

- Spiegelman D, et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (Methylight) for quantitative DNA methylation analysis[J]. JMD, 2006, 8: 209-217.
- [19] Zhong XY, Holzgreve W, Gebhardt S, Hillermann R, Tofa KC, Gupta AK, et al. Minimal alteration in the ratio of circulatory fetal DNA to fetal corticotrophin-releasing hormone mRNA level in preeclampsia[J]. Fetal Diagn Ther, 2006, 21: 246-249.
- [20] Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, Mazza V, Neri C, Percepe A. Quantitation of DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe[J]. Mol Hum Reprod, 2006, 12: 587-591.
- [21] Ge Q, Bai Y, Liu Z, Liu Q, Yan L, LU Z. Detection of fetal DNA in maternal plasma by microarray coupled with emulsion PCR[J]. Clin Chim Acta, 2006, 369: 82-88.
- [22] 王文博, 张毅, 孙树汉. 孕妇外周血中胎儿游离 DNA 在产前诊断中的应用[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(4): 442-446.
- [23] Lo YM. Recent developments in fetal nucleic acids in maternal plasma: implications to noninvasive prenatal blood group genotyping[J]. Transfus Clin Biol, 2006, 13: 50-52.

(收稿日期: 2010-05-10)

• 综 述 •

立克次体基因分型研究进展

蒋明明¹综述, 毛旭虎^{1△}, 张守印²审校

(1. 第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室, 重庆 400038;

2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206)

关键词: 立克次属; 斑疹伤寒, 流行性虱传; 胞内寄生菌; 斑点热群; 基因分型; 分型特异性序列**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.020**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)04-0474-03

立克次体 (Rickettsia) 是一类复杂的细胞内寄生菌, 大多为人兽共患病原体, 其引起的立克次体病在世界范围内呈散发性和季节性流行。此外, 立克次体作为潜在的生物恐怖病原体, 也日益受到重视。为防控立克次体疾病, 并对立克次体流行株进行溯源, 国内外学者对菌株进行了分型鉴定。立克次体的分型方法主要为血清分型和基因分型。最先用于立克次体分型的方法是血清分型。但是, 由于不同菌株的抗体间存在交叉反应, 结果重复性差, 容易出现模棱两可的结果等原因, 使血清分型存在一定的缺陷。而基因分型方法具有高分辨力、高重复性、结果评价客观性以及能对数据进行统计学分析等特点^[2]。因此, 随着分子生物学技术的不断进步, 基因分型方法得到了迅速发展。基因分型是以 DNA 序列信息为基础的分型技术, 例如: 针对全基因组分析的 PFGE (pulsed field gel electrophoresis) 分型; 针对单个或多个基因分析的 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)、MLST (multilocus sequence typing) 和 PCR-Sequencing (polymerase chain reaction-sequencing) 分型^[3]; 针对非编码序列的 MST (multiple spacer typing) 分型^[4], 这些技术在立克次体分型中得到迅速应用。但是这些分型方法各有优缺点, 目前还没有一种方法被公认为立克次体基因分型的金标准。本文对立克次体基因分型的研究进展作一综述。

1 立克次体基因分型研究情况

立克次体是一类严格胞内寄生菌, 其基因组大小约为 1 兆~2 兆个碱基对。由于与其宿主 (节肢动物) 长期的共存和共同进化, 受到的选择压力较小, 立克次体具有遗传保守性特点^[1]。目前, 立克次体主要包括斑点热群和斑疹伤寒群, 此外, 还有很多立克次体至今仍未得到充分的认识和命名^[5-7]。因此, 为了研究立克次体的流行病学特点, 需要对它们进行分类和分型。下面将斑点热群和斑疹伤寒群立克次体的基因分型情况作一简要综述。

1.1 斑点热群 斑点热群立克次体是较为复杂的一个生态

群, 从上世纪 80 年代至今, 对斑点热群立克次体菌种的分类, 不断发生变动^[5-7]。而对斑点热群立克次体的基因型分析, 也在不断发展中。1992 年 Mnor 等^[8]报道, 以色列流行的 *R. conorii* 菌株引起的立克次体病临床特点不同 (从轻微症状到患者死亡)。为研究其原因, 他们应用 PCR-RFLP 基因分型方法, 用 7 种限制性内切酶对这些菌株的 190 KDa 和 120 KDa 抗原蛋白编码基因进行了酶切分析, 发现: 所有以色列菌株都属于一个基因型。因此, 他们认为, 在以色列患者出现的不同临床症状, 可能是由于患者本身的体质差异所导致。2004 年 Fournier 等^[9]报道, 他们首先将 MST 分型方法应用于立克次体的基因分型。通过比对 *R. conorii* 和 *R. prowazekii* 的全基因组, 选取了 3 类序列对 *R. conorii* 分离株进行分型: (1) 5 个编码基因。(2) 28 个在 *R. conorii* 中退化, 但在 *Rickettsia prowazekii* 完整的基因。(3) 27 个保守和 23 变异的基因间区。经过比对分析后发现: *ompA* 的差异可将 *R. conorii* 分成 3 个基因型, 而 25 个变异的基因间区中的 4 个含有高度的序列多态性, 可将 39 株 *R. conorii* 分成 27 个基因型。经综合分析, 他们认为: MST 分型具有高分辨力、可重复性、结果易于分析以及各实验室间可通过互联网进行数据共享的优点, 可用于追踪菌株来源, 甚至可被直接用于对临床标本的分型。2006 年 Zhang 等^[10]应用 *ompA* 部分片段测序和 MST 分析, 对 1974 年至 2000 年来自中国各地的 15 株 *R. sibirica* 菌株进行了基因分型。通过对 3 个基因间区的序列分析, 发现所有 15 株菌的这 3 个基因间区序列都相同, 且与 *R. sibirica* 的 *sibirica* 亚种相同。而根据 *ompA* 片段的序列, 15 株菌分成 2 个型: 4 个北京菌株分为一个型, 其他 11 株菌为一个型。最后, 他们认为: *R. sibirica* 的 *sibirica* 亚种在中国的东、西、南、北部地区都有分布, 而且有 4 株菌分离自患者。因此, 中国这些地区有 *R. sibirica* subsp. *sibirica* 流行的可能性。2007 年, Fournier 和 Raoult^[10]在菌种和菌株水平对来自世界各地的 23 种立克次体 (包括所有斑点热群和斑疹伤寒群立克次体) 分离菌株或节肢

△ 通讯作者, 电话: (023) 68752315。

动物扩增子共 108 个标本,进行了 MST 分析。他们通过扩增和分析 3 个基因间区的序列,不仅能将所有 23 个菌种区分开来,而且可以对 *R. conorii*、*R. felis*、*R. massiliae*、*R. prowazekii*、*R. sibirica* 和 *R. slovaca* 的菌株进行有效的基因分型。他们认为:通过对这 3 个基因间区的序列分析,既能用于立克次体属菌种之间的鉴定,又能对立克次体属的 6 个菌种的基因型进行分析。

1.2 斑疹伤寒群 目前,斑疹伤寒群立克次体只包括普氏立克次体(*R. prowazekii*)和莫氏立克次体(*R. typhi*)2 个菌种^[5]。1993 年 Ereemeeva 等^[11]报道了对普氏立克次体和莫氏立克次体的 PFGE 和 RFLP 分析。他们用 PFGE 对普氏立克次体的 Breinl 和 EVir 菌株分析后,发现这 2 个菌株的 SalI 酶切带型不同,而 RFLP 分析没有发现莫氏立克次体不同宿主来源的菌株之间存在差异。2005 年 Zhu 等^[12]应用 MST 分型方法,将 *R. prowazekii* 和 *R. conorii* 基因组进行比对后,找出了 2 个在菌株水平存在差异的基因间区,并将 15 株普氏立克次体分为 4 个基因型,且强毒株 Evir 与其减毒株 Madrid E 属于一个基因型。2007 年 Hong 等^[13]对 5 株普氏立克次体进行了 MLST 分析。通过对 4 个管家基因(17kDa、gltA、ompB、sca4)的序列分析,Hong 等认为:MLST 分析可作为一种快速的鉴定 SNPs 的方法,用于研究普氏立克次体菌株的流行特点;普氏立克次体各菌株间高度同源而不应该建立普氏立克次体的亚种。2008 年,Zhu 等^[14]报道将 MST 方法进行改进后应用于普氏立克次体的分型。他们通过比对普氏立克次体的 Madrid E 和 Nuevo Leon 株的全基因组,找出了 6 个位点,包括:3 个基因间区,2 个假基因,以及甲基转移酶基因 *rp028*。这些位点的序列在两株菌之间存在核苷酸的缺失或插入。通过扩增这 6 个位点,可以将 8 个不同来源的菌株分成 7 个基因型。而且,他们认为:在 DNA 的 PCR 扩增和测序过程中,对插入和缺失突变的检测比对点突变的检测更少出现错误,因此更加准确。

2 基因分型方法在立克次体分型中的应用前景

立克次体作为一种分离培养困难的严格胞内寄生菌,具有遗传保守性特点^[15],且种类繁多,因此按照分型方法选择标准,不同的菌种可能需要不同的基因分型方法。PFGE 是一种高分辨力的基因型分析方法,是某些细菌基因分型的金标准^[16]。但是,PFGE 分析对操作要求较高,且需要大量的细菌,而立克次体却是一类较难分离培养和纯化的胞内寄生菌。另外,PFGE 分析反映的是酶切片段长度多态性而不是核苷酸序列多态性,使其分型分辨力可能受到一定限制^[17],而且该方法也不能对菌株进行系统发育学分析。MLST 是通过管家基因的核苷酸序列变异来分型,在对某些细菌进行分型时,其分型分辨力可能会比 PFGE 更高^[17],并且已经建立了几十种细菌的 MLST 基因型数据库,便于各实验室之间进行数据交流。然而,管家基因的变异较小,可能无法得到满意的分型效果。PCR-RFLP 和 PCR-Sequencing 是针对某一个或几个特征性基因的分型方法。其缺点:在挑选特征基因时存在主观性^[9],如果所选基因的变异性较小,就不能获得足够的分型分辨力,而且有可能出现所选基因不能准确反映菌株的流行病特点^[9]。目前,以基因间区的序列变异为基础的 MST 基因分型方法,在立克次体分型中得到了推广应用。由于基因间区为非编码 DNA,受到的选择压力比编码基因小,因此其序列变异性较大,使 MST 分析较好地适用于立克次体的分型^[18]。而且,通过对已知菌株全基因组的比对来挑选基因间区,避免了选择的主观性^[5]。但是该方法也有其局限性,例如:因为基因组重排,

原来相邻的两个基因被分开,导致所选基因间区的缺失而无法得到 PCR 扩增产物^[5]。另外,MST 基因型可能与菌株流行分布存在一些差异^[9],分型分辨力可能低于 PCR-Sequencing^[10]等,也会限制它在立克次体分型中的应用。2008 年,Zhu 等^[14]对 MST 进行了改进,通过比对普氏立克次体 Madrid E 和 Nuevo Leon 株的全基因组,挑选出 1 个特征基因、2 个假基因和 3 个基因间区,且这些位点间在两株菌之间都存在插入或缺失变异。该方法既获得了较高的分型分辨力,又避免了核苷酸测序错误导致的分型错误,而且用这 6 个位点的拼接序列进行系统发育学分析所得到的结果,与菌株的地理和宿主来源相一致。这一方法结合应用了编码基因和非编码序列,提高了位点选择的多样性,得到了较好的分型效果。随着分子生物学,特别是测序技术的迅猛发展,细菌的全基因组测序成本大幅下降,测序的菌株越来越多,为我们提供了完整的序列信息。而基因分型的依据,正是不同菌株基因组中的某些序列差异。因此,比对所有菌株的全基因组序列,该方法应该是最为理想的基因分型方法。但是,目前的全基因组测序技术成本过高,且对数据分析的要求也很高,限制了这种方法的应用。此外,该方法也不能直接对标本中的病原体进行基因型分析。因此,通过比对几株菌的全基因组序列获得分型特异性序列,再应用这些序列对待测的所有菌株进行基因型分析,是目前最为现实而有效的基因分型方法,将会在立克次体基因分型中得到推广。

参考文献

- [1] Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. [J]. Emerg Infect Dis, 1998, 4(2): 179-186.
- [2] Persing DH. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications[M]. 2005; 44-45.
- [3] 童能胜, 鞠萍, 柯才明, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌基因型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 691-692.
- [4] Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms[J]. APMIS, 2004, 112(11-12): 785-807.
- [5] Fournier PE, Raoult D. Identification of rickettsial isolates at the species level using multi-spacer typing[J]. BMC Microbiol, 2007, 7(3): 72.
- [6] Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, et al. Rickettsia raoultii sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with Dermacentor ticks in Europe and Russia[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(7): 1635-1639.
- [7] Duh D, Punda-Polic V, Avsic-Zupanc T, et al. Rickettsia hoogstraalii sp. nov., isolated from hard-and soft-bodied ticks. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(4): 977-984.
- [8] Manor E, Ighbarieh J, Sarov B, et al. Human and tick spotted fever group Rickettsia isolates from Israel: a genotypic analysis[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(10): 2653-2656.
- [9] Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, et al. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of Rickettsia conorii strains[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5757-5766.
- [10] Zhang L, Jin J, Fu X, et al. Genetic differentiation of Chinese isolates of Rickettsia sibirica by partial ompA gene sequencing and multispacer typing[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2465-2467.
- [11] Ereemeeva ME, Roux V, Raoult D. Determination of genome size and restriction pattern polymorphism of Rickettsia prowazekii and Rickettsia typhi by pulsed field gel electrophoresis[J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 112(1): 105-112.

[12] Zhu Y, Fournier PE, Ogata H, et al. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4708-4712.

[13] Ge H, Tong M, Jiang J, et al. Genotypic comparison of five isolates of *Rickettsia prowazekii* by multilocus sequence typing[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271(1): 112-117.

[14] Zhu Y, Medina-Sanchez A, Bouyer D, et al. Genotyping *Rickettsia prowazekii* isolates[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1300-1302.

[15] Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors[J]. Emerg Infect Dis, 1998, 4(2): 179-186.

[16] Fakhr MK, Nolan LK, Logue CM. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis

for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2215-2219.

[17] Kotetishvili M, Stine OC, Chen Y, et al. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 2191-2196.

[18] Drancourt M, Roux V, Dang LV, et al. Genotyping, *Orientalis*-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics[J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(9): 1585-1592.

(收稿日期: 2010-05-10)

• 综 述 •

髓过氧化物酶与冠心病

韩海荣¹综述, 沈 茜^{1△}, 赵伟国²审校

(1. 第二军医大学附属长海医院实验诊断科, 上海 200400; 2. 上海市博阳生物科技有限公司, 上海 200433)

关键词: 过氧化物酶; 动脉粥样硬化; 冠心病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0476-02

炎症在冠心病的发生、发展过程中起到了十分重要的作用。髓过氧化物酶既是氧化应激的介质, 又是系统性炎症的标志物。能通过氧化修饰作用促进动脉粥样硬化的形成, 并参与了动脉粥样斑块的发展演变过程, 甚至引起动脉粥样斑块的不稳定或破溃^[1]。目前越来越多的证据表明髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)作为冠心病一个新的预测因子对于冠心病的诊断和危险分层具有十分重要的价值^[2], 并有望成为治疗靶点。本文结合最近国内外关于 MPO 与冠心病的研究作一综述。

1 MPO 的来源和生物学特性

MPO 是粒细胞进入循环之前在骨髓内合成并贮存于嗜天青颗粒中的一种血红素蛋白酶, 主要存在于中性粒细胞、单核细胞和某些巨噬细胞中^[3]。中性粒细胞被激活后 MPO 被释放到吞噬泡和血浆中。多形核白细胞是血管内 MPO 的主要来源, 分泌的 MPO 占全部循环 MPO 含量的 95%。健康人 MPO 相对分子质量为 75×2 kDa, MPO 基因位于人类的第 17 号染色体(17p13), 含有 12 个外显子 11 个内含子, 大小为 10 kb, 调控其表达的因子是生长因子。在生理情况下, MPO 是天然免疫系统的一部分, 可抗击细菌、真菌等病原菌入侵机体, 是中性粒细胞活化的标志。然而, 在特定条件下, 它能诱导氧化应激和组织损伤, 通过多种机制参与冠心病的发生、发展。大量流行病学及临床研究显示 MPO 浓度的增高与冠心病密切相关^[4]。

2 MPO 与冠心病的发病机制

动脉粥样硬化是冠心病的病理基础, 粥样斑块是一种脂代谢紊乱所致的炎症性疾病。研究表明, MPO 在急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者中明显升高^[5-8]。在确诊急性冠脉综合征患者中, 有大量具有 MPO 活性的中性粒细胞、巨噬细胞等在粥样斑块中浸润, 提示 MPO 对于粥样斑块的形成及演变具有重要的作用^[9]。MPO 通过多种机制参与粥样斑块的形成: (1) 氧化修饰低密度脂蛋白(LDL)。该过程出现在动脉粥样硬化的早期, MPO 作用于氯化物形成次氯酸(HCLO), 作用于酪氨酸, 产生酪氨酸基。HCLO 和酪氨酸

基都能改变 LDL 的结构, 氧化修饰后的 LDL 即氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL), 它是一种能被巨噬细胞的 CD36 受体识别的脂蛋白颗粒。LDL 的氧化修饰使其能够更加有效的被巨噬细胞所摄取, 从而导致了胆固醇沉积和泡沫细胞的形成。(2) 促进泡沫细胞的形成 MPO 氧化修饰 HDL 或载脂蛋白 A-I 使得胆固醇外流功能受到选择性损伤, 抑制了 HDL 的抗粥样硬化作用, 进而促进了胆固醇的沉积、泡沫细胞的形成^[10]。把动脉壁中的巨噬细胞转变成为泡沫细胞是动脉粥样硬化发展过程中的关键环节。(3) 削弱一氧化氮(NO)的生物活性。来源于内皮细胞的 NO 是具有舒张血管, 抗炎等功能。MPO 能直接催化消耗 NO, 削弱其正常功能, 进而引起血管内皮功能障碍导致冠状动脉痉挛。(4) 降解粥样斑块纤维帽, 促使斑块破裂。MPO 通过其产生的 HCLO 活化金属蛋白酶降解粥样斑块的纤维帽, 进而导致斑块的不稳定甚至破裂或糜烂^[11]。

3 MPO 与冠心病的相关性研究

目前大量研究显示 MPO 对于冠心病的诊断及危险分层具有十分重要的作用。Ndrepepa 及其同事选取 680 例诊断为冠脉疾病的患者(382 例稳定型冠脉疾病、107 例非 ST 段抬高型急性冠脉综合征、191 例 ST 段抬高型急性冠脉综合征)并与 194 例冠状动脉造影正常者作对照研究, 结果显示冠脉疾病患者的 MPO 水平明显高于对照组, ROC 曲线下面积为 0.731 (95%可信区间 0.692~0.770; $P<0.001$); 在冠脉疾病从稳定型心绞痛发展为非 ST 段抬高型急性冠脉综合征、急性心梗的过程中检测到的 MPO 水平也逐步提高, MPO 水平与冠脉疾病的严重程度相关; MPO 与冠脉疾病具有独立的相关性, 且相关程度较超敏 C 反应蛋白(hsCRP)高^[12]。

Morrow 等通过对 1 524 例急性冠脉综合征患者随访研究发现, 基线 MPO 水平大于 884 pM 的患者近期(30 d)发生急性心血管事件(非致命性心肌梗死和死亡事件)的风险更高(93%和 46%, $P<0.001$), 说明 MPO 对于急性冠脉综合征患者近期内出现临床事件危险性的评估具有举足轻重的价值, 与肌钙蛋白(Tn)、脑钠肽(BNP)、血清可溶性 CD40 配体

△ 通讯作者, E-mail: msminli@hotmail.com。