

- [30] Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4+ CD25+ T-cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis[J]. *Blood*, 2005, 105(6):735-741.
- [31] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/miRNA 155 for normal immune function [J]. *Science*, 2007, 316(5824):608-611.
- [32] Jiang L, Cheng Z, Qiu S, et al. Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly

targeting IL-10 in Jurkat cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 14(2): 217-223.

- [33] Cheng Z, Qiu S, Jiang L, et al. MiR-320a is downregulated in patients with Myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1 [J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2012, 11, (30):2573-2592.

(收稿日期:2013-01-18)

• 综 述 •

微流控芯片即时检验技术的应用研究进展

王 韧, 王 婷 综述, 张蕾蕾 审校

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏镇江 212003)

关键词:微流控芯片; 床旁诊断化验信息系统; 血液化学分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1709-03

微型化和集成化是当今生物化学分析发展的重要方向,而微流控芯片(Microfluidic chips)则是其中的前沿领域之一。该技术以微机电加工为依托,以微通道网络为结构特征,其目标是将生化分析等领域中所涉及的取样、预处理、分离、混合、反应、检测等操作单元部分或全部集成于一块几平方厘米大小的芯片上,通过对芯片微通道网络内微流体的操控实现常规生化实验室的各种功能,故又被称为芯片实验室(Lab on a chip)。微流控芯片在样品分析方面具有快速、高通量和低消耗的特点,同时兼具操作灵活和便携化的优势,使其在检验医学方面展现出巨大的发展潜力和应用价值^[1-2]。尤其在即时检验(Point of care testing, POCT)领域,已成为其重要发展方向,受到世界范围内的普遍关注^[3-4]。本文从微流控芯片 POCT 的特点出发,对其近年来的应用研究现状进行了介绍,并就其今后发展和应用中可能存在的问题作了一定分析展望,以期能够与其他研究者提供参考和借鉴。

1 微流控芯片 POCT 概况

POCT 是现代医学检验发展的一种新模式,美国国家临床生化科学院将其定义为“在接近患者治疗处,由未接受临床实验室学科训练的临床人员或者患者(自我检测)进行的临床检验。POCT 是在传统或中心实验室以外进行的一切检验”。笼统地说,POCT 是指在中心实验室之外,靠近检测对象,并能及时报告结果的一个可移动的微型检测系统。POCT 在提高医学诊断效率和改进诊断结果方面具有明显的优势,使其在诞生之初就成功应用于 HIV(艾滋病)和血糖检测领域,并陆续在其他检验和疾病诊断方面得到广泛应用^[5]。

微流控芯片固有的快速、灵敏特点和取代常规生化实验室的潜力使其成为实现 POCT 的理想载体,并已公认为 POCT 发展的重要方向^[6-7],在包括临床分析(血气分析、葡萄糖/乳酸分析等)、DNA 分析(包括核酸序列分析)、蛋白质组学分析(蛋白质和肽)、综合分析、免疫测定、毒性检测和法医鉴定等一系列生化分析领域具有广阔的应用前景。微流控芯片 POCT 装置在尺寸规模和检测灵活性方面与中心实验室相比有着明显优势,检测设备投入和样品/试剂消耗大幅减小,并且更加快速、简便和经济,尤其适用于缺少昂贵大型检测设备的发展中国家和偏远地区^[8-9]。

2 微流控芯片 POCT 的应用研究现状

微流控芯片 POCT 继承了微流控技术的诸多特征,其研究覆盖生物工程、微机电、材料、化学和物理等众多学科。在免疫测定方面,微流控芯片 POCT 的研究主要集中于病原检测(细菌、病毒、寄生虫等)和分子诊断(寡核苷酸)等方面^[10];同时,血液分析^[11-13]、核酸提取^[14-15]、细胞分析^[16]等领域的研究也不断涌现。各部分研究既有所独立、又相互交融,共同推动着微流控芯片 POCT 技术的发展。

以现代生命科学和医学研究领域的核酸提取为例,微流控芯片 POCT 在其研究过程中表现出独特的魅力。传统技术在对细胞 DNA 提取方面相当费时,操作过程中用到的有毒试剂还会给测试结果带来不利影响。而借助微流控芯片从生物样品细胞内提取和隔离核酸则为基因分析带来了革命,并成为当前 DNA 检测分析的重要步骤。Wolfe 等^[17]利用微流控芯片,通过固相萃取(SPE)方法从细胞溶解物中获得核酸,该方法主要包括三个步骤:(1)在离液盐环境下 DNA 的吸附;(2)通过酒精水溶液清除杂质;(3)对少量含有吸附 DNA 缓冲液的洗脱处理。由于 SPE 依赖于 DNA 和固相载体(通常为二氧化硅或功能磁性微粒)之间的结合性能^[18-19],增强芯片材料和核酸之间的亲和性曾引起大家的关注^[14,20],但由于其对 pH 值、温度和缓冲液成分极为敏感,使分析过程中难以保留完整的 DNA,易造成部分片段的缺失。同时,除 DNA 之外的其他细胞溶解物还可能对期望的结合反应造成阻碍(例如细胞溶解物中带负电荷的蛋白会通过芯片表面正电荷之间的相互作用削弱提取效率),致使目前的提取效率普遍停留在 60%~90%^[21],因此需开发新技术以弥补其不足。

最近, Benitez 等^[22]借助 PDMS 微流控芯片在单细胞水平上对人体染色体 DNA 进行了提取、纯化和拉长处理。该方法与借助核酸与功能表面间生化和静电相互作用的传统方法不同,人体细胞在微通道内被大量无规则排列的微柱捕获后,通过细胞溶解处理使 DNA 链缠绕拉伸固定于微柱间,即可获得 100% 的完整基因组 DNA,然后可对 DNA 进行下游和离片(off-chip)分析。该技术使从少量细胞和单细胞中隔离和分析完整基因组 DNA 成为可能,将为 DNA 测序和基因分析提供新的途径。

而在与我们日常生活息息相关的领域,微流控芯片 POCT 同样大有作为,从致病细菌、病毒检测到体液(包括血液、尿液、唾液等)分析等领域均有广泛的研究和应用^[7]。最近,美国波士顿大学的 Klapperich 小组设计制作了一种可快速精确诊断季节性和流行性流感菌株的微流控芯片,该芯片集成有固体萃取和分子放大单元,可通过逆转录聚合酶反应(TR-PCR)实现对 A 型流感病毒 RNA 的扩增^[23]。通过对收集的临床鼻咽样本的测试分析发现,该芯片较目前两种使用的快速免疫测定方法更加灵敏,并且具有高特异性,与实验室快速化验和直接荧光抗体(DFA)检测结果的准确性相当。这种基于微流控芯片的测试方法大大提高了病毒培养时间和快速免疫检测的灵敏度,同时也减少了 DFA 和 RT-PCR 的使用频率,有望成为个人诊断流感的理想工具。

鉴于微流控芯片 POCT 研究发展过程中所展现出的巨大应用前景,IBM 公司^[24]提出了应用于免疫诊断学的理想微流控芯片 POCT 装置。该装置只需从患者处提取少量未经处理的体液样品即可展开分析,样品所需量最少可达 1 μL ,且能够同时处理多达 100 份的样品,其中包含不同种类的蛋白和核酸。仅需 1 分钟即可知道定量分析的结果,样品分析物的检测具有高度选择性,可消除干扰和假阳性,并且包含负反馈系统,能够消除来自不同患者或不同批次样品之间的交叉感染。

目前,包括 Biosite、i-STAT、Cepheid、Micronics、Unipath 等在内的众多新兴高科技公司纷纷推出自己基于微流控芯片技术的 POCT 产品,主要集中于疾病标志物蛋白、传染病毒和细胞检测等方面,使整个产业在世界范围内进入迅猛发展时期。法国市场研究公司 Yole Développement 预测,微流控芯片 POCT 市场在未来五年会保持快速增长,预计至 2017 年其市场规模将高达 160 亿美元,约占整个 POCT 市场份额的 42%^[25],表现出强劲的发展势头。

3 微流控芯片 POCT 的发展方向和应用中存在的问题

与传统微流控芯片相比,面向 POCT 的微流控芯片在使用便捷化方面要求更高,只需少量甚至无需任何外部辅助设备,该要求也限制了大量其他微流控技术(操作过程中通常会使用注射泵和显微镜)在该领域的应用。为避免污染和疾病传播,一次性非反复使用是医学检验的基本要求,为此必须大力降低微流控芯片 POCT 装置的制造成本、增强量化生产能力,并向小型手持式或插入式部件模式发展^[3]。为满足大家的需求,微流控芯片 POCT 装置中所含的一次性检测元件必须相当便宜,其成本能够与普通临床检测大体相当,具有价格优势。

目前,开发更多“个性化”的检验手段是微流控芯片 POCT 研究的重要方向^[9],特别是用于检测易出现和可能复发的疾病(例如肺结核、SARS、流感),以及疫苗治疗疾病(例如麻疹、破伤风和小儿麻痹症等),对这些疾病的早期诊断、病情监测和管理至关重要。

因为针对样品的相关检测工作偏于专业、操作复杂,目前很多投入应用的微流控芯片 POCT 装置尚难以直接面向未经任何技术培训的个人^[5],仍离不开专业医护人员的辅助操作,这明显有悖于微流控芯片 POCT 的设计和使用初衷。为此,须大力增强其操作的简便性和智能化,使其能够更好的直接面向普通用户,便于非专业人员的使用,这将是微流控芯片 POCT 发展过程中面临的重要挑战。同时,也需适当对微流控芯片 POCT 的操作者(包括医护人员、患者和家属)进行多种形式的专业培训,培训内容包括了解仪器的技术参数和基本性

能,以及操作和规范使用等。

值得注意的是,虽然微流控芯片 POCT 展现出极高的应用价值,但并非适用于所有的诊断或分析应用领域。特别是对于那些在家中即可直接开展的测试项目,比如 HIV 检测、口服抗凝剂检测、妊娠检测等,如果没有专业的解释说明(或者缺乏相关专业知识)可能会导致错误的检验结果,误导患者。而对于一些特别敏感的内容(比如 HIV 和未来的基因测试),还可能带来一系列涉及个人隐私、信息盗窃和医疗纠纷等在内的社会问题,在推广应用之前必须建立有效的监管机制。通过制定统一标准,建立严格的质量控制体系,使微流控芯片 POCT 的应用更加可靠。

4 结 论

虽然目前许多基于微流控芯片技术的 POCT 产品已成功推向市场,但更多有前景的技术还处于早期实验室研究开发阶段,必须经过大量的技术创新和完善才能正真投入应用中。随着微流控芯片 POCT 技术的日趋成熟,终将走出实验室并真正进入到应用领域,对人们的日常生活产生重要影响。

参考文献

- [1] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics[J]. Nature, 2006, 442(27): 368-673.
- [2] Mark D, Haeblerle S, Rith G, et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications[J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(10): 1153-1182.
- [3] Sia SK, Kricka LJ. Microfluidics and point-of-care testing[J]. Lab Chip, 2008, 8(12): 1982-1983.
- [4] Yeo LY, Chang H, Chan PPY, et al. Microfluidic Devices for Bio-applications[J]. Small, 2011, 7(1): 12-48.
- [5] Chin CD, Linder V, Sia SK. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices[J]. Lab Chip, 2012, 12(12): 2118-2134.
- [6] Ahn C H, Choi J, Beaucage G, et al. Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics[J]. Proc IEEE, 2004, 92(1): 154-173.
- [7] Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, et al. Point of Care Diagnostics: Status and Future[J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 487-515.
- [8] Yager P, Edwards T, Fu E, et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health[J]. Nature, 2006, 442(27): 412-418.
- [9] Chin CD, Linder V, Sia SK. Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities[J]. Lab Chip, 2007, 7(1): 41-47.
- [10] Ng AHC, Uddayasankar U, Wheeler AR. Immunoassays in microfluidic systems[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(3): 991-1007.
- [11] Toner M, Irimia D. BLOOD-ON-A-CHIP[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2005, 7(1): 77-103.
- [12] Dimov IK, Basabe-Desmonts L, Garcia-Cordero JL, et al. Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS)[J]. Lab Chip, 2011, 11(5): 845-850.
- [13] Hou HW, Bhagat AAS, Lee WC, et al. Microfluidic Devices for Blood Fractionation[J]. Micromachines, 2011, 2(3): 319-343.
- [14] Price CW, Leslie DC, Landers JP. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip[J]. Lab Chip, 2009, 9(17): 2484-2494.
- [15] Choi S, Goryll M, Sin LYM, et al. Microfluidic-based biosensors toward point-of-care detection of nucleic acids and proteins[J]. Microfluid Nanofluid, 2011, 10(2): 231-247.

[16] Zare RN, Kim S. Microfluidic Platforms for Single-Cell Analysis [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2010, 12(2):187-201.
 [17] Wolfe KA, Breadmore MC, Ferrance JP, et al. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids[J]. Electrophoresis, 2002, 23(6):727-733.
 [18] Gijs M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications[J]. Microfluid Nanofluid, 2004, 1(1):22-40.
 [19] Duarte GR, Price CW, Littlewood JJ, et al. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads[J]. Analyst, 2010, 135(3):531-537.
 [20] Reedy CR, Price CW, Sniogowski J, et al. Solid phase extraction of DNA from biological samples in a post-based, high surface area poly(methyl methacrylate) (PMMA) microdevice[J]. Lab Chip, 2011, 11(9):1603-1611.
 [21] Kim J, Johnson M, Hill P, et al. Microfluidic sample preparation:

cell lysis and nucleic acid purification[J]. Integr Biol, 2009, 1(10):575-586.
 [22] Bentéz JJ, Topolancik J, Tian HC, et al. Microfluidic extraction, stretching and analysis of human chromosomal DNA from single cells[J]. Lab Chip, 2012, 12(22):4848-4854.
 [23] Cao Q, Mahalanabis M, Chang J, et al. Microfluidic Chip for Molecular Amplification of Influenza A RNA in Human Respiratory Specimens[J]. PLOS One, 2012, 7(3):e33176.
 [24] Gervais L, Rooij N, Delamarche E. Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics[J]. Adv Mater, 2011, 23(24):H151-H176.
 [25] Breussin F, Roussel B. Point of Care Testing Applications of Microfluidics Technologies[S]. Yole Développement, June 2012.

(收稿日期:2012-11-08)

• 综 述 •

诊断类风湿性关节炎伴感染的新指标:中性粒细胞 CD64

魏忠华,何思春,王利君,焦 鑫,周 红 综述,黄君富 审核

(四川省达州市中心医院检验科 635000)

关键词:中性粒细胞; 关节炎,类风湿; 细菌感染; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1711-03

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以对称性多关节炎为主要临床表现的异质性、系统性、自身免疫性疾病。我国 RA 的患病率略低于 0.5%~1%的世界平均水平,为 0.32%~0.36%左右^[1]。感染是类风湿性关节炎(RA)患者一个主要的并发症,还常引起死亡,生物试剂如 TNF- α 受体阻滞剂增加肺结核发病率或机会感染^[2],RA 活动期患者有发热、关节痛、炎性标志物(如 CRP、ESR)增高,感染也有发热、炎性标志物增高,用临床症状和血液中炎性标志物升高来区分 RA 患者是活动期或感染非常困难,医生常用经验判断是否使用抗菌素,可能引起非感染患者使用抗菌素,会增大细菌的耐药性、病人不良事件的风险。因此,对类风湿性关节炎是否伴感染的鉴别诊断就显得十分重要和必要。近年来,国内外大量研究证明,中性粒细胞表面 CD64 的表达对诊断细菌性感染具有较高的特异性及敏感性,而对 RA 伴感染的研究较少。本文就中性粒细胞 CD64 对早期诊断 RA 伴感染早期的诊断价值及应用前景进行综述。

1 感染的检测指标

感染是一种临床常见的病理生理过程,其测定指标较多,常用的指标有:白细胞计数、中性粒细胞百分比、C-反应蛋白、血沉、体温等。当发生感染时,这些指标通常都会升高,而非感染性炎症反应也会引起这些指标升高。因此,这些指标在诊断细菌性感染时特异性不高^[3-4],必须结合临床表现,作为感染诊断的参考指标。细菌培养或 PCR 方法能检测出明确的病原微生物,但培养时间较长,阳性率偏低,PCR 方法灵敏度高,不过也存在一定的假阳性或假阴性问题,并且无法做药敏实验。近年来,PCT 作为诊断感染和败血症的指标准确性好于 CRP,而且感染时比 CRP 升高更迅速^[5],但也有研究表明 PCT 在诊断细菌性感染时敏感性仅为 76%,特异性仅为 70%,只有中等诊

断能力^[6]。随着流式细胞分析技术日渐成熟,郑林华等^[7]研究淋巴细胞亚群与慢性乙型肝炎的关系,发现外周血及肝组织内 T 淋巴细胞亚群的数量与乙肝病毒感染相关;Ng 等^[8]对多种白细胞表面标记物,即细胞表面受体进行研究,结果发现 CD64 对严重感染有较高的敏感性和特异性。

2 CD64 的生物学特性

CD64 是相对分子质量为 72 000 的跨膜糖蛋白,它的基本结构分为胞外部分、跨膜片段及胞浆尾,由位于 1 号染色体长臂上的 A、B、C 3 个基因编码,它分布于白细胞的表面,是 Fc 受体之一,即(Fc γ RI),属于免疫球蛋白超家族的成员。IgG 的 Fc γ R 分 3 型:Fc γ I(CD64)、Fc γ R II(CD32)、Fc γ R III(CD16),CD64 是其中亲和力最高的受体。CD64 具有信号传导作用、介导吞噬作用、介导细胞毒作用,这些功能参与先天或后天免疫应答,在吞噬细菌与免疫复合物的过程起着非常重要的作用。CD64 在通常情况下(非细菌感染)在中性粒细胞表面低水平表达,而在外周血中,主要分布在单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞表面。一般情况下,机体感染或内毒素入侵时 CD64 在刺激后 4~6 h 即可升高^[5],可作为感染的早期诊断标志物之一,在诊断感染性疾病时敏感性和特异性都比较高(90%~100%),显示了很好的诊断优势。目前,由美国 BD 诊断试剂公司生产的 CD64 检测试剂盒和 FACSCalibur 流式分析仪分析软件使得 CD64 的检测更标准化^[9],数据分析自动化,结果更准确,CD64 检测结果常用阳性细胞百分率、CD64 平均密度和 CD64 指数 3 种方法表示,国内外学者^[10-12]认为 CD64 指数对细菌性感染有很好敏感性和特异性,还可判断感染的严重程度。

3 中性粒细胞 CD64 在 RA 并发感染的价值

自身免疫性疾病患者受到损害,常发机会感染,诊断其感