

• 综 述 •

1,3- β -D-葡聚糖定量测定在真菌感染诊断中的研究进展*于 婷¹, 蔡 彤²综述; 黄清泉^{1△} 审核

(中国食品药品检定研究院: 1. 医疗器械检定所; 2. 化学药品检定所, 北京 100050)

关键词: 1,3- β -D-葡聚糖; 真菌感染; 定量测定**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 23. 038**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)23-3186-03

1,3- β -D-葡聚糖广泛存在于各类真菌细胞壁中,是细胞壁的重要组成部分之一。研究表明,除少数真菌外,所有真菌细胞壁上都含有 1,3- β -D-葡聚糖,以酵母样真菌含量最高。当真菌进入人体血液或深部组织,经吞噬细胞吞噬、消化后,1,3- β -D-葡聚糖可从胞壁中释放出来,其在血液及其他体液(如尿、脑脊液、腹水、胸腔积液等)中的含量增加。因此,1,3- β -D-葡聚糖已成为检测真菌感染的一个有意义的指标。国内、外早在 20 世纪 80 年代就开始对 1,3- β -D-葡聚糖的定量检测方法进行研究,近年来更取得了较快的进展。本文就目前已有的 1,3- β -D-葡聚糖定量检测方法进行综述。

1 以 G 试验为原理的检测方法及相关试剂盒

1981 年日本学者 Kakinuma 等^[1]偶然发现,真菌细胞壁成分 1,3- β -D-葡聚糖能激活鲎变形细胞溶解物中的 G 因子,从而旁路活化检测革兰阴性菌内毒素的鲎试剂,发生凝集反应,因激活 G 因子,故称为 G 试验。鲎变形细胞溶解物中除含有 G 因子外,还含有 B 因子、C 因子、凝固酶原等成分。内毒素能依次激活 C 因子、B 因子,而葡聚糖只活化 G 因子。激活的 B 因子和 G 因子均可活化凝固酶原,生成凝固酶。若在鲎试剂中加入显色底物,凝固酶即可水解该底物,使其释放出显色基团并对硝基苯胺产生显色反应,用分光光度计测 405 nm 处的吸光度。若加入重氮偶联物,可增加显色反应灵敏度,在 545 nm 处测吸光度。吸光度值与 1,3- β -D-葡聚糖或内毒素的含量成正比。G 试验较灵敏,检测限可至 1.0 pg/mL。

基于 G 试验原理,目前国内、外已有数家研发机构开发出了多种 1,3- β -D-葡聚糖检测试剂盒,主要分为比浊法和显色法。研发机构包括日本 Seikagaku Kogyo 公司、和光纯药(Wako)公司、Maruha 公司以及美国 ACC 公司,中国有北京金山川科技发展有限公司、厦门市鲎试剂实验厂有限公司、湛江安度斯生物有限公司等。

比浊法利用 G 试验反应过程中吸光度或透光率的变化来测定 1,3- β -D-葡聚糖含量,比浊法可分为动态比浊法和终点比浊法。动态比浊法是检测反应混合物的浊度达到预设吸光度或透光率时所需反应时间的方法,反应时间(Tg)定义为透光率达到阈值所需的时间。1,3- β -D-葡聚糖浓度越高,反应时间越短,log1,3- β -D-葡聚糖与 log(Tg)成反比,通过绘制标准曲线,得到待检标本的 1,3- β -D-葡聚糖浓度。终点比浊法是根据反应终点时反应混合物的浊度与样本中 1,3- β -D-葡聚糖含量成正比的关系测定 1,3- β -D-葡聚糖浓度的方法。代表试剂盒有日本 Wako 公司的 β -葡聚糖 Wako 试剂盒和国内湛江安度

斯生物有限公司、北京金山川科技发展有限公司以及厦门市鲎试剂实验厂有限公司的真菌 1,3- β -D-葡聚糖检测试剂盒。

显色法与比浊法相似,只是在试剂中增加了显色底物,通过反应过程中产生的凝固酶使显色底物释放显色基团,根据显色基团的多少来测定 1,3- β -D-葡聚糖含量的方法。显色法分为动态显色法和终点显色法。动态显色法中,反应释放的硝基苯胺色度达到预设吸光度所需时间的对数值与 1,3- β -D-葡聚糖浓度的对数值成反比关系,通过标准曲线可计算待测样本中的 1,3- β -D-葡聚糖的含量。终点显色法是当显色反应达到了预设的反应时间后,用终止液终止反应后测吸光度,吸光度与 1,3- β -D-葡聚糖浓度成正比,通过标准曲线,计算待测样本中的 1,3- β -D-葡聚糖含量。代表试剂盒有日本 Seikagaku Kogyo 公司的 Fungitec G 试剂盒和美国 ACC 公司的 Fungitell(Glu-catell)试剂盒。

由于各试剂盒采用的 1,3- β -D-葡聚糖标准、血液预处理方法以及鲎种类不同,测定的 1,3- β -D-葡聚糖浓度值存在一定的差异。这些不一致的 1,3- β -D-葡聚糖浓度值可能会影响对真菌感染的诊断。因此,各试剂盒必须建立各自的 1,3- β -D-葡聚糖的参考值范围以及样本阴性、阳性判定标准。

G 试验系统亦存在一些薄弱环节。人体血液中具有与凝血级联相似的丝氨酸蛋白酶和蛋白酶抑制剂,这些因素可干扰级联反应,因此需要进行预先灭活处理。并且,由于内毒素亦能激活级联反应,所以需要抑制样本中的内毒素。另一方面,G 因子也会与 1,3/1,4- β -葡聚糖有交叉反应,并且反应易受葡聚糖的相对分子质量、分支度,特别是多糖三维结构的影响。研究发现平均相对分子质量为 6 800~216 000 的 1,3- β -D-葡聚糖,随着其相对分子质量的增加和分支度的减少,激活 G 因子的能力越强;相对分子质量为 6 750~27 500 的裂褶菌多糖对 G 因子的级联反应有抑制作用。研究发现单股螺旋的 1,3- β -D-葡聚糖在 G 因子反应中起着决定性的作用。

2 以桑蚕幼虫自我保护机制为原理的检测方法及相关试剂盒

近年来,日本 Wako 公司又研发了另一种检测 1,3- β -D-葡聚糖的试剂盒即桑蚕幼虫血浆(SLP)试剂盒。桑蚕幼虫血浆有一种自我保护机制,被称为酚氧化酶级联系统。当受真菌入侵时,这个级联反应系统参与黑色素的形成并使自身免受袭击。这个系统由细菌中的肽聚糖或真菌中的 1,3- β -D-葡聚糖引发,并激活酚氧化酶原,将溶液中的 3,4-二羟苯基丙氨酸氧化,最终在反应混合物中形成黑色素。SLP 试剂盒的检测范围为 6.25~100.00 pg/mL,该试剂盒可以通过肉眼观察或酶

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2011AA02A115)。 作者简介:于婷(1978~),女,副研究员,主要从事体外诊断试剂检定及标准物质研制研究。 △ 通讯作者,E-mail:qqwho686@126.com。

标仪(650 nm)定量检测黑色素来计算样品中真菌 1,3- β -D-葡聚糖含量。SLP 法摒弃了传统的从鲎变形细胞溶解物去除 B 因子和 C 因子的方法,利用与葡聚糖或肽聚糖反应生成黑色素的原理来定量或者定性地检测 1,3- β -D-葡聚糖、肽聚糖,进一步判断真菌或者细菌污染,通过不同参考物的设立定量检测不同菌种的含量。需要注意的是,细菌表面肽聚糖也能够通过肽聚糖反应蛋白引发酚氧化酶级联反应,最终形成黑色素,造成对实验的干扰。因此,需要通过其他实验室手段排除细菌污染的可能后再进行检测。目前,利用 SLP 试剂盒检测的样品种类主要有支气管肺泡灌洗液、稀释痰液、脑脊液、透析液、胸腹水等^[2-5]。与以 G 实验为原理的试剂盒相比,其优点主要在于可以快速检测血浆成分以外的其他体液。

3 以其他蛋白特异识别为基础的检测方法

3.1 以重组 G 因子蛋白为基础的检测方法 Yoneda 等^[6]利用重组鲎 G 因子 α 亚基的片段可特异性与 1,3- β -D-葡聚糖结合的原理,研制出一种双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)。重组鲎 G 因子 α 亚基片段中含 1 个 QQWS 基序,2 个 β -葡聚糖结合域和 1 个额外的 N-末端半胱氨酸残基。该片段作为夹心 ELISA 反应中的固定捕获分子和过氧化物酶标记分子,检测样本中的 1,3- β -D-葡聚糖。以香菇多糖为标准品,建立并通过标准曲线计算 1,3- β -D-葡聚糖浓度。该方法检测限约为 1 ng/mL,与 G 试验方法相关性良好。这种检测方法不利用蛋白水解酶的级联反应,因此,不需要对样品进行预处理灭活蛋白酶和蛋白酶抑制剂,测定时间更短,更适合于使用自动分析仪进行高通量分析。

3.2 以 β -葡聚糖受体--Dectin-1 为基础的检测方法 Graham 等^[7]建立了一种利用 Dectin-1 检测 β -葡聚糖的 ELISA 方法。Dectin-1 为 II 型跨膜糖蛋白,相对分子质量为 43 000,含有 1 个单一的细胞外 C 型碳水化合物识别区域和 1 个胞质内以酪氨酸为基础的免疫受体样活化基序。Dectin-1 是哺乳动物主要的 β -葡聚糖受体,在细胞识别中 N-连接的葡萄糖残基起着关键性的作用,可特异的识别 1,3/1,6- β -葡聚糖^[8],进行 β -葡聚糖的定量检测。这种方法的灵敏度虽不及 G 试验的 pg 级别,但特异性较强。

3.3 以抗- β -葡聚糖抗体为基础的检测方法 Sander 等^[9]以氧化昆布多糖(一种 1,3- β -D-葡聚糖)免疫小鼠,得到 1,3- β -D-葡聚糖特异性抗体,在此基础上,建立了一种双抗体夹心 ELISA 法。以 CM-curdlan(羧甲基-可得胶,一种羧甲基化的 1,3- β -D-葡聚糖)为标准品,在 0.36~15.00 ng/mL 的浓度范围内,剂量反应曲线的相关系数良好,与 Glucatell 试剂盒的相关性较好。该检测方法的检测限虽不及常规 G 试验方法,但是费用较低,主要检测对象是来自空气中的尘埃样本,所以适用于研究暴露于这一类生物活性分子对健康的影响。

3.4 以新发现的鲎 β -葡聚糖结合蛋白为基础的检测方法 Tamura 等^[10]从日本鲎血液变形细胞溶解物中纯化了一种新的鲎蛋白,可特异性结合 1,3- β -D-葡聚糖,据此开发了一种高度敏感的特异性检测 1,3- β -D-葡聚糖的酶免方法。此方法在 0.1~1 000.0 ng/mL 的浓度范围内,可定量测定直链或支链结构葡聚糖,而不与其他类型葡聚糖(如甘露聚糖、脂多糖、及肽聚糖等)反应,因此,可用于人和动物血浆真菌感染的检测。高浓度血浆葡聚糖与真菌感染的严重程度密切相关。

3.5 以半乳糖神经酰胺为基础的检测方法 Milton 等^[11]基

于半乳糖神经酰胺可高亲和性地与 1,3- β -D-葡聚糖结合的原理,建立了检测 1,3- β -D-葡聚糖的 ELISA 法。以半乳糖神经酰胺为包被物,以鼠抗 1,3- β -D-葡聚糖为单克隆抗体、生物素化抗鼠 IgG 和辣根过氧化物酶标记亲和素为检测系统建立 ELISA 法。结果表明该方法在葡聚糖浓度低于 80 ng/mL 时线性良好,与显色试验有良好的相关性。国内闻平等^[12]用该方法检测各种生物体液中 1,3- β -D-葡聚糖的含量时发现,葡聚糖的含量低于 0.8 ng/mL 时线性良好,具有良好的重复性和满意的回收率,相对鲎 G 试验法受干扰物质的影响更小,并同样具有较高的精密度和准确度。

4 小 结

近十几年来,真菌感染的发病率上升很快,如何在早期准确地诊断真菌感染是迫切需要解决的实际问题。传统诊断方法,如培养、病理组织学方法等,耗时长、敏感性低,容易受干扰,难以达到早期诊断、早期治疗、降低病死率的目的。目前,通过检测体液中真菌抗原或代谢物来诊断真菌感染的研究很多^[13-14],其中之一就是关于真菌的细胞壁成分 1,3- β -D-葡聚糖。国内、外文献报道了多种不同的 1,3- β -D-葡聚糖检测方法,虽然所用于阴、阳性判断的临界值稍有不同,但均提示 1,3- β -D-葡聚糖水平可以间接反映机体感染真菌的程度。检测方法主要有 G 试验、SLP 法以及以其他蛋白特异识别为基础的检测方法。此外,有报道称除鲎 G 因子和蚕^[15]外,大黄粉虫^[16]、海绵动物^[17]中也发现存在能与 1,3- β -D-葡聚糖专一反应的蛋白质分子,可望为 1,3- β -D-葡聚糖的定量测定提供新方法。

在这些检测方法中,G 试验发展最早也最成熟,具有快速、灵敏、特异性强、重复性好等优点,灵敏度最高,在临床上已经广泛应用。国内、外已有配套试剂盒上市。通过 G 试验检测真菌细胞壁 1,3- β -D-葡聚糖的方法,来诊断侵袭性肺部真菌感染具有无创、可重复的优点,已列入国内最新侵袭性肺部真菌感染的诊断标准^[18]。以其他蛋白特异识别为基础的检测方法目前多处于研究阶段,并且灵敏度不够高。随着分析方法的不断进步,将来的 1-3- β -D-葡聚糖定量测定方法的研究也必定会向着操作更简单、测定更快捷、灵敏的方向发展,为临床诊断真菌感染发挥更大的应用价值。

参考文献

- [1] Kakinuma A, Asano T, Torii H, et al. Gelation of limulus amoebocyte lysate by an antitumor(1 leads to 3)-beta-D-glucan[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1981, 101(2): 434-439.
- [2] Tsuchiya M, Asahi N, Suzuoki F, et al. Detection of peptidoglycan and beta-glucan with silkworm larvae plasma test[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996, 15(2/3): 129-134.
- [3] Yoshida H, Ochiai M, Ashida M. Beta-1, 3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 141(3): 1177-1184.
- [4] Tsuchida K, Takemoto Y, Yamagami S, et al. Detection of peptidoglycan and endotoxin in dialysate, using silkworm larvae plasma and limulus amebocyte lysate methods[J]. Nephron, 1997, 75(4): 438-443.
- [5] Ochiai M, Niki T, Ashida M. Immunocytochemical localization of beta-1, 3-glucan recognition protein in the silkworm, Bombyx mori [J]. Cell Tissue Res, 1992, 268(3): 431-437.

- [6] Yoneda A, Kurokawa T. A sensitive sandwich ELISA to measure (1→3)-β-d-glucan levels in blood[J]. J Immunol Methods, 2011, 365(1/2):158-165.
- [7] Graham LM, Tsoni SV, Willment JA, et al. Soluble dectin-1 as a tool to detect beta-glucans[J]. J Immunol Methods, 2006, 314(1/2):164-169.
- [8] Brown GD, Herre J, Williams DL, et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans[J]. J Exp Med, 2003, 197(9):1119-1124.
- [9] Sander I, Fleischer C, Borowitzki G, et al. Development of a two-site enzyme immunoassay based on monoclonal antibodies to measure airborne exposure to (1→3)-beta-D-glucan[J]. J Immunol Methods, 2008, 337(1):55-62.
- [10] Tamura H, Tanaka S, Ikeda T, et al. Plasma (1→3)-beta-D-glucan assay and immunohistochemical staining of (1→3)-beta-D-glucan in the fungal cell walls using a novel horseshoe crab protein(T-GBP) that specifically binds to (1→3)-beta-D-glucan[J]. J Clin Lab Anal, 1997, 11(2):104-109.
- [11] Milton DK, Alwis KU, Fisette L, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific for (1→6) branched, (1→3)-beta-D-glucan detection in environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(12):5420-5424.
- [12] 闻平, 郭月芳. (1,3)-β-D-葡聚糖 ELISA 检测方法建立及初步临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2003, 18(5):1-2.
- [13] Yoshida K. Recent advances of serodiagnosis for systemic fungal infections[J]. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2006, 47(3):135-142.
- [14] 熊祝嘉, 徐英春. 半乳甘露聚糖用于侵袭性曲霉感染实验诊断的研究现状[J]. 中国真菌学杂志, 2007, 2(1):52-54.
- [15] Ochiai M, Ashida M. A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, Bombyx mori[J]. J Biol Chem, 2000, 275(7):4995-5002.
- [16] Zhang R, Cho HY, Kim HS, et al. Characterization and properties of a 1,3-beta-D-glucan pattern recognition protein of Tenebrio molitor larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(43):42072-42079.
- [17] Perovic-Ottstadt S, Adell T, Proksch P, et al. A (1→3)-beta-D-glucan recognition protein from the sponge Suberites domuncula. Mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(10):1924-1937.
- [18] 中华内科杂志编辑委员会. 侵袭性肺部真菌感染的诊断标准与治疗原则(草案)[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(8):697-700.

(收稿日期:2013-06-02)

• 综 述 •

Hedgehog 信号通路在肝脏疾病中的研究进展^{*}

傅海涛, 杨 敏 综述; 仲人前[△] 审校

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

关键词: Hedgehog; 信号通路; 肝脏疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)23-3188-04

刺猬(Hh)因子信号通路在胚胎发育, 器官形成以及发育过程中具有十分重要的作用。近年来在肝脏疾病的研究中发现, Hh 信号通路在受到损伤因素作用后可被激活, 该信号通路活化后可以参与包括促进肝祖细胞的增殖, 肝内炎症细胞的聚集, 肝纤维化以及血管形成等多个过程, 上述这些变化都与急慢性肝脏疾病的发生、发展有重要关系。因此, 进一步深入研究 Hh 信号通路在急、慢性肝脏疾病中的作用机制, 有望为临床提供治疗肝脏疾病的有力证据。

1 Hh 概述

Hh 基因是在 1980 年首先由 Nusslein-Volhard C 等在对筛选可能引起果蝇突变的基因时发现^[1]。Hh 是一种分节极性基因, 因突变的果蝇胚胎呈多毛团状, 酷似受惊刺猬而得名。它是一种能够编码一系列分泌蛋白的基因家族, 在果蝇中调控着许多发育事件, 如: 翅膀、体节、腿和眼睛的发育等。哺乳动物中存在 3 个 Hh 的同源基因: 音猬因子(SHH)、印度刺猬因子(IIHH)和沙漠刺猬因子(DHH)^[2-3], 分别编码 SHH、IHH 和 DHH 蛋白。Hh 蛋白家族成员均由两个结构域组成: 氨基

端结构域(Hh-N)及羧基端结构域(Hh-C), 其中, Hh-N 具有 Hh 蛋白的信号活性, 而 Hh-C 则具有自身蛋白水解酶活性及胆固醇转移酶功能。Hh-C 的胆固醇转移酶活性可以将胆固醇分子与 Hh-N 的羧基端进行共价结合, Hh 蛋白前体在内质网中通过自身催化分裂成 Hh-N 及 Hh-C 两部分, 虽然 Hh-C 没有信号活性, 但是它可以促进自身蛋白酶解作用。体外研究证实, Hh-C 片段在从内质网转移到蛋白媒体后被迅速降解^[4]。在酰基转移酶 skinny(SKI)的作用下, Hh-N 氨基端的半胱氨酸发生棕榈酰化。Hh 蛋白只有通过这些翻译后的修饰过程才能获得完全功能。

2 Hh 信号通路组成

Hh 信号通路包含 Patched(Ptch)、Smoothered(Smo)及通路下游的类运动蛋白(Cos2)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Fu)、Fu 抑制剂(SuFu)、蛋白激酶 A(PKA)、Hedgehog 相互作用蛋白(Hhip)、在果蝇中为 Ci, 哺乳动物中 Gli1、Gli2、Gli3 等多种蛋白^[5]。Ptch 是 12 次跨膜蛋白, 在人类有 2 个同源基因—Ptch1 和 Ptch2, 能与 Hedgehog 结合; Smo 为 7 次跨膜蛋白, 与

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072479); 卫生部卫生公益性行业科研专项基金资助项目(201202004)。 作者简介: 傅海涛 (1988~), 男, 在读硕士研究生, 主要从事自身免疫性疾病发病机制的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: rqzhong@hotmail.com。