

医学参考报

微生物学与免疫学专刊

Microbiology and Immunology

第七期 NO.07

基于多传感器色度纸快速鉴定产碳青霉烯酶和头孢菌素酶病原菌

【据《Analytical Chemistry》2022年6月报道】题：基于多传感器色度纸快速鉴定产碳青霉烯酶和头孢菌素酶病原菌（西班牙巴利阿里群岛健康研究所 Son Espases 大学医院 作者 Giulia Santopolo 等）

产 β -内酰胺酶细菌 (BLs)，尤其是产碳青霉烯酶和头孢菌素酶细菌，引起的医院感染是一个值得关注的问题。这些细菌菌株的表型检测在分析之前需要进行 72 h 培养，常常难以指导患者首次抗菌治疗方案的制定。目前基于聚合酶链式反应的检测组合可以在 1 h 内检测耐药基因，但价格昂贵且需要笨重的仪器。另外，可以将耐药菌株暴露于抗菌药物中并通过比色法或光谱学方法检测其水解度来检测 β -内酰胺酶活性，但这需要分离培养菌株，推迟了诊断时间。最近，通过过滤器或磁珠，可在无须培养的情况下检测到产碳青霉烯酶的病原菌，总检测时间低于 2.5 h。然而，这种方法每次检测只能检测到一种耐药机制。因此，迫切需要一种无须培养鉴定多种细菌耐药表型的方法。

西班牙巴利阿里群岛健康研究所 Son Espases 大学医院 Giulia Santopolo 等提出了一种多传感器，可以在 90 min 内识别携带不同类型 β -内酰胺酶的病原菌，而且不需要培养样本。研究人员使用阳离子聚合物 (PDDA) 修饰的 Whatman 6 级滤纸捕获细菌。通过向 Whatman 6 级滤纸中加入 10^7 CFU/ml 阴沟肠杆菌后对细菌细胞的观察试验证实，PDDA 修饰后的滤纸能够固定细菌细胞。之后研究人员用 PDDA 修饰的试纸开发了图 1 所示的多传感器。首先对产生不同类型的 β -内酰胺酶 (AmpC、CTX-M、KPC 或 VIM 和 AmpC 的组合) 的临床分离株进行了定性检测，选择了青霉素、头孢菌素类 (头孢噻肟) 和碳青霉烯类 (亚胺培南) 抗菌药物来评估医院感染中常见的不同 β -内酰胺酶活性，氯唑西林作为 AmpC 酶抑制剂，他唑巴坦分别作为 CTX-M 和 KPC 酶抑制剂加入抗菌药物溶液中。首先在预处理后，将样本和含 β -内酰胺酶抗菌药物

加入有 Whatman 纸的仪器中联合作用 1 h，Whatman 纸随后用 Brother MFC 1910 W 扫描仪拍摄，并通过使用 Adobe Photoshop 测量每个斑点较大区域内的平均像素强度来量化彩色信号。对产生不同类型的 β -内酰胺酶 (AmpC、CTX-M、KPC 或 VIM 和 AmpC 的组合) 的临床分离株进行了定性检测。药物的水解度通过 pH 指示器监测，当 pH 下降时该指示器变为黄色。同时检

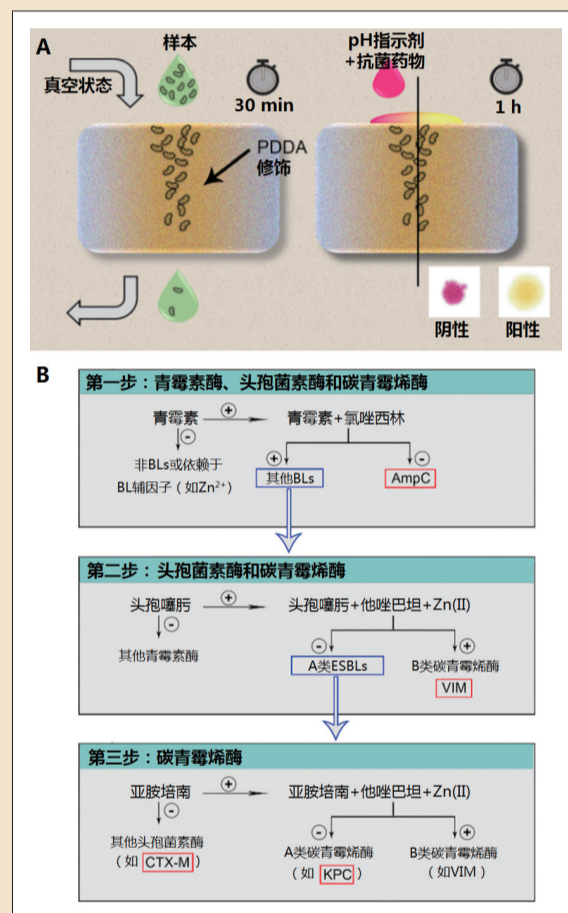


图 1 用于识别产生 β -内酰胺酶的病原菌的分析示意图

测 6 种抗菌药物和抑制剂 / 辅因子的组合：青霉素 (i)、青霉素 + 氯唑西林 (ii)、头孢噻肟 (iii)、头孢噻肟 + 他唑巴坦 + 锌 (iv)、亚胺培南 (v)、亚胺培南 + 他唑巴坦 + 锌 (vi)。并且同时进行了 6 个对照试验，以减去抗菌药物自发水解对信号的任何影响。在氯唑西林 (ii) 存在的情况下进行检测时，用青霉素 (i) 获得的黄色信号恢复为洋红。超广谱 β -内酰胺酶和碳青霉烯酶都不会被氯唑西林 (ii) 抑制，在他唑巴坦 (iii 和 iv) 不存在、头孢噻肟存在的情况下会产生黄色斑点。碳青霉烯酶 (KPC) 被选择性地鉴定，因为含有亚胺培南的斑点 (v) 显示出更清晰的颜色，而 ESBLs 在该斑点仍然是洋红。最后，该传感器可鉴定产 AmpC 酶和 VIM 酶的多重耐药分离株，其在没有锌的情况下与青霉素产生黄色，加入氯唑西林又转化为洋红 (i 和 ii)，而在添加锌和他唑巴坦的头孢噻肟 (iv) 试验中变为黄色。这些试验结果表明，即使在存在多种耐药机制的情况下，也可以使用该研究所提出的比色阵列来区分 β -内酰胺酶。不过应该注意的是，一些试验产生了颜色不均匀分布的斑点。如果信号没有被仔细量化，这可能会导致测量误差。

这种方法旨在区分 AmpC 酶、ESBL 酶 (如 CTX-M)、A 类碳青霉烯酶 (如 KPC) 和 B 类金属 β -内酰胺酶 (如 VIM) 的活性，该仪器系统也可根据抗菌药物的选择进行调节，并允许在与选择性酶抑制剂和 (或) 辅因子结合时识别特定亚类的 β -内酰胺酶。未来，传感器中的抗菌药物和抑制剂 / 辅因子的数量可能会扩大，以最大限度地提高灵敏度和改进分类。在批量购买时，滤纸和 PDDA 也很便宜，检测价格主要受抗菌药物使用的影响。这些特点使其成为帮助临床医生尽快开出适当治疗方案的理想选择，可以从根本上改变医院使用抗菌药物的方式。

(温州医科大学附属第一医院 杜欣 徐孟新 周铁丽 编译)

导读

- 慢性自发性荨麻疹患者肠道菌群变化及功能预测 2版
- EUCAST 快速药敏试验：快速鉴定血培养中的肠杆菌目细菌的抗菌药物敏感性 3版
- 预防婴儿 B 族链球菌侵袭性疾病的孕妇疫苗许可研究进展 4版
- RT-qPCR 联合细胞内流式细胞术检测流行 SARS-CoV-2 变体 5版
- 外泌体介导的 miR-486-5p 低表达通过促进上皮-间质转化进程引起胃癌细胞的腹膜转移 6版
- SARS-CoV-2 特异性 T 细胞与感染和疫苗接种 7版
- 通过诱导自噬逆转抗体诱导的甲状腺细胞凋亡 8版

阴道微生物菌群易位与子宫健康的损伤和保护有关

【据《Nature Communications》2021年12月报道】题：阴道微生物菌群易位与子宫健康的损伤和保护有关 (中国科学院 作者 Jinfeng Wang 等)

阴道和子宫微生物菌群对女性生殖系统的健康起着重要作用。子宫腔和阴道生理上相邻，因此，从理论上讲，在阴道定植的细菌有机会通过宫颈向上迁移到达子宫。尽管某些研究推测宫内感染是由阴道细菌上行易位到子宫腔，但是这两个身体部位之间微生物的交流联系目前尚不清楚，以及当阴道细菌转移到上生殖系统时，子宫内微生物菌群的调节和疾病的诱导机制尚未明确。中国科学院 Jinfeng Wang 等分析了 145 名女性的阴道和子宫微生物

样本，深度挖掘公共数据并结合动物实验，描述了女性生殖道中的微生物易位及其在调节

子宫健康中的作用。研究发现，随着年龄的增长，阴道和子宫微生物菌群也发生同步变化。

研究还发现，将阴道细菌的某些菌株移植到大鼠的阴道中可

下转第 7 版

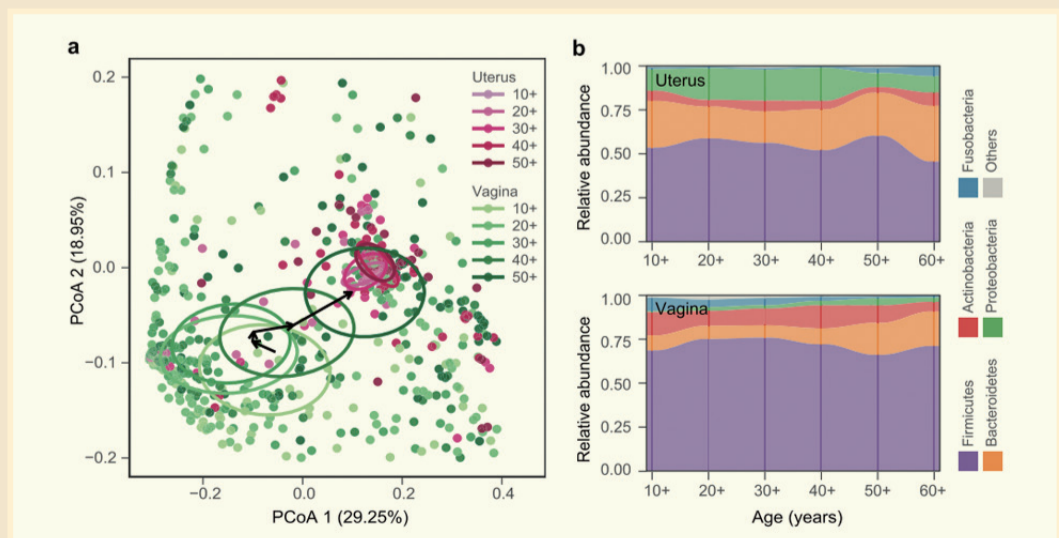


图 1 子宫和阴道微生物群随着年龄增长而变化

慢性自发性荨麻疹患者肠道菌群变化及功能预测

【据《JMB》2021年5月报道】慢性自发性荨麻疹患者肠道菌群变化及功能预测（西安交通大学第二附属医院皮肤科 作者Xinyue Zhang等）

慢性荨麻疹（CU）是最常见的皮肤病之一，发病率高，15%~25%的人口患有该病。CU包括慢性自发性荨麻疹（CSU）和慢性诱导性荨麻疹（CIndU），可由冷、热、压力等引起。CSU是一种需要排除其他类型才能诊断的CU，50%的CSU患者对抗组胺治疗反应不佳。先前的研究暗示了CU患者的微生物群变化，到目前为止，还没有关于CSU患者肠道微生物群组成和结构变化的全面研究。西安交通大学第二附属医院皮肤科 Xinyue Zhang 等对此进行了探讨。

该研究纳入了在西安交大第二附属医院就诊的20例临床诊断为CSU的患者，收集粪便样本，首次利用了新的高通量DNA测序技术，表明CSU患者与正常对照组相比，在群落组成和预测的基因功能方面存在差异。结果表明，通过操作分类单元（OTU）聚类，共收集872个OTU，其中457个为共享OTU，151个为健康对照（N）特有，264个为CSU患者（P）特有，

共享OTU分别占N组和P组的75.16%（457/608）和63.38%（457/721）。然后，根据KEGG数据库对OTU进行注释。细菌beta多样性分析显示健康对照组（N）和患者（P）的显著聚类（ $P < 0.001$ ），表明两组之间肠道微生物群组成不同。与健康对照相比，患者的变形杆菌门（ $P=0.04$ ）、芽孢杆菌纲（ $P < 0.05$ ）、肠杆菌目（ $P=0.03$ ）、肠杆菌科（ $P=0.03$ ）

丰度增加，巨型菌属和戴阿利斯特菌属减少（ $P < 0.05$ ）（图1）。基于Greengenes数据库中的群落结构，利用PICRUSt1从参考细菌基因组预测不同类群的功能分布，研究者筛选出患者组（P）和对照组（N）之间具有统计学显著差异的通路。参与碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、辅助因子和维生素代谢以及核苷酸代谢的代谢酶在患者粪便微生物群中更为丰富（图2）。

综上所述，Zhang等通过对20例CSU患者粪便样本中的肠道菌群进行测序，初步描述了CSU患者肠道菌群的基本组成。在比较了20名正常对照的肠道微生物群后，发现CSU患者肠道菌群的相对丰度存在显著差异，尤其是在其他疾病中异常的变形杆菌门、芽孢杆菌纲和肠杆菌目。进一步的功能预测证实，这些不同的微生物群组成可能导致功能障碍。该研究证实了CSU中的肠道微生物群失调，并预测肠道微生物群可能通过代谢异常影响CSU的发病机制。进一步研究有助于确定CSU有意义的微生物标志物和治疗靶点。

（西安医学院第一附属医院检验科 何天娇 李卓 编译）

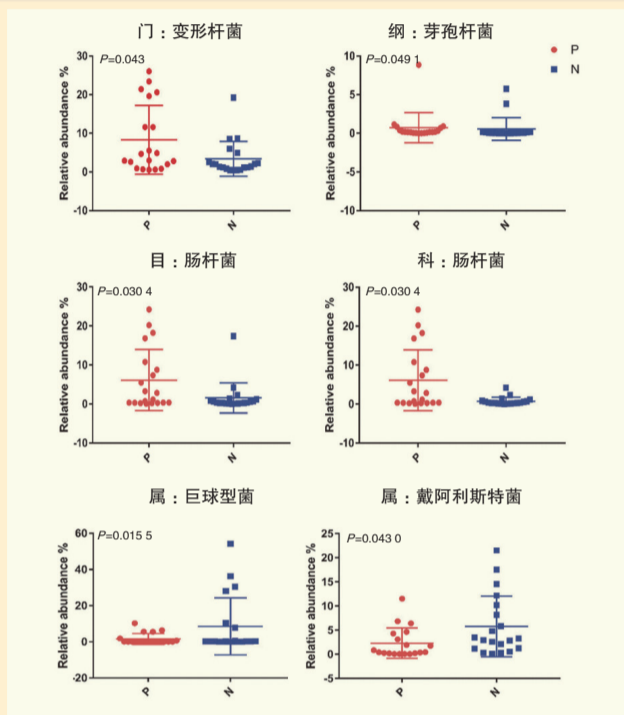


图1比较CSU患者（P）和对照组（N）在不同细菌水平下的相对丰度

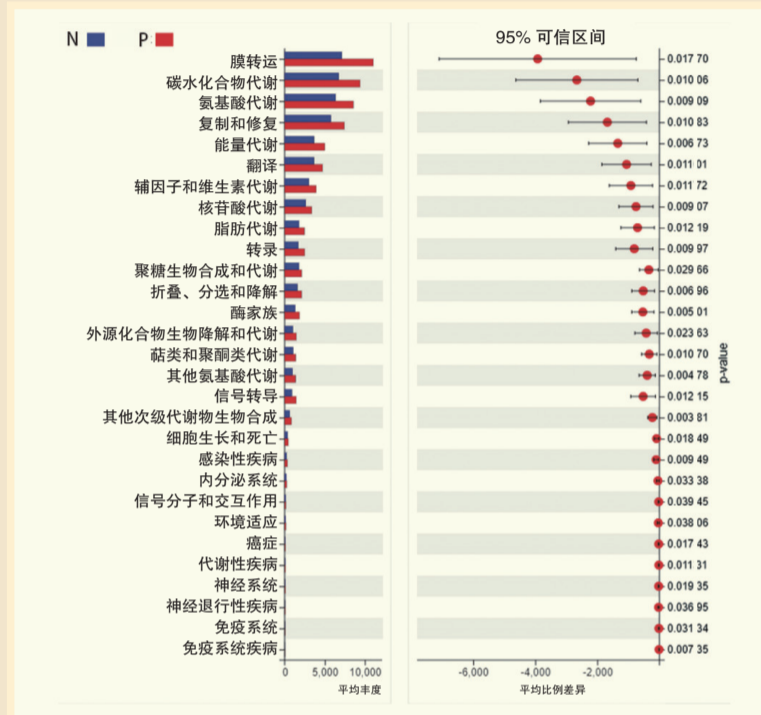


图2患者组（P，红色）和健康对照组（N，蓝色）之间的差异通路功能分析

第十三届中国临床微生物学大会暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛征文通知

由医学参考报社主办，中国微生物学会临床微生物专业委员会、宁波大学医学院附属医院和医学参考报微生物学与免疫学专刊承办的第十三届中国临床微生物学大会暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛[国家级继续医学教育项目：2022-01-06-021(国)]定于2022年11月下旬举行学术会议。届时将邀请国内相关领域的知名专家做专题报告，同时面向从事临床微生物学和免疫学相关专业工作者征集论文。

文章不超过5000字，研究论文不超过3000字，需附中文摘要（不超过500字）。③英文稿件，需附中文题目、摘要、关键词等。④在校研究生论文（来稿请注明“在校研究生投稿”的字样）。⑤论文最后请注明作者姓名、职称、单位、科室、联系地址、联系电话和E-mail等，来稿一律不退、自留底稿。⑥只收电子稿件，投稿邮箱 clinmicrobiolab@vip.sina.com。

一、征文内容及要求

1. 征文内容

细菌分类与鉴定、厌氧菌、分枝杆菌、支原体和脲原体、螺旋体、衣原体、放线菌、病毒、真菌、寄生虫、微生物致病机制、微生物耐药、微生物基因分型、微生物保藏、微生物感染诊断与治疗、微生物学质量控制、医院感染、流行病学、感染免疫、肿瘤免疫、生殖免疫、移植免疫、自身免疫、免疫缺陷和基础免疫学等相关内容。

2. 征文要求

①投稿应未在有关杂志上公开发表、未在其他会议上交流，文责自负。②综述

3. 征文截止日期

2022年11月13日征文截止；稿件一经录用，将另函通知。

二、优秀论文评选

论文经初选后，通过专家匿名评审的方式，评选出大会优秀论文和优秀研究生论文一、二、三等奖、优秀奖，对获奖论文作者颁发证书，同时获奖论文将择优进行报告展示。

三、联系方式

联系人：励琰如、吕宝霞

联系电话：0574-87035856，18106645856

医学参考报

理事长兼总编辑：巴德年 社长：魏海明
副理事长兼副总编辑：曹雪涛等 副社长：吕春雷
理事会秘书长：周赞 副社长：周赞
社址：北京市西城区红莲南路30号红莲大厦B0403
邮编：100055 总机：010-63265066
网址：www.yxckb.com

微生物学与免疫学专刊

主编：谷海瀛
副主编：陈海 关秀茹 王谦 徐小平
于波海 张仁利 张展 赵虎 赵林清
常务编委：（按姓氏笔画排序）
邓少丽 伍广安 刘辉 刘新波 许颖
何成彦 罗光华 周铁丽 赵雅 赵明才
胡继红 黄芳 鲁颖
编委：（按姓氏笔画排序）
王丽 方莹 叶嗣颖 刘卫平 刘庆中
闫东辉 邹翠美 张芳琳 陈宇宁 罗振华
金炎 金凤玲 孟冬娅 赵建平 胡晓梅
宫殿军 姚立琼 崔建娇 梁红萍 魏取好

青年编委会
副主任编委：雷迎峰 秦琴 石瑛 张艳梅
编委：（按姓氏笔画排序）
于晓丽 王月玲 韦传东 申艳娜 冯永辉 吕欣
朱雄 朱晓彤 刘燕 麦文慧 李卓 李昕
李寅雁 时景伟 何英 宋江勤 张利军 张昭勇
邵春红 武有聪 罗亮 罗春玉 金大智 周柯
周爱萍 赵广会 胡斌 胡同平 俞娟 徐和平
高冬梅 郭大文 黄宇 黄轶 黄筱钧 惠燕霞
傅锦坚 穆廷杰
编辑部主任：谷海瀛
编辑：吕宝霞 励琰如
投稿邮箱：mmmi@vip.sina.com

EUCAST 快速药敏试验:快速鉴定血培养中的肠杆菌目细菌的抗菌药物敏感性

【据《Journal of Clinical Microbiology》2022年3月报道】题: EUCAST快速药敏试验检测对分离自中国的血流感染肠杆菌目常用抗菌药物敏感性的评价(上海复旦大学中山医院 作者Yuzhang Shan等)

血流感染(BSI)指病原微生物侵入血液循环,引起脓毒症、脓毒性休克、器官功能障碍等一系列全身性感染疾病,其中大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌检出率较高。治疗血流感染的关键是及时诊断并进行早期抗菌治疗。目前国内BSI微生物诊断的工作流程包括三个阶段:血液培养、菌种鉴定和抗菌药物敏感性检测,耗时约3天,这在一定程度上延误了临床治疗,因此亟须一种快速、经济、准确的方法来检测血培养样本中肠杆菌目细菌的抗菌药物敏感性。为此欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(EUCAST)开发了一种快速抗菌药物敏感性试验(RAST)方法,其可在8h内获得血培养阳性标本对抗菌药物的敏感性结果,并已为欧洲国家鉴定肠杆菌目对13种不同抗菌药物敏感性提供了实际指导。上海复旦大学中山医院Yuzhang Shan等首次评估了RAST方法对中国BSI相关微生物的抗菌药物敏感性的检测性能,并测定了头孢他啶/阿维巴坦对肠杆菌目的潜在折点。

研究选取了72株肺炎克雷伯菌和43株大肠埃希菌,使用RAST方法检测其对6种国内常用抗菌药物的敏感

性,包括阿米卡星(30 μg)、环丙沙星(5 μg)、左氧氟沙星(5 μg)、亚胺培南(10 μg)、美罗培南(10 μg)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(1.25/23.75 μg),以及最近引入的头孢他啶/阿维巴坦(30/20 μg)。将2.5 ml的菌液和5 ml羊血加入含有30 ml TSB肉汤的需氧瓶中,使细菌终浓度达到10 CFU/ml,报阳后10 h将125 μl肉汤涂布接种于MH琼脂,贴上药敏纸片,35℃培养6 h和8 h时测量抑菌圈直径。参考EUCAST RAST指南用于确定血培养样本中细菌的敏感和耐药分离株的折点。参考

CLSI指南,使用VITEK 2确定菌株的MIC值。

RAST方法的结果分析:将RAST所获结果与VITEK 2所得结果相比较,计算两种方法敏感(S)和耐药(R)的分类一致率(CA)、次要错误(mE)、重大错误(ME)、非常重大错误(VME),若RAST结果处在参考折点不能区分范围内(ATU)时不予分类。对于分类为ME和VME的菌株,再将RAST结果同标准纸片扩散法进行比较,若结果一致则认为结果可信。试验结果显示,与VITEK 2所得结果相比,使用RAST方

法检测实验菌株对上述6种常见抗菌药物的敏感性具有很高的致一致性。对于肺炎克雷伯菌,6 h和8 h总体CA分别为98.6%和100%,mE分别为0.2%和0.7%;大肠埃希菌的6 h和8 h总体CA均为100%,mE分别为0%和0.4%。虽然总体ME和VME很小(分别为1.1%和1.5%),但对某些药物存在较大误差,如大肠埃希菌对甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的ME为11.1%,肺炎克雷伯菌对阿米卡星的VME为15.4%。此外关于头孢他啶/阿维巴坦的潜在折点,通过该方法培养8 h的折点如下,大肠埃希菌—S ≥ 19 mm, ATU 16~18 mm, R ≤ 15 mm;肺炎克雷伯菌—S ≥ 16 mm, ATU 14~15 mm, R ≤ 13 mm。与VITEK 2所得结果相比,8 h时两种细菌的CA ≥ 90%,高于可接受范围。

综上所述,RAST是临床检测抗菌药物敏感性的一种可靠而实用的方法,与传统分离培养鉴定的流程相比,RAST节省了分离培养的时间和缩短了药敏鉴定的培养时长。该研究中RAST的主要误差来自阿米卡星的错误及处于ATU范围内的结果。但在实际工作中会进行多种药物的敏感性检测,因此这种影响似乎不大。目前国内仍然依靠传统的分离培养和商业化方法检测血流感染病原体,RAST在国内有广阔的应用前景,用于血流感染的快速诊断,可以更早地为临床提供可靠的检测报告。

(温州医科大学附属第一医院
王悦 冯络珠 周铁丽 编译)

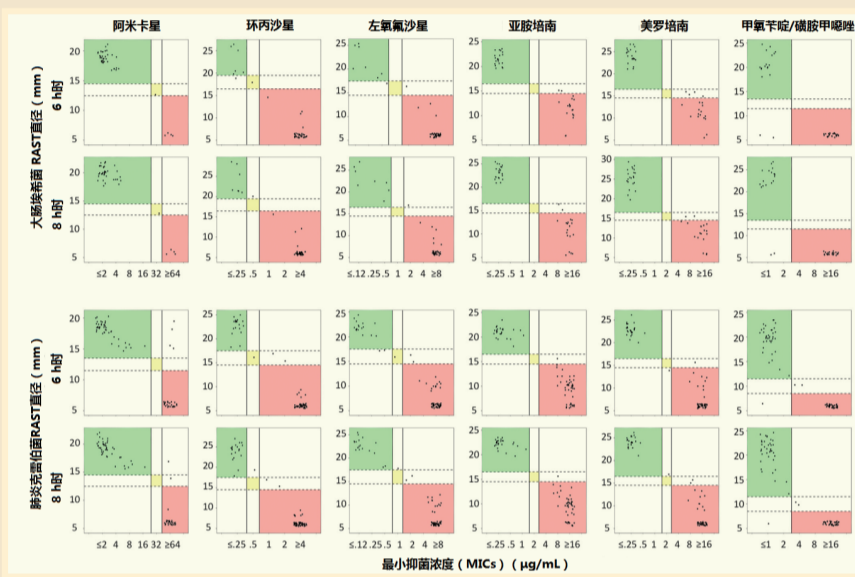


图1 6 h和8 h时大肠埃希菌(上图)和肺炎克雷伯菌(下图) RAST直径与商业抗菌药物敏感性试验的MIC高度一致
注:垂直实线表示MIC折点,水平虚线表示RAST区直径的折点;绿色和红色区域分别表示敏感和耐药的分类一致;黄色区域为技术上不确定划分的区域(ATU)

利用机器学习自动判读抗菌药物敏感性试验结果的应用验证

【据《Journal of Clinical Microbiology》2022年3月报道】题: Antilogic——一种用于临床微生物学抗菌药物敏感性试验自动判读的新型监督机器学习软件:对三种常见分离细菌的概念验证(法国艾克斯-马赛大学 作者Andriamiharimamy Rajaonison等)

抗菌药物敏感性试验(AST)对于调整经验性抗菌药物治疗、改善临床结果至关重要,但执行起来既耗时又复杂。纸片扩散法是一种广泛使用的依赖生长的AST法,用于测试微生物对抗菌药物的敏感性,但这可能需要耗时48 h。而解释AST的结果又是一项复杂的任务,因为它需要了解细菌生物学、每种受试药物的药效学和耐药性的流行病学。因此,开发一种有助于临床微生物学领域更快、更容易的诊断方法显得尤为重要。

目前已经有测量个体抑菌直径、解释表型并通过一系列问题和建议指导生物学家解释耐药谱的专家系统(Adagio和SIRScan 2000系统);在同一仪器上集成了微生物鉴定和液

体介质上的AST系统(VITEK 2);带有实时视频成像器的孵化器、可以在短短3.5 h内检测到耐药性的系统;从3 500个表型集合中自动返回耐药谱的系统等各种专家系统。然而,这些系统仍然严重依赖于人类的干预,需要生物学家专业的投入。法国艾克斯-马赛大学Andriamiharimamy Rajaonison等人开发了一个机器学习软件——Antilogic,该软件能够在不需要任何人工干预的情况下读取AST图像,并基于临床验证符合欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(EUCAST)规则的抗菌谱数据库自动解释AST。该软件可以直接根据细菌的抗菌谱图片预测细菌的抗菌药物耐药性曲线,而不需要人工干预直径测量或决策过程,并且能够表达不确定性,如果对其预测有疑问,则会通知生物学家。其一般工作流程如图1所示。

研究人员收集了2016年1月1日至2021年1月7日法国马赛医院公共援助中心(AP-HM)实验室的抗菌谱图片,试

图达到每个表型至少100张照片,来建立图像数据库。他们选择了三种实验室常见菌种:大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌,对16种抗菌药物进行了AST测试,分析了两个系列的8种抗菌药物,分别命名为TOP(小组中的前8种抗菌药物)和BOTTOM(小组中的后8种抗菌药物),根据EUCAST折点规则判读为耐药或敏感。研究人员利用一个包含18 072张抗菌谱图片的数据库对Antilogic进行了培训,给软件配

置了一个主动学习周期,让其对诊断中的常规照片执行预测,并将新照片纳入改进初始数据库中。最后他们使用一个由5 100个随机选择的图像组成的专用评估集,针对这5 100张抗菌谱的验证集对Antilogic进行了盲测,测试了该软件在分类、误差分析、不确定性量化等方面的性能。结果显示,Antilogic对其预测的约85.98%(4 386/5 100)结果是确定的,表型方面与验证集的总体一致性达到97%(16 855/17 281)。评估了差错严重程度:重

大错误1.66%(287/17 281),非常重大错误0.80%(136/17 281)。实施不确定度量后,重大错误和非常重大错误的错误率分别降至0.80%(114/13 451)和0.42%(51/13 451)。这表明,Antilogic的误差率较低,并具有表达不确定性的能力。

综上,当涉及抗菌谱的判读时,Antilogic软件是一种可行的替代专家系统的方法。主要专家系统的供应商已经开发了基于规则的人工智能(AI)系统,该系统指导生物学家确认某些表型的存在(例如,协同存在)。本文的方法可以从生物学家对抗菌谱的最终判读中学习,因此,模型随着数据的增加而自动改进,而不需要用户执行额外的步骤。该方法的局限性在于该软件在很大程度上依赖于数据量和质量。此数据库的大小仍然小于其他医学数据集。未来的版本可能使用包括菌落纹理和颜色在内的额外特征,以及采用深度学习方法以自动提取特征。

(温州医科大学附属第一医院
周慧静 石士艺 周铁丽 编译)

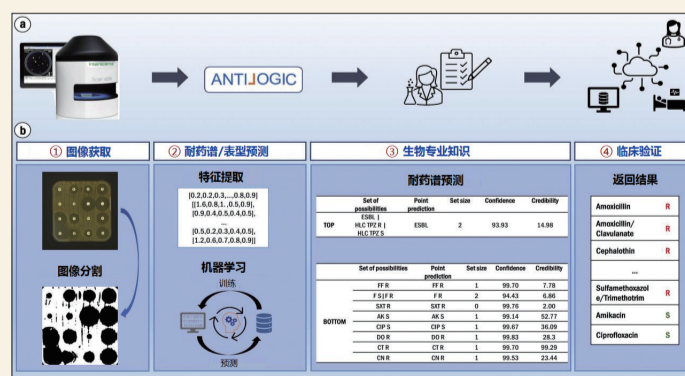


图1 Antilogic临床预测工作流程

a. SCAN4000设备拍摄图像经Antilogic服务器反馈结果后由专家核查验证后用于临床;b.详细过程:Antilogic提取表型特征、主动学习并更新数据库,输出预测的关于抗菌药物的数据

预防婴儿B族链球菌侵袭性疾病的孕妇疫苗许可研究进展

【据《Human Vaccines & Immunotherapeutics》2022年5月报道】题：预防婴儿B族链球菌侵袭性疾病的孕妇疫苗许可研究进展：不同方案的讨论（美国辉瑞公司 作者Judith Absalon等）

B族链球菌（*Streptococcus agalactiae*, GBS）是一种革兰阳性球菌，通常定植于人体直肠、阴道。当机体免疫功能受损时，GBS可引起侵袭性疾病，表现为败血症、脑膜炎及肺炎等。新生儿出生一周内发生的GBS感染称为早发性感染（early onset disease, EOD），而出身后1周到3个月的感染称为迟发性感染（late onset disease, LOD）。一项关于2000—2017年GBS侵袭性感染的流行病学meta分析表明，新生儿GBS全球发病率（EOD与LOD总和）为0.49/1 000活胎，而死亡率为8.4%。另一项研究显示，在存活的婴儿中，约19%患有神经系统后遗症，包括认知延迟、脑瘫、失明或听力损失等。

GBS感染除对婴儿造成严重影响外，还可通过孕妇感染直接影响腹中发育的胎儿。例如，GBS感染引起孕妇绒毛膜炎而致胎儿早产或死胎。在高收入国家进行的meta分析数据表明，侵袭性GBS感染的孕妇发病率为0.38/1 000次妊娠，略高于目前美国婴儿GBS EOD发病率（0.25/1 000）。保守估计，1%~4%的死胎归因于GBS感染。同时，产妇GBS定植会增加21%~85%的早产风险。

生产时预防性使用抗生素（intrapartum antibiotic prophylaxis, IAP）已将美国新生儿GBS感染EOD发病率从1990年约1.7‰降至2010年约0.26‰。毫不夸张地说，IAP在预防EOD方面非常有效，21世纪初实现大幅度降低，随后趋于平稳。而余下恒定发病率表明，筛查后及IAP干预并非百分之百有效。其原因可能包括筛查时漏检和假阴性培养结果等。此外，筛查、IAP对LOD的发病率没有显著影响。而由于美国大多数婴儿脑膜炎病例与GBS LOD有关，因此GBS所致脑膜炎的发病率同样没有下降。最后，广泛使用预防性抗菌药物引发耐药性的影响令人担忧。

而GBS特异性免疫为预防婴儿GBS感染提供了一种替代方案。靶向细菌荚膜多糖的疫

苗，在预防有荚膜结构细菌所致感染方面有不少成功经验。然而，有文献研究表明婴儿主动免疫效果并不明显，因为GBS感染风险最高的时段是出生后前3个月。相对的，孕妇GBS特异性免疫能产生足量、有效的保护性抗体（包括抗荚膜多糖IgG），通过胎盘从母体主动转运到婴儿，这是一种强有力的保护性机制。如图1A所示，母体IgG抗体与新生儿Fc受体结合并通过胎盘转运。新生儿Fc受体，对IgG1

GBS定植率，也为预防、减少婴儿感染。

依据CPS不同可将GBS划分为10个血清型（I a, I b~IX），共由五种多糖成分构成，即葡萄糖、半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰神经氨酸（唾液酸），以及VIII型中的鼠李糖。在全球范围内，血清型I a、III是EOD和LOD的主要致病类型，贡献了余下病例主要由I b、II、IV和V血清型所致。

两种不同配方的GBS6接种情况。研究揭示，健康成年人对GBS6有良好的耐受性，更重要的是，GBS6所有实验剂量水平和配方中都能引发强烈的免疫反应。机体诱导产生的IgG平均几何浓度在接种2周后达峰，持续时间至少1个月，然后逐渐下降，免疫反应在接种后至少持续6个月。

为了支持GBS6临床研究，美国辉瑞公司开发并验证了一种基于Luminex平台IgG检测方法，以同时检测GBS6

性，并缓解迄今为止阻碍制定国际公认的保护滴度的限制。

关于孕妇GBS6疫苗许可申请方案有下述三种申请途径（图2），不涉及“动物规则”。美国FDA疫苗与相关生物产品咨询委员会认为，免疫学终点法可解释GBS疫苗的有效性并支持美国许可证的申请，特别是正在进行的血清学标准化研究中利于这一情况的进行。

备选方案1：使用免疫学终点法来申请加速批准，随后进行有效性实验予以申请传统许可证。此方案需在已引入疫苗且高发病率地区进行有效性研究，并将其与产科及妊娠监测系统联系起来，监测发病情况，作为有效性的衡量标准。此种方案的弊端为：虽然加速批准方案可以实现早期许可，但不能保证其使用。而在低收入、中等收入国家地区在批准使用疫苗之前通常需提供有效性数据，且进行有效性研究需在疫苗批准使用之前。

备选方案2：为免疫原性分析结合有效性研究，来获取早期的许可。与方案1一样，这种方法最重要的好处之一为GBS疫苗将快速获得许可，并可供孕妇及高危婴儿使用。但此方法最显著的缺点为需招募足够的受试者以达到期望临床疗效。

备选方案3：如果无法建立或商榷免疫抗体保护阈值，则可以通过进行临床三期实验—安慰剂随机对照试验获得GBS疫苗的许可证。具体通过比较疫苗或安慰剂在降低婴儿侵袭性GBS感染率方面的效果来确定疗效。同样，这项研究需要在高GBS发病率的国家进行。此研究需要对婴儿及母亲随访至少6~12个月，具有高挑战性和风险，需投入大量资金，很可能导致疫苗使用延迟。

虽然经过几十年的研究，人们对GBS CPS的免疫生物学功能有了深刻认识，GBS多糖结合疫苗—GBS6也将问世。但是，GBS6疫苗获得许可资格这一过程非常复杂，且可能需很多年才能完成。基于已建立的肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌及流感嗜血杆菌b新疫苗批准许可经验得出：疫苗功效研究的免疫阈值的许可申请方案是可行的。

综上所述，使用安全有效的疫苗预防影响婴幼儿的GBS侵袭性感染指日可待。

（广州中医药大学深圳医院（福田）赵海娟于波海 编译）

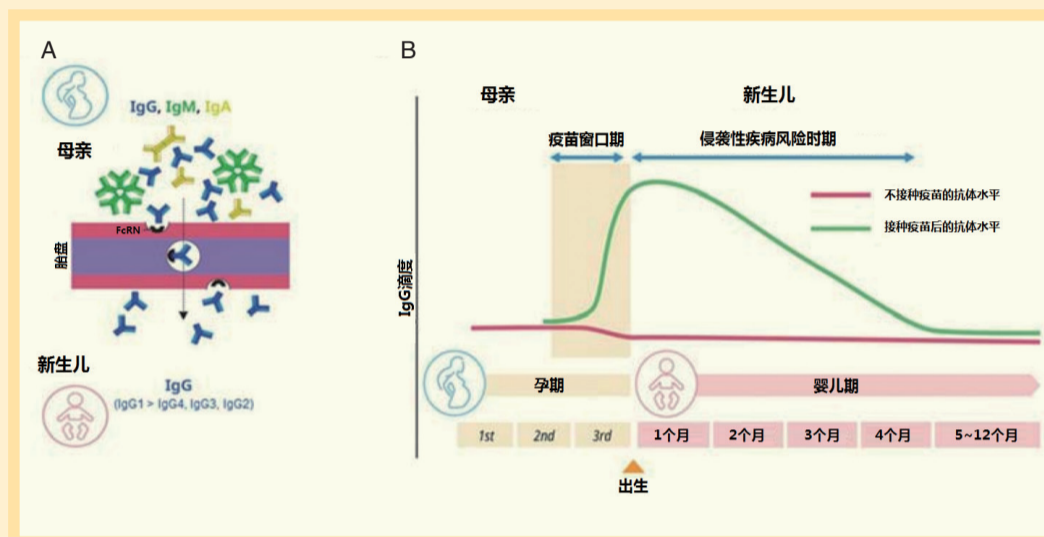


图1 母亲接种GBS疫苗，婴儿体内免疫球蛋白示意图

A. 孕妇IgG抗体与新生儿Fc受体（FcRN）结合并通过胎盘转运至胎儿体内；B. 母亲接种疫苗可诱导或提高母体抗体水平，保护新生儿在出生后的前几个月免受GBS感染

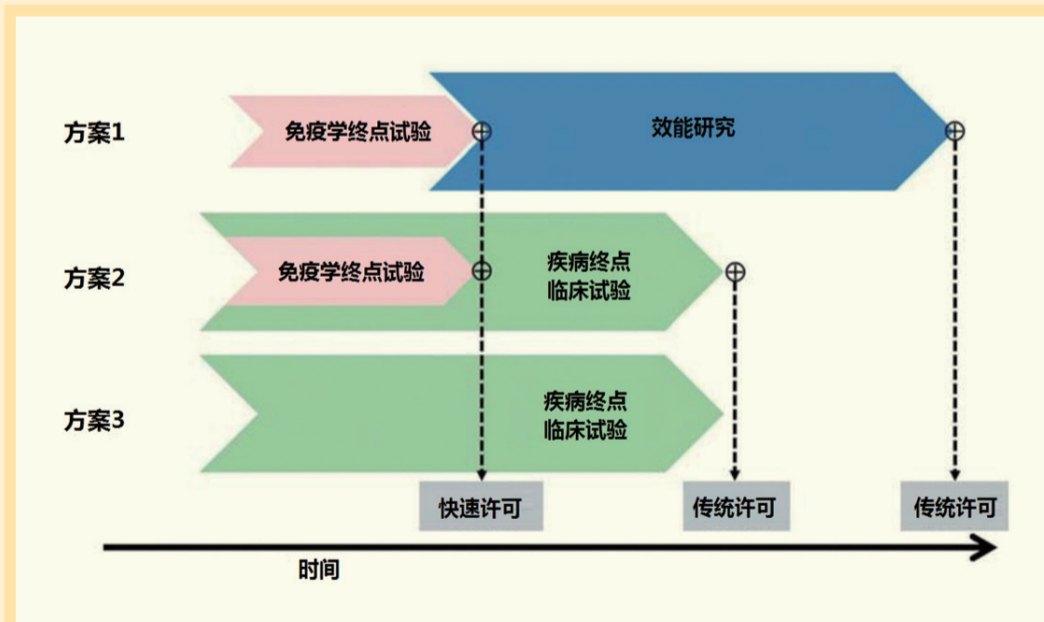


图2 孕妇GBS6疫苗许可申请方案一览

亚类具有选择性偏好，其次为IgG2、IgG3和IgG4。母亲接种疫苗后，婴儿在出生时和出生后一段时间体内持续存在足量抗体水平（图1B）。

其中，多糖结合疫苗最适合这一目的，成年人免疫系统已发育成熟，且通常在单次免疫后即表现出强大、快速的免疫反应和功能活性。有研究揭示：接种GBS荚膜多糖（the capsular polysaccharide, CPS）结合疫苗既能减少母亲

鉴于在全球范围内预防GBS侵袭性感染在公共卫生领域的需要，自20世纪80年代以来，GBS疫苗的开发一直是一个活跃的研究领域。目前，辉瑞公司Judith Absalon等正在开发一款六价GBS CPS结合疫苗（GBS6），它覆盖了目前最广泛致GBS感染的血清型。2017年，GBS6在美国进行I/II期剂量递增临床试验。实验评估了18~49岁健康成年男女的三种不同剂量水平、

疫苗诱导机体产生不同的类型的血清抗体。该试验由比尔·梅琳达·盖茨基金会资助且被GBS试验标准化联盟采用。本研究的主要目标是开发一组质控血清，并对每种血清型的IgG抗体浓度进行统一评估。这种新的标准化IgG检测方法，将有助于更好地了解GBS CPS特异性血清IgG抗体浓度与婴儿感染的相对风险之间的关系。重要的是，它促使血清流行病学研究之间具有可比

RT-qPCR 联合细胞内流式细胞术检测流行 SARS-CoV-2 变体

【据《BioTechniques》2022年6月报道】题：RT-qPCR 联合细胞内流式细胞术检测流行 SARS-CoV-2 变体（比利时鲁汶大学 作者 Emiel Vanhulle 等）

自 2019 年 12 月以来，COVID-19 对全球健康构成了严重威胁，并对全球经济产生了巨大影响。SARS-CoV-2 是一种新型 β 属冠状病毒，为 COVID-19 的病原体。目前，针对 SARS-CoV-2 的疫苗已取得巨大成功，但 Omicron 变体的高传染性警示了人们研发新型有效的抗病毒药物的迫切性。

SARS-CoV-2 的病毒基础和抗病毒研究不仅依赖于病毒复制的细胞分析，还依赖于对病毒感染细胞和释放的病毒颗粒的准确检测。但细胞病变效应（CPE）监测和评分具有主观性，比利时鲁汶大学 Emiel Vanhulle 等通过 RT-qPCR 客观量化了病毒感染和病毒粒子的产生，并利用细胞内流式细胞术补充了对各种 SARS-CoV-2 变体的检测。

研究者制备了目前流行的武汉株、20A.EU2 株、Alpha 株、Beta 株、Gamma 株、Delta 株、Omicron 株共 6 种 SARS-CoV-2 变种病毒原液，选用 20A.EU2 感染 Vero E6 细胞，在实验组培养液中加入来自 Sino Biological 的 SARS-CoV-2 突变特

异性抗体 R001 或 R007，培养后观察细胞病变作用，结果显示与 S 蛋白 RBD 结合的 R001 中和型抗体几乎完全阻止了 CPE 的发展，较 R007 非中和型抗体更具抗病毒感染的保护作用（图 1）。

为了能够更加灵敏、准确地表现病毒感染程度，需要在病毒基础研究的背景下，完善一套基于细胞水平的检测技术。研究者优化了一种双重 RT-qPCR 反应体系，设计 N2 探针为 FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG (BHQ1)，E 探针为 HEX-ACACTAGCC (ZEN) ATCCTTACTGCGCTTCG (3IABkFQ)，选取针对 SARS-CoV-2 (20A.EU2) 基因组的保守区域的引物序列，提取受感染细胞培养液上清中总 RNA，同时扩增病毒 E 基因和 N 基因，以非特异性附着于细胞的病毒残留量为病毒产量的检测下限。结果显示，Vero E6 细胞成功感染了 SARS-CoV-2，并在上清液中释放出了新的感染颗粒（图 2A），而在培养液中加入 R001 抗体的实验组中基因拷贝数低于检测下限，结果与 CPE 相同，不仅表明其显著的抗病毒作用，也证实了双重 RT-qPCR 反应体系的可靠性。为了验证该体系的稳定性，研究者分别检测了感染 6 种不同 SARS-CoV-2 变体的 Vero E6 细胞

的病毒产量（图 2B），均具有统计学意义，证明了在不同变体中报告的许多突变几乎不影响该体系引物/探针结合位点，双重 RT-qPCR 反应体系具有实用意义。

为进一步优化检测方法，排除因病毒感染的死细胞及细胞碎片的干扰，使其适用于目前流行的所有 SARS-CoV-2 变体，研究者通过流式细胞技术在单细胞水平分析病毒进入 Vero E6 细胞后胞内 N 蛋白的表达情况来判断细胞感染情况。首先用 SARS-CoV-2 (20A.EU2) 感染 Vero E6 细胞，选择特定的时间点搜集细胞，对胞内 N 蛋白进行染色标记及检测。结果显示，孵育 24 h 后，30% Vero E6 细胞被感染，

48 h 时约 87% 的细胞被感染。接着分别对 6 种 SARS-CoV-2 变体不同浓度感染细胞 N 蛋白进行检测，流式细胞仪结果显示，对于大多数变体，高浓度的病毒输入细胞使 CPE 增强，更多的细胞裂解死亡，低浓度输入则细胞寿命更长，感染比例相对更高，同时也可发生多轮病毒感染，导致感染细胞的绝对数量增加。这对于确定异质细胞群中哪些细胞易受 SARS-CoV-2 感染非常有价值，也体现了细胞内流式细胞术应用广泛性。

进一步分析流式细胞仪数据结果，根据 N 蛋白表达水平高低可区分出两个感染细胞亚群。研究者将 Vero E6 细胞在高浓度病

毒培养液中培养 4 h，使病毒有足够的进入细胞但又未开始复制，对照组加入 R001 抗体作为病毒进入细胞的抑制剂，流式结果显示实验组有 18.9% 的 N 低表达细胞。延长孵育时间至 24 h，细胞中病毒开始复制，N 高表达细胞增多至 41.8%，新的病毒粒子从受感染的细胞中释放出来，进入未感染细胞，产生新的 N 低表达细胞。而对 R001 阻止病毒进入细胞，几乎没有细胞被病毒感染，证实了结果的可靠性。细胞内流式细胞术可以区分处于病毒复制早期（N 低表达）或晚期（N 高表达）的感染细胞亚群，作为新型候选抗病毒药物研发的切入点，用以阐明药物作用机制，区分病毒进入抑制剂和阻止病毒复制的病毒聚合酶抑制剂。

综上所述，该研究优化了一种双重 RT-qPCR 反应体系，能够量化大多数 SARS-CoV-2 变种感染细胞的病毒复制及感染颗粒释放能力，而细胞内流式细胞术检测感染细胞内 N 蛋白技术补充了单细胞水平的检测技术，适用于所有 SARS-CoV-2 变种，能够区分感染细胞亚群，用以研发新型抗病毒药物，不仅对 COVID-19 具有研究意义，相信对于其他病毒学研究同样有价值。

（广州中医药大学深圳医院（福田）邵立群 编译）

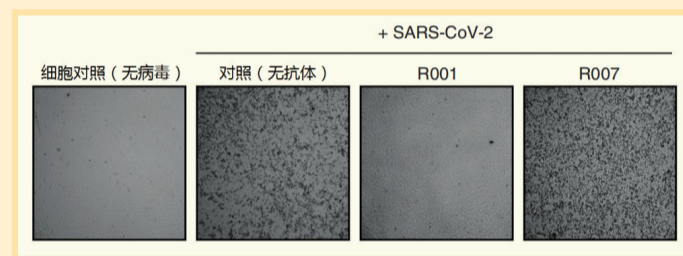


图 1 SARS-CoV-2 病毒对 Vero E6 细胞的细胞病变效应

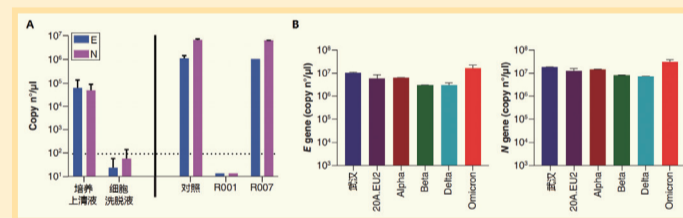


图 2 双重 RT-qPCR 分析 SARS-CoV-2 病毒产量
A. 图 1 实验所使用的 20A.EU2；B. 六种受关注的 SARS-CoV-2 变体

基于 CRISPR/Cas12a 系统的 SARS-CoV-2 RNA 快速检测

【据《Nature Biomedical Engineering》2022年3月报道】题：基于 CRISPR/Cas12a 系统的 SARS-CoV-2 RNA 快速检测（武汉大学中南医院 作者 Shuhan Lu 等）

规律成簇的间隔短回文重复序列（CRISPR）/CRISPR 相关蛋白（CRISPR/Cas）最初被发现具有基因编辑（gene editing）功能，并进行较为深入的研究。然而随着对 Cas 蛋白结构研究的不断深入，CRISPR/Cas 系统除了应用于基因编辑外，逐渐开始应用于碱基编辑（base editing）、转录调控（transcriptional regulation）、分子诊断（molecular diagnostics）、基因突变（gene mutation）、单碱基突变疾病（pathogenic single nucleotide polymorphisms, SNPs）的治疗等方面。CRISPR/Cas 介导的碱基编辑系统（base editing）是基于 CRISPR/Cas 蛋白识别靶向序列功能构建的碱基编辑器，目前主要有胞嘧啶碱基编辑器（cytosine base editor, C 转化为 T、G 或 A）、腺嘌呤碱基编辑器（adenine

base editor, A 转化为 G）和 prime editing（N 转化为 N，其中 N 代表 A、T、C 和 G 任意一种碱基）等，实现了部分基因碱基之间的转换。CRISPR/Cas 另外一个重要的应用是其分子检测功能，因其具有简单、快捷等优势，近年来得到了快速的研究与发展，目前已采用 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12、CRISPR/Cas13 和 CRISPR/Cas1 系统构建了一系列分子诊断平台，其中典型的代表有 SHERLOCK（specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking）与 DETECTR（DNA endonuclease-targeted crisp trans

porter）等。

CRISPR/Cas 被分为不同的类型：① CRISPR/Cas12 系统中的 Cas12 蛋白含有 RuvC 酶活性区域，识别过程中只需要 crRNA，CRISPR/Cas12 在 gRNA 的引导下，CRISPR/Cas12/crRNA 识别 DNA 靶标上游的 PAM 序列，激活 CRISPR/Cas12 对靶向双链 DNA 进行切割，激活了 CRISPR/Cas12 的 collateral 切割活性。② CRISPR/Cas13 为针对 RNA 的一种核酸识别系统，首先在 gRNA 的引导下 CRISPR/Cas13 与 crRNA 序列形成复合物，识别 PFS 序列

和靶向 RNA 序列后，crRNA 间隔区片段特异性地与靶标 DNA 碱基配对形成三元复合物，Cas13 针对靶向 RNA 序列进行特异性的剪切，同时也激活了 Cas13 蛋白 collateral 切割活性。③ CRISPR/Cas14 是一种碱基编辑系统，Cas14 系统成熟的 crRNA（crRNA/tracrRNA），在 gRNA 的引导下靶向识别核酸 ssDNA 序列，并且识别靶向序列的过程中不要的 PAM 序列，CRISPR/Cas14/gRNA 识别靶向序列后，形成靶向序列 CRISPR/Cas14/gRNA 的三元复合物，激活了 CRISPR/Cas14 靶向切割 ssDNA 和非靶向切割 ssDNA 能力。

基于上述 CRISPR/Cas12 系统切割的特点和优势，武汉大学中南医院 Shuhan Lu 等选取 Cas12a 建立了 SARS-CoV-2 的检测方法（sPAMC）。首先灭活临床样本，通过转录（RT）获得 SARS-CoV-2 病毒的 cDNA，然后通过重组酶体外扩增技术（RPA）扩增目标区域 DNA 序列。设计目标 gRNA 序列，分别通过荧光素和生物素标记非

靶向序列的核苷酸，其中 Cas12a 在 gRNA 的引导下，识别靶向核酸序列，激活 Cas12a 的靶向切割活性和非靶向切割活性。然后通过紫外光 8-15 min 或者通过侧向流试纸条技术进行检测，大约需要 25 min 即可实现 SARS-CoV-2 的快速检测（图 1）。侧向流试纸条试验的最低检出限为 120 拷贝/μl，检测时间为 5-15 min。通过对 104 份 SARS-CoV-2 阳性鼻咽拭子样本（48 份未提取样本和 56 份提取样本；Ct 值介于 18.1-35.8）及 100 份 SARS-CoV-2 阴性样本进行验证，sPAMC 的敏感性为 94.2%，特异性为 100%，可检测到 Ct 值为 35.8 的样本。

综上所述，与传统 RT-PCR 方法相比，基于 Cas12a 建立的 SARS-CoV-2 核酸快速检测方法 sPAMC，灵敏度和特异性分别为 94.2% 和 100%，检测时间大约需要 20 min，因此该检测方法具有简单快速和灵敏度高等优势。

（西安医学院第一附属医院检验科 周建 李卓 编译）

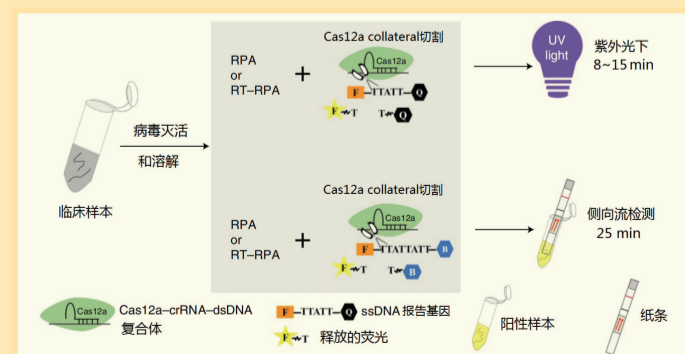


图 1 基于 Cas12a 的 SARS-CoV-2 病毒核酸检测方法

外泌体介导的 miR-486-5p 低表达

通过促进上皮-间质转化进程引起胃癌细胞的腹膜转移

【据《World Journal of Surgical Oncology》2021年8月报道】题：外泌体介导的miR-486-5p低表达促进上皮-间质转化从而致胃癌细胞的腹膜转移（浙江大学医学院附属第二医院 作者Xian-Ming Lin等）

我国每年新增约40万胃癌患者，约占全球胃癌发病总数的42%，其高居不下的发病率与环境、遗传因素相关，其中包括遗传、饮食、健康状况、吸烟及饮酒等。腹膜转移是胃癌最常见的转移和复发部位，一旦发生腹膜转移，患者的中位生存期仅为4个月。因此，深入研究胃癌细胞腹膜转移的病理机制对晚期胃癌患者的诊治具有重要的临床意义。近年来，多项数据表明外泌体（exosomes, Exos）在参与细胞间通讯、调节细胞生物功能和促进多种疾病进程中发挥重要作用，特别是肿瘤研究领域的大量报道证实外泌体促进肿瘤疾病的发展进程。

现有数据发现胃癌细胞释放的外泌体可能触发了腹膜间皮细胞中上皮-间质转化（EMT）的进展，发挥促胃癌细胞的转移。为了深入研究其病理机制，浙江大学医学院附属第二医院Xian-Ming Lin等分别从人非转移性胃癌细胞GC9811及GC9811-p细胞（具

有高腹膜转移潜能）分离出外泌体Con-Exo和PM-Exo，并将两种外泌体与人腹膜间皮细胞HMrSV5进行共培养。结果显示，与Con-Exo及PM-Exo共培养后，HMrSV5的细胞形态发生了明显改变，梭形细胞比例增多。已有研究提出EMT过程启动时，上皮细胞中的细胞连接会断开、相关配体蛋白被降解，且极性蛋白复合物的表达受到抑制，导致上皮细胞的形态由经典的卵石形转变为梭形（间充质细胞的形态）。此时，细胞完整性破坏、黏附力下降、迁移力增强，促进了肿瘤细胞从原发病灶向远端迁移。而该研究证实，用两组外泌体分别处理HMrSV5细胞后，细胞形态明显改变为梭形，提示EMT开始发生；且PM-Exo组梭形细胞比例高于Con-Exo组，说明PM-Exo诱导的EMT作用更为显著。

EMT相关标志物的表达可以反映EMT进程。在EMT进程中，上皮细胞关键蛋白E-cadherin转化为间充质细胞标志物N-cadherin，并伴随N-cadherin表达上调和E-cadherin表达下调。且两者之间转化受相关转录因子如Snail家族和 α -SMA的调控，这些转录因子抑制E-cadherin的表达，促进N-cadherin的表达。研究人员通过免疫荧光染色观

察发现，PM-Exo及Con-Exo两个处理组中 α -SMA和Snail1的表达显著升高，而E-cadherin的表达均受到抑制（ $P < 0.05$ ）；且PM-Exo组细胞的 α -SMA、Snail1及E-cadherin的表达改变较Con-Exo组更显著（ $P < 0.01$ ，图1A）。

miRNAs促进EMT进程的调控作用已被广泛报道，例如miR-406通过作用靶点Snail2抑

制EMT进展，上调E-cadherin的表达；miR-204直接通过靶向TGF- β 受体2，抑制SMAD2和SMAD3的磷酸化，进而抑制EMT，提高胃癌细胞对5-氟尿嘧啶的敏感性等。作者对两种外泌体进行了miRNA检测，发现与Con-Exo相比，PM-Exo中miR-486-5p及miR-132-3p显著降低，而miR-132-5p显著上调；qRT-PCR方法同样验证

了这三个miRNA的表达（ $P < 0.01$ ，图1B）。为了验证其作用机制，作者合成miRNA模拟物阴性对照及miR-486-5p、miR-132-3p、miR-132-5p模拟物并转染HMrSV5细胞，结果发现与对照相比， α -SMA的表达水平在miR-486-5p或miR-132-3p转染组中被显著抑制，而在miR-132-5p组中显著提高；其中miR-486-5p诱导的差异表达最显著（ $P < 0.01$ ，图1C）。该结果表明miR-486-5p和miR-132-3p可能是EMT进程的抑制因子。

最后，作者用Cys标记的miR-486-5p（Cys-miR-486-5p）转染GC9811-p细胞，发现miR-486-5p可通过GC9811-p细胞释放的外泌体进入HMrSV5细胞。而摄入miR-486-5p后HMrSV5中SAMD2、CDK4和ACTR3的表达水平被显著抑制，且ACTR3表达也显著下调。

综上，胃癌细胞可能通过下调释放的外泌体中miR-486-5p，改变SAMD2、CDK4和ACTR3等因子表达，从而破坏上皮与间皮细胞之间转化的平衡。下一步，作者将研究miR-486-5p作用的直接靶点，并通过检测N-cadherin的表达来验证上皮-间充质细胞的转变过程。

（西安医学院第一附属医院 检验科王妍李卓编译）

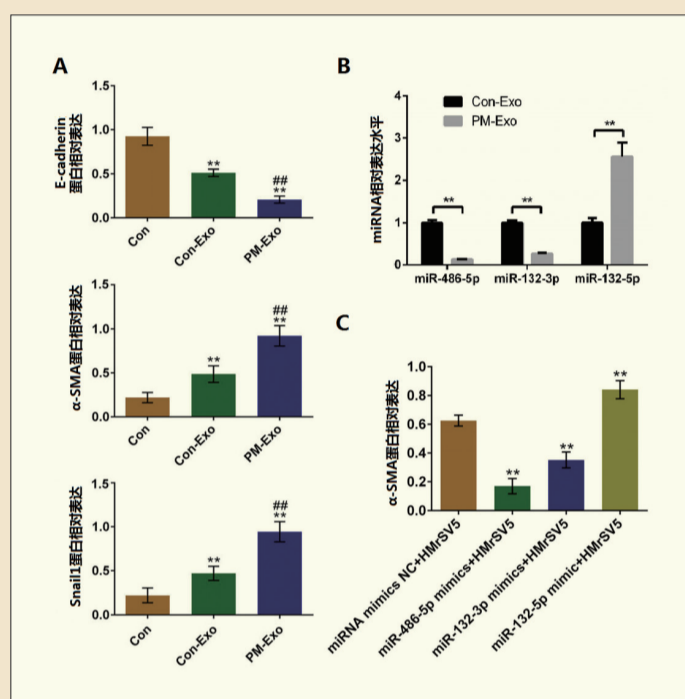


图1 A. 采用免疫印迹法检测E-cadherin、 α -SMA和Snail1在处理后的HMrSV5细胞中的表达（** $P < 0.01$ vs 对照，## $P < 0.01$ vs Con-Exo）；B. 采用qRT-PCR法检测miR-486-5p、miR-132-3p和miR-132-5p的表达水平（ $P < 0.01$ vs Con-Exo）；C. 采用免疫印迹法检测转染了不同miRNA的HMrSV5细胞中 α -SMA的表达水平（** $P < 0.01$ vs miRNA模拟物阴性对照）

肠道菌群失调引发免疫反应加速肝细胞癌进展

【据《Journal of Immunology Research》2021年10月报道】题：肠道菌群失调引发免疫反应加速肝细胞癌进展（首都医科大学医学微生物学教研室 作者Nan Zhang等）

肝细胞癌（HCC）在全球癌症死亡原因中排名第三，但人们对其潜在机制知之甚少。近年来，越来越多的证据表明肠道菌群失调与肝癌发生发展密切相关。

有研究发现，除菌群失调外，肠道通透性与肝细胞癌亦有关。与健康人相比，肝癌患者的肠道通透性显著升高。微生物易位在肝硬化中的作用已经得到了很好的研究，但在肝细胞癌中尚无。

因此，首都医科大学医学微生物学教研室Nan Zhang等对此进行了研究，旨在评估74名不同肝癌分期的男性患者菌群失调、肠道损伤和微生物易位情况，同时检测炎症和免疫反应的细胞因子水平。

研究人员将74例中国男性肝癌患者分为早期（ $n=19$ ）、中期（ $n=37$ ）和晚期（ $n=18$ ）组，分别称为巴塞罗那临床肝癌0+A期、B期和C+D期。收集双份粪便和血浆样本，通过16S rRNA基因测序分析微生物组成和概况；采用酶联免疫吸附试验（ELISA）测定肠道损伤标志物再生胰岛衍生蛋白3 α （REG3 α ）和微生物易位标志物可溶性CD14

（sCD14）、脂多糖结合蛋白（LBP）、肽聚糖识别蛋白（PGRPs）的水平；采用发光法测定血浆中20种细胞因子和趋化因子。

74例男性肝癌患者平均年龄61.00（53.00~65.00）岁。其中早期组0期7例、A期12例，中期组B期37例，晚期组C期8例、D期10例。其中37例为乙型肝炎病毒携带者，其余为丙型肝炎病毒携带者。

早期组、中期组和晚期组的OTU数分别为322 \pm 68、314 \pm 76和303 \pm 66。随HCC进展程度，可观察到微生物物种和Chao1指数降低，Shannon指数和Simpson

指数也显著下降。结果表明，OTUs变化与HCC进展平行相关。

早期、中期和晚期组双歧杆菌科丰度显著降低（分别为3.52%、1.55%和0.56%， $P=0.003$ ），肠球菌科丰度显著升高（分别为1.6%、2.9%和13.4%， $P=0.022$ ）。

晚期组患者的肠道损伤增强。晚期组血浆REG3 α 水平（17 830 \pm 3 257 pg/ml）显著高于早期组（11 591 \pm 2 388 pg/ml， $P=0.025$ ）和中期组（10 881 \pm 2 298 pg/ml， $P=0.023$ ）（图1A）。晚期患者血浆微生物易位标志物水平升高；晚期组血浆sCD14水平（1 504 \pm 174 ng/ml）高于早期组（1 148 \pm 100 ng/ml， $P=0.048$ ）和中期组（1 115 \pm 53 ng/ml， $P=0.046$ ）（图1B）。中期组LBP水平（3 984 \pm 412 ng/ml）和晚期组（4 037 \pm 911 ng/ml）高于早期组（2 818 \pm 488 ng/ml， $P=0.035$ 和0.025）（图1C）；晚期组PGRP水平（20.01 \pm 1.17 ng/ml）显著高于早期组（13.41 \pm 1.62 ng/ml， $P=0.018$ ）（图1D）。

IFN- γ 、IL-4、IL-12p70、IL-13

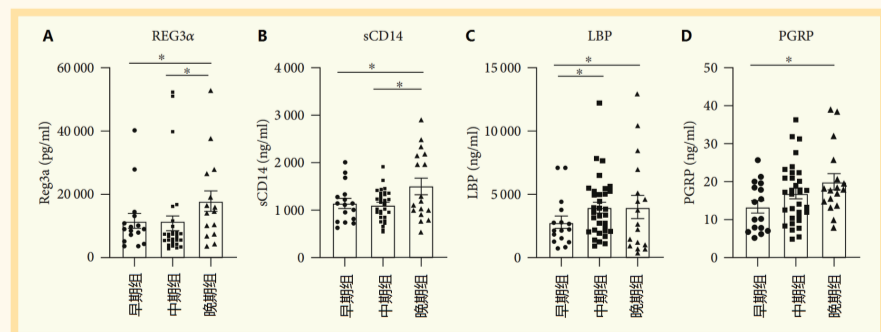


图1 HCC进展患者的肠道屏障完整性标志物和血浆微生物易位标志物的水

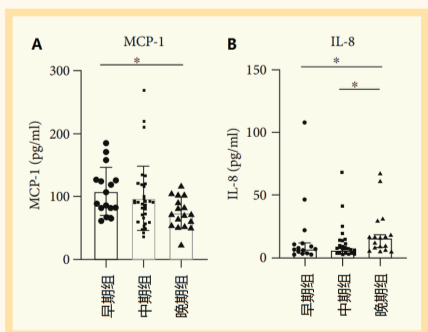


图2 HCC进展期患者血浆炎症标志物水平对比

SARS-CoV-2 特异性 T 细胞与感染和疫苗接种

【据《Cellular & Molecular Immunology》2021年9月报道】
题：SARS-CoV-2特异性T细胞与感染和疫苗接种（杜克-新加坡国立大学医学院 作者Antonio Bertoletti等）

在病毒感染过程中，抗体和T细胞共同作用防止病原体传播，并清除病毒感染的细胞。病毒特异性T细胞在新型冠状病毒（SARS-CoV-2）感染中的保护作用（或）病理作用一直是COVID-19患者和接种疫苗者的研究重点。杜克-新加坡国立大学医学院Antonio Bertoletti等回顾了SARS-CoV-2特异性T细胞在患者和接种者中发挥的功能。

与许多其他病毒感染一样，感染者可以通过协调激活免疫系统的先天性和适应性成分，有效控制SARS-CoV-2。由抗IFN- α 自身抗体产生增加介导的IFN- α 功能受损与严重的COVID-19病例有关，而能够控制感染且没有严重症状的个体能够迅速产生病毒特异性抗体和T细胞反应。局部或全身病理改变的严重程度和持续时间可能与病毒载量或免疫反应直接相关。了解T细胞是否与保护或发病机制相关，对于确定当前疫苗如何工作和提供保护至关重要。

研究表明，SARS-CoV-2特异性T细胞和B细胞反应的快

速诱导与病毒控制有关。针对不同SARS-CoV-2蛋白特异性的CD4和CD8 T细胞和B细胞的分析表明，适应性免疫的所有成分的协调存在与有限的疾病严重程度相关。相反，在老年人中观察到体液免疫和细胞免疫的不协调激活，而他们更容易出现重症。

SARS-CoV-2 特异性 T 细胞的保护作用

Tan等调查了一些有症状的急性SARS-CoV-2感染患者从疾病发作到康复期间病毒学和免疫学参数的动态变化。他们对呼吸道中的SARS-CoV-2病毒RNA进行定量，同时，对抗体和循环T细胞、各种结构蛋白

（NP、M、ORF3a和刺突）和非结构蛋白（ORF7/8、NSP7和NSP13）进行分析。早期诱导分泌IFN- γ 的SARS-CoV-2特异性T细胞仅存在于轻症和加速病毒清除的患者中（图1）。另一项研究表明，刺突特异性抗体和中和抗体的早期诱导与病毒控制和轻症相关。

最近，从对不同免疫缺陷或接受特异性免疫抑制治疗的患者的研究中得出了SARS-CoV-2特异性T细胞保护作用的间接证据。例如，丙种球蛋白缺乏症患者在完全康复前仅出现轻微的COVID-19症状。在体液反应降低和B细胞缺乏的血液病患者中，CD8 T细胞反应强的

患者表现出改善的生存率。

接下来，Bertoletti等探讨了由感染或通过接种疫苗诱导的记忆T细胞在提供保护，免受后续感染或疾病控制方面的作用。

接种疫苗后的 SARS-CoV-2 特异性 T 细胞

针对SARS-CoV-2的不同疫苗制剂的开发和实施证明，启动病毒特异性免疫反应可以预防SARS-CoV-2感染和减轻COVID-19的严重程度，一些数据显示疫苗诱导的特异性T细胞在保护中的重要性。例如，对最初的BNT162b2疫苗剂量后的体液和细胞免疫的分析表明，在第10天检测到大量的刺突特异性T细胞和抗原结合，但没有中和抗体（图2）。中和抗体仅在第二十天开始出现高滴度，并在第二次剂量后增加。BNT162b2疫苗功效的临床试验表明，在第一剂接种后大约10天就开始了对于有症状性疾病的保护。因此，中和抗体并不是保护的唯一相关因素。与康复期患者一样，刺突特异性T细胞可能在减少病毒复制方面发挥了重要作用，从而限制了感染的致病性。

疫苗诱导的 SARS-CoV-2 特异性 T 细胞的异质性

mRNA疫苗诱导刺突特异性T细胞，优先产生IL-2和IFN- γ ，并识别刺突的不同区

域。Tan等发现，在接种疫苗后3个月，刺突特异性T细胞的平均数量与SARS-CoV-2感染后相似时间在康复期患者中检测到的数量相当。值得注意的是，刺突特异性T细胞在不同的疫苗接种者中不仅在特异性方面而且在定量方面都是高度异质的。另外有研究发现，无论采用何种检测方法，刺突特异性T细胞的数量至少会变化1个对数值（即每百万个CD4或CD8 T细胞有200~300个点或2 000~3 000个点）。这种变异不仅在未接种疫苗的个体中发现，在那些已经被SARS-CoV-2感染的个体、80岁以上疫苗接种者和接受免疫抑制治疗的个体中均有发现。

综上所述，Bertoletti等讨论了CD4和CD8病毒特异性T细胞在SARS-CoV-2感染过程中的重要作用。另一方面，大规模疫苗接种活动引起的感染流行病学的改变及不同疫苗总体上取得的惊人成功，要求专家们更好地评估用于管理COVID-19大流行所需的保护相关性因素。T细胞研究可能通过收集精确的功能性和定量数据，指导未来疫苗接种活动的管理，这有望将SARS-CoV-2感染转变为对整个世界的轻微扰动。

（辽宁省抚顺市中心医院
检验科王焕成 鲁颖 编译）

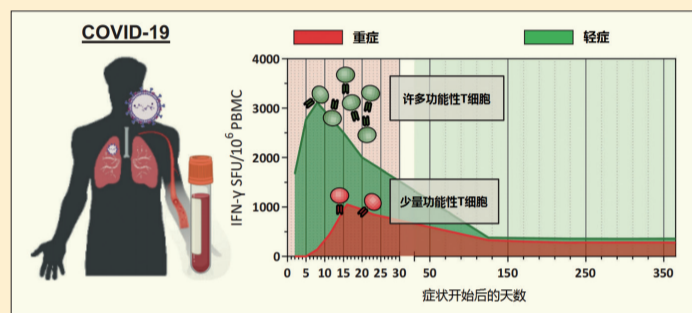


图1 SARS-CoV-2 特异性 T 细胞的动力学

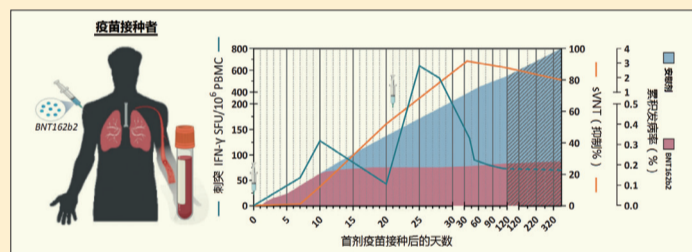


图2 接种 BNT162b2 疫苗后，刺突特异性 T 细胞和中和抗体反应示意图

上接第 1 版

诱导或减少类似子宫内膜炎的症状，并验证了某些阴道细菌对子宫内膜的损害或保护作用。

研究者招募了 145 名年龄在 19~71 岁的女性作为第一组研究对象，其中 106 人至少经历过一次流产，其中 95 人的分娩方式不同（阴道分娩 72 例，剖宫产 23 例）。从每个受试者身上采集阴道和宫颈样本，对 16S rRNA 基因 V3~V4 区域进行扩增并测序。结果表明，子宫和阴道微生物菌群都会随着年龄的增长而发生变化（图 1）。在子宫腔，最年轻的女性表现出最高的 α 多样性，随着年龄的增长，多样性略有下降。然而，在阴道中，微生物多样性和均匀度随着年龄的增长而逐渐增加。同年龄组个体间微生物群的群体差异表现出随年龄增长的初始增长模式，然后逐渐减少，子宫腔比阴道明显变化较小。具体来看，20 岁及以下的年轻女性具有最高的个体间相似性。相比之下，41~60 岁的

女性具有最高的个体间差异。不同年龄组的个体之间微生物群的 BC 距离显示，子宫微生物组逐渐偏离年轻人，差异性随着年龄

的增长而积累，高龄（60 岁以上）妇女在子宫微生物组中表现出最大的差异。相比之下，阴道微生物组早期出现变化，在 41~60 岁

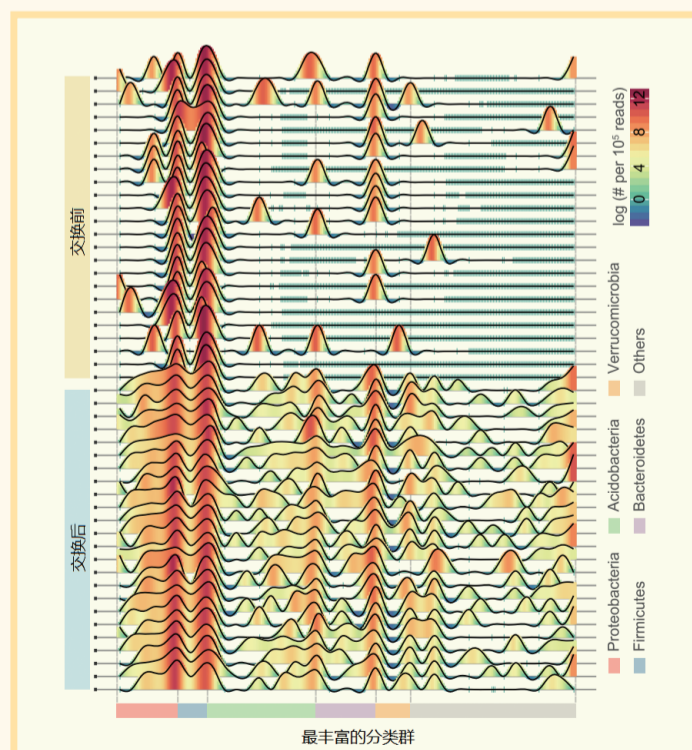


图2 大鼠交换阴道微生物后，子宫微生物群多样性和结构发生改变

的女性中差异最大。

为了研究与年龄相关的细菌群落变化对子宫健康的可能影响，研究者比较了 71 名患有慢性子宫内膜炎的女性志愿者和无子宫内炎症（健康对照组）之间微生物组的差异，评估子宫和阴道微生物菌群失调与慢性子宫内膜炎的相关性，探索女性生殖系统健康与年龄之间的内在联系。结果显示，有宫内炎症感染的女性，子宫和阴道微生物群明显不同于健康女性。子宫内膜炎组的子宫微生物组多样性显著低于对照组。相反的趋势是，子宫内膜炎组的阴道微生物组多样性显著高于对照组女性。与对照组相比，子宫腔中的优势菌比例在所有受试者中相似，但在患有子宫内膜炎的女性中波动较大。

由于子宫和阴道微生物组在各种临床环境下同时发生变化，甚至融合，因此研究者进行了动物实验，在 1 周内交换 Brown Norway (BN) 和 Sprague Dawley (SD) 大鼠的阴道微生物群 3 次，并在

3 周后收集每只大鼠子宫腔灌洗液，以研究阴道细菌通过宫颈屏障的可能性，探讨阴道生态失调对宫内微生态的潜在影响。结果表明阴道微生物群的交换可以使不同个体的子宫微生物群同质化（图 2）。在交换之前，大鼠的子宫腔中除变形菌和厚壁菌外几乎没有其他细菌类群，微生物丰富度和均匀度较低，个体间相似性较小。交换后，上述参数显著增加，表明阴道扰动可能会影响子宫微生物菌群。

总之，该研究第一次揭示了子宫和阴道微生物的同步变化，发现年龄、流产史、生产方式会影响女性这两个身体部位之间的微生物群结构和相似性，通过动物实验揭示了阴道扰动对子宫微环境失调的影响，阐明了阴道细菌易位与子宫微生态和子宫内膜健康之间的相互依赖关系，这无疑将增加我们对女性生殖健康的了解。

（西安医学院第一附属医院
检验科辛娜 李卓 编译）

通过诱导自噬逆转抗体诱导的甲状腺细胞凋亡

【据《Journal of Autoimmunity》2021年11月报道】题：通过诱导自噬逆转抗体诱导的甲状腺细胞凋亡（美国西奈山伊坎医学院 作者Syed Morshed等）

格雷夫斯病（Graves disease, GD），是一种自身免疫性疾病，患者体内存在针对促甲状腺激素受体 TSHR 的特异性抗体，根据其对抗 TSHR 信号的影响可分为“刺激型”“阻断型”或“中性型”，“中性”TSHR-抗体（N-TSHR-Abs）识别 TSHR 的铰链区域，该抗体在 GD 患者中出现的频率高达 30%。尽管这些抗体的临床重要性还不明确，但相关研究表明，N-TSHR-Abs 通过多种应激信号通路诱导细胞凋亡，而 TSH 或抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸（NAC）能够对 N-TSHR-Abs 的效应，抑制应激细胞的凋亡。此外，前期研究表明，中性抗体通过增强活性氧（ROS）生成是甲状腺细胞凋亡的先兆，然而这种抗体诱导的细胞应激和 ROS 积累可以被 TSH 阻止，以上两种现象机制目前尚不清楚。基于以上理论，美国西奈山伊坎医学院 Syed Morshed 等对 TSH 对抗中性抗体介导的甲状腺细胞凋亡的潜在机制进行了初步探究。

线粒体超氧化物的产生是细胞氧化损伤的主要原因，ROS 的生成被认为是线粒体氧化损伤的唯一上游步骤。在该研究中，研究人员首先假设甲状腺细胞中过量的 mROS 产生可能会破坏线粒体 DNA，进而引起线粒体功能障碍，8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）是选择性线粒体 DNA 损伤的标志物，而氧化应激标志物和 ROS 生成的变化平行。N-TSHR-mAb、鱼藤酮和 PKA 抑制剂（H89）对氧化 DNA 损伤的激活均呈剂量依赖性，而 TSH 则没有这种作用（图 1A），这些证据清楚地表明 N-TSHR-mAb 诱导 ROS 导致线粒体氧化损伤，从而导致线粒体功能障碍。由 ICW 和 ICC 检测，并由免疫印迹证实，N-TSHR-mAb 诱导 Bax/细胞色素 C（Cyt-C）/caspase-9/caspase-3 信号级

联（图 1B），形成凋亡小体，通过细胞内在途径诱导细胞凋亡。

多项证据表明，对不同自噬调节刺激的反应有助于维持促生存自噬和促凋亡反应之间的正常平衡。Morshed 等的观察阐明，N-TSHR-mAb 随着时间的推移不能维持 Akt/mTOR/S6K 信号级联，mTOR 抑制会导致自噬的激活。ICW 实验及甲状腺细胞的活细胞成像显示 N-TSHR-mAb 在激活自噬的效应和诱导自噬相关蛋白 beclin 1、LC3A、LC3B、ULK1 和 p62 的表达上均呈剂量依赖性（图 1C），LC3A 表达最强。然而，尽管诱导了多种自噬蛋白，细胞仍发生凋亡。

为了了解失败的原因，研究人员进一步评估 TSH 或抗氧化剂是否可以通过诱导成功的自噬来逆转 N-TSHR-mAb 诱导的甲状腺细胞凋亡。数据显示 TSH/NAC 降低了 N-TSHR-mAb 诱导的细胞凋亡效应。激活 beclin 1、LC3-2A 和 LC3-2B 自噬相关蛋白，清除细胞应激，使细胞从凋亡信号中恢复，并帮助细胞存活。

现在已经明确 N-TSHR-mAb 可以诱导线粒体功能障碍，但其潜在机制仍不清楚。研究人员研究了几种线粒体生物发生信号标志物如 PGC1 α 、mitofusin-2、TFAM 和 NRF-2，发现

N-TSHR-mAb 抑制了这些生物标志物，而在 TSH/NAC 存在时表达显著上调，特别是 PGC1 α 和 mitofusin-2，表明这两个标志物是线粒体生物发生的主要贡献者。总之，结果表明，N-TSHR-mAb 抑制线粒体生物发生，导致细胞稳态受损，虽然可以诱导线粒体自噬，但由于缺乏生存信号而导致诱导的自噬不完全，最终引起细胞凋亡，而 TSH/NAC 则激活它们。

从甲状腺细胞的整体代谢活动来看，细胞存活和增殖的核心信号级联主要涉及 cAMP/PKA/Creb, Akt/mTOR/S6K, PKC/Raf/Mek/Erk/p90RSK/Elk1。研究人员发现 p38/ATF-2 应激信号级联可被激活，更重要的是，N-TSHR-mAb 激活 NF κ B，而 TSH/NAC 抑制 NF κ B，恢复了细胞代谢功能。同时 N-TSHR-mAb 抑制乙酰化酶 1 和 3、AMPK2 和过氧化氢酶这些与细胞代谢活性相关的蛋白，而 TSH/NAC 能够恢复其表达（图 1D），这可能是甲状腺细胞存活和增殖的关键途径。众所周知，TSHR 信号级联主要通过 G 蛋白下游信号级联启动，缺乏 cAMP/PKA/Creb 等拯救信号会导致细胞凋亡，因此，需要进一步的研究来分析究竟哪些级联扮演着维持细胞稳态的核心角色。

综上所述，N-TSHR-mAb 诱导 mROS 损伤 mtDNA，损害线粒体功能。此外，N-TSHR-mAb 通过细胞内在途径激活 Bax/Cyt-C/caspase-9/caspase-3，触发凋亡级联反应。事实上，N-TSHR-mAb 也试图诱导自噬，但这种自噬缺乏活跃的溶酶体形成，溶酶体与自噬体融合失败导致细胞凋亡，但 TSH 诱导增强的自噬反应能够阻止甲状腺细胞的凋亡。这些发现清楚地表明，用 TSH 或抗氧化剂治疗应激甲状腺细胞，可以通过诱导增强自噬来抑制它们的细胞死亡。有望在未来成为临床治疗 GD 的有效手段。

（西安医学院第一附属医院 检验科 王科勇 李卓 编译）

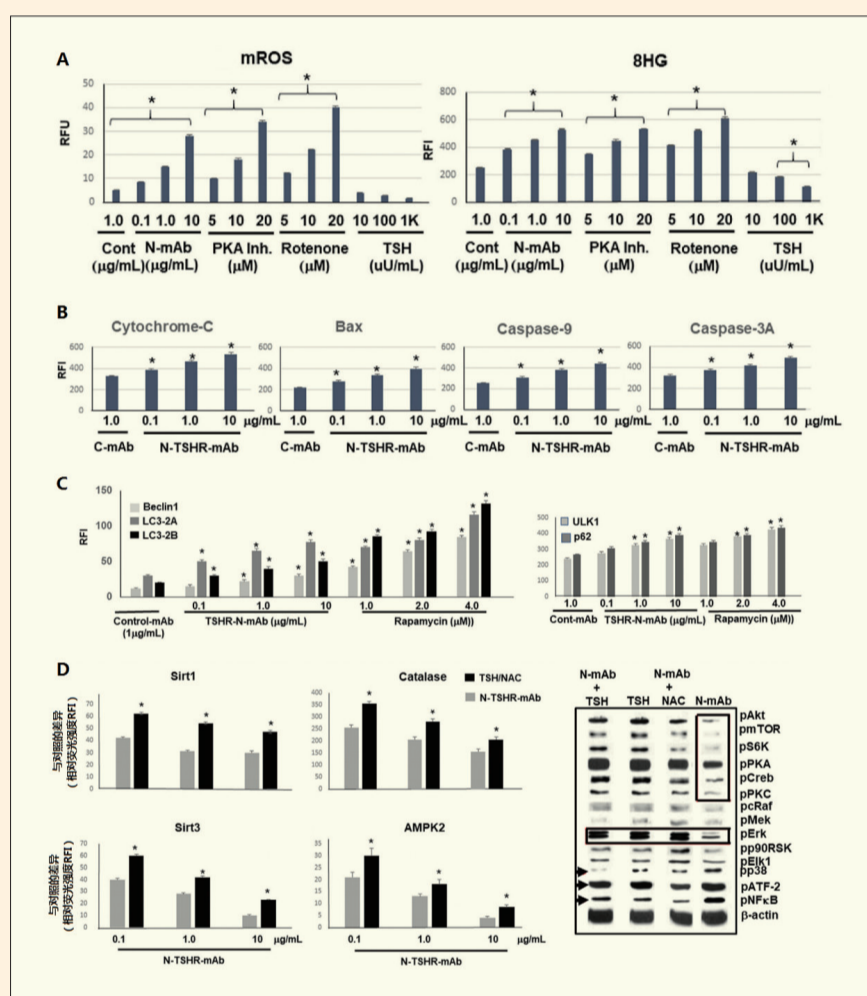


图 1 A.N-TSHR-mAb、鱼藤酮和 PKA 抑制剂（H89）对 mROS 的激活效应；B.N-TSHR-mAb 诱导 Bax/细胞色素 C（Cyt-C）/caspase-9/caspase-3 信号级联；C.N-TSHR-mAb 诱导自噬相关蛋白表达；D.TSH/NAC 能够恢复甲状腺细胞代谢活动相关蛋白表达

上接第 6 版

和 IL-17A 等与 T 细胞免疫反应相关的细胞因子和趋化因子，从早期到中期和晚期均呈下降趋势，但无显著性差异。晚期组 MCP-1 水平（74.69 ng/ml）显著低于早期组（10 826 ng/ml, $P=0.005$ ）和中期组（90.70 ng/ml, $P=0.015$ ）（图 2A）；晚期组 GM-CSF、sE-选择素、sP-选择素等趋化因子水平呈下降趋势，但差异无统计学意义。其他促炎细胞因子，包括 IL-1 α 、IL-6、IL-10、IP-10、MIP-1 α 和 MIP-1 β ，水平在晚期组中增加，但差异无统计学意义。晚期组 IL-8 水平（16.31 ng/ml）显著高于早期组（7.42 ng/ml, $P=0.04$ ）和中期组（6.80 ng/ml,

$P=0.004$ ）（图 2B）。上述结果表明，微生物产物诱导的炎症反应升高和 T 细胞免疫抑制可能是 HCC 进展的机制之一。

随着 HCC 的进展，双歧杆菌科的丰度降低，肠球菌科的丰度增加。肠球菌与双

歧杆菌的比例与 REG3 α 和 sCD14、LBP、PGRP 呈正相关；IL-6 和 IL-8 水平与微生物易位标志物呈正相关，IL-6 水平与 sCD14 和 LBP 呈正相关；IL-8 水平与 sCD14 和 PGRP 呈正相关；MCP-1 水

平与 LBP 和 PGRP 呈负相关；血浆肿瘤坏死因子- α 水平与上述各项指标均无相关性，见表 1。

该项研究表明，肠道菌群失调及肠道通透性和微生物易位的增加与 HCC 进展过

程中循环炎症反应升高和 T 细胞反应降低有相关性，此研究结果也提示肠道菌群可能是 HCC 治疗和干预的一个潜在靶点。

（辽宁省丹东市中心医院 刘一廷 鲁颖 编译）

表 1 肝细胞癌患者肠球菌和双歧杆菌比例或不同细胞因子与血浆 REG3 α 或微生物易位标志物之间的关系

	肠球菌科与双歧杆菌科的比例	IL-6	IL-8	MCP-1
REG3 α	$r=0.366$ $P=0.003$	$r=0.035$ $P=0.783$	$r=0.081$ $P=0.520$	$r=-0.201$ $P=0.106$
sCD14	$r=0.322$ $P=0.008$	$r=0.299$ $P=0.015$	$r=0.347$ $P=0.004$	$r=-0.183$ $P=0.142$
LBP	$r=0.386$ $P=0.001$	$r=0.261$ $P=0.034$	$r=0.102$ $P=0.414$	$r=-0.296$ $P=0.016$
PGRP	$r=0.405$ $P=0.001$	$r=0.198$ $P=0.111$	$r=0.411$ $P=0.001$	$r=-0.245$ $P=0.047$

注：MCP-1：单核细胞趋化蛋白-1；REG3 α ：再生胰岛衍生蛋白 3 α ；sCD14：可溶性 CD14；LBP：脂多糖结合蛋白；PGRP：肽聚糖识别蛋白