

non-alcoholic fatty liver[J]. Clinica Chimica Acta, 2013, 424: 99-103.

[17] Hulsmans M, Howoet P, MicroRNAs as early biomarkers in obesity and related metabolic and caroliovasoular disease[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(32): 5704-5717.

[18] DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009[J]. Diabetologia, 2010, 53(7): 1270-1287.

[19] Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, et al. microRNAs in cancer management[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): 249-258.

[20] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861-874.

[21] Dehwah MA, Xu A, Huang Q. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity[J]. J Genet Genomics, 2012, 39(1): 11-18.

[22] Babu PV, Si H, Fu Z, et al. Genistein prevents hyperglycemia-induced monocyte adhesion to human aortic endothelial cells through preservation of the cAMP signaling pathway and ameliorates vascular inflammation in obese diabetic mice[J]. J Nutr, 2012, 142(4): 724-730.

[23] Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration[J]. Mol Cell, 2010, 39(1): 133-144.

[24] Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation [J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(4): 633-644.

[25] Vrijksen KR, Sluijter JPG, Schuchardt MWL, et al. Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(5): 1064-1070.

[26] Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(3): 249-256.

[27] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 423-433.

[28] Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study[J]. Lancet, 2006, 368(9548): 1673-1679.

[29] Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(12): 1977-1984.

[30] Kong L, Zhu J, Han W, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study [J]. Acta Diabetol, 2011, 48(1): 61-69.

[31] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes[J]. Circ Res, 2010, 107(6): 810-817.

[32] 梁国威, 宋燕, 邵冬华, 等. 初诊 2 型糖尿病患者血清中 miR-29a 和 miR-375 表达变化及其与糖、脂标志物相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(3): 475-478.

[33] Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2011, 6(8): 228-239.

(收稿日期: 2014-03-18)

• 综 述 •

## 结核分枝杆菌 L 型生物学特性及其感染现状\*

苏汉珍<sup>1</sup>综述, 韦善求<sup>2</sup>审校

(1. 广西南宁市第四人民医院检验科, 广西南宁 530023; 2. 广西艾滋病临床检验中心, 广西南宁 530023)

**关键词:** 结核分枝杆菌; 感染; 生物学特性

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 21. 025

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)21-2919-03

结核分枝杆菌 L 型(MTB-L)即结核分枝杆菌(MTB)细胞壁缺陷型。近年研究发现, 耐多药肺结核(MDR-TB)较初治无耐药肺结核 MTB-L 培养阳性率显著增高, 并随着耐药种类的增多而增高<sup>[1]</sup>。MTB-L 感染者结核病复发率显著高于细菌型结核感染者<sup>[2-3]</sup>。由于不规范的抗结核治疗导致耐药及 MDR-TB 的产生与传播是造成全球结核病严峻形式的主要原因, 特别是广泛耐多药结核分枝杆菌(XDR-TB)的出现使得结核病的防控更加棘手<sup>[4]</sup>。因此, 加强对 MTB-L 感染的认识, 普及 MTB-L 检测对预防和控制结核病蔓延及科学评价结核病防治效果具有重要意义。

### 1 生物学特性

**1.1 形态学特性** MTB-L 由于细胞壁缺陷, 在分裂时不能按时断裂, 细胞壁部分缺失时菌体通常呈丝形体、棒状或小圆球体, 完全缺失时菌体呈较大体积的圆球体形态, 直径通常为 5~

20  $\mu\text{m}$ , 可在普通光学显微镜的高倍镜下观察。圆球体具有可塑性, 加压下可透过 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的滤菌器。还有一些直径为 0.1  $\mu\text{m}$  的微小 L 型细胞或原生质体需借助电子显微镜才能观察到, 是造成细菌学常规方法检测或一般 L 型检测漏诊的常见因素。MTB-L 细胞壁部分缺失时抗酸染色可呈红色、紫色或淡红色, 完全缺失时则通常抗酸染色阴性, 细胞壁染色整个菌体浓染呈紫色。

**1.2 生长特性** MTB-L 一般需用高渗培养基分离, 对营养要求较苛刻, 需要蛋白胨、血清、氨基酸、蔗糖、琼脂、无机盐等, 最适 pH 为 5.0~9.0, 5%~10%  $\text{CO}_2$  有利于生长。MTB-L 在 92-3TBL 液体培养基中 1~2 周即可见颗粒生长, 黏附于管壁或沉于管底, 不形成菌膜, 液体澄清或微混; 在改良 TSA-L 培养基平板上培养 1~5 周, 一般先出现颗粒状幼小菌落, 由十几个到数十个球状体组成, 随着时间延长, 典型“油煎蛋”状菌落

\* 基金项目: 2011 年南宁市科学研究与技术开发计划项目(201109047C); 2012 年南宁市科学研究与技术开发计划项目(20123161、2123164)。 作者简介: 苏汉珍, 女, 主管技师, 主要从事艾滋病的临床检验研究。

逐渐增多,有时亦可见丝状菌落生长于琼脂内。MTB-L 在常规罗琴(L-J)培养上不易生长。根据细菌返祖能力,MTB-L 可分为非稳定 L 型和稳定 L 型(BTL),前者在不含诱导因素的环境中容易自发返祖为细菌型,是引起结核病恶化和内源性复发的细菌学根源。

**1.3 遗传学特性** 相关研究<sup>[5-6]</sup>先后对经 8~12 次传代培养的 BTL DNA 某重复保守序列进行 PCR-SSCP 分析,以及对自发形成或经利福平诱导形成的 BTL 进行 PCR 扩增,结果 TBL 保留了与其亲代细菌一致的扩增产物,但染色体基因发生了点突变。认为,用于检测 MTB 的基因片段均可用于 MTB-L 检测。目前,检测 MTB 复合群的特异性基因片段主要有 IS6110 插入序列,国外也采用 MPB64 片段鉴定 MTB 复合群,敏感度与特异度均较好<sup>[7-8]</sup>。

**1.4 致病性** MTB-L 的致病性与其细胞壁缺陷程度有关。TBL 因细胞壁完全缺失,菌体表面黏附蛋白暴露使其带电性发生改变。细菌可通过免疫结合或物理吸附的方式黏附或侵入细胞<sup>[9]</sup>,使之形成空泡、变圆、脱落和裂解。此外,TBL 侵入循环系统后可经补体途径与 C3b 结合黏附于红细胞表面,使之免疫功能下降。动物实验表明,TBL 毒力较亲代细菌型明显减弱,感染后结核菌素试验(PPD)呈阴性反应,但可有结核样病理改变,表现为非特异性炎症。不稳定 L 型保留有部分细胞壁结构,遗传基因未发生明显改变,当内环境适宜时又可返祖为原杆菌型。因此,不稳定 L 型不但仍然可引起特异性炎症反应,还与结核病的反复发作与加重有关<sup>[2]</sup>。世界各国学者在研究肺癌诱因时注意到:长期潜伏于肺泡上皮细胞的 MTB-L 可能类似一些致癌病毒,通过 DNA 整合或激活肺泡上皮细胞的原癌基因和(或)抑制抑癌基因而致癌<sup>[10]</sup>。也有学者认为,肺结核易患肺癌的原因可能是由于结核钙化、瘢痕组织或结核性局部支气管扩张,滞留吸烟时产生的含苯物质长期刺激而致癌变,或结核空洞壁上的上皮细胞发生鳞状化而癌变<sup>[11]</sup>。

**1.5 耐药特点** 结核分枝杆菌 L 型变异后,对作用于细胞壁的乙胺丁醇、环丝氨酸等耐药,对作用于细胞质的异烟肼、利福平、链霉素、卡那霉素、阿米卡星以及卷曲霉素敏感,甚至对红霉素、氯霉素及氟喹诺酮类等抗菌药物敏感性增高。研究显示,无论是自发形成或是经利福平、异烟肼、乙胺丁醇等药物诱导形成的 TBL,其染色体耐药基因并没有产生新的突变<sup>[12-14]</sup>。相关研究还认为,除染色体耐药相关基因突变可造成 MTB 耐药外,细胞壁缺陷也是造成其耐药的一个重要原因;另一方面,带有耐药基因的不稳定 MTB-L 返祖为细菌形时仍保留其原有的耐药性<sup>[15]</sup>,也是造成其耐药的一个原因。因此,MTB-L 耐药形势较细菌型严峻得多。

## 2 感染现状

**2.1 MTB-L 与肺结核** 在肺结核患者中复治、难治以及耐药人群中,MTB-L 型感染率较初治肺结核感染率显著增高。黄桑德等<sup>[2]</sup>对 328 例初治涂阳肺结核痰标本进行 MTB-L 培养,阳性率为 11.9%。另有两组临床研究分别对难治、复治肺结核及 MDR-TB 患者痰标本进行 MTB-L 培养,结果检出率分别为 29.6%<sup>[3]</sup>和 53.75%<sup>[1]</sup>。田艳生等<sup>[16]</sup>采用溶血离心培养法检测肺结核患者外周血 MTB 及其 L 型,结果 42 例痰菌阳性及 98 例痰菌阴性患者 MTB 检出率分别为 2.4%、0.0%;MTB-L 型检出率为 31.0%和 23.5%。认为,肺结核病灶内的 MTB 可被吞噬细胞吞噬,或经淋巴回流等途径入血而引起菌

血症,血液中含有较高浓度的药物、抗体、溶菌酶等活性物质有利于 MTB-L 形成并持续存在,进入循环的 MTB 可能主要是以 L 型形式存在。

**2.2 MTB-L 与尘肺结核** 尘肺患者容易并发肺结核,并随着尘肺的加重而明显增多。由于二氧化硅对 MTB 活性及毒性具有增强作用,加上肺组织缺血缺氧以及患者长期药物治疗等因素作用,尘肺结核患者 MTB-L 阳性率可达 48.00%~50.79%,远高于细菌型(11.60%~14.29%)<sup>[17-18]</sup>,且多数为不稳定 L 型<sup>[19]</sup>。这可能是尘肺结核迁延,易转为难治性结核的原因。与单纯尘肺患者比较,尘肺结核感染者生存率明显下降,是尘肺患者死亡的主要原因之一。

**2.3 MTB-L 与肿瘤** MTB-L 与肿瘤尤其是肺癌的发生有着密切联系。MPB64 是 MTB 复合群特有的 DNA 片段,有学者对 167 例肺癌组织进行 IK 抗酸染色和探针原位杂交,结果 MTB-L 阳性率为 67.1%,癌细胞核内 MPB64 阳性率为 80.2%,认为肺癌组织中的 MTB 主要以 L 型存在,MPB64 基因在肺癌组织癌细胞核内高度表达<sup>[20]</sup>。此外,MTB-L 与其他肿瘤的关系也有报道。国内相关研究对 68 例膀胱移行细胞癌、30 例前列腺癌及 20 例前列腺增生标本行 MTB-L 检测,检出率分别为 35.2%、43.3%和 45.0%<sup>[21-22]</sup>。提示 MTB-L 型感染与肿瘤的发生和发展可能有一定关系。

**2.4 MTB-L 与肺外结核** 有学者对 155 例慢性淋巴结炎切片作回顾性检测,经抗酸和免疫酶染色,分别有 60%和 68%检出 MTB-L<sup>[23]</sup>。韩凤满等<sup>[24]</sup>对 60 例骨关节结核灶内容物进行 MTB-L 检测(其中复治病例 52 例),结果阳性率达 20%。国内相关学者还采用抗酸染色结合 PCR 的方法对 121 例慢性前列腺炎的前列腺液及 216 例非淋菌性宫颈炎的宫颈分泌物进行 MTB-L 检测,检出率分别为 11.6%、15.3%<sup>[25-26]</sup>。以上研究提示,对淋巴结、骨骼、泌尿生殖系统慢性感染患者很有必要进行 MTB-L 检测。MTB 感染是神经系统感染最常见的形式,但实验室病原学诊断非常困难。丰岩清等<sup>[27]</sup>对一组脑脊液检测无明显感染证据的不完全横贯性脊髓炎(ITM)患者进行了抗 MTB 诊断性治疗(ATT),结果患者初始治疗反应良好,脊髓功能不断改善,脊髓内异常信号逐步消退,考虑 MTB 感染可能是 ITM 的一个重要病因。

## 3 结 语

文献报道,结核分枝杆菌不但能够在生长繁殖过程中自发形成 L 型,而且也能够多种抗结核药物作用下被诱导形成 L 型<sup>[28]</sup>。在结核病患者中 MTB-L 检出率可高达 10%~50%。由于 MTB-L 耐药机制除了具有其细菌型的特性外,对作用于细胞壁的药物先天耐药,对诱导其产生 L 型变异的药物亦不再敏感。因此,MTB-L 形成 MDR-TB 以及 XDR-TB 的危险性要比其细菌型严重得多。近十年来,由于 MDR-TB 以及 XDR-TB 的产生和流行,导致结核病在全球范围内的复燃,特别是 HIV/AIDS 的流行更是其产生与传播的加速剂。因此,将 MTB-L 纳入结核病的病原学诊断、治疗方案制定以及疗效考核标准就显得十分必要。另一方面,由于 MTB-L 病原学诊断试验成本高,目前国内三级综合医院甚至传染病专科医院大多都未常规开展 MTB-L 检测,从公共卫生安全的角度考虑,国家财政应加大对结核病实验室的投入力度。

## 参考文献

[1] 丁卫民,肖志坚,崔秀琴,等.耐药药肺结核患者结核分枝杆菌 L

型感染检测的临床价值[J]. 临床荟萃, 2005, 20(6): 317-319.

[2] 黄崇德, 黄凤贤, 汤志强. 结核分枝杆菌 L 型与肺结核复发的研究[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(6): 977-978.

[3] 卢润生, 蒋绍双, 李筱萍, 等. 复治难治肺结核中结核菌-L 型感染调查[J]. 预防医学情报杂志, 2008, 24(9): 706-707.

[4] Banerjee R, Schecter GF, Flood J, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis: new strains, new challenges[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008, 6(5): 713-724.

[5] 梁菁苹, 王和. 结核分枝杆菌稳定 L 型利福平耐药性基因的研究[J]. 贵州医药, 2006, 30(6): 486-489.

[6] 王豫萍, 王和. 结核分枝杆菌稳定 L 型染色体 DNA 的 PCR-SSCP 分析[J]. 江西医学检验, 2004, 22(4): 295-296.

[7] Rafi W, Venkataswamy MM, Ravi V, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative evaluation of in-house PCR assays involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, MPB-64 and 65 kDa antigen[J]. J Neurol Sci, 2007, 252(2): 163-168.

[8] Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for mycobacterium tuberculosis DNA[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1029-1039.

[9] 陈峥宏, 朱以勇, 王和. 结核分枝杆菌稳定 L 型黏附 ECal09 细胞的荧光染色法观察[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(8): 761-763.

[10] Engels EA, Shen M, Chapman RS, et al. Tuberculosis and subsequent risk of lung cancer in Xuanwei, China[J]. Int J Cancer, 2009, 124(5): 1183-1187.

[11] Lienhardt C, Fielding K, Sillah JS, et al. Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa[J]. Int J Epidemiol, 2005, 34(4): 914-923.

[12] 王和, 罗振华, 徐艳, 等. 细胞壁缺陷结核分枝杆菌耐药性的基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(10): 636-640.

[13] 梁菁苹, 王和. 结核分枝杆菌稳定 L 型利福平耐药性基因的研究[J]. 贵州医药, 2006, 30(6): 486-489.

[14] 罗振华, 王和. 结核分枝杆菌稳定 L 型耐乙胺丁醇 embB 基因的研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(27): 20-23.

[15] 陆军, 叶松, 金强. PCR-SSCP 法检测结核分枝杆菌 L 型 rpsL 耐药基因[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(2): 107-108.

[16] 田艳生, 张淑杰, 崔幸琨, 等. 从结核病和肺癌患者外周血中检测结核分枝杆菌及其 L 型[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(12): 1353-1357.

[17] 朱春梅. 120 例矽肺结核患者结核分枝杆菌 L 型致病情况研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(12): 1591-1592.

[18] 叶松, 王晓秋. 煤工尘肺患者结核分枝杆菌 L 型感染状况分析[J]. 中国职业医学, 2004, 31(4): 51-52.

[19] 陆军, 叶松, 李朝品. 淮南矿区尘肺结核患者结核分支杆菌 L 型耐药性及相关基因突变[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(6): 369-370.

[20] 田艳生, 崔幸琨, 郝彤, 等. 结核分枝杆菌 L-型感染与肺癌的相关性初步研究[J]. 肿瘤, 2009, 29(11): 1085-1089.

[21] 汪万英, 何杰. 用原位核酸杂交检测膀胱癌中结核菌 L 型 DNA [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19(6): 536.

[22] 宛跃生, 汪万英. 抗酸菌 L 型感染与前列腺癌的关系[J]. 中国微生物学杂志, 1999, 11(1): 49-50.

[23] 张世馥, 姚敏. 抗酸菌 L 型感染病理和临床误诊的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(3): 159-161.

[24] 韩风满, 程宏, 吴启秋, 等. 骨关节结核病灶结核菌 L 型状况的观察[J]. 中国防痨杂志, 2004, 26(4): 233-234.

[25] 刘开扬, 刘芳, 李建军, 等. 结核菌 L 型感染与慢性前列腺炎的关系[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2003, 17(4): 242.

[26] 刘开扬, 刘进军, 刘芳. 结核菌 L 型感染与非淋菌性宫颈炎的关系[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(17): 2368-2369.

[27] 毕岩清, 国宁, 黄帆, 等. 结核分枝杆菌感染与难治性不完全性脊髓炎的初步研究[CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2010, 4(1): 23-28.

[28] 陆俊梅, 王洁, 黄晓辰, 等. 显微镜观察药物敏感性检测技术在痰标本直接药敏试验中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(1): 21-25.

(收稿日期: 2014-03-22)

• 综 述 •

# 白细胞介素-12 在结核病发生发展中的作用\*

魏振宏<sup>1</sup> 综述, 居 军<sup>2△</sup> 审校

(1. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院检验中心, 甘肃兰州 730000)

**关键词:** 白细胞介素-12; 结核病; 免疫调节; 综述

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 21. 026

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)21-2921-04

在全球范围内, 结核病仍然是危害人类健康的主要疾病之一, 是因感染导致死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。并且, 随着耐多药结核病和广泛耐药结核病的出现, 及 HIV 感染合并结核菌感染病例增加, 使结核病的控制和治疗变得更加复杂<sup>[2]</sup>。机体感染结核分枝杆菌(MTB)后, 抗原提呈细胞(APC)在加工、处理、提呈抗原及启动适应性免疫应答的同时, 分泌 IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等促炎性细胞因子和抑炎性细胞因子 IL-10<sup>[3]</sup>。这些

细胞因子参与机体抗 MTB 感染的免疫调节作用。其中, IL-12 作为一种多功能的细胞因子, 在抗 MTB 感染免疫应答中起着关键的作用。

## 1 IL-12 的结构特征

**1.1 IL-12 的产生** IL-12 主要由专职的 APC, 如树突状细胞、巨噬细胞和 B 淋巴细胞分泌。研究表明, IL-12 的产生需要 CD40-CD40L 的相互作用<sup>[4]</sup>。在小鼠的模型中, CD40L 可

\* 基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目(090NKCA099)。 作者简介: 魏振宏, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床免疫学与检验方向的研究。 △ 通讯作者, E-mail: jjwork@163. com。