

LEADMAN 检验视界

2015年 第2期

生物科学改善人类生活
A PROMISE FOR A BETTER LIFE

肿瘤诊断专题

肿瘤标志物发展史及临床应用

常见肿瘤标志物检测异常指标分析

血清唾液酸的检测及应用

新品速递——适用于利德曼化学发光检测平台

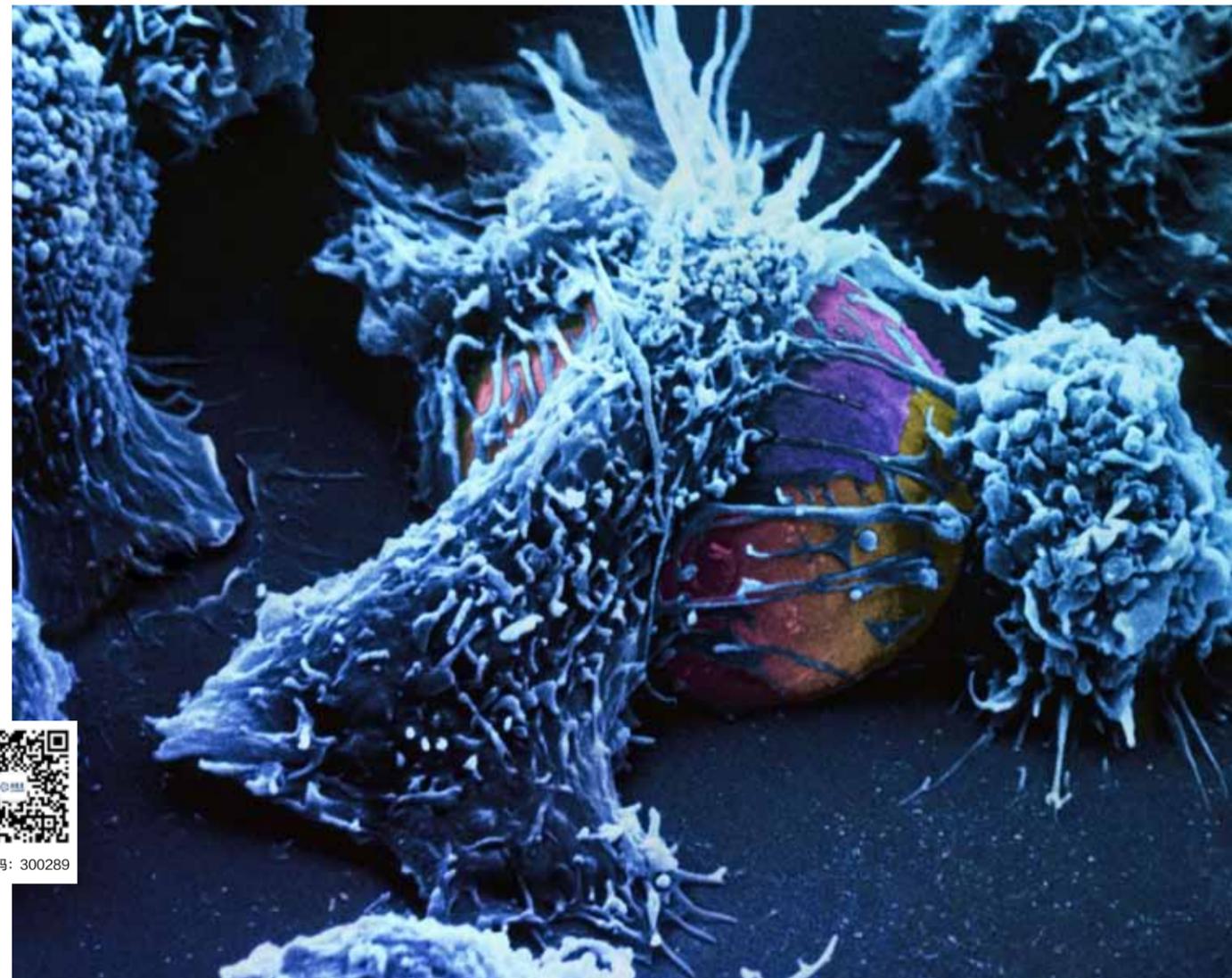
联合检测 AFP 和 AFU 在原发性肝癌中的作用

利德曼 CI1000 全自动化学发光免疫分析仪产品研发及其市场前景分析



北京利德曼生化股份有限公司
BEIJING LEADMAN BIOCHEMISTRY CO., LTD.

地址：中国·北京经济技术开发区兴海路5号，邮编：100176
Add: No.5 Xinghai Road, BDA, Beijing 100176, China
电话 / Tel: +8610-67855500 传真 / Fax: +8610-67856540
网址 / Website: www.leadmanbio.com
技术热线 / Service line: 400-010-2155 800-810-0802
订购热线 / Hotline: 400-010-2055



股票代码：300289

LEADMAN 检验视界

2015年 第2期

生物科学改善人类生活
A PROMISE FOR A BETTER LIFE

出版人 沈广仟	PUBLISHER GUANGQIAN SHEN
总编辑 王毅兴	CHIEF EDITOR YIXING WANG
副总编 王建华 张坤 张志勇	VICE CHIEF EDITOR JIANHUA WANG KUN ZHANG ZHIYONG ZHANG
主编 朱晓春	CHIEF EDITOR XIAOCHUN ZHU
编委 (排名不分先后)	EDITORIAL BOARD MEMBER
陈立杰	LIJIE CHEN
孟刚	GANG MENG
熊宁	NING XIONG
滕大志	DAZHI TENG
郑延军	YANJUN ZHENG
马志远	ZHIYUAN MA
编辑	EDITOR
孙翔	XIANG SUN
王蕊	RUI WANG
肖白	BAI XIAO
尹佳	JIA YIN



生物科学改善人类生活
A PROMISE FOR A BETTER LIFE



利德曼
LEADMAN

生物科学改善人类生活
A PROMISE FOR A BETTER LIFE



股票代码: 300289

唾液酸 (SA) 测定试剂盒 (神经氨酸苷酶法)

广谱的肿瘤标志物



临床意义:

唾液酸测定试剂盒用于体外定量测定人体血清或血浆中唾液酸的含量。人体中唾液酸主要来源于葡萄糖代谢的中间产物,其值在发生炎症性疾病及恶性肿瘤时升高,例如肺癌、胃癌、肠癌、肝癌、卵巢癌等。因此,测定血清中的唾液酸是诊断这些疾病、观察治疗过程及诊断愈后判定的重要指标;亦可作为普通人群肿瘤筛查的生物标记物。

利德曼 SA 定量检测试剂盒优势:

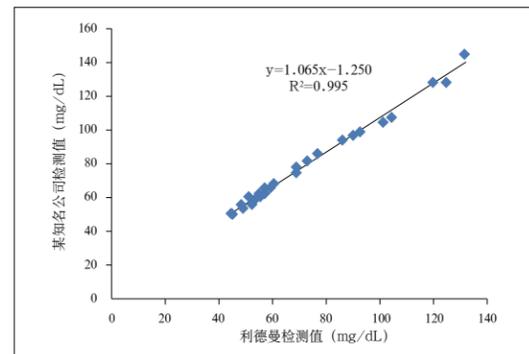
- 利德曼采用神经氨酸苷酶法,灵敏度高。试剂盒在高、中、低浓度样本检测中均表现出良好的精密密度;
- 试剂盒抗干扰能力强,若待测血清无严重的溶血、乳糜和黄疸均可以正常检测;
- 长达18个月的有效期以及半个月的定标周期,稳定的试剂状态保证结果的可靠,方便与科室的日常操作;
- 试剂为液体双试剂,比例为3:1,利德曼配有多种类型试剂瓶规格,适用于市面上绝大多数全自动生化分析仪,上机即用,使用方便;
- 原料到成品全程质量控制,真正保证试剂品质。



股票代码: 300289

唾液酸 (SA) 测定试剂盒 (神经氨酸苷酶法)

广谱的肿瘤标志物



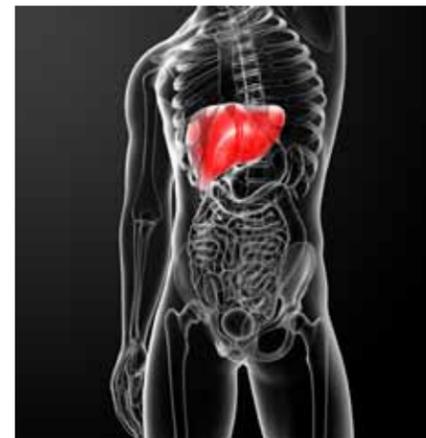
< 利德曼 SA 与某知名品牌试剂相关性 >

Times	15	15	15
Concentration	35.73 mg/dL	67.42 mg/dL	95.27 mg/dL
SD	0.37	0.56	1.01
CV	1.03%	0.84%	1.06%

< 利德曼 SA 的低、中、高浓度测值精密度 >

订货信息

产品名称	唾液酸测定试剂盒—SA (神经氨酸苷酶法)
包装规格	R1:2x60mL R2:2x20mL
	质控品 (选配) 2x1mL
	校准品 (选配) 1x1mL



CONTENTS

- 2 卷首语**
- 4 检验视野**
 - 肿瘤标志物发展史及临床应用
 - 甲胎蛋白 (AFP) 抗体制备及鉴定
 - 常见肿瘤标志物检测异常指标分析
 - 血清唾液酸的检测及应用
 - 联合检测 AFP 和 AFU 在原发性肝癌中的作用
 - 肝细胞癌中的肿瘤循环细胞 (circulating tumor cells, AKA CTCs)
 - 一项对病例和对比控制病例关于检测、细胞计数、以及下一代测序的初始研究
 - Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls
 - 利德曼 CI1000 全自动化学发光免疫分析仪产品研发及其市场前景分析
- 28 技术导航**
 - 化学发光检测系统间偏差的分析
 - 如何正确判断反应曲线
 - 底物耗尽解析
- 33 行业动态**
 - IVD 抽验工作方案发布
 - 《医疗器械监督管理条例》带来的行业影响分析
 - 国务院出台城市公立医院改革试点意见
- 40 产品聚焦**
 - 新品速递——适用于利德曼化学发光检测平台
 - 早期胃癌风险指标——PGI、PGII
- 43 专家论坛**
 - 多发性骨髓瘤实验室结果分析与评价
 - 白细胞介素-18 基因启动子多态性与鼻咽癌的遗传易感性的研究
- 52 新闻导读**
 - 第 73 届 CMEF ——“四叶草”绽放利德曼“生物科技之花”
 - 利德曼参展首届全国临床检验装备与应用学术会议
 - 利德曼、德赛研发团队沟通会顺利召开
 - 北京协和医院检验科团队来访利德曼
 - 国家食品药品监督管理总局调研组访问利德曼
- 56 曼生活**
 - 利德曼持续改进培训项目圆满结束
 - 利德曼 2015 年第一期员工生日会活动
 - 非财务经理财务课程培训圆满结束
 - 利德曼家属开放日暨利德曼儿童游乐园开园仪式
 - 利德曼 2015 爱心捐赠活动圆满结束
- 58 曼博士**
 - 肿瘤异常蛋白 TAP
 - 循环肿瘤细胞 CTCs

随着全国第二十一届肿瘤防治宣传周的启动，癌症这个话题又将被我们重新提起。据统计，全世界每年癌症新发病人超过一千万人，死亡人数超过七百万。在一些发达国家和我国的大中城市，癌症死亡占死因中的第一位，且比率高达百分之二十并且逐渐递增，预计到了2020年，全球每年将有两千万起新的癌症病例，而癌症患者死亡人数将突破一千万人。

环境因素的恶化、饮食结构改变造成的不良生活习惯及机体内基因突变已经成为癌症发生的主要因素。而其中三分之一的肿瘤可以通过早期发现、早期诊断、早期治疗进行治愈。

传统的分子影像体外检测方法，如B超、胸部X线，超声成像、光学成像、X线计算机断层成像(CT)、磁共振成像(MRI)、单光子发射断层成像(SPECT)与正电子发射断层成像(PET)等技术，在肿瘤诊断方面提供了强有力的依据。但是这些方法检测相对昂贵，因此临床亟需既经济又高效的检测方法。

各种肿瘤标志物的检测方法因其简便、经济、快速、无创的特点成为目前早期发现、早期诊断肿瘤最直接的手段。同时肿瘤标志物在肿瘤发生明显影像学改变之前就可以通过血清学方法检测出来，为肿瘤的早期诊断、早期治疗提供了一个新的途径，对肿瘤进展及治疗、预后也起着很好指导作用。本专刊就肿瘤早期诊断给各位提供了一些新的诊断指标和检测方法。

除了单一的肿瘤指标检测之外，多种肿瘤标志物联合检测可提高肿瘤诊断的敏感性和特异性，为临床的精确诊断提供更全面的信息。例如，AFP和AFU在原发性肝癌中的联合检测，仅靠单项AFP或AFU对PHC的诊断及病程判断存在一定局限性，将两者联合检测，互为补偿，总阳性率可达到98.85%，明显提高原发性肝癌的发现率，而且能更有效地进行病程判断。胃蛋白酶原(PG)作为萎缩性胃炎的诊断指标具有很高的灵敏度和特异性，联合测定血清胃蛋白酶原PGI和PGI/II比值，是判定正常胃底粘膜、慢性萎缩性胃炎、肠化生及胃癌的可靠无创性试验。

近年来的研究表明，脱离了原发灶的肿瘤细胞游离在人体的血液循环中，称为循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)可用来检测癌症。进入循环的肿瘤细胞绝大多数在短期内死亡，只有极少数具有高度活力、高度转移潜能的肿瘤细胞可在循环系统中存活下来，相互聚集形成微小癌栓，并在一定条件下发展为转移灶，因此在外周血中检测到肿瘤细胞预示着有发生肿瘤远处转移的可能。CTCs的检测作为一种非侵袭性的检测手段可有效应用于体外早期诊断、化疗药物的快速评估、个体化治疗，临床筛药、耐药性的检测、肿瘤复发的监测以及肿瘤新药、药物靶向治疗的开发等。

随着检测技术的不断改进，敏感性和特异性的不断提高，各种具有高度可行性和可重复性的非侵入性新型诊断工具已经在肿瘤诊治、转移、治疗疗效及预后评估中发挥关键性作用。■

肿瘤标志物发展史及临床应用

文 | 薛颖

一、肿瘤标志物发展史

肿瘤标志物，指在肿瘤发生和增殖过程中，由肿瘤细胞生物合成、释放或者是宿主对癌类反应性的一类物质。这类物质可能是循环物质，可在细胞、组织或体液中出现，人们能利用化学、免疫和分子生物学等技术对血液或分泌物进行定性或定量检测。通过对这类物质的分析，能帮助人们从正常组织中区别肿瘤或测定肿瘤细胞核、细胞质以及对细胞膜上的特性进行分析，以此作为辨认肿瘤细胞的标志^[1]。

在世界上首先报告肿瘤标志物的是1846年由Bence-Jones发现在尿中有一种随温度变化而改变成凝溶状态的蛋白质，后经证实这是患有多发性骨髓瘤病人的浆细胞所产生，由尿液排泄的蛋白质，并被命名为B-J蛋白。B-J蛋白的发现，开创了肿瘤标志物的新时期，故常将这一年代称为肿瘤标志物的开创期，或称肿瘤标志物的第一阶段。

其后从1928年到1963年(肿瘤标志物的第二阶段)，B. Zondek, C. Markert等科学家发现了与肿瘤相关的多种标志物，包括激素、同工酶、蛋白质。但是这些标志物的应用，特别是肿瘤所表达的这些物质的理化特性，此时还未得到明确的认知。

从1963年至1969年(肿瘤标志物的第三阶段)，科学家们如G. I. Abelev, P. Gold and S. Freeman^[2-4]等发现并证实在肿瘤所产生的蛋白质中，某些胎儿期蛋白在肿瘤状态时重新出现，从而认为对这种胎儿蛋白的检测，十分有利于对肿瘤的诊断。自此， α -甲胎蛋白(AFP)，癌胚抗原(CEA)等肿瘤标志物被广泛应用于诊断中。

自1975年起(肿瘤标志物的第四阶段)，发现了单克隆抗体，并在肿瘤细胞系中获得了肿瘤抗原和癌胚胎抗

原如CA125、CA153、CA549^[6-10]等。随后，随着分子遗传学的理论和技术的发展，分子探针的使用，单克隆抗体的筛选成功，基因的定位，包括肿瘤基因和抑癌基因的测定，使肿瘤标志物的检测内容更广，技术更先进。

近年来，肿瘤标志物在临床上已得到较广泛的应用，它们的来源以及特异性也不尽相同，有针对某种肿瘤所产生的特异性标志物如前列腺特异性抗原(PSA)，但更多的肿瘤标志物为辅助型，这类标志物往往易同良性肿瘤或正常组织发生混淆。但在肿瘤发生时，这类标志物的含量要明显高出良性肿瘤或正常组织。

二、肿瘤标志物的临床应用

目前发现的肿瘤标志物，按其化学性质，可分为①肿瘤胚胎性抗原标志物；②糖类标志物；③酶类标志物；④激素类标志物；⑤蛋白质类标志物；⑥基因类标志物。这些年来，随着肿瘤标志物与临床诊断符合率的增加，不少标志物已逐渐成为肿瘤检测中可依赖的指标。

1. 肿瘤胚胎性抗原标志物

许多抗原只在胎盘期才具有的蛋白类物质，本应随胎儿的出生而逐渐停止合成和分泌，但因某种因素的影响，特别是肿瘤状态时，会使得机体一些“关闭”的基因激活，出现了返祖现象，而重新开启并重新生成和分泌这些胚胎、胎儿期的蛋白。这类蛋白虽然与肿瘤组织不一定具有特定的相关性，但与肿瘤的发生存在着内在的联系，故被作为一种较为常见的肿瘤标志物。

表 1. 肿瘤胚胎性抗原标志物及临床应用

名称	英文缩写	性质	相关肿瘤
甲胎蛋白	AFP	糖蛋白 70k	肝细胞、胚细胞
癌胚铁蛋白	CEF	糖蛋白 600k	肝
癌胚抗原	CEA	糖蛋白 22k	结肠、直肠、胰腺、肺、乳腺
胰癌胚抗原	POA	糖蛋白 40k	胰腺
鳞状细胞抗原	SCC	糖蛋白 44-48k	肺、皮肤、头和颈部
组织多肽抗原	TPA	单链多肽 ~ 45k	乳腺、结肠

2. 糖类抗原标志物

由肿瘤细胞表面的抗原物质或者是肿瘤细胞所分泌的一类标志物，称为糖类抗原(carbohydrate antigen, CA)。这类标志物的出现为临床肿瘤的诊断带来方便，糖类抗原标志物产生又可分为两大类，为高分子粘蛋白类和血型类抗原。

表 2. 糖类抗原标志物及临床应用

	名称	英文缩写	性质	相关肿瘤
高分子粘蛋白类	糖类抗原 125	CA125	糖蛋白 > 200k	卵巢、子宫内腹
	糖类抗原 15-3	CA15-3	糖蛋白 400k	乳腺、卵巢
	糖类抗原 549	CA549	高分子量糖蛋白	乳腺、卵巢
	糖类抗原 27.29	CA27.29	高分子量糖蛋白	乳腺
	DU-PAN-2	DU-PAN-2	粘蛋白 100-500k	胰腺、卵巢、胃
血型类抗原	糖类抗原 CA19-9	CA19-9	唾液酸化 Le ^a	胰腺、胃肠、肝
	糖类抗原 19-5	CA19-5	唾液酸化 Le ^a 和 Le ^x	胃肠、卵巢
	糖类抗原 CA50	CA50	唾液酸化 Le ^a	胰腺、胃肠、结肠
	糖类抗原 CA72-4	CA72-4	唾液酸化 Tn	卵巢、乳腺、胃肠、结肠
	糖类抗原 CA242	CA242	唾液酸化 CHO	结肠、直肠、胰腺
	鳞状细胞抗原	SCC	糖蛋白 44-48k	肺、皮肤、头和颈部

3. 酶类标志物

酶及同工酶是最早出现和使用的肿瘤标志物之一。肿瘤状态时，机体的酶活力就会发生较大变化。在肿瘤标志酶中根据来源可将其分为两类：①组织特异性酶，因组织损伤或变化而使储存在细胞中的酶释放，如前列腺特异性抗原等；②非组织特异性酶，主要是肿瘤细胞代谢加强。

表 3. 酶类标志物及临床应用

名称	英文缩写	性质	相关肿瘤
醛缩酶	ALD	160k	肝
碱性磷酸酶	ALP	95k	骨、肝、白血病、肉瘤、卵巢等
淀粉酶	AMY	45k	胰腺等
谷胱甘肽转移酶	GST	80k	肝、胃、结肠
肌酸激酶	CK	83k	前列腺、肺、结肠、卵巢等
γ -谷氨酰转移酶	GGT	90k	肝
乳酸脱氢酶	LDH	135k	肝、淋巴瘤、白血病
神经原特异性烯醇化酶	NSE	73k	肺(小细胞)、神经母细胞瘤、类癌、黑色素瘤、嗜铬细胞瘤
5-核苷酸酶	5-NT	70K	肝
α -L-岩藻糖苷酶	AFU	230k	肝
核糖核酸酶	RNASE	20K	卵巢、肺、大肠等
前列腺特异性抗原	PSA	34k	前列腺

4. 激素类标志物

激素是一类由特异的内分泌腺体或散在体内的分泌细胞所产生的生物活性物质，当这类具有分泌激素功能的细胞癌变时，就会使所分泌的激素量发生异常。常称这类激素为异位激素异常。而异位激素则是指在正常情况下不能生成激素的那些细胞，转化为肿瘤细胞后所产生的激素，或者是那些能产出激素的细胞癌变后，分泌出的是其它激素细胞所产生的激素。

表 4. 激素类标志物及临床应用

名称	英文缩写	性质	相关肿瘤
促肾上腺皮质激素	ACTH	4.5k	库欣综合征、肺(小细胞)
抗利尿激素	ADH		肺(小细胞)、原发性类癌等
降钙素	CT	3.5k	甲状腺髓质
生长激素	GH	21k	垂体腺瘤、肾、肺
人绒毛膜促性腺激素	hCG	45k	胚胎绒毛膜、睾丸(非精原细胞癌)
人胎盘催乳素	HPL	22k	滋养层、性腺、肺、乳腺
甲状旁腺素	PTH	9k	肝、肾、乳腺、肺等
催乳素	PRL	22k	垂体腺瘤、肾、肺
胰高糖素	GLG	3k	胰高糖素瘤、嗜铬细胞瘤
转化生长因子	TGF	25K	鳞瘤、肾、乳腺

5. 其它蛋白质类标志物

蛋白质肿瘤标志物是最早发现的标志物。在现有的标志物中，如 β 2微球蛋白、免疫球蛋白。一般来讲这类标志物特异性稍差，但检测方法相对比较容易，常作常规检测项目。

表 5. 其它蛋白质类标志物

名称	英文缩写	性质	相关肿瘤
β 2-微球蛋白	β 2M	12k	多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、Waldenstrom's 巨球蛋白血症
C肽	C-P	3.6k	胰岛素瘤
铁蛋白	FER	450k	肝、肺、乳腺、白血病
本周蛋白	BJP	22.5-45k	游离轻链病、多发性骨髓病
免疫球蛋白	IgG	160-900k	多发性骨髓瘤、淋巴瘤
铜蓝蛋白	CP	126-160k	肝、胃肠、胰腺
甲状腺球蛋白	TG	670k	甲状腺癌

6. 肿瘤标志物的联用

用肿瘤标志物测定肿瘤在临床上已应用了许多年，为临床的诊断和疗效观察起了很大的作用，但在应用过程中，确实也存在着特异性不强、阳性率不高等不足。为了达到诊断的阳性率检测水平，临床上常将几项相关的标志物组成联合标志物组，同时对某一肿瘤进行检测，应用多变量分析的方法，提高临床诊断的准确性^[11]。

表 6 肿瘤标志物的联用 + 其他有用的生化标志物

肿瘤	肿瘤标志物	其他有用的生化标志物
胆道	CA19-9, CEA, CA72-4, ALP	GGT
膀胱	NMP22, TPA, CEA, CA50	APP
骨肉瘤	TPA, CEA, PTH	B-ALP, HYP,
乳腺	CA15-3, MCA, CA549, CEA	SHR, Her-2/neu
支气管 / 肺	NSE, SCC, CYF21-1, CEA, PTH, PRL, ADH, ACTH, FER, GH, CT	APP
宫颈 / 子宫	SCC, CEA, CA125, TPA, HCG _β	APP
绒毛膜	HCG, β-HCG	
结肠 / 直肠	CEA, CA19-9, TPA, FER	APP
肝脏	AFP, CEA, CA19-9, FER	L-Enz
黑色素瘤	S-100, FER	MEL
食管 / 胃	CA72-4, CA19-9, CEA, SCC, FER	GAS
卵巢	CA125, CA72-4, CA15-3, CEA	APP
胰腺	CA19-9, CEA, CA125, TPA, FER, GLG	INS, GAS,
前列腺	t-PSA, f-PSA, C-PSA, PAP, FER	APP
胃	CA72-4, CA19-9, CEA, TPA, FER	GAS
睾丸	AFP, β-HCG, HCG, LDH	
喉 / 耳 / 鼻	SCC, CEA, FER	EBV
甲状腺	TG, NSE, CEA, TPA, CT	

虽然目前用于肿瘤筛检和诊断或者用作预后分析的肿瘤标志物只有几个，但是肿瘤标志物对检测疾病和评估疗效起着关键作用。在检测患者疾病复发时，只有当治疗方法具备潜在疗效时才能确定肿瘤标志物的水平。

肿瘤标志物水平恢复到正常水平即预示已治愈，而放射线照片可能显示残留肿瘤的存在，这种情况下的肿瘤残块一般不具备生存能力，在没有其他依据表明疾病存在时，肿瘤标志物的检测就显得尤为重要。

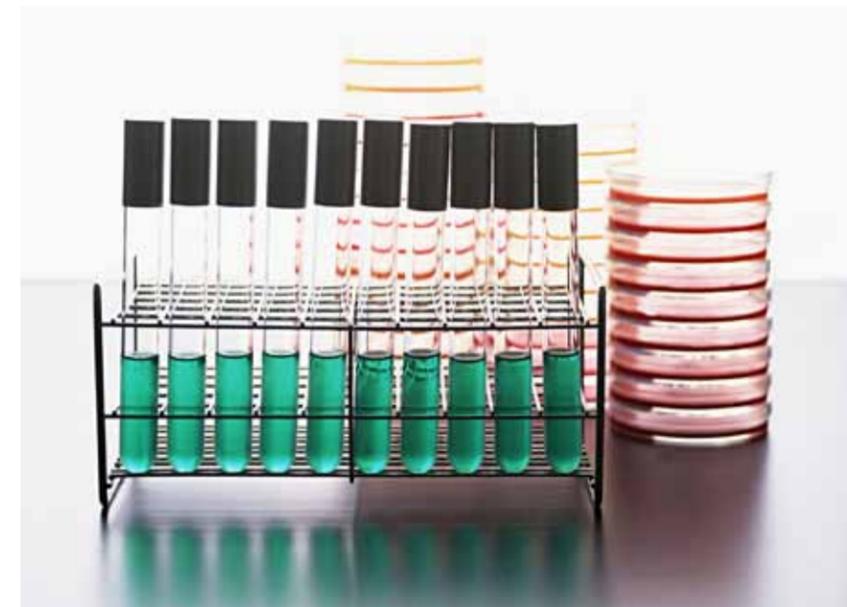
总之，肿瘤标志物检测在针对不同肿瘤的诊断、监测以及预后分析中起到了不可替代的作用，对于疾病的早期诊断和发现有一定的意义。

参考文献:

- 张惠中, 临床生物化学, 人民卫生出版社, 2009; 12: 第八章 肿瘤标志物的临床实验室检查。
- Silver HKB, Gold P, Feder S, Freedman SO, Shuster J. Radioimmunoassay for Human Alpha-Fetoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1973; 70: 526-30.
- Waldmann TA, McIntire KR. The Use of a Radioimmunoassay for Alpha-Fetoprotein in the Diagnosis of Malignancy. Cancer 1974;34:1510-5.
- Abelev GI. Alpha-Fetoprotein in Ontogenesis and Its Association with Malignant Tumors. Adv Cancer Res 1971; 14:295-358.
- Davis HM, Zurawski VJ, Bast RJ, et al. Characterization of the CA125 Antigen Associated with Human Epithelial Ovarian Carcinomas. Cancer Res 1986;46:6143.
- Atack DB, Nisker JA, Allen HH, et al. CA 125 Surveillance and Second-Look Laparotomy in Ovarian Carcinoma. Am J Obstet Gynecol 1986;154:287.
- Crombach G, Zippel HH, Wrz H. Clinical Significance of Cancer Antigen 125 (CA 125) in Ovarian Cancer. Cancer Detect Prev 1985;8:135.
- Hayes DF, Zurawski V, Kufe D. Comparison of Circulating CA15-3 and Carcinoembryonic Antigen Levels in Patients with Breast Cancer. J Clin Onc 1986;4:1542-1550.
- Tobias R, Rothwell C, Wagner J, et al. Development and Evaluation of a Radioimmunoassay for the Detection of a Monoclonal Antibody Defined Breast Tumor Associated Antigen 115D8/DF3. Clin Chem 1985;31:986.
- Bon GG, Kenemans P, Yedemac A, et al. Clinical Relevance of the Tumor Marker CA 15-3 in the Management of Cancer Patients. In: Crommelin DJA, Schellekens H, editors. From Clone To Clinic. The Netherlands; Kluwer Academic Publishers, 1990:111-122.
- Francesco Dati, Erwin Metzmann, 潘柏申等人, 蛋白质实验室检测项目临床应用指南. 上海科学技术出版社, 2008: 409-42. ■

甲胎蛋白 (AFP) 抗体制备及鉴定

文 | 刘文婷



肝细胞肝癌是危害人类生命与健康的重要疾病之一，尤其在我国的肝细胞肝癌近年来发病率有增高趋势。甲胎蛋白 (α-fetoprotein, AFP) 是肝细胞癌的特征性蛋白，在临床诊断和治疗方面一直受到广泛的重视。AFP 在体内可运载不饱和脂肪酸至肝癌细胞吸收利用，并可抑制 T 淋巴细胞增殖而保护肿瘤细胞逃脱免疫监视，对维持肿瘤细胞生长增殖起着一定的作用，在分泌释放之前可停留在肝癌细胞表面，成为肝癌细胞的重要标志物，这一特性是利用抗 AFP 抗体进行肿瘤显像诊断和导向治疗的物质基础，近年来，已有不少鼠源性抗 AFP 单克隆抗体及抗体分子片段在这些方面应用的报道。

以往的研究显示，肝癌因抗原性弱、缺少特异性抗原而成为检测抗体制备一个主要难点。近年研究显示人的 AFP 存在 4 个 CTL 表位，这些免疫显性表位能诱导 T 细胞产生 AFP 特异性的 CTL 以及针对 AFP 的抗肝癌免疫力。然而，上述抗原肽尚不能适应肝癌免疫治疗的需要，还有必要进一步寻找和鉴定新的肝癌特异性抗原表位肽。本专利在大肠杆菌中分别表达这 3 个肝癌特异性抗原表位肽。经过 4~5 轮免疫后，小鼠尾血效价达到 1:10 万以上时，

进行细胞融合。每种免疫原分别筛选 5 株特异性较高的细胞单株，制备单抗后分别酶标 HRP 进行组间双抗夹心 ELISA 筛选。本发明筛选到的两株单抗利用化学发光法检测病人血样，得以达到最低检测限不大于 0.5ng/ml，完全可以超越国内试剂盒的标准。

1 实验

1.1 材料

1.1.1 抗原表位肽的基因合成，上海生工生物技术有限公司。动物 6 周龄，雌性，BALB/c 小鼠，购自协和医科大学实验动物中心。SP2/0 骨髓瘤细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。

1.1.2 AFP 抗原购自 Biospecific 公司；HisTrap HP、HiTrap Protein G 柱购自 GE；弗氏佐剂、50% 聚乙二醇 (PEG) 1450 溶液、HAT、HT 以及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG、四甲基联苯胺 (TMB) 均为 Sigma 产品；DMEM 培养基为 Gibco 产品；新生牛血清购于杭州四季清生物工程有限公司；甲胎蛋白 (AFP) 购于 Biospecific 公司，纯度 > 90%。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 体外扩增 AFP 基因片段

取液氮保存的人胎肝 100 mg，提取总 RNA；RT-PCR 反应条件：50℃ 逆转录 30min，94℃ 变性 2 min，94℃ 45s，58℃ 30s，72℃ 45s，循环 33 次，72℃ 延伸 7min。PCR 大量扩增目的基因 cDNA 片段，反应条件：94℃ 2 min，94℃ 30 s，61℃ 30 s，72℃ 30 s 循环 33 次，72℃ 延伸 7 min。

1.2.2 抗原表位肽的基因合成及重组质粒的构建及鉴定

AFP-1: P1 5' -CATGCCATGGGACATTCAGAC-3'

P2 5' -CCGCTCGAGGCATTCAACTGC-3'

AFP-2: P1 5' -CATGCCATGGAACGTGGTCAATG-3'

P2 5' -CCGCTCGAGCTCTGGTATCC-3'

AFP-3: P1 5' -CATGCCATGGGACACTTATGTATC-3'

P2 5' -CCGCTCGAGCTCTTGTTCATCG-3'

以上序列由上海生工生物技术有限公司合成

AFP-1、AFP-2、AFP-3 以 RT-PCR 体外扩增 AFP 基因片段为模板，用 P1、P2 为引物合成目的 DNA 片段。3 段 DNA 合成后与去磷酸化的载体 pET-28a(+) 进行连接，常规方法转化新鲜制备的感受态菌 DH5 α ，涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板，获取重组子。提取重组质粒，Nco I、Xho I 双酶切，经电泳初步鉴定后，将重组质粒送至 TaKaRa 公司进行测序。

1.2.3 抗原表位肽的表达及抗原偶联

重组质粒鉴定完毕后，提取质粒，转化 BL21(DE3) 感受态细胞。将上述菌株挑单菌落在 LB 培养基中 37℃ 过夜培养，第二天 1:100 稀释于 LB 培养基中，37℃ 培养至 OD1.0，加入终浓度 1mM 的 IPTG 进行诱导，4 小时后收获菌液。将收集到的菌液超声波破碎，经 HisTrap HP 柱纯化，得到抗原表位肽纯化物。多肽合成、纯化后直接作为免疫抗原与检测抗原使用。

LB 培养基配方：

蛋白胨：10g/L

酵母粉：5g/L

NaCl：10g/L

121℃ 20min 灭菌。将冻存管中的菌种用接种针接种于 LB 培养基中，26℃ 过夜培养。

1.2.4 动物免疫

选用 6 周龄、雌性 BALB/c 小鼠。首次免疫，

50 μ g/ 只的抗原加等体积完全福氏佐剂，采用皮下注射；4 周后，第二次免疫，用 25 μ g/ 只的抗原加等体积不完全福氏佐剂，皮下注射；2 周后，第三次免疫，用 25 μ g/ 只的抗原加等体积不完全福氏佐剂，皮下注射，7-10 天后，ELISA 检测免疫鼠血清效价，效价达到 1:10W 即可准备做细胞融合。如果效价比较低，则 2 周后继续进行第四次免疫，免疫剂量及方式同第三次免疫一致，直至尾血效价检测达到 1:10W 左右。细胞融合前 3 天，再用 25 μ g 抗原腹腔注射以加强免疫。

1.2.5 细胞融合

取免疫小鼠脾脏细胞 (1×10^8 个细胞) 与骨髓瘤细胞株 Sp2/0 (1×10^7 个细胞 %)，在 50% PEG1450 作用下进行常规融合。融合细胞用 HAT 培养基作选择性培养，7d 后改用 HT 培养基，14 d 后改用 DMEM 培养基培养 (20% 小牛血清)。采用间接 ELISA 方法，用抗原 (包被浓度为 200ng/ml) 对融合细胞进行阳性筛选，阳性细胞再进行亚克隆，经过 3-5 次亚克隆直到达到 100% 的阳性率。

1.2.6 抗体纯化

在预先 1 周注射石蜡油 (0.5 ml/ 只) 致敏的 BALB/c 小鼠腹腔接种已建株的杂交瘤细胞数为 106，7-10 d 后采集腹水并离心得上清。腹水上清按 1:10 稀释于 PBS 中，并以 0.5 ml/min 上样于经 PBS 平衡的 HiTrap Protein G 亲和层析柱中。用 PBS 洗杂，再用甘氨酸缓冲液 (pH 2.9) 洗脱，用 SDS-PAGE 电泳鉴定纯度。

1.2.7 抗体的标酶

利用改良过碘酸钠氧化法进行抗体标酶。首先称取适量 HRP 酶，溶于三蒸水中，加入新近配制的过碘酸钠溶液，混匀后置 4℃，30min；加入乙二醇溶液，室温，30 min；加入适量纯化抗体，混匀，调 pH 值至 9.0，放 4℃，过夜；加入硼氢化钠，混匀，置 4℃，2 h；将酶标抗体混合液加入等体积饱和硫酸铵溶液，置 4℃，30 min；离心后，用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析过夜。包被 AFP 抗原，直接 ELISA 法测定酶标抗体效价。

1.2.8 ELISA 法标酶抗体配对及优化

双抗夹心 ELISA 检测方案：用 0.01mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将单克隆抗体稀释至 5 μ g/ml 包被酶标板，4℃ 过夜；用 PBS/T20 洗板 3 次，每次 3 min；用含 5%

小牛血清的 PBS/T20 封闭，37℃ 孵育 1 h，洗板；加入倍比稀释的 AFP 溶液，37℃ 孵育 45 min，洗板；加入 HRP- 单克隆抗体，37℃，30 min，洗板；加入 TMB 显色液，37℃ 避光反应 15 min 后，加入终止液；读取波长为 450 nm 时的 OD 值。

2 结果

2.1 抗原表位肽的基因鉴定

合成的基因送至 TaKaRa 公司进行测序，测序结果与 GenBank 报道序列比较，序列完全正确。鉴定结果：重组质粒构建成功。

2.2 鼠抗 AFP 单克隆抗体的获得

分泌抗 AFP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株的建立。3 个抗原表位肽分别免疫 2 只 BALB/c 小鼠，各自进行细胞融合。每个次细胞融合用 7 块 96 孔板，平均每孔有 1-2 株融合细胞生长，融合率为 100%。经过对阳性杂交瘤细胞株进行 4-5 次有限稀释克隆，7 种抗原分别筛选到 3 株单克隆抗体杂交瘤细胞株，这 21 株抗体除了能和相应的免疫抗原酶联反应呈阳性、还可以与外购 AFP 抗原酶联反应呈阳性。

2.3 AFP 单克隆抗体的质检

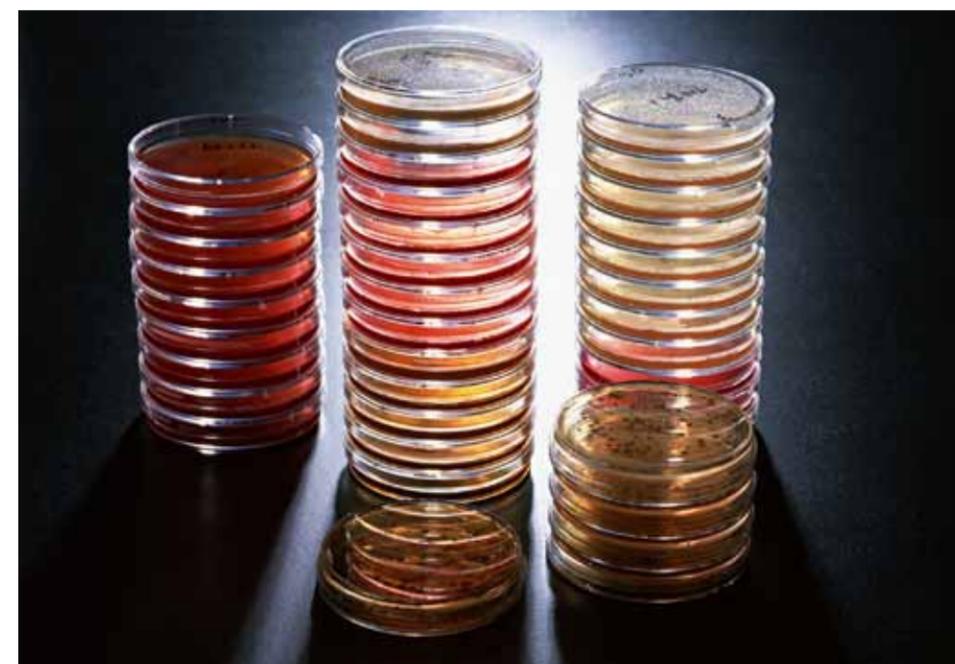
获得单抗后是否能应用于试剂盒研发生产的要求，需要进行将 15 株稳定分泌抗 AFP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株制备腹水，纯化抗体。AFP 试剂盒大多数使用的为双抗夹心法原理，这就需要将获得抗体进行酶标和抗体配对试验。

2.3.1 抗体效价检测

得到纯化抗体后，用外购 AFP 抗原作为包被抗原，ELISA 检测抗体效价，20 株抗体的效价在 1:6W-1:20W 之间。酶标抗体酶标后，酶标抗体的效价在 1:500-1:5K 之间，酶标抗体的工作浓度为 1:200-2K 之间。

2.3.2 ELISA 法标酶抗体配对及优化

通过 ELISA 鉴定出一对配对成功的抗体，分别是针对 AFP-1 抗原表位肽的抗体 3D5、针对 AFP-2 抗原表位肽的抗体 7B11。本发明筛选到的两株单抗利用化学发光法检测病人血样，得以达到最低检测限不大于 0.5ng/ml，完全可以超越国内试剂盒的标准。这可以大量制备抗体，从而进行试剂盒研发及生产。■



常见肿瘤标志物检测异常指标分析

文 | 孙翔

肿瘤标志物 (Tumor markers, TM) 是恶性肿瘤发生和增殖过程中, 由肿瘤细胞基因表达而合成分泌, 或由机体对肿瘤反应而异常产生或升高, 能够反映肿瘤存在和生长的一类物质。它存在于病人的血液、体液、细胞或组织中, 可用生物化学, 免疫学及分子生物学等方法测定, 对肿瘤的辅助诊断、鉴别诊断、观察疗效、监测复发和预后评价具有临床价值。

恶性肿瘤严重危害人民的健康, 近年来多种恶性肿瘤的发病率及发病绝对人数皆有不断升高的趋势, 并趋于年轻化。肿瘤的实验检查方法多种多样, 各有其优缺点。血清肿瘤标志物的检测是肿瘤诊断的常用方法之一, 对于恶性肿瘤的诊断、疗效的观察、病情进展的判断和复发的监测等皆有一定的临床应用价值, 并具有简便无创、测定结果定量客观、可重复测定以便动态监测、费用相对低廉等优点。下面, 我们简单介绍一下目前临床上常用的肿瘤标志物及其异常指标所反映的临床指征。

甲胎蛋白 (AFP)

AFP 是一种糖蛋白, 正常情况下, 这种蛋白主要来自胚胎的肝细胞, 胎儿出生后约两周甲胎蛋白从血液中消失。AFP 在胚胎期是功能蛋白, 由卵黄囊、胚胎肝产生, 脐带血含量为 1000~5000 $\mu\text{g/L}$, 出生后 1 年内降至成人水平 (低于 20 $\mu\text{g/L}$) 。约 70% 以上原发性肝细胞癌患者 AFP 在 400 $\mu\text{g/L}$ 以上, 多数逐渐升高, 但也有不高于 400 $\mu\text{g/L}$, 甚至在正常水平的患者。妊娠、活动性肝病、生殖腺胚胎源性肿瘤等也可升高。

正常情况:

成人 0~20 $\mu\text{g/L}$; 婴儿 (3 周 -6 月) 0~39 $\mu\text{g/L}$ 。

异常情况:

1. 原发性肝细胞癌患者血清中 AFP 明显升高, 约有

77.1% 的患者 AFP>500 $\mu\text{g/L}$, 但也有 18% 病人无 AFP 升高, 值得注意。

- 病毒性肝炎, 肝硬化患者 AFP 有不同程度的升高, 但其水平常 <300 $\mu\text{g/L}$, 实际上大部分病人 <100 $\mu\text{g/L}$ 。AFP 升高的原因, 主要是由于受损伤的肝细胞再生而幼稚化时, 肝细胞便重新具有产生 AFP 的能力, 随着受损肝细胞的修复, AFP 逐渐恢复正常。
- 生殖腺胚胎性肿瘤患者血清中 AFP 可见升高。
- 妇女妊娠 3 个月后, 血清 AFP 开始升高, 7 ~ 8 个月时达到高峰, 一般在 400 $\mu\text{g/L}$ 。

癌抗原 50(CA50)

CA50 是胰腺和结、直肠癌的标志物, 是最常用的糖类抗原肿瘤标志物, 因其广泛存在胰腺、胆囊、肝、胃、结直肠、膀胱、子宫, 因此它又是一种普遍的肿瘤标志相关抗原, 而不是特指某个器官的肿瘤标志物。CA50 在多种恶性肿瘤中可检出不同的阳性率, 对胰腺癌和胆囊癌的阳性检出率居首位, 占 94.4%; 其它依次为肝癌 (88%) 、卵巢与子宫癌 (88%) 和恶性胸水 (80%) 等。可用于胰腺癌、胆囊癌等肿瘤的早期诊断, 对肝癌、胃癌、结直肠癌及卵巢肿瘤诊断亦有较高价值。

正常情况:

0 ~ 23kU/L

异常情况:

- 胰腺癌, 结肠癌, 直肠癌, 胃癌等胃肠道恶性肿瘤时血清 CA50 升高, 特别是胰腺癌患者升高最为明显。
- 肝癌, 肺癌, 子宫癌, 卵巢癌, 肾癌, 乳腺癌等也可见 CA50 升高, 因此 CA50 是一种非特异性的广谱肿瘤标志物。
- 溃疡性结肠炎, 肝硬化, 黑色素瘤, 淋巴瘤, 自身免疫性疾病等也有 CA50 升高现象。

鳞状上皮细胞癌抗原 (SCC)

SCC 是从宫颈鳞状上皮细胞癌组织提取的肿瘤相关抗原 TA-4, 正常人血清含量极微 < 2.5 $\mu\text{g/L}$ 。SCC 是一种特异性很好的肿瘤标志物, 但敏感性较低, 适用于宫颈癌、肺鳞癌、食管癌、头颈部癌, 膀胱癌的辅助诊断, 治疗观察和复发监测。

正常情况:

0 ~ 1.5 ng/mL

异常情况:

- 子宫颈癌、肺癌, 头颈部癌时, 血清中 SCC 升高, 其浓度随病情的加重而增高。临床上 SCC 还可用于监测上述肿瘤的疗效, 复发和转移以及评价预后。
- 肝炎、肝硬化、肺炎、肾功能衰竭、结核等疾病, SCC 也有一定的升高。

α -L-岩藻糖苷酶 (AFU)

AFU 是对原发性肝细胞性肝癌检测的又一敏感、特异的新标志物。原发性肝癌患者血清 AFU 活力显著高于其它各类疾患 (包括良、恶性肿瘤) 。血清 AFU 活性动态曲线对判断肝癌治疗效果、估计预后和预报复发有着极其重要的意义, 甚至优于 AFP。但是, 值得提出的是, 血清 AFU 活力测定在某些转移性肝癌、肺癌、乳腺癌、卵巢或子宫癌之间有一些重叠, 甚至在某些非肿瘤性疾患如肝硬化、慢性肝炎和消化道出血等也有轻度升高, 在使用 AFU 时应与 AFP 同时测定, 可提高原发性肝癌的诊断率, 有较好的互补作用。

正常情况:

0~40U/L

异常情况:

- 血清 AFU 升高主要见于原发性肝癌, 与 AFP 联合检测, 可提高肝癌的诊断阳性率。AFU 活性高低与肝癌的大小和 AFP 浓度无明显相关, 可作为原发性肝癌的早期诊断参考指标。肝癌术后观察血清 AFU 的水平, 可用于监测疗效。
- 肺癌、乳腺癌、子宫癌以及肝硬化、糖尿病也可见升高。
- 妊娠期间, AFU 升高, 分娩后血清 AFU 迅速下降。

神经元特异性烯醇化酶 (NSE)

NSE 为烯醇化酶的一种同工酶, 是小细胞肺癌 (SCLC) 的肿瘤标志物, 诊断阳性率为 91%。有助于小细胞肺癌和非小细胞肺癌 (NSCLC) 的鉴别诊断。对小细胞肺癌的疗效观察和复发监测也有重要价值。神经母细胞瘤, 神经内分泌细胞瘤的血清 NSE 浓度可明显升高。

正常情况:

0~20 ng/mL

异常情况:

- 小细胞肺癌患者 NSE 水平明显高于肺腺癌、肺鳞癌、大细胞肺癌等非小细胞肺癌 (NSCLC) , 可用于鉴别诊断, 监测小细胞肺癌放疗, 化疗后的治疗效果, 治疗有效时 NSE 浓度逐渐降低至正常水平, 复发时血清 NSE 升高。用 NSE 升高来监测复发要比临床确定复发早 4 ~ 12 周。
- 神经母细胞瘤患者 NSE 水平异常增高, 而 Wilms 瘤则升高不明显, 因此测定 NSE 的水平可用于上述疾病的诊断和鉴别诊断, 也可用来监测神经母细胞瘤的病情变化, 评价疗效和预报复发。
- 神经内分泌细胞肿瘤, 如嗜铬细胞瘤, 胰岛细胞瘤, 甲状腺髓样癌, 黑色素瘤, 视网膜母细胞瘤等患者的血清 NSE 也可增高。

游离脂肪酸 (NFFA)

NFFA 又称非酯化脂肪酸, 是由油酸、软脂酸、亚油酸等组成, 大部分游离脂肪酸与白蛋白结合, 存在于血液中, 血清中含量很少, 如用小量血清标本测定必须采用灵敏的方法, 并要避免脂肪水解产生的脂肪酸的干扰。血清中游离脂肪酸的浓度与脂类代谢、糖代谢、内分泌功能有关, 游离脂肪酸的浓度会因为糖尿病、重症肝障碍、甲状腺功能亢进等疾病而上升。

正常情况:

0.1 ~ 0.76 mmol/L

异常情况:

NAFE 浓度升高多见于嗜铬细胞瘤, 甲亢, 乙醇中毒, 糖尿病急性心肌梗塞, 肝性脑病, 长期禁食, 糖原累积病, Reye 综合征等疾病情况。■

血清唾液酸的检测及应用

文 | 吴素敬

血清唾液酸 (sialic acid SA) 又称 N-乙酰神经氨酸 (NANA), 存在于人体各种组织, 主要是在细胞膜内, 是真核细胞膜上糖蛋白、糖脂的重要组成部分, 参与机体的多种生理功能。在细胞的恶性转化时起着特殊的作用, 其含量与恶性肿瘤细胞的增殖、转移、浸润、细胞粘附性降低、肿瘤抗原性及逃避宿主细胞的免疫监视等密切相关, 是一种广泛有效的肿瘤标志物。正常代谢时血清 SA 含量稳定, 在正常细胞转化为恶性肿瘤细胞的过程中, 细胞膜上糖脂合成增加及细胞膜上糖脂转化异常并更多地脱落或分泌入血, 是导致肿瘤患者血清中 SA 含量增加的主要机制。

据文献报导, 测定血清 SA 的含量对恶性肿瘤的筛查、辅助诊断、疗效观察及预后判断有重要的临床价值。其临床意义主要体现在以下几个方面:

1、消化系统恶性肿瘤辅助诊断

目前对于消化系恶性肿瘤的诊断, 除了内窥镜和影像学检查与病理切片检查外, 血清肿瘤标志物的检测也成为临床常用的检测手段之一。SA 和 CEA 联合检测能显著提高消化系统恶性肿瘤诊断阳性检出率, 据资料报导, SA 和 CEA 联合检出率显著高于两者单项检测的检出率, 在急性炎症患者血清中, 唾液酸水平也有升高。

2、肠恶性肿瘤辅助诊断

SA 对多种肿瘤诊断具有临床应用价值, 血清 SA 对肠癌检出敏感度为 73.7%、特异度为 90.1%、准确度为 86.0%, SA 对肠癌的敏感度比 CEA 高 20%, 两者特异度相当, SA 临床价值优于 CEA。

研究表明, 肠癌发生位置越高, 则血清 SA 含量升高越显著, 阳性率越高, 癌症已转移者 SA 含量和阳性率均高于未转移者, 术后复发转移者 SA 含量和阳性率显著高于术后未见复发或转移者, 后者 SA 含量完全在正常范围。

测定血清 SA 对肠癌转移 (特别是术后复发转移) 监测具有更显著的临床应用价值。

3、肝癌的辅助诊断

肝癌患者血清和腹腔积液中 SA 水平均显著高于肝硬化组和正常人组, 其阳性率也明显高于正常人组和肝硬化组, 与 CEA (癌胚抗原) 和 SF (铁蛋白) 联合检测可使阳性增加到 96.1% 以上。此外, 检测血清和腹腔积液 SA 水平也有助于肝癌和肝硬化的鉴别诊断。

4、肺部恶性肿瘤辅助诊断

在肺癌患者中, SA 阳性率为 80.4%, 诊断正确率为 87.3% (以组织学或细胞学结果为金标准); 联合检测 SA 和 TSGF (恶性肿瘤特异性生长因子), 肺癌阳性率可上升到 89.8%。当肿瘤切除后 SA 和 TSGF 的血清浓度明显下降, 阳性率显著下降, 肺癌手术前后测定血清中 SA 和 TSGF 含量有助于了解病人的预后, 对手术疗效的监测具有重要临床意义。

5、白血病辅助诊断

白血病患者 SA 阳性率达 70-80%, 急性白血病更高, 白血病骨髓像好转者, 说明临床症状和体征稳定或好转, 血清 SA 含量明显下降; 骨髓像恶化者, 血清 SA 含量明显上升, 预示病情恶化或死亡。

6、头颈部肿瘤

头颈部解剖形态复杂, 许多部位肿瘤不易早期发现, 性质也难确定, 对临床诊断、治疗造成一定困难。检测唾液酸 (SA) 可对部分恶性肿瘤进行诊断和监控。口腔颌面部恶性肿瘤病人 SA 含量明显高于正常人和良性肿瘤病人, 恶性肿瘤 III、IV 期病人高于 I、II 期病人, 而且 SA 含量下降后再升高并持续保持高水平, 提示有复发、转移的可能, 预后不良。如一直保持正常水平则提示病情平稳, 预后较好。

7、II 型糖尿病

SA 是细胞膜表面糖蛋白和糖酯的重要组成部分, 广泛存在于动物细胞膜、血清糖蛋白以及哺乳动物的黏液腺中, 它参与多种重要的生理过程。SA 含量升高是由于 SA 为受体的基本组成部分参与胰岛素与受体结合后的信号调节过程。糖尿病患者发病时体内脂肪细胞表面胰岛素受体中 SA 分解释放增加, 循环血液中 SA 含量升高, 因此受体异常是影响糖尿病患者 SA 水平的一个重要因素。有文献报道, 糖尿病患者血清 SA 均值明显高于对照组的结果, 血清 SA 检测可作为糖尿病检测的一项参考指标。

SA 在恶性肿瘤中诊断价值的研究, 国内外不断有文献报道。SA 在临床上的应用除以上介绍外, 在卵巢癌、宫颈癌等都有应用报导, 血清 SA 联合 CEA、AFP、CA 125、CA 50 等进行检测, 可进一步地提高检测的灵敏度和特异性, 更能准确地对肿瘤进行诊断和治疗, 弥补单一测定的漏诊和误诊。在肺癌、白血病、肠癌等检测中阳性率较高, 说明 SA 与恶性肿瘤的关系非常密切, 是一种较好的肿瘤标志物。

血清 SA 检测对手术后病人动态观察也有一定的价值。手术切除临床治愈后能使血清 SA 含量降低甚至达到正常范围。表明血清 SA 不仅是恶性肿瘤辅助诊断的客观指标, 还是监测手术治疗病程变化的可靠指标。血清 SA 水平不随年龄和性别而变化, 在不同类型的恶性肿瘤中表达不尽相同, 但它与细胞间的粘着和聚集、接触抑制、细胞转化、恶性肿瘤的转移、复发和扩散密切相关。文献表明, 治疗前、后恶性肿瘤血清 SA 含量有所不同。有效的抗肿瘤治疗后临床症状明显好转者血清 SA 含量明显下降或呈阴性, 治疗过程中转移、复发以至病情恶化或住院期间死亡者血清 SA 含量没有变化反而有上升趋势, 而且血清 SA 含量异常升高与肿瘤恶性程度呈正相关。在肿瘤复发患者中血清 SA 含量增高, 即使临床无复发病状的亦增高。对已确诊为恶性肿瘤的患者, 在治疗过程中动态观察血清 SA 水平变化可以预测和监测肿瘤的治疗效果, 而且对疾病分期、肿瘤状况、转移范围、预后估计和病变有无复发均有重要意义。

综上所述, 血清 SA 可用于多种恶性肿瘤 (特别是肺癌) 的筛查, 适用于大批人群健康筛查, 以便对肿瘤患者做到早期发现、早期诊断和治疗。血清 SA 还可以作为肿瘤疗效观察指标, 监测肿瘤的生长, 估计预后, 是否扩散、复发和转移。

血清中唾液酸的测定常用方法为比色法。由于使用显色反应的物质不同, 已有多种方法的报道。另外测定血清中唾液酸的含量还可以用高效液相色谱法。相对于比色法, 高效液相色谱法较复杂。

利德曼生化股份有限公司生产的唾液酸 (SA) 定量检测试剂盒采用比色法, 试剂盒的抗干扰能力较强, 若待测血清中无严重的脂浊和黄疸均可正常检测; 试剂为液体双试剂, 比例为 3:1, 并配有多种类型试剂瓶规格, 适用于市面上绝大多数全自动生化分析仪, 上机即用, 使用方便; 长达 18 个月的有效期及半个月的定标周期, 稳定的试剂状态保证结果可靠, 方便科室的日常操作。

参考文献:

1. 丁克峰, 吴金民, 郑树等. 乳腺组织内唾液酸的表达及其与预后的关系. 中国肿瘤临床, 1999, 26 (1): 16-18.
2. 周强, 张子学, 曹予明等. 唾液酸的检测及其临床应用. 中国实用内科杂志, 1999, 19 (8): 478-479.
3. Patel PS, Raval GN, Rawal RL, et al. Importance of glycoprotein in human cancer. Indian J Biophys, 1997, 34: 226-229.
4. Drickamer K, Taylor M. Introduction to Glycobiology [M]. 2nd edn Oxford University Press. Oxford, UK, 2006.
5. Ohtsubo K and Marth J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease [J]. Cell, 2006, 126(5): 855-867.
6. Liang P H, Wu C Y, Greenberg W A and Wong C H. Glycan arrays: biological and medical applications [J]. Curr Opin Chem Biol, 2008, 12(1): 86-92.
7. Varki A, Kannagi R and Toole B P. Glycosylation changes in cancer [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009.
8. 龚祖元, 廖彩仙, 王宇, 等. 肝细胞癌细胞膜表面唾液酸含量的变化 [J]. 南方医科大学学报, 2010: 30(10): 2323-2326.
9. 李炜. 细胞表面 α 2,3 唾液酸结构与胃癌细胞 AGS 增殖、迁移的关系及相关基因表达的初步研究 [D]. 江苏: 苏州大学, 2010: 17-25. ■

联合检测 AFP 和 AFU 在原发性肝癌中的作用

文 | 王蕊

概述

原发性肝癌 (Primary hepatic carcinoma, PHC) 是最为常见的恶性肿瘤之一, PHC 的发生主要与肝病毒的感染、黄曲霉毒素、肝硬化、酒精等有关^[1]。原发性肝癌一般发病较为隐匿, 缺乏早期症状, 一旦发现基本都为中晚期, 失去手术治疗的机会, 所以早期诊断和治疗是提高患者生存率的重要手段。目前 PHC 的早期诊断, 除了 B 超、CT 等影像学检查外, AFP 是 PHC 最常见的检测标志物, 但是对于部分患者, 由于其 AFP 浓度较低, 易出现漏诊。为了提高检出率, 只有多种肿瘤标志物联合检测可提高 PHC 诊断的敏感性和特异性^[2]。

生物学特性及临床意义

AFP (甲胎蛋白) 是一种酸性糖蛋白, 存在于胎儿发育的早期肝脏和卵黄囊中, 胎儿出生后不久即逐渐消失。目前 AFP 是一种公认的诊断肝癌的最佳标志物^[3], 也可用于提示肝癌手术切除的疗效 (即是否彻底或复发)。AFP 升高主要见于原发性肝癌、恶性畸胎瘤、卵巢胚胎性肿瘤, 胃癌肝转移、病毒性肝炎、肝硬化等; 同时其作为 PHC 的辅助诊断指标应用较广, 但有 30%~40% 的肝癌患者血清 AFP 呈现低水平表达。

AFU (α -岩藻糖苷酶) 是一种溶酶体酸性水解酶, 主要参与含岩藻糖基的糖蛋白、糖脂及粘多糖等生物活性大分子的分解代谢。它广泛存在于哺乳动物与人体各组织、细胞和体液中, 在人体内以肝脏等组织中活性最高。1980 年 deugnier^[4] 发现原发性肝癌患者血清 AFU 活性明显升高, 诊断肝癌特异性达 90%, 认为 AFU 可能系诊

断 PHC 的一个新的指标。其后国内外不少学者研究进一步证实了 AFU 对肝癌的诊断价值^[5]。

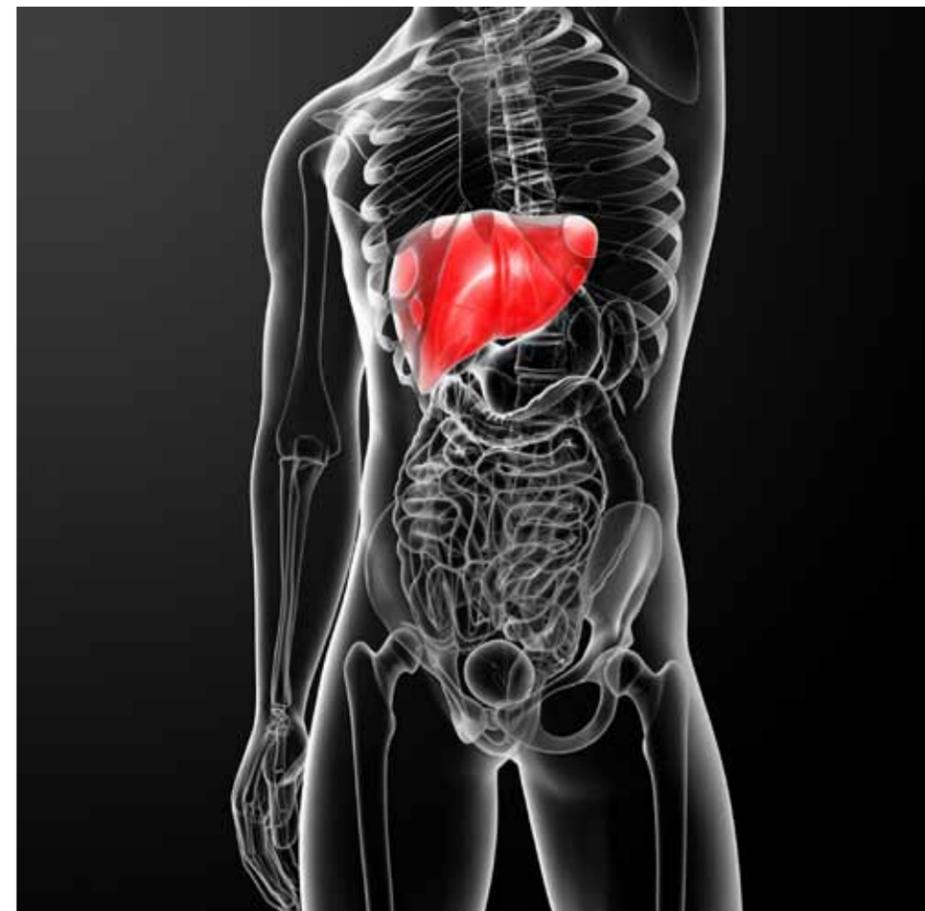
联合检测的优势

AFP 是肿瘤胚胎性抗原标志物, 它与肿瘤大小有关, 早期 PHC 和小肺癌时, AFP 常呈低水平表达, 易出现假阴性; AFU 是肿瘤酶类标志物, 它与肿瘤大小无明显相关性, 但特异性强, 有助于早期 PHC 及小肺癌的诊断。因此, 仅靠单项 AFP 或 AFU 对 PHC 的诊断及病程判断存在一定局限性。将两者联合检测, 互为补偿, 总阳性率可达到 98.85%, 明显提高 PHC 的发现率, 而且能更有效地进行病程判断。

检测方法

目前, 甲胎蛋白 (AFP) 在临床常采用化学发光法、生物化学法、酶标法、酶标电泳法、放射免疫法等检测。一般认为: 定性法阳性或定量 $>400\text{ng/ml}$ 、 $>200\text{ng/ml}$, 持续 8 周, 而谷丙转氨酶 (SGPT) 正常, 并排除妊娠和生殖腺胚胎瘤, 原发性肝癌的诊断确立。特别应用在早期亚临床肝癌的诊断并及时手术可大大提高患者的存活率。对肝癌手术、化疗、中西医结合治疗、放疗等疗效及预后判断、动态测定血清甲胎蛋白有其重要的临床价值。

肝癌最有效的治疗方法是外科手术切除, 术后 AFP $>200\text{ng/ml}$, 则意味着肺癌细胞未完全切除或有转移。当 AFP $>500\text{ng/ml}$, 胆红素 $>342\mu\text{mol/L}$ 病人存活期很短; 病人 AFP 急剧增长意味着肝癌转移。术后 AFU 活性会很快下降, 其下降速度根据切除肝标本断面血管内有无癌栓而不同。若以后 AFU 水平再度上升, 则提示肝癌复发。



因此, 在原发性肝癌的诊断中, 血清中 AFU、AFP 的联合检测对肝癌高发人群筛查、肝癌早期诊断及肝癌疗效观察均有重要意义。联合检测提高肝癌的确诊率, 为临床提供更加快速准确的诊断, 使患者得到早诊断、早治疗, 以延长患者的生存率, 保障患者的健康。

参考文献

- [1] 赵惠柳, 劳明, 朱波. 血清 AFU 活性测定对原发性肝癌诊断及疗效观察的临床价值 [J]. 现代肿瘤医学, 2004, 12 (2): 97.
- [2] 沈铮, 沈霞. 甲胎蛋白及其异质体检测的临床应用价值

[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15 (6): 361—362

- [3] 王爱华, 王华梁, 方芳, 等. AFP 和 AFP 异质体对 405 例原发性肝癌的诊断价值探讨 [J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17 (2): 87—89
- [4] Deugnier Y, Le Treut A, G laised, et al .A study of lysosomal enzyme activities in serum and leukocytes in chronic hepatic disease. Clin Chim Acta, 1980, 108 (3): 385—392.
- [5] 于志伟, 杨晓卫, 段芳龄, 等. 血清 α -L-岩藻糖苷酶的测定方法 [J]. 中华医学检验杂志, 1992, 15 (3): 139. ■

肝细胞癌中的肿瘤循环细胞 (circulating tumor cells, AKA CTCs) 一项对病例和对比控制病例关于检测、细胞计数、以及下一代测序的初始研究

译 | 马志远

摘要

背景：肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, AKA HCC) 急需循环生物标记物。此项研究的目的是研究利用富集上皮细胞粘附分子表达 (EpCAM) 的方法检测和分离 HCC 病人体内的肿瘤循环细胞的可行性，考察其预后规划的价值，以及探索用以肿瘤细胞为基础的 DNA 测序对转移性肝细胞癌病人和非恶性肝脏疾病 (NMLD) 病人 (比对控制病人组) 进行比较中的应用。

方法

从转移性 HCC 病人和 NMLD 病人取得全血样本，用 CellSearch 对 CTCs 进行计数，然后利用免疫磁性 EpCAM 富集和荧光激发细胞分类的方法进行纯化。

对 CTCs DNA 全基因扩增产物，肿瘤样本，以及外周血单核细胞上进行目标离子半导体测序。

数据结果：20 例 HCC 病人和 10 例 NMLD 病人注册了此次研究。20 例 HCC 病人当中，检测显示有 7 人的 CTCs 计数 $CTCs \geq 2/7.5 \text{ mL}$ (35%, 95% 置信区间：12%, 60%)，在 9 例合格的 NMLD 病人当中 ($p=0.04$)，没有任何一个病人 CTCs 浓度在此之上。在 $CTCs \geq 1/7.5 \text{ mL}$ 的病例中均伴随指标 $\alpha\text{-fetoprotein} \geq 400 \text{ ng/mL}$ ($p = 0.008$) 以及血管侵入。CTC DNA 测序发现了特征性的 HCC 变异型。大于 100 倍覆盖深度的比例方面，CTCs 为 43%，较肿瘤或 PMBC (87%) 相比较低。CTCs ($p < 0.001$) 中低频变异较高。

结论

在转移性 HCC 中，可以通过 EpCAM 富集的方法检测到 CTCs，而且 NMLD 不会引起假阳性背景的干扰。CTC 检测和不足的预兆因素是相关的。CTC DNA 测序可以识别已知的 HCC 变异型，但是和 FFPE 或 PBMC 相比，有较高的低频变异和较低的覆盖深度比列。

关键词：肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)，肿瘤循环细胞 (Circulating tumor cells, CTCs)，EpCAM，测序

背景

肝细胞癌是一种恶性的、错杂的疾病，是现在世界范围癌症死亡的第三大原因，目前的治疗方案选择很有限。传统的肝脏影像检测方法对于其诊断和病情所属阶段的判断是不准确的，而且会造成对病情真实程度的低估。微脉管侵害和多病灶肿瘤经常被不经意错误的认定为是由于切除手术或移植手术造成的，从而导致制定不准确的后续治疗方案。

转译学研究工作希望能更好的理解肝细胞癌中复杂肿瘤的生物特性，定义生物标记物，以及寻找并确定新型治疗目标。由于放射影像诊断没有组织样本确认，在移植手术前对病人肝脏进行大量的治疗，其风险与病人的肿瘤组织活检相关。导致未经治疗的肿瘤样本很难获得。而这给转译学研究工作的进行带来了很大的限制。要解决普遍面临的肝细胞癌的种种难题，我们急需非侵入性的生物标记物来进行诊断和分子表征。

在多种预判不准确的上皮肿瘤中，外周血中的循环肿瘤细胞都可以作为生物标记物。CellSearch 系统 (Veridex LLC, Raritan, New Jersey, U.S.A) 是一个由美国 FDA 批准的应用 EpCAM 富集方法来检测循环肿瘤细胞的设备。在乳腺，结肠和前列腺癌症中，检测到的循环肿瘤细胞的绝对数量以及在治疗过程中的变化与病人对治疗的反应和治愈相关联。多项小规模研究利用 EpCAM 富集方法或非以 EpCAM 富集为基础的方法对肝细胞癌病人的循环肿瘤细胞进行检测。由于方法学以及所研究的病人人群的不同，CTCs 的检出率大约在 30% 到 80%。在其他的上皮肿瘤类型中，使用 CellSearch 对 CTCs 的检测与肝细胞癌病人组不充分预判的情况相关，包括切除术后上升的复发风险和总体更短的存活期。

要研究使用 CTCs 作为 HCC 的生物标记物，首先确保在 HCC 患者中的循环上皮细胞真正是肿瘤细胞，而不是由于潜在的与肝脏疾病相关的发炎或脉管错乱所释放到循环系统的良性上皮细胞。尽管在健康的自愿者或者良性症状病人当中用 CellSearch 检测出 CTCs 存在的例子极为少见，但是对于大多数 HCC 患者，包括肝硬化、肝炎，或其他引起肝脏损失的原因存在的情况下，有数据表明循环 EpCAM 阳性上皮细胞曾在有上述情况的患者中被检测出来。

在进行 CTCs 的检测和计数之后，分离癌症病人的 CTCs 是一种很有前景的“液体活体组织检测”，在分子分型中提供了一种非入侵的可以实时获取已处于转移状态的肿瘤组织方法。

阵列基因组杂交比较研究显示，在乳腺，结肠以及前列腺癌症当中，CTC 衍生 DNA 和存档的原发肿瘤样本之间存在标志性的拷贝数偏差，并且这些偏差存在很好的重复性和一致性。下一代测序技术现在已经可以对非常少量的 DNA 样本进行准确的测序。Illumina MiSeq 技术可以从转移性直肠癌患者的一个循环肿瘤细胞中检测出标志性的驱动变异，其结果与变异档案以及相应的原发瘤样本是一致的。迄今为止，还没有关于 HCC 中循环肿瘤细胞有效的分离手段，分子分型以及下一代 DNA 测序工作的可行性的相关报道。

我们在假设循环 EpCAM 阳性细胞是真正的肿瘤细胞，而不是良性的上皮细胞的基础上进行了这项研究。我

们的目的是利用 CellSearch 系统连续检测转移性肝细胞癌患者中的循环 EpCAM 阳性上皮细胞，并与相关的患有肝脏疾病的控制病人组进行比较来确定有循环 EpCAM 阳性上皮细胞存在的病人的比例。为了评估判断循环肿瘤细胞在病症预判中的重要性，此次研究调查了 CTC 水平与包括甲胎蛋白水平，脉管入侵现象的存在，以及总体存活率等临床协变量之间的联系。

为了考察在 HCC 病例中使用 CTCs 作为肿瘤 DNA 来源来进行基因描述的潜能，我们收集混合并纯化了的 CTCs，进行 DNA 全基因扩增，然后对其进行测序，与目标癌症基因菜单进行比较。我们同样对储存备案的嵌入帕拉胶膜的肿瘤样本和外周血中的单核细胞的 DNA 进行了测序和比较研究。

结论

本项研究很好的支持以下几点：利用 CellSearch 检测方法，在 HCC 病人中可以检测到循环上皮细胞的存在。这些细胞是循环系统中的 EpCAM 阳性肿瘤细胞，而不是由于肝脏损伤了释放到循环系统中的良性的上皮细胞。这些结论是建立在多个实验发现的：在 HCC 病人当中，可以很显著的检测到 CTC，而在非恶性肝脏疾病病人中，没有检测到 CTC，CTC 的检测水平和 HCC 症状相关；从纯化的 CTCs 得到的 DNA 中可以发现标志性的 HCC 变异基因。在此项研究中，CTC 在循环系统中的存在与病患大血管病变和甲胎蛋白水平的上升有很强的相关性，并伴随着降低的存活率，显示了 CTC 作为转移性 HCC 病症预判生物标记物很好的潜在价值。

在病人研究是否要进行肝脏移植手术时，在疾病早期进行预先的 CTC 分析可以判断血管入侵的替代方法。同时，我们也展示了 CTCs 可以作为非侵入性获取肿瘤 DNA 的来源，为 HCC 的下一代测序工作和分子分型研究工作提供样本。今后的研究将优化 CTC 的分离技术，确定检测方法和人群的范围设置。为了能将 CTC 发展成为一个诊断和治疗 HCC 的临床和研究有效工具，还要进一步探索单细胞 CTC 的全表征方法和手段。■

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls

Robin K Kelley^{1*}, Mark Jesus M Magbanua², Timothy M Butler³, Eric A Collisson², Jimmy Hwang², Nikoletta Sidiropoulos⁴, Kimberley Evason⁵, Ryan M McWhirter², Bilal Hameed⁶, Elizabeth M Wayne⁷, Francis Y Yao⁸, Alan P Venook¹ and John W Park²

Abstract

Background: Circulating biomarkers are urgently needed in hepatocellular carcinoma (HCC). The aims of this study were to determine the feasibility of detecting and isolating circulating tumor cells (CTCs) in HCC patients using enrichment for epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expression, to examine their prognostic value, and to explore CTC-based DNA sequencing in metastatic HCC patients compared to a control cohort with non-malignant liver diseases (NMLD).

Methods: Whole blood was obtained from patients with metastatic HCC or NMLD. CTCs were enumerated by CellSearch then purified by immunomagnetic EpCAM enrichment and fluorescence-activated cell sorting. Targeted ion semiconductor sequencing was performed on whole genome-amplified DNA from CTCs, tumor specimens, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) when available.

Results: Twenty HCC and 10 NMLD patients enrolled. CTCs $\geq 2/7.5$ mL were detected in 7/20 (35%, 95% confidence interval: 12%, 60%) HCC and 0/9 eligible NMLD ($p = 0.04$). CTCs $\geq 1/7.5$ mL was associated with alpha-fetoprotein ≥ 400 ng/mL ($p = 0.008$) and vascular invasion ($p = 0.009$). Sequencing of CTC DNA identified characteristic HCC mutations. The proportion with $\geq 100\times$ coverage depth was lower in CTCs (43%) than tumor or PBMC (87%) ($p < 0.025$). Low frequency variants were higher in CTCs ($p < 0.001$).

Conclusions: CTCs are detectable by EpCAM enrichment in metastatic HCC, without confounding false positive background from NMLD. CTC detection was associated with poor prognostic factors. Sequencing of CTC DNA identified known HCC mutations but more low-frequency variants and lower coverage depth than FFPE or PBMC.

Keywords: Hepatocellular carcinoma (HCC), Circulating tumor cells (CTC), EpCAM, Sequencing

Background

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a grim, heterogeneous disease with limited treatment options despite its enormous global impact as the third leading cause of cancer death worldwide [1]. Conventional liver imaging modalities for diagnosis and staging are imprecise and can result in underestimation of the true extent of disease, with microvascular invasion and multifocal tumors often identified incidentally at resection or transplant and associated with significantly poorer prognosis [2,3]. Translational research efforts to better understand the complex tumor biology of HCC, define biomarkers, and identify novel therapeutic targets are further limited by a scarcity of annotated, untreated tumor specimens, owing to the acceptance of radiographic diagnosis without tissue confirmation, the prevalence of liver-directed therapy before transplantation, and the risks associated with tumor biopsy in this population [4,5]. Non-invasive biomarkers for diagnosis and molecular characterization are urgently needed to overcome these pervasive challenges in HCC.

Circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood are a biomarker of poor prognosis in multiple epithelial tumor types [6,7]. The CellSearch System (Veridex LLC, Raritan, New Jersey, U.S.A) is an FDA-cleared device for CTC detection using enrichment for cells in the blood expressing the epithelial cell adhesion marker (EpCAM) [6]. The absolute numbers of CTCs detected and changes on therapy have been associated with survival and treatment response in breast, colon, and prostate cancers [8-13]. Multiple small studies have examined CTCs in patients with HCC using EpCAM- and non-EpCAM-based enrichment methods, with detection rates ranging from approximately 30% to over

80% depending on methodology and population [14-17]. As in other epithelial tumor types, the detection of CTCs by CellSearch correlates with poor prognosis in HCC cohorts, including increased recurrence risk after resection and shorter overall survival [14,15].

In order to study CTCs as a biomarker in HCC, however, it is essential to establish that circulating epithelial cells in HCC populations are true tumor cells, rather than benign epithelial cells released into circulation as a consequence of the underlying inflammation or aberrant vasculature associated with liver disease. Though the detection of CTCs by CellSearch is extremely rare in healthy volunteers or patients with benign conditions [6,10], there is limited data describing the incidence of circulating EpCAM-positive epithelial cells in the context of cirrhosis, viral hepatitis, or other causes of liver injury, conditions present in the majority of patients with HCC [14].

Beyond detection and enumeration, isolation of CTCs in cancer patients holds great promise as a "liquid biopsy", a non-invasive means of accessing real-time tumor tissue in the metastatic state for molecular profiling. Array comparative genomic hybridization has demonstrated concordance of characteristic copy number aberrations between CTC-derived DNA and archival primary tumor samples in breast, colon, prostate, and lung cancer [12,18-20]. Next-generation sequencing technologies now have the ability to sequence very small amounts of input DNA with high accuracy [21,22]. Illumina MiSeq technology can detect characteristic driver mutations in single CTCs derived from patients with metastatic colorectal cancer, concordant with the mutational profile of paired primary tumor specimens [18]. To date, the feasibility of efficient CTC isolation and molecular profiling, e.g. next-generation DNA sequencing, has not been reported in HCC.

We conducted this study to determine the proportion of metastatic HCC patients with detectable circulating EpCAM-positive epithelial cells using the CellSearch System, compared to a relevant control cohort

of patients with liver disease, hypothesizing that circulating EpCAM-positive cells are actual tumor cells rather than benign epithelial cells. To characterize their prognostic significance, CTC levels were examined for association with clinical covariates including alpha-fetoprotein (AFP) levels, the presence of vascular invasion, and overall survival. To explore the potential for CTCs to serve as a source of tumor DNA for genomic profiling in HCC, next-generation sequencing using a targeted cancer gene panel was performed using whole genome-amplified DNA derived from pooled purified CTCs, along with DNA from paired archival, paraffin-embedded tumor tissue and peripheral blood mononuclear cells when available.

Methods

Study design

This pilot study was a non-therapeutic, minimally-invasive biomarker study. The trial was approved by the UCSF Committee on Human Research. All patients provided written informed consent for specimen collection and genetic testing of tumor and germline DNA. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice.

The primary endpoint was incidence of CTCs detected in metastatic HCC patients compared to a control cohort with NMLD. Secondary endpoints were enumeration of CTCs in each cohort, association with clinical and pathologic characteristics including alpha fetoprotein (AFP) level, tumor vascular invasion, and etiology of liver disease in the HCC cohort, and association with overall survival in the HCC cohort. An exploratory endpoint was to describe performance of and somatic mutations identified by next-generation sequencing of CTC whole-genome-amplified DNA along with paired tumor and germline DNA when available.

Patient selection

HCC patients were recruited at the UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center. Principal inclusion criteria were: radiographic [4] or histologic diagnosis of American Joint Committee on Cancer (AJCC) stage IV HCC; ≥ 6 weeks post biopsy, surgery, liverdirected interventions, or other invasive procedures; no prior systemic therapy or ≥ 4 weeks since last dose of sorafenib or other systemic therapy for advanced HCC. Non-malignant liver disease (NMLD) control cohort patients were recruited at the UCSF Gastroenterology and Liver Disease Clinic. Principal inclusion criteria were: diagnosis of active hepatitis of any etiology plus clinical or pathologic diagnosis of cirrhosis or hepatic fibrosis (any stage); no evidence liver tumor on ultrasound or cross-sectional imaging within 6 months; AFP ≤ 20 ng/mL within 6 months; ≥ 6 weeks post biopsy, surgery, or other invasive procedures; no prior history of HCC.

Specimen collection

Approximately 30 mL of whole blood was obtained from study subjects at a single time-point. For HCC patients with available archival tumor tissue from prior biopsy or resection, approximately five 10-micron sections of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor along with a matching H&E slide were collected from the pathology files of the University of California, San Francisco. Banked frozen aliquots of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were obtained when available from HCC cohort patients.

Circulating tumor cell enumeration

CTCs were isolated from 7.5 mL whole blood and enumerated using the CellSearch System (Veridex LLC, Raritan, NJ) [6-8]. Briefly, specific antibodies to EpCAM were used to enrich for epithelial cells. A mixture of fluorescently-labeled monoclonal antibodies to cytokeratin and the nuclear dye DAPI were used to select for nucleated, keratin-positive cells. CTCs were defined as nucleated, EpCAM-positive cells that stain positive for cytokeratin and negative for leukocyte common antigen, CD45 [6]. Labeled cells were enumerated using semiautomated fluorescence-based microscopy. Analysis was performed by a trained technician blinded to diagnosis (HCC versus NMLD).

Immunoenrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS)

A novel EpCAM-based immunoenrichment (IE)/fluorescence-activated cell sorting (FACS) procedure has been developed to isolate purified CTCs without contamination from normal blood cells and has demonstrated correlation with CellSearch System CTC enumeration [12,19,23]. For patients found to have > 10 CTCs in 7.5 mL of whole blood by CellSearch System, IE/FACS was then performed to isolate purified CTCs as has been previously described [12,24]. Briefly, approximately 15–20 mL of whole blood was incubated with immunomagnetic particles coated with two different monoclonal antibodies to EpCAM, one conjugated to magnetic particles and the other to a fluorophore. FACS was used to isolate nucleated, EpCAM-positive, CD45-negative cells.

Whole genome amplification (WGA)

A ligation-adaptor method of WGA was performed on whole cell lysates from pooled CTCs isolated by IE/FACS using a GenomePlex whole genome amplification kit (WGA4, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions [12,25]. DNA was randomly fragmented and converted to polymerase chain reaction (PCR)-amplifiable library molecules flanked by universal priming sites. PCR amplification of library molecules was performed using universal oligonucleotide primers.

DNA extraction from tumor tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Tumor-containing FFPE sections were identified and marked by a hepatopathologist (KE). DNA was extracted from FFPE sections as well as from banked PBMC using QIAmp kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was quantified using PicoGreen.

Ion semiconductor NGS

Sequencing of DNA extracted from CTCs, FFPE, and PBMC was performed by TMB in the Spellman Laboratory at Oregon Health Sciences University. From each sample, 10 ng DNA was PCR-amplified using AmpliSeq Cancer Panel Primer Pools and Library Kit 2.0 to generate 190 multiplexed amplicons (representing 46 cancer-related genes) [21]. Up to 11 barcoded samples were multiplexed on Ion 318 chips. Sequencing was performed on a Personal Genome Machine (PGM) sequencer (Ion Torrent) using the Ion PGM 200 sequencing kit. Torrent Suite software version 4.0.1 was employed to analyze read counts and quality. Variant Caller software version 4.0.1 identified variants. Coverage Analysis software version 4.0.1 determined target coverage. To minimize false positives, variants were required to have sequencing depth of at least 20x, an allele frequency of 5 percent, and not be present in any of the 3 PBMC samples sequenced. Variant calls were filtered against the Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) version 132, using the software ANNOVAR. Protein-altering variants were predicted by Mutation Assessor version 2 (<http://mutationassessor.org>).

Statistical analysis

Based upon the a priori hypothesis that approximately 50% of the HCC cohort and none of the NMLD cohort would have detectable CTCs by CellSearch, the planned sample size for this pilot study was 20 patients with metastatic HCC and 10 patients with NMLD, to permit estimation of proportion of detectable CTCs with 95% confidence intervals (CI) as (0.30, 0.70) in the HCC cohort and (0.01, 0.26) in the NMLD cohort. The incidence and number of detectable CTCs were analyzed using frequency and proportions with 95% CI and compared between HCC and NMLD cohorts using the Wilcoxon-Kruskal-Wallis rank test. Cut-points of ≥ 1 , ≥ 2 , ≥ 3 , and ≥ 5 CTCs/7.5 mL were examined based upon published literature in HCC and other tumor types [8,10,14,15]. Wilcoxon-Kruskal-Wallis rank testing was also used to determine association between the presence of detectable CTCs by CellSearch System, AFP elevation using ≥ 400 ng/mL as an established prognostic cut-point [26,27], and the presence of vascular invasion (all binary variables). In the HCC cohort, overall survival was measured in months from date of CTC blood draw to the date of death with censoring at date of last known vital status if lost to follow-

* Correspondence: Katie.kelley@ucsf.edu

¹Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center and The Liver Center, University of California San Francisco (UCSF), 550 16th St., Box 3211, San Francisco, CA 94143, USA

Full list of author information is available at the end of the article

up. Kaplan-Meier methods were used to determine the impact of CTCs at each cut-point and conventional prognostic factors on overall survival. The CTC level, AFP value of 400 ng/mL, and presence of macrovessel invasion were used to dichotomize for univariate analyses. The Child Pugh score and etiology of liver disease were also examined. A p value of < 0.05 was considered statistically significant under log-rank tests. Sequencing coverage depth was compared between sample types using two-tailed t-tests assuming unequal variance. Variant calls were reported descriptively due to small sample size.

Results

Patient characteristics

Twenty patients with a diagnosis of metastatic HCC (HCC cohort) and 10 patients with underlying nonmalignant liver disease without cancer (NMLD cohort) were prospectively enrolled between June 2011 and April 2012. All HCC patients were followed to date of death. Baseline patient characteristics are shown in Table 1. The median overall survival in the HCC cohort was 9.44 months from date of CTC blood draw. One NMLD cohort patient with HCV cirrhosis (Hep 25) was found to have a liver mass with adjacent portal vein thrombosis on a surveillance ultrasound after enrollment and was excluded based upon a suspected new diagnosis of HCC, resulting in 9 eligible patients in the NMLD cohort. The patient was subsequently lost to follow up. Figure 1 displays the study subject enrollment and samples tested.

CTC detection and enumeration by CellSearch

Figure 2 depicts the number of CTCs detected in each patient. At least 1 CTC per 7.5 mL was detected in 8 of 20 (40%, 95% CI: 17%, 64%) HCC patients and 1 of 9 (11%, 95% CI: 0, 37%) eligible NMLD patients ($p = 0.1$, Wilcoxon-Kruskal-Wallis rank test). At least 2 CTC per 7.5 mL were detected in 7 of 20 (35%, 95% CI: 12%, 60%) HCC patients and 0 of 9 eligible NMLD patients ($p = 0.04$, Wilcoxon-Kruskal-Wallis rank test). Among the HCC cohort patients, at least 1 CTC per 7.5 mL was detected in 7 of 10 (70%, 95% CI: 35%, 100%) with AFP ≥ 400 ng/mL, versus 1 of 10 (10%, 95% CI: 0, 33%) with AFP < 400 ng/mL ($p = 0.008$). At least 1 CTC per 7.5 mL was detected in 8 of 13 (62%, 95% CI: 31%, 92%) with vascular invasion versus 0 of 7 without ($p = 0.009$) (Wilcoxon-Kruskal-Wallis rank tests). The NMLD control cohort patient Hep 25 who was removed for ineligibility (due to new liver mass with thrombosis consistent with HCC) was found to have 20 CTCs per 7.5 mL peripheral blood. Another NMLD cohort patient with alcoholic cirrhosis had 1 CTC detected per 7.5 mL peripheral blood. It is noteworthy that the single eligible NMLD control patient with detectable CTCs (1 in 7.5 mL) subsequently developed new infiltrative changes in the liver on a

Table 1 Patient characteristics

	HCC cohort (n = 20)	NMLD control Cohort (n = 10)
Median age (range) (years)	61.5 (50-82)	26-91 (53.5)
Male/female (n)	20/0	9/1
Etiology of liver disease (%)		
HBV	25	20
HCV	45	60
Co-infection HBV + HCV ^a	10	0
ETOH	5	10
NAFLD	10	0
PSC	0	10
Unknown	5	0
Race/ethnicity (%)		
African-American	5	10
Asian	35	10
Caucasian	55	70
Hispanic/Latino	5	30
Non-Hispanic/Latino	50	40
Native American	5	0
Other/unknown	0	10
Child Pugh score (%)		
A/B/C/unknown	70/25/5/0	30/30/30/10
Median AFP (range) (ng/mL)	492 (3.8-587,134)	5.5 (1.7-17.2)
BCLC score C (%) ^b	100	N/A
Vascular invasion (%)	65	N/A
Extrahepatic spread (%) ^c	100	N/A
Median overall survival (months)	9.4 months	Not measured

Key: HBV = hepatitis B virus. HCV = hepatitis C virus. ETOH = alcohol. NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease. PSC = primary sclerosing cholangitis. BCLC = Barcelona Clinic Liver Cancer. N/A = not applicable. ^aDefined as HCV antibody positive plus either HBV surface antigen and/or core antibody positive. ^bBCLC C and presence of extrahepatic spread were required eligibility criteria for HCC cohort.

surveillance ultrasound, raising the possibility of underlying tumor though no formal HCC diagnosis was made before his death of complications of cirrhosis approximately 13 months after CTC blood draw.

The median overall survival (OS) in the HCC cohort was 9.4 months. Among HCC cohort patients with at least 1 CTC per 7.5 mL, the median OS was 2.8 months (95% CI: 1.08, 15.5), versus 11.3 months (95% CI: 7.49, 12.9) for those without CTCs detected, although the difference was not statistically significant ($p = 0.62$, Log-Rank test) (Figure 3). In univariate analysis of CTC levels and conventional prognostic factors (Table 2), none showed significant effect on overall survival, though analyses were limited by small sample sizes; no further multivariate analysis was performed.

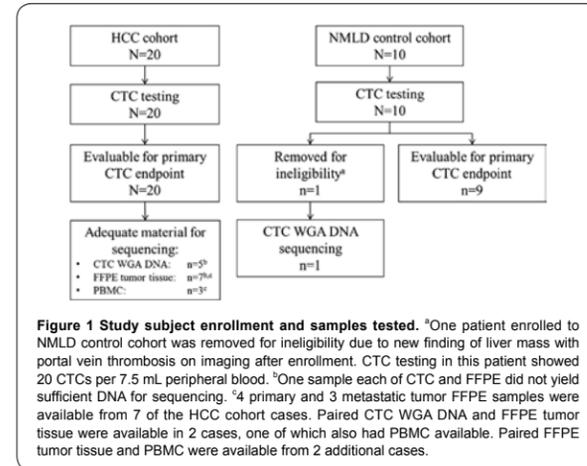


Figure 1 Study subject enrollment and samples tested. ^aOne patient enrolled to NMLD control cohort was removed for ineligibility due to new finding of liver mass with portal vein thrombosis on imaging after enrollment. CTC testing in this patient showed 20 CTCs per 7.5 mL peripheral blood. ^bOne sample each of CTC and FFPE did not yield sufficient DNA for sequencing. ^c4 primary and 3 metastatic tumor FFPE samples were available from 7 of the HCC cohort cases. Paired CTC WGA DNA and FFPE tumor tissue were available in 2 cases, one of which also had PBMC available. Paired FFPE tumor tissue and PBMC were available from 2 additional cases.

CTC isolation by IE/FACS

Five patients in the HCC cohort showed greater than 10 CTC per 7.5 mL detected by CellSearch. CTCs were then isolated via IE/FACS performed on the remaining blood samples collected from these patients. IE/FACS was also performed on the specimen from Hep 25, the patient removed from the NMLD cohort for the finding of a liver mass with portal vein thrombosis. Absolute CTC counts by CellSearch and IE/FACS for these samples are provided in Additional file 1.

CTC, PBMC, and FFPE sequencing performance

Sequencing of adequate DNA samples from CTCs, FFPE tumor samples, and banked PBMC from the study cohort (Figure 1, Table 3) was performed. Paired FFPE tumor and/or PBMC from patients with adequate CTC DNA for sequencing were available in two cases; two additional cases with paired FFPE tumor and PBMC samples available without adequate CTC DNA also were analyzed from the HCC cohort (Figure 1). Sequencing performance according to sample type is displayed in Table 3. Sequencing performance data for FFPE tumor samples and banked PBMC (both a source of DNA not requiring WGA) were combined due to small sample sizes, for comparison to WGA DNA from CTCs (Table 3). The mean amplicon read depth was lower (2258 versus 2954, $p < 0.01$) and proportion of targeted bases with sequencing coverage of $\geq 100x$ was significantly lower in CTC samples (43%) than in FFPE tumor plus PBMC samples (87%) ($p < 0.025$), using two-tailed t-tests. The mean number of variant calls per sample was higher in CTC samples compared to FFPE samples (9 vs. 2, $p < 0.04$), though the mean frequency of individual variant alleles was significantly lower (36% vs. 60%, $p < 0.001$) (two-tailed t-tests). Reproducibility of sequencing results was demonstrated by 3 samples run in duplicate (data not shown).

Sequencing results: variants, SNPs and mutation calls

Eighty-six variants overall, 58 of which were predicted to be protein-altering, were identified from all of the CTC and FFPE tumor samples combined. Approximately 54% were low-frequency (occurring in less than 10% of the individual sample), among which 93% were from CTC-derived DNA. Fifty-

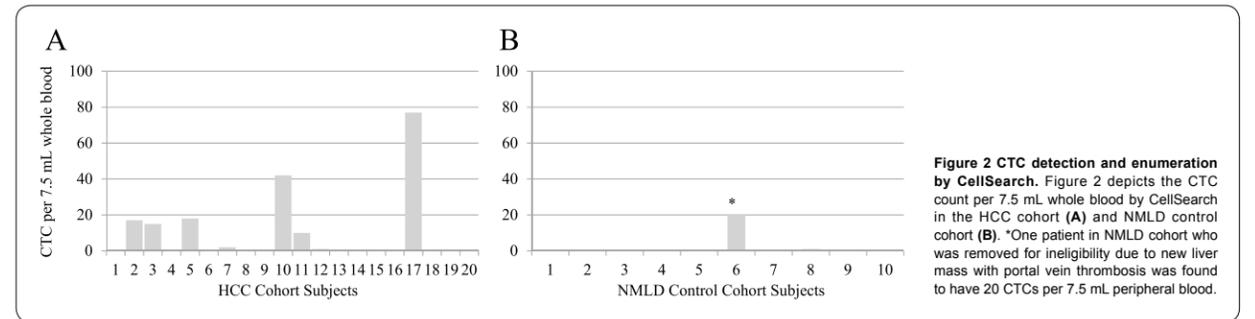


Figure 2 CTC detection and enumeration by CellSearch. Figure 2 depicts the CTC count per 7.5 mL whole blood by CellSearch in the HCC cohort (A) and NMLD control cohort (B). ^{*}One patient in NMLD cohort who was removed for ineligibility due to new liver mass with portal vein thrombosis was found to have 20 CTCs per 7.5 mL peripheral blood.

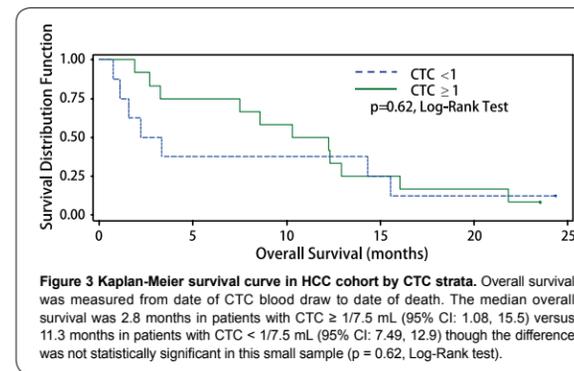


Figure 3 Kaplan-Meier survival curve in HCC cohort by CTC strata. Overall survival was measured from date of CTC blood draw to date of death. The median overall survival was 2.8 months in patients with CTC $\geq 1/7.5$ mL (95% CI: 1.08, 15.5) versus 11.3 months in patients with CTC < 1/7.5 mL (95% CI: 7.49, 12.9) though the difference was not statistically significant in this small sample ($p = 0.62$, Log-Rank test).

Table 2 Univariate analysis of CTC levels and conventional prognostic factors with overall survival

HCC Cohort (n = 20)	Mean overall survival (months) (standard error)	Median overall survival (months) (95% CI)	p value (Log-Rank test)
CTC per 7.5 mL			
< 1.0 (n = 12)	10.96 (1.95)	11.29 (2.69, 16.06)	
1.0 (n = 8)	8.49 (3.63)	2.76 (0.72, 15.54)	0.6179
< 2.0 (n = 13)	10.37 (1.89)	10.32 (3.25, 12.91)	0.8021
≥ 2.0 (n = 7)	9.23 (4.11)	2.20 (0.72, 15.54)	0.8510
< 3.0 (n = 14)	9.74 (1.86)	9.45 (2.69, 12.91)	
≥ 3.0 (n = 6)	10.50 (4.62)	8.26 (0.72, 29.14)	
Median AFP (ng/mL)			
< 400 (n = 10)	11.20 (2.29)	11.32 (2.69, 16.07)	0.4058
≥ 400 (n = 10)	8.73 (2.92)	5.39 (0.72, 14.32)	
Macrovascular invasion			
No (n = 7)	10.12 (2.48)	10.32 (2.69, 12.91)	0.7493
Yes (n = 13)	10.45 (2.82)	8.58 (1.58, 15.54)	
Child Pugh score (%)			
A (n = 14)	10.69 (1.87)	11.32 (2.20, 15.54)	
B (n = 5)	9.29 (5.39)	3.25 (0.72, 29.14)	0.7181
C (n = 1)	1	1	
Etiology of liver disease (%)			
HBV (n = 5)	10.28 (3.83)	8.58 (2.20, 21.85)	
HCV (n = 9)	10.41 (1.96)	12.62 (1.91, 15.54)	0.9324
HBV + HCV (n = 2)	1	1	
ETOH (n = 1)	1	1	
NAFLD (n = 2)	1	1	
Unknown (n = 1)	1	1	

Kaplan-Meier methods were used to determine the impact of CTC at each cut-point and conventional prognostic factors on overall survival. The CTC level, AFP value of 400 ng/mL, and presence of macrovessel invasion were used to dichotomize for univariate analyses. The Child Pugh score and etiology of liver disease were also examined. A p value of < 0.05 was considered statistically significant under log-rank tests. No factor showed significance in univariate analysis though analyses were limited due to small sample sizes. Key: CI = confidence interval. ETOH = alcohol. NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease. 1 = sample size insufficient for analysis.

Table 3 Sequencing performance by sample type

Sample type	CTC WGA DNA (n = 5)	FFPE Tumor DNA (n = 6) and PBMC DNA (n = 3) (n = 9 total ^a)	p value (two-tailed t-test)
Mean read length	74 bp	76 bp	NS
Mean mapped reads per sample	653,878 bp	668,633 bp	NS
Mean amplicon read depth (std. dev)	2258 (4389)	2954 (1379)	$p < 0.001$
Proportion with coverage > 20x	50%	97%	$p < 0.0002$
Proportion with coverage > 100x	43%	88%	$p < 0.026$
Mean non-synonymous variant calls per sample	9	2 ^b	$p < 0.03$
Mean variant allele frequency	37%	61% ^b	$p < 0.0001$

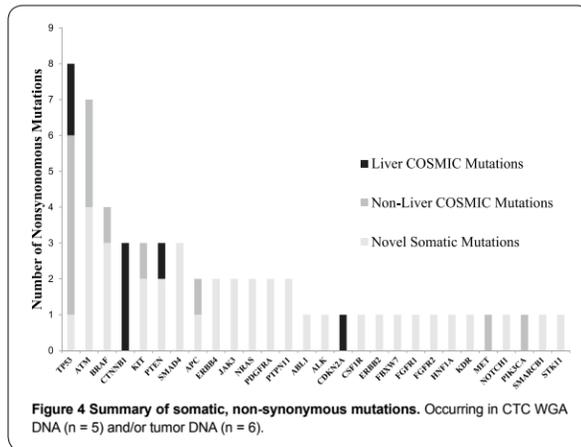
^aData from FFPE and PBMC DNA samples were combined for sequencing performance analyses (but not for genotype analyses) due to small sample size and similar observed coverage. NS = not significant. ^bPBMC samples (germline DNA) were excluded from variant analyses, n = 3.

eight somatic, non-synonymous variants were called mutations if a matching mutation has been described in liver cancer, if the variant shared the same amino acid residue as a COSMIC mutation in any cancer type, and/or if the variant allele frequency was greater than 5% but the variant was not a known SNP and not present in any PBMC sample [28]. Frameshift mutations were excluded from analysis due to known limitations of ion semiconductor sequencing to accurately detect frameshift mutations. Characteristic mutations in HCC (TP53, PTEN) were identified in CTC-derived DNA from two cases. Figure 4 displays a summary of the somatic, non-synonymous mutations identified in CTC and FFPE tumor samples combined. A listing of all somatic, non-synonymous mutations (excluding frameshift) detected according to sample type is provided in Additional file 2. In one HCC case with matched CTC, FFPE tumor, and PBMC DNA, 8 SNPs were present and concordant in both FFPE tumor and PBMC DNA; 5 of these (63%) were detected in the CTC DNA. Neither was identified in the paired CTC DNA.

Discussion

The ability to detect and characterize malignant cells in circulation holds enormous promise as a biomarker in HCC, a grim cancer challenged by the inability of conventional noninvasive diagnostic and staging modalities to encompass its great clinical and biological heterogeneity, as well as by a scarcity of tumor tissue available for diagnostic or research purposes. In this study, at least one CTC was detected in 8/20 (40%) of patients with metastatic HCC, compared to 1/9 (11%) of eligible NMLD patients using the CellSearch System. Though the cut-point of ≥ 1 CTC/7.5 mL did not achieve significance between the two groups, a cut-point of ≥ 2 CTCs/7.5 mL was significant, positive in 7/20 (35%) HCC patients compared with none in the NMLD cohort ($p = 0.04$), consistent with prior reports [14,15]. The one eligible NMLD control patient with CTC count of 1/7.5 mL was subsequently found to have ultrasound findings suggestive of underlying tumor, although no formal HCC diagnosis was made, and thus he was not removed from the control cohort. Our findings confirm the limited existing data suggesting that circulating EpCAM-positive epithelial cells are rare in patients with nonmalignant liver diseases, and that EpCAM-positive cells in HCC patients are generally of tumor origin [14].

Corroborating the prognostic value of EpCAM-positive CTCs in other recent series [14,15], the detection of CTCs in the HCC cohort of this study was significantly associated with high AFP and the presence of vascular invasion, and there was a non-significant trend toward poorer overall survival in patients with detectable CTCs. These findings support the value of CTCs as a prognostic biomarker in metastatic HCC and suggest future potential roles for CTCs in treatment decisionmaking as



well as for stratification in clinical research, which historically has been challenged by the great prognostic heterogeneity of this disease [29].

The unexpected finding of high CTC levels in a patient initially enrolled to the NMLD cohort, who subsequently was removed for ineligibility due to the finding of a new liver mass with vascular invasion on ultrasound suggestive of HCC, raises the intriguing possibility that CTC detection also may be associated with vascular invasion and poor prognosis in earlier stages of disease. This incidental finding, along with recent results of Schulze et al. and Sun et al. indicating prognostic value of CTC detection in patients with localized HCC [14,15], suggest an important potential role for CTCs as a biomarker of occult vascular invasion, recurrence risk, and overall survival in patients with apparent localized disease undergoing evaluation for surgery or transplantation.

Our finding that EpCAM-positive CTCs are associated with high AFP and the presence of vascular invasion is in keeping with the results of others [14,15] which indicate that EpCAM-positive CTCs have biologic relevance as a diagnostic and prognostic biomarker in HCC. EpCAM expression and an EpCAM-positive gene expression signature are associated with poor differentiation, high AFP levels, and activation of Wnt- β -catenin signaling pathways [30-32]. EpCAM-positive HCC cells also express markers associated with cancer stem cells and the epithelial to mesenchymal transition, supporting a hypothesis that EpCAM enrichment identifies stemlike cells with potential for metastasis [15,30,31,33].

A key unanswered question is whether EpCAM is the optimal marker for CTC enrichment in HCC. Unlike other epithelial tumor types which demonstrate nearly universal EpCAM expression [34], EpCAM is not expressed on mature hepatocytes and is expressed in only approximately 35% to 60% of HCC tumors by immunohistochemistry or PCR-based methods [30,31,35-37]. Thus, it is possible that non-EpCAM-expressing HCC cells exist in circulation and are undetectable by technologies employing EpCAM enrichment, which may account for our inability to detect CTCs in some of our HCC patients. Small series of non-EpCAM-based CTC isolation methods, such selection for the expression of asialoglycoprotein receptor or pancytokeratin or by cell size, suggest numerically higher incidence of detectable CTCs in metastatic HCC patients than has been reported with CellSearch, though the data are limited by small sample sizes and are not comparative [16,17,38]. Optimal CTC isolation and enrichment in HCC may require combining EpCAM with other markers.

Beyond using CTC detection and enumeration as a prognostic biomarker, however, CTCs offer a dynamic window into the evolution of metastatic disease. The advent of next-generation sequencing has revealed a remarkable degree of heterogeneity within individual tumors and between primary tumors and their metastases [39]. With increasingly sensitive and precise technologies for the detection and molecular profiling of rare

cells, the genomic interrogation of CTCs may offer a powerful new tool to characterize, and someday to target, the dominant tumor subclones responsible for treatment resistance or metastatic progression. Heitzer et al. recently reported the first comprehensive genomic profiling of single CTCs using array comparative genomic hybridization and next-generation sequencing in a study of 37 patients with metastatic colorectal cancer [18]. Among the 6 patients with adequate (>10) CTCs isolated for genomic profiling, concordance on copy number changes and characteristic driver mutations including PIK3CA, APC, and KRAS was shown, along with many additional mutations in the CTCs which were later found to be present at subclonal levels in the primary tumors by deep sequencing. Interestingly, heterogeneity was observed between CTCs isolated from the same patient at the same time-point.

This pilot study represents the first report of efficient isolation and next-generation sequencing of CTCs in HCC, to our knowledge. In this study, ion semiconductor next-generation sequencing showed a significantly higher proportion of targeted bases with at least 100x coverage depth among FFPE tumor and PBMC samples (87%) compared to CTC-derived DNA samples (43%) ($p < 0.025$). The disparate coverage depths according to sample type may be due in part to the use of an adaptor-ligation PCR WGA method which has been associated with allelic loss; alternate methods of amplification such as multiple displacement may mitigate this effect [40-42]. An alternate or contributory factor leading to the difference in allele frequency between sample types, as well as to the mutational disagreements between FFPE and CTC samples, may be the inherent heterogeneity of individual CTCs which were pooled for WGA from each patient [43]. WGA may also introduce low frequency variants by artifact [40,41].

In our study, 86 variants were identified from CTC and FFPE tumor samples. One half of the variants were low frequency (<10%) and derived predominantly from the CTC DNA samples. While again this finding could be due to coverage bias or artifact arising from WGA, these results are also consistent with the findings from Heitzer et al. in a colorectal cancer cohort [18], which suggest significant inter-CTC heterogeneity and could explain the prevalence of low-frequency variants arising from pooled DNA derived from multiple CTCs from an individual patient. Characteristic mutations associated with HCC (including TP53 and PTEN) were identified in CTC-derived DNA, consistent with tumor origin [44]. The overall sequencing accuracy in this study was demonstrated by several cases with available paired PBMC, CTC, and tumor DNA samples showing concordance on SNP calls, along with reproducibility of results in duplicate runs. A significant limitation of the exploratory sequencing in this pilot study, however, was its small sample size, along with the limited proportion of cases with paired CTC, FFPE tumor, and PBMC DNA available.

Conclusions

This study strongly supports that circulating epithelial cells are detectable in HCC patients, including via the CellSearch assay; and that these cells are EpCAM-positive tumor cells in circulation, rather than benign epithelial cells released in the setting of liver injury. These findings are based on significant CTC detection in HCC but not in NMLD cohorts, associations between CTC detection and HCC prognostic markers, and the demonstration of characteristic HCC mutations in DNA derived from purified CTCs. The significant association with macrovessel invasion and elevated AFP in this study, along with a trend towards poorer survival, indicate the potential value of CTC detection as a prognostic biomarker in metastatic HCC. Prospective analyses of CTCs in earlier stages of disease are warranted to determine surrogacy for vascular invasion in patients undergoing evaluation for surgery or liver transplantation. In parallel, we demonstrate that CTCs offer a source of noninvasive tumor DNA for next-generation sequencing and molecular profiling efforts in HCC. Future studies to determine the optimal CTC isolation technology, cut-points by assay and population, and methods for single-cell CTC molecular characterization are essential to develop CTCs as a clinical biomarker as well as a research tool in this grim, complex disease in urgent need of new biomarkers and therapeutic targets.

Additional files

Additional file 1: Absolute CTC counts by CellSearch and IE/FACS.
Additional file 2: List of somatic, non-synonymous mutations identified by targeted sequencing. Key: VAF = variant allele frequency. SNV = single nucleotide variant. Met = metastasis. * = Same amino acid residue as a liver COSMIC mutation. Variants were identified as somatic mutations if non-synonymous and: a matching COSMIC[®] mutation has been described in liver cancer (highlighted in yellow), the variant shared the same amino acid residue as a COSMIC mutation, and/or if the variant allele frequency was greater than 5% but the variant was not a known SNP and not present in any PBMC sample tested. Frameshift mutations were excluded due to known limitations of ion semiconductor sequencing on frameshift calls.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RKK developed study concept, design, and protocol, consented and enrolled patients, managed and analyzed data, and wrote manuscript. MJ-MM performed CTC and WGA assays and contributed to data analysis and writing. TMB performed sequencing and analysis of sequencing data. EAC performed DNA extraction and contributed to study design, analysis, and writing. JH participated in study design and performed statistical analysis. NS performed DNA extraction. KE reviewed and marked pathology specimens for tumor content. RMM assisted in patient consent, blood specimen collection, and study coordination. BH, EMW, and FYY identified and consented control cases. APV participated in study design and data analysis. JWP participated in study design, developed IE/FACS assay, and contributed to data analysis and writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge and deeply appreciate the patients who donated their specimens and time to participate in this biomarker study. The study was funded by a grant to RKK from the Mt. Zion Health Fund, University of California, San Francisco. Support for specimen processing was provided by The Bill Project Foundation, Inc. RKK's effort was funded in part by a Young Investigator Award (YIA) from the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and by the NHGRI (R01HG007063, PI: Phillips). KE was a Robert Black Fellow of the Damon Runyon Cancer Research Foundation (DRG-109-10) and is supported by the NCI/NIH (1K08CA172288-01A1). We thank Janet Scott, Eduardo Sosa, and Adam Foye for technical assistance in specimen processing.

Author details

¹Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center and The Liver Center, University of California San Francisco (UCSF), 550 16th St., Box 3211, San Francisco, CA 94143, USA. ²Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, UCSF, San Francisco, CA 94143, USA. ³Department of Molecular and Medical Genetics, Oregon Health Sciences University, 3181 SW Sam Jackson Park Road, Mail Code #L103, Portland, OR 97239, USA. ⁴University of Vermont Medical Center, 89 Beaumont Ave., Burlington, VT 05405, USA. ⁵Department of Pathology, UCSF, 513 Parnassus Ave., San Francisco, CA 94143, USA. ⁶Division of Hepatology and Liver Transplant, UCSF, 513 Parnassus Ave., S-357, San Francisco, CA 94143, USA. ⁷Department of Transplantation-Abdominal, UCSF, 513 Parnassus Ave., S-357, San Francisco, CA 94143, USA. ⁸Division of Hepatology and Liver Transplant and The Liver Center, UCSF, 513 Parnassus Ave., S-357, San Francisco, CA 94143, USA.

Received: 27 May 2014 Accepted: 16 March 2015

Published online: 31 March 2015

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Rodriguez-Peralvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhilon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(1):325-39.
3. Lim KC, Chow PK, Allen JC, Chia GS, Lim M, Cheow PC, et al. Microvascular invasion is a better predictor of tumor recurrence and overall survival following surgical resection for hepatocellular carcinoma compared to the Milan criteria. *Ann Surg*. 2011;254(1):108-13.
4. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.
5. Mulhaupt B, Durand F, Roskams T, Dutkowski P, Heim M. Is tumor biopsy necessary? *Liver Transpl*. 2011;17 Suppl 2:S14-25.
6. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connolly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897-904.
7. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of circulating tumor cells detected by the cell search system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *J Oncol*. 2010;20(10):6174-21.
8. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213-21.
9. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(7):1223-9.
10. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.
11. Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5153-9.
12. Magbanua MJ, Sosa EV, Scott JH, Simko J, Collins C, Pinkel D, et al. Isolation and genomic analysis of circulating tumor cells from castration resistant metastatic prostate cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:78.

13. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. *J Urol*. 2009;181(3):1091-7.
14. Schulze K, Gasch C, Stauter K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2013;133(9):2165-71.
15. Sun YF, Xu Y, Yang XR, Guo W, Zhang X, Qiu SJ, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology*. 2013;57(4):1458-68.
16. Vona G, Estepa L, Beroud C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology*. 2004;39(3):792-7.
17. Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang XF, Qian HH, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(11):3783-93.
18. Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res*. 2013;73(10):2965-75.
19. Magbanua MJ, Sosa EV, Roy R, Eisenbud LE, Scott JH, Olshen A, et al. Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Cancer Res*. 2013;73(1):30-40.
20. Ni X, Zhuo M, Su Z, Duan J, Gao Y, Wang Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(52):21083-8.
21. Beadling C, Neff TL, Heinrich MC, Rhodes K, Thornton M, Leamon J, et al. Combining highly multiplexed PCR with semiconductor-based sequencing for rapid cancer genotyping. *J Mol Diagn*. 2013;15(2):171-8.
22. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.
23. Magbanua MJ, Carey LA, DeLuca A, Hwang J, Scott JH, Rimawi MF, et al. Circulating tumor cell analysis in metastatic triple-negative breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1098-105. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1948. Epub 2014 Dec 18.
24. Magbanua MJ, Park JW. Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling. *Methods*. 2013;64(2):114-8.
25. Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF, Giannola D, Irsula OR, Lasken RS, et al. Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res*. 2004;14(5):901-7.
26. Ma WJ, Wang HY, Teng LS. Correlation analysis of preoperative serum alpha-fetoprotein (AFP) level and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) after hepatectomy. *World J Surg Oncol*. 2013;11:212.
27. Tangkijvanich P, Anukulkarnkul N, Suwagoon P, Lertmaharit S, Hanvivatvong O, Kullavanijaya P, et al. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol*. 2000;31(4):302-8.
28. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D945-50.
29. Kelley RK, Venook AP. Novel therapeutics in hepatocellular carcinoma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book 2013/ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting 2013*:137-142.
30. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, et al. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(4):1484-97. doi:10.1002/hep.26168. Epub 2013 Jan 18.
31. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68(5):1451-61.
32. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007;67(22):10831-9.
33. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009;136(3):1012-24.
34. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Miralcher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2004;35(1):122-8.
35. Liang J, Ding T, Guo ZW, Yu XJ, Hu YZ, Zheng L, et al. Expression pattern of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma: association with immune infiltration and disease progression. *Br J Cancer*. 2013;109(4):1031-9.
36. Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, et al. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2014;60(1):127-34.
37. de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*. 1999;188(2):201-6.
38. Kelley RK, Nimeiri HS, Munster PN, Vergo MT, Huang Y, Li CM, et al. Temozolomide combined with sorafenib in hepatocellular carcinoma: a phase I dose-finding trial with pharmacokinetic and biomarker correlates. *Ann Oncol*. 2013;24(7):1900-7.
39. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92.
40. Park JW, Beaty TH, Boyce P, Scott AF, McIntosh I. Comparing whole-genome amplification methods and sources of biological samples for single-nucleotide polymorphism genotyping. *Clin Chem*. 2005;51(8):1520-3.
41. Stokes A, Drozdov I, Guerra E, Ouzounis CA, Warnakulasuriya S, Gleeson MJ, et al. Copy number and loss of heterozygosity detected by SNP array of formalin-fixed tissues using whole-genome amplification. *PLoS One*. 2011;6(9):e24503.
42. Swennenhuis JF, Reumers J, Thys K, Aerssens J, Terstappen LW. Efficiency of whole genome amplification of single circulating tumor cells enriched by Cell Search and sorted by FACS. *Genome Med*. 2013;5(11):106.
43. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Borevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet*. 2012;44(7):760-4.
44. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(6):694-8.

利德曼 CI1000 全自动化学发光免疫分析仪 产品研发及其市场前景分析

文 | 孟刚

【摘要】由于化学发光免疫分析技术灵敏度高、线性范围宽、检测结果准确等优点，化学发光免疫分析设备已成为中型以上医院的必备检验设备，有着巨大的市场空间。利德曼作为中国 IVD 诊断市场的龙头企业之一，历时 4 年多打造了一款 180 测试 / 小时的全自动化学发光免疫分析仪 CI1000，其各项功能、性能指标均达到与国际先进机型相当水平。本文旨在通过对利德曼 CI1000 产品研发历程、仪器性能介绍及其市场前景分析，使广大业内人士概略了解国内化学发光免疫分析设备的发展情况。

【关键词】CI1000 化学发光免疫分析仪 利德曼

概述

随着我国诊疗需求的稳步提升，医疗卫生投入的持续增长，诊断技术的发展与应用领域的扩张，IVD 在中国实现持续快速增长，IVD 行业 2014 年市场规模已达 260 亿元，其中免疫诊断和生化诊断是两块最大的市场，其在 IVD（试剂）的市场占比分别为 35% 和 32%，对应的市场规模大约为 42 亿元和 38 亿元。

随着政府对 IVD 行业的扶持力增大及化学发光产品向中小型医院及血站的普及，化学发光产品在较长一段时间内将保持持续高速增长；并且客户对仪器自动化程度的要求越来越高，要求测试成本越来越低。随着国产设备技术的日益成熟，成本优势将会更加的突显出来，正如国产生化设备已在国内市场中占据较大市场份额一样，国产化学发光产品必将在国内市场中占据一席之地。

利德曼作为中国 IVD 诊断市场的龙头企业之一，在试剂研发方面有着较深的技术积累，同时公司有着国内一流

的研发体系、在试剂研发方面有较强的竞争优势，公司早在多年前就开始了化学发光试剂的研究和开发工作；同时通过引进行业高端人才，于 2009 年成立了仪器研发事业部，开始了化学发光仪器的开发工作，希望及早的推出自己的试剂、仪器配套的化学发光产品，抢占化学发光市场巨大的先机。

CI1000 市场定位与研发历程

CI1000 市场定位

目前国内大型三甲医院的化学发光设备几乎被进口设备垄断，并且用户对产品稳定性、准确性、自动化程度、易用性都有极高的要求，国产设备尚未得到认可。利德曼公司化学发光产品，主要面对中高端市场（三级医院、二级医院、大中型实验室及大中型体检中心等）。由于公司对产品的战略定位，决定了化学发光产品的功能及性能指标就要瞄准国际先进设备的同等水平。

根据对国际先进免疫分析仪器的分析及调研，确定 CI1000 的主要性能指标：

1. 测试通量达到 180test/h；
2. 采样针加样精度：CV<2%@10uL；
CV<0.5%@50uL，携带污染小于 1ppm；
3. 采样针支持液位探测及凝块探测功能；
4. 支持样本、试剂自动扫描，支持 LIS 系统；
5. 支持所有耗材的在线添加、最大支持 4h 离机测试；
6. 支持急诊和随机测试功能；
7. 支持样本自动稀释；
8. 4 周以上定标有效期；
9. 智能化的样本、试剂、定标、质控管理体系；
10. 智能化的故障监控系统及错误处理系统。

CI1000 研发历程

2009 年利德曼通过引进业内高端技术人才，成立仪器研发部，全面开始 CI1000 全自动化学发光免疫分析仪以及配套免疫试剂的研发。

公司通过一年的时间进行需求征集、技术调研、专利分析、关键技术攻关研究。先后走访了近 10 家大型医院了解用户需求，收集市面现有先进进口设备的主要功能特点及性能参数，通过广泛的调研后确定 CI1000 产品的设计需求；收集和查阅了近千篇国内外相关技术专利，对业内相关技术深入了解的同时，避免了后续开发过程中造成侵权；通过模块化分析及反复验证、优化，先后解决了多个免疫分析仪的关键技术难点，如：保证低的磁珠损失及高清洗效率的磁分离技术、高可靠性及定位精度的三维机械手机构、高精度精密加样系统、无管间串扰低外界干扰的测光系统、反应盘自动混匀反应液系统等。

在确定了需求和进行关键技术的攻关后，开始进行整机布局及系统流程的设计，开发设计了 CI1000 原理样机，在半年时间里完成了原理样机的装配和整机流程调试，原理样机提供了整机优化验证的平台，同时试剂可以开始在原理样机上进行相关验证及与仪器的整合，使相关的临床问题及时暴露，并及时的进行试剂和仪器的双向改进。

在经过原理样机的大量实验后，暴露了一些仪器可靠性、稳定性、测试流程中故障监控的问题，这些问题在第一版开发样机中得到了改进。通过整机结构件、关键器件及系统流程的 DFMEA（设计失效模式分析）分析，制定了模块及器件的可靠性排查及实验方案，对流程中的可能造成测试结果错误及人员伤害的故障进行实时监控、及时发现故障并进行停机或标记错误结果处理。如增加了电压、气压监控，采样针碰撞及运动部件运动故障监控、反应杯抓放杯故障监控、废液溢流监控等。2011 年 6 月公司完成第一版工程样机开发。

第一版工程样机完成后，进行了大量的临床验证，验证试剂、耗材的稳定性、与仪器配套的相关性能，通过大量的实验分析影响整套仪器试剂系统性能稳定的因素，并确定在仪器或试剂端改进。通过正交实验研究影响仪器测试结果和性能的关键因素，如：清洗液浓度、清洗液温度、反应盘温度稳定性、清洗盘磁分离效果、环境温度。在第二版开发样机中进行参数确定和改进。2012 年 9 年公司

完成第二版工程样机开发。

第二版仪器开发完成后，仪器基本定型，在接下来一年时间里主要进行整机可靠性的验证工作和临床注册工作，3 台开发样机被投放到北京 3 家大型医院进行了长达一年的临床验证。一年大量的临床实验及可靠性实验为正式投产前一些隐蔽问题及难点的解决提供了数据支持。2013 年底，CI1000 正式投产。

历时 4 年多的研发，CI1000 全自动化学发光免疫分析仪与 2014 年 7 月成功上市销售，上市以来，CI1000 发光仪便以其优越的测试性能及稳定性，优良的可靠性和低故障率，得到了医院用户的一致好评，市场反响良好。

总结整个研发过程，我们认为影响产品质量的关键环节有以下几点：

1. 立项前进行充分的市场调研，明确需求，在产品研发过程尽量避免重大需求的调整；
2. 对市场竞争机型的功能、性能、实现技术进行充分调研、对比分析，接合自身研发实力及规避相关专利确定技术实现方案；
3. 需要有一个对试剂和仪器都有较深刻认识的临床专家协调整个开发过程，确定交叉环节的改进方向；
4. 充分重视仪器可靠性测试，使故障在研发过程中充分暴露；
5. 进行大量的临床试验研究，对影响测试结果和稳定性的因素进行分解、确定影响大小及控制方法。



CI1000 性能特性及与国际先进免疫分析仪器对比

CI1000 关键参数及性能指标

序号	项目	性能指标	说明
1	通量	180 t/h	一步法最快测试通量
2	批内测量重复性	CV<5%	夹心法甲胎蛋白 (AFP)、间接法抗甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAB)、竞争法甲状腺素 (T4) 的变异系数 (CV, %) ≤ 5%。
3	线性相关性	r ≥ 0.99	夹心法甲胎蛋白 (AFP)、间接法抗甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAB)、竞争法甲状腺素 (T4) 的线性相关系数 (r) ≥ 0.99;
4	最快出样时间	14min	设置测试项目, 第一个管测试完成时间
6	携带污染率	<1ppm	
7	液面探测	支持	取样针 (试剂针、样品针、底物针) 均具备液面探测功能
8	凝块检测	支持	样本针具备凝块检测功能
9	用户离机时间	4 小时	
10	样本容量	20 个样本架 100 个样本	可随时添加样品
11	样本管类型	采血管及微量杯	兼容 Φ13×75mm, Φ13×100mm 两种采血管以及各种微量杯
12	采样针加样精度	CV<2%@10uL; CV<0.5%@50uL	
13	定标方式	6 点 / 7 点定标	支持 6 点 / 7 点定标方式
14	试剂位	24 个	支持在仪器运行中更换或添加试剂
15	试剂冷藏	2 ~ 8℃	24 小时不间断制冷
16	试剂盒规格	100 人份	
17	反应位	72 个	
18	反应盘温度	37±/-0.1℃	
19	磁珠清洗方式	针吸式 4 级清洗	共清洗 4 次
20	急诊	支持	
21	液路维护	每日维护时间 <15 分钟 每周维护时间 <30 分钟	

CI1000 与国际先进免疫分析仪的对比

产品型号	ARCHITECT i2000SR (i2000)	Access2 (Access)	E601(E170)	CI1000
生产商	abbott	Beckman	roche	Leadman
检验技术原理	直接化学发光免疫分析技术 (吖啶酯)	微粒子酶促化学发光免疫分析技术 (ALP-APMMD)	电化学发光 (ECLIA)	微粒子酶促化学发光免疫分析技术 (ALP-APMMD)
仪器形式	立式	台式	立式	立式
通量	200test/h	100test/h	170test/h	180test/h
最快出样时间	15.6min	15min	18min	14min
在线检测项目	25 个	24 个	25 个	24 个
试剂包装规格	有 100/500test 不同包装可供选择	100test	有 100/200/test	100test
自动定标	是, 6 点定标	是, 6 点定标	是, 2 点定标	兼容 6 点和 7 点定标方式
定标周期 (天)	30 天	28 天	28 天	28 天
样本容量	135 个样本	60 个样本	150 个样本	100 个样本 (20 个样本架)
离机测试数量	5 小时	3 小时	5 小时	4 小时
急诊	支持	支持	支持	支持
采样针液位探测	支持	支持	支持	支持
凝块探测	支持	支持	支持	支持
最小加样量	50uL	5uL	10uL	5uL
交叉污染率		<1PPM	无交叉污染	<1PPM
反应杯在机容量	1200		672 个	480
反应盘温控精度	37±0.1	37±0.1	37±0.3	37±0.1

由于 CI1000 的设计一开始就瞄准国际先进水平, 如上表所示, CI1000 的主要功能、性能指标都能与国际先进机型达到同等或接近水平。



拥有各类生产测试设备 60 余台, 检验设备 10 余台; 各类专业生产人员 20 余名。目前具备年产全自动化学发光免疫分析仪产品 200 余台的能力。

CI1000 市场化分析

目前国内大型三甲医院对国产免疫分析仪的认识和信心不足, 并且目前国产仪器在质量的稳定性方面与进口仪器确实有一定差距, 从大型三甲医院直接作为市场化的突破口十分困难。因此 CI1000 上市之初的销售对象为三级合格医院及二级医院、中小型血站、体检中心, 获得市场口碑后销售范围逐步扩大至大型三甲医院。

目前 CI1000 达到产品成熟期, 产品经过市场检验, 获得了较好市场口碑并已经大批量出售仪器及配套试剂。

CI1000 产业化与市场化分析

CI1000 产业化实施

目前 CI1000 已经通过了多个批次仪器的生产、调试和检验, 已顺利完成产品的大批量生产, 通过不断的优化生产和检验工艺, 目前相关工艺流程已经固定。

关于物料采购环节, IVD 行业在中国已成熟发展十余年, CI1000 关键元器件全部采用国际知名厂商产品, 其多数为国内 IVD 仪器公司成熟的供应商, 在货期、质量控制、技术支持方面都比较成熟; 在机加、钣金及定制件方面, 中国是制造业大国, 如今各地机加厂、钣金厂、模具厂已是遍地开花, 为了保证货期及生产质量, 公司在全国范围内遴选优秀供应商, 并与供应商确定统一的制图、加工、检验规范, 再通过公司严格的质量控质体系确保质量可靠。

在质量控制及检验环节, 利德曼有着严格的质量管控体系, 从零部件检验、到组件检验、再到整机性能检验、可靠性检验, 都有着严密的检验流程, 另外, 在每一台 CI1000 设备出厂前都会经过长达 120 小时的老化测试, 确保仪器功能、性能稳定, 这是很多仪器生产厂商很难做到的。

目前利德曼仪器生产场地 1700 余平米, 其中电装区 300 平方米, 装配区 300 平方米, 总装区 600 平方米, 调试区 400 平方米, 半成品库房 100 平方米。现拥有电装生产线 3 条, 机装生产线 3 条, 调试机位 10 个, 同时

目前利德曼已有三十余项化学发光试剂产品取得注册证书, 并且上市销售。这些项目主要集中在市场前景较好的肿瘤标志物、甲状腺激素、性腺激素、心肌标志物、糖代谢等项目上, 这些项目能满足大部分医院的检测需求。

化学发光免疫分析设备与生化仪相比有着灵敏度高、检测范围宽、准确度高等优点, 随着仪器及配套试剂的逐步国产化, 免疫与生化检测的成本差异将逐步缩小, 免疫检测设备必将在中小型医院逐渐普及, 这将带来巨大的市场空间。假如产品成熟后年销售量 200 台左右, 每年试剂和仪器增加的收入就会有 1 亿以上, 且装机设备会每年固定的试剂、耗材采购将为公司带来巨大的利润回报。

结论

利德曼公司自主研发的 CI1000 全自动化学发光免疫分析仪及其配套试剂的成功上市销售, 极大丰富了公司的产品线优势, 并能扩大公司的规模, 提升公司的整体实力, 提高公司在整个领域内的竞争优势, 将为公司提供新的利润增长点, 成为公司另一个产业支柱。同时也极大地推动了我国化学发光免疫分析仪项目相关产品的供应能力, 推动行业进一步发展, 提升行业产品质量和市场竞争能力。利德曼将响应国家产业政策的号召, 持续加大对研发的投入、秉承着质量是企业的生命线的理念, 生产出质量可靠、市场信赖的免疫分析设备及配套试剂, 保持在体外诊断领域的领先地位, 助力利德曼发光免疫诊断技术在中国市场的普及和推广, 降低中国医院免疫检测成本。■

化学发光检测系统间偏差的分析

文 | 陈立杰



目前我国市场上销售的化学发光检测产品绝大部分是封闭式的。分析仪、试剂盒、校准品、质控品和通用试剂等组合成一个检测系统才能完成对样本的检测。常见和知名的检测系统举例如下：

1. 罗氏 (ROCHE)：链霉亲和素包被磁微粒间接包被，电化学发光检测系统；
2. 雅培 (ABBOTT ARCHITECT)：抗体直接包被磁微粒为主，吖啶酯直接化学发光检测系统；
3. 贝克曼 (BECKMAN)：抗体直接包被磁微粒为主，

碱性磷酸酶催化酶促发光检测系统；

4. 西门子 (收购拜耳系统)：抗体直接包被磁微粒为主，吖啶酯直接化学发光检测系统；
5. 西门子 (收购德普系统)：抗体直接包被有机微粒，碱性磷酸酶催化酶促发光检测系统。

这些检测系统是目前国内市场占有率较高，质量、服务等均较好的进口化学发光检测系统供应商。

同时，国产的免疫检测系统供应商也逐渐出现，与进口厂家构成一定竞争。

一、化学发光检测系统间检测结果偏差的表现

对同一个目标物质，不同检测系统间产品存在诸多的差异，在此称之为“检测结果偏差”。

当然，各种检测方法中都或多或少的存在差异。例如，生化检测试剂，血球检测试剂等，不同厂家产品间也都有有一定差异，但是在化学发光为代表的免疫检测试剂中特别突出。这种差异表现在方方面面，例如：

1. 表现在：不同系统检测同一外部质控品测值有差异

举例参见下图：不同系统检测 SERO 质控品 (SERO 公司生产的外部质控品，批号：0911670)。

例 1：游离 T3

雅培 ARCHITECT 系统检测平均值为 10.5pmol/L；
罗氏 E170 检测平均值为 13.0pmol/L；

例 2：游离 T3

罗氏 E170 检测平均值为 13.0pmol/L；
罗氏 E411 检测平均值为 11.9pmol/L；

2. 表现在：不同系统检测正常值范围有差异

详见表 1。

表 1. T3, FT3 项目不同系统正常值范围

项目	检测系统正常值 (参考值) 范围	
	T3	FT3
罗氏	0.8-2.0ng/mL	1.8-4.6pg/mL
雅培	0.58-1.59 ng/mL	1.71-3.71pg/mL
西门子 (IMMULITE)	0.84-1.72 ng/mL	1.8-4.2 pg/mL

注：上述结果来源于相应系统试剂盒说明书

3. 表现在：检测室内质评样本差异

各系统检测临检中心室内质评样本检测结果存在明显的差异 (结果未显示)。

4. 表现在：对实际样本检测结果存在差异

不同系统检测相同样本存在明显差异 (结果未显示)。

二、不同系统间检测偏差产生的原因分析

与任何检测方法相同，这种偏差都由两部分构成，即系统误差和随机 (偶然) 误差。

1. 系统误差原因分析：

(1)、不同厂家试剂所用的抗体、抗原等重要原料不同。

目前市售的发光试剂产品从方法学上都采用免疫检测原理，即抗原抗体反应。不同的抗体对样本中待测抗原的识

别能力或抗干扰能力有一定差异。这种差异是造成系统误差的最重要原因。化学发光检测的待测物是一些生物活性分子，很多具有多态性，也就是说待测物不是一个均一物质。例如，肌钙蛋白 I (c-TNI)，存在甲基化、糖基化、磷酸化、单体、二聚体、三聚体等形式，不同的抗体对这些多态性的物质的识别能力差异非常大，有些识别甲基化强，有些则不能识别甲基化等。表现在检测结果上，也就较大。

需要指出的是，免疫试剂的质量提高，往往是通过选用了对待测物识别能力或抗干扰能力更强的抗体来实现的。过去测不到或测不全，升级后能测到或测的更全了，自然和以往的检测结果有差异。这种差异是质量提升的表现。因此不能单用检测偏差来判定某新检测方法的质量不佳，而是应该深入分析。

(2)、不同系统间溯源上有差异。

目前市售的发光试剂产品，均需要先检测已知浓度的校准品 (2 点或多点)，获得或校准定标曲线后，将样本检测的发光信号带入曲线才能获得样本的检测浓度。

校准品的生产工艺是，将不同浓度的抗原以某种溶液稀释，然后通过某种方式确定校准品的浓度。最常见的方法是溯源到标准物质。但是目前阶段，溯源的方法和过程是非常不统一的，表现在：

- A、标准物质不统一：有些溯源到国际标准物质，有些溯源到纯物质，有些溯源到内部参考物质，详见表 2。
- B、根本没有溯源物质：没有溯源物质的情况下，厂家只能各自制定标准
- C、没有标准的溯源方法，各厂家溯源方法各不相同。

表 2. FT3, T3, TSH 不同系统溯源物质

检测系统	项目和溯源方法		
	FT3	T3	TSH
罗氏	均衡透析 (Equilibrium dialysis)	内部参考物质	WHO 2 rd IRP 80/558
雅培	称重 (Gravimetry)	内部参考物质	WHO 2rd IRP 80/558
贝克曼	内部标准物质 (Internal standard)	内部参考物质	WHO 2 rd IRP 80/558
西门子 (ADVIA Centaur)	USP 标物	USP 标物	WHO 3rd IRP 81/565

(3)、不同系统间定标方式的差异

目前常见的定标方式是 6 点定标和 2 点校正。如：

罗氏：2 点定标；

雅培：2 点定标；

贝克曼：6 点定标。

在科学性上 6 点定标各校准点浓度范围涉及检测范围

的所有区段，更能代表真实的情况，在整个检测范围内的检测准确度更高。2点定标，2个校准点更多的强调正常值范围区段的准确性，对于曲线首位两端的准确性往往不如6点定标。这也在一定程度上造成系统误差。

2、偶然（随机）误差分析：

偶然（随机）误差大多由试剂质量不佳、仪器性能不佳、操作不当、环境因素、样本因素等造成。

- 1) 企业参考品（母校准品）赋值浓度不准确：由于企业参考品（母校准品）赋值方法不合理，赋值过程有误，储存不善或其他原因造成变质等，这些都会导致新批号校准品赋值的准确性，进而造成样本测值的变化；
- 2) 校准品赋值浓度不准确：企业参考品正常，但是在校准品生产过程中由于某些原因造成校准品赋值不准确；
- 3) 抗体等原料批间差过大，或生产未按工艺操作进行，造成成品试剂抗干扰能力变化或抗原识别能力变化，进而造成样本检测结果的变化；
- 4) 试剂生产后在工厂或用户处不合理的储存或运输造成一定程度的变质；
- 5) 用户没有按照规定要求合理的使用试剂或仪器，常见错误有：
 - 超过规定定标周期不定标，
 - 更换新批号试剂不定标，
 - 超过开瓶有效期继续使用试剂，
 - 样本采集或储存出现问题，
 - 不按照规定要求维护保养仪器。

三、对不同系统检测偏差的认识

1、针对系统误差

在目前世界技术水平条件下，不同检测系统间“系统误差”是必然存在的，不可能根本消除，不同检测系统间必然不同程度的存在系统偏差。这种差异不单在进口厂家和国产厂家检测系统间存在，在不同厂家不同检测系统间存在，在同一厂家不同检测系统间也存在。

用户在新检测系统正式使用前，建立自己的正常值范围是非常有必要的。至少也要用该生产商提供的正常值范围，不能借用其他检测系统的正常值。

在建立某检测系统自己的正常值范围的情况下，即便存在系统偏差，检测结果仍然对疾病的诊断和疗效监测上有重要意义。

不同检测系统间检测结果必须结合各自的正常值范围分析，否则会得到相异的结果。

2、针对偶然（随机）误差

偶然（随机）误差无论生产厂家，还是用户都是应该努力减小或消除的。应该做好以下环节：

- 1) 加强参考实验室建设，确保母校准品的赋值合理，储存和使用正确。这是缩小试剂批间差的根本性举措或方式，也是试剂质量的根本保证之一；
- 2) 确保校准品生产过程中赋值操作正确，确保企业校准品的值准确传递给每一批新生产的校准品；
- 3) 加强重要原材料供应商的管理，不轻率更换供应商，加强原料的检验，确保试剂生产中的原料都是合格的；
- 4) 加强生产管理和工艺控制，减小试剂的变化；
- 5) 规范仓储管理，将试剂在储存和运输中的不利影响降低到最小；
- 6) 加强试剂的跟踪工作，确保在试剂出现问题能及时发现问题不流入市场；
- 7) 加强仪器的生产工艺控制和检验，尽量减小台间差；
- 8) 加强客服工程师的培训，首先使公司的客服工程师知道正确的仪器和试剂使用方法，进而影响客户，使客户形成正确的试剂和仪器使用方法，减小或消除不当使用造成的问题。■



如何正确判断反应曲线

通过查看反应曲线和反应数据，能给用户还原一个完整的反应过程，这对用户发现和解决问题提供了一个很好的线索，大多数与结果有关的故障，都可以在反应曲线上找到原因。

以在贝克曼库尔特 AU680 仪器上，使用北京利德曼生化股份有限公司 ALP 测定试剂盒进行血清中 ALP 测定为例：

1.1 反应曲线的纵坐标为原始吸光度 (OD 值)：大部分项目设置的都是双波长，蓝色曲线为主波长的反应曲线，绿色曲线为副波长的反应曲线，主、副波长吸光度之差为反应的吸光度，一般用黑线表示；纵坐标的间隔是不固定的。

1.2 反应曲线的横坐标是测量周期：AU680 设计的是 18 秒一个读点，10min 总共 27 读点。

1.3 AU680 把双试剂反应分为 5 个部分，如图 1 所示：

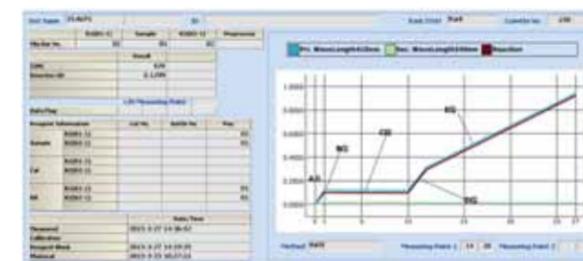


图 1 ALP 反应曲线

A 点：0 点，加入试剂 1 (R1)

在 A 点加入试剂 1，这一点的吸光度实际为试剂 1 的试剂空白的吸光度。对于不同厂家的试剂，A 点的吸光度是不一样的，应该经常把该点的 OD 值与做试剂空白时 0 点的 OD 值进行比较，如相差较大，可考虑试剂失效；如相差不大，可排除试剂失效的原因，重新做该项目的试剂空白。

B 段：0 点到 1 点之间，加入标本 (S) 且搅拌

加入标本：在加入标本后，由于标本本身是有颜色的，必然导致吸光度的变化。标本自身颜色深浅不一，吸光度的变化也不尽相同。

C 段：1 点到 10 点之间，为 R1+S 的孵育时间

试剂 1 和标本孵育时间：此段时间，试剂 1 和标本在 37℃ 的恒温环境下进行孵育，吸光度会有一些细小的变化但基本上呈一条平稳的直线。如果呈不规则变化，如波浪样或尖峰样突起，可能是标本或试剂中含有气泡、搅拌棒打杯等原因引起的。

D 段：10 到 11 点之间，加入试剂 2 (R2) 且搅拌

加入试剂 2：由于利德曼的大部分反应底物或抗体都是在试剂 2 中，加入试剂 2 后，吸光度会有很大的变化。如 ALP 试剂 2 中的对硝基苯磷酸二钠是试剂的反应底物，本身是无色的，但是其在碱性磷酸酶作用下，生成淡黄色对硝基苯酚，后者在 405nm 处有特异吸收峰，通过测量在 405nm 处吸光度的变化速率来计算标本中 ALP 的活性。而如果自 10 点以后吸光度没有明显的变化，可以考虑试剂 2 由于某种原因没有加进反应系统中或试剂 2 失效。

E 段：11 点直至反应结束。单试剂只是少了 D、E 两步。

11 点直至反应结束这时的反应曲线变化取决于当前测试所采取的方法。终点法、固定法、速率法都有各自的特点，特别要注意的是说明书中对反应方向的描述，如果出现与预期方法学和反应方向不匹配的反应曲线，可以考虑试剂是否失效、试剂摆放错误、对试剂说明书的解读错误等。要理解反应曲线，首先应该要知道生化分析仪的反应过程及反应曲线的设置。■

底物耗尽解析

底物耗尽：在化学反应中被酶催化的反应物质在反应过程中消耗殆尽的现象。

试剂盒应用过程中的底物耗尽：在测定酶活性的速率法检测项目中，在测定范围内出现酶催化反应停止的现象。

为什么会出现底物耗尽？

当人体心脏、肝脏等器官出现严重损伤时，ALT、AST 等酶的大量释放使血液中的浓度极度升高，有时会超过正常范围的几百倍甚至几千倍，此时就容易出现在反应过程中所添加的底物不能满足参与反应的酶对底物的需求量，从而出现底物被耗尽的现象。

导致底物耗尽的原因

- A1. 酶类活性过高
- A2. 测定时间选取不当
- A3. 试剂中底物量加入不足
- A4. 试剂失效

底物耗尽的异常反应曲线与相应的解决方案

Q1. 我们以吸光度上升反应的 AMY 为例，当血清酶活性过高，超过线性范围时导致底物耗尽，从而使反应曲线转换点明显改变（如图 1），可以通过样本稀释重测的方式得到准确结果、正确曲线（如图 2）。

Q2. 修改最佳读点，对于市场上某些仪器可以设置弹性读点进而减少复查次数和节省试剂。

弹性读点：针对速率法（酶促反应的项目），当参数中设定的用于计算的读点处发生底物耗尽现象，无法计算出酶活性时，仪器将自动用所设置的弹性读点计算酶活性值。

Q3.1. 改进配方增加更多的反应底物

- 2. 增加试剂体积、减少样本体积

修改样本试剂比例会导致以下情况出现。■

- 1、加大样本量会导致…… ➔ 1、线性变窄，灵敏度增加
- 2、减少样本量会导致…… ➔ 2、线性变宽，灵敏度降低
- 3、加大试剂量会导致…… ➔ 3、线性变宽，灵敏度降低
- 4、减少试剂量会导致…… ➔ 4、线性变窄，灵敏度增加

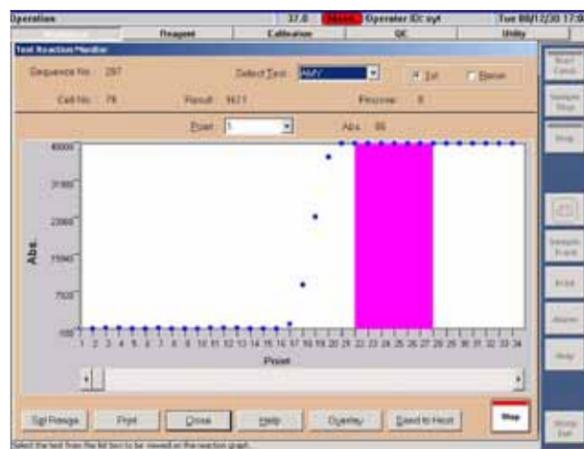


图 1

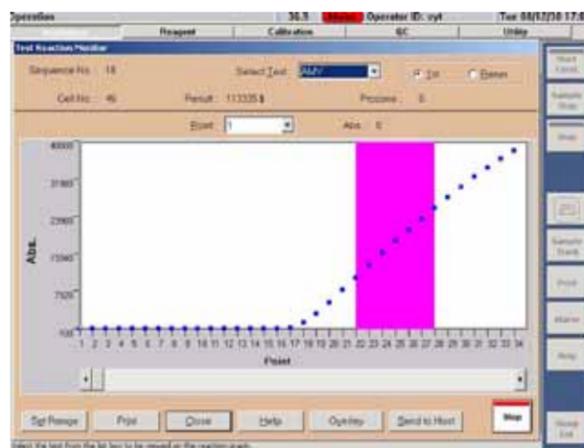


图 2

IVD 抽验工作方案发布

关于印发《体外诊断试剂抽验工作方案》的通知

食药监械监便函（2015）37号

各省、自治区、直辖市食品药品监督管理局：

为全面了解体外诊断试剂质量安全状况，切实加强相关产品监管，保障产品质量安全，根据《食品药品监管总局办公厅关于印发体外诊断试剂质量评估和综合治理工作方案的通知》（食药监办械监〔2015〕55号）要求，我司组织制定了《体外诊断试剂抽验工作方案》。现印发给你们，请认真组织实施。

食品药品监管总局器械监管司
2015年4月8日

一、抽验方式和品种

本次抽验工作包括监督抽验和风险监测，共涉及 16 种体外诊断试剂产品和 2 种原材料（见附件）。

（一）监督抽验

1. 对丙氨酸氨基转移酶测定试剂等 10 种产品（附件中 1—10）同时开展国家级监督抽验（以下简称国抽）和省级监督抽验（以下简称省抽）。其中，总局选取上述品种的部分生产企业和进口产品国内代理商开展国抽，各省对本行政区域内上述各品种的其他生产企业开展省抽。
2. 对总蛋白测定试剂等 6 种产品（附件中 11—16）开展省抽。各省对本行政区域内上述品种生产企业开展监督抽验。

（二）风险监测

对体外诊断试剂生产环节、使用环节以及国内外同类产品 and 近效期产品开展质量风险监测。

1. 生产环节质量风险监测：对部分省（市）体外诊断试剂生产用水和还原型辅酶 I 两种原材料（附件中 17—18）进行风险监测。其中，北京市局在本行政区域内

体外诊断试剂生产企业抽取生产用纯化水和还原型辅酶 I 各 20 批次，浙江省局在本行政区域内体外诊断试剂生产企业抽取生产用纯化水 20 批次。北京市医疗器械检验所和浙江省医疗器械检验院承担样品的检验工作。抽样同时，上述两省（市）局还应开展相关调研工作。

2. 使用环节质量风险监测：对部分省（市）的总蛋白测定试剂等 6 种产品（附件中 11—16）在使用环节的质量进行风险监测。其中，天津、河北、黑龙江、辽宁、江西、福建、云南、重庆、广西、海南等省（区、市）局负责上述产品在使用环节的抽样工作。
3. 国内外同类产品风险监测：对丙氨酸氨基转移酶测定试剂等 5 种产品（附件中 1—5）的国内外同类产品进行对比研究。此项风险监测产品已在国抽中完成抽样，无需另外抽样。
4. 近效期产品质量风险监测：对丙氨酸氨基转移酶测定试剂等 5 种产品（附件中 1—5）的效期内和近效期产品质量状况进行对比研究。其中，效期内产品已在国抽中完成抽样，近效期产品应与其同时抽取。

二、时间安排

- （一）6 月 30 日前，抽样单位应当完成国抽抽样、样品寄送、抽样信息录入系统和抽样工作总结报送等工作。
- （二）8 月 31 日前，承检单位应当完成国抽检验、检验报告寄送、风险监测检验、检验结果录入系统和检验工作总结报送等工作。
- （三）9 月 30 日前，各相关省（区、市）食品药品监管部门应当完成检验报告送达工作。
- （四）10 月 31 日前，承检单位应当完成复验、数据上报和质量评估报告撰写等工作。
- （五）11 月中旬，完成抽验数据汇总，发布质量公告。

抽验产品汇总表

序号	产品	工作内容	批次	抽样环节	牵头单位
1	丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定试剂 (丙氨酸底物法)	国家监督抽验 省级监督抽验 风险监测 (国内外同类产品比较、近效期质量分析)	(1) 国家监督抽验 36 批次 (包括进口产品 16 批次, 指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 覆盖辖区内生产企业) (3) 风险监测 20 批次 (指定的国产近效期产品 20 批次)	生产、经营	北京市医疗器械检验所
2	天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 测定试剂 (天门冬氨酸底物法)	国家监督抽验 省级监督抽验 风险监测 (国内外同类产品比较、近效期质量分析)	(1) 国家监督抽验 36 批次 (包括进口产品 16 批次, 指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 覆盖辖区内生产企业) (3) 风险监测 20 批次 (指定的国产近效期产品 20 批次)	生产、经营	北京市医疗器械检验所
3	肌肝 (CRE) 测定试剂 (肌氨酸氧化酶法)	国家监督抽验 省级监督抽验 风险监测 (国内外同类产品比较、近效期质量分析)	(1) 国家监督抽验 36 批次 (包括进口产品 16 批次, 指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 覆盖辖区内生产企业) (3) 风险监测 20 批次 (指定的国产近效期产品 20 批次)	生产、经营	浙江省医疗器械检验院
4	游离前列腺特异性抗原 (f-PSA) 定量测定试剂 (酶联免疫法、化学发光法)	国家监督抽验 省级监督抽验 风险监测 (国内外同类产品比较、近效期质量分析)	(1) 国家监督抽验 28 批次 (包括进口产品 8 批次, 指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 覆盖辖区内生产企业) (3) 风险监测 20 批次 (指定的国产近效期产品 20 批次)	生产、经营	中国食品药品检定研究院
5	促甲状腺素定量测定试剂 (酶联免疫法、化学发光法)	国家监督抽验 省级监督抽验 风险监测 (国内外同类产品比较、近效期质量分析)	(1) 国家监督抽验 26 批次 (包括进口产品 6 批次, 指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 覆盖辖区内生产企业) (3) 风险监测 20 批次 (指定的国产近效期产品 20 批次)	生产、经营	中国食品药品检定研究院
6	葡萄糖 (Glu) 测定试剂 (己糖激酶法、葡萄糖氧化酶法)	国家监督抽验 省级监督抽验	(1) 国家监督抽验 20 批次 (指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 覆盖辖区内生产企业)	生产	北京市医疗器械检验所
7	心肌肌钙蛋白 I 检测试剂 (胶体金法)	国家监督抽验 省级监督抽验	(1) 国家监督抽验 16 批次 (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 基本覆盖辖区内生产企业)	生产	深圳市医疗器械检测中心
8	巨细胞病毒 IgG 抗体检测试剂 (酶联免疫吸附法、化学发光法)	国家监督抽验 省级监督抽验	(1) 国家监督抽验 20 批次 (指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 基本覆盖辖区内生产企业)	生产	中国食品药品检定研究院
9	风疹病毒 IgG 抗体检测试剂 (酶联免疫吸附法、化学发光法)	国家监督抽验 省级监督抽验	(1) 国家监督抽验 20 批次 (指定的国产产品 20 批次) (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 基本覆盖辖区内生产企业)	生产	中国食品药品检定研究院
10	淋球菌 (NG) 核酸检测试剂 (荧光 PCR 法)	国家监督抽验 省级监督抽验	(1) 国家监督抽验 13 批次 (2) 省级监督抽验 (与国抽相结合, 基本覆盖辖区内生产企业)	生产	北京市医疗器械检验所
11	总蛋白 (TP) 测定试剂 (双缩脲法)	省级监督抽验 风险监测 (使用环节质量评估)	(1) 省级监督抽验 (每省辖区内生产企业全覆盖, 有生产企业的省份经营环节再抽取 2 批次) (2) 风险监测 40 批次 (选择生产企业数量少的 10 省份, 每省三级医院 1 批次, 二级医院 2 批次, 体检中心 1 批次)	生产、经营、使用	江苏省医疗器械检验所
12	尿素 (BUN) 测定试剂 (尿素酶法)	省级监督抽验 风险监测 (使用环节质量评估)	(1) 省级监督抽验 (每省辖区内生产企业全覆盖, 有生产企业的省份经营环节再抽取 2 批次) (2) 风险监测 40 批次 (选择生产企业数量少的 10 省份, 每省三级医院 1 批次, 二级医院 2 批次, 体检中心 1 批次)	生产、经营、使用	吉林省医疗器械检验所
13	碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂 (NPP 底物-AMP 缓冲液法、NPP 底物-DEA 缓冲液法)	省级监督抽验 风险监测 (使用环节质量评估)	(1) 省级监督抽验 (每省辖区内生产企业全覆盖, 有生产企业的省份经营环节再抽取 2 批次) (2) 风险监测 40 批次 (选择生产企业数量少的 10 省份, 每省三级医院 1 批次, 二级医院 2 批次, 体检中心 1 批次)	生产、经营、使用	广东省医疗器械质量监督检验所
14	白蛋白 (ALB) 测定试剂 (溴酚绿法)	省级监督抽验 风险监测 (使用环节质量评估)	(1) 省级监督抽验 (每省辖区内生产企业全覆盖, 有生产企业的省份经营环节再抽取 2 批次) (2) 风险监测 40 批次 (选择生产企业数量少的 10 省份, 每省三级医院 1 批次, 二级医院 2 批次, 体检中心 1 批次)	生产、经营、使用	山东省医疗器械产品质量检验中心
15	载脂蛋白 A1 测定试剂 (免疫比浊法)	省级监督抽验 风险监测 (使用环节质量评估)	(1) 省级监督抽验 (每省辖区内生产企业全覆盖, 有生产企业的省份经营环节再抽取 2 批次) (2) 风险监测 40 批次 (选择生产企业数量少的 10 省份, 每省三级医院 1 批次, 二级医院 2 批次, 体检中心 1 批次)	生产、经营、使用	辽宁省医疗器械检验检测院
16	人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 检测试纸 (胶体金法)	省级监督抽验 风险监测 (使用环节质量评估)	(1) 省级监督抽验 (每省辖区内生产企业全覆盖, 有生产企业的省份经营环节再抽取 2 批次) (2) 风险监测 40 批次 (选择生产企业数量少的 10 省份, 每省三级医院 1 批次, 二级医院 2 批次, 妇产医院 1 批次)	生产、经营、使用	黑龙江省食品药品检验检测所
17	体外诊断试剂生产用水	风险监测 (生产环节质量评估)	40 批次	生产	浙江省医疗器械检验院
18	还原型辅酶 I (HADH)	风险监测 (生产环节质量评估)	20 批次	生产	北京市医疗器械检验所

注: 省级监督抽验的承检机构由各省(区、市)食品药品监督管理部门指定具备相应资质能力的检验机构承担。

《医疗器械监督管理条例》带来的行业影响分析

文 | 孙茜

2014年3月31日,国家食药监总局正式发布新版的《医疗器械监督管理条例》,并于6月1日正式实施,这部14年来首次大修的法规,涉及8章80条,全面覆盖医疗器械研发、生产、流通、使用等环节,这一重要法规给医疗器械行业带来了一系列的影响。也使这一细分行业在这一年中成为众多领域关注的焦点。

自80年代开始,我国医疗器械的监督管理已经开展,但真正有系统地对医疗器械实行监管则是自1998年第一轮药品监督管理体制改革形成。相应的其他配套法规更是自2000年4月1日国务院出台的《医疗器械监督管理条例》(以下简称《条例》),才基本形成对医疗器械生产、经营、使用进行全方位监管的法律体系,使医疗器械产业在政策的保障下得到了高速发展。但是,经过十余年的摸索,目前我国医疗器械法制化进程还处于起步阶段,2014年之前的监管法律体系也反应出了很多问题,在很多方面,难以适合目前行业发展的速度和方式。

相比于药品及其他行业,我国医疗器械产业发展迅速,自2010年以来,每年的增幅达15%以上,在技术层面与国际接轨的程度也非常高,但同时医疗器械行业的生产、销售比例却相对较小,与目前极大的市场空间及需求形成矛盾,加之医疗器械行业分支众多,涉及的技术较为复杂,想要从法规层面进行医疗器械生产、经营、使用进行全方位监管,是十分困难的。

新的法规对之前的流程、监管等矛盾问题较突出的部分进行了修订,在很多重要的方面都进行了重新定义。

“先产品注册、后生产许可”是本次法规修订的一大关注点,此项修改降低了医疗器械注册、生产的门槛,希望能够激发企业、机构、个人的参与积极性,对于小微企业、科研机构等进入这一行业有着重大的推动作用。使得知识产权的成果转换加快,能够提升行业的技术含量和新技术注入的速度,增加创新项目,加速产品更新换代。

提升产品按风险级别管理的意识,新版的《医疗器械监督管理条例》中通篇将医疗器械产品按照风险级别进行管理。从注册,生产,监管各方面更精细化管理,并且着力强化医疗器械上市后监管。注重建立完善立体风险防控体系,开展整个医疗器械行业的“五整治”以及“质量万里行”,同时开展体外诊断试剂产品质量评估和综合治理,建立长效机制,制定生产流通领域关键环节有针对性的监管措施,加大飞行检查力度。

新版法规增加了不良事件处理和召回,体现出了监管机构对于上市后监管的重视和决心。不仅对于医疗器械的生产、经营单位的活动进行了更加细致的规范,明确责任、处罚,同时要求各医疗机构据此成立不良事件监测站,患者的安全得到更多的保障。新增了在用医疗器械监管的专项要求;新增了医疗器械不良事件监测、追溯、召回等制度;加大了对违法违规行为的惩处力度等。

注册收费是在新版法规中增加的部分,虽然只在条例最后第七十七条有简短的一句话,“医疗器械产品注册可以收取费用。具体收费项目、标准分别由国务院财政、价格主管部门按照国家有关规定制定。”却已经在业内引起很大争议。目前收费标准于5月27日由国家药监局公布,即日执行。一方面收费能否对遏制低端产品无序注册起到作用,另一方面收费能否真正解决审批资源和需求的矛盾,这些都有待商榷。希望在此问题上,既能通过收费达到促进行业有序前行,又不会增加企业更大的负担。

针对2014年下半年密集出台的各项配套法规,以及2015年即将陆续出台的其他规章制度,业界的消化和适应都需要一个过程,国家药监局在此期间,也一直密切关注各界对于新版法规的反馈,以便在未出台的法规中予以调整。所以,2015年可以说是更为关键的一年,企业能否在行业转变的过程中顺利过渡,积极保持对于各项法规的关注是至关重要的一点。

国务院出台城市公立医院改革试点意见

今天，国务院办公厅印发了《关于城市公立医院综合改革试点的指导意见》，要求破除公立医院逐利机制，建立起维护公益性、调动积极性、保障可持续的运行新机制；构建起布局合理、分工协作的医疗服务体系和分级诊疗就医格局，有效缓解群众看病难、看病贵问题。

《意见》明确了城市公立医院改革的三条主要路径。建立现代医院管理制度、建立公立医院科学补偿机制、构建协同发展的服务体系成为驱动城市公立医院改革的“三驾马车”。下面，就用一张图将这三条路径重点摘要展现。

附文件全文

国务院办公厅关于城市公立医院综合改革试点的指导意见

国办发〔2015〕38号

各省、自治区、直辖市人民政府，国务院各部委、各直属机构：

城市公立医院综合改革是深化医药卫生体制改革的一项重要任务。2010年国家联系试点城市公立医院改革启动以来，各试点城市积极探索，改革取得明显进展，积累了宝贵经验，奠定了拓展深化改革试点的基础。但是公立医院改革是一项长期艰巨复杂的系统工程，当前还存在一些比较突出的矛盾和问题，公立医院逐利机制有待破除，外部治理和内部管理水平有待提升，符合行业特点的人事薪酬制度有待健全，结构布局有待优化，合理的就医秩序还未形成，人民群众就医负担依然较重等，迫切需要通过体制机制改革逐步加以解决。根据党的十八大、十八届二中、三中、四中全会精神和《中共中央国务院关于深化医药卫生体制改革的意见》、《国务院关于印发“十二五”期间深化医药卫生体制改革规划暨实施方案的通知》（国发〔2012〕11号）要求，为加强对城市公立医院（地级市辖区及以上城市公立医院）综合改革试点的指导，经国务院同意，现提出如下意见。

一、总体要求

（一）**指导思想**。深入贯彻落实党的十八大和十八届二中、三中、四中全会精神，按照党中央、国务院决策部署，着力解决群众看病就医问题，把深化医改作为保障和改善民生的重要举措，将公平可及、群众受益作为改革出发点和立足点，加快推进城市公立医院改革。充分发挥公立医院公益性性质和主体作用，切实落实政府办医责任，着力推进管理体制、补偿机制、价格机制、人事编制、收入分配、医疗监管等体制机制改革。统筹优化医疗资源布局、构建合理就医秩序、推动社会办医、加强人才培养等各项工作，为持续深化公立医院改革形成可复制、可推广的实践经验。

（二）**基本原则**。**坚持改革联动**。推进医疗、医保、医药联动，促进区域内公立医疗机构同步改革，强化公立医院与基层医疗卫生机构分工协作，与社会办医协调发展，营造良好的公立医院改革环境，增强改革的系统性、整体性和协同性。

坚持分类指导。明确城市公立医院功能定位，充分发挥其在基本医疗服务提供、急危重症和疑难病症诊疗等方面的骨干作用。从实际出发，针对不同地区、不同层级、不同类型的公立医院，在医保支付、价格调整、

绩效考核等方面实行差别化的改革政策。

坚持探索创新。在中央确定的改革方向和原则下，鼓励地方发扬首创精神，大胆探索、锐意创新，突破政策障碍和利益藩篱，建立符合实际的体制机制。

（三）**基本目标**。破除公立医院逐利机制，落实政府的领导责任、保障责任、管理责任、监督责任，充分发挥市场机制作用，建立起维护公益性、调动积极性、保障可持续的运行新机制；构建起布局合理、分工协作的医疗服务体系和分级诊疗就医格局，有效缓解群众看病难、看病贵问题。2015年进一步扩大城市公立医院综合改革试点。到2017年，城市公立医院综合改革试点全面推开，现代医院管理制度初步建立，医疗服务体系能力明显提升，就医秩序得到改善，城市三级医院普通门诊就诊人次占医疗卫生机构总诊疗人次的比重明显降低；医药费用不合理增长得到有效控制，卫生总费用增幅与本地区生产总值的增幅相协调；群众满意度明显提升，就医费用负担明显减轻，总体上个人卫生支出占卫生总费用的比例降低到30%以下。

（四）**基本路径**。建立现代医院管理制度，加快政府职能转变，推进管办分开，完善法人治理结构和治理机制，合理界定政府、公立医院、社会、患者的责权利关系。建立公立医院科学补偿机制，以破除以药补医机制为关键环节，通过降低药品耗材费用、取消药品加成、深化医保支付方式改革、规范药品使用和医疗行为等措施，留出空间，同步理顺公立医院医疗服务价格，建立符合医疗行业特点的薪酬制度。构建协同发展的服务体系，以基层服务能力建设为基础，以分工协作机制为支撑，综合运用法律、社保、行政和市场手段，优化资源配置，引导合理就医。

将管理体制、运行机制、服务价格调整、医保支付、人事管理、收入分配等改革作为重点任务，国家、省级相关部门要加强指导，给予政策支持，并将相关权限下放给试点城市。

二、改革公立医院管理体制

（五）**建立高效的政府办医体制**。实行政事分开，合理界定政府作为出资人的举办监督职责和公立医院作为事业单位的自主运营管理权限。积极探索公立医院管办分开的多种有效实现形式，明确政府及相关部门的管理权力和职责，构建决策、执行、监督相互分工、相互制衡的权力运行机制。建立协调、统一、高效的办医体制，各试点城市可组建由政府负责同志牵头，政府有关部门、部分人大代表和政协委员，以及其他利益相关方组成的管理委员会，履行政府办医职能，负责公立医院的发展规划、章程制定、重大项目实施、财政投入、运行监管、绩效考核等，并明确办事机构，承担管理委员会日常工作。各级行政主管部门要创新管理方式，从直接管理公立医院转为行业管理，强化政策法规、行业规划、标准规范的制定和监督指导职责。卫生计生、教育等部门要积极研究探索高校附属医院管理体制

改革。

（六）**落实公立医院自主权**。完善公立医院法人治理结构和治理机制，落实公立医院人事管理、内部分配、运营管理等自主权。采取有效形式建立公立医院内部决策和制约机制，实行重大决策、重要干部任免、重大项目实施、大额资金使用集体讨论并按规定程序执行，落实院务公开，发挥职工代表大会职能，强化民主管理。健全院长选拔任用制度，鼓励实行院长聘任制，突出专业化管理能力，推进职业化建设。实行院长任期目标责任考核和问责制。逐步取消公立医院的行政级别，各级卫生计生行政部门负责人一律不得兼任公立医院领导职务。对于资产多元化、实行托管的公立医院以及医疗联合体等可在医院层面成立理事会。

（七）**建立以公益性为导向的考核评价机制**。卫生计生行政部门或专门的公立医院管理机构制定绩效评价指标体系，突出功能定位、职责履行、费用控制、运行绩效、财务管理、成本控制和社会满意度等考核指标，定期组织公立医院绩效考核以及院长年度和任期目标责任考核，考核结果向社会公开，并与医院财政补助、医保支付、工资总额以及院长薪酬、任免、奖惩等挂钩，建立激励约束机制。

（八）**强化公立医院精细化管理**。加强医院财务会计管理，强化成本核算与控制，落实三级公立医院总会计师制度。推进公立医院后勤服务社会化。加强医疗质量管理与控制，规范临床检查、诊断、治疗、使用药物和植（介）入类医疗器械行为。全面开展便民惠民服务，加强预约和分诊管理，不断优化医疗服务流程，改善患者就医环境和就医体验。深入开展优质护理服务。优化执业环境，尊重医务人员劳动，维护医务人员合法权益。健全调解机制，鼓励医疗机构和医师个人购买医疗责任保险等医疗执业保险，构建和谐医患关系。

（九）**完善多方监管机制**。强化卫生计生行政部门（含中医药管理部门）医疗服务监管职能，统一规划、统一准入、统一监管，建立属地化、全行业管理体制。强化对医院经济运行和财务活动的会计监督，加强审计监督。加强医院信息公开，建立定期公示制度，运用信息系统采集数据，重点公开财务状况、绩效考核、质量安全、价格和医疗费用等信息。二级以上公立医院相关信息每年向社会公布。充分发挥医疗行业协会、学会等社会组织作用，加强行业自律、监督和职业道德建设，引导医疗机构依法经营、严格自律。发挥人大、监察、审计机关以及社会层面的监督作用。探索对公立医院进行第三方专业机构评价，强化社会监督。

三、建立公立医院运行新机制

（十）**破除以药补医机制**。试点城市所有公立医院推进医药分开，积极探索多种有效方式改革以药补医机制，取消药品加成（中药饮片除外）。将公立医院补偿由服务收费、药品加成收入和政府补助三个渠道改为服务收费和政府补助两个渠道。通过调整医疗服务价格、加大政府投入、改革支付方式、降低医院运行成本等，建立科学合理的补偿机制。对医院的药品贮藏、保管、损耗等费用列入医院运行成本予以补偿。采取综合措施切断医院和医务人员与药品间的利益链，完善医药费用管控制度，严格控制医药费用不合理增长。按照总量控制、结构调整的办法，改变公立医院收入结构，提高业务收入中技术劳务性收入的比重，降低药品和卫生材料收入的比重，确保公立医院良性运行和发展。力争到2017年试点城市公立医院药占比（不含中药饮片）总体降到30%左右；百元医疗收入（不含药品收入）中消耗的卫生材料降到20元以下。

（十一）**降低药品和医用耗材费用**。改革药品价格监管方式，规范高值医用耗材的价格行为。减少药品和医用耗材流通环节，规范流通经营和企业自主定价行为。全面落实《国务院办公厅关于完善公立医院药品集中采购工作的指导意见》（国办发〔2015〕7号），允许试点城市以市为单位，按照有利于破除以药补医机制、降低药品虚高价格、预防和遏制腐败行为、推动药品生产流通企业整合重组的原则，在省级药品集中采购平台上自行采购。试点城市成交价格不得高于省级中标价格。如果试点城市成交价格明显低于省级中标价格，省级中标价格应按试点城市成交价格调整。可结合实际鼓励省际跨区域、专科医院等联合采购。高值医用耗材必须通过省级集中采购平台进行阳光采购，网上公开交易。在保证质量的前提下鼓励采购国产高值医用耗材。加强药品质量安全监管，严格市场准入和药品注册审批，保障药品的供应配送和质量安全。采取多种形式推进医药分开，患者可自主选择在医院门诊药房或凭处方到零售药店购药。加强合理用药和处方监管，采取处方负面清单管理、处方点评等形式控制抗菌药物不合理使用，强化激素类药物、抗肿瘤药物、辅助用药的临床使用干预。

（十二）**理顺医疗服务价格**。在保证公立医院良性运行、医保基金可承受、群众整体负担不增加的前提下，试点城市要在2015年制定出台公立医院医疗服务价格改革方案。经科学测算，在降低药品、医用耗材费用和取消药品加成的同时，降低大型医用设备检查治疗价格，合理调整提升体现医务人员技术劳务价值的医疗服务价格，特别是诊疗、手术、护理、床位、中医等服务项目价格。改革价格形成机制，逐步减少按项目定价的医疗服务项目数量，积极探索按病种、按服务单元定价。逐步理顺不同级别医疗机构间和医疗服务项目的比价关系，建立以成本和收入结构变化为基础的价格动态调整机制。公立医院由政府投资购置的大型设备，按扣除折旧后的成本制定检查价格；对符合规划及相关政策规定的贷款或集资购置的大型设备，由政府按扣除折旧后的价格回购，回购有困难的限期降低检查价格。医疗服务价格、医保支付、分级诊疗等政策要相互衔接。加强医药价格监管，

建立价格监测和预警机制，及时防范价格异动。加大对价格垄断和欺诈等违法行为的查处力度。

（十三）**落实政府投入责任**。各级政府要落实符合区域卫生规划的公立医院基本建设和设备购置、重点学科发展、人才培养、符合国家规定的离退休人员费用和政策性亏损补贴等投入，对公立医院承担的公共卫生任务给予专项补助，保障政府指定的紧急救治、救灾、援外、支农、支边和城乡医院对口支援等公共服务经费。落实对中医院（民族医院）、传染病院、精神病院、职业病防治院、妇产医院、儿童医院以及康复医院等专科医院的投入倾斜政策。改革财政补助方式，强化财政补助与公立医院的绩效考核结果挂钩关系。完善政府购买服务机制。

四、强化医保支付和监控作用

（十四）**深化医保支付方式改革**。充分发挥基本医保的基础性作用，强化医保基金收支预算，建立以按病种付费为主，按人头付费、按服务单元付费等复合型付费方式，逐步减少按项目付费。鼓励推行按疾病诊断相关组（DRGs）付费方式。2015年医保支付方式改革要覆盖区域内所有公立医院，并逐步覆盖所有医疗服务。综合考虑医疗服务质量安全、基本医疗需求等因素制定临床路径，加快推进临床路径管理。到2015年底，试点城市实施临床路径管理的病例数要达到公立医院出院病例数的30%，同步扩大按病种付费的病种数和住院患者按病种付费的覆盖面，实行按病种付费的病种不少于100个。加快建立各类医疗保险经办机构 and 定点医疗机构之间公开、平等的谈判协商机制和风险分担机制。充分发挥各类医疗保险对医疗服务行为和费用的调控引导与监督制约作用，有效控制医疗成本，逐步将医保对医疗机构服务监管延伸到对医务人员医疗服务行为的监管。利用商业健康保险公司的专业知识，发挥其第三方购买者的作用，帮助缓解医患信息不对称和医患矛盾问题。

（十五）**逐步提高保障绩效**。逐步提升医保保障水平，逐步缩小政策范围内住院费用支付比例与实际住院费用支付比例间的差距。在规范日间手术和中医非药物诊疗技术的基础上，逐步扩大纳入医保支付的日间手术和医疗机构中药制剂、针灸、治疗性推拿等中医非药物诊疗技术范围，鼓励提供和使用适宜的中医药服务。建立疾病应急救助制度。全面实施城乡居民大病保险。推进商业健康保险发展。加强基本医保、城乡居民大病保险、职工补充医疗保险、医疗救助、商业健康保险等多种保障制度的衔接，进一步减轻群众医药费用负担。

五、建立符合医疗行业特点的人事薪酬制度

（十六）**深化编制人事制度改革**。在地方现有编制总量内，合理核定公立医院编制总量，创新公立医院机构编制管理方式，逐步实行编制备案制，建立动态调整机制。在岗位设置、收入分配、职称评定、管理使用等方面，对编制内外人员待遇统筹考虑，按照国家规定推进养老保险制度改革。实行聘用制度和岗位管理制度，人员由身份管理向岗位管理转变，定编定岗不固定人员，形成能进能出、能上能下的灵活用人机制。落实公立医院用人自主权，对医院紧缺、高层次人才，可按规定由医院采取考察的方式予以招聘，结果公开。

（十七）**合理确定医务人员薪酬水平**。根据医疗行业培养周期长、职业风险高、技术难度大、责任担当重等特点，国家有关部门要加快研究制定符合医疗卫生行业特点的薪酬改革方案。在方案出台前，试点城市可先行探索制定公立医院绩效工资总量核定办法，着力体现医务人员技术劳务价值，合理确定医务人员收入水平，并建立动态调整机制。完善绩效工资制度，公立医院通过科学的绩效考核自主进行收入分配，做到多劳多得、优绩优酬，重点向临床一线、业务骨干、关键岗位以及支援基层和有突出贡献的人员倾斜，合理拉开收入差距。

（十八）**强化医务人员绩效考核**。公立医院负责内部考核与奖惩，突出岗位工作量、服务质量、行为规范、技术能力、医德医风和患者满意度，将考核结果与医务人员岗位聘用、职称晋升、个人薪酬挂钩。完善公立医院用药管理，严格控制高值医用耗材的不合理使用。严禁给医务人员设定创收指标，医务人员个人薪酬不得与医院的药品、耗材、大型医学检查等业务收入挂钩。

六、构建各类医疗机构协同发展的服务体系

(十九) **优化城市公立医院规划布局。**按照《国务院办公厅关于印发全国医疗卫生服务体系规划纲要(2015—2020年)的通知》(国办发〔2015〕14号)要求以及本省(区、市)卫生资源配置标准,并结合服务人口与服务半径、城镇化发展水平和群众医疗需求变化,制定区域卫生规划、人才队伍规划和医疗机构设置规划。国家、省级卫生计生部门及相关部门要加强指导和协调,将区域内各方面、各层次医疗卫生资源纳入规划统筹考虑。要把落实规划情况作为医院建设、财政投入、绩效考核、医保支付、人员配置、床位设置等的依据,增强规划的约束力,定期向社会公示规划执行情况。从严控制公立医院床位规模、建设标准和大型医用设备配备,对超出规模标准的公立医院,要采取综合措施,逐步压缩床位。公立医院优先配置国产医用设备。严禁公立医院举债建设和超标准装修。控制公立医院特需服务规模,提供特需服务的比例不超过全部医疗服务的10%。

(二十) **推进社会力量参与公立医院改革。**按照区域卫生规划和医疗机构设置规划,合理把控公立医院数量、布局 and 结构,鼓励企业、慈善机构、基金会、商业保险机构等社会力量办医,扩大卫生资源总量。鼓励采取迁建、整合、转型等多种途径将部分城市二级医院改造为社区卫生服务机构、专科医院、老年护理和康复等机构。鼓励社会力量以出资新建、参与改制等多种形式投资医疗,优先支持举办非营利性医疗机构。公立医院资源丰富的城市,可选择部分公立医院引入社会资本进行改制试点,加强有形资产和无形资产的评估,防止国有资产流失,要坚持规范有序、监管有力,确保公开公平公正,维护职工合法权益。

(二十一) **强化分工协作机制。**引导各级公立医院与基层医疗卫生机构建立目标明确、权责清晰的分工协作机制,加强公立医院与专业公共卫生机构的沟通与协作。以提升基层医疗卫生服务能力为导向,以业务、技术、管理、资产等为纽带,探索构建包括医疗联合体在内的各种分工协作模式,完善管理运行机制,并引导开展有序竞争。在统一质量控制标准前提下,实行同级医疗机构医学检查检验结果互认。可探索整合和利用现有资源,设置专门的医学影像、病理学诊断和医学检验医疗机构,促进医疗机构之间大型医用设备共享使用。

(二十二) **加强人才队伍培养和提升服务能力。**推进医教研协同发展。2015年,试点城市要实施住院医师规范化培训,原则上所有城市公立医院新进医疗岗位的本科及以上学历临床医师均应接受住院医师规范化培训。积极扩大全科及儿科、精神科等急需紧缺专业的培训规模。推动三级综合医院设立全科医学科。推动建立专科医师规范化培训制度,加强公立医院骨干医生培养和临床重点专科建设。加强继续教育的针对性和有效性,创新教育模式及管理方法,强化职业综合素质教育和业务技术培训。加强公立医院院长职业培训。探索建立以需求为导向,以医德、能力、业绩为重点的人才评价体系。

七、推动建立分级诊疗制度

(二十三) **构建分级诊疗服务模式。**推动医疗卫生工作重心下移,医疗卫生资源下沉。按照国家建立分级诊疗制度的政策要求,在试点城市构建基层首诊、双向转诊、急慢分治、上下联动的分级诊疗模式。落实基层首诊,基层医疗卫生机构提供基本医疗和转诊服务,注重发挥全科医生作用,推进全科医生签约服务。逐步增加城市公立医院通过基层医疗卫生机构和全科医生预约挂号和转诊服务号源,上级医院对经基层和全科医生预约或转诊的患者提供优先接诊、优先检查、优先住院等服务。到2015年底,预约转诊占公立医院门诊就诊量的比例要提高到20%以上,减少三级医院普通门诊就诊人次。完善双向转诊程序,各地要制定常见病种出入院标准和双向转诊标准,实现不同级别和类别医疗机构之间有序转诊,重点畅通患者向下转诊渠道,鼓励上级医院出具治疗方案,在下级医院或基层医疗卫生机构实施治疗。推进急慢分治格局的形成,在医院、基层医疗卫生机构和慢性病长期照护机构之间建立起科学合理的分工协作机制,加强基层医疗卫生机构与公立医院药品采购和使用的衔接。可由三级医院专科医师与基层全科医生、护理人员组成医疗团队,对下转慢性病和康复期患者进行管理和指导。推进和规范医师多点执业,促进优质医疗资源下沉到基层。

(二十四) **完善与分级诊疗相适应的医保政策。**2015年底前,试点城市要结合分级诊疗工作推进情况,明确促进分级诊疗的医保支付政策。对没有按照转诊程序就医的,降低医保支付比例或按规定不予支付。完善不同级别医疗机构医保差异化支付政策。适当拉开不同级别医疗机构的起付线和支付比例差距,对符合规定的转诊住院患者可以连续计算起付线。

八、加快推进医疗卫生信息化建设

(二十五) **加强区域医疗卫生信息平台建设。**构建完善的区域人口健康信息平台,建立动态更新的标准电子化健康档案和电子病历数据库,完善技术标准和安全防护体系,逐步实现居民基本健康信息和公共卫生、医疗服务、医疗保障、药品管理、综合管理等应用系统业务协同,促进医疗卫生、医保和药品管理等系统对接、信息共享,推动建立综合监管、科学决策、精细服务的新模式。2015年底前,实现行政区域内所有二级以上公立医院和80%以上的基层医疗卫生机构与区域平台对接。

(二十六) **推进医疗信息系统建设与应用。**加强医疗卫生机构信息化建设,强化信息技术标准应用和数据安全管理。全面实施健康医疗信息惠民行动计划,方便居民预约诊疗、分时段就诊、共享检验检查结果、诊间付费以及医保费用的即时结算,为药品零售企业通过网上信息系统核实患者提供的医师处方提供便利。依靠大数据支撑,强化对医疗卫生服务的绩效考核和质量监管。加强远程医疗系统建设,强化远程会诊、教育等服务功能,促进优质医疗资源共享。2015年底前,实现与国家药品电子监管系统对接,积极开展药品电子监管码核注核销;各试点城市基本完成所有二级以上医院信息化标准建设,60%的基层医疗卫生机构与上级医院建立远程医疗信息系统。

九、强化组织实施

(二十七) **明确进度安排。**试点地区政府要结合实际,及时出台改革的具体实施方案。明确改革的路线图、时间表,把握好改革重点任务、优先顺序、推进方式,做到科学测算、分类施策、务实操作、务求突破。建立试点地区的国家、省、市公立医院改革联动机制,确保试点区域内所有公立医院均纳入改革范围整体推进。所辖县及县级市要按照国家关于县级公立医院综合改革的政策要求推进改革。综合医改试点省份要将城市公立医院改革作为改革重中之重,加强组织领导、政策指导和督促推进,在体制机制创新方面取得新突破,并统筹推进医疗保障、医疗服务、药品供应、公共卫生、监管体制等综合改革,率先实现医改总体目标。

(二十八) **强化组织保障。**各地区要将公立医院改革作为当地全面深化改革的重要内容,试点城市主要领导负总责,分管领导具体负责,围绕公立医院改革政策,分解工作任务,明确各部门职责,责任到人,确保落实。国家和省级层面也要明确任务分工,卫生计生、财政、发展改革、价格、编制、人力资源社会保障、中医药、教育等相关部门各司其职,进一步解放思想,强化对地方试点的支持和指导,完善配套改革措施,密切配合,综合推进。

(二十九) **加强督导评价。**各省(区、市)要建立督导、考核、评估、问责机制,督促试点城市整体推进改革任务,并将公立医院改革工作纳入试点城市政府绩效考核内容。相关部门要加强对城市公立医院改革试点工作的指导,制定改革效果评价指标体系。探索对试点城市改革效果进行第三方评估。建立试点城市改革推进情况定期通报和退出机制,对改革进展滞后的地区向省级人民政府通报并实行问责,收回有关补助资金。

(三十) **及时总结宣传。**各有关部门要密切跟踪工作进展,及时总结经验,研究解决改革中出现的问题。对于相对成熟的改革经验,要加快推广应用。大力宣传和解读改革的政策措施,加大正面宣传力度,合理引导社会舆论和群众预期,凝聚共识、增强信心,营造改革的良好氛围。做好医务人员宣传动员工作,发掘和宣传先进典型,调动广大医务人员参与改革的积极性、主动性。开展对地方各级政府、相关部门领导干部和公立医院管理者的政策培训,提高政策水平和执行力,确保改革顺利推进。

国务院办公厅

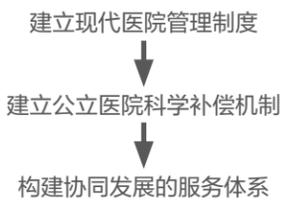
2015年5月6日

《城市公立医院综合改革试点指导意见》要点提纲

近日,国务院办公厅印发了《关于城市公立医院综合改革试点的指导意见》,要求破除公立医院逐利机制,建立起维护公益性、调动积极性、保障可持续发展的运行新机制;构建起布局合理、分工协作的医疗服务体系和分级诊疗就医格局,有效缓解群众看病难、看病贵问题。

《意见》明确了城市公立医院改革的三条主要路径。建立现代医院管理制度、建立公立医院科学补偿机制、构建协同发展的服务体系成为驱动城市公立医院改革的“三驾马车”。下面,就用图示将这三条路径重点摘要展现。

2015年进一步扩大公立医院综合改革试点。到2017年,城市公立医院综合改革试点全面推开,现代医院管理制度初步建立,医疗服务体系能力明显提升,就医秩序得到改善;卫生总费用增幅与本地区生产总值的增幅相协调;个人卫生支出占卫生总费用的比例降低到30%以下。



建立现代医院管理制度

1. 改革公立医院管理体制

政事分开、管办分开

完善公立医院法人治理结构和治理机制

改革考核评价机制

强调精细化管理

加强监管机制

2. 人事薪酬改革

改革编制和人事管理制度

加强医院内部分配和绩效考核机制改革

医疗人员绩效考核严禁与业务收入指标挂钩

建立公立医院科学补偿机制

1. 公立医院运行新机制

破除以药补医

降低药品和医用耗材费用

理顺医疗服务价格 制定符合行业特点的薪酬改革方案

落实政府收入

任务: 2015年试点城市制定出台公立医院医疗服务价格改革方案。力争2017年试点城市公立医院药占比总体降到30%以下,百元医疗收入消耗的卫生材料降到20元以下。

2. 医保支付

改革医保支付方式,加强对医务人员医疗服务行为监管缩小政策报销比与实际补偿比的差距、扩大纳入医保支付的日间手术和部分中医非药物诊疗技术范围

任务: 2015年支付方式改革要覆盖区域内所有公立医院,并逐步覆盖所有医疗服务。到2015年底,试点城市实施临床路径管理的病例数达到30%,实行按病种付费的病种不少于100个。

构建协同发展的服务体系

1. 各类医疗机构协同发展

优化城市公立医院规划布局

鼓励社会力量参与

强化机构之间分工协作

加强人才队伍培养

任务: 2015年,试点城市要实施住院医师规范化培训,临床医师均应接受培训。

2. 分级诊疗

建立“基层首诊、双向转诊、急慢分治、上下联动”分级诊疗模式

医保配套政策及时跟进

任务: 2015年底前,试点城市明确促进分级诊疗的医保支付政策。

2015年底,预约转诊比例要提高到20%以上。

3. 医疗卫生信息化

建立区域医疗卫生信息平台

加强医疗信息系统的建设与应用

任务: 2015年底前,辖区内所有二级以上公立医院和80%以上的基层医疗卫生机构与区域平台对接;实现与国家药品电子监管系统对接;试点城市基本完成二级以上医院信息化标准建设,60%的基层医疗卫生机构与上级医院建立远程医疗信息系统。■

新品速递

——适用于利德曼化学发光检测平台

NSE(神经元特异性烯醇化酶)

神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 是参与糖酵解途径的烯醇化酶中的一种, 存在于神经组织和神经内分泌组织中。NSE 在脑组织细胞的活性最高, 外周神经和神经内分泌组织的活性水平居中, 最低值见于非神经组织、血清和脊髓液。它被发现在与神经内分泌组织起源有关的肿瘤中, 特别是 SCLC 中有过量的 NSE 表达, 导致血清中 NSE 明显升高。

临床意义:

- (1) 小细胞肺癌患者 (SCLC) 血清 NSE 明显增高, 60~81% 小细胞肺癌病例 NSE 浓度升高。尽管 NSE 浓度与转移部位或脑部转移没有相关性, 但是与临床分期如疾病进展有很好的相关性。NSE 的诊断灵敏度达 80%, 特异性达 80% ~ 90%, 而非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者并无明显增高, 故可作为 SCLC 与 NSCLC 的鉴别诊断。血清 NSE 水平与 SCLC 的临床分期呈正相关, 因此, 血清 NSE 检测对 SCLC 的监测病情、疗效评价及预测复发具有重要的临床价值。
- (2) 神经母细胞瘤时, NSE 阳性率可达 96% ~ 100%, 其测定值明显增高, 血清 NSE 水平与病期及预后相关。测定血清 NSE 对该类肿瘤的早期诊断及预后判断具有较高的临床价值。
- (3) 血清 NSE 增高还可见于少数 NSCLC、甲状腺髓样癌、嗜铬细胞瘤、转移性精原细胞瘤、黑色素瘤、胰腺内分泌瘤等。

CA50(肿瘤抗原 CA50)

CA50 是一种唾液酸酯和唾液酸糖蛋白, 正常组织中一般不存在, 当细胞恶变时, 糖基化酶被激活, 造成细胞表面糖基结构改变而成为 CA50 标志物。正常血 <20 μg/L, 许多恶性肿瘤患者血中皆可升高, 如 66.6% 的肺癌、88.2% 的肝癌、68.9% 的胃癌、88.5% 的卵巢或子宫颈癌、94.4% 胰或胆管癌, 其他如直肠癌、膀胱癌等皆有 70% 以上是升高的。

临床意义:

- (1) 胰腺癌、结肠癌、直肠癌、胃癌等血清 CA50 升高, 特别是胰腺癌患者升高最为明显。
- (2) 肝癌、肺癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、乳腺癌等也可见 CA50 升高。
- (3) 溃疡性结肠炎、肝硬化、黑色素瘤、淋巴瘤, 自身免疫性疾病等也有 CA50 升高现象。

SCC(鳞状细胞癌相关抗原)

肿瘤相关抗原 TA-4 的亚型, 是一种糖蛋白。SCC 存在于子宫、子宫颈、肺、头颈等鳞状上皮细胞癌的细胞浆中, 特别在非角化癌的细胞中, 含量更丰富。

临床意义:

- (1) 血清中 SCC 水平升高, 可见于 83% 的宫颈癌、25% ~ 75% 的肺鳞状细胞癌、30% 的 I 期食道癌、89% 的 III 期食道癌。
- (2) 也见于卵巢癌、子宫癌和颈部鳞状上皮细胞癌。
- (3) 临床上常用于监测上述恶性肿瘤的治疗效果、复发、转移或评价预后。■

早期胃癌风险指标——PGI、PGII

背景

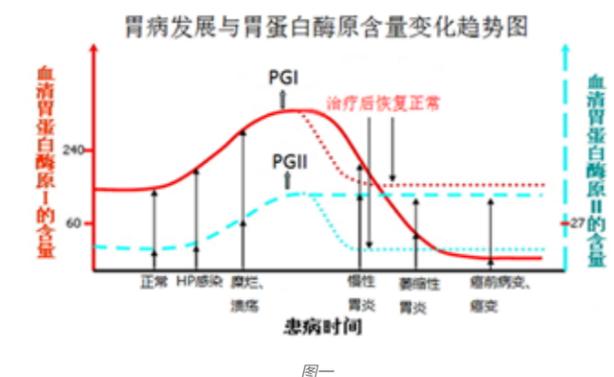
胃癌是全球的第二大癌症死因, 在东亚的发病率居全球之首。我国是胃癌高发区, 2012 年我国新增胃癌及死亡率均占全球总发病及死亡率的 40% 以上。根据《2012 中国肿瘤登记年报》报道, 我国胃癌已成为死亡率前三的恶性肿瘤之一, 仅次于肺癌与肝癌, 是危害人类健康的重大疾病之一。

目前, 日本、韩国等胃癌高发国家已建立胃癌普查机制, 日本在“老年保健法”的指导下开展了“日本胃癌检测计划”, 利用胃蛋白酶原检测, 在大面积人群中普查, 使胃癌的早诊率提高到 90%^[1]。我国也逐渐建立胃癌筛查机制, 鉴于影像学检查在常规筛查中的限制因素, 研究人员近年来发展胃病相关的血清学检查, 如癌胚抗原(CEA)、糖抗原 19-9(CA19-9) 等肿瘤标志物以及胃蛋白酶原检测。

胃病诊断指标: 胃蛋白酶原

胃蛋白酶原 (Pepsinogen, PG) 是胃液中胃蛋白酶的非活性前体, 在免疫原型上分为 PGI 和 PGII。近年来, PG 作为萎缩性胃炎的诊断指标已成为新的研究与应用热点。1994 年, 国际癌症研究机构公布, 幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori, HP) 为人类第一类致癌因子。HP 感染是造成萎缩性胃炎的主要病因之一, 而萎缩性胃炎已被普遍认为是胃癌的癌前病变^[2]。在由 HP 感染——浅表性胃炎——胃黏膜糜烂溃疡——萎缩性胃炎——胃癌的发展过程中, 均伴随着胃蛋白酶原 (PG) 的变化 (如图 1), 联合测定血清胃蛋白酶原 PGI 和 PGII 比值, 是判定正常胃底黏膜、慢性萎缩性胃炎、肠化生及胃癌的可靠无创性试验。研究表明, HP 感染不伴有萎缩性胃炎患者胃癌发病风险高出正常胃黏膜者 4 倍, 而伴有萎缩性胃炎患者则高 15 倍^[3]。对于具有严重的全萎缩性胃炎 (同时具有胃体、胃窦性胃炎, 或严重的弥散性萎缩性胃炎) 患者,

无论是否存在进行性幽门螺旋杆菌感染, 其胃癌发病风险是正常人的 90 倍^[4]。血清 PG 作为萎缩性胃炎的诊断指标, 其灵敏度和特异性很高。



图一

临床应用

一、PG 与 HP 感染:

HP 感染与胃良、恶性疾病的发生密切相关。研究证明, 血清 PG 水平与 HP 感染相关, HP 感染后可刺激主细胞, 通过增加主细胞内钙离子流, cAMP 和磷酸肌醇浓度而刺激 PG 的合成和分泌, 主要是 PGII^[5]。PGII 的升高可以作为进行性 HP 感染的辅助诊断指标和 HP 感染活性的间接指标。尽管 HP 感染与胃癌的发生有着密切的关系, 但目前没有数据表明胃癌的筛查应仅限于 HP 感染阳性患者。研究显示, 60 岁以上胃蛋白酶原减少、HP 抗体阴性的男性每年的胃癌发病率最高 (1.8%)^[6]。血清 PG 与 HP 抗体联合检测作为胃癌筛查的初筛方法 (ABC 法) (如表 1), 已使早期胃癌诊断率提高 78%^[7]。

		HP 抗体检查	
		(-)	(+)
PG	(-)	A	B
	(+)	C	

表 1: ABC 法检测结果

备注:

A 型 健康的胃黏膜, 患胃疾病的概率较小。

B 型 注意患者有胃溃疡、十二指肠溃疡, 少数有胃癌可能性。

C 型 很可能患有萎缩性胃炎、胃癌等疾病, 需接受内镜镜检查。

多发性骨髓瘤实验室结果分析与评价

文 | 刘铁牛 陈要朋 黄丽 钱无暇 黄贵才
解放军第 303 医院检验科 广西南宁 5230021

PG 亦可作为根除 HP 治疗效果评价指标。早在 1998 年国外就有文献报道，血清 PGI/PGII 的百分率变化是判断胃十二指肠溃疡病人 HP 根除疗效的最好方法^[8]。HP 性胃炎经多年后可发展成为萎缩性胃炎，有 60% 的胃癌可归因于原始的 HP 感染，若早期 HP 感染得到控制，可以避免胃癌的发生。

二、PG 与慢性萎缩性胃炎

浅表性胃底腺粘膜胃炎患者血清 PGI,PGII 均升高，但 PGII 的升高率常为 PGI 的三倍，可使 PGI/PGII 比值下降。当轻度到中度胃炎时，出现 PGI 下降，PGII 持续升高，使 PGI/PGII 降低到 2.9 ± 0.4 ，显著低于正常和浅表性胃炎；严重的慢性萎缩性胃炎患者血清 PGI 急剧下降，PGII 维持不变，导致 PGI/PGII 比值更大幅度降低，可达到 0.7 ± 0.3 (Sipponen 1987)。可见，从浅表性胃炎到严重萎缩性胃炎 PGI/PGII 比值越来越低。鉴别性功能分析显示，血清学判断胃底粘膜组织学状态的最佳指标是 PGI/PGII 比值和 PGI 绝对值相结合，它与胃底粘膜状态判断的总灵敏度与阳性预示值为 70%，有胃底腺粘膜“血清学活检”的美称 (Samloff 1982)。慢性萎缩性胃炎被认为是胃癌发生的过渡病变，“慢性萎缩性胃炎——肠化生——不典型增生——新生物”是常见的肠性胃癌发生的四个阶段，测定血清 PGI/PGII 比值是区分不同阶段的可靠指标之一。Gritti (2000) 指出，在一般的胃炎患者中，血清 PGI 处于较高水平，而在萎缩性胃炎中，血清 PGI 总处于低水平，但在此两种情况下，血清 PGII 均为高水平，而在大多数病例情况下，PGI/PGII 比值降低。另外，研究指出动态观察全胃切除术 PGI、PGII 的变化可作为判断胃癌手术后有无复发的临床指标^[9]。因此，PGI 可用于诊断萎缩性胃炎并指示胃癌高危，从而检出可根治的早期胃癌。

三、PG 与胃癌普查

胃癌是很常见的恶性疾病，在我国胃癌的发病率也较高，从组织学类型来看，“肠型”最为常见，它与萎缩性胃炎、肠化生有密切关系，故可以发现胃癌发生的高危者。也有报道显示，随着胃病的发展，血清 PG 水平也在变化^[10]。因此，血清 PG 的测定在胃癌普查中具有重要的临床意义。

检测方法

目前在临床上使用的 PGI、PGII 检测方法主要有：放射免疫分析、酶免疫分析和化学发光免疫分析等，放射免疫分析灵敏度高，但由于有放射性物质，已经逐渐被酶免疫分析和化学发光免疫分析所替代。酶免疫分析成本较低廉，但灵敏度相对较低，检测范围较窄，操作较繁琐。而化学发光免疫分析法虽然灵敏度高，但价格高，造成医疗负担重。北京利德曼生化股份有限公司研制的 PGI、PGII 定量检测试剂，使用胶乳包被的抗体，保证特异性的同时大大提高了检测灵敏度。试剂无论在高浓度样本还是低浓度样本检测中，均表现出良好的精密度。液体双试剂，上机即用，使用方便，规格齐全，适用于市面上绝大多数全自动生化分析仪，适合临床推广。

参考文献

- [1] Miki K,FujishiroM,Kodashima S,Yahagi N.Long-term results of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method among an asymptomatic middle-aged Japanese population.Digestive endoscopy:official journal of the Japen Gastroenterologica Endoscopy Society.2009 Apr;21(2):78-81.PubMed PMID:19691778.
- [2] Valle J,Kekki M,Sipponen P,Ihamaki T,Siurala M.Long-term course and consequences of Helicobacter pylori gastritis.Results of a 32-year follow-up study.Scandinavian journal of gastroenterology.1996 Jun;31(6):546-50.PubMed PMID:8789892.
- [3] Wong BC LS,Wong WM,Chen JS,Zheng TT,Feng RE,China Gastric Cancer Study Group.Helicobacterpylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China:a randomized controlled trial.JAMA.2004;291:187-94.
- [4] Sipponen P,Kekki M,Haspakoski J,Ihamaki T,Siurala M.Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis:statistical calculations of cross-sectional data.International journal of cancer Journal international du cancer.1985 Feb 15;35(2):173-7.PubMed PMID:3871738.
- [5] Lorente S,Doiz O,Trinidad Serrano M,Castillo J,Lanas A.Helicobacter pylori stimulates pepsinogen secretion from isolatedhuman peptic cells.Gut.2002 Jan;50(1):13-8.PubMed PMID:11772960.Pubmed Central PMCID:1773080.
- [6] Leung WK,Wu MS,Kakugawa Y,Kim JJ,Yeoh KG,Goh KL,et al.Screening for gastric cancer in Asia:current evidence and practice.The lancet oncology.2008 Mar;9(3):279-87. PubMed PMID:18308253.
- [7] 王婕敏, 林三仁. 为爱研究及治疗新进展. 胃肠病学和肝病学杂志.2012;21(1).
- [8] Furuta T. 血清胃蛋白酶原的百分率变化是幽门螺杆菌根除的有用指标. 国外医学, 消化系统病分册, 1998,18 (2) : 111.
- [9] 肖志坚, 蒋孟军, 肖华龙, 吕国强, 程兆明, 王博诚. 胃癌患者全胃切除后血清 PGI、PGII 含量变化与胃癌复发的关系. 癌症 (临床研究).2000;1(19).
- [10] 陈美珍, 张民乐, 岑国桢. 血清胃蛋白酶原含量测定在危重病中的应用价值. 当代医学.2012,33:34-35. ■

【摘要】目的：研究分析多发性骨髓瘤相关实验室检查结果，对相关的实验检查指标进行初步评价。**方法：**回顾性分析我院 2007-2010 年收治的 52 例多发性骨髓瘤患者的实验室检查资料。**结果：**52 例多发性骨髓瘤中，45 例表现不同程度贫血，51 例血沉明显增高；蛋白尿 31 例，尿本周氏蛋白阳性 11 例；血清蛋白电泳 46 例在 γ 区带见到单克隆带，其中 24 例免疫固定电泳，其中 IgG- κ 型 7 例，IgG- λ 型 6 例，IgA- κ 型 4 例，IgA- λ 型 3 例，IgM- λ 型 2 例，轻链 λ 1 例，正常 1 例；TP>80G/L 28 例，GLO>30g/L 36 例，白球比 A/G<1.0 39 例，血清钙 >2.7 mmol/L 12 例；骨髓涂片骨髓瘤细胞比例 4.5% ~ 76.5%(平均 40.5%)。**结论：**多发性骨髓瘤实验室结果复杂多变，综合分析多发性骨髓瘤相关实验室各项指标，有利于提高多发性骨髓瘤诊断的准确性。

【关键词】多发性骨髓瘤；实验室检查；骨髓瘤细胞；
【中图分类号】R733.3 [文献标识码]A

The Laboratory Features Analysis of Multiple Myeloma

Liu TieNiu,Chen YaoPeng, Huang Li ,Qian Wu Xia , Huang GuiCai
NO.303 hospital of PLA NanNing GuangXi 530021

【Abstract】Objectives: To analyse the laboratory features of the patients wwith multiple myeloma . **Methods:** The records of 52 patients with MM in our hospital from 2007 to 2010 were

retrospectively reviewed . **Results:** Of the 52 study patients with MM,45 of them have various degrees of hemopthisis;51 of them have growth of eruthrocutes sedimentation rate;31 of them have proteinuria,;11 of them have Bence-Jones protein; 46 of them have serum M protein in the serum electrophoresiswas performed in 24 sera samples, there were 7 cases of IgG- κ , 6 IgG- λ , 4 IgA- κ , 3- IgA λ , 2 IgM- λ , 1 λ chain and 1 natural. Serum total protein increased TP>80g/L in 28 samples, globulin level also increased in 36 cases,A/G <1.0 in 39 cases, Serum calcium >2.7 mmol/L in 12samples. the proportion of Myeloma cells in bone marrow is 4.5% ~ 76.5%(the average level is 40.5%). Conclusion because of the complicated laboratory tests’ results, The related laboratory comprehensive analysis may increase the veracity diagnosis of MM.

【Keywords】Multiple Myeloma(MM);
Laboratory diagnosis; Myeloma cells

多发性骨髓瘤 (Multiple myelama, MM) 是浆细胞异常增生的恶性肿瘤，发生率约占血液恶性肿瘤的 10%^[1]。多发于中老年人。临床表现复杂多样，易误诊或漏诊。为提高对 MM 实验室检查表现的认识，现结合我院 2007 年 -2010 年 52 例 MM 患者的临床实验室检查资料，对多发性骨髓瘤实验室结果进行分析和初步评价。

1 病例和方法

1.1 病人来源 2007年-2010年我院确诊住院的多发性骨髓瘤患者52例,男29例,女23例;男女比例为1.27:1。年龄35~85岁,平均年龄61.5岁。所有病例均符合目前国内诊断标准^[2]。

1.2 方法 回顾性分析52例多发性骨髓瘤入院时的实验室检查资料,包括:血细胞分析、血沉、尿蛋白定性及尿本周氏蛋白定性、血清蛋白电泳、免疫固定电泳及血清免疫球蛋白测定、血清总蛋白及白蛋白、血清钙、骨髓细胞学涂片等各项相关检查。

2 结果

2.1 血细胞分析和血沉 52例患者外周血细胞分析未见明显异常的7例,单纯表现为贫血的33例,其中29例正细胞正色素性贫血,4例小细胞低色素性贫血,表现为贫血、白细胞或血小板减少的两系改变14例,表现为全血细胞减少4例。血沉表现普遍明显加快,均值为105mm/h,大于健康人群参考值的4倍以上(男0-15 mm/h,女0-20 mm/h)。仅有1例血沉正常。

2.2 尿本周氏蛋白 52例患者尿蛋白定性阳性31例,尿蛋白 $\pm\sim++$,尿本周氏蛋白定性实验阳性11例。

2.3 血清蛋白电泳、免疫固定电泳、免疫球蛋白测定 血清蛋白电泳检测中46例 γ 区出现单克隆峰,其中24例免疫固定电泳,其中IgG- κ 型7例,IgG- λ 型6例,IgA- κ 型4例,IgA- λ 型3例,IgM- λ 型2例,轻链 λ 1例,正常1例(后证实为IgE)。41例进行了免疫球蛋白定量检测IgG升高28例,IgA升高9例,IgM升高2例,IgE升高1例;IgG、A、M正常1例。

2.4 血清总蛋白、白蛋白、血清钙等生化指标 52例患者中TP>80g/L 28例,GLO>30g/L 36例,白球比A/G<1.0 39例,血清钙均值为 2.36 ± 0.5 mmol/L。血清钙>2.7 mmol/L 12例(参考值:2.10-2.70 mmol/L)

2.5 骨髓细胞学涂片 52例患者骨髓瘤细胞比例为1.2%~95%(平均40.5%),其中骨髓瘤细胞>15%者31例(%),骨髓瘤细胞<15%者21例,其中7例仅见成

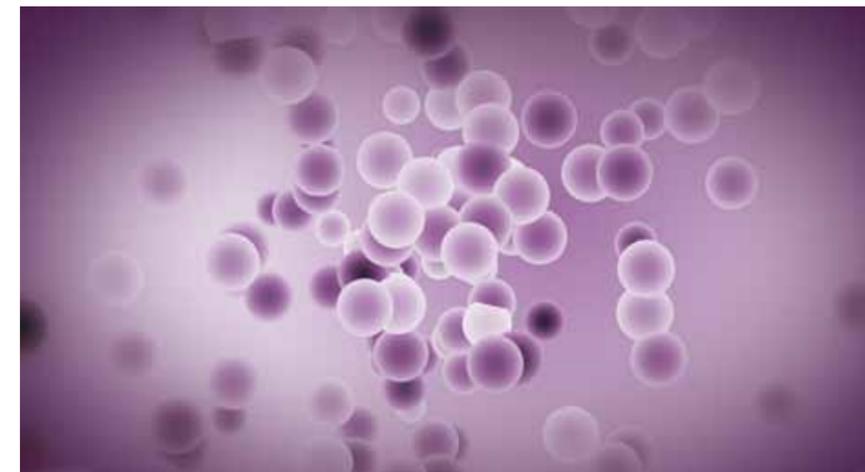
熟浆细胞,比例为1.4%-5.6%。

3 讨论

多发性骨髓瘤属于成熟B细胞肿瘤,由于单克隆浆细胞增生并合成、分泌大量单克隆免疫球蛋白(Ig),即M蛋白,临床表现骨质破坏、骨痛、病理性骨折、贫血、感染、高血钙血症、肾功能不全等一系列症状。由于瘤细胞增殖缓慢,早期临床症状不显著,随着瘤细胞负荷的增高,临床表现逐渐明显。临床各期的MM实验室检查表现不尽相同,准确掌握MM相关实验室指标变化是减少误诊的重要措施,下面就结合52例实验室检测结果对多发性骨髓瘤实验诊断的常规检查项目进行分析。

3.1 血细胞分析和血沉 由于瘤细胞的浸润,造血功能被抑制,贫血是MM最常见的临床表现,多为正细胞正色素性贫血,本文观察到4例小细胞低色素性贫血(经基因筛查为地中海贫血基因携带),作者曾对1例进行病例报道^[3],分析其诊治过程提示患者本身存在的基础疾病是影响医生对贫血原因分析的重要因素。白细胞和血小板变化不一,多数正常,晚期可减少。本文观察到4例就诊时即表现为全细胞减少,骨髓涂片中瘤细胞百分比分别为65.6%、82.5%、48.8%、79.5%,较高的瘤细胞负荷,严重抑制骨髓粒系、红系、巨核细胞的增生,进而外周血出现三系的改变。外周血的变化应是反映患者瘤细胞负荷及评估预后的最直接简单的手段。MM患者血沉明显增快,本文观察到1例血沉正常病例为非分泌型骨髓瘤。值得一提的是,在日常的检验工作中,发现不明原因贫血,血沉明显增快,血细胞涂片中发现成熟红细胞缟钱状排列,建议临床做骨髓穿刺,有助于临床发现多发性骨髓瘤病例,本文观察的52例病例中有7例为实验室外周血细胞涂片检查后建议骨穿确诊骨髓瘤。

3.2 尿蛋白定性和尿本周氏蛋白定性 MM患者多数存在肾功能的损害,约60%(31/52)患者出现不同程度的蛋白尿,这与文献报道大致相同^[4],但52例患者中尿本周氏蛋白阳性仅为11例,阳性率明显低于于同类文献评论^[5]。本文观察的尿本周氏蛋白定性实验采用热沉淀反应法^[6],结合其他实验室检测指标分析,存在较高的假阴率,敏感性较差。所用热沉淀反应法加热法的干扰因素较多,包括标本本身的影响(尿蛋白加热凝固干扰观察)以及实验操作人员的主观判断的影响。基于尿本周蛋白的实质为



MM患者尿液游离 κ 或 λ 链,建议应淘汰尿本周氏的热沉淀反应法,以尿免疫球蛋白(轻链)的定量或尿蛋白电泳及免疫固定电泳等特异性和敏感性较好来替代^[7]。

3.3 血清蛋白电泳、免疫固定电泳、免疫球蛋白定量 多发性骨髓瘤者多数可见免疫球蛋白IgG、IgA、IgM、IgD、IgE等单克隆增多,偶见双克隆,血清蛋白电泳、免疫固定电泳及免疫球蛋白、轻链(κ 、 λ)定量测定对MM的诊断、分型、疗效、预后的评估具有重要的价值,多数在血清蛋白电泳中可见到特征性的单克隆带^[8],即M蛋白。由于不同类型的免疫球蛋白电泳时出现的位置不同,单克隆带出现在 γ 带时易于观察判断,出现在 β 或 $\beta-\gamma$ 间时,不易观察到是否有单克隆带的存在,所以血清蛋白电泳在检测多发性骨髓瘤的M蛋白时,存在一定的漏诊率^[9],本文观察的52例血清蛋白电泳结果只是46例在 γ 区见单克隆带。免疫固定电泳结合电泳的分离作用和单克隆抗体的特异性和高敏感性来检测血清中的单克隆免疫球蛋白,具有相对血清蛋白电泳而言,较高的检出率,并可对单克隆免疫球蛋白分型,是诊断多发性骨髓瘤重要实验室依据^[10]。但由于实验中常用的单克隆抗体常为IgG、IgA、IgM、 κ 链、 λ 链,发病率低的IgE或IgD型可能会出现正常的免疫固定电泳结果。免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)、轻链(κ 、 λ)定量不仅对明确多发性骨髓瘤的诊断有重要价值,常可来反应瘤细胞负荷,疗效的观察和预后的评估。

3.4 总蛋白、白蛋白、A/G、血清钙等生化指标 多发性骨髓瘤患者多数血清总蛋白增高,球蛋白增高,白蛋白正常或减少,白球比例倒置。我们观察到52例病中52例

患者中TP>80g/L 28例,GLO>30g/L 36例,白球比A/G<1.0 39例,总蛋白、球蛋白正常亦占一定比例,结合其他实验室检测指标分析,应是由于肾功能的异常,大量蛋白从肾脏丢失导致的。所以,在判断患者是否存在高球蛋白血症时,应重视A/G的临床应用价值,结合患者的肾功能指标来判断。

MM患者多存在广泛性骨质破坏,高钙血症发生率为15~20%。故血钙水平的高低对于MM的诊治和预后有一定的指导意义,亦有学者将血钙水平作为临床分期的指标之一。临床实验室常用测定血清总钙以观察血清离子钙的变化情况,但血清总钙浓度受到血清白蛋白浓度的影响较大,MM中晚期患者多存在血清白蛋白水平下降,在一定程度上低白蛋白血症掩盖了血钙水平。文献报道^[11、12]以白蛋白浓度对血钙浓度进行校正后,高钙血症比例明显升高,本文参照文献对ALB<40g/L按公式:校正血钙mmol/L=(血钙mmol/L-0.025*血清白蛋白g/L+1.0)对血钙的校正。校正前血清钙>2.7mmol/L 12例,校正后血钙>2.7mmol/L 17例,与文献报道大致相同。校正血钙的目的是使血钙值更能反应真实血浆离子钙水平,该公式是以假定白蛋白为40g/L为标准值,参照血清总钙正常参考值范围来判断是否为高钙血症。笔者认为根据钙与白蛋白的相关系数0.025^[13]直接计算血清离子钙mmol/L=血钙mmol/L-0.025*血清白蛋白(g/L),参照血清离子钙参考值范围(离子选择电极法,1.12mmol/L-1.23 mmol/L)^[14]来判断,更能直接反应离子钙的水平,灵敏性优于原公式,有利于提高临床对高钙血症的警惕。总之,校正血钙能敏感地反应疾病的严重程度,对于临床分期及预后更具有指导意义,当然,在有条件的单位应首选离子钙的检测。

白细胞介素-18 基因启动子多态性与鼻咽癌的遗传易感性的研究

文 | 潘国刚 罗斌 黄春传 梁丽娜
广西百色市右江民族医学院附属医院检验科 533000

3.5 骨髓细胞形态学检查 作为多发性骨髓瘤的最重要的诊断性依据,骨髓细胞形态学检查在MM的诊断中有不可替代的作用。国内诊断标准为瘤细胞通常占骨髓有核细胞的15%以上。本文52例患者中骨髓瘤细胞<15%者21例,其中7例仅见成熟浆细胞,比例为1.4%~5.6%,但结合临床表现,放射及病理三方面的综合分析,最后诊断为多发性骨髓瘤。所以除浆细胞数以外,浆细胞的形态也很重要,出现原幼浆细胞,或有双核,多核浆细胞,伴随核浆发育有异常亦可诊断为多发性骨髓瘤^[15]。典型的骨髓瘤细胞瑞氏染色形态:细胞胞体大小不一,多数较大,外形不规则,可有伪足;胞核较大,核染色质细致,有1~2个核仁,可见双核或多核;胞浆蓝染、或火焰状、蓝灰色,核周淡染区消失或不明显,部分浆内可见内含物(核小体、结晶、Russell小体等)^[16]。可分为原始型、幼稚型、中间型和成熟型瘤细胞。其中成熟型骨髓瘤细胞具有正常浆细胞的基本形态,形态上不易鉴别。作为骨髓细胞形态者需加强骨髓瘤细胞形态学认识,掌握瘤细胞各型形态特点,从数量和形态上两方面同浆细胞反应性增多区别开,特别是浆细胞比例较低,但存在有形态上的异常,应考虑到MM的可能,并提示临床做实验室相关检查,如血清免疫球蛋白测定,血清蛋白电泳,提高MM诊断的准确性,为临床提供可靠依据。MM的恶性浆骨髓瘤细胞在骨髓中的分布是不均匀的甚至为孤立存在的,不易取出,故部分患者须经多次,多部位骨髓穿刺才获得最后的正确诊断,不能以一次骨髓穿刺涂片中的浆细胞比例高低,轻易作出排除多发性骨髓瘤诊断。

综上所述,我们可以看到,MM的实验室检查结果变化多样,各种临床常用的实验室诊断MM的实验检查均存在一定局限性,不能完全独立作为诊断MM的金指标,需要综合分析。鉴于MM临床表现复杂多样,患者多被收治到不同的专业科室^[17],为了提高多发性骨髓瘤的首诊符合率,我们作出如下建议:①年龄在50~60岁以上的中老年人;②原因不明的贫血;③不明原因的骨痛、骨质疏松、腰痛、非外伤性的骨折;④红细胞沉降率明显增快;⑤血清球蛋白异常增高,或A/G倒置;⑥蛋白尿、肾功能不全等,应考虑到MM的可能性,引起足够重视,进行相关的实验室检查,如骨髓穿刺、血清蛋白电泳及免疫球蛋白定量测定等。

参考文献

- [1] 达万明,裴雪涛.现代血液病学[M].北京:人民军医出版社,2003:940-945.
- [2] 张之南.血液病诊断及疗效标准[M].第3版北京:科学出版社,1998:373~380.
- [3] 陈要朋,刘铁牛等.以下颌下淋巴结肿大为首发症状的多发性骨髓瘤一例报道[J].广西医学内科学,2006
- [4] 陈培培,苗华.老年多发性骨髓瘤肾脏损害临床分析[J].实用老年医学,2004,18(3):160-161.
- [5] 陈雷,潘景业.多发性骨髓瘤的诊治与尿蛋白检测[J].温州医学院学报,2001,31(3):173~1741
- [6] 叶应妹.等.全国临床检验操作规程(3版),南京:东南大学出版社,2006:281-282.
- [7] 丛玉隆.现代尿液分析技术与临床.北京:人民军医出版社,2007:96-99.
- [8] 张建琴.血清蛋白电泳在诊断多发性骨髓瘤中的临床应用[J].江苏大学学报(医学版).2005.15(4):337-339.
- [9] 崔凡.免疫固定电泳检查在多发性骨髓瘤中的应用[J].临床和实验医学杂志.2008.1.7(1):33-34.
- [10] 赵应斌.吕桂桦.丁燕玲等.34例多发性骨髓瘤的免疫固定电泳检查[J].右江民族医学院学.2006.1:233-235.
- [11] 高健,侯健,高巍然.113例多发性骨髓瘤校正血钙的意义[J].江西医药,2003,38(3):157-159.
- [12] 张曦.常春康.吴凌云等.多发性骨髓瘤患者白蛋白校正后高血钙发生率的研究[J].诊断学理论与实践.2010.9(3):233-235.
- [13] Prakash J,Mandal AK,Vohra R,et al.Renal disease is a prodrom of multiple myeloma :an analysis of 50 patients from eastern India[J].Ren Fail,2009,31(4):267-271.
- [14] 王鸿利.实验诊断学[M].北京:人民卫生出版社,2005.7:204-205.
- [15] 丛玉隆.李顺义.卢兴国等中国血细胞诊断学[M].北京:人民军医出版社,2010.2:225-230.
- [16] Jaff,e.s 著,周小鸽等译.造血与淋巴组织肿瘤病理学和遗传学[M].北京:人民卫生出版社,2006.7:152-155.
- [17] 庄俊玲.武永吉.等多发性骨髓瘤218例临床分析[J].中国实用内科学杂志,2004,24(2),108-110. ■

【摘要】目的:探讨白细胞介素-18(IL-18)基因单核苷酸多态性及其单倍型与鼻咽癌易感性之间的关系。**方法:**以190例鼻咽癌患者和200例健康对照者为研究对象,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法对IL-18基因-137G/C、-607C/A单核苷酸多态性进行基因分型,同时用SHEsis软件分析IL-18基因的连锁不平衡及单倍型频率。**结果:**IL-18基因-607C/A多态性在鼻咽癌组和正常人群中的分布差异无显著性($P>0.05$),而IL-18基因-137G/C多态性在两组人群中的分布差异存在显著性($P<0.05$),等位基因频率的相对风险分析发现,C等位基因携带者患鼻咽癌的风险是G等位基因的1.730倍($OR=1.730$,95%CI:1.227~2.439)。联合基因型分析发现,IL-18基因-137G/C、-607C/A单核苷酸多态性存在着强烈的连锁不平衡($|D'|=0.951$),-137C/-607A单倍型频率在鼻咽癌组中显著高于对照组($P<0.05$),-137C/-607A单倍型携带者显著增加了鼻咽癌的发病风险($OR=1.699$,95%CI:1.174~2.457)。**结论:**IL-18基因-137G/C多态性和-137C/-607A单倍型与鼻咽癌的发病可能具有相关性,其中-137C等位基因可能是鼻咽癌的遗传易感基因。

【关键词】白细胞介素-18;鼻咽癌;基因;多态性

Association of IL-18 gene promoter polymorphisms with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. PAN Guo-gang, LUO Bin, HUANG Chun-chuang, LIANG Li-na.. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China.

【Abstract】Objective To investigate the single nucleotide polymorphisms (SNPs) and

its haplotypes of interleukin-18 (IL-18) gene promoter are associated with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma (NPC) in a Chinese population. **Methods** We analyzed two single nucleotide polymorphisms of IL-18 gene promoter -137G/C and -607C/A in 190 patients with NPC and 200 age and sex matched controls in a Chinese population, using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) strategy, Frequency of haplotypes and linkage disequilibrium of IL-18 gene in different groups were analyzed by SHEsis programs. **Results** The distributions of IL-18 gene -607C/A polymorphism was not different between NPC and control group, but the IL-18 gene -137G/C polymorphism was significantly different ($P<0.05$). The relative risk suffered from NPC of C allele was 1.730 times of the G allele carriers ($OR=1.730$,95%CI:1.227~2.439). Consistent with the results of the genotyping analyses, IL-18 -137G/C and -607C/A polymorphisms showed strong linkage disequilibrium($|D'|=0.951$), frequency of the -137C/-607A haplotype in patients with NPC was significant higher than that in controls ($P<0.05$). The -137C/-607A haplotype was associated with a significantly increased risk of NPC ($OR=1.699$,95%CI:1.174~2.457). **Conclusion** IL-18 gene -137G/C polymorphism and its -137C/-607A haplotype were associated with NPC, -137 C allele is an important genetic susceptibility gene for NPC.

【Key words】 Interleukin-18; Nasopharyngeal carcinoma; Gene; Polymorphism

鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种多基因、多因素综合作用而导致的一种常见疾病, 然其病因和发病机制尚未完全阐明, 但遗传基因在鼻咽癌发病过程中可能起着重要的作用, 随着人类基因组计划的迅速发展, 鼻咽癌相关基因的定位和识别已成为研究的热点。白细胞介素-18 (Interleukin-18, IL-18) 是一种多效性细胞因子, 主要由激活的单核巨噬细胞产生, 可诱导 γ -干扰素 (IFN- γ) 产生, 参与了多种疾病病理过程, 在感染、免疫调节、肿瘤发生中的作用受到广泛关注^[1,2]。近年对 IL-18 基因多态性与疾病的关系有较多研究报道。但是, IL-18 在肿瘤发生和进程中的分子机制还尚未完全阐明。IL-18 基因位于 11 号染色体长臂上 (11q22.2-q22.3), 由 6 个外显子和 5 个内含子组成, 分子生物学研究表明 IL-18 基因存在着单核苷酸多态性 (SNPs), 这种基因多态性与人类多种肿瘤、霍奇金病及自身免疫性疾病的关系^[3-5], 已成为国内外学者研究的热点。目前, 有关 IL-18 基因多态性与鼻咽癌关系的研究国内较少文献报道。为此, 我们采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 的方法, 研究 IL-18 基因多态性及单倍型与鼻咽癌的关系, 为认识鼻咽癌的发病机制提供一定的理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 全部鼻咽癌来自于右江民族医学院附属医院住院的患者, 全部研究对象均经病理证实, 共 190 例, 其中男 135 例, 女 55 例, 年龄 48.3 ± 8.1 岁; 选择年龄、性别相匹配的 200 例无血缘关系的同期正常健康体检者为对照组, 其中男 140 例, 女 60 例, 年龄 46.5 ± 7.6 岁。全部研究对象均为广西籍人。该研究获得右江民族医学院附属医院研究委员会批准, 且以上标本采集均由本人知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集静脉血 3ml, 用 EDTA-K2 抗凝; 采用改良碘化钠法提取白细胞基因组 DNA, -70°C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 参照 Genbank 公布的序列 (NT033899.7) 设计两对引物, 由上海英俊有限公司合成。用于特异性扩增 IL-18 基因包含 -607 位点的一段 DNA 引物序列, 上游引物为: 5'-CCCTCTCCCAAGCTTACTT-3'; 下游引物为: 5'-TTCAGTGAACAGGAGTCCA-3'; 用于特异性扩增

IL-18 基因包含 -137 位点的一段 DNA 引物序列, 上游引物为: 5'-TTGTAAC ATTGTAGGAATTACC-3'; 下游引物为: 5'-ATGTAATATCACTATTTTCATGAGA-3', IL-18 的 PCR 扩增反应体系均为 25 μl , 其中含 $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 2.5 μl , 2.5mmol/L dNTPs 2.0 μl , 上、下游引物各 20pmol, 模板 DNA 2.0 μl , TaqDNA 聚合酶 1.25U, 不足体积用灭菌双蒸水补足至 25 μl 。置热循环仪 (Bio-Rad) 中 94°C 预变性 5 min; 再按下列程序循环 35 次, 即 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 45 s, 72°C 延伸 55 s; 末次循环后, 72°C 延伸 5 min。

1.2.3 扩增产物的限制性酶切 取 PCR 扩增产物 3 μl , 分别用 2 U 限制性内切酶 Mse I 和 BfuC I (英国 Biolabs 公司) 酶切 IL-18 基因 -607 和 -137 位点, 37°C 孵育 3 小时, 反应终止后, 消化片段在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, EB 染色, 染色后通过凝胶成像系统判断结果。

1.3 统计学方法 用 SPSS11.5 软件包进行分析。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算, 研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度及各组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验, 并以比值比 (OR) 及其 95% 可信区间 (CI) 表示相对风险度。以 $P < 0.05$ 为统计学意义。

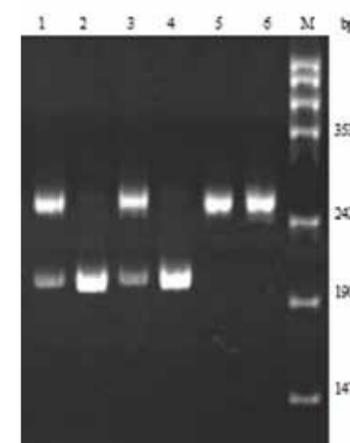
2 结果

2.1 IL-18 基因型检测结果 IL-18 基因 -137 G/C 多态性, PCR 扩增产物片段大小为 256 bp, 根据限制性内切酶 BfuC I 酶切片段的情况, 检测到基因型有 3 种, CC 型 (256 bp 1 条带), GC 型 (256 bp, 229 bp 和 27 bp 3 条带, 27 bp 这条带已跑出胶外), GG 型 (229 bp 和 27 bp 2 条带) (图 1); IL-18 基因 -607 C/A 多态性, PCR 扩增产物片段大小为 137 bp, 根据限制性内切酶 Mse I 酶切片段的情况, 检测到基因型有 3 种, AA 型 (91 bp, 46 bp 2 条带, 46 bp 这条带已跑出胶外), CA 型 (137 bp, 91 bp 和 46 bp 3 条带), CC 型 (137 bp 1 条带) (图 2)。为验证基因型结果, PCR 产物直接测序结果与 Genbank 参照序列 (NT033899.7) 相一致 (图 3-4)。

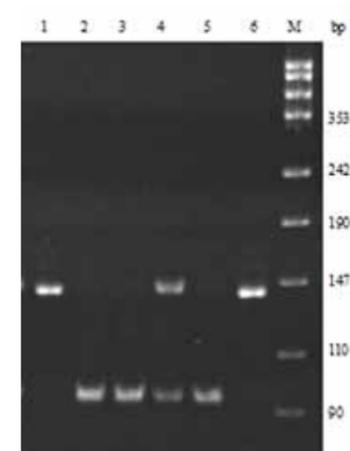
2.2 鼻咽癌与对照组 IL-18 基因多态性的比较 IL-18 基因型在两组人群中分布频率, 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验, 两组均达到遗传平衡, 具有群体代表性。

经 χ^2 检验及相关分析, IL-18 -137 位点等位基因频率在两组人群中的分布存在着显著性差异 ($\chi^2=9.895$, $P=0.002$); 等位基因频率的相对风险分析发现, C 等位基因携带者患鼻咽癌的风险是 G 等位基因的 1.730 倍 (OR=1.730, 95%CI: 1.227 ~ 2.439) IL-18 基因 -607 C/A 多态性在两组人群中的分布差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.3 鼻咽癌组与对照组 IL-18 基因的连锁不平衡及单倍型分析 应用单倍型 SHEsis 分析软件对 IL-18 基因 -137 G/C 和 -607 C/A 这 2 个位点的单核苷酸多态性进行连锁不平衡分析, 结果显示 IL-18 基因 -137 G/C 与 -607 C/A 单核苷酸多态性存在强烈的连锁不平衡 ($|D'|=0.951$)。联合基因型分析发现, 3 种单倍型分布频率在鼻咽癌组与对照组间分布具有显著性差异 ($\chi^2=9.530$, $P=0.009$), -137C/-607A 单倍型携带者显著增加了鼻咽癌的发病风险 (OR=1.699, 95%CI: 1.174 ~ 2.457) (表 2)。



注 1, 3: GC 基因型; 2, 4: GG 基因型; 5, 6: CC 基因型; M: 标准分子量
图 1 IL-18 基因 -137 G/C 多态性 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图



注 1, 6: CC 基因型; 2, 3, 5: AA 基因型; 4: CA 基因型; M: 标准分子量
图 2 IL-18 基因 -607 C/A 多态性 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

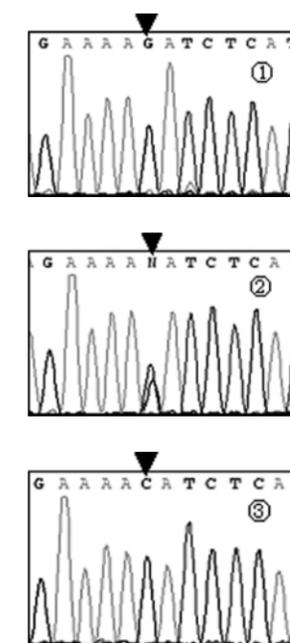


图 3 IL-18 基因 -137 G/C 测序图: ①、②、③分别表示 GG、GC 和 CC 基因型; 箭头所示为基因突变位点

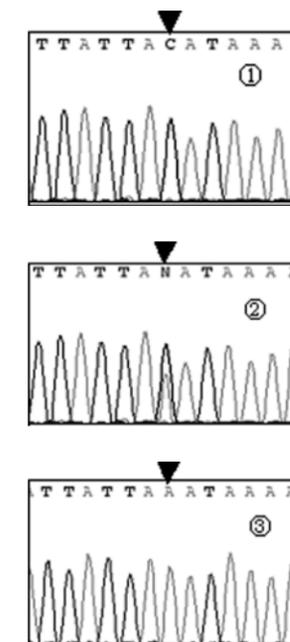


图 4 IL-18 基因 -607 C/A 测序图: ①、②、③分别表示 CC、CA 和 AA 基因型; 箭头所示为基因突变位点

表 1 鼻咽癌组与对照组 IL-18 基因多态性分布频率的比较

基因型或等位基因	NPC 组 n = 190 (%)	对照组 n = 200 (%)	χ^2 值	P 值
IL-18 -137 G/C				
GG	102 (53.7)	139 (69.5)	10.359	0.006
GC	74 (38.9)	52 (26.0)		
CC	14 (7.4)	9 (4.5)		
G	278 (73.2)	330 (82.5)	9.895	0.002
C	102 (26.8)	70 (17.5)		
IL-18 -607 C/A				
CC	40 (21.1)	56 (28.0)	2.535	0.282
CA	97 (51.1)	93 (46.5)		
AA	53 (27.9)	51 (25.5)		
C	177 (46.6)	205 (51.3)	1.701	0.192
A	203 (53.4)	195 (48.7)		

表 2 鼻咽癌组与对照组 IL-18 基因单倍型分布频率的比较

IL-18 基因单倍型	NPC 组 2n = 380 (%)	对照组 2n = 400 (%)	比值比 (95% 可信区间)	P 值
-137 G/-607 C	174 (45.8)	203 (50.8)	1.000 (参照)	
-137 G/-607 A	107 (28.2)	129 (32.3)	0.968 (0.698-1.341)	0.844
-137 C/-607 A	99 (26.1)	68 (17.0)	1.699 (1.174-2.457)	0.005
-137 C/-607 C	0 (0.0)	0 (0.0)		

3 讨论

鼻咽癌是由环境因素和遗传基因相互作用而导致的一种头颈部恶性肿瘤。然其病因和发病机制尚未完全阐明,但细胞因子在其中的作用越来越受到重视。IL-18 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,IL-18 除能强烈地诱导免疫细胞释放 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子外,它亦具有增强 FasL 表达和 NK 细胞毒作用等多种生物学效能。IL-18 在免疫调节、抗肿瘤及抗感染等方面有着潜在的应用前景,并与多种肿瘤的发病可能密切相关。近年来,许多临床研究表明 IL-18 基因转染到树突状细胞和乳腺癌细胞中均具有特异性和非特异性的抗肿瘤作用,认为 IL-18 在肿瘤的发病和活动性中可能起着重要的作用^[6,7]。IL-18 基因位于 11 号染色体长臂上,由 6 个外显子和 5 个内含子组成。研究表明,IL-18 基因具有遗传多态性,这种基因多态性影响 IL-18 的基因转录和表达,进而影响到 IL-18 的生物学功能,从而影响到肿瘤的发生、发展。因而,我们推测 IL-18 基因多态性可能与肿瘤的易感性有关。

关于 IL-18 基因多态性与肿瘤的关系,文献报道较少。Farjadfar 等^[8]检测肺癌 IL-18 基因多态性,结果发现 IL-18 基因 -607 C/A 多态性与肺癌的发病具有相关性,其中 -607 A 等位基因频率在肺癌患者中显著高于对照组,-607 A 等位基因携带者显著降低血清 IL-18 的表达,

因而提出 -607 A 等位基因携带者机体抗肿瘤减弱,从而导致肺癌易感。Nong 等^[9]通过对鼻咽癌 IL-18 基因多态性的研究发现,IL-18 基因 -137 G/C 多态性与鼻咽癌的发病具有相关性,其中 -137 C 等位基因可能是鼻咽癌的遗传易感基因;联合基因型进一步发现,-137 C/-607 A 单倍型携带者显著增加了鼻咽癌的发病风险。但西班牙学者 Sáenz-López 等^[10]研究发现 IL-18 基因 -137 G/C 和 -607 C/A 两位点多态性与肾细胞癌都具有相关性。由于基因多态性存在地域间的差异,IL-18 基因多态性与鼻咽癌之间是否真正存在相关性,目前尚无定论。为进一步明确 IL-18 基因多态性是否与鼻咽癌的发生相关,我们采用病例-对照的研究方法对 IL-18 基因多态性进行分析,结果发现鼻咽癌患者 IL-18 基因 -137 G/C 多态性分布与正常人比较差异具有显著性,其中 C 等位基因携带者频率在鼻咽癌组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。联合基因型进一步分析发现,IL-18 基因 -137 G/C 与 -607 C/A 单核苷酸多态性存在强烈的连锁不平衡 ($|D'| = 0.951$),3 种单倍型分布频率在鼻咽癌组与对照组间分布具有显著性差异 ($\chi^2 = 9.530$, $P = 0.009$),-137 C/-607 A 单倍型携带者显著增加了鼻咽癌的发病风险 ($OR = 1.699$, $95\%CI: 1.174 \sim 2.457$)。结果提示,IL-18 基因 -137 G/C 多态性和 -137 C/-607 A 单倍型与鼻咽癌的发病可能具有相关性,其中 -137 C 等位基因可能是鼻咽癌的遗传易感基因。我们的结果与 Nong 等^[3]人报道相一致。

综上所述,鼻咽癌是一种多因素参与的常见病,除环境因素影响之外,遗传因素在其中也起着更为重要的作用,通过我们的研究可以发现,IL-18 基因 -137 G/C 多态性和 -137 C/-607 A 单倍型与鼻咽癌的发病可能具有相关性,其中 -137 C 等位基因可能是鼻咽癌的遗传易感基因。但 IL-18 细胞因子基因多态性是通过何种机理对鼻咽癌产生影响的,它在鼻咽癌发病中的确切分子机制尚待进一步研究。

参考文献

- Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, et al. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine Helicobacter pylori-specific immune tolerance, and asthma protection. J Clin Invest. 2012;122(3):1082-1096.
- Dwivedi S, Goel A, Natu SM, et al. Diagnostic and prognostic significance of prostate specific antigen and serum interleukin 18 and 10 in patients with locally advanced prostate cancer: a prospective study. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(7):1843-1848.
- Mi YY, Yu QQ, Yu ML, et al. Review and pooled analysis of studies on -607(C/A) and -137(G/C) polymorphisms in IL-18 and cancer risk. Med Oncol. 2011;28(4):1107-1115.
- Monroy CM, Cortes AC, Lopez MS, et al. Hodgkin disease risk: role of genetic polymorphisms and gene-gene interactions in inflammation pathway genes. Mol Carcinog.

2011;50(1):36-46.

- Tso TK, Huang WN, Huang HY, et al. Elevation of plasma interleukin-18 concentration is associated with insulin levels in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2006;15(4):207-212.
- Xia D, Li F, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-18 gene-modified tumor cells and dendritic cells induces enhanced antitumor immunity. Cancer Biother Radiopharm 2004; 19(3):322-330.
- Han MY, Zheng S, Yu JM, et al. Study on interleukin-18 gene transfer into human breast cancer cells to prevent tumorigenicity. J Zhejiang Univ Sci 2004;5(4):472-476.
- Farjadfar A, Mojtahedi Z, Ghayumi MA, et al. Interleukin-18 promoter polymorphism is associated with lung cancer: a case-control study. Acta Oncol. 2009;48(7):971-976.
- Nong LG, Luo B, Zhang L, et al. Interleukin-18 gene promoter polymorphism and the risk of nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. DNA Cell Biol. 2009;28(10):507-513.
- Sáenz-López P, Carretero R, Vazquez F, et al. Impact of interleukin-18 polymorphisms-607 and -137 on clinical characteristics of renal cell carcinoma patients. Hum Immunol. 2010;71(3):309-313. ■



第73届CMEF—— “四叶草”绽放利德曼“生物科技之花”



2015年5月15日至18日，第73届中国国际医疗器械（春季）博览会（CMEF）在国家会展中心（上海）成功举办。CMEF始创于1979年，每年春秋两届，经历了36年的不断创新、自我完善，已成为亚太地区最大的医疗器械及相关产品、服务展览会。同时也是医疗行业内最大的专业医疗采购贸易平台、最佳的企业形象发布地以及专业信息集散地和学术、技术交流平台。



上海国家会展中心——世界最大的建筑单体和会展综合体，此次中国国际医疗器械博览会在此举办，其俯视图呈现四叶草造型。大家所熟悉的利德曼标识，呈现花朵形状，代表“生物科学改善人类生活”的“生物科学之花”。利德曼“生物科学之花”绽放于上海“四叶草”，为观众展示了利德曼生化诊断试剂新成员以及系列仪器：CI1000全自动化学发光免疫分析仪、IDS-iSYS全自动生化免疫分析仪、德赛 Innovastar POC 检测仪、Enigma® ML 全自动化分子检测平台等仪器。更有最新推出的CM4000全自动凝血分析仪首次亮相CMEF。利德曼推出的多种仪器产品涉及生化、免疫、分子诊断等方面，均具有优异的市场表现并拥有不同客户群的簇拥，成为众多观众关注的焦点。



自从利德曼自主研发生产的CI1000全自动化学发光免疫分析仪上市以来，其卓越的稳定性就得到了用户的广泛认可。配套试剂采用碱性磷酸酶化学发光体系，磁微粒固相包被先进技术。百万级宽线性范围，超微量灵敏度、背景干扰接近零值、试剂稳定性强。稳定的试剂与仪器同源体系，为客户提供了准确、可靠的检测结果。



展会上，IDS-iSYS全自动生化免疫分析仪成为众多观众关注的焦点。IDS-iSYS引领全球的骨代谢、钙代谢、高血压、生长因子、自身免疫等特色菜单，具有最广泛的

拓展领域：血管钙化、自身免疫、传染病、特种蛋白等。其创新设计也是吸引众多观众的原因之一：IDS-iSYS的智能凝块检测功能iCM，可防止检测中止，最大化节省时间、提高工作效率；仪器中独特的高压清洗站和专用清洗液，能有效的防止交叉污染而无需额外维护；Walk-away系统和连续加载功能真正实现简易操作。人性化的贴心设计为IDS-iSYS增加了更多人气。

在分子诊断方面，会上展出了Enigma迷你实验室（Enigma ML）全自动化分子检测平台。Enigma ML是POCT应用和分子诊断技术的完美产物。此款全自动化的PCR反应系统可广泛应用于临床实验室、重症监护及外科手术室、疾控中心实验室和流行病学研究等多种领域。该系统结合了实时荧光PCR反应的高灵敏度、高特异性和POCT类产品检测快速、简易的特点，将反应所需的全部试剂预装入一次性卡架内进行操作，免去了之前PCR产品费时费力的样本核酸提取等前处理过程，大大降低了操作人员被病人样本感染的风险。病人信息的输入和程序设定可通过触摸屏来简单操作。所有检测结果实时加密上传云端。Enigma ML系统可以在不同的医疗健康项目需求下提供灵活配置，它的出现颠覆了原有分子诊断产品需要专属实验室以及专业人员进行操作的概念，Enigma ML产品完全可以在任何非实验室条件下的正常使用，对操作者无需任何专业要求，是POCT分子诊断领域毋庸置疑的领导者。

德赛 Innovastar POC 检测仪，只需一个标本，即可检测四个项目：糖化血红蛋白A1c，血糖，血红蛋白，C反应蛋白。具有简单易用的优点：操作简单易学，无需额外培训；单剂量包装试剂，大幅减少试剂损耗；参数信息卡中预存校准信息，无需校准，大幅降低成本；结果准确：配套的高品质试剂，不论是线性范围还是精密度都达到了高水准；持续发展：多种检测都可被较容易的加入，检测项目菜单有非常大的扩展空间，具有很大发展前景。引领了POC检测的新高度。

会上，利德曼展示了最新推出的CM4000全自动凝血分析仪。CM4000采用凝固法、免疫比浊法、发色底



物法对各种凝血及纤溶项目准确测量，取样针（试剂针、样品针）均具备液面探测功能，100个样本位可供随时添加样本，66个试剂位供随时添加试剂，2000个反应管支持连续不断添加装载，集成式液路便于用户及售后人员维护。CM4000全自动凝血分析仪将成为临床检验的最佳之选。

利德曼生化试剂产品经过多年的不断发展完善，已具有涵盖肝脏疾病、肾脏疾病、心血管病、糖尿病、免疫性疾病、代谢性疾病、胰腺炎、凝血与纤溶障碍等主要疾病类型的12大类检测项目。利德曼推出的生化试剂产品规格齐全，适用于多种品牌全自动生化分析仪。此次展会上，利德曼还带来了其金牌项目：心血管疾病的独立风险因素及预测指标脂蛋白a（Lp(a)）测定试剂盒（胶乳免疫比浊法）；心肌损伤的敏感性指标肌钙蛋白I（cTnI）测定试剂盒（胶乳免疫比浊法）；急性心肌梗死（AMI）的早期诊断指标心型脂肪酸结合蛋白（H-FABP）测定试剂盒（胶乳免疫比浊法）；早期肾损伤的敏感性指标α1-微球蛋白（α1-MG）测定试剂盒（胶乳免疫比浊法）；评估肾功能敏感性好、特异性高的指标胱抑素C（Cys-C）测定试剂盒（免疫比浊法）；广谱的肿瘤标志物唾液酸（SA）测定试剂盒（神经氨酸苷酶法）。试剂稳定性、抗干扰能力、准确性、精密度和线性范围等技术指标经过严格的考核与评价，受到新老用户和业界同行的一致好评。

本次展会是利德曼与新老朋友接洽的一个良好平台。我们致力于发展生物科学，帮助人们及早和及时地诊断出疾病，并得到有效治疗，获得更健康的生活。我们为客户提供先进精准的产品与周到全面的服务。我们深信：生物科学改善人类生活。■



利德曼参展首届全国临床检验装备与应用学术会议

“第一届全国临床检验装备与应用学术会议暨第一届全国临床检验装备展览会”于2015年4月26日至28日在宁波国际会议中心召开。本次盛会由中国医学装备协会临床检验装备技术专业委员会、卫生计生委科技发展中心、宁波市科技局、解放军医学计量科委会临床检验设备安全与质量管理委员会共同举办。

会议以“搭建产学研用的平台提高大检验整体水平”为宗旨，本次会议的三大亮点是：推进产业化发展，政府部门大力支持，以及研讨基础上特设交流环节。

此次展会，利德曼公司携生化全线产品、IDS-iSYS全自动生化免疫分析仪以及Enigma@ML全自动分子检测平台亮相，成为众多观众关注的焦点。在本次会议组织的优秀论文评选活动中，我司研发部陈立杰所著《降钙素原磁分离化学发光法定量检测试剂盒研制》荣获优秀论文二等奖。



利德曼、德赛研发团队沟通会顺利召开

为加强交流合作，2015年3月5日至7日在利德曼三期召开了与德赛研发团队的沟通会。德赛诊断大中华区总经理钱震斌先生、德赛诊断 Erwin Metzmann 教授、德赛诊断研发总监王荣芳女士、技术总监丁耀良先生及利德曼研发中心副主任陈立杰先生、仪器研发事业部总监孟刚先生、生物化学研发事业部总监熊宁先生与研发中心核心研发员们参与了本次会议。

临床诊断学知名专家德赛诊断系统的 Erwin Metzmann 教授，在会上做了题为《光散射法检测血浆蛋白的过去、现在和未来》的学术报告，并对目前利德曼研发中所遇到的问题给予了指导性建议。利德曼与德赛诊断系统就未来双方的研发合作协同发展作了进恳切深入的探讨。



北京协和医院检验科团队来访利德曼

3月12日北京协和医院检验科团队一行8人来访利德曼，双方就感兴趣的科研议题进行了深入探讨。

利德曼总裁助理沈今钊先生、总裁助理张志勇先生、市场管理中心总监朱晓春女士、质量管理中心总监郑延军先生、副总裁助理马志远先生等一行人共同接待了北京协和医院检验科团队的来访。双方团队互相介绍做简单交流之后，在利德曼总裁助理沈今钊先生的带领下，协和医院检验科团队参观了利德曼生产、研发、质量等办公区域，其中着重参观了利德曼参考实验室，并对利德曼开放式科研合作实验室研发实验相关大型仪器设备的使用作了详细的介绍。在参观过程中，协和医院团队对于利德曼购置的实验仪器设备的运用表示了极大兴趣，利德曼随访人员针对大家的问题一一解答。参观完毕后，双方就利德曼科研合作平台的发展方向作进一步交流，针对相关科研问题作进一步探讨同时寻找双方合作的契机。

未来，利德曼开放式科研合作实验室在将不断引进和大学、研究所以及业界企业的多种科研合作项目，不仅会注重于医疗器械和公共卫生市场及时所需产品的研制与开发，同时也会战略性的探索生物化学领域更前端的基础科学的研究，为公司后续战略发展做科学技术储备。



国家食品药品监督管理总局调研组访问利德曼

2015年5月12日，针对新版医疗器械法规实施后企业可能面临的问题与困难，国家食品药品监督管理总局专门成立专业调研组针对全国重点地区选取有代表性企业进行现场走访调研。利德曼成为北京地区被调研的五家大型诊断产品公司之一，调研过程中就新版法规的变化情况，体外诊断试剂企业的挑战，产品的质量控制等关键问题进行了讨论。

生产运营副总裁王建华先生代表公司对国家食品药品监督管理总局的领导及北京食品药品监督管理局的陪同领导，表示欢迎，并重点介绍了利德曼的运营状况和公司近期在生化、免疫及分子等诊断产品方面的发展。

来访领导重点参观了公司研发中心仪器、试剂、原料实验室和生产车间等，认真了解公司研发生产检验过程，对公司在产品质量控制方面投入的努力表示肯定，并希望在新法规的制定和实行过程中积极参与，起到重点企业的代表作用。■

利德曼持续改进培训项目圆满结束

为提高企业活力、提升行业内竞争力，公司于近日开展以执行、改善、持续改进为主题的系列活动。2015年3月10日，利德曼生产运营副总裁王建华先生作为培训讲师，为来自各中心事业部子公司员工进行了“持续改进2015”项目培训。

生产运营副总裁王建华先生详细介绍了“持续流程改进 Sustainable Process Improvement” (SPI) 在企业运营中起到的作用。会上，参训人员分组，根据工作中出现的待改进现象进行汇总、分类、讨论。培训讲师通过持续流程改善案例详细解读了以 PDCA 原则完成持续改进项



目的基本步骤与原理，介绍了完成持续改进 SPI 项目中所需的人员设置。小组发言人介绍了持续改进 SPI 项目报告，现场实践环节进一步加深了参训人员对于持续改进的全方面理解与认识。

利德曼 2015 年第一期员工生日会活动

利德曼 2015 年第一期员工生日会于 3 月 31 日在三期员工餐厅举行，为一季度出生的同事们庆祝生日。来自各中心部门 40 余人参与了本次生日会。大家齐聚一堂，欢声笑语不断。

生日会于 16:30 开始，寿星们按照月份入座，主持人在送出祝福后，便开始带领着寿星们进入游戏环节。在游戏中，大家玩得不亦乐乎。在大家意犹未尽之时，生日祝福的音乐响起，大家围在各组中央的蛋糕旁，点燃蜡烛，唱起生日歌，闭上眼睛虔诚的许愿，场面非常温馨感人。



在 2015 年一季度的最后一天，我们共同度过了一个难忘的下午。再次祝福我们所有的寿星们生日快乐，衷心希望大家在利德曼的工作中感受到快乐，感受到温暖！

非财务经理财务课程培训圆满结束

随着财务管理在企业中作用的日益凸显，让非财务管理人员理解基本财务知识，提高经营管理效率，显得尤为重要。2015 年 5 月 13 日下午，人力资源部邀请财务管理中心财务部经理王三红女士作为本次利德曼 2015 年非财务经理的财务课程系列培训的首场培训嘉宾。本次培训主要围绕财务预算的编制和财务报表的解读展开。培训讲师详细解读了大家在日常工作中对于财务相关知识的疑问。

本次针对财务预算、财务报表的培训为 2015 年非财



务经理的财务培训系列课程之一。所培训的财务管理专业知识，有助于日常相关财务工作效率的提高。

利德曼家属开放日暨利德曼儿童游乐园开园仪式

为充分体现公司对员工的关爱，使员工家属零距离了解员工的工作环境和企业发展情况，和我们的员工共同分享在利德曼的点点滴滴，5 月 30 日公司举办了首届“家属开放日暨开园仪式”活动。

员工带领自己的小朋友（学龄前儿童及小学生）到儿童乐园游玩，各种游乐设施供孩子选择，有滑梯、海洋球、蹦床、秋千等，孩子们尽情徜徉在愉快的游乐世界里，度过一个难忘的、美好的上午时光。同时六层的员工俱乐部全部开放，家属在俱乐部进行乒乓球、篮球、台球等比赛，活动一下紧绷了一周的神经，尽情展现自己的运动天赋。



中午，员工食堂准备了丰富可口的自助餐款待大家，供小朋友及家属玩得开心、吃得满意。下午，公司还准备了一系列的亲子活动，有才艺的小朋友进行了才艺展示，充分满足了孩子们的表演欲望。

利德曼 2015 爱心捐赠活动圆满结束

为进一步践行利德曼的企业社会责任，充分弘扬扶贫济困、乐善好施的传统美德，公司于 2015 年 3 月中下旬通过 OA 发布利德曼 2015 年爱心捐赠旧衣物活动的通知，人力资源部收到来自各中心部门同事的积极响应与热烈支持，本次活动总计参与人数 68 人，共计收到衣物 1107 件。2015 年 5 月 8 日，在行政办公室同事的协助下，对所有爱心捐赠衣物统一整理打包，并运送至中国社会福利基金会随手公益基金组织。

随手公益基金由中国社会科学院著名学者于建嵘教授发起的“随手”系列公益活动整合而成的，其是中国社会福利基金会管理下的公募基金。随手公益基金秉承“随心而为、手留余香”的公益理念，借助开放的网络平台，将



微公益开展成为人人参与、人人监督的全民性公益活动。本次爱心捐赠活动是利德曼与随手公益基金的第一次合作，所有爱心捐赠的衣物将由随手公益分类打包整理发至西部贫困地区。未来利德曼将继续践行企业社会责任，为爱心事业贡献自己的一份力量！

肿瘤异常蛋白 TAP

肿瘤异常蛋白 (简称 TAP) 是各种正常组织细胞发生恶变时所分泌的异常糖链糖蛋白。大量研究显示,当肿瘤细胞产生的 TAP 量达到一定程度时,即可以在末梢血液中检出。TAP 与恶性肿瘤的发生、发展、转移、及预后存在密切关系。

TAP 检测是一种组合肿瘤标志物检测技术,它在同一反应体系中将 AFP、CEA 等现有临床可以检测及部分尚无法检测的几十种糖链异常的肿瘤标志物(包括 AFP、CEA、糖类抗原、转铁蛋白、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转移酶、人绒毛膜促性腺激素、 α 1-抗胰蛋白酶及前列腺酸性磷酸酶等含有异常糖链的肿瘤标志物)进行一次性组合检测,高度集聚肿瘤信号,不仅大大提高了肿瘤检测的灵敏度和准确性,而且可以检测到更多种类的肿瘤。TAP 检测既适用于体检人群和病人的癌症筛查,早期发现癌症;也能用于癌症患者的疗效评估和复发转移动态监测及预后评估。

Tumor abnormal protein (TAP)

Tumor abnormal protein (TAP) is abnormal carbohydrate glycoprotein of all kinds of normal tissue cells during malignant transformation. A lot of research shows that TAP can be detected in the peripheral blood when it achieves a certain amount. TAP is closely related to tumor genesis, development, metastasis, and tumor prognosis.

TAP detection is a combination of tumor markers detection technique. It can detect the tumor markers in the same reaction system, contains existing items and other that still unable to be detected (including AFP, CEA, carbohydrate antigen, transferrin, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transferase, human chorionic gonadotropin, α 1- antitrypsin and prostatic acid phosphatase). Highly enhance detection signal, not only greatly improve the sensitivity and accuracy of detection, but also detect more types of cancer. TAP is suitable for the detection of cancer screening, early detection of cancer, therapeutic effect evaluation and monitoring and evaluation of prognosis and recurrence in patients with metastatic cancer. ■

循环肿瘤细胞 CTCs

循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cells, CTCs) 是指由肿瘤原发灶或转移灶脱落进入血液循环系统的肿瘤细胞。

1896 年,澳大利亚学者 Ashworth 首次提出循环肿瘤细胞的概念。进入循环的肿瘤细胞绝大多数在短期内死亡。只有极少数具有高度活力、高度转移潜能的肿瘤细胞在循环系统中存活下来,相互聚集形成微小癌栓,并在一定条件下发展为转移灶,因此在外周血中检测到肿瘤细胞预示着有发生肿瘤远处转移的可能。

循环肿瘤细胞 CTCs 特点:

- (1) 稀有性: CTCs 在血液中的数量极低,平均约每 10mL 中才会有几个;
- (2) 特异性: 不同肿瘤细胞表面表达的标示物种类及表达量不同;
- (3) 非典型的细胞形态: 肿瘤细胞通常具备较高的核质比,但入血的肿瘤细胞 CTC 由于受血液循环的影响以及一些应激反应的发生等便呈现出非典型的细胞形态。

随着现代分子生物学技术的发展,CTCs 检测方法的敏感性和特异性将不断提高,目前在单个 CTCs 水平进行基因组及 mRNA 表达谱的分析,将有助于提高人们对 CTCs 本质的认识。

作为一种非侵袭性的检测手段,CTCs 的检测可有效应用于体外早期诊断、化疗药物的快速评估、个体化治疗,临床筛药、耐药性的检测、肿瘤复发的监测以及肿瘤新药、药物靶向治疗的开发等。

Circulating tumor cells (CTCs)

Circulating tumor cells (CTCs) are rare malignant cells found in the peripheral blood that originate from the primary tumor or metastatic sites.

Ashworth proposed the concept of circulating tumor cells for the first time in 1896. The majority of CTCs are dead in a short time. Only very few tumor cells with high viability and high potential of metastasis can survive in the circulation system and develop to metastases under certain conditions. Therefore, the detection of tumor cells in peripheral blood may indicate tumor metastasis occur.

The characteristics of circulating tumor cells:

- (1) Scarcity: the number of CTCs in blood is extremely low.
- (2) Specificity: the species classes and expression of biomarkers are different between different tumor cells.
- (3) Atypical cells: tumor cells usually has a high ratio nuclear mass. But tumor cells, especially CTCs present a typical morphology due to the influence of the circulation of blood and some of the stress reactions.

With the development of molecular biology techniques, the detection sensitivity and specificity of CTCs will continue to improve. At present the single genome level and mRNA expression analysis of CTCs will help to better understand the essential of CTCs. As a noninvasive detection method, the detection of CTCs can be effectively applied to early diagnosis and rapid assessment of chemotherapeutic drugs and individualized treatment, clinical drug screening, drug resistance detection, monitoring of tumor recurrence, targeted therapy of cancer drugs, drug development, etc. ■