症研究机构归为 I 类致癌物质,且与多种疾病相关,如霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤<sup>[4]</sup>、传染性单核细胞增多症、淋巴组织细胞增生症<sup>[5]</sup>等,并且是导致 NPC 的重要致癌因素,也在 NPC 中研究最多。在全国范围内,大部分人在儿童时期就感染了 EBV,但少数人在成年后发展成 NPC,由于现在 EBV 的致病机制并不是很清楚,有研究表明 CD4 和 CD8 阳性的免疫细胞在清除 EBV 中发挥着重要的作用<sup>[6]</sup>,所以机体免疫系统对 EBV 的清除作用是至关重要的,也是目前研究的重点之一<sup>[7]</sup>,所以需要更多的基础性研究来解决这些至关重要的问题。

目前 NPC 患者在治疗过程中反复的检测全血中 EBV DNA 含量,目的就是为监测治疗效果,NPC 虽然对放疗敏感,但是根治放疗后的远处转移及局部复发仍然是治疗失败的主要原因<sup>[1]</sup>。本研究将研究对象分为 4 个组,分别是初诊 NPC 患者组,NPC 放疗后患者组,NPC 伴转移患者组以及 NPC 治愈后复查组,就是为了研究 NPC 患者对放疗的敏感性及其预测患者的治疗效果;有研究数据显示治疗后出现复发或转移的 NPC 患者其治疗前全血中 EBV DNA 的中位拷贝数远高于未出现临床进展的患者<sup>[1,8]</sup>,所以本研究对于 NPC 的临床进展具有一定的临床意义;另外,NPC 患者治疗前全血中 EBV DNA 的基线含量也是预测患者的预后的一个独立因素,其含量越高,局部复发或远处转移的危险性也就越大<sup>[1,9]</sup>。本文采用实施荧光定量 PCR 方法对初诊 NPC 患者 168 例,NPC 放疗后患者 142 例,NPC 伴转移患者 28 例,以及 NPC 治愈后复查组 86 例患者进行血液中 EBV DNA 检测,结果阳性率分别是 89.3%、55.0%、100.0%、6.9%,EBV DNA 的平均拷贝数分别是  $3.52 \times 10^4$ 、 $1.12 \times 10^2$ 、 $8.68 \times 10^4$ 、 $2.21 \times 10$ ,表明患 NPC 的组明显高于放疗组和治愈后复查组,且放疗组也明显高于治愈后复查组,不仅和其他研究结果一样说明 EBV 是导致患 NPC 的重要因素<sup>[10]</sup>,也表明定期检测血液中的 EBV 是监测疾病进展和治疗效果的重要指标,这和 Zhang 等<sup>[11]</sup>研究的结果一致。

本研究发现,EBV DNA 对于在初次治疗后出现复发还是转移或是一开始就有转移的 NPC 患者中都有重要的预测价值,且对治愈后的随访也有重要的临床意义<sup>[12]</sup>。所以,在今后的研究中可以确定一下最佳的随访时间和随访间隔时间;对于治疗后全血中 EBV DNA 持续存在的患者应该进一步采取治疗措施,以防疾病的复发和转移。

参考文献

[1] 黄爽,管西寅,应红梅.全血 EB 病毒 DNA 检测在鼻咽癌中的应用进展[J].中国癌症杂志,2012,22(3):227-231.  
[2] 赵秀利,李军,胡万宁.鼻咽癌组织中 EB 病毒定量检测的临床意义[J].中华肿瘤防治杂志,2010,17(5):362-364.  
[3] He YX,Wang Y,Cao PF,et al. Prognostic value and predictive threshold of tumor volume for patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma receiving intensity-modulated radiotherapy[J]. Chinese J Cancer, 2016, 35 (12):96.  
[4] Mitarnun W,Suwiwat S,Pradutkanchana J. Epstein-Barr virus-associated extranodal non-Hodgkin's lymphoma of the sinonasal tract and nasopharynx in Thailand[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2006,7 (1):91-94.  
[5] Kawamura Y,Miura H,Matsumoto Y,et al. A case of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis with severe cardiac complications[J]. BMC pediatr,2016,16 (1):172.  
[6] Gschoesser C,Almanzar G,Hainz U,et al. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> mediated cellular immune response to recombinant influenza nucleoprotein[J]. Vaccine, 2002, 20 (31/32): 3731-3738.  
[7] Hongbo C,Hongzhen M,Lingzhi H,et al. Secondary neuropsychiatric manifestations caused by Epstein-Barr virus encephalitis in a new onset systemic lupus erythematosus patient[J]. Rheumatol Int,2012,32 (8):2321-2323.  
[8] Adham M,Greijer AE,Verkuijlen SA,et al. Epstein-Barr

virus DNA load in nasopharyngeal brushings and whole blood in nasopharyngeal carcinoma patients before and after treatment[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19 (8): 2175-2186.

[9] 方唯意,郑文岭,马文丽,等. EBV 全基因组芯片的制备及应用[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(9): 1812-1815.

[10] Auburn H, Zuckerman M, Smith M. Analysis of Epstein-Barr virus and cellular gene expression during the early phases of Epstein-Barr virus lytic induction[J]. J Med Microbiol, 2016, 65 (11): 1243-1252.

[11] Zhang J, Shu C, Song Y, et al. Epstein-Barr virus DNA level as a novel prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma: A meta-analysis [J]. Medicine, 2016, 95 (40): e5130.

[12] Zheng XH, Lu LX, Li XZ, et al. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load in nasopharyngeal brushing samples in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma in southern China[J]. Cancer science, 2015, 106 (9): 1196-1201.

(收稿日期: 2016-09-12 修回日期: 2016-12-23)

• 临床研究 •

## 2004—2015 年某驻闽部队结核病的流行特征分析

张澍澍, 施 瑾, 张宝华<sup>△</sup>

(南京军区福州总医院第二住院部, 福州 350003)

**摘要:**目的 了解某驻闽部队军人结核病近 12 年的发病情况, 为部队结核病防治提供决策依据。方法 将 2004 年 1 月至 2015 年 10 月某驻闽部队军人结核病患者的病例资料进行数据整理, 并进行描述性分析。结果 2004—2015 年某驻闽部队共有 247 例确诊结核病例, 男 239 例, 占 96.76%, 女 8 例, 占 3.24%; 年龄 18~94 岁, 其中 21~30 岁军人为主要患病人群, 共 155 例, 占 62.75%; 247 例确诊结核病例中干部 62 例, 占 25.10%, 战士(士官、学员)185 例, 占 74.90%; 肺结核共 185 例, 占 74.90%, 结核性胸膜炎共 53 例, 占 24.56%, 其他肺外结核例如结核性脑膜炎、泌尿生殖系结核、淋巴结结核、胸壁结核等共 9 例, 占 3.64%。各年度结核病总数、各类型结核分类构成比, 战士明显高于干部。结论 年轻战士是结核病高发人群, 早期发现, 早期治疗, 彻底治愈是控制传染源的关键, 是军队结核病防控工作重点。

**关键词:**结核病; 部队; 发病情况; 防治

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)08-1111-03

结核病是由结核分枝杆菌复合群引起的慢性感染性疾病, 可累及全身多器官系统。最常见的患病部位是肺脏, 占各器官结核病总数的 80%~90%。也可以累及淋巴结、肾、脑、等器官, 但主要通过呼吸道传播。排菌的肺结核患者痰液干燥后, 病原菌随尘土飞扬, 被易感者吸入而引起感染。尤其在军队这一特殊环境中, 人数众多, 居住环境比较集中, 就极易传染给周围人群, 造成暴发, 严重威胁到部队官兵的身体健康。为了完成结核病控制规划目标, 为部队结核病防控策略提供依据, 现将 2004—2015 年中某驻闽部队军人结核病患者病例资料的构成、分型、分布特征进行分析, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2004 年 1 月至 2015 年 10 月某驻闽部队军人结核病患者的临床资料。以本院保障军人患者为对象, 包括在职干部、战士、士官、学员, 参照 2004 年中华医学会《结核病临床诊疗指南》为诊断及分型标准进行检索, 共 247 例确诊结核病住院军人, 所有病例排除疑似病例。

**1.2 仪器与试剂** 结核分枝杆菌涂片: 试剂使用珠海贝索生物技术有限公司研制结核菌染色液(抗酸染色液)。快速结核菌培养法: 采用 BD 公司研制 Bactec MGIT960 系统培养管置仪及相关试剂。结核分枝杆菌 DNA 检测方法: 采用 ABI RealTime 7300 PCR 分析仪及广东中山大学达安基因公司结核分枝杆菌 PCR 荧光定量检测试剂盒进行检测。

**1.3 方法** 结核分枝杆菌涂片方法: 涂片镜检检测法采用抗酸染色显微镜下找抗酸杆菌, 按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)标准操作执行, 以每 100 个视野抗酸杆菌 ≥3 个为阳性。快速结核菌培养法: 检测方法按照试剂配套说明书操作, 操作均在生物安全柜内进行。Bactec MGIT960 系统培养管置

仪器培养, 去除阳性标本, 阴性标本 42 d 报告结果。结核分枝杆菌 DNA 检测方法: 广东中山大学达安基因公司结核分枝杆菌(PCR)荧光定量检测试剂盒采用一对结核分枝杆菌特异性引物和一条结核分枝杆菌特异性荧光探针, 配以 PCR 反应液、耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)、四种核苷酸单体(dNTPs)等成分, 用 PCR 体外扩增法检测结核分枝杆菌 DNA。Ct<30, 实验结果为阳性。

**1.4 统计学处理** 所有数据采用 Microsoft Excel2003 进行处理, 按入院时间、结核病分型、结核病患者身份分布进行统计分析, 采用一般频数分布法对军队结核病患者情况做出分析。

### 2 结果

**2.1 结核病总体发病情况** 研究结果显示, 2004—2015 年共有 247 例确诊结核病例, 男 239 例, 占 96.76%, 女 8 例, 占 3.24%。其中干部 62 人, 占 25.10%, 战士(士官、学员)185 人, 占 74.90%。军人年龄段为 18~94 岁; 其中 21~30 岁军人为主要患病人群, 共 155 例, 占 62.75%。12 年中复治病例共 72 例, 占 29.15%。见表 1。

表 1 2004—2015 某驻闽部队性别、职别、年龄段结核病发病情况统计表

项目	性别		职别		年龄(岁)			
	男	女	干部	士兵	<20	20~30	>30~≤40	>40
发病例数(n)	239	8	62	185	55	155	30	7
构成比(%)	96.76	3.24	25.10	74.90	22.27	62.75	12.15	2.83

**2.2 结核病历年发病情况** 研究结果显示, 2004—2015 这 12 年中某驻闽部队军人结核病发病数总体呈下降趋势, 共出现了

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zhangbaohuajyk@163.com。