

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。

势,同时也是慢性重型肝炎的重要发病机制之一^[9]。但有研究认为前 C 区突变是普遍现象,与疾病严重似无明显相关^[10]。

根据中医辨证将各类证候分成虚证和实证,把湿热中阻证、瘀血阻络证归为实证组;把肝郁脾虚证、肝肾阴虚证、脾肾阳虚证归为虚证组。肖倩等^[11]认为,前 C 区突变与中医辨证分型存在相关性,可能的机制与 HBeAg 阴性患者大多病程较长(或 HBsAg 携带史较长)有关,湿热、瘀血为病理基础,引起气滞、阴虚、阳虚等病理变化致使病情迁延难愈,因实致虚,符合慢性乙型肝炎的自然发展过程,也说明虚证患者(尤其是肝郁脾虚证和脾肾阳虚证)较实证更容易发生前 C 区突变。但另一有研究认为实证患者比虚证患者更容易发生前 C 区突变。有研究发现 102 例未经拉米夫定及干扰素治疗的 HBV DNA 阳性慢性肝炎患者中,实证组前 C 区 1896 位点的突变株检出率明显高于虚证组,其中湿热中阻证患者突变株的检出率最高^[12]。该研究认为实证者可能较易发生前 C 区点突变,其中湿热中阻证患者可能更为显著。出现不同的结论,分析原因可能为研究的对象不同,分别为 HBeAg 阴性患者(大多为 HBV DNA 为阴性)和 HBV DNA 阳性患者,患者的疾病状态个体差异较大,提示中医辨证对乙肝患者个体化治疗具有重要意义。

关于慢性乙型肝炎患者前 C 区基因突变位点与中医证候的关系,有研究采用基因芯片检测慢性乙型肝炎不同证候的 HBV 前 C 区基因突变^[13-14]。研究发现,不同证候突变株信号强度差异显著,对于 1762 位点、1764 位点:瘀血阻络证>肝肾阴虚证>肝郁脾虚证;对于 1862 位点:肝肾阴虚证>肝郁脾虚证;对于 1896 位点:肝肾阴虚证>瘀血阻络证>湿热中阻证>肝郁脾虚证;而对于 1899 位点:瘀血阻络证>肝肾阴虚证>湿热中阻证>肝郁脾虚证,表明慢性乙型肝炎 HBV 前 C 区基因突变与中医证候相关。研究还发现,HBV 前 C 区基因突变的检出率与血清肝纤维化标志物水平成正相关,提示 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势,因此瘀血阻络证可能更容易发展成肝硬化和肝癌。

对前 C 区突变的慢性乙型肝炎患者,运用传统中医中药适时切入的治疗,可避免患者病情进一步加重。肖琳等^[15]采用基因芯片技术定量检测慢乙型肝炎胆湿热/湿热中阻证患者治疗(清热利湿)前后的 HBV 前 C 区 1762 位点、1764 位点、1896 位点、1899 位点突变率。结果,治疗后 1762 位点、1764 位点、1896 位点突变株信号强度下降,其中 1896 位点信号强度显著下降($P<0.05$)。研究表明,清热利湿法在改善慢性乙型肝炎肝胆湿热/湿热中阻证患者临床症状的同时,可在一定程度上抑制 HBV 前 C 区突变株的复制。

2 HBV C 基因启动子 (BCP) 双突变慢性乙型肝炎患者的中医证候特点

HBV BCP 区突变可导致 HBeAg 的合成减少或停止,血清 HBeAg 水平下降或消失,但 HBV 的复制增强。由于失去了 HBeAg 的免疫调节,表达 HBeAg 的肝细胞受增强的 CTL 细胞的细胞毒作用,激发或加重机体免疫反应,从而导致肝细胞的损伤进一步加重,甚至成为原发性肝癌的高危因素^[16-18],并与急性、亚急性和慢加急性肝衰竭相关^[19]。

关于 HBV C 基因启动子 (BCP) 双突变与慢性乙型肝炎患者的中医证候特点,有研究^[20-22]对 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 168 例进行观察发现,HBV BCP 双突变的慢性乙型肝炎患者中医证候以实证中的湿热中阻为主,肝郁脾虚居次。此外研究结果还发现实证组的突变检出率明显高于虚证组,其中湿

热中阻证患者突变株的检出率最高,因此认为实证者可能较易发生 C 基本启动子双突变,其中湿热中阻证患者突变株的检出率最高。原因可能为慢性乙型肝炎患者的细胞免疫和体液免疫功能有差异。实证患者机体的免疫功能亢进,部分 HBV 可能发生突变,从而逃避机体的免疫清除,并逐步成为优势毒株。虚证患者免疫功能低下,感染 HBV 后并没有很强的免疫应答来清除病毒,HBV 发生突变的可能性相对较小,或者可能一开始就感染了 HBV 突变株,因此虚证中也有突变株的检出。

3 HBV-YMDD 突变与中医证候的关系

临床常常使用核苷类似物治疗慢性乙型肝炎,但由于 HBV 出现 P 基因区 YMDD 突变,易引起基因耐药,但也有报道^[23]未行任何抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者仍存在 YMDD 突变。慢性乙型肝炎患者出现 HBV-YMDD 突变后不仅肝功能及乙肝病毒血清标志物出现反跳,部分患者出现病情加重,少数甚至发生肝功能失代偿或死亡^[24]。但也有研究称基因突变也可能导致病毒复制能力的降低,并不会加重病情^[25]。

有研究报道^[26],100 例服用拉米夫定的慢性乙型肝炎患者,比较 6、12、18 个月时各组的 YMDD 突变率,结果各组 HBV-YMDD 突变发生率 6 个月时无差异或差异无统计学意义。12、18 个月时,瘀血阻络组最高,肝肾阴虚组次之,肝郁脾虚组和湿热中阻组最低,提示拉米夫定治疗后,慢性乙型肝炎 HBV-YMDD 突变发生率与中医证候之间有一定的相关性。拉米夫定联合扶正化瘀胶囊有调节慢性乙型肝炎患者细胞免疫水平的作用,可降低 YMDD 突变率^[27]。因此,充分发挥中医中药的优势,可以弥补和完善对 HBV-YMDD 突变的治疗。

对 48 例经拉米夫定治疗后患者出现 HBV-YMDD 突变与中医虚实证型关系的相关研究发现^[28],HBV-YMDD 突变患者实证组(38/48)中突变率明显高于虚证组(10/48)。说明中医辨证实证与虚证不仅与前 C 区突变有关,而且与 HBV-YMDD 突变也是密切相关的。中医认为:实证与湿热、瘀血密切相关。HBV 是湿热难缠之邪,湿热在疾病的发展过程中占主导地位,它可使病情迁延反复,丛生变证。湿热之渐可导致气滞、瘀血,而瘀血又是乙型慢性病毒性肝炎的病理特征。湿与热与瘀互结,与毒相搏,使病情更为复杂。因此,实证较虚证更容易发生 HBV-YMDD 突变。

4 总结与展望

对于一些并非热点的突变区域,以及多个区域位点的联合突变,中医证候研究的比较匮乏,如 HBV S 区基因突变,多项研究发现在肝细胞癌患者中 pre-S 缺失突变、pre-S 起始密码子突变、S 基因点突变发生频率较高,并认为这些突变是肝细胞癌的高危因素^[29]。但关于中医证候与 S 区基因突变的关系尚未见报道。因此,需不断加强中医证候与非热点的突变区域及多个区域位点联合突变关系的研究。

了解 HBV 突变,预测突变的发生,有助于提高乙型肝炎抗病毒治疗的成功率,合理用药,防止耐药发生,减少不必要的医疗资源的浪费。HBV 基因突变与中医证候的相关性研究,将发挥中医辨证论治优势,同时结合现代医学为慢性乙肝患者提供新的治疗手段,为中西医结合治疗慢性乙型肝炎提供可靠的依据。

参考文献

- [1] Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis[J]. Oncogene, 2010, 29(16):2309-2324.

[2] Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(46):5761-5769.

[3] Grabarczyk P, Garmiri P, Liszewski G, et al. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus genotype A and D infected blood donors in Poland[J]. J Viral Hepat, 2010, 17(6):444-452.

[4] Sharma S, Sharma B, Singla B, et al. Clinical significance of genotypes and precore/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in North India[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(3):794-802.

[5] Ren X, Xu Z, Liu Y, et al. Hapatitis B virus genotype and basal core promoter/precore mutations are associated with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure without pre-existing liver cirrhosis[J]. J Viral Hepatol, 2010, 17(12):887-895.

[6] Liu S, Zhang H, Gu C, et al. Associations Between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma; a meta-analysis[J]. Natl Cancer Inst, 2009, 101(15):1066-1082.

[7] Vergani D, Mieli-Vergni G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis [J]. Word J Gastroenterol, 2008, 14(21):3306-3312.

[8] 梁蔚芳, 何海棠, 刘志华, 等. 乙型肝炎病毒前 C/C 区及其调控基因变异的研究[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(4):331-334.

[9] 周秀梅, 顾华丽, 朱亮, 等. 慢性重型乙型肝炎前 C 区及 BCP 区基因突变的临床意义[J]. 山东医药, 2009, 49(1):57-58.

[10] Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS, et al. Word-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core pro2moter variants[J]. J Viral, 2002, 9(1):52-61.

[11] 肖倩, 向晓星, 龙爱华. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者 HBV 变异与中医分型的相关性研究[J]. 江苏中医药, 2008, 40(4):22-24.

[12] 周飞, 王灵台, 陈建杰, 等. 乙型肝炎病毒前 C 区基因变异与中医证型的关系[J]. 世界感染杂志, 2003, 3(4):286-288.

[13] 李瀚昱, 赵映前, 向楠, 等. HBV 前 C 区基因变异与中医证候的相关性研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22(2):84-85.

[14] 李瀚昱, 张振鄂, 张金发, 等. HBV 前 C 区基因变异与血清肝纤维化标志物的相关性研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2003, 19(1):29-30.

[15] 肖琳, 李瀚昱, 高翔, 等. 清热利湿法对慢性乙型肝炎 HBV 基因突变株复制的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(5):261-263.

[16] Yuen MF, Tanaka Y, Mizokami M, et al. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma; A case control study[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(9):1953-1958.

[17] Inoue J. Factors involved in the development of fulminant hepatitis B; Are the mutations of hepatitis B virus implicated? [J]. Hepatol Res, 2009, 39(11):1053-1055.

[18] Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma; a prospective study[J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(9):2254-2262.

[19] Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, et al. Role of hepatitis B viral load and Basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers[J]. J Infect Dis, 2006, 193(9):1258-1265.

[20] 蒋开平, 王虹, 陶银, 等. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子双变异患者中医证候特点研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(5):259-261.

[21] 周飞, 王灵台, 陈建杰, 等. 乙型肝炎病毒 BCP 联合点突变与中医证型的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(9):777-779.

[22] 施卫兵. 慢性乙型肝炎中医证型与客观检测指标的相关性研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(5):275-280.

[23] 周一鸣, 曹建彪, 闻炜, 等. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异后果及原因分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(11):1035-1037.

[24] 丘源旺, 蒋祥虎, 黄利华, 等. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异的治疗对策[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(3):171-174.

[25] Sallie R. Replicative homeostasis; a fundamental mechanism mediating selective viral replication and escape mutation[J]. Virol J, 2005, 2(1):10.

[26] 缪锡民, 章亮. 慢性乙型肝炎 YMDD 变异与中医证型的临床研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(6):702-703.

[27] 陈星浩, 宋洁, 石玉珍, 等. 核苷(酸)类似物联合中药治疗 HBV-P 基因序列耐药变异研究[J]. 临床合理用药, 2013, 2(6):1-2.

[28] 张玮, 王奕, 贺德昌, 等. HBV-YMDD 变异患者与中医虚实辨证关系初探[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(9):731-732.

[29] Chen CH, Hung CH, Lee CM, et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients [J]. Gastroenterology, 2007, 133(5):1466-1474.

(收稿日期:2013-09-12)

• 综 述 •

肿瘤标志物在肺癌诊断中的研究进展

王 冰 综述, 邱 红 审校

(中国人民解放军第八一医院检验科, 江苏南京 210002)

关键词:肺癌; 肿瘤标志物; 综述
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 24. 056

文献标识码:A **文章编号:**1673-4130(2013)24-3384-03

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率在逐年上升,早期诊断肺癌在临床工作中具有重要意义。肿瘤标志物具有早期发现特定肿瘤的作用,而目前肿瘤标志物的概念已突破了原来的范围,内容包括肿瘤抗原、激素、受体、酶与同工酶、癌基因与抑癌基因及其产物等 200 余种,其作用也从

单纯的肿瘤诊断扩大到检测肿瘤复发与转移、判断疗效和预后以及人群普查等方面。用于肺癌诊断的肿瘤标志物很多,本文就近年来新现的肺癌肿瘤标志物作一综述。

1 蛋白质类肿瘤标志物

1.1 Dickkopf 1 蛋白(DKK1) DKK1 是 Wnt 信号途径的一