

LKB1 在甲状腺乳头状癌中表达及意义

沈峰清 姚 军 杨晶金 杨林军 金晓燕 梁 勇

摘 要 **目的** 探讨 LKB1 在甲状腺乳头状癌中的表达特点及其生物学意义。**方法** 甲状腺乳头状癌和正常甲状腺组织标本各 25 例,采用免疫组织化学、Western blot 和 real-time PCR 检测比较 LKB1 蛋白表达及 mRNA 情况。**结果** 人甲状腺乳头状癌组织中 LKB1 蛋白表达显著低于正常甲状腺组织($P < 0.05$),其 mRNA 明显下调($P < 0.01$),LKB1 表达与甲状腺乳头状癌淋巴结转移呈负相关($P < 0.01$)。**结论** LKB1 基因和蛋白表达水平在甲状腺乳头状癌组织中普遍下调并与其淋巴结转移呈负相关,提示 LKB1 在甲状腺乳头状癌的形成及淋巴结转移中起负向调节作用。

关键词 LKB1 甲状腺乳头状癌 免疫组织化学 Western blot Real-time PCR

LKB1 Expression in Human Papillary Carcinoma of Thyroid and Its Biological Significance. Shen Fengqing, Yao Jun, Yang Jingjin, Yang Linjun, Jin Xiaoyan, Liang Yong. Department of Oncology, The First Clinical Medical School, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To compare the mRNA and protein expression of LKB1 in the papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue, and investigate its biological significance. **Methods** LKB1 protein was detected by immunohistochemistry and Western blot in 25 cases of human papillary carcinoma of thyroid, 25 cases of normal thyroid tissues around the nodular goiter as control. The expression of LKB1 mRNA was detected by real-time PCR in above cases. **Results** Compared with normal thyroid tissue, LKB1's expression was significantly reduced both in protein and mRNA level in papillary thyroid cancer($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduction of LKB1 protein were reverse correlated with lymphatic metastasis ($P < 0.01$). **Conclusion** LKB1 was lower expression in the papillary thyroid carcinoma both in gene and protein level, suggesting that LKB1 plays a negative regulation role in the formation of papillary thyroid carcinoma and lymph node metastasis.

Key words LKB1; Papillary thyroid carcinoma (PTC); Immunohistochemistry; Western blot; Real-time PCR

LKB1 是一种在细胞内分布较为广泛的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, STK), 在细胞的生长增殖、能量代谢和细胞极性调控等方面起重要作用, 且被证明作为抑癌基因与多种肿瘤关系密切^[1]。该基因与甲状腺癌尤其是甲状腺乳头状癌 (PTC) 的关系至今尚不明确。本研究采用免疫组织化学、Western blot、real-time PCR 等方法比较 LKB1 基因及蛋白在 PTC 中的表达情况, 旨在阐明其与 PTC 发生发展的关系。

材料与方法

1. 材料: (1) 一般资料: 收集台州学院附属市立医院肿瘤外科 2011 年 6 ~ 12 月间经病理证实的甲状腺手术切除组织样本 50 例, 所有患者术前未接受化疗或放疗。其中实验组为

甲状腺乳头状癌 25 例, 对照组为结节性甲状腺肿标本中病灶旁正常的甲状腺组织标本 25 例。标本均分为两部分, 一部分 10% 甲醛液固定用于免疫组织化学检测, 另一部分 -80℃ 保存用于 Real-time PCR 和 Western blot 检测。其中肿瘤组男性 9 例, 女性 16 例, 年龄 17 ~ 54 岁, 中位年龄 42.3 岁。对照组男性 7 例, 女性 18 例, 年龄 27 ~ 51 岁, 中位年龄 40.1 岁。(2) 主要仪器及试剂: Applied Biosystems stepone™ Real-time PCR 系统, 垂直电泳槽及转膜槽 (北京市六一仪器厂), Thermo 公司 MK3 型酶标仪, BIO-RAD gel DOC™ XR + 成像系统, 兔抗人 LKB1 多克隆抗体 (ab58786, Abcam 公司), 兔抗人 GAPDH 单克隆抗体 (#2118, Cell signaling technology 公司); 二步法免疫组化检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物科技有限公司), T-PER 组织总蛋白提取试剂盒 (Thermo scientific 公司), Trizol RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司), Quant cDNA 第 1 链合成试剂盒和 RealMasterMix (SYBRGreen) 试剂盒 (天根生物科技有限公司), 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

2. 方法: (1) 免疫组织化学: ① 样本检测: 石蜡包埋组织、4μm 厚度连续切片, 采用免疫组化 SP 法, 一抗为兔抗人 LKB1 多克隆抗体以 1:125 稀释, 0.1mmol/L 枸橼酸缓冲液煮沸修

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072209); 台州市科技计划项目 (102ky11)

作者单位: 325000 温州医学院第一临床医学院肿瘤科 (沈峰清、杨晶金); 318000 台州学院医学院 (姚军、杨晶金、梁勇); 318000 台州学院医学院附属市立医院肿瘤科 (杨林军、金晓燕、梁勇)

通讯作者: 梁勇, 电子信箱: liangy@ yahoo. cn

复抗原,DAB 显色,苏木素复染,封片后光镜下观察。PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性片作为阳性对照。每批实验均设阴性对照;②结果判定标准:高倍镜(×40)对每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,计数 500 个细胞/视野,共计 2500 个,结果以出现细胞核或伴胞质着色判断为阳性,根据阳性细胞所占比例及进行半定量。参照 Carcangiu 等^[2]的半定量评分方法判定免疫组化结果。阳性细胞数按<5%、5%~35%、36%~70%和>70%分别记为 0、1、2、3 分;阳性着色强度按无色、淡棕色、棕黄色和棕褐色分别记为 0、1、2、3 分。取两项评分的乘积进行综合评分,≤1 分为阴性、2~3 分为弱阳性、4~5 分为中度阳性、≥6 分为强阳性。本实验合并阴性和弱阳性为结果阴性,中度阳性和强阳性为结果阳性。(2) Western blot:取甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织标本各 25 例约 25mg 组织,加入 500μl T-PER 组织总蛋白提取液(含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂),在冰上充分碾磨裂解 30min,10000r/min 离心 5min,取上清液;BCA 法检测蛋白浓度;取 40μg 总蛋白上样,10% 聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳后,湿转法将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC)上。转膜条件:300mA,1.5h。5% BSA 封闭 2h 后,滴加兔抗人 LKB1(1:800)和 GAPDH(1:1000)一抗,4℃过夜。TBST 洗 2 次后 TBS 洗 1 次,每次 10min,然后滴加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:1000, Beyotime),室温孵育 1.5h,洗膜后与免疫印迹化学发光法

(ECL)反应,X 线片曝光,显影,定影后结果应用 ImageJ 软件处理分析。(3) real-time PCR:取甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织各 25 例,每例标本重约 25mg,采用 Trizol 提取组织中的总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,OD260/OD280=1.8~2.0,并在 1% 琼脂糖凝胶电泳中显示出清晰的 28S 和 18S 两条 rRNA 带,证明提取的 RNA 完整。cDNA 合成反应体系含 2μg RNA,2μl 10×RT mix(终浓度为 1×),2μl dNTP 混合液(终浓度为 0.25mmol/L each dNTP),2μl Oligo-dT15(终浓度为 1μmol/L),1μl Quant 反转录酶,加 RNase free ddH₂O 至终体积为 20μl,37℃ 孵育 60min。采用 SYBR Green 荧光染料,参照试剂盒说明完成 real-time PCR,PCR 反应体系包括:2.5×Real Master Mix/20×SYBR 溶液混合反应液 9μl、cDNA 溶液 2μl、上下引物(终浓度 200nmol/L)各 2μl,加 ddH₂O 至 20μl。LKB1 基因 PCR 反应条件为:95℃ 预变性 2min;95℃ 15s,56℃ 30s,68℃ 60s,38 个循环;最后 95℃ 15s,降温至 60℃ 1min,然后按每 15s 上升 0.3℃ 至 95℃ 后,保持 15s。分别收集荧光信号,进行熔解曲线分析。GAPDH 基因 PCR 反应条件为 95℃ 预变性 2min;95℃ 15s,63℃ 30s,68℃ 60s,40 个循环;最后 95℃ 15s,降温至 60℃ 1min,然后按每 15s 上升 0.3℃ 至 95℃ 后,保持 15s。分别收集荧光信号,进行熔解曲线分析。结果采用相对定量 2^{-ΔΔCt}法计算,基因引物序列、退火温度见表 1。

表 1 引物序列及退火温度

基因名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度(℃)
LKB1	CTGGGGTCACCCCTCTACAAC	ACTCAAGCATCCCTTTCAGC	153	56
GAPDH	ATGGCCTTCCTGTCCCCACTG	TGAGTGTGGCAGGGAAGTCCCCA	398	63

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件,结果分析采用 *t* 检验,χ² 检验,Fisher 确切概率法,两独立样本 Wilcoxon 符号秩检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. LKB1 蛋白在 PTC 与对照组中的表达水平比较:(1)免疫组织化学:免疫组织化学检测显示 LKB1 蛋白主要定位于细胞核,细胞质有少量表达,表现为棕色颗粒(图 1)。参照 Carcangiu 等^[2]的半定量评分方法判断肿瘤组与对照组阳性率结果如表 2。如表 2 所示,甲状腺乳头状癌组中 LKB1 阳性率为 32%,而正常甲状腺组织中为 84%。甲状腺乳头状癌组 LKB1 蛋白表达低于正常对照组(χ²=13.875,*P*<0.01),有统计显著差异。本研究还对比了肿瘤组与对照组间不同的生物学行为,结果见表 3。如表 3 所示,LKB1 蛋白表达程度与肿瘤大小及患者年龄等因素无显著性差异(χ₁²=3.179,*P*₁>0.05;χ₂²=0.746,*P*₂>0.05)。而 LKB1 蛋白在淋巴结转移组的表达水平明显低于无淋巴结转移组(χ₃²=6.625,*P*₃<0.01),

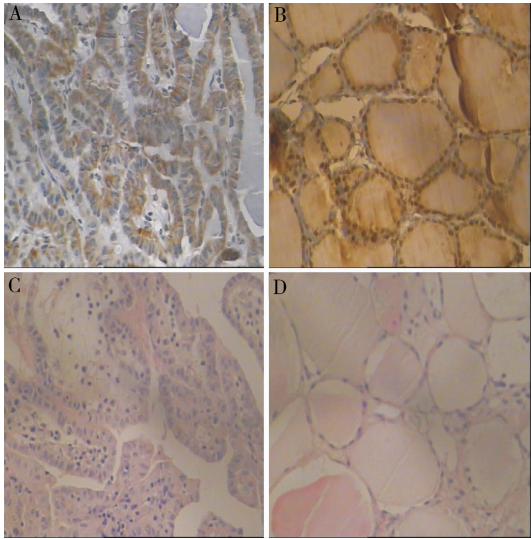


图 1 LKB1 在 PTC 和对照组中的染色结果(×200)
A. PTC 免疫组化染色 LKB1 阳性表达;B. 正常甲状腺组织免疫组化 LKB1 阳性表达;C. PTC 组织 HE 染色;D. 正常甲状腺组织 HE 染色

表 2 LKB1 在甲状腺乳头状癌及对照组中的表达 (n)

组别	阳性	阴性	阳性率 (%)	χ^2	P
甲状腺乳头状癌组 (n=25)	8	17	32		
正常甲状腺组织 (n=25)	21	4	84	13.875	<0.01

表 3 LKB1 蛋白表达与甲状腺癌临床因素的关系

临床因素	n	LKB1 蛋白表达水平		阳性率 (%)	P
		- ~ +	++ ~ ++++		
肿瘤大小 (cm)					
<2	8	3	5	62.5	
≥2	17	14	3	17.6	>0.05
患者年龄 (岁)					
<45	8	4	4	50	
≥45	17	13	4	23.5	>0.05
淋巴结转移					
是	14	13	1	7.1	
否	11	4	7	63.6	<0.01

其表达与 PTC 淋巴结转移呈负相关 ($T_3 = 77, P < 0.01$)。(2) Western blot: 肿瘤组和对照组 Western blot 结果见图 2, 通过比较两组间显色灰度平均值计算结果见图 3。结果显示, LKB1 在甲状腺乳头状癌及正常甲状腺组织中蛋白质水平的表达分别是 0.208 ± 0.061 和 0.271 ± 0.075 , 甲状腺乳头状癌中 LKB1 表达低于正常甲状腺组织, 具有统计学显著性差异 ($P < 0.05$)。

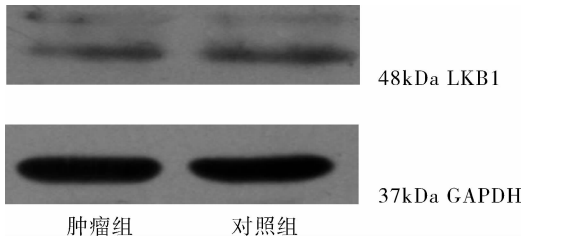


图 2 Western blot 检测 LKB1、GAPDH 在 PTC 和对照组的表达情况

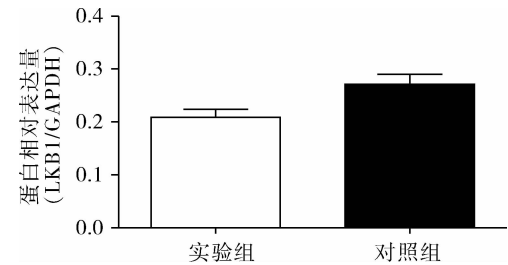


图 3 LKB1 在 PTC 与对照组中的相对表达量

2. LKB1mRNA 在 PTC 与对照组中的表达水平比较:(1) 实时荧光定量 PCR 体系的确定: real - time

PCR 体系建立 LKB1 和 GAPDH 扩增曲线和溶解曲线 (图 4)。根据目的基因 LKB1 与内参照基因 GAPDH 的溶解曲线及扩增曲线, 它们的融解曲线均为单峰特异性, 峰值分别为 86.33°C 和 90.54°C , 引物的特异性好且无二聚体产生; LKB1 与 GAPDH 的 PCR 扩增效率恒定, 且均达到平台期; 相应的阈值循环数 (Ct) 稳定, 重现性好。可以使用该体系对目的基因 LKB1 进行相对定量检测。(2) LKB1 mRNA 在 PTC 与对照组中的表达水平比较: 采用相对定量方法 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 LKB1mRNA 在肿瘤组和对照组中的平均表达率如图 5。比较 LKB1 在甲状腺乳头状癌与正常甲状腺组织中的表达程度, LKB1mRNA 在甲状腺乳头状癌中的表达为对照组的 0.648 ± 0.165 , 甲状腺乳头状癌中的 LKB1mRNA 表达明显降低, 采用 t 检验分析, 具有统计学显著差异 ($P < 0.01$)。

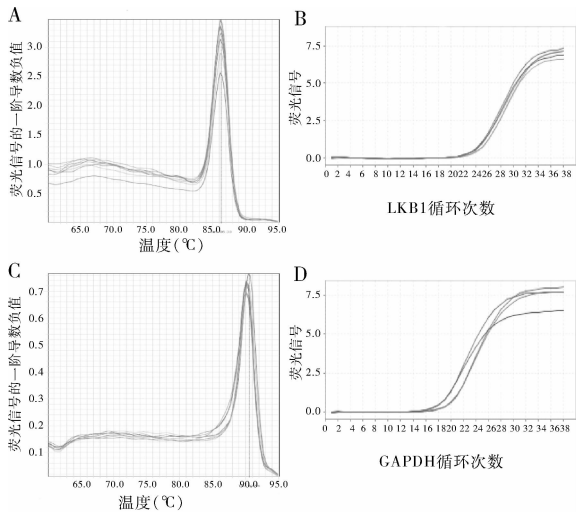


图 4 LKB1 与 GAPDH 扩增曲线及溶解曲线

A. LKB1 融解曲线; B. LKB1 扩增曲线; C. GAPDH 融解曲线; D. GAPDH 扩增曲线

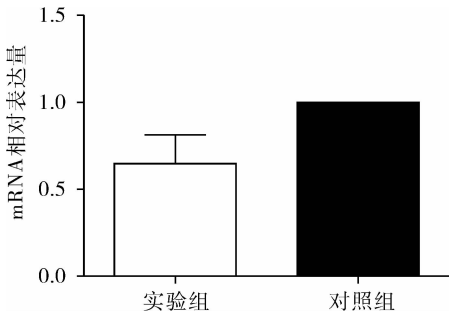


图 5 LKB1mRNA 相对表达量

讨 论

甲状腺癌是常见的内分泌系统恶性肿瘤之一, 占

恶性肿瘤的 1% 左右。据报道,每年甲状腺癌的发病率以 4% 的速度增长,已成为女性第 8 大常见肿瘤^[3]。而甲状腺癌中以甲状腺乳头状癌最常见,约占 78%。因此在分子水平研究甲状腺乳头状癌发病机制是非常必要的。

1998 年,芬兰学者 Hemminki^[4] 和德国学者 Jenne^[5] 成功克隆了 Peutz - Jeghers 综合征的致病基因,分别命名为 LKB1 和 STK11。LKB1 定位于 19P13.3, DNA 全长 2158bp, 编码区 1302bp, 包括 9 个外显子、1 个非编码外显子和 11 个内含子,其编码的 LKB1 蛋白由 433 个氨基酸组成,相对分子质量为 60kDa,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。其第 44 ~ 309 位氨基酸为激酶催化区,N 端第 38 ~ 43 位氨基酸残基是核定位信号序列(nuclear localization signal, NLS)。Rowan 等^[6] 研究表明,人体中几乎所有的组织均有 LKB1 mRNA 的表达,其中胎儿组织中的表达高于成人,成人以上皮、睾丸生精小管和肝脏表达最强。其野生等位突变、失活或杂合性缺失(LOH)与多与 Peutz - Jeghers 综合征的发生相关。LKB1 主要定位于细胞核内,也可在胞质中表达。研究证明,LKB1 在胞质中的高表达和其核定位信号缺失、胞质中 LIP1 (LKB1 interacting protein - 1) 或核内 STRAD (STe20 Related Adaptor) 表达升高有关^[7,8]。

越来越多的研究证明,LKB1 与多种肿瘤的发生关系密切,而且普遍认为 LKB1 基因是一种抑癌基因。但是,LKB1 和甲状腺癌尤其是甲状腺乳头状癌的相关性迄今尚未完全阐明。本研究采用免疫组化方法研究 LKB1 蛋白在甲状腺乳头状癌与正常甲状腺组织中,结果显示甲状腺乳头状癌组的 LKB1 蛋白表达低于正常对照组($P < 0.01$),定性的证实了甲状腺乳头状癌中与 LKB1 蛋白低表达相关。还进一步对比分析了 LKB1 在有淋巴结转移的甲状腺乳头状癌组织中的表达情况,淋巴结转移组甲状腺乳头状癌组织中 LKB1 表达较无淋巴结转移组明显下调($P < 0.01$)。有学者在肺癌、胃癌、乳腺癌等中也得出有相似的结论,提示 LKB1 在不同恶性肿瘤中的分子机制具有类似性^[9~11]。研究显示 LKB1 的功能主要是使细胞周期阻滞在 G_1 期、促进细胞凋亡和调节胚胎血管形成。其主要机制可能是 LKB1 在 TSC2 介导下调节 mTORC1 活性,TSC2 通过抑制小 G 蛋白 Rheb 抑制 mTORC1 的活性^[12]。mTORC1 是细胞中控制蛋白合成和生长增殖的重要成分,可以磷酸化核糖体激酶 S6K1 和真核翻译因子结合蛋白 4EBP1 而起

始多种调节蛋白的翻译,如 Cyclin D1、HIF - 1 α 和 Myc 等,从而促进细胞生长和细胞周期进程。

Kim 等^[13] 研究显示 LKB1 通过抑制 RET/PTC 对 STAT3 的磷酸化,从而抑制 STAT3 二聚体的形成及阻碍其与 GAS 增强子的结合,影响 VEGF、Cyclin D1 及 Bcl - xL 表达,而上述因子已证实在甲状腺乳头状癌中活性都出现异常调节。有研究显示 LKB1 缺失诱导细胞周期抑制因子 P21 生成减少,同时上调 Cyclin D1 的总水平和核定位,使细胞周期过快从 G_1 期进入 S 期,细胞增殖加速^[14]。此外 LKB1 的缺失与细胞色素 C 和 caspase 依赖的凋亡途径受阻相关^[15]。因此 LKB1 的缺失可能引起甲状腺滤泡细胞过度增殖、凋亡受阻,最终引起恶性转变。甲状腺乳头状癌的一个重要临床特点早期区域淋巴结转移,这可能与 LKB1 表达下降有关。Zhuang 等通过体内体外实验将 LKB1 转染的乳腺癌细胞株 MDA - MB - 435 与空载体及野生型的细胞株相比较,发现转染 LKB1 的乳腺癌细胞株的 VEGF 和 bFGF 的 mRNA 和蛋白水平明显低于对照组。此外 Ylikorkala 等在研究 LKB1 敲除的老鼠胚胎期即死亡,并伴随血管发育异常和血管内皮生长因子(VEGF)表达量的明显上调,而且过表达 LKB1 可下调 VEGF 的水平,提示 LKB1 具有负性调节 VEGF 的作用。因此甲状腺乳头状癌中 LKB1 表达下降可能导致 VEGF 表达增加,从而促进甲状腺乳头状癌血管形成及淋巴转移。本实验还采用了 Western blot 方法对 LKB1 蛋白在实验组及对照中的表达,结果显示甲状腺乳头状癌中 LKB1 表达低于正常对照组($P < 0.05$)。以上研究从蛋白质定性到半定量水平证明了 LKB1 在 PTC 中呈低表达,这为 LKB1 在 PTC 中的表达情况提供了进一步证据。

为进一步分析 LKB1 表达下调的分子机制,本研究采用 real - time PCR 检测 PTC 组织中 LKB1 在 mRNA 在水平的表达,结果显示:LKB1mRNA 在甲状腺乳头状癌中的表达为对照组的 0.648 ± 0.165 ,明显低于正常甲状腺组织中的表达($P < 0.01$)。这结果证实了,甲状腺乳头状癌中 LKB1 的下调由于其 mRNA 水平下调引起。Triggiani 等分析了 1 例 Peutz - Jeghers 综合征的甲状腺乳头状女性患者,也证实了在甲状腺乳头状癌中 LKB1mRNA 低表达,并进行其 DNA 测序和多种 DNA 探针对甲状腺病理标本进行检测,未发现 LKB1 有任何突变,然而甲基化特异性 PCR 检测显示 LKB1 启动子序列的甲基化,因此 LKB1mRNA 表达水平下降可能与其启动子甲基化对

其表达沉默在甲状腺乳头状发生发展中起一定影响。

综上所述, LKB1 在甲状腺乳头状癌的形成及淋巴结转移中起负向调节作用。而 LKB1 在甲状腺乳头状癌中的低表达对甲状腺乳头状癌的增殖、凋亡和淋巴转移的影响有待进一步研究, 可望为甲状腺乳头状癌基础研究提供更多的证据并为甲状腺乳头状癌的分子诊断及治疗提供潜在的分子基础。

参考文献

- 1 Shorning BY, Clarke AR. LKB1 loss of function studied in vivo[J]. FEBS Lett, 2011, 585(7): 958-966
- 2 Carcangiu ML, Chambers JT, Voynick IM, et al. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations [J]. Am J Clin Pathol, 1990, 94(3): 247-254
- 3 杨晶金, 姚军, 沈峰清, 等. Notch-1 信号通路及甲状腺乳头状癌的关系[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(2): 120-126
- 4 Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome [J]. Nature, 1998, 391(6663): 184-187
- 5 Jenne DE, Rammann H, Nezu J, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase [J]. Nature Genetics, 1998, 18(1): 38-43
- 6 Rowan A, Bataille V, MacKie R, et al. Somatic mutations in the Peutz-Jeghers (LKB1/STKII) gene in sporadic malignant melanomas [J]. J Invest Dermatol, 1999, 112(4): 509-511
- 7 Morén A, Raja E, Heldin CH, et al. Negative regulation of TGF β signaling by the kinase LKB1 and the scaffolding protein LIP1 [J]. J

- Biol Chem, 2011, 286(1): 341-353
- 8 Gaude H, Aznar N, Delay A, et al. Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor LKB1 [J]. Oncogene, 2012, 31(12): 1582-1591
- 9 Gill RK, Yang SH, Meerzaman D, et al. Frequent homozygous deletion of the LKB1/STK11 gene in non-small cell lung cancer [J]. Oncogene, 2011, 30(35): 3784-3791
- 10 Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, et al. Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. Oncogene [J]. 2000, 19(1): 164-168
- 11 沈赞, 吴晴, 岳麓, 等. 抑癌基因 LKB1 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中华医学会杂志, 2005, 85(10): 15-18
- 12 Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth [J]. Biochem J, 2008, 412(2): 179-190
- 13 Kim DW, Chung HK, Park KC, et al. Tumor suppressor LKB1 inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) by thyroid oncogenic tyrosine kinase rearranged in transformation (RET)/papillary thyroid carcinoma (PTC) [J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(12): 3039-3049
- 14 Morton JP, Jamieson NB, Karim SA, et al. LKB1 haploinsufficiency cooperates with Kras to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest [J]. Gastroenterology, 2010, 139(2): 586-597
- 15 Lee JH, Koh H, Kim M, et al. JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(7): 1110-1122

(收稿日期: 2012-05-22)

(修回日期: 2012-06-15)

几种液体分枝杆菌分离培养方法的多中心应用评估

宋媛媛 夏 辉 赵雁林

摘 要 目的 评估自动化及手动液体分枝杆菌分离培养系统的临床应用效果。方法 采集 2008 年 11 月~2009 年 4 月就诊的肺结核可疑症状者痰标本 1012 例, 其中涂阳 472 例, 涂阴 540 例。对每份痰标本进行 L-J 培养及 4 种液体培养。结果 使用 L-J 培养、MGIT™ 960、BacT/ALERT 3D、MicroMGIT™ 手动判读仪、紫外灯的检出率分别为 47.1% (477/1012)、52.5% (531/1012)、51.9% (310/597)、51.8% (524/1012)、52.8% (429/812)。几种液体培养方法检出率均高于 L-J 培养, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。自动化 MGIT™ 960 和 MicroMGIT™ 手动判读仪、紫外灯的检出率无统计学差异 ($P > 0.05$)。5 种培养方法阳性结果报告时间分别为 21.1 ± 8.1 天、 11.0 ± 5.9 天、 16.4 ± 8.3 天、 11.8 ± 6.6 天、 10.7 ± 5.6 天。4 种液体培养方法阳性结果报告时间均短于 L-J 方法 ($P < 0.05$)。MGIT™ 960 阳性结果报告时间短于 MicroMGIT™ 手动判读仪, 且有统计学差异 ($P = 0.048$), 但比紫外灯长, 两者比较无统计学差异 ($P = 0.520$)。结论 自动化及手动液体培养方法较 L-J 方法均能检出更多分枝杆菌, 且能缩短阳性结果报告时间, 且手动判读系统不需要昂贵仪器, 更加适合基层实验室推广应用。

关键词 结核 分枝杆菌 分离培养

基金项目: 国家科技部重大专项基金资助项目 (2008ZX10003-009)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心 (注: 宋媛媛、夏辉为共同第一作者)

通讯作者: 赵雁林, 电子信箱: zhaoyanlin@chinatb.org