

虽然目前对于 Lp-PLA2 作用机制还存在不同的意见,但本研究进一步证实了 Lp-PLA2 的临床作用。关于 Lp-PLA2 的具体机制还需进一步研究和证实,这对其发生和防治具有重要的临床意义,预测高风险人群更有十分重要的参考价值。

参考文献

[1] 郝丽娟,李保. 冠心病患者脂蛋白相关磷脂酶 A2 的变化及其与炎症标记物的相关性[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2010,7(4):776-778.

[2] 李明. 血清 Lp-PLA2、hs-CRP 和 D-二聚体在冠心病患者冠脉病变程度中的评估价值[J]. 重庆医学,2015,31(9):1215-1217.

[3] Jellinger PS, Smith DA, Mehta AE, et al. American Association of Clinical Endocrinologists' guide lines for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis [J]. Endocr Pract, 2012, 18(Suppl 1):1-78.

[4] 谢荣章,叶伙梅. 冠心病患者血清胆固醇对脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性水平的影响[J]. 检验医学与临床,2015,12(8):2875-2877.

[5] 熊卿圆,曾赤佳,岑锦明,等. 不同类型冠状动脉粥样硬化

• 临床研究 •

性心脏病患者血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平变化的临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2015,29(2):78-82.

[6] 齐宏,黄珊,马祥生,等. 同型半胱氨酸、超敏 C 反应蛋白及胱抑素 C 和脂蛋白相关磷脂酶 A2 与冠心病的相关性[J]. 广东医学,2014,35(14):2253-2256.

[7] 张清平,邹长进,彭焦武,等. 急性脑梗死患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2、超敏 C 反应蛋白及 D-二聚体水平[J]. 微循环学杂志,2013,18(1):31-32.

[8] Xu RX, Zhang Y, Li XL, et al. RelationshIL between plasma phosphol ILaseA2 concentrations and lipoprotein subfractions in patients with stable coronary artery disease [J]. Clin Chim Acta, 2015, 446(10):15-20.

[9] 黄少兴,李雪华,邱双成. 脂蛋白磷脂酶 A2 检测在心脑血管疾病中的诊断价值[J]. 赣南医学院学报,2015,35(2):287-288.

[10] 程清. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 和同型半胱氨酸水平与动脉粥样硬化性心脑血管疾病关系的研究[J]. 检验医学, 2015,20(1):40-43.

(收稿日期:2016-04-17 修回日期:2016-06-15)

弱精子症患者与正常生育者精浆差异蛋白的研究

李旺胜¹, 余 蕾²

(1. 贵州省六盘水市人民医院检验科 553401; 2. 贵州医科大学附属医院/贵州省产前诊断中心, 贵阳 553001)

摘要:目的 研究弱精子症患者精浆差异蛋白的特征。方法 选取六盘水市人民医院 2015 年 1~12 月就诊的 200 例弱精子症患者(研究组),同时收集同期已婚生育健康男性 200 例(对照组),采集所有研究对象的精液标本,采用 Percoll 技术获得精浆,酶解获得肽段,Shotgun 技术检测蛋白质成分。比较 2 组标本唯一肽段数等于 1 但肽段总数大于或等于 4、唯一肽段数大于或等于 2 的结果。结果 2 组标本唯一肽段数等于 1 但肽段总数大于或等于 4、唯一肽段数大于或等于 2 情况下,有 172 种差异蛋白,其中研究组 89 种,对照组 83 种。研究组 89 种差异蛋白有 3 种与运动相关蛋白、3 种细胞凋亡关联蛋白,分别为磷脂磷酸水解酶 1 同工型 1、凝血酶敏感素 1 前体、相对分子质量为 400×10^3 的蛋白质,另有信号转导蛋白 10 种、细胞周期蛋白 4 种、结构分子 7 种、催化活性蛋白 27 种、分子功能未知蛋白 19 种、生物进程未知蛋白 29 种、细胞成分未知蛋白 27 种。酶催化活性、信号转导蛋白是常见差异蛋白。结论 10 种差异蛋白与弱精子症紧密相关,分别为膜联蛋白 A4、蛋白 S100-A9、蛋白 S100-A11、维生素 D 结合蛋白前体、受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 η 前体、 α 辅肌动蛋白、胞质动力蛋白、相对分子质量 400×10^3 的蛋白质、白细胞介素-6 受体 β 亚单位同工型 1 前体、联蛋白 VI 同工型 2。

关键词:弱精子症; 精浆; 差异蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.044 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)19-2759-03

Shotgun 蛋白质检测技术又叫鸟枪蛋白质组学策略,该技术无需蛋白纯化步骤,可直接迅速鉴定蛋白混合标本中的蛋白质,消化作用将蛋白质处理成为多肽后,对多肽进行串联质谱测序分析,利用所得多肽波谱数据对数据进行搜索,特别算法得出肽段结构特征,从而区分蛋白质^[1]。为了解弱精子症者精液蛋白差异,现对其与健康体检者进行检测对比。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取六盘水市人民医院 2015 年 1~12 月就诊的 200 例弱精子症患者(研究组),年龄 22~39 岁,平均年龄 (29.4 ± 3.2) 岁。另选同期已婚生育健康男性 200 例(对照组),均经过全面检测显示正常,年龄 23~31 岁,平均年龄 (30.3 ± 2.3) 岁。2 组研究对象均符合入选标准:研究组精子密度大于或等于 50×10^6 /mL, a 级精子(快速前向运动)比例小

于 25%,且 a+b 级精子(前向运动)小于 50%,其余指标符合 WHO 标准。对照组精液液化时间在 30 min 内,精子计数大于或等于 20×10^6 /mL, a 级精子大于或等于 25%,或 a+b 级精子大于或等于 50%;正常形态精子比例大于或等于 15%。2 组研究对象的年龄、体质量等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法 2 组研究对象均禁欲 1 周,采集精液标本。根据 WHO 相关标准对标本黏稠度、凝集度、精子密度、液化时间、畸形率、存活率、活动度及白细胞水平、酸性磷酸酶、果糖进行检测。所有标本定量分装至 100 微克/管,混合后使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离处理,考马斯亮蓝染色胶体标本。获得分离图谱后,将泳道以手术刀切割分为 4 段,分置于试管内,采用 100 mmol/L 的 NH_4HCO_3 /30% 的 ACN 脱色处理,清洗去除

上清液后将剩余部分冻干保存;加入 DTT、NH₄HCO₃ 孵化 30 min,孵化温度 56 ℃,还原处理后去除上清液,各自将 100 μL 100% ACN 加入后等待 5 min,吸除;各自加入 30 μL 200 mmol/L IAA、70 μL 100 mmol/L NH₄HCO₃,避光静置 20 min 后,去除上清液部分,再次将 10 μL 的 NH₄HCO₃ (100 mmol/L)加入,室温静置,去除上清液,将 100 μL 100% ACN 加入后等待 5 min,吸除,冻干;将 5 μL 胰蛋白酶加入标本,4 ℃ 保存 60 min,胶块膨胀后,根据实际体积加入缓冲液 NH₄HCO₃ 50 mmol/L,置 37 ℃ 20 h,将酶解液吸除后移至清洁的 EP 管内,置入 TFA、ACN,超声粉碎后将溶液吸除,向其中加入前次溶液,如此抽提重复 3 次,合并且冻干。毛细血管反相色谱、电喷雾线性离子阱质谱分析标本,并通过碎片图谱扫描、全扫描技术分析多肽及多肽碎片质量电荷比。结合分析结果对蛋白质库进行搜索,SEQUEST 方法整合分析结果,从而获得蛋白质鉴定结果,并使用 GOA 软件对蛋白质进行分类鉴定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行分析,计数资料对比应用 χ^2 检验,计量资料比较使用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组研究对象精浆差异蛋白检测结果比较 2 组研究对象标本唯一肽段数等于 1 但肽段总数大于或等于 4、唯一肽段数大于或等于 2 时,有 172 种差异蛋白,其中研究组标本有 89 种,对照组标本有 83 种。见图 1~3。

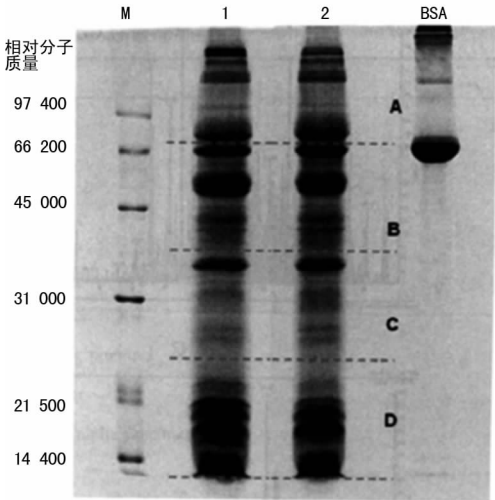


图 1 精浆 SDS PAGE 谱图及切胶部位

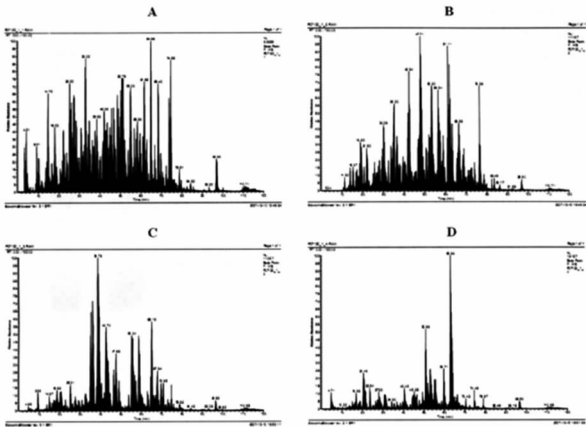


图 2 对照组精浆蛋白 MS-MS 图

2.2 2 组研究对象差异蛋白的功能分类 2 组标本差异蛋白采用 GOA 软件分类处理,表明研究组 89 种差异蛋白有 3 种运动相关蛋白、3 种细胞凋亡关联蛋白,分别为磷脂磷酸水解酶 1 同工型 1、凝血酶敏感素 1 前体、相对分子质量为 400×10³ 的蛋白质,另有信号转导蛋白 10 种、细胞周期蛋白 4 种、结构分子 7 种、催化活性蛋白 27 种、分子功能未知蛋白 19 种、生物进程未知蛋白 29 种、细胞成分未知蛋白 27 种。酶催化活性、信号转导蛋白是常见差异蛋白。

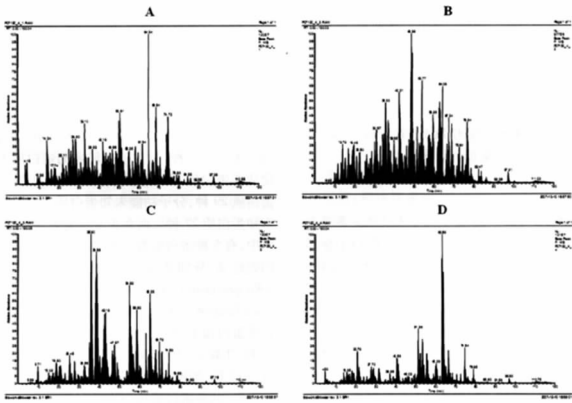


图 3 研究组精浆蛋白 MS-MS 图

3 讨 论

临床研究者一致认可的蛋白质研究常见工具是 Shotgun 蛋白质组学策略,该方式主要借助 LC-MS/MS 串联质谱偶联液相层析技术完成混合物中蛋白质的鉴别,省去蛋白质纯化的时间和步骤^[2-3]。鉴定到的蛋白质根据 peptide counts 和 unique peptide counts 这 2 个参数将其可信度分级:peptide 是鉴定到的肽段总数(这里指重复肽段也被包含在内),非重复肽段即 unique peptide counts 是指某组、某种蛋白质特有的唯一肽段数,其中可信度最高的蛋白质为 unique peptide counts 大于或等于 2 类,其次为 unique peptide counts 等于 1,再次为 peptide counts 大于或等于 4 类^[4-5]。

人体精浆的蛋白有较大差别,本研究结合以往成功案例,对 2 组研究对象均使用混合同类标本进行鉴定,以保证整体研究的顺利进行和最终结果的可信度,同时增加对比研究,以提高标本例数缩小个体差异^[6-7]。

本研究探讨弱精子症者精液蛋白差异,对研究组 200 例和对照组 200 例的精液标本蛋白进行检测比较,采用 Percoll 技术分离得到精浆、酶解获得肽段、Shotgun 技术测定蛋白质成分,对比 2 组标本唯一肽段数等于 1 但肽段总数大于或等于 4、唯一肽段数大于或等于 2 的结果^[8-9]。本研究结果显示,2 组标本唯一肽段数等于 1 但肽段总数大于或等于 4、唯一肽段数大于或等于 2 时,有 172 种差异蛋白,其中研究组 89 种,对照组 83 种。研究组 89 种差异蛋白有 3 种与运动相关的蛋白、3 种细胞凋亡关联蛋白,分别为磷脂磷酸水解酶 1 同工型 1、凝血酶敏感素 1 前体、相对分子质量为 400×10³ 的蛋白质,另有信号转导蛋白 10 种、细胞周期蛋白 4 种、结构分子 7 种、催化活性蛋白 27 种、分子功能未知蛋白 19 种、生物进程未知蛋白 29 种、细胞成分未知蛋白 27 种。酶催化活性、信号转导蛋白是常见差异蛋白。10 种差异蛋白与弱精子症紧密相关,分别为膜联蛋白 A4、蛋白 S100-A9、蛋白 S100-A11、维生素 D 结合

蛋白前体、受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 η 前体、 α 辅肌动蛋白、胞质动力蛋白、相对分子质量 400×10^3 的蛋白质、白细胞介素-6 受体 β 亚单位同工型 1 前体、联蛋白 VI 同工型 2。

Shotgun 鉴定方式也存在一定的局限性,该技术无法发现在表达丰度上有显著差异的蛋白质,提示本研究得到的 172 种差异性的蛋白质均为“有和无”的关系,这些蛋白质不能完全代表正常生育者精浆和弱精子症精浆蛋白质的差异性。进一步的功能鉴别分类则精细化地区别与病情有直接关联的差异性蛋白质^[10]。

综上所述,弱精子症患者精液差异蛋白应着重与研究所示的 172 种差异蛋白进行鉴别和统计分析,筛选关联密切和重要度高的蛋白质,通过添加蛋白和封闭方式获取功能、去除功能,观察精子运动能力变化情况,精准寻找差异蛋白,为临床诊疗工作取得突破性的进展。

参考文献

- [1] 杜晓钟,陕文生,郑雷,等. 少弱精子症患者精浆中精子及睾丸组织端粒酶活性实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(12):1277-1278.
- [2] 麦丽萍,张婷婷,姚华伊,等. 佛山市 1 865 例男性不育门诊就诊者精液质量分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(14):1851-1853.
- [3] 左江成,曾一芹,艾红,等. 不育男性精浆中免疫球蛋白与精子参数的相关分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33

• 临床研究 •

(2):166-167.

- [4] 周俊豪,薛康颐,陈明坤,等. CRISP2 基因及蛋白在弱精子症患者中的表达及其临床意义[J]. 南方医科大学学报,2014,34(10):1528-1533.
- [5] 颜秋霞,漆正宇,赵晓英,等. ACRV1 在正常男性和弱精子症患者精液精子中的表达差异[J]. 中国男科学杂志, 2015,29(2):12-16.
- [6] 王海燕,刘能辉,曾鸿,等. 特发性弱精子症患者精子中 peroxiredoxin I 与精浆活性氧的关系[J]. 中南大学学报(医学版),2014,39(8):842-848.
- [7] 刘伯龙,王娟花,肖秀娟,等. 硫氧还蛋白-3 基因及蛋白在弱精子症患者中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(18):31-34.
- [8] 刘刚,刘淳,崔志刚,等. 复方玄驹胶囊联合十一酸睾酮胶丸治疗少弱精子症的临床观察[J]. 现代药物与临床, 2014,15(9):998-1002.
- [9] 申树林,刘德铭,贺大林,等. GRP78 在弱精症精子和活力正常精子蛋白中的表达差异研究[J]. 陕西医学杂志, 2012,41(1):27-29.
- [10] 申树林,梁季鸿,朱春晖,等. 睾丸特异性钙结合蛋白 CBP86-IV 表达水平变化及抗体制备[J]. 中国男科学杂志,2013,20(10):61-62.

(收稿日期:2016-04-21 修回日期:2016-06-19)

粪肠球菌和屎肠球菌感染的临床分布与耐药性分析

王化凤

(山东省淄博市张店区人民医院检验科 255025)

摘要:目的 探讨粪肠球菌和屎肠球菌感染的临床分布特点及药物敏感结果。方法 回顾分析该院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月分离鉴定的粪肠球菌和屎肠球菌,分析其药物敏感结果。结果 138 株粪肠球菌和 143 株屎肠球菌主要来源于尿液、胆汁;普外科、重症医学科、泌尿外科、肾内科的分离率较高。粪肠球菌对青霉素 G、氨基西林、莫西沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因的耐药率小于 30.0%,屎肠球菌对上述药物耐药率高,均大于 70.0%。2 种细菌对红霉素、四环素的耐药率较高(>50.0%),对利奈唑胺的耐药率较低(<3.6%)。粪肠球菌和屎肠球菌的耐高浓度庆大霉素的检出率分别为 37.7%和 61.5%。未检出耐万古霉素和替加环素菌株。结论 粪肠球菌和屎肠球菌感染以泌尿系统感染最为常见;两者耐药性明显不同,多重耐药现象比较严重,临床治疗其引起的感染时,应严格按药物敏感试验结果合理用药。

关键词:粪肠球菌; 屎肠球菌; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2761-03

肠球菌属常寄居于人和动物的肠道及女性生殖道,是条件致病菌,在自然界分布广泛。临床上粪肠球菌和屎肠球菌占肠球菌属分离的绝大多数^[1]。近年来,由于免疫抑制剂及抗菌药物的广泛使用和大量侵袭性操作,其检出率逐渐增加,耐药率也日趋升高。现对感染标本中分离的粪肠球菌和屎肠球菌的临床分布特点及耐药性进行分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集该院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月分离鉴定的 138 株粪肠球菌和 143 株屎肠球菌。同一患者同一取材部位多次检测出肠球菌只计算首次分离株。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29523,粪肠球菌 ATCC29212。

1.2 仪器与试剂 鉴定卡片和药物敏感卡片均购于法国梅里

埃公司,同时使用该公司的 ATB Expression 型微生物鉴定药敏分析仪。

1.3 方法 患者标本取材按照《全国临床检验操作规程(第 3 版)》^[2]。尿液、分泌物、血液、导管等均严格按照无菌操作进行,以排除正常菌群携带污染。尿液标本须取自中段尿,且菌落计数大于 10^4 CFU/mL 具有诊断意义。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 软件统计进行数据分析,计数资料使用例数或百分率, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。耐药=耐药+中介。

2 结果

2.1 患者标本分离结果 138 株粪肠球菌主要来源于尿液、胆汁、分泌物,分别占 34.8%、29.7%、10.9%;143 株屎肠球菌