

- [14] Ancona V, Appel DN, de Figueiredo P. Xylella fastidiosa: a model for analyzing agricultural biosecurity [J]. Biosecur Bioterror, 2010, 8(2): 171-182.
- [15] Jin DZ, Liu GC, Wen SY, et al. DNA microarrays assay for simultaneous detection and identification of multiple common intestinal pathogens [J]. Molecular & Cellular Probes, 2008, 89 (20): 337-347.
- [16] 瞿良, 王惠萱, 谭德勇, 等. 金黄色葡萄球菌的基因芯片检测研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 773-775.
- [17] Niotis AE, Mastichiadis C, Petrou PS, et al. Dual-cardiac marker capillary waveguide fluoroimmunosensor based on tyramide signal amplification [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(3): 1187-1196.

(收稿日期: 2011-11-01)

• 综 述 •

北京基因型结核杆菌播散致病的相关性研究

张运玲 综述, 朱朝敏 审核

(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科 400014)

关键词: 抗药性; 北京基因型; 结核杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.023 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)01-0053-03

北京基因型结核杆菌是结核杆菌的一个独特遗传谱系, 全球广泛分布, 并在许多地区占优势, 已达全球分离结核杆菌的 13%, 在东亚超过 50%, 并常和结核多耐药耐多药相关。在过去的十年里, 许多研究显示北京基因型结核杆菌对世界结核杆菌的流行和结核多耐药耐多药有重要意义。

1 选择性优势

北京基因型结核杆菌的广泛传播和分布与抗结核的两大措施, 即卡介苗接种和抗结核治疗有一定的相关性^[1]。长期以来, 接种卡介苗被认为可能是北京基因型结核杆菌成功蔓延的一个优势。在雅加达^[2]、印尼的一项研究中显示, 26% 的北京基因型结核杆菌和 23% 其他患者有卡介苗接种疤痕。在越南, 北京基因型结核杆菌患者中, 卡介苗接种者也比其他菌株患者高。虽然在调整年龄后相关性不明显^[3], 但许多研究提示卡介苗接种对北京基因型结核杆菌患者的保护作用更弱, 结核抗体的治疗效果更差, 这在 BALB/c 小鼠结核动物模型中得到证明^[4-5]。也有学者认为, 北京基因型结核杆菌的传播优势源于其对抗结核药的敏感性下降。

最近有调查显示, 埃塞俄比亚菌株显示出更多的基因多态性, 但卡介苗接种在突尼斯更为普遍, 这在一定程度上提示卡介苗接种对结核杆菌的选择性。北京基因型结核杆菌可能也有相似的机制。

2 分子表达的改变

北京基因型结核杆菌的蔓延在疫苗引进和抗菌剂治疗很早之前就已经开始, 提示北京基因型结核杆菌可能有内在生物学优势^[6-7], 赋予其更高的毒力, 更好的抵抗性, 和逃逸人类免疫系统的能力。全球流行的 4 种不同遗传背景的菌株中发现, 北京基因型菌株毒力最强, 且能在一定程度上抑制宿主的免疫反应, 显示分子表达的改变是导致其高毒力和宿主免疫抑制的重要因素^[8]。

体外实验中发现, 北京基因型结核杆菌的一个亚群产生具有生物活性的脂质-酚糖脂 (PGL), 抑制炎症介质的释放, 并与动物的致命性感染相关^[8]。动物模型实验发现, 敲除相关编码基因, 该菌株毒力明显减弱。但该糖脂只能由北京基因型结核杆菌的一种亚型合成, 所以其不是致病的惟一因素。同时, 体外有氧培养中发现北京基因型结核杆菌蓄积了大量的三酰甘油 (TG), 同时上调 Rv3130c (一种 DOSR 休眠调节子)。Rv3130c 的产物即 TG 合成酶, DOSR 的正调节可能使该家族成员比其

他菌株在低氧或无氧环境中更具有选择优势^[9]。

蛋白质组研究中, 与其他临床分离株和 H37Rv 相比, 北京基因型结核杆菌高表达 α -晶体体同源蛋白^[10] (16×10^3 的蛋白; 一种结核分枝杆菌的致病因子), 同时减少了热休克蛋白 Hsp65、磷酸盐转运蛋白 PstS1, 47×10^3 蛋白的表达, 逃逸宿主免疫杀伤^[11]。其中 PstS1 是 38×10^3 的磷酸脂蛋白, 已知的 T、B 细胞刺激分子。韩国一项利用人类单核细胞系 U-937 表达蛋白质的研究中发现, GlpP 蛋白在北京基因型结核杆菌的亚型中较其他菌株有更高的表达^[12], 高表达的 GlpP 蛋白可诱导巨噬细胞活化迁移抑制因子, 这对细菌是有利的。目前这些蛋白质的作用尚未完全明确, 但其可能在结核发病播散中起重要作用。

综上所述, 北京基因型结核杆菌分子表达的改变, 有助于增加毒力, 或逃避宿主防御保护机制的抑制, 利于细菌广泛播散、蔓延。

3 高免疫原性与免疫抑制

不同基因型菌株诱导不同的宿主免疫反应, 北京基因型结核杆菌可诱导不同的免疫反应或者破坏有效宿主免疫反应。北京基因型结核杆菌感染的巨噬细胞表达高水平的诱导型氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-12 (IL-12) 和低水平的抗炎因子白细胞介素-10 (IL-10)^[13], 这种细胞因子模式与结核控制相关。北京基因型结核杆菌感染的巨噬细胞虽能高表达 TNF 和 iNOS, 但不足以刺激 Th1 细胞, 阻止细菌的大量增殖, 导致大面积组织损伤和宿主早期死亡。巨噬细胞受到北京基因型结核杆菌脂质碎片的刺激, 可以表达更高水平的 TNF- α 和 IL-10, 但同时下调 TLR2 (Toll 样受体 2)、TLR4 (Toll 样受体 4)、MHc II 类分子表达, 降低了对结核菌的免疫识别和抗原呈递作用^[14-15]。有研究表明, 感染细胞的凋亡有利于宿主消除细菌的生长环境, 北京基因型结核杆菌可调节已感染肺泡巨噬细胞的凋亡, 为细菌的增殖和扩散创造条件。对肺结核鼠模型的研究显示, 北京基因型结核分枝杆菌感染鼠 1~3 d 后, 诱导活化巨噬细胞的凋亡比 H37Rv 诱导的凋亡低一半^[16]。

4 易获得耐药性

北京基因型结核杆菌被怀疑是获得耐药性优势的进化谱系, 将北京基因型结核杆菌在多药耐药菌株中的比例与在药物敏感株中的比例进行比较 (82% 与 72%) 发现^[17], 北京基因型

结核杆菌与多药耐药密切相关,但不同国家和地区各有不同,可能是由于北京家族不同亚型适应性的不均一和在当地的人口比例不同。在俄国、巴西的关于耐多药北京基因型结核杆菌的研究中,评估其毒力特征,并将耐药和敏感的北京基因型结核杆菌与标准 H37Rv 相比较,证实了其适应力更强,耐多药北京基因型结核杆菌在这一地区表现了由于毒力增强致其顺利克隆、播散的模式。一旦有 1 株耐多药,治疗就变得复杂、困难,患者在很长时期内具有传染性,更易造成播散^[18]。北京基因型结核杆菌耐药性的获得主要是其相关耐药基因突变所致,现已证实的主要相关耐药基因突变有以下几种,且证实该突变比非北京基因型结核杆菌更普遍。

4.1 katG315 基因 该基因对耐异烟肼菌株尤其重要,这与许多研究发现相符。瑞典(96%)、哈萨克(100%)、苏联(96.8%)和韩国(85.7%)等的研究中均发现了该基因的高突变频率。inhA 突变在北京基因型结核杆菌中不是很普遍,但在南非儿童耐药结核研究中,其变异在耐异烟肼的北京基因型结核杆菌中最常见^[19]。

4.2 rpoB 基因 耐 RIF 北京基因型结核杆菌突变在 rpoB 基因 531 密码子最普遍,这在耐多药北京基因型结核杆菌中比非北京基因型结核杆菌中更流行^[20]。耐 RIF 患者在大多情况下都伴随着耐 INH,很少有单耐 RIF 的报道。来自泰国的一项研究显示,531 密码子的突变率在单耐 RIF 菌株中比起在耐多药菌株中低^[21]。

4.3 EmbB 基因 EmbB 基因与耐 EMB 菌株密切相关,苏联有研究显示,北京家族与其他家族相比(50.6%与 17.4%),在 embB306 基因显示出更高的突变率^[22]。目前还没有北京基因型和其他耐药基因(如 pncA、gyrA、rpsL/rrs)的报道,其分别与吡嗪酰胺、氟喹诺酮类、链霉素的耐药相关^[23]。

可见,北京基因型结核杆菌耐药性的获得和特定的耐药突变密切相关,但不同亚型的北京基因型结核杆菌可能有不同的适应药物选择压力的机制,目前很少有此类报道,需要进行更多的研究解开其背后的耐药机制,为今后临床治疗提供更多依据。此外,北京基因型结核杆菌的毒力增加会导致更多的持续感染,长期暴露于抗结核药物治疗中,增加了耐药性获得的风险。北京基因型结核杆菌是否更易获得耐药性现在还未完全肯定,但其成功蔓延在一定程度上归因于耐药性的获得。

5 遗传变异

与 DNA 变异修补有关基因(Mut 基因)的改变会导致细菌变异频率的增加和细菌对环境压力更好地适应,从而使北京基因型结核杆菌更适合人类感染,导致疾病。北京基因型结核杆菌的 Rv3908、mutT2 和 ogt 三种公认的 DNA 突变修复基因上表现出独特的错义突变^[24],这些基因的多态性在一定程度上解释了北京基因型结核杆菌对环境的快速适应能力,导致全球蔓延的优势。研究发现,mutT2 基因在结核菌丧失必要的营养物质时起到了减缓新陈代谢率的作用^[25],使其更好地适应环境。

最近,在印尼一项研究中,北京基因型结核杆菌和 SLC11A1(天然抗性相关巨噬细胞蛋白)的多态性有紧密相关,是最重要的结核易感相关基因之一^[26]。

综上所述,北京基因型结核杆菌的成功播散除了外在选择因素外,与其内在特性密切相关,但是相关分子表达的改变和基因变异可能只在某一亚型中存在,并不能对所有北京基因型结核杆菌进行全面解释,目前尚未进行细致、深入的分型及相关研究。

由于可得到的信息有限,研究可能存在偏倚,目前不可能得到关于北京基因型结核杆菌广泛蔓延致病及耐药相关性的明确结论。有很多流行病学研究显示了北京基因型结核杆菌及其耐药性的变异,但揭示相关潜在机制的实验研究和深入的分子生物学研究都失败了,也有学者认为其耐药性并非基因突变能力增强所致,这需更多地研究该家族菌株的播散致病性在获得耐药性以及宿主免疫系统相互作用,北京基因型结核杆菌与其他基因型是否有选择优势及其相关机制。分子流行病学和结核基因组遗传学进展的结合为作者进一步揭示其相关性的潜在机制提供了一个良好的开始,解开北京基因型结核杆菌广泛蔓延的背后机制,为今后研究制定结核控制策略提供依据。

参考文献

- [1] Dvan S, Kremer K, Borgdorff M. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype, Thailand-reply to Dr Prodinger[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(4): 763-764.
- [2] van Crevel R, Nelwan RHH, de Lenne W, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(5): 880-883.
- [3] Anh DD, Borgdorff M, Gorkom T, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype emerging in Vietnam[J]. Emerg Infect Dis, 2000, 6(3): 302-305.
- [4] Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes[J]. Clin Exp Immunol, 2003, 133(1): 30-37.
- [5] Tsenova L, Harbacheuski R, Sung N, et al. BCG vaccination confers poor protection against M. tuberculosis HN878-induced central nervous system disease[J]. Vaccine, 2007, 25(28): 5126-5132.
- [6] Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, et al. Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(9): e1000160.
- [7] de Jong BC, Hill PC, Aiken A, et al. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by Mycobacterium tuberculosis lineage in the Gambia[J]. J Infect Dis, 2008, 198(7): 1037-1043.
- [8] Abebe F, Bjune G. The emergence of Beijing family genotypes of Mycobacterium tuberculosis and low-level protection by bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines; is there a link[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 145(3): 389-397.
- [9] Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, et al. The W-Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated[J]. J Bacteriol, 2007, 189(7): 2583-2589.
- [10] Ryoo SW, Park YK, Park SN, et al. Comparative proteomic analysis of virulent Korean Mycobacterium tuberculosis K-strain with other mycobacteria strain following infection of U-937 macrophage[J]. J Microbiol, 2007, 45(3): 268-271.
- [11] Stewart GR, Snewin VA, Walzl G, et al. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of Mycobacterium tuberculosis in the chronic phase of infection[J]. Nat Med, 2001, 7(6): 732-737.
- [12] Ryoo SW, Park YK, Park SN, et al. Comparative proteomic analysis of virulent Korean Mycobacterium tuberculosis K-strain with other mycobacteria strain following infection of U-937 macrophage[J]. J Microbiol, 2007, 45(3): 268-271.
- [13] Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, Ramos-Payan R, et al. Differ-

ential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 140(3): 443-449.

[14] 黄家禹, 赵岩, 宋秀宇, 等. TNF- α 和脂多糖刺激结核病患者树突状细胞成熟效果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 9.

[15] Rocha-Ramirez LM, Estrada-Garcia I, Lopez-Marin LM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages[J]. Tuberculosis (Edinb), 2008, 88(3): 212-220.

[16] Rios-Barrera VA, Campos-Pena V, Aguilar-Leon D, et al. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis; their relationship to mycobacterial virulence[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(2): 345-353.

[17] Park YK, Shin S, Ryu S, et al. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea[J]. Microbiol Methods, 2005, 63(2): 1165-1172.

[18] Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, et al. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence[J]. Microbes and Infection, 2010, 12(6): 467-475.

[19] Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, et al. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10): 3539-3543.

[20] Mokrousov I, Otten T, Vyazovaya A, et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003, 22(6): 342-348.

[21] Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, et al. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(5): 446-453.

[22] Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, et al. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3810-3813.

[23] Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains Lancet[J]. Infectious Diseases, 2010, 10(2): 103-111.

[24] Rad ME, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(7): 838-845.

[25] Moreland NJ, Charlier C, Dingley AJ, et al. Making sense of a missense mutation: characterization of MutT2, a Nudix hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*, and the G58R mutant encoded in W-Beijing strains of M[J]. Tuberculosis Biochemistry, 2009, 48(4): 699-708.

[26] van Crevel R, Parwati I, Sahiratmadja E, et al. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2009, 200(11): 1671-1674.

(收稿日期: 2011-08-11)

• 综 述 •

干细胞移植治疗下肢缺血性疾病的研究进展

邢 帅¹综述, 陈剑秋^{2△}审校

(天津医科大学第二医院: 1. 普外科实验室; 2. 外科 300211)

关键词: 骨髓; 干细胞移植; 下肢缺血疾病
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 01. 024 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)01-0055-04

近年来, 随着人口老龄化的进程及人们饮食结构的变化, 以动脉粥样硬化闭塞症、糖尿病足和血栓闭塞性脉管炎为主的下肢缺血性疾病发病率在中国逐年上升^[1]。其主要表现为周围动脉的闭塞, 约 30% 发生在髂动脉, 70% 位于股、腘以及远动脉, 单纯小腿动脉病变者仅占 15%。在严重下肢缺血患者中, 10%~30% 患者于半年内死亡, 25%~35% 的患者需高位截肢^[2]。此类患者多伴有体弱、高龄, 下肢动脉血管常表现为主干动脉及其终末支全段或大部分的严重狭窄或闭塞, 血管流出道的条件很差, 患者无法接受动脉搭桥或支架植入, 临床医师多盼望能有效解决远端流出道不理想的问题, 将其作为血管外科基本课题之一^[3]。而自体干细胞在一定诱导条件下可分化成为血管性内皮细胞, 可促进局部血管再生, 使缺血部位生成新的毛细血管网, 形成较为丰富的侧支循环, 形成远侧肢体的流出道, 达到治疗下肢缺血的目的, 近几年来得到广泛关注

和应用。

1 干细胞治疗下肢缺血性疾病的基础研究

2003 年 Tepper 等^[4]阐述血管新生有两种方式, 血管生成和血管形成, 前者是指通过血管内皮细胞迁移、增殖, 在原有的血管上以出芽的方式生长出新的血管; 后者是指在原来没有血管系统的情况下, 通过内皮祖细胞和造血干细胞的分化和相互作用产生新的血管。细胞参与血管形成的机制主要有两个方面, 一是通过归巢、整合于受损的血管丛, 进而直接分化、成熟为新血管; 二是能直接分泌血管内皮生长因子 (VEGF) 等细胞因子, 通过旁分泌的方式促进局部缺血组织的血管新生, 其准确的作用机制尚不完全清楚。目前的基础研究主要限于单纯的干细胞移植和联合基因治疗的干细胞移植。前者主要分为单个核细胞 (MNC) 移植、骨髓间充质干细胞 (MSCs) 移植、内皮祖细胞 (EPCs) 移植三大类。MNC 包括骨髓造血系细胞、

△ 通讯作者, E-mail: chenchunchenqiu@yahoo. com. cn.