

作为恶性肿瘤的初筛指标^[20]。李莉等^[21]研究发现,血清乳酸脱氢酶(LDH)和 PA 可作为判断非小细胞肺癌病情指标,追踪检测对了解病情变化有指导意义。PA 与肿瘤标志物联合检测,以提高阳性率及特异性,更具有临床意义。

5 小 结

PA 在营养不良、肝病、感染性疾病、肿瘤等都有很好的应用,有学者还把 PA 应用于脑脊液中检测,检测 PA 用于化脓性脑膜炎、结核性脑膜炎与病毒性脑膜炎的鉴别诊断和疗效观察^[22];急性脑出血患者血清中 PA 值水平越低,预后越差^[23];PA 和白细胞介素-6(IL-6)检测对创伤性骨折患者病情、疗效及预后的判断更加准确等应用^[24]。PA 目前检测方法主要采用免疫透射比浊法,检测方法简便、快速等优点,其在临床疾病诊断、鉴别诊断和疗效观察中都有很好的参考价值,可作为各级医院常规开展的检验项目,为临床提供帮助。由于引起 PA 降低的原因很多,对于疾病是由营养不良、炎症、肝脏疾病等引起,临床医生还要根据患者病情、结合其他检查项目综合分析。

参考文献

[1] 丛玉隆,尹一兵,陈瑜. 检验医学高级教程[M]. 北京:人民军医出版社,2011:639-640.

[2] 张明鸣,伍晓汀,罗婷,等. 纤维连接蛋白和前清蛋白在营养支持效果评价中的作用[J]. 肠外与肠内营养,2005,12(6):358-360.

[3] Bae HJ, Lee HJ, Han DS, et al. Prealbumin levels as a useful marker for predicting infectious complications after gastric surgery[J]. J Gastrointest Surg,2011,15(12):2136-2144.

[4] Jie B, Jiang ZM, Nolan MT, et al. Impact of nutritional support on clinical outcome in patients at nutritional risk: a multicenter, prospective cohort study in Baltimore and Beijing teaching hospitals [J]. Nutrition,2010,26(11/12):1088-1093.

[5] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:354.

[6] 刘豫隆. 血清胆碱脂酶、总胆固醇和总胆汁酸评价肝硬化患者肝功能[J]. 福建医科大学学报,2003,37(4):416-417.

[7] 张瑞霞,杨义明. 血清丁酰胆碱酯酶、前清蛋白评价肝硬化患者肝脏储备功能的临床价值[J]. 山东医药,2006,46(31):31-32.

[8] 马丽,涂斌. 肝硬化患者血清前清蛋白、总胆汁酸、腺苷脱氨酶、胆碱酯酶测定的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(10):1125-1127.

• 综 述 •

[9] 李雪梅,刘露. 前清蛋白、总胆汁酸、胆碱酯酶对不同类型肝病的临床价值分析[J]. 中国医药导报,2008,5(20):45-46.

[10] 王海英,梁化歧,樊卫红. 血清前清蛋白检测对良、恶性肿瘤的鉴别诊断探讨[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(15):3480-3481.

[11] 杨琼,俞文萍,张艳. 血清前白蛋白和 C-反应蛋白检测在小儿感染性疾病临床诊断中的应用[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(10):2233-2234.

[12] Dahl M, Nordestgaard BG. Markers of early disease and prognosis in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2009,4:157-167.

[13] 杨钧,奚晶晶. 前清蛋白、D-二聚体及血小板动态变化评估重症脓毒症血症患者病情严重度的临床分析[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2009,8(3):292-293.

[14] 唐洁瑛,周吉祥. 血清前清蛋白和 C-反应蛋白与呼吸系统感染相关性观察[J]. 中华护理杂志,2005,2(2):104-105.

[15] 郑青林,吴文武,陈宇. C 反应蛋白和前清蛋白在 AECOPD 中的临床意义[J]. 临床肺科杂志,2012,17(10):1804-1806.

[16] 顾宇平,赵云根. 血清清蛋白和前清蛋白水平在 AECOPD 的临床意义[J]. 临床肺科杂志,2012,17(10):1810-1811.

[17] 楼秀敏,陈虹,黄静. 前清蛋白、白细胞计数在新生儿感染性疾病中的相关分析[J]. 检验医学,2010,25(9):727-728.

[18] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.

[19] 黄学梅,卢萍,何萌,等. 血清 PA 测定在恶性肿瘤诊断中的价值及其在手术治疗中的动态观察[J]. 第三军医大学学报,2011,33(21):2304-2305.

[20] 文国泰,刘成桂,邓成莲,等. 血清前清蛋白测定在肿瘤良恶性鉴别诊断中的价值[J]. 四川医学,2008,29(4):416-418.

[21] 李莉,李超,徐晓婷,等. 非小细胞肺癌同步放化疗疗效与血清 LDH、PA 检测的临床意义[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(1):75-78.

[22] 钟苏梅,钟国权,侯燕明,等. 中枢神经系统感染脑脊液中前清蛋白的变化[J]. 中国医药科学,2012,2(12):115-116.

[23] 李基克,李军,郭志强,等. 前清蛋白对急性脑出血患者预后的评估[J]. 现代检验医学杂志,2011,26(6):123-124.

[24] 时华凤. 前清蛋白与白细胞介素-6 在创伤性骨折患者中的检测及临床意义[J]. 中国现代医生,2012,50(3):90-91.

(收稿日期:2013-01-21)

流式细胞术在转化医学研究中的应用

杨瑞宁¹,周显光²,张 迪¹综述,江淑芳^{1△}审校

(1. 解放军第 81 医院检验科,江苏南京 210002;2. 南京军区南京总医院全军肾脏病研究所,江苏南京 210002)

关键词:流式细胞术; 转化医学; 肿瘤; 免疫
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 16. 036 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)16-2138-03

流式技术起源于 20 世纪 60 年代的显微荧光测定法,当时这种分析技术主要是应用激光分析液流中的单个细胞的性质^[1]。通过将液流分割,形成成串的小液滴,使液滴中包裹单独的细胞,之后快速记录液滴在激光照射下所产生的光信号。单个细胞可以带上电荷,并通过同样带电荷的偏转板使液滴沿

飞落的方向产生偏转,落入收集器中。单克隆抗体能特异性的结合细胞表面的标志物,同时目前发现了各种各样具有较窄光谱的激发光和发射光的荧光染料,使得这项技术能够应用于基础免疫学研究、临床免疫学诊断,以及为临床前的模型和临床器官移植表型试验确定细胞亚群。流式细胞技术经过 50 余年

的发展,已从早期单一的荧光定量技术发展为广泛用于肿瘤、免疫缺陷等多种疾病的诊断、发病机制的研究和预后监测的重要手段。本文将对流式细胞技术在转化医学研究中的应用以及最新进展进行综述。

1 流式细胞技术用于肿瘤诊断和判断预后

越来越多的文献支持流式细胞术在白血病的预后和监测中的应用^[2-3],这项技术也同样适用于肿瘤、免疫缺陷、干细胞移植和器官移植患者免疫状态的临床研究^[4]。早在 50 多年前,形态学实际上是当时唯一的诊断方法,只有少数特殊的血液系统肿瘤能被辨别出来,例如霍奇金淋巴瘤。目前血液系统肿瘤分类的重要内容是确定抗原表达谱所指向的最适的、非恶性增生的免疫细胞系(如 B 细胞、T 细胞)和分化状态(如前体、成熟体)。国际上对血液系统肿瘤的分类几乎都需要整合免疫表型、形态学、细胞来源和分子遗传数据,以获取精确诊断。利用相应抗体可检测稀有的免疫细胞亚群(如浆细胞样树突状细胞),目前已经在临床疾病的精细分类中得到运用^[5]。

流式分析技术可以提供重要的诊断和预后信息,且能非常精确地识别恶性肿瘤的特殊免疫表型和 DNA 序列,因而可用于选择特异的治疗方法。例如,体内有许多 CD20⁺ B 细胞的恶性肿瘤患者,目前常使用抗-CD20 单抗(美罗华)治疗;同样,如果以表达 CD52 的 T 细胞和 B 细胞亚群为主,则也许能用抗 CD52 单抗进行治疗(阿仑珠单抗)。套细胞淋巴瘤进展迅速,需要更多的强化治疗,流式细胞术可用于将其与另一种形态学相似的非活动性的 CD20⁺ 成熟 B 细胞淋巴瘤相鉴别^[6]。此外,流式细胞术能够精细地区分 B 细胞淋巴瘤的抗原表达分布、识别特异性肿瘤之间重复性的抗原、定量恶性腺瘤细胞的抗原密度,从而帮助临床诊断。流式细胞术还能精细区分大量异种细胞,可用于检测治疗后体内残存的恶性肿瘤细胞(如监测极小的残留病灶)^[6]。在一些常见的恶性肿瘤疾病中,这些残留病灶长期存在导致预后很差^[7]。最后,流式细胞术可用于对急性淋巴细胞白血病(最常见的儿童血液疾病)相关细胞进行分型,并帮助指导治疗。

2 用于免疫学疾病的诊断和预后判断

流式细胞术也可作为主要的临床实验室平台应用于评估患者的免疫状态,比如 HIV 感染后的血液 CD4⁺ T 细胞计数^[8-9]分类,还可以预测几种主要的免疫缺陷,例如自身免疫性淋巴组织增生综合征、严重的联合免疫缺陷和抗体缺陷。此外,流式细胞仪可以定量检测异体干细胞移植中的特殊免疫细胞亚群和异体骨髓移植后的免疫重建^[10-11],因而可以预测移植后的存活率^[12-13]。最后,流式细胞术可用于定量检测血液中极少量的 CD34⁺ 血管内皮祖细胞,可作为临床上的一种非常规方法用于预测外周动脉和心血管疾病的预后。

3 流式细胞技术在细胞治疗和器官移植中的应用

流式细胞术作为分选纯化特殊细胞群的研究工具,可以用于基于细胞水平的治疗。CD34⁺ 是人类造血干细胞和祖细胞的特殊标记物^[14],因此可以使用流式技术分离和纯化表型为 CD34⁺ 的细胞进行移植。这种方法的理论依据是,肿瘤患者先经过高强度的放疗和化疗,随后进行自体干细胞移植,以缓解一般化疗后复发的肿瘤或者一般化疗不足以带来长期缓解的肿瘤。使用流式细胞技术分离自体 CD34⁺ 干细胞并应用于临床,可减少干细胞移植时再灌注及肿瘤细胞污染引起的风险。乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤患者使用高纯度流式分选的 CD34⁺ 干细胞进行自体移植的研究已经启动。令人遗憾的是,这些研究规模较小以及缺乏足够的对照,使得该技术

尚未取得美国 FDA 的支持。虽然流式细胞术可以满足鉴别治疗需要的细胞亚群,例如 FOXP3⁺ 调节 T 细胞,但是细胞经过固定破膜处理后,便不能用于临床治疗^[15]。

流式细胞术另一种新用途是可以用于检测输血后、移植前、怀孕时潜在产生的 HLA 抗体,也可用于移植时 HLA 分型的检测。最初检测以上项目使用的是繁琐且敏感性较差的血清学试验。精细的 HLA 抗体分析和 HLA 分型,成为人类组织相容性检测最前沿的技术手段。1983 年,一个生殖期刊证明了用流式细胞术可检测到针对供体的 HLA 抗体^[16],这种抗体会带来明显的早期异体肾移植排斥。从那以后,大量的研究证实了这种观察,这不仅仅适用于肾移植的受者,其他器官移植也同样适用^[17-18]。从血液学角度来看,异体干细胞移植中 HLA 抗体和 HLA 抗原不吻合,导致移植物植入失败。在某些情况下,供者检测到特异性 HLA 抗体可以作为移植的禁忌证,而在另外一些情况下,定制抑制抗体的治疗方案对于提高细胞治疗方法的疗效更为重要。

采用微球检测 HLA 抗体的新方法加速了流式技术在临床上的应用。将纯化的一类和二类 HLA 抗原连接在微球表面,明显降低了使用整个细胞作为靶抗原时非 HLA 细胞膜蛋白造成的假阳性。最近出现一种新的基于流式技术的多通路平台,可以同时鉴别 100 种独立的双色荧光微球^[19],并构成二维虚拟阵列。一种复杂的设门方案,使用三色激光,可以分析每种独立的微球,根据荧光强度来判断每种微球的反应是阴性还是阳性。HLA 抗原包被的微球可以用于辨别致敏患者血清中的一类和二类抗体。相关研究证明,流式技术检测显示交叉配对性结果,与供体特异性抗体、早期排斥反应、移植失败有很强的相关性^[20]。这种新技术将给实体器官移植带来帮助。

有趣的是,这种多通路流式细胞术同样可应用于 HLA 基因分型,通过微球上附属的 DNA 探针,可同时检测到近 100 种等位基因的变化^[21]。因此,目前任何 HLA 实验室都可以轻松实现用流式技术进行高通量的 HLA 基因分型。实际上,这种技术足够敏感和特异,可以精确检测干细胞和实体器官移植患者的 HLA 分子间特异性的单个氨基酸序列的差异^[22]。

4 流式细胞术数据分析系统的发展趋势

高通量诊断、预后评价中的多通路微球分析、DNA 倍数分析,以及稀有淋巴细胞亚群的检测,会获得非常大量的数据,而分析和数据报告的标准化将有助于大量数据的共享,从而促进流式细胞术在临床和科研中的广泛应用^[23-25]。

目前,一些流式技术平台已经建立了自动化数据分析系统,其使用标准化的方法,将数据集作为统计学客体嵌入 n-维空间或者群体分布,更能促进目标数据的获取、评估和报告。这些创新会促进流式技术在临床的应用,并拓展其在血液恶性肿瘤及免疫检测以外的其他研究领域中的应用。

参考文献

- [1] Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, et al. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement[J]. Science, 1969, 163(3872): 1213-1214.
- [2] Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(Suppl 1): S14-22.
- [3] Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cyto-

metric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation[J]. Blood, 2008, 112(10): 4017-4023.

[4] Ogawa H, Ikegame K, Yoshihara S, et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched(haploidentical) stem cell transplantation using nonmyeloablative conditioning[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(10): 1073-1084.

[5] Jaye DL, Geigerman CM, Herling M, et al. Expression of the plasmacytoid dendritic cell marker BDCA-2 supports a spectrum of maturation among CD4⁺ CD56⁺ hematodermic neoplasms[J]. Mod Pathol, 2006, 19(12): 1555-1562.

[6] Kraus TS, Sillings CN, Saxe DF, et al. The role of CD11c expression in the diagnosis of mantle cell lymphoma[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(2): 271-277.

[7] Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(13): 2971-2979.

[8] Barnett D, Walker B, Landay A, et al. CD4 immunophenotyping in HIV infection[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(Suppl 11): S7-15.

[9] Soiffer RJ, Mauch P, Fairclough D, et al. CD6⁺ T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation from genotypically HLA nonidentical related donors[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 1997, 3(1): 11-17.

[10] Ogawa H, Ikegame K, Kaida K, et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched(haploidentical) bone marrow transplantation using only pharmacological GVHD prophylaxis[J]. Exp Hematol, 2008, 36(1): 1-8.

[11] Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus(prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation[J]. Blood, 1998, 92(7): 2303-2314.

[12] Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, et al. Larger numbers of CD4 (bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation[J]. Blood, 2001, 97(10): 2948-2956.

[13] Reddy V, Winer AG, Eksioglu E, et al. Interleukin 12 is associated with reduced relapse without increased incidence of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(12): 1014-1021.

[14] Civin CI, Strauss LC, Brovall C, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells[J]. J Immunol, 1984, 133(1): 157-165.

[15] Roncador G, Brown PJ, Maestre L, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD41CD251 regulatory T cells at the single-cell level[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(6): 1681-1691.

[16] Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, et al. A high technology crossmatch technique facilitating transplantation[J]. Transplant, 1983, 15(5): 1939-1941.

[17] Bray RA, Tarsitani C, Gebel HM, et al. Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection[J]. Methods Cell Biol, 2011, 103(1): 285-310.

[18] Lindemann M, Nyadu B, Heinemann FM, et al. High negative predictive value of an amplified flow cytometry crossmatch before living donor kidney transplantation[J]. Hum Immunol, 2010, 71(8): 771-776.

[19] Taylor JD, Briley D, Nguyen Q, et al. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis[J]. Biotechniques, 2001, 30(3): 661-666.

[20] Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay[J]. Transplantation, 2011, 91(5): 527-535.

[21] Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, et al. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches[J]. Am J Transplant, 2011, 11(4): 719-724.

[22] Ciurea SO, de Lima M, Cano P, et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation[J]. Transplantation, 2009, 88(8): 1019-1024.

[23] Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, et al. 2006 Bethesda International Consensus Conference on flow cytometric immunophenotyping of hematolymphoid Neoplasia[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(Suppl 1): S3.

[24] Calvo KR, McCoy CS, Stetler-Stevenson M, et al. Flow cytometry immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia[J]. Methods Mol Biol, 2011, 699(1): 295-316.

[25] Wilson WH. International consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(Suppl 1): S2.

(收稿日期: 2013-02-28)

• 综 述 •

先天性心脏病的遗传学研究进展

徐 菲, 孙奉劼 综述, 张瑞生 审校

(南京市第一医院检验科/南京医科大学附属南京第一医院, 江苏南京 210000)

关键词:先天性心脏病; 基因; 染色体
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 16. 037 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)16-2140-03

先天性心脏病(先心病)是人胚胎发育时期(怀孕初期 2~3 个月内)由于心脏及大血管的形成障碍而引起的局部解剖结构异常,或出生后应自动关闭的通道未能闭合(在胎儿属正常)的心脏,称为先天性心脏病。其发生率占活产婴儿的 0.7%~1%,中国每年新增 15 万至 20 万例先心病患儿^[1]。临床上以心功能不全、发绀以及发育不良等为主要表现。先心病是胚胎

作者简介:徐菲,女,研究员,主要从事医学遗传学研究。