维普资讯 http://www.cqvip.com

368-370

29

小儿白血病瘤细胞P－糖蛋白测定方法及应用

儿科学院 血液科 徐百华*
儿科研究所 王 珊

R733.7
R969.4

提 要 本文介绍免疫组化法检测小儿白血病瘤细胞(P－gp)。检测30例小儿白血病细胞膜P－gp，观察其原发耐药性。30例中有8例P－gp阳性，总阳性率26.67%，其中ANLL单项阳性率33.33%，ALL为20%。本组病例耐药性最高的是CML，其次是ANLL，ALL组最低。同时发现MDR阳性者复发率高，MDR阴性者复发率低，多因素分析表明MDR对初诊白血病患者预后及抗癌药物选择有重要意义。目前临床评价MDR采用检测mdr_1 mRNA或P－gp，本文认为采用简便、快速的免疫组化法检测P－gp在临床上具有较大的实用价值。

关键词 P－糖蛋白；白血病；儿童
中图分类号 R725.5

白血病是儿童最常见的恶性肿瘤，联合化疗为首选治疗方法，肿瘤细胞耐药性是影响疗效的主要因素之一。因此，测定肿瘤细胞耐药性对临床药物选择，疗效及预后判定都有重要意义。研究表明多药耐药(Multidrug Resistance，简称MDR)是肿瘤细胞的主要耐药机理。MDR主要通过mdr_1基因过度表达，肿瘤细胞膜上P－糖蛋白(P－glycoprotein，简称P－gp)过量产生。P－gp作为一种能量依赖性药物排出泵，将进入肿瘤细胞内的抗癌药物泵出细胞外，临床表现为肿瘤细胞的耐药。本文采用半定量方法测定了白血病细胞膜P－gp，探讨白血病患儿耐药性的临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床病例

1995年11月至1996年3月收治诊断为白血病的患儿30例，经临床表现、血象、骨髓象及组织化学方法确诊。其中男性18例，女性12例。年龄2月～13岁。临床分类：急性淋巴细胞白血病(ALL)20例，急性非淋巴细胞白血病(ANLL)9例，慢性粒细胞白血病(CML)1例。ANLL中，M_1型2例，M_2型4例，M_5型2例，M_6型1例。

1.2 主要试剂

P－gp单克隆抗体(JSB－1)(荷兰Sanbio公司)

APAAP免疫酶标试剂盒(军事医科学院生物制剂发展中心)

1.3 实验方法

1.3.1 肿瘤细胞涂片的制备 30例均采集骨髓液2～3ml，1640液稀释2～3倍后加入到含有3ml淋巴细胞分离液的试管上层，缓慢加入以使两液间保持清晰界面，2000转/分离心15～20分钟，吸取两液面间的单个核细胞层。加5倍PBS液混匀，800～1000转/分离心5分钟，去掉上清液，沉淀物即为单个核细胞，制成细胞浓度为$1\sim3\times10^6$个/ml细胞悬液，滴到涂有一层粘片剂的玻片上，然后吸取滴液使玻片上仅剩一薄层细胞，快速吹干。

1.3.2 标本的保存 干燥后的玻片用塑料纸包装，密封防潮，置－20℃可保存一年抗原不会丢失。固定前将标本从冰冻状态取出，使其恢复至室温后再打开密封袋。

1.3.3 标本染色 细胞涂片标本室温干燥2小时以上，用画圈油在标本外画圈，戊二醛固定液滴加于标本上，固定2分钟后PBS液洗。加JSB－1 10μl，放湿盒30分钟，加羊抗鼠IgG二抗15μl，湿盒30分钟，加APAAP复合物15μl，湿盒30分钟。加碱性磷酸酶底物显色，取A液和B液混合的底物液，按每毫升底物1毫克坚因红的比例加入坚因红，充分混匀，取30μl加于标本上。室温显色30分钟，低倍显微镜下观察，可见细胞膜上出现红色标记物，待显色效果明显时用自来水冲洗中止显色。显色各步骤间均用0.01M，pH 7.2PBS液洗三次。加苏木素复染液1滴复染1分钟，自来水冲洗，明胶甘油封片，镜检。

1.3.4 观察指标 高倍镜下，细胞核呈兰色，细胞膜有红色标记物的细胞为阳性细胞，无红色标记物的细胞为阴性细胞。

1.3.5 结果判定 计数100个肿瘤细胞，计算阳性细胞百分率，阳性等级判定如下：

+——细胞膜、细胞浆内可见部分浅红色。

* 女，1945－05出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

++——细胞膜、细胞浆内可见均匀一致的浅红色标记物.

+++——细胞膜、细胞浆内可见深红色标记物.

++++——在+++的基础上可见细胞膜有红色透亮圈点状标记物.

2 实验结果

本组30例白血病患儿白血病细胞膜P—gp测定结果如下:

表1 30例患儿白血病细胞膜P-gp测定结果

诊断	例数	P-gp阳性	P-gp阴性	P-gp阳性等级 +	++
ALL	20	4	16	3	1
ANLL	9	3	6	1	2
CML	1	1	0	0	1
合计	30	8	22	4	4

30例中8例P-gp为阳性,总阳性率为26.67%,其中ANLL P-gp单项阳性率33.33%,ALL较ANLL阳性率稍低为20%,经x^2检验,ANLL与ALL的阳性率无显著差异($x^2=0.3692$, $P>0.05$),此结果可能受到例数较少的影响。P-gp阳性的阳性等级是+和++,未出现+++和++++的阳性等级。

4 讨论

4.1 白血病细胞多药耐药性检测方法评价

MDR是肿瘤细胞产生的一种特殊耐药现象,近十多年来已被逐渐应用于解释白血病细胞的耐药机理。1985年Kartner等[1]成功地制备了抗P-gp单克隆抗体,1986年Ueda等[2]证明P-gp由MDR基因mdr_1编码,八十年代末MDR的检测已应用临床。目前评价MDR主要是检测mdr_1 mRNA及P-gp。所用的方法主要有①RNA水平:Northern blot,Slot blot,RT-PCR,原位杂交,RNase保护法;②蛋白水平:免疫组化法,间接免疫荧光法,流式细胞技术等;③功能性检测等。由于各种组织和细胞间P-gp表达的异质性以及检测时采用的方法和试剂不同,至今尚无一种公认的判断MDR阳性的标准。Zhou等[3]于1992年应用间接免疫荧光法测定AML的mdr_1基因表达时采用了$P-gp^+>5\%$的阳性判断标准。Lamy等[4]1994年采用免疫组化法判定成年人AML的P-gp和CD_{34}时采用$P-gp^+>1\%$作为MDR阳性的判断标准。作者在本文采用的MDR阳性判断标准可为判断小儿白血病的耐药性提供参考。

mdr_1 mRNA在检测上相对复杂,作者认为采用简便、快速的免疫组化法检测P-gp在临床上有较高的实用价值,有条件单位可列入白血病检查常规。部分病例可辅以mdr_1 mRNA检测以提高判断MDR准确性。本组总的P-gp阳性率为26.67%,其中ALL P-gp阳性率为20%,ANLL的阳性率为33.33%,CML仅1例阳性,与Zhou等国外作者报道相近。目前国内这方面的研究还在探索之中。

4.2 P-gp检测的临床意义

白血病恶性细胞的细胞膜P-gp含量与白血病分类、化疗前后的状态,治疗缓解率及疾病预后都有一定相关性。耐药白血病细胞的发生可以是原发的,即在化疗前存在MDR的细胞亚群。但更多是继发的,即在化疗过程中或化疗后由抗癌药物诱发产生MDR细胞亚群。Pirker[5]报道,在成人白血病原发MDR中耐药性最高的是CML,其次是ANLL,ALL阳性率最低,与本组检测结果相近。

mdr_1基因过度表达,P-gp增高的患者疗程相对较长,预后较差。Goasguen等[6]用JSB-1和C_{219}对36例儿童和23例成人ALL进行检测,MDR阳性者16例中13例复发(81%),35例MDR阴性者仅13例复发(37%)。MDR阴性组生存率明显高于MDR阳性组。本文检测30例,8例MDR阳性患儿6例复发(75%),12例MDR阴性者3例复发(25%)与文献报道基本一致。多因素分析表明MDR对初诊白血病患者预后有一定意义。

MDR阳性的白血病患者的白血病细胞对抗癌药物有广泛的耐药性,主要相关药物有烷化剂,植物碱类,蒽环类抗癌药物等。P-gp介导的这些耐药抗癌药物谱对解释化疗后的耐药机理及抗癌药物选择有重要指导意义。作者认为对多次化疗效果欠佳的白血病患儿应常规检测白血病细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞P－gp，以指导化疗药物选择。

参 考 文 献

1.Kartner N,et al. Nature 1985;316:820
2.Ueda K, et al. Biochim Biophys Res Commun 1986; 141:956.
3.Zhou DC, et al. Leukemia 1992;6:879
4.Lamy T, et al. Leukemia 1994;8:1879
5.Pirker R, et al. J Natl Cancer Inst 1991;83(10):708
6.Goasguen JE, et al. Blood 1993;81:2394

(收稿日期 1997－04－09)

Research method and clinical application of measurement of P－gp in the malignant cell of children with leukaemia

Xu Youhua, et al
Department of Hematology, College of Peadiatrics

The immunohistochemistry measurement method of P－gp in the malignant cells of children with leukaemia was introduced in this paper and the P－gp values in the cell membrane of this malignant cells of 30 cases were measured. Eight cases of the 30 patients were positive (26.7%) and in ANLL group of all groups positive rate was highest (33.3%) and Lowest in ALL group.

Multiple factor analysis in this study showed the measurement of MDR(Multidrug Resistance) had an important values for choice of anticancer drugs and estimation of the prognosis of patients. Also this study showed that the immunohistochemistry measurement method of P－gp is a valuable and simple method in clinical practice.

KEY WORDS P－gp; Leukaemia; Children

G-B综合征，临床分析
370—371
(30)
R745.43

变异型格林－巴利综合征 4例临床报道及文献复习

临床学院 神经内科 李光勤* 秦宪忠 董为伟

中图分类号 R745.4

格林－巴利综合征(Guillain－Barre syndrome,GBS)是一种常见的主要累及脊神经根及脊神经的自身免疫性疾病。典型者的临床表现为四肢对称性、驰缓性瘫痪及腱反射对称性减弱或消失。绝大多数患者根据其典型的临床表现，结合脑脊液蛋白－细胞分离及电生理检查有神经传导减慢，诊断并不困难。但根据国内外的报道，GBS存在多种变异型[1~3]。现将我科的4例GBS变异型报道如下，并对目前国内外的GBS变异型作一文献复习。

1 临床资料

病例1(住院号47711)：男，25岁。入院(1977－9－6)前1月因感冒出现畏寒、发热、咽痛及头痛，经当地医院治疗明显好转。3周前突然出现吞咽梗阻；次日感舌活动不灵活，进食呛咳；第3天出现声音嘶哑。5天后到当地地区医院住院，住院5天后又出现右颈及肩酸痛，2天后出现右颈及肩无力。神经系统检查示右Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ颅神经麻痹，诊断为Collet－Sicard综合征，经烟酸、强的松治疗进食呛咳减轻，其余症状无缓解而转来我院。右中耳流脓史10年。

入院后神经系统检查仅发现右Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ颅神经麻

* 男，1965－06出生，讲师