

癌诊断中效果优于单纯行纤维支气管镜刷检物检查。

表 1 各方法肺癌检出阳性率比较				
方法	<i>n</i>	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	阳性率(%)
刷检物	116	99	17	85.3△*
灌洗液	116	78	38	67.2
痰标本	116	30	86	25.9
刷检物结合灌洗液	116	105	11	90.5
三种方法结合	116	109	7	94.0**

△: $P<0.05$,与灌洗液组及痰标本组比较;*: $P>0.05$,与刷检物结合灌洗液组比较;**: $P<0.05$,与刷检物组比较。

3 讨 论

刷检物细胞学检查对诊断肺癌的特异性及敏感性均高^[3],特别在无任何临床症状,仅在体检拍摄胸片时,发现肺癌病变,在纤维支气管镜下未见到肿物,无法获得病理组织时,细胞学刷片检查显得尤为重要^[4]。灌洗液获取的细胞数量相对少,黏液多,制作过程中细胞损失较多,所以诊断率要低很多^[5]。痰细胞学检查属于无损伤性检查,患者容易接受,是肺癌诊断中最便捷、最经济的诊断方法,但痰细胞学检查的阳性率及敏感性受肿瘤分期、分型及送检次数诸多因素影响^[6],所以阳性检出率较低。

灌洗液可直接获得采样区远端病变组织脱落标本及分泌物的优点,而能大面积冲洗及收集肿瘤的脱落细胞,因此,刷检物结合灌洗液比单独做刷检物对肺癌检出阳性率提高了5.2%。本资料 116 例肺癌患者中,有 6 例通过灌洗液检出,刷检后残留的有价值成分通过灌洗保留下来,与刷检起到互补的作用^[7]。所以,为了在纤维支气管镜中更大可能做出诊断,刷检物结合灌洗液检查是很有必要的,临床普遍采用。痰是呼吸道黏膜的分泌物,主要成分是黏液和细胞^[8]。痰细胞学检查可以作为纤维支气管镜检查阴性和不能耐受纤维支气管镜等创

• 经验交流 •

伤性检查的肺癌患者的重要检查手段^[6]。鳞癌与小细胞未分化癌细胞较易随痰咳出,在痰中检出此类癌细胞的敏感性较高。本组资料显示,三种标本结合检查与刷检物结合灌洗液相比,阳性率又提高了 3.5%,所以三种标本结合检查对肺癌检出阳性率最高。细胞学检查在肺癌诊断中是一种简单有效、高效实用的检测手段,联合检测,可大大提高原发性肺癌的诊断阳性率^[9]。刷检物、灌洗液、痰细胞学简便、快捷、经济、实用,被临床广泛用于肺癌的筛查和确诊。

参考文献

[1] 谭海涛,陈必桂,杨亦尤.纤维支气管镜在肺癌诊断中的应用[J].中国临床实用医学,2009,3(3):44-46.
[2] 蒋述科.X 线检查胸部阴影与纤维支气管镜检查 132 例对比分析[J].中国实用内科杂志,1997,17(5):290.
[3] 丁莉利,牛海燕,王明华,等.纤维支气管镜刷检细胞学检查诊断肺癌的价值及影响因素分析[J].山东医药,2010,50(3):60-61.
[4] 王其生.临床肿瘤细胞学检查[M].合肥:安徽科技出版社,2005:51-71.
[5] 于晓棠,李连宏,孙雷,等.纤维支气管镜检查中刷检及灌洗液对肺癌诊断的价值[J].大连医科大学学报,2009,31(5):576-579.
[6] 郭会芹,张智慧,曹箭,等.痰和纤维支气管镜刷片细胞学检查在肺癌诊断中的意义[J].实用癌症杂志,2009,24(1):57-59.
[7] 刘舒萍,李风刚.三术合用提高肺癌诊断价值[J].国际检验医学杂志,2010,31(6):607-608.
[8] 曾怀跃,董孝平,魏炳华,等.痰细胞学检查标本不同处理方法对分类计数结果的影响[J].国际检验医学杂志,2010,31(12):1468-1469.
[9] 梁娟英,牟敏红.细胞学检查在原发性肺癌诊断中的价值[J].检验医学与临床,2010,7(16):1731-1732.

(收稿日期:2011-12-20)

利用 Gap-PCR 技术鉴定 1 例罕见的巴氏水肿胎儿

李友琼¹,周莹¹,覃桂芳¹,罗焰芳¹,方颖迪²

(1.广西壮族自治区人民医院检验科,南宁 530021;2.广东省深圳市益生堂生物企业有限公司 518033)

摘要:目的 运用 Gap-PCR 技术对罕见的缺失型珠蛋白生成障碍性贫血进行基因分析鉴定。方法 用 XE-2100 血细胞分析仪对一对夫妻的静脉血标本进行检测,并用毛细管电泳分析仪 Capillarys2 对夫妻的静脉血和胎儿脐带血进行分析。最后用珠蛋白生成障碍性贫血商品试剂盒和实验室配置的试剂进行珠蛋白生成障碍性贫血基因分析。结果 血细胞分析显示,夫妻二人的红细胞参数为小细胞低色素型细胞,而血红蛋白电泳分析结果正常。胎儿血红蛋白分析显示,HbH 带 1.0%,HbBart's 带 90.9%,HbF 带 4.5%,HbA 带 2.1%,另有一条不明快速带 1.5%。珠蛋白生成障碍性贫血基因 Gap-PCR 分析,丈夫为东南亚型缺失珠蛋白生成障碍性贫血,妻子为泰国型缺失珠蛋白生成障碍性贫血,胎儿为泰国型缺失合并泰国型缺失珠蛋白生成障碍性贫血。结论 Gap-PCR 技术可以用于鉴定未知缺失突变的珠蛋白生成障碍性贫血基因型。

关键词:地中海贫血; 聚合酶链反应; 泰国型缺失; 东南亚型缺失; 巴氏水肿胎儿

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.047 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2012)14-1753-03

珠蛋白生成障碍性贫血是由于珠蛋白基因缺失或突变导致珠蛋白肽链合成减少或者缺乏引起的一种遗传性溶血性贫血。临床上,主要有 α 珠蛋白生成障碍性贫血和 β 珠蛋白生成障碍性贫血,其中以 α 珠蛋白生成障碍性贫血最为常见。在中国,对缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血患者检查主要是检测 3 种,即东南亚型缺失(SEA 缺失)、左缺失(4.2 缺失)、右缺失

(3.7 缺失),这些缺失占到缺失类型总数的 99%以上,但是也有报道过极少数其他类型的缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血,比如泰国型、菲律宾型^[1-3],另外,巴氏水肿胎儿是由两条珠蛋白肽链缺失造成的,这种缺失几乎属于东南亚型缺失。而作者最近进行产前诊断时,发现了 1 例更为罕见的泰国型合并东南亚型 α 珠蛋白生成障碍性贫血巴氏儿。

1 资料与方法

1.1 一般资料 夫妻双方静脉血标本和胎儿脐带血标本用 EDTA-K₂ 抗凝管采集。

1.2 仪器与试剂 XE-2100 血细胞分析仪由日本 Sysmex 公司提供, Capillarys2 毛细管电泳分析仪由法国 Sebia 公司提供, 试剂均为仪器配套试剂。普通 PCR 仪 K960 由杭州晶格公司提供, 梯度 PCR 仪 C-1000 由美国 BIO-RAD 公司提供, HL-2000 Hybrilinker 分子杂交仪由美国 UVP 公司提供, 凝胶成像仪 GelDoc 由美国 BIO-RAD 公司提供。基因诊断试剂盒由深圳益生堂生物企业有限公司提供。

1.3 引物设计 目前的商品试剂盒仅能检测东南亚型缺失、左缺失和右缺失, 不能够检测泰国型缺失。另外, 自行设计泰国型缺失引物, 引物序列为 THAI(F): 5'-GAC CAT TCC TCA GCG TGG GTG-3'; THAI(R): 5'-CAA GTG GGC TGA GCC CTT GAG-3'。泰国型缺失等位基因的扩增片段长度为 1 153 bp, α 基因扩增片段长度为 1 800 bp, 左缺失等位基因扩增片段为 1 600 bp, 右缺失等位基因扩增片段为 2 000 bp, 东南亚缺失型等位基因的扩增片段长度为 1 300 bp, PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳分离。

1.4 方法

1.4.1 先对夫妻双方的静脉血标本进行血常规检测; 再将静脉血和脐带血进行血红蛋白电泳分析。在仪器状态良好的情况下, 按照 SOP 文件进行。

1.4.2 按照常规采用益生堂公司珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂盒进行 α 珠蛋白生成障碍性贫血缺失型和点突变、β 珠蛋白生成障碍性贫血点突变检测, 缺失型的检测利用的是 Gap-PCR 技术, 点突变利用反向斑点杂交技术。按照试剂盒操作说明书进行检测。

1.4.3 利用 Gap-PCR 技术对女方静脉血和胎儿脐带血进行泰国缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血扩增, 然后 PCR 产物进行凝胶电泳分析。PCR 反应体系: 1× TaKaRa GC Buffer II 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 2 U/μL TaKaRa LA Taq 1 μL, 10 pmol/μL 上、下游引物各 1 μL, DNA 模板 2 μL, 加灭菌水至 25 μL 反应体积。扩增参数: 95℃ 预变性 5 min(98℃ 45 s, 60℃ 90 s, 72℃ 150 s)×32 个循环, 72℃ 最终延伸 5 min。

2 结果

2.1 血常规检测 夫妻双方的标本可见红细胞参数有改变, 而血红蛋白电泳分析却是正常的, 具体如表 1。

表 1 夫妻双方的血常规红细胞参数和血红蛋白分析								
标本	Hb (g/L)	RBC (×10 ¹²)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)	HbA (%)	HbA2 (%)
丈夫	130	5.25	68.2	24.8	318	13.5	97.2	2.8
妻子	94	4.19	70.9	22.4	316	13.9	97.4	2.6

2.2 胎儿血红蛋白电泳 HbH 带 1.0%, HbBart's 带 90.9%, HbF 带 4.5%, HbA 带 2.1%, 另有一条不明快速带 1.5%, 位于 Bart's 带和 H 带之间。

2.3 基因分析 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测试剂盒检测: 丈夫扩增出东南亚型缺失条带, 17 个 β 珠蛋白生成障碍性贫血突变位点未见; 妻子仅扩增出正常的珠蛋白 α 基因片段, 18 个 β 珠蛋白生成障碍性贫血突变位点未见; 胎儿仅扩增出东南亚型缺失条带。自行配制的泰国型缺失试剂检测: 丈夫未见扩增条带, 妻子和胎儿均可见扩增条带。

3 讨论

Gap-PCR 又叫裂口 PCR 或跨越式断裂点 PCR, 是目前检

测缺失型珠蛋白生成障碍性贫血的常用方法^[4-5]。其原理是在缺失序列的两侧设计一对引物, 在正常情况下, 由于上、下游引物间的 DNA 片段很长, 普通的 DNA 聚合酶无法扩增, 当片段存在缺失时, 使得上、下游引物靠近, 从而可以成功扩增特异条带。在 α 珠蛋白生成障碍性贫血中, 以缺失型常见, Gap-PCR 技术是非常有效的检测手段^[6-7]。除了常见的缺失类型外, 也可能存在一些尚未发现的缺失型珠蛋白生成障碍性贫血, 同样都可以利用多重连接探针扩增技术和 Gap-PCR 技术进行分析和鉴定^[8-11]。

这对夫妻在做婚前检查的时候, 丈夫是东南亚型缺失, 妻子是除了红细胞参数有所改变外, 基因分析未见异常, 因此一直未进行产前诊断。但是由于这对夫妻已经有过 3 次不明流产史, 因此, 对于这一次怀孕, 临床上建议其进行产前诊断。血常规结果显示, 夫妻双方为小细胞低色素性红细胞, 进一步血红蛋白电泳未见异常, 但是胎儿脐带血血红蛋白电泳却显示有 90.9% 的 Bart's 带, 提示为巴氏水肿胎儿。通过商品试剂盒的基因分析, 丈夫为东南亚型缺失, 而妻子未见异常, 胎儿凝胶电泳仅见一条东南亚缺失带。在中国, 巴氏水肿胎儿一般常见为东南亚缺失型引起的^[12], 根据遗传规律, 作者推断妻子应该也存在缺失肽链, 胎儿可能是东南亚型合并其他缺失类型的巴氏水肿胎儿。根据中国目前报道的罕见缺失珠蛋白生成障碍性贫血类型主要是泰国型缺失, 作者利用 Gap-PCR 技术通过对妻子和胎儿进行泰国型缺失等位基因扩增, 证实了妻子为泰国型缺失, 胎儿为泰国型缺失合并东南亚型缺失的巴氏水肿胎儿。因此, 针对大片段缺失的基因型, 都是可以通过在其上、下游设计特异引物, 利用 Gap-PCR 技术进行分析和鉴定。

参考文献

[1] Ko TM, Chen TA, Hsieh MI, et al. Alpha-thalassemia in the four major aboriginal groups in Taiwan [J]. Hum Genet, 1993, 92(1): 79-80.

[2] 卢建沛, 贾世奇, 温怡仙, 等. 广东省汕头地区二例泰国型 α 珠蛋白生成障碍性贫血携带者 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(4): 232-233.

[3] 陈萍, 李树全, 李敏清, 等. 泰国缺失型 α 珠蛋白生成障碍性贫血 1 的产前诊断 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(3): 247.

[4] 周玉球, 肖鸽飞, 李莉艳, 等. Gap-PCR 作为临床一线 α 珠蛋白生成障碍性贫血携带者筛查技术的应用评价 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(5): 434-436.

[5] 肖奇志, 周玉球, 张永良, 等. 单管多重 PCR 结合 RDB 技术在 α 珠蛋白生成障碍性贫血产前诊断中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3): 271-273.

[6] Li DZ. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis with gap-PCR system [J]. Acta Haematol, 2009, 122(1): 50-51.

[7] 郭华, 蓝慧娟, 熊礼宽. 珠蛋白生成障碍性贫血基因检测技术的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1090-1092.

[8] Suemasu CN, Kimura EM, Oliveira DM, et al. Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population [J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(1): 16-22.

[9] Wei XF, Shang X, He DQ, et al. Molecular characterization of a novel 27.6 kb deletion causing alpha(+) thalassemia in a Chinese family [J]. Ann Hematol, 2011, 90(1): 17-22.

[10] So CC, So AC, Chan AY, et al. Detection and characterisation of beta-globin gene cluster deletions in Chinese using multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. J Clin Pathol, 2009, 62(12): 1107-1111.

[11] Colosimo A, Gatta V, Guida V, et al. Application of MLPA assay to characterize unsolved alpha-globin gene rearrangements[J]. Blood Cells Mol Dis, 2011, 46(2):139-144.

[12] Li D, Liao C, Li J, et al. Detection of alpha-thalassemia in beta-thalassemia carriers and prevention of Hb Bart's hydrops fetalis through prenatal screening [J]. Haematologica, 2006, 91(5):649-651.

(收稿日期:2012-01-10)

• 经验交流 •

结核性胸水生化学指标与实时荧光 PCR 检测结果的关系分析

郭明日, 张立, 张丽霞
(天津市海河医院/天津市呼吸疾病研究所 300350)

摘要:目的 探讨结核性胸水生化学指标与实时荧光 PCR 检测结果之间的关系。方法 对该院结核科 93 例结核性胸膜炎住院患者测定其胸水生化指标腺苷脱氨酶(ADA)、乳酸脱氢酶(LDH)、血管紧张素转化酶(ACE)、葡萄糖、蛋白质水平,同时采用实时荧光 PCR 技术测定胸水中结核分枝杆菌 DNA,分析实时荧光 PCR 检测结果与生化学指标之间的关系。结果 实时荧光 PCR 检测 45 例阳性,48 例阴性。PCR 阳性组生化学指标 ADA、LDH、ACE、葡萄糖和蛋白质的酶活性或含量分别为(69.4±39.3)U/L、(614.3±341.3)U/L、(22.4±30.4)U/L、(3.5±2.5)g/L 和(47.1±9.4)g/L;PCR 阴性组分别为(62.9±21.5)U/L、(558.1±284.1)U/L、(25.0±24.3)U/L、(4.4±1.3)g/L 和(50.3±5.3)g/L。阳性组与阴性组的生化学指标比较,差异均无统计学意义。结论 实时荧光 PCR 检测联合胸水生化学检测对结核性胸膜炎病情诊断具有重要意义。

关键词:胸水; 分枝杆菌,结核; 生化指标; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.048 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2012)14-1755-02

结核性胸水是由于结核分枝杆菌直接感染和(或)胸膜对结核分枝杆菌感染产生高度变态反应而发生的渗出性液体。临床上对结核性胸水的检测项目主要包括胸水结核分枝杆菌分离培养、胸水生化、PCR 检测,以及 X 线、超声和细胞学检测等。其中胸水生化检测包括 ADA、LDH、ACE、葡萄糖和蛋白质含量对诊断结核所致胸水具有重要参考价值,近年来实时荧光 PCR 因其技术成熟具有较高的灵敏度和特异性,已逐渐应用于临床^[1]。对本院结核科住院患者的 93 例结核性胸水临床标本进行胸水生化及实时荧光 PCR 检测,并对检测结果分析比较,为临床快速诊断及治疗提供相关数据,满足临床需求。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2010 年 5 月至 2011 年 10 月结核科因结核所致胸水的住院患者 93 例,其中男 78 例,女 15 例;年龄 15~88 岁,平均 38 岁;胸水由临床医师按照标准操作规程留取,标本于无菌标本盒中送检。结核性胸水的留取标准^[2],临床表现:结核中毒症状及胸腔积液体征;影像学检查:胸部 X 线或胸部 CT 检查提示胸腔积液;实验室检查:胸水检查为结核性渗出液;胸部 B 超检查证实有液性暗区。

1.2 试剂与方法 胸水生化学指标 ADA、LDH、ACE、葡萄糖和蛋白质的检测采用 BECKMAN DXC800 全自动生化仪检测,试剂为浙江东欧公司产品。结核分枝杆菌 DNA 的检测采用 ABI-7500 型实时荧光 PCR 仪,试剂盒为广州达安基因股份有限公司产品,荧光 PCR 扩增程序按照试剂盒说明书进行。荧光 PCR 检测结果按照:若 Ct=30,则实验结果为阴性;如果 Ct<30,则实验结果为阳性,具体数值按照软件计算结果确定。

1.3 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据分析采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,显著性比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 93 例结核性胸水生化学与实时荧光 PCR 检测结果之间的关系,见表 1。

2.2 93 例结核性胸水生化学与实时荧光 PCR 检测结果之间的相关性分析 本文结果显示,PCR 阳性组与 PCR 阴性组相比,ADA(*t*=1.01, *P*>0.05),LDH(*t*=0.87, *P*>0.05),ACE

(*t*=0.54, *P*>0.05),葡萄糖(*t*=1.10, *P*>0.05),蛋白质(*t*=0.32, *P*>0.05)。检测结果表明,结核性胸水实时荧光 PCR 检测阳性组与阴性组的胸水生化学检测结果的差异无统计学意义。

表 1 93 例结核性胸膜炎胸水生化学指标与 PCR 结果的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	ADA (U/L)	LDH (U/L)	ACE (U/L)	葡萄糖 (g/L)	蛋白质 (g/L)
PCR 阳性组	69.4±39.3	614.3±341.3	22.4±30.4	3.5±2.5	47.1±9.4
PCR 阴性组	62.9±21.5	558.1±284.1	25.0±24.3	4.4±1.3	50.3±5.3

3 讨论

胸腔积液是临床上常见的一种体征,可由多种疾病引起,其中结核性胸膜炎所导致的胸腔积液是其主要病因之一。临床医师会对胸水行常规生化学检查,包括 ADA、LDH、ACE、葡萄糖和蛋白质检测,从而为判断胸水的性质及病因提供依据,但对实时荧光 PCR 检测结核分枝杆菌检查的确实不多。ADA 在淋巴细胞内含量较高,结核性胸膜炎时,因细胞免疫受刺激,淋巴细胞明显增多,胸水中 ADA 活性明显增高^[3],当 ADA>45 U/L,强烈提示结核性胸膜炎;ACE,即血管紧张素转化酶,广泛分布于全身各组织的血管内皮或上皮细胞,单核巨噬细胞在特定环境中也可分泌 ACE,结核性胸水中 ACE 明显升高;LDH、葡萄糖和蛋白质测定是鉴别胸腔积液为渗出液还是漏出液的常用指标,胸水 LDH 结合血清 LDH 测定对结核性胸膜炎诊断有一定参考价值,此外,结核性胸水葡萄糖含量一般会有不同程度的降低,化脓性、结核性等炎性渗出液的蛋白含量常大于 40 g/L^[4-5]。但对于确诊为结核性胸膜炎的患者,常规生化学检查已很难满足临床对于结核病情的评估。本文研究结果显示,确诊为结核性胸膜炎的 93 例患者的胸水同时进行生化学指标检查和实时荧光 PCR 检测结核分枝杆菌,PCR 阳性组与阴性组的生化学指标间的差异无统计学意义,这表明单纯行常规生化学检测对结核性胸膜炎的病情评估存在明显不足,虽然胸水行抗酸染色及培养找结核分枝杆菌是临床上常规检测的项目,但也存在阳性率低及时间长的缺点,此