

col,2007,63(6):537-546.

[9] Chen X, Wang L, Zhi L, et al. The G-113A polymorphism in CYP1A2 affects the caffeine metabolic ratio in a Chinese population[J]. Clin Pharmacol Ther, 2005, 78(3): 249-259.

[10] Chevalier D, Cauffiez C, Allorge D, et al. Five novel natural allelic variants-951A> C, 1042G> A (D348N), 1156A> T (I386F), 1217G> A (C406Y) and 1291C> T (C431Y)-of the human CYP1A2 gene in a French Caucasian population [J]. Hum Mutat, 2001, 17(4): 355-356.

[11] Huang JD, Guo WC, Lai MD, et al. Detection of a novel cytochrome P-450 1A2 polymorphism (F21L) in Chinese [J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27(1): 98-101.

[12] Allorge D, Chevalier D, Lo-Guidice J M, et al. Identification of a novel splice-site mutation in the CYP1A2 gene [J]. Br J Clin Pharmacol, 2003, 56(3): 341-344.

[13] Murayama N, Soyama A, Saito Y, et al. Six novel nonsynonymous CYP1A2 gene polymorphisms; catalytic activities of the naturally occurring variant enzymes [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308(1): 300-306.

[14] Browning SL, Tarekegn A, Bekele E, et al. CYP1A2 is more variable than previously thought: a genomic biography of the gene behind the human drug-metabolizing enzyme [J]. Pharmacogenet Genomics, 2010, 20(11): 647-664.

[15] Gunes A, Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications; influence of environmental factors and genetic polymorphisms [J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(5): 625-637.

[16] Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, et al. The interindividual differences in the 3-demthylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors [J]. Pharmacogenetics, 2002, 12(6): 473-478.

• 综 述 •

[17] Obase Y, Shimoda T, Kawano T, et al. Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theophylline metabolism in patients with asthma [J]. Clin Pharmacol Ther, 2003, 73(5): 468-474.

[18] 滕建荣, 张顺泉, 陈岳明, 等. 氯氮平在体内代谢与细胞色素 P4501A2-2964 位点多态性的关系 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(2): 176-179.

[19] Laika B, Leucht S, Heres S, et al. Pharmacogenetics and olanzapine treatment: CYP1A2* 1F and serotonergic polymorphisms influence therapeutic outcome [J]. Pharmacogenomics J, 2010, 10(1): 20-29.

[20] Härtter S, Nordmark A, Rose DM, et al. Effects of caffeine intake on the pharmacokinetics of melatonin, a probe drug for CYP1A2 activity [J]. Br J Clin Pharmacol, 2003, 56(6): 679-682.

[21] Tay J K X, Tan CH, Chong SA, et al. Functional polymorphisms of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and prolonged QTc interval in schizophrenia [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007, 31(6): 1297-1302.

[22] Dorado P, Berecz R, Penas-Lledó EM, et al. No effect of the CYP1A2* 1F genotype on thioridazine, mesoridazine, sulforidazine plasma concentrations in psychiatric patients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2007, 63(5): 527-528.

[23] Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, et al. Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine [J]. Br J Clin Pharmacol, 1999, 47(4): 445-449.

[24] Ou-Yang DS, Huang SL, Wang W, et al. Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population [J]. Br J Clin Pharmacol, 2000, 49(2): 145-151.

(收稿日期: 2013-09-20)

胞外 DNA 在细菌生物膜形成中的作用

黄 炎¹综述, 徐元宏^{2△}审校

(1. 伦敦大学学院感染免疫系, 英国伦敦 WC1E 6BT; 2. 安徽医科大学第一附属医院检验科, 安徽合肥 230032)

关键词:胞外 DNA; 细菌生物膜; 综述
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 24. 054 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)24-3380-03

细菌生物膜是微生物在生长过程中为了适应生存环境而形成的与浮游细胞相对应的存在形式^[1]。细菌生物膜的特殊结构及其对耐药性的影响是造成很多慢性顽固性感染的原因^[2]。胞外 DNA 来自于死亡细菌体裂解释放或活菌主动分泌, 是细菌生物膜胞外基质中的重要成分之一。在多数种类的细菌生物膜中, 尤其是致病菌所形成的生物膜, 胞外 DNA 起到了促进生物膜形成的作用^[3] (如铜绿假单胞菌^[1]、表皮葡萄球菌^[4]、金黄色葡萄球菌^[5]、肺炎链球菌^[6]、脑膜炎奈瑟菌^[7]、淋病奈瑟菌^[8]、单核细胞增多性李斯特菌^[9]和部分真菌如白色念珠菌^[10])。然而, 近几年对新月柄杆菌的研究提示, 某些细菌所形成的生物膜或者在某些特定情况下, 胞外 DNA 亦可限制生物膜的形成, 这可能与胞外 DNA 的片段长度有关, 亦或者是由于新月柄杆菌的特定生活周期所致^[11]。生物膜中的活菌可摄取基质中的胞外 DNA 并整合入其染色体 DNA, 这是生

物膜中水平基因转移的主要方式, 如毒力因子和耐药基因的传播。而不能用于基因转化的异源性 DNA 可作为细菌生长的营养物质。本文旨在总结生物膜中胞外 DNA 的结构作用, 以及胞外 DNA 的来源和去路 (基因转化、营养作用)。

1 胞外 DNA 对生物膜结构的影响

1.1 胞外 DNA 介导了起始黏附并稳定已成熟的生物膜 继 2002 年对铜绿假单胞菌生物膜中胞外 DNA 作用的研究之后, 一些类似研究, 如对金黄色葡萄球菌 (2006)、肺炎链球菌 (2006)、表皮葡萄球菌 (2007)、脑膜炎奈瑟菌 (2010)、以及单核细胞增多性李斯特菌 (2010) 的研究相继出现。虽然有细微差异, 总体来说这些研究均表明胞外 DNA 是介导起始黏附和稳定已成熟生物膜的必要组分。

胞外 DNA 在细菌生物膜形成的起始黏附阶段起到了菌体表面间、菌体与菌体间的黏合剂作用。在上述所有病原菌菌

膜的研究中,用 DNA 酶去除胞外 DNA 并不影响细菌生长,但可显著抑制细菌黏附。Harmsen 等^[9]为对单核细胞增多性李斯特菌的研究表明,与不做任何处理相比,在培养液中加入 DNA 酶移除胞外 DNA,37 ℃ 孵育 30 min 后细胞培养玻片表面黏附的细菌显著减少,而加入 RNA 酶不产生任何影响。蛋白酶去除蛋白对黏附是否有影响取决于不同的菌株、附着表面的性质和蛋白酶的种类^[9,12]。胞外 DNA 也是后续生物膜形成,以及维持其稳定性的重要组分。胞外 DNA 将单个菌体交联至微生物菌落,并阻止细菌从菌落上冲刷下来。在早期对铜绿假单胞菌菌膜的研究中,Whitchurch 等^[11]就证明了在培养基中加入 DNA 酶,72 h 后黏附表面上的菌量仅为不加 DNA 酶时的 1/3。而 Lappann 等^[7]对脑膜炎奈瑟菌生物膜的研究也表明,无胞外 DNA 分泌的突变体菌株在孵育 12 h 后仍无法形成菌膜,只能以分散的菌体存在。

然而,胞外 DNA 在生物膜形成过程中对结构作用的强度随生物膜的生长而降低。一些对铜绿假单胞菌^[11]、表皮葡萄球菌^[4]、单核细胞增多性李斯特菌^[9]和脑膜炎奈瑟菌^[7]的研究显示,在生物膜生长的不同时期加入 DNA 酶会产生不同的结果。当 DNA 酶加入一个新形成的菌膜,后续的生物膜形成可以被显著抑制,已形成的部分也会被迅速溶解。然而加入一个成熟的生物膜,DNA 酶的作用就很微弱。图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)显示在铜绿假单胞菌生物膜形成的不同阶段(12、36、60、84 h)加入 DNA 酶,均继续孵育 150 min 后,12、36、60 h 的生物膜可以被分解,而 84 h 的生物膜不能被分解。这或许是由于成熟的生物膜产生了足够的蛋白酶使 DNA 酶失活^[11],或者除了胞外 DNA,存在另一物质稳定生物膜。对于单核细胞增多性李斯特菌菌膜,DNA 酶对生物膜的抑制作用可通过单纯加入未处理的外源性 DNA 不完全恢复,或通过加入蛋白酶 K 处理的纯化 DNA 完全恢复^[9]。这一结果进一步表明稳定生物膜的另一物质并不是蛋白质。而裂解的细胞释放出的肽聚糖,尤其是其组分氮乙酰氨基葡萄糖则是最可能的物质。但是,对脑膜炎奈瑟菌的研究显示,对生物膜的抑制作用可以通过加入未纯化的 DNA 恢复,但不可通过加入蛋白酶 K 处理的 DNA 恢复,提示 DNA 和蛋白质组分的相互作用可能对生物膜的形成有一定影响^[7]。

1.2 胞外 DNA 在某些情况下可能抑制菌膜形成 值得注意的是胞外 DNA 在细菌生物膜形成中的作用可能受 DNA 片段长度的影响。在前文所述的支持胞外 DNA 促进菌膜形成的研究中,胞外 DNA 的长度大约为 20~30 kb。然而在对单核细胞增多性李斯特菌的研究中提出,如果人为地将消化的染色体 DNA 或短 DNA 片段扩增得到的 200 bp 左右的 DNA 片段加入生物膜,则对其形成产生抑制作用^[9]。

提出胞外 DNA 在生物膜形成中具有抑制作用的第一个模型是新月柄杆菌,一种广泛分布于淡水中的细菌。新月柄杆菌有独特的双态生长周期:游动细胞(swarmer cell)时期和柄细胞(stalked cell)时期。胞外 DNA 可以结合在游动细胞的黏性末端 holdfast(一种高度黏合性、有极性的多糖)上,抑制新的游离菌体结合在生物膜上,从而抑制生物膜形成。新月柄杆菌生物膜中的胞外 DNA 长度约为 500 bp,远大于笔者之前所述的致病微生物膜中胞外 DNA 的长度。此外,研究者尝试用来源于其他多种细菌的胞外 DNA 阻止 holdfast 的黏合,但未抑制生物膜的形成^[11]。

2 生物膜中胞外 DNA 的来源

研究人员通过 PCR 技术和 Southern 分析发现菌膜中胞

外 DNA 和细菌染色体 DNA 具有同源性。但是不同菌种的 DNA 释放机制不同,并且有些菌膜中胞外 DNA 来源不止一种途径,如铜绿假单胞菌。

2.1 菌膜中部分细菌裂解 表皮葡萄球菌菌膜中,部分细菌中自溶素 *altE* 基因被激活后,细菌裂解释放 DNA,这些 DNA 对其他未溶解细菌构建生物膜起到促进作用^[4]。金黄色葡萄球菌通过 *cidA* 基因激活胞壁质水解酶,从而裂解菌体释放基因组 DNA。肺炎链球菌部分菌体的裂解与诱发转化活性有关,依赖 *LtyA* 基因(编码肺炎球菌自溶素)和 *LtyC* 基因(胞壁质水解酶)^[6]。脑膜炎奈瑟菌胞外 DNA 的释放机制根据生物膜的不同阶段而异。早期阶段依赖 *MltA*,*B*(膜结合的裂解转糖基酶)和 *AmpD*(胞质-乙酰胞壁碱-L-氨基酰胺酶);晚期阶段依赖自溶素外膜磷脂酶 *A*^[7]。铜绿假单胞菌 DNA 的释放与噬菌体诱导和喹诺酮信号(PQS)的激活有关^[13]。

2.2 释放含有 DNA 的小囊泡 铜绿假单胞菌菌膜除通过噬菌体介导菌体裂解 DNA 释放外,活菌还可分泌含有 DNA 的小囊泡。囊泡再通过自溶素裂解释放胞外 DNA,并通过其溶菌活性裂解其他菌体^[13]。

2.3 活细胞的主动分泌 淋病奈瑟菌可通过 *Gonococcal Genetic Island*(GGI)编码的蛋白所构成的一种特殊的 IV 型分泌系统分泌染色体 DNA^[8]。

3 胞外 DNA 在细菌生物膜中的其他作用

3.1 胞外 DNA 的摄取和自然基因转化 生物膜基质中的胞外 DNA 可被周围活菌摄取并用于基因转化,细菌可进行这一活动的状态是短暂的,称为“感受态”。除了铜绿假单胞菌,大多数可形成生物膜的细菌有自然形成感受态的能力,如枯草芽孢杆菌,变异链球菌,肺炎链球菌,流感嗜血杆菌,淋病奈瑟菌^[14]。由于革兰阳性菌和革兰阴性菌的包被结构不同,DNA 摄取机制也有所不同。对于革兰阳性菌,胞外 DNA 需穿过细胞壁和质膜进入细胞,对于革兰阴性菌,仅需要穿过外膜。然而,由于蛋白的同源性,大部分细菌摄取胞外 DNA 的基本原理是相同的。首先,双链的胞外 DNA 结合在感受态细菌表变的受体上,例如 *ComEA*,一种有 DNA 结合活性的蛋白,是枯草芽孢杆菌表面的 DNA 结合受体^[15]。对于大多数种类的细菌来说,这种结合是非序列特异性的,但是对于某些革兰阴性菌,如流感嗜血杆菌和奈瑟菌属,则依赖一种特殊的 DNA 摄取序列 *DUS*^[15]。接下来,DNA 双螺旋中的一条链通过 DNA 异位复合体进入胞质,另一条被核酸酶降解。对于革兰阴性菌,构成异位复合体的蛋白与组成 IV 型菌毛和 II 型分泌系统的蛋白非常相似^[15]。最后,若含有同源性区域,异位入胞质的单链 DNA 通过 *RecA* 的介导整合入受体菌染色体 DNA。感受态细菌的染色体 DNA 上此时出现一些单链缺口便于重组^[16]。

基因转化是细菌适应和进化的主要力量,例如获得毒力因子和耐药性。在菌膜中,各个细菌长期相互接近,利于基因转化。变异链球菌是生物膜体外研究的重要模型,其链霉素抵抗^[16]和一些致龋能力如合成非水溶性葡萄糖和产生细菌素^[18]就与自然基因转化有关。此外,对变异链球菌和革兰阴性菌的代表菌不动杆菌的研究表明,与浮游细菌不同,菌膜中的细菌可长期处于感受态,尤其是表面黏附的菌群^[16]。并且极少量的胞外 DNA 和极短的时间就可发生转化^[16]。

3.2 胞外 DNA 的降解和营养作用 转化过程中产生的胞外 DNA 片段可以作为碳和能量的唯一来源,支持菌膜中其余细菌的生长。为了保护受体菌,转化仅能利用同源性 DNA,而营养作用可兼性利用同源性异源性 DNA,这一特点提高了胞外

DNA 利用的效率,尤其在诸如牙菌斑这种菌种混杂的环境中^[14]。虽然至今还没有关于胞外 DNA 营养作用的系统性实验,Finkel 等^[14]的研究表明不能将双链 DNA 作为碳源的突变菌种与野生型相比有明显的竞争劣势,尤其在长期营养匮乏的环境中。而且由于蛋白的同源性,将 DNA 作为营养物的能力与自然基因感受态有一定关系。因此,可以推断,由于生物膜里层细菌更不易接触营养基,尤其在生物膜形成的晚期这种营养物质匮乏的情况下,胞外 DNA 是其存活的重要营养来源^[16]。

4 总结与展望

胞外 DNA 通常来说可以促进细菌生物膜的构建,并且通过转化提高菌群的致病性。它是治疗生物膜相关疾病的新靶点,去除胞外 DNA 可以分散生物膜,从而提高疗效。此外,长远来说,分散有害的生物膜可以阻止毒力因子及抗菌药物耐药性的传播。目前已证明雾化的人重组 DNA 酶可有效的降低囊泡性肺纤维化患者痰液的黏度,并可预防铜绿假单胞菌的慢性感染^[1]。

参考文献

[1] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation[J]. Science, 2002, 295(5559):1487.

[2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418):1318-1322.

[3] Jermy A. Biofilms: eDNA limits biofilm attachment[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(9):612-613.

[4] Qin Z, Ou Y, Yang L, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis[J]. Microbiology, 2007, 153(7):2083-2092.

[5] Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in Staphylococcus aureus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(19):8113-8118.

[6] Moscoso M, García E, López R. Biofilm formation by Streptococcus pneumoniae: role of choline, extracellular DNA, and capsular

polysaccharide in microbial accretion[J]. J Bacteriol, 2006, 188(22):7785-7795.

[7] Lappann M, Claus H, Van Alen T, et al. A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of Neisseria meningitides[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(6):1355-1371.

[8] Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, et al. Neisseria gonorrhoeae secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system[J]. Mol Microbiol, 2005, 55(6):1704-1721.

[9] Harmsen M, Lappann M, Knöchel S, et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by Listeria monocytogenes[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(7):2271-2279.

[10] 许颖, 刘亚男, 赵亮. 白色念珠菌生物膜中胞外 DNA 分布观察[J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(3):17-18.

[11] Berne C, Kysela DT, Brun YV. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm[J]. Mol Microbiol, 2010, 77(4):815-829.

[12] Smoot LM, Pierson MD. Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of Listeria monocytogenes Scott A to Buna-N rubber and stainless steel[J]. J Food Prot, 1998, 61(10):1286-1292.

[13] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms[J]. Mol Microbiol, 2006, 59(4):1114-1128.

[14] Finkel SE, Kolter R. DNA as a nutrient novel role for bacterial competence gene homologs[J]. J Bacteriol, 2001, 183(21):6288-6293.

[15] Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(3):241-249.

[16] Cvitkovitch DG. Genetic exchange in biofilms[M]. Washington DC: ASM, 2004:192-199.

[17] Perry D, Kuramitsu HK. Genetic transformation of Streptococcus mutans[J]. Infect Immun, 1981, 32(3):1295-1297.

[18] Kuramitsu HK, Trapa V. Genetic exchange between oral streptococci during mixed growth[J]. J Gen Microbiol, 1984, 130(10):2497-2500.

(收稿日期:2013-09-18)

• 综 述 •

乙型肝炎病毒基因突变与中医证候的关系

李菲菲 综述, 王 蕾[△] 审校

(上海中医药大学附属龙华医院检验科, 上海 200032)

关键词:乙型肝炎病毒; 基因突变; 中医证候
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.055

文献标识码:A **文章编号:**1673-4130(2013)24-3382-03

乙型肝炎病毒感染是一个严重危害全世界人类健康的公共卫生问题^[1]。由于 HBV DNA 复制过程中具有突变特性^[2-4], HBV 不同位点突变, 既对慢性乙型肝炎发展成肝硬化、肝癌有重要影响^[5-6], 又给疾病的预防、诊断、治疗等方面带来了新的挑战。研究 HBV 基因突变与中医证候的关系, 不仅是完善中医微观辨证的基础, 也是中医辨证客观化、规范化、标准化的要求, 更是提高慢性乙型肝炎治疗疗效的依据^[7]。因此笔

者对乙型肝炎病毒基因突变与中医证候的关系做一综述。

1 HBV 前 C 区突变与中医证候的关系

HBV 前 C 区突变与慢性乙型肝炎的治疗及预后密切相关。慢性乙型肝炎患者的 HBV 前 C 区基因及其调控突变序列具有多样性及复杂性, 与体内的免疫清除及病毒逃避免疫攻击有关, 从而容易导致疾病的慢性化^[8], 致使 HBV 持续复制并诱导肝脏炎症活动和肝损害, 从而使肝纤维化程度呈加重趋

作者简介:李菲菲,女,在读硕士,主要从事乙型肝炎病毒基因突变及相关研究。 [△] 通讯作者, E-mail:wolei6610@126.com。