

• 综 述 •

# 白细胞介素 12 基因多态性与结核易感性的关系\*

胡世玲 综述, 陈维贤<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 404016)

**关键词:** 结核; 白细胞介素 12; 基因多态性

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 03. 022

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)03-0307-03

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌感染引起,在全球由单一致病菌致死最多的慢性传染病。人类基因组学指出遗传易感性可能是影响宿主免疫功能和结核病发生、发展的因素之一,然而,基因多态性和环境因素共同影响了结核病的发病与转归。Cooper 等<sup>[1]</sup>提出,γ-干扰素、白细胞介素(interleukin, IL)-12、IL-17、IL-23 和 IL-27 等细胞因子在结核病免疫反应中起着关键作用。其中,IL-12 作为促炎性细胞因子,与宿主抗结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染的先天性和获得性免疫反应密切相关,在机体抗 MTB 感染过程中起到了重要的保护作用<sup>[2-5]</sup>。

## 1 IL-12 的产生和发现

IL-12 又称自然杀伤细胞刺激因子(natural killer cell stimulatory factor, NKSF)或细胞毒性淋巴细胞成熟因子(cytotoxic lymphocyte maturation factor, CLMF)<sup>[6]</sup>;它来自于活化的淋巴细胞,主要由巨噬细胞和单核细胞产生,部分来自中性粒细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞等,由美国的 Stern 等<sup>[7]</sup>发现;1991 年被 CLMF cDNA 成功克隆表达,并且被命名为 IL-12。有研究表明,在淋巴组织(胸腺、脾、骨髓)、非淋巴组织(肝、肾、肌肉等)中均能表达 IL-12,而在受到刺激的淋巴组织中 IL-12 为高水平表达。在体外条件下,脂多糖(LPS)、刀豆蛋白(ConA)、植物血凝素(PHA)能诱导脾脏细胞和外周血单核细胞产生 IL-12。

## 2 IL-12 的分子结构和生物学功能

天然 IL-12 是由相对分子质量分别为  $35 \times 10^3$  (IL-12A, p35)和  $40 \times 10^3$  (IL-12B, p40)的两个亚基通过二硫键连接而成的异二聚体(p70)。2 个亚基由不同的基因所编码,当 p35 和 p40 两者单独存在时无生物学作用,只有以异二聚体方式结合为 p70,即将编码两个亚单位的 cDNA 同时转染后才能获得具有生物学活性的 IL-12<sup>[8-9]</sup>。

人 IL-12 的作用具有种属特异性,它有诱导外周血细胞、T 细胞、NK 细胞产生 γ-干扰素;增强 T 细胞、NK 细胞杀伤活性;促进 T 细胞、NK 细胞增殖等功能。IL-12 是调节宿主免疫反应的关键分子,其发挥生物学效应所需的细胞因子浓度很低( $\leq 1$  pmol/L),在肿瘤免疫治疗<sup>[10]</sup>和抗寄生虫、抗病毒免疫治疗方面均有潜在的应用价值。

## 3 IL-12 基因多态性与结核易感性的关系

**3.1 IL-12A 基因多态性与结核易感性** IL-12A(p35)能激活 T 细胞和 NK 细胞,提高淋巴因子激活的杀伤细胞的裂解活性,并通过抑制外周单个核细胞来刺激产生 γ-干扰素。

IL-12A 基因的易感性研究报道相对较少。国内 Wang

等<sup>[11]</sup>研究发现位于 IL-12A 5'UTR 的 rs2243115 TG/GG 多态性降低了中国人群结核病的易感率( $OR=0.7, P<0.05$ ),位于其 3'UTR 的 rs568408 G/A 基因多态性与结核易感性之间无关联。国外 Kusuvara 等<sup>[12]</sup>研究显示 IL-12A 3'下游 rs668998、内含子 rs2242382 等基因多态性均与结核易感的相关性无统计学意义。

**3.2 IL-12B 基因多态性与结核易感性** IL-12B(p40)是 IL-12 的重要组成部分。国内外的许多研究已经发现,IL-12B 的启动子、内含子 2、内含子 4、外显子 5、3'UTR 基因多态性与结核病有相关性。3'UTR 和启动子上等位基因的变异对 IL-12B mRNA 和 IL12p70 的表达水平有着不同的效应,内含子 2 与结核易感的相关性最强。

2003 年, Tso 等<sup>[13]</sup>研究证实中国香港人群 IL-12B 内含子 2 纯合体感染结核率是杂合体的 2.14 倍,而启动子、内含子 4、3'UTR 基因多态性与结核病之间的关联没有统计学意义。Sahiratmadja 等<sup>[14]</sup>研究结果显示,在印度尼西亚人群中 IL-12B 启动子多态性与结核易感性的关系十分微弱,但接种过卡介苗(BCG)后,IL-12B 杂合体是印尼人结核病的抗性基因或称预防性基因( $OR=0.6, P=0.03$ )。此外,相关研究也表明印度、冈比亚和几内亚等国 IL-12B 基因的多态性是结核病易感的危险因素<sup>[15]</sup>。Morahan 等<sup>[16]</sup>也认为,结核病患者不仅拥有高表达的 IL12B 启动子基因型( $P=0.01$ ),更有可能拥有高表达的 3'UTR 的等位基因( $P=0.0009$ )。而在中国研究发现 IL-12B 3'UTR rs3212227 多态性可能是结核病的危险因素,差异却没有统计学意义。Kusuvara 等<sup>[12]</sup>研究也显示日本人群 IL-12B rs11135058、rs6870828、rs2288831 的多态性与结核病之间的关系不明显。

可见,IL-12B 基因多态性与结核易感性之间的关系存在种族差异,但 Ma 等<sup>[17]</sup>同时进行病例对照研究和家系遗传连锁不平衡检验指出白人和黑人 IL-12 3'UTR 基因多态性与结核易感具有相关性是无可否认的。

**3.3 IL-12 受体(IL-12R)基因多态性与结核易感性** IL-12R 主要有 IL-12Rβ1 和 IL-12Rβ2 两种,其中 IL-12Rβ2 的多态性并不常见。Verma 等<sup>[18]</sup>研究发现,IL-12Rβ2-237C/T 多态性位于调控区,能潜在地调节 IL-12Rβ2,同时也影响了 IL-12 的基因表达。大多数结核患者及所有健康对照 IL-12Rβ2-237 位点以 C 等位基因为主(93.4%, 43/46),而个别结核患者仅含有 T 等位基因(6.5%, 3/46)。

IL-12Rβ1 的两种常见单体型,等位基因 1: QMG(Q214-M365-G378)和等位基因 2: RTR(R214-T365-R378),它们对

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171628)。 作者简介:胡世玲,女,研究生,主要从事病原菌致病机制的研究。 △ 通讯作者, E-mail: chenweixian75@163.com。

IL-12 的反应有所不同。有人发现,日本人群中 RTR 单体与结核病有关系;RTR 纯合子是结核病易感的危险因素( $OR=2.45, P=0.013$ ),但其杂合体却与结核易感性没有联系( $OR=1.54, P=0.12$ )<sup>[19]</sup>。而在印度,没有发现这两个单体及任何 SNPs 与结核易感性有关。Remus 等<sup>[20]</sup>研究提示 IL-12R $\beta$ 1 基因多态性可能是肺结核易感的危险因素,在摩洛哥成年人中-111A/T( $OR=2.03, P=0.019$ )和-2C/T( $OR=2.69, P=0.013$ )基因频率有显著差异。Kusuhara 等<sup>[12]</sup>在日本用连锁不平衡方法证实 IL-12R $\beta$ 1 基因位点:641A/G、1095T/C、1132C/G 在结核发生、发展过程中具有促进作用,在患者和正常对照人群中 641A/G 和 1132C/G 的基因频率也有显著区别,另外,对家庭成员的连锁分析中也发现结核病与 641A/G 和 1132C/G 存在相关性。Lee 等<sup>[21]</sup>指出,虽然在日本和摩洛哥人群中发现 IL-12R $\beta$ 1 基因多态性和结核易感性有关联,但在韩国却体现了种族差异性:5 种 IL-12R $\beta$ 1 基因,+705A/G(Q214R)、+1158T/C(M365T)、+1196G/C(G378R)、+1637G/A(A525T)和+1664C/T(P534S)在病例组和对照组中基因频率没有显著差别。

综上,从目前的研究看来,IL-12 基因多态性与人类结核易感性具有关联性,但这种关联性在种族间存在差异。IL-12 具体哪个位点的基因多态性与结核易感性的相关性更直接和密切,需要更进一步的探讨和研究。虽然已研制出的 HVJ-Envelope/HSP65+IL-12 的 DNA 疫苗(HSP65 疫苗)对 MDR-TB 和 XDR-TB 的小鼠有较强的治疗效果<sup>[22-24]</sup>,但新型疫苗对预防和治疗人类结核病有无类似作用,还需要进一步的临床试验去验证<sup>[25-26]</sup>。随着研究的深入,对 IL-12 等宿主因素在结核易感性中关系的阐明,必将有助于新的防治策略的产生,从而以实现对结核病的预防和控制。

## 参考文献

- [1] Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis[J]. Immunol Rev, 2008, 226(2): 191-204.
- [2] Shahemabadi AS, Hosseini AZ, Shaghasempour S, et al. IL-10 and IL-12 production in response to Mycobacterium tuberculosis total lipid antigens in multidrug resistant tuberculosis[J]. Iran J Immunol, 2010, 7(1): 57-63.
- [3] 邵燕丽, 吕小华, 吕世静, 等. 3 种白细胞介素与结核病免疫水平的关系[J]. 检验医学与临床, 2008, 32(5): 577-578.
- [4] Nalepa P, Strach M. Two siblings with an IL-12 and IFN- $\gamma$  production disorder diagnosed with pulmonary mycobacteriosis caused by M. kansasii. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection: an overview of literature[J]. Pneumonol Alergol Pol, 2011, 79(6): 428-436.
- [5] 丁珍珍, 杜先智. 结核分枝杆菌 Ag85A 基因 DNA 疫苗的构建及其联合人 IL-12 表达质粒诱导的小鼠细胞免疫应答观察[J]. 中国免疫学杂志, 2011, (1): 15-19.
- [6] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor(NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes[J]. J Exp Med, 2008, 189(3): 827-845.
- [7] Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2009, 105(17): 6808-6812.
- [8] 曲春枫, 孙宗棠. 人 IL-12 的克隆、表达及生物活性的鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2008, (1): 15-17.
- [9] Zhang S, Wang Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 372: 509-512.
- [10] Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression[J]. Cancer Res, 2011, 71(17): 5697-5706.
- [11] Wang J, Tang S, Shen H. Association of genetic polymorphisms in the IL-12-IFNG pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29: 1291-1295.
- [12] Kusuhara K, Yamamoto K, Okada K, et al. Association of IL12R $\beta$ 1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes[J]. Int J Immunogenet, 2007, 34(1): 35-44.
- [13] Tso HW, Lau YL, Tam CM, et al. Associations between IL12B Polymorphisms and Tuberculosis in the Hong Kong Chinese Population[J]. J Infect Dis, 2008, 194(5): 913-919.
- [14] Sahiratmadja E, Baak-Pablo R, de Visser AW, et al. Association of polymorphisms in IL-12/IFN- $\gamma$  pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia[J]. Tuberculosis (Edinb), 2007, 87(4): 303-311.
- [15] Morris GA, Edwards DR, Hill PC, et al. Interleukin 12B(IL12B) Genetic Variation and Pulmonary Tuberculosis: A Study of Cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16656.
- [16] Morahan G, Kaur G, Singh M, et al. Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis[J]. Tissue Antigens, 2007, 69(1): 234-236.
- [17] Ma X, Reich RA, Gonzalez O, et al. No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2003, 193(8): 1116-1118.
- [18] Verma VK, Taneja V, Jaiswal A, et al. Prevalence, distribution and functional significance of the -237C to T polymorphism in the IL-12R $\beta$ 2 promoter in Indian tuberculosis patients[J]. PLoS One. 2012, 7(4): 343-355.
- [19] Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K, et al. Influence of interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 polymorphisms on tuberculosis[J]. Hum Genet, 2008, 117(3): 237-243.
- [20] Remus N, El Baghdadi J, Fieschi C, et al. Association of IL12R $\beta$ 1 Polymorphisms with Pulmonary Tuberculosis in Adults in Morocco[J]. J Infect Dis, 2004, 194(3): 580-587.
- [21] Lee HW, Lee HS, Kim DK, et al. Lack of an association between interleukin-12 receptor $\beta$ 1 polymorphisms and tuberculosis in Koreans[J]. Respiration, 2005, 72(4): 365-368.
- [22] Kita Y, Hashimoto S, Nakajima T, et al. Novel therapeutic vaccines[(HSP65 + IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine]a-gainst tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy[J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(3): 526-533.
- [23] Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al. Novel therapeutic vaccine: granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis[J]. Hum Vaccin, 2011, 7: 60-67.

- [24] Kita Y, Okada M, Nakajima T, et al. Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models[J]. Hum Vaccin, 2011, 7: 108-114.
- [25] Okada M. The development of novel vaccines against tuberculosis [J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2008, 31(5): 356-368.

- [26] Okada M, Kita Y. Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells \* granulysin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+IL-12 DNA) [J]. Kekaku, 2010, 85(6): 531-538.

(收稿日期: 2013-09-02)

• 综 述 •

# 空肠弯曲杆菌对大环内酯类抗菌药物耐药机制的研究进展\*

陈云鹏, 林 雯 综述, 邓建平<sup>△</sup> 审校  
(湖北省黄石市爱康医院, 湖北黄石 435000)

**关键词:** 大环内酯类; 耐药性; 空肠弯曲杆菌

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.023

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)03-0309-03

空肠弯曲杆菌是全球食源性急性细菌胃肠炎的主要致病因素之一, 比沙门菌、志贺菌、大肠埃希菌 O157:H7 引发的感染更为频繁。虽然该菌引发疾病的病死率低, 但其感染后后遗症则较为严重, 如格林-巴利综合征、瑞特综合征、反应性关节炎、肠易激综合征等<sup>[1]</sup>。通常而言, 大多数空肠弯曲杆菌感染可通过抗生素治疗。其中, 大环内酯类抗菌药物中的红霉素是治疗空肠弯曲杆菌引发疾病的首选药物<sup>[2]</sup>。但是, 在人类使用大环内酯类药物的治疗期间, 发现了耐红霉素空肠弯曲杆菌。此外, 大环内酯类抗菌药物在兽药中的广泛应用更是加速了这一趋势<sup>[3-4]</sup>。耐药性的出现是当今抗菌药物应用的主要问题, 研究耐药机制有助于指导临床用药、控制耐药菌产生和发现新型抗菌药物。因此, 研究空肠弯曲杆菌对大环内酯类抗菌药物的耐药机制显得尤为重要。以下将从目前已知的 3 个方面来阐述空肠弯曲杆菌对大环内酯类药物耐药的机制。

## 1 靶位改变

目前出现的大环内酯高水平耐药空肠弯曲杆菌主要是由 23S rRNA V 域的第 2074 和 2075 位碱基突变所致<sup>[5-13]</sup>。细菌核糖体由 30S 小亚基和 50S 大亚基组成; 其中, 大亚基又由 23S rRNA 和核糖体蛋白组成。23S rRNA 分为 I~VI 个域, 根据碱基互补配对原则折叠成二级结构, 并与核糖体蛋白相互作用维持其立体构象。红霉素等十四元环大环内酯类药物的脱氧氨基糖侧链能与 23S rRNA V 域的第 2074 和 2075 位碱基分子上的氮原子形成氢键。这些位点的突变可改变大环内酯类药物的主要结合位点, 影响药物与核糖体作用位点的结合, 从而导致耐药性的发生<sup>[14]</sup>。

相关研究证实 A2075G 突变是空肠弯曲杆菌主要的突变类型; 该突变与高水平红霉素耐药有关。空肠弯曲杆菌的生物学特性使得 A2075G 具有较高的突变频率; 因此, 空肠弯曲杆菌 A2075G 突变比其他突变更具有生存优势。

目前, 只在一株红霉素耐药空肠弯曲杆菌上发现了 A2074G 突变, 该突变对宿主的生长有抑制作用; 同时, 观察到这种突变在红霉素存在的情况下相对不稳定, 因此空肠弯曲杆菌菌株很少发生这种突变。另一种与大环内酯类耐药性相关的突变, A2074C 突变在空肠弯曲菌的出现频率也比较低。因为 A2074C 突变可能导致核糖体结构发生细微的变化, 对耐药株的生长具有一定影响。

在特殊情况下, 空肠弯曲杆菌的大环内酯类耐药株能够同时携带 A2075G 和 A2074C 两种突变。大多数大环内酯类抗菌药物耐药的空肠弯曲杆菌菌株含有 3 个拷贝的碱基突变<sup>[15]</sup>。一般大环内酯耐药至少需要 2 个拷贝的碱基突变, 只有单一拷贝的 23S rRNA 突变株未见报道。一些只有两个拷贝的碱基突变株的大环内酯类抗菌药物最低抑菌浓度比 3 个拷贝突变株要低, 表明可能存在一定的基因剂量效应。

酮内酯是最近开发出来的第 3 代大环内酯类药物, 其代表药物-泰利霉素, 被用来克服大环内酯类抗菌药物耐药问题。它们以内酯环 C3 位的克拉定糖被酮基取代为特征。多数酮内酯药物还含有烷芳基侧链及一个 11, 12-氨基甲酸。与结构改造前的大环内酯类药物相比, 酮内酯药物与核糖体之间具有更强的亲和力。泰利霉素的抗菌活性增强, 主要是因为从大环内酯环延伸出来的烷基-芳基对 50S 核糖体亚基具有更高的亲和力。在靶基因突变的情况下, 空肠弯曲杆菌泰利霉素的最低抑菌浓度为 32~128 mg/L; 比红霉素的最低抑菌浓度 1 024~2 048 mg/L 低。因此, 空肠弯曲杆菌 23S rRNA 基因 A2075G 突变对泰利霉素的影响可能比其他大环内酯类药物, 如红霉素、阿奇霉素和泰乐菌素等要小。

## 2 外排系统

CmeABC 系统作为耐药空肠弯曲杆菌的主要外排系统<sup>[5, 11, 16-19]</sup>能够外排喹诺酮类、 $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类抗菌药物。外排泵突变导致对大环内酯类抗菌药物高度敏感的 NCTC11168 菌株的发现, 证实了 CmeABC 系统对大环内酯类抗菌药物具有外排作用。CmeABC 外排泵与革兰阴性菌 RND 超家族中的典型多药物外排泵具有高度的同源性。该外排泵由三部分组成, 分别为周质融合蛋白(CmeA)、内膜药物转运蛋白(CmeB)和外膜蛋白(CmeC)。

这 3 种蛋白共同作用形成膜通道, 能够将一些抗菌药物直接排出空肠弯曲杆菌。位于 CmeA 基因上游的 CmeR 基因编码一种蛋白质(与转录抑制因子 TetR 家族成员的序列和结构相似), 该蛋白质通过直接与外排操纵子的启动子区相结合, 从而抑制 CmeABC 操纵子的转录。空肠弯曲杆菌的 CmeR 蛋白负责协调、维持 CmeABC 外排泵的基本表达水平, 以满足其生理需求。

研究表明, 作用于 CmeABC 外排系统的外排泵抑制剂

\* 基金项目: 黄石市医疗卫生科技攻关计划项目(2012A070-19)。  
通讯作者, E-mail: 3yue12@sina.com。

作者简介: 陈云鹏, 男, 主管技师, 主要从事微生物检验的研究。 <sup>△</sup>