

• 论 著 •

基因芯片法用于检测长沙地区结核分枝杆菌耐药性研究*

邓叶华¹, 向延根^{2△}, 马小华², 石国民², 喻 容², 彭雪峰²

(1. 南华大学, 湖南衡阳 421001; 2. 长沙市中心医院检验科, 湖南长沙 410004)

摘要:目的 了解长沙市中心医院 2013 年 1 月 1 日至 2014 年 9 月 30 日临床分离的 1 031 株结核分枝杆菌对利福平和异烟肼的耐药性。方法 将结核分枝杆菌培养阳性, 并经鉴定为结核分枝杆菌的 1 031 株菌株, 采用绝对浓度法进行常规药敏检测, 同时应用基因芯片技术检测利福平和异烟肼耐药相关的 rpoB、katG 和 inhA 基因上的位点突变, 并对 2 种结果进行比较。结果 基因芯片法检测利福平耐药性中, 其敏感株 896 株, 耐药株 135 株; 检测异烟肼耐药性为敏感株 901 株, 耐药株 130 株。与绝对浓度法比较, 基因芯片检测利福平耐药结果与其一致的菌株共 1 011 株(包含敏感株 894 株, 耐药株 117 株), 符合率为 98.00%; 基因芯片检测异烟肼耐药结果与其一致的菌株共 1 005 株(包含敏感株 890 株, 耐药株 115 株), 符合率为 97.48%。与利福平耐药相关的 rpoB 基因的突变位点最常见的为 531TCG→TTG 突变, 占耐药株的 51.11%; 其次为 526CAC→TAC 突变耐药株的 10.37%; 526 CAC→GAC 共 11 株菌株突变, 占耐药菌株的 8.15%。异烟肼耐药主要是由 katG315AGC→ACC 位突变引起, 占耐药株的 83.85%, inhA-15C→T 突变仅占 12.30%。结论 基因芯片法与绝对浓度法结果高度一致, 可成为筛查利福平和异烟肼耐药性的快速有效方法, 长沙地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药以 rpoB531, 526 及 katG315 突变位点为主。

关键词: 结核分枝杆菌; 基因芯片; 利福平; 异烟肼; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)22-3223-04

Identification of drug-resistance gene type in *Mycobacterium tuberculosis* by gene chip in Hunan province*

Deng Yehua¹, Xiang Yangen^{2△}, Ma Xiaohua², Shi Guomin², Yu Rong², Peng Xuefeng²

(1. Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Central Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance of 1 031 *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazide in the Center Hospital of Changsha from January 1, 2013 to September 30, 2014. **Methods** A total of 1 031 strains with positive culture result and identified as strains of *Mycobacterium tuberculosis* were used absolute concentration method to do the conventional drug susceptibility, and detected rifampicin and isoniazide resistance gene including rpoB, katG and inhA gene locus mutation by chip technology, the results of two methods were compared using card square test statistics. **Results** By gene chip method, the sensitive strain of rifampicin was 896, the drug-resistant strains was 135, the sensitive strains of isoniazide was 901 strains, 130 drug-resistant strains. Compared with the absolute concentration method, resistance chip detection results were consistent with rifampicin resistant strains 1 011 strains(including 894 drug-resistant strains, and 117 sensitive strains), the coincidence rate was 98.00%, consistent with isoniazideresistant strains 1 005 strains(including 890 drug-resistant strains, 115 sensitive strains), the coincidence rate was 97.48%. The most common spot of rifampin resistance related mutations of rpoB gene was 531TCG to TTG, accounted for 51.11%, followed by 526CAC→TAC, accounted for 10.37%, 11 strains with 526TCG to TTG, accounted for 8.15%. Isoniazid resistance was caused by mutations in katG315AGC→ACC resistant strains, accounted for 83.85%, inhA-15C→T mutations accounted for only 12.30%. **Conclusion** The results of gene chip method is highly consistent with that of absolute concentration method, could be a fast and effective method for screening rifampicin and isoniazide, the resistant gene of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazide almost mutate in rpoB531, 526 and katG315 in Changsha.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; gene chip; rifampicin; isoniazide; drug resistance

结核病仍然是当今世界威胁人类健康的主要传染性疾病, 仅次于艾滋病^[1]。据 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查估算, 2010 年全国 15 岁及以上人口中有活动性肺结核患者 499 万, 每年新增 130 万患者, 年死亡人数 13 万^[2]。在造成全球结核病疫情回升的诸多因素中, 耐多药结核菌(MDR-TB)是主要原因之一。目前, 绝对浓度法和比例法是结核药物敏感性检测的常规方法, 结核分枝杆菌 18~20 h 才分裂一次, 培养时间长, 需 4~8 周才出结果, 易延误患者治疗, 也是 MDR-TB 出现及传播的原因。基因芯片技术是一种通过检测与耐结核

药物相关的基因突变来判断结核分枝杆菌耐药性的新型分子生物学技术。本研究通过比较基因芯片与绝对浓度法二者的符合率, 初步评价芯片法对快速检测结核分枝杆菌耐药的实用价值, 同时分析湖南地区耐药基因突变位点的分布特征。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 1 031 株结核分枝杆菌分离自 2013 年 1 月 1 日至 2014 年 9 月 30 日就诊于长沙市中心医院肺科中心的肺结核患者的痰液、肺泡灌洗液、24 h 尿液沉渣、胸腔积液、腹水、脑脊液和分泌物等标本。H37R 标准株由中国结核病控制

* 基金项目: 国家十二五重大专项课题资助项目(2013ZX10005004-004)。 作者简介: 邓叶华, 女, 检验技师, 主要从事结核分枝杆菌耐药研究。 △ 通讯作者, E-mail: xiangyangen@126.com。

中心临床中心参比室提供。

1.2 仪器与试剂 利福平和异烟肼纯药粉由美国 Sigma 公司提供;耐药 DNA 微阵列芯片由北京奥博生物有限公司生产;配套设备包括 Extratocr 36 核酸快速提取仪, LuScan 10K-B 微阵列芯片扫描仪, BioMixer™ II 芯片杂交仪, SlideWasher™ 8 芯片洗干仪均为奥博生物有限公司生产; ABI7300 PCR 扩增仪由美国 ABI 公司生产, 干式恒温器恒温金属浴由上海之信仪器有限公司提供, 恒温摇床由杭州博日科技有限公司提供, 微量加样器与高速离心机由德国 eppendorf 公司生产, 生物安全柜由美国 Baker 公司生产。

1.3 检测方法

1.3.1 绝对浓度法 按《结核病诊断细菌学检验规程》^[3] 规定要求处理结核分枝杆菌临床分离株, 接种于自制改良罗氏培养基, 进行结核分枝杆菌培养和绝对浓度法药物敏感性检测, 其中耐利福平基因低浓度为 50 μg/mL, 利福平高浓度为 250 μg/mL; 耐异烟肼基因低浓度为 1 μg/mL, 异烟肼高浓度为 10 μg/mL。

1.3.2 耐药基因芯片法 (1)DNA 提取: 从 Middlebrook 7H9 液体培养基中吸取大于或等于 1 个麦氏单位浊度的菌悬液 10~20 μL 于含核酸提取液的核酸提取管中, 加入 80 μL 的核酸提取液, 用 Extractor 36 核酸快速提取仪震荡 10 min, 95 ℃ 水浴 5 min, 5 000 r/min 离心 1 min, 得到的核酸提取液放置于 -20 ℃ 保存待检。(2)PCR 扩增: 取出 PCR 扩增试剂使其自然解冻, 瞬时离心至管底。每份标本加入 3 支试管进行反应, 将扩增液 1、2、3 分别按每管 18 μL 分装, 对于 1 份标本, 向 3 管中分别加入同一标本 DNA 各 2 μL, 放入 ABI7300 PCR 扩增仪中扩增。扩增条件设定为: 37 ℃ 600 s; 94 ℃ 600 s; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 共 35 个循环; 94 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 共 10 个循环; 72 ℃ 420 s。

1.3.3 耐药基因检测 将扩增好的 DNA 置于 PCR 仪中 95

℃ 变性 5 min, 然后骤冷冰浴 5 min, 取出热浴好的杂交缓冲液按 9 μL 杂交缓冲液、3 μL + 3 μL PCR 产物的比例配制杂交混合液, 吸取 13.5 μL 混合液加入杂交芯片加样孔中, 置入已设置杂交条件为 50 ℃, 2 h 的 BioMixer™ II 芯片杂交仪中进行杂交。杂交完成后, 再进行芯片洗涤、干燥、芯片扫描及结果判读。以试剂盒自带的阴阳性对照作为质控, 耐药基因芯片探针分布图见表 1~2 (见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

1.3.4 耐药芯片结果判定 耐药芯片结果判定按照说明书严格执行, 部分检测结果见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 及 Excel2003 软件进行数据处理及统计学分析, 计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 耐利福平基因芯片检测结果 绝对浓度法检测的 1 031 株结核分枝杆菌药敏分析中, 912 株对利福平敏感, 119 株耐药。基因芯片检测耐利福平基因时, 野生型 (即敏感) 896 株, 突变型 (即耐药) 135 株。2 种方法比较差异无统计学意义 ($\chi^2=1.149, P=0.284$)。其中绝对浓度法检测的 912 株对利福平敏感的菌株中, 基因芯片法检测野生型 894 株, 18 株为突变型。而绝对浓度法检测的 119 例耐药菌株经芯片法检测, 耐药菌株 117 例, 有 2 例敏感, 两者符合率为 (894 + 117) / 1 031 × 100% = 98.00%, 以绝对浓度法为金标准, 基因芯片的灵敏度为 894 / (894 + 18) × 100% = 98.00%, 特异度为 117 / (117 + 2) × 100% = 98.32%。135 例分离株 rpoB 基因突变位点类型及数量见表 3。最常见的三个位点分别为 531 (51.11%)、526 (22.96%) 和 516 (11.84%), 其中有 5 株有双位点突变。此外, 绝对浓度法研究 912 株对利福平敏感的基因芯片中, 有 18 株存在对利福平有基因突变现象, 见表 4。

表 3 利福平耐药相关的 rpoB 基因突变位点分布

耐药基因	突变位点	氨基酸转换	突变[n(%)]	合计[n(%)]
531	TCG→TTG	丝氨酸-亮氨酸	69(51.11)	69(51.11)
	TCG→TGG	丝氨酸-色氨酸	0(0.00)	
526	CAC→TAC	组氨酸-酪氨酸	14(10.37)	31(22.96)
	CAC→GAC	组氨酸-天冬氨酸	11(8.15)	
	CAC→CTC	组氨酸-亮氨酸	4(2.96)	
	CAC→CGC	组氨酸-酪氨酸	2(1.48)	
516	GAC→TAC	天冬氨酸-酪氨酸	8(5.92)	16(11.84)
	GAC→GTC	天冬氨酸-缬氨酸	6(4.44)	
	GAC→GGC	天冬氨酸-甘氨酸	2(1.48)	
533	CTG→CCG	亮氨酸-脯氨酸	6(4.44)	6(4.44)
511	CTG→CCG	亮氨酸-脯氨酸	5(3.70)	5(3.70)
513	CAA→CCA	谷氨酰胺-脯氨酸	3(2.22)	3(2.22)
	CAA→AAA	谷氨酰胺-赖氨酸	0(0.00)	
511	CTG→CCG/516GAC→GGC	亮氨酸-脯氨酸/天冬氨酸-甘氨酸	3(2.22)	3(2.22)
526	CAC→GAC/531TCG→TTG	组氨酸-天冬氨酸/丝氨酸-亮氨酸	1(1.35)	1(1.35)
531	TCG→TTG/533CTG→CCG	丝氨酸-亮氨酸/亮氨酸-脯氨酸	1(1.35)	1(1.35)

表 4 基因芯片法检测 18 株对利福平突变位点

突变类型	n
511CTG→CCG	3
516GAC→TAC	2
516GAC→GTC	1
526CAC→TAC	4
526CAC→GAC	1
531TCG→TTG	4
533CTG→CCG	2
511CTG→CCG/516GAC→TAC	1

2.2 耐异烟肼基因芯片检测结果 绝对浓度法检测的 1 031 株结核分枝杆菌药敏中,905 株对异烟肼敏感,126 例耐药。基因芯片检测耐异烟肼基因时,野生型 901 株,突变型 130 株。2 种方法比较差异无统计学意义($\chi^2=0.071, P=0.789$),其中绝对浓度法检测的 905 株对异烟肼敏感中,基因芯片法检测野生型 890 株,15 株为突变型。而绝对浓度法检测的 126 株耐药菌株经芯片法检测,耐药菌株 115 株,有 11 株敏感,两者符合率为 $(890+115)/1031\times 100\%=97.48\%$,以绝对浓度法为金标准,基因芯片的灵敏度为 $890/(890+11)\times 100\%=98.78\%$,特异度为 $115/(115+15)\times 100\%=88.46\%$ 。130 例分离株 katG、inhA 基因突变位点类型及数量分别为:katG315AGC→ACC 109 株(83.8%),katG315AGC→AAC 5 株(3.9%),inhA15C→T16 株(12.3%)。异烟肼耐药主要以 katG 315AGC→ACC 突变为主,占突变分离株总数的 83.85%。inhA-15C→T 突变仅占异烟肼耐药的 12.30%。绝对浓度法研究 905 株对异烟肼敏感的基因芯片中,有 15 株存在对利福平有基因突变现象,其中 315C-T 突变 12 株,315AGC→ACC 2 株,315AGC→AAC 1 株。

3 讨 论

随着 MDR-TB 的出现,耐药形势越发严峻。加之传统抗结核药物敏感试验时间周期长,某些条件不易掌控,不能及时满足临床用药的要求。基因芯片技术具有高通量、速度快、灵敏度高、检测范围广等特点,目前逐渐被专科医院广为运用,目前长沙地区尚未进行过大规模统计研究,本研究通过对长沙地区结核病患者进行基因芯片及传统药敏试验方法的比较,以期了解长沙地区主要耐药基因分布情况。

利福平作为最重要的一线抗结核药物之一,属于利福霉素类的半合成广谱抗菌药,主要作用于结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的 β 亚单位,干扰转录的开始及 RNA 延伸,发挥抑菌和杀菌作用^[4]。据报道,约有 95.00% 或更高比例对利福平耐药菌株的突变发生在 rpo B 基因 81bp 的热点区域(编码密码子 507 位—533 位)^[1],这个区域被称为利福平耐药决定区(RRDR)。本研究所检测的 6 个突变位点均位于 RRDR 区域内。长沙地区 531、526 和 516 位点突变占总耐药株的 85.91%,其中 531 占 51.11%,526 占 22.96%,516 占 11.84%,最常见的突变类型为 531TCG→TTG、526CAC→TAC,这与文献[5-8]研究的结果相似。而斯里兰卡的学者们 Adikaram 等^[9] 研究结果显示,526 突变率为 48.43%,531 仅为 9.75%;南亚地区学者 Ahmad 等^[10] 研究结果显示,526 突变率为 41.36%,531 仅为 31.00%,均以 526 位突变为主。墨西哥地区^[11] 以 450、455 位点突变为主,突尼斯中部^[12] 突变率最高

的是 516 位点。由此可见,利福平耐药存在地域差异,地域分布导致的传播不均和药物本身的选择性都是产生这种差异的原因。此外,本研究发现了 5 例双位点联合突变,且均来自于 MDR-TB,提示联合突变可能与 MDR-TB 相关。本研究中绝对浓度法敏感而芯片法耐药的分离株共 18 株,突变的位点有 511(3)、516(3)、526(5)、531(4)及 533(2),还有 1 例有 511 和 516 双位点突变。导致这种结果的原因可能有三点:(1)绝对浓度法控制条件不良;(2)细菌群体中耐药细菌数量未达到耐药比例,而 PCR 技术凭借高灵敏性能检测出细菌 DNA;(3)某些基因位点的突变是与低水平耐药相关的。Ramaswamy 等^[11] 的实验证实不同位点突变所引起的耐利福平程度不一样,511 和 533 等位点突变引起的是低水平耐药。本研究 511 位点共 5 例突变,有 3 例为绝对浓度法敏感;共 6 例 533 位点突变,绝对浓度法敏感 2 例,与 Ramaswamy 等^[11] 结论一致。导致绝对浓度法耐药而芯片法敏感的原因可能有以下三点:(1)绝对浓度法控制条件不良;(2)位点在检测范围之内,但突变形式未包含其中,如 526 位点的突变,芯片法仅包含了 4 种,并未检测 CAC-AAC 等形式的突变;(3)突变位点在检测范围之外却可导致利福平耐药,如墨西哥耐利福平主要的突变位点 450、445^[11]、Bahrmand 等^[13] 发现并证实与耐药相关的 572 位点。

异烟肼是酰胺类化学合成药物,主要攻击细胞壁中的杆菌酸,也可能攻击 DNA 和脂类等结核分枝杆菌的多个靶点,破坏其生理功能,最终导致细菌死亡。Kat G 基因编码过氧化氢-过氧化物酶,在细胞内能将异烟肼氧化成异烟酸,从而抑制细胞壁中杆菌酸的生物合成作用,最终杀灭细菌。inhA 基因可编码结核分枝杆菌分枝菌酸合成途径中的烯酰基还原酶,是异烟肼的作用靶点。长沙地区异烟肼耐药 87.70% 发生于 katG 315 位点,其中 315 AGC→ACC 突变所占比例最大,占突变分离株总数的 83.85%。;inhA-15 C→T 突变仅占异烟肼耐药的 12.30%,这与其他研究的结果相似^[5-8],然而异烟肼耐药也有地域差别,如 katG 315 突变在乌干达 61.50%,南非 37.62%;文献[13-15]报道了高水平的 inhA 突变(41.71%),这种地域差异可能由于标本数量不足够大所致。本研究中绝对浓度法敏感而芯片法耐药的分离株共 15 株,其中 80.00%(12/15)为 inhA-15 C→T 突变,符合 Tekwu 等^[16] 关于 InhA 编码基因的突变常见于低耐药菌的研究。导致异烟肼绝对浓度法敏感而芯片法耐药的原因同利福平,导致绝对浓度法耐药而芯片法敏感的原因如下:(1)绝对浓度法控制条件不良;(2)位点在检测范围之内,但突变形式未包含其中,如 315 除了这两种形式外,AGC 还能置换成 ACA、AGA、GGC 等;(3)突变位点在检测范围之外却可导致异烟肼耐药的位点及基因片段,如 katG 的 104、108 位点;kas A 基因、oxyR 调节子与 ahpC 基因等基因片段的突变。

综上所述,基因芯片法和绝对浓度法检测利福平和异烟肼耐药性差异无统计学意义($P>0.05$),芯片法检测利福平耐药性符合率为 98.00%,灵敏度为 98.00%,特异度为 98.32%;检测异烟肼符合率为 97.48%,灵敏度为 98.78%,特异度为 88.46%,可成为筛查利福平和异烟肼耐药性的快速有效方法。此外,长沙地区结核分枝杆菌 RFP 和异烟肼耐药以 rpoB531、526 以及 katG315 突变位点为主。

参考文献

[1] Shubladze N, Tadumadze N, Bablishvili N. Molecular patterns of

multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Georgia [J]. *Inter J Myc*, 2013, 2(2): 73-78.

[2] 王黎霞, 成诗明, 陈明亭, 等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. *中国防痨杂志*, 2012, 63(8): 485-508.

[3] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. *中国防痨杂志*, 1996, 18(3): 127-134.

[4] Yu XL, Wen ZL, Chen GZ, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from south-central in China[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2014, 67(4): 291-297.

[5] Yao C, Zhu T, Li Y, et al. Detection of *rpoB*, *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray[J]. *Clin Mic Inf*, 2010, 16(11): 1639-1643.

[6] 李桂莲. 天津市耐药结核病危险因素及结核分枝杆菌耐药分子机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2010.

[7] Lu J, Jiang S, Ye S, et al. Sequence analysis of the drug-resistant *rpoB* gene in the *Mycobacterium tuberculosis* L-form among patients with pneumoconiosis complicated by tuberculosis[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1325-1330.

[8] Singhal R, Myneedu VP, Arora J, et al. Detection of multi-drug resistance & characterization of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North-Eastern States of India using Geno-Type MTBDRplus assay[J]. *Indian J Med Res*, 2014, 140(4): 501-506.

[9] Adikaram CP, Perera J, Wijesundera SS. Geographical profile of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Sri Lanka[J]. *Mic Drug Res*, 2012, 18(5): 525-530.

[10] Ahmad S, Mokaddas E, Fares E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* iso-

lates from Kuwait and Dubai[J]. *Diagn Mic Inf Dis*, 2002, 44(3): 245-252.

[11] Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico[J]. *J Med Mic*, 2004, 53(Pt 2): 107-113.

[12] Ben Kahla I, Marzouk M, Henry M, et al. Molecular characterisation of isoniazid- and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Central Tunisia[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(12): 1685-1688.

[13] Bahrmand AR, Titov LP, Tasbiti AH, et al. High-level rifampin resistance correlates with multiple mutations in the *rpoB* gene of pulmonary tuberculosis isolates from the Afghanistan border of Iran[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(9): 2744-2750.

[14] Albert H, Bwanga F, Mukkada S, et al. Rapid screening of MDR-TB using molecular line probe assay is feasible in Uganda[J]. *BMC Inf Dis*, 2010, 10(10): 41.

[15] Barnard M, Albert H, Coetzee G, et al. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(7): 787-792.

[16] Tekwu EM, Sidze LK, Assam JP, et al. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the central region of Cameroon[J]. *BMC Mic*, 2014, 14(1): 113.

(收稿日期: 2015-06-28)



(上接第 3222 页)

树突状细胞产生和分泌, 具有多种免疫调节作用, 已证明 IL-18 与关节炎、肺损伤、肠炎等疾病有关, 且主要通过中和抗体发生作用^[9]。

本实验采用与人基因结构非常相似的 BALB/c 小鼠作为造模对象, 因为该小鼠对 MP 敏感, 遗传背景清晰。本研究结果表明, 在 MP 感染初期, 小鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-18 水平明显升高; 随着病情的发展, 肺组织的持续纤维化, 血清中 IL-18 表达逐步升高。在 MP 感染后期, 血清和肺泡灌洗液的 IL-18 水平增加, 用克拉霉素治疗感染 MP 小鼠后, 小鼠血清和肺泡灌洗液 IL-18 水平明显下降, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肺组织病理检查可见肺部炎症减轻。表明 MP 感染小鼠后其血清和肺泡灌洗液 IL-18 表达与 MP 感染程度有关。

综上所述, IL-18 参与 MP 感染的病理、生理发展, 引起机体损伤。MP 感染后 IL-18 表达下降到一定值可作为判断 MP 感染得到有效控制的标志, 其具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Jacobs E. *Mycoplasma pneumoniae*; now in the focus of Clinicians and epidemiologists[J]. *Eurosurveillance*, 2012, 17(6): 1-3.

[2] Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker BJ, et al. Differential

production of pro-inflammatory cytokines; in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 79(2): 115-127.

[3] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*[M]. New York: W H Freeman and Company, 2000.

[4] Toews GB. Cytokines and the lung inflammation[J]. *Am Rev Respir Dis*, 2011, 141(3): 765-788.

[5] Nathan C. Points of control in inflammation[J]. *Nature*, 2012, 420(1): 846-852.

[6] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*[M]. New York: W. H. Freeman and Company, 2000.

[7] Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, et al. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway[J]. *Immunol*, 1999, 162(11): 7322-7329.

[8] Volin MV, Koch AE. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *J Inter Cyt Res*, 2011, 31(10): 745-751.

[9] Dinarello CA. Interleukin-18, a pro-inflammatory cytokine[M]. *Eur Cytokine Netw*, 2012, 11(3): 483-486.

(收稿日期: 2015-07-08)