

- tis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(3): 291-302.
- [4] Balkwill F. Cancer and the chemokine network[J]. *Nature Rev Cancer*, 2004, 4(7): 540-550.
- [5] Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL[J]. *Nature*, 2003, 425(6955): 307-311.
- [6] Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21631-21638.
- [7] Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 431-436.
- [8] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells; role of STAT3 in the tumour microenvironment[J]. *Nature Rev Immunol*, 2007, 7(1): 41-51.
- [9] Biswas SK, Gangi L, Paul S, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages; defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation[J]. *Blood*, 2006, 107(5): 2112-2122.
- [10] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy[J]. *Nature Med*, 2007, 13(9): 1050-1059.
- [11] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity[J]. *Nature Med*, 2005, 11(12): 1314-1321.
- [12] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(1): 103-113.
- [13] Maeda S, Kamata H, Luo JL, et al. IKKb couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis[J]. *Cell*, 2005, 121(8): 977-990.
- [14] Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth[J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 461-465.
- [15] Wang L, Yi T, Kortylewski M, et al. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(7): 1457-1464.
- [16] Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(1): 114-123.
- [17] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis; the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 453-458.
- [18] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer; the good, the bad and the ugly[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899.
- [19] Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, et al. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily; from simple paradigms to complex mechanisms[J]. *Int Rev Cytol*, 2006, 252(2): 129-161.
- [20] Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10355-10362.
- [21] Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state[J]. *Nature*, 2005, 450(7171): 903-907.

(收稿日期: 2012-10-28)

• 综 述 •

Hic-5/ARA55 蛋白的研究进展

李 波¹综述, 雷小峰²审校

(1. 泸州医学院附属医院肝胆外科, 四川泸州 646000; 2. 日本国昭和大学生化学教研室, 日本东京 142-8555)

关键词: Hic-5/ARA55 蛋白; 黏着斑; 核输出信号

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 01. 030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)01-0065-04

Hic-5/ARA55 基因最早是作为转化生长因子 β 1 诱导基因(TGF- β 1)和过氧化氢诱导的克隆从小鼠成骨细胞 MC3T3 中分离出来, 属于 LIM 结构域蛋白家族, 与桩蛋白具有高度同源性。Hic-5/ARA55 蛋白主要位于细胞黏着斑, 可以穿梭于细胞质和细胞核的蛋白质, 在黏着斑作为调节分子与多种蛋白质相互作用, 在细胞核作为一个辅助调节因子, 选择性与核受体和靶基因启动子相互作用。Hic-5/ARA55 在多种组织中表达, 是细胞骨架蛋白的关键调节蛋白之一和整合素信号通路中关键分子。

1 Hic-5/ARA55 的结构和功能

Hic-5/ARA55 基因编码一个长约 55×10^3 的多肽, 有 4 个 LIM 模体和 4 个 LIM 结构域, 结构类似桩蛋白, 与桩蛋白具有 55% 的氨基酸相同序列, 相似性为 72%。Hic-5/ARA55 根据细胞类型和细胞接收信号不同表达于黏着斑或细胞核内, 主

要局限于黏着斑^[1]。在黏着斑, Hic-5/ARA55 通过富亮氨酸的 LD 模体和/或双锌指 LIM 结构域与众多蛋白质反应^[2]。在细胞核 Hic-5/ARA55 C 末端的 4 个 LIM 结构域以锌指方式特异性结合于 DNA, 富有高比例的 G+A 和长的 A/T 片段。LIM 结构域为蛋白质-蛋白质和蛋白质-核酸反应相互作用的接口^[3]。Hic-5/ARA55 和桩蛋白都能与黏着斑激酶 (FAK)、黏着斑激酶相关非激酶 (FRNK) 和组蛋白联系, 对整合素装配进行调节, 调节黏着斑的动力, 二者在功能上可能是重迭。但是, Hic-5/ARA55 与桩蛋白在生理反应上功能可能是相反, 各自调节不同功能, Hic-5/ARA55 与细胞生长停滞和衰老有关, 过度表达的 Hic-5/ARA55 诱导细胞衰老, 在 Ras 转化细胞以及从人肿瘤分离出的细胞缺乏 Hic-5/ARA55 表达。而桩蛋白与细胞生长有关, 在 v-src、BCR-Abl 或 v-crk 转化细胞已经证实存在桩蛋白表达; 其表达与 Ras-MAP 激酶途径有

关。位于黏着斑的 Hic-5/ARA55 不能与 Crk 蛋白结合,但可以负性调节蛋白 Src、PTKs、Csk 结合, Hic-5/ARA55 与 FAK 和纽蛋白联系,可以取代桩蛋白,阻止桩蛋白与 Crk 蛋白结合,改变 Ras-MAP 激酶活性从而影响细胞生长和分化。此外, Hic-5/ARA55 和桩蛋白对细胞迁徙的影响也不同, Crk 与黏着斑蛋白 CAS 联系可以促进细胞迁徙,桩蛋白与 Crk 作用促进细胞移动; Hic-5/ARA55 表达细胞迁移受到抑制,增殖不受影响^[2]。桩蛋白和 Hic-5/ARA55 在蛋白质结构上相似,相互调节,共同表达。功能上 Hic-5/ARA55 和桩蛋白可以认为是调节细胞生长和分化的重迭(串路)或相反调节通路^[4-5]。

黏着斑是链接整合素介导的信号到肌动蛋白细胞骨架的大分子蛋白质复合物,为细胞骨架的装配提供锚定点,募集调节蛋白和激酶,如桩蛋白、Hic-5/ARA55、整合素联系激酶(ILK)、FAK、Src 和 Rho 家族 GTP 酶,通过细胞粘附分子结构和触发多种信号转导途径的影响细胞运动和活力^[6-7]。在黏着斑 Hic-5/ARA55 和桩蛋白作为调节分子与多种蛋白质相互作用,形成整合素与其他多种结构和信号分子反应的黏着斑支架,如 AK、Pyk2/Cakb、纽蛋白、GIT1、Csk 和 PTP-PEST。在细胞核, Hic-5/ARA55 含有 2 个核输出信号序列,是促进或抑制基因的表达的辅助调节因子,选择性与核受体和目标启动子相互作用,形成核受体反应组件^[8-10]。表达在细胞核内 Hic-5/ARA55 作为类固醇激素依赖性启动核受体如雄激素受体(AR)、糖皮质激素受体和孕激素受体的辅因子或作为转录因子如淋巴增强因子(LEF)/T 细胞因子(TCF)的辅阻碍因子^[11-12]。Hic-5/ARA55 是细胞 TGF- β 信号型特异性辅因子,其 LIM 结构域与 TGF- β 的调节蛋白 Smad3 的 MH2 结构域结合,阻止 Smad 3 蛋白介导的转录反应,而且可以与 TGF- β 负性调节蛋白 Smad7 结合促进 Smad7 降解,从而逆转 Smad7 抑制 TGF- β 信号。因此, Hic-5/ARA55 可以对全面抑制 Smad3 和 Smad7 表达,增强 Smad2 活性。Hic-5/ARA55 对 TGF- β 反应的效应取决于 Smad3 和 Smad2 信号之间的平衡^[9]。Hic-5/ARA55 也是糖皮质激素受体的辅因子, Hic-5/ARA55 与转录中介因子 2(TIF2)、核受体辅启动因子 3、cAMP 反应组件结合蛋白结合蛋白和 p300 形成复合物,为糖皮质激素受体介导的基因启动提供反应支架^[12]。总之,在黏着斑 Hic-5/ARA55 作为调节分子与多种蛋白质相互作用;在细胞核 Hic-5/ARA55 作为一个辅调节因子,选择性与核受体和靶基因启动子相互作用^[10],参与细胞增殖、迁移分化、衰老、创伤愈合、血管损伤、肿瘤发生、类固醇激素活性、细胞凋亡、信号整合和分化的调节。

2 Hic-5/ARA55 参与机体生理功能和疾病中的作用机制

2.1 Hic-5/ARA55 对生长发育的影响

妊娠晚期的子宫特征是肌层生长、IV 型胶原和纤维明显增加,细胞骨架和黏着斑的重塑。组织重构需要黏着斑重塑,生长的肌层细胞才能正确锚定细胞外基质。小鼠妊娠中晚期子宫肌层 Hic-5/ARA55 表达明显上调,参与了在黏着斑重塑作用^[13]。研究证实 Hic-5/ARA55 基因敲出的小鼠发育过程中没有组织学异常,能够繁殖后代;但是缺乏桩蛋白表达的胚胎为致死性胚胎,表明桩蛋白在胚胎发育中起着关键作用。Src 和 Crk 可以与桩蛋白结合,而不能与 Hic-5/ARA55 结合,缺乏 Crk 的小鼠类似桩蛋白缺乏一样是致死胚胎^[14]。表明 Hic-5/ARA55 不是胚胎发育中必不可少的基因,即使存在 Hic-5/ARA55 表达缺陷,桩蛋白在小鼠发育和生存中起着补偿作用。桩蛋白缺陷对小鼠胚胎发育的影响,是 Hic-5/ARA55 介导的信号通路无法补偿的。此外,在大鼠肾脏发育过程, Hic-5/ARA55 高表达于胚胎肾脏

间质细胞、未成熟肾小球内皮细胞和系膜细胞, Hic-5/ARA55 可能与骨髓间充质细胞的发展有关^[7]。

2.2 Hic-5/ARA55 对血管平滑肌细胞的调节

小鼠和人的内脏组织和血管平滑肌细胞(SMCs)中 Hic-5/ARA55 高表达,参与血管平滑肌细胞收缩功能的调节。机械应力下黏着斑 Hic-5/ARA55 直接移位于肌动蛋白纤维,从而调节细胞的收缩^[8]。血清应答因子(SRF)是诱导平滑肌特异性基因表达的一个弱辅因子,需要其他辅因子,如 myocardin 辅助才能激活平滑肌基因转录。Hic-5/ARA55 启动子包含一个高度保守的 CArG 盒顺式调控元件,在 SMCs 中 SRF 与 CArG 结合, Hic-5/ARA55 表达上调是维持平滑肌收缩的关键^[15]。此外, Hic-5/ARA55 在血管损伤后修复过程中调节血管重塑的关键因素。成年小鼠受到经导管机械血管损伤后急性期 SMCs 细胞核内 Hic-5/ARA55 下调,修复期 Hic-5/ARA55 表达恢复, Hic-5/ARA55 高表达可以减少内膜增生, Hic-5/ARA55 基因敲出的小鼠股动脉损伤后内膜增生明显。Hic-5/ARA55 参与血管损伤修复机制不同于桩蛋白, Hic-5/ARA55 抑制尿激酶型纤溶酶原(uPA)激活,桩蛋白促进 uPA 的激活,活性 uPA 生成的纤维蛋白溶酶将基质金属蛋白酶前体活化成基质金属蛋白酶(MMP)^[8]。Hic-5/ARA55 表达下降微血管内皮细胞形成新生血管管状结构减少,形成的结构网络不密集,分支缺乏联系, Hic-5/ARA55 表达下降拮抗纽蛋白去乙酰化酶抑制剂的促血管生成作用^[14]。

2.3 Hic-5/ARA55 参与雄激素性脱发的发病机制

雄性激素源性脱发(AGA)的主要原因是细胞质中有 5 α -还原酶将睾酮变为荷尔蒙作用增强 5 倍的双氢睾酮(DHT), DHT 进入细胞核,影响细胞能量代谢,母毛细胞失去活力角质化,继而脱发。在 AGA 雄激素脱发区域真皮毛乳头细胞 II 型 5 α 还原酶、雄激素受体(AR)和 Hic-5/ARA55 表达较高, Hic-5/ARA55 可以增加毛乳头对雄激素的敏感性。在真皮毛乳头细胞中雄激素受体(AR)受到 TGF- β 1 调控, Smad3 和 Hic-5/ARA55 都是雄激素敏感调节因子, TGF- β 1 以自分泌方式通过 Smad3 介导增强 AR 对雄激素敏感性,同时, AGA 的真皮毛乳头的 TGF- β 1 以旁分泌方式抑制毛囊上皮细胞生长, Hic-5/ARA55 作为 AR 的辅因子增加了脱发区域毛乳头对雄激素的敏感性^[16-17]。

2.4 Hic-5/ARA55 与肾小球硬化的关系

健康的大鼠肾小球 Hic-5/ARA55 的表达非常低,在进行性肾小球硬化动物模型中 Hic-5/ARA55 表达高度上调,伴有系膜异常的 I 型胶原沉积和肾小球系膜细胞凋亡。将大鼠肾小球系膜细胞培养在 I 型胶原表面,发现 Hic-5/ARA55 表达上调,并增加了细胞对凋亡的易感性。用 siRNA 封闭 Hic-5/ARA55 表达,肾小球系膜细胞耐受凋亡的能力增加。Hic-5/ARA55 表达的程度与肾小球系膜 I 型胶原的表达增加和肾小球细胞的凋亡程度一致,表明 Hic-5/ARA55 是肾小球疤痕中异常的肾小球细胞外基质形成的关键环节^[18]。

2.5 Hic-5/ARA55 与纤维化

已有证据表明激活的 TGF- β 1 持续的自分泌是导致纤维化疾病的病因。在 TGF- β 1 刺激下静态成纤维细胞激活进入细胞外基质(ECM)分化为分化成肌纤维母细胞,产出大量 α 平滑肌细胞肌动蛋白(α -SMA)和胶原蛋白,形成纤维化。增生性视网膜病变(PVR)肌纤维母细胞分泌大量的 α -SMA,同时细胞核 Hic-5/ARA55 表达明显上调呈持续性表达^[19]。在严重创伤或烧伤所致的增生性疤痕中肌纤维母细胞持续存在,持续过度表达的 α -SMA 沉积在过量的细

胞外基质中,伴有高度收缩,并稳定地显示大黏着斑,形成明显的富有胶原纤维的结节。Hic-5/ARA55 是肌纤维母细胞辅激活因子,TGF- β 1 诱导 Hic-5/ARA55 表达上调。在增生性瘢痕中 Hic-5/ARA55 维持着肌纤维母细胞持续存在,Hic-5/ARA55 基因表达沉默的结果导致 TGF- β 1 分泌下降,超成熟黏着斑和细胞外基质合成明显减少,胶原收缩减少, α -SMA 的表达下调,平滑肌细胞 α 肌动蛋白、胶原蛋白 I 和纤连蛋白减少。表明,Hic-5/ARA55 是 TGF- β 1 分泌诱导的致病肌纤维母细胞不可缺少的成分^[20]。

2.6 Hic-5/ARA55 参与肿瘤发生机制 锚定依赖性生长受到 Hic-5/ARA55 的调节,锚定非依赖性生长的机制认为是 G1 期阶段的周期蛋白依赖性激酶(CDKs)的异常活化,Cyclin D1 能刺激 CDK4 介导的 Rb 产物磷酸化,Cyclin D1 表达过度表达促使细胞通过细胞周期和规避失巢凋亡。核输出信号 CRM 1 抑制 Cyclin D1 的核输出,Hic-5/ARA55 与 CRM1 的高亲和力,利于 Hic-5/ARA55 的核输出。在悬浮细胞,细胞活性氧(ROS)水平升高抑制了 Hic-5/ARA55 的核输出,Cyclin D1 的核输出增加。Hic-5/ARA55 和 Cyclin D1 竞争性与 CRM1 结合,抑制抑制 Cyclin D1 的核输出,防止锚定非依赖性细胞生长^[21]。恶性肿瘤细胞能够以集束或单个细胞方式入侵通过组织细胞外基质(ECM)的微环境,从而促进淋巴和血行渗透。Rho GTP 酶家族公认是细胞迁移、粘附和细胞骨架重构的重要调节因子。在三维细胞外基质(3D ECMs)研究侵袭性乳腺癌细胞迁移的分子调节机制,发现通过 RNAi 使桩蛋白表达沉默,细胞显示出高度拉长的间充质形态,而 Hic-5/ARA55 基因表达沉默后乳腺癌细胞呈现变形状态、可塑性、迁移持久性和速度降低,二者表达平衡在乳腺癌侵袭和迁移中具有协同作用^[5]。Hic-5/ARA55 是 TGF- β 诱导启动前列腺基质表达的雄激素受体(AR)的辅启动子。在去势后的小鼠和人类前列腺组织上皮中 Hic-5/ARA55 表达。Hic-5/ARA55 对雄激素刺激下介导临近上皮细胞转化和生长具有促进作用。在去势后小鼠前列腺和 90% 人前列腺癌基质表达出 Wnt/ β -连环蛋白信号,Wnt/ β -连环蛋白信号作为旁分泌活化信号有助于去势后上皮细胞存活,Wnt 信号促进 C-myc 基因表达上调。前列腺和前列腺癌去势后上皮细胞 Hic-5/ARA55 表达通过抑制 Wnt/ β -连环蛋白信号,进而抑制雄激素依赖的 C-myc 基因启动子,消除内在雄激素的反应^[22]。Hic-5/ARA55 介导正常前列腺上皮细胞在缺乏雄激素时发生凋亡,前列腺间质中 Hic-5/ARA55 表达降低或丧失有利于肿瘤发展,在乳腺癌和前列腺癌细胞 Hic-5/ARA55 能促进 TGF- β 诱导上皮细胞向间质转型^[6]。

3 小 结

Hic-5/ARA55 作为一种多结构域蛋白质,可以与多种结构蛋白和信号蛋白结合结合,不仅参与细胞外基质中黏着斑的构建,在信号通路中发挥着承上启下的作用;而且作为核受体的辅助启动因子,对靶基因启动起着调节作用。随着越来越多特异性结合蛋白的鉴定和确定,以及这些蛋白质相互作用的特点和介导的相应信号转导通路的深入研究,对 Hic-5/ARA55 生物学功能和在疾病中的发生机制会更清晰。

参考文献

[1] Lee YH,Kayali US,Sousa AM,et al. Transforming growth factor-beta1 effects on endothelial monolayer permeability involve focal adhesion kinase/Src[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2007,37

(4):485-493.
 [2] Yund EE,Hill JA,Keller RS. Hic-5 is required for fetal gene expression and cytoskeletal organization of neonatal cardiac myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol,2009,47(4):520-527.
 [3] Thomas SM,Hagel M,Turner CE. Characterization of a focal adhesion protein, Hic-5, that shares extensive homology with paxillin[J]. J Cell Sci,1999,112(Pt 2):181-190.
 [4] Deakin NO,Turner CE. Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology,invasion,and metastasis[J]. Mol Biol Cell,2011,22(3):327-341.
 [5] Shola DT,Wang H,Wahdan-Alaswad R,et al. Hic-5 controls BMP4 responses in prostate cancer cells through interacting with Smads 1,5 and 8[J]. Oncogene,2012,31(19):2480-2490.
 [6] Matsuura S,Kondo S,Suga K,et al. Expression of focal adhesion proteins in the developing rat kidney[J]. J Histochem Cytochem,2011,59(9):864-874.
 [7] Kim-Kaneyama JR,Wachi N,Sata M,et al. Hic-5,an adaptor protein expressed in vascular smooth muscle cells,modulates the arterial response to injury in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun,2008,376(4):682-687.
 [8] Wang H,Song K,Krebs TL,et al. Smad7 is inactivated through a direct physical interaction with the LIM protein Hic-5/ARA55[J]. Oncogene,2008,27(54):6791-805.
 [9] Aghajanova L,Velarde MC,Giudice LC. The progesterone receptor coactivator Hic-5 is involved in the pathophysiology of endometriosis[J]. Endocrinology,2009,150(8):3863-3870.
 [10] Heitzer MD,DeFranco DB. Mechanism of action of Hic-5/androgen receptor activator 55,a LIM domain-containing nuclear receptor coactivator[J]. Mol Endocrinol,2006,20(1):56-64.
 [11] Caltagarene J,Hamilton RL,Murdoch G,et al. Paxillin and hydrogen peroxide-inducible clone 5 expression and distribution in control and Alzheimer disease hippocampi[J]. J Neuropathol Exp Neurol,2010,69(4):356-371.
 [12] Croke JM,Pike LR,MacPhee DJ. The focal adhesion protein Hic-5 is highly expressed in the rat myometrium during late pregnancy and labour and co-localizes with FAK[J]. Reprod Biol Endocrinol,2007,5(1):22.
 [13] Kim-Kaneyama JR,Takeda N,Sasai A,et al. Hic-5 deficiency enhances mechanosensitive apoptosis and modulates vascular remodeling[J]. J Mol Cell Cardiol,2011,50(1):77-86.
 [14] Komorowsky C,Samarin J,Rehm M,et al. Hic-5 as a regulator of endothelial cell morphology and connective tissue growth factor gene expression[J]. J Mol Med(Berl),2010,88(6):623-631.
 [15] Srinivasan R,Forman S,Quinlan RA,et al. Regulation of contractility by Hsp27 and Hic-5 in rat mesenteric small arteries[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2008,294(2):H961-H969.
 [16] Inui S,Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia:From androgen to paracrine mediators through dermal papilla[J]. J Dermatol Sci,2011,61(1):1-6.
 [17] Inui S,Itami S. Androgen receptor transactivity is potentiated by TGF- β 1 through Smad3 but checked by its coactivator Hic-5/ARA55 in balding dermal papilla cells[J]. J Dermatol Sci,2011,64(2):149-151.
 [18] Hornigold N,Craven RA,Keen JN,et al. Upregulation of Hic-5 in glomerulosclerosis and its regulation of mesangial cell apoptosis[J]. Kidney Int,2010,77(4):329-338.
 [19] Abu El-Asrar AM,Missotten L,Geboes K. Expression of myofibroblast activation molecules in proliferative vitreoretinopathy

- epiretinal membranes[J]. Acta Ophthalmol, 2011, 89(2): 115-121.
- [20] Dabiri G, Tumbarello DA, Turner CE, et al. Hic-5 promotes the hypertrophic scar myofibroblast phenotype by regulating the TGF-beta1 autocrine loop[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(10): 2518-2525.
- [21] Mori K, Hirao E, Toya Y, et al. Competitive nuclear export of cy-
- clin D1 and Hic-5 regulates anchorage dependence of cell growth and survival[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(1): 218-232.
- [22] Li X, Martinez-Ferrer M, Botta V, et al. Epithelial Hic-5/ARA55 expression contributes to prostate tumorigenesis and castrate responsiveness[J]. Oncogene, 2011, 30(2): 167-177.

(收稿日期: 2012-11-18)

产碳青霉烯酶菌株实验室检测研究进展

谷秀梅¹, 杨敏²综述, 刘文恩^{1△}审校

(1. 中南大学湘雅医院检验科, 湖南长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院医学检验系, 湖南长沙 410003)

关键词: 碳青霉烯酶; 表型检测; 分子诊断技术; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.031**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)01-0068-03

碳青霉烯类抗菌药物是抗菌谱最广、抗菌活性最强的非典型 β -内酰胺类药物, 因其具有对 β -内酰胺酶稳定以及毒性低等特点, 已成为治疗严重细菌感染最主要的抗菌药物之一。随着此类药物的大量使用, 耐药菌株不断出现且检出率逐年提高, 给临床治疗和院内感染控制带来新的挑战。既往临床上常见的耐药菌株以铜绿假单胞菌和不动杆菌属细菌为代表, 但随着此类抗菌药物使用频率增加, 对其耐药的肠杆菌科细菌在世界各地均有报道。对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性可以由产生过量 AmpC 酶同时伴外膜孔道蛋白大量缺失和(或)外排泵过量表达, 或产生碳青霉烯酶引起。而产碳青霉烯酶是碳青霉烯类药物耐药的主要原因, 包括 KPC 酶、金属酶以及部分 OXA 酶, 编码此类酶的基因大多位于可移动基因元件上, 通过质粒或转座子在不同菌种间传播, 从而导致耐药基因的迅速播散^[1]。碳青霉烯类药物是临床治疗重症感染的最后选择, 如果患者对其耐药, 几乎无药可医。因此, 对碳青霉烯酶的快速检测已迫在眉睫。然而, 单独的药敏试验并不能筛查所有的产碳青霉烯酶菌株, 因此预防和控制产酶菌株的播散就必须依赖实验室的诊断。

1 碳青霉烯酶

碳青霉烯酶是能够明显水解亚胺培南或美罗培南等碳青霉烯类抗菌药物的 β -内酰胺酶, 目前发现的碳青霉烯酶属于 Ambler 分子分类中的 A、B、D 类。

1.1 A 类碳青霉烯酶 A 类碳青霉烯酶活性部位具有丝氨酸结构, 对亚胺培南的水解活性强于美罗培南, 可引起青霉素类、氨基糖苷类、碳青霉烯类耐药, 不水解第 3 代头孢菌素, 他唑巴坦、克拉维酸可以抑制此类酶, 而 EDTA 不能抑制。A 类酶主要包括 KPC、NMC-A、IMI-1、SME、GES。其中由质粒介导的 KPC 酶易于在不同菌种间传播, 已成为肠杆菌科细菌耐碳青霉烯类抗菌药物的主要原因之一。自 KPC 酶首次发现后, 产 KPC 酶的肠杆菌科细菌不断被分离, 在美国、法国、希腊、英国、巴西、以色列及中国均有产 KPC 酶菌株感染的病例报道^[2-3], 故推测 KPC 酶可能在全球范围内均有播散。目前国内外研究已发现 12 种 KPC 亚型, 中国主要见于浙江省。

1.2 B 类碳青霉烯酶 B 类酶为金属酶, 主要包括 IMP、VIM、SPM、GIM 及 NDM-1 等, 大多由整合子介导^[4]。其催化活性依赖 Zn^{2+} , 因此可被 EDTA 等金属螯合剂抑制, 但不被克

拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦等 β -内酰胺酶抑制剂抑制, 能灭活青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物, 对氨基糖苷类无水解活性。B 类酶中 IMP、VIM 的检出率较高, 已在铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、弗劳地柠檬酸杆菌等细菌中分离到。此外, 自 2008 年首次报道从肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中分离出 NDM-1 以来, 到 2010 年已有 13 个欧盟国家报道共出现 77 例 NDM-1 阳性的菌株, 大部分为肺炎克雷伯菌, 而这 77 例中有 55 例的患者均有在印度或巴基斯坦的旅游史或治疗史^[5]。2011 年 8 月广州地区报道在臭鼻克雷伯菌和鲍曼不动杆菌中发现 4 株 NDM-1 阳性株, 为该地区首次报道^[6]。

1.3 D 类碳青霉烯酶 D 类酶主要是指 OXA 酶, 目前发现较多的是来自鲍曼不动杆菌的 OXA-23 以及肺炎克雷伯菌的 OXA-48, 其对亚胺培南有较高的水解活性, 编码基因位于质粒上。在欧洲、美国、伊朗、日本及中国均有许多关于 OXA 酶的报道。

2 碳青霉烯酶检测

2.1 表型检测

2.1.1 检测碳青霉烯类的 MIC 值 药物敏感试验可以初步确定药物对细菌的体外抗菌活性, 因此, 准确检测碳青霉烯类抗菌药物的耐药性是筛选产酶菌株的关键。但不同的药敏检测方法对耐药性的检出率也不同。国外有文献报道自动化药敏检测系统并不能有效检测出产 KPC 酶菌株对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性^[7]。不同的菌种对碳青霉烯类抗菌药物的敏感性水平亦不尽相同。例如, 产碳青霉烯酶肠杆菌科菌株对亚胺培南的 MIC 值可以低至 $0.125 \mu\text{g/mL}$ ^[8], 产 OXA 或 KPC 酶鲍曼不动杆菌菌株一般对碳青霉烯类耐药, 而产金属酶菌株可能对其敏感^[4]; 产碳青霉烯酶铜绿假单胞菌通常对亚胺培南的 $\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/mL}$ ^[9]。因此, 不能仅仅凭借单一的碳青霉烯类抗菌药物的药敏结果去筛查所有可疑菌株。联合评价多种碳青霉烯类药物的抗菌活性可以提高产酶菌株的筛查效果^[10], 且对于不同的菌种或者不同的酶应当选择合理的实验组合灵活鉴定。

2.1.2 改良 Hodge 试验 2010 年版 CLSI 建议对 MIC 增高或纸片法抑菌圈缩小的对碳青霉烯类抗菌药物敏感的肠杆菌科细菌采用改良 Hodge 试验 (MHT) 进行碳青霉烯酶表型确