

β -tubulin III (+) 且 survivin (+) 组有效率为 25.0%, β -tubulin III (-) 且 survivin (-) 组有效率为 73.91%, 两者差异显著 ($P < 0.05$)。疗效与性别、年龄、组织类型均无相关性 ($P > 0.05$)。所有患者均未出现过敏反应, 主要不良反应为消化道症状和骨髓抑制。恶心、呕吐 30 例 (42.50%), 其中 2 例为 III ~ IV 度; 白细胞减少 32 例 (43.24%), 其中 3 例发生 III ~ IV 度骨髓抑制, 各组之间无显著性差别 ($P > 0.05$)。经对症支持治疗均能耐受并完成治疗。

综上所述, β -tubulin III、survivin 高表达的进展期胃癌患者对多西紫杉醇耐药, 化疗前对其标本进行 β -tubulin III、survivin 蛋白检测, 可以指导临床化疗, 提高化疗有效率, 其临床意义值得进一步研究, 我们将进一步扩大入组病例, 根据两种蛋白的检测水平对进展期胃癌患者的化疗疗效进行前瞻性的预测。

参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74
- 2 Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K, et al. Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus irinotecan and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer: The Japan Clinical Oncology Group Study [JC (YG9205)] [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(1):54
- 3 Ajani, Vall Custem E, Moiseyenko FC, et al. Docetaxel (D), cisplatin, 5-fluorouracil (F) for chemotherapy-naïve patients with metastatic or locally recurrent, unresectable gastric carcinoma: Interim results of a

- randomized phase III trial [J]. Proc Am Soc Clin Oncol, 2003, 22:999
- 4 Banerjee A. Increased levels of tyrosinated alpha-beta III- and beta IV-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293:598-601
- 5 Yonemura Y, Elnemr A, Endou Y, et al. Multidisciplinary therapy for treatment of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer [J]. World J Gastrointest Oncol, 2010, 15(2):85-97
- 6 Li CP, Chen JS, Chen LT, et al. A phase II study of weekly docetaxel and cisplatin plus oral tegafur/uracil and leucovorin as first-line chemotherapy in patients with locally advanced or metastatic gastric cancer [J]. Br J Cancer, 2010, 103(9):1343-1348
- 7 Faucz FR. Docetaxel treatment in castration-resistant prostate cancer: the triad gene-drug-disease [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(2):351-353
- 8 Kappler M, Rot S, Taubert H, et al. The effects of knockdown of wild-type survivin, survivin-2B or survivin-delta3 on the radiosensitization in a soft tissue sarcoma cells in vitro under different oxygen conditions [J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(12):994-1001
- 9 Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(13):462
- 10 Liang QL, Wang BR, Li GH. DcR3 and survivin are highly expressed in colorectal carcinoma and closely correlated to its clinicopathologic parameters [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2009, 10(9):675-682
- 11 Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, et al. Altered-tubulin isotype expression in paclitaxel resistant human prostate carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 2008, 77(4):562-566

(收稿:2011-03-16)

(修回:2011-03-31)

两种不同基因引物检测痰液标本中肺炎链球菌的比较

刘丽 张颖 杨锦红 田鹏鹏 李向阳

摘要 目的 建立 cpsA 和 spn9802 两种引物基因定量检测肺炎链球菌检测方法。方法 根据基因库中两种基因的序列设计特异性引物, 对 127 例肺炎患者痰液标本进行荧光定量 PCR 检测, 比较两种方法检测的敏感性和特异性, 并用传统痰培养方法同时检测标本。结果 所有传统微生物检测肺炎链球菌阳性的 12 例标本在 cpsA 和 spn9802 检测中均为阳性; 在传统微生物检测肺炎链球菌阴性的 114 例标本中 cpsA 法 9 例阳性, spn9802 法 29 例阳性。统计分析表明, 3 种方法的阳性率比较存在显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 cpsA 和 spn9802 两种引物基因定量检测肺炎链球菌能提高肺炎患者痰液标本肺炎链球菌的阳性率。两种引物共同检测结果与培养结果相符, 有一定的临床应用价值。

关键词 肺炎链球菌 荧光定量 PCR

Comparison of Real-time PCR Methods by Two Different Primers for Identification of *Streptococcus Pneumoniae*. Liu Li, Zhang Ying,

基金项目:温州市科技计划项目(Y20070137)

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院检验科

通讯作者:李向阳, 电子信箱:lxxy@wzhealth.com

Yang Jinhong, et al. Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To compare two real-time PCR methods by primer cpsA and spn9802 for detection and identification of *Streptococcus pneumoniae*. **Methods** Two sets of primers targeting different genes of *Streptococcus pneumoniae* were designed and synthesized. The sensitivity and specificity of real-time PCR were determined. 127 sputum specimens from suspected pneumonia cases were detected by real-time PCR and bacterial culture simultaneously. **Results** Of the 127 sputum specimens, 12 positive by culture were both positive by real-time PCR methods. Of the 115 negative by culture, 12 were positive by cpsA real-time PCR and 29 were positive by spn9802 real-time PCR. The analysis showed that there was statistically significant difference between the three methods ($P < 0.05$). **Conclusion** cpsA real-time PCR and spn9802 real-time PCR can effectively improve the rate of positivity for diagnosis of suspicious pneumonia cases. Detecting sputum specimens with both cpsA and spn9802 can get the same results as bacterial culture, so it is useful for clinical diagnosis.

Key words *Streptococcus pneumoniae*; Real-time PCR

肺炎链球菌是引起 5 岁以下儿童支气管炎、肺炎和脑膜炎的重要病原菌^[1]。临床上常规采用培养的方法进行检测,此方法耗时长、阳性率低。为解决这一问题,PCR 的方法已用于临床标本中肺炎链球菌的诊断。这些方法分别针对 16sRNA、溶素(pneumolysin, ply)和自溶素(autolysin, lytA)等肺炎链球菌的不同成分设计引物实现临床标本中肺炎链球菌的扩增^[2-4]。最近的报道表明痰液中常见的口腔链球菌和缓症链球菌含有上述物质,上述方法的特异性不强^[5]。通过探针和测序等方法证实编码肺炎链球菌荚膜多糖生物形成蛋白的 cpsA 基因和编码未知蛋白的 DNA 片段 spn9802 是肺炎链球菌所特有的^[7,8]。本实验就针对这两种基因设计引物,通过定量 PCR 方法,比较两种方法对临床标本中肺炎链球菌检测的敏感性和特异性。

材料与方法

1. 材料:(1)主要仪器和试剂:ABI7500 荧光定量 PCR 仪、Vitek-32 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)、TAKA-TA 荧光定量试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。(2)菌株和标本来源:本实验所用 75 株菌株来自温州医学院附属第二医院检验科细菌室分离的临床株,其中 35 株为肺炎链球菌,40 株为非肺炎链球菌(大肠杆菌、奇异变形杆菌、产酸杆菌、肺炎克雷伯菌、黏质沙雷菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽假单胞菌、不动杆菌、黄杆菌、副流感嗜血杆菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌各 1 株,藤黄微球菌、尿肠球菌、粪肠球菌、草绿色链球菌各 2 株,无乳链球菌 3 株,化脓链球菌 3 株,口腔链球菌 6 株,缓症链球菌 5 株);127 份痰液标本为本院临床诊断为肺炎的 5 岁以下儿童的痰液标本。

2. 方法:(1)引物:根据肺炎链球菌荚膜多糖生物形成蛋白的 cpsA 基因(登录号 NC_011072)和编码未知蛋白的 DNA 片段 spn9802(登录号 AE008434)设计引物。两对引物分别为 cpsA:上游引物,ACGCAACTGACGAGTGTGAC;下游引物,GATCGCGACACCGAAGTAAT。spn9802:上游引物,CAAGTCGTTCCAAGGTAACAAGTC;下游引物,CTAAAC-

CAACTCGACCACCTCTTT。(2)DNA 模板的制取:取 0.5 麦氏浓度的临床分离菌株的菌液 1ml 于 Ep 管中,13000r/min 离心 5min,弃上清。在沉淀中加入 150μl 裂解液(蛋白酶 K 浓度为 200ng/ml 的 0.5% NP-40 溶液),提取 DNA 检测的模板液备用。取临床送检的 5 岁以下患肺炎的儿童痰液 1ml,加入等倍体积的 1% 的胰蛋白酶液按照临床检验操作规程进行消化后,按上述操作进行提取。(3)荧光定量 PCR 反应体系和反应条件:两种引物扩增采用相同的 20μl 体系,包括 SYBR® Premix Ex Taq TM II 10.0μl,参比荧光 ROX0.8μl,上下游引物(10μmol/L)各 0.8μl, DNA 模板 2.0μl,用双蒸水补至 20μl。反应条件:预变性:95℃,30s;PCR 反应:95℃,5s;60℃,30s。进行 40 个循环。用引物 cpsA 检测时退火温度设为 63℃。每次扩增均以临床分离鉴定的一株肺炎链球菌的 DNA 为阳性对照,双蒸水为阴性对照,空白孔为空白对照。所有样品和阴阳性对照都设 2 孔进行平行检测。(4)荧光定量 PCR:①敏感性和特异性评价:麦氏浊度为 1.0 的上述作为阳性对照的肺炎链球菌临床分离菌株原液倍比稀释后按照涂布计数法得出菌落数为 6×10^7 CFU/ml。将菌种浓度为 10^7 CFU/ml 到 10^0 CFU/ml 的倍比稀释液取 1ml 分别提取核酸 DNA 后,用本实验建立的两种荧光定量 PCR 检测体系进行检测,考察检测下限,并将该 Ct 值作为临床标本检测的 cut-off 值。同时对反应体系中肺炎链球菌数量(CFU)的对数和相对应的扩增 Ct 值作标准曲线,根据曲线参数评价实验结果的可信度。用两种检测体系检测 35 株肺炎链球菌和 40 株非肺炎链球菌并比较两种检测体系检测结果的差异;②稳定性评价:分别用两种引物扩增 10^7 CFU/ml 菌液 DNA 重复 5 次,计算各引物 Ct 值的平均值和变异系数来评价方法的稳定性。(5)临床标本检测:根据第 4 版《临床检验操作规程》,用传统方法(革兰染色镜检、奥普托欣敏感试验和胆汁溶菌实验并用 Vitek-32 全自动细菌鉴定仪检测确证)和两种荧光定量方法同时检测 127 例临床标本,同一标本的两孔 Ct 值均小于相应 cut-off 值的定为阳性。只有 1 孔 Ct 小于相应 cut-off 值的重复检测。实验过程均参照实验室无菌标准操作规程进行无菌操作。

3. 统计学方法:本实验采用 SPSS16.0 软件进行统计。3 种方法检出阳性率的比较采用行 × 列表的 χ^2 检验,两种引物

检测率的比较采用配对四格表的 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 反应体系评价结果: (1) 敏感性和特异性: 两种引物最低检测限均为 10^2 CFU /ml, 此时 Ct 值为 30。cpsA、spn9802 为引物扩增的标准曲线的 R^2 分别为 0.997 和 0.998, 说明实验操作准确, 实验结果可信^[6]。35 株肺炎链球菌两种引物检测均全为阳性, 40 株非肺炎链球菌均为阴性, 最小 Ct 值 < 30 , 且为非特异扩增 (溶解曲线双峰)。(2) 稳定性: cpsA 为引物扩增 10^7 CFU/ml 菌液 DNA 时 Ct 值分别为 17.33、17.41、17.16、17.38、17.40, 平均数为 17.34 ± 0.10 , 变异系数为 0.59%。spn9802 为引物扩增 10^7 CFU/ml 菌液 DNA 时 Ct 值分别为 16.21、16.34、16.25、16.04、16.43, 平均数为 16.25 ± 0.12 , 变异系数为 0.76%, 说明两种方法具有可靠的稳定性。

2. 临床标本检测结果: 如表 1、表 2 所示 127 份痰液标本用培养方法共检出 12 例阳性, cpsA 和 spn9802 两种方法检测结果均为阳性。传统培养法检测的 115 例阴性标本, cpsA 法有 12 例检出阳性, spn9802 法有 29 例检出阳性。表 2 中 cpsA 法和 spn9802 法均阳性的 22 例标本培养结果亦为阳性。3 种方法检出率比较, χ^2 为 20.7, $P < 0.05$, 存在显著差异; spn9802 与 cpsA 法检出率相比, χ^2 为 5.79, $P < 0.05$, 有显著差异。

表 1 3 种方法检出率比较

组别	阴性	阳性	合计	阳性率 (%)
cpsA 组	103	24	127	19.00
spn9802 组	86	41	127	32.00
培养组	115	12	127	9.40
合计	304	77	381	20.00

表 2 两种引物扩增检出率比较

cpsA 组	spn9802 组		合计
	阳性	阴性	
阳性	22	2	24
阴性	19	84	103
合计	41	86	127

讨 论

cpsA 是肺炎链球菌荚膜多糖生物合成基因。在一次基因组比较研究中, 学者应用抑制消减杂交技术比对肺炎链球菌和缓症链球菌全基因组时发现并证实该基因只存在于肺炎链球菌中^[7]。应用该方法,

学者还发现 1 个 DNA 片段 spn9802, 该片段只存在于肺炎链球菌基因组中。在肺炎链球菌 R6 中, spn9802 基因片段编码一种蛋白, 这种蛋白的功能不详但是与肺炎链球菌及肺炎链球菌以外的所有菌种表达的任何蛋白都没有相似性^[8]。

我们针对 cpsA、spn9802 设计引物, 建立荧光定量 PCR 法并观察其在临床标本的具体应用效果。本实验结果表明, 用纯菌种检测的两种引物的敏感性没有差别, 最低检测限都为 10^2 CFU/ml。35 例肺炎链球菌两种引物都能正确检测, 40 例非肺炎链球菌包括口腔链球菌和缓症链球菌检测都为阴性。说明两种引物都能很好将肺炎链球菌和上述两种菌区分开, 具有较高特异性。

常规培养阳性的标本两种引物检测的结果均为阳性。培养阴性的标本有 41 例两种引物检测检测为阳性结果。本实验的两种引物的特异性和敏感性已有证明。两种方法对所有标本都进行 2 孔平行检测, 2 孔结果不一致者重复检测。操作过程所用的移液枪枪头、Ep 管及试剂配制所用液体等均经高压蒸汽灭菌处理 (120℃, 20min)。我们主要通过上述操作降低培养阴性的情况下扩增出的阳性标本假阳性和污染的可能性。cpsA 引物扩增阳性的标本只有 2 例用 spn9802 引物扩增为阴性, 而 spn9802 引物扩增为阳性的标本中有 19 例标本用 cpsA 扩增结果为阴性。虽然纯菌株界定的两种引物扩增的特异性和敏感性没有明显差别, 但是由于临床标本中可能存在没有荚膜的肺炎链球菌或荚膜丢失的肺炎链球菌菌株, 使 spn9802 的阳性率高于与荚膜表达有关的 cpsA 阳性率, 同时临床标本中存在其他很多难以预知的因素, 致使临床标本的检测结果并不能完全与纯菌株检测结果吻合, 而两种引物的结果在排除了污染的情况下仍然可信^[9]。两种方法检测结果均阳性的标本与培养结果完全符合, 说明同时用两种方法检测临床标本有重要的临床意义。但是, 具体的临床应用价值还需要大量临床标本检测结果的支持。

细菌培养是目前临床上肺炎链球菌诊断的检测方法。本实验发现其敏感性明显低于荧光定量 PCR, 而且荧光定量 PCR 法明显缩短了检测时间。两种引物检测法都能有效地将肺炎链球菌与口腔和缓症链球菌分开, 而且同时用两种方法检测临床标本的结果与培养结果完全符合, 所以本实验的方法具有一定的临床应用价值。

参考文献

1 何礼贤, 陈雪华. 社区获得性肺炎病原谱构成及初始经验性抗菌药

- 物应用的争议[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(2): 110-113
- 2 Nabil AE, Stefan E, Tarja K, *et al.* The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays[J]. *Infectious Diseases*, 2010, 10: 104
- 3 Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, *et al.* Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2460-2466
- 4 Llull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *streptococcus pneumoniae* infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4): 1250-1256
- 5 Yang S, Lin S, Khalil A, *et al.* Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 3221-3226
- 6 朱兵清, 李马超, 徐丽, 等. TaqMan 荧光定量 PCR 检测流感嗜血杆菌和肺炎链球菌方法的建立和应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(3): 263-267
- 7 Hee KP, Hee JL, Wonyong K. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *streptococcus pneumoniae* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 1; 310(1): 48-53
- 8 Abdeldaim GM, Stralin K, Olcen P, *et al.* Toward a quantitative DNA-based definition of pneumococcal pneumonia: a comparison of *streptococcus pneumoniae* target genes, with special reference to the *Spn9802* fragment[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(2): 143-150
- 9 Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9: 508-514
- (收稿: 2011-04-14)
(修回: 2011-05-04)

阿霉素肾病大鼠肾组织乙酰肝素酶表达改变及其对蛋白尿的影响

杨红丽 曹英杰 范亚平 陈晓岚

摘要 目的 观察阿霉素肾病大鼠肾组织乙酰肝素酶(HPA)、硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)的表达变化。**方法** 清洁级健康雄性SD大鼠随机分为对照组(NC组)和阿霉素肾病组(AN组),分别观察0、7、14、21、28天的24h尿蛋白定量、0、14、21、28天血清白蛋白、尿素、肌酐、甘油三酯和胆固醇水平以及肾小球HPA、HSPG、bFGF、PDGF表达的改变。**结果** AN组造模后14、21及28天24h尿蛋白定量较同时点NC组及同组前一时间点明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);同时AN组在造模后各观察时间点HPA与PDGF表达显著增多,且随观察时间延长增加,与NC组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);AN组在造模后各观察时间点HSPG表达较NC组显著减少,且随观察时间延长降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);bFGF在NC组及AN组各观察时间点表达均未见明显变化($P > 0.05$);HPA表达与HSPG表达呈负相关($r = -0.757$, $P < 0.05$),与PDGF表达及蛋白尿呈正相关($r = 0.899$, $P < 0.05$; $r = 0.868$, $P < 0.05$)。**结论** HPA表达增加导致HSPG水解增多,同时释放出PDGF等因子,肾小球基膜的物理屏障和电荷屏障受损,促进蛋白尿的发生发展。

关键词 阿霉素肾病 蛋白尿 乙酰肝素酶 硫酸乙酰肝素蛋白多糖

Expression Changes of Heparanase and Its Effects on Proteinuria in Adriamycin-induced Nephropathy Rats. Yang Hongli, Cao Yingjie, Fan Yaping, Chen Xiaolan. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu 226001, China

Abstract Objective To observe the expression change of heparanase (HPA), heparan sulfate proteoglycan (HSPG), basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) in rats with adriamycin-induced nephropathy. **Methods** Forty rats were randomly divided into two groups: the normal control group (NC) and the adriamycin nephropathy group (AN), and the latter was induced by intravenous injection of adriamycin. The 24h urine samples were collected at 0, 7, 14, 21, 28 days, and serum and renal tissue samples were collected at 0, 14, 21, 28 days respectively to observe the changes of 24h proteinuria, serum albumin, urea, creatinine, triglyceride, cholesterol and expressions of HPA, HSPG, bFGF, PDGF. **Results** The 24h proteinuria quantities in AN at 14, 21 and 28 days were significant higher than those of NC ($P < 0.05$). Compared to NC, the expressions of HPA and PDGF in AN were increased significantly along with the time prolonged ($P < 0.05$), but the expressions of HSPG were decreased ($P < 0.05$). The expressions of bFGF in two groups were not changed ($P > 0.05$). The expressions of HPA were positively correlated with proteinuria and expres-

作者单位: 226001 南通大学附属医院肾内科(注: 杨红丽和曹英杰为共同第一作者)

通讯作者: 范亚平, 电子信箱: fanyp19107@medmail.com.cn