

且主要组织相容性复合体(MHC)相匹配的肿瘤细胞具有明显的杀伤效应。体内研究表明,上述多肽表位对肿瘤小鼠具有明显的免疫保护和免疫治疗作用^[11]。Sommerfeldt 等^[12]亦从 HPA 氨基酸序列中设计了 3 条受组织相容性抗原(HLA-A2)限制的 HPA 抗原表位,即 HPA8-16、HPA16-24、HPA183-191。实验表明,这 3 条抗原表位负载的 DC 细胞均可以产生 HPA 特异性的 CTL,对 HPA 阳性且 HLA-A2 阳性的乳腺癌细胞(BT-20、BT-549 及 BT-124)具有明显的杀伤效应,而对 HLA-A2 阳性但 HPA 阴性的 MCF-7 乳腺癌细胞不具有杀伤效应。以上研究进一步提示,HPA 可以作为一种广谱的肿瘤相关抗原用于肿瘤的免疫治疗。与 HPA 全基因序列腺病毒负载 DC 疫苗相比,HPA 多肽疫苗没有腺病毒载体的参与,从而不必考虑载体及其整合的安全性,并且 CTL 抗原长度仅约 9 个氨基酸序列,体外可以合成,具有更为广阔的临床应用前景,因此很有可能成为临床上 HCC 的免疫治疗方法之一。

3.3 合成反义寡核苷酸抑制 HPA 表达 手术、放疗及化疗仍是目前肿瘤治疗的 3 种主要手段,但手术治疗对早期肿瘤疗效佳,许多患者在就诊时多为中晚期,已失去手术治疗的最佳时机,而放、化疗由于副作用大,对目标的选择性不高,不易为患者所接受。由于 HPA 与肿瘤的侵袭、转移及预后有关,其是否能作为一种广谱的抗肿瘤转移靶点,应用于中晚期肿瘤(包括 HCC)的治疗已成为目前研究的一大热点。随着反义核酸技术日趋完善,其特异性、选择性和效果有很大提高,特别经过修饰后增加了稳定性、与靶 RNA 的亲合力以及对细胞的通透性。在此基础上合成针对 HPA mRNA 的起始密码区的反义寡脱氧核苷酸,经硫代磷酸化修饰后,采用阳离子脂质体介导,转染至 HCC 细胞 SMMC-7221 和 BEL-7402 细胞,结果实验组的侵袭细胞数量明显低于对照组,证明了基于 HPA 的反义寡脱氧核苷酸能明显下调 HPA 的表达并抑制 HCC 细胞的侵袭力。

4 结 语

HPA 是近年来发现的与肿瘤浸润和转移密切相关的内切酶,能作为评价包括 HCC 患者在内的肿瘤患者临床预后的一个指标。对于中晚期 HCC,由于对多发性转移仍缺乏有效的治疗手段,基于 HPA 在 HCC 侵袭和转移中的作用,针对 HPA 靶位的肿瘤治疗不失为一种新的途径。但目前 HPA 活性检测方法繁琐,应用于临床有尚待进一步努力。

• 综 述 •

基质辅助激光解吸电离飞行质谱用于血培养中病原菌的快速鉴定研究进展

杨勤英¹综述,王 沛²审校

(1. 湖北省荆门市妇幼保健院检验科 448000; 2. 湖北省荆门市第一人民医院检验科 448000)

关键词: 研究; 基质辅助激光解吸电离飞行质谱; 病原菌; 血培养

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 15. 031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)15-1723-03

临床微生物检验与其他检验项目相比,最大的缺点是报告时间长,远不能满足临床的需要。分子生物学方法如 PCR 法虽可提高检测灵敏度,缩短检测报告时间,但假阳性率高,对实验室环境的要求很高,在操作的过程中还需使用一些毒性化学药品。快速、准确地从临床标本中检测鉴定出病原菌,对于感染

参考文献

- [1] Ben-Zaken O, Shafat I, Gingis-Velitski S, et al. Low and high affinity receptors mediate cellular uptake of heparanase[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3): 530-542.
- [2] Vonderheide RH. Prospects and challenges of building a cancer vaccine targeting telomerase[J]. Biochimie, 2008, 90(1): 173-180.
- [3] Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(5): 341-352.
- [4] Yamaguchi S, Tatsomi T, Takeham T, et al. Immunotherapy of routine colon cancer using receptor tyrosine kinase EphA2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines[J]. Cancer, 2007, 110(7): 1469-1477.
- [5] Minato N, HaRofi M. Spa-1(Sipa1) and Rap signaling in leukemia and cancer metastasis[J]. Cancer Sci, 2009, 100(1): 17-23.
- [6] Galliher AJ, Schiemann WP. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3752-3758.
- [7] Ferro V, Dredge K, Liu L, et al. PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis[J]. Semin Thromb Hemost, 2007, 33(5): 557-568.
- [8] 周怀龙, 黎才海, 李其云. 乙酰肝素酶在肿瘤侵袭、转移及治疗作用中的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(1): 104-106.
- [9] 罗志强, 刘锋, 邵江华, 等. 原发性肝癌组织中肝素酶表达与肝癌侵袭转移关系的研究[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(12): 1560-1562.
- [10] 田志宏, 王顺祥, 张凤瑞. 乙酰肝素酶在原发性肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. 河北医科大学学报, 2007, 28(3): 172-174.
- [11] Chen T, Tang XD, Wan Y, et al. HLA-A2-restricted CTL epitopes from human heparanase as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy[J]. Neoplasia, 2008, 10(9): 977-986.
- [12] Sommerfeldt N, Beckhove P, Ge Y, et al. Heparanase: a new metastasis-associated antigen recognized in breast cancer patients by spontaneously induced memory T lymphocytes[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7716-7723.

(收稿日期: 2011-01-20)

性疾病的诊断、治疗及预后发挥着重要作用。基质辅助激光解吸电离飞行质谱(MALDI-TOF MS)是一项近期发展起来的检测新技术,已经广泛应用于临床检验医学的各个领域^[1-5]。

1 MALDI-TOF MS 简介

MALDI-TOF MS 是一项应用于细菌和真菌鉴定的快速

检测技术。不同的样品与过量的基质溶液点在样品板上,溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶。共结晶受激光照射后,基质分子吸收能量后与样品解吸附并使样品解离,经过飞行时间检测器,将不同荷质比的离子分开,形成特异性的病原菌指纹图谱。已知菌株或标准菌株检测后可建立指纹图谱库。相关软件将待检菌的指纹图谱与已知的指纹图谱库进行比对,即可判断待检菌的种类^[6]。检测的过程可大致分为:样品处理、MALDI-TOF MS 分析、结果判读。它的检测优势在于:(1)可取经培养后的菌落检测或不经培养直接从标本中检测^[7-8]。(2)检测速度快,整个过程可在 1 h 内完成^[9]。(3)可在种、株的水平上将细菌区分,能将不同血清型的菌株区别开来^[10]。

2 MALDI-TOF MS 检测血培养中病原菌的方法学

MALDI-TOF MS 直接用于阳性血培养中病原菌的检测鉴定的报道并不多见^[11-16]。因血培养瓶中有病原菌及红细胞和其他蛋白成分,会干扰指纹图谱库的结果判读,须对标本进行预处理,特别是除掉其中的血红蛋白。

检测方法大致分为如下几个步骤:(1)阳性血培养样本采集;(2)清除肉汤中的红细胞;(3)菌体蛋白质沉淀;(4)菌体蛋白质提取及溶解。具体操作流程:首先使用双蒸水^[17]、氯化铵^[14-15]或皂甙^[11]处理使红细胞溶解破裂,再低速离心并使用双蒸水洗涤。双蒸水洗涤的目的在于清除血液及血培养肉汤中的蛋白,十二烷基硫酸钠(SDS)则用于血培养念珠菌阳性血培养肉汤的处理^[18]。菌体蛋白用 70%乙醇沉淀,沉淀后的菌体蛋白联合使用三氟乙酸/乙腈或甲酸/乙腈以便溶解、提取菌体蛋白质。研究发现,甲酸/乙腈联用的效果优于三氟乙酸/乙腈^[12]。将细菌蛋白均匀地加在样品盘的微孔中,再用移液器取 2 μ L 基质液覆盖在样品盘中。室温下自然干燥后进行检测。

3 检测效能

部分研究人员对 MALDI-TOF MS 检测血培养中病原菌的方法学进行了评价。尽管研究者们使用了不同的血培养系统,但尚无证据表明血培养系统对实验结果的影响。在 1 项为期 5 个月的回顾性研究中,研究者对 584 份阳性血培养标本进行了检测。其中 562 份为单一菌感染,22 份为混合菌感染。结果显示 MALDI-TOF MS 可鉴定 94%的革兰阴性杆菌,但只能鉴定 67%的革兰阳性球菌,尤其是链球菌无法鉴定。通过比较不同的溶剂,发现使用乙腈作为前处理的溶剂不利于革兰阳性球菌的鉴定^[12]。另一项为期 9 周的研究发现,122 份阳性血培养标本中,98.55%的标本可鉴定至种属水平,发生鉴定错误的细菌主要见于链球菌和葡萄球菌。10 株肺炎链球菌中有 8 株无法鉴定,2 株虽可鉴定至种,但其所获鉴定评分较低(1.7~2)^[15]。菌体带有荚膜的病原菌如肺炎克雷伯菌与流感嗜血杆菌所获鉴定评分低(<1.7),而 La Scola 和 Raoult^[12]报道的 28 份肺炎克雷伯菌中 26 份可正确鉴定,3 份流感嗜血杆菌中 1 份可正确鉴定。造成这种差异的原因可能与标本的预处理方法不同有关。

Stevenson 等^[14]的研究对象包括了 60 种不同菌属的 212 份血培养标本,将 MALDI-TOF MS 与传统的生化反应鉴定法比较,两法不一者采用基因测序法进行最终确认。212 份血培养标本中 42 份无法鉴定(19.8%),这或许与阳性血培养瓶中受试的待检菌数量太少达不到最低检测限有关。在鉴定评分大于 1.7 的 170 份标本中,162 份被正确鉴定(95.3%),其余的 8 份缓症链球菌则被误鉴定为肺炎链球菌。通过上述的几项研究可见,MALDI-TOF MS 快速、可靠,但对肺炎链球菌的

鉴定尚存一定困难,必须用其他方法确认。如使用链球菌胶乳凝集试剂可成功地将肺炎链球菌与缓症链球菌区分。MALDI-TOF MS 法可在约 1 h 内完成检测过程,最快约 20 min^[11],最长约 2 h^[13]。

4 检测费用

Seng 等^[19]估计 MALDI-TOF MS 的费用约为传统鉴定方法的 1/4 左右,Cherkaoui 等^[20]的报道也证实了这一点。因为 MALDI-TOF MS 可直接检测报警后的阳性血培养瓶,无需将菌液转种平板培养,无需生化试验鉴定。

5 耐药性检测

有报告称借助 MALDI-TOF MS 可以将耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)区分^[10,21]。细菌的耐药机制千差万别,基于蛋白改变(如青霉素结合蛋白的变异)或诱导性耐药不能被 MALDI-TOF MS 检测。但针对抗生素的获得性酶(如 β -内酰胺酶、甲基化酶、外排泵等)的耐药性有可能通过 MALDI-TOF MS 检测^[22]。有趣的是,一种发生蛋白质组漂移的白色念珠菌对氟康唑的最小抑菌浓度(MIC)发生改变,这种改变可通过 MALDI-TOF MS 检测到^[23]。通过大量数据库的建立与分析,也能发现某些病原菌的毒力基因,如 4 448 amu 处的特征性的质谱峰是判断金黄色葡萄球菌是否携带杀白细胞素毒力基因的良好指标,其敏感度与特异度分别可达到 100%与 90.6%^[24]。国内石柱英等^[25]研究发现此技术可较好地用于 MRSA 的区分,但不适用于其他细菌的耐药性检测。

6 存在的问题

阳性血培养瓶中肺炎链球菌的鉴定依然有一定的困难,现有的证据指示,单独借助 MALDI-TOF MS 法还不能正确鉴定肺炎链球菌,补救方法是在革兰染色后,对疑似链球菌者使用链球菌胶乳凝集试验鉴定。导致这现象的原因之一是 MALDI-TOF MS 数据库的缺乏,另一方面也表明了 MALDI-TOF MS 对部分种类的病原菌无法正确鉴定。

对阳性血培养瓶中的混合菌的鉴定也是 1 个难题。1 项研究对 15 份混合菌感染的血培养瓶进行 MALDI-TOF MS 分析,结果仅检出 1 种或 2 种菌^[13,15]。虽然研究者认为建立特殊的数据库可提高混合菌的鉴定能力,但多数学者报告混合菌感染中仅 1 种菌可被检出。此外,混合感染会导致无法鉴定或错误鉴定^[12]。

阳性血培养瓶中的肉汤的预处理也有待于评估与优化,只有标准化肉汤的预处理才能为检测过程的自动化铺平道路。MALDI-TOF MS 也受最低检测限的限制,MALDI-TOF MS 鉴定病原菌的能力很大程度上取决于血培养中的细菌量^[11]。模拟试验显示,细菌量在 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL 的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌可正确鉴定,细菌量在 10^6 CFU/mL 时不易与背景信号区别^[13]。

7 展望

提高 MALDI-TOF MS 的检测灵敏度,可以使其更好地快速检测血培养中的病原菌,并实施败血症的床旁检验(POCT)。对 MALDI-TOF MS 数据库的深度分析有助于提供细菌的耐药信息或判断细菌的表型,这些信息可帮助临床选用适当的抗生素^[23]。MALDI-TOF MS 检测鉴定血培养中病原菌的经验也可应用到其他无菌体液标本,如尿液、脑脊液等。MALDI-TOF MS 数据库的更新非常简便,有利于扩大待检菌的范围。作为一种快速、简便的检测技术,MALDI-TOF MS 有望取代传统的血培养检测技术,为血培养中病原菌的快速诊

断和治疗提供有力的支持。

参考文献

- [1] 刘维薇, 吕元. 蛋白质飞行时间质谱技术及其临床应用进展[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(5): 363-367.
- [2] 王晔茹, 崔生辉, 李凤琴. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在沙门菌检测和鉴定分型中的应用研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(6): 685-689.
- [3] 梁双花, 王开正. SELDI-TOF-MS 技术诊断卵巢癌的系统评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 26-28.
- [4] 赵学峰, 王世鑫, 涂植光. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选尘暴露天人群血清生物标记物和诊断决策树研究[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(6): 492-495.
- [5] 金宏伟, 杨光, 黄河清. 柱层析和 MALDI-TOF 质谱技术筛选食道癌血清标志物多肽[J]. 检验医学, 2009, 24(11): 792-795.
- [6] 孙宗科, 张伟, 陈西平. 应用飞行时间质谱仪快速鉴定细菌的初步研究[J]. 卫生研究, 2004, 33(55): 552-554.
- [7] Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11): 1614-1619.
- [8] Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2110-2115.
- [9] Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, et al. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11): 1604-1613.
- [10] Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry[J]. J Med Microbiol, 2000, 49(3): 295-300.
- [11] Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1542-1548.
- [12] La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e8041.
- [13] Christner M, Rohde H, Wolters M, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1584-1591.
- [14] Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 444-447.
- [15] Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1481-1483.
- [16] Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(11): 1631-1638.
- [17] Liu H, Du Z, Wang J, et al. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6): 1899-1907.
- [18] Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry[J]. PLoS One, 2010, 25; 5(1): e8862.
- [19] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(4): 543-551.
- [20] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1169-1175.
- [21] Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, et al. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 255(2): 233-239.
- [22] Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(5): 1633-1638.
- [23] Marinach C, Alanio A, Palous M, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole[J]. Proteomics, 2009, 9(20): 4627-4631.
- [24] Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, et al. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(5): 467-470.
- [25] 石桂英, 孙宗科, 陈西平. 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测细菌耐药性的初步研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(1): 82-84.

(收稿日期: 2011-01-21)

• 综述 •

自噬和抗肿瘤免疫关系的研究进展

丁洁颖, 胡水清 综述, 陈福祥 审校

(上海交通大学医学院附属第九人民医院检验科 200011)

关键词: 自噬; 炎症; 抗肿瘤免疫

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)15-1725-04

自噬是真核细胞进化过程中相对固定的蛋白质降解途径。真核细胞通过自噬实现对长寿命蛋白质和细胞器的降解和重

复利用。自噬在维持真核细胞合成代谢和分解代谢的平衡作用上备受关注。肿瘤细胞普遍存在着合成代谢和分解代谢的