

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.13.013

REDE-DHPLC 检测 NSCLC 血浆 EGFR 突变及其临床意义*

阙丹¹,肖何¹,陈川¹,蓝美玲¹,李建¹,黄环¹,赵莲花¹,肖华亮²,王阔^{1△}
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1.肿瘤中心;2.病理科,重庆 400042)

[摘要] **目的** 探讨酶切富集联合变性高效液相色谱法(REDE-DHPLC)检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血表皮生长因子受体(EGFR)突变的临床应用价值。**方法** 采用 REDE-DHPLC 法对该院收治的 403 例 NSCLC 患者血浆 EGFR 19 和 21 外显子突变状态进行检测,分析突变与基线资料的相关性。其中 115 例患者同时采用 ARMS 法对肿瘤组织样本进行突变检测,比较两种方法检测的一致性。**结果** 403 例患者血浆样本总突变率为 26.3%(106/403)。女性、不吸烟、腺癌及晚期(Ⅲb~Ⅳ)患者血浆 EGFR 突变率分别显著高于男性、吸烟、非腺癌及早期患者($P<0.05$)。多变量 Logistic 分析显示性别、吸烟史及组织类型是血浆 EGFR 突变的独立预测因素($P<0.05$)。115 例配对样本中,以组织样本为标准,REDE-DHPLC 法检测血浆 EGFR 突变的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 69.0%、97.3%、93.5%、84.5%,两种检测方法具有较好的一致性($\kappa=0.702$)。**结论** 性别、吸烟史及组织类型是 NSCLC 患者血浆 EGFR 突变的独立预测因素,REDE-DHPLC 法检测血浆 EGFR 突变敏感度及特异度较高。

[关键词] 癌,非小细胞肺;色谱法,高压液相;酶切富集;受体,表皮生长因子

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)13-1767-03

Detect of plasma EGFR mutations in NSCLC by REDE-DHPLC method and its clinical significance*

Que Dan¹, Xiao He¹, Chen Chuan¹, Lan Meiling¹, Li Jian¹, Huang Huan¹,
Zhao Lianhua¹, Xiao Hualiang², Wang Ge^{1△}

(1. Tumor Center; 2. Department of Pathology, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical application value of peripheral blood epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) detected by the restriction endonuclease digestion combine with denaturing high performance liquid chromatography (REDE-DHPLC). **Methods** Four hundred and three patients with NSCLC in our department were detected plasma EGFR mutations for exons 19 and 21 by the REDE-DHPLC method. The relationships of EGFR mutations with the patients' clinical characteristics at baseline were analyzed. Among 403 patients, 115 cases were detected EGFR mutations in tumor tissue by simultaneously adopting the ARMS method. The consistency of the two methods was compared. **Results** The total activating mutation rate of EGFR was 26.3% (106/403) in plasma. The mutation rate in female, non-smoking, adenocarcinoma and stage III B-IV were significantly higher than that in men, smoking, non-adenocarcinoma and stage I A-III A ($P<0.05$). The multivariate Logistic analysis results showed that gender, smoking history and histological types were the independent predictors of EGFR mutations in plasma ($P<0.05$). In the 115 matched samples, taking the tissue samples as standards, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the REDE-DHPLC for detecting EGFR mutation were 69.0%, 97.3%, 93.5% and 84.5% respectively. The two detection methods had better consistency ($\kappa=0.702, P<0.01$). **Conclusion** Gender, smoking history and histological types are the independent predictors of plasma EGFR mutation. REDE-DHPLC has higher sensitivity and higher specificity for detecting plasma EGFR mutation.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; chromatography, high pressure liquid; enzyme digestion enrichment; receptor, epidermal growth factor

肺癌是目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占 85%^[1],多数患者在确诊时已属晚期,失去手术治疗机会。以酪氨酸激酶抑制剂(TKI)为代表的靶向治疗给临床 NSCLC 的治疗提供了新的思路,成为近年研究的热点。组织样本是检测表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变的“金标准”,但多数晚期患者常无法获取满意组织样本用于突变检测。因此,寻找更易获取、方便动态监测的样本对临床具有重要意义。近期,国内外多项临床研究显示外周血 EGFR 突变与组织样本具有较高的符合率^[2-4],但各检测方法的敏感度和特异

度存在一定差异,外周血样本能否替代组织样本用于临床突变检测有待进一步研究。本研究采用酶切富集联合变性高效液相色谱法(restriction endonuclease digestion-denaturing high performance liquid chromatography, REDE-DHPLC)对 NSCLC 患者血浆 EGFR 突变进行检测,分析突变与基线资料的相关性,并与配对组织样本检测进行对比分析,探讨 REDE-DHPLC 法检测血浆 EGFR 突变与组织检测的一致性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月至 2014 年 12 月本院肿瘤中心收治的 403 例 NSCLC 患者临床资料,其中男 282 例,女

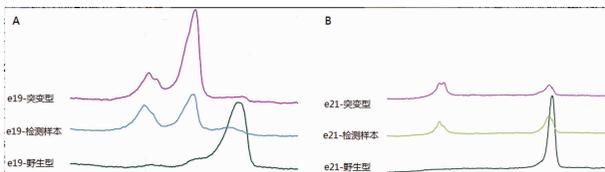
* 基金项目:吴阶平基金资助项目(320.6750.12228;320.6750.12177)。 作者简介:阙丹(1988-),在读硕士研究生,医师,主要从事肺癌靶向治疗方面研究。△ 通讯作者, Tel: (023)68757617; E-mail: wangge70@hotmail.com。

121 例,年龄 33~86 岁,平均(60.5±10.0)岁。患者均经病理确诊为 NSCLC。403 例患者均在首次入科治疗前采集空腹血浆进行血浆突变检测,其中 115 例患者在血浆检测同时对穿刺或术后病理标本进行组织突变检测(与血浆检测时间差小于 1 个月)。403 例患者及家属均签署知情同意书。

1.2 方法 403 例 NSCLC 患者血浆 EGFR 19 和 21 外显子突变采用 REDE-DHPLC 法进行检测,115 例配对患者的组织样本采用 ARMS 法进行检测。EGFR 19 和 21 外显子引物设计参考文献[5]进行。

1.2.1 标本收集及 DNA 提取 患者入院后采集空腹外周静脉血 4 mL 置于 EDTA 抗凝管中,离心后采用美国 QIAGEN 公司生产的 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取游离 DNA。从患者石蜡标本中获取 5 片 5 μm 厚石蜡标本,使用 QIAGEN 公司生产的 FFEP-DNA Kit 试剂盒提取组织 DNA 样本。

1.2.2 REDE-DHPLC 法检测血浆检测 第一轮 PCR 扩增体系为 25 μL,包括 10 ×PCR 缓冲液 2 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL、dNTP(10 μmol/μL)2 μL、上下游引物(10 μmol/μL)各 1 μL、模板 DNA 2 μL。PCR 条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 50 s,共 40 个循环;72 °C 7 min。19 外显子为缺失突变(19 Del),将第一轮 PCR 产物加入含 Mse I(美国 NEB 公司生产)的酶切体系,37 °C 孵育 150 min,酶切产物进行第二轮 PCR,扩增体系同第一轮 PCR,共 40 个循环。产物采用美国 Transgenomic 公司生产的 DNASep 柱进行分析。21 外显子为置换突变(21 L858R),将第一轮 PCR 产物加入含 Msc I(美国 NEB 公司生产)的酶切体系,37 °C 孵育 150 min,第二轮 PCR 产物采用 Sau96 I 酶切(美国 NEB 公司生产),而后产物 95 °C 孵化 5 min,以 1 °C/min 速度将至 35 °C 进行复性。设定 DNASep 柱缓冲液流速为 0.9 mL/min,检测器紫外分光光度计设为 260 nm。检测突变图谱见图 1。



A:19 外显子缺失突变;B:21 外显子点突变。

图 1 REDE-DHPLC 法检测血浆样本 19、21

外显子突变检测结果

1.2.3 组织样本 ARMS 法突变检测 组织样本 DNA 提取后采用 ARMS 法进行突变检测。试剂盒采用厦门艾德公司研发的人类 EGFR 基因突变检测试剂盒(ADx-ARMS),按照提供的判读标准,对组织样本提取的 DNA 突变情况进行检测,在本院病理科完成。

1.3 统计学处理 运用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计数资料用构成比表示,采用 χ^2 检验分析。基线特征与突变率的关系采用 χ^2 检验及 Logistic 回归分析,一致性分析采用 κ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者血浆 EGFR 突变率比较 患者血浆样本总突变率为 26.3%(106/403),其中 19 和 21 外显子突变率分别为 62.3%(66/106)和 37.7%(40/106)。

2.2 血浆 EGFR 突变与基线特征相关性分析 血浆 EGFR 突变与患者临床基线特征相关性分析显示,女性、不吸烟、腺癌及晚期(III b~IV)患者血浆 EGFR 突变率分别显著高于男性、

吸烟、非腺癌及早期(I a~III a)患者($P < 0.05$),见表 1。以单因素分析 $P < 0.01$ 的变量(性别、吸烟史、组织类型及分期)为自变量,以血浆突变状态为因变量进行 Logistic 多变量逐步向前回归,结果表明,性别、吸烟史及组织类型是 NSCLC 患者血浆 EGFR 突变的独立预测因素,见表 2。

表 1 患者血浆 EGFR 突变与基线特征的关系(n)

项目	野生型	突变型	χ^2	P
性别				
男	230	52	29.957	<0.01
女	67	54		
年龄(岁)				
≤60	143	54	0.244	0.621
>60	154	52		
吸烟史				
有	167	29	26.064	<0.01
无	130	77		
组织类型				
腺癌	178	86	15.538	<0.01
非腺癌	119	20		
分期				
I a~III a	59	12	3.930	0.047
III b~IV	238	94		
PS 评分				
2~4	41	13	0.160	0.689
0~1	256	93		

表 2 多变量逐步 Logistic 回归分析结果

变量	回归系数	标准误	OR	95%CI	P
性别	0.670	0.305	1.954	1.075~3.550	0.028
吸烟史	0.678	0.313	1.970	1.067~3.639	0.030
组织类型	0.676	0.292	1.965	1.109~3.483	0.021

2.3 配对样本一致性比较 115 例配对患者中,42 例组织检测结果为突变型,其中 13 例血浆检测结果为野生型;31 例血浆检测结果为突变型,其中 2 例组织检测结果为野生型。以组织检测为标准,REDE-DHPLC 法检测血浆样本的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 69.0%、97.3%、93.5%、84.5%,两种检测方法具有较好的一致性($\kappa = 0.702$),见表 3。

表 3 两种检测方法一致性比较

血浆	组织			合计	κ
	19 Del	21 L858R	野生型		
19 Del	12	5	1	18	0.702
21 L858R	3	9	1	13	
野生型	10	3	71	84	
合计	25	17	73	115	

3 讨论

大型临床研究均表明,TKI 能显著延长 EGFR 突变

NSCLC 患者无进展生存期,疗效明显优于化疗方案^[6-7]。EGFR 基因突变是患者 TKI 获益的关键,组织样本是突变检测的“金标准”^[8],但大部分 NSCLC 患者在确诊时已进入晚期,常无法获得足够组织样本进行突变检测。Mok 等^[6]研究中仅 36% 患者可提供用于检测突变的组织样本,这导致组织样本突变检测在临床应用中受到一定限制。外周血循环肿瘤 DNA 主要来源于凋亡坏死和脱落的肿瘤细胞,其遗传特性与肿瘤细胞基因组 DNA 相同^[2],这为血浆样本用于 EGFR 突变检测提供了可行性。此外,外周血检测还具有易获取、创伤小、患者易接受、方便动态检测等特点,具有广阔的临床应用前景。

目前,应用于血浆 EGFR 突变检测的方法包括 ARMS 法、PCR 限制性片段长度多态性分析法、突变富集型 PCR、DH-PLC 法、微数字 PCR、荧光定量 PCR 等^[9]。由于纳入患者样本量及基线特征的差异、血样本采集时间的不同、检测方法灵敏度差异等,各检测方法与组织样本检测的一致性为 48.2%~92.0%^[3-6]。部分方法对仪器和操作要求较高、检测成本高、操作复杂,临床广泛推广仍存在一定困难。DHPLC 法具有操作简单、快速、自动化程度高等优点,目前已在临床 EGFR 突变检测中开展应用,Bai 等^[5]报道 DHPLC 法检测血浆 EGFR 突变的检测限值约为 3%。杨卓等^[10]采用 REDE-DHPLC 法对质粒标准品 EGFR 突变进行检测,发现其检测限值达到 0.1%,显著高于传统 DHPLC 法。本研究结果中,患者血浆样本总突变率为 26.3%(106/403),其中 19 和 21 外显子突变率分别为 62.3%(66/106)和 37.7%(40/106),与既往报道基本一致^[3-5]。研究发现,女性、非吸烟者、肺腺癌及亚洲人种是组织 EGFR 突变的高发对象^[9]。本研究对血浆样本突变分析发现性别、吸烟史及组织类型是患者血浆 EGFR 突变的独立预测因素,可作为初步判断患者潜在突变的因素。

115 例配对样本中,以组织检测为标准,REDE-DHPLC 法检测血浆样本的敏感度和特异度分别为 69.0%和 97.3%,两种方法具有较好的一致性。在 42 例组织突变样本中,有 13 例血浆检测为野生型。考虑主要与检测方法灵敏度相关。Liu 等^[11]采用直接测序法检测患者血浆 EGFR 突变发现,突变率仅为 5.1%,远低于组织样本检测结果。而采用敏感性更高的 ARMS 法重新检测发现,5 例血浆直接测序法阴性患者 ARMS 法检测为阳性。Rosell 等^[12]发现,晚期 NSCLC 患者和低分化癌患者,血浆突变检出率更高,与组织样本检测具有更高一致性,这可能与晚期患者肿瘤负荷较大、低分化肿瘤侵袭性强,更易血性转移相关,提示肿瘤负荷与血浆突变检出率具有相关性。微数字 PCR 法是以单分子反应为基础的极高选择性检测方法,该技术能够较易实现对单个分子的检测,Yung 等^[13]报道其检测准确度高达 99%以上,但在对 12 例组织直接测序法检测突变阳性患者的血浆应用微数字 PCR 检测时仍有 1 例患者血浆检测阴性,推测肿瘤异质性可能是影响检测结果的因素之一。本研究中,3 例组织 19 Del 患者血浆检测为 21 L858R,5 例组织 21 L858R 患者血浆检测为 19 Del,可能与肿瘤自身内部、原发灶与外周血液间等存在异质性相关。本研究中,2 例(2.7%)组织检测阴性患者血浆检测为突变阳性,这与 Li 等^[14]的报道类似,其研究中 4 例(80%)组织检测阴性而血浆阳性患者服用 TKI 后疗效较差,提示该血浆检测阳性结果可能为假阳性。

REDE-DHPLC 具有快速、经济、自动化程度高、可高通量检测等优点,与组织 EGFR 突变检测结果具有较高一致性,可作为临床血浆 EGFR 突变检测有效方法。

参考文献

- [1] Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer; relevance for clinical practice and clinical trials[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(8): 992-1001.
- [2] Zhao X, Han RB, Zhao J, et al. Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients [J]. *Respiration*, 2013, 85(2): 119-125.
- [3] Chen YM, Fan WC, Tseng PC, et al. Plasma epidermal growth factor receptor mutation analysis and possible clinical applications in pulmonary adenocarcinoma patients treated with erlotinib [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(3): 713-717.
- [4] Sun H, Gan ZC, Gao JJ, et al. Non-invasive detection of EGFR deletion at exon 19 in non-small cell lung cancer by real time diagnostic [J]. *Clin Lab*, 2014, 60(9): 1517-1526.
- [5] Bai H, Mao L, Wang HS, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(16): 2653-2659.
- [6] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
- [7] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 121-128.
- [8] Pan JB, Hou YH, Zhang GJ. Correlation between efficacy of the EGFR tyrosine kinase inhibitor and serum tumor markers in lung adenocarcinoma patients [J]. *Clin Lab*, 2014, 60(9): 1439-1447.
- [9] Ellison G, Zhu G, Moulis A, et al. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples [J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(2): 79-89.
- [10] 杨卓, 龙美娟, 王斐, 等. 酶切富集联合 DHPLC 检测肿瘤患者外周血 EGFR 和 KRAS 基因突变及其临床应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(4): 327-332.
- [11] Liu Y, Liu B, Li XY, et al. A comparison of ARMS and direct sequencing for EGFR mutation analysis and tyrosine kinase inhibitors treatment prediction in body fluid samples of non-small-cell lung cancer patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(1): 111.
- [12] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(3): 239-246.
- [13] Yung TK, Chan K., Mok TS, et al. Single- (下转第 1772 页)

目前,ADA 已将 $HbA1c \geq 6.5\%$ 作为非孕期人群糖尿病诊断切点并已得到公认,但 $HbA1c$ 作为 GDM 诊断的界值尚无统一标准。柳双燕等^[9]以 $HbA1c$ 5.5%、6.0% 为诊断界值联合体质指数(BMI)筛查妊娠早期糖尿病, $HbA1c \geq 5.5\%$ 、 $BMI \geq 24 \text{ kg/m}^2$ 时诊断的敏感性和特异性为 87.4% 和 88.0%。胡璟等^[10]在对 1 280 例 24~28 周的孕妇进行研究后发现以 $HbA1c$ 5.5% 作为切点可保证筛查的高敏感性,而以 $HbA1c$ 6.5% 作为切点则具有较高的诊断特异性。但如果能在孕早期就使用 $HbA1c$ 进行早期诊断和干预则更有价值。

ROC 曲线是一种评价诊断效能的有效工具,它通过改变诊断临界值,获得灵敏度和特异度。以灵敏度为纵坐标,特异度为横坐标,绘制 ROC 曲线,计算与比较曲线下面积,从而客观分析诊断实验的诊断价值,同时,通过 ROC 曲线还可确定诊断性实验的最佳灵敏度。作者利用在本院建卡孕妇的正常妊娠组和 GDM 组的 $HbA1c$ 检测结果绘制 ROC 曲线,其灵敏度为 96.9%,特异度为 58.14%,结果提示孕妇的 $HbA1c$ 检测是有临床意义的。并且,最终确定孕妇的 $HbA1c$ 的最佳临界值为 5.6%,与非孕期人群糖尿病诊断切点 $HbA1c \geq 6.5\%$ 有明显差异。

随着人们生活水平的不断提高,孕妇营养过剩,肥胖者日益增多,GDM 的发病率也呈上升趋势^[10]。北京地区 1996 年发病率为 6.8%,到 2004 年为 7.61%;昆明地区 2007 年发病率为 11.6%^[11];而赵帮勤等^[12]报道的重庆某地区 GDM 的发病率已达到 15.82%,且高龄孕妇的发病率更高达 27.47%。因此,对所有孕妇进行正规合理的筛查,极早预防、诊断、治疗糖尿病及控制孕妇血糖水平在正常和接近正常的范围内,可明显减轻母婴并发症^[13]。

另外, $HbA1c$ 水平与 GDM 母婴并发症发生率的关系随着 $HbA1c$ 水平升高而并发症增多。张艳霞^[14]研究表明,随 $HbA1c$ 水平升高,胎膜早破、妊娠高血压综合征、羊水过多、新生儿窒息和高胆红素血症的发生率也随之上升,故对 GDM 的早期诊断及监测治疗对保障母婴平安具重要临床意义。本研究结果提示,在妊娠 12 周到产科建卡检查血常规、生化常规及输血免疫全套等项目时可同时测定 $HbA1c$,如 $HbA1c < 5.6\%$,FPG 正常并且临床无糖尿病的症状,可在妊娠中期再进行 75 g 糖耐量筛查。如 $HbA1c \geq 5.6\%$,建议提前进行 75 g 糖耐量试验确诊,以便早期发现 GDM 并进行干预治疗,调整孕妇饮食及营养水平,避免各种 GDM 并发症的发生,尤其对高龄孕妇、有糖尿病家族史、孕前肥胖等均为 GDM 的重点干预对象,即使口服 75 g 葡萄糖后 1、2 h 检测正常,也应根据临床表现多次筛查,避免漏诊^[15]。

总之, $HbA1c$ 测定对 GDM 诊断、治疗及监测提供了新的依据。本研究建立了正常妊娠早、中、晚期的参考值,对

$HbA1c$ 作为 GDM 早期诊断的切点及敏感性、特异性进行了探讨。所以, $HbA1c$ 测定对 GDM 筛查和血糖控制情况的监测及减少母婴并发症的发生均有重要价值。

参考文献

- [1] 严芝光. 糖化血红蛋白的检测技术与临床应用进展[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(6): 714-716.
- [2] Amer DA. Standards of medical care in diabetes-2010[J]. Diabetes Care, 2010, 33(1): 11-61.
- [3] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2011 [J]. Diabetes Care, 2011, 34 Suppl 1: S11-61.
- [4] Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine[J]. Clin Biochem, 2009, 42(4/5): 236-240.
- [5] Glad Working Group A1c Delegates WG, Mosca A, Branca MT, et al. Recommendations for the implementation of international standardization of glycosylated hemoglobin in Italy[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(5): 623-626.
- [6] 徐国宾. 糖尿病诊断标准的完善及糖化血红蛋白 A1c 检测的标准化[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(6): 401-405.
- [7] 李坚, 冯莉, 隆维东, 等. 正常妊娠早期妇女 $HbA1c$ 水平调查的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(12): 904-906.
- [8] 王亚南, 吴元健, 陆禅, 等. 糖化血红蛋白在糖尿病中的应用价值[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(6): 414-415.
- [9] 柳双燕, 张静媛, 张亚军, 等. 妊娠早期糖化血红蛋白联合体重指数筛查妊娠期糖尿病的意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(5): 73-74, 34.
- [10] 胡璟, 苏珂, 彭鹰, 等. 糖化血红蛋白在妊娠期糖尿病筛查中的临床价值探讨[J]. 重庆医学, 2013, 42(18): 2151-2152.
- [11] Cheng YW, Caughey AB. Gestational diabetes: diagnosis and management[J]. J Perinatol, 2008, 28(10): 657-664.
- [12] 赵帮勤, 李坚, 隆维东. 某地区妊娠妇女糖尿病发病率调查[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(3): 315-316.
- [13] 向红丁. 关注妊娠糖尿病[J]. 中国糖尿病杂志, 2011, 19(9): 641-642.
- [14] 张艳霞. 妊娠期糖代谢异常患者糖化血红蛋白检测的临床价值[J]. 当代医学, 2010, 16(33): 13-14.
- [15] 洪姗姗. ADA: 糖尿病医学诊断实用标准纲要[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 2(1): 81-90.

(收稿日期: 2015-11-26 修回日期: 2016-01-09)

(上接第 1769 页)

Molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in Non-Small cell lung cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6): 2076-2084.

[14] Li X, Ren R, Ren S, et al. Peripheral blood for epidermal

growth factor receptor mutation detection in non-small cell lung cancer patients [J]. Transl Oncol, 2014, 7(3): 341-348.

(收稿日期: 2015-11-21 修回日期: 2016-01-16)