

是导致严重烧伤后并发全身性感染、多器官功能受损及患者死亡的重要原因之一<sup>[4]</sup>。全面观察烧伤后患者,特别是重度烧伤患者,细胞免疫功能的变化,对了解烧伤后机体免疫状况,探索免疫功能紊乱的发生机制,以及免疫功能紊乱的治疗及病情监测有一定的临床价值。

T 淋巴细胞主要执行细胞免疫的效应功能及免疫调节功能。本文表 1 显示:重度烧伤患者外周血 CD3 细胞比例较健康者明显下降,说明重度烧伤患者细胞免疫功能处于抑制状态。CD4 细胞和 CD8 细胞是参与细胞免疫调节的一对相互制约的 T 淋巴细胞亚群;CD4 细胞为辅助/诱导 T 细胞亚群,可协调 B 细胞分化抗体,CD8 细胞为抑制/细胞毒 T 细胞亚群,可抑制抗体的合成、分泌及 T 细胞的增殖,二者的稳态维持着机体的免疫应答。重度烧伤患者外周血 CD4 细胞比例明显低于健康者,CD8 细胞比例则高于健康者,CD4/CD8 比值明显低于健康者,说明重度烧伤患者机体的免疫稳态遭到破坏,正是这种稳态的破坏,导致烧伤患者机体发生免疫功能紊乱,进而并发全身感染和器官损伤。轻度灼伤患者各项免疫指标则无显著变化。免疫指标的变化可反映患者病情的严重程度。因此,检测烧伤患者外周血 T 淋巴细胞亚群的表达,对了解烧伤患者,特别是重度烧伤患者机体免疫功能,控制病情发展起到至关重要的意义。

另一方面,烧伤后患者机体的炎性反应本质上是对烧伤所致组织损伤的一种防御反应,有助于清除创面坏死组织,限制组织损伤的扩大,并加速组织的修复。本文表 2 显示:重度烧伤患者 CRP、AAG、HP 水平较健康者明显升高,而 CER 较健康者降低( $P < 0.05$ );轻度灼伤患者 CRP、HP 较健康者升高,而 CER 较正常者降低( $P < 0.05$ ),AAG 则无明显变化。重度烧伤患者 CRP、AAG 较轻度灼伤患者明显升高( $P < 0.05$ ),说

#### • 临床免疫学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

明炎症因子指标 CRP、AAG 可以反映烧伤患者机体的炎症损伤及其严重程度。由于烧伤越重、病程越长,全身性感染发病率越高<sup>[5]</sup>,而且过激的炎症应激性反应,往往导致 SIRS 的发生以及对组织器官的直接损伤,积极有效维持机体抵抗力成为治愈重度烧伤的关键,对烧伤患者尽早行炎症因子指标检测非常必要。

综上所述,烧伤患者机体不仅存在细胞免疫功能的低下,而且也呈现炎性反应的增强;如何调节提高烧伤患者,尤其是重症烧伤患者机体的细胞免疫功能和控制过激的炎症应激性反应,防止烧伤患者的全身性感染以及器官损伤,对烧伤患者行外周血淋巴细胞亚群和炎症因子指标检测有助于临床烧伤患者的诊断、治疗和病情监测。

#### 参考文献

- [1] 孙东明,程亚颖,井丽娟,等.全身炎症反应综合征患儿血内毒素、脂多糖结合蛋白/脂多糖受体水平变化的意义[J].实用儿科临床杂志,2007,22(6):426-427.
- [2] 黎鳌.烧伤治疗学[M].2 版,北京:人民卫生出版社,1995:80.
- [3] Bak Z,Berg F,Eriksson O,et al. Hemodynamic changes during resuscitation after burns using the Parkland formula[J]. J Trauma, 2009,66(2):329-336.
- [4] Housbrough JF,Zopatel Sirveel RL,Paterson VM. Immunomodulation following burn injury[J]. Surg Clin Nor Am,1987,67(1):69-72.
- [5] Edward RS,Toliver K. Mechanisms of the inflammatory response [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol,2004,18(3):385-405.

(收稿日期:2012-08-09)

## 类风湿关节炎患者血清瓜氨酸化蛋白差异表达分析

高德玉,刘 阳,王 凯, 虞伟,严孝岭,陈芳芳,李晓军

(解放军南京总医院全军临床检验医学研究所,江苏南京 210002)

**摘要:**目的 血清抗环瓜氨酸化蛋白抗体(抗 CCP 抗体)检测对类风湿关节炎(RA)诊断具有高度的敏感性及特异性,是一种 RA 早期诊断指标。尽管抗体已被发现多年,但是其所针对的天然靶抗原仍不十分清楚。本试验通过合成免抗 CCP 抗体免疫亲和层析柱,提取 RA 患者及健康人血清中瓜氨酸化相关抗原,并通过蛋白质组学技术对提取的具有差异性的瓜氨酸化蛋白进行鉴定。**方法** 抗 CCP 抗体阳性血清取自 2010 年 12 月至 2011 年 7 月本院门诊及住院 RA 患者,正常血清取自健康献血者及体检者。体外人工合成 CCP 肽(HQCHQESTXGRSRGRCGRSGS),制备并纯化免抗 CCP 多克隆抗体。将纯化的免抗 CCP 抗体与高流速 NHs-活化琼脂糖偶联制作免疫亲和柱,提取 RA 患者抗 CCP 抗体阳性血清及正常血清中的瓜氨酸化蛋白,通过二维电泳将提取蛋白分离,分析并筛选二者有差异蛋白质点,通过基质辅助激光解吸电离飞行质谱分析进行蛋白鉴定。**结果** 通过免抗 CCP 抗体-高流速 NHs-活化琼脂糖免疫亲和层析纯化、二维电泳和基质辅助激光解吸电离飞行质谱分析,获得了差异性及重复性很好的差异蛋白图谱,将 RA 患者 ACCP 阳性血清和正常血清亲和层析提取蛋白 2-D 图谱比对发现,RA 提取蛋白二维凝胶电泳图谱中共 312 蛋白点,正常血清提取蛋白有 274 个蛋白点,其中有 166 个具有差异表达的蛋白点。在差异蛋白点中,有 101 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调,65 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达下调。52 个蛋白点 RA 患者血清提取蛋白中表达而在正常血清提取蛋白缺失,16 种蛋白在 RA 患者血清提取蛋白中表达而在正常血清提取蛋白缺失。挑选其中差异明显并且灰度值较高的 51 个点进行鉴定分析,并与 IPI 和 Swiss-Prot 数据库进行比对,共鉴定出多种可能与 RA 发病相关的蛋白。在选取的 51 个蛋白点中,有 30 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调,21 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达下调。**结论** 在 RA 患者与健康者血清蛋白中发现部分差异表达的瓜氨酸化蛋白,这些差异蛋白可能成为涉及 RA 发病机制的自身抗原,为进一步研究 RA 的发病机制奠定了基础。

**关键词:**关节炎,类风湿; 抗环瓜氨酸化蛋白抗体; 二维电泳; 质谱分析法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2482-04

类风湿关节炎(RA)是以慢性关节滑膜炎症为主要病理变化的自身免疫性疾病,以对称性、破坏性的关节病变为主要特征。虽已证实感染和受遗传控制的抗原驱动的自身免疫反应是 RA 发病的中心环节,但确切发病机制并不完全明确。近年来研究发现,蛋白质的瓜氨酸化在 RA 发病机制中扮演着重要的角色。血清抗环瓜氨酸化蛋白(CCP)抗体(抗 CCP 抗体)检测对 RA 诊断具有高度的敏感性及特异性,是一种 RA 早期特异性诊断指标,但是其所针对的体内天然靶抗原仍不十分清楚。本实验通过合成兔抗 CCP 抗体免疫亲和层析柱,提取 RA 患者及健康者血清中瓜氨酸化相关抗原,并且通过蛋白质组学技术对提取的具有差异性的瓜氨酸化蛋白进行鉴定。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 抗 CCP 抗体阳性血清取自 2010 年 12 月至 2011 年 7 月于本院确诊的 RA 患者,正常血清取自健康献血者及体检者。RA 诊断符合 1987 年美国风湿病协会(ACR)诊断标准。标本收集均获得患者及主管医生知情同意。

**1.2 仪器与试剂** CCP 肽链由上海华大天源公司合成,序列为:HQCQESTXGRSRGRCGRSGS,纯度大于 95%;兔抗 CCP 抗体由本实验室制备<sup>[9]</sup>;IPG 胶条(pH4~7,非线性)、丙烯酰胺、过硫酸铵、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、三羟甲基氨基甲烷、尿素、硫脲、3-[3-胆酰胺酸]-二乙胺-丙磺酸(CHAPS)、IPG 胶条缓冲液(pH4~7)、胶槽清洗液、凝胶覆盖液、二硫苏糖醇(DTT)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、低熔点琼脂糖、溴丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺、溴酚蓝均购自 Amersham 公司,十二氨基磺酸钠(SDS)购自 Promega 公司,蛋白酶抑制剂 cocktail、37%甲醛、DBP(分析纯,浓度 1 g/mL)、硫脲、碘乙酰胺(IAA)购自 Sigma 公司,乙酸、无水乙醇、甲醇、硝酸银、无水碳酸钠、硫代硫酸钠、醋酸钠、考马斯亮蓝 G250 购自 Amresco 公司,其余均为国产分析纯。紫外分光光度计、HiTrap Protein G HP 亲和层析柱、NHs 琼脂糖凝胶购自 GE Healthcare 公司;冻干机购自美国 FTS 公司,超滤管购自 Millipore 公司,低温超高速离心机购自 Beckman 公司,Pure Lab Classic PL 5243 型纯水仪购自 PALL 公司,IPGphor 聚焦系统、Ettan Dah II 垂直电泳系统、Image Master 凝胶分析软件均购自 Amersham 公司,ImageScannerTM 扫描仪购自 Umax 公司、基质辅助激光解吸电离飞行质谱(MALDI-TOF MS)分析仪购自 Bruker Daltonics 公司。

**1.3 兔抗 CCP 抗体纯化** 利用 HiTrap Protein G HP 亲和层析柱提取兔血清中的抗体,进一步纯化浓缩后利用冻干机冷冻干燥得到抗 CCP 抗体冻干粉,分装后置于 -70 ℃ 冰箱保存备用。

**1.4 兔抗 CCP 抗体与 NHs 琼脂糖凝胶柱偶联** (1)凝胶预处理:实验所用凝胶为高流速 NHs-活化琼脂糖-4,使用前预先用 10 倍介质体积的 1 μmol/L HCl 活化。(2)偶联:称取纯化的兔抗 CCP 抗体约 30 mg 溶于 2 mL 偶联缓冲液中,再与 NHs 琼脂糖凝胶介质混合,室温混匀结合 2~4 h 或 4 ℃ 过夜。(3)封闭:利用 0.5 μmol/L 乙醇胺加 0.1 μmol/L Tris-HCl (pH8.5) 封闭 2~3 h,再用 Tris 缓冲液与醋酸盐缓冲液交替冲洗,重复 3~6 次。(4)保存介质:为防止微生物污染,使用 20%乙醇保存。

**1.5 血清蛋白提取** 利用偶联兔抗 CCP 抗体的 NHs 琼脂糖凝胶提取血清蛋白。(1)将阳性血清和正常血清分别混合,用 0.22 μm 滤器过滤去除较大颗粒,再按照 1 : 10 比例加入

Tris-HCl,1 : 100 比例加入蛋白酶抑制剂,混匀。(2)将兔抗 CCP 抗体-NHs 琼脂糖凝胶与标本混合,室温翻转混匀孵育 2 h。(3)用 0.05 μmol/L PBST 冲洗除去未结合蛋白。(4)用 0.1 μmol/L 甘氨酸-盐酸(pH2.9)洗脱蛋白,接取洗脱下来的蛋白液置于预先加入 100 μL pH8.5 Tris-HCl 的试管中。

**1.6 提取蛋白的预处理** (1)用 0.01 μmol/L PBS 将提取的蛋白透析除盐,之后利用 PEG20000 初步浓缩,再利用超滤管(10×10<sup>3</sup> 道尔顿)浓缩,4 500×g 离心 1 h。(2)将浓缩后的蛋白按 1 : 3~1 : 4 比例加入沉淀液中,-20 ℃ 沉淀过夜。(3)将沉淀后的蛋白 8 000×g 离心 10 min,弃上清,并用无尘纸仔细吸干管壁残留液体。(4)加入蛋白酶裂解液,使蛋白复溶,15 000×g 离心 20 min,吸取上清,每管分装 40 μL,Bradford 法测蛋白浓度,-80 ℃ 保存备用。

**1.7 蛋白质 2 维凝胶电泳(2-DE)** (1)第一向等电聚焦:利用 Amersham Biosciences 公司 IPGphor IEF system 进行第一向等电聚焦,选取 24 cm 长, pH4~7 的线性胶条,将蛋白质提取液与水化液充分混匀,总体积为 450 μL,上样量均为每胶条 200 μg。水化及聚焦程序为:①低电压水化,30 V 6 h,60 V 6 h;②升压,500 V 1 h,1 000 V 1 h;③等电聚焦,8 000 V 约 10 h。待胶条等电聚焦达到 80 000 V/h 时,等电聚焦结束。(2)平衡:取出胶条进行两步平衡,第一步用 1% DTT,第二步将 DTT 换成 2.5% 碘乙酰胺,时间均为 15 min。(3)第二向凝胶电泳:将胶条转移到 12.5% 的 SDS-PAGE 胶上行第二向电泳,先以每胶条 5 W 恒定功率电泳 45 min,然后以 15 W 的恒功率电泳直至溴酚蓝指示带到达凝胶底部 1 cm 处,结束电泳,时间为 5~5.5 h。(4)显色。采用银染方法进行显色。

**1.8 图像采集及图谱分析** 染色后的凝胶用 ImageScannerTM 扫描仪进行透射扫描,将扫描后的凝胶放 10% 乙醇于 4 ℃ 保存待用。数字化图像文件运用 Amersham Pharmacia 公司 ImageMaster 2D Elite 软件分析。图像分析过程包括蛋白质点的检测、量化、背景扣除和点的匹配。蛋白质点自动检测后进行编辑,蛋白质点匹配前先从中选取 1 块凝胶图像作为参考胶,并建立一些匹配点,然后自动匹配其他蛋白质点,与参考胶不相匹配的点被加入到参考胶中,在 2 组图谱中蛋白质的表达量相差 3 倍的点视为有差异的点。

**1.9 MALDI-TOF MS 分析** 选取具有差异的点从胶上切下蛋白质凝胶点置 96 孔培养板内,经乙腈脱水,加入适量胰蛋白酶,37 ℃ 酶解 12 h,加入肽提取液,室温振荡 30 min,收集提取液,干燥浓缩备用。将大约 1 μL 冻干的多肽样品和 1 μL 基质(α-基-β-羟基肉桂酸+含 30% 乙腈的 0.1% 三氟乙酸)充分混合后,点样于上样靶,室温下干燥。在延迟解吸和反射模式下进行谱图采集,激光波长 337 nm,加速电压设置 19 kV。每个肽谱图大约是由 200 次轰击垒加而成。将蛋白点的肽质量指纹图谱、相对分子质量和等电点数据输入计算机,使用 Mascot 搜索引擎进行数据库检索,检索条件为:数据库选择国际蛋白索引库(IPI)、物种选择人、酶为胰蛋白酶、允许不完全的酶解片段选择为 1 个。用 Mascot 搜索引擎(<http://www.matrixscience.com>)在 SwissProt 数据库进行查询,并综合评估其相对分子质量和等电点的匹配程度,确定蛋白名称。

## 2 结 果

**2.1 2-DE 图谱** 通过 2-DE 技术对标本进行分离,染色后使用 ImageMaster TM 2D Platinum software(Versioin5.0) 软件对试验组和对照组 2-DE 图谱进行分析。每份样品重复电泳 3 遍,同一样品的 3 张图谱中蛋白点显示了良好的重复性与稳定性。

性。上样量均为每胶条 200  $\mu\text{g}$ , 均在相同条件下制备 2-DE 胶条。将 RA 患者抗 CCP 抗体阳性血清和正常血清亲和层析提取蛋白 2-DE 图谱比对发现, RA 提取蛋白 2-DE 图谱中共 312 蛋白点, 正常血清提取蛋白有 274 个蛋白点, 其中有 166 个具有差异表达的蛋白点。在差异蛋白点中, 有 101 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调, 65 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达下调。52 个蛋白点 CCP 阳性患者血清提取蛋白中表达而在 CCP 阴性患者血清提取蛋白缺失, 16 种蛋白在 CCP 阴性患者血清提取蛋白中表达而在 CCP 阳性患者血清提取蛋白缺失(图略)。

**2.2 质谱结果及生物信息学分析** 挑选其中差异明显并且灰度值较高的 51 个点进行鉴定分析, 并与 IPI 和 Swiss-Prot 数据库进行比对, 共鉴定出多种可能与 RA 发病相关的蛋白。在选取的 51 个蛋白点中, 有 30 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调, 其中包括: 转铁蛋白、补体 C3c, 载脂蛋白等; 21 个蛋白点在 RA 血清提取蛋白中表达下调, 其中包括: 白三烯 A4 水解酶(LTA4H), 成纤维细胞生长因子 22(FGF-22), 硫化糖蛋白-2(SGP-2)等。

### 3 讨 论

RA 是一种慢性、炎症性、多关节受累的系统性自身免疫性疾病, 可导致软骨和骨不可逆的破坏, 从而导致永久的残疾。尽管 RA 的发病机制不完全清楚, 但是自身免疫反应在 RA 滑膜炎病理过程中发挥重要作用。近年来的研究已经证实, 针对瓜氨酸蛋白的自身抗体(APF、AKA、聚丝蛋白、CCP 和抗 Sa)是 RA 特有的自身抗体。RA 患者血清中存在多种自身抗原自己自身抗体, 其形成的免疫复合物(ICs)易沉积于 RA 关节囊滑膜, 引起滑膜增厚、充血及淋巴细胞和巨噬细胞浸润<sup>[1]</sup>。而在 RA 发病机制中, 蛋白质氨基酸化是关键步骤, 蛋白质氨基酸化与 RA 的自身 T 细胞活化、抗体形成和炎症反应密切相关<sup>[2]</sup>。尽管 RA 患者体内抗体已经发现多种, 但是其所针对的体内天然靶抗原仍不是很清楚。随着对 RA 研究的深入, 越来越多的人开始研究关于 RA 中相关抗原在 RA 发病中的作用。

蛋白质组学是研究细胞内全部蛋白质的组成和动态变化的一门学科, 整体水平研究蛋白组成、表达丰度、蛋白质间以及蛋白质与其他分子间的相互作用, 为寻找疾病生物标志物带来了希望<sup>[4]</sup>。MALDI-TOF MS 可实现二维分离后蛋白质的快速、灵敏和高通量鉴定, 而肽片断质量指纹图谱可对酶解蛋白质进行 MS 测定, 获得一系列肽片段质量, 结合其等电点、相对分子质量、物种来源、修饰情况等查询蛋白质数据库实现蛋白质的鉴定<sup>[5]</sup>。虽然它也存在着一些缺陷, 如不适合研究极酸、极碱的蛋白或疏水性蛋白, 但是凭借着其强大的分离能力和高分辨率的特点, 仍然是研究蛋白质组学最成熟的方法<sup>[6]</sup>。目前, 蛋白质组学技术已广泛用于 RA 相关性抗原研究中。

本试验利用 2-DE 和 MALDI-TOF MS 技术来分析 RA 患者与健康者血清间具有差异表达的蛋白。通过利用兔抗 CCP 抗体柱提取血清中可以与其结合的蛋白, 并且有效地减少血清中清蛋白、免疫球蛋白等高丰度蛋白的干扰, 通过利用 2-DE 分离所提取的蛋白, 得到较好的 2-DE 图谱。在 RA 患者血清提取蛋白 2-DE 图谱中共 791 蛋白点, 而正常血清蛋白的 2-DE 图谱则只有 707 个蛋白点, 其中有 166 个蛋白点的表达具有明显差异。在差异蛋白点中, 有 101 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达上调, 65 个蛋白点在正常血清提取蛋白中表达下调。52 个蛋白点在 RA 患者血清提取蛋白中表达而在正常血清提取蛋白缺失, 16 种蛋白在 RA 患者血清提取蛋白中表

达而在正常血清提取蛋白缺失。此外, 质谱鉴定出的部分蛋白名称也没有确定。

在这鉴定的 51 个蛋白质中, 其功能涉及多方面, 包括: 构成细胞成分、参与细胞物质代谢、炎性反应、细胞内信号转导、分子伴侣等。例如 LTA4H 多位于细胞质中, 1、2 亚型可在单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、成纤维细胞中表达, 属于 M1 肽酶家族, 能够被苯丁抑制素抑制, 也可因白三烯 A4(LTA4)在 Tyr-379 形成共价化合物而受到抑制。LTA4H 具有环氧化物水解酶、氨肽酶及金属水解酶活性, 能够催化促炎性因子介质白三烯 B4(LTB4)的生物合成及蛋白分解, 在炎性反应中扮演着重要角色<sup>[7]</sup>。SGP-2 在肿瘤发生和进展过程中起重要的抗细胞坏死和抗凋亡作用。肿瘤细胞中不同亚型的 SGP-2 表达水平与肿瘤细胞的侵袭能力相关, 肿瘤的发生、发展与 s-SGP-2 过表达和 nSGP-2 缺失有关。SGP-2 在多种肿瘤组织中都有异常表达, 可作为多种恶性肿瘤和癌前病变的早期检测标志物及肿瘤预后评价的参考指标<sup>[8-9]</sup>。FGF-22 参与成纤维细胞生长因子受体信号通路, 在应激反应、糖类平衡、脂肪分解与合成中都扮演重要角色, 在体外也具有刺激细胞增殖作用<sup>[10]</sup>。已有文献报道以上发现的某些蛋白, 如 LAT4H, 激肽原(KNG1)、T 细胞受体  $\beta$  链、载脂蛋白等与 RA 具有相关性<sup>[6,11-14]</sup>, 表明多种蛋白质可能参与 RA 的发病过程。

在对选取的蛋白质点鉴定结果中发现, 有相当一部分蛋白质是免疫球蛋白片段及其补体成分, 并且免疫球蛋白在二维凝胶中含有蛋白质所占比重也不可忽视, 这可能与 RA 患者血清中存在着较高浓度的抗原-抗体免疫复合物有关。因为当利用抗 CCP 抗体免疫亲和层析柱纯化血清中的瓜氨酸化抗原时, 由于该抗原有可能与血清中的抗瓜氨酸化抗原的抗体结合, 部分免疫球蛋白抗体可能与瓜氨酸化抗原一起被纯化下来, 因此导致质谱鉴定出一些免疫球蛋白和补体片段。本实验室拟挑选其中的几个差异蛋白进行功能研究, 以进一步验证差异表达蛋白及其功能, 为阐明 RA 相关抗原在 RA 发病过程中具体机制奠定基础。

### 参考文献

- [1] Zhao XY, Okeke NL, Sharpe O, et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R94.
- [2] Szodoray P, Szabó Z, Kapitány A. Anti-citrullinated peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2010, 9(3): 140-143.
- [3] Goëb V, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, et al. Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(2): R38.
- [4] 赵晓琴, 李晓军, 赵建宁, 等. 双向电泳和质谱技术在类风湿关节炎滑膜细胞差异蛋白分析中的应用及意义[J]. 中华检验杂志, 2010, 33(9): 625-630.
- [5] Rappaport J, Moniatte M, Nielsen ML, et al. Experience and perspectives of MALDI MS and MS/MS in proteomic research[J]. Int Mass Spectrometry, 2003, 226(1): 223-237.
- [6] Sun ZL, Zhu Y, Wang FQ, et al. Serum proteomic-based analysis of pancreatic carcinoma for the identification of potential cancer biomarkers[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1774(6): 764-771.
- [7] Cardoso CC, Pereira AC, Marques CD, et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and

- disease outcome[J]. Future Microbiol, 2011, 6(5): 533-549.
- [8] Park IS, Che YZ, Bendayan M, et al. Up-regulation of clusterin (sulfated glycoprotein-2) in pancreatic islet cells upon streptozotocin injection to rats[J]. J Endocrinol, 1999, 162(7): 268-272.
- [9] 张建举,于跃利,杜颖. Clusterin 在肿瘤中的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(4): 445-448.
- [10] Nakatake Y, Hoshikawa M, Asaki T, et al. Identification of a novel fibroblast growth factor(FGF-22) preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2007, 1517(3): 460-463.
- [11] Feelders RA, Vreugdenhil G, Dejong G, et al. Transferrin micro-heterogeneity in rheumatoid arthritis relation with activity and anemia of chronic disease[J]. Rheumatoid International, 1992, 12(5): 195-199.
- [12] Trocme C, Marotte H, Baillet A, et al. Apolipoprotein A and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(8): 1328-1333.
- [13] Cassim B, Shaw OM, Mazur M, et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol, 2009, 48(5): 490-496.
- [14] Grom AA, Thompson SD, Luyrink L, et al. Dominant T-cell-receptor-Beta chain variable region V-Beta-14(+) clones in juvenile rheumatoid arthritis[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1993, 90(23): 11104-11108.

(收稿日期:2012-08-09)

## • 临床微生物学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

中朝边境鸭绿江江水细菌分布及耐药性监测<sup>\*</sup>邱广斌<sup>1△</sup>,徐宏亮<sup>2</sup>,翟如波<sup>1</sup>,胡伟华<sup>3</sup>,杨军<sup>4</sup>,杨慎江<sup>5</sup>,谢文全<sup>6</sup>,孔祥利<sup>7</sup>

(1. 解放军第 202 医院检验科,辽宁沈阳 110003;2. 解放军第 230 医院检验科,辽宁丹东 118000;  
解放军第 206 医院;3. 检验科;4. 医务处,吉林通化 134000;5. 解放军 65835 部队  
卫生队,吉林集安 134200;6. 解放军 65827 部队卫生队,吉林临江 134600;  
7. 解放军 65755 部队卫生队,辽宁宽甸 118200)

**摘要:**目的 了解军营附近鸭绿江水域的细菌种类、分布情况及细菌对抗菌药物的敏感性。防止部队因环境污染造成战士非战斗减员。**方法** 采用采样器采集鸭绿江江水 15 个不同水域,每个位置采集 3 份,45 份水样经增菌培养和细菌分离,采用全自动微生物分析仪进行细菌学鉴定及抗菌药物敏感性试验。**结果** 共分离出细菌 45 种 218 株,其中肠杆菌科细菌 88 株(44.89%)、非发酵菌 52 株(26.53%)、弧菌科细菌 50 株(25.51%)、革兰阳性球菌 22 株(10.09%)。药敏试验结果显示,88 株肠杆菌科细菌对亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、阿米卡星的敏感率为 100%,对三代头孢菌素、喹诺酮类、氨基糖苷类敏感率为 85.95%,非发酵菌敏感率均为 95%~100%,弧菌科细菌敏感率为 95%~100%(替卡西林/棒酸、哌拉西林/复方新诺明除外)。**结论** 驻军附近鸭绿江江水细菌种类繁多分布广泛,对抗菌药物耐药率低,开展江水细菌调查及耐药性监测,对江水细菌感染的防治及耐药菌的传播具有重要意义。

**关键词:**军营驻地; 抗药性, 细菌; 辽宁**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.022**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)20-2485-04Surveillance of the distribution and drug-resistance of the bacteria in the water  
of Yalujiang River of Sino-korean border<sup>\*</sup>Qiu Guangbin<sup>1△</sup>, Xu Hongliang<sup>2</sup>, Zhai Rubo<sup>1</sup>, Hu Weihua<sup>3</sup>,  
Yang Jun<sup>4</sup>, Yang Shenjiang<sup>5</sup>, Xie Wenguan<sup>6</sup>, Kong Xiangli<sup>7</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, No. 202 Hospital of PLA, Shenyang, Liaoning 110003, China;  
2. Department of Clinical Laboratory, No. 230 Hospital of PLA, Dandong, Liaoning 118000, China;  
3. Department of Clinical Laboratory; 4. Medical Department, No. 206 Hospital of PLA, Tonghua, Jilin 134000, China;  
5. PLA 65835 Military Medical Team, Ji'an, Jilin 134200, China; 6. PLA 65827 Military Medical Team,  
Linjiang, Jilin 134600, China; 7. PLA 65755 Military Medical Team, Kuandian, Liaoning 118200, China)

**Abstract: Objective** To reduce non-battle casualties of soldiers due to environmental pollution, it might be necessary to understand the bacterial species, its distribution and bacterial sensitivity to antibiotics near the Yalujiang River barracks. **Methods** Collect samples of water from 15 different water areas of the Yalujiang River, each location with three copies. The bacterial species in the 45 water samples were cultured and isolated for bacteriological identification and antibiotic sensitivity tests by automatic microbial analyzer. **Results** 218 strains of 45 kinds of species of bacteria were isolated, including 88 strains of Enterobacteriaceae(44.89%), 52 strains of non-fermenting bacteria(26.53%), 50 strains of the Vibrionaceae bacteria(25.51%), and 22 strains of Gram-positive cocci(10.09%). Susceptibility testing results show that sensitivity rate of the 88 strains of Enterobacteriaceae to imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, cefoperazone/sulbactam, cefepime, amikacin was 100%, while sensitivity rate of which to third

<sup>\*</sup> 基金项目:全军医学科学技术研究“十二五”课题(CWS11J210)。 <sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:qiuwangbin@163.com。