

cRNA-PCAT1 is closely related to clinical diagnosis of multiple myeloma as a predictive biomarker in serum [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 18(3):257-263.

[25] CANELLA A, HARSHMAN S W, RADOMSKA H S, et al. The potential diagnostic power of extracellular vesicle analysis for multiple myeloma[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(3):277-284.

[26] HUH N S, WEINHOLD N, NICKEL J, et al. Circulating tumor cells as a biomarker for response to therapy in multiple myeloma patients treated within the GMMG-MM5 trial[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2017, 52(8):1194-1198.

[27] MITHRAPRABHU S, KHONG T, RAMACHANDRAN M, et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma[J]. *Leukemia*, 2017, 31(8):1695-1705.

[28] QIN Y, ZHANG S, DENG S, et al. Epigenetic silencing of miR-137 induces drug resistance and chromosomal instability by targeting AURKA in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2017, 31(5):1123-1135.

[29] KUBICZKOVA L, KRYUKOV F, SLABY O, et al. Circulating serum microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance[J]. *Haematologica*, 2014, 99(3):511-518.

[30] ZHOU M, ZHAO H, WANG Z, et al. Identification and validation of potential prognostic lncRNA biomarkers for predicting survival in patients with multiple myeloma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1):102.

[31] SHAUGHNESSY J D, ZHAN F, BURINGTON B E, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1 [J]. *Blood*, 2007, 109(6):2276-2284.

[32] ZHUANG W, GE X, YANG S, et al. Upregulation of lncRNA MEG3 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Multiple Myeloma Patients By Targeting BMP4 Transcription[J]. *Stem cells*, 2015, 33(6):1985-1997.

[33] CHO S F, CHANG Y C, CHANG C S, et al. MALAT1 long non-coding RNA is overexpressed in multiple myeloma and may serve as a marker to predict disease progression[J]. *BMC cancer*, 2014, 14(14):809.

(收稿日期:2017-10-22 修回日期:2018-01-02)

• 综 述 •

急性髓系白血病相关循环肿瘤标志物的临床应用*

黄春燕, 查显丰 综述, 温旺荣[△] 审校

(暨南大学附属第一医院临床检验中心, 广东广州 510630)

摘 要: 恶性肿瘤严重危害人类生命健康, 为了设计和选择更好的治疗方案, 早期诊断是其治疗中最重要的步骤之一。虽然近年来急性髓系白血病(AML)的诊治方法不断提高, 但其长期无病生存率仍然较低。因此, 探寻更加灵敏、特异的早期生物学标志物, 尽早明确 AML 的诊断和治疗方案, 对提高 AML 患者的长期无病生存率具有重要意义。随着无创检验技术的不断创新, 循环肿瘤标志物成为研究的热点。这些肿瘤标志物的出现为 AML 的早期诊断提供了新靶点, 并为患者的预后和生存带来希望。本文主要对近年来报道的 AML 相关循环肿瘤标志物及其在临床的应用价值进行综述。

关键词: 急性髓系白血病; 循环肿瘤标志物; 长链非编码 RNA; 微小 RNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.005

中图法分类号: R733.71

文章编号: 1673-4130(2018)10-1173-04

文献标识码: A

急性髓系白血病(AML)是血液系统常见的恶性克隆性疾病, 其最主要的特征是造血干/祖细胞不受控制的增殖, 蓄积于骨髓并抑制正常造血^[1]。随着环境等因素的影响, 其发病率呈逐年上升趋势。虽然联合阿糖胞苷和蒽环类药物治疗使 AML 的完全缓解(CR)率达 70%, 但约 60% 的患者缓解后复发并死亡。研究表明, AML 患者的预后仍然不理想, 5 年无

病生存率仅 20%~40%^[2]。从 2001 年开始主要用形态学、免疫学、细胞遗传学、分子生物学(MICM)来对 AML 进行诊断和分类。虽然 MICM 对 AML 的诊断和预后评估有所贡献, 但其诊断耗时较长且骨髓穿刺是有创的侵入性操作。对 AML 患者, 早期发现和及时干预可以增加其生存概率。因此, 为了制定更有效的预防和治疗方案, 有必要探寻新的 AML 诊断和预

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81400109)。

[△] 通信作者, E-mail: wenwangrong@yeah.net。

本文引用格式: 黄春燕, 查显丰, 温旺荣. 急性髓系白血病相关循环肿瘤标志物的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(10):1172-

后的生物标志物。本文对近期报道的 AML 相关循环肿瘤标志物(包括循环游离 DNA、微小 RNA、长链非编码 RNA 和蛋白质组学等)进行了综述。

1 循环游离 DNA(cfDNA)的临床研究

cfDNA 是由细胞凋亡或坏死释放到血液中的胞外 DNA;肿瘤特异性 cfDNA 由原发肿瘤和转移瘤细胞坏死释放,是肿瘤特征性的生物标志物。HOCK-ING 等^[3]表明 cfDNA 标本易得、用量少、适于进行重复分析,可以作为肿瘤诊断和预后等的标志物。

JIANG 等^[4]对 66 例 AML 患者和 100 例对照组(60 例健康体检者,20 例良性血液病患者和 20 例实体瘤患者)血浆循环 DNA 水平进行研究,发现 AML 患者初诊时血浆 DNA 水平中值为 168.5(73.4~245.1)ng/mL,显著高于 3 个对照组;与化疗前相比,完全缓解和部分缓解患者的血浆 DNA 水平明显下降;此外,研究者还随访了 31 例缓解患者,发现 83.3%(5/6)复发患者血浆 DNA 水平增加,但 88.0%(22/25)非复发患者血浆 DNA 水平没有增加。提示定量检测血浆 DNA 可能有助于评估 AML 患者的治疗效果和监测疾病复发。

ZHONG 等^[5]对 235 例 AML 患者进行研究,提取患者血浆游离 DNA 后进行珠蛋白基因鉴定,通过 PCR 扩增血浆游离 DNA FLT3,并将其与白血病细胞 DNA 的检测结果进行比较,发现在 235 例患者中,190 例成功扩增出血浆游离 DNA 中的珠蛋白基因;在 188 例初诊、复发和难治性患者血浆游离 DNA 中,有 35 例(19%)检测到 FLT3-ITD 突变,而这 35 例患者的细胞 DNA 同样表现出 FLT3-ITD 突变;此外在 47 例缓解患者中,有 2 例血浆游离 DNA FLT3-ITD 突变者其细胞 DNA 却未见突变,但是出现早期复发;表明在 AML 患者血浆中可以检测到特异性 DNA,并且与细胞 DNA 的检测结果一致,此外,血浆中的游离 DNA FLT3-ITD 对缓解患者微小残留病(MRD)的监测更为敏感,血浆 FLT3-ITD 可用于 AML 患者的预后评估。

QUAN 等^[6]采用实时荧光定量 PCR(qPCR)和测序方法对 100 例初诊 AML 患者的外周血标本进行分析,发现 AML 患者血浆中核磷蛋白(NPM)突变率(37%)与 FALINI 等^[7]研究的 591 例 AML 患者骨髓标本中 NPM 突变率(35.2%)相当,其进一步研究发现 AML 中 M2、M4 和 M5 亚型患者 NPM 突变率较高,此外,与 M2 和 M4 亚型患者相比,M5 亚型患者血浆循环 NPM 水平显著升高($P=0.000$, $P=0.046$),说明血浆循环 NPM 可用于 AML 的诊断和分型。

血浆或血清中的 cf-DNA 具有与患者肿瘤组织相同的遗传和表观遗传变化,因此可以根据肿瘤特异性 DNA 标志物来开展无创的诊断检测。然而,为了证明 cfDNA 可以作为 AML 诊断及预后指标,还有必要进行大量的临床配对试验,得出相关 cfDNA 检

测的灵敏度和特异性。

2 微小 RNA(miRNA)的临床研究

循环 miRNA 是一类来源于组织并出现在无细胞体液中的 miRNA,高稳定性使其成为肿瘤诊断和预后的生物指标。XU 等^[8]通过对 32 篇就血液循环 miRNA 对白血病总体诊断准确性的研究进行荟萃分析,表明其诊断准确性高,灵敏度为 0.84,特异性为 0.88,阳性似然比为 7.20,阴性似然比为 0.18,曲线下 AUC 面积为 0.94,说明基于血液的循环 miRNA 可以作为白血病的诊断性生物标志物。

LIN 等^[9]研究发现,与健康对照相比,小儿 AML 患者血清和骨髓中 miR-370 的表达水平均显著降低($P=0.001$),而且 Spearman 相关分析显示,患者血清 miR-370 的表达水平与骨髓 miR-370 的表达水平密切相关($r=0.302$, $P=0.002$);血清 miR-370 诊断小儿 AML 的 AUC(ROC)为 0.993,灵敏度和特异性分别为 95.30%和 100.00%;此外,Kaplan-Meier 曲线显示,血清 miR-370 水平低的患者比高血清 miR-370 患者的无病生存(RFS)和总体生存期(OS)更短($P<0.001$),通过多变量分析进一步确定血清 miR-370 水平是小儿 AML RFS 和 OS 的独立预后因素。另外有研究证明,小儿 AML 患者血清中 miR-195 表达水平显著下调,其诊断小儿 AML 的 AUC(ROC)为 0.910,灵敏度和特异性分别为 68.87%和 96.23%;低血清 miR-195 水平是小儿 AML RFS 和 OS 独立危险预后因子^[10]。

ELHAMAMSY 等^[11]研究了 65 例初诊 AML 患者和 50 例健康对照血浆中 miR-92a、miR-143 和 miR-342 的表达水平,发现与健康对照组相比 AML 患者血浆中 miR-92a、miR-143 和 miR-342 显著降低,血浆 miR-92a 诊断 AML 的 AUC(ROC)为 0.928,其灵敏度和特异性分别为 81.5%和 94%;血浆 miR-143 诊断 AML 的 AUC(ROC)为 0.907,其灵敏度和特异性分别为 87.7%和 80%;血浆 miR-342 诊断 AML 的 AUC(ROC)为 0.889,其灵敏度和特异性分别为 75.4%和 90%,AML 患者和健康对照的差异表达说明血浆 miR-92a、miR-143 和 miR-342 可以作为诊断 AML 潜在的新型循环肿瘤标志物,而且具有较高的可行性。此外,其进一步分析发现联合检测 miR-92a、miR-143 和 miR-342 的 AUC(ROC)为 0.974,说明循环 miRNA 的联合检测比单项检测具有更大的临床诊断价值。

HORNICK 等^[12]开发生物统计模型,揭示循环外泌体 miRNA 在 AML 患者骨髓肿瘤低负荷之前就可以检测到,说明血清外泌体 miRNA 可以作为一个新的、敏感的 AML 微创早期生物标志物。细胞外囊泡(EV)是由细胞分泌并且可能含有遗传物质的脂质双层纳米级颗粒,体液中的 miRNA 可以通过与 EV 结合而免于降解^[13]。有研究表明体液中 EVs 作为“液体活检”正在成为癌症患者诊断、预后和治疗监测

的有效方法。CAIVANO 等^[14]采用 qPCR 方法定量分析 AML 患者和健康对照者循环 EV miR155 水平,发现 AML 患者 EV miR155 水平是健康对照组的 16 倍,差异有统计学意义($P \leq 0.03$);通过 ROC 曲线分析,其 AUC 为 0.780,灵敏度和特异性分别为 72.7% 和 87.5%,这些分析表明 EV miR155 水平是 AML 检测的一个重要生物标志物;此外,其还发现 AML 患者循环 EV miR155 水平和 WBC 计数呈显著的正相关($r=0.718, P=0.016$),由于高 WBC 计数和复杂核型是 AML 已知的不利预后因素,因此可以推测循环 EV miR155 水平可能作为 AML 独立的预后因子(需要进一步的研究来证实)。

miRNA 在循环血和体液中表达谱的研究为 AML 提供了新的非侵入性生物指标,然而需要注意的是,虽然有研究表明循环 miRNA 可以作为 AML 诊断及预后判断生物标志物,但总体样本量仍然很小,需要在更大的群体中进一步验证,同时有必要在不同类型的肿瘤疾病中进行研究,以验证这些 miRNA 对 AML 诊断的特异性。

3 长链非编码 RNA(lncRNA)的临床研究

lncRNA 是大于 200 个核苷酸的转录物,可以从基因间、基因内或特定的染色体区域转录,位于蛋白质编码基因的基因间延伸或重叠反义转录物内,具有多种生物学效应。HOTAIR 是 HOX 基因座中的 lncRNA 之一,能够抑制 HOXD 基因座后部区域的转录。研究表明,HOTAIR 参与多种原发性肿瘤的发生发展和转移,并且可以作为肿瘤患者预后的循环标志物和潜在治疗靶点^[15]。ZENG 等^[16]分析了 31 例初诊急性早幼粒细胞白血病(APL)患者外周血细胞中 lncRNA NEAT1 的表达水平,发现与健康对照相比 APL 患者的 NEAT1 显著降低。WU 等^[17]证明,lncRNA PVT1 在 APL 患者外周血细胞中的表达水平比健康对照显著上调,认为 lncRNA PVT1 可能在 APL 细胞的增殖中发挥重要作用。DE CLARA 等^[18]评估了细胞遗传学正常的 AML(CN-AML)患者的 lncRNA 表达谱,鉴定出 CN-AML 患者中表达的 11036 个 lncRNA,并通过 ROC 曲线和 log-rank 检验发现 XLOC-109948 是 CN-AML 无事件存活(EFS)的良好假定生物标志物,XLOC-109948 转录物水平高和低的患者的 EFS 时间中值分别为 474 d 和 1 128 d,估计 5 年 EFS 率分别为 22% 和 45%($P=0.003$),证明 XLOC-109948 lncRNA 可作为 CN-AML 的预后生物标志物。CHEN 等^[19]为了研究结肠癌相关转录物-1(CCAT1)在 AML 患者中是否异常表达,检测了 60 例新诊断 AML 患者和 60 例健康人的外周血单个核细胞中 CCAT1 的水平,结果与健康者相比,AML 患者中 CCAT1 显著上调($P<0.01$);此外其还比较了不同 AML 亚型中的 CCAT1 水平,发现在 M4 和 M5 亚型的样品中 CCAT1 增加最明显,说明外周血单个核细胞中 CCAT1 不仅可用

于 AML 的筛查和诊断,还可以用于 AML 的分型。然而,目前关于 lncRNA 在 AML 中具有诊断及预后价值的报道较少,因此需要做更多的工作来探讨 lncRNA 是否可以作为 AML 诊断和预后判断的生物标志物,如果能在大规模的 AML 临床样本中验证某些 lncRNAs,有可能为 AML 提供新的治疗靶标。

4 蛋白质组学的临床研究

CPNE3 是 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白家族的成员,被鉴定为 ERBB2 的配体,在癌症发生中具有普遍的作用。FU 等^[20]通过微阵列数据分析,发现 272 例 AML 中,高 CPNE3 表达与 AML 的 OS($P<0.001$)和 EFS($P<0.001$)相关,此外,在高 CPNE3 表达患者中,与接受同种异体造血干细胞移植患者相比,化疗的患者具有更短的 OS 和 EFS,但在低 CPNE3 表达患者中治疗方式对其作用不明显,这表明高 CPNE3 是 AML 一个独立的、不良的预后生物标志物。

上皮生长因子 7(EGFL7)是由内皮细胞分泌的约 30×10^3 的蛋白质,在血管生成中起重要作用。PAPAIOANNOU 等^[21]用 ELISA 方法测量发现与健康志愿者相比部分 AML 患者血清中的 EGFL7 蛋白水平显著增加,而 EGFL7 的抑制导致 AML 细胞增殖减少并诱导细胞凋亡。

solCD44 是一种单链膜表面糖蛋白,可分为标准型(solCD44std)和变异型(solCD44v5、solCD44v6)两类。罗代平^[22]对 80 例 AML 患者(包括初诊 31 例、复发 24 例、缓解 25 例)和 40 例健康对照进行分析,比较各组患者血清 solCD44std、solCD44v5、solCD44v6 水平,结果初诊、复发 AML 组患者血清 solCD44std、solCD44v5、solCD44v6 水平显著高于缓解组及对照组($P<0.05$),此外不同 FAB 分型的血清 solCD44std、solCD44v5、solCD44v6 水平比较有差异,且 M3 型显著高于非 M3 型($P<0.05$),说明血清 solCD44 水平与 AML 患者病情变化密切相关,可以作为 AML 诊断分型、预后评估及复发预测的血清学参考指标。

MA 等^[23]检测 84 例急性白血病患者和 20 例健康人血清程序性死亡蛋白配体-1(PD-L1),热休克蛋白 90(HSP90)和 HSP90 α 蛋白表达水平,发现急性白血病患者血清 PD-L1、HSP90 和 HSP90 α 的阳性表达率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),然而缓解期患者血清 PD-L1、HSP90 和 HSP90 α 阳性表达率低于初诊患者,差异有统计学意义($P<0.05$),复发患者 3 者的阳性表达率又明显高于初诊患者和缓解患者,差异有统计学意义($P<0.05$),这些差异表达说明血清 PD-L1、HSP90 和 HSP90 α 可被用作急性白血病诊断和临床疗效及预后评估的潜在指标。

RAZA 等^[24]采用 5D 蛋白质组学方法分离鉴定 AML 患者和健康对照的血浆蛋白质组学,在双向凝

胶电泳中观察到 AML 与健康对照蛋白质浓度的差异变化,并且在分离的血浆中总共鉴定了 34 种蛋白质,其中有 15 个蛋白质存在显著差异,其进一步通过 ELISA 方法对 SAA1、补体因子 C7、ApoE、纤溶酶原和 ApoA1 这 5 个蛋白质进行验证,发现 SAA1 和纤溶酶原在 AML 与健康个体中差异有统计学意义($P < 0.05$),表明血浆 SAA1 和纤溶酶原可以作为 AML 的潜在生物标志物。

5 其他循环肿瘤标志物的临床研究

王爱萍^[25]采用 ELISA 法测定了 39 例初诊急性白血病(AL)患者和 30 例健康人血清中白细胞介素-10(IL-10)、IL-12 和 γ -干扰素(IFN- γ)水平,发现与健康对照组相比 AL 患者血清 IL-10 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 IL-12 和 IFN- γ 水平则明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。然而,经化疗后完全缓解(CR)的 27 例患者血清 IL-10 较初诊 AL 组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),且 IL-12 和 IFN- γ 水平与之相比显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 12 例未缓解患者与化疗前相比差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 IL-10、IL-12 和 IFN- γ 对 AML 早期诊断和疗效评估具有一定的应用价值。

ANAGNOSTOPOULOU 等^[26]通过检测初诊 AML 患者和健康人血清透明质酸(HA)浓度,发现 AML 患者血清 HA 浓度高于对照组,此外,非存活者初诊时的血清 HA 浓度高于存活者,复发 AML 患者的血清 HA 水平高于缓解患者,认为血清 HA 是 AML 潜在的诊断及不良预后指标。

6 结 论

随着无创检验技术的不断发展,循环肿瘤标志物成为研究的热点。目前关于肿瘤标志物的研究有许多,但大部分仍处于检测其表达水平的层面,对其调控肿瘤的机制研究还不够深入,而且这些生物学指标在各种肿瘤中表达的特异性还未明确,从而限制了其在临床检测上的应用。尽管现在还未发现与 AML 相关的特异性循环肿瘤标志物,但可以将上文中提到的 cfDNA,miR-370 和 miR-195 等 miRNA,lncRNA、CPNE3 等生物指标联合检测以做出更为准确的早期诊断及预后判断。同时,研究者们还有必要开展多中心的临床研究,来确保这些循环肿瘤标志物的可行性。通过发现更多灵敏度高、特异性强的肿瘤标志物,实现 AML 的早诊断和早治疗,并通过评估 AML 患者个体的预后及药物耐受性,可达到个体化精准治疗的目的。

参考文献

[1] DÖHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2015, 373(12): 1136-1152.
[2] KANTARJIAN H, O'BRIEN S, CORTES J, et al. Thera-

peutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years[J]. Cancer, 2008, 113(7): 1933-1952.
[3] HOCKING J, MITHRAPRABHU S, KAIF A, et al. Liquid biopsies for liquid tumors; emerging potential of circulating free nucleic acid evaluation for the management of hematologic malignancies[J]. Cancer Biol Med, 2016, 13(2): 215-225.
[4] JIANG Y, PAN S Y, XIA W Y, et al. Dynamic monitoring of plasma circulating DNA in patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2012, 20(1): 53-56.
[5] ZHONG L, MENG WT, ZHENG Q, et al. FLT3-ITD detection of free DNA in plasma from 235 patients with acute myeloid leukemia and its clinical significance[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2009, 17(5): 1144-1148.
[6] QUAN J, GAO Y J, YANG Z L, et al. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia[J]. Int J Med Sci, 2015, 12(1): 17-22.
[7] FALINI B, MECUCCI C, TIACCI E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype[J]. N Engl J Med, 2005, 352(3): 254-266.
[8] XU L H, GUO Y, ZHANG X L, et al. Blood-based circulating microRNAs are potential diagnostic biomarkers for leukemia; result from a meta-analysis[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(3): 939-949.
[9] LIN X, WANG Z, WANG Y, et al. Serum MicroRNA-370 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for pediatric acute myeloid leukemia[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14658-14666.
[10] HONG Z, ZHANG R, QI H. Diagnostic and prognostic relevance of serum miR-195 in pediatric acute myeloid leukemia[J]. Cancer Biomark, 2018, 21(2): 269-275.
[11] ELHAMAMSY A R, SHARKAWY M S, ZANATY A F, et al. Circulating miR-92a, miR-143 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia[J]. Int J Mol Cell Med, 2017, 6(2): 77-86.
[12] HORNICK N I, HUAN J, DORON B, et al. Serum exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive early biomarker of AML[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11295.
[13] DESROCHERS L M, ANTONYAK M A, CERIONE R A. Extracellular vesicles; satellites of information transfer in cancer and stem cell biology[J]. Dev Cell, 2016, 37(4): 301-309.
[14] CAIVANO A, LA ROCCA F, SIMEON V A, et al. MicroRNA-155 in serum-derived extracellular vesicles as a potential biomarker for hematologic malignancies — a short report[J]. Cellular Oncology, 2017, 40(1): 97-103.
[15] BOTTI G, MARRA L, MALZONE M G, et al. LncRNA HOTAIR as prognostic circulating marker and potential therapeutic target in patients with tumor diseases[J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(1): 27-34. (下转第 1179 页)

E2、PDC-E2 和 OGDC-E2; 本实验基于化学拼接法原理获得三联体基因, 将多拷贝的基因片段一次性合成, 形成一个完整的多拷贝基因片段, 然后再以此为扩增模板, 构建表达载体。JIANG 等^[2]使用的随机定向串联法, 利用合成 PCR 引物, 通过 PCR 获得 1 个拷贝的基因片段, 通过限制性内切酶的黏性末端, 将单拷贝基因经酶切后进行自身随机串联, 该法只有将自身串联物克隆于载体后, 经筛选来确定串联体中单体数目, 而且除形成期望的串联体外, 单体或串联体也可利用黏性末端自身环化, 导致后续克隆失败, 最终得不到串联体; 两法相比较, 本实验方法虽然基因合成的成本较高, 但既简化了操作步骤, 又可以避免三联体表达载体构建出错, 因此更有优势。

部分商业化的 ELISA 试剂盒只是基于 PDC-E2 这个靶抗原设计的^[9-10], 因此会导致 PBC 患者的漏检或者误诊。本实验应用三联体作为靶抗原, 成功建立 ELISA 检测方法, 对 PBC 均有较高的灵敏度和特异度, 在保证特异度的同时也能有效地降低漏检率; 据文献报道^[11-12], AMA 对 PBC 的特异度并非 100%, AIH、特发性血小板减少性紫癜和系统性硬化症等患者偶见 AMA 阳性, 所以临床除了参考 AMA-M2 的结果外, 还须结合生化指标进一步明确诊断。

参考文献

[1] METCALF J V, MITCHISON H C, PALMER J M, et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis[J]. *Lancet*, 1996, 348(9039): 1399-1402.

[2] JIANG X H, ZHONG R Q, WANG X P, et al. Development of enzyme immune assay for detecting M2 autoantibody specific for primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Pnt*, 2003, 2(2): 290-294.

[3] HEATHCOTE E J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31(4): 1005-1013.

[4] CAREY E J, ALI A H, LINDOR K D. Primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2015, 50(1): 291-308.

[5] POUPON R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(5): 745-758.

[6] BOGDANOS D P, INVERNIZZI P, MACKAY I R. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(21): 3374-3387.

[7] KAPLAN M M, GERSHWIN M E. Primary biliary cirrhosis[J]. *N Engl J Med*, 2006, 353(3): 313.

[8] GERSHWIN M, MACKAY I R, STURGESS A, et al. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kD mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis[J]. *J Immunol*, 1987, 138(10): 3525-3531.

[9] INVERNIZZI P, LLEO A, PODDA M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases[J]. *Semin Liver Dis*, 2007, 27(2): 161-172.

[10] MURATORI L, GRANITO A, MURATORI P, et al. Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value[J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(2): 261-276.

[11] PREUSS B, BERG C, DENGJEL J, et al. Relevance of the inner mitochondrial membrane enzyme F1F0-ATPase as an autoantigen in autoimmune liver disorders[J]. *Liver International*, 2012, 32(2): 249-257.

[12] ZOGRAFOS T, GATSELIS N, ZACHOU K, et al. Primary biliary cirrhosis specific auto-antibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(34): 4721-4728.

(收稿日期: 2017-09-12 修回日期: 2017-11-02)

(上接第 1175 页)

[16] ZENG C, XU Y, XU L, et al. Inhibition of long non-coding RNA NEAT1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells[J]. *BMC Cancer*, 2014, 23(14): 693.

[17] WU S, ZHENG C, CHEN S, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2410-2414.

[18] DE CLARA E, GOURVEST M, MA H, et al. Long non-coding RNA expression profile in cytogenetically normal acute myeloid leukemia identifies a distinct signature and a new biomarker in NPM1-mutated patients[J]. *Haematologica*, 2017, 102(10): 1718-1726.

[19] CHEN L, WANG W, CAO L, et al. Long Non-Coding RNA CCAT1 Acts as a competing endogenous RNA to regulate cell growth and differentiation in acute myeloid leukemia[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(4): 330-336.

[20] FU L, FU H, QIAO J, et al. High expression of CPNE3 predicts adverse prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(9): 1850-1857.

[21] PAPAIOANNOU D, SHEN C, NICOLET D, et al. Prog-

nostic and biological significance of the proangiogenic factor EGFL7 in acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(23): 4641-4647.

[22] 罗代平. 血清可溶性 CD44 检测对急性髓系白血病的诊断分型价值研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13): 1790-1792.

[23] MA X J, ZHANG F H, SU L. HSP90 and HSP90alpha in Serum of Patients with Acute Leukemia[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2017, 25(5): 1384-1389.

[24] RAZA S K, SALEEM M, SHAMSI T, et al. 5D proteomic approach for the biomarker search in plasma: Acute myeloid leukaemia as a case study[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16440.

[25] 王爱萍. 血清 IL-10、IL-12 和 IFN- γ 水平对急性白血病的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(16): 2290-2292.

[26] ANAGNOSTOPOULOU E, PAPANASTASOPOULOU C, PAPASTAMATAKI M, et al. Serum hyaluronic acid levels are altered in acute leukemia patients: potential prognostic implications[J]. *Acta Haematol*, 2017, 138(1): 44-51.

(收稿日期: 2017-11-28 修回日期: 2018-01-08)