

CpG ODN 佐剂序列的筛选及其免疫刺激活性研究

赵玉娇 蔡路奎 王晓丹 席珏敏 陈俊英 潘 玥 邱丽娟 姜黎明 孙强明

摘 要 **目的** 设计和筛选对人 PBMC 细胞和小鼠脾细胞具有免疫刺激活性的 CpG ODN 序列,研发能用于人用疫苗的有效核酸佐剂。**方法** 根据具有免疫刺激活性的 CpG ODN 序列结构特点,设计并合成出 15 条候选序列,分别合成并进行非硫代和硫代修饰。分选健康人 PBMC 细胞及 Balb/c 小鼠脾细胞,以不同 CpG ODN 进行体外刺激,MTT 法检测 CpG ODN 诱导细胞增殖水平。随后将筛选出的有效 CpG ODN 序列与人类基因组序列进行同源性比较,以评估其安全性。**结果** 在刺激人 PBMC 和小鼠脾细胞 72h 后,硫代和非硫代修饰的 15 条序列 A 值均高于阴性对照组,其中 IMB - AC5 序列刺激人 PBMC 后 A 值分别达到 0.377 和 0.334,与阳性对照 ISS1018 序列 A 值(0.387 和 0.338)接近;刺激小鼠脾细胞 72h 后,A 值同样高于其他序列,达到 0.571 和 0.486,与阳性对照 ISS1018 序列 A 值(0.588 和 0.464)接近。综合上述结果,选择 5 号非硫代序列作为候选佐剂。同源性比较结果显示,该序列与人类基因组序列没有同源性,与部分蛋白编码基因的同源性只有 50% ~ 65%,此外其部分序列与人 18 号染色体上的一些重复序列有同源性,最高同源性达 62%。证明筛选出的新型 CpG ODN 佐剂 IMB - AC5 安全性较高。**结论** 设计筛选出对人 PBMC 细胞和小鼠脾细胞具有免疫刺激活性的 CpG ODN 序列 IMB - AC5,与人类基因组序列具有较低同源性,为进一步研发人用疫苗佐剂奠定基础。

关键词 CpG ODN 佐剂 免疫刺激活性 同源性

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.009

Designing and Immunostimulation Activation Study of CpG ODN Adjuvants. Zhao Yujiao, Cai Lukui, Wang Xiaodan, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract **Objective** To design and screen out a CpG ODN sequence which has good immunostimulation activation on human PBMCs and mice spleen cells, to develop effective nucleic acid adjuvant for human vaccines. **Methods** According to the structure characteristics of CpG ODN sequences which have immunostimulation activities, 15 candidate sequences were designed and synthesised, with and without phosphorothioate modified respectively. Healthy PBMC cells and Balb/c mice spleen cells were Sorted out, and stimulated with different CpG ODN in vitro. CpG ODN inducing cells proliferation were detected by MTT method. Then for evaluating its safety, the homology of effective CpG ODN sequence were compared with human genome sequence. **Results** After 72h stimulating by CpG ODN in human PBMCs and in mice spleen cells, A values of totally 15 sequences (both phosphorothioate modified and non - modified) were higher than the negative control group, and A values of IMB - AC5 sequence in PBMCs was 0.377 and 0.334, close to the positive control ISS1018 sequence (0.387 and 0.338); and the A value in mice spleen cells reached to 0.571 and 0.486, close to the positive control ISS1018 sequence (0.588 and 0.464). Comprehensive the results above, the IMB - AC5 non - phosphorothioate modified sequence were chosen as the candidate adjuvant. The homology of its sequence was compared with the human genome sequence. The results showed that the sequence was not homogenous with human gene sequences, and the homology with part of protein - coding genes were between 50% - 65% only, besides part of its sequence were homogenous with some repetitive sequences on chromosome 18. The highest homologies only reach to 62%, which showed that the new CpG ODN adjuvants IMB - AC5 had good safety. **Conclusion** We designed and screened out an effective CpG ODN sequence IMB - AC5, which has good immunostimulation activation on human PBMCs and mice spleen cells, and has low homology with the human genome sequence, lay a foundation for further development of adjuvants for human vaccines.

Key words CpG; ODN; Adjuvant; Immunostimulation activation; Homology

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81171946);教育部高校博士学科点专项科研基金资助项目(20111106120055);教育部留学回国人员启动基金资助项目[(2011)1568];云南省科技厅社会发展科技计划项目(2011CA016);云南省自然科学基金资助项目(2012FB188)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者:孙强明,电子邮箱:msun08@yahoo.com

目前市场上预防用疫苗大部分使用氢氧化铝 $[Al(OH)_3]$ 作为佐剂。铝佐剂被称为抗原仓库,能包裹抗原并缓慢地释放,起到贮藏的作用,且推迟抗原清除的时间,延长抗原暴露于免疫系统的时间,同时活化补体,提高淋巴结诱捕能力和淋巴细胞的滞留时间。此外还能吸附抗原并转运抗原至淋巴结,增强Th2类免疫应答和体液免疫。但其存在不能诱导产生Th1细胞免疫反应,阻断 $CD8^+$ CTL的激活等缺点^[1,2]。

CpG寡脱氧核苷酸(CpG oligonucleotide, CpG ODN)作为一种新型佐剂,与其他佐剂相比具有许多优点:CPG ODN本身无免疫原性,不会诱发自身免疫反应;CPG ODN合成及纯化能进行标准化生产,极其稳定,半衰期长达几年;疫苗配伍安全性高,能通过任何途径给药等,是一种非常有效和良好耐受的新型疫苗佐剂^[3-5]。但目前公布的CpG ODN佐剂大多受专利保护,因此筛选拥有自主知识产权的有效CpG ODN佐剂对新型疫苗的研发具有重要意义。

根据CpG ODN的结构和在体外对外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)刺激作用的不同,可将具有免疫刺激作用的CpG ODN分为3种类型:A型:部分硫代修饰,5'和(或)3'端多有poly-G,非常稳定的、有序的高级结构(G-四聚体),能刺激人pDC产生大量 $IFN-\alpha$,并能强烈激活NK细胞;B型:全部硫代修饰的骨架,含有1个或多个CpG基序,没有poly G,不形成典型的高级结构,能刺激B细胞增殖并分泌大量免疫球蛋白、白介素IL-6和IL-10,并能刺激pDC成熟;C型:全部硫代修饰,含有1个或多个CpG基序,无poly G结构,5'端含有刺激能力强的基序GTCGTT,序列中含有回文结构,兼有A型和B型CpG ODN的作用特点^[6,7]。

总结目前作为疫苗佐剂进入临床的CpG ODN序列,均属于B型结构^[8,9]。本研究通过查询和比较已有专利保护的B型CpG ODN序列,依据B型CpG ODN结构特点,设计和筛选具有良好免疫刺激活性的疫苗佐剂候选序列,为进一步研发拥有自主知识产权的新型佐剂疫苗奠定基础。

材料与方法

1. 实验材料:RPMI-1640培养液(Sigma产品)含L-谷氨酰胺、10%小牛血清、青霉素、链霉素、 β -巯基乙醇,4℃储存备用;MTT(Sigma产品):用PBS配成质量浓度为5mg/ml的液体,过滤除菌,4℃储存备用;淋巴细胞分离液购自深圳市达科为

生物技术有限公司;CpG ODN序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,HPLC纯化,硫代修饰。

2. CpG ODN序列的设计原则:总结国内外研究资料,具有免疫刺激活性的CpG ODN序列基本结构有以下特点:①CpG基序是CpG ODN产生免疫刺激作用的基本结构,由CpG二核苷酸及其5'端和3'端的各两个碱基构成;②CpG两侧的嘌呤和嘧啶以及CpG的间隔都会影响CpG ODN的免疫刺激活性及其作用特点;③ODN所含CpG基序的数目,通常含有2~4个CpG基序是最佳的,CpG基序间的间隔,通常至少要间隔两个碱基,而且最好是胸腺嘧啶;④含有poly-G序列(3个或以上鸟嘌呤组成)的CpG ODN具有较强刺激浆细胞样树突状细胞产生干扰素- α ($IFN-\alpha$)的作用;全部硫代修饰的CpG ODN最稳定,且对B细胞的刺激作用最佳,但全部硫代修饰的CpG ODN刺激pDC产生 $IFN-\alpha$ 的作用却不及部分硫代修饰的CpG ODN。以上述结果为依据,共设计15条CpG ODN序列,分别合成硫代和非硫代2种形式。

3. CpG ODN含量测定:将合成的CpG ODN短暂离心后置于冰盒上,以标注的吸光度值A用去离子水稀释至20~30 μ g/ml作为供试品。为测定CpG ODN含量,置供试品于UV-2501紫外分光光度计中,以波长260nm进行检测,根据供试品的吸光度值计算待检样品的含量:待检样品含量(μ g/ml) = A 供试品 $\times$ 33 $\times$ 稀释倍数(33:单链寡脱氧核苷酸当A₂₆₀ = 1时,为33 μ g/ml)。

4. 以人PBMC筛选具有免疫刺激活性的CpG ODN序列:人PBMC中含有丰富的T、B淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞,这些免疫细胞是人体应对外来病原体感染的主要功能细胞。以Ficoll分离液将人PBMC从新鲜全血中分离,悬于含10%FBS的1640培养基中,接种于24孔板,5 $\times$ 10⁵个细胞/孔。将合成的CpG ODN序列用去离子水稀释后以20 μ g/ml的终浓度加入PBMC细胞作为刺激物,每个序列设3个复孔。于37℃、5%CO₂培养72h后以MTT法检测CpG ODN诱导PBMC细胞增殖水平,对自行设计的CpG ODN佐剂的免疫调节活性进行筛选分析。

5. 以小鼠脾细胞筛选具有免疫刺激活性的CpG ODN序列:选4~6周龄雌性Balb/c小鼠,脱颈处死小鼠,浸入75%的乙醇中浸泡3min,无菌操作取出脾脏。将脾剪为连体4段,放置在70 μ mol/L筛网上,筛网放置10ml培养板中,培养板中提前加入10ml IM-

DM-2,用无菌注射器内芯轻轻研磨,磨完后,脾细胞悬液过滤至 15ml 离心管,接种于 24 孔板,5×10⁵ 个细胞/孔。将合成的 CpG ODN 序列用去离子水稀释后以 20μg/mL 的终浓度加入脾细胞作为刺激物,于 37℃、5% CO₂ 培养 72h 后以 MTT 法检测 CpG ODN 诱导小鼠脾细胞增殖水平,对 CpG ODN 佐剂的免疫调节活性进行筛选分析。

6. CpG ODN 佐剂序列与人类基因组序列同源性比较:为了比较 CpG ODN 佐剂序列与人类基因组序列是否具有同源性。采用目前所通用的核酸序列同源性检索方式,利用 GenBank 数据库中收录的 EST 序列进行同源性检索,检索与其同源的核酸序列。典型分析是采取 NCBI 的 Blast 软件对 GenBank 中的非冗余数据库进行查询。该数据库是对 GenBank EMBL 和 DDBJ 中去除所有相同核酸序列进行整合后所得的最为全面的已知基因数据库。在 Blast 里选择人类基因组,再选择 Highly similar sequences (megablast) 进行比对。

7. 统计学方法:数据结果采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,CpG ODN 供试品浓度与标准浓度间的差异以标准偏差计算;MTT 法检测结果中各组 A 值采用单因素方差分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CpG ODN 序列的设计与合成:根据 CpG ODN 序列设计原则,共设计合成 15 条候选 CpG ODN 序列(表 1)。每条分别合成硫代修饰和非硫代修饰各 100A,

HPLC 纯化(纯度达 99% 以上)。同时合成目前已获批进入 III 期临床的 Dynavax 公司 CpG ODN 佐剂 ISS1018 作为阳性对照。

2. CpG ODN 序列的溶解及浓度测定:首先参考标注含量将合成的 CpG ODN 以去离子溶解成 30μg/ml 浓度,然后通过分光光度法测量及计算 CpG ODN 含量。结果显示根据合成公司提供的 A 值进行溶解,非硫代和硫代 CpG ODN 溶解后浓度与理论浓度(30μg/ml)差异较大(标准偏差达 2.0373 和 1.6994)。为保证供试品中 CpG ODN 含量无显著性差异,根据检测结果以去离子水稀释,调整浓度到 20μg/ml,再次测量其浓度。经统计学分析,非硫代和硫代 CpG ODN 供试品浓度与标准浓度(20μg/ml)间的标准偏差为 0.2926 和 0.3256,差异显著小于初次溶解后浓度的差异。

3. 不同 CpG ODN 序列对人 PBMC 免疫刺激活性比较。利用设计出的不同 CpG ODN 序列对人 PBMC 进行体外刺激,用 MTT 法检测各组 A 值。结果显示,15 条非硫代序列中,各 CpG ODN 的 A 值均高于阴性对照组,其中 3、5、11 号序列 A 值分别达到 0.359、0.377 和 0.365,与阳性对照 ISS1018 序列 A 值(0.387)接近,显示出较好的针对人 PBMC 的免疫刺激作用。硫代修饰的 15 条序列中,3、5、9、11、14 号序列 A 值均明显比其他序列高,分别达到 0.320、0.334、0.334、0.336 和 0.339,与阳性对照 ISS1018 序列 A 值(0.338)接近(图 1)。

4. 不同 CpG ODN 序列对小鼠脾细胞免疫刺激活性比较:分离 4~6 周龄雌性 Balb/c 小鼠脾细胞,利用设计出的不同 CpG ODN 序列对脾细胞进行体外刺激,用 MTT 法检测各组 A 值。结果显示,15 条非硫代序列中,各 CpG ODN 的 A 值均高于阴性对照组,其中第 5 和 11 号序列 A 值分别达到 0.571 和 0.509,与阳性对照 ISS1018 序列 A 值(0.588)接近,显示出较好的针对人 PBMC 的免疫刺激作用。硫代修饰的 15 条序列中,3、4、5、11、14 号序列 A 值均明显比其他序列高,分别达到 0.466、0.416、0.486、0.426 和 0.429,与阳性对照 ISS1018 序列 A 值(0.464)接近(图 2)。

5. CpG ODN 佐剂序列与人类基因组序列同源性比较:综合不同 CpG ODN 序列对人 PBMC 细胞和小鼠脾细胞免疫刺激活性比较结果,初步筛选出 IMB-AC5 序列作为新型 CpG ODN 候选佐剂。为评估其安全性,将其序列与人类基因组序列进行同源性比较。

表 1 候选的 CpG ODN 序列

样品编号	佐剂名称	序列(5'→3')
1	IMB-AC1	TCCGGCCGCCGATCGGGGGG
2	IMB-AC2	TCGTGCCGTGCGCCCCC
3	IMB-AC3	TTCGCTTCGCTTTTCGCTTCGCTT
4	IMB-AC4	GGGGACGTCGCCGGGGGGG
5	IMB-AC5	TCGTGCGGTGCGACGTCGCAGGGGGG
6	IMB-AC6	TGCCCCACCGGTGGGGGGG
7	IMB-AC7	TCGTGCGGTGCGACGATCGTCGGGGG
8	IMB-AC8	TCGTGCCGTGCGGGGGGG
9	IMB-AC9	TCGTACGGCCCGCTACGCCGGG
10	IMB-AC10	TCGTGCTCGACTCGTGCTCGGGG
11	IMB-AC11	TCGTGCGGCCCGGAGGGGG
12	IMB-AC12	GGGGTCCATGACGTTCTGAAGGGGG
13	IMB-AC13	TTCTGCTTTGATCGATGTTCTTGGGGG
14	IMB-AC14	TCGTGCTGCTGCTTGCTGTTGGGG
15	IMB-AC15	TAGTAACCGGTCCGGCGCCCC
1018	ISS1018 (Dynavax)	TGACTGTGACGTTTCGAGATGA

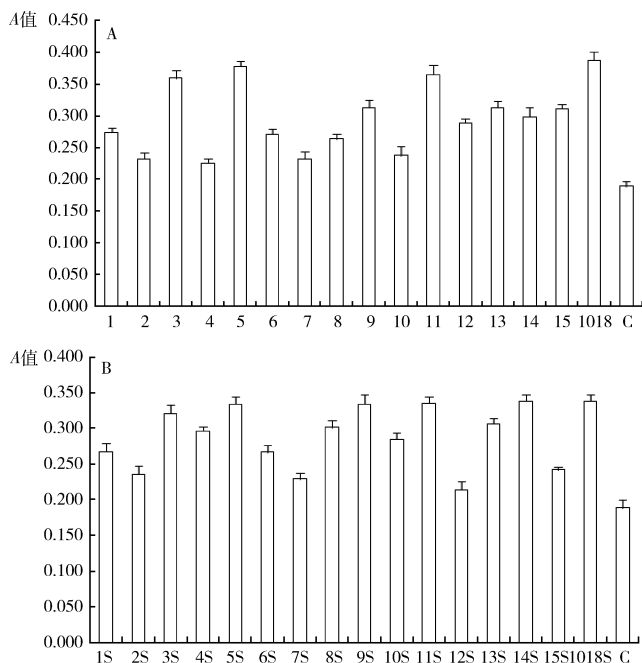


图1 CpG ODN 体外刺激人 PBMC, MTT 法检测结果

A. 非硫代修饰 CpG ODN 序列; B. 硫代修饰 CpG ODN 序列
1018. 阳性对照, 为 Dynavax 公司 ISS1018 序列; C. Control,
为空白 PBMC 细胞对照, 按供试品组方法培养

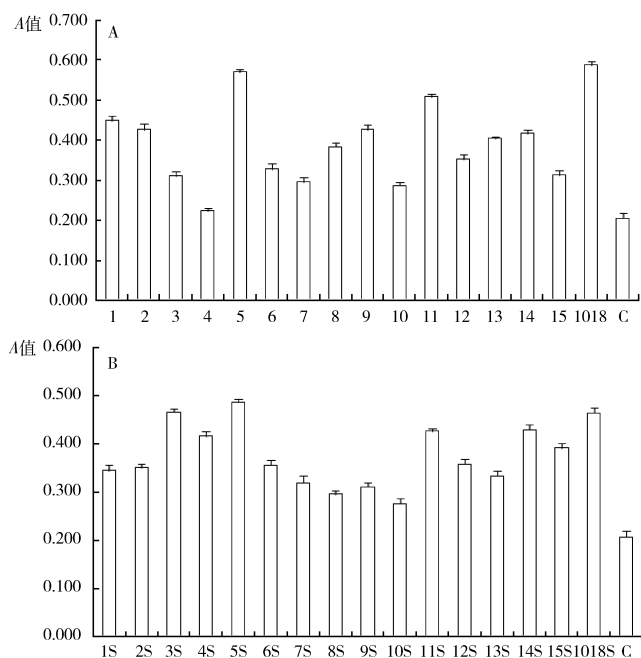


图2 CpG ODN 体外刺激小鼠脾细胞, MTT 法检测结果

A. 非硫代修饰 CpG ODN 序列; B. 硫代修饰 CpG ODN 序列
1018. 阳性对照, 为 Dynavax 公司 ISS1018 序列; C. Control,
为空白小鼠脾细胞对照, 按供试品组方法培养

同源性只有 50% ~ 65%。此外其部分序列与人 18 号染色体上的一些重复序列有同源性, 最高同源性达 62%, 比对结果如图 3 所示, 证明筛选出的新型 CpG ODN 佐剂 IMB - AC5 安全性较高。

讨 论

从 CpG ODN 佐剂成功运用于乙肝疫苗, 使部分对普通乙肝疫苗无免疫应答的人群产生保护后, CpG ODN 佐剂成为了疫苗研发中的一大热点^[10,11]。大量研究表明, 浆细胞来源的树突状细胞 pDC 经 CpG ODN 刺激后能分泌大量的 IFN - α , 后者使 pDC 向淋巴结的边缘区和外测 T 细胞区迁移和募集, 进而更有效地刺激获得性免疫应答。CpG ODN 通过激活 TLR9 信号, 可以与 B 细胞抗原受体信号协同促进初始 B 细胞、已诱发 B 细胞和记忆性 B 细胞的激活, 并进一步分化为分泌抗体分子的浆细胞。虽然除 pDC 和 B 细胞以外的免疫细胞不表达 TLR9, 不能直接被 CpG ODN 激活, 但可以通过其诱生的细胞因子等被间接活化促进免疫反应, 如增强 T 细胞受体介导的 T 细胞的活化; 活化 NK 细胞, 促进其杀伤靶细胞; 诱导单核细胞 CD40、CD69 分子表达上调, 并分泌高水平 IP - 10、IL - 6 和 TNF - α 等。

本研究旨在设计和筛选出具有良好免疫刺激作用的 CpG ODN 佐剂, 为研发具有自主知识产权的 CpG ODN 佐剂疫苗奠定基础。通过专利序列比对, 在设计 CpG ODN 序列的过程中尽量避开国内外已申请专利保护的 CpG ODN 佐剂核心序列, 如 Coley 公司于 2000 年申请的中国专利(专利号: 00814840.6)《免疫刺激性核酸》, 其中涉及核心免疫刺激序列 5' X₁X₂TTTTX₃X₄3', 其中 X₁、X₂、X₃、X₄ 均为核苷酸, 且可以为 A、T、G、C 任意组合。本研究设计的序列均未采用所述序列, 不涉及知识产权问题。

人外周血单个核细胞(hPBMC)由 T 细胞、B 细胞、单核 - 吞噬细胞、树突状细胞等多种细胞组成。人体免疫系统中表达 TLR9 的主要是 B 细胞和浆液样树突状细胞(pDC), 它们分别在适应免疫和固有免疫中占有重要地位。B 型和 C 型 CpG ODN 能促进 B 细胞增殖和分泌抗体, 通过检测免疫调节活性。虽然 CpG ODN 仅作用于具有 TLR9 受体的细胞, 但免疫系统的激活是由多种细胞协同作用产生的, 因此采用人 PBMC 能客观的反映人体自然状态下的免疫反应。

由于 CpG ODN 两侧序列的不同, CpG ODN 可有多种多样的形式, 表现不同性质、不同强度的免疫增强和免疫调节作用。有研究表明, CpG ODN 可表现

比对结果显示, CpG ODN 佐剂 IMB - AC5 总共 23nt, 与人的基因序列没有同源性, 与部分蛋白编码基因的

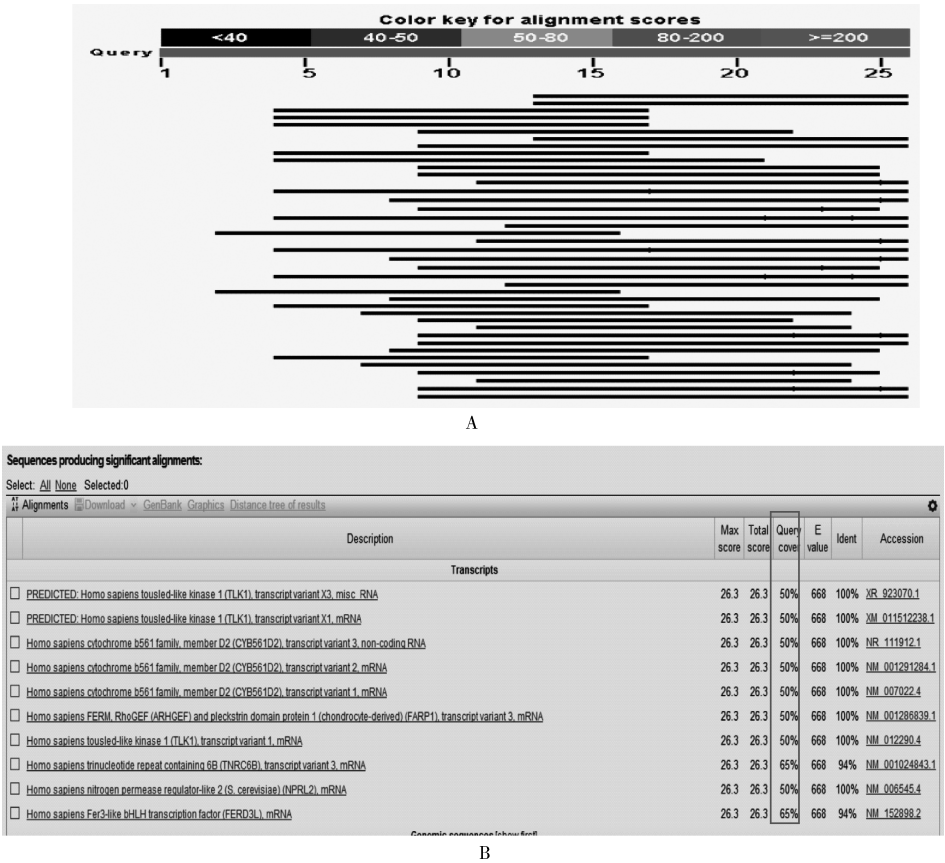


图3 筛选出的 CpG ODN 佐剂序列 IMB – AC5 与人类基因组序列同源性比较
A. IMB – AC5 序列与人类基因组序列的同源性比较; B. IMB – AC5 序列与人类部分蛋白编码基因的同源性比较

出种属依赖性,即对一种动物表现免疫增强功能的 CpG ODN,在另一种动物或人则未必表现出同样的或等效的免疫增强功能。因此本研究采用人 PBMC 和 Balb/c 小鼠脾细胞作为双重筛选依据,进行 CpG ODN 佐剂筛选。既考虑了种属特异性,又考虑到了筛选动物的敏感度及试验的便利性。

大量资料显示硫代修饰的 CpG ODN 序列一般具有更强的免疫刺激作用。对比本研究中非硫代和硫代修饰的 15 条 CpG ODN 序列刺激人 PBMC 细胞和 Balb/c 小鼠脾细胞增殖作用效果,却发现非硫代的 CpG ODN 序列刺激效果普遍高于硫代修饰的序列,可见硫代修饰并非对所有 CpG ODN 佐剂具有增强作用,后续研究均拟采用非硫代 CpG ODN 序列进行。

为评估筛选出的在人 PBMC 细胞和 Balb/c 小鼠脾细胞上具有显著刺激作用的 CpG ODN 序列 IMB – AC5 作为人用疫苗的风险,笔者将其与人类基因组序列进行了同源性比较。结果显示,CpG ODN 佐剂 IMB – AC5 与人的基因序列没有同源性,与部分蛋白

编码基因的同源性只有 50% ~ 65%,部分序列与人 18 号染色体上的一些重复序列有同源性,但最高同源性只达 62%,证明筛选出的新型 CpG ODN 佐剂 IMB – AC5 安全性较高。但单纯性的同源性比较只能作为核酸佐剂安全性评估的参考而非标准,此序列作为人用疫苗佐剂的安全性仍需进一步证明。

参考文献

- 1 Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses[J]. Clin Microbiol, 2009, 22(4):240 – 273
- 2 Kawai T, Akira S. The role of pattern – recognition receptors in innate immunity: update on Toll – likereceptors[J]. Nat Immunol, 2010,11(6):373 – 384
- 3 Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant[J]. Exp Rev Vaccin, 2011,10(4):499 – 511
- 4 Overstreet MG, Freyberger H, Cockburn IA, et al. CpG – enhanced CD8 + T – cell responses to peptide immunization are severely inhibited by B cells[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(8):124 – 133
- 5 Eng NF, Bhardwaj N, Mulligan R, et al. The potential of 1018 ISS adjuvant in hepatitis B vaccines: HEPLISAV review[J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(5):1661 – 1672
- 6 Samulowitz U, Weber M, Weeratna R, et al. A novel class of immune – stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in

- type I interferon induction with preferred structural properties[J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20(6):93-101
- 7 Tougan T, Aoshi T, Coban C, *et al.* TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models[J]. *Human Vaccin Immunother*, 2013, 9(2):283-290
 - 8 Cooper C, Mackie D. Hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine: a review of HEPLISAV safety and efficacy[J]. *Expert Rev Vaccin*, 2011, 10(4):417-427
 - 9 Cooper CL, Davis HL, Morris ML, *et al.* CPG 7909, an Immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to engerix-B? HBV vaccine in healthy adults: A Double-Blind Phase I/II Study[J]. *J Clin Immunol*, 2004, 24(9):693-701
 - 10 Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, *et al.* Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(8):3086-3091
 - 11 Lee B. L, Barton G. M. Trafficking of endosomal Toll-like receptors[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(6):360-369
- (收稿日期:2015-09-18)
(修回日期:2015-11-02)

常规超声诊断困难的甲状腺结节的超声造影定性及定量研究

吴 琼 姜玉新 房世保 李建初 赵瑞娜 徐景竹 杨 筱 朱沈玲 赖兴建 张晓燕 刘如玉 张 波

摘 要 **目的** 探讨超声造影定性指标及定量参数对常规超声诊断困难的甲状腺结节的诊断价值。**方法** 在2011年11月~2015年12月就诊于北京协和医院的甲状腺结节患者中,前瞻性纳入常规超声诊断困难结节,65例患者共71个结节,所有患者均经手术治疗,术前均行常规超声和超声造影检查。以手术病理结果为金标准,分析超声造影灌注模式及时间强度曲线指标在良恶性鉴别中的意义。**结果** 恶性组10个(14.1%)结节,其中5个乳头状癌,5个滤泡癌;良性组61个(85.9%)结节,其中44个(72.1%)结节性甲状腺肿,14个(23.0%)腺瘤,3个(4.9%)桥本甲状腺炎。恶性组最大径 2.80 ± 1.48 cm,良性组最大径 2.89 ± 1.35 cm,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。超声造影灌注增强模式在良恶性组间差异有统计学意义($P < 0.05$),不均匀增强的模式更易发生于恶性病变,诊断敏感度、特异性、阳性预测值及阴性预测值分别为50.0%、95.1%、62.5%、92.1%。余超声造影定性指标(增强方向、增强程度)和超声造影定量参数(增强始增时间、达峰时间、峰值强度、峰值降半时间和相对达峰时间、相对达峰强度)在良恶性病变中差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 超声造影增强模式有助于鉴别常规超声诊断困难的甲状腺结节,其他指标均无法有效鉴别良恶性。

关键词 甲状腺结节 甲状腺癌 超声造影 时间强度曲线

中图分类号 R445

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.010

Qualitative and Quantitative Diagnosis of Indeterminate Thyroid Nodules Evaluated by Conventional Ultrasound Using Contrast-enhanced Ultrasound. Wu Qiong, Jiang Yuxin, Fang Shibao, *et al.* Department of Ultrasound, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong 266003, China

Abstract Objective To explore the value of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in qualitative and quantitative diagnosis of indeterminate thyroid nodules evaluated by conventional ultrasound (CUS). **Methods** From November 2011 to December 2015 at Peking Union Medical College Hospital, 71 thyroid nodules in 65 patients were prospectively enrolled in this study. All of them had surgical excision, and CUS and CEUS examinations were performed before operation. With surgical pathology as gold standard of diagnosis, the value of patterns of CEUS and indices of time-intensity curves in the differentiation of indeterminate thyroid nodules was analyzed. **Results** There were 10 nodules (14.1%) in malignant group (5 papillary thyroid carcinomas and 5 follicular carcinomas), 44 nodules (85.9%) in benign group (44 goiters, 14 adenomas and 3 Hashimoto's thyroiditis). There was no statistical difference between the largest diameter

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81541131);国家国际科技合作专项基金资助项目(2015DFA30440);北京市科技新星计划项目(Z131107000413063)

作者单位:266003 青岛大学附属医院超声诊断科(吴琼、房世保);100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院超声医学科(吴琼、姜玉新、李建初、赵瑞娜、徐景竹、杨筱、朱沈玲、赖兴建、张晓燕、刘如玉、张波)

通讯作者:张波,电子邮箱:zora19702006@163.com