

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: Gresle P, Page CP, Fuster V, Vermynen 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 $\alpha$ 13 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, Skchel 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<sup>1</sup>综述, 周梅<sup>2</sup>审校

(1. 广西南宁明县卫生监督所, 广西南宁明 532500; 2. 广西南宁明县疾病预防控制中心, 广西南宁明 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<sup>[1]</sup>、生菜有关<sup>[2]</sup>, 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<sup>[3]</sup>。因此, 早期发现及时治疗 and 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<sup>[4]</sup>, 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<sup>[5]</sup>将山梨醇麦康凯琼脂(SMAC)改良成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, 以辣根过氧化物酶(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<sup>[6]</sup>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<sub>450</sub> 值的高度线性相关性, 根据检测 OD<sub>450</sub> 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<sup>4</sup> 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<sup>4</sup> CFU/mL 的食品样品可增菌 14 h 后检测。该方法灵敏度为

0.1~0.2 CFU/mL,但体系多步反应使检测的误差增大,需进一步优化。

**2.2 免疫胶体金技术** 免疫胶体金法是以胶体金作为标记物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。该方法主要用于研制快速诊断试剂。王玉金等<sup>[7]</sup>将 *E. coli* O157:H7 的特异抗体先固定于硝酸纤维素膜的一端,以胶体金标记其多抗,建立 *E. coli* O157:H7 双抗体夹心胶体金免疫层析试纸,检测大肠杆菌 *E. coli* O157:H7,可在 10 min 内完成,最低检测浓度为 105 CFU/mL,并且与其他肠道菌无交叉反应。免疫胶体金技术快速简便、特异、敏感、稳定性强,不需要特殊设备和试剂判断直观等优点。

**2.3 免疫亲和层析法** 免疫亲和层析是用于分离和纯化抗原、抗体的一种特异性吸附层析技术。Brunt 等<sup>[8]</sup>用 *E. coli* O157:H7 抗体偶联到聚乙烯固相载体亲和层柱,以辣根过氧化物酶标记羊抗 *E. coli* O157:H7 抗体,建立类似于 ELISA 检测原理的免疫亲和层析法,用于检测食品中 *E. coli* O157:H7,其检出限量为 500 个细胞,仅需时间 15~30 min,不用任何专业设备完成,具有简便、快速等优点。

**2.4 纳米免疫磁珠技术** 纳米免疫磁珠技术是以抗体包被纳米磁珠的为载体,通过抗体与反应介质中特异性抗原结合,形成抗原-抗体复合物,此复合物在外加磁场的作用下发生定向移动,从而达到分离目的。侯楠楠等<sup>[9]</sup>用大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体包被纳米级免疫磁颗粒,用于样品中菌体的富集和分离;再制备一种表面分别标记有大肠杆菌 O157:H7 多克隆抗体和生物素化核酸探针的胶体金颗粒;利用生物素亲和素酶系统信号放大作用,建立一种功能化纳米粒子检测大肠杆菌 O157:H7 的技术。该方法可在 1 h 内完成菌体的分离和检测,检测限为 10 CFU/mL。Shen 等<sup>[10]</sup>采用纳米免疫磁珠及胶体金技术,结合石英晶体微天平免疫传感技术,建立一种新型的基于纳米免疫磁珠胶体金催化增长的石英晶体微天平免疫传感器检测 *E. coli* O157:H7 的检测技术,该方法在磷酸盐缓冲液和牛奶中检出限分别为 23 CFU/mL 和 3 CFU/mL。纳米技术是一种新兴的热门技术,该技术需要一些特殊的设备如透射电子显微镜才进行,目前仅于一些科研单位研究。

### 3 PCR

PCR 是一种模拟天然 DNA 复制的体外扩增技术。是以待扩增的两条 DNA 链为模板,由一对人工合成的寡核苷酸引物介导,以三磷酸脱氧核糖核苷为底物,通过 DNA 多聚酶酶促反应,于体外快速扩增特异性 DNA 序列。目前,对 *E. coli* O157:H7 的全基因组测序已经基本完成,但其致病机制尚未完全阐明,已公认的与其致病性有关的主要基因有志贺样毒素基因(stx)、大毒力质粒 pO157 和 LEE 毒力岛等<sup>[11-12]</sup>。可以根据 *E. coli* O157:H7 特异性基因序列设计引物,进行 PCR 检测。目前,常用的靶基因主要有 stx1、stx2、eaeA、rfbE、hly、uidA、fliC 等。*E. coli* O157:H7 PCR 方法常用的有常规 PCR、多重 PCR、免疫 PCR 和实时荧光定量 PCR 等。

常规 PCR 只需要设计一对相应的引物,扩增后需做凝胶电泳鉴定,故操作比较繁琐,同时扩增产物极易受到污染造成假阳性。多重 PCR 是在同一个反应管中用多对引物同时扩增几条 DNA 片段。吴家林等<sup>[13]</sup>选用针对 *E. coli* O157:H7 志贺样毒素 1、2 (slt1/slt2) 基因、溶血素 (hlyA) 基因和 O157 特异性基因 (rfbE) 的 4 对引物,在同一扩增体系中进行 PCR,优化反应体系,对猪肉模拟样品检测,结果该方法扩增目的基因片段分别为 348、584、250bp 和 497 bp,特异性和灵敏度均高,

细菌纯培养物检测灵敏度为  $10^3$  CFU/mL 猪肉模拟样品 37 °C 预增菌 4 h 后检测灵敏度能达到 10 CFU/mL。免疫 PCR (Immuno-PCR) 以 ELISA 为基础,通过 PCR 扩增 DNA 指示分子对抗原做出定性或定量分析。王海河等<sup>[14]</sup>用链亲和素桥联生物素化的二抗和双链 DNA 指示分子构建桥联系统,建立 ELISA-PCR 技术,通过 PCR 扩增指示分子检测 O157:H7。经测试,结果检测限可达到 10 CFU/mL 的纯培养菌,灵敏度较 ELISA 提高 103 倍,非 O157:H7 菌株检测结果均为阴性。实时荧光定量 PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用对荧光信号积累的实时检测来监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。徐德顺等<sup>[15]</sup>以 rfbE 基因作为靶序列,设计一对引物和 Taqman 探针序列,建立实时荧光 PCR 快速检测方法,并进行了引物、探针浓度和  $Mg^{2+}$  的浓度优化,确定了反应体系和反应参数。结果显示,当引物和探针的浓度为 0.6  $\mu$ mol/L、0.8  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  浓度为 4 mmol/L 时,具有良好的特异性和敏感性。实时荧光定量 PCR 不仅实现了对 DNA/RNA 模板的定量,而且采用完全封闭检测,不需要琼脂电泳确证,自动化程度高,降低了 PCR 产物污染造成的假阳性,因而在一定程度上具有较高的灵敏度和特异性,目前已广泛应用于分子生物学研究和医学研究等领域。

### 4 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型 DNA 扩增技术。它依赖于一套针对靶基因的 4~6 条引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶,在 60~65 °C 左右,保温 30~60 min,即可完成对靶基因的特异性扩增。易海华等<sup>[16]</sup>选取 rfbE 基因和 fliC 基因特征性保守序列,建立 LAMP 核酸扩增基因技术,对 21 株 O157:H7 和非 O157:H7 菌株进行特异性检测,并与 PCR 方法进行比较,结果 LAMP 法可以在 1 h, LAMP 法检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度、特异度、准确性分别为 96.72%、85.71%、93.26%。与常规 PCR 相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。LAMP 在灵敏度、特异性和检测范围等指标上能媲美甚至优于 PCR 技术,不依赖任何专门的仪器设备实现现场高通量快速检测,检测成本远低于实时荧光定量 PCR。

### 5 展望

上述方法是临床上检测 *E. coli* O157:H7 的常用方法。经过多年的优化提高,细菌培养发展得比较成熟,因其所需设备要求不高,已成为基层最常用的方法,但操作复杂、费时,不能做到早期诊断。免疫学方法因其灵敏性和特异性尚不理想,目前还不为临床广泛接受。PCR 虽然快速、敏感性和特异性高,但检测费用高也限制其在基层实验室广泛使用,同时 PCR 所需的特异性基因,目前除 rfbE 基因特异性较高外,大部分与其他微生物具有一定的同源性,特异性还不理想。因此,以 rfbE 基因为靶点的 PCR 在临床上应用后,显示高度的特异性和敏感性,随着对靶基因研究的不断深入,和更特异性靶基因的发现以及实时荧光定量 PCR 的不断完善,PCR 技术在 *E. coli* O157:H7 诊断上将具有良好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Neil KP, Biggerstaff G, MacDonald JK, et al. A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans; multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consump-

- tion of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough—United States, 2009[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(4): 511-518.
- [2] Slayton RB, Turabelidze G, Bennett SD, et al. Outbreak of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) O157: H7 Associated with Romaine Lettuce Consumption, 2011[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55300.
- [3] Ateba CN, Mbewe M. Detection of Escherichia coli O157: H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications[J]. Res Microbiol, 2011, 162(3): 240-248.
- [4] Ngwa GA, Schop R, Weir S, et al. Detection and enumeration of E. coli O157: H7 in water samples by culture and molecular methods[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(2): 164-172.
- [5] Park SH, Ryu S, Kang DH. Improved selective and differential medium for isolation of Escherichia coli O157: H7[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 405-408.
- [6] 宋宏新, 马冬, 薛海燕, 等. 双抗夹心 ELISA 法定量检测食品中大肠杆菌 O157: H7 初探[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 528-530.
- [7] 王玉金, 杨书豪, 刘丽, 等. 大肠杆菌 O157: H7 胶体金免疫层析快速检测法的建立[J]. 河南科学, 2012, 3(7): 874-877.
- [8] Brunt J, Webb MD, Peck MW. Rapid affinity immunochromatography column-based tests for sensitive detection of Clostridium botulinum neurotoxins and Escherichia coli O157[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13): 4143-4150.
- [9] 侯楠楠, 谌志强, 金敏, 等. 基于功能化纳米粒子的大肠杆菌 O157: H7 检测技术研究[J]. 环境与健康杂志, 2010, 7(5): 410-412.
- [10] Shen ZQ, Wang JF, Qiu ZG, et al. QCM immunosensor detection of Escherichia coli O157: H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(7): 3376-3381.
- [11] Hermos CR, Janineh M, Han LL, et al. Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Children: Diagnosis and Clinical Manifestations of O157: H7 and Non-O157: H7 Infection[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 955-959.
- [12] Wang P, Xiong Y, Lan R, et al. pO157\_Sal, a novel conjugative plasmid detected in outbreak isolates of Escherichia coli O157: H7[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1594-1597.
- [13] 吴家林, 肖勇, 凌霞, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157 H7 多重 PCR 快速检测研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(1): 117-119.
- [14] 王海河, 梁鹤桐, 林雪松, 等. 肠出血型大肠埃希菌免疫 PCR 检测方法的建立[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(6): 865-866.
- [15] 徐德顺, 沈月华, 程平庆. 大肠杆菌 O: H 实时荧光 PCR 快速检测方法的建立[J]. 上海预防医学杂志, 2009, 21(4): 174-177.
- [16] 易海华, 赵金伟, 徐波, 等. 使用环介导等温扩增技术快速检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的初步研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 206-213.

(收稿日期: 2013-02-05)

• 综 述 •

## 细胞微粒整体特征的研究进展

李倩综述, 辛晓敏<sup>△</sup>, 金英玉 审校

(哈尔滨医科大学第一附属医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150000)

关键词: 细胞微粒; 形成过程; 炎症; 凝血反应; 血管形成

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)19-2572-04

细胞微粒(microparticles, MPs), 也称微囊泡, 是各类细胞遭受一系列应激(激活或凋亡)时, 从细胞浆膜上脱落而释放的一些膜性小囊泡。1967年, Wolf<sup>[1]</sup>首先发现并描述了血小板微粒, 称之为“血小板尘埃”。后来的研究证实, 红细胞、白细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肿瘤细胞等均可释放细胞微粒, 并以其细胞表面标记来分类这些微粒。目前为止微粒没有一个确切的定义, 只是普遍认为它是一种球形结构的、直径在 0.1~1 μm 的异源群体, 它是携带有其亲代细胞的特异性抗原的磷脂囊泡, 通过出芽方式释放。健康人外周血中也存在一定微粒, 其中血小板来源的微粒占总体的 70%~90%。

除具有原始的生物特征外, 最新研究表明微粒在循环细胞和血管细胞间的相互交流中起重要作用<sup>[2]</sup>; 他们能够促进细胞-细胞间相互作用、传递细胞信号、传输不同细胞类型的受体。可见微粒在疾病的发生发展中起重要作用。为了更好地了解微粒的生理特征和作用机制, 本文主要陈述微粒的形成、组成和其在疾病中的病理生理功能, 以便为临床提供更好的诊断和治疗措施。

### 1 微粒的形成

细胞凋亡与细胞活化产生的微粒在大小、磷脂和蛋白的含

量、生理作用上是不同的。当然, 微粒的形成是一个十分复杂的过程其具体机制并不明确。在正常情况下, 细胞膜脂质双层成分的不对称性主要是由三种酶共同作用来维持的: flippases, floppases, scramblases。才能保证磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM)保持在脂质双层的外侧, 磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰乙醇胺(PE)在内侧<sup>[3]</sup>。细胞一旦被激活, 流入细胞质的 Ca<sup>2+</sup>抑制 flippases, 活化 floppases, and scramblases<sup>[4]</sup>, 这种正常的磷脂排列就被打乱, 这是微粒产生过程中关键的一步。

**1.1 细胞活化途径** 微粒可通过激活剂或其他因素激活细胞产生。细胞活化产生的微粒具有时间和 Ca<sup>2+</sup>依赖性<sup>[5]</sup>。激活剂与细胞上受体结合后引起细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度增加, 尤其在囊泡形成的部位, 这是细胞活化的第一个信号。Ca<sup>2+</sup>的增加促使细胞内钙激活蛋白激酶的活化并抑制磷脂酶, 进而激活钙蛋白酶<sup>[3]</sup>。EDTA 和细胞外 Ca<sup>2+</sup>进行螯合后可阻止细胞内钙的增加进而阻断微粒的释放。细胞骨架的破坏是促进微粒形成的另一因素, 细胞骨架由多种蛋白组成其中包括肌动蛋白、黏着斑蛋白、踝蛋白等, 活化的钙蛋白酶可以降解细胞骨架中的踝蛋白, 引起细胞收缩和细胞膜的破坏, 细胞收缩的同时细胞膜向外伸展变形形成伪足, 在变形的细胞膜上胞膜以出芽方式