

- vary flow and burning mouth syndrome; new evidence in this enigmatic pathology[J]. J Oral Pathol Med, 2015, 44(3):229-233.
- [15] LEE C F, LIN K Y, LIN M C, et al. Sleep disorders increase the risk of burning mouth syndrome: a retrospective population-based cohort study[J]. Sleep Med, 2014, 15(11):1405-1410.
- [16] MARINO R, PICCI R L, FERRO G, et al. Peculiar alexithymic traits in burning mouth syndrome: case-control study[J]. Clin Oral Investig, 2015, 19(8):1799-1805.
- [17] ARBABI-KALATI F, BAKHSHANI N M, RASTI M. Evaluation of the efficacy of low-level laser in improving the symptoms of burning mouth syndrome[J]. J Clin Exp Dent, 2015, 7(4):e524-e527.
- [18] TOKURA T, KIMURA H, ITO M. Temperament and character profiles of patients with burning mouth syndrome[J]. J Psychosom Res, 2015, 78(5):495-498.
- [19] MIZIARA I, CHAGURY A, VARGAS C, et al. Therapeutic options in idiopathic burning mouth syndrome: literature review[J]. Int Arch Otorhinolaryngol, 2015, 19(1):86-89.
- [20] POON R, SU N, CHING V, et al. Reduction in unstimulated salivary flow rate in burning mouth syndrome[J]. Br Dent J, 2014, 217(7):879-883.
- [21] MCGIRR A, DAVIS L, VILA-RODRIGUEZ F. Idiopathic burning mouth syndrome: a common treatment-refractory somatoform condition responsive to ECT[J]. Psychiatry Res, 2014, 216(1):158-159.
- [22] WALEGA D R, SMITH C, EPSTEIN J B. Bilateral stellate ganglion blockade for recalcitrant oral pain from Burning Mouth Syndrome: a case report[J]. J Oral Facial Pain Headache, 2014, 28(2):171-175.
- [23] KOMIYAMA O, OBARA R, UCHIDA T, et al. Pain intensity and psychosocial characteristics of patients with burning mouth syndrome and trigeminal neuralgia[J]. J Oral Sci, 2012, 54(4):321-327.
- [24] DEEPAK G, SOHEYL S, SHAMBULINGAPPA P, et al. Burning Mouth Syndrome due to Television Moans, an Enigma for Oral Physician: Treatment with Counseling[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2014, 8(2):118-122.
- [25] NASRI-HEIR C, ZAGURY JG, THOMAS D, et al. Burning mouth syndrome: Current concepts [J]. J Indian Prosthodont Soc, 2015, 15(4):300-307.

(收稿日期:2017-08-25 修回日期:2017-11-05)

• 综 述 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 07. 052

单细胞分析研究进展

丁钟欢 综述, 卢忠心[△]审校

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院检验科, 武汉 430000)

关键词: 单细胞; 分离; 组学分析

中图法分类号: Q2-33

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)07-1043-04

细胞是组成人体组织与器官的基本单位,通过细胞集合进行的研究通常会错失很多重要信息,主要是由于细胞集合性研究反映的是这一细胞集体的平均水平,而单个细胞间表达的信息往往千差万别。肿瘤细胞的突变状态、表观遗传状况以及相关蛋白的表达水平等重要信息可能只有一小部分甚至少数几个细胞表达^[1]。另外,很多能反映疾病状态的珍贵细胞,如母体血胎儿细胞、循环肿瘤细胞(CTC)的数量非常稀少,很容易被大量的背景细胞所干扰^[2]。因此,近年来随着个体化医疗的发展及二代测序技术的提高,单细胞分析逐渐受到关注。

单细胞分析即是通过相应的技术对单个靶细胞进行分离提取,并通过全基因组扩增及二代测序等技术对靶细胞内的基因组信息、蛋白信息进行分析的过程。通过单细胞分析,会将肿瘤进展过程中的细胞变

化、单个 CTC 的遗传状态、细胞与细胞间的异质性、利用胎儿细胞遗传疾病等问题迎刃而解^[2]。本文将从近年来单个细胞的分离与提取手段、全基因组扩增及下游组学分析等研究进展作一综述。

1 单细胞的分离与提取

单个细胞的分离与提取是进行单细胞分析的前提条件。流式细胞术等传统细胞分离方法对单细胞的分离效果并不理想;近年来,有很多学者对单细胞的分离与提取方法进行了不断地探索。新发展的方法是结合了几种传统方法的特点而建立的新方法。例如, CAMPTON 等^[3]于 2015 年报道的单个 CTC 的分离检测系统-AccuCyte®-CyteFinder®系统将离心、染色、镜检、细胞挑选集于一体,大大提高了单细胞分离的效率。

另外,传统方法的改进与发展也是近年来研究的

[△] 通信作者, E-mail: lzx71@yahoo. com。

热点,很多方法是基于微流控芯片检测方法的改进。如 ZHANG 等^[4]利用油性小滴将细胞隔离为单个细胞,再与微流控芯片系统结合进行检测,其单细胞的分离效率超过 90%。ANTFOLK 等^[5]将分离 CTC 的声动力分选富集芯片与介电电泳芯片结合成联合式的微流控系统可用于单个 CTC 的检测。还有 ZHANG 等^[6]报道的“3D 凝胶岛”芯片芯片,ANTFOLK 等^[5]报道的不同组分结构芯片,以及 KIM 等^[7]报道的单细胞检测芯片等都表明其对单细胞具有较好的分离效果。另外,也有免疫磁珠法的改进,如 HUANG 等^[8]报道表明用微磁珠与微流控芯片结合的新方法能提高对 CTC 的捕获效率,在癌细胞模型中的捕获效率超过 97%。也有人工细胞提取技术的改进,如 YOSHINO 等^[9]首先将乙二醇二丙烯酸酯光聚合水凝胶与微阵列捕获进行结合对单细胞进行分离和下游分析。KRONEIS 等^[10]报道的自动激光微分离法能准确地分离特异性染色的单个靶细胞。此外,也有利用靶细胞的新特性或利用新技术进行单细胞分离的新方法,如 DENG 等^[11]发现在封闭的小室内用激光诱导前向转移技术也能很好地对单个细胞进行分离。CHEN 等^[12]利用微量吸管液体乳胶生成器生成很多乳糜状的油性小滴,能将单个细胞包被在此环境中进行全基因组扩增和下游分析。

总的来说,这些研究均表明,可根据靶细胞的不同特性进行多种不同方法的单细胞分离,但是这些分离方法仍局限于实验室探索阶段,高效、特异、简单的单细胞分离方法有待进一步的验证。

2 单细胞信息分析

2.1 全基因组扩增 单细胞基因组 DNA 水平低至 6 pg,每个基因只含有 2 个拷贝数,因此,利用普通方法进行单细胞基因组扩增与分析是不可行的^[2]。目前为止,传统的全基因组扩增方法主要包括点聚合酶链反应(DOP-PCR)、多重置换扩增法(MDA)、多重退火及环式循环扩增法^[2]。由于基因组覆盖的广度不同、鸟嘌呤与胞嘧啶碱基水平差异产生扩增偏倚、等位基因缺失、等位基因优先扩增等因素会使这些全基因组扩增方法间存在明显的差异,能影响下游的微阵列芯片及二代测序分析。

因此,近年来人们也在对全基因组扩增方法进行不断的改进与探索。最近,CHEN 等^[13]的转座子插入线性扩增法通过转座子插入进行线性放大,DNA 被含有 T7 启动子的 Tn5 转座子随机片段化,T7 启动子允许线性扩增,该方法能在千碱基分辨率进行微拷贝数变异(CNA)、单核苷酸变异(SNV)的检测。PICHER 等^[14]报道了一种特殊的 DNA 聚合酶-TthPrimPol 酶,具有比 Phi29 DNA 酶具有更强的聚合活性,利用该酶进行的多重置换扩增反应比 Phi29

具有更广的基因组覆盖度及单核苷酸变异位点检测能力。LEUNG 等^[15]通过一种油性-MDA,能在纳米级体积的基础上进行高效的单细胞全基因组扩增。

总之,随着单细胞,特别是 CTC、循环胎儿细胞等珍贵细胞在临床中扮演着越来越重要的角色,单细胞全基因组扩增技术逐渐受到重视,为下游测序及相应基因组分析提供良好的基础。

2.2 单细胞基因组测序分析 全基因组测序是筛查单细胞 SNV 及 CNA 的有效手段,是检测拷贝数变异的有效工具。目前为止,大规模平行测序技术主要在 2 个平台上进行检测: Illumina 公司的 HiSeq/MiSeq 平台以及 Thermo Fisher Scientific 公司的 Ion Torrent 测序平台^[16]。HiSeq 平台因测序覆盖度更广及价格较为低廉而被更广泛地使用。而 Ion Torrent 平台则更倾向于靶向测序,是临床上用于突变等检测的金标准。另外,不同类型变异的检测所要求的测序深度不同;如单细胞拷贝数变异分析所要求的测序深度较浅,可低至 $0.1 \sim 2.0 \times$,而单细胞单核苷酸变异的测序深度则较大,为 $30.0 \sim 50.0 \times$ ^[17]。

值得一提的是,在基因组中,外显子虽然只占其全长的 1%,却包含了约 85% 疾病相关的变异位点,因此,外显子组测序也十分重要。外显子组测序只对外显子进行富集、扩增,所以其相比全基因组测序能更加高效、更利于编码序列的读取。目前,几种可用于单细胞外显子建库的方法包括 NimbleGen's Seq-Cap、Agilent SureSelect、Illumina TruSeq 及 Nextera Exome^[18]。CHILAMAKURI 等^[18]对这 4 种方法进行评估结果显示, Illumina 平台能更高效地对编码及翻译区域的碱基进行读取。此外,Nextera Exome 技术结合了样本准备的简化程序及 TruSeq 的富集程序,使 DNA 需要量更少、时间需求更短^[19]。

2.3 单细胞转录组分析 在单细胞中,mRNA 虽然水平较低,但也存在着上千个拷贝数,这使单细胞转录组分析成为可能^[2]。而 mRNA 需经过反转录为 cDNA 后经 PCR 扩增后才能进行测序分析,因此,高效、无偏差地反转录是扩增、测序的先决条件。细胞外转录本线性 RNA 扩增法是最早被用于扩增转录组 RNA 的方法,促进了单细胞转录组分析的发展^[20]。目前,主要有以下几种改良的 cDNA 扩增法:全组 PCR 扩增法、3'末端扩增法及链开关介导的反转录扩增^[21]。另外,几种新的 RNA 测序方法也在探索与发展中,其中包括:细胞内转录本分析、单分子荧光原位杂交及荧光原位杂交 RNA 测序等^[2]。

2.4 单细胞蛋白质分析 单细胞蛋白质分析对了解细胞信号通路及细胞间的异质性具有重要的作用。传统的蛋白检测方法例如凝胶电泳法、免疫测定法、层析法、质谱法都需要大量的细胞作为标本。因此,

单细胞蛋白质分析的主要瓶颈在于单细胞内及其只有少量的蛋白质而缺乏有效的扩增方法^[22]。最近,一些方法学的发展也能使单细胞蛋白质分析具有较好的灵敏度与特异度^[2]。如 LINDSTROM 等^[22]报道的以微流控芯片为基础,发展的小型流式细胞仪能对少量细胞(100~1 000)进行分析。MELLORS 等^[23]的研究表明,通过加入毛细管电泳改进质谱的方法使其灵敏度提升,能同时对单细胞中多达 40 项参数进行测量。DENG 等^[24]报道显示,的通过多聚赖氨酸标签结合微流控芯片的方法能有效对单个 CTC 细胞蛋白质水平进行评估。即便如此,单细胞蛋白质分析仅仅是一个开端,更简便、更灵敏的单细胞蛋白质检测方法与手段有待进一步的探索和研究。

3 小 结

目前,单细胞的分离与提取方法仍未成熟,近年来探究的方法常以各种传统方法相结合、传统方法的改进以及利用新特性等方式为主;全基因组扩增的发展为单细胞基因组及转录组序列分析奠定了良好的基础;单细胞蛋白质表达分析为细胞间通路及其相互作用提供了条件;完善单细胞分离、提取手段及信息分析方法对研究细胞间异质性及稀有细胞用于疾病诊断等方面具有重要的意义。

参考文献

- [1] 郑磊,陈静.循环肿瘤细胞检测新进展及临床价值[J].中华检验医学杂志,2016,39(8):565-567.
- [2] HU P,ZHANG W,XIN H,et al. Single cell isolation and analysis[J]. Front cell Dev Bio,2016,4:116-124.
- [3] CAMPTON D E,RAMIREZ A B,NORDBERG J J,et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining[J]. BMC Cancer, 2015, 15 (1): 360.
- [4] ZHANG Q,WANG T,ZHOU Q,et al. Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms[J]. Sci Rep,2017,7:41192-41198.
- [5] ANTFOLEK M,KIM S H,KOIZUMI S,et al. Label-free single-cell separation and imaging of cancer cells using an integrated microfluidic system [J]. Sci Rep, 2017, 7: 46507-46518.
- [6] ZHANG Z,CHEN Y C,CHENG Y H,et al. Microfluidics 3D gel-island chip for single cell isolation and lineage-dependent drug responses study [J]. Lab Chip, 2016, 16 (13):2504-2512.
- [7] KIM J,CHO H,HAN S I,et al. Single-cell isolation of circulating tumor cells from whole blood by lateral magnetophoretic microseparation and microfluidic dispensing [J]. Anal Chem,2016,88(9):4857-4863.

- [8] HUANG Y Y,CHEN P,WU C H,et al. Screening and Molecular Analysis of Single Circulating Tumor Cells Using Micromagnet Array [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16047-16053.
- [9] YOSHINO T,TANAKA T,NAKAMURA S,et al. Manipulation of a single circulating tumor cell using visualization of hydrogel encapsulation toward single-cell whole-genome amplification [J]. Anall Chem, 2016, 88 (14): 7230-7237.
- [10] KRONEIS T,CHEN S,EL-HELIEBI A. Low-volume on-chip single-cell whole genome amplification for multiple subsequent analyses [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1347 (1):245-261.
- [11] DENG Y,RENAUD P,GUO Z,et al. Single cell isolation process with laser induced forward transfer [J]. J Biol Eng,2017,11(1):2-10.
- [12] CHEN Z,FU Y,ZHANG F,et al. Spinning micropipette liquid emulsion generator for single cell whole genome amplification [J]. Lab Chip,2016,16(23):4512-4516.
- [13] CHEN C,XING D,TAN L,et al. Single-cell whole-genome analyses by linear amplification via transposon insertion (LIANTI) [J]. Science, 2017, 356 (6334): 189-194.
- [14] PICHER A J,BUDEUS B,WAFZIG O,et al. TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol [J]. Nat Commun,2016, 7:13296.
- [15] LEUNG K,KLAUS A,LIN B K,et al. Robust high-performance nanoliter-volume single-cell multiple displacement amplification on planar substrates [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2016,113(30):8484-8489.
- [16] ZHANG X,MARJANI S L,HU Z,et al. Single-Cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects [J]. Cancer research,2016,76(6):1305-1312.
- [17] SIMS D,SUDBERY I,ILOTT N E,et al. Sequencing depth and coverage:key considerations in genomic analyses [J]. Nat Rev Genet,2014,15(2):121-132.
- [18] CHILAMAKURI C S,LORENZ S,MADOU M A,et al. Performance comparison of four exome capture systems for deep sequencing [J]. BMC Genomics, 2014, 15 (1):449.
- [19] LIU N,LIU L,PAN X. Single-cell analysis of the transcriptome and its application in the characterization of stem cells and early embryos [J]. Cell Mol Life Sci,2014, 71(14):2707-2715.
- [20] PAN X. Single cell analysis:from technology to biology and medicine [J]. Single Cell Biology, 2014, 3 (1): 106-123.
- [21] 沈燧均,齐谢敏,宋沁馨,等.单细胞蛋白定量检测方法研究进展 [J]. 中国药科大学学报,2015,46(5):521-531.
- [22] LINDSTROM S,ANDERSSON-SVAHN H. Overview of single-cell analyses:microdevices and applications [J]. Lab

Chip, 2010, 10(24): 3363-3372.

- [23] MELLORS J S, JORABCHI K, SMITH L M, et al. Integrated microfluidic device for automated single cell analysis using electrophoretic separation and electrospray ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2010, 82(3): 967-973.

- [24] DENG Y, ZHANG Y, SUN S, et al. An integrated microfluidic chip system for single-cell secretion profiling of rare circulating tumor cells[J]. Sci Rep, 2014, 4: 7499-7454.

(收稿日期: 2017-09-14 修回日期: 2017-11-24)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.07.053

ERAS 在老年股骨转子间骨折行 PFNA 治疗围术期的应用

胡 定, 倪卫东 综述, 罗 刚[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

关键词: 股骨转子间骨折; 术后快速康复; 围术期

中图法分类号: R687.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)07-1046-04

随着社会人口的老龄化, 出现老年骨质疏松症的患者越来越多, 而股骨转子间骨折多是由骨质疏松症引起, 骨折的发病率亦逐渐增高^[1]。保守及手术是治疗股骨转子间骨折的两种方法, 保守治疗的对象是稳定性骨折, 但需长期卧床, 容易导致肺部感染、泌尿系感染、褥疮、深静脉血栓形成等并发症的发生, 并发症例数、死亡例数均高于手术治疗, 此方法存在明显缺点^[2-3]。所以现在一般采用手术治疗, 且大多数的股骨转子间骨折采用股骨近端防旋髓内钉(PFNA)内固定治疗, 人工髋关节置换不作为转子间骨折的常规治疗方法, 仅作为一种补充手段^[4], 但如患侧髋关节具有明显骨性关节炎、股骨头缺血性坏死、类风湿关节炎, 则需行髋关节置换术。虽然手术治疗可明显改善患者症状, 但患者在半年内的病死率仍然较高, 其中住院期间死亡的患者占 1.6%, 且相对于其他普通手术, 并发症的发生率仍明显较高。围术期诱发的应激反应, 加之老年患者体质差及伴有多种基础疾病, 很容易导致术后发生相关并发症。改善疗效、减少并发症及降低病死率是治疗的目标, 所以, 有效控制围术期应激反应是当前的研究重点。在 2001 年, 术后快速康复(ERAS)概念由 Kehlet 和 Wilemore 共同提出, 主要内容包括在循证医学证据的基础上通过改进医疗行为, 将各种有效的方法应用于术前、术中及术后, 以达到围术期的应激反应、患者的痛苦最大限度地减少及早期恢复器官功能^[5]。围术期 ERAS 环节包括患者超前镇痛、术前措施、术中措施、术后处理、功能锻炼等。本文就老年股骨转子间骨折行 PFNA 治疗围术期各阶段采取有益于患者的相应优化措施综述如下。

1 超前镇痛

在围术期对于治疗股骨转子间骨折患者的首要

目标是减轻疼痛, 其次是改善患肢功能。随着对疼痛分子机制的研究进展和临床经验的积累, 人们逐渐认识到超前镇痛的实质其实应该是减少有害刺激传入, 进而导致的外周和中枢敏感化, 以抑制神经元可塑性变化, 并不特指“切皮前”所给予的镇痛^[6]。常用的超前镇痛药物较多, 但临床应用最多的是非甾体抗炎类药物, 可抑制前列腺素的早期产生, 进一步减弱痛觉过敏及手术相关炎性反应。已有文献证实, 术前使用非甾体抗炎药可减少术后目测类比分, 减少阿片类药物的使用以及促进术后康复^[7]。超前镇痛通过减轻围术期的应激反应, 从而降低患者在术中、术后对镇痛剂的需求量。老年患者因对创伤后应激反应的耐受性较差, 加之镇痛药物对胃肠道的不良反应, 容易导致消化道溃疡甚至消化道出血, 帕瑞昔布是选择性非甾体抗炎药物, 选择性抑制 COX-2, 对胃肠道的不良反应小, 以及对心血管系统的影响小加之镇痛效果好, 所以一般采用帕瑞昔布镇痛。入院后即常规予以帕瑞昔布(特耐)40 mg 静脉推注, 每日 1 次, 至手术当日。

2 术前措施

2.1 评估和宣教 入院后即采用皮牵引或胫骨结节骨牵引。股骨转子间骨折多见于高龄患者, 多合并高血压、糖尿病、冠心病等基础疾病。监测、控制血压、血糖, 维持水、电解质、酸碱平衡, 积极控制并发症。因受伤后需卧床, 为防止深静脉血栓的形成, 入院后需予以抗凝处理(利伐沙班或低分子肝素等); 患者在病床上解大小便的不习惯与卧床后胃肠蠕动功能减弱, 入院后应予以促胃肠蠕动及润便药物促进大便排泄, 防止腹胀。老年患者胃黏膜的屏障功能减弱及创伤, 易发生应激性溃疡, 入院后需给予保胃药物保胃。入院后尽快完善相关术前检查, 到相关科室会诊, 积

[△] 通信作者, E-mail: luo_gang_lg@163.com。