



妇产科临床、基础研究 及科研方法学探讨学术研讨会 论文汇编

中华医学会中华妇产科杂志编委会

2008年6月 杭州

会议日程

时间	内容	主持人
6月27日	全天报到	潘伟、沈平虎、高婷婷
6月28日上午		
8:30~9:00	开幕式	林其德教授等
	专题报告	谢幸教授、罗新教授
9:00~9:30	(1)郎景和:妇产科临床科研中的几个问题	
9:40~10:40	(2)杨慧霞:新英格兰医学杂志产科临床科研论文的剖析 ——我国产科临床科研的思考	
10:40~11:00	茶歇	
	专题报告	杨慧霞教授等
11:00~12:00	(1)谢幸:科研选题及研究思路的建立——卵巢癌细胞对DC 及其前提细胞分化和功能的影响	
6月28日下午		
	专题报告	李力教授等
14:00~14:40	(1)丛亚丽:涉及人的生物医学研究与伦理	
14:50~15:50	(2)马丁:肿瘤转移分子靶向阻遏研究	
15:50~16:10	茶歇	
	专题报告	马丁教授等
16:10~16:50	(1)罗新:子宫内膜异位症诊治规范中的若干问题思考	
17:00~18:00	(2)李丽:蛋白质组学在妇科肿瘤研究中的应用	
18:30~19:30	晚宴(杨森)	
6月29日上午		
	专题报告	刘萍教授等
8:30~9:30	(1)崔恒:近2年ASCO会议报告对妇科肿瘤临床研究的启示	
9:40~10:20	(2)狄文:循证医学与临床科研	
10:20~10:40	茶歇	
	专题报告	狄文教授等
10:40~11:20	(1)刘萍:数字化人体技术的现状及对女性盆腔研究的应用	
11:30~12:00	(2)赵一鸣:临床研究顶层设计中的几个关键问题	
6月29日下午		
14:00~16:00	大会讨论(每节约40分钟)	
	(1)妇产科临床基础科研的基本状况估价	黄醒华教授
	(2)妇产科临床基础科研需加强的关键点	石一复教授
	(3)如何发挥科研的优势	林其德教授
16:10	会议总结	郎景和教授

目 录

专题讲座

新英格兰医学杂志产科临床科研论文的剖析——我国产科临床科研的思考·····	杨慧霞	(1)
科研选题及研究思路的建立——卵巢癌细胞对 DC 及其前提细胞分化 和功能的影响·····	谢 幸	(5)
涉及人的生物医学研究与伦理·····	丛亚丽	(15)
肿瘤转移分子靶向阻遏研究·····	马 丁	(20)
子宫内膜异位症诊治规范中的若干问题思考·····	罗 新	(27)
蛋白质组学在妇科肿瘤研究中的应用·····	李 丽	(30)
近 2 年 ASCO 会议报告对妇科肿瘤临床研究的启示·····	崔 恒	(39)
循证医学与临床科研·····	狄 文	(49)
数字化人体技术的研究现状及对女性盆腔研究的应用前景·····	刘 萍	(51)
临床研究顶层设计中的几个关键问题·····	赵一鸣	(54)

大会交流

多囊卵巢综合征患者颗粒细胞中抑制素亚基及卵泡抑素 mRNA 的表达意义·····	陈小平等	(59)
凝集素受体在正常小鼠脾组织和过量维甲酸致脾裂发生中的作用·····	段淑红等	(64)
妇科老年患者腹腔镜手术的应用价值及围手术期处理·····	郎 雁等	(67)
低功率超声对家兔卵巢微血管的影响·····	高迎春等	(70)
女性不孕症影响因素的病例对照研究·····	何 晓等	(73)
垂体后叶素在腹腔镜输卵管切开取胚术的应用价值·····	蒋立辉	(79)
表面增强激光解析离子化飞行时间质谱筛查子宫内膜异位症 新型生物标记物的临床意义·····	荆建红等	(82)
异位妊娠药物保守治疗方式探讨·····	林 舟等	(88)
女性生殖器结核早期诊断的研究·····	刘宝瑛等	(90)
可塑性会阴保护器在顺产接生中的应用·····	潘伟芳等	(93)
特制专用 IUD 测量尺的研究·····	秦 宇等	(95)
雌激素及他莫昔芬对子宫内膜癌细胞增殖作用的影响·····	尚丽新	(101)
剖宫产对初乳 sIgA 的影响·····	王全英等	(102)
宫颈巴氏涂片与 LCT 在贫困妇女妇科普查中的价值·····	杨伶俐等	(104)
特殊类型异位妊娠 57 例诊治方法探讨·····	尹 玲等	(108)
CA ₁₂₅ 和可溶性 Fas、FasL 联合检测在子宫腺肌病中的应用价值·····	张 蓉等	(112)
剖宫产术 426 例的临床分析·····	赵小金等	(116)
DCC 基因对卵巢上皮性癌细胞生长及其化疗敏感性的影响·····	庄如锦等	(117)
巨大儿的分娩方式及其对母儿的影响·····	吕国新	(124)

专题讲座

新英格兰医学杂志产科临床科研论文的剖析 ——我国产科临床科研的思考

北京大学第一医院

杨慧霞

- 新英格兰医学杂志(NEJM), 综合期刊, 目前为月刊, 其影响因子已经超过50分(2006年), 在全球科技期刊中居于领先地位。
- 该杂志主要刊登医学领域最新临床研究成果。
- 作为一医学类综合期刊尽管产科文章不多, 但每篇论著刊登的结果将会对所涉及领域产生极大影响。
- 述评和综述质量高。

该杂志刊登的RCT研究, 选题新颖、设计好, 研究结论对临床实践有较大的影响。

下面主要围绕近些年NEJM杂志上刊登的早产、GDM领域的文章加以分析。

fFN与早产的预测

1991年, Lockwood, et al. 在N Engl J Med 1991;325:669 刊登阴道分泌物fFN在早产预测的价值。

- 推动了这一领域的研究, 目前该指标广泛用于早产临床预测。
- FDA批准将fFN用于早产的预测。

17- α 羟孕酮对早产预防效果的评价

- 2003年, NEJM, 348: 2379
17- α 羟孕酮对于有自发性早产史(或晚期流产史)再次早产发生的影响(RCT)——具有预防作用。
- 2007年, NEJM, 357: 454
17- α 羟孕酮双胎妊娠所致早产预防作用的研究。

中孕超声筛查与孕激素预防早产效果的评价

THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Progesterone and the Risk of Preterm Birth among Women with a Short Cervix

Eduardo B. Fonseca, M.D., Ebru Celik, M.D., Mauro Parra, M.D.,

Mandeep Singh, M.D., and Kypros H. Nicolaides, M.D.

From the Fetal Medicine Foundation Second Trimester Screening Group

BACKGROUND

Previous randomized trials have shown that progesterone administration in women who previously delivered prematurely reduces the risk of recurrent premature delivery. Asymptomatic women found at midgestation to have a short cervix are at greatly increased risk for spontaneous early preterm delivery, and it is unknown whether progesterone reduces this risk in such women.

METHODS

Cervical length was measured by transvaginal ultrasonography at a median of 22 weeks of gestation (range, 20 to 25) in 24,620 pregnant women seen for routine prenatal care. Cervical length was 15 mm or less in 413 of the women (1.7%), and 250 (60.5%) of these 413 women were randomly assigned to receive vaginal progesterone (200 mg each night) or placebo from 24 to 34 weeks of gestation. The primary outcome was spontaneous delivery before 34 weeks.

RESULTS

Spontaneous delivery before 34 weeks of gestation was less frequent in the progesterone group than in the placebo group (19.2% vs. 34.4%; relative risk, 0.56; 95% confidence interval [CI], 0.36 to 0.86). Progesterone was associated with a nonsignificant reduction in neonatal morbidity (8.1% vs. 13.8%; relative risk, 0.59; 95% CI, 0.26 to 1.25; P=0.17). There were no serious adverse events associated with the use of progesterone.

CONCLUSIONS

In women with a short cervix, treatment with progesterone reduces the rate of spontaneous early preterm delivery. (ClinicalTrials.gov number, NCT00422526.)

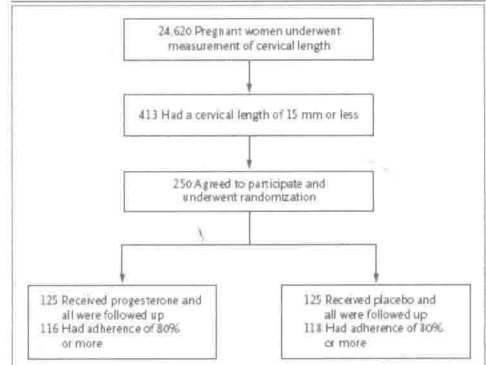


Figure 1. Patient Enrollment.

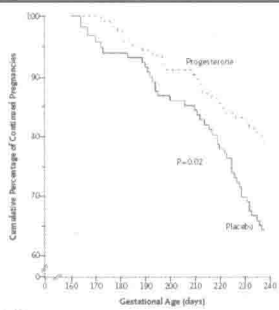


Figure 2. Kaplan-Meier Plot of the Probability of Continued Pregnancy without Delivery among Patients Receiving Vaginal Progesterone as Compared with Placebo. Progesterone reduces the risk of spontaneous delivery before 34 weeks by 44.2% (hazard ratio for progesterone, 0.57; 95% CI, 0.35 to 0.92; P=0.02). P=0.49 for the test of the proportional hazards assumption.

口服降糖药的评价

2000年, 美国O. Lange (NEJM, 2000, 343: 1134)

➢ 2代磺脲类降糖药——优降糖胎盘通透性极低, RCT研究结果, 该药有效、安全等。

➢ 2007年, 欧洲guideline:
将该口服降糖药用于

The New England
Journal of Medicine

A COMPARISON OF GLYBURIDE AND INSULIN IN WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS
© 2000, 343: 1134-1139
GLYBURIDE vs. INSULIN
© 2000, 343: 1134-1139
GLYBURIDE vs. INSULIN
© 2000, 343: 1134-1139

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF 404 WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES.*

CHARACTERISTIC	GLYBURIDE (N=201)	INSULIN (N=203)
Age — yr	29±7	30±6
BMI ≥ 27.5 before pregnancy — no. (%)†	141 (70)	132 (65)
Nulliparity — no. (%)	56 (28)	59 (29)
Family history of diabetes — no. (%)	86 (43)	91 (45)
Previous gestational diabetes — no. (%)	24 (12)	22 (11)
Previous delivery of infant with macrosomia — no. (%)	36 (18)	45 (22)
Screening plasma glucose — mg/dL‡	169±28	169±31
Wk of gestation	24±7	25±7
Wk of gestation at delivery	38.7±1.6	38.5±2.1
Results of oral glucose-tolerance test — mg/dL‡		
Fasting	97±14	98±16
At 1 hr	197±31	201±30
At 2 hr	174±31	174±29
At 3 hr	140±37	134±37
Serum C-peptide — ng/mL§	3.8±2.3	3.4±1.5
Dose of glyburide — mg/day	9.5	—
Dose of insulin — units/day	—	85±48
No. of clinic visits attended	11±5	12±6
No. of clinic visits missed	1.5±2.1	1.2±2.2
No. of measurements of blood glucose/day	4.2	4.2
Weight gain — lb	21±17	21±15

TABLE 3. BLOOD GLUCOSE CONCENTRATIONS MEASURED AT HOME AND GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN VALUES DURING TREATMENT IN WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES.*

VARIABLE	GLYBURIDE (N=201)	INSULIN (N=203)	P VALUE†
Week of gestation when blood glucose testing started	28±6	27±8	0.22
No. of weeks of testing	10±6	11±7	0.12
Blood glucose (mg/dL)‡			
Fasting	98±13	96±16	0.17
Preprandial	95±15	97±14	0.17
Postprandial	113±22	112±15	0.60
Mean	105±16	105±18	0.99
Glycosylated hemoglobin (%)§	5.5±0.7	5.4±0.6	0.12

*Values are means ±SD.
†P values were calculated by a two-tailed t-test.
‡Blood glucose values are means of measurements obtained throughout pregnancy. To convert values for glucose to millimoles per liter, multiply by 0.056.
§The test was performed late in the third trimester.

GDM的治疗 controversy

OUTCOME
obesity?
age?

TREATMENT
?

Greene : 1000例GDM RCT
490 intervention group
510 routine care group
(N Engl J Med 2005;352:2544-2546)

The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus
on Pregnancy Outcomes

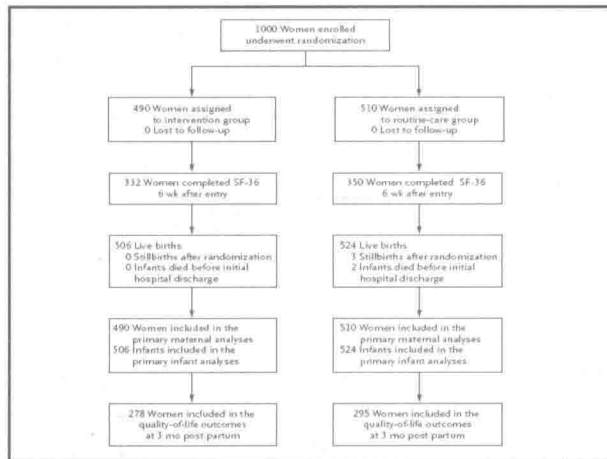


Table 1. Baseline Characteristics of the Women.*

Characteristic	Intervention Group (N=490)	Routine-Care Group (N=510)
Age — yr	30.9±3.4	30.1±3.5
Primiparous — no. (%)	212 (43)	251 (49)
Body-mass index†		
Median	26.8	26.0
Interquartile range	23.3–31.2	22.6–30.9
Race or ethnic group — no. (%)‡		
White	356 (73)	396 (78)
Asian	92 (19)	72 (14)
Other	42 (9)	42 (8)
Gestational age at entry — wk		
Median	29.1	29.1
Interquartile range	28.2–30.0	28.2–30.0
OGCT — mmol/liter		
Median	8.8	8.8
Interquartile range	8.2–9.7	8.3–9.7
OGTT for positive OGCT — no. (%)	461 (94)	471 (92)
Fasting	4.8±0.7	4.8±0.6
2hr		
Median	8.4	8.5
Interquartile range	8.1–9.3	8.1–9.1
Previous pregnancy ending in perinatal death — no./total no. (%)	12/278 (4)	7/259 (3)

Table 2. Primary Clinical Outcomes among the Infants and Their Mothers.*

Outcome	Intervention Group	Routine- Care Group	Unadjusted Relative Risk (95% CI)	Unadjusted P Value	Adjusted Relative Risk (95% CI)†	Adjusted P Value†	Step-Down Sidak P Value
no. (%)							
Infants							
Total no.	506	524					
Any serious perinatal complication‡	7 (1)	23 (4)	0.32 (0.14–0.73)	0.004	0.33 (0.14–0.75)	0.01	0.04
Death	0	5 (1)		0.06		0.07	
Stillbirth	0	3 (1)§		0.25		0.26	
Neonatal death	0	2 (<1)		0.50		0.50	
Shoulder dystocia¶	7 (1)	16 (3)	0.45 (0.19–1.09)	0.07	0.46 (0.19–1.10)	0.08	
Bone fracture	0	1 (<1)		1.00		0.38	
Nerve palsy	0	3 (1)		0.25		0.11	
Admission to neonatal nursery**	357 (71)	321 (61)	1.15 (1.05–1.26)	0.002	1.13 (1.03–1.23)	0.01	0.04
Jaundice requiring phototherapy	44 (9)	48 (9)	0.95 (0.64–1.40)	0.79	0.93 (0.63–1.37)	0.72	0.98
Women							
Total no.	490	510					
Induction of labor††	189 (39)	150 (29)	1.31 (1.10–1.56)	0.002	1.36 (1.15–1.62)	<0.001	0.003
Cesarean delivery	152 (31)	164 (32)	0.96 (0.80–1.16)	0.70	0.97 (0.81–1.16)	0.73	0.98
Elective	72 (15)	61 (12)	1.23 (0.89–1.69)	0.20	1.17 (0.85–1.60)	0.33	
Emergency	80 (16)	103 (20)	0.81 (0.62–1.05)	0.11	0.87 (0.68–1.13)	0.31	

Table 4. Secondary Outcomes among the Infants.*

Outcome	Intervention Group (N=506)	Routine-Care Group (N=524)	Adjusted Treatment Effect (95% CI)†	Adjusted P Value†
Birth weight — g	3335±551	3482±660	-145 (-219 to -70)	<0.001
Large for gestational age — no. (%)‡	68 (13)	115 (22)	0.62 (0.47 to 0.81)	<0.001
Macrosomia (≥4 kg) — no. (%)	49 (10)	110 (21)	0.47 (0.34 to 0.64)	<0.001
Small for gestational age — no. (%)§	33 (7)	38 (7)	0.88 (0.56 to 1.39)	0.59
5-Min Apgar score <7 — no. (%)	6 (1)	11 (2)	0.57 (0.21 to 1.53)	0.26
Hypoglycemia requiring IV therapy — no. (%)¶	35 (7)	27 (5)	1.42 (0.87 to 2.32)	0.16
Neonatal convulsions — no. (%)	1 (<1)	2 (<1)	0.52 (0.05 to 5.69)	1.00
Respiratory distress syndrome — no. (%)	27 (5)	19 (4)	1.52 (0.86 to 2.71)	0.15

Table 5. Secondary Clinical Outcomes among the Women.*

Outcome	Intervention Group (N=495)	Routine-Care Group (N=510)	Adjusted Treatment Effect (95% CI)†	Adjusted P Value‡
No. of antenatal clinic visits after enrollment				<0.001
Median	5.0	5.2		
Interquartile range	1-7	3-7		
No. of physician clinic visits after enrollment				<0.001
Median	3	0		
Interquartile range	1-7	0-2		
Visit with a dietitian — no. (%)	453 (92)	51 (10)	9.19 (7.68 to 11.94)	<0.001
Visit with a diabetes educator — no. (%)	460 (94)	56 (11)	8.56 (6.69 to 10.96)	<0.001
Weight gain from first prenatal visit to last visit — kg	8.1±0.3	9.8±0.4	-1.4 (-2.3 to -0.4)	0.01
Antenatal admission — no. (%)	141 (28)	139 (27)	1.10 (0.90 to 1.34)	0.34
Antenatal preeclampsia — no. (%)	58 (12)	93 (18)	0.70 (0.51 to 0.95)	0.02
Gestational age at birth — wk				0.02
Median	39.0	39.3		
Interquartile range	38.1-40.0	38.3-40.4		
Any perinatal trauma — no. (%)	255 (52)	254 (50)	1.05 (0.93 to 1.19)	0.42
Postpartum hemorrhage (≥600 mL) — no. (%)	29 (6)	32 (6)	0.96 (0.59 to 1.56)	0.86
Puerperal pyrexia (≥38°C) — no. (%)	17 (3)	29 (6)	0.63 (0.35 to 1.13)	0.12
Length of postnatal stay — days				0.80
Median	4	4		
Interquartile range	3-5	3-5		
Breast-feeding at hospital discharge — no. (%)	413 (84)	412 (81)	1.04 (0.98 to 1.10)	0.17

该RCT研究显示:

GDM规范化治疗对改善母婴结局的意义。

2008年5月NEJM刊登: 9个国家参加的多中心HAPO研究, 进一步确定GDM血糖控制目标。

美国B Metzger 主持全球多中心HAPO研究 (Hyperglycemia and Pregnancy Outcome) 9个不同国家(15个医疗中心)部分结果已发表, 其中, 亚洲的三个国家参加。

2008年6月11-12美国召开国际GDM诊断标准与血糖控制目标的专家共识会。

HAPO研究结果 (NEJM,2008-5-8)

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED 1912 MAY 8, 2008 VOL 358 NO 19

Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes

The HAPO Study Collaborative Research Group*

ABSTRACT

BACKGROUND: It is controversial whether maternal hyperglycemia less severe than that in diabetes mellitus is associated with increased risks of adverse pregnancy outcomes.

DESIGN: A total of 52,500 pregnant women at 15 centers in four countries underwent 75-g oral glucose tolerance testing at 24 to 32 weeks of gestation. Data remained blinded if the fasting plasma glucose (FPG) was 105 mg per deciliter (5.8 mmol per liter) or less and the 2-hour plasma glucose level was 200 mg per deciliter (11.1 mmol per liter) or less. Primary outcomes were birth weight above the 90th percentile for gestational age, primary cesarean delivery, clinically diagnosed neonatal hypoglycemia, and cord-blood serum C-peptide level above the 90th percentile. Secondary outcomes were delivery before 37 weeks of gestation, shoulder dystocia or birth trauma, and perinatal mortality.

RESULTS: The number of the 5000 Group (lead: B. Metzger, M.D., Saint P. Louis, Mo.), Alan B. Linn, Ph.D., Northwestern Univ. Feinberg School of Medicine, Chicago; Elizabeth R. Thomsen, M.D., Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland; Ulrike Chervenacki, M.D., Rensselaer Hospital, Rensselaer, N.Y.; Edward R. Coustan, M.D., Women and Infants Hospital of Rhode Island; Bruce L. D'Alton, M.D., Brigham Young University, Salt Lake City, Utah; David R. Hadden, M.D., Bristol F. Kennedy, M.D., Frank Johnson Maternity Hospital, Belfast; Nathaniel S. Mack, M.D., M.D., Helen S. Cooper Hospital for Women, Baber, Medical Center, Seattle; Faculty of the University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

HAPO研究部分结果 (NEJM,2008-5-8)

RESULTS

For the 23,716 participants with blinded data, we calculated adjusted odds ratios for adverse pregnancy outcomes associated with an increase in the fasting plasma glucose level of 1 SD (6.9 mg per deciliter [0.4 mmol per liter]), an increase in the 1-hour plasma glucose level of 1 SD (50.9 mg per deciliter [1.7 mmol per liter]), and an increase in the 2-hour plasma glucose level of 1 SD (25.5 mg per deciliter [1.3 mmol per liter]). For birth weight above the 90th percentile, the odds ratios were 1.38 (95% confidence interval [CI], 1.32 to 1.44), 1.46 (1.39 to 1.53), and 1.38 (1.32 to 1.44), respectively, for cord-blood serum C-peptide level above the 90th percentile, 1.55 (95% CI, 1.47 to 1.64), 1.46 (1.38 to 1.54), and 1.37 (1.30 to 1.44); for primary cesarean delivery, 1.11 (95% CI, 1.06 to 1.15), 1.10 (1.06 to 1.15), and 1.08 (1.03 to 1.12); and for neonatal hypoglycemia, 1.08 (95% CI, 0.98 to 1.19), 1.13 (1.03 to 1.26), and 1.10 (1.00 to 1.12). There were no obvious thresholds at which risks increased. Significant associations were also observed for secondary outcomes, although these tended to be weaker.

CONCLUSIONS

Our results indicate strong, continuous associations of maternal glucose levels below those diagnostic of diabetes with increased birth weight and increased cord-blood serum C-peptide levels.

- 我国临床资料丰富, 近年也陆续开展了多中心合作研究, 尽管存在一定不足。
- 今后怎样提高临床科研论文水平? 临床研究应有临床流行病学专家共同参与设计, 严格的质控, 科学的分析等。

科研选题及研究思路的建立

——卵巢癌细胞对DC及其前提细胞分化和功能的影响

浙江大学医学院附属妇产科医院

谢幸

医学科学研究

为解决医学科学问题而提出的包含具体目标、设想和实施方案的 basic 研究单元

科学研究的基本框架

选题 → 执行 → 总结

医学实践 提出问题 查阅文献 形成思路	实验设计 调研计量 积累数据 分析数据	撰写论文 科学评估 推广应用 解决问题
------------------------------	------------------------------	------------------------------

选 题

基本原则

- ❖ 科学性
- ❖ 创新性
- ❖ 实用性
- ❖ 可行性

关键 ----- 提出科学问题

- ❖ 以科学理论和揭示自然规律为依据
- ❖ 带着科学的思维进行实践
- ❖ 来自医学实践中存在的各种矛盾
- ❖ 关注难点、热点和重点,不忽略盲点

提出一个问题往往比解决一个问题更重要,因为解决问题也许仅仅是一个数学上或实验上的技能而已。而提出新的问题,新的可能性,以新的角度看旧的问题,却需要创造性的想象力,而且标志着科学的真正进步。

——爱因斯坦

选题中的创新性

- ❖ 创新性是科学研究的灵魂
- ❖ 在实践积累中创新
- ❖ 在坚实的基础知识上创新
- ❖ 在学科的融合、交叉和综合中创新

创新的内涵

- ❖ 根本性创新 (突破性)
- ❖ 增量性创新 (改进性)

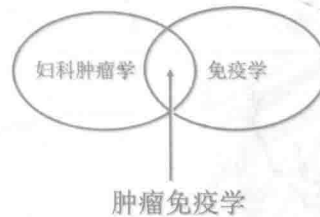
卵巢癌细胞对DC及其前提细胞分化和功能的影响

我们选题的思路, 课题设计及课题完成

临床问题

- ❖ 卵巢癌治疗现状：尽管手术和化疗不断改进，晚期卵巢癌5年总体生存率无明显改善
- ❖ 免疫学进展迅速，正在作为候选的第四种肿瘤治疗。树突状细胞（Dendritic Cell, DC）肿瘤疫苗在国外已进入临床I、II期验证
- ❖ 问题：卵巢癌亟需新的治疗方法
DC疫苗疗效并不满意，其原因尚不清楚

发现学科交叉点



调研发新充实基础知识

- ◆ 肿瘤微环境：肿瘤局部由肿瘤细胞、细胞外基质与机体免疫系统之间相互作用所形成的免疫网络
- ◆ 免疫网络中的肿瘤反击现象
 - 逃脱机体免疫攻击（免疫逃逸）
 - 诱导机体免疫耐受

肿瘤免疫逃逸的主要相关机制

- ◆ 肿瘤特异抗原缺失
- ◆ 肿瘤相关抗原表达呈低水平
- ◆ 抗原提呈相关分子不表达或低表达
MHC I类分子、MHC II类分子和共刺激分子
- ◆ 物理屏障防止效应免疫细胞接触肿瘤细胞
- ◆ 机体自我免疫耐受抑制

肿瘤免疫反击的相关机制

- ◆ 分泌免疫抑制性细胞因子，诱导Th1/Th2漂移
- ◆ 诱导抗原提呈细胞成熟障碍、功能缺陷及凋亡
- ◆ 抑制免疫效应细胞功能、诱导其凋亡
- ◆ 诱导调节性免疫细胞集聚、增生

肿瘤免疫反击的相关机制

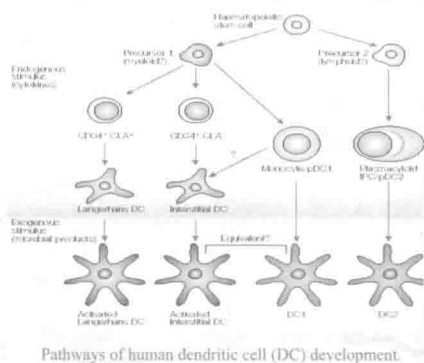
其中肿瘤诱导专职抗原提呈细胞，即树突状细胞(DC)的成熟障碍、功能缺陷及凋亡，可能是关键机制，也是当今肿瘤免疫学研究的热点之一

DC的功能

- ◆ 摄取，处理，提呈抗原，并迁移至淋巴组织
- ◆ 免疫反应的始动者：刺激静止的，原始的和记忆性的B细胞和T细胞
- ◆ 强大的刺激T细胞的潜能：少量的DCs和低水平的抗原能诱导强烈的T细胞反应
- ◆ 诱导免疫耐受：去除自身反应性的胸腺细胞，使成熟的T细胞免疫无能。

DC的分类及功能差异

- ◆ 髓系 (myeloid DC, mDC/DC1)
 - 诱导TH1类免疫反应
- ◆ 浆细胞系 (plasmacytoid DC, pDC/DC2)
 - 诱导TH2类免疫反应
 - 诱导抗病毒免疫反应



肿瘤中DC分化缺陷

- ◆ 肿瘤患者外周血中DC数量下降
- ◆ 肿瘤患者的外周血和肿瘤组织中未成熟的DC数量增加
- ◆ 肿瘤细胞来源的条件培养基在体外抑制DC的分化，
- ◆ 受到影响的主要是髓系DC而非淋巴系的DC
- ◆ 在肿瘤切除后，肿瘤患者外周血中的髓系DC恢复

卵巢癌相关DC功能缺陷

- ◆ 成熟的DCs减少，未成熟的DCs增多，有功能DC减少
- ◆ pDCs增多，mDC/pDC下降

科学问题

- ◆ 卵巢癌细胞是否是DC分化和功能缺陷的原因？
- ◆ 卵巢癌细胞在哪一个阶段影响DC亚群分化？
- ◆ 卵巢癌细胞影响DC亚群分化的结局如何？
- ◆ 卵巢癌细胞影响DC亚群分化和功能的机制是什么？

研究思路

以卵巢癌细胞培养上清模拟卵巢癌微环境，观察上清对DC及其前提细胞分化和功能的影响及其参与因素，以阐明卵巢癌微环境的DC缺陷的机制，为制定卵巢癌的免疫治疗新策略提供实验依据。

课题设计包括三个部分

- ◆ 体外扩增成熟DC技术的建立
- ◆ 卵巢癌细胞株培养上清对CD34⁺造血干细胞来源的成熟DC分化和功能的影响
- ◆ 卵巢癌细胞株培养上清对CD34⁺造血干细胞来源的DC前体细胞分化和功能的影响

第一部分

体外扩增成熟DC技术的建立

研究方法



实验分组中不同的细胞因子组合

- ① 空白 (不加细胞因子)
- ② GM-CSF (100ng/ml) / TNF- α (50ng/ml)
- ③ GM-CSF (100ng/ml) / TNF- α (50ng/ml) / SCF (50ng/ml)
- ④ GM-CSF (100ng/ml) / TNF- α (50ng/ml) / FL (50ng/ml)
- ⑤ GM-CSF (100ng/ml) / TNF- α (50ng/ml) / SCF (50ng/ml) / FL (50ng/ml)

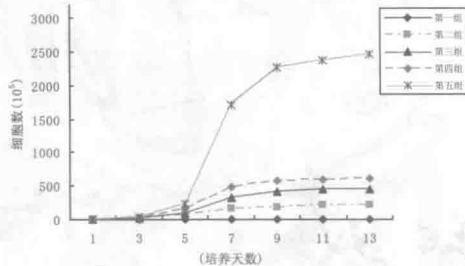


图1. 不同细胞因子组合对细胞增殖动力学影响

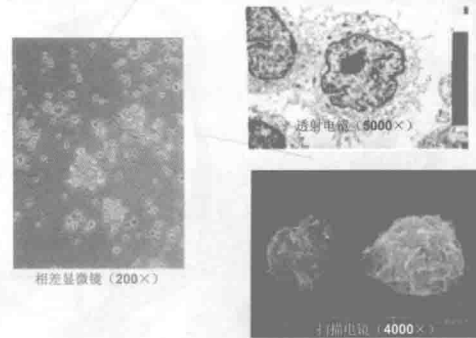


图2. DC形态学观察

表1. 不同细胞因子组合对DC相关分化抗原表达的影响

	CD1 α	CD83	CD80	HLA-DR	CD54	CD14
第二组	26.54 \pm 2.19	25.52 \pm 2.47	34.46 \pm 2.05	34.8 \pm 8.36	61.72 \pm 1.83	1.67 \pm 0.33
第三组	33.62 \pm 2.30	55.32 \pm 3.17	53.58 \pm 3.62	50.7 \pm 4.82	72.10 \pm 1.50	1.41 \pm 0.15
第四组	58.08 \pm 13.5	63.32 \pm 3.24	66.46 \pm 7.85	64.44 \pm 3.55	76.06 \pm 1.42	0.54 \pm 0.21
第五组	83.76 \pm 8.29	87.94 \pm 6.91	94.3 \pm 0.90	73.06 \pm 4.05	95.46 \pm 1.12	0.21 \pm 0.06

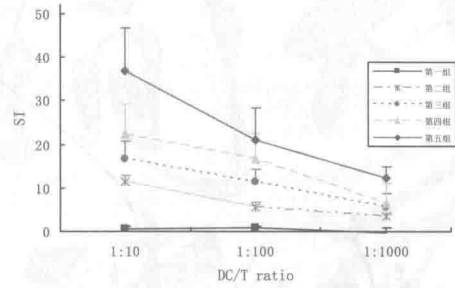


图3. 不同细胞因子组合对DC刺激T细胞增殖能力的影响

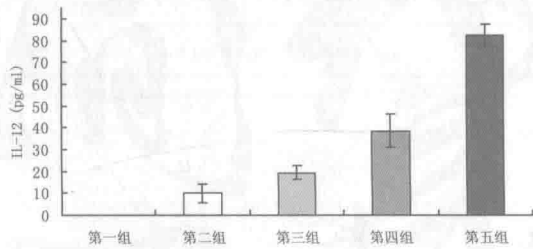


图4. 不同细胞因子组合对DC分泌IL-12能力的影响

结论

GM-CSF/TNF- α /FLT-3L/SCF是扩增成熟DC的最有效细胞因子组合,为下一步实验奠定了基础

第二部分

卵巢癌细胞培养上清对成熟DC分化和功能的影响

研究方法

- ❖ 采用DC扩增技术中GM-CSF/TNF- α /SCF/FLT-3L细胞因子组合,分别在培养的第1d或第9d加入VEGF或20% SKOV3细胞上清
- ❖ 培养14天后收获悬浮DC,并进行细胞表型的检测和同种异体混合淋巴细胞反应(MLR)

研究结果

- ❖ 培养第一天加入VEGF或SKOV3培养上清均能促进DC的扩增,加入VEGF和中性抗体能阻断其增生效应,在培养的第九天加入上述干扰因素,无明显促细胞增殖效应
- ❖ 在培养第一天加入VEGF或SKOV3培养上清均能下调各种DC分化抗原的表达,加入VEGF和中性抗体能阻断其增生效应,在培养的第九天加入上述干扰因素,无明显效应
- ❖ 在培养第一天加入VEGF或SKOV3培养上清均能下调DC对T细胞的刺激效应,加入VEGF和中性抗体能阻断其效应,在培养的第九天加入上述干扰因素,无明显效应

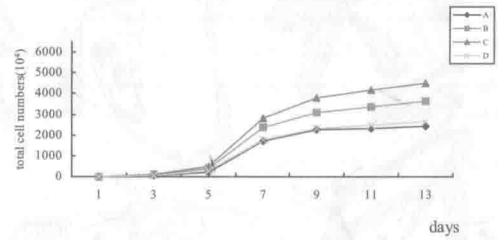


图5. 培养第1天加入VEGF或SKOV3细胞上清对细胞增殖的影响

A: 对照组; B: VEGF (25ng/ml); C: SKOV3细胞上清(20%); D: SKOV3细胞上清(20%)+anti-VEGF (10ug/ml)

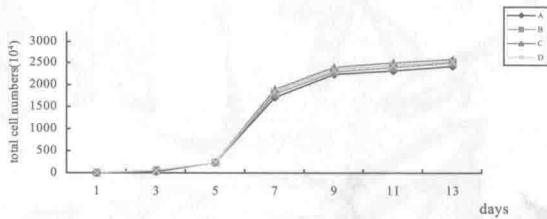


图6. 培养第9天加入VEGF或SKOV3细胞上清对细胞增殖的影响

A: 对照组; B: VEGF (25ng/ml); C: SKOV3细胞上清(20%); D: SKOV3细胞上清(20%)+anti-VEGF (10ug/ml)

表2. VEGF及SKOV3细胞培养上清对DC表型的影响

	CD1a	CD83	CD89	HLA-DR	CD54	CD14
对照	81.20 ± 6.93	87.98 ± 9.79	94.53 ± 0.87	74.15 ± 3.74	85.55 ± 2.26	0.18 ± 0.05
VEGF-day1	33.00 ± 2.12	42.23 ± 1.15	42.93 ± 1.32	37.93 ± 8.30	77.78 ± 4.91	9.16 ± 0.52
上清-day1	27.08 ± 2.12	54.63 ± 3.19	52.53 ± 3.18	47.30 ± 2.16	79.40 ± 5.15	10.06 ± 1.11
上清+抗体-day1	51.93 ± 8.97	64.30 ± 2.75	67.95 ± 8.20	67.40 ± 1.17	78.88 ± 3.27	1.68 ± 1.19
VEGF-day9	77.95 ± 1.91	85.83 ± 7.88	90.28 ± 6.78	72.10 ± 2.32	84.10 ± 5.92	0.21 ± 0.10
上清-day9	61.95 ± 1.60	72.03 ± 1.31	66.53 ± 2.01	51.13 ± 0.91	82.53 ± 1.73	1.40 ± 0.19
上清+抗体-day9	89.75 ± 0.59	73.83 ± 1.02	70.98 ± 1.59	54.78 ± 1.83	82.50 ± 2.82	1.37 ± 0.08

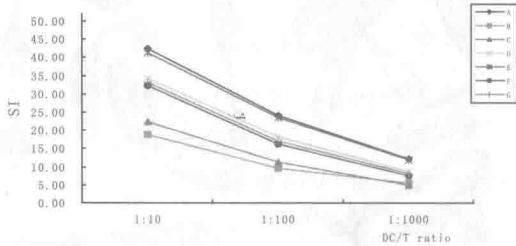


图7. VEGF或SKOV3细胞上清对DC刺激T细胞增殖能力的影响

A: 对照组; B: 第1d 加入VEGF (25ng/ml); C: 第1d 加入SKOV3细胞上清(20%); D: 第1d 加入SKOV3细胞上清(20%)和VEGF 抗体(10ug/ml); E: 第9d 加入VEGF (25ng/ml); F: 第9d 加入SKOV3细胞上清(20%) 和VEGF 抗体(10ug/ml); G: 第9d 加入SKOV3细胞上清(20%)和VEGF 抗体(10ug/ml)

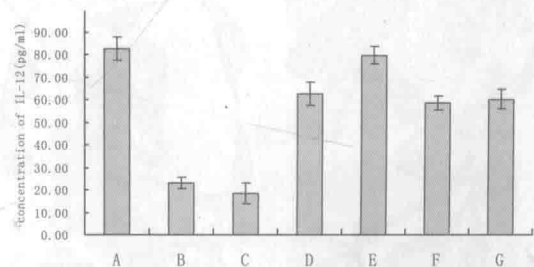


图8. VEGF或SKOV3细胞上清对DC分泌IL-12能力的影响

A: 对照组; B: 第1d 加入VEGF (25ng/ml); C: 第1d 加入SKOV3细胞上清(20%); D: 第1d 加入SKOV3细胞上清(20%) 和VEGF 抗体(10ug/ml); E: 第9d 加入VEGF (25ng/ml); F: 第9d 加入SKOV3细胞上清(20%) 和VEGF 抗体(10ug/ml); G: 第9d 加入SKOV3细胞上清(20%)和VEGF 抗体(10ug/ml)

结论

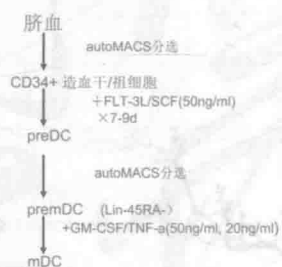
- ◆ 上皮性卵巢癌细胞能在DC成熟早期阻滞其进一步成熟，并抑制DC刺激T细胞增殖和分泌Th1细胞因子的能力
- ◆ 卵巢癌细胞分泌的VEGF参与了对DC分化和功能影响的过程

第三部分

卵巢癌细胞培养上清对mDC前体细胞 分化和功能的影响

研究方法

体外诱导和扩增DC



实验分组

- control组: premDC(lin-CD45RA-) + GM-CSF/TNF-α(50ng/ml/20ng/ml)
- OSE上清组: premDC(lin-CD45RA-) + GM-CSF/TNF-α(50ng/ml/20ng/ml) + OSE上清
- SKOV3上清: premDC(lin-CD45RA-) + GM-CSF/TNF-α(50ng/ml/20ng/ml) + SKOV3上清

研究内容

- (1) 流式测定DC1 (HLA-DR+CD11c+CD123-) 和DC2 (HLA-DR+CD11c-CD123+) 比例
- (2) 流式测定DC表面共刺激分子CD80的表达
- (3) ELISA测定培养系统中IL-12的分泌
- (4) MLR测定培养的DC免疫刺激功能。

研究结果

- ◆ GM-CSF+TNF诱导Lin-CD45RA-前体细胞分化成为HLA-DR+CD11c-CD123+ mDCs and HLA-DR+CD11c+CD123- pDCs
- ◆ 在mDC前体细胞分化的过程中，SKOV3使mDC的比例下降，pDC的比例增加
- ◆ 在SKOV3培养上清的作用下，DC的功能发生缺陷，对T细胞刺激能力降低，分泌IL-12的能力降低

表 3. 不同培养条件下DC表面分子标记的表达 (n=8, mean±SD, %)

group	HLA-DR	CD80	CD11c+CD123-	CD11c-CD123+
control	26.5±6.9	25.3±15.4	29.1±3.9	6.6±1.4
OSE-上清	22.3±6.4	29.8±18.6	27.9±11.9	5.3±1.9
SKOV3-上清	26.0±6.4	32.6±22.5	16.4±7.4*	8.1±0.9*

* 和control组相比较, p=0.005. 和OSE-上清组相比较, p=0.008
* 和control组相比较, p=0.049. 和OSE-上清组相比较, p=0.039

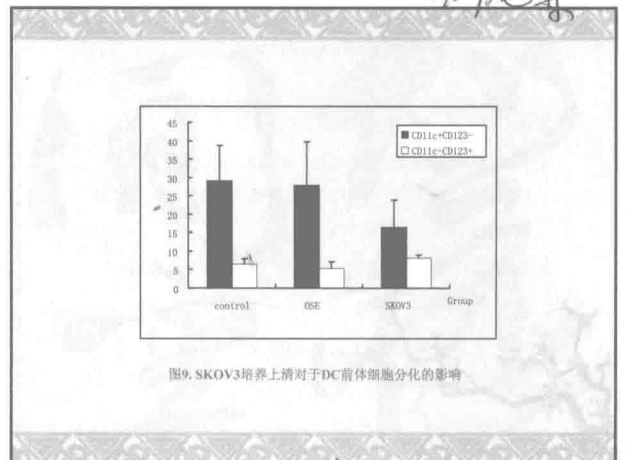


图9. SKOV3培养上清对于DC前体细胞分化的影响

阳正亚型即ca, 评估的免疫功能如何呢? 免疫治疗的地位如何呢!

表 4. 不同培养条件和不同DC/T比率对T细胞刺激能力 (n=3, mean±SD)

DC/T	control	OSE	SKOV3
1/10	7.7±1.3	8.1±2.5	4.8±0.9
1/100	6.6±1.3	5.5±1.6	3.3±0.3
1/1000	3.0±0.7	2.9±1.4	1.1±1.0

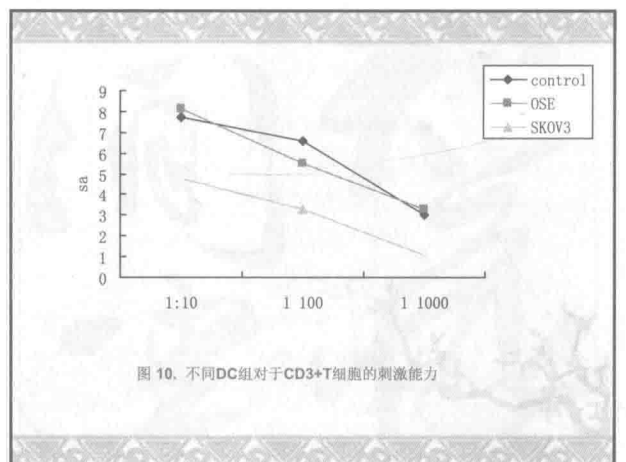


图 10. 不同DC组对于CD3+T细胞的刺激能力

其他CAIN中 如何处理, ①观察自身抗体是否致敏 ③ 换药
② PET-CT, 最好影像学: VP16

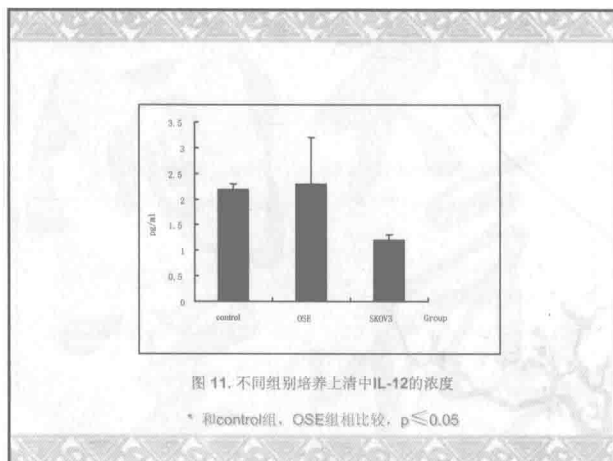


图 11. 不同组别培养上清中IL-12的浓度

* 和control组, OSE组相比较, p≤0.05

结论
上皮性卵巢癌细胞影响mDC前体细胞的分化, 导致成熟mDC减少, pDC增多, 同时影响了成熟DC的免疫功能

研究结论

- ◆ GM-CSF/TNF- α /FLT-3L/SCF是扩增成熟DC的最有效细胞因子组合
- ◆ 上皮性卵巢癌细胞能在DC成熟早期,通过分泌VEGF阻碍DC的进一步成熟,并降低其免疫功能
- ◆ 上皮性卵巢癌细胞影响mDC前体细胞的分化,导致成熟mDC减少,pDC增多,同时影响了成熟DC的免疫功能

本研究创新点

- ◆ 明确了卵巢癌细胞在DC亚群前体细胞和成熟早期阶段影响其分化和功能
- ◆ 阐明了卵巢癌细胞通过分泌特定细胞因子VEGF影响DC分化和功能
- ◆ 证实了肿瘤微环境中mDC/pDC下降与卵巢癌细胞引起的DC前体细胞分化异常有关

肿瘤微环境
免疫网络的肿瘤免疫现象

本研究结果对临床的启示

在DC肿瘤疫苗的制备和应用中,要去除DC2,充分关注VEGF等特定的细胞因子对不同DC亚群分化和功能影响,从而提高DC肿瘤疫苗的临床疗效

本研究的不足之处

- ◆ 观察到的还局限于现象描述,缺乏更深入的机制研究
- ◆ 缺少动物模型的研究,对临床研究的指导意义尚有一定的差距

髓系: myeloid DC mDC / DC1 调节TH1
浆细胞系: / DC2 TH2

我们的后续工作

- ◆ 筛查卵巢癌细胞中影响DC分化的细胞因子
目前我们在进行的工作有细胞因子芯片筛查已知范围内的细胞因子,蛋白质二维电泳-质谱分析筛查可能未知的细胞因子,对可能的细胞因子进行序列、结构及相关功能研究
- ◆ 动物模型体内研究
构建移植瘤免疫缺陷鼠动物模型,模拟人类卵巢癌对DC分化的影响,寻找治疗靶分子,并为DC疫苗研究提供理论基础

本研究受基金资助情况:

- 树突状细胞亚群漂移与肿瘤诱导细胞死亡及其分子机制,国家自然科学基金(30471811),2005.1-2007.12,
- 卵巢癌微环境诱导调节性树突状细胞外周分化及信号转导,国家自然科学基金(30672229),2007.1-2009.12
- 免疫调节细胞异常外周分化与卵巢癌免疫反击,浙江省自然科学基金重点项目(Z205170),2006.1-2008.12

发表论文

- ◆ Ovarian Carcinoma Cells Effectively Inhibit Differentiation And Maturation Of Dendritic Cells Derived From Hematopoietic Progenitor Cells In Vitro. *Cancer Investigation*, 2005, 23(5): 379-385
- ◆ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And Ovarian Cancer Cell Supernatant Activate Signal Transducers And Activators Of Transcription (STATs) Via VEGF Receptor-2 (KDR) In Human Hemopoietic Progenitor Cells. *Gynecologic Oncology*, 2004, 94(1): 125-133
- ◆ Evaluation of immune inhibitory cytokines profiles in epithelial ovarian carcinoma. *Journal of Obstetric and gynecological Research*. accepted
- ◆ VEGF对CD34+造血干细胞来源的树突状细胞分化及功能的影响. *中华血液学杂志*. 2004; 25 (9) : 532-535.
- ◆ VEGF诱导CD34+造血干细胞STAT活化的体外研究. *中国医学科学院学报*. 2004; 26 (1) : 12-16
- ◆ 几种细胞因子对人脐血CD34+干细胞在体外诱导扩增为树突状细胞的研究. *中华微生物学与免疫学杂志*. 2004; 24 (2) : 91
- ◆ 浆细胞样树突状细胞前体细胞及其与疾病的研究进展. *免疫学杂志*. 2006, 3 (22) : 26

