

目前, PCT 检测方法众多, 且多以进口试剂为主, 如罗氏、西门子、生物梅里埃等, 但这些试剂与所用仪器采用封闭式系统, 即仪器与试剂必须配套使用方可保证检验结果的准确性, 因此检验试剂价格昂贵, 故而如果在基层医院采用进口仪器设备进行该项目的检测, 无疑增加了医疗成本。与之相对的是, 成本较低的国产仪器及试剂盒, 但国产试剂盒的检测效能需要进行验证。本次试验采用国产仪器及配套试剂进行 PCT 的检测, 试验结果显示: 采用品牌为新产业的化学发光检测系统进行 PCT 的检测, 其精密度良好, 低值样本的不精密度为  $CV_{\text{批内}} = 1.56\%$ ,  $CV_{\text{批间}} = 2.30\%$ ; 中值样本为  $CV_{\text{批内}} = 2.23\%$ ,  $CV_{\text{批间}} = 3.05\%$ , 均小于厂家提供的  $CV_{\text{批内}} \leq 5\%$ ,  $CV_{\text{批间}} \leq 10\%$ , 完全符合有关规定要求。在  $0.5 \sim 98.0 \text{ ng/mL}$  浓度范围内线性良好,  $Y = 0.99722X + 0.17377$ ,  $r^2 = 0.99812$ , 该浓度范围为临床患者检测的常见范围, 可以满足临床诊断要求。检测系统携带污染率为  $0.89\%$ , 低于  $3\%$  的要求, 样本间交叉污染小, 不会因为上一个较高浓度的 PCT 样本, 引起下一个低浓度样本升高, 因此可以满足检测要求; 通过与靶标仪器梅里埃 mini VIDAS 荧光免疫分析仪进行比较, 结果呈明显相关,  $Y = 1.004X + 0.00559$ ,  $r^2 = 0.99958$ 。

综上所述, 在新产业 MAGLUMI4000 化学发光仪上检测 PCT 的性能良好, 不会出现不正确或错误的检验结果, 且成本较进口试剂低廉, 操作简便, 可以单个或批量检测, 每小时可完成上百个测试, 完全可满足临床使用, 对于提高临床细菌感染的诊断水平, 降低医疗成本都具有十分重要的意义。

#### 参考文献

- [1] 曹艳林, 刘德贝, 夏先考. 新生儿肺炎合并脓毒症患儿检测 · 临床研究 ·

- 测血清降钙素原和高敏 C 反应蛋白的临床价值[J]. 检验医学, 2014, 29(10): 1000-1003.
- [2] 曹校校, 李强, 陈荣. 降钙素原与 C-反应蛋白联合检测在成人细菌性肺炎中的临床评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(19): 4933-4935.
- [3] Ramirez P, Garcia MA, Ferrer M, et al. Sequential measurements of procalcitonin levels in diagnosing ventilator-associated pneumonia[J]. Euro Respir J, 2008, 31(2): 356-362.
- [4] CLSI. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [5] CLSI. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach[S]. Wayne, PA: CLSI, 2003.
- [6] CLSI. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples[M]. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI, 2002.
- [7] 陆一鸣. 降钙素原 PCT 感染诊治新技术[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20): 2641-2642.
- [8] 吴修宇, 邓梦, 黎杨杨, 等. 降钙素原在感染性疾病中的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(1): 75-77.

(收稿日期: 2016-01-11 修回日期: 2016-03-20)

## U266 多发性骨髓瘤细胞株中 CD138 阴性细胞的分离和培养

张 霞, 胡大春

(云南省昆明市第一人民医院检验科 650011)

**摘要:**目的 从 U266 多发性骨髓瘤细胞株中分离 CD138 阴性细胞, 对其进行培养, 观察分离到的 CD138 阴性细胞的生长特性。方法 用免疫磁珠法分离 U266 多发性骨髓瘤细胞株中的 CD138 阴性细胞, 用干细胞培养基进行培养。结果 从 U266 多发性骨髓瘤细胞株中分离 CD138 阴性细胞在干细胞培养基内呈球体生长。结论 CD138 阴性细胞具有干细胞生长的相关特征。

**关键词:** 多发性骨髓瘤; CD138; 肿瘤干细胞

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.041

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2016)14-1999-03

多发性骨髓瘤(MM)是一种主要发生于中老年人群的恶性浆细胞肿瘤, 在欧美国家血液肿瘤中的占比达  $10\%$ 。近年来, 随着我国进入老龄化社会, MM 的发病率已呈明显上升趋势<sup>[1]</sup>。目前 MM 治疗措施已有大的进步。可同时针对 MM 细胞本身和其所处微环境进行大剂量化疗治疗, 这些大剂量化疗联合应用自体造血干细胞移植和(或)异体造血干细胞移植, 使得部分患者可获得完全缓解(CR), 但这些患者多数会出现复发。其复发的主要原因之一是存在于微量残留病灶(MRD), 即在患者的体内可能存在极少量能够诱导肿瘤复发的“种子细胞”或者说“肿瘤干细胞”<sup>[2]</sup>。2012 年 Kawano 等<sup>[3]</sup>发现, 复发、进展中的 MM 患者与未治疗的 MM 患者比较, CD138 阴性 B 细胞比例有着显著增加。通过实验研究也发现 CD138 阴性 B 细胞增多和 MM 患者的不良预后、细胞表型的更幼稚, 以及对

雷利度胺和治疗表现为低敏感, 这些特征都证明 CD138 阴性 B 细胞可能是 MM 肿瘤干细胞。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 人 MM 细胞 U266 购自中国科学院昆明动物研究所。

**1.2 仪器与试剂** 改良型 RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; RNAiso Plus 购自 TaKaRa 公司; CDNA 逆转录试剂盒购自广州复能基因有限公司; LONZA X-VIVO 无血清培养基购自 LONZA 公司; rhIL-3、SCF 和 LIF 购自 PeproTech 公司; PE-CD138 抗体购自贝克曼公司; MicroBead CD138 抗体购自德国美天旌公司。

**1.3 方法** U266MM 细胞株中 CD138 阴性细胞的分选和培养。首先对 U266 细胞进行预处理, 使用 MicroBead CD138 抗

体和 U266 细胞进行孵育,然后用分离系统分离获取 CD138 阴性细胞,最后用干细胞培养基和干细胞培养 6 孔板进行培养。5 d 进行 1 次传代,2 次传代后在进行 1 次免疫磁珠分离,培养 5 d 后观察细胞生长的特征、流式细胞 CD138 阴性细胞纯度的鉴定及传代培养。干细胞培养基配制:由无血清 LONZA X-VIVO 培养基按比例加入 20 ng/mL 人类重组白细胞介素 3 (rhIL-3)、50 ng/mL 白血病抑制因子(LIF)、20 ng/mL 干细胞因子(SCF)。

2 结 果

2.1 U266 MM 细胞株中 CD138 阴性细胞分选与纯度分析 第 1 次磁珠法分选收集到 CD138 阴性细胞悬液,用 PE-CD138 荧光抗体染色,进行流式细胞技术纯度分析,其中 CD138 阴性细胞数仅占 41.4%。由于第 1 次分选到的细胞中 CD138 阴性细胞占比较低,不能满足分析需求,因此对第 1 次分选收集到细胞进行培养后在进行第 2 次磁珠分选和第 2 次流式细胞技术纯度分析。第 2 次磁珠分选后得到的 CD138 阴性细胞纯度为 71.6%,见图 1。

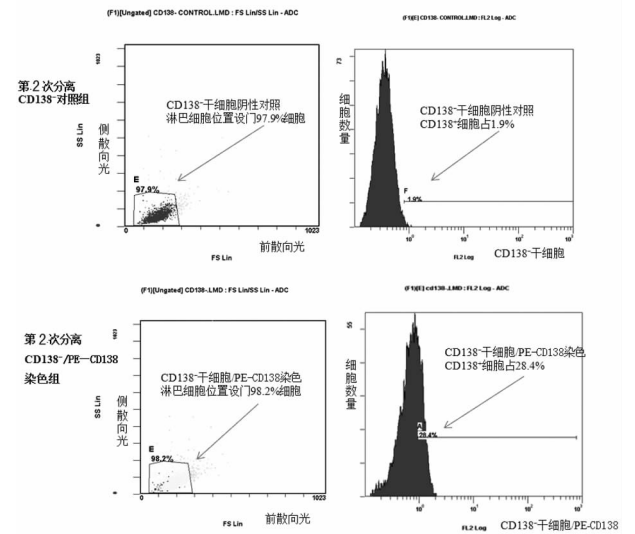


图 1 第 2 次磁珠分选 CD138 阴性细胞结果

2.2 CD138 阴性细胞在干细胞培养液中的生长情况 CD138 阴性细胞在干细胞培养液中呈漂浮立体球状生长,球体巨大,细胞之间结合紧密,其生长情况见图 2(低倍镜)。

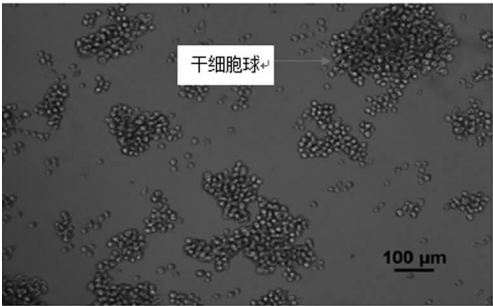


图 2 CD138 阴性细胞在干细胞培养液中的生长情况(10×)

3 讨 论

2004 年 Matsui 证实 MM 肿瘤样本和细胞系中存在克隆性极强的 CD19<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>肿瘤干细胞<sup>[4]</sup>,而源自 MM 细胞系和临床患者骨髓标本中的 CD138<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>细胞也被认为是 MM 干细胞<sup>[5]</sup>。而肿瘤干细胞是肿瘤细胞增殖、化疗耐药、转移及复发的重要因素,更是治疗的一个关键靶点<sup>[6]</sup>。

目前肿瘤干细胞研究的首要问题就是分离与鉴定。目前,肿瘤干细胞常用的分离方法有无血清悬浮细胞培养法<sup>[7]</sup>、侧群细胞法<sup>[8]</sup>、流式细胞分选法<sup>[9]</sup>和免疫磁珠分选法<sup>[10]</sup>。无血清悬浮培养法是人为地制造一富集肿瘤干细胞的培养环境,与肿瘤干细胞实际生长的体内微环境不尽相同,目前有争议;侧群细胞法荧光染料本身具有细胞毒性,被标记分选出的细胞活性有可能受到影响,从而影响实验效果和准确性;流式细胞分选法应用广泛,但耗时较长,分选的细胞活性可能受损影响功能;免疫磁珠法免疫磁珠特异性高,适合分选单个阳性表达的细胞,且分选的细胞纯度及细胞活力均较高,并且可以短时间内反复大量获取所需要的干细胞。本试验经过 2 次磁珠分选后 CD138 阴性细胞地纯度才达到 71.6%。因为分选的 CD138 阴性细胞属非阳性细胞,在分选过程中,附着在 LD 柱上的 CD138 阳性细胞可因多种因素进入到 CD138 阴性细胞中,导致 CD138 阴性细胞的纯度下降:(1)细胞因素,离心的细胞未用胰酶消化,细胞成团,细胞团中心的细胞与免疫磁珠上的 CD138 抗体未充分接触;细胞计数误差大远低于实际细胞数,导致免疫磁珠 CD138 抗体用量不足;(2)免疫磁珠 CD138 因素,主要见于免疫磁珠的抗体效价下降,导致免疫磁珠 CD138 用量不足;(3)操作者因素,一次性在柱上加入大于说明书规定的 buffer 用量,将 CD138 阳性细胞带入 CD138 阴性细胞中;(4)细胞自身因素,细胞活性下降,CD138 阴性细胞含量很少等原因。因此欲获取纯度较高的 CD138 阴性细胞,一般都要经过 2 次或多次分选才可能获得较高纯度。

在对 CD138 阴性细胞培养中,选择 2 种刺激造血干细胞的细胞因子,rhIL-3 和 SCF 刺激其生长。同时添加 LIF 抑制 CD138 阴性细胞向下分化,维持其多能性。另外选择含有 IM-DM、胰岛素、转铁蛋白和人血清清蛋白无血清淋巴细胞培养基作为基础培养液添加生长因子联合配成干细胞培养基。

用干细胞培养液对 CD138 阴性细胞培养 5~7 d 培养形成漂浮状的球体细胞,通常干细胞生长的球体形状可作为干细胞鉴定的一个依据,但是该方法仍有其自身的不足<sup>[11]</sup>:肿瘤球仍然是个混合细胞群体,它仅代表一小部分的肿瘤起源细胞,其潜在的异质性通过肿瘤球筛选可能被丢失。另外,这些肿瘤球传代要进行大量扩增,而在扩增的过程中可能诱导细胞生物学和基因表达的改变,需要强有力的证据来鉴定细胞表面抗原。因此可选择少量干细胞胚胎标记物来对肿瘤球进行鉴定,同时也可用 TSC 基于 SP 细胞特性、肿瘤细胞体外形成克隆能力、动物致瘤性试验等来对肿瘤球进行鉴定。目前已有资料表明 MM 中 CD138 阴性细胞表达胚胎干细胞标志 SOX2<sup>[12]</sup>。本试验由于经费非常紧张,未进行相关的试验进行 CD138 阴性球体细胞的验证,为本试验的一个缺陷。

参考文献

[1] Rajkumar SV. Multiple myeloma;2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2012, 87(5): 511-519.

[2] Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, et al. Understanding the cancer stem cell[J]. Br J Cancer, 2010, 103(4): 439-445.

[3] Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide[J]. Int J Oncol, 2012, 41(3): 876-884.

- [4] Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells[J]. Blood, 2004, 103(6):2332-2336.
- [5] Yang C, Wang J, Chen D, et al. Paclitaxel-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles inhibit growth of CD138<sup>+</sup> D34<sup>+</sup> tumor stem-like cells in multiple myeloma-bearing mice[J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8(10):1439-1449.
- [6] Xia J, Chen C, Chen Z, et al. Targeting pancreatic cancer stem cells for cancer therapy[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826(2):385-399.
- [7] Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(10):1453-1468.
- [8] Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(39):14228-14233.
- [9] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(3):973-978.
- [10] Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 16):3539-3545.
- [11] 窦骏. 肿瘤干细胞[M]. 南京:东南大学出版社, 2009: 231.
- [12] 李雅婷, 窦骏, 文萍, 等. 小鼠骨髓瘤中肿瘤干细胞的初步分析[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(4):31-35.
- (收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-03-29)
- 临床研究 •

## 抗突变型瓜氨酸波形蛋白抗体在类风湿关节炎诊断中的应用价值

夏秋风, 张 慧, 邹晓月, 张龙峰

(江苏大学附属医院检验科, 江苏镇江 212001)

**摘 要:**目的 了解抗突变型瓜氨酸波形蛋白(MCV)抗体在类风湿关节炎(RA)诊断中的意义,并比较抗 MCV 抗体与类风湿因子(RF)、红细胞沉降率(ESR)、抗环瓜氨酸多肽(CCP)抗体的相关性。方法 对 90 例 RA 患者(RA 组)、56 例非 RA 患者(非 RA 组)和 85 例健康体检人员(对照组),应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中的抗 MCV 抗体,同时检测 87 例 RA 患者类风湿因子(RF)、ESR、CCP 抗体指标,用统计学方法分析抗 MCV 抗体的诊断价值。结果 抗 MCV 抗体对 RA 诊断的敏感性为 78%,特异性为 69%,阳性预测值为 73%,阴性预测值为 76%。抗 MCV 抗体的平均浓度依次为(459±441)U/mL(RA 组)、(42±136)U/mL(非 RA 组)、(46±152)U/mL(对照组),RA 组的平均抗体浓度较高。RA 组活动期[(600±420)U/mL]比慢性期[(70±202)U/mL]抗 MCV 抗体的平均浓度显著增高。抗 MCV 抗体与抗 CCP 抗体( $r=0.602, P=0.000$ )的相关性较与 RF( $r=0.237, P<0.05$ )的相关性强,与 ESR 无相关性( $P=0.53$ )。结论 抗 MCV 抗体在 RA 中具有较高的敏感性和特异性,与抗 CCP 抗体、RF 有正相关性,联合抗 CCP 抗体、RF 检测可提高 RA 的诊断效率。动态监测抗 MCV 抗体的浓度可用于判断 RA 的病情活动程度。

**关键词:**类风湿关节炎; 突变型瓜氨酸波形蛋白; 类风湿因子; 红细胞沉降率; 环瓜氨酸多肽; 抗体

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.042

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2016)14-2001-03

类风湿关节炎(RA)是一种高发的致畸性自身免疫性疾病。早期诊断并及时治疗可以减少骨关节破坏并改善预后。近年来有多种针对 RA 的自身抗体已用于临床检测。类风湿因子(RF)和抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体等是辅助诊断 RA 的常用检测指标。有报道显示抗 CCP 抗体较 RF 的敏感性差,但特异性高,单独检测某个指标,容易引起 RA 的漏诊<sup>[1-2]</sup>。目前多个血清学检测指标联合检测更能提高 RA 的诊断效率,寻找 RA 免疫学诊断的新检测指标已成为研究热点。抗突变型瓜氨酸波形蛋白(MCV)是新兴的辅助诊断 RA 的免疫学检测指标之一。抗 MCV 抗体因抗原 MCV 系天然蛋白来源和具多个潜在抗原决定簇结构特点比抗 CCP 抗体具有更高的特异性和敏感性<sup>[3]</sup>。

本研究应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗 MCV 抗体,分析其在 RA 诊断中是否比抗 CCP 抗体或 RF 具有更高的敏感性和特异性,并比较它与 RF、抗 CCP 抗体、红细胞沉降率(ESR)的相关关系,为 RA 的早期诊断及判断疾病活动程度提供有价值的帮助。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 3 月至 2015 年 12 月到本院就诊的 RA 患者 90 例作为测试组,年龄 26~78 岁,平均(60±11)岁,其中 RA 活动期 66 例,慢性期 24 例,均符合 1987 年美国风湿病协会(ARA)的诊断标准。56 例非 RA 组(其他自身免疫性疾病,主要为强直性脊柱炎、结缔组织病、系统性红斑狼疮、干燥综合征和皮炎类)作为自身免疫性疾病比较组,年龄 15~77 岁,平均(51±14)岁。85 例健康体检人员(排除自身免疫性疾病)的血清作为对照组,年龄 21~91 岁,平均(61±15)岁。RA 组和对照组年龄差异无统计学意义( $t=-1.028, P=0.306$ ),男女性别分布均匀,排除年龄、性别因素干扰。

**1.2 方法** (1)抗 CCP 抗体测定采用 ELISA 法,试剂由德国欧蒙公司提供,严格按试剂盒说明书进行操作。本实验中抗 CCP 抗体浓度超过 800 U/mL,均按 800 U/mL 计算。阳性判断标准:抗 CCP 抗体>25 U/mL。(2)RF 定量测定采用美国贝克曼库尔特公司 Immage 特种蛋白分析仪,试剂为专用试剂。阳性判断标准:RF>20 U/mL。(3)抗 MCV 抗体测定采