

• 论 著 •

当归贝母苦参丸加味方对荷瘤小鼠 H22 肝癌肿瘤组织 MMP13 和 bFGF 表达的影响*

刘春萍¹, 李海龙², 张艳², 吴红彦², 王宏伟^{3△}

(1. 甘肃省酒泉市第二人民医院 735000; 2. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室/甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730020)

摘要:目的 研究当归贝母苦参丸加味方对 H22 荷瘤小鼠瘤组织基质金属蛋白酶 13(MMP13)和成纤维细胞生长因子 2(bFGF)表达的影响。方法 建立 H22 荷瘤小鼠模型进行体内抗肿瘤试验,将 60 只荷瘤小鼠随机分为模型组,顺铂阳性对照组,当归贝母苦参丸加味方高、低剂量组,当归贝母苦参丸加味方高、低剂量联合顺铂组,连续灌胃给药 14 d,观察肿瘤生长情况以及小鼠一般情况,肿瘤大体标本及 HE 染色后组织形态观察;RT-qPCR 和免疫组织化学技术分别检测肿瘤组织中 MMP13 和 bFGF 的表达。结果 大体观察剥离的肿瘤瘤体发现,模型组与中药低剂量组瘤体较大,瘤体内有溃烂,包膜基本完整;各治疗组瘤体较模型组相比较小,但包膜不完整,有不同程度溃烂,剥离易出血,当归贝母苦参丸加味方高、低剂量联合顺铂组瘤体小,包膜完整,肿瘤溃烂较少;HE 染色病理形态观察发现,各治疗组结缔组织明显,细胞稀疏程度增加,坏死癌细胞数目增加。RT-qPCR 检测显示,与模型组相比,各用药组中 MMP13 和 bFGF mRNA 的表达量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);免疫组化检测显示, MMP13 和 bFGF 在当归贝母苦参丸加味方高、低剂量联合顺铂组中蛋白着色变浅,呈弱阳性表达,当归贝母苦参丸加味方高、低剂量联合顺铂组较单独用药蛋白表达量低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 当归贝母苦参丸加味方可以在 mRNA 和蛋白水平下调荷瘤小鼠肿瘤组织中 MMP13 和 bFGF 的表达,进而抑制肿瘤侵袭和血管生成,发挥抑瘤减毒增效目的。

关键词:当归贝母苦参丸加味方; 肝癌; 荷瘤小鼠; MMP13; bFGF

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)02-0153-04

Effects of Dangguibeimukushen pill on expressions of MMP13 and bFGF on H22 hepatocarcinoma xenograft mice*

LIU Chunping¹, LI Hailong², ZHANG Yan², WU Hongyan², WANG Hongwei^{3△}

(1. The Second People's Hospital of Jiuquan, Jiuquan, Gansu 735000, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province/Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730020, China)

Abstract: Objective To study the effects of supplemental Dangguibeimukushen pill prescription on the expressions of MMP13 and bFGF in tumor tissues on H22 hepatoma bearing mice. **Methods** H22 hepatoma bearing mice was employed to carry out anti-tumor experiment in vivo in this study. A total of 60 mice were randomly divided into model group, DDP positive control group, low and high dosage of supplemental Dangguibeimukushen pill treatment group, supplemental Dangguibeimukushen pill combined with DDP group. In each group, gastric infusion was performed continuously 14 d. The tumor growth and the general conditions of mice were recorded. After the last administration of gavages orally treatment, all mice were anaesthetized and killed by cervical dislocation method to obtain completely tumor tissue for further HE staining measure and detection of MMP13 and bFGF in tumor tissue with the method of RT-qPCR and immunohistochemistry. **Results** The tumor volume of model group and low dosage of supplemental Dangguibeimukushen pill treatment group were larger than that of other groups, furthermore, ulceration were found inside tumor, and basic integrity were observed of tumor capsule. However, in all the treatment groups, the tumor volume was relatively smaller, and the capsule of tumor was incomplete, ulceration of different degrees and bleeding when tumor was peeled off. In combination groups, the tumor volume was much smaller, and the tumor had incomplete capsule and less ulceration inside. Pathological observation showed that connective tissue was found inside tumor, cells were sparsely spread and the number of necrosis cancer cells were increased in all treatment groups. RT-qPCR detection showed that the mRNA expression of MMP13 and bFGF in each treatment group were decreased comparing with the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Immunohistochemical detection showed that the expression of MMP13 and bFGF in the combined group were less colored and weakly positive expression comparing with the positive group or the pure Chinese medicine treatment group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Dangguibeimukushen pill could downregulate the expression of MMP13 and bFGF of tumor tissue in H22 hepatocarcinoma xenograft mice at mRNA and protein levels, and played a vital role in inhibiting cancer invasion and angiogen-

* 基金项目:甘肃省高等学校科研资助项目(2013A-088);甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金资助项目[ZDSYS-ZZKJ-2013(B)-005]。

作者简介:刘春萍,女,主管技师,主要从事临床检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail:whw197710@163.com。

esis, reducing toxics and side effects and enhancing its efficiency.

Key words: Dangguibeimukushen pill; hepatocellular carcinoma; tumor bearing mice; MMP13; bFGF

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,也是全球恶性肿瘤病死率排第 2 位的肿瘤^[1-2]。目前,原发性肝癌的治疗策略包括化疗、肝动脉灌注化疗、手术及其他替代治疗方法。尽管在原发性肝癌的预防和治疗方面取得了一定进展,包括外科手术和辅助治疗措施的研究进展,原发性肝癌的预后并不理想^[3]。因此,积极探索原发性肝癌的防控措施对其治疗意义重大。中医药治疗肿瘤的优势十分明显,例如,中医药可以减轻化疗的不良反应,延长肿瘤患者生存期等^[4]。中医药抗肿瘤可以通过调节免疫功能、诱导肿瘤细胞凋亡、减轻血管生成和抑制侵袭转移来实现。

前期研究显示,当归贝母苦参丸含药血清可以抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,减弱其侵袭转移的能力^[5]。当归贝母苦参丸加味方联合肝动脉栓塞治疗能使 Th1 升高,并且能够减少不良反应,提高患者的生存质量^[6]。当归贝母苦参丸还可以使 H22 荷瘤小鼠血清 HIF-1 α 升高及肿瘤组织 caspase-3 和 BAX 表达,达到减轻顺铂的毒性,提高胸腺的免疫功能^[7]。课题组在临床运用当归贝母苦参丸加味方治疗效果更为显著,故本课题以当归贝母苦参丸作为基础方药,以活血化瘀、化痰散结、解毒攻癌,兼顾调节机体补虚扶正,化生气血的功能,提出扶正祛邪之法组成当归贝母苦参丸加味方。本研究拟通过 RT-qPCR 及免疫组织化学为手段,研究和探讨当归贝母苦参丸加味方对肝癌的抑制作用、抗肿瘤血管生成的影响及作用机制,为中医药临床防治肝癌提供有效的科学依据。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 昆明小鼠 60 只,体质量(20 \pm 2)g,雌鼠 30 只,雄鼠 30 只,购于甘肃中医药大学科研实验动物中心;合格证号:SCXK(甘)2011-0001。饲养条件:室温 20~25 $^{\circ}$ C,湿度 45%~55%。动物分笼饲养,食标准饲料,饮水自由,饲料由甘肃中医药大学科研中心动物实验室提供。小鼠肝癌细胞:H22 细胞由甘肃中医药大学中西医结合研究所刘凯老师所赠。

1.2 仪器与试剂 超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司);CO₂ 培养箱(力康公司);荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);ABI7500 荧光 PCR 仪(ABI,美国伯乐公司)。DMEM 培养基(健顺生物公司)、胎牛血清(杭州四季青公司);逆转录试剂盒、扩增试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司),一抗和二抗分别由博士德生物和中杉金桥公司提供。当归贝母苦参丸加味方主要药物由黄芪、当归、浙贝母、苦参、山慈菇等组成,购自甘肃中医药大学附属医院,使用前,将以上组方药材水煎制备成生药 1、0.5 g/mL 的水煎剂高压灭菌置于冰箱备用。顺铂注射液,20 毫克/支,江苏豪森药业股份有限公司(批号 H20010743)。

1.3 方法

1.3.1 荷瘤鼠模型的建立 将收集好的小鼠体内传代的细胞计数后,用 PBS 将细胞浓度调整为 15 \times 10⁶/mL 的悬液,小鼠腋下接种肝癌 H22 细胞,每只接种 0.2 mL。

1.3.2 治疗及分组 造模后,将小鼠随机分设为模型组(简称 1 组)、顺铂对照组(简称 2 组)、当归贝母苦参丸加味方高剂量组(简称 3 组)、当归贝母苦参丸加味方低剂量组(简称 4 组)、当归贝母苦参丸加味方高剂量组联合顺铂组(简称 5 组)、当归

贝母苦参丸加味方低剂量组联合顺铂组(简称 6 组)6 个组。分组后第 2 天开始治疗,当归贝母苦参丸加味方高、低剂量组给药浓度分别为 1 g 生药/mL、0.5 g 生药/mL,小鼠灌服量为:0.4 mL/d 中药煎剂,1 组与 2 组灌胃生理盐水,顺铂给药量为腹腔注射:0.05 mg/(0.2 mL \cdot d),连续治疗 14 d。

1.3.3 肿瘤大体标本及组织形态观察 对荷瘤小鼠的肿瘤组织进行剥离,剥离后,首先对剥离出的肿瘤进行肉眼观察,对肿瘤的体积、颜色以及质地进行记录,与此同时,需要观察确定肿瘤组织的假膜完整程度,是否存在出血状况等。随后对肿瘤组织进行固定,选用 10% 的甲醛,进行常规脱水,石蜡包埋,随后进行切片,染色。运用显微镜对肿瘤组织以及细胞的形态学变化进行观察。

1.3.4 RT-qPCR 检测基质金属蛋白酶 13(MMP13)和成纤维细胞生长因子 2(bFGF)mRNA 的表达 首先,将肿瘤组织从液氮中取出片刻后称取 30 mg 置于无 RNA 酶的 EP 管中匀浆,然后加入 1 mL 提取液静置 5 min,用低温离心机 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min;取上清液至新的 EP 管中,加入 200 μ L 三氯甲烷,反复上下颠倒使充分混匀,静置 5 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min;取上清液至新的 EP 管中,加入等量异丙醇混匀,4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 10 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,将液体倒掉,管底白色沉淀即为 RNA;继续向管内加入 75% DEPC 水配制的乙醇 1 mL 清洗,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min;轻轻倒掉液体,并用吸水纸吸干,加入 DEPC 水溶解;检测 RNA 浓度后,用 Takara 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。使用 ABI7500 荧光 PCR 仪扩增目的基因。引物序列(5' \sim 3'):
Actin 上游引物 CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C, Actin 下游引物 ATG GAG CCA CCG ATC CAC A;扩增产物片段大小为 171 bp;MMP13 上游引物 TCC CTG GAA TTG GCA ACA AAG;MMP13 下游引物 GCA TGA CTC TCA CAA TGC GAT TAC,扩增产物片段大小为 120 bp;bFGF 上游引物 AAG CGG CTC TAC TGC AAG AA, bFGF 下游引物 TAC CGG TTG GCA CAC ACT C,扩增产物片段大小为 158 bp。采用荧光定量 PCR 试剂盒说明操作,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 10 s 预变性,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环分析溶解曲线,确认扩增产物的特异性,相对表达量计算采取 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法,独立样本重复 3 次检测。

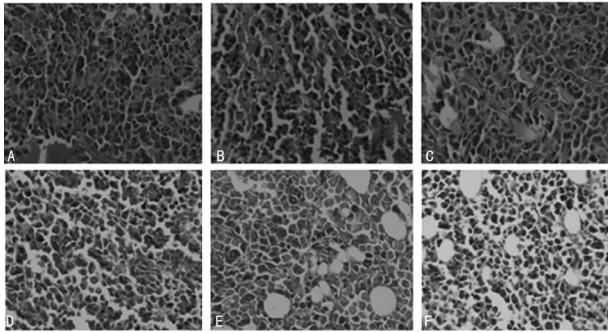
1.3.5 免疫组织化学法检测 MMP13 和 bFGF 的蛋白表达 免疫组织化学法采用 ABC 法。其过程如下:切片常规脱蜡水化,3% 去离子水灭活内源性酶 10 min,微波修复抗原 5 min,间隔重复 1 次;然后依次滴加山羊血清、一抗、生物素化山羊抗兔;滴加 SABC, DAB 显色,苏木素复染,梯度脱水透明后封片,显微镜下观察。结果判定:以胞质中出现棕黄色颗粒为阳性。应用图像分析系统记录各自的积分吸光度(IA)作为蛋白表达的量化指标。

1.4 统计学处理 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用数据处理软件 SPSS17.0 进行处理,并进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤大体标本及组织形态观察结果 见图 1。观察剥离

出的各组瘤体显示,1组与4组瘤体较大,瘤体内有溃烂,包膜基本完整;2组瘤体较1组相比较小,但包膜不完整,肿瘤溃烂较多,剥离易出血;3组与5、6组瘤体小,包膜完整,肿瘤溃烂较少。各组肿瘤组织病理学形态比较,首先对肿瘤组织进行切片,以HE法染色,置于光学显微镜下观察后发现,在1组中,肿瘤细胞生长方式为弥散或团块状,细胞紧密排列,核大浆多,具有明显的特异性,很少的坏死细胞(图1A)。在2组中,细胞排列疏松,出现大量的坏死细胞,细胞数开始减少,细胞核出现缩小破裂的现象(图1B);在4组中,较1组坏死的癌细胞数目变多,且细胞大小不同(图1C、图1D);在5、6组中,结缔组织明显,细胞稀疏程度增加,坏死癌细胞数目增加(图1E、图1F)。



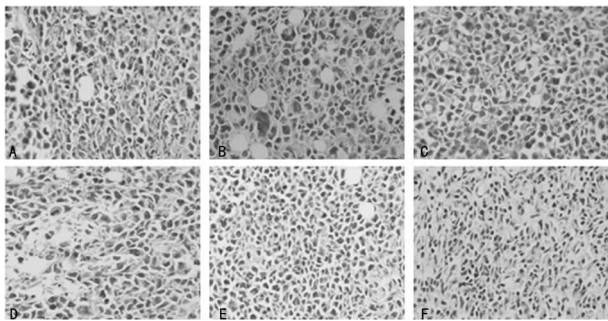
注:A表示1组;B表示2组;C表示3组;D表示4组;E表示5组;F表示6组。

图1 6组HE染色图片(×400)

表2 当归贝母苦参丸加味方对肿瘤组织MMP13 mRNA和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	bFGF ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	MMP13 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	bFGF (平均灰度值)	MMP13 (平均灰度值)
1组	1.00±0.00	1.00±0.00	77.32±4.75	65.24±2.13
2组	0.53±0.17▲	0.84±0.07▲	65.21±3.67	50.48±2.53▲
3组	1.03±0.25▲	1.09±0.01▲▲	68.43±4.13▲△	53.11±3.03▲
4组	0.63±0.11▲△	0.91±0.03▲△	60.15±2.84▲△	44.26±2.42▲△
5组	0.43±0.02▲△	0.75±0.16▲△	55.61±2.36▲△	41.07±2.27▲△
6组	0.32±0.02▲△	0.67±0.07▲△	43.72±2.18▲△	36.12±1.31▲△

注:与1组比较,▲ $P<0.05$;与2组比较,△ $P<0.05$ 。



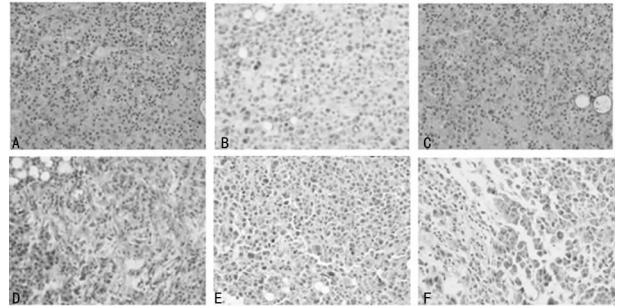
注:A表示1组;B表示2组;C表示3组;D表示4组;E表示5组;F表示6组。

图2 MMP13在各组中的表达(×400)

2.2 RT-qPCR分别检测MMP13和bFGF mRNA的表达 6组RT-qPCR结果显示,各组对MMP13、bFGF与2组相比表

达量均有下调,其中3组下调明显,尤其以5、6组下调表达明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2、图2。

2.3 免疫组织化学检测MMP13和bFGF蛋白的表达 6组免疫组织化学结果显示,胞浆或胞膜出现的黄色或棕黄色颗粒为阳性着色。各组蛋白表达结果如下,MMP13、bFGF蛋白着色与1组相比呈现深着色现象,表明为强阳性或阳性表达,而1组呈现弱阳性或阴性表达,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2、图2、图3。



注:A表示1组;B表示2组;C表示3组;D表示4组;E表示5组;F表示6组。

图3 bFGF在各组中的表达(×400)

3 讨论

中医认为,肝癌的发病为痰、毒、瘀、虚共致致病的结果,通过中医辨证论治、标本兼治的特点,补虚、祛邪即为中医治疗肝癌的基础治法。当归贝母苦参丸加味方由当归贝母苦参丸加味而成,当归贝母苦参丸出自《金匮要略》,用来治疗妊娠小便不利。全方由当归、贝母、苦参等组成,具有养血、开郁、清热、除湿的功效。当归贝母苦参丸加味方在此基础上加益气解毒药组成新方。当归贝母苦参丸加味方的整体组方准确地针对肝癌的病因病机遣方选药,组成整体功效为活血化瘀、化痰散结、解毒攻癌,兼顾调节机体补虚扶正,化生气血功能的方药。

本研究显示,当归贝母苦参丸加味方可使肿瘤组织瘤体缩小,有明显的抑制肿瘤生长的作用,并且在与化疗药物联合运用后,抗肿瘤作用更加明显。免疫组织化学研究显示,当归贝母苦参丸加味方可抑制肿瘤组织中MMP13、bFGF mRNA和蛋白的表达,并且在与化疗药物联合运用后,MMP13、bFGF mRNA和蛋白的下调表达更加明显。

bFGF是成纤维细胞生长因子家族的1个成员,其功能较为广泛,在与肝素结合后参与调节细胞生存、分裂、血管生成、分化和迁移。研究表明,bFGF在原发性肝癌组织中高表达,其高表达与肝细胞癌转移密切相关,转染bFGF反义寡核苷酸转染HepG2细胞可以增加细胞凋亡^[8-9]。此外,相关研究也表明,bFGF能通过PI3K信号通路促进Survivin基因的表达和肝癌细胞增殖,因此,它可作为1种新型的早期靶向肝细胞癌治疗分子^[10]。

MMP13是基质金属蛋白酶M10家族成员,在侵袭转移中参与细胞外基质的降解。相关研究发现,MMP13可促进口腔癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、胃癌和肝癌的侵袭转移^[11-12]。联合运用LIFR和p-Akt或MMP13,可以强有力预测预后差的原发性肝癌的预后^[13-15]。

当归贝母苦参丸加味方主要由黄芪、当归、浙贝母、苦参、山慈菇等组成,其中关于黄芪、当归、浙贝母、苦参,有文献报道用于中药复方抗肿瘤研究或者临床应用于抗肿瘤治疗,其机制

涉及抑制肿瘤增殖及其侵袭转移等,而应用肝癌抗肿瘤分子机制探讨则少见报道。本研究显示,当归贝母苦参丸加味方发挥对 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用与下调 MMP13、bFGF mRNA 和蛋白的表达。

参考文献

[1] Mcglynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2): 223-238.

[2] Wallace MC, Preen D, Jeffrey GP, et al. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 9(6): 765-779.

[3] Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan[J]. J Gastroenterol, 2009, 44(19): 102-107.

[4] Shu X, Mcculloch M, Xiao H, et al. Chinese herbal medicine and chemotherapy in the treatment of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Integr Cancer Ther, 2005, 4(3): 219-229.

[5] 师金凤, 李海龙, 王红蕾, 等. 当归贝母苦参丸含药血清对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭转移能力和周期的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 10: 30-33.

[6] 闫德祺, 白雪峰, 刘群才. 加味当归贝母苦参丸辅助经肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 5(5): 33-36.

[7] Yan DQ, Liu YQ, Li YD, et al. Tumor inhibition effects and mechanisms of Angelica sinensis and Sophorae flavescens ait decoction combined with cisplatin in xenograft mice[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(11): 4609-4615.

[8] El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, et al. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5): 1299-1305.

[9] Imura S, Miyake H, Izumi K, et al. Correlation of vascular endothelial cell proliferation with microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in hepatocellular carcinoma[J]. J Med Invest, 2004, 51(3/4): 202-209.

[10] Sun B, Xu H, Zhang G, et al. Basic fibroblast growth factor upregulates survivin expression in hepatocellular carcinoma cells via a protein kinase B-dependent pathway [J]. Oncol Rep, 2013, 30(1): 385-390.

[11] Yang B, Gao J, Rao Z, et al. Clinicopathological significance and prognostic value of MMP-13 expression in colorectal cancer[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(6): 501-505.

[12] 侯文权, 周凌云, 侯文锋, 等. 原发性肝癌患者 VEGF、MMP-13、SF 和 BXTM 联合检测的临床研究[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(17): 1842-1843.

[13] 任雪霞, 徐正府, 黄介飞, 等. MMP-13 及 MMP-13 mRNA 在人肝细胞肝癌及癌旁组织中的表达[J]. 江苏医药, 2009, 35(1): 44-46.

[14] 徐正府, 任雪霞, 黄介飞, 等. MMP-13 及 p38 MAPK 在肝细胞癌侵袭和转移中的作用[J]. 苏州大学学报(医学版), 2008, 28(6): 966-969.

[15] 郑会聪, 沈波, 聂玉强, 等. 原发性肝癌中 MMP-9、MMP-13 和 TIMP-3 的表达及意义[J]. 广东医学, 2013, 34(13): 1995-1998.

(收稿日期: 2016-09-11 修回日期: 2016-10-30)

(上接第 152 页)

和庆大霉素都耐药,说明氨基糖苷类耐药基因 armA 与阿米卡星、妥布霉素和庆大霉素耐药密切相关。因此,应加强重症监护病房和神经外科病房耐药菌的监测,以预防和控制多重耐药鲍曼不动杆菌引起的院内感染。

参考文献

[1] 谢强, 曹明杰, 王金丽, 等. 34 株鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(15): 2112-2113.

[2] 宋彩虹, 陆水英, 张秀瑜, 等. 鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药性及同源性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 161-164.

[3] 植志全, 何志恒, 江鹏, 等. 多重耐药绿脓假单胞菌 β 内酰胺类氨基糖苷类耐药相关基因研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(11): 1211-1214.

[4] 杨银梅, 叶惠芬, 张伟红, 等. 臭鼻克雷伯和鲍曼不动杆菌中检出 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1407-1409.

[5] 陆德胜. 重症监护病房病原菌分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(8): 1026-1028.

[6] 刘和艳. 鲍曼不动杆菌感染情况及耐药性监测[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 229-231.

[7] 王磊, 宋立强, 徐修礼, 等. 我院 2009—2011 年重症监护病房病原菌分布及耐药性分析[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(3): 28-30.

[8] 胡美春, 杨西宁, 韦柳青, 等. 鲍氏不动杆菌医院感染流行病学调查及对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(7): 1523-1525.

[9] 刘薇, 李禄俊, 龙云, 等. 2012 年某院鲍曼不动杆菌感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(5): 576-577.

[10] Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin resistance in Neisseria spp. due to mutations in 16S rRNA [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(5): 1365-1366.

(收稿日期: 2016-09-06 修回日期: 2016-10-25)