responses by targeting antigen to DC[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(4): 931-938.

[13] Flacher V, Sparber F, Tripp CH, et al. Targeting epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(7): 1137-1147.

[14] Ma LN, Liu J, Shen JJ, et al. Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(7): 554-561.

[15] Binder RJ, Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of $CD8^+$ T cells[J]. Nature Immunology, 2005, 6(6): 593-599.

[16] Suzue K, Young RA. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24[J]. J Immunol, 1996, 156(2): 873-879.

[17] Bolhassani A and Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine developments[J]. Expert Rev Vaccines, 2008, 7(8): 1185-1199.

[18] Cheong C, Choi JH, Vitle L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody[J]. Blood, 2010, 116(19): 3828-3838.

[19] Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(6): 2384-2389.

(收稿日期:2013-02-22)

·综　　述·

心血管疾病中纤维蛋白原介导的微血管功能障碍机制研究

李　琦,周　名,田鹏鹏 综述,杜　昆△审校

(长江大学附属一医院检验科,湖北荆州 434000)

关键词:纤维蛋白原;　ET-1;　整联蛋白;　血液黏度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.033　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1673-4130(2013)19-2568-03

血液黏度对不利的心血管病事件如高血压,卒中和糖尿病有强烈的预示作用。血液黏度的增高是几个因素变化的结果,包括血球压积,红细胞的聚集以及血浆黏度的增加。血浆纤维蛋白原(fibrinogen,Fg)浓度的增加使血液黏度升高,从而引起血流剪切力的增加,血流剪切力的变化会启动内皮细胞和血小板的改变,导致各种黏附分子和整联蛋白的表达和/或活化。其中一些分子如胞内黏附分子(ICAM-1)和 α5β1 整联蛋白都是纤维蛋白原的受体。Rampling 等[1]对红细胞聚集提出了非特异性机制的两种主要理论模型。一种是基于大分子的桥联模型,因为很好的描述了红细胞缗钱现象形成而被广泛接受;另一种非特异性黏附理论是细胞聚集与分子团块和表面吸附无关,主要是由较大相对分子质量的蛋白促成的。纤维蛋白原可以特异性的结合于红细胞膜[2]。大相对分子质量的血浆蛋白如触珠蛋白、C 反应蛋白、血浆铜蓝蛋白和纤维蛋白原显示了强的促红细胞聚集效应[3]。纤维蛋白原较其他血浆蛋白对红细胞聚集有更强的效应。

1　纤维蛋白原和血管反应性

最近有研究,显示纤维蛋白原含量的增加可致猪小冠状动脉(直径 0.8～1.4 mm)和人胸腔内动脉段的扩张,在此项研究中 2 μm 浓度的纤维蛋白原只引起约 20%的血管扩张,而 60%的血管扩张是在纤维蛋白原浓度达到 12 μm 时出现[4]。纤维蛋白原介导的血管扩张作用可以被阿昔单抗(抑制血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 的血小板聚集抑制剂)抵消,以及由于内皮的剥脱或一氧化氮合成抑制物的存在而被减弱。由于阿昔单抗与血小板 GPⅡb/Ⅲa 一样对 αvβ3 整合蛋白有亲和力,作者提出纤维蛋白原结合血管 αvβ3 整合蛋白是导致血管反应性媒介物合成的机制。Lominadze 等[5]第一次阐述了纤维蛋白原结合内皮黏附分子-1(ICAM-1)介导动脉的收缩,提示 ICAM-1 可能参与纤维蛋白原结合到血管内皮的过程中,是纤维蛋白原介导血管收缩的可能机制。实验发现纤维蛋白原介导的血管收缩效应可以被内皮缩血管肽 A 型(ET-A)受体抑制剂转换。更进一步的研究发现纤维蛋白原的增高会通过增强来自内皮细胞的 Weibel-Palade 小体的胞吐作用来增加内皮缩血管肽的生成[6]。有研究还提示 ICAM-1 启动胞外信号调节激酶-1/2(ERK-1/2),促进了内皮缩血管肽 1 型(ET-1)的生成。纤维蛋白原在其 Aa 链上有两个 RGD 序列,Aa 链上的 572 到 574 残基是 αvβ3 和 α5β1 整联蛋白的结合点,两者竞争结合纤维蛋白原。而内皮缩血管肽 1 型(ET-1)可能参与了 RGD/α5β1 整联蛋白相互作用介导血管收缩机制的过程中。血管平滑肌细胞(VSMC)间 Ca^{2+} 和 K^+ 通道活化的减少参与了 RGD/αvβ3 整联蛋白交互反应介导血管扩张机制中,α5β1 缺失的情况下,αvβ3 整联蛋白呈启动的状态,与纤维蛋白原有高亲和力,α5β1 整联蛋白的重新表达可以抑制 αvβ3 整联蛋白介导的黏附功能。这些研究提示在病理过程中,α5β1 表达可能出现变异从而导致 αvβ3 整联蛋白其配体亲和力的调整[7]。另外,Martinez-Lemas 等[8]研究表明在骨骼肌微小动脉中产生肌源性血管收缩需要 αvβ3 和 α5β1 整联蛋白的参与。

2　参与内皮细胞收缩性的 ICAM-1 和 α5β1 整联蛋白信号通路

血管内皮细胞管腔内表面受体的活化可以启动很多的信号级联,其中一些会导致血管反应性的改变。纤维蛋白原结合内皮 ICAM-1 可以致 ERK-1/2 路径的活化(磷酸化作用)[6]。

整联蛋白信号传导既包括 ERK 也包括 JNK 路径[9],像 α5β1 一类的整联蛋白的活化可以引导多种激酶的活化(如黏着斑激酶 FAK,Src,Fyn,Shc 等),与细胞骨架肌动蛋白相关的 FAK/Src 激酶的活化能引导 JNK 的活化,Fyn/Shc 激酶与

作者简介:李琦,女,副主任技师,主要从事凝血机制研究。　△　通讯作者,E-mail:dukun818110@qq.com。

ERK 活化相关，另外，ICAM-1 的启动介导多种细胞成分的活化进而启动 Rho 家族成员，包括 RhoA、Cas、Crk、Cdc42 和 Rac，最终启动 JNK。RhoA，Cdc42 和 Rac 在调节肌动蛋白细胞骨架结构上有各自的功能，RhoA 促进细胞收缩和肌动纤维形成，Cdc42 调节丝状伪足的形成，而 Rac 调节胞膜边缘的波动。P38 促细胞分裂活化的蛋白激酶（MAPK）的启动调节纤维丝状肌动蛋白生成[10]。整联蛋白的活化与 Rho 家族成员有着直接的关联，纤维蛋白原结合 ICAM-1，可能还有 α5β1 整联蛋白参与启动 ERK1/2 信号通路导致纤维丝状肌动蛋白形成以及细胞的收缩[11]。

3　ET-1 及其受体，纤维蛋白原介导 ET-1 释放和 NO 的作用

血管内皮释放物质通过介导血管扩张（前列腺素，一氧化氮和内皮衍生超化因子）和血管收缩（血栓烷 A2 和内皮缩血管肽-1）来影响血管的特性，这些物质还影响血小板黏附和聚集[12]。NO 是 ET-1 的拮抗剂，减少 NO 的利用率可能使得 ET-1 对高血压的血管特性起到显著的作用。内皮血管肽-1 亚型（ET-1），被目前认为是最强的血管收缩剂。ET-1 合成的最后两步中，由蛋白酶将大的 ET-1 裂解成前多肽原，然后再由内皮血管肽转化酶裂解成为 ET-1，ET-1 的合成和分离是在胞浆粗面内质网高尔基体进行的，主要储存在 WPb，由一些刺激剂如凝血酶，肾上腺素，组胺会启动内皮细胞引起 WPb 的胞吐作用从而释放 ET-1 进入血液循环。最近研究提示纤维蛋白原浓度的升高促进培养的内皮细胞中 ET-1 的生成[6]。ET-A 受体（与 ET-1 有更强的亲和力）位于血管骨架细胞，而 ET-B（非选择性受体）主要存在于内皮细胞和血管骨架细胞中[12]。ET-A 和 ET-B 受体通过两种途径来调节血管和血管床的性质：（1）调节钠和钙离子信道的功能；（2）通过 ET-B 介导的释放 NO 和 PGI2。在正常的生理条件下，ET-1 和 NO 是由内皮层释放并保持血管收缩和扩张状态的一个平衡，但在一些病理情况下如高血压，NO 的可利用率减少，纤维蛋白原的增加导致 ET-1 的增多，就会产生收缩的趋势。因为内皮血管肽诱导 NO 的生成，NO 很有可能抗衡和阻止高浓度纤维蛋白原存在下血管收缩进一步的增强。

4　ET-1 产物的信号通路以及纤丝肌动蛋白的作用

目前关于 ET-1 产物完整的信号通路机制仍然不清楚。ET-1 的转录依赖信号外信号调节激酶（ERK）的活性，培养的内皮细胞中 ET-1 基因的表达也参与到 ERK 路径[13]。ERK-1/2 的活化与纤维蛋白原介导的 ET-1 调解产物相关[6]。JNK 介导路径在前 ET-1 基因转录过程的作用也有报导[14]。但是，MAPKs 在高血压进程 ET-1 产物中的作用并未明了。有研究显示 ICAM-1 的活化引起 p38MAP 激酶的启动，并且通过小热休克蛋白 27（Hsp27）导致纤维丝状肌动蛋白的形成[15]。纤维丝状肌动蛋白的形成需要 WPbs 的胞吐作用[16]，纤维蛋白原的增高促进纤维丝状肌动蛋白的形成和 ET-1 的产生[11]，基于上述的研究有理由推断纤维蛋白原结合 ICAM-1（可能是 α5β1 整联蛋白）引起内皮细胞膜邻近的 WPbs 的聚集。纤维蛋白原的结合还可能通过 ERK（也可能是 JNK 和/或 p38）信号通路引起 WPB 的胞吐作用，从而导致大的 ET-1 和内皮缩血管肽转换酶（ECE）从这些颗粒中释放。ET-1 结合到血管骨架平滑肌细胞上的 ET-A 受体引起血管的收缩[6]。

5　纤维蛋白原与内皮层完整性；对紧密连接蛋白（TJPs）作用

包含有紧密交联、缝隙交联和黏附交联的一整套复杂的交联蛋白使得内皮细胞之间互相连接。闭锁蛋白和交联黏附分子是主要的紧密交联蛋白 TJPs[17]，TJPs 在内皮细胞上形成第一层保护屏障，使内皮细胞与血液隔离开来。心、脑或肺中的炎症反应会启动血管的高通透性，从而促进水肿形成，疾病进程的加重以及病情不易恢复[18]。另外一项研究显示 Fg-C 末端结合内皮 αvβ3 整联蛋白通过依赖 RhoA 机制引起肠系膜微血管的漏出[19]。未降解的纤维蛋白原能促进纤维丝状肌动蛋白的形成，从而导致内皮层清蛋白的漏出。另外，纤维蛋白原浓度的增加也引起它自身通过内皮细胞层漏出的增加，表明纤维蛋白原漏出血管壁是由不同的激活剂或者疾病介导的可能性[11]。纤维蛋白原结合 ICAM-1 和 α5β1 整联蛋白在纤维蛋白原介导的内皮细胞层通透性增加中起到作用，这项研究提示 RGD 肽会增加内皮的液体导电性。这些资料解释了 Ancrod 在治疗心肌梗死再灌注中无效是因为其减少了血中纤维蛋白原的浓度，而同时增加了纤维蛋白原降解产物的含量，后者可能导致血管损伤的加重[20]。最近有研究资料显示未降解的纤维蛋白原的升高会损害单层内皮细胞，ERK-1/2 的激活随后结合纤维蛋白原到内皮 ICAM-1 上被认为是破坏内皮层完整性以及增加对清蛋白的通透性的可能机制。另外，纤维蛋白原浓度的升高引起肌动蛋白相关蛋白，闭合蛋白等表达的减少[21]。纤维蛋白原结合内皮 ICAM-1 牵涉到 TJPs 的改变和基质金属蛋白酶（MMPs）的激活。而纤维蛋白原与血管内皮层结合的增加以及其向内皮下层基质的渗漏可能为其通过凝血酶转化成纤维蛋白提供了合适的条件。这一现象在高血压发展过程中出现增加[22]。如果过多纤维蛋白的形成会引起其在血管壁的沉积引起粥样硬化斑块[23]，也可以引起脑血管的损伤和神经炎症。

参考文献

[1] Rampling M, Meiselman H, Neu B, et al. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation[J]. Biorheology, 2004, 41(2): 91-112.

[2] Lominadze D, Dean W. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation[J]. Clin Exp Hypertens, 2002, 517(1/3): 41-44.

[3] Lip G, Beevers D. Abnormalities of rheology and coagulation in hypertension[J]. J Hum Hypertens, 2007, 8(9): 693-702.

[4] Bas M, Kirchhartz N, Hochfeld J, et al. Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(4): 969-975.

[5] Lominadze D, Tsakadze N, Sen U, et al. Fibrinogen- and fragment D-induced vascular constriction[J]. Am J Physiol, 2005, 288(3): H1257-H1264.

[6] Sen U, Tyagi N, Patibandla PK, et al. Fibrinogen-induced endothelin-1 production from endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol. 2009, 296(4): C840-C847.

[7] Ly D, Zazzali K, Corbett S. De novo expression of the integrin alpha5beta1 regulates alphavbeta3-mediated adhesion and migration on fibrinogen[J]. J Biol Chem, 2003, 278(24): 21878-21885.

[8] Martinez-Lemus LA, Crow T, Davis MJ, et al. {alpha}v{beta}3- and {alpha}5{beta}1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(1): H322-H329.

[9] Shyy J-J, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress[J]. Circ Res, 2002, 91(9): 769-775.

[10] Buchsbaum R, Connolly B, Feig L. Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(12):

4073-4085.
[11] Tyagi N, Roberts A, Dean W, et al. Fibrinogen induces endothelial cell permeability[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 307(1/2): 13-22.
[12] Willoughby S, Loscanzo J. Vascular control of platelet function. In: Gresele P, Page CP, Fuster V, Vermylen J, editors. Platelets; In Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders; Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics [M]. Cambridge University Press, New York, 2002: 432-455.
[13] Juan S, Chen J, Chen C, et al. 17{beta}-Estradiol inhibits cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression within vascular endothelial cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(3): H1254-H1261.
[14] Yamakaw K, Kitamura K, Nonoguchi H, et al. G alpha13 induces preproET-1 gene expression via JNK[J]. Hypertens Res, 2002, 25(3): 427-432.
[15] Wang Q, Yerukhimovich M, Gaarde W, et al. MKK3 and -6-dependent activation of p38 MAP kinase is required for cytoskeletal changes in pulmonary microvascular endothelial cells induced by ICAM-1 ligation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(2): L359-L369.
[16] Manneville J, Etienne-Manneville S, Skehel P, et al. Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116(19): 3927-3938.
[17] Mehta D, Malik A. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability[J]. Physiol Rev, 2006, 86(1): 279-367.
[18] Weis S. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer [J]. Curr Opin Hematol, 2008, 15(3): 243-249.
[19] Guo M, Daines D, Tang J, et al. Fibrinogen-{gamma} C-terminal fragments induce endothelial barrier dysfunction and microvascular leak via integrin-mediated and RhoA-dependent mechanism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(3): 394-400.
[20] Zacharowski K, Zacharowski P, Reingruber S, et al. Fibrin(ogen) and its fragments in the pathophysiology and treatment of myocardial infarction[J]. J Mol Med, 2006, 84(6): 1434-1440.
[21] Patibandla PK, Tyagi N, Dean WL, et al. Fibrinogen induces alterations of endothelial cell tight junction proteins[J]. J Cell Physiol, 2009, 221(1): 195-203.
[22] Iida M, Yamamoto M, Yamazaki M, et al. Association of aortic valve sclerosis with thrombin generation in hypertensive patients [J]. J Hum Hypertens, 2008, 22(11): 781-787.
[23] Paul J, Strickland S, Melchor JP. Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease[J]. J Exp Med, 2007, 204(8): 1999-2008.

(收稿日期: 2013-03-10)

·综　　述·

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测技术进展

王培育[1] 综述, 周　梅[2] 审校
(1. 广西宁明县卫生监督所, 广西宁明 532500; 2. 广西宁明县疾病预防控制中心, 广西宁明 532500)

关键词: 大肠杆菌 O157:H7;　食源性疾病;　分离培养法;　聚合酶链反应
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.034　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1673-4130(2013)19-2570-03

肠出血性大肠杆菌 O157:H7(E. coli O157:H7)是肠出血性大肠杆菌(EHEC)的一个血清型, 主要引起人的食源性疾病, 以突发性腹痛、腹泻、血便为主要症状, 严重时并发肾衰竭, 病死率高。E. coli O157:H7 广泛分布于自然界, 其引起的疾病与食用未烘烤的饼干面团[1]、生菜有关[2], 在猪、牛粪便及猪肉、牛肉中分离率极高, 对公众健康构成严重威胁[3]。因此, 早期发现及时治疗和预防是控制该病的关键。E. coli O157:H7 实验室诊断以细菌培养、分离及生化和血清鉴定为主。近年来出现的新型免疫学方法和聚合酶链反应(PCR)具有较高的敏感性和特异性。本文将 E. coli O157:H7 检测技术进展综述如下。

1　分离培养法

培养法是实验室检测 E. coli O157:H7 的常规方法。标本经改良 EC 肉汤增菌后转种选择性培养基, 于 37 ℃温箱培养 18～24 h, 观察菌落形态, 挑选可疑作初步生化试验, 再作进一步的血清学鉴定。目前常用的选择性培养基有改良山梨醇麦康凯琼脂培养基(CT-SMAC)和改良 CHROMO157 显色琼脂, CHROM 的敏感性和特异性高于 CT-SMAC[4], 但价格较高, 故临床上常选用 CT-SMAC。然而一些革兰阴性菌如气单胞菌属、变形杆菌、摩根菌、爱德华菌、蜂窝哈夫尼亚菌属等不发酵山梨醇, 选用 CT-SMAC 也常出现假阳性。针对这种情况, Park 等[5]将山梨醇麦康凯琼脂(SMAC)改良成龙胆山梨醇麦康凯琼脂(GMAC), 蜂窝哈夫尼亚菌在 GMAC 上显粉红色, 而 E. coli O157:H7 不显色, 可以把他们区分开来。常规培养法不需要贵重设备, 一般实验室都可以开展, 但操作复杂、耗时、特异性和敏感性不高。

2　免疫学方法

免疫学方法是以检测 E. coli O157:H7 的多糖磷脂复合物或鞭毛抗原为主。目前常用的方法有 ELISA、金标法和免疫磁珠技术等。

2.1　ELISA　ELISA 是根据抗原或抗体特异性免疫反应原理设计, 将已知的抗原或抗体结合在某种固相载体上, 以辣根过氧化酶(HRP)为指示剂, 标记在另一种抗原或抗体上, 加入酶作用底物, 酶与底物发生反应后, 底物显色, 根据底物显色的深浅定性或定量地检测样本中的抗体或抗原。宋宏新等[6]以鸡抗 O157:H7 特异性脂多糖(LPS)抗体(IgY)为捕获抗体, 酶标抗体(HRP-IgY)为检测抗体建立双抗夹心 ELISA 检测食品中大肠杆菌 O157:H7 的方法, 确定了抗原浓度对数与 OD_{450} 值的高度线性相关性, 根据检测 OD450 值可从拟合回归曲线确定样品中的含菌量, 含菌量大于或等于 10^4 CFU/mL 的食品样品可直接用双抗夹心法进行检测, 含菌量小于或等于 10^4 CFU/mL 的食品样品可增菌 14 h 后检测。该方法灵敏度为

作者简介: 王培育, 男, 主管技师, 从事卫生检验及卫生监督执法工作研究。