

湖北地区非小细胞肺癌 EGFR 基因突变及其意义的研究*

王京伟, 李 艳, 童永清, 吴 薇, 郑红云 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 探讨湖北地区非小细胞肺癌(NSCLC)患者中 EGFR 基因的突变情况,评价湖北地区 EGFR 突变的检测力度,为临床合理选择酪氨酸激酶抑制剂提供可靠的实验依据。方法 采用 PCR-sanger 测序法以及 ADx-ARMS 法检测 2010~2015 年期间 253 例肺癌标本中 EGFR 基因突变情况,探讨不同检测手段的敏感度,探讨不同性别、不同组织分型间 EGFR 不同外显子的突变频率差异及其临床意义。结果 253 例肺癌标本中共检测到突变位点 93 个,以 E19 和 E21 的突变最为常见,占比为 53.76% 和 35.38%。ADx-ARMS 法的 EGFR 总突变检出率明显高于 Sanger 测序法($P=0.001$)。女性肺癌患者的检出率明显高于男性($P=0.001$)。不同组织分型中,腺癌(38.01%)的检出率最高,腺鳞癌(30.77%)与大细胞癌(20%)次之,鳞癌(4.55%)较低。无吸烟史的肺癌患者检出率(51.6%, 81/157)明显高于有吸烟史患者(24%, 12/50)。结论 与 PCR-sanger 测序法相比,ADx-ARMS 法对临床筛选 EGFR-TKI 治疗的受益亚群,预测 EGFR-TKI 疗效更为敏感有意义。湖北地区女性肺癌患者中 EGFR 突变频率明显高于男性,与激素水平变化及吸烟状况有关。

关键词:非小细胞肺癌;EGFR 突变;PCR-sanger 测序;ARMS 扩增

中图分类号:R734.2;R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)03-007-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.003

Detection of Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR) Mutations and the Significance in Patients with Non-small Cell Lung Cancer(NSCLC) of Hubei Province

WANG Jing-wei, LI Yan, TONG Yong-qing, WU Wei, ZHENG Hong-yun

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the prevalence of EGFR mutations in Hubei region, to provide reliable experimental basis for reasonable screening TKI beneficiaries in clinic. **Methods** EGFR mutation of 253 patients diagnosed with NSCLC in Hubei region during 2010 to 2015 was detected by PCR-sanger sequencing and ARMS assay, to investigate the sensitivity of different methods, to explore the frequency and clinical significance of EGFR mutation in different gender, in different histological type and different exons. **Results** 93 of 253 NSCLC patients harbored EGFR mutation, mainly occurred in exon 19 and 21, accounting for 53.76% and 35.38% of the total EGFR mutation rate, respectively. ADx-ARMS method showed higher sensitivity ($P=0.001$). The mutation detection rate of female NSCLC was significantly higher than that of male NSCLC ($P=0.001$). The observed incidence of EGFR mutations in patients with adenocarcinomas (38.01%) was the highest in different histological type, followed by glandular squamous cell carcinoma (30.77%), large cell carcinoma (20%) and squamous cell carcinoma (4.55%). Nonsmoking patients had a higher EGFR mutation frequency (51.6%, 81/157) than those with a history of smoking (24%, 12/50). **Conclusion** ARMS assay was more sensitive and more convenient detection method for clinical screening for EGFR-TKI treatment subpopulation. The mutation rate of female NSCLC was significantly higher than that of male NSCLC in Hubei Province. Speculated that the sexual differences in NSCLC with EGFR mutation frequencies were related to hormone levels and smoking status.

Keywords: NSCLC; EGFR mutation; PCR-sanger sequencing; ARMS

肺癌是世界上最常见的致死性恶性肿瘤之一,发达国家肺癌的发病率和死亡率居男性恶性肿瘤的首位,居女性恶性肿瘤发病率第三位,死亡率第二位^[1],我国肺癌患者的病死率居所有恶性肿瘤首位,其中以非小细胞肺癌(NSCLC)最常见,约占85%,但NSCLC的治愈率和五年生存率却仍小于20%。2004年以来国内外的研究数据均证明EG-

FR基因突变与NSCLC患者接受酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)治疗的有效性密切相关,携带EGFR敏感性基因突变的NSCLC患者可显著提高疾病缓解率并延长无病生存期。目前认为EGFR突变的位点主要集中在E18~E21,以E19和E21最常见,占整个突变的90%左右。提高EGFR突变的检测力度可推广靶向治疗技术的使用范围,有效提

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81200389, 8110059),武汉大学青年教师自主科研项目(2042015Kf0113)。

作者简介:王京伟(1986—),女,博士,主治医师,主要从事分子诊断与个体化医疗,动脉粥样硬化的分子机制,泛素化蛋白质组学研究, Tel: 17771860355, E-mail: sophia_wang03@hotmail.com。

通讯作者:李 艳, E-mail: yanlitf120@yahoo.com.cn。

高 NSCLC 患者的治愈率和五年生存率。

2015 年美国国立综合癌症网络(NCCN)非小细胞肺癌临床指南明确指出 EGFR 变异与 TKIs 治疗有效性相关,强烈支持肺癌患者接受 EGFR 等分子检测,尤其是腺癌患者。美国肺腺癌患者中 EGFR 突变率约为 15%,亚裔人群 EGFR 突变率约为 30%~50%,且大部分是腺癌和支气管肺泡癌,鳞状细胞癌的 EGFR 突变率也有 2.5%。亚裔 NSCLC 患者进行广泛的分子检测是改善治疗效果的关键^[2]。

尽管 EGFR 检测已较为普遍,但其在男女性患者之间的差异至今较少研究,同时湖北地区不同病理类型间 EGFR 基因突变频率差异的研究也未报道。本研究希望通过 ADx-ARMS 法和 PCR-Sanger 法对湖北地区肺癌患者不同性别及不同病理类型患者中 EGFR 突变情况,评价湖北地区 EGFR 突变的检测力度,为选择最佳治疗方案提供可靠的实验依据。本次研究就探讨共收集肺癌标本 253 例,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集武汉大学人民医院 2010 年 2 月~2015 年 7 月经病理组织学确诊为肺癌患者的肺部原发或转移癌标本 253 例,其中男性 152 例,女性 101 例,年龄跨度为 22~85 岁,平均年龄 58.40 ± 10.91 岁;男性患者平均年龄 59.03 ± 11.00 岁,女性患者平均年龄 57.46 ± 10.76 岁。253 例肺癌标本中石蜡组织切片 233 例,肺癌手术切除标本 107 例,支气管镜活检标本 67 例,CT 引导针吸活检标本 44 例,经支气管超声引导针吸活检标本 19 例,胸腔积液 4 例和新鲜手术切除组织 12 例。其中腺癌 171 例,鳞癌 42 例,腺鳞癌 13 例,大细胞癌 5 例,未知病理分型 22 例。疾病分期依据 2015 年 NCCN 非小细胞肺癌临床指南^[2],包括Ⅲ期肺癌 201 例,Ⅳ期肺癌 42 例。上述 253 例晚期肺癌患者中初诊患者 31 例,治疗后复发患者 109 例,持续治疗后进展的 59 例,其他部位肿瘤转移至肺部的 54 例。本研究获得医院医学伦理学委员会批准,临床资料及标本采集均获患者知情同意。

回顾性分析纳入研究的肺癌患者的临床资料,253 例受检者中共收集到 207 例患者的吸烟史,其中 94 例女性患者中有吸烟史者 11 人,远远低于男性患者抽烟比例(18.4%,39/103)。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器:9700 型 PCR 仪、3500dx 型测序仪和 ViiA7 DX 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司);Nanodrop2000 超微量分光光度计(美国 Nano-

Drop 公司);凝胶成像系统(BioSpectrum 公司),Sub-Cell GT Cell 型水平电泳系统(Bio-Rad 公司)。

1.2.2 试剂:石蜡组织 DNA 提取试剂盒和新鲜组织 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司)。人 EGFR 基因突变检测试剂盒(上海源奇生物医药科技有限公司),2×PCR mix buffer(Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本采集:经病理医师鉴定和划分肿瘤区域,区域内的肿瘤细胞含量>80%。用一次性解剖刀刮取 5~10 μm 石蜡切片 3~10 张,新鲜癌组织不少于 0.2 g,胸腔积液和外周血要求不少于 800 μl 胸腔积液上清或血浆。按相应说明书操作提取 DNA,NanoDrop 2000 对核酸样本进行质量评估和浓度检测,DNA 样本置-20℃保存。

1.3.2 PCR 扩增:用巢式 PCR 分别扩增 EGFR 基因 18~21 外显子。引物参照 Paez 等^[3]设计,扩增片段为 400~600 bp,引物由上海 Invitrogen 公司合成。首轮 PCR 总反应体系为 25 μl ,包括模板 DNA 2 μl ,2×PCR mix buffer 12.5 μl ,终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 2 μl ddH₂O 补足至 25 μl 。循环参数:95℃预变性 5 min;95℃30 s,57℃30 s,72℃1 min,共 35 个循环;72℃延伸 5 min。取 PCR 产物 2 μl 进行第二轮 PCR 扩增,步骤同上。PCR 产物经 2 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,采用凝胶成像系统拍照成像,验证 PCR 扩增产物是否为目的片段。

1.3.3 PCR 产物回收:紫外灯下回收目的 DNA 条带,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 DNA,-20℃保存备用。

1.3.4 测序反应:取 BigDye 缓冲液 1.15 μl ,BigDye 0.3 μl ,待测 DNA 1 μl ,正反向引物各 1 μl ,灭菌去离子水补体积为 6 μl 。PCR 扩增条件:98℃变性 2 min 后;96℃10 s,50℃5 s,60℃4 min,25 个循环,然后置 4℃保存。PCR 产物中加入 16 μl 醋酸钠/乙醇混合液,充分振荡,4℃离心后弃上清液;加 70%(v/v)的乙醇 70 μl 洗涤沉淀 2 次。室温干燥沉淀后加 10 μl 的甲酰胺充分溶解 DNA,在 PCR 仪上 95℃热变性 2 min,冰中骤冷待用。将纯化后测序反应产物在 ABI3500dx 型测序仪上进行测序。电泳结束后仪器自动分析彩色测序图谱,其 DNA 最低检出浓度为 20~40 ng/L。

1.3.5 基因序列分析:经 BLAST 软件比较分析测序结果与 NCBI genbank 数据库中 EGFR 序列(NM_005228.3)的差异,分析 EGFR 是否存在突变位点。

1.3.6 PCR 荧光探针法:EGFR 突变检测采用上海吉菲源试剂盒,具体操作参照说明书进行,采用 ADx-ARMS 法通过荧光信号的变化来检测标本 EGFR 基因中 18~21 外显子的 25 个突变点,包括 2 种 E18 突变,16 种 E19 突变,5 种 E20 突变和 2 种 E21 突变。突变情况根据标本内参基因 Ct 值 <38 或 ≥ 38 来判断。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件,组间计数资料比较采用 χ^2 检验($1 \leq T < 5$ 且 $n \geq 40$ 采用校正 χ^2 , $T < 1$ 或 $n < 40$ 采用 Fisher 精确概率法),均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 突变与性别之间的关系 见表 1。不同性别中的基因突变和扩增情况观察发现,女性肺癌患者的 EGFR 突变总检出率, E19 及 E21 突变检出率均高于男性,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。男女患者 E19 突变频率分别为 15.13% 和 26.73%, P 值为 0.023;男女患者 E21 突变分别为 8.55% 和 19.80%, P 值为 0.009;男性患者中检出 T790M 耐药突变 2 例,女性患者检出 1 例,值得注意的是三例患者均同时伴有敏感性突变。

2.2 ADx-ARMS 和 PCR-sanger 测序法检测 EGFR 突变敏感性差异 见图 1,图 2 和表 2。本研究前期采用 PCR-Sanger 法检测肺癌标本 116 例,后期改用灵敏度更高的 ADx-ARMS 法检测肺癌标本 137 例。ADx-ARMS 法检出 19-del + T790M 双突变 2 例,PCR-Sanger 法检出 19-del + T790M 双突变 1 例;E20 的 N771N/S + T790M 双突变 1 例,19-del + E21 的 L858R 双突变 1 例,19-del + E18 的 T693T/I 双突变 1 例,E20 的 R776R/C 和 Q787Q + E21 的 L858L/R 三突变 1 例。ADx-ARMS 法对 EGFR 突变总检出率及 E19-del 突变的检出率均明显高于 PCR-Sanger 法。两种检测手段对其它外显子突变检出率的差异无统计学差异,但 ADx-ARMS 法对 E21 的突变检出率明显高于 PCR-Sanger 法,PCR-Sanger 法可以检出更多

ADx-ARMS 法无法检出的少见突变类型。

2.3 EGFR 突变与患者临床特征的关系 见表 3。不同组织分型患者间的 EGFR 检出率无统计学差异,但腺癌的 EGFR 突变检出率最高,腺鳞癌次之,鳞癌最低。大细胞癌由于受检例数限制无可比性。两种检测方法在腺癌的 EGFR 检出率中差异有统计学意义($P < 0.05$),其它组织类型患者中 EGFR 突变检出率差异无统计学意义。临床选择对腺癌和腺鳞混合癌患者进行 EGFR 基因突变检测居多。其中有吸烟史的晚期肺癌患者中的 EGFR 突变频率为 24%(12/50),无吸烟史的晚期肺癌患者中 EGFR 突变频率为 51.6%(81/157),两者之间的差异有统计学意义。

表 1 不同性别 NSCLC 患者的 EGFR 突变和扩增情况(n)

基因点位	男性($n=152$)	女性($n=101$)	χ^2	P
野生型	113	54		
E18	3	0	2.017	0.156
E19	23	27	5.150	0.023
E20	2	2	0.172	0.678
E21	13	20	6.770	0.009
T790M	2	1	0.055	0.815
多位点检出数	4	3	0.026	0.872
总突变率[$n(\%)$]	39(25.66)	47(46.53)	20.184	0.001

表 2 不同检测方法的基因突变和扩增情况[$n(\%)$]

项 目	PCR-Sanger($n=116$)	ADx-ARMS($n=137$)	χ^2	P
野生型	89	78		
E20(Q787Q)	15	0	-	-
E18(L704L)	1	0	-	-
E18	2	1	-	-
E19	13	37	9.889	0.002*
E20	4	0	-	-
E21	11	22	2.395	0.122
T790M	2	1	-	-
多点检出率[$n(\%)$]	5(4.31)	2(1.46)	-	-
总突变率[$n(\%)$]	27(23.28)	59(43.07)	10.964	0.001*

注: * $P < 0.05$ 。

表 3 ADx-ARMS 法和 PCR-Sanger 测序法检测不同类型标本 EGFR 基因突变

病理类型	n	EGFR 突变检出率[$n/N(\%)$]		χ^2	P	突变频率(%)
		ADx-ARMS	PCR-Sanger			
腺 癌	171	52/115(45.22)	13/56(23.21)	7.738	0.005*	38.01
鳞 癌	22	1/19(6.9)	0/3(0)	0.165	0.684	4.55
腺鳞癌	13	3/7(42.86)	1/6(16.67)	1.040	0.559	30.77
大细胞癌	5	1/4(25)	0/1(0)	0.313	1.000	20
未知	42	9/27(33.33)	4/15(26.67)	0.201	0.739	30.95

注: * $P < 0.05$ 。

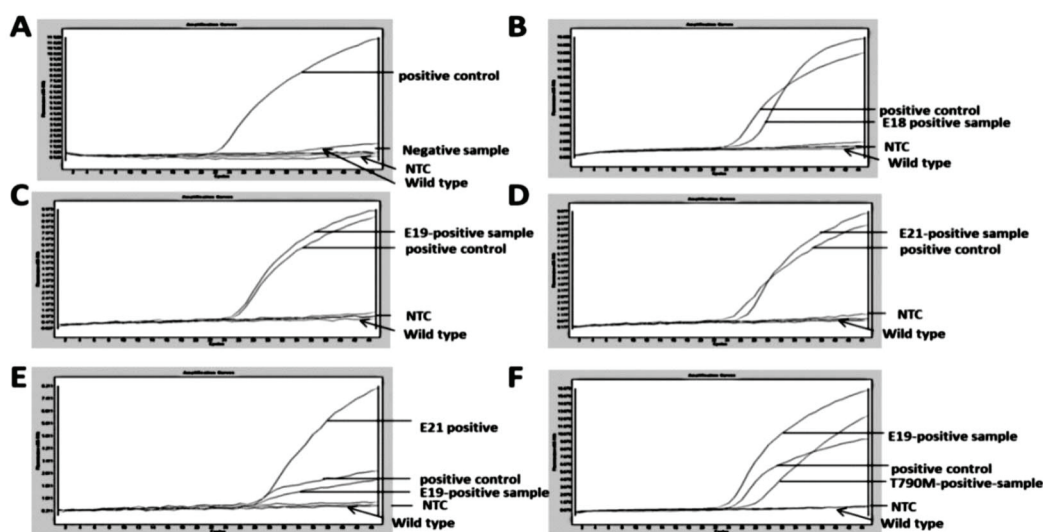


图1 荧光定量PCR扩增曲线

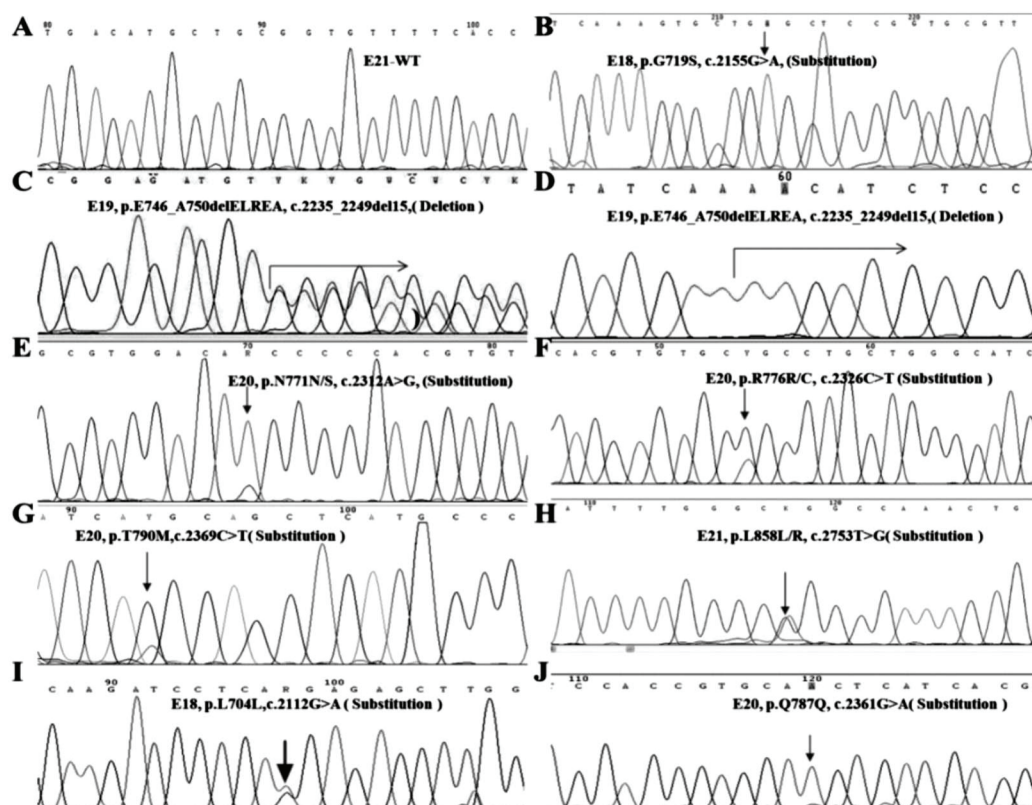


图2 EGFR基因突变测序图谱

3 讨论 EGFR突变检测为临床合理使用靶向药物提供有效指导依据^[4]。不同的EGFR突变类型对TKIs类药物的指导意义不同,如E18的G719A/C/S突变、E19框内缺失突变、E21的L858R突变及L861Q突变等均为TKI敏感性突变,而E20的T790M突变和D770_N771 insG突变则与肿瘤耐药机制有关。此外E20的Q787Q多态性为I和II期肺鳞状细胞癌的独立预后指标,携带该基因多态性的患者提示预后不良^[5]。一代EGFR-TKI对EGFR敏感突变携带者的晚期肺癌

患者有较好的疗效,其效果优于化疗,然而大部分患者10个月左右出现获得性耐药,60%~70%的耐药与T790M有关。所幸EGFR-TKI药物的研发也在不遗余力的同步推进,三代EGFR-TKIs为T790M突变携带者的治疗带来曙光。Rociletinib^[6]和AZD9291^[7]为活性EGFR抑制剂,适用于伴或不伴有T790M突变的EGFR突变患者,T790M阳性患者接受治疗的整体客观反应率及疾病无进展生存期均优于T790M阴性患者。随着靶向治疗的快速发展,需要高灵敏、高特异的检测

技术来指导临床用药。

本研究不同时间段采取 ADx-ARMS 法和 PCR-Sanger 法对我院就诊并接受 EGFR 突变检测的肺癌患者进行研究,253 例肺癌患者的 EGFR 基因突变检出率为 34%,较之前报道的浙江地区^[8](50%)、莆田地区(37.6%)及北京地区^[9](38.78%)肺癌患者 EGFR 突变率低,可能是由于检测方法,纳入研究的患者病理分期、组织类型不同。本研究是近几年来研究 EGFR 突变中标本量最大的一次区域性研究。由于测序法的灵敏度低(10%~25%),后期改用灵敏度高达 1%的 ADx-ARMS 法对临床标本进行检测,证实 ARMS 法较 PCR-Sanger 测序法检测湖北地区 EGFR 突变的灵敏度更高,操作更为简单快捷,适合在临床中广泛应用;测序法可以检测出 ARMS 法不包括的少见突变。此外利用外周血或循环 DNA 大面积筛查靶向治疗受益人群及疾病进展也成为可能^[10]。因此根据临床标本采集难易程度、临床对 EGFR 检出灵敏度需求及检测平台的实力综合考虑选择 EGFR 突变检测手段,可合理的结合 2 种或多种检测手段来为临床提供更为全面可靠的实验依据。

本研究中 EGFR 突变集中在 E19 和 E21,这一结果与以往的研究报道一致^[11]。回顾性分析发现本研究中女性患者平均年龄为 57.46±10.76 岁,处于更年期或绝经期,此阶段女性最大特点为雌激素水平大幅度下降,且女性患者的抽烟比例(11.7%)远远低于男性患者(37.9%),而不吸烟者的 EGFR 突变率要高于吸烟患者^[12]。因此我们推测男女患者间 EGFR 突变频率的差异可能与绝经期激素水平改变及吸烟比例差异有关。不同的组织类型中腺癌的 EGFR 发生率最高,腺鳞癌次之,鳞癌最低,符合 NCCN 指南标准,说明湖北地区肺癌的治疗及 EGFR 的检测力度是符合 NCCN 标准的。检出的 3 例 T790M 突变患者均伴有 EGFR 敏感突变,且均有吸烟史,推测 T790M 突变均为药物诱导型突变。

EGFR-TKI 使用前进行 EGFR, ALK-EML4, KRAS 和 BRAF 等基因的突变检测已经连续几年列入 NCCN 非小细胞肺癌治疗指南中,直接与药物疗效有关,具有重要的临床意义。因此检测肺癌患者 EGFR 突变状态,尤其吸烟指数低,年限短的肺癌患者,对临床筛选不同 EGFR-TKI 获益人群有重要意义,对针对 EGFR 基因的分子靶向药物的个体化治疗、实现精准医疗具有十分重要的临床意义。

本研究为地区性回顾性分析,受样本数以及地区差异的限制,会造成收集病例时存在一定的选择

偏倚,因此还需进一步扩大样本扩大地区范围对本研究的结果进行验证。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. Non-small cell lung cancer, version 6, 2015[J]. J Nat Compr Can Net, 2015, 13(5): 515-524.
- [3] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer; correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science (New York, NY), 2004, 304(5676): 1497-1500.
- [4] 周瑞芳, 卢仁泉. EGFR 基因突变检测的临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(3): 72-74.
Zhou RF, Lu RQ. Clinical application of detecting EGFR mutations[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(3): 72-74.
- [5] Koh YW, Kim HJ, Kwon HY, et al. Q787Q EGFR polymorphism as a prognostic factor for lung squamous cell carcinoma[J]. Oncology, 2016; [Epub ahead of print].
- [6] Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2015, 372(18): 1700-1709.
- [7] Jönne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2015, 372(18): 1689-1699.
- [8] 赵 钊, 陈盼盼, 张 萍. NSCLC 患者 EGFR 基因突变与血清肿瘤标志物相关性分析研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 2217-2219, 2222.
Zhao Z, Chen PP, Zhang P. Association of EGFR gene mutations and tumor markers in patients with non small-cell lung cancer[J]. Chinses Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(15): 2217-2219, 2222.
- [9] 农巧红, 申东兰, 牟尚东. 非小细胞肺癌患者 EGFR 检测的临床意义分析[J]. 中国当代医药, 2014, 21(35): 131-132, 137.
Nong QH, Shen DL, Mou SD. Analysis of clinical significance on EGFR detection in patients with non-small cell lung cancer[J]. China Modern Medicine, 2014, 21(35): 131-132, 137.
- [10] 姜 北, 李 晶, 巩 平. 非小细胞肺癌患者血清 EGFR 基因突变循环 DNA 检测[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(1): 29-33.
Jiang B, Li J, Gong P. EGFR gene mutation detection with circulating DNA and the targeting therapy response in advanced NSCLC patients[J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 21(1): 29-33. (下转 15 页)

SOD活性与血清HCY水平呈负相关。前期研究显示,HCY通过参与脂质代谢和动脉粥样硬化形成,促进冠心病的发生发展^[13]。HCY可以通过巯基发生自身氧化,形成氧自由基,引起血管内皮细胞损伤^[14]。HCY还可以通过抑制细胞抗氧化酶如Mn-SOD的活性,减少活性氧的清除,导致活性氧在组织细胞内聚集,加剧动脉粥样硬化的进展^[15]。Mn-SOD 9 Val等位基因携带者的血清HCY水平增高,自身氧化形成的氧自由基增多,同时抑制了Mn-SOD的活性,减少氧自由基的清除,致使大量氧自由基在体内积聚,增加了冠心病的发病风险。

参考文献:

- [1] Matsushima S, Kuroda J, Ago T, et al. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2013, 112(4): 651-663.
- [2] Altenhöfer S, Kleikers PW, Radermacher KA, et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2327-2343.
- [3] Lee R, Margaritis M, Channon KM, et al. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(16): 2504-2520.
- [4] 姚创利, 赵佳, 黎阳, 等. 锰超氧化物歧化酶9 Ala/Val基因多态性对冠心病的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(2): 1-2, 6.
Yao CL, Zhao J, Li Y, et al. Effects of manganese superoxide dismutase 9 Ala/Val genetic polymorphisms on coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(2): 1-2, 6.
- [5] 杨茂平, 叶林秀, 邱红, 等. 锰超氧化物歧化酶9 Ala/Val基因多态性与冠心病的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2008, 29(6): 775-779.
Yang MP, Ye LX, Qiu H, et al. Association between manganese superoxide dismutase 9 Ala/Val genetic polymorphisms and coronary artery disease[J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2008, 29(6): 775-779.
- [6] Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(10): 1267-1274.
- [7] Erhardt LR, Leiter LA, Hobbs FD. Lipid management in cardiovascular disease prevention guidelines: strategies and tactics for implementation[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(2): 532-541.
- [8] Deedwania P, Singh V, Davidson MH. Low high-density lipoprotein cholesterol and increased cardiovascular disease risk: an analysis of statin clinical trials[J]. *Am J Cardiol*, 2009, 104(10 Suppl): 3E-9E.
- [9] Smith JD. Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein[J]. *J Clin Lipidol*, 2010, 4(5): 382-388.
- [10] Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, et al. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2006, 26(10): 2331-2336.
- [11] Hazen S. HDL structure, function, therapeutics, and imaging[J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2010, 30(2): 138.
- [12] Thomas MJ, Chen Q, Zabalawi M, et al. Is the oxidation of high-density lipoprotein lipids different than the oxidation of low-density lipoprotein lipids[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(6): 1719-1724.
- [13] 赵佳, 姚创利, 左林, 等. 冠心病患者血清同型半胱氨酸对血脂和锰超氧化物歧化酶的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(5): 44-45, 49.
Zhao J, Yao CL, Zuo L, et al. Effects of homocysteine on blood lipid and manganese superoxide dismutase in patients with coronary heart disease[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(5): 44-45, 49.
- [14] Ignashkova TI, Mesitov MV, Rybakov AS, et al. Deposition of von willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine in vitro[J]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 2012(3): 81-86.
- [15] Caylak E, Aytekin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 60(4/5): 289-294.

收稿日期: 2015-03-06

修回日期: 2016-01-23

(上接 11 页)

- [11] 孙宇晶, 刘畅, 龙彦, 等. ADx-ARMS法与PCR-Sanger测序法检测非小细胞肺癌微小标本EGFR基因突变的比较[J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(7): 485-489.
Sun YJ, Liu C, Long Y, et al. Comparison between ADx-ARMS and PCR-Sanger sequencing for EGFR mutation detection in small biopsy samples of non-small cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical*

Laboratory Science, 2014, 32(7): 485-489.

- [12] 李曙东, 田伟, 豆亚伟, 等. 吸烟相关因素与EGFR基因突变状态的关系研究[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2015, 18(9): 1489-1493.
Li SD, Tian W, Dou YW, et al. Relationship between EGFR gene mutation and smoking-related factors[J]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2015, 18(9): 1489-1493.

收稿日期: 2015-12-01

修回日期: 2016-05-13