

本知识与技能,对死亡的话题探讨较少,导致很多晚期肿瘤患者因得不到适当的支持和帮助,在恐惧、担心、猜疑中走完了人生的最后旅程。通过对晚期肿瘤患者及其家属应用自编的生死教育指导路径实施生死教育,直接影响安宁疗护病房晚期肿瘤患者的生存质量,有利于更好地开展安宁疗护工作。我国安宁疗护工作主要在基层医院开展,生死教育这一服务尚未被列入正式的工作内容,需要政策制度,也需要质量监管,更需要教育培训。患者认为最重要的照护是同理心,即时对患者的需求进行回应,视患者为一个整体,护士应具备较强的沟通和操作能力^[11]。医院也应加强对安宁护士及医生生死教育、心理咨询、沟通技巧等方面的培训,为规范开展生死教育提供必要的条件,提高临终关怀质量^[12]。

安宁疗护是对晚期肿瘤患者综合照护过程中不可缺少的重要组成部分,但目前尚缺乏可靠的实践依据。通过本社区卫生服务中心安宁护理团队自编的生死教育指导路径的临床实践,为晚期肿瘤患者照护提供了重要的参考,有助于提高晚期肿瘤患者和家属的整体生活质量。

参考文献

- [1] 兰礼吉,冯镜.死亡观及生死教育的哲学浅析[J].中国医学伦理学,2000,13(4):64.
- [2] 张慧兰,王丹,罗羽.军医大学医学生死亡教育课程内容体系的构建研究[J].护理学杂志,2016,31(21):63-67.

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.033

- [3] 华焱坤,袁炜,江勤康,等.舒缓疗护患者的中医药适宜技术探析[J].贵阳中医学院学报,2016,38(5):70.
- [4] 李新秋,林诗富.芬太尼复合镇痛液对晚期癌痛的疗效观察[J].贵阳中医学院学报,2006,28(6):20-22.
- [5] GREIMEL E R, KULJANIC VLASIC K, WALDEN-STROM A C, et al. The European organization for research and treatment of cancer (EORTC) quality-of-life questionnaire cervical cancer module: EORTC QLQ-CX24[J]. Cancer, 2006, 107(8):1812-1822.
- [6] 王婧婷,吴傅蕾,张颖婷,等.2017 版 NCCN 肿瘤患者安宁疗护临床实践指南要点解读[J].上海护理,2017,17(5):9-12.
- [7] 李红梅.体验香港生死教育的沟通技巧[J].中国民康医学,2009,21(16):2028.
- [8] 龙风雷,马新娟,蔡文宇,等.护士与白血病家属矛盾的原因分析及对策[J].现代护理,2004,10(4):316-317.
- [9] 周晓敏,张华萍,林章华,等.生死教育对家居晚期癌症患者生活质量的影响[J].中国临床康复,2005,40(9):54-56.
- [10] 岳亮.医学教育必须重视生死教育[J].职业教育,2005,23(4):33.
- [11] RADWIN L, ALSTER K, RUBIN K M. Development and testing of the oncology patients' perceptions of the quality of nursing care scale[J]. Oncol Nurs Forum, 2003, 30(2):283-290.
- [12] 郭辉,范爱飞,丁小容,等.医务人员生死教育认知调查研究[J].中国医药指南,2010,8(29):165.

(收稿日期:2018-12-10 修回日期:2019-03-12)

重组登革病毒包膜蛋白第Ⅲ结构域抑制登革病毒感染的研究

潘冠和¹,杨笑涵²,廖雁玲¹,杨昭群¹,刘耀洪¹,马 胜^{1△}

1. 广东省佛山市顺德区勒流医院检验科,广东佛山 528322;

2. 广州中医药大学第二临床医学院医学检验部,广东广州 510120

摘要:目的 通过原核基因工程技术获得登革 2 型病毒(DENV2)包膜蛋白第Ⅲ结构域(EDⅢ)重组蛋白,检测其抑制登革病毒感染细胞的效率。**方法** 利用聚合酶链反应技术扩增 DENV2 编码 EDⅢ重组蛋白的基因片段,构建 pET28b(+)-EDⅢ原核表达载体并在大肠埃希菌中诱导 EDⅢ重组蛋白表达,进行质谱鉴定。将登革病毒感染 VeroE6 细胞(经 EDⅢ重组蛋白孵育),根据空斑减少数量计算 EDⅢ重组蛋白对登革病毒感染的抑制率。**结果** 成功表达并纯化 EDⅢ重组蛋白。EDⅢ重组蛋白可以抑制登革病毒感染的 VeroE6 细胞,且抑制率与蛋白水平呈正相关,当蛋白水平为 100 μg/mL 时,病毒抑制率为 90.5%。**结论** DENV2 EDⅢ重组蛋白能够抑制 DENV2 吸附和感染细胞,为以 EDⅢ重组蛋白为靶标研制药物和疫苗提供重要的实验基础。

关键词:登革病毒; 包膜蛋白第Ⅲ结构域; 原核表达

中图法分类号: R373.3

文献标志码: B

文章编号: 1672-9455(2019)16-2383-04

登革病毒(DENV)广泛流行于热带和亚热带地区,是一种分布广、发病率高、危害较大的虫媒传染病,分 4 个血清型[登革 1 型病毒(DENV1)、登革 2 型病毒(DENV2)、登革 3 型病毒(DENV3)、登革 4 型病

毒(DENV4)]^[1]。据估计,全球每年约有 3.9 亿人感染 DENV^[2]。我国东南沿海地区是登革热的高发区,2014 年广东省登革热大暴发,不仅威胁人们健康,而且给我国的公共卫生事业带来了巨大的负担^[3-4]。包

膜蛋白(E 蛋白)是 DENV 的重要结构蛋白,含有 3 个不同的结构域[包膜蛋白第 I 结构域(ED I)、包膜蛋白第 II 结构域(ED II)、包膜蛋白第 III 结构域(ED III)],其中 ED III 暴露于病毒颗粒表面,折叠形成一个 IgG 样结构,DENV 通过 ED III 结合细胞表面受体从而感染受体细胞。因此,ED III 重组蛋白成为研究防治 DENV 药物和疫苗的重要靶标^[5-6]。本研究通过原核基因工程技术获得 DENV2 ED III 重组蛋白,并证实了 ED III 重组蛋白具有抑制 DENV 感染细胞的生物学效应,为以 ED III 重组蛋白为靶标研制药物和疫苗提供了重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体来源 感受态细胞 BL21(DE3)、原核表达质粒 pET28b(+)、DENV2、VeroE6 细胞等由广东省佛山市顺德区勒流医院检验科保存。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括:ABI700 型聚合酶链反应(PCR)仪、伯乐公司电泳仪及凝胶成像仪、美国 ABI 公司 4800 plus MALDI-TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪。主要试剂如下:Q5[®]热启动超保真

聚合酶、T4 连接酶、Nco I 和 Xho I 限制性内切酶等购自 NEB 公司(美国);病毒 RNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒回收试剂盒等均购自 Qiagen 公司(德国);镍亲和层析柱购自 GE 公司(美国);牛血清清蛋白(BSA)、DMEM 细胞培养基和胎牛血清等细胞培养材料购自 Gibco 公司(美国);异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和甲基纤维素钠等均购自上海生工公司。引物合成与 DNA 测序由英潍捷基公司(美国)完成。

1.3 方法

1.3.1 表达载体的构建与鉴定 根据 DENV2 E 蛋白基因序列信息,设计 ED III 目的基因上游引物和下游引物时分别引入 Nco I (CCATGG)和 Xho I (CTCGAG)限制性内切酶酶切位点及保护碱基,引物序列见表 1。用 Q5[®]热启动超保真酶扩增 DENV2 的 ED III 基因片段,利用 Nco I 和 Xho I 限制性内切酶对目的片段进行双酶切,克隆至 pET-28b(+)原核表达载体并转化至感受态细胞 BL21(DE3),对构建成功的重组菌进行测序鉴定。

表 1 DENV2 ED III 基因扩增引物序列

引物	序列(5'~3')
pET-ED III -F	CATG <u>CCATGG</u> ACAACTACAGCTCAAAGG
pET-ED III -R	CCG <u>CTCGAG</u> AATAGAACTTCCTTTCTTAAACCAGTC

注:划线部分为限制性内切酶酶切位点

1.3.2 ED III 重组蛋白的诱导表达和纯化 将重组菌接种于含有卡那霉素的液体培养基中,37 ℃ 220 r/min 摇菌培养至 A_{600 nm} 值为 0.6,加入 IPTG 至终水平为 1 mmol/L,继续诱导培养 4 h,收集菌体沉淀。超声裂解菌体收集包涵体,溶解于 8 mol/L 尿素中,镍亲和层析柱对 ED III 重组蛋白进行纯化,梯度透析 ED III 重组蛋白使其恢复天然构象,聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分析结果。

1.3.3 ED III 重组蛋白的鉴定 纯化后的 ED III 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R250 染色、洗脱、成像。运用美国 ABI 公司 4800 plus MALDI-TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪对 ED III 重组蛋白进行鉴定。

1.3.4 ED III 重组蛋白抑制 DENV 感染细胞 用胰蛋白酶将生长良好的 VeroE6 细胞消化、分散为单个细胞,将单个细胞铺于 6 孔板中(4×10⁵ 个细胞/孔),待细胞丰度为 90%时,弃培养基。将含 ED III 重组蛋白(100、50、10、0 μL/mL)的细胞培养基分别加入上述六孔板中,使 ED III 重组蛋白吸附至细胞表面,同时设置 BSA 对照组。将六孔板 37 ℃ 孵育 30 min,弃培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍,每孔加入含 100 个噬斑单位的 DENV 培养液 0.5 mL,37 ℃ 感染 1.5 h,每隔 15 min 十字摇动 1 次。弃病毒液,每孔加入含 2%羧甲基纤维素的 DMEM 培养基 6 mL,37 ℃ 5% CO₂ 培养 6~10 d,弃培养基,固定并染色(0.1%结晶

紫、4%甲醛),根据空斑减少数计算病毒抑制效率。

2 结 果

2.1 重组原核表达载体 pET28b(+)-ED III 的鉴定 对重组原核表达载体 pET28b(+)-ED III 进行测序,结果显示 Nco I (CCATGG)、Xho I (CTCGAG)、ED III 目的片段和 His 标签与预期结果相符。比对结果显示,ED III 基因序列同 Genbank 数据库 KU291813.1 号 DENV2 株序列具有 100%同源性,说明表达载体构建成功。

2.2 ED III 重组蛋白的表达与纯化 重组质粒转化大肠埃希菌感受态细胞 BL21(DE3),1 mmol/L IPTG 诱导 4 h,产物经 SDS-PAGE 电泳分析,在大约 13×10³ 处出现差异性条带,与预期的相对分子质量(13.3×10³)相当,且重组蛋白以包涵体形式存在。通过镍亲和层析柱对 ED III 重组蛋白进行纯化,对纯化后的蛋白复性并进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示获得高纯度的 ED III 重组蛋白。见图 1。

2.3 重组蛋白 ED III 的质谱鉴定 将纯化后的 ED III 重组蛋白通过 SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色后,切下目的蛋白经脱色、还原、酶解等处理后,进行 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图谱分析,结果见图 2。利用 Mascot 软件在 MSDB 数据库对质谱结果进行检索。检索结果显示,ED III 重组蛋白与 DENV2 ED III (登录号:gi|59304)相匹配,得分 154 分,高于阈值分数(P<0.05),证明 ED III 重组蛋白为 DENV2 ED III 蛋白。见表 2。

表 2 DENV2 EDⅢ 重组蛋白质谱结果

肽段序列	观测值	检测值	计算值	误差	得分(分)	登录号
IPFEIMDLEKR	1 405.863 9	1 405.863 9	1 405.727 5	0.1364	27	gi 59304
EIAETQHGTIVIR	1 465.926 5	1 465.926 5	1 465.788 9	0.1376	83	
VQYEGDGSPCKIPFEIMDLEKR	2 611.402 8	2 610.395 5	2 610.245 8	0.1419	44	

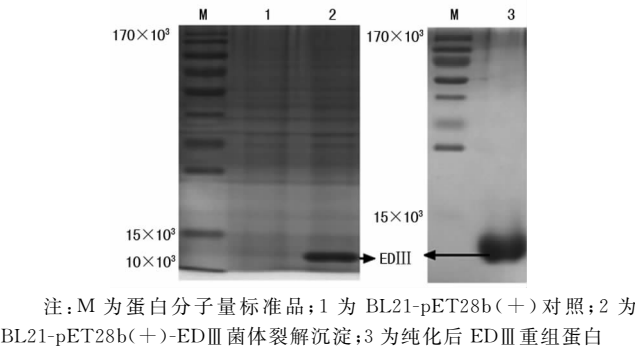


图 1 DENV2 EDⅢ 重组蛋白的原核表达和纯化电泳图

2.4 EDⅢ 重组蛋白抑制 DENV 感染 VeroE6 细胞 结果显示,EDⅢ 重组蛋白可竞争性抑制 DENV2 感染 VeroE6 细胞,而 BSA 对照组几乎不能抑制病毒感染细胞(图 3)。病毒感染的抑制率与 EDⅢ 重组蛋白剂量呈正相关($R^2=0.846\ 5$, $P=0.000\ 4$)。当蛋白水平分别为 10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 时,对病毒感染细胞的抑制率分别为 43.2%、77.9%和 90.5%。见表 3。

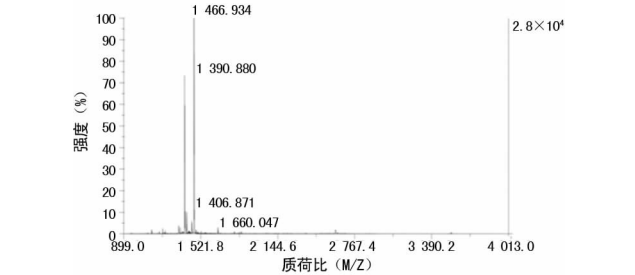


图 2 DENV2 EDⅢ 重组蛋白一级质谱图

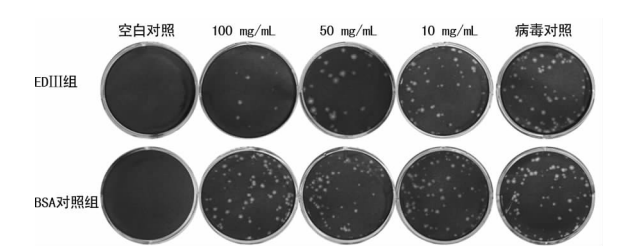


图 3 DENV2 EDⅢ 重组蛋白阻止 DENV 感染的空斑减少实验

表 3 EDⅢ 重组蛋白对 DENV2 感染的抑制率

蛋白水平 ($\mu\text{g/mL}$)	EDⅢ重组蛋白组		BSA 对照组	
	空斑计数(pfu)	抑制率(%)	空斑计数(pfu)	抑制率(%)
100	9	90.5	94	2.1
50	21	77.9	93	3.1
10	54	43.2	93	3.1
0	95	—	96	—

注:pfu 为空斑形成单位,指在单层动物细胞上形成一个空斑的病毒数;在标准条件下,1 个空斑形成单位相当于 1 个病毒颗粒;—表示无数据

3 讨 论

近年来,蚊媒传染病登革热在全球呈现快速蔓延和上升的流行趋势,但目前仍没有特异性的治疗药物和有效疫苗应用于临床^[1]。DENV E 蛋白被广泛应用于 DENV 的诊断和重组亚单位疫苗的研发。而 EDⅢ 含有 Ig 样结构,它通过结合细胞表面受体进而感染细胞,同时 EDⅢ 能够促使机体产生中和抗体并诱导机体的免疫应答。因此,EDⅢ 成为研制抗 DENV 疫苗和药物重要的靶点^[7-10]。CHIN 等^[7]研究发现,DENV1 和 DENV2 的 EDⅢ 重组蛋白均能阻断 DENV 吸附细胞,并且不同型别的 DENV 也存在一定的交叉作用。KHANAM 等^[8]利用基因工程技术获得 DENV2 和 DENV4 的 EDⅢ 嵌合蛋白,证实其具有良好的免疫原性,免疫动物后产生中和抗体的滴度高,并可有效阻止 DENV2 和 DENV4 吸附宿主细胞。YANG 等^[9]研究也显示,通过原核蛋白表达技术制备的 DENV2 EDⅢ 可诱导小鼠产生中和抗体,该抗体可以提高乳鼠的生存率。易海粟等^[10]对 EDⅢ 重组蛋白光谱中和抗体识别表位进行鉴定并发现了一个保守的保护性构象表位。这些研究都证实了以 EDⅢ 为研究方向的疫苗有高效且安全的免疫原性,具有广阔的开发前景。

本研究通过原核基因工程技术构建了 EDⅢ 原核表达质粒,选择感受态细胞 BL21 对目的蛋白进行表达,然后超声破碎,将沉淀处理后进行蛋白纯化,纯化后蛋白纯度可达 90% 以上。由于诱导后蛋白主要以包涵体形式存在,虽然笔者也尝试用上清液做纯化,但是纯化后蛋白纯度不高。为了获得高纯度、高水平的重组蛋白,本研究选择对包涵体进行纯化,并将获得的重组蛋白进行鉴定。通过正离子发射模式的质谱仪对重组蛋白进行鉴定,即多肽离子飞到飞行管顶端后,反射器使之折返回起点(相当于 2 倍线性模式的飞行)。结果显示,EDⅢ 重组蛋白水解后的肽段匹配分数明显高于阈值分数,说明该重组蛋白正是 DENV2 EDⅢ 蛋白。

梯度透析法可以使包涵体蛋白 EDⅢ 恢复蛋白质天然构象,这样就可模拟病毒颗粒的 EDⅢ,竞争结合易感细胞表面受体而阻止 DENV 感染。通过重组的 EDⅢ 蛋白竞争性抑制 DENV 与 VeroE6 细胞表面受体结合,从而达到抑制 DENV 感染的目的。本研究证实了 EDⅢ 重组蛋白能够竞争性阻断 DENV2 吸附并感染 VeroE6 细胞,而且 EDⅢ 重组蛋白阻断病毒吸附效果与其水平呈正相关,当孵育蛋白量达 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,可保护 90.5% 的 VeroE6 细胞不被感染。本次实验提示,通过阻断 EDⅢ 重组蛋白与 VeroE6 细

胞表面受体结合,可以抑制 DENV 感染细胞,因此 EDⅢ重组蛋白表位是研制 DENV 亚单位疫苗必须考虑的抗原表位之一。

参考文献

[1] GUZMAN M G, HARRIS E. Dengue[J]. Lancet, 2015, 385(9966):453-465.
 [2] BHATT S, GETHING P W, BRADY O J, et al. The global distribution and burden of dengue[J]. Nature, 2013, 496(7446):504-507.
 [3] LAI S J, HUANG Z J, ZHOU H, et al. The changing epidemiology of dengue in China, 1990—2014; a descriptive analysis of 25 years of nationwide surveillance data[J]. BMC Med, 2015, 13(1):100-110.
 [4] CHEN B, LIU Q. Dengue fever in China[J]. Lancet, 2015, 385(9978):1621-1622.
 [5] 郭勇晖. 登革病毒重组包膜蛋白表达及其应用的研究进展[J]. 广东医学, 2012, 33(9):1350-1352.
 [6] HUNG J J, HSIEH M T, YOUNG M J, et al. An external loop region of domain Ⅲ of dengue virus type 2 envelope

protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells[J]. J Virol, 2004, 78(1):378-388.
 [7] CHIN J, CHU J, NG M L. The envelope glycoprotein domain Ⅲ of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry[J]. Microbes Infect, 2007, 9(1):1-6.
 [8] KHANAM S, ETEMAD B, KHANNA N, et al. Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains Ⅲ of these two serotypes[J]. Am J Tropical Med Hyg, 2006, 74(2):266-277.
 [9] YANG J, ZHANG J, CHEN W, et al. Eliciting cross-neutralizing anti-bodies in mice challenged with a dengue virus envelope domain Ⅲ expressed in Escherichia coli[J]. Can J Microbiol, 2012, 58(4):369-380.
 [10] 易海粟, 温坤, 朱伟, 等. 登革病毒包膜 EDⅢ蛋白广谱中和抗体识别表位鉴定[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(7):612-617.

(收稿日期:2018-12-26 修回日期:2019-04-12)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.034

131 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床特征分析

陈晓颖¹, 陈航¹, 焦丽丽²

1. 福建省福清市医院, 福建福清 350300; 2. 福建省福清市妇幼保健院, 福建福清 350300

摘要:目的 回顾性分析 131 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的临床特征,通过改良碳青霉烯酶灭活试验(mCIM 试验)与 EDTA 改良碳青霉烯酶灭活试验(eCIM 试验)分析其产酶类型,为院内感染防控和优化临床用药提供依据。**方法** 收集 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日分离的 131 株 CRE,分析其菌种构成、标本来源、科室分布等临床特征,采用 mCIM 试验对其进行快速表型分析,并通过 eCIM 试验确定其产酶类型。**结果** 收集到的 131 株 CRE 菌株中,以肺炎克雷伯菌(86.2%)为主,其次分别为大肠埃希菌(7.6%)、弗劳地枸橼酸杆菌(2.3%)等。标本来源以痰液(36.6%)为主,其次为尿液(17.5%)、血液(13.0%)等。科室分布以重症监护病房(37.4%)为主,其次分别为神经外科(16.8%)、特诊病房(6.2%)等。mCIM 试验阳性率为 84.73%,以肺炎克雷伯菌为主(91.89%),eCIM 试验分析其产酶类型,其中肺炎克雷伯菌主要以产丝氨酸酶为主(80.39%),大肠埃希菌以产金属碳青霉烯酶为主(88.89%)。**结论** CRE 临床感染现状较为严峻,应加强监测,防止并控制传播;mCIM 试验与 eCIM 试验检测快速简便,有较高的应用价值。

关键词:肠杆菌科细菌; 耐碳青霉烯酶; 改良碳青霉烯酶灭活试验; EDTA 改良碳青霉烯酶灭活试验
中图法分类号:R446.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)16-2386-03

肠杆菌科细菌是引发医院感染的主要病原菌之一,可引起呼吸道、泌尿道等部位的感染^[1]。碳青霉烯类药物抗菌活性强、抗菌谱广,是治疗肠杆菌科细菌感染的最后一道防线^[2]。但随着抗菌药物的滥用,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的比例不断上升,其耐药率高,造成患者治疗失败率高、病死率高。CRE 的耐药基因可通过质粒传递,对院内感染的防控造成很大困扰,如何快速、简便地检测出 CRE,尤其是产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌(CPE),就显得极为重要。本文对 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日临床分离的 131 株 CRE 菌株进行分析,从临床特征、快速诊断方面进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日临床分离的 CRE 菌株,剔除同一病例相同部位的重复菌株,共计 131 株。质控菌株肺炎克雷伯菌(ATCC700603)、大肠埃希菌(ATCC25922)等均购自原卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 法国生物梅里埃公司 VITEK-60 全自动细菌鉴定药敏仪及配套的鉴定药敏卡;哥伦比亚血琼脂平板、M-H 药敏平板等购自郑州贝瑞特公司;美罗培南、亚胺培南药敏纸片等购自杭州天和微生物公司。所有试剂均在有效期内。

1.3 培养、鉴定和药敏试验 严格按照《全国临床检