

化学发光免疫分析法快速检测血清登革热病毒 NS1 抗原方法的建立及初步应用评价

陈翠翠^{1,2}, 梁焕坤¹, 钟树海¹, 陆嫣红¹, 李来庆^{1,2}

(1. 广州优迪生物科技股份有限公司, 广州 510663; 2. 济南市来德生物科技有限公司, 济南 271100)

摘要: **目的** 建立一种化学发光免疫分析法 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 用于血清中登革热病毒 (dengue virus, DENV) NS1 抗原的定量检测。**方法** 先制备 NS1 单抗与吖啶酯发光剂的偶联物, 同时活化磁珠并标记抗 NS1 的配对单抗, 基于双抗体夹心检测技术原理构建定量检测血清中 NS1 抗原浓度的化学发光检测方法。通过对其灵敏度、特异度和参考区间等试验评估其检测性能。取 85 例临床确诊的登革热阳性血清样本和 20 份健康志愿者阴性血清样本, 采用美国 Cortez 公司的登革热 NS1 快速检测试剂盒和该方法进行临床样本验证。**结果** 该方法对血清中 NS1 抗原的检测灵敏度为 1.12 ng/ml, 线性范围在 0.1 ~ 1 000 ng/ml; 与血清中常见干扰物质的交叉反应率均低于 2%, 检测特异度较好; 参考区间的 cut off 值为 3.66 ng/ml; 对临床样本的检测准确度较高, 与 Cortez 公司 NS1 检测试剂盒比较无显著性差异 (χ^2 检验 $P=1.000$, 一致性检验, $Kappa=0.876$)。**结论** 建立了一种可定量检测血清中登革热病毒 NS1 抗原的 CLIA 法, 该方法具有高灵敏度、高准确度、操作简单和方便快捷等优点, 有望为登革热临床样品的早期准确筛查提供一种新的选择。

关键词: 登革热病毒; NS1 抗原; 化学发光免疫分析法; 吖啶酯; 磁珠

中图分类号: R373.33; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 03-176-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.032

Establishment and Preliminary Evaluation of Chemiluminescence Immunoassay Method for Rapid Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Serum

CHEN Cui-cui^{1,2}, LIANG Huan-kun¹, ZHONG Shu-hai¹, LU Yan-hong¹, LI Lai-qing^{1,2}

(1. Guangzhou Youdi Biotechnology Co. Ltd, Guangzhou 510663, China; 2. Jinan Laide Biotechnology Co. Ltd, Jinan 271100, China)

Abstract: **Objective** To establish a chemiluminescence immunoassay (CLIA) for quantitative detection of dengue virus (DENV) NS1 antigen in serum. **Methods** The conjugation of NS1 monoclonal antibody and acridine ester luminescent agent was prepared, and the magnetic beads were activated at the same time to label the paired monoclonal antibody against NS1. Based on the technical principle of double antibody sandwich detection method, a CLIA method was constructed to quantitatively detect the concentration of NS1 antigen in serum. The detection performance was evaluated by sensitivity assays, specificity assays and reference interval assays. 85 dengue positive serum samples and 20 negative serum samples of healthy volunteers were taken for clinical sample verification with the dengue NS1 rapid detection kit of Cortez and this method. **Results** The sensitivity of this method to detect NS1 antigen in serum was 1.12 ng/ml, and the linear range was 0.1~1 000 ng/ml. The cross reaction rates with common interfering substances in serum were all lower than 2%, and the detection specificity was good. The cut off value of the reference interval was 3.66 ng/ml. The detection accuracy of clinical samples was high, and there was no significant difference compared with Cortez NS1 detection kit (χ^2 test, $P=1.000$ and $Kappa=0.876$). **Conclusion** A CLIA method for quantifying dengue virus NS1 antigen in serum has been established, which has the advantages of high sensitivity and accuracy, simple operation, convenience and rapidity, and it is expected to provide a new choice for early and accurate screening of dengue clinical samples.

Keywords: dengue virus; NS1 antigen; chemiluminescence immunoassay; acridine ester; magnetic beads

登革热是由登革热病毒 (dengue virus, DENV) 热带和亚热带地区, 是分布最广、发病数量最多、感染引起的一种急性传染性疾病, 广泛流行于全球 危害较大的一种虫媒病毒性疾病^[1]。人感染 DENV

作者简介: 陈翠翠 (1984-), 女, 食品安全工学硕士, 助理工程师, 主要从事诊断试剂研发, E-mail: 285020003@qq.com。

通讯作者: 李来庆 (1983-), 男, 本科, 助理工程师, 主要从事诊断试剂的生产与推广。E-mail: lilaiqing191@163.com。

的临床症状有持久高热、头痛、全身肌肉痛、骨关节痛、皮疹等症状^[2]。全球每年约有4亿例登革热病例和2.2万例死亡病例^[3]。自1978年在广东出现首例确诊病例后,登革热在我国呈现由南向北不断蔓延、感染人数不断增加的趋势。以2019年为例,中国大陆高达28个省(自治区、直辖市)报告登革热病例共计22 599例,显著高于2018年(5 136例)^[4]。目前,登革热病毒并没有有效疫苗或针对性的治疗方法,而快速准确的检测方法对于其防控和治疗具有重要意义^[5]。目前,我国的登革热体外诊断试剂均为定性检测产品,对灵敏度更高的定量产品有迫切需求。化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)是一种新型的分析方法,具有极高的灵敏度和准确度、选择性较好、仪器简单、分析速度快、线性范围可宽达几个数量级等优点,在近几年的临床检验医学中应用愈来愈广泛^[6]。本研究拟采用CLIA建立一种登革热病毒NS1抗原快速检测方法,为登革热的快速、准确、早期筛查提供一种新的技术方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象 登革热阴阳性样本来自广州市疾病预防控制中心,其中110例阴性样本来自健康体检志愿者,年龄5~65岁,无传染病、一月内无服药史;85例阳性样本为临床确诊的患者血清样本(具有登革热临床表现或流行病学史,登革热病毒核酸阳性),年龄6~58岁,无传染病、一月内无服药史。血清样本的使用已获得作者知情同意。

1.2 仪器与试剂 羧基化磁珠(杭州博岳生物技术有限公司,货号M1000C);NS1抗原及其配对抗体对为广州优迪生物科技股份有限公司制备;吖啶酯[赫利森(厦门)生物科技有限公司,货号HS-11015006];1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, (EDC, 货号22980)], N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium, NHS)(Sigma公司)。化学发光检测仪(重庆科斯迈生物科技有限公司,型号SMART500S)。发光底物(含激发液和预激发液)(雅培公司,货号6E23-82和6C55-82)。

1.3 方法

1.3.1 NS1单抗-吖啶酯发光试剂的制备:按照4:1的质量比,将NS1单抗与吖啶酯混合,室温下振荡反应1h,加入终浓度为0.5%(v/v)赖氨酸溶液终止反应。用0.1mol磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)透析(去除游离的吖啶酯)24h后,过Sephadex G50凝胶层析纯化,收集具有高发光强度的产物,即为纯化的NS1单抗-吖啶酯

发光试剂,储存于4℃下备用。

1.3.2 NS1配对单抗-磁珠偶联物的制备:采用常用的EDC/NHS方法活化羧基磁珠后再与NS1配对单抗进行偶联。具体步骤为:0.05mol吗啉磺酸(pH 6.0)洗涤羧基磁珠后,加入等量的EDC和NHS,常温下振荡活化30min后,按照NS1配对单抗与磁珠质量比1:5加入NS1配对单抗,室温下振荡反应3h。然后,经封闭缓冲液(0.05mol Tris+0.02% Triton X-100+5g/dl牛血清清蛋白)封闭1h后,0.1mol PBS洗涤数次后得到NS1配对单抗-磁珠偶联物,用磁珠稀释液(0.05mol Tris+5g/dl牛血清清蛋白+0.05% Triton X-100+5g/dl海藻糖+0.05g/dl Proclin300)溶解,放于4℃下保存备用。

1.3.3 检测步骤:按照优化的条件,在化学发光检测仪上设置各参数,进行全自动化检测。具体检测步骤为:取50μl NS1配对单抗-磁珠偶联物,分别加入50μl的NS1抗原标准品或人血清样本和100μl NS1单抗-吖啶酯发光试剂,37℃温育反应20min,外加磁场促使磁珠及其磁珠偶联物聚集到试管底部,洗涤磁珠上吸附的杂质,然后加入100μl的发光底物预激发液和激发液后,检测吖啶酯光子的相对光强度(relative luminosity, RLU)。样本中的NS1抗原浓度与收集到的RLU呈正相关,通过检测一系列NS1抗原标准品绘制标准曲线,利用标准曲线即可计算得出待测样品中NS1抗原的浓度。

1.3.4 检测线性范围和灵敏度评估:制备NS1抗原系列浓度:0, 0.1, 1, 10, 100, 500和1 000 ng/ml,采用本方法检测各浓度对应的发光光度值,采用双对数数学模型进行标准曲线的拟合,绘制标准曲线。每个浓度测定3个复孔。以不含NS1抗原的溶液为样本,重复测定20次,计算平均值(\bar{x})及其标准差(standard deviation, s),数值代入标准曲线方程,得到本方法检测NS1抗原的灵敏度。

1.3.5 检测特异度评估:采用本检测方法分别检测100ng/ml人血清清蛋白,100ng/ml胆红素,100ng/ml血红蛋白,100ng/ml白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)和100ng/ml甲流病毒抗原样本,以评估该试剂盒的特异度。

1.3.6 参考区间的确定:对110例健康志愿者血清样本进行检测,应用SPSS17.0进行数据统计分析。先确定110例样本NS1抗原浓度值是否为正态分布,若为正态分布,采用正态分布法计算参考区间;若为偏态分布,则采用百分位法计算参考区间,取其第95百分位^[7]。

1.3.7 临床样本验证实验:取85例临床确诊的登革热阳性血清样本,20例健康志愿者阴性血清样本,

采用美国 Cortez 公司的登革热 NS1 快速检测试剂盒和本试剂盒同时进行检测。检测结果与临床结果进行对比,以确定本试剂盒临床筛查登革热的灵敏度。采用配对卡方检验 (McNemar test) 和一致性检验 (Kappa test) 分析两种方法的对比结果。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, GraphPad Prism 5 软件绘制标准曲线。参考区间采用正态分布法计算。

2 结果

2.1 检测线性范围和灵敏度结果 见图 1。以 NS1 抗原系列浓度为横坐标,其对应的化学发光值为纵坐标,双对数数学模型拟合的标准曲线方程为: $Y = 0.3553X + 3.4462$, $r^2 = 0.9913$ 。NS1 抗原浓度在 0.1 ~ 1 000 ng/ml 范围内时,本检测方法具有良好的剂量-反应效应。以不含 NS1 抗原的溶液为样本,重复测定 20 次,得到本方法检测 NS1 抗原的灵敏度为 1.12 ng/ml。

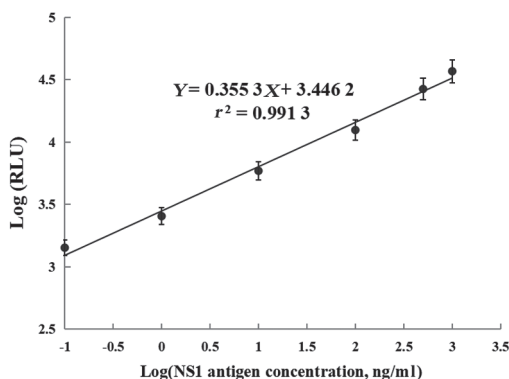


图1 标准曲线

2.2 检测特异度结果 见表1。用本方法重复3次检测 100 ng/ml NS1 抗原,得到的平均浓度为 98.60 ng/ml;人血清清蛋白、胆红素、血红蛋白、IL-6 和甲流病毒抗原,检测值分别为 1.46, 1.05, 1.11, 0.96 和 1.63 ng/ml,交叉反应率均低于 2%,表明血清中常见干扰物质对该方法 NS1 抗原检测的影响较小,方法特异度较好。

表1 特异度实验结果

交叉反应物	交叉反应物浓度 (ng/ml)	检测平均值 (ng/ml)	交叉反应率 (%)
NS1 抗原	100.00	98.60	98.60
人血清清蛋白	100.00	1.46	1.46
胆红素	100.00	1.05	1.05
血红蛋白	100.00	1.11	1.11
IL-6	100.00	0.96	0.96
甲流病毒抗原	100.00	1.63	1.63

2.3 参考区间 110 份健康志愿者血清样本进行检测,计算得到的 NS1 抗原浓度使用 SPSS 17.0 进

行正态性检验,发现其数值呈正态分布,参考区间 cut off 值计算公式为 $\bar{x} \pm 1.64s$, 110 份健康志愿者 NS1 抗原的平均浓度为 2.53 ng/ml, s 为 0.692,计算得到 cut off 值为 3.66 ng/ml。这意味着当利用本方法检测临床血清样本时 NS1 抗原浓度大于 3.66 ng/ml 时,怀疑患者感染了登革热病毒;NS1 抗原浓度值小于 3.66 ng/ml 时,患者感染登革热病毒的可能性较小。

2.4 临床样本验证结果 本方法检测 85 例临床确诊的登革热阳性血清样本,20 份健康志愿者阴性血清样本,结果发现 85 例临床确诊的登革热阳性血清样本全部为阳性,20 例阴性血清样本全部为阴性,提示该方法临床检测准确度较高。两种方法的比对结果采用 SPSS 软件进行卡方检验,配对卡方检验 (McNemar test) 的 P 值为 1.000,一致性检验 (Kappa test) 的 Kappa 值为 0.876。卡方检验结果说明了本方法与 Cortez 公司试剂盒在临床样本检测上无显著性差异。

3 讨论

酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 和胶体金法是目前登革热病毒抗原和抗体最常用的血清学检测方法,实时荧光定量聚合酶链式反应法 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 是最常用的分子学检测方法^[8-9]。美国 Cortez 公司的 NS1 检测试剂盒 (胶体金法) 是世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 推荐的、灵敏度和特异度好的登革热快速诊断试剂盒,也是我国进口数量最多、使用最广的登革热快速检测试剂盒^[10]。目前,我国的登革热体外诊断试剂均为定性检测产品,远远无法满足国内市场对登革热快速诊断试剂的需求。本实验选择临床检验医学中日益受到青睐的 CLIA,经过 NS1 单抗-吖啶酯发光试剂的制备、NS1 配对单抗-磁珠偶联物的制备和检测步骤的优化,建立了一种登革热病毒 NS1 抗原 CLIA,该方法对血清中 NS1 抗原的检测灵敏度高、线性范围宽、特异度好、对临床样本的检测准确度较高、与 Cortez 公司 NS1 检测试剂盒比较无显著性差异,为登革热的快速、准确、早期筛查提供一种新的技术方法。

登革热病毒为单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 11 kb,由 1 个开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和非编码区 (5'UTR, 3'UTR) 组成,ORF 可编码三种结构蛋白 (衣壳蛋白、膜蛋白和包膜蛋白) 和七种非结构蛋白 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B 和 NS5)^[11-12]。其中,NS1 是临床上公认的 DENV 感染早期检测的生物标志

物^[13]。NS1 基因长约 1 056bp, 编码的 NS1 蛋白是登革热病毒非结构蛋白中唯一的糖蛋白, 该糖蛋白在登革热病毒四种病毒血清型间高度保守, 其在血清中的检测常早于 IgM 抗体和 RNA 的产生, 在登革热的早期诊断中具有重要作用^[14]。此外, 在 13 例原发性登革热感染病例中, NS1 抗原是 5 例中检测到的唯一标志物^[15]。因此, 本研究选择 NS1 抗原作为检测对象, 建立了一种登革热临床筛查的新方法。

临床样本验证结果显示, 85 例临床确诊的登革热阳性血清样本全部为阳性, 20 例阴性血清样本全部为阴性, 说明本 CLIA 法的检测准确度较高。Cortez 公司试剂盒的检测结果有 2 例阳性样本检测为阴性, 2 例阴性样本检测为阳性, 其准确度不如该 CLIA 法。但配对卡方检验和一致性检验显示 CLIA 法与 Cortez 公司试剂盒无显著性差异, 提示该 CLIA 法具有更高的检测灵敏度(假阴性率低)和特异度(假阳性率低)、抗溶血等干扰能力较强。虽然在操作简便性、快捷性上不如 Cortez 公司的胶体金试剂, 该方法优势在于可全自动化检测, 检测的灵敏度和特异度更好。值得注意的是, 临床检验中对阳性结果的判断一定要慎重, 不能仅凭单一检测结果而确诊, 要结合流行病学调查及患者的临床症状进行综合分析。

本研究也有一些局限性。首先, 由于临床样本数量有限, 参考区间 cutoff 值的获得可能与实际情况存在偏差, 后续实验需增加样本量, 进一步明确参考区间。其次, 临床样本验证选择的是 85 例临床确诊的登革热阳性血清样本, 缺少疑似病例样本的验证, 后续将补充临床疑似病例样本、治疗恢复期的临床样本, 全面考核该 CLIA 法的检测性能。本研究建立的 CLIA 法, 仅仅进行了初步的灵敏度、特异度和临床样本验证评价, 明确该方法达到了实验室检测的基本要求, 且具有与商业化试剂相当的检测性能, 有开发为临床检测试剂的潜力, 但未进行全面客观的评价, 并未获得国家注册, 目前还无法临床应用。

综上所述, 本研究建立的登革热 NS1 抗原 CLIA 法, 具有高灵敏度、高准确度、强特异度、简便快捷等优点, 可为临床登革热的诊断提供一种新的技术手段, 在登革热的早期诊断和疗效评估等方面可能发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 曾嘉庆, 李成辉, 张赫, 等. 蚊媒病毒病流行现状及病原学检测技术研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(6): 728-730.
ZENG Jiaqing, LI Chenghui, ZHANG He, et al. The

- current status of outbreaks of mosquito-borne viral diseases and advances in the study of pathogen detection techniques[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(6): 728-730.
- [2] 毛祥华, 张再兴. 中国登革热的流行现状 [J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(5): 385-388.
MAO Xianghua, ZHANG Zaixing. Current situation of the Dengue fever in China[J]. Journal of Pathogen Biology, 2007, 2(5): 385-388.
- [3] ROY S K, BHATTACHARJEE S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2021, 67(10): 687-702.
- [4] 刘起勇. 我国登革热流行新趋势、防控挑战及策略分析 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2020, 31(1): 1-6.
LIU Qiyong. Dengue fever in China: new epidemical trend, challenges and strategies for prevention and control[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2020, 31(1): 1-6.
- [5] 王倩, 刘师文, 龚甜. 登革病毒实验室检测方法研究进展 [J]. 实验与检验医学, 2022, 40(2): 139-143.
WANG Qian, LIU Shiwen, GONG Tian. Advances in laboratory detection of Dengue virus[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2022, 40(2): 139-143.
- [6] 张磊, 李德涛, 朱艳, 等. 6 种化学发光系统检测肿瘤标志物的应用评估分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2): 88-91.
ZHANG Lei, LI Detao, ZHU Yan, et al. Methodological evaluation of six chemiluminescence detection systems for tumor markers[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2): 88-91.
- [7] MA Hongyan, MAO Qian, ZHU Yanbin, et al. Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for the simultaneous detection of MMP-9 and Lp-PLA2 in serum[J]. Journal of Fluorescence, 2021, 31(6): 1771-1777.
- [8] 郭丹桂, 许少洪, 郭鹏娟, 等. NS1 抗原胶体金法在登革热早期快速诊断中的应用评价 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(9): 1071-1073.
GUO Dangui, XU Shaohong, GUO Pengjuan, et al. Application evaluation of NS1 antigen colloidal gold method in early rapid diagnosis of Dengue fever[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2021, 31(9): 1071-1073.
- [9] 王陈龙, 何思杰, 顾大勇, 等. 登革病毒 NS1 抗原捕获酶联免疫吸附试验在登革热实验室诊断中的应用价值 [J]. 中国医学创新, 2018, 15(22): 137-140.
WANG Chenlong, HE Sijie, GU Dayong, et al. The application significance of Dengue virus NS1 antigen capture ELISA in the Diagnosis of dengue fever[J]. Medical Innovation of China, 2018, 15(22): 137-140.
- [10] 李娜, 杨恒林, 郭晓芳, 等. 一种国产登革热 NS1 抗原检测试剂盒的性能评价 [J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(8): 731-733.
LI Na, YANG Henglin, GUO Xiaofang, et al. Evaluation of the performance of a domestic kit to detect the Dengue NS1 antigen[J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(8): 731-733. (下转第 194 页)

- Cancer Immunol Immunother, 2018, 67(7): 1031-1040.
- [8] JIN Yi, WANG Zhanwang, HE Dong, et al. Identification of novel subtypes based on ssGSEA in immune-related prognostic signature for tongue squamous cell carcinoma[J]. Cancer Medicine, 2021, 10(23): 8693-8707.
- [9] 荣蓉, 古颖, 高翔, 等. 前列腺癌组织肝激酶 B1, Rab 鸟嘌呤核苷酸交换因子 -5 mRNA 表达水平与临床病理特征和预后的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(6): 1-5, 26.
RONG Rong, GU Ying, GAO Xiang, et al. Correlation between the expression levels of liver kinase B1, Rab guanine nucleotide exchange factor-5 mRNA in prostate cancer tissues and its clinicopathological characteristics and prognosis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(6): 1-5, 26.
- [10] GILLESSEN S, ARMSTRONG A, ATTARD G, et al. Management of patients with advanced prostate cancer: report from the advanced prostate cancer consensus conference 2021[J]. European Urology, 2022, 82(1): 115-141.
- [11] VIDOTTO T, SAGGIORO F P, JAMASPIHVILI T, et al. PTEN-deficient prostate cancer is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment mediated by increased expression of IDO1 and infiltrating FoxP3+ T regulatory cells[J]. Prostate, 2019, 79(9): 969-979.
- [12] ANDERSEN L B, NØRGAARD M, RASMUSSEN M, et al. Immune cell analyses of the tumor microenvironment in prostate cancer highlight infiltrating regulatory T cells and macrophages as adverse prognostic factors[J]. The Journal of Pathology, 2021, 255(2): 155-165.
- [13] RADEJ S, SZEWC M, MACIEJEWSKI R. Prostate infiltration by Treg and Th17 cells as an immune response to propionibacterium acnes infection in the course of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 8849.
- [14] MENG Jialin, LIU Yi, GUAN Shiyang, et al. The establishment of immune infiltration based novel recurrence predicting nomogram in prostate cancer[J]. Cancer Medicine, 2019, 8(11): 5202-5213.
- [15] ERLANDSSON A, CARLSSON J, LUNDHOLM M, et al. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer[J]. Prostate, 2019, 79(4): 363-369.
- [16] PENG Shihong, HU Pan, XIAO Yutian, et al. Single-cell analysis reveals EP4 as a target for restoring T-Cell infiltration and sensitizing prostate cancer to immunotherapy[J]. Clinical Cancer Research, 2022, 28(3): 552-567.
- [17] CERQUEIRA M A, FERRARI K L, DE MATTOS A C, et al. T cells CD4+/CD8+ local immune modulation by prostate cancer hemi-cryoablation[J]. World Journal of Urology, 2020, 38(3): 673-680.
- [18] DAVIDSSON S, ANDREN O, OHLSON A L, et al. FOXP3(+) regulatory T cells in normal prostate tissue, postatrophic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and tumor histological lesions in men with and without prostate cancer[J]. Prostate, 2018, 78(1): 40-47.
- [19] LIU Sen, LIU Fengli, ZHANG Bing, et al. CD4+ T helper 17 cell response of aged mice promotes prostate cancer cell migration and invasion[J]. The Prostate, 2020, 80(10): 764-776.
- [20] PALANO M T, GALLAZZI M, CUCCHIARA M, et al. The tumor innate immune microenvironment in prostate cancer: an overview of soluble factors and cellular effectors[J]. Explor Target Antitumor Ther, 2022, 3(5): 694-718.
- [21] CHOWDHURY S, OUDARD S, UEMURA H, et al. Apalutamide compared with darolutamide for the treatment of non-metastatic castration-resistant prostate cancer: efficacy and tolerability in a matching-adjusted indirect comparison[J]. Advances in Therapy, 2022, 39(1): 518-531.
- [22] COSTANZO-GARVEY D L, KEELEY T, CASE A J, et al. Neutrophils are mediators of metastatic prostate cancer progression in bone[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(6): 1113-1130.
- [23] SALAH S, ABU-HIJLIH R, ABUHIJLA F, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a potential prognostic biomarker for newly diagnosed patients with metastatic castration-sensitive prostate cancer[J]. Cancer Reports, 2021, 4(5): e1392.
- 收稿日期: 2022-05-27
修回日期: 2022-12-08

(上接第 179 页)

- [11] SUN Yiting, VARANI G. Structure of the Dengue virus RNA promoter[J]. RNA, 2022, 28(9): 1210-1223.
- [12] SOUZA L R, COLONNA J G, COMODARO J M, et al. Using amino acids co-occurrence matrices and explainability model to investigate patterns in dengue virus proteins[J]. BMC Bioinformatics, 2022, 23(1): 80-98.
- [13] WASIK D, MULCHANDANI A, YATES M V. Salivary detection of Dengue virus NS1 protein with a Label-Free immunosensor for early Dengue diagnosis[J]. Sensors, 2018, 18(8): 2641.
- [14] SULEMAN M, FARYAL R, ALAM M M, et al. NS1 antigen: A new beam of light in the early diagnosis of Dengue infection[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2016, 9(12): 1212-1214.
- [15] MATHEWS A A. Role of NS1 antigen in the diagnosis of Dengue viral infection[J]. The Journal of Communicable Diseases, 2018, 49(4): 52-55.
- 收稿日期: 2022-12-09
修回日期: 2023-02-10