

- preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy [J]. BJOG, 2009, 116(10): 1315-1324.
- [7] Laxmi U, Agrawal S, Raghunandan C, et al. Association of bacterial vaginosis with adverse fetomaternal outcome in women with spontaneous preterm labor: a prospective cohort study [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 15(3): 468-471.
- [8] Marx G, John-Stewart G, Bosire R, et al. Diagnosis of sexually transmitted infections and bacterial vaginosis among HIV-1-infected pregnant women in Nairobi [J]. Int J STD AIDS, 2010, 21(8): 549-552.
- [9] 吴晓宁, 黄燕. 细菌性阴道病交叉感染的调查 [J]. 广西医学, 2008, 30(1): 50-51.
- [10] Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations [J]. Am J Med, 1983, 74(1): 14-22.
- [11] Thomason, Gellbart, Anderson, et al. Statistical evaluation of diagnostic criteria for bacterial vaginosis [J]. Am J Obstet Gynecol, 1990, 162(1): 155-160.
- [12] 蔡昀, 童明庆. 细菌性阴道病的实验室诊断 [J]. 医学综述, 2005, 11(6): 551-551.
- [13] 朱园园, 沈佐君, 万士林. 一种检测细菌性阴道病方法的建立及临床评价 [J]. 检验医学, 2009, 24(5): 350-354.
- [14] Hillier SL. Diagnosis microbiology of bacterial Vaginostie [J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 169(2Pt2): 455-459.
- [15] Thromason JL, Gelbart SM, Wilcoski LM. Proline aminopeptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis [J]. Obstet Gynecol, 1988, 71(4): 607-611.
- [16] Nagy G, Gyurcsanyi RE, Cristalli CA, et al. Screen-printed amperometric microcell for proline iminopeptidase enzyme activity assay [J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(5-6): 265-272.
- [17] 罗招凡, 王惠英, 丁红, 等. 改良胺试验诊断细菌性阴道病的临床应用评价 [J]. 国际医药卫生导报, 2007, 13(3): 73-74.
- [18] Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D. Anacrobic bacteria in non-specific vaginitis [J]. N Engl J Med, 1980, 303(11): 601-607.
- [19] Mastrobattista JM, Bishop KD, Newton ER. Wet smear compared with gram stain diagnosis of bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women [J]. Obstet Gynecol, 2000, 96(4): 504-506.
- [20] Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(2): 297.
- [21] Discacciati MG, Simoes JA, Amaral RG, et al. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears [J]. Diagn Cytopathol, 2006, 34(4): 272-276.
- [22] Teixeira GS, Soares-Brandao KL, Branco KM, et al. Antagonism and synergism in Gardnerella vaginalis strains isolated from women with bacterial vaginosis [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(8): 891-897.
- [23] Brown HL, Fuller DD, Jasper LT, et al. Clinical evaluation of af- firm VPIII in the detection and identification of Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis, and Candida species in vaginitis/vaginosis [J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2004, 12(1): 17-21.
- [24] Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, et al. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3270-3276.
- [25] Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, et al. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 721-726.

(收稿日期: 2011-10-09)

· 综 述 ·

以逆境生理理论分析肿瘤的发病机制

葛才保 综述, 陈六生 审校

(溧水县人民医院检验科, 江苏南京 211200)

关键词: 肿瘤; 逆境生理; 腺苷三磷酸; 钠钾交换 ATP 酶**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.037**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2012)03-0337-04

1 引 言

1.1 肿瘤发生与细胞受损及功能异常密切相关。病因学研究表明, 外在化学、物理、生物等因素均可能使机体细胞受到损害; 内环境紊乱、免疫功能下降等则使机体抗肿瘤能力降低。内外因素共同作用致基因突变, 突变细胞降低生长因子需求, 表现出肿瘤细胞的不死性特点。细胞膜葡萄糖转运增强、ATP 酶活性增高、细胞内无氧代谢增强及特异性肿瘤标志物分泌等特点表明肿瘤细胞存在细胞功能异常。细胞功能异常和肿瘤发生密切相关。

1.2 细胞生存环境和 K-Na ATPase 活性在肿瘤发病机制中的作用值得深入研究。流行病学研究表明, 肿瘤发生与环境因素密切相关, 细胞生存环境更值得深入研究。各种化学、物理、生物因素都可引起细胞生存环境的改变, 使机体细胞处于生存逆境状态。因细胞膜负责细胞与其环境的隔离和物质交换的

重任, 所以细胞膜的功能状态又与细胞的功能状态密切相关, 代表细胞膜转运状态的 K-Na ATPase 活性在肿瘤的发病机制中具有重要的作用。本文旨在通过论证逆境生理的生物学共性而应用于肿瘤发病机制分析, 以细胞外 ATP(extracellular ATP, eATP) 不足和 K-Na ATPase 活性的变化为切入点, 分析肿瘤细胞的生存环境和代谢特点, 进而分析机体细胞逆境生理, 探讨肿瘤的发病机制。

2 逆境生理理论^[1]

植物细胞学研究表明, 细胞能对逆境作出反应和适应, 并已形成完整的逆境生理理论。

K-Na ATPase 活力下降是逆境存在依据, K-Na ATPase 活力增强是逆境适应依据: 植物细胞能对生存逆境作出反应和适应。在逆境中, 细胞膜系统最先受到损伤, 细胞膜 ATP 酶(K-Na ATPase 等)活力降低, 细胞膜转运下降, K-Na ATPase

活性下降是细胞生存逆境的依据。如果逆境对细胞的伤害是非致死性的，则随着逆境时间的延长，部分细胞会对此作出适应性的反应。上调 K-Na ATPase 活性，增强细胞膜的转运速率，提高细胞的生存能力。对逆境的适应中，细胞内的物质代谢也发生多方面的变化。首先是代谢途径的改变，同时激素的平衡也被改变。激素平衡的改变将导致基因表达的改变，使代谢途径及许多生物学特性发生一系列的改变。许多基因在相应的逆境中发生诱发性表达，从而产生特异性蛋白质。刘尼歌^[2]观察到细胞在养分胁迫逆境下，细胞膜 H⁺-ATPase 的表达得以加强，而增加细胞膜对养分的摄取。对逆境的适应中环腺苷磷酸二酯酶(cAMP-PDEase)活性被抑制，影响细胞内 cAMP 水平，并造成核酸的过度合成。抗逆性研究也同样发现，在逆境中，基因突变的目的是有利于自己的生存。

3 逆境分析

3.1 逆境生理具有生物学共性 细胞是生命活动的最小单位，其代谢特征具有生物学共性；对照植物细胞的逆境理论，人体和动物细胞也应该存在逆境生理。吴众望^[3]研究了 Cu²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺ 对凡纳滨对虾腮丝细胞的影响，结果 K-Na ATPase 活性明显下降，K-Na ATPase 活性可以作为环境污染的指标之一，表明逆境生理在动物的存在。李石^[4]研究发现大鼠神经元细胞在缺氧逆境下培养 30 min，K-Na ATPase 活性即受到抑制，表明逆境生理在哺乳动物的存在。许多重金属离子和药物可以造成人体红细胞 K-Na ATPase 活性下降，机体细胞在缺氧逆境下，能促进血管上皮细胞生长因子的分泌，促进血管形成，以提高氧的供给。这些公认的逆境事例明确提示逆境生理具有生物学共性。

3.2 eATP 不足与肿瘤发病机制密切相关 eATP 对细胞膜转运和细胞代谢具有重要作用，也对细胞的增殖起着重要作用^[5]。葛才保等^[6]研究表明，肿瘤患者 eATP 不足并导致细胞膜转运障碍，葡萄糖和氧等不能有效进入细胞内利用，细胞内能量代谢障碍，使细胞处于生存逆境，eATP 不足与肿瘤发病机制密切相关。

3.3 逆境特异性蛋白和逆境信号与肿瘤发生密切相关 热应激蛋白(HSPs)是一组逆境特异性蛋白，其中 HSP27 在抗逆性适应细胞的线粒体中多有表达。程磊等^[7]研究表明鼻咽癌组织中 HSP27 明显升高，但在鼻咽癌的组织分型和临床分期之间，差异无显著性意义，提示逆境生理和鼻咽癌的发生具有相关性。Hatzfeld-Charbonnier 等^[8]发现成熟树突状细胞在热逆境下表达高水平的肿瘤坏死因子(TNF- α)，Morin 和 Huot^[9]对许多实验进行分析总结，认为肿瘤组织存在缺氧逆境和养分逆境以及多种逆境信号。

3.4 高糖逆境与肿瘤发生密切相关 徐海峰^[10]发现高糖对 ARPE-19 细胞的 K-Na ATPase 活性明显抑制，表明高葡萄糖水平也是逆境因素之一。Coughlin^[11]在对大样本人群长达 16 年的跟踪调查后得出糖耐量下降可以独立预测多种癌症的发病率的结论，高糖逆境和肿瘤发生存在密切相关性。Jee^[12]对 1 298 385 名韩国人进行的一项历时 10 年的前瞻性研究结果也表明糖代谢异常导致的高糖、高渗、能量供应不足的细胞逆境是肿瘤发生的重要因素。

3.5 氧化逆境在肿瘤发生中具有重要作用 氧化逆境在肿瘤发病机制中的作用已有许多研究，不但与肿瘤发病机制密切相关，也与机体免疫功能密切相关，并影响细胞增殖^[13]。Elsing

等^[14]发现，氧化逆境能抑制细胞膜离子交换，进而影响细胞的代谢和增殖，在肿瘤发生机制中具有重要作用。

3.6 吸烟、感染等肿瘤诱因存在逆境因素 吸烟与肿瘤发生密切相关，碳氧血红蛋白的形成容易导致缺氧逆境。Kalra 等^[15]研究表明尼古丁和焦油可引起局部炎性反应，抑制 K-Na ATPase 的活性，提示吸烟导致局部逆境生理。Sela 等^[16]研究表明，吸烟者中性粒细胞存在缺氧逆境，并可以通过和正常血清共同孵育而获得改善，提示逆境因素存在于细胞环境。病原微生物(细菌、病毒、真菌)感染在肿瘤发生、发展中也具有重要作用，部分病原体直接侵入宿主细胞，破坏细胞能量代谢，使细胞内 ATP 严重不足，细胞内缺氧等而影响细胞分化。病原体感染造成营养物质的竞争、代谢性废物释放和炎性反应等，都可使细胞生存逆境。Spooner 和 Yilmaz^[17]发现微生物慢性感染和缺氧逆境密切相关，细胞内活性氧起着十分重要的作用。

3.7 机体免疫功能下降存在逆境因素 机体免疫功能下降与肿瘤发生密切相关，eATP 不足可以引起免疫细胞功能缺陷。Trautmann^[18]的研究表明足量 eATP 可以向 T 细胞发出协同刺激信号以易化对抗原的识别。Moenner 等^[19]也指出，肿瘤机体网状内皮系统存在逆境应答，与异常的逆境信号相关。

3.8 肿瘤发生的化学性诱因存在逆境因素 人类社会的现代化发展伴随化学工业的成就，化学物质的过度使用，改善了人们的生活条件，但肿瘤发病率也在不断增高。多种金属离子、化学物质、亚硝酸盐等对细胞膜 K-Na ATPase 的活性抑制作用，明确提示化学物质容易造成细胞逆境。主要原因在于化学物质吸收入机体，可以在局部或全身形成高浓度，而使细胞处于生存逆境。台湾成功大学杨倍昌在对 14 个加氯消毒的乡镇和 14 个未加氯消毒乡镇的对照研究中发现，10 年间加氯消毒乡镇的结肠癌、肺癌、膀胱癌及肾脏癌的死亡率显著高于未加氯消毒乡镇，表明肿瘤发生与加氯消毒等日常化学品应用密切相关，也使肿瘤的化学性诱因复杂而多样。

3.9 肿瘤细胞的代谢特点和逆境生理密切相关 肿瘤细胞代谢的最大特点是在细胞外氧供给充足的情况下，肿瘤细胞依然通过耗氧量少、效率低下的糖酵解途径供能，表明肿瘤细胞内的氧供应不足或氧的细胞膜转运不足，使细胞处于缺氧逆境和能量不足逆境，也称 Warburg 效应。Hsu 和 Sabatini^[20]的研究表明 Warburg 效应是针对细胞环境，并为细胞自身生存、繁殖的一种选择或适应。氧胁迫诱导转录因子(HIF)的产生是针对缺氧逆境的表达，使细胞有氧呼吸依赖性下降，细胞呼吸朝葡萄糖酵解途径转移，线粒体内代谢受到抑制。HIF 通过促进血管内皮细胞生长因子的分泌，加强葡萄糖酵解酶活性和葡萄糖转运蛋白表达，刺激血管生成，而改善了肿瘤细胞的缺氧状态。肿瘤细胞增加 M2 型丙酮酸激酶的表达，也是为了有利于肿瘤细胞在缺氧逆境、营养逆境环境下的生存。

3.10 肿瘤细胞内 ATP 不足逆境与细胞异常增殖密切相关 肿瘤细胞进行低效率的糖酵解途径供能，细胞内 ATP 严重不足。但肿瘤细胞的快速生长却需求大量的 ATP，形成了能量供需矛盾。Israelsen^[21]的研究表明，肿瘤细胞以非正常途径允许细胞快速增殖，调控细胞增殖的 PI3K 信号被激活起着重要的作用，使 ATP/AMP 比值下降，增殖细胞将生长信号表达为能量所需，促进葡萄糖的摄取，细胞内 ATP 的消耗促进了核酸等大分子的生物合成，并影响整个细胞代谢平衡。肿瘤细胞的 ATP 代谢和一般细胞形成很大的差异，正常细胞内 ATP 水平

可以影响生长因子受体的表达与折叠,当 ATP 不足时,细胞生长就会受到抑制。但肿瘤细胞的细胞内 ATP 平衡显然处于异常状态,肿瘤细胞已经能够适应低 ATP 状态,大部分的 ATP 被用于大分子物质的合成。

4 逆境比较

4.1 肿瘤逆境和植物逆境密切相关 植物逆境的种类与人体可能存在许多差异,但射线损害(α 、 β 、 γ 射线)造成的物理性逆境、细菌(病毒)感染引起的生物竞争性逆境、各种化学物质的过量或不足引起的化学性逆境具有相似性。eATP 不足引起的细胞膜转运障碍而致细胞内代谢异常的逆境则是一种严重的生存逆境,并具有普遍性。许多研究表明肿瘤机体红细胞等正常细胞的 K-Na ATPase 活性降低,而肿瘤细胞 K-Na ATPase 活性增高^[22-24]。红细胞 K-Na ATPase 活性降低,表明机体逆境的存在,而肿瘤细胞 K-Na ATPase 活性增高则表明肿瘤细胞对逆境的适应,而且同恶性程度、生长速度正相关。肿瘤细胞高 K-Na ATPase 活性、高 Ca-Mg ATPase 活性、葡萄糖转运蛋白的高表达、葡萄糖代谢率增强、膜转运增强、基因突变、cAMP-PDEase 活性下降都符合机体细胞在逆境中的抗逆性适应。对 miRNA 的研究表明,多种逆境均会诱导 miRNA 的产生,其作用是通过引导目的基因 miRNA 的降解和阻止翻译过程来调控靶基因。而 miRNA 也参与肿瘤发展的多个阶段,与基因之间相互调控,两者比较具有一致性。原癌基因在肿瘤的发生中起着重要的作用,同时也在植物细胞的抗逆性适应中有着充分的表达,说明肿瘤逆境和植物逆境密切相关。

4.2 肿瘤的基因突变具有逆境适应性目的 肿瘤细胞的基因突变显然属于条件诱发性突变,而烟焦油、亚硝酸盐等致癌实验的可重复性表明肿瘤细胞的基因突变具有方向性。肿瘤细胞的不死性特点表明,面对生存逆境,抗逆性适应过程是从不适应到适应,说明肿瘤细胞的基因突变具有目的性。由于逆境作用的时间、空间的不同,也使肿瘤的基因突变具有不稳定性特点。肿瘤细胞的基因突变是机体细胞对生存逆境的自然反应,和植物细胞的逆境生理是一致的,基因突变只是机体对逆境适应的一个中间环节。研究发现 eATP 和肿瘤发生密切相关,并与基因突变密切相关,eATP 不足导致肿瘤细胞的异常增殖。肿瘤细胞加速 ATP 的摄取表明了肿瘤细胞对 eATP 的依赖。肿瘤细胞以高表达的 K-Na ATPase 活性对抗 eATP 不足,肿瘤组织对血管的依赖正是肿瘤细胞对血液 eATP 等必需物质的趋化性表达,所以有学者称肿瘤细胞的基因突变为适应性进化。

5 eATP 不足导致肿瘤发生的可能机制

eATP 不足导致细胞膜物质转运受阻,细胞所需葡萄糖、氧等不能有效进入细胞内,细胞内 ATP 生成不足,使细胞处于生存逆境。在逆境环境下,细胞膜受损,机体细胞膜 K-Na ATPase 活性下降。cAMP-PDEase 活性受到抑制,细胞代谢发生改变,形成逆境损害。逆境促进部分具有增殖能力的细胞进行抗逆性适应,对抗 eATP 不足的逆境适应产生基因突变,上调细胞膜 K-Na ATPase 活性,增加葡萄糖转运蛋白的表达,导致细胞“疯狂”地摄取葡萄糖和所需物质,维持自我生命的延续,表现出突变细胞不死性特点。cAMP-PDEase 活性受到抑制,使核酸过度合成。而没有基因突变的细胞 K-Na ATPase 活性下降,细胞膜转运下降,使整个机体的正常组织和细胞进入能量耗尽衰竭状态。eATP 不足条件下葡萄糖的加速摄取

也使氧的细胞膜转运下降,并加重细胞内缺氧逆境,使线粒体内缺氧逆境更为严重,迫使细胞能量代谢向线粒体外的酵解途径转移。eATP 不足导致细胞内 ATP 不足逆境,导致核酸的过度合成和细胞的异常增殖。

6 总 结

本文通过论证逆境理论的生物学共性,将其应用于肿瘤发病机制分析,通过 eATP 不足等逆境事例论证了肿瘤发病机制中存在逆境因素。通过逆境理论分析了肿瘤细胞的代谢特点,肿瘤细胞的代谢特点与逆境生理密切相关。通过 K-Na ATPase 活性下降作为逆境依据,K-Na ATPase 活性增高作为适应依据,论证了肿瘤发病机制的逆境生理。以 eATP 不足事例,探讨了肿瘤发生的机制。笔者认为:逆境生理和肿瘤发生密切相关,肿瘤逆境值得深入研究。

参考文献

- [1] 汪塑仁. 细胞生物学[M]. 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1998: 92-93.
- [2] 刘尼歌. 质膜 H⁺-ATPase 与环境胁迫[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(3): 263-264.
- [3] 吴众望. 金属离子对凡纳滨对虾鳃丝 K-Na ATPase 活力的影响 [J]. 海洋环境科学, 2004, 23(3): 27-29.
- [4] 李石. Na-K ATP 酶参与缺氧所致大鼠皮质神经元内钙升高[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(1): 44-47.
- [5] 黄亿华, 翁星河, 周产铨. 胞外 ATP 的作用、来源和命运[J]. 生理科学进展, 1998, 29(2): 115-119.
- [6] 葛才保, 陈六生, 张力. 细胞外三磷酸腺苷在细胞膜物质转运中的作用机制与 2 型糖尿病和肿瘤的病因研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 75-76.
- [7] 程磊, 刘立思, 张明. 主要热应激蛋白和 p53 在鼻咽癌中的表达 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2003, 17(8): 458-460.
- [8] Hatzfeld-Charbonnier AS, Lasek A, Castera L, et al. Influence of heat stress on human monocyte-derived dendritic cell functions with immunotherapeutic potential for antitumor vaccines[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(13): 1179-1187.
- [9] Morin CI, Huot J. Recent advances in stress signaling in cancer [J]. Cancer Res, 2004, 64(14): 1893-1898.
- [10] 徐海峰. 高糖对人视网膜色素上皮细胞 Na-K-ATP 酶表达的影响 [J]. 眼科研究, 2007, 2(2): 113-116.
- [11] Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, et al. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults[J]. Am J Epidemiol, 2004, 159(12): 1160-1167.
- [12] Jee SH, Pastor-Barriuso R, Appel LJ, et al. Body mass index and incident ischemic heart disease in South Korean men and women [J]. Am J Epidemiol, 2005, 162(1): 42-48.
- [13] Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, et al. Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species[J]. J Immunol, 2004, 172(2): 989-999.
- [14] Elsing C, Voss A, Herrmann T, et al. Oxidative stress reduces Na⁺/H⁺ exchange (NHE) activity in a biliary epithelial cancer cell line (Mz-Cha-1)[J]. Anticancer Res, 2011, 31(2): 459-465.
- [15] Kalra VK, Ying Y, Deemer K, et al. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells[J]. J Cell Physiol, 1994, 160(1): 154-162.
- [16] Sela S, Shurtz-Swirski R, Awad J, et al. The involvement of pe-

- ipheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation among cigarette smokers [J]. Isr Med Assoc J, 2002, 4(11): 1015-1019.
- [17] Spooner R, Yilmaz O. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(1): 334-352.
- [18] Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal" [J/OL]. Sci Signal, 2009-02-03 [2011-09-12], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193605.
- [19] Moenner M, Pluquet O, Boucheareilh M, et al. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(22): 10631-10634.
- [20] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond [J]. Cell, 2008, 134(5): 703-707.
- [21] Israelsen WJ, Vander Heiden MG. ATP consumption promotes cancer metabolism [J]. Cell, 2010, 143(5): 669-671.
- [22] Dearth LR, Brachmann RK. ATP, Cancer and p53 [J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(7): 638-640.
- [23] Miki K, Tanaka H, Nagai Y, et al. Transforming growth factor beta1 alters calcium mobilizing properties and endogenous ATP release in A549 cells; possible implications for cell migration [J]. J Pharmacol Sci, 2010, 113(4): 387-394.
- [24] Rotte A, Garman D, Buss I, et al. Effect of extracellular ATP on cisplatin-induced cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells [J]. Chemotherapy, 2010, 56(1): 1-8.

(收稿日期:2011-10-09)

· 综述 ·

口腔黏膜渗出液在 HIV、梅毒抗体检测中的研究进展

郑冰洁¹,徐辰²综述,尹跃平^{1△}审校

(1. 中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所、中国疾病控制预防中心性病控制中心,北京 210042;
2. 成都医学院医学检验系 07 级 610083)

关键词:HIV; 梅毒; 口腔黏膜渗出液; 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0340-03

口腔黏膜渗出液(oral mucosal transudate, OMT)是一种复杂的体液,能反映血液中各种蛋白质和抗体水平的变化,并具有采集方便、快速、无创性等特点,可代替血液作为感染性疾病筛查所用的诊断性液体。

1 OMT 抗体检测的原理和方法

1.1 OMT 的成分 OMT 由唾液和齿龈隙液混合而成。唾液由腮腺、下颌腺、舌下腺以及其他一些小唾液腺分泌混合而成,含有电解质、酶、低分子化合物、激素、免疫球蛋白、维生素等^[1]。唾液中的免疫球蛋白主要是分泌型 IgA,约占唾液中免疫球蛋白的 87%^[2]。齿龈隙液由齿龈缘和颊黏膜毛细血管中的血浆渗透进入口腔产生,故而含有和血浆中一致的 IgA、IgG、IgM 以及其他血浆成分。有研究认为齿龈隙液中的蛋白 7% 是免疫球蛋白,其中约 58% 来源于血浆^[3]。齿龈隙液中不同免疫球蛋白浓度有所不同,IgG、IgM、IgA 的浓度分别约为血浆中的 1/4, 1/5, 1/2^[4]。因为齿龈隙液体中含有丰富的免疫球蛋白,所以含有齿龈隙液体的 OMT 样本最适宜检测抗体^[4],其中 IgG 是检测的主体。

1.2 OMT 的收集方法 一般有两种收集 OMT 的方法,直接收集法和特殊设备收集法。早期使用的是直接收集法,通过流涎或吐口水的方式收集,但这种方法收集的全唾液中抗体含量较低^[2],收集量不够,并且可能因为不太雅观而不被一些患者所接受。目前以特殊设备收集法为主,使用含有吸收垫、抗蛋白水解物、缓冲液及稳定剂等的特殊设备在口腔前庭、牙齿唇颊面颈 1/3 和牙龈间摩擦,能最大程度收集到抗体含量较高的齿龈隙液体^[5]。特殊的 OMT 收集设备可以大大提高检测的敏感性和特异性,设备中含有的吸收垫和稳定剂等在提高了样本中免疫球蛋白浓度的同时增加了其稳定性,延长了常温下样

本的保存时间,可以保存至少 3 个星期^[2,6]。目前国外商品化的口腔液体样本收集设备主要有 Salivette、Orapette、Omni-SAL、OraSure、Oracol 5 种^[2,4,7]。OraSure(OraQuick)是目前口腔液体收集设备中唯一获得 FDA 认证的产品,有文献报道 OraSure(OraQuick)对 IgG、IgM、IgA 的收集效果都比较好^[7]。相比于发达国家,国内对于 OMT 的采样及应用研究还比较欠缺,尚处于起步阶段,多数相关产品由国外引进销售,自主研发者较少,也鲜见相关的文献与报道。

1.3 OMT 抗体检测方法 由于 OMT 中免疫球蛋白含量较低,故宜采用较敏感的方法。临幊上常用的是酶联免疫吸附法(ELISA),主要有抗体捕捉 ELISA、实时荧光免疫技术等。抗体捕捉 ELISA 常用于检测特殊抗体,原理在于用固定好的抗抗体捕捉样本中的人类抗体形成抗原抗体复合物,然后再用针对样本中人类抗体的抗原和该抗原相应的特殊标记的抗体捕捉并产生信号。抗体捕捉 ELISA 和其他试验不同之处在于信号的强度不是取决于样本中特异性抗体的浓度,而是取决于可被抗原捕捉到的人类抗体的比例。因为 OMT 中的血浆渗出液是免疫球蛋白的主要来源,所以对所有的免疫球蛋白产生的信号在血浆和 OMT 中是相似的。因此,只要样本中含有足够的特异性抗体可以渗透抗特异性抗体的结合板,信号即会显现^[4]。实时荧光免疫技术使用放射性物质标记抗人抗体,与样本中抗体和抗原形成的免疫复合物发生反应,并产生荧光。该法现在被广泛用于 HIV 的 OMT 抗体检测。抗体捕捉 ELISA 是现在 OMT 检测的主要方法。还有一种方法是免疫 PCR 试验^[8],是对 ELISA 的改进,将 ELISA 中和抗原抗体复合物发生反应的酶分子用一个可与 DNA、RNA 结合的抗体代替,DNA、RNA 可以用来作为 PCR 扩增的模板,所得产物可以用