

疫分析法(Nano-TRFIA),现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 90份血清样品均来自江苏省原子医学研究所附属江原医院就诊者,年龄24~83岁,其中30份样品经ECLIA检测CA199( $\geq 37$  U/mL)为阳性,其余60份标本均为阴性标本( $< 37$  U/mL)。

**1.2 仪器与试剂** NHS耦联磁珠、缓冲液和封闭液为英芮诚Prot Elut公司产品,2株抗体(抗CA199单克隆抗体B1和Eu<sup>3+</sup>-CA199-B7)及CA199参考标准、增强液和洗涤液由江苏省无锡市江原实业技贸总公司提供,CA199质控品由罗氏公司提供。牛血清蛋白(BSA)为Sigma产品。96孔微孔板系Nunc产品,去离子超纯水由本室自制,其他试剂均为国产分析纯。DR6606型时间分辨荧光免疫分析仪为广州达瑞公司产品。CA125、甲胎蛋白(AFP)标准液为达安基因公司产品。

## 1.3 方法

**1.3.1 免疫磁珠的制备** 严格按英芮诚Prot Elut公司提供的操作步骤完成耦联CA199-B1抗体磁珠的制备,完成后将该磁珠置于1mL的保存试剂中(含0.05%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液),放置4℃备用。

**1.3.2 测定方法** 96孔微孔板中先加入5 $\mu$ L被磁珠耦联的抗CA199-B1单抗,再依次加入50 $\mu$ L CA199参考标准和待测血清,再加入150 $\mu$ L以50 mmol/L(pH7.8)的Tris-HCl反应缓冲液(含8 mmol/LNaCl、0.1%BSA、0.2%牛IgG、0.1mL/L的吐温-80和0.1%NaN3)1:30稀释的Eu<sup>3+</sup>-抗CA199-B7,25℃振荡孵育10 min后,磁性分离,保留磁珠;用含14.5 mmol/LNaCl、0.2 mL/L吐温-80和0.2%NaN3上述缓冲液洗涤液重复上述步骤洗涤5次,再加增强液200 $\mu$ L,25℃振荡反应3 min,荧光检测。检测过程和拟合结果在DR6606型时间分辨荧光免疫分析仪上完成。

**1.4 统计学处理** 用SPSS19.0软件进行数据处理及统计学分析。

## 2 结 果

**2.1 磁珠耦联的抗CA199-B1单抗的理化鉴定** 分别检测耦联反应前与反应后的溶液中鼠IgG抗体的量,加入纳米磁珠前检测值为28 $\mu$ g,反应结束分离去除纳米磁珠后上清液中检测值为4.8 $\mu$ g。标记率为 $23.2/28.0 = 82.86\%$ 。

## 2.2 实验条件的选择

**2.2.1 耦联CA199-B1抗体磁珠加样量的选择** 在反应微孔中分别加入50 $\mu$ L的参考标准后,分别加入2、5、10、15、20 $\mu$ L耦联CA199-B1抗体的磁珠微球,按反应条件检测,考察并验证不同的免疫磁珠上样量对检测结果的影响,结果见图1。由图1可知,随抗体标记浓度的增加,各浓度点的结合率呈现先增后降的趋势,耦联CA199-B1抗体磁珠量为5 $\mu$ L时就有最大

值。因此,本着简便经济的原则选择耦联CA199-B1抗体磁珠量为5 $\mu$ L的免疫磁珠进行后续实验。

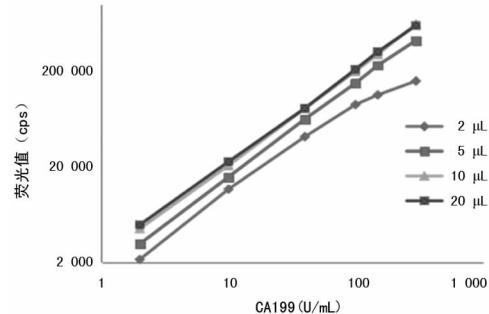


图1 抗体标记量对检测结果的影响

**2.2.2 上样量的选择** 在保持其他条件不变情况下,比较不同上样量对测量结果的影响。在反应微孔中分别加入10、20、50、100 $\mu$ L的CA199参考标准液进行检测,结果见图2。由图2可知,随着上样量的增加,各浓度点的结合率均增大。当上样量为50 $\mu$ L时,继续增加上样量,结合率增加不明显,可认为反应微孔中的双抗体夹心吸附基本达到饱和,因此后续选择50 $\mu$ L上样量进行实验。

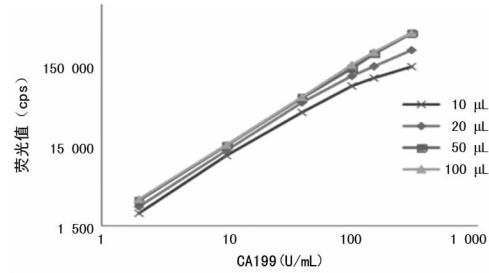


图2 上样量对检测结果的影响

**2.2.3 检测时间的选择** 在反应微孔中加入5 $\mu$ L的标记纳米磁珠,再加入50 $\mu$ L的参考标准,按反应条件分别在5、10、15、20、25、30 min时检测,考察检测时间对结果的影响,结果见图3。由图3可知,随检测时间的延长,各浓度点的结合率基本呈现增加的趋势。而随着检测时间增加,各浓度点的结合率不再发生较大的变化,趋于平稳,反应微孔中的双抗体夹心吸附在反应10 min时基本达到饱和,因此,按照快速简便的原则,选择检测时间为10 min。

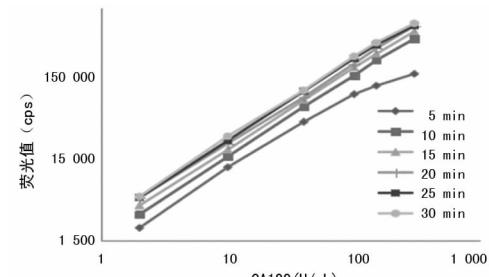


图3 检测时间对检测结果的影响

**2.3 标准曲线数据** 按照自编程软件,用双对数函数处理所得标准曲线,以检测样品荧光值为纵坐标,CA199标准品水平为横坐标,建立方程并拟合出标准

曲线见图 4。

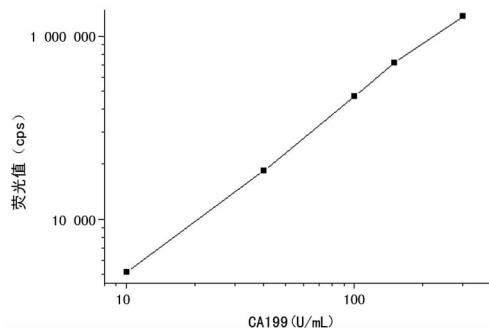


图 4 磁性微球时间分辨荧光免疫分析技术检测 CA199 的标准曲线

**2.4** 纳米磁珠时间分辨免疫技术定量检测 CA199 的方法学评价

**2.4.1** 灵敏度与稳定性 以零浓度点计数(cps)均值( $\bar{x}$ )加 2s 后的计数率在标准曲线上所得到的相应值为检测的灵敏度, 可知本方法的灵敏度为 0.2 U/mL。4 ℃ 保存的抗 CA199-B1、Eu<sup>3+</sup>-CA199-B7 冻干粉剂在 3、6 个月后分别测定, 最高浓度点的结合率平均仅下降 9% 和 6%, 说明试剂盒稳定性较好, 可较长时间保存应用。

**2.4.2** 精密度和回收率 采用 Nano-TRFIA 测定罗氏质控血清中 CA199 低、高 2 种浓度的 10 次批内和批间变异系数(CV) 分别为 4.34%~5.33% 和 4.99%~11.64%, 见表 1, 平均 CV 分别为 4.84% 和 8.32%, 符合批内 CV<10% 和批间 CV<15% 的要求。低、高 2 组质控品浓度分别为 20.6、100.0 U/mL, 样品浓度为 25.8 U/mL, 添加样品后实测样品浓度分别为 43.46、128.51 U/mL, 回收率分别为 93.66%、102.15%, 添加样品后的平均回收率为 97.91%。

表 1 纳米磁珠时间分辨免疫技术定量检测 CA199 的精密度试验

浓度	批内		批间	
	批内均值 ( $\bar{x} \pm s$ , U/mL)	CV(%)	批内均值 ( $\bar{x} \pm s$ , U/mL)	CV(%)
低	20.83±2.22	5.33	22.04±5.13	11.64
高	101.42±8.81	4.34	105.54±10.54	4.99

**2.4.3** 特异度 采用 Nano-TRFIA 测量 500 U/mL 水平的 AFP 时, 测定值为 1.5 U/mL, 测量浓度为 250 U/mL 的 CA125 时测定值为 1.2 U/mL, 说明该试剂盒与 AFP 及 CA125 之间无交叉反应, 抗体特异度比较好。

**2.4.4** 临床血清标本分析 采用 Nano-TRFIA 检测 90 例本院就诊者的血清标本, 并作比较, 见图 5。Nano-TRFIA 和 ECLIA 两者结果基本相符, 两者高度相关, 其中 ECLIA 检出的阳性血清样品采用 Nano-TRFIA 检测均为阳性。以 ECLIA 为金标准, 其中有 2 份标本出现假阳性。从图 5 可以看出,  $Y=0.9698X+4.0153$ ,  $r^2=0.9887$ 。Nano-TRFIA 与 ECLIA 法测定血清中 CA199 结果高度相关。

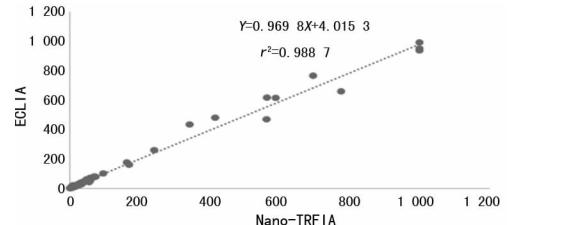


图 5 ECLIA 与 Nano-TRFIA 测定 CA199 的相关试验( $n=90$ )

### 3 讨 论

CA19-9 是一种低聚糖类相关抗原, 由腺癌细胞产生, 经胸导管引流到血液中, 引起外周血中 CA19-9 水平的升高, 该指标异常与消化系统疾病相关, 尤其在胃癌、结直肠癌、胰腺癌等疾病的良恶性鉴别中有较大意义<sup>[4-7]</sup>。

目前 CA199 的全定量检测方法主要有 IRA、ELISA、ECLIA、TRFIA 等, 随着方法学的发展和对指标精确定量等要求的提高, 其中一些方法的缺点也日益突显, 如 ELISA 灵敏度不高, IRA 有放射性污染, TRFIA 自动化程度不高、反应时间长等。本文所建方法与其他检测方法相比较具有独特优势, 首先 NHS 磁珠是以超顺磁性四氧化三铁( $Fe_3O_4$ )为核<sup>[8-9]</sup>, 磁珠直径小, 可以均匀地分散于液相中, 反应体系可以暴露更多的结合位点, 明显减小抗原-抗体反应的空间位阻, 利于抗体与血清标本中特异度结合效率提高<sup>[10-11]</sup>, 且可提高检测的特异度及灵敏度, NHS 磁珠具有超顺磁性, 可通过施加外部磁场进行快速移动和分离, 无需离心即可将免疫反应形成的免疫复合物与未结合的其他物质分开, 经过洗涤液的充分洗涤, 可以有效降低检测过程中的干扰, 提高检测灵敏度和降低检测信噪比; 免疫磁珠均匀分散于溶液中, 与 CA199 抗体接触机会更大, 从而加快免疫磁珠与 CA199 抗体的结合速率<sup>[12-13]</sup>, 反应时间只需要 10 min, 大大提高了临床检测速度。本研究将纳米磁性微球引入到 TRFIA 技术中, 构建 Nano-TRFIA 方法。这个改变解决了 TRFIA 自动化检测的技术瓶颈, 既突出了 TRFIA 高灵敏、宽范围的特性, 又可缩短反应时间。Nano-TRFIA 法灵敏度高, 与 ECLIA 结果高度相关( $r^2=0.9887$ ); 平均 CV 分别为 4.84% 和 8.32%, 完全符合临床使用需求。本研究中测量结果与现有方法比较存在一定的差异, 初步分析为如下两个原因: (1) 目前 CA199 检测均基于免疫检测技术, 但不同公司所用的标记方法不同, 所使用的试剂来源也不一样, 导致系统之间存在差异; (2) 2 例差异标本的测定值在正常参考值范围的上限附近, 这种称为灰区的测值有可能影响结果判断的准确性, 需要进一步作临床追踪检测才可能进行 (下转第 395 页)

## 论著·基础研究

## Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究\*

孙 倩,张 倩,张治国

(北京市昌平区结核病防治所检验科,北京 102200)

**摘要:**目的 探讨 Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌(MTB)耐药性的临床适用性。方法 对 2013—2015 年昌平区结核病防治所 479 株培养分离菌株进行 Genotype MTBDRplus 检测和比例法药敏试验,并对结果进行分析比较。结果 479 株培养分离株中,有 434 株两种检测方法均显示为 MTB,对这 434 例 MTB 的分离株使用 Genotype MTBDRplus 检测进行分析,其对利福平(RIF)耐药性的灵敏度和特异度分别为 96.55%(28/29)和 99.51%(403/405),两种检测方法的符合率为 99.31%(431/434);突变位点主要为 S531L;对异烟肼(INH)耐药性的灵敏度和特异度的分别为 88.14%(52/59)和 94.93%(356/375),两种检测方法的符合率为 94.01%(408/434),突变位点主要为 C15T 和 S315T1。结论 Genotype MTBDRplus 检测能快速提供 RIF 和 INH 耐药结果,是传统比例法药敏试验的有效补充。

**关键词:**结核分枝杆菌; Genotype MTBDRplus; 耐药; 突变

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.003

**文章编号:**1673-4130(2018)04-0392-04

**中图法分类号:**R378.91+1/R446.5

**文献标识码:**A

Apply of Genotype MTBDRplus on detecting the resistance of *Mycobacterium tuberculosis*\*

SUN Qian, ZHANG Qian, ZHANG Zhiguo

(Department of Clinical Laboratory, Tuberculosis Prevention and Control in Changping District, Beijing 102200, China)

**Abstract; Objective** To investigate the adaptability of Genotype MTBDRplus on detecting the resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** Analyze and compare the results of Proportional drug sensitivity test and Genotype MTBDRplus detection in 479 strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Tuberculosis Prevention and Control in Changping District from 2013 to 2015. **Results** A total of 434 strains in the 479 strains were detected as *Mycobacterium tuberculosis* by both of the two tests. The sensitivity and specificity of Genotype MTBDRplus on detecting rifampicin(RIF) in the 434 strains of *Mycobacterium tuberculosis* were 96.55% (28/29) and 99.51%(403/405), the compliance rate of the two methods was 99.31%(431/434), and the mutation site was mainly S531L. The sensitivity and specificity of isoniazid(INH) were 88.14%(52/59) and 94.93%(356/375), the compliance rate of the two methods was 94.01%(408/434), and mutation sites were mainly C15T and S315T1. **Conclusion** Genotype MTBDRplus detection could provide the results of RIF and INH resistance, and it is an effective supplement to the traditional proportional drug sensitivity method.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; Genotype MTBDRplus; drug resistance; mutation

结核病是世界级的流行病,对人类健康造成了很大的危害。近年来由于耐药结核,尤其是耐多药结核(MDR)感染率的上升,我国已被世界卫生组织(WHO)认定为 27 个 MDR 及广泛耐药结核(XDR-TB)的高负担国家之一,我国结核病的诊断和治疗面临着更为严峻的考验。目前,结核分枝杆菌(MTB)的耐药诊断方式仍以比例法药敏试验为主,由于 MTB 生长较慢,在培养分离出菌株后,还需耗时 4~6 周才

能根据菌株在培养基上的生长情况判定结果,所以,临床急需能够快速、准确提供结果的药敏试验方法。Genotype MTBDRplus 检测是一种基于多重 PCR 和分子探针杂交技术,根据杂交条带显色情况判断分离菌株基因 *rpoB*、*inhA* 和 *katG* 的突变情况,进而判断分离菌株对利福平(RIF)和异烟肼(INH)的耐药情况。在有培养菌株情况下,耗时小于 24 h。本研究使用比例法进行药敏试验,对 2013—2015 年昌平区结

\* 基金项目:十二五艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项项目(2015ZX10003003);北京市昌平区卫生发展专项项目(2016-2-01)。

作者简介:孙倩,女,技师,主要从事结核病分子生物学研究。

本文引用格式:孙倩,张倩,张治国. Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4):392-395.

核病防治所 479 株 MTB 分离菌株进行了对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)生长实验,以及 RIF、INH 耐药检测。同时,使用 Genotype MTBDRplus 试剂盒对这些菌株进行了 rpoB(与 RIF 耐药相关)、inhA 和 katG(与 INH 耐药相关)基因突变检测,与比例法药敏结果进行对比研究,探讨 Genotype MTBDRplus 检测在临床应用中的优缺点。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 选取昌平区结核病防治所 2013—2015 年全年临床分离菌株,共 479 株,全部纳入实验。H37Rv(ATCC 27294)标准菌株由中国疾病预防控制中心提供。

**1.2 仪器与试剂** 比例法药敏培养基为珠海贝索生物技术有限公司生产的 MTB 药敏培养基。Genotype MTBDRplus 试剂盒和 HotStar Taq DNA 聚合酶(QIAGEN)均由法国生物梅里埃公司提供。

## 1.3 方法

**1.3.1 比例法药敏试验** 对纳入实验的全部菌株和标准菌株 H37Rv 进行 PNB 和 TCH 生长实验和比例法药敏检测<sup>[1]</sup>,记录 RIF 和 INH 的耐药情况<sup>[2]</sup>。

**1.3.2 Genotype MTBDRplus 检测** 对全部纳入实验菌株和标准菌株 H37Rv 进行 Genotype MTBDRplus 检测,操作和结果判断完全按照操作手册进行,记录被测菌株 rpoB 基因、katG 基因和 inhA 基因检测情况。所有操作根据 Genotype MTBDRplus 试剂盒说明书进行。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计分析,两种检测方法的结果一致性比较采用 *Kappa* 检验。*Kappa* > 0.75, 表示两者一致性好; *Kappa* < 0.40, 表示两者一致性较差。

## 2 结 果

**2.1 MTB 鉴定结果** 对照菌株 H37Rv 药敏试验结果为 MTB,对 RIF 和 INH 全敏感。比例法药敏试验结果显示 479 株分离菌株中,MTB 复合群 452 株,非 MTB(NTM)27 株。同样以 H37Rv 为对照菌株,采用 Genotype MTBDRplus 检测比例法药敏试验得到的 452 株 MTB,其中 18 株 TUB 条带未显示,标记为 NTM,其余 434 株均有 TUB 条带,记录为 MTB;检测 27 株 NTM,其中 22 株 TUB 条带未显示,记录为 NTM,5 株有 TUB 条带显示,记录为 MTB。在 479 株 MTB 培养分离株中使用 Genotype MTBDRplus 检测鉴定 MTB 复合群的灵敏度和特异度分别为 96.01%(434/452) 和 81.48%(22/27),总符合率为 95.20%(456/479),*Kappa* 值为 0.63,表明在鉴定 MTB 结果方面两者有较高的一致性。

## 2.2 MTB 耐药结果

**2.2.1 RIF 及 INH 的耐药性结果比较** 对 434 株两种方法检测均鉴定为 MTB 的菌株进行 RIF 和 INH 耐药性分析,其中, rpoB 基因突变标记为 RIF 耐药,

katG 基因和 inhA 基因突变均标记为 INH 耐药。以比例法药敏试验结果为对照,29 株 RIF 耐药株中,28 株被 Genotype MTBDRplus 检测为耐药,1 株为敏感;405 株敏感株中,403 株被检测为敏感,2 株为耐药;59 株 INH 耐药株中,52 株被检测为耐药,7 株被检测为敏感;375 株敏感株中 356 株被检测为敏感,19 株检测结果为耐药。使用 Genotype MTBDRplus 检测 RIF 耐药性的灵敏度和特异度分别为 96.55%(28/29) 和 99.51%(403/405),两种方法的符合率为 99.31%(431/434);检测 INH 耐药性的灵敏度和特异度分别为 88.14%(52/59) 和 94.93%(356/375),符合率为 94.01%(408/434)。*Kappa* 值分别为 0.95 和 0.77,均大于 0.75,说明在耐药检测方面两者有很高的一致性。具体结果见表 1。

表 1 Genotype MTBDRplus 与比例法药敏试验结果(n)

Genotype	比例法			
	RIF(n=434)		INH(n=434)	
	耐药	敏感	耐药	敏感
耐药	28	2	52	19
敏感	1	403	7	356
小计	29	405	59	375

注:有 1 株 inhA 和 katG 基因同时突变的菌株

**2.2.2 Genotype MTBDRplus 检测 INH 耐药结果** Genotype MTBDRplus 检测 INH 耐药基因 katG 和 inhA 的突变结果见表 2。比例法药敏试验检测出 INH 耐药菌株共 59 株(有 1 株 inhA 和 katG 同时突变),其中 inhA 突变 33.90%(20/59),katG 突变 55.93%(33/59),未检测到 inhA 和 katG 突变 11.86%(7/59);比例法药敏试验检测出 INH 敏感株 375 株,其中 inhA 突变 5.07%(19/375),katG 突变 0(0/375),未检测到 inhA 和 katG 突变 94.93%(356/375)。inhA 突变菌株 39 株中,其中比例法药敏试验结果显示耐药率为 51.28%(20/39),敏感率为 48.72%(19/39);katG 突变 33 株,比例法药敏试验结果显示耐药率为 100.00%(33/33)。

表 2 INH 耐药基因 katG 和 inhA 突变统计(n)

Genotype	比例法		
	耐药	敏感	合计
inhA 突变	20	19	39
katG 突变	33	0	33
无突变	7	356	363
合计	59	375	434

注:有 1 株 inhA 和 katG 基因同时突变的菌株

**2.2.3 Genotype MTBDRplus 检测 3 种基因的突变频率** 434 株 MTB 菌株统计,rpoB 基因突变共 30 株,频率最高的突变位点为 S531L(63.33%,19/30);INH 耐药菌株中,katG 基因突变共 33 株,突变频率最高位点为 S315T1(96.97%,32/33);inhA 基因突变

变共39株,突变频率最高位点为C15T(87.18%,34/39)。见表3。

表3 Genotype MTBDRplus 检测基因突变频率

基因	n	野生型探针	突变型探针	菌株 (n)	百分比 (%)
rpoB	30	WT8	MUT3(S531L)	19	63.33
		WT8	—	2	6.67
		WT7	MUT2A(H526Y)	3	10.00
		WT7	—	1	3.33
		WT3 WT4	MUT1(D516V)	1	3.33
		WT3 WT4	—	2	6.67
katG	33	WT2	—	2	6.67
		WT	MUT1(S315T1)	32	96.97
		WT	—	1	3.03
		WT1	MUT1(C15T)	34	87.18
inhA	39	—	MUT1(C15T)	2	5.13
		WT2	MUT3A(T8C)	2	5.13
		WT2	MUT3B(T8A)	1	2.56

注:—表示无突变

### 3 讨 论

传统的MTB分离培养、药敏试验,耗时长,工作量大,在药敏检测进行期间患者很可能已经在耐药诊断不明确的情况下使用了不合适的化疗方案。Genotype MTBDRplus检测可以同时检测rpoB、katG和inhA 3种基因的突变情况,进而判断出RIF和INH的耐药情况,较传统药敏检测速度快,操作简便。

本研究结果显示,在479株分离菌株中,使用Genotype MTBDRplus检测鉴定MTB复合群的灵敏度和特异度分别为96.01%、81.48%,总符合率为95.20%,*Kappa*值为0.63,表明Genotype MTBDRplus检测可以比较好地区分MTB和非MTB。

使用Genotype MTBDRplus对434株MTB进行检测,对RIF和INH耐药性检测的特异度分别为99.51%、94.93%,灵敏度分别为96.55%、88.14%,符合率分别为99.31%、94.01%。Genotype MTBDRplus对RIF耐药性的检测性能与菅记涌等<sup>[3]</sup>及蒋云宇等<sup>[4]</sup>报道相符。而INH耐药情况比较复杂,以往报道显示,以比例法药敏试验为对照,Genotype MTBDRplus检测INH耐药情况的特异度为60.7%~97.54%,灵敏度为73.3%~89.56%<sup>[4-8]</sup>,本研究结果的特异度和灵敏度均在上述范围内。然而,国外报道显示,使用Genotype MTBDRplus方法对RIF和INH耐药性检测的灵敏度分别为大于或等于97%,以及大于或等于90%<sup>[9]</sup>,本研究及其他国内报道与之差异明显,可能是由于地区差异或者耐药菌株样本量大小所导致的差异。Genotype MTBDRplus检测RIF和INH耐药情况与比例法药敏实验结果相比,*Kappa*值分别为0.95和0.77,均大于0.75,说明使用Genotype MTBDRplus检测RIF和INH耐药情况与传统比例法药敏试验检测结果之间有较好的一致性,证明Genotype MTBDRplus检测能够很好地检

测MTB分离株对RIF和INH的耐药情况。

本研究中Genotype MTBDRplus检测RIF耐药性的灵敏度和特异度均高于INH耐药性,这与MTB耐RIF和耐INH两种药物的分子机制有一定的关系。有研究显示,MTB对RIF耐药主要与rpoB基因的突变有关,可解释约95%以上的RIF耐药突变<sup>[10]</sup>;而MTB对INH耐药主要与katG、inhA、kasA、ndh、ahpC5等多个基因突变或缺失等相关<sup>[11]</sup>,Genotype MTBDRplus只检测katG和inhA两个基因的情况,有报道显示这两个基因只能解释约80%以上的INH耐药株<sup>[12]</sup>,所以这也是导致Genotype MTBDRplus系统在检测INH耐药时特异度和灵敏度都较低的原因之一。

对katG和inhA基因突变频率进行分析后发现,同时具有katG和inhA突变的菌株仅1株。分析显示全部katG基因突变的菌株,在比例法药敏试验中均表现为INH耐药,而inhA突变则有48.72%显示为INH敏感。对耐药基因突变位点进行分析发现,rpoB基因突变以S531L突变为主(63.33%),与叶远馨等<sup>[13]</sup>报道的63.16%为S531L突变相符,高于菅记涌等<sup>[3]</sup>报道的55.21%为S531L突变。katG突变以S315T1为主(96.97%,32/33),占全部INH耐药的54.24%,这与已有报道也是相符的<sup>[3]</sup>。inhA突变以C15T(87.18%)突变为主,inhA突变菌株中有19株在比例法药敏试验中表现为敏感,20株表现为耐药,占全部INH耐药的33.90%。

以上研究结果提示,在INH耐药基因突变中,katG基因的突变较inhA基因突变有更高的概率导致菌株的耐药性改变。同时也提示,除实验过程中存在的判读误差外,一些菌株耐药性的基因改变要早于表型改变,或者某些基因突变是无义突变,并不会造成耐药表型的改变,这些推论有赖于进一步的分子和表型的研究,才能得出更准确的结论。有7株未检测到katG或inhA基因突变,但表型为耐药株,占耐INH菌株的11.86%(7/59),这7株中可能是其他耐INH相关基因突变所导致的耐药,这与文献<sup>[12]</sup>报道的低于20%的INH耐药株是由其他基因突变引起的结论相一致。

本研究中使用的479株分离菌株,18株经Genotype MTBDRplus检测鉴定为NTM,比例法药敏试验检测为MTB,原因可能是由于部分NTM会对PNB敏感<sup>[14]</sup>。而有5株经Genotype MTBDRplus检测鉴定为MTB,而比例法检测为NTM,这有可能是由于实验室污染等原因造成的,但需要进一步的测序和重复试验进行确认。

综上所述,Genotype MTBDRplus检测的RIF和INH耐药结果与传统的比例法药敏试验检测结果有较高的一致性,对于INH敏感或耐药的结果判断应结合其他诊断标准进行综合判断。鉴于Genotype

MTBDRplus 检测速度快,可同时进行 MTB 鉴定和 RIF、INH 耐药鉴定,可以为临床提供更为快速、有效的诊断依据,对传统比例法药敏试验进行了一定的补充。

## 参考文献

- [1] WU X, YANG Y, HAN Y, et al. Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Applied Microbiol*, 2008, 105(4): 1121-1127.
- [2] 张立兴,屠德华,端木宏谨,等.结核病诊断实验室检验规程 [M].北京:中国教育文化出版社,2006.
- [3] 詹记涌,王嫩寒,易俊莉,等. Genotype MTBDRplus 方法快速检测北京地区临床结核分枝杆菌分离株利福平和异烟肼耐药性效果评价 [J]. 中国防痨杂志, 2010, 61(10): 189-192.
- [4] 蒋云宇,张德坤,缪昌东. HAIN 技术快速检测耐药结核病及耐多药结核病效果评价 [J]. 江苏预防医学, 2017, 28(1): 103-104.
- [5] 欧维正,厉宁,蒙俊,等. Hain 和基因芯片技术在结核分枝杆菌异烟肼耐药性检测中的应用评价 [J]. 中国病原学微生物杂志, 2016, 11(12): 1062-1065.
- [6] 陈琛. Hain Test 法用于脊柱结核诊断的实验研究 [D]. 太原:山西医科大学, 2016.
- [7] 梁佳元,杨立军,刘敏,等, Hain 和 Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌药物灵敏度的检测 [J]. 中国热带医学, 2017, 17(3): 263-265.
- [8] 刘亚芹,杨振斌,冯冬霞. HAIN 用于检测原发性耐药结核的研究 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(8): 1266-1269.
- [9] FREDDIE B, SVEN H, MELLES H, et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis [J]. *BMC Infect Dis*, 2009, 9: 67-82.
- [10] PHAM M, LEMBERG D A, DAY A S. Probiotics: sorting the evidence from the Myths [J]. *Med J Aust*, 2008, 188(5): 304.
- [11] DOUSTDAR F, KHOSRAVI A D, FARNIA P, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iran [J]. *Microb Drug Resist*, 2008, 14(4): 273-279.
- [12] JIAO W W, MOKROUSOV I, SUN G Z, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China [J]. *Chin Med J*, 2007, 120(9): 814-819.
- [13] 叶远馨,陆小军,宋兴勃,等. Hain 法检测不同来源标本结核耐药性及突变位点分析 [C]//中华医学会. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议论文集: 2012 年卷. 北京:中华医学会, 2012: 195-198.
- [14] 于霞,尚媛媛,赵立平,等. 分子杂交法快速鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的初步评价 [J]. 检验医学, 2014, 29(10): 1037-1040.

(收稿日期:2017-07-23 修回日期:2017-09-29)

(上接第 391 页)

试验结果的判断和临床意义的分析。

综上所述,本文所建方法将 TRFIA 的灵敏性、磁分离技术的高反应效率相结合,在显著缩短反应时间的基础上,获得可靠的临床检验结果且重复性良好,如果有相关配套设施跟进即可形成全自动化操作,具有良好的推广意义。

## 参考文献

- [1] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [2] 焦艳华,梁媛媛,郭卫强. 基于磁性微球 HCG 化学发光免疫检测方法的研究 [J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2014, 13(5): 495-498.
- [3] 周敏,陆仁飞,杨曼. 磁分离酶联免疫法检测 SCC-Ag 的方法学研究 [J]. 南通大学学报(医学版), 2014, 34(2): 107-110.
- [4] 熊会玲,范彦,胡美,等. 血清 CA199 对良恶性胆道疾病的意义 [J]. 临床消化病杂志, 2013, 25(6): 327-329.
- [5] 刘太峰,赫红姣,张一帆. PET-CT 在消化道肿瘤术后 CEA、CA199 升高患者中的应用价值 [J]. 中国医学创新, 2012, 9(27): 70-71.
- [6] 李凤焕,王晓东,向鑫. 消化道恶性肿瘤血清 CA199 检测的临床意义 [J]. 中国医药导刊, 2013, 15(5): 876-878.
- [7] KELLY P J, ARCHBOLD P, PRICE J H, et al. Serum

CA199 levels are commonly elevated in primary ovarian mucinous tumours but cannot be used to predict the histological subtype [J]. *J Clin Pathol*, 2010, 63(2): 169-173.

- [8] WU H B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 369(2): 119-124.
- [9] ZHANG Q Y, WANG X, LI Z J, et al. Evaluation of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 631(2): 212-217.
- [10] 殷实,古宏晨,徐宏. 基于磁性纳米颗粒磁学信号的生物检测技术 [J]. 生物医学工程学杂志, 2013, 30(4): 879-883.
- [11] OSAKA T, MATSUNAGA T, NAKANISHI T, et al. Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays [J]. *Analytical Bioanal Chem*, 2006, 384(3): 593-600.
- [12] JIN S Q, YIN B C, YE B C. Multiplexed bead-based mesofluidic system for detection of food-borne pathogenic bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(21): 6647-6654.
- [13] KIM S M, CHAE M K, YIM M S, et al. Hybrid PET/ MR imaging of tumors using an oleanolic acid-conjugated nanoparticle [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33): 8114-8121.

(收稿日期:2017-07-25 修回日期:2017-09-27)

论著·基础研究

## 6种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究\*

房 华, 汪瑞忠, 张晓雪, 杨 柳

(上海健康医学院附属浦东新区人民医院检验科, 上海 201299)

**摘要:**目的 筛选抗菌活性较强并可逆转细菌耐药性的中草药,为治疗多重耐药菌感染提供新的思路。方法 以赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草、小檗碱等6种临床常用抗菌中草药为研究对象,煎煮法制备提取液后,采用2倍稀释法观察6种中草药对多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA)与多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)的抑菌效果;采用纸片扩散(K-B)法检测中草药对多重耐药菌及原始菌株的最低抑菌浓度,计算两者抑菌圈差值,评估中草药逆转多重耐药菌耐药性的效果。**结果** 6种中草药对MDR-AB与MDR-PA有不同程度的抑制作用,抑菌作用由强到弱依次为五倍子、鱼腥草、野菊花、赤芍、青黛、小檗碱,五倍子对MDR-AB与MDR-PA抑菌效价为512~1 024,抑菌作用最强;五倍子与小檗碱对MDR-AB与MDR-PA的敏感性在逆转前后的抑菌圈直径均值比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但逆转前后抑菌圈直径均值的差值小于3 mm。**结论** 赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草、小檗碱对MDR-AB与MDR-PA有不同程度抑制作用,五倍子抑菌作用最强;五倍子与小檗碱对MDR-AB与MDR-PA的耐药性有一定程度逆转作用。

**关键词:**中草药; 多重耐药菌; 抗菌活性; 耐药性; 逆转**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.004 **中图法分类号:**R932**文章编号:**1673-4130(2018)04-0396-04**文献标识码:**A

**Antimicrobial activity and drug-resistant reverse of 6 traditional Chinese medicines against multidrug resistant bacteria in vitro\***

FANG Hua, WANG Ruizhong, ZHANG Xiaoxue, YANG Liu

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Pudong New Area People's Hospital, Shanghai University of Medicine &amp; Health Sciences, Shanghai 201299, China)

**Abstract: Objective** To filter the traditional Chinese medicine with strong antibacterial activity and effects of reversing drug resistance of bacteria for providing new ideas for the treatment of multi-drug resistant bacteria infection. **Methods** Six kinds of antibacterial Chinese traditional medicines commonly used in clinic treatment as Radix Paeoniae Rubra, Indigo Naturalis, Galla Chinensis, Flos Chrysanthemi Indici, Herba Houttuyniae, and Berberine were used in this study. After preparation of the extract using decocting method, bacteriostatic effects of these six kinds of Chinese medicine on multiple resistant bacteria were detected by double dilution method. To evaluate the effects of Chinese medicines on reversing drug resistance of multi-drug resistant bacteria, minimum inhibitory concentrations for multi-drug resistant bacteria and the original strain were detected by K-B method and calculated the difference of the bacterial inhibition rings. **Results** The six kinds of traditional Chinese medicines had different degrees of inhibitory effects on MDR-AB and MDR-PA, and the bacteriostatic effect sequence were Galla Chinensis, Herba Houttuyniae, Flos Chrysanthemi Indici, Radix Paeoniae Rubra, Indigo Naturalis, and Berberine. The bacteriostatic titer of Galla Chinensis on MDR-AB and MDR-PA was 512~1 024, whose antibacterial activity was the strongest in the six antibacterial Chinese traditional medicines. Galla chinensis and Berberine had significant effects on reversing drug resistance of MDR-AB MDR-PA( $P<0.05$ ), but the difference value of inhibition zone diameters before and after reversing were less than 3 mm. **Conclusion** Radix Paeoniae Rubra, Indigo Naturalis, Galla Chinensis, Flos Chrysanthemi Indici, Herba Houttuyniae, and Berberine could inhibit MDR-AB and MDR-PA in different degrees, in which Galla

\* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会资助项目(201440066)。

作者简介:房华,男,副主任技师,主要从事微生物学研究。

本文引用格式:房华,汪瑞忠,张晓雪,等.6种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(4):396-399.

Chinensis was the most effective antibacterial Chinese Medicine. Ggalla chinensis and Berberine could reverse drug resistance of MDR-AB and MDR-PA to some extent.

**Key words:** traditional Chinese medicine; multi-drug resistant bacteria; antimicrobial activity; drug resistant; reverse

随着广谱抗菌药在临床的广泛使用,多重耐药菌不断出现,已成为临床感染治疗的难题。我国中医中草药治疗疾病已有千年历史,不少中草药具有抗菌、抑菌活性,可逆转细菌耐药性。为了研究中草药对多种耐药菌的抗菌及逆转耐药性作用,本研究选取文献[1-3]中报道的对鲍曼不动杆菌与铜绿假单胞菌抑菌作用较好的 6 种中草药,分别对多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA)与多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)进行了体外抑菌及逆转细菌耐药性试验,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验菌株** 2014 年 5 月至 2016 年 12 月临床分离鉴定菌株:MDR-AB 20 株,其中来自痰液标本 15 株,导管标本 3 株,血液标本 2 株;MDR-PA 20 株,痰液标本 11 株,伤口分泌物标本 4 株,尿液标本 3 株,血液标本 1 株,导管标本 1 株。多重耐药判断参照文献[4]的判断标准,标准菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

**1.2 中草药水煎剂** 赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草购自养和堂药房,小檗碱粉剂购自中国药品生物检定所,水解酪蛋白(M-H)肉汤培养基购自上海伊华公司,Oxid 药敏纸片购自北京普纳德科技有限公司。

**1.3 方法** 目前中草药抗菌实验和逆转细菌耐药性实验尚无统一的标准操作规范。中草药抗菌实验采用中草药实验试管法,逆转细菌耐药性实验采用纸片扩散(K-B)法,分别参照参考文献[5-6]进行。

**1.3.1 中草药原液的制备** 分别称取赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草、小檗碱粉剂 6 种中草药各 50 g,按 5 倍量加入蒸馏水浸泡,4 ℃冰箱内放置 24 h 后,加热 100 ℃ 30 min,过滤,将滤渣再加 5 倍水加热 100 ℃ 30 min。将两次滤液混合加热浓缩至 50 mL,生药含量为 1 g/mL;根据说明书将小檗碱配制成 1 g/mL;调节 pH 值为 7.6,离心后留取上清,进行高压灭菌,4 ℃冰箱保存备用。

**1.3.2 药液的倍比稀释** 取上述药液采用 2 倍稀释法稀释,即取 72 支无菌试管,每组 12 支编号,每管加 1 mL 肉汤;取上述中草药原液,先在第 1 管加 1 mL,混匀后加入第 2 管中,以此类推,到第 10 管吸出 1 mL 弃去,使 1~10 管含有倍比稀释的药液即 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1 024。

**1.3.3 加菌** 抽取 MDR-AB 与 MDR-PA 各 10 株,

MDR-AB 组:除对多黏菌素 B 敏感,其余药物均耐药;MDR-PA 组:对哌拉西林、头孢噻肟、环丙沙星、亚胺培南、庆大霉素均耐药。复苏后,从 18~24 h 35 ℃ 培养的血琼脂培养基上挑选几个菌落于生理盐水中,调配至 0.5 麦氏浓度( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL),稀释 30 倍,向 2 倍稀释的 1~11 支试管药液中加 100  $\mu$ L 菌悬液,最终接种量为  $5 \times 10^5$  CFU/mL,第 11 管为阳性对照管,第 12 管不加菌为阴性对照管。

**1.3.4 中草药抗菌实验结果判读** 35 ℃ 孵育 18~24 h 后观察,抑制检测菌肉眼可见生长的最低药物浓度为测定药物对检测菌的最低抑菌浓度,阳性对照组呈浑浊状,阴性对照管呈清晰状。为了排除中草药煎剂本身颜色对结果判读影响,读取最低抑菌浓度时应以第 12 管不加菌液的药液为对照,在光亮处判读,这样比对浓度变化,使结果更加准确。

**1.3.5 逆转细菌耐药性实验** 分别将 6 种中草药原液配制成低于最低抑菌浓度的药液,挑取 MDR-PA 与 MDR-AB 于各药液中,35 ℃ 培养 18~24 h 后,使用生理盐水离心洗涤配制成 0.5 麦氏浓度菌液,M-H 平板上用 K-B 法做药敏实验,同时做原菌株药敏实验作为阴性对照。比较逆转前后抑菌圈直径变化。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计分析,中草药抗菌效价取中位数,其他计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,比较方法采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 6 种中草药的抑菌作用** 除小檗碱外,其余 5 种中草药对 MDR-AB 与 MDR-PA 有不同程度的抑菌作用,抑菌作用由强到弱依次为五倍子、鱼腥草、野菊花、赤芍、青黛、小檗碱,见表 1。

表 1 6 种中草药对 2 种多重耐药菌作用对比

细菌	<i>n</i>	赤芍	青黛	五倍子	野菊花	鱼腥草	小檗碱
MDR-AB	10	8	2	512	8	16	2
MDR-PA	10	8	4	1 024	16	32	2

注:表内数字代表抗菌效价中位数,以能抑制试验细菌生长的最高稀释度为 MIC,如 8 表示将 100% 中草药提取原液稀释成 1:8 时,该菌的 MIC 为 8

**2.2 6 种中草药的逆转细菌耐药性作用** 五倍子与小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 的敏感性在逆转前后的抑菌圈直径均值比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。但逆转前后抑菌圈直径均值的差值小于 3 mm,6 种中草药材对 MDR-AB 与 MDR-PA 逆转细菌

耐药性不明显。见表2、3。

表2 6种中草药对10株MDR-AB逆转耐药性后药敏直径( $\bar{x} \pm s$ , mm)

抗菌药物	赤芍	青黛	五倍子*	野菊花	鱼腥草	小檗碱*	阴性对照
阿米卡星	6.3±0.48	6.1±0.32	9.0±0.67	7.1±0.57	6.7±0.48	8.0±0.67	6.8±0.63
庆大霉素	6.1±0.32	6.1±0.32	7.0±0.47	6.2±0.42	6.1±0.32	7.0±0.47	6.2±0.42
哌拉西林	6.1±0.32	6.2±0.42	7.1±0.47	6.1±0.32	6.1±0.32	6.1±0.32	6.2±0.42
头孢噻肟	6.1±0.32	6.1±0.32	8.3±0.48	6.1±0.32	6.0±0.00	8.3±0.48	6.1±0.32
头孢吡肟	7.2±0.42	7.2±0.42	10.1±0.57	7.6±0.52	7.2±0.42	9.2±0.42	7.7±0.48
环丙沙星	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00
亚胺培南	6.3±0.48	6.2±0.42	7.2±0.42	6.1±0.32	6.1±0.32	8.1±0.32	6.2±0.42
多黏菌素B	14.4±0.70	14.3±0.67	15.0±0.67	15.1±0.57	14.3±0.48	16.8±1.12	15.0±0.67

注:与阴性对照比较,\*  $P < 0.05$

表3 6种中草药对10株MDR-PA逆转耐药性后药敏直径( $\bar{x} \pm s$ , mm)

抗菌药物	赤芍	青黛	五倍子*	野菊花	鱼腥草	小檗碱*	阴性对照
阿米卡星	14.4±1.71	14.4±0.97	16.4±1.07	15.2±0.92	15.1±0.58	15.1±0.99	15.1±0.87
庆大霉素	8.1±0.57	8.3±0.67	9.1±0.99	8.1±0.57	8.2±0.79	10.1±0.99	7.9±0.57
哌拉西林	9.3±2.26	9.4±1.90	10.8±1.87	9.3±1.89	9.3±1.89	11.1±2.18	9.3±2.00
头孢噻肟	11.2±2.35	11.3±1.34	12.8±1.75	11.3±2.11	11.3±1.95	13.2±1.69	11.1±1.85
头孢吡肟	18.3±1.70	18.2±1.69	21.2±2.20	19.3±1.42	18.4±1.90	19.8±1.69	19.3±1.70
环丙沙星	6.0±0.00	6.1±0.32	6.4±0.52	6.1±0.32	6.2±0.42	6.3±0.48	6.2±0.42
亚胺培南	6.1±0.32	6.1±0.32	8.1±0.88	6.1±0.32	6.1±0.32	8.3±0.48	6.2±0.42
多黏菌素B	21.4±2.27	21.4±2.07	21.9±1.91	21.9±2.02	21.3±1.70	21.8±1.77	21.8±2.04

注:与阴性对照比较,\*  $P < 0.05$

### 3 讨 论

自抗菌药物在临床应用以来,其在治疗病原菌感染方面起到极其重要的作用,成为二十世纪微生物学对人类的最大贡献之一。但随着抗菌药物的不合理使用,耐药菌已经大量产生,多重耐药菌不断增加,甚至出现泛耐药菌株<sup>[7]</sup>,单一抗菌药物治疗往往以失败而告终,尤其是泛耐药铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌需要亚胺培南与多黏菌素联合治疗<sup>[8-9]</sup>。新药的研发速度远跟不上细菌耐药的速度,加之很多抗菌药物有很多不良反应,给临床抗感染治疗带来极大困难。

中草药抗菌作用有着悠久的历史,近年来的研究已经表明,中草药的确有抗菌、延缓、消除细菌耐药性的作用<sup>[10-12]</sup>。中草药的抗菌机制可以分为两类,一类是通过各种途径直接对细菌进行抑制;第二类是通过提高人体的免疫力来抗菌。目前对中草药提高人体免疫力抗菌的这种间接方式研究较少,专注于中草药直接抗菌作用的研究较多,也取得了许多成果。一种抗菌、抑菌的中草药材中可能含有多种抑菌、抗菌的活性成分,有多种抑菌、抗菌的作用靶点,细菌不易对这样的单一中草药材产生抗药性突变<sup>[13]</sup>。某些中草药的抑菌成分,可通过多种抑菌、抗菌途径起作用,也

具有多种作用靶点,如金建玲等<sup>[10]</sup>发现小檗碱能与细菌核酸结合,而产生抑制细菌DNA复制、RNA转录、蛋白质翻译等作用,且其他研究还发现其能与细菌蛋白质结合,并因此干扰多种酶的活性<sup>[14]</sup>,还能增加细菌细胞膜的通透性<sup>[15]</sup>。近几年,中草药逆转耐药性的机制作为中草药抗菌研究的一个新的领域悄然兴起,近年来得到的一些成果也给医疗工作者带来了巨大的想象空间,中草药可否改变即将面临无药可用的尴尬局面呢?本文就中草药对MDR-AB、MDR-PA抑菌与逆转细菌耐药性作用进行了探索研究。

铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌为条件致病菌,是医院内感染的两种主要病原菌<sup>[16-17]</sup>,在抗菌药物广泛使用情况下容易出现多重耐药菌株。常见抗菌药物不能用于临床治疗的情况下,如何选择一些具有抗菌作用的中草药成为一种潜在的可行性途径。本研究的抑菌实验中,用2倍稀释法检测中草药单体对MDR-AB与MDR-PA的抑菌作用,6种中草药对MDR-AB与MDR-PA均有不同程度的抑菌作用,五倍子对MDR-AB与MDR-PA抑菌效价为512~1 024,抑菌作用最强,抑菌作用由强到弱依次为五倍子、鱼腥草、野菊花、赤芍、青黛、小檗碱。中草药煎

提取物成分复杂,使用剂量也比较大<sup>[18]</sup>,单一中草药口服后血药浓度可能达不到体外试验时最小抑菌浓度。临床常用复方中草药制剂或中西药联合方式治疗感染性疾病<sup>[19-20]</sup>。但随着科学技术的进步,中草药抗菌活性成分的研究将越来越充分,中草药抗菌活性组分纯化技术的提高,以及对中草抗菌药活性成分的抗菌效价的提高,必将使中草药在抗菌治疗方面得到长足发展。本次实验结果也表明中草药可以作为后抗菌药物时代一个新的选择,随着祖国医药日新月异的发展,中医药将在抗多重耐药感染领域发挥重要作用。

中草药能够逆转细菌耐药性的效果是明确的<sup>[21]</sup>,如果能够使 MDR-AB 与 MDR-PA 部分或全部恢复对抗菌药物的敏感性,则对临床治疗多重耐药菌感染具有重要意义。本实验通过中草药与多重耐药菌孵育 35℃ 24 h,观察孵育前后 K-B 法检测的抑菌圈直径变化,结果显示五倍子与小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 的敏感性在逆转前后的抑菌圈直径均值比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。但逆转前后抑菌圈直径均值的差值小于 3 mm,6 种中草药对 MDR-AB 与 MDR-PA 的耐药性逆转不明显。该结果与王洁等<sup>[22]</sup>研究结论相似,说明细菌耐药性逆转率低。但无论中草药抑菌与逆转细菌耐药性的体外试验结果怎样,在体内及血清药理等方面值得进一步探讨。

综上所述,中草药研究已经成为人们关注的热点,其现代化也已列入国家中长期发展规划。中草药成为缓解和控制细菌耐药性难题的一条可行性途径,在治疗多重耐药菌或泛耐药菌感染方面应该得到发展<sup>[23]</sup>,这方面的研究应该得到关注,力争发扬祖国医学,提升中草药在国际上的竞争力。

## 参考文献

- [1] 段欣冉,姜志辉,杨相海,等.中药抑制鲍曼不动杆菌研究进展[J].中国感染控制杂志,2017,16(6):577-581.
- [2] 宓伟,曲巍.对抗绿脓杆菌的中药筛选及联合应用的研究[J].滨州医学院学报,2012,35(5):359-361.
- [3] 何先元,李坤,喻录容,等.53 味清热类中药对绿脓杆菌抑菌作用的聚类分析[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(20):222-225.
- [4] 李春辉. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准定义—国际专家建议[J].中国感染控制杂志,2014,13(1):62-64.
- [5] 李建志,刘文丽,王亚贤.9 种中草药抗菌作用实验研究[J].中医药学报,2012,40(1):45-46.
- [6] 芦亚君,程宁.3 种中药方剂逆转大肠杆菌耐药性的实验观察[J].西北药学杂志,2007,22(6):309-311.
- [7] 张小江,张辉,窦红涛,等.2012 年北京协和医院细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(2):104-111.
- [8] 杨海慧,韩立中,刘怡菁,等.亚胺培南联合多黏菌素 B 对不同表型铜绿假单胞菌体外抗菌活性的研究[J].检验医学,2013,28(1):1-6.
- [9] 刘立凡,陈佰义.多黏菌素 B 与亚胺培南联用对泛耐药鲍曼不动杆菌体外抗菌活性的研究[J].中国医疗前沿,2013,8(2):4-5.
- [10] 金建玲,徐舸,高培基.中西药联合使用在应对细菌抗药性方面的优势[J].中医药学报,2011,39(4):95-98.
- [11] ZHANG G B, GONG S Y, YU D H, et al. Propolis and herba epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, *myoxo-cyprinus asiaticus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3):467-472.
- [12] 贾云鹏,程宁.中药对大肠埃希菌抗菌药物耐药性逆转作用的实验研究[J].陕西中医,2009,30(3):366-368.
- [13] 陈美玲,王剑,周红霞,等.中药饮片对多重抗菌药物耐药细菌的抑菌作用[J].中医药学报,2012,40(2):10-13.
- [14] 蔡燕,邢艳,谢文光.中药抗菌作用研究进展[J].中国医药导报,2011,8(6):9-10.
- [15] KAPP E, WHITELEY C. Protein ligand interactions: iso-quinoline alkaloids as inhibitors for lactate and malate dehydrogenase[J]. J Enzyme Inhib, 1991, 4(3):233-243.
- [16] 袁莉莉,丁百兴,沈震,等.碳青霉烯类抗菌药物耐药铜绿假单胞菌感染的临床研究[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(2):121-126.
- [17] 张岩岩,朱婉,张静萍,等.多重耐药鲍曼不动杆菌血流感染危险因素分析[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(2):135-139.
- [18] GEORGE T, FRANK R. Mutidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials[J]. Antimicrob Agent Chemother, 2002, 46(10):3133.
- [19] 崔煦然,赵京霞,郭玉红,等.细菌耐药背景下中药抗菌作用研究进展[J].世界中医药,2016,11(10):1940-1944.
- [20] 李玉洋.中西医结合治疗慢性盆腔炎的疗效观察[J].中国医药指南,2017,15(3):174.
- [21] 潘杰,苗霞,刘启波,等.12 种中药配方颗粒体外逆转临床常见细菌耐药性分析[J].检验医学,2016,36(6):503-508.
- [22] 王洁,朱俊豪,张斌,等.能逆转细菌耐药性的中药的筛选[J].中国药学杂志,2014,49(21):1892-1896.
- [23] 李娟,李晓东,杨丽霞,等.单味中药体外抑菌活性的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):283-286.

(收稿日期:2017-07-24 修回日期:2017-09-30)

## 论著·临床研究

# 直肠癌新辅助放化疗前后血清癌胚抗原与糖类抗原 724 的变化及临床意义\*

杨平,魏建昌,张通,陈华翠,曾山崎,曹杰<sup>△</sup>

(广州医科大学附属广州市第一人民医院胃肠外科,广州 510180)

**摘要:**目的 探讨直肠癌患者新辅助放化疗前后血清癌胚抗原(CEA)及糖类抗原 724(CA724)水平的变化及临床意义。方法 应用电化学发光法检测 30 例直肠癌患者(研究组)新辅助放化疗前后血清 CEA 与 CA724 的水平,并与 30 例健康人(对照组)作比较。结果 研究组新辅助放化疗前血清 CEA、CA724 水平明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。新辅助放化疗 8 周后,完全缓解组及部分缓解组化疗后 CEA、CA724 水平均较化疗前明显减低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),降低程度明显高于稳定组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );稳定组化疗后 CEA、CA724 较化疗前降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );进展组化疗后 CEA、CA724 水平均较化疗前升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );化疗前 CEA、CA724 水平呈正相关关系( $r = 0.862, P = 0.000$ )。结论 直肠癌患者血清中 CEA、CA724 均高表达,两者与直肠癌的发生、发展密切相关,测定直肠癌患者新辅助放化疗前后血清 CEA、CA724 水平的变化有助于临床判断新辅助放化疗疗效及肿瘤进程。

**关键词:**直肠癌; 新辅助放化疗; 癌胚抗原; 糖类抗原 724

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.005

**中图法分类号:**R446.62/R735.3+7

**文章编号:**1673-4130(2018)04-0400-04

**文献标识码:**A

## The change and clinical significance of the serum levels of CEA and CA724 in patients with rectal cancer before and after neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy\*

YANG Ping,WEI Jianchang,ZHANG Tong,CHEN Huacui,ZENG Shansi,CAO Jie<sup>△</sup>  
(Department of Gastrointestinal Surgery,Guangzhou First People's Hospital,Guangzhou  
Medical University,Guangzhou,Guangdong 510180,China)

**Abstract: Objective** To explore the change and clinical significance of the serum carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 724(CA724) in patients with rectal cancer before and after neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy. **Methods** The serum levels of CEA and CA724 of 30 patients with rectal carcinoma were detected by electrochemiluminescence method and were compared with those in 30 healthy people. **Results** The serum levels of CEA and CA724 in rectal carcinoma patients before neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy were significantly higher than those in the healthy people, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The serum levels in complete remission and partial remission patients after eight-week neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy were significantly lower than those before treatment, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ), and the reduction levels were obviously higher than those in the stable group, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The CEA and CA724 levels in the stable treatment patients were also lower than those of before neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The serum levels in the progression group were higher than those of before treatment( $P < 0.05$ ). The serum levels of CEA and CA724 before neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy existed a positive correlation( $r = 0.862, P = 0.000$ ). **Conclusion** The serum levels of CEA and CA724 in rectal cancer are highly expressed, suggesting that both of them are closely related to the occurrence and development of rectal carcinoma, the measurement of the serum level changes of CEA and CA724 in patients with rectal cancer before and after treatment contributes to estimate the efficacy of neoadjuvant radio-

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272556);广东省科技计划项目(2014A020212614);广州市科技计划项目(2014Y2-00137)。

作者简介:杨平,男,副主任医师,主要从事结直肠癌临床与基础研究。 △ 通信作者,E-mail:northpark@163.com。

本文引用格式:杨平,魏建昌,张通,等.直肠癌新辅助放化疗前后血清癌胚抗原与糖类抗原 724 的变化及临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(4):400-402.

therapy and chemotherapy and tumor progression.

**Key words:** rectal cancer; neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy; carcinoembryonic antigen; carbohydrate antigen 724

相关报道,中国结直肠癌的发病率居所有恶性肿瘤中的第四位,且与欧美发达国家相反,呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。结直肠癌中直肠癌所占比例超过50%,尤以中低位直肠癌多见,对于直肠癌的治疗目前仍采用以手术切除为主的综合治疗<sup>[3-4]</sup>。近年来,术前新辅助放化疗被越来越广泛地应用于中低位直肠癌的辅助治疗中,并被写入《中国结直肠癌诊疗规范(2015 版)》<sup>[5]</sup>。对新辅助放化疗进行及时有效的疗效评价对于调整治疗方案及判断预后至关重要,传统的影像学检查,如超声内镜、CT 或 MRI 等能从形态学评估疗效,准确率高,但费用昂贵,无法频繁应用,选择合适的血液肿瘤标志物对消化道恶性肿瘤进行动态监测具有重要意义。本研究选择血清癌胚抗原(CEA)及糖类抗原 724(CA724)作为研究指标,探讨上述指标在直肠癌新辅助放化疗前后的变化及其与新辅助放化疗疗效的相关性,为直肠癌新辅助放化疗的疗效评估提供临床依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 1 月至 2016 年 12 月收治于广州市第一人民医院胃肠外科进行新辅助放化疗的中低位直肠癌患者 30 例纳入研究组,其中男 18 例,女 12 例,年龄 35~73 岁,平均(56.23±14.86)岁;ⅢB 期 21 例,ⅢC 期 9 例。新辅助放化疗患者(研究组)纳入标准:(1)所有患者放化疗前均经过结肠镜活检、病理活检证实为直肠癌;(2)术前分期为Ⅲ期,分期根据 2010 年美国癌症联合委员会(AJCC)结直肠癌 pTNM 分期系统进行<sup>[6]</sup>,临床分期主要依据:肠镜、超声肠镜及腹部增强 CT 或 MRI 扫描检查;(3)所有患者的入选均经过由胃肠外科、肿瘤科、病理科及影像科参加的多学科讨论研究,确认可选性、临床分期及治疗策略,新辅助治疗的目的、方案、不良反应及风险均告知患者及其家属,患者接受新辅助放化疗并签署知情同意书;(4)治疗前患者卡氏功能状态评分(KPS)>60 分,预计生存期在 3 个月以上,无过敏体质,化疗前心、肝、肾功能及血常规正常,近 1 个月内未进行其他的抗肿瘤治疗;(5)均为中低位直肠癌初治患者。对照组 30 例,为本院体检中心健康体检合格的健康人,其中男 16 例,女 14 例,年龄 31~52 岁。2 组研究对象均排除心、脑、肝、肾、内分泌腺等重要脏器疾病,肝肾功能检查正常。本研究经医院伦理委员会讨论同意进行。

## 1.2 方法

**1.2.1 新辅助放化疗方案** 在取得患者知情同意的情况下接受 XELOX 方案化疗,即奥沙利铂 130 mg/m<sup>2</sup>,1 次服用,仅用 1 d;卡培他滨(希罗达)850~1 000

mg/m<sup>2</sup>,每天 2 次,持续 14 d;每 3 周重复,共 3~4 个疗程。预防性使用减轻化疗不良反应的药物,如中枢性止吐药、护肝药、增强机体免疫力药物。化疗后定期复查血常规、肝功能、肾功能等生化常规检查,排除肝肾功能损伤、骨髓抑制等严重化疗不良反应。盆腔放疗剂量 45~50 Gy/23~25 次,放射野包括肿瘤或者瘤床及 2~5 cm 的安全边缘、骶前淋巴结、髂内淋巴结。T4 肿瘤侵犯前方结构时需照射髂外淋巴结,肿瘤侵犯远端肛管时需照射腹股沟淋巴结。

**1.2.2 标本检测** 研究组患者分别于化疗前和化疗 3 个疗程(9 周)后清晨采集空腹静脉血 5 mL,对照组仅采集 1 次空腹静脉血,按说明书操作流程采用电化学发光法测定血清 CEA、CA724 水平。临床参考值按说明书设定 CA724≤6.9 U/mL,CEA<5 ng/mL。

**1.2.3 评定标准** 化疗前后均检查血常规及肝肾功能。根据世界卫生组织(WHO)关于实体肿瘤化疗标准评价疗效,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(NC)、进展(PD)。临床有效组为 CR+PR 患者,临床无效组为 NC+PD 患者。新辅助放化疗前后均由两位具有丰富临床经验、副主任以上的肿瘤医师评估肿瘤进程。

**1.3 统计学处理** 采用统计学软件 SPSS16.0 进行数据处理及统计学分析,呈正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,多组间中的 2 组比较采用 *q* 检验及等级相关分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 研究组化疗前与对照组血清 CEA、CA724 水平比较** 研究组化疗前血清 CEA、CA724 水平明显高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 研究组化疗前与对照组血清 CEA、CA724

水平比较( $\bar{x}\pm s$ )			
组别	<i>n</i>	CEA(μg/mL)	CA724(U/mL)
研究组(化疗前)	30	9.71±1.17*	9.89±1.30*
对照组	30	2.18±0.35	4.71±0.52

注:与对照组比较,\* *P*<0.05

**2.2 研究组新辅助疗效与放化疗前后血清 CEA、CA724 水平的关系** 研究组中各疗效组化疗前 CEA、CA724 水平比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。CR+PR 组化疗后 CEA、CA724 水平较化疗前明显减低,差异有统计学意义(*P*<0.05),降低程度明显高于 NC 组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。NC 组化疗后 CEA、CA724 较化疗前降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。PD 组化疗后 CEA、CA724 水平均

较化疗前升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 研究组新辅助疗效与放化疗前后血清CEA、CA724水平的关系( $\bar{x} \pm s$ )

疗效组别	n	CEA(μg/L)		CA724(U/L)	
		化疗前	化疗后	化疗前	化疗后
CR+PR组	21	9.87±0.82	5.41±0.89*	9.84±0.95	6.23±1.07*
NC组	7	9.05±1.04	7.14±1.28*	10.05±1.42	8.77±1.40*
PD组	2	10.35±3.21	14.86±5.17*	9.90±3.56	17.32±7.26*

注:与化疗前比较,\*  $P < 0.05$

**2.3 CEA与CA724水平之间的关系** 化疗前CEA与CA724之间呈显著正相关( $r=0.862, P=0.000$ )。化疗后两者之间无显著相关( $r=0.067, P=0.734$ )。

### 3 讨 论

近几年来,随着人民生活水平的提高和饮食习惯的改变,结直肠癌的发病率呈上升趋势。据2013年肿瘤登记年报报道,我国结直肠癌发病率已跃居恶性肿瘤发病率的第4位,病死率居第5位<sup>[7-8]</sup>,且中低位直肠癌所占比例高达50%以上。目前直肠癌治疗的主要方法是外科手术治疗,随着综合治疗理念的提出和强化,规范化治疗的推广,术前新辅助放化疗联合根治性手术已成为了中低位直肠癌的标准治疗模式<sup>[9-10]</sup>。

新辅助放化疗在临床开展已有相当长的一段时间,20%左右的患者能获得病理完全缓解(pCR),预后较好<sup>[11]</sup>。但新辅助放化疗也存在潜在的风险,目前尚不能在化疗前有效地预测化疗药物的敏感性,部分对化疗不敏感的患者,化疗可能不但无法使肿瘤缩小降期,相反还可能导致肿瘤患者病情进展,延误最佳手术时机。因此在直肠癌新辅助化疗过程中需严密监测肿瘤变化,选择最合适的时机终止化疗进行手术治疗,目前临幊上可供判定新辅助放化疗效果的指标不多,常用的指标包括:临床体征、血液生化指标和影像学指标<sup>[12]</sup>。临床体征检查主要通过直肠指检检查肿瘤大小、活动度等,主观性较强;影像学检查如超声内镜、CT或MRI等预测的准确率为30%~60%<sup>[13]</sup>,但受限于费用高,导致无法频繁使用。因此,探讨血液肿瘤标志物对于直肠癌新辅助放化疗后的疗效评价正成为目前研究的热点。

CEA是一种酸性糖蛋白,属于肿瘤相关抗原,作为一种经典的肿瘤标志物,其在大多数肿瘤疾病,尤其是结直肠癌、乳腺癌和肺癌中明显升高,在肿瘤患者中CEA可能参与了肿瘤细胞对机体免疫清除的逃避<sup>[14]</sup>。CA724为一种糖类抗原,已知在消化道肿瘤患者血清中可特异性升高,85%~95%存在于胃、结直肠及卵巢肿瘤中,对原发性结直肠癌的提示具有较高临床价值,可作为直肠癌疗效判断,以及病情发展监测和预后估计的依据<sup>[15]</sup>。

本研究结果显示,直肠癌患者新辅助放化疗前血清中CEA、CA724的水平明显高于健康人,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。尽管新辅助放化疗血清中CEA、CA724的水平较化疗前有所降低,但仍明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明CEA、CA724作为肿瘤标志物,在早期诊断结直肠癌的过程中起到提示作用。本研究显示,CR+PR组化疗后CEA、CA724水平均较化疗前明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),降低程度均明显高于NC组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。NC组化疗后CEA、CA724较化疗前降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明化疗药物可有效地抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡,从而使其表达CEA、CA724能力下降,也可使肿瘤的发展受到一定的抑制,达到一定的抑瘤效果<sup>[16]</sup>。反之,若化疗药物未能起有效作用,则血清中CEA、CA724不会降低,这从PD组可以得出相应的结果。本研究结果还发现,化疗前CEA、CA724水平均高表达,且二者呈正相关( $P < 0.05$ ),化疗后CR+PR组CEA、CA724水平下降程度明显高于NC组,故可以推测,在临幊中检查CEA、CA724水平有助于判断和评价直肠癌患者新辅助放化疗效果及预后情况。

综上所述,CEA、CA724是判断新辅助放化疗治疗疗效的有效生物学指标,检查直肠癌患者血清中CEA、CA724的表达量有助于判断临床肿瘤进程,新辅助放化疗前后CEA、CA724水平的变化能够反映化疗近期疗效。

### 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [2] 陈万青.从肿瘤登记数据看中国恶性肿瘤的发病特点和趋势[J].中华健康管理学杂志, 2016, 10(4): 249-252.
- [3] SAO JULIAO G P, HABR-GAMA A, VAILATI B B, et al. New strategies in rectal cancer[J]. Surg Clin North Am, 2017, 97(3): 587-604.
- [4] 王磊, 刘志华, 汪建平, 等. 我国结直肠癌的诊疗现状[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(4): 677-679.
- [5] 国家卫生和计划生育委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2015版)[J]. 中华胃肠外科杂志, 2015, 18(10): 961-973.
- [6] CHEN V W, HSIEH M C, CHARLTON M E, et al. Analysis of stage and clinical/prognostic factors for colon and rectal cancer from SEER registries: AJCC and collaborative stage data collection system[J]. Cancer, 2014, 120(Suppl23): S3793-3806.
- [7] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.
- [8] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al (下转第407页)

- 志物检测与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(12): 1680-1682.
- [6] CHAO C T, CHIANG C K, HUANG J W, et al. Vitamin D is closely linked to the clinical courses of herpes zoster: From pathogenesis to complications[J]. Med Hypotheses, 2015, 85(4): 452-457.
- [7] WEI S T, SUN Y H, ZONG S H, et al. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha may correlate with activity and severity of rheumatoid arthritis[J]. Med Sci Monit, 2015, 90(21): 4030-4038.
- [8] PREVOO M L, VAN 'T HOF M A, KUPER H H, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1): 44-48.
- [9] BENNETT M. The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs[J]. Pain, 2001, 92(1/2): 147-157.
- [10] YESIL H, SUNGUR U, AKDENIZ S, et al. Association between serum vitamin D levels and neuropathic pain in rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional study[J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20(11): 1201-1203.
- [11] SPANOS K, LACHANAS V A, CHAN P, et al. Validation of the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs(LANSS) questionnaire and its correlation with visual analog pain scales in Greek population[J]. J Diabetes Complications, 2015, 29(8): 1142-1145.
- [12] HOLICK M F, CHEN T C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(4): 1080-1086.
- [13] VAN SCHOOR N, LIPS P. Global overview of Vitamin D status[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2017, 46(4): 631-646.
- [14] 何忠斌, 朱海波. 类风湿性关节炎血清 25-羟维生素 D 水平变化及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(15): 2224-2225.
- [15] HARMS L R, BURNE T H, EYLES D W, et al. Vitamin D and the brain[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011, 25(4): 657-669.
- [16] LEE P, CHEN R. Vitamin D as an analgesic for patients with type 2 diabetes and neuropathic pain[J]. Arch Intern Med, 2008, 168(7): 771-772.
- [17] SHEHAB D, AL-JARALLAH K, ABDELLA N, et al. Prospective evaluation of the effect of short-term oral vitamin d supplementation on peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus[J]. Med Princ Pract, 2015, 24(3): 250-256.
- [18] ANGELOTTI F, PARMA A, CAFARO G, et al. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2017, 35(3): 368-378.
- [19] FOSTER W, CARRUTHERS D, LIP G Y, et al. Inflammatory cytokines, endothelial markers and adhesion molecules in rheumatoid arthritis: effect of intensive anti-inflammatory treatment[J]. J Thromb Thrombolysis, 2010, 29(4): 437-442.
- [20] MILLER R E, MILLER R J, MALFAIT A M. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection[J]. Cytokine, 2014, 70(2): 185-193.
- [21] SAMAD T A, MOORE K A, SAPIRSTEIN A, et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity[J]. Nature, 2001, 410(6827): 471-475.

(收稿日期: 2017-08-20 修回日期: 2017-10-26)

(上接第 402 页)

- al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [9] DENG Y, CHI P, LAN P, et al. Modified FOLFOX6 with or without radiation versus fluorouracil and leucovorin with radiation in neoadjuvant treatment of locally advanced rectal cancer: initial results of the Chinese FOWARC multicenter, Open-Label, randomized Three-Arm phase III trial[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(27): 3300-3307.
- [10] ZHAO L, LIU R, ZHANG Z, et al. Oxaliplatin/fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Colorectal Dis, 2016, 18(8): 763-772.
- [11] RYAN J E, WARRIOR S K, LYNCH A C, et al. Predicting pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: a systematic review[J]. Colorectal Dis, 2016, 18(3): 234-246.

- [12] 连文, 陈转鹏, 杨平, 等. 直肠癌新辅助化疗前后血清 VEGF 与 VEGFR-2 的变化及临床意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(3): 235-237.
- [13] 章真. 直肠癌新辅助放化疗研究问题探讨[J/CD]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2014, 3(3): 10-14.
- [14] YU H, LUO Y, WANG X, et al. Time to lowest postoperative carcinoembryonic antigen level is predictive on survival outcome in rectal cancer[J]. Sci Rep, 2016, 33(6): 34131.
- [15] ZHU Z, CHEN Z, CHEN C, et al. Opposite variation tendencies of serum CA724 levels in patients with colon and rectal carcinoma[J]. J Cancer Res, 2014, 2(1): 139-145.
- [16] 李国文, 曾山崎, 王成兴, 等. 糖类抗原 724、癌胚抗原在结直肠术后患者血清中的表达及相关性研究[J]. 岭南现代临床外科, 2014, 20(2): 143-146.

(收稿日期: 2017-08-13 修回日期: 2017-10-19)