

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.009

血清 AFP-IgM 复合物联合肝功能检测对原发性肝癌的评价

罗子俨¹, 秦锡虎², 徐 斌³, 蒋敬庭³(1. 苏州大学附属第三医院肝胆外科; 2. 常州市中医医院肝胆外科;
3. 苏州大学附属第三医院肿瘤生物诊疗中心, 常州 213003)

【摘 要】目的: 分析新型的肝癌诊断标志物甲胎蛋白-免疫球蛋白 M (Alpha-fetoprotein-immunoglobulin M, AFP-IgM) 复合物联合肝功能检测对原发性肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 的诊断意义。方法: 收集 HCC 患者血清 64 例、肝硬化患者血清 27 例, 用酶联免疫吸附法与电化学发光法分别检测血清 AFP-IgM 复合物和甲胎蛋白 (Alpha-fetoprotein, AFP) 含量, 并收集临床肝功能检测数据。结果: 应用接受者操作特性 (Receiver operating characteristic, ROC) 曲线确定 AFP-IgM 的最佳切割值为 300 AU/ml。在此切割值下, 肿瘤直径 ≤ 3 cm 的患者血清 AFP-IgM 浓度 ($1\,195.4 \pm 561.8$) AU/ml 明显高于肿瘤直径 > 3 cm 者 (584.3 ± 771.7) AU/ml。且 AFP-IgM 浓度与临床分期比较, I ~ II 期的 HCC 患者血清中的 AFP-IgM 浓度 ($1\,033.0 \pm 508.0$) AU/ml 高于 III ~ IV 期 HCC 患者 (569.2 ± 791.7) AU/ml, 其差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。应用 ROC 曲线确定 γ -谷氨酰转氨酶 (Gamma-glutamyl transpeptidase, GGT) 的最佳切割值为 $\text{GGT} \geq 154$ U/L。在此切割值下, GGT 对 HCC 诊断的敏感度为 73.4%, 特异度为 55.6%。联合 GGT 与 AFP-IgM 对 HCC 诊断, 其敏感度为 46.9%, 特异度为 70.3%, 有效率为 53.8%。结论: AFP-IgM 检测有助于提高原发性小肝癌诊断的有效性和早期 HCC 的筛查与确诊。AFP-IgM 联合肝功能检测在临床上有助于鉴别诊断 HCC 和肝硬化, 并有望成为早期小肝癌的筛查方法之一。

【关键词】原发性肝癌; 甲胎蛋白; 甲胎蛋白-免疫球蛋白 M 复合物; 肝功能; γ -谷氨酰转氨酶

【中国图书分类法分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-19

Evaluation of hepatocellular carcinoma by combined detection of serum
AFP-IgM complex and liver functionLUO Ziyang¹, QIN Xihu², XU Bin³, JIANG Jingting³(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Third Affiliated Hospital, Suzhou University;
2. Department of Hepatobiliary Surgery, Hospital of Traditional Chinese Medicine in Changzhou;
3. Department of Tumor Biological Treatment, the Third Affiliated Hospital, Suzhou University)

【Abstract】Objective: To analyze the value of the combined detection of a new hepatocellular carcinoma (HCC) marker, alpha-fetoprotein immunoglobulin M (AFP-IgM) complex and liver function in diagnosing HCC. Methods: The serum from 64 cases of HCC and 27 cases of liver cirrhosis was collected. ELISA and electrochemiluminescence were employed in the detection of AFP-IgM complex and AFP respectively. The clinical data of patients' liver function were collected. Results: According to the receiver operating characteristic (ROC) curve, the best cut-off value of AFP-IgM immune complex was 300 AU/ml. At this best cut-off value, the serum AFP-IgM complex was significantly higher in the patients with tumor diameter ≤ 3 cm than in the patients with tumor diameter > 3 cm ($(1\,195.4 \pm 561.8)$ AU/ml vs. (584.3 ± 771.7) AU/ml). The serum AFP-IgM complex in patients at I - II clinic stages was higher than that in patients at III - IV clinic stages ($(1\,033.0 \pm 508.0)$ AU/ml vs. (569.2 ± 791.7) AU/ml) ($P < 0.01$). According to ROC curve, the best cut-off value of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) was ≥ 154 U/L. The sensitivity of GGT in the diagnosis of HCC was 73.4%, with specificity of 55.6%, and the sensitivity of combined AFP-IgM and GGT in the diagnosis of HCC was 46.9%, with specificity of primary 70.3% and effective rate of 53.8%. Conclusions: AFP-IgM detection helps to improve the effectiveness in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma and HCC at early stage. AFP-IgM combined liver function tests can help to do differential diagnosis of liver cirrhosis and HCC, which is expected to become screening method for small hepatocellular carcinoma at early stage.

【Key words】hepatocellular carcinoma; alpha-fetoprotein (AFP); alpha-fetoprotein-immunoglobulin M (AFP-IgM) complex; liver function; gamma-glutamyl transpeptidase

作者介绍: 罗子俨 (1984-), 男, 硕士,

研究方向: 肝胆胰疾病。

通信作者: 秦锡虎, 男, 教授, Email: qinxihu@126.com。

基金项目: 苏州大学医学发展基金资助项目 (编号: EE12407); 常州

市卫生局重大招标资助项目 (编号: ZD200710); 常州市

社会发展计划资助项目 (编号: CS2007202)。

原发性肝癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一,早期缺乏典型的临床表现,恶性程度高,难以早期诊断,预后较差^[1]。甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein,AFP)为最常用的 HCC 标志物,在 HCC 的定性诊断中起到了一定的作用,但只有 70% 左右的患者出现 AFP 阳性,也存在着假阳性和假阴性^[2,3],因此单独应用 AFP 诊断 HCC 有一定的局限性。肝功能指标,如谷丙转氨酶(Alanine transaminase,ALT)、 γ -谷氨酰转氨酶(Gamma-glutamyl transpeptidase,GGT)、球蛋白、白/球蛋白比值、总胆红素等,单独应用对 HCC 的诊断也有辅助作用,但同样存在阳性率、特异性不足等缺点。因此,如何提高实验室检测对 HCC 的诊断成为近年来研究的热点。

近年研究表明^[4],AFP 在 HCC 病人体内以 2 种形式存在:即游离 AFP(fAFP)和循环 IgM 复合型 AFP(AFP-IgM IC)。fAFP 和 AFP-IgM IC 不会发生交迭,存在很好的互补性。甲胎蛋白-免疫球蛋白 M (Alpha-fetoprotein-immunoglobulin M,AFP-IgM)复合物是近年发现的新型 HCC 标志物^[5]。本研究对 HCC 和肝硬化患者血清 AFP-IgM 含量进行分析,并联合肝功能指标,旨在探讨 AFP-IgM 联合肝功能检测对 HCC 的诊断意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 11 月至 2011 年 8 月苏州大学附属第三医院住院 HCC 患者 64 例空腹静脉血 5 ml,离心后血清-70℃冻存,其中男 52 例,女 12 例,中位年龄(58.1±12.3)岁。其中 HBV 阳性 52 例,阴性 12 例,丙肝抗体均为阴性;肝硬化患者 27 例空腹静脉血 5 ml,离心后血清-70℃冻存,其中男 20 例,女 7 例,中位年龄(51.2±8.8)岁。HCC 诊断以 UICC^[6]为标准,本实验肝癌均为经临床及病理证实的肝细胞肝癌。

1.2 试剂与方法

AFP-IgM 药盒(意大利 XEPTAGEN 公司,常州市欣迪商贸公司经销)、HBsAg 药盒和丙肝抗体药盒(英科新创科技有限公司),应用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。AFP 试剂盒(ROCHE 公司)和 ELECSYS 2010 电化学发光分析仪(瑞士 ROCHE 公司),应用电化学发光法测定。肝功能试剂盒和日立 7600-120 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司),应用速率法,由苏州大学附属第三医院检验科检测。

1.3 统计学方法

实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,全部数据用 SPSS 13.0 统计学软件包进行统计分析,所有数据比较采用 Mann-Whitney 检验和 Pearson 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。肝功能检测指标与 AFP-IgM 的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以 HCC 患者出现 AFP-IgM 或肝功能大于最佳切割(Cut-off)值为真阳性(True positive,TP),HCC 中阴性为假阴性(False negative,FN),肝硬化阳性为假阳性(False positive,FP),肝硬化阴性为真阴性(True negative,TN),诊断效能评价以敏感度和特异度表示。敏感度=TP/(TP+FN)×100%,特异度=TN/(TN+FP)×100%,有效率=(TP+TN)/(TP+FP+TN+FN)×100%。

2 结果

2.1 AFP-IgM 不同浓度的表达与肝癌参数的比较

本中心前期研究结果^[7]采用接受者操作特性曲线(Receiver operating characteristic,ROC)统计分析,确立 AFP-IgM 对 HCC 诊断的最佳切割值为 AFP-IgM>300 AU/ml,以此作为诊断肝癌的临界值。AFP-IgM 含量与 HCC 患者的性别和 HBV 感染比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。肿瘤直径小于 3 cm 者血清 AFP-IgM 含量为(1 195.4±561.8) AU/ml,大于 3 cm 者 AFP-IgM 含量为(584.3±771.7) AU/ml,差异有统计学意义($P < 0.01$)。根据美国癌症联合委员会(AJCC)标准对 HCC 进行临床分期,I~II 期 HCC 患者血清 AFP-IgM 含量为(1 033.0±508.0) AU/ml,III~IV 期 HCC 患者 AFP-IgM 含量为(569.2±791.7) AU/ml,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 AFP 比较,见表 1。

表 1 肝癌组中 AFP-IgM、AFP、GGT 与临床参数相关趋势($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Relative tendency among AFP-IgM,AFP,GGT and clinic data in HCC group($\bar{x} \pm s$)

参数		例数	AFP-IgM (AU/ml)	Z 值	P 值	AFP (AU/ml)	Z 值	P 值	GGT (U/L)	Z 值	P 值
性别	男	52	660.6 ± 723.6	-0.722	0.470 0	10 028.3 ± 27 794.8	-0.817	0.414	166.2 ± 153.3	-0.641	0.521
	女	12	675.6 ± 951.5			8 419.9 ± 24 353.4			115.8 ± 71.1		
HBV	-	12	560.5 ± 573.2	-0.292	0.770 0	944.2 ± 2 768.7	-2.228	0.026	175.7 ± 202.5	-0.086	0.932
	+	52	686.0 ± 802.4			11 752.8 ± 29 614.3			151.0 ± 126.6		
直径	≤3	10	1 195.4 ± 561.8	-3.162	0.002 0	260.8 ± 515.3	-2.219	0.026	86.2 ± 64.7	-1.315	0.195
	>3	54	584.3 ± 771.7			11 478.6 ± 29 101.5			162.8 ± 145.0		
数目	1	37	579.9 ± 769.1	-1.298	0.194 0	6 327.6 ± 16 276.2	-0.850	0.396	139.9 ± 145.2	-1.636	0.102
	>1	27	777.9 ± 753.4			14 384.8 ± 36 898.6			175.6 ± 135.0		
分期	I ~ II	13	1 033.0 ± 508.0	-3.513	0.000 4	218.5 ± 479.6	-2.587	0.010	175.6 ± 135.0	-0.776	0.449
	III ~ IV	51	569.2 ± 791.7			12 150.4 ± 29 823.4			158.1 ± 142.4		

2.2 HCC 组和肝硬化组肝功能各项指标和 AFP-IgM 的相关性比较

对 HCC 组和肝硬化组病例肝功能指标和 AFP-IgM 含量进行相关性分析。HCC 组患者血清球蛋白和总胆红素水平与 AFP-IgM 含量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。其它肝功能指标与 AFP-IgM 比较差异无统计学意义。肝硬化组患者肝功能指标 ALT 表达水平与 AFP-IgM 含量有显著相关性,差异具有统计学意义($P<0.01$)。但其它肝功能指标与 AFP-IgM 比较,其差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各分组肝功能检测指标与 AFP-IgM 相关性

Tab.2 Correlations between liver function test indicators and

参数	AFP-IgM		肝硬化
	球蛋白	总胆红素	
r 值	0.305	0.305	0.518
P 值	0.029	0.029	0.007

2.3 HCC 与肝硬化 2 组肝功能检测的比较

对 HCC 与肝硬化 2 组肝功能检测进行比较分析,GGT、球蛋白、总胆红素的血清含量、白蛋白/球蛋白比值存在差异,差异具有统计学意义($P<0.01$)。且 GGT 在 HCC 组中的含量(155.3 ± 140.7) U/L 明显高于肝硬化组(86.6 ± 65.8) U/L。而球蛋白、总胆红素的血清含量均为 HCC 组低于肝硬化组。见表 3。

表 3 HCC 与肝硬化 2 组肝功能检测的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison on liver function test indicators between

HCC and liver cirrhosis ($\bar{x} \pm s$)					
分组	例数	GGT (U/L)	球蛋白 (g/L)	总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	白/球蛋白 比值
肝癌	64	155.3 ± 140.7	31.9 ± 7.0	17.5 ± 13.7	1.2 ± 0.3
肝硬化	27	86.6 ± 65.8	41.8 ± 20.3	53.6 ± 52.6	0.8 ± 0.3
Z 值		-2.278	-3.684	-5.063	-3.991
P 值		0.023 0	0.000 2	<0.000 1	<0.000 1

2.4 AFP-IgM 和 GGT 对 HCC 诊断的 ROC 曲线(图 1)

AFP-IgM 对 HCC 诊断的最佳切割值 AFP-IgM > 300 AU/ml, 以此作为诊断肝癌的临界值。在此切割值下,本实验血清 AFP-IgM 对 HCC 诊断的敏感度为 63.5%, 特异度为 50.0%。AFP-IgM 曲线下面积为 0.698, 95% 可信区间为 0.582~0.814。

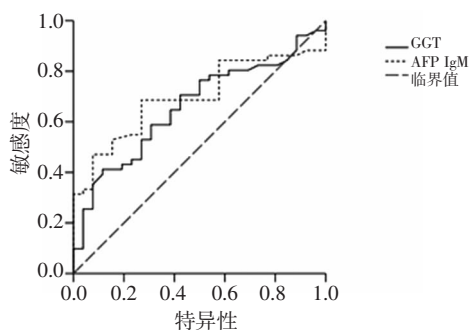


图 1 AFP-IgM 和 GGT 对 HCC 诊断的 ROC 曲线

Fig.1 ROC curve of AFP-IgM and GGT in the diagnosis of HCC

GGT 对 HCC 诊断的最佳切割值 $\text{GGT} \geq 154$ U/L, 以此作为诊断 HCC 的临界值。在此切割值下,本实验血清 GGT 对 HCC 诊断的敏感度为 73.4%, 特异度为 55.6%。GGT 曲线下面积为 0.660, 95% 可信区间为 0.536~0.783。

2.5 AFP-IgM 联合肝功能 GGT 检测

以 HCC 患者出现 AFP-IgM 或肝功能大于最佳切割值为 TP, HCC 中阴性为 FN, 肝硬化阳性为 FP, 肝硬化阴性为 TN, 诊断效能评价以敏感度和特异度表示。AFP-IgM+GGT, 即两者均为阳性, 对 HCC 诊断的敏感度为 46.9%, 特异度为 70.3%, 有效率为 53.8%。见表 4。另外, AFP-IgM 联合其他多项肝功能指标进行分析, 如在 HCC 和肝硬化组中存在明显差异的球蛋白、总胆红素等, 其检测对 HCC 的诊断意义不大, 敏感性仅在 40% 以内, 特异度也不高。

表 4 AFP-IgM 联合肝功能 GGT 检测诊断效能比较

Tab.4 Comparison on efficiency among tests of AFP-IgM, GGT

and AFP-IgM combined with GGT			
参数	敏感度	特异度	有效率
AFP-IgM	63.5%	50.0%	52.3%
GGT	73.4%	55.6%	64.5%
AFP-IgM+GGT	46.9%	70.3%	53.8%

3 讨论

HCC 常在肝炎病毒感染等基础上发生, 在免疫应答过程中, AFP 的作用是免疫抑制, 主要表现为抑制母体对胚胎发育的免疫应答以及肿瘤患者对肿瘤的免疫应答, 而 IgM 在免疫调节中起到了重要的作用。AFP 用于定性诊断 HCC 的价值已得到肯定, 但文献报道^[8]其对肝癌诊断的阳性率也仅在 60%~70% 之间, 且假阳性率较高, 易受其他因素影响, 如 HBV、HCV 感染。AFP 对 HCC 诊断的假阴性率或假阳性率可达 40% 以上, 晚期 HCC 患者 AFP 的假阴性率为 15%~20%^[9], 部分 HCC 患者的血清 AFP 浓度不升高或轻微升高但低于 400 $\mu\text{g/L}$, 尤其是直径小于 3 cm 的原发性小肝癌。在 HCC 早期, 癌细胞分化接近正常时, 或变性坏死组织被结缔组织包裹或癌组织中结缔组织过多时, 也易造成 AFP 假阴性, 运用单一的 AFP 诊断 HCC 易造成漏诊与误诊^[10], 因此, 寻求一种早期诊断的方法非常重要。

本研究显示, AFP-IgM 含量与 HCC 患者性别、是否感染 HBV 尚无关系。肝脏肿瘤直径 ≤ 3 cm 的患者血清 AFP-IgM 含量为 ($1\ 954 \pm 561.8$) AU/ml, 肿瘤直径 > 3 cm 者血清 AFP-IgM 含量为 (584.3 ± 771.7) AU/ml, 可见, 肿瘤直径 ≤ 3 cm 组 AFP-IgM 含量明显高于肿瘤直径 > 3 cm 组, 而血清 AFP 水平与之相反。肿瘤的大小与 AFP-IgM 密切相关, 即肿瘤越小, 患者血清 AFP-IgM 的阳性率越高, 特别是

对于肿瘤直径 <3 cm 的小肝癌尤为明显。该结果与本中心 Jiang 等^[7]的实验有类似的结论。虽然 AFP 也可鉴别原发性小肝癌,但小肝癌患者 AFP 含量明显低于 AFP-IgM,因此,患原发性小肝癌时检测 AFP-IgM 更准确。AFP-IgM 对肿瘤直径 ≤ 3 cm 的原发性小肝癌诊断具有一定意义,且明显优于 AFP。由于细胞坏死或退行性变的肝癌、纤维板层肝癌和肿瘤直径 3 cm 以下小肝癌,AFP 都可能为阴性,因此采用 AFP-IgM 检测,弥补了上述缺陷,以提高肿瘤直径 3 cm 以内小肝癌诊断的有效性。肝癌细胞容易侵犯血管,造成癌细胞的血行播散,被认为是影响肝癌切除术后复发和转移的重要原因,由此可见能尽早发现小肝癌,这对于指导治疗、判断疗效及预后等都具有重要的意义^[4]。

AFP-IgM 浓度与 HCC 分期呈负相关,根据 AJCC 标准对 HCC 进行临床分期,Ⅰ~Ⅱ期 HCC 患者血清 AFP-IgM 浓度明显高于Ⅲ~Ⅳ期 HCC 患者,其差异有统计学意义($P<0.05$)。这可能因为肝细胞受损修复时 AFP 有不同程度升高^[11],同时产生 AFP-IgM,由于 AFP-IgM 分子量^[4]大,进入外周血更早被检出,但 IgM 具有出现早,半衰期短的性质,且中晚期 HCC 患者肝功能严重受损,引起肿瘤免疫耐受,免疫球蛋白合成减少导致中晚期肝癌患者外周血中 AFP-IgM 分泌量减少。HCC 患者在临床Ⅰ期时没有显著的临床症状,一般不易发现,Ⅰ~Ⅱ期 HCC 患者血清 AFP 含量仅为 (218.5 ± 479.6) AU/ml,如果 AFP 阴性则发现率更低,待到出现临床症状时,已属于Ⅲ期或Ⅳ期,失去了最佳治疗时机。HCC 患者血清 AFP 的水平高低与肝癌细胞分化程度有关,Ⅰ~Ⅱ期 HCC 细胞分化接近正常细胞,故 AFP 不足以测出。而Ⅰ~Ⅱ期 HCC 患者血清 AFP-IgM 浓度为 $(1\ 033.0 \pm 508.0)$ AU/ml,Ⅲ~Ⅳ期患者为 (569.2 ± 791.7) AU/ml,说明早期 HCC 测定 AFP-IgM 含量更加准确,不易漏诊。由于Ⅰ~Ⅱ期 HCC 患者常用肿瘤标记物 AFP 的含量水平明显低于Ⅲ~Ⅳ期患者,而 AFP-IgM 则与之相反,如表 1 所示,因此 AFP-IgM 对早期 HCC 的诊断优于 AFP。故对 HCC 的高发区要进行普查 AFP,尤其应该采用 AFP-IgM 检测,以提高早期 HCC 诊断的有效性。

在临床影像学检查时,HCC 和肝硬化均可呈小结节病灶,且临床症状也可相同,两者也可同时存在。AFP-IgM 作为新型 HCC 标志物^[5],对于早期 HCC 和小肝癌的诊断优于其他肝癌相关的肿瘤标志物,包括 AFP,但是用于鉴别 HCC 和肝硬化则有一定局限性。单独应用 AFP-IgM 对 HCC 诊断的敏感度为 63.5%,特异度为 50.0%,特异度并不高。肝功能检

测临床上常用于评价肝脏功能,由于肿瘤标志物的出现和影像学检查的发展,肝功能检测对肝癌的诊断作用往往被人们忽视。因此,联合检测 AFP-IgM 和肝功能,以求弥补 AFP-IgM 的缺陷,达到鉴别诊断 HCC 与肝硬化的意义,尤其是早期原发性小肝癌。肝功能检测指标中,GGT 在体内分布较为广泛,但血清中的 GGT 主要来自肝脏,具有较强的组织特异性。GGT 对 HCC 诊断的阳性率为 73.4%,明显高于 AFP 的阳性率(60.8%)^[7],且在 HCC 与肝硬化间比较差异有统计学意义,如表 3 所示。根据 GGT 的临床正常参考值为 3~73 U/L,ROC 曲线确立的切割值为 $GGT \geq 154$ U/L,在此切割值下,GGT 对 HCC 诊断的敏感度为 73.4%,特异度为 55.6%。联合 GGT 与 AFP-IgM 对 HCC 诊断,即两者均为阳性,其敏感度为 46.9%,特异度为 70.3%,有效率为 53.8%。再对比单独应用 AFP-IgM 对 HCC 诊断的敏感度虽然为 63.5%,有效率与之相当,但特异度仅为 50.0%,明显低于联合诊断。可见,联合 GGT 与 AFP-IgM 在 HCC 和肝硬化患者中对 HCC 诊断时,特异度明显升高,虽然敏感度稍有降低,但有效率也超过 50%,与 AFP-IgM 相当。因此,除了 AFP,AFP-IgM 联合肝功能(GGT)检测对 HCC 和肝硬化的鉴别诊断也有重要意义,尤其是早期原发性小肝癌。

综上所述,检测血清 AFP-IgM 有助于提高原发性小肝癌诊断的有效性和早期 HCC 的筛检与确诊。AFP-IgM 联合肝功能(GGT)检测在临床上有助于鉴别 HCC 和肝硬化,并有望成为除了 AFP 以外鉴别早期原发性小肝癌和肝硬化的筛选指标之一。

参 考 文 献

- [1] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis[J]. Seminars in Liver Disease, 2010, 30(1): 3-16.
- [2] Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, et al. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2C): 1747-1753.
- [3] Tong M J, Blatt L M, Kao V W. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis in the United States of America[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(5): 553-559.
- [4] Beneduce L, Castaldi F, Marino M, et al. Improvement of liver cancer detection with simultaneous assessment of circulating levels of free alpha-fetoprotein (AFP) and AFP-IgM complexes[J]. Int J Biol Markers, 2004, 19(2): 155-159.
- [5] Nakamura K, Zen Y, Sato Y, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver[J]. Hum Pathol, 2007, 38(10): 1532-1546.
- [6] Novak J, Fabian P. Comments on the TNM classification of malignancy[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(26): 3333-3334.

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.010

兔骨髓间充质干细胞的体外分离、培养及诱导分化

张超,王涛

(重庆市口腔疾病与生物医学研究中心、重庆医科大学附属口腔医院颌面外科,重庆 400015)

【摘要】目的:研究兔骨髓间充质干细胞(Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells,rBMSCs)的体外分离培养,观察其生长特性并探讨其定向诱导分化为成骨细胞和成脂肪细胞的途径,为种子细胞的选择提供一定的实验基础。方法:乌拉坦麻醉下耳缘静脉空气栓塞处死兔子,无菌条件下取出兔股骨,用 percoll 液密度梯度离心法+全骨髓贴壁培养法相结合进行体外培养、传代,倒置显微镜下观察细胞形态。取第 3 代细胞向成骨细胞和成脂肪细胞诱导,14 d 后成骨细胞诱导组检测碱性磷酸酶,成脂肪细胞诱导组进行油红 O 染色。结果:percoll 密度梯度离心法+全骨髓贴壁培养法可成功获得 rBMSCs,具有活跃的增殖能力。第 3 代细胞的生物学特征基本一致,并能定向诱导分化为成骨细胞及成脂肪细胞。成骨细胞诱导组碱性磷酸酶检测表达呈强阳性,成脂肪细胞诱导组油红 O 染色见胞浆内出现大量红染脂滴。结论:percoll 密度梯度离心法+全骨髓贴壁培养法可成功分离和培养 rBMSCs,其生长稳定,增殖力强,能定向诱导分化为成骨细胞及成脂肪细胞,可见 rBMSCs 是组织工程的优良种子细胞。

【关键词】骨髓间充质干细胞;定向分化;兔

【中国图书分类法分类号】R318.0

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-02-08

Isolation, cultivation and differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

ZHANG Chao, WANG Tao

(Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science; Department of Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the isolation and cultivation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells(rBMSCs) in vitro, to observe their biological characteristics and to discuss the paths of inducing the rBMSCs into osteoblasts and lipoblasts in order to provide experimental basis for selecting seed cells. Methods: The rabbit was put to death by air embolism to the ear marginal vein with the anesthesia of urethane. The femur of the rabbits was got under the sterilized condition. rBMSCs were separated by percoll density gradient centrifugation method and the whole bone marrow adherence culture method in vitro. The morphology of cells was observed by inverted microscope. At the third passage, rBMSCs were chosen to be induced into osteoblasts and lipoblasts. After 14 d of incubation, alkaline phosphatase detection was used in osteoblast-induced group and oil red O staining was performed in lipoblast-induced group. Results: The rBMSCs with good reproductive activities were obtained successfully by percoll density gradient centrifugation and the whole bone marrow adherence culture method. The biological characteristics of the cells in the third generation were identical. In osteoblast-induced group, alkaline phosphatase test showed strong positive expression. After oil red O staining, there was a large number of intracytoplasmic lipid droplets stained red in lipoblast-induced group. Conclusions: rBMSCs can be isolated and proliferated effectively by percoll density gradient cen-

作者介绍:张超(1988-),女,硕士,

研究方向:口腔颌面外科。

通信作者:王涛,男,教授,Email:taosan@126.com。

nant tumours-7th edition[J].Klin Onkol,2011,24(2):149-150.

[7] Jiang J, Wu C, Shen Y, et al. Clinical application of determining serum AFP-IgM complexes for diagnosis of small hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2011, 31(2): 687-691.

[8] Baig J A, Alam J M, Mahmood S R, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC) and diagnostic significance of A-fetoprotein (AFP) [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2009, 21(1): 72-75.

[9] Trevisani F, D'Intino P E, Morselli-Labate A M, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease; influence of HBsAg and anti-HCV status [J]. J Hepatol, 2001, 34(4): 570-575.

[10] Lee H Y, Jung J H, Kang Y S, et al. Clinical significance of transiently elevated serum AFP level in developing hepatocellular carcinoma in HBsAg positive-liver cirrhosis [J]. Korean J Gastroenterol, 2004, 43(4): 252-259.

[11] 何泽宝,朱坚胜,蔡修熙,等.甲胎蛋白与肝炎病毒关系研究[J].中华传染病杂志,2001,6(3):176-177.

He Z B, Zhu J S, Cai X X, et al. Relationship of Alpha-fetoprotein and hepatitis virus [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2001, 6(3): 176-177.

(责任编辑:冉明会)