

[13] YANG F, ZHANG L, HUO X S, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans[J]. *Hepatology*, 2011, 54(5):1679-1689.

[14] LIANG D, YANG S B, XU F F, et al. Long noncoding RNA CCAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by functioning as let-7 sponge[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1):18.

[15] YUAN J H, YANG F, WANG F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(5):666-681.

[16] RINN J L, KERTESZ M, WANG J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2007, 129(7):1311-1323.

[17] YANG X D, XU H T, XU X H, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and invasiveness and improves radio sensitivity in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1):479-487.

[18] HU Z Y, WANG X Y, GUO W B, et al. Long non-coding RNA MALAT1 increases AKAP-9 expression by promoting SRPK1-catalyzed SRSF1 phosphorylation in colorectal cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10):11733-11743.

[19] YANG X J, HUANG C Q, PENG C W, et al. Long non-coding RNA HULC promotes colorectal carcinoma progression through epigenetically repressing NKD2 expression[J]. *Gene*, 2016, 592(1):172-178.

[20] MATOUK I J, ABBASI I, HOCHBERG A, et al. Highly

upregulated in liver cancer noncoding RNA is overexpressed in hepatic colorectal metastasis[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(6):688-692.

[21] SCHMIDT L H, SPIEKER T, KOSCHMIEDER S, et al. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(12):1984-1992.

[22] HUARTE M. The emerging role of lncRNAs in cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11):1253-1261.

[23] CUI Z, REN S, LU J, et al. The prostate cancer-up-regulated long noncoding RNA PlncRNA-1 modulates apoptosis and proliferation through reciprocal regulation of androgen receptor[J]. *Urol Oncol*, 2013, 31(7):1117-1123.

[24] CRAWFORD E D, ROVE K O, TRABULSI E J, et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases[J]. *J Urol*, 2012, 188(5):1726-1731.

[25] ZHANG Y, ZHANG P, WAN X, et al. Downregulation of long non-coding RNA HCG11 predicts a poor prognosis in prostate cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:936-941.

[26] HE A, LIU Y, CHEN Z, et al. Over-expression of long noncoding RNA BANCR inhibits malignant phenotypes of human bladder cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1):125.

(收稿日期:2018-01-19 修回日期:2018-03-24)

• 综 述 •

关节假体感染细菌生物膜病原菌检测方法的研究进展*

王丽娟^{1,2}, 杨培丽^{1,2}, 王奕翔^{1,2} 综述, 王勇平¹ 审校

(1. 兰州大学第一医院骨科, 兰州 730000; 2. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000)

摘要:目的 人工关节置换术现多用于终末期关节疾病的治疗, 但关节置换术后出现的假体感染是常见并较为严重的并发症, 同样是导致关节置换手术失败的常见原因之一。细菌生物膜的形成是关节置换术后感染的重要原因, 然而对感染病原的诊断至今仍然存在许多困难。该文主要对人工关节假体感染细菌生物膜的检测方法进行综述。

关键词: 关节置换; 假体感染; 细菌生物膜; 检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.12.025

中图法分类号: R378; R619

文章编号: 1673-4130(2018)12-1495-04

文献标识码: A

人工关节置换术现多用于终末期关节疾病的治疗, 但关节置换术后出现的假体感染是常见并较为严

重的并发症, 同样是导致关节置换手术失败的常见原因之一^[1]。目前, 关节假体感染的诊断及治疗尚未取

* 基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSHY-2015-53)。

△ 通信作者, E-mail: wangyp312@163.com。

本文引用格式: 王丽娟, 杨培丽, 王奕翔, 等. 关节假体感染细菌生物膜病原菌检测方法的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(12):

得令人满意的结果,这主要是因为导致关节假体感染的病原菌发生了变化,形成细菌生物膜(BBF)。有关植入物引起感染的基础研究近几年得到了快速的发展,根据对植入物慢性感染机制的基础研究,人们意识到植入物表面 BBF 的形成是导致关节假体感染难以诊治的主要原因^[2]。因此,研究 BBF 的检测方法,建立新型假体感染生物膜细菌组合式检测流程,对临床上迫切需要解决的关节假体感染病原诊断问题至关重要。

1 BBF 与人工关节感染

BBF 是微生物(如细菌)被其自身分泌的多糖蛋白复合物包裹的附着于正常组织或植入物表面的有组织的细胞团体^[3]。BBF 中 97% 是水,既可以固着于生物膜,又可以作为溶剂流动,除水外,生物膜中还包括黏多糖、蛋白质、DNA 和多价阳离子等^[4]。

BBF 的形成是一个动态过程,主要包括黏附、发展、成熟、细菌脱落与再植 4 个阶段。在黏附阶段,生物膜的主要成分多糖蛋白复合物将细菌包裹其中,形成膜状物并固着于正常组织或植入物表面^[5]。BBF 多在假体植入最初的 6 h 内形成,因此在术后 6 h 内减少细菌的黏附对于预防假体感染就显得至关重要^[1]。当细菌以固着形式存在于植入材料表面形成生物膜时,进入生物膜的发展与成熟阶段,形成微菌落并逐渐连接形成扩散性结构,从而使生物膜逐渐增厚,此时,表层菌容易获得氧气和养料,代谢废物也容易排出,处于代谢活跃状态,对抗菌药物也敏感,而里层菌由于不易获得氧气和养料,代谢废物也不易排出,表现为代谢缓慢,增殖期长,处于“休眠状态”,对抗生素也有很强抵抗力^[6],细菌以被其分泌的多糖蛋白复合物包裹而形成的膜状物为形式存在,造成了临床上许多难治性假体感染,使关节假体感染的病原诊断及治疗面临很大的困难。成熟的 BBF 受到内在调节机制与外部冲刷力的作用而脱落下来,变为浮游生长状态,从而在合适的部位再次黏附形成新的 BBF,此为生物膜的脱落与再植,继而形成感染的扩散与复发。这也是 BBF 引起感染难以治疗的原因之一。

2 BBF 病原菌检测方法

2.1 假体感染的血清学检测 假体感染常用的血清学实验室检查有红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CRP)和白细胞介素-6(IL-6)。CRP、ESR 和白细胞计数(WBC)对感染诊断虽然有帮助,但都是非特异性的炎症指标。CRP 的高峰比 ESR 早,在术后 2 个月内降到正常,ESR 则可能持续数月,手术前 CRP 正常的患者,如果术后 3 个月仍高于正常或者下降后又上升,提示可能存在关节假体感染^[7]。CRP 正常通常表示没有感染,但也不能排除前期用过抗生素治疗或存在低毒性细菌感染而导致结果的假阴性。IL-6 是由单核巨噬细胞系统产生的一种急性时相反应蛋白,多在关节置换术后 6~12 h 出现峰值,在术后 48~72 h

恢复正常^[7]。

2.2 结晶紫染色法 结晶紫是一种优良的染色剂,利用生物膜内的物质能够与结晶紫结合的性质,通过染色的方法可以对 BBF 进行定量检测。主要步骤如下:将 1% 的结晶紫溶液浸润于已形成生物膜的假体表面,静置 30 min 后用清水洗去多余染料,并去除多余水分;用乙醇或乙酸溶液溶解附着于生物膜上的染料;用分光光度计或酶标仪测定所得有色溶液在 590 nm 处的吸光度^[8]。此方法步骤简单操作快捷,多用于试管法及 96 孔板法形成的生物膜的检测^[9]。

2.3 生物膜的细菌培养 传统的细菌培养方法作为感染检测的“金标准”,却无法适用于 BBF 的检测,较为传统的假体感染的病原学诊断主要依靠假体周围组织和抽取滑液标本中分离得到的病原菌,从至少两个组织或关节液样本中培养鉴定出致病菌被推荐为假体周围感染临床诊断的一条主要标准^[10]。但培养的阳性率却不理想,临床上经常存在所取标本在常规培养或营养培养基中都培养不到细菌,抗生素的使用及低毒性细菌引起感染都有可能出现这样的情况。但更重要的原因是,细菌以生物膜的形式黏附于假体表面,一般采集的滑液和组织标本中都没有生物膜中的细菌,故常规培养技术很难得到理想的结果。对于这部分患者,临床医生往往只能通过经验性治疗以控制感染,没有针对性的用药,治疗效果也不好,也容易发生感染的复发,加重了患者的痛苦。因此,寻找有效诊断引起假体感染的生物膜内病原菌的方法,是目前实现假体感染针对性治疗,继而减少患者痛苦的关键步骤。

有研究证明,超声处理假体后细菌培养、延长细菌培养时间或反复细菌培养均可明显提高检测结果的阳性率^[5],有研究者对 120 个关节假体进行了超声处理后细菌培养和常规培养,其中前者有 26 例发现了细菌,而后者只有 5 例发现了细菌,从而首次证明了超声处理后细菌培养在假体感染病原菌诊断中的作用^[11]。在另外的 22 例可疑感染假体研究中,常规细菌培养发现感染 9 例,占 41%;延长细菌培养时间发现感染 14 例,占 64%;反复培养发现感染 19 例,占 86%^[12]。相关研究表明,对取出的感染的关节假体进行超声处理后对裂解液进行常规细菌培养,其敏感度高于普通细菌培养^[13-14]。因此,对生物膜进行超声波预处理,可提高细菌培养的阳性率及敏感性,从而提高 BBF 的检测率。

2.4 显微镜观测技术 显微镜观测技术可直接观测到细菌形态及内部结构,主要可以通过光镜、电镜、共聚焦显微镜及原子力显微镜进行观察。

2.4.1 光镜 高倍光镜下可直接观察到被革兰染色后的细菌,可以直接观测到细菌形态及生长模式。

2.4.2 电镜 电镜和光学显微镜相比,能够直接观察样品表面的结构,具有制备过程简单、样品的尺寸

大、图像的放大范围广、分辨率高、电子束对样品的损伤与污染程度较小等特点^[15]。因此主要利用电镜对生物膜的表面形貌和厚度进行观察。

2.4.3 激光共聚焦显微镜 激光扫描共聚焦荧光显微镜是以激光为光源,结合计算机和图像处理技术获得生物样品三维数据,主要用于动态观察活细胞结构及特定分子、离子的生物学变化等^[16]。激光共聚焦显微镜与电镜和普通光镜相比,具有很多优势:(1)共聚焦系统可提高图像分辨率,使传统视野的广度和深度得以明显改善;(2)可用于观察活细胞的结构;(3)可观察和分析样品的三维结构,尽可能保持标本的完整性,从而使结果更加接近真实情况。故而被认为是目前研究细菌较为理想的方法^[17]。此外,使用激光共聚焦显微镜,可以更为方便地对生物膜形成过程中的各种指标如生物膜的厚度、比表面积等进行动态监测^[18-19]。有研究利用共聚焦显微镜对处理后的髋关节假体表面进行观察,发现生物膜在假体表面的空间分布并不均匀,由几层细胞构成,厚约 3~45 μm ^[10]。

2.4.4 原子力显微镜 原子力显微镜主要通过微悬臂感受及放大悬臂上探针与受测样品原子之间的作用力来进行样品的检测,具有原子级的分辨率。与电子显微镜相比,原子力显微镜有很多优势:空间分辨率高,研究对象广泛(样品材料不受限制),样品制备简便,操作环境不受限制(既可以在真空,又可以在大气中进行),可以表现样品表面三维形貌等^[20]。

2.5 PCR 技术 PCR 技术由高温变性、低温退火及延伸等几步反应组成 1 个周期,循环进行,使微量的目的 DNA 得以迅速扩增,此技术具有产率高、特异度高、敏感度高、可重复及操作快速简便等优点,也因此迅速成为了分子生物学研究中应用最为广泛的方法之一,同时,PCR 技术还可用于疾病的诊断或任何有关 DNA、RNA 研究的地方。用 PCR 技术检测 BBF 可以缩短等待细菌培养结果的时间^[5],利用很少的 DNA 样品就可以进行基因扩增,从而检测亚型^[21]。DE MAN 等^[22]的研究表明,PCR 诊断关节感染的特异度很高,可达 100%,但敏感度低,约为 50%,而当 PCR 联合细菌培养时敏感度可提高至 67%。但是 PCR 技术仍然存在一定的缺陷,在临床研究中 PCR 技术不能筛选出已经使用敏感药物治疗后的致病菌,也不能检测出混合感染中的单个病原菌^[7],且容易因污染而导致假阳性^[23]。

2.6 荧光原位杂交技术(FISH) FISH 是根据已知特异的 DNA 序列,利用荧光标记的特异寡聚核苷酸片段作为探针,与环境基因组中靶 DNA 分子杂交,以实现已知基因或序列的染色体定位。其优点在于实验周期短、出结果快、特异性强、定位准确,FISH 可定位长度在 1 kb 的 DNA 序列,其灵敏度与放射性探针相当^[24]。在荧光原位杂交的基础上借助荧光显微镜可检测 BBF 中的菌量、空间形态分布及细菌 DNA^[25]。

3 小 结

BBF 的自身特性决定了其对假体感染诊断与治疗的影响,诊断感染而培养阴性,使临床医生无法采用针对性的抗菌治疗。同样,当面对无菌性松动和低毒性感染时,由于二者的治疗方法截然不同,因此正确诊断就显得尤为重要,但由于低毒性感染的病原菌具有侵袭性差而黏附能力较强的特点,对所取得的滑液和组织标本往往表现为培养阴性,因此治疗方法的选择方面就显得很困难^[26]。上述这些因素均会导致假体感染治疗不彻底,引起感染的复发。因此,寻找有效诊断引起假体感染的生物膜内病原菌的方法,是目前实现假体感染针对性治疗,继而减少患者痛苦的关键步骤所在。研究建立一种组合式检测流程以提高检测阳性率、指导关节感染的临床诊断就显得尤为重要。

参考文献

- [1] 郭国栋. 人工关节置换后感染假体细菌生物膜检测方法研究进展[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(4): 434-437.
- [2] 孙永, 周新社. 人工关节假体感染细菌生物膜诊断的研究进展[J]. 安徽医药, 2017, 21(9): 1570-1574.
- [3] 祝司霞. 细菌生物膜的结构及形成机制的研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 2015, 17(2): 115-117.
- [4] SINGH S, SINGH S K, CHOWDHURY I, et al. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents[J]. Open Microbiol J, 2017, 11: 53-62.
- [5] DONLAN R M. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.
- [6] 温绍霞, 孙竞. 细菌生物膜形成及相关耐药性治疗研究进展[J]. 海南医学, 2014(9): 1331-1333.
- [7] 田学东, 王曦光. 人工关节感染的实验室诊断研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(5): 973-977.
- [8] ABOU EL-KHIER N T, EL GANAINY AEL-R, ELGEIDY A, et al. Assessment of interleukin-6 and other inflammatory markers in the diagnosis of Egyptian patients with periprosthetic joint infection[J]. Egypt J Immunol, 2013, 20(2): 93-99.
- [9] 袁俊, 冯建民. 人工关节置换术后假体周围感染的病原学诊断研究进展[J]. 中华关节外科杂志, 2016, 10(4): 432-435.
- [10] WU P G, IMLAY J A, SHANG J K. Mechanism of escherichia coli inactivation on palladium-modified nitrogen-doped Titanium dioxide[J]. Biomaterials, 2010, 31(29): 7526-7533.
- [11] 郭国栋, 褚立涛, 郭亭, 等. 超声裂解法处理人工关节感染假体细菌培养敏感性与特异性的 Meta 分析[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(11): 1168-1172.
- [12] NEUT D, DIERCKX R L. Biomaterial-related Infections in orthopedic implants[M]. Biomaterials In Modern Medicine: The Groningen Perspective, 2015: 169-189.
- [13] HOLINKA J, BAUER L, HIRSCHL A M, et al. Sonica-

tion cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection[J]. J Orthop Res, 2011, 29(4): 617-622.

- [14] TRAMPUZ A, PIPER K E, JACOBSON M J, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection[J]. N Engl J Med, 2007, 357(7): 654-663.
- [15] 陈晶. 微纳米切削装置及实验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.
- [16] 陈景祥, 孙凤军, 刘松青, 等. 激光扫描共聚焦显微镜观察细菌生物膜形成的方法学研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 653-655.
- [17] ZHANG Z H, SUN X T, FENG A P. Formation capability of bacterial biofilm on titanium plate versus necrotic bone Characterization with confocal laser scanning microscope[J]. Chinese J Tiss Eng Res, 2012, 16(17): 3078-3081.
- [18] SHUKLA S K, RAO T S. Effect of calcium on staphylococcus aureus biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 103: 448-454.
- [19] MARIANI T, MUSIO A, FREDIANI C, et al. An atomic force microscope for cytological and histological investigations[J]. J Microsc, 1994, 176(Pt 2): 121-131.
- [20] 徐井华, 李强. 原子力显微镜的工作原理及其应用[J]. 通

化师范学院学报, 2013, 34(1): 22-24.

- [21] HADDAD B, OUSSEDIK S. The diagnosis of prosthetic joint infection[M]. Total Knee Arthroplasty: Springer International Publishing, 2015: 197-207.
- [22] DE MAN F H, GRABER P, LÜEM M, et al. Broad-range PCR in selected episodes of prosthetic joint infection[J]. Infection, 2009, 37(3): 292-294.
- [23] HULETSKY A, GIROUX R, ROSSBACH V, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 1875-1884.
- [24] 邓小宽, 张新宜, 田敏. 现代生物技术在分子微生物生态学中的应用[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2006, 27(4): 164-170.
- [25] BJARNSHOLT T, TOLKER-NIELSEN T, GIVSKOV M A, et al. Detection of bacteria by fluorescence in situ hybridization in culture: negative soft tissue filler lesions [J]. Dermatol Surg, 2009, 35(Suppl 2): S1620-1624.
- [26] NELSON C L, MCLAREN A C, MCLAREN S G, et al. Is aseptic loosening truly aseptic? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005(437): 25-30.

(收稿日期: 2018-01-20 修回日期: 2018-03-25)

• 综 述 •

恶性肿瘤患者输血与复发相关性的研究进展

梁金凤 综述, 韦赐秋 审校

(贵港市人民医院输血科, 广西贵港 537100)

摘要:目的 输血对于恶性肿瘤患者来说, 仍然是肿瘤治疗的重要支持手段之一。但几十年来, 输血与恶性肿瘤复发和转移的相关性一直有所争议。该文就近年来恶性肿瘤患者输血的相关研究报道, 探讨输血引发肿瘤复发转移的免疫机制、输血与恶性肿瘤预后的关系和恶性肿瘤患者的输血策略。

关键词:输血; 恶性肿瘤; 复发; 免疫机制; 输血策略

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.12.026

中图法分类号:R457.1+3

文章编号:1673-4130(2018)12-1498-04

文献标识码:A

恶性肿瘤患者机体慢性消耗, 以及病程中需要进行放疗、化疗和手术, 这些原因均可能导致贫血, 尤其是需做手术而血红蛋白(Hb) < 60 g/L 的肿瘤患者, 须将 Hb 提高至 70 g/L 以上^[1], 因此输血往往不可避免。但异体输血除了可能导致输血不良反应、输血传染病外, 还可能导致患者免疫抑制, 从而促进肿瘤的生长复发, 影响肿瘤患者的预后。但也有部分学者对上述观点持怀疑态度。因此, 输血对肿瘤患者的影响仍存在较大争议。本文拟从肿瘤患者血型基因特异性、输血引发肿瘤复发转移的免疫机制、输血与恶性肿瘤预后的关系这三大方面阐述输血对肿瘤患者免

疫及预后的影响, 并探寻合理的输血策略。

1 肿瘤患者与血型的相关性

某些肿瘤患者尤其是急性白血病患者可出现 ABO 血型抗原减弱或消失的现象, 使得血型难以确定, 而这种血型抗原改变的现象随着疾病的好转或缓解, 仍可恢复成原有血型。红细胞抗原改变, 引起其生物功能改变和疾病的发生也有相关性。A 和 B 抗原在某些组织早期发育中会消失, 但有时重新出现在恶性肿瘤组织上, 例如成人正常结肠组织中缺乏 A 和 B 抗原, 但在结肠癌组织中 A 和 B 抗原重新表达^[2]。目前, 国内外已有不少研究表明, ABO 血型抗原基因