

- [12] Myers E, Hill AD, Kelly G, et al. A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression [J]. Br J Cancer, 2006, 95(10): 1404-1409.
- [13] Xia WY, Lien HC, Wang SC, et al. Expression of PEA3 and lack of correlation between PEA3 and HER-2/neu expression in breast Cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 98(3): 295-301.
- [14] Ishida S, Higashino F, Aoyagi M, et al. Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(1): 325-330.
- [15] Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in Cancer progression [J]. Cell Res, 2003, 284(1): 99-110.
- [16] Qin L, Liao L, Redmond A, et al. The AIB1 oncogene promotes breast Cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(19): 5937-5950.
- [17] Xu J, Wu RC, O'malley BW. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(9): 615-630.
- [18] 黄竹英, 李松, 汪平帮, 等. VEGF 与 MMP-9 在原发性肝癌中的表达及意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1353-1354, 1356.
- [19] 朱民, 寿楠海. E1AF、MMP-2 及 MMP-7 在大肠癌组织中的表达及意义 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2004, 42(4): 434-436.
- [20] 张涛, 陈晓品, 汤为学, 等. MMP-2, MMP-9 在高、低转移潜能乳腺癌细胞中的表达变化 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6): 600-603.
- [21] Gu S, Chen L, Hong Q, et al. PEA3 activates CXCR4 transcription in MDA-MB-231 and MCF7 breast Cancer cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(10): 771-778.
- [22] Verreman K, Baert JL, Verger A, et al. The coactivator activator CoAA regulates PEA3 group member transcriptional activity [J]. Biochem J, 2011, 439(3): 469-477.
- [23] Vageli D, Ioannou MG, Koukoulis GK. Transcriptional activation of hTERT in breast carcinomas by the Her2-ER81-related pathway [J]. Oncol Res, 2009, 17(9): 413-423.
- [24] Baker R, Kent CV, Silbermann RA, et al. Pea3 transcription factors and wnt1-induced mouse mammary neoplasia [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8854.
- [25] Brenner JC, Ateeq B, Li Y, et al. Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate Cancer [J]. Cancer Cell, 2011, 19(5): 664-678.

(收稿日期: 2012-10-09)

## • 综 述 •

## 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪应用于 鲍曼不动杆菌检测的研究进展

梁 亮 综述, 农生洲<sup>△</sup>审校

(广西壮族自治区人民医院检验科, 广西南宁 530021)

**关键词:** 鲍氏不动杆菌; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.028**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)05-0578-03

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是一种新型的软电离物质谱,其原理是用激光照射待测物与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量传递给生物分子使其电离,让离子在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同可以推断出片段的大小,适用于混合物及生物大分子的测定。MALDI-TOF MS具有灵敏度高、准确度高及分辨率高的特点,为生命科学等研究领域中的一种强有力的分析测试手段。近年来, MALDI-TOF MS已逐渐应用于临床微生物学细菌鉴定<sup>[1]</sup>及真菌药敏的研究<sup>[2]</sup>,尤其在非发酵革兰阴性杆菌的鉴定方面有着重要的作用<sup>[3]</sup>。鲍曼不动杆菌是一种常见的革兰阴性非发酵杆菌,是当前国内外医院感染和社区获得性感染的主要条件致病菌<sup>[4-5]</sup>。本文就近年来 MALDI-TOF MS在检测鲍曼不动杆菌中的研究进展进行综述。

### 1 对产碳青霉烯酶菌株的检测

目前碳青霉烯类抗生素已广泛用于治疗鲍曼不动杆菌感染。有研究表明,全球范围内碳青霉烯类抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌感染的发病率逐年增多<sup>[6]</sup>,此类爆发流行的菌株多以产 OXA 型  $\beta$ -内酰胺酶为主<sup>[7-8]</sup>。如何快速、准确的鉴定出细菌是否具有产碳青霉烯酶的活性,对指导临床合理用药、控制鲍曼不动杆菌感染播散有重要的意义。Hrabák 等<sup>[9]</sup>用 MAL-

DI-TOF MS 检测碳青霉烯类药物美洛培南及其降解产物的情况,对已知产碳青霉烯酶和不产碳青霉烯酶的肠杆菌科和假单胞菌属细菌分别作了验证,结果显示此方法用于鉴别菌株是否产碳青霉烯酶的检测灵敏度为 96.67%,特异度可达 97.87%,说明 MALDI-TOF MS 检测具有快速、灵敏、特异性高的特点; Hrabák 等<sup>[10]</sup>对 108 株产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌、35 株不产碳青霉烯酶而对碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌,以及 2 株产 NDM-1 型的鲍曼不动杆菌用 MALDI-TOF MS 对碳青霉烯类药物美洛培南的水解情况进行了分析测定,结果显示 MALDI-TOF MS 适用于产碳青霉烯酶类的菌株的检测。Burckhardt 等<sup>[11]</sup>用同样的方法对多种产碳青霉烯酶的细菌进行检测时,发现在 1~2.5 h 内就可以检测到大量的碳青霉烯酶活性。Kempf 等<sup>[12]</sup>用 MALDI-TOF MS 对 106 株鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类的情况进行分析,经过严格的质控测试,推论 MALDI-TOF MS 适用于大量的产碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌临床分离株的检测。上述研究均提示 MALDI-TOF MS 在检测菌株产碳青霉烯酶尤其是  $\beta$ -内酰胺酶方面,具有快捷高效、准确度和特异度高的特点。

### 2 基因分型研究

PCR(palindromic-polymerase chain-reaction, PCR)相关检测技术是菌株基因分型研究中公认的检测金标准,早已在临床常规应用。然而由于 PCR 操作复杂,试剂成本高,仪器需要专

人培训等限制了它在微生物实验室中的大批量使用。黄髭飞等<sup>[13]</sup>收集了 60 株多重耐药的鲍曼不动杆菌,用重复序列 PCR (repetitive element palindromic-polymerase chain-reaction, REP-PCR)和 MAIDI-TOF MS 对菌株进行基因分型和溯源性鉴定。结果显示用 REP-PCR 可将 60 株鲍曼不动杆菌分为 REP-A~REP-L 共 12 型;用 MALDI-TOF MS 可将其分为 a~e 五个类型。表明 REP-PCR 分型较 MALDI-TOF MS 更为精确。但作者出于对试验所需成本、操作简易性等方面的综合考虑,认为在对鲍曼不动杆菌耐药菌株的初步基因分型筛选时,使用 MALDI-TOF MS 进行检测更具优势。

用实验室常规生化表型检测方法,鲍曼不动杆菌与鲍曼不动杆菌基因组 3 型、不动杆菌基因组 13TU 型很难区分,但是将鲍曼不动杆菌菌株鉴别到种的水平,对于研究鲍曼不动杆菌的致病性、流行病学、医院感染控制等方面有着重要的意义<sup>[14-15]</sup>。Espinal 等<sup>[16]</sup>尝试采用 MALDI-TOF MS 对鲍曼不动杆菌的基因组种群进行分类,研究中选择了 60 株菌株:18 株鲍曼不动杆菌、17 株鲍曼不动杆菌基因组 3 型、18 株鲍曼不动杆菌基因组 13TU 型和 7 株不动杆菌属的其他菌株。检测的同时用核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析 (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA), rRNA 基因间隔区序列分析以及 recA 基因和 bla(OXA-51)基因测序进行验证。发现 MALDI-TOF MS 检测能够识别绝大多数的鲍曼不动杆菌基因型的菌株,仅有部分的鲍曼不动杆菌基因组 13TU 型会误判为鲍曼不动杆菌,作者认为是由于现有的数据库内缺乏标准的基因组 13TU 型的参考株所致。此也证实了 MALDI-TOF MS 有利于实验室快速检测识别鲍曼不动杆菌的基因分型研究。Kusradze 等<sup>[17]</sup>用 PCR 联合 MALDI-TOF MS 对产碳青霉烯酶并对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌进行分型,研究了产 OXA 型碳青霉烯酶的多重耐药鲍曼不动杆菌菌株的流行播散趋势,再次证实此基因型的多重耐药鲍曼不动杆菌在世界范围内的流行播散。以上研究均表明 MALDI-TOF MS 无论是在鲍曼不动杆菌菌株基因分型,还是在多重耐药菌感染的流行病学调查中,均有一定的检测价值。

### 3 参与蛋白质组学研究

蛋白质组学是当前生命科学研究的的前沿领域,采用 MALDI-TOF MS 测得肽质量指纹图谱,在数据库中以查询识别的方式鉴定蛋白质,是蛋白质组学研究中普遍应用的鉴定方法。对鲍曼不动杆菌进行细胞外蛋白质组的研究,有利于进一步了解菌株的致病机制及发现新的毒力因子。Siroy 等<sup>[18]</sup>用 MALDI-TOF MS 对鲍曼不动杆菌参考菌株 ATCC19606 和临床分离的耐碳青霉烯类抗生素的鲍曼不动杆菌菌株外膜蛋白质组分同时进行比较分析,一共鉴定出 135 种膜内和膜外的蛋白。在临床分离的鲍曼不动杆菌菌株中,有 4 种孔蛋白的表达呈明显下调趋势;具有特定运输与酶学性质的大量蛋白表达呈上调趋势;发现多重耐药鲍曼不动杆菌菌株的青霉素结合蛋白 1B 的表达较低,产生具有不同于参考株的初级和四级结构的 CarO 蛋白质,并有 OmpW 的异形体蛋白质。Shin 等<sup>[19]</sup>通过二维双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 和 MALDI-TOF MS 对临床分离的编号为 1656-2 的鲍曼不动杆菌菌株进行研究,此菌株的特点是在特定的培养条件下,具备高效的产生生物膜的能力。该研究不仅发现了大量的鲍曼不动杆菌胞外蛋白成分,还观测到了相关的氧化应激反应和受巨噬细胞攻击时的防御反应。作者通过对差异表达蛋白质的进一步鉴定,发现在菌株生物膜上表达或呈上调的蛋白质有:以转铁蛋白为主的外膜受体转运蛋白;组氨酸激酶/反应调节剂

传感器以及 PAS-GGEDF-EAL 基因编码的双鸟苷酸环化酶的区域;有关的代谢蛋白质如 NAD-连接糖核苷二磷酸异构酶,苹果酸脱氢酶,N-乙酰-L-丙氨酸酰胺酶等;细菌的抗生素耐药相关蛋白;exodeoxyribonuclease III 基因和 GidA 基因编码的修复蛋白等。MALDI-TOF MS 检测在一定程度上揭示了鲍曼不动杆菌的新型胞外蛋白质组,为研究细菌的致病性提供了新的思路。鉴于生物膜的形成是鲍曼不动杆菌在社区和医院内获得性感染的主要途径之一<sup>[20]</sup>,Cabral 等<sup>[21]</sup>采用了包括 MALDI-TOF MS 在内的检测技术,用比较蛋白质组学的方法,构建了一个以新的蛋白质为靶向的、可防止鲍曼不动杆菌生物膜形成的生物学模型。上述研究均表明,在蛋白质组学研究中应用 MALDI-TOF MS 检测,有助于对鲍曼不动杆菌的生物膜的持久性与耐受性机理的深入探讨,从而进一步了解细菌外膜蛋白结构与功能的关系。

### 4 用于疾病诊断与耐药机制探讨

用 MALDI-TOF MS 技术对鲍曼不动杆菌感染引起的相关疾病的诊治、临床药物耐药机制的研究是当前一大热点,早期研究已取得了初步的成绩。Soares 等<sup>[22]</sup>用 MALDI-TOF MS 等检测 10 名确诊为鲍曼不动杆菌感染的败血症的成人患者的血浆,与健康对照组比较其蛋白质组分的改变情况,检测出包括有差异表达的脂蛋白、属于炎症/凝血途径和激肽释放酶-激肽系统的蛋白质等,提示 MALDI-TOF MS 在一定程度上可以辅助临床医生对鲍曼不动杆菌感染引起的败血症的诊断。Beceiro 等<sup>[23]</sup>通过 MALDI-TOF MS 研究多黏菌素耐药的鲍曼不动杆菌相关的耐药机理与产生条件,为治疗碳青霉烯类抗生素耐药的鲍曼不动杆菌感染提供了新的策略。

### 5 小 结

MALDI-TOF MS 具有简便高效、检测范围宽及分析速度快等优点,可作为一种便捷的方法用于检测鲍曼不动杆菌所产的碳青霉烯酶,也可用于相关的菌株基因分型、蛋白质组学及疾病诊断、耐药机制等方面的研究。MALDI-TOF-MS 仍存在一些不足:一是在检测基因型时, MALDI-TOF MS 结果与 PCR 结果相比,有一定的假阴性<sup>[24-25]</sup>;二是目前仍缺乏标准的参考菌株的数据库资料,不能鉴别出鲍曼不动杆菌基因组内的其他型。推测今后 MALDI-TOF MS 将在已联用 2DE 和 PCR 的基础上,联合其他分子生物学检测技术,对目前所知的对产酶菌株的检测方法、基因分型及测序、蛋白质组学方面开展更深入的研究,有望成为常规实验室内微生物鉴定分型发展的方向,对进一步研究鲍曼不动杆菌流行病学和相关的耐药机制,有效遏制耐药菌株的流行播散有积极意义。

### 参考文献

- [1] 蒋颜,周宏伟,蔡加昌,等. MALDI-TOF MS 在临床常见菌快速鉴定中的应用研究[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(1):544-547.
- [2] 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.
- [3] Jacquier H, Carbone E, Corvec S, et al. Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2011,30(12):1579-1586.
- [4] 薛炼,张亚茹,公衍文. 2007~2011 年鲍曼不动杆菌医院感染 5 年监测数据分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(13):1650-1652.
- [5] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options[J]. Int J Antimicrob Agents,2012,39(2):105-114.
- [6] Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, et al. *Acinetobacter baumannii* 2002-2008: increase of carbapenem-associated multi-

class resistance in the United States[J]. *Microb Drug Resist*, 2010, 16(3):209-215.

[7] D'arezzo S, Principe L, Capone A, et al. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(1):54-61.

[8] Nemec A, Krizová L, Maixnerová M, et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(3):484-489.

[9] Hrabák J, Walková R, Studentová V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9):3222-3227.

[10] Hrabák J, Studentová V, Walková R, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(7):2441-2443.

[11] Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9):3321-3324.

[12] Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31676.

[13] 黄艳飞, 王俊瑞, 顾海彤, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌医院获得性感染相关因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(36):2525-2529.

[14] Peleg AY, de Breij A, Adams MD, et al. The success of *acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e46984.

[15] Choi JY, Kim Y, Ko EA, et al. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments; species survey and observations of antimicrobial resistance[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 74(2):177-180.

[16] Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, et al. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(11):1097-1103.

[17] Kusradze Ia, Diene SM, Goderdzishvili M, et al. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 38(2):164-168.

[18] Siroy A, Cosette P, Seyer D, et al. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(12):3385-3398.

[19] Shin JH, Lee HW, Kim SM, et al. Proteomic analysis of *Acinetobacter baumannii* in biofilm and planktonic growth mode[J]. *J Microbiol*, 2009, 47(6):728-735.

[20] Bitrian M, Solari CM, González RH, et al. Identification of virulence markers in clinically relevant strains of *Acinetobacter* species[J]. *Int Microbiol*, 2012, 15(2):79-88.

[21] Cabral MP, Soares NC, Aranda J, et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(8):3399-3417.

[22] Soares AJ, Santos MF, Trugilho MR, et al. Differential proteomics of the plasma of individuals with sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Proteomics*, 2009, 73(2):267-278.

[23] Beceiro A, Llobet E, Aranda J, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7):3370-3379.

[24] Dusková M, sedo O, Ksicová K, et al. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS[J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 159(2):107-114.

[25] Alvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. Identification of *acinetobacter* species; is bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? [J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(2):345-349.

(收稿日期:2012-08-30)

• 综 述 •

## 甲胎蛋白异质体 L3 在原发性肝癌诊断中的研究进展

纪凤卿, 徐振兴 综述, 滕 菁 审校  
(厦门市中医院检验科, 福建厦门 361009)

**关键词:** 甲胎蛋白类; 肝癌; 诊断; 综述  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.029      **文献标识码:**A      **文章编号:**1673-4130(2013)05-0580-04

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是一种单链糖蛋白。1970年 Purves 对肝癌患者血清作凝胶电泳时先发现 AFP 有不同的迁移率, 提出甲胎蛋白异质体(alpha-fetoprotein variants)这一概念。随着生物化学及其相关分析技术的发展, 研究人员根据与外源性凝集素亲和性的不同, 可对 AFP 来源作出判断。Taketa 等<sup>[1]</sup>发现原发性肝癌(PHC)患者血清中 AFP 与小扁豆素(lens culinaris agglutinin, LCA)结合后, 电泳分成三带, 依次命名为 AFP-L1、AFP-L2、AFP-L3, 即 LCA 非结

合型(AFP-L1、AFP-L2)和 LCA 结合型(AFP-L3)。现通常把与小扁豆素结合的 AFP-L3 称为 AFP 异质体, 与原发性肝癌密切相关, 是重要的肝癌诊断因子, 是新一代的肿瘤标志物<sup>[2]</sup>。本文对 AFP-L3 在原发性肝癌诊断检测值的影响因素, 临床意义以及肿瘤的病理、影像学方面相关性方面作个简要综述。

**1 影响 AFP 异质体 L3 检测值的因素**

**1.1 肿瘤性质** AFP-L3 含量一般不受 AFP 总含量的影响,

作者简介: 纪凤卿, 女, 初级检验技师, 主要从事临床免疫学与检验研究。