

factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms [J]. Blood, 2007, 110(1):133-141.

[26] Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth[J]. Blood, 2008, 111(1):190-199.

[27] Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(12):1999-2004.

[28] Zoudilova M, Kumar P, Ge L, et al. Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(28):20634-20646.

[29] Eisenreich A, Malz R, Pepke W, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in hu-

man endothelial cells [J]. Circ J, 2009, 73(9):1746-1752.

[30] He Y, Chang G, Zhan S, et al. Soluble tissue factor has unique angiogenic activities that selectively promote migration and differentiation but not proliferation of endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(3):489-494.

[31] Chand HS, Ness SA, Kisiel W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells [J]. Int J Cancer, 2006, 118(7):1713-1720.

[32] Rollin J, Regina S, Gruel Y. Tumor expression of alternatively spliced tissue factor is a prognostic marker in non-small cell lung cancer [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(3):607-610.

(收稿日期:2011-10-03)

CTX-M 型超广谱 β-内酰胺酶耐药性特点分析

李 浩 综述, 刘 岚 审校(重庆医科大学附属儿童医院临检中心 400014)

【关键词】 CTX-M; 超广谱 β-内酰胺酶; 基因型; 耐药性
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.040 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)07-0848-03

超广谱 β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamases, ESBLs)是革兰阴性杆菌对新型广谱内酰胺类抗生素耐药最重要的机制之一,ESBLs 由质粒介导,能够水解青霉素、氨基糖苷、及 1、2、3 代头孢菌素。近年来,革兰阴性杆菌分离出 ESBLs 的概率逐渐增加,其主要原因是临床上新型广谱 β-内酰胺类抗生素的广泛使用,而且 ESBLs 表型的基因种类有逐年增多的趋势。ESBLs 的基因型主要包括 TEM、CTX-M、SHV、OXA 及其他类型,根据各国学者近年研究,TEM、SHV、CTX-M 型最为常见。而在我国,则以 CTX-M 型 ESBLs 最为常见。以下就从 CTX-M 型 ESBLs 的分子流行病学、结构功能、检测方法及治疗方面分析其耐药性的特点。

1 CTX-M 型 ESBLs 的分子流行病学情况

1.1 CTX-M 型 ESBLs 的发现 CTX-M 型 ESBLs 是德国的 Bauernfeind 等^[1]在 1990 年报道发现,具有高等电点及对头孢噻肟高水解活性的特点。在此之后世界上很多国家分离出了产 CTX-M 型 ESBLs 的菌株,其中美洲、欧洲和亚洲较为多见。到目前为止,全世界分离出的 CTX-M 型 ESBLs 至少有 110 种(<http://www.lahey.org/studies/>)。

1.2 CTX-M 型 ESBLs 世界范围内的流行 在欧洲,继德国最早报道 CTX-M 酶之后,又发现了很多 CTX-M 的变异酶,如从阴沟肠杆菌分离出的 CTX-M-1、-3 等,分离于奇异变形杆菌的 CTX-M-1、-2、-20 等以及分离于大肠埃希菌的 CTX-M-1、-2、-9、-14、-21、-27 等。在北美,从大肠埃希菌、奇异变形杆菌、费劳地枸橼酸杆菌、黏质沙雷菌、产气肠杆菌等肠杆菌科的不同菌属中发现了编码 CTX-M-2 的基因^[2]。在亚洲,分离出 CTX-M 型酶是在 1993 年,之后发现了 CTX-M-2、-3、-15、-14、Toho-2 等 CTX-M 的变异酶。而各种 CTX-M 的变异酶在不同国家分布不尽相同,CTX-M-2 和-3 型为日本肠杆菌科细菌中最常见的变异酶;印度的学者从大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和产气肠杆菌中分离出 CTX-M-15。在我国,从大肠埃希

菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌中已分离出 CTX-M-3、-9、-13、-14、-15、-22 和-24 等型酶。2004 年,加拿大学者 Abdalh-amid 等^[3]报道了于费劳地枸橼酸杆菌中分离出的 CTX-M-30。

2 CTX-M 型 ESBLs 的分子生物学特征及其与耐药性关系

2.1 CTX-M 型 ESBLs 的分子特点与亚群 CTX-M 型 ESBLs 一般由 291 个氨基酸残基组成,等电点介于 7.4~9.0 之间^[4]。由于没有相应的广谱酶基础,CTX-M 型 ESBLs 的超广谱活性应不是几个位点突变的结果,而是它的本质特征。按照 CTX-M 型 ESBLs 氨基酸序列的同源性,可将其分为 5 个亚群^[5]。其中 CTX-M-1 亚群包括 CTX-M-1、-3、-10、-11、-12、-15、-22、-23、-28、-32 和 FEC-1;CTX-M-2 亚群中包括 CTX-M-2、-4~7、-20、-24、-31 和-44;CTX-M-8 亚群中包括 CTX-M-8 和-40;CTX-M-9 亚群中包括 CTX-M-9、-13、-14、-18、-16、-17、-19、-21、-24、-27 和-45;CTX-M-25 亚群中包括 CTX-M-25、-26 和-39。

2.2 分子结构与其耐药性的关系 CTX-M 型 ESBLs 同其他类型 ESBLs 一样,具有可以水解单环 β-内酰胺类抗生素、头孢菌素以及对酶抑制剂敏感的一般特性。但 CTX-M 型 ESBLs 水解青霉素类抗生素的活性不如 SHV 和 TEM,其水解窄谱头孢菌素的活性较其他类型高。由于 CTX-M 型亚群中大部分氨基酸的取代部位远离酶活性中心,对它们的共有活性影响较小^[6]。所以大多数 CTX-M 型 ESBLs(除 CTX-M-6、CTX-M-15 和 CTX-M-19 外)都具有水解头孢噻肟的活性高于头孢他啶的特性。这也是 CTM-X 型与 SHV、TEM 型 ESBLs 的主要区别之一。

之前有学者认为,在介导 CTX-M 型 ESBLs 促水解活性当中,第 104、160、167、232、237、240、244 和 276 位氨基酸可能具有着较为关键的作用。但现在的研究表明,第 160、244 和 276 位氨基酸残基和 CTX-M 型 ESBLs 的催化特性无直接关系。在 Asn-104→Glu 突变之后,CTX-M-14 型酶对第 3 代头孢菌

素(如头孢噻肟)的水解能力明显下降,但其水解第 1、2 代头孢菌素(如头孢呋辛、头孢克洛、阿莫西林)和青霉素类的能力变化较小^[7]。原因可能是由于 Asn104→Glu 突变之后破坏了 β -内酰胺酶的侧链结构,弱化了其与底物氧亚胺基团的静电吸引力,减弱了底物与酶之间的亲和力,最终导致其水解头孢噻肟的活性降低。另外,CTX-M 型 ESBLs 的蛋白质序列分析显示,ser237 残基在各菌株中较为普遍,却在抗坏血酸克吕沃尔菌中缺如,说明 ser237 对于维持酶的活性起着比较重要的作用。综上可推测,在 CTX-M 型 ESBLs 水解头孢噻肟过程中,Ser237 和 Asn104 位的作用很关键。另外,CTX-M-15 和 CTX-M-19 对头孢他啶的水解能力要高于头孢噻肟。通过研究发现,Gly240 和 Ser167 可以使 CTX-M 型 ESBLs 与头孢他啶的结合部位扩大,进而促进其对头孢他啶的水解^[8-9],说明第 167 和 240 位上的氨基酸残基对其水解头孢他啶发挥重要作用。

3 CTX-M 型 ESBLs 的检测方法

3.1 临床微生物检测方法 主要包括美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐方法、E 试验、双纸片法、三维检测法及自动化仪器法(VITEK-AMS)等。NCCLS 推荐方法操作简单,结果判断也比较简单,为国际通用标准,但其灵敏度受实验中所选用的底物影响较大;E 试验操作简单,但结果分析稍复杂,价格较昂贵;双纸片法操作也较简单,但两个纸片间的距离未标准化;三维检测法灵敏度高,但对实验室条件要求较高;VITEK 检测法操作简单,结果分析也容易,但其灵敏度偏低^[10]。所有临床微生物检测方法并未达到分子水平,所以这些方法的特异度及灵敏度均无法达到 100%。

3.2 分子生物学检测方法 主要包括聚合酶链反应(PCR)法、DNA 探针法、PCR-单链构象多态性、PCR-限制性片段长度多态性和测序等。这些方法都是从基因水平上进行分析和检测,可以了解 CTX-M 型 ESBLs 不同亚型之间核苷酸序列的差异,特异性和准确性较高^[11]。目前公认的 CTX-M 型 ESBLs 基因分型的“金标准”为测序,但测序操作复杂,花费时间较长,仪器昂贵,以致整体费用较高,所以并不适合作为 CTX-M 型 ESBLs 的分子流行病学监测筛查的方法。

近年来变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography,DHPLC)技术已运用于 CTX-M 型 ESBLs 的检测。DHPLC 的原理为:将待测样本与参照样本的 PCR 产物混合再经历变性、复性后,形成同源双链和异源双链混合物,再注入到色谱柱,在部分变性温度的条件下异源双链比同源双链解链早,柱保留时间短,异源双链先被洗脱下来,经 DHPLC 分析后再将结果转换成不同峰形的色谱峰图^[12]。2006 年刘朝晖等^[13]运用 DHPLC 快速检测 CTM-X 型超广谱 β -内酰胺酶基因型,证实其具有自动化程度高、经济、快速、特异度及灵敏度高等优点。

4 对产 CTX-M 型 ESBLs 菌株的治疗措施

按照 NCCLS 的推荐意见,产 ESBLs 菌株都应视为对氨基青霉素和头孢菌素耐药。而且由于产 CTX-M 型 ESBLs 菌株对头孢他啶的耐药选择压力比头孢噻肟高,其接种量的提高也会导致头孢他啶的 MIC 值升高^[14]。另外,CTX-M-6、CTX-M-15、CTX-M-19 等型 ESBLs 对头孢他啶水解活性较高,并且产 CTX-M 型 ESBLs 菌株有可能会同时产生其他类型的 β -内酰胺酶,使其水解头孢他啶的能力提高,所以在治疗产 CTX-M 型 ESBLs 菌株引起的感染中不适合选用头孢他啶。目前,治疗时可以选用头霉素类、碳青霉烯类抗生素以及 β -内酰胺类抗

生素和 β -内酰胺酶抑制剂的复合剂,氟喹诺酮类和氨基糖苷类也可以选用^[15]。为了避免新型耐药基因的出现,可以将上述几种适宜的抗生素交替使用。

5 结 语

由于新 β -内酰胺类抗生素大量使用所造成的选择性压力,CTX-M 型 ESBLs 不断出现新的亚型,从而给临床的抗感染治疗及预防带来比较沉重的负担。所以应加强对 CTX-M 型 ESBLs 表型及基因型的检测,促进临床更加合理得使用抗生素,这对于控制产 CTX-M 型 ESBLs 菌株的传播具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli* [J]. *Infection*, 1990, 18(3): 294-298.
- [2] 吴爱琴, 元刚. CTX-M 型 β -内酰胺酶的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2009, 6(6): 450-452.
- [3] Abdalhamid B, Pitout JD, Moland ES, et al. Community-onset disease caused by *Citrobacter freundii* producing a novel CTX-M beta-lactamase, CTX-M-30, in Canada[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(11): 4435-4437.
- [4] 张阮章, 王沙燕, 卢月梅, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 bla-CTM-M 基因的检测[J]. *中国微生物学杂志*, 2004, 16(5): 342-344.
- [5] Cartelle M, del Mar Tomas M, Molina F, et al. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(6): 2308-2313.
- [6] Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(7): 1936-1942.
- [7] 陆坚, 唐英春, 张扣兴, 等. CTX-M-14 型超广谱 β -内酰胺酶基因的定点突变研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(10): 800-804.
- [8] Poirel L, Naas T, Le Thomas I, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(12): 3355-3361.
- [9] Boyd DA, Tyler S, Christianson S, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(10): 3758-3764.
- [10] 李静, 王洛平. 超广谱 β -内酰胺酶的特点及其检测进展[J]. *中国医学检验杂志*, 2008, 9(2): 117-120.
- [11] 陈天宝, 陈建魁, 尹秀云. 超广谱 β -内酰胺酶检测方法研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(6): 1144-1147.
- [12] Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, et al. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. *J Microbiol*

Methods, 2005, 61(3):399-412.

- [13] 刘朝晖, 张盛斌, 王汉平, 等. 运用变性高效液相色谱快速检测 CTX-M 超广谱 β -内酰胺酶基因型[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(6):764-767.

- [14] Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Tassios PT, et al. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-

spectrum enzymes[J]. Int J Antimicrob Agents, 2000, 14(2):137-142.

- [15] 舒艳, 况九龙. 肺炎克雷伯菌产超广谱 β -内酰胺酶研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(21):110-112.

(收稿日期:2011-10-12)

生物芯片技术在消化道肿瘤研究中的应用进展

李先茜 综述, 余琛 审校(上海市徐汇区中心医院中心实验室 200031)

【关键词】 基因芯片; 消化道肿瘤; 微流体技术; 分子印刷技术; 毫微秒技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.041 文章编号: 1672-9455(2012)07-0850-02

随着人类基因组计划(HGP), 即全部核苷酸测序的完成, 人类基因组研究的重心逐渐转向功能基因组。由此, 产生了一个大规模基因分析工具——基因芯片。基因芯片又称 DNA 微阵列(DNA microarray), 是近年发展起来的一项 DNA 分析技术, 一般包括寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片两种。其基本原理是将成千上万个代表不同基因的寡核苷酸或 cDNA“探针”密集而有规律地排列在固相支持物表面, 通过与标记目的材料中的 DNA 或 cDNA 杂交, 再对获得的信号应用扫描仪和相关软件进行分析。该技术具有高通量、高效率 and 样本量少等特点。正常基因的突变、癌基因的异常激活以及抑癌基因的失活、基因本身的多效性和机体免疫因素决定了肿瘤表型的表达与否^[1]。通过对肿瘤基因表达谱的深入研究, 有助于很好地定性肿瘤, 揭示相似组织病理类型和不同临床特征的亚临床分类, 而且可以帮助确定不同肿瘤的治疗敏感性和判断预后, 对肿瘤基因表达谱的分析寻找新的治疗靶点, 为分子肿瘤学书写了新的篇章^[2]。本文就生物芯片在消化道肿瘤研究中的应用进展作一综述。

1 生物芯片

目前, 生物芯片主要包括 DNA 芯片、蛋白质芯片和肽芯片、碳水化合物芯片、组织芯片和细胞芯片、芯片实验室。

1.1 DNA 芯片 DNA 芯片原理主要是应用单色或双色荧光技术, 可以对许多基因进行定量基因表达分析。单色荧光分析技术最初应用于采用影印石版术制作的芯片。Affymetrix 公司将此芯片技术申请专利, 商品名为 GeneChipTM。应用该项技术, 每例样本的表达谱产生于单色荧光(如藻红蛋白)标记的芯片之上, 通过对不同的图像加以比较来进行检测。接着建立了双色荧光分析技术, 即两种 RNA 样本分别用不同的荧光染料进行标记, 如酞菁 3 和酞菁 5。这些标记探针与微阵列 cDNA 先进行杂交, 然后进行荧光扫描, 荧光信号就可被转换成相应的表达上调或下调的基因。可用短链寡核苷酸(15~25 个核苷酸)、长链寡核苷酸(50~120 个核苷酸)或聚合酶链反应(PCR)扩增的 cDNA(100~3 000 碱基对)制备 DNA 芯片。在一固相载体上应用影印石版术进行原位寡核苷酸合成, 核苷酸相邻排列可达 20 个碱基, 从而组成芯片。也可以将长链寡核苷酸和 cDNA 直接点样在玻璃载玻片上。采用机械臂金属针, 可在一张玻璃载玻片上点样 10 000~30 000 次。

1.2 蛋白质芯片和肽芯片 只要建立合适的对照系统, DNA 芯片就可以对样本中存在的 RNA 或 DNA 进行检测并生成相应的信息。但是, 它并不能对基因翻译产物进行分析, 而要对基因翻译产物进行分析就需要建立多肽类的芯片。许多药物

靶点就是蛋白质, 因而蛋白质芯片和肽芯片的建立对于新药的开发有着深远的影响。由于技术上的困难, 时至今日, 这类芯片并未得到充分的应用。其中一个大的困难就是在制作蛋白质芯片时要保证其功能性的完整, 如翻译后的修饰和磷酸化作用。蛋白质芯片技术发展的另一重要方面在于检测方法的选择。现今采用的检测方法包括应用酶联免疫吸附测定原理, 使用酶标记物、荧光标记物进行芯片的标记, 或使用常用的蛋白质标记物来标记芯片, 这些检测方法都有一定的局限性。其他蛋白质芯片检测方法包括 MS 分析和细胞质基因组表面共振技术^[3]。

1.3 碳水化合物芯片 尽管肽芯片能够传递越来越多的信息, 但现今所采用的芯片并未涉及到翻译后的修饰问题。许多蛋白质和生物分子通过共价结合被糖基所修饰, 这种糖基被称为聚糖。许多生物过程包括糖-受体结合以及基因芯片成为研究这种相互作用的重要工具。将新糖脂点样于真离子镀膜的硝化纤维素膜上, 制作成一种碳水化合物芯片^[4]。用已知的可以与碳水化合物特异性结合的蛋白质作为新糖脂的探针, 来检测蛋白质-寡糖间的相互作用。另一种方法可以通过识别细胞表面表达的特异性聚糖来鉴定病原微生物^[5]。将聚糖点样于硝化纤维素膜表面, 用抗体作为探针来明确聚糖来源的病原微生物, 应用结果较为满意, 抗体可以检测出特异性的聚糖。这表明采用该技术, 有可能从临床血液样本中检测出特异性的致病原。

1.4 组织芯片和细胞芯片 基因表达水平或蛋白表达水平分析, 仅能提供相关基因的生物功能信息, 其潜在的临床应用信息以及作为药物靶点的信息。功能基因组学则可以对芯片筛选出的药物靶点进行验证。1998 年, Kononen 和 Kallioinen 建立了组织芯片(TMA)技术, 借此可以将感兴趣的组织样本放置在一张载玻片上。将分子靶点(DNA、RNA 或蛋白质)作为探针, 应用免疫组织化学、荧光原位杂交或其他分子检测技术来分析 TMA^[6-7], 从而能够对于成百上千个组织样本中的特异性分子靶点进行高通量的原位分析。

1.5 芯片实验室 芯片实验室(lab-on-a-chip, LOC)是一个跨学科的新研究领域, 是基于微电子机械系统技术研究发展起来的一种全新微生化分析系统^[8-9], 国外也称之为微全分析系统。它是通过微细加工和微电子技术在固体芯片表面构建微型生物化学分析单元和系统, 以实现蛋白质、核酸、无机离子, 以及其他生化组分的准确、快速检测。从本质上讲, 芯片实验室就是一种微型化的生化分析仪, 芯片实验室技术就是要把生物和化学等领域所涉及的样品制备、生化反应、分离检测等基本