

代谢组学分析在肿瘤标志物筛选中的应用进展

吴杰¹, 陈文虎¹, 尹沛源², 许志良²

1. 浙江省肿瘤医院检验科, 浙江 杭州 310022; 2. 中科(杭州)生命科学院, 浙江 杭州 310052

关键词: 代谢组学; 肿瘤标志物; 质谱

中图分类号: R730.4 R496 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2016)06-1026-04

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2016.06.047

代谢组学(metabonomics)的概念是Nicholson等在1999年率先提出的。相对于基因组学、转录组学以及蛋白质组学,代谢组学更关注生物体的表型,因此也是肿瘤潜在生物标志物筛选中最有前景的发展方向^[1-2]。它借助于核磁共振波谱法(nuclear magnetic, NMR)、质谱(mass spectrometry, MS)结合多种分离手段对生物体系在生理或病理状态下所有内源性小分子代谢产物的动态变化进行分析,从而描绘出生物体代谢轮廓,探索内源性小分子物质与疾病发生发展间的关系^[3]。分子量小于1 000道尔顿的小分子化合物是代谢组学关注的主要目标。相比较于基因、转录和蛋白质研究,代谢组学反映的是细胞活动的最终产物,所以也最稳定。由于细胞在维持功能时时刻刻都在发生代谢,因此代谢组学分析能反映有机体在一定时间段内的功能和状态,在某种疾病状态下基因和蛋白表达的微小变化会在代谢物上得到放大,许多不能从这两种物质上体现的变化可以在代谢组学中得到检测。目前研究已证实肿瘤的发生和进展与代谢异常密切相关^[4-5],而肿瘤的常规检测与研究中又缺乏高敏感性和高特异性的肿瘤标志物,因此作为一种新型的研究方法,代谢组学可以分析肿瘤发生发展中产生的所有代谢物,识别有价值的潜在标志物,从而为肿瘤的诊治开辟新途径。

1 代谢组学的技术策略

通常的代谢组学研究从生物样本的采集开始,经过样本的预处理,样本的分离、检测、鉴定以及数据分析,生物标记物识别和途径分析。

1.1 样本的采集和预处理 代谢分析样本可以为生物液体和细胞、组织提取物,目前研究较多的主要是血清、血浆、尿液、胆汁、脑脊液等生物液体^[6-7]。样本入选时应注意研究群体间参数应尽量接近,样本采集的时间、部位、种类等应保持一致,同时应考虑生活习惯、昼夜节律、药物、精神状态以及地域等外在因素的影响。样本采集后一般在-80℃低温下保存,运输过程用干冰或冰袋低温保存。样本的处理过程应保证样本中各组分的稳定,避免引起变化。

1.2 代谢组学的分析技术 可用于代谢组学分析的技术有NMR、MS、红外光谱、紫外吸收等,其中NMR和MS是目前最常用的分析技术^[8]。NMR的优势在于能够对样品实现无创性和无偏向的检测,样品处理简单,因此客观性较好。同时NMR也有检测灵敏度有限、动态范围小、硬件设备投入较大等缺点。通过与色谱技术的联用,质谱平台的普适性、高敏感性、高特异性结合色谱对小分子化合物的分离,能够有效地降低离子抑制效应,改善代谢物的分析。目前,色谱-质谱联用已发展成为代谢组学研究的主流技术平台,通过质谱与气相色谱、液相色谱以及毛细管电泳等分离技术的联用,实现了对大多数代谢物分析的覆盖。常规的各种质谱联用技术各有优缺点,气相色谱-质谱法(GC-MS)主要优点是对挥发性小分子的分辨率和检测灵敏度高,可定性能力强等,而对于挥发性差、分子量较大的代谢物只能采用衍生化的方法,且处理过程较为繁琐。液相色谱-质谱法(LC-MS)的优点是敏感性高,样本预处理方法相对简单,代谢物检测的覆盖面大。缺点是对样本预处理的要求比较高,为实现对不同理化特性代谢物的分析,需开发不同的样本预处理方法,同时样品的轻微污染会对数据分析产生较大的影响。

1.3 代谢组学的数据分析 代谢物经仪器分析产生的原始数据需经过一系列的数据预处理过程才能够得到可进行后续分析的数据,目前该过程多由仪器公司的商业化软件完成。预处理完成后可通过多元统计分析及常规的统计分析来获取有用的生物学信息,包括生物表型、代谢标志物等信息^[9]。

模式识别是分析代谢表型的主要数据处理方法之一,其中非监督模式方法多用于分析生物体或特定疾病人群的表型特征,其中最常用的有主成分分析(principal component analysis, PCA)、聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)^[10]等方法。而有监督模式识别方法则通过数学模型实现不同类代谢表型组的分离,来实现对未知类别样本的分类预测以及发现新的代谢标志物等目的。常用的有监督模式识别方法包括偏最小二乘法(partial least squares, PLS)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-discriminant analysis, PLS-DA)等^[10]。

基金项目: 浙江省卫生厅资助项目(2015KYA042)

通信作者: 陈文虎, E-mail: 47975164@qq.com

在实际应用中先用非监督模式识别方法对样本进行初步分类,然后借助监督模式方法建立预测模型,发现生物标志物。对于未知结构的代谢标志物,通过网络数据库(例如人类代谢组数据库 HMDB)的查询,推断代谢物可能的分子结构和生物学功能。

2 代谢组学分析在肿瘤潜在标志物筛选中的应用

通过对肿瘤患者血清、尿液、胆汁、脑脊液等体液中代谢产物的分析能够发现一些区别于正常人异常表达的潜在标志物,其诊断效率显著高于常规的检测项目,并且部分标志物与肿瘤的分期分化等预后因素密切相关,因此组学分析在肿瘤标志物筛选中有重要意义。国内外已有部分学者在这方面进行了研究,并取得一定的成效^[11-13]。

2.1 血液样本潜在肿瘤标志物的筛选

血液样本是代谢组学研究中最常用的样本,目前已有学者将代谢组学成功应用于胃癌、前列腺癌、乳腺癌、肠癌^[14-16]等肿瘤标志物识别中,并显示出它们在肿瘤早期诊断和研究中的优势和价值。Kim SC 等^[17]通过运用 MALDI-TOF-MS 结合 PCA-DA 识别对卵巢癌患者和正常人血清进行分析后发现了 2 种有意义的低质量离子(LMI)差异代谢物,通过鉴定后发现这 2 种代谢物质为同型半胱氨酸(L-homocysteic acid, HCA)和溶血磷脂胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC 16:0),其中 HCA 在卵巢癌中的表达显著高于健康对照组,进一步用 ELISA 方法验证卵巢癌患者血清中 HCA 的水平后发现:当 cutoff 值设为 10 nmol/ml 时 HCA 的敏感性和特异性分别达到 64.0% 和 96.9%,显著高于常规的血清学检测项目 CA125 和 HE4,对卵巢癌早期诊断有重要价值,因此 Kim SC 认为 HCA 是卵巢癌血清学初筛中一个强有力的潜在肿瘤标志物。同时 HCA 和 LPC 16:0 水平还与卵巢癌的分期和组织分型密切相关,因此对卵巢癌的预后等研究也有重要意义。Ashish Gupta 等^[18]运用 1H-NMR 与 OPLS-DA 结合的方法分析了 100 例口腔白斑病(癌前病变),100 例口腔鳞状细胞癌以及 75 例健康对照血清中的代谢产物,发现了 8 种有意义的代谢产物,其中谷氨酰胺、丙酸、丙酮、胆碱等代谢产物能精确地将 93.5% 的口腔白斑患者与其他两者区分(ROC:0.97),而谷氨酰胺、丙酮、乙酸和胆碱能区分 92.4% 的口腔白斑患者和口腔癌患者(ROC:0.96),因此他们认为基于 NMR 的血清代谢组学分析能准确区分口腔癌发展的不同阶段,为口腔癌的诊治提供了新方向。国内学者 Xie G 等^[19]运用 GC-MS 联合 OPLS-DA 对美国康涅狄格州和中国上海各 100 例早期胰腺癌患者及 100 例健康对照进行研究后发现,运用一组包括谷氨酸、胆碱、1,5-脱水葡萄糖醇、三甲胺乙内酯、甲基胍 5 种代谢产物可将两地区早期胰腺

癌患者和健康对照显著区分,敏感性和特异性分别高达 97.7%、83.1% 和 77.4%、75.8%,由于胰腺癌早期诊断十分困难且恶性程度高,因此这一结果在胰腺癌早期诊断标志物的筛选和研究中有重要价值。在血液疾病研究方面,Chen WL 等^[20]通过 GC-TOF-MS 联合 OPLS-DA 的方法检测了 400 例急性髓系白血病(AML)患者和 446 例健康对照,结果发现在检测的 10 多种葡萄糖代谢产物中有 6 种代谢产物在 2 组间有显著差异,其中甘油-3-磷酸、乳酸、柠檬酸在 AML 患者血清中的含量较对照组显著下降,而丙酮酸、 α -酮戊二酸和 2-HG 在 AML 患者中显著增加。进一步将这 6 种代谢产物组合来评估 AML 患者的预后发现:患者的生存期(OS)和无事件发生期(EFS)与乳酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸、2-HG、甘油-3-磷酸的含量成负相关,但与柠檬酸含量成正相关,由于这些代谢物与 AML 遗传基因间无相关性,因此他们认为可以将其作为研究 AML 一个独立的疾病特征因素。

2.2 尿液样本潜在肿瘤标志物的筛选

在尿液代谢物的研究方面 Chan AW 等^[21]采用 1H-NMR 的方法结合 PLS-DA 和 OPLS-DA 方法对 3 组研究对象包括 43 例胃癌患者、40 例胃部良性病变患者以及 40 例健康人的尿液进行检测并分析,结果发现了多种在不同组别间有显著差异的代谢产物,其中有 9 种代谢产物包括蔗糖、二甲胺、1-甲基烟酰胺、2-糠酰甘氨酸、N-乙酰羟色胺、反乌头酸、丙氨酸、甲酸和 5-羟色胺等可将胃癌患者和健康人显著区分且 VIP 值较高,有望成为潜在的肿瘤标志物。研究者进一步运用 LASSO-LR 回归分析将 2-羟基异丁酸、3-吡啶硫酸酯、丙氨酸 3 种代谢产物组合后建立了一种区分胃癌患者和健康人的有效方法,其 ROC 曲线下诊断面积 AUC 值高达 0.95。因此他们认为胃癌患者存在差异性尿液代谢谱,将其应用于临床对胃癌的早期诊断潜力巨大。Alberice JV 等^[22]通过液相色谱-质谱和毛细管电泳-质谱的方法对 48 例已确诊的膀胱癌患者的尿液进行分析后发现了 27 种差异性代谢物,其中部分代谢物与患者的诊断和分期密切相关,因此这一研究结果对筛选膀胱癌诊断、预后的潜在标志物有重要价值。

2.3 胆汁样本潜在肿瘤标志物的筛选

Xu XF 等^[23]通过 LC-MS 的方法对 32 例胆道癌患者、61 例良性胆道疾病患者和 22 例正常人的胆汁样本进行分析,结果发现运用 PLS-DA 的二维和三维散点图能明确区分胆道癌患者、良性患者和正常人。进一步运用 OPLS-DA 的方法来寻找鉴别胆道癌患者和良性患者的潜在标志物,结果显示,胆道癌组胆汁中溶血磷脂酰胆碱、苯丙氨酸、色氨酸的含量显著低于良性组,而牛磺酸和甘氨酸结合胆汁酸含量则显著高于良性组。鉴于目前胆道

癌早期诊断缺乏有效的检测方法,因此他们认为代谢组学分析是鉴别良恶性胆道疾病非常有价值的方法,同时通过组学分析寻找胆道癌早期诊断标志物也将值得期待。

2.4 脑脊液样本潜在肿瘤标志物的筛选 An YJ等^[24]通过对26例肺癌转移性软脑膜癌患者和41例正常人的脑脊液样本运用NMR方法进行研究后发现:转移性软脑膜癌患者的脑脊液代谢物和正常人之间差异有统计学意义,其中肌醇、肌酸、乳酸、丙氨酸和柠檬酸差异性最显著,将其组合后诊断软脑膜癌患者ROC曲线下面积高达0.996,同时患者脑脊液代谢物还与软脑膜癌患者的分级密切相关。由于首次脑脊液细胞学检查的检出率较低(约69%),而多次取样会增加患者痛苦,因此他们认为代谢组学方法将为转移性软脑膜癌患者的诊断提供新思路。类似Nakamizo S等^[25]通过GC-MS的方法分析了32例术前胶质瘤患者的脑脊液样本,结果发现在检测到的61种代谢产物中柠檬酸、异柠檬酸水平在胶质母细胞瘤GBM(高度恶性)患者中显著高于其他I~III级胶质瘤患者,而乳酸和2-氨基庚二酸水平在胶质母细胞瘤中显著高于I、II级胶质瘤。进一步研究发现,在I~III期异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变型胶质瘤患者中其柠檬酸、异柠檬酸和乳酸的水平要显著高于野生型患者,同时在III~IV级胶质瘤患者中乳酸水平的升高与病情恶化相关,综合以上结果他们认为对胶质瘤患者脑脊液的代谢组学分析非常有助于研究胶质瘤的分期和预后。

3 代谢组学的研究展望

代谢组学研究已成为当前肿瘤研究的一个新方向,通过对肿瘤患者血液、尿液、胆汁、脑脊液等体液中代谢产物的分析能够发现,对临床诊断、预后及监测有价值的标志物,同时也能筛选出新型的分子治疗靶点^[26-27],因此,组学研究在筛选潜在肿瘤标志物中有非常重要的意义。同时随着“精准医疗”概念在肿瘤治疗中的逐步推广,在未来通过深入分析个体的代谢组学结合基因组学和蛋白组学分析将能够指导临床制定出更理想的个性化治疗方案,而且组学样本获取容易、安全,检测方便、快速,随着组学技术的进一步发展,它在肿瘤研究和应用中前景广阔。但目前代谢组学的发展也需要不断的完善:一方面代谢组学的发展寄托于样本获取、保存、干扰以及组学检测、分析等方面的标准化,代谢数据库的不断扩大和更新,检测成本的进一步下降,而对未知物的鉴定是代谢组学研究的瓶颈;另一方面也依靠检测筛选的差异性标志物其敏感性和特异性在临床应用中得到反复的验证,从而为组学技术在肿瘤早期诊断、分期、分化、预后以及疗效监测等应用中打开空间。

参考文献

- [1] Denkert C, Bucher E, Hilvo M, et al. Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery[J]. *Genome Med*, 2012, 4(4): 37.
- [2] Olivares O, Däbritz JH, King A, et al. Research into cancer metabolomics: Towards a clinical metamorphosis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 43(7): 52-64.
- [3] 苏君梅, 葛卫红, 许广艳, 等. 2型糖尿病患者尿液的代谢组学研究[J]. *浙江医学*, 2015, 37(4): 278-282.
- [4] 方芳. 代谢综合征与老年胰腺癌相关性分析[J]. *安徽医学*, 2015, 36(7): 801-804.
- [5] 吕磊, 张国庆, 金彦. 体内胆汁酸质量浓度变化的临床意义及研究进展[J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17(9): 159-161.
- [6] Patel S, Ahmed S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2015, 107(3): 63-74.
- [7] Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3(3): 23.
- [8] Patel S, Ahmed S. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2015, 107(3): 63-65.
- [9] Bowling FG, Thomas M. Analyzing the metabolome[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1168: 31-35.
- [10] Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H. Current metabolomics: technological advances[J]. *Biosci Bioeng*, 2013, 116(1): 9-16.
- [11] Kumar V, Dwivedi DK, Jagannathan NR. High-resolution NMR spectroscopy of human body fluids and tissues in relation to prostate cancer[J]. *NMR Biomed*, 2014, 27(1): 80-89.
- [12] Zhang X, Xu L, Shen J, et al. Metabolic signatures of esophageal cancer: NMR-based metabolomics and UHPLC-based focused metabolomics of bloodserum[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(8): 1207-1216.
- [13] Mayers JR, Wu C, Clish CB, et al. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development[J]. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1193-1198.
- [14] Aa J, Yu L, Sun M, et al. Metabolic features of the tumor microenvironment of gastric cancer and the link to the systemic macroenvironment[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(1): 164-173.
- [15] Tosoian JJ, Ross AE, Sokoll LJ, et al. Urinary Biomarkers for prostate Cancer[J]. *Urol Clin North Am*, 2016, 43(1): 17-38.
- [16] Kühn T, Floegel A, Sookthai D, et al. Higher plasma levels of lysophosphatidylcholine 18:0 are related to a lower risk of common cancers in a prospective metabolomics study[J]. *BMC Med*, 2016, 14(1): 13.
- [17] Kim SC, Kim MK, Kim YH, et al. Differential levels of L-homocysteic-acid and lysophosphatidylcholine (16:0) in sera of patients with ovarian cancer[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 566-574.
- [18] Ashish Gupta, Shalini Gupta, Abbas Ali Mahdi. 1H NMR-derived serum metabolomics of leukoplakia and squamous[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 441(2): 47-55.
- [19] Xie G, Lu L, Qiu Y, et al. Plasma metabolite biomarkers for the detection of pancreatic cancer[J]. *ProteomeRes*, 2015, 14(2): 1195-1202.
- [20] Chen WL, Wang JH, Zhao AH, et al. A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value[J]. *Blood*, 2014, 124(10): 1645-1654.
- [21] Chan AW, Mercier P, Schiller D, et al. (1)H-NMR urinary metabolomic profiling for diagnosis of gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2016, 114(1): 59-62.

- [22] Alberice JV, Amaral AF, Armitage EG, et al. Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics approach [J]. *Chromatogr A*, 2013, 1318 (22): 163-170.
- [23] Xu XF, Cheng SB, Ding CF, et al. Identification of bile biomarkers of biliary tract cancer through a liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomic method [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11 (3): 2191-2198.
- [24] An YJ, Cho HR, Kim TM, et al. An NMR metabolomics approach for the diagnosis of leptomeningeal carcinomatosis in lung adenocarcino-

- ma cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(1): 162-171.
- [25] Nakamizo S, Sasayama T, Shinohara M, et al. GC/MS-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid (CSF) from glioma patients [J]. *J Neurooncol*, 2013, 113(1): 65-74.
- [26] Tashiro E, Imoto M. Metabolomics and molecular targeted therapy of cancer [J]. *Nihon Rinsho*, 2015, 73(8): 1268-1272.
- [27] Phillips MM, Sheaff MT, Szlosarek PW. Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges [J]. *Cancer Res Treat*, 2013, 45(4): 251-262.
- (本文编辑:季群) 收稿日期:2015-04-03

(上接第 1018 页)

在氨苄青霉素培养基中不再成活生长。2010 年国内毛艳等^[9]采用 siHybrids 技术沉默铜绿假单胞菌外排泵 mexB 基因,通过体外效应研究证明 siHybrids 分子能干预铜绿假单胞菌 PAO1 mexB 基因 mRNA 的表达,且沉默作用呈现时间依赖性,在 24 h 能有效地发挥干预作用。

本研究通过 PCR 检测耐药基因以及 MIC 和硼酸抑制实验检测细菌的耐药性和产 KPC 酶情况,筛选出产 kpc-2 的耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌株,根据 kpc-2 基因序列以及 siHybrids 设计原则,设计合成 21 bp 的 siHybrids 干扰片段。通过 PCR 扩增 kpc-2 基因序列,并将基因连接到表达载体 pET28a,构建表达 kpc-2 的载体 pET28a-kpc-2,并最终转化到 BL21LD3 工程菌并进行培养,进行 siHybrids 干扰实验。研究结果显示,不加 siHybrids 的对照组菌株,其 kpc-2 基因的表达水平随着时间的延长而呈升高趋势。加入 siHybrids 的低浓度组和高浓度组菌株,其 kpc-2 基因的表达水平均随着时间的延长而呈下降趋势,与细菌对数生长周期性的规律截然不同,且 siHybrids 的浓度与 kpc-2 基因的表达水平呈负关($r = -0.782, P = 0.014$),这些现象证实了试验中的 siHybrids 分子对耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌的 kpc-2 基因起到了沉默作用^[10-12]。另外,研究结果还显示,siHybrids 干预能显著增大美罗培南抑菌圈的直径($P < 0.05$),不同浓度的 siHybrids 对美罗培南抑菌圈直径的增大幅度不同,高浓度组美罗培南抑菌圈的直径显著大于低浓度组($P < 0.05$),且 siHybrids 的浓度与美罗培南抑菌圈直径的大小呈正相关($r = 0.882, P = 0.024$),这些都说明 siHybrids 的浓度与 kpc-2 基因的沉默作用效果密切相关,浓度越高,沉默效果越显著^[13-15]。

总之,本研究证实了 siHybrids 能抑制耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌 kpc-2 基因的表达水平,能提高美罗培南的抑菌效果,其作用机制是 siHybrids 分子特异性沉默了肺炎克雷伯菌的 kpc-2 基因。

参考文献

- [1] 杨金辉,吕媛. 中国肺炎克雷伯菌碳青霉烯类抗生素耐药现状和

- 流行病学分析 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2012, 28(5): 323-326.
- [2] 刘瑛,俞静,张良,等. 同一患者不同部位的 4 株肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究和同源性分析 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2013, 13(6): 460-464.
- [3] Zhou M, Cai T, Pu F, et al. Graphene/Carbon-Coated Si Nanoparticle Hybrids as High-Performance Anode Materials for Li-Ion Batteries [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5(8): 3449-3455.
- [4] 赵燕,袁轶群,叶琴,等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检测 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(17): 4081-4083.
- [5] 王建友,周阿旺,陈丹. 碳青霉烯酶在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯杆菌的分布及分子流行病学 [J]. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(5): 517-520.
- [6] Ballarín-González B, Ebbesen MF, Howard KA. Polycation-based nanoparticles for RNAi-mediated cancer treatment [J]. *Cancer Letters*, 2014, 352(1): 66-80.
- [7] Chiu CW, Huang TK, Wang YC, et al. Intercalation strategies in clay/polymer hybrids [J]. *Progress in Polymer Science*, 2014, 39(3): 443-485.
- [8] Meng H, Mai WX, Zhang H, et al. Codelivery of an Optimal Drug/siRNA Combination Using Mesoporous Silica Nanoparticles To Overcome Drug Resistance in Breast Cancer in Vitro and in Vivo [J]. *Acs Nano*, 2013, 7(2): 994-1005.
- [9] 毛艳,陈佳,许东,等. siHybrids 技术沉默铜绿假单胞菌外排泵 mexB 基因体外效应的初步研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(8): 707-712.
- [10] 宁明哲,沈翰,张之烽,等. 对亚胺培南不敏感的肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类药物的机制研究 [J]. *临床检验杂志*, 2012, 24(9): 706-708.
- [11] 于亲德,徐平,于勇文,等. 肺炎克雷伯菌介导致碳青霉烯类耐药的基因检测研究 [J]. *海南医学*, 2014, 25(17): 2499-2502.
- [12] 陈济超,陈凯丽,梁国威,等. 肺炎克雷伯杆菌 101 株临床分布与耐药性分析 [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(6): 111-113.
- [13] 李艳华,庞峰,贾秀芹,等. 碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌流行病学分析及耐药性观察 [J]. *山东医药*, 2013, 53(7): 57-59.
- [14] 张晓玲,霍丽静,刘鹏,等. 秦皇岛市替加环素对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌体外抗菌活性研究 [J]. *河北医药*, 2015, 37(5): 767-769.
- [15] 刘琳,叶贤伟,刘维佳,等. 下呼吸道感染患者大肠杆菌和肺炎克雷伯杆菌产超广谱 β -内酰胺酶的检测和耐药性研究 [J]. *贵州医药*, 2013, 37(3): 256-258.

(本文编辑:谢飞凤)

收稿日期:2015-12-12