

CFP10 蛋白时间分辨荧光免疫分析法在结核性胸腔积液中的诊断价值

邓岚兰 陈海霞 安 军 张洪涛 刘静仪 李卫民 高基民

摘要 目的 对基于时间分辨荧光免疫分析技术(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)诊断结核性胸腔积液的新方法进行临床评价。方法 共收集 191 例疑似结核性胸腔积液标本。采用 TRFIA 检测胸腔积液标本中结核分枝杆菌培养滤液蛋白-10(CFP10),并与培养、涂片及 T. SPOT. TB 进行比较。结果 有效检测标本 174 例,其中 100 例临床综合诊断为结核性胸腔积液,74 例诊断为非结核性胸腔积液。以临床综合诊断为金标准,CFP10 蛋白时间分辨荧光免疫分析法(CFP10-TRFIA)检测结核性胸腔积液患者的敏感度为 42% (42/100) 高于细菌学方法($P < 0.05$),特异性为 90.5% (67/74) 优于 T. SPOT. TB ($P < 0.05$),阳性预测值为 84% (42/50),阴性预测值为 53.2% (66/124)。其中 24 例培养阳性患者中,CFP10-TRFIA 共检测出 24 例。结论 CFP10-TRFIA 可提高结核性胸腔积液的检出率,可作为结核性胸腔积液的快速诊断工具并为临床及时治疗提供参考。

关键词 结核病 胸腔积液 培养滤液蛋白-10 时间分辨荧光免疫分析

中图分类号 R52.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.021

Diagnostic Value of CFP10 Time-resolved Fluoroimmunoassay in Tuberculosis Pleural Effusion. Deng Lanlan, Chen Haixia, An Jun, et al. Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To evaluate the mycobacterium tuberculosis specific antigen culture filtrate protein10 time-resolved fluoroimmunoassay (CFP10-TRFIA) for the diagnosis of tuberculous pleural effusion(TPE). **Methods** A total of 191 suspected TPE patients were enrolled. CFP10-TRFIA were performed and compared with culture, acid fast stain and T. SPOT. TB. **Results** Eventually 174 sample results were analysed, of which 100 patients were diagnosed as TPE, and 74 patients were diagnosed as non-tuberculosis pleural effusion according to the composite reference standards(CRS). The sensitivity of CFP10-TRFIA (42%, 42/100) was higher than bacteriologic methods ($P < 0.05$), the specificity (90.5%, 67/74) was higher than T. SPOT. TB ($P < 0.05$), PPV and NPV of CFP10-TRFIA in diagnosing TPE was 84% (42/50) and 53.2% (66/124). Also, CFP10-TRFIA has identified all 24 culture positive samples. **Conclusion** CFP10-TRFIA can enhance the detection rate of TPE and provide treatment reference for clinicians as a fast diagnosing technic.

Key words Tuberculosis; Pleural effusion; CFP10; Time-resolved fluoroimmunoassay

结核性胸膜炎是结核分枝杆菌及其自溶产物、代谢产物进入超敏感机体的胸膜腔而引起的胸膜炎症,是最为常见的肺外结核之一^[1,2]。据估算,我国每年胸腔积液的病例数 693 万左右,其中结核性胸腔积液比例为 46.7%^[1]。结核杆菌侵入人体后,特异性菌体抗原蛋白出现的时间早于宿主抗体,而且大多数肺外结核是由于结核菌体抗原蛋白诱导的免疫反应,而非菌体本身诱导的免疫反应^[3]。因此,特异性抗原蛋白的检测对结核性胸腔积液的早期诊断意义重大。研究发现,培养滤液蛋白-10(10kDa culture filtrate

antigen, CFP10)的编码基因在 RD1 区,该区在卡介苗和绝大多数的非致病性分枝杆菌中缺失(除外海分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、苏加分枝杆菌等),为结核分枝杆菌复合群特异性蛋白^[4]。时间分辨荧光免疫分析技术的敏感度完全可与放射免疫分析技术相媲美,甚至超过放射免疫分析的水平,利用镧系金属离子(如 Eu^{3+})作为示踪物进行标记, Stokes 位移达 200nm,镧系元素离子螯合物荧光的衰变时间为传统荧光的 103~106 倍,可以有效克服样品背景荧光强度高、干扰强等其他免疫荧光技术的缺点^[5]。因此通过此技术检测 CFP-10 蛋白不失为诊断结核病的手段之一。本研究前期建立了 CFP10 蛋白时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluoroimmunoassay, CFP10-TRFIA),设立 cut-off 值为 0.8ng/ml,在此基础上对该方法进行了小规模临床评价,探讨其对结

基金项目:北京市通州区科技创新项目(KJ2017CX046)

作者单位:325035 温州医科大学(邓岚兰、陈海霞、刘静仪、高基民);100010 首都医科大学附属北京胸科医院(安军、张洪涛、李卫民)

通讯作者:高基民,电子信箱:jimingao64@163.com

核性胸腔积液的诊断价值^[6]。

对象与方法

1. 研究对象:收集于 2016 年 3 月~2017 年 6 月期间在北京胸科医院住院的患者胸腔积液标本 191 例。(1)结核性胸腔积液诊断金标准参考临床综合诊断(CRS)^[7]:①胸腔积液结核分枝杆菌培养阳性(涂片镜检阳性或阴性);②涂片镜检阳性且影像学检查提示结核病灶;③胸膜病理学检查符合结核表现;④上述结果检测结果均阴性,但有临床症状如低热、盗汗、乏力、渗出性胸腔积液等且抗结核治疗有效。(2)非结核性胸腔积液诊断标准为:细菌学、组织病理学或血清学等检查诊断为其他疾病引起的胸腔积液。(3)疑似病例纳入标准:①患者胸腔积液为渗出性且年龄 ≥ 18 岁;②有典型的临床症状(发热、盗汗、体重减轻、咳嗽等);③胸部 CT 提示结核病灶;④不能做出其他临床诊断,但结核病诊断性治疗有效者。所有患者均需符合指标①,其余各项指标至少符合一项。(4)排除标准:①年龄 < 18 岁;②无培养、涂片、T. SPOT. TB 检查结果;③标本污染或怀疑污染。

2. 仪器与试剂:(1)主要仪器:EnVision™ Multilabel Reader(美国 PerKin Elmer 公司);DEM-3 型自动洗板机(广州佛山达安医疗设备有限公司);Oscillator KJ0291C 微量振荡器(北京拓扑分析仪器有限公司);Sephadex-50 离子交换层析柱(厦门亿辰科技有限公司);96 孔微孔板(美国 Corning 公司)。(2)主要试剂:牛血清白蛋白(美国 Amersco 公司);CFP10 单克隆抗体 C01398M 和 C01400M(美国 Meridian Life Science 公司);Eu³⁺ 标记试剂(美国 PerKin Elmer 公司);分析缓冲液(美国 PerKin Elmer 公司);荧光增强液:含有 15 $\mu\text{mol/L}$ β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA),0.1% Triton X-100,50 $\mu\text{mol/L}$ 三正辛基氧化膦(TOPO)(美国 PerKin Elmer 公司),CFP10 蛋白标准品(由北京胸科医院中心实验室提供);Wallac Eu³⁺ 标记试剂盒(美国 PerKin Elmer 公司)。

3. 胸腔积液中 CFP10 抗原的检测:(1)标本收集及处理:由临床医师采用盐酸利多卡因局部麻醉、B 型超声引导下进行胸腔穿刺引流收集患者胸腔积液标本送检验科。应尽快对标本进行处理,过程为:①10ml 胸腔积液标本离心,条件为:4℃,8000r/min,15min;②将上清液分装至已灭菌的 EP 管中,每个标本分装 3 管,每管 1ml,并进行编号,于-80℃保存。其他检测方法均按照本实验室操作流程严格执行

行^[8]。(2)Eu³⁺ 标记抗体按待标志物:EuNa = 5:1 (质量比)加入钕标配体,过夜。用 G-50 凝胶层析柱纯化,时间分辨荧光免疫仪检测,收集第一峰。对包被抗体浓度优化:分别取 3、6、12 $\mu\text{g/ml}$ 的抗体进行包被,加入 CFP10 和 Eu³⁺ 标记抗体,观察荧光值变化。Eu³⁺ 标记抗体浓度优化:以 3 $\mu\text{g/ml}$ 抗体进行包被,加入 CFP10,洗涤后,分别加入 0.4、0.8、1.6、3.2 $\mu\text{g/ml}$ Eu³⁺ 标记抗体,荧光值为 3 个复孔取平均值。(3)CFP10-TRFIA 检测:用 PH9.6 的碳酸氢钠缓冲液稀 C01400M 特异性单克隆抗体至 3 $\mu\text{g/ml}$,加入 100 微升/孔于 96 孔板,4℃包被过夜,每个样品设置两个副孔。用 2% BSA 溶液封闭 2h。扣干,加入 100 微升/孔待测样品,37℃孵育 3h。洗板 4 次,再加入 100 微升/孔用分析缓冲液稀释的 Eu³⁺ 标记抗体(C01398M),孵育 45min,洗板 6 次,再加入荧光增强液,每孔 150 μl ,避光震荡孵育 15min,上机检测,检测值代入标准曲线计算,结果大于 0.8ng/ml 被认为是阳性结果。

4. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析处理,年龄等计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。文中计算公式:敏感度(%) = 真阳性/(真阳性 + 假阴性) $\times$ 100%,特异性 = 真阴性/(真阴性 + 假阳性) $\times$ 100%,阳性预测值(%) = 真阳性/(真阳性 + 假阳性) $\times$ 100%,阴性预测值(%) = 真阴性/(真阴性 + 假阴性) $\times$ 100%。

结 果

1. 患者基本资料:共纳入胸腔积液患者 191 例。排除 17 例无培养或涂片或 T. SPOT. TB 检查结果的标本。其中 100 例为结核性胸腔积液,男性 72 例,女性 28 例,中位年龄 38 ± 15 岁(18~82 岁)。非结核性胸腔积液 74 例,中位年龄 46 ± 10 岁(21~80 岁)。非结核性胸腔积液包括恶性胸腔积液患者(32 例)、类肺炎旁胸腔积液(2 例)、肾病综合征(10 例)、脓胸(18 例)、系统性红斑狼疮(3 例)、类风湿关节炎(6 例)、淋巴导管阻塞(3 例)。

2. Eu³⁺ 标记抗体结果:收集的第一峰为 Eu³⁺ 标记抗体(图 1)。包被抗体浓度确定为 3 $\mu\text{g/ml}$ 。Eu³⁺ 标记抗体浓度优化,结果荧光值为 24967、46855、46764、48752,因此标记抗体浓度确定为 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 。

3. CFP10-TRFIA 检测结核性胸腔积液结果:以临床综合诊断为金标准,CFP10-TRFIA 共检测标本

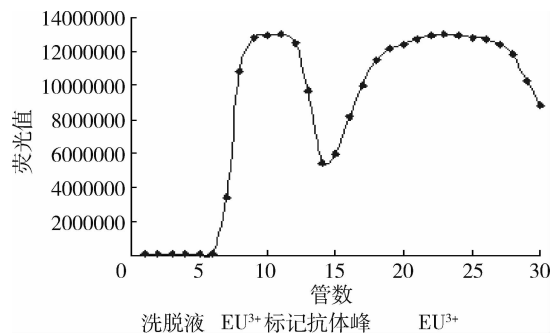


图 1 Eu^{3+} 标记抗体峰位图

表 1 CFP-10 TRFIA、结核分枝杆菌快速培养、涂片及 T.SPOT. TB 检测结核性胸腔积液结果

临床综合诊断	n	CFP-10 TRFIA		结核分枝杆菌快速培养		涂片		T.SPOT. TB	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	100	42	58	24	76	16	84	73	27
阴性	74	7	67	0	74	0	74	19	55
合计	174	49	125	24	150	16	158	92	82

表 2 CFP-10 TRFIA 检测结核性胸腔积液结果与培养、涂片、T.SPOT. TB 检测的敏感度、特异性等比较

检测方法	敏感度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
CFP-10 TRFIA	42% (42/100)	90.5% (67/74)	84% (42/50)	53.2% (66/124)
培养	24% (24/100) *	100% (74/74)	100% (24/24)	49.3% (74/150)
涂片	16% (16/100) *	100% (74/74)	100% (16/16)	46.8% (74/158)
T.SPOT. TB	73% (73/100) *	74.3% (55/74) *	79.3% (73/92)	67.1% (55/82)

与 CFP-10 TRFIA 比较, * $P < 0.05$

讨 论

目前,针对结核分枝杆菌的体外分离培养仍是结核病诊断的金标准^[9]。其缺点是敏感度低、培养周期长(4~8周),虽然 Bactec 分枝杆菌培养/鉴定/药敏系统可将阳性标本检出时间缩短至平均 2 周,但对肺外结核,包括结核性胸腔积液的敏感度仅为 0~25%,影响治疗和预后^[10,11]。本研究中胸腔积液结核分枝杆菌快速培养敏感度为 24% (24/100),与报道相符,特异性 100% (74/74)。涂片的敏感度仅为 16% (16/100),特异性 100% (74/74) (表 2),细菌学的诊断方法都难以突破“慢”的限制,且敏感度远远不能满足临床诊疗的需求。

Wong 等^[12]报道,结核分枝杆菌的早期分泌蛋白 (ESAT-6, 早期分泌抗原靶 6) 可诱导 NLRP3 的活化 (NLRP3 为一种炎症小体) 从而可诱发巨噬细胞的坏死和炎症反应。另外有研究提示,炎症渗出表现为 CAMP/CG MP 的失衡,结核分枝杆菌存在与 CAMP 信使密切相关的基因,例如 Rv1264、Rv1647 和 Rv2212 等^[13]。这些基础研究均支持结核病的炎

性渗出、坏死与结核菌的抗原蛋白相关,CFP10 是结核分枝杆菌感染早期分泌蛋白,主要存在于致病性结核分枝杆菌中,由结核分枝杆菌致病性的决定性编码区 RD-1 区基因编码,在卡介苗中缺失^[14,15]。因此 CFP10 可作为活动性结核的早期诊断标志物,具有诊断性抗原的优势^[16]。TRFIA 具有以下优点:①敏感度高,检测下限为 1 pmol,达到或超过放射免疫分析水平;②线性范围宽,可达 6 个数量级,远宽于 ELISA 的线性范围;③不受样品中自然荧光干扰,背景低^[5]。Ding 等^[17]利用此技术检测宫颈组织中 p16INK4a 蛋白,与免疫组化检测结果基本一致,且操作简便对检测条件要求低。也有研究将 TRFIA 用于细胞角蛋白 19 片段、癌抗原 50 等肿瘤标志物的检测,均发现其有较高的敏感度^[18,19]。

4. 各检测方法比较:CFP10-TRFIA 检测结核性胸腔积液 CFP10 蛋白的敏感度 (42%, 42/100) 高于结核分枝杆菌快速培养 ($\chi^2 = 32.868, P = 0.000$), 高于涂片 ($\chi^2 = 15.264, P = 0.000$), 特异性 (90.5%, 67/74) 高于免疫学方法 T.SPOT. TB ($\chi^2 = 8.481, P = 0.010$, 表 2)。

在此基础上对本课题组建立的 CFP10-TRFIA 进行小规模临床评价。以临床综合诊断为金标准,CFP10-TRFIA 检测结核性胸腔积液的敏感度为 42% (42/100), 特异性为 90.5% (67/74)。与传统检

测方法——培养和涂片相比,CFP10-TRFIA 的敏感度明显优于传统检测方法 ($P < 0.05$), 特异性与培养和涂片无统计学意义差异 ($P > 0.05$)。虽有文献报道 T.SPOT.TB 检测结核性胸腔积液标本的敏感度为 92.7%, 特异性为 94.5%^[20]。但本研究中 T.SPOT.TB 检测结核性胸腔积液的敏感度为 73% (73/100), 而特异性仅为 74.3% (55/74) (表 2)。此外 CFP10-TRFIA 可将检测时间缩短至一天, 大大提高了检测效率。但其敏感度较免疫学诊断方法—T.SPOT.TB 低, 分析其原因可能为: ① CFP10 为结核感染早期分泌抗原, 在抗结核治疗后由于 M.TB 停止复制, 被免疫系统清除; ② 部分结核性胸腔积液患者还合并有糖尿病、营养不良等疾病, 移植术后服用免疫抑制剂导致机体免疫功能状态低下, 感染结核菌后不能有效激发体内免疫反应; ③ 有研究表明 CFP10 蛋白和 ESAT-6 蛋白在功能上相互影响, 且 ESAT-6 的分泌表达才能保证其同时发挥强烈的免疫原性作用, 因此后期将增加 ESAT-6 这个指标^[21]。另外有研究用 TRFIA 双标记方法检测动脉粥样硬化患者血清中 Lp-PLA2 和 HsCRP, 与现有的单标记方法相比有较高的敏感度和特异性, 这可能也是提高检测敏感度的一个方向。

CFP10-TRFIA 检测结核性胸腔积液的特异性为 90.5% (67/74), 高于本研究中 T.SPOT.TB, 但仍有 7 例临床诊断为非结核性胸腔积液的标本检测结果为阳性, 其中两例为肺癌胸腔积液标本, 查看病例为曾患有肺结核, 可能体内存在还未被完全清除的抗原。另外 5 例并未找到结核病的临床及细菌学证据, 其假阳性的出现可能与医院特殊环境有关, 住院期间存在一定的结核患者接触, 但具体原因有待进一步研究。另外因本研究中标本大部分为菌阴性标本, 采用临床综合诊断为金标准可能会使检测结果判读有一定误差。在 24 例培养阳性患者中, 采用 CFP10-TRFIA 共检测出 24 例, 检出率 100%, 在涂片阳性病例中, 采用 CFP10-TRFIA 共检测出 15 例, 检出率为 93.8% (15/16)。

免疫学诊断是实现结核病早期快速诊断的突破口, 但在结核病免疫学诊断方法上的探索仍然任重而道远。尽管 CFP10 具有作为结核分枝杆菌诊断性抗原的优势, 且 CFP10-TRFIA 的敏感度和特异性与现有临床诊断方法相比也有一定优势, 但敏感度仍然有待提高。目前其可作为优于其他辅助检查的一项新的检查手段。

参考文献

- 1 钟南山. 呼吸病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012
- 2 Light RW. Update on tuberculous pleural effusion[J]. *Respirology*, 2010, 15(3): 451-458
- 3 Algood HM, Chan J, Flynn JL, *et al.* Chemokines and tuberculosis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(6): 467-477
- 4 Baghani AA, Soleimanpour S, Farsiani H, *et al.* CFP10: mFcy2 as a novel tuberculosis vaccine candidate increases immune response in mouse:[J]. *Iranian J Basic Med Sci*, 2017, 20(2): 122-130
- 5 Chris Maple PA, Gunn A, Sellwood J, *et al.* Comparison of fifteen commercial assays for detecting Varicella Zoster virus IgG with reference to a time resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) and the performance of two commercial assays for screening sera from immunocompromised individuals[J]. *J Virol Method*, 2009, 155(2): 143-149
- 6 Lu J, Zou L, Liu B, *et al.* Development of a time-resolved fluoroimmunoassay of CFP-10 for rapid diagnosis of tuberculous pleural effusion[J]. *Tuberculosis*, 2015, 95(4): 426
- 7 中华人民共和国卫生部. 中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009
- 8 Organization WH. Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children: Policy Update[J]. *Economic History Rev*, 2011, 58(4): 765-796
- 9 Verghese VP, Thomas L, Michael J S, *et al.* Accuracy of the Xpert MTB/RIF assay compared to the "gold standard" AFB culture in the diagnosis of tuberculosis in children in India[J]. *Int J Infect Dis*, 2016, 45: 343
- 10 Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006[J]. *Chest*, 2007, 131: 880-889
- 11 Zhai K, Lu Y, Shi H. Tuberculous pleural effusion. [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(7): E486
- 12 Wong KW, Jr WR. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by mycobacterium tuberculosis [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(9): 1371-1384
- 13 Knapp GS, McDonough KA. Cyclic AMP Signaling in mycobacteria [J]. *Microbiol Spect*, 2014, 2(2):
- 14 Converse SE, Cox JS. A protein secretion pathway critical for mycobacterium tuberculosis virulence is conserved and functional in mycobacterium smegmatis [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(4): 1238
- 15 Lewis KN, Liao R, Guinn KM, *et al.* Deletion of RD1 from mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guérin attenuation[J]. *J Infect Dis*, 2003, 187(1): 117
- 16 Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, *et al.* Optimizing antigen cocktails for detection of mycobacterium bovis in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6+CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 44(12): 4326-4335

(转第 52 页)

HBx - Mut120 的 HepG2 细胞均能检测到 HBx 蛋白的表达,但突变体 HBx - Mut120 细胞所表达的蛋白条带较前者稍短,而未转染及转染空载体的 HepG2 细胞未检测出 HBx 蛋白,再次证明此实验已成功构建并稳定表达 HBx 蛋白的 HBx - 120 - HepG2 和 HBx - HepG2 这两种细胞系。经流式细胞术检测细胞周期后发现,稳转 HBx 及 HBx - Mut120 目的基因的细胞增殖能力明显强于其他两组对照组,且突变体较野生型的细胞系增殖能力也稍强,提示目的基因能促进 HepG2 细胞增殖。

综上所述,相信本研究建立的这种稳定 HepG2 细胞系的建立不仅为进一步研究缺失型的 HBx 基因所表达 HBx 蛋白的突变体在肝癌细胞的增殖、生物学作用及分子机制等方面提供了实验素材,亦将来临床上肝细胞肝癌治疗方案的研究奠定了基础。

参考文献

- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator[J]. *Gastroenterol*, 2001, 36:651 - 660
- Sun H, Gao Y, Lu K, *et al.* Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/b - catenin signaling pathway [J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13:307
- Liu J, Ni W, Xiao M, *et al.* Decreased expression and prognostic role of mitogen - activated protein kinase phosphatase 4 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(4):756 - 765
- 王丽君,卜文哲,陈华.等.TACE 联合替卡韦治疗乙型肝炎相关厚发性肝癌回顾性分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(20):1617 - 1622
- Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus[J]. *Viruses*, 2012, 4(11):2945 - 2972
- Liu H, Xu L, He H, *et al.* Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(12):2072 - 2081
- Geng X, Huang C, Qin Y, *et al.* Hepatitis B virus X protein target Bcl - 2 protein to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(45):18471 - 18476
- Assar S, Arababadi MK, Ahmadabadi BN, *et al.* Occult hepatitis B virus (HBV) infection: a global challenge for medicine [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(11 - 12):1225 - 1230
- Arzumanyan A, Sambandam V, Clayton MM, *et al.* Hedgehog signaling blockade delays hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22):5912 - 5920
- 王宏利,沙小莹,郭雅玲,等.乙肝相关性肝癌组织中 HBx 和 CEACAM1 的表达水平及意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2016, 3(20):384 - 388
- 潘颖. X 蛋白的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(13):1485 - 1487
- Huang J, Deng Q, Wang Q, *et al.* Exome sequencing of hepatitis B virus - associated hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(10):1117 - 1121
- Wang F, Xia XM, Wang JL, *et al.* Notch1 signaling contributes to the oncogenic effect of HBx on human hepatic cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(1):29 - 37
- 杨盛力,张小玲,刘利平,等.乙肝病毒 X 蛋白通过激活 NF - κ B 信号通路上调耐药相关蛋白表达的表达式 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(1):54 - 58
- Cho HK, Kim SY, Kyaw YY, *et al.* HBx induces the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via API over - expressed as a result of ER stress[J]. *Biochem J*, 2015, 466(1):115 - 121
- Chen JJ, Tang YS, Huang SF, *et al.* HBx protein - induced upregulation of microRNA - 221 promotes aberrant proliferation in HBV related hepatocellular carcinoma by targeting estrogen receptor - α [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(2):792 - 798
- Hwang GY, Huang CJ, Lin CY, *et al.* Dominant mutations of hepatitis B virus variants in hepatoma accumulate in B - cell and T - cell epitopes of the HBx antigen [J]. *Virus Res*, 2003, 92:157 - 164
- Tu H, Bonura C, Giannini C, *et al.* Biological impact of natural COOH - terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:7803 - 7810
- 麦丽,杨林,邝建玉,等.乙型肝炎病毒 X 蛋白抑制 p16 蛋白表达及其促进 HepG2 肝癌细胞生长 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(8):614 - 618
- 姚雪兵,杨林,朱建芸,等.野生型及羧基端缺失突变 HBx 对肝癌细胞增殖的影响 [J]. *广东医学*, 2015, 36(24):3742 - 3745
- (收稿日期:2017 - 07 - 30)
- (修回日期:2017 - 09 - 08)
- (接第 85 页)
- Ding L, Chen Q, Fan W, *et al.* Application of a time - resolved fluoroimmunoassay for detection of p16INK4a in cervix [J]. *Ann Diagnostic Pathol*, 2017, 29:7 - 10
- Lin G, Liu T, Hou J, *et al.* A Magnetic nanoparticle - based time - resolved fluoroimmunoassay for determination of the cytokeratin 19 fragment in human serum [J]. *J Fluorescence*, 2015, 25(2):361
- Xie M, Huang H, Hang J, *et al.* Evaluation of the analytical and clinical performances of time - resolved fluoroimmunoassay for detecting carcinoma antigen 50. [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2015, 36(3):265
- Liu F, Gao M, Zhang X, *et al.* Interferon - gamma release assay performance of pleural fluid and peripheral blood in pleural tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83857 - e83857
- 阮巧玲,张文宏.非人类免疫缺陷病毒感染潜伏性结核分枝杆菌感染的预防性治疗策略再思考 [J]. *中华传染病杂志*, 2016, 34(1):1 - 5
- (收稿日期:2017 - 07 - 13)
- (修回日期:2017 - 08 - 07)