

分类号: R378  
学号: 2011109028

密级: 内部  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 新疆地区北京/W系和非北京/W系 MTB 两个重要蛋白表达差异研究

学位申请人	李枫
指导教师	袁俐教授
申请学位类别	医学硕士
专业名称	免疫学
研究方向	感染免疫
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2014年5月

分类号: R378  
学 号: 2011109028

密 级: 内部  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 新疆地区北京/W 系和非北京/W 系 MTB 两个重要蛋白表达差异研究

学 位 申 请 人	李 枫
指 导 教 师	袁 俐 教 授
申 请 学 位 类 别	医 学 硕 士
专 业 名 称	免 疫 学
研 究 方 向	感 染 免 疫
所 在 学 院	医 学 院

中国 · 新疆 · 石河子

2014 年 5 月

**Study on expression differences of two major proteins of Beijing/W  
lineage and non-Beijing/W lineage MTB in Xinjiang.**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Medicine**

By

**Li Feng**

(Immunology)

Supervisor: Prof. Yuan Li

May, 2014

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：李枫

时间：2014年06月10日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：李枫

时间：2014年06月10日

导师签名：袁利

时间：2014年06月10日

## 中文摘要

**目的** 本研究旨在检测北京/W系和非北京/W系结核分枝杆菌HspX、Hsp65在基因、mRNA和蛋白水平表达有无差异,探讨这两个重要蛋白对于北京/W系家族菌株广泛流行的可能作用。培养观察北京/W系与非北京/W系菌株在低氧、营养缺乏以及感染巨噬细胞后的生存能力。

**方法** 收集结核分枝杆菌临床分离株,选取北京/W系与非北京/W系菌株各60株。运用DNA直接测序法检测北京/W系和非北京/W系结核分枝杆菌HspX、Hsp65对应编码基因*hspX*、*groEL2*的PCR扩增产物,结果与标准株H37Rv进行比较是否存在基因突变。培养结核分枝杆菌至对数生长期,采用实时荧光定量PCR技术检测这两个重要蛋白HspX、Hsp65的编码基因mRNA的表达水平。将细菌感染RAW264.7巨噬细胞24h后,使用Western blot技术检测这两个蛋白在北京/W系和非北京/W系结核分枝杆菌中的表达水平。分别在低氧、营养缺乏以及感染巨噬细胞三个条件下培养结核分枝杆菌,观察北京/W系与非北京/W系菌株的生存能力。统计学分析采用两个独立样本的t检验。

**结果** 1. HspX、Hsp65对应编码基因的PCR扩增产物测序均未发现突变。2. 处于对数生长期的结核分枝杆菌HspX、Hsp65的编码基因mRNA的表达水平在北京/W系和非北京/W系菌株中未见差异( $P > 0.05$ )。3. 在细菌感染RAW264.7巨噬细胞24h后,北京/W系结核分枝杆菌中两个热休克蛋白HspX、Hsp65的表达水平均高于非北京/W系菌株,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。4. 在低氧和营养缺乏环境下,北京/W系与非北京/W系菌株的生长差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。细菌感染细胞后2d、3d、5d,北京/W系菌株的菌量显著多于非北京/W系( $P < 0.05$ )。

**结论** 在结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的过程中,HspX、Hsp65在北京/W系菌株中的表达水平高于非北京/W系菌株中的表达水平,推测这两个蛋白表达的改变可能与北京/W系菌株的流行有一定的关系。结核分枝杆菌感染巨噬细胞后,北京/W系菌株较非北京/W系菌株具有较强的生存能力。

**关键词** 结核分枝杆菌,北京/W系菌株,HspX,Hsp65

## Abstract

**Objective** In order to evaluate the potential roles of HspX and Hsp65 in Beijing/W lineage *Mycobacterium tuberculosis* in Xinjiang, we studied the differential expression of these proteins in Beijing/W lineage and non-Beijing/W lineage strains. To observe the different growth rates between the Beijing/W lineage and non-Beijing/W lineage *M. tuberculosis* in the conditions of hypoxia, nutrient starvation and in murine macrophages.

**Methods** The sputum samples were cultured and isolated and the strains were identified. The genes encoding HspX and Hsp65 were amplified by PCR from genome of clinical isolates including 60 Beijing/W lineage and 60 non-Beijing/W lineage strains, and then were sent to sequencing. Using quantitative real-time PCR, we detected the expression levels of HspX and Hsp65 mRNA in Beijing/W lineage and non-Beijing/W lineage *Mycobacterium tuberculosis* in the logarithmic growth phase. After 24 hours the RAW264.7 macrophage was infected with *Mycobacterium tuberculosis*, then Western-blot was used for the detection of protein levels of the two genes. Observe the different growth rates between the Beijing/W lineage and non-Beijing/W lineage *M. tuberculosis* in the conditions of hypoxia, nutrient starvation and in murine macrophages. The statistical analyses were performed using the t test.

**Results** 1. The two genes HspX and Hsp65 of clinical isolates in Xinjiang had not mutated. 2. Compared with non-Beijing/W lineage strains, no significant differences on the expression of HspX and Hsp65 mRNA in Beijing/W lineage strains was found ( $P > 0.05$ ). 3. The levels of HspX and Hsp65 proteins were higher in Beijing/W lineage strains than that in non-Beijing/W lineage strains after the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophage after 24 hours ( $P < 0.05$ ). 4. It showed the difference between Beijing /W and non-Beijing /W lineage strains in viability had no statistical significance ( $P > 0.05$ ) in the conditions of hypoxia, nutrient starvation, but in macrophages the last figure of Beijing /W lineage strains was higher than that of non-Beijing /W lineage strains and H37Rv at 2d, 3d and 5d. ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** In the course of *Mycobacterium tuberculosis* confrontation with the host macrophages, compared with non-Beijing/W lineage strains, the expressions of HspX、Hsp65 were relatively higher in Beijing/W lineage strains. The changes of HspX and Hsp65 may be associated with the widespread popularity of Beijing/W lineage *Mycobacterium tuberculosis*.

**Keywords** *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing/W lineage strains, HspX, Hsp65

# 目录

中文摘要 .....	错误!未定义书签。
英文摘要 .....	II
缩略语表 .....	IV
前 言 .....	错误!未定义书签。
材料 .....	4
1.1 标本来源 .....	4
1.2 主要仪器设备 .....	4
1.3 主要实验试剂 .....	5
1.4 常用试剂的配制方法 .....	错误!未定义书签。
方法 .....	错误!未定义书签。
2.1 结核分枝杆菌的分离培养与鉴定 .....	错误!未定义书签。
2.2 结核分枝杆菌目的基因克隆与测序 .....	错误!未定义书签。
2.3 结核分枝杆菌目的基因 mRNA 表达水平的检测 .....	错误!未定义书签。
2.4 总蛋白的制备 .....	错误!未定义书签。
2.5 Western-blot 检测目的蛋白的表达水平 .....	错误!未定义书签。
2.6 MTB 在不同培养条件下生存能力的检测 .....	错误!未定义书签。
2.7 MTB 在巨噬细胞内生存能力的检测 .....	错误!未定义书签。
2.8 统计学分析 .....	错误!未定义书签。
结果 .....	错误!未定义书签。
3.1 结核分枝杆菌目的基因测序分析 .....	错误!未定义书签。
3.2 结核分枝杆菌目的基因 mRNA 的表达水平 .....	错误!未定义书签。
3.3 结核分枝杆菌目的蛋白的表达水平 .....	错误!未定义书签。
3.4 MTB 在不同培养条件下的生长情况 .....	21
3.5 MTB 感染巨噬细胞后的生存能力 .....	21
讨论 .....	错误!未定义书签。
4.1 结核病流行现状 .....	错误!未定义书签。
4.2 新疆结核病疫情状况 .....	错误!未定义书签。
4.3 结核分枝杆菌北京/W 系家族的分子特征 .....	错误!未定义书签。
4.4 结核分枝杆菌北京/W 系家族的分布 .....	错误!未定义书签。
4.5 结核分枝杆菌北京/W 系家族的优势 .....	错误!未定义书签。
4.6 结核分枝杆菌 HspX .....	错误!未定义书签。
4.7 结核分枝杆菌 Hsp65 .....	28
4.8 展望 .....	29
结论 .....	30
参考文献 .....	31
文献综述 .....	38
致 谢 .....	46
作者简介 .....	47
导师评阅表 .....	48

## 主要符号和缩略词语表

简称	中文全称	英文全称
TB	tuberculosis	结核病
MTB	Mycobacterium tuberculosis	结核分枝杆菌
PNB	P- Nitrobenzoic Acid	对硝基苯甲酸
TCH	2 - thiophene carboxylic acid hydrazide	噻吩-2-羧酸肼
LAM	Latin American and Mediterranean	拉丁美洲和地中海
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
EAI	East African and Indian	东非印度
L-J	Löwenstein-Jensen	罗氏
LSPs	Large sequence polymorphisms	长序列多态性
RD	region of difference	差异区
VNTR	variable number of tandem repeat	数目可变串联重复序列
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
HspX	Heat shock protein X	热休克蛋白 X
Hsp65	Heat shock protein 65	热休克蛋白 65
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧腺/胞/鸟/胸苷三磷酸
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦磷酸二乙酯
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
QRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffered Saline	磷酸缓冲盐溶液
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	十二烷基硫酸钠
TEMED	Tetram ethylethylenediamine	四甲基乙二胺
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$	$\gamma$ 干扰素
IL	Interleukin	白细胞介素
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
BCG	Bacillus Calmette-Guerin	卡介苗

## 前 言

### (Introduction)

结核病是一种由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的慢性感染性疾病, 可侵入人体全身的多器官, 主要侵犯肺部, MTB 的致病性可能与细菌侵入组织细胞大量繁殖导致的炎症反应、菌体自身成分和代谢产物的毒性以及宿主对菌体成分产生的免疫效应有关, 对人类的健康构成很大的威胁。结核病又称为痨病, 在人类历史上曾经广泛流行并且剥夺了数亿人的生命, 被称之为白色瘟疫。近年来由于耐药结核分支杆菌的增加、MTB 和 HIV 病毒的合并感染者增多、卡介苗效果的不确定性以及全球性的人口流动等因素导致结核病全球流行趋势日益加剧, 再次成为了严重的公共卫生问题和重大的社会经济问题, 与 HIV、疟疾共同被 WHO 列为当前急需解决的三大公共健康难题。据世界卫生组织最新的调查报告显示, 全球约有 1/3 即 20 亿人口患有结核病, 每年新增患者达 800~1000 万, 每年死亡人数近 300 万, 死亡率已经超过了大部分的癌症。而且更为棘手的是由于广泛耐药菌和多重耐药菌的出现, 使得抗结核药物治疗效果不理想。因此, 发展新的行之有效的治疗及预防措施对全球抗结核医务工作者是一个巨大的挑战。

我国的结核病疫情形势严峻, 约有三分之一左右的人口感染了结核分枝杆菌, 是全球 22 个结核病流行严重的国家之一, 同时也是全球 27 个耐多药结核病流行严重的国家之一。据 2010 年世界卫生组织估算中国结核病年发病人数达 100 万, 占全球年发病总人数 (880 万) 的 11%, 位居全球第二位<sup>[1]</sup>。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示<sup>[2]</sup>, 我国结核病疫情存在以下几个主要特点: 第一, 结核病负担仍较重, 我国现有肺结核患者约 500 万, 主要集中在 25 岁及以上人群, 与过去相比青年患者中活动性肺结核患者数量有所增加。第二, 耐药情况严重, 虽然总耐药率有所下降, 但是仍高于全球的平均水平。第三, 结核患病率存在地区间差异, 农村地区明显高于城镇, 西部地区高于东中部地区, 局部地区主要是偏远地区结核病疫情严重。第四, 无症状肺结核患者比例显著增加。《全国结核病防治规划 (2011—2015 年) 》中指出, 未来数年内可能出现以耐药菌为主的结核病流行态势, 结核菌/艾滋病病毒合并感染患者数量会持续增加<sup>[3]</sup>。

结核病的不同分子流行病学研究结果显示, 全世界结核病的流行主要是由几种特殊的结核分枝杆菌家族引起的, 并且不同的家族具有不同的流行病学特征、地区性分布、致病性和耐药性的差异。如北京家族、Haarlm 家族、Latin-American and editerranean (LAM) 家族、East African、Indian(EAI) 家族和 Central Asian(CAS) 家族等菌株群, 其中有关北京家族菌株的报道分布相当广泛<sup>[4]</sup>。

北京家族结核分枝杆菌现已正式更名为北京/W系结核分枝杆菌，是 MTB 的一个独特遗传谱系，具有相同的基因标记，即相同的 IS6110 限制片段长度多态性 (IS6110 RFLP) 和间隔寡核苷酸分型 (spoligotyping) 的特征。1995 年，Van soelingen 等在中国北京地区首次发现了此类菌株<sup>[5]</sup>。北京/W系结核分枝杆菌广泛分布于全球，主要集中在中国、日本、东南亚和俄罗斯等国家和地区，是世界第二大流行的结核分枝杆菌，占全球分离菌株的 13%，全世界约有 1/3 的结核病由该型菌株导致<sup>[6]</sup>。北京/W系结核分枝杆菌被认为是一类传播速度更快、致病性更强、更容易形成耐药的菌株。

我国是结核病的高负担国家，而新疆又是我国结核病高发省区，活动性肺结核患病率、涂阳患病率和死亡率分别是 464 /10 万、160 /10 万和 38 /10 万，分别为全国平均水平的 1.26 倍、1.51 倍和 3.88 倍。WHO 新疆结核病耐药监测报告显示：新疆维吾尔自治区的结核分枝杆菌的耐药率依然较高，结核病控制工作不容忽视<sup>[7]</sup>。我国北京/W系 MTB 分布调查结果显示，该型菌株在我国北方占有绝对优势，可高达 70%~80%，在北京地区甚至可高达 90%，在其他地方也有不同程度的流行。大量研究表明，在结核疫情高发的新疆，北京/W系结核分枝杆菌为主要流行菌株。綦迎成<sup>[8]</sup>等报道，新疆地区北京/W系结核分枝杆菌占全部检测菌株的 68.57% (120/175)。李君莲等<sup>[9]</sup>研究表明：新疆结核分枝杆菌临床分离株存在明显的 VNTR 基因多态性，主要流行菌株为 VNTR 一群即北京基因型。吴长东<sup>[10]</sup>等研究结果显示，新疆北京/W系结核分枝杆菌在维吾尔族和汉族病例中所占的比例分别为 39.5% (79/200) 和 72.4% (21/29)，平均水平为 55.95%。张娟<sup>[11]</sup>等研究结果显示：新疆石河子地区的汉族结核病例中北京/W系结核分枝杆菌所占比例为 85.45% (47/55)。黄艺<sup>[12]</sup>等研究结果也显示在新疆北疆地区，北京/W系结核分枝杆菌为当地主要流行菌株，耐药情况较为严重。南北疆不同民族患者体内的北京/W系菌株分布具有明显差异。因此，把北京/W系结核分枝杆菌的监测作为新疆防治结核病工作的重点，加强对此型菌株的监测力度，必将对控制结核病疫情的进一步蔓延产生积极的影响。

结核分枝杆菌不产生内毒素，也不产生外毒素和侵袭性酶，其致病性可能与细菌在组织细胞内大量繁殖引发的炎症、菌体自身成分和代谢物质的毒性以及机体对抗细菌入侵产生的免疫损伤有关。巨噬细胞为结核分枝杆菌的宿主细胞，在其表面存在许多抗原受体，MTB 通过受体介导的内吞作用进入巨噬细胞形成吞噬体，吞噬体具有一定的灭菌作用。结核分枝杆菌与巨噬细胞的相互作用是抗结核免疫反应的关键，结核分枝杆菌通过阻止吞噬溶酶体的融合、减少巨噬细胞的凋亡以及降低巨噬细胞对免疫应答的敏感性等途径逃避巨噬细胞的免疫监视和攻击，以求得在细胞内的存活和增殖。结核分枝杆菌菌体蛋白及其分泌的蛋白在宿主抗结核分枝杆菌的免疫反应中发挥着重要的作用。HspX 是结核分枝杆菌潜伏感染期机体免疫反应的重要靶抗原，如果没有 HspX，结核分枝杆菌将很难在巨噬细胞内存活，其对 MTB 的生存力和稳定性有着重要的调节作用。Hsp65 是结核

分枝杆菌的一种分泌蛋白，该蛋白具有很强的免疫原性，在结核分枝杆菌感染过程中，Hsp65 是机体对抗其入侵的一种重要的免疫保护性抗原。有蛋白质组学研究表明，与其他家族结核分枝杆菌相比，HspX 和 Hsp65 均为北京/W 系家族的差异表达蛋白<sup>[13]</sup>。本实验旨在研究这两个蛋白在新疆主要流行菌株北京/W 系 MTB 中是否存在特异性表达，并且从 DNA、RNA 和蛋白水平比较观察哪个水平发生了差异，期望能为新疆地区结核病防治工作开辟新的途径。

热休克蛋白 HspX 是结核分枝杆菌持续感染的特异性表达蛋白。在结核患者的血清中发现了抗 HspX 的 B 细胞和 T 细胞反应，显示了 HspX 作为 MTB 持续感染期抗原靶标的重要性，有学者提出发展 HspX 与其他潜伏性抗原联合的新型亚单位疫苗<sup>[14]</sup>。该疫苗较传统的 BCG 疫苗和大部分新发展的疫苗具有明显的优势。BCG 疫苗在保护成年人抵抗结核病方面的作用不确定，而大部分新发展的疫苗也都是基于感染早期表达抗体的预防性疫苗，对感染后期的患者基本无效。所以研究能够激活感染后期相关抗原 T 细胞反应的治疗性疫苗非常必要，此类疫苗可以清除持留态的结核菌，从而有助于阻止潜伏性结核病的复发<sup>[15]</sup>。热休克蛋白 Hsp65 是机体对抗 MTB 入侵的重要的免疫保护性抗原，在结核菌感染的小鼠体内，20% 的反应性 T 细胞能够识别 Hsp65<sup>[16]</sup>，Hsp65 DNA 疫苗免疫小鼠后可以清除其体内的持留菌，防止其治疗后结核病的复发<sup>[17]</sup>，因此 Hsp65 是结核病预防和治疗的一个关键因素，已成为近年来研究的重点和热点之一。结核分枝杆菌北京/W 系菌株的进化、流行与其分子表达的改变密切相关，内在生物学优势赋予其广泛播散的能力、更高的毒力和更强的抵抗性，因此发现其差异表达的分子，揭示其持续感染的机制，有助于寻找适当的药物靶标及治疗性疫苗靶点。

# 材 料

## (Materials)

### 1.1 标本来源

本研究共采用结核分枝杆菌临床分离株 120 株，其中包括北京/W 系菌株和非北京/W 系菌株各 60 株，均采集分离于新疆地区结核患者的痰液。结核分枝杆菌标准株 H37Rv 由北京结核病胸部肿瘤研究所提供。鼠源性巨噬细胞株 RAW264.7 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

### 1.2 主要仪器设备

仪器设备	生产厂商
生物安全柜(II级)	Thermo Electron Corporation
SHH. W21 电热恒温水浴箱	北京光明医疗仪器厂
GNP-9080 隔水式电热恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司
JA2003N 电子分析天平	上海精密科学仪器有限公司
微波炉	日本松下公司
1000 $\mu$ l、200 $\mu$ l、20 $\mu$ l、10 $\mu$ l 微量加样器	eppendorf公司产品
无菌培养管	浙江拱东技术服务公司
eppendorf 管	eppendorf 公司产品
22SWG 标准接种环	北京玻璃仪器厂
电控高温接种灭菌器	天津开发区合普工贸有限公司
ZHWY-1102C 双层小容量恒温摇床	上海百典设备有限公司
XW-80A涡旋振荡器	上海精科实验有限公司
无Rnase酶枪头及离心管	上海生物工程有限责任公司
Light Cycler480 实时荧光定量 PCR 仪	美国 Cepheid 公司
T-GRADIENT PCR 仪	美国 Bio-Rad 生物工程公司
Gel Doc 2000 凝胶成像系统	美国 Bio-RAD 公司产品
高速冷冻离心机 labofuge 4008	德国 Heraeus 公司
TGL-16L 型离心机	上海安亭科学仪器厂
YXQ-SG46 高压蒸汽灭菌器	上海佳胜实验设备有限公司
DYY-6B 型电泳仪	北京六一仪器厂
磨菌管	北京玻璃仪器厂
细菌浊度仪	上海昕瑞仪器仪表有限公司

SW-CJ-1F 超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
二氧化碳细胞培养箱	美国 New BrunswickGalaxy 170s
倒置生物显微镜	上海光学仪器厂
细胞超声破碎仪	上海苑胜仪器设备有限公司
水平摇床	北京六一仪器厂
电泳仪	Biometra
转膜仪	Biometra
核酸蛋白检测仪	美国 Thermo 公司
Millipiore 纯水装置	美国 Millipiore 公司
-80℃超低温冰箱	日本 SYNYO 公司

### 1.3 主要实验试剂

实验试剂	生产厂商
无水乙醇及75%乙醇	西安化学试剂厂产品
磷酸二氢钾	安徽合肥工业大学化学试剂厂产品
谷氨酸钠	上海蓝季科技发展有限公司
硫酸镁	上海普侨科技实业公司
枸缘酸镁	上海试剂一厂产品
丙三醇	天津市天新精细华工开发中心产品
孔雀绿	天津市化学试剂研究所
吐温-80	天津市福晨化学试剂厂产品
7H9 液体培养基	美国 BD 公司
OADC	美国 Difco 公司
细菌 RNA 提取试剂盒	美国 Omega 公司
逆转录试剂盒	宝生物工程(大连)有限公司
荧光定量 PCR 试剂盒	TAKARA
DNA Marker	北京天根生物工程公司
6×Buffer	北京天根生物工程公司
dNTP (10mM)	北京天根生物工程公司
Taq DNA polymerase	北京天根生物工程公司
核酸染料	大连宝生物工程公司产品
琼脂糖	西班牙生物工程公司产品
引物	上海生物工程有限责任公司
5×TBE	上海生物工程有限责任公司
细胞培养基RPMI 1640	Hyclone
胎牛血清	四季青
RIPA裂解液及PMSF	北京索莱宝科技有限公司

蛋白上样缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
蛋白Marker	美国 Thermo 公司
SDS	北京索莱宝科技有限公司
丙烯酰胺	美国 Amresco 公司
甲叉双丙烯酰胺	美国 Amresco 公司
过硫酸铵 (AP)	北京索莱宝科技有限公司
Tris	北京索莱宝科技有限公司
TEMED	北京索莱宝科技有限公司
甘氨酸	北京索莱宝科技有限公司
甲醇	天津富宇精细化工有限公司
PVDF膜	美国 Millipore
吐温-20	北京索莱宝科技有限公司
$\beta$ -action单克隆抗体	北京中衫金桥生物技术有限公司
辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗鼠IgG	北京中衫金桥生物技术有限公司
ECL发光试剂盒	美国 Thermo 公司
显影粉	天津世纪奥博商贸有限公司
定影粉	天津世纪奥博商贸有限公司
结核分枝杆菌16kD单克隆抗体	美国 Abcam 公司
结核分枝杆菌HSP65单克隆抗体	美国 Abcam 公司

## 1.4 常用试剂的配制方法

- (1) 4%NaOH: 将 20g NaOH 溶于 500 mL 无菌蒸馏水中, 4℃保存备用。
- (2) 2%孔雀绿水溶液: 将 2g 孔雀绿溶于 100 mL 无菌蒸馏水中, 加热溶解后 121℃, 30 min 高压, 4℃保存备用。
- (3) 7H9 液体培养基: 将 7H9 粉末 0.47g, Tween-80 50  $\mu$  L, 丙三醇 200  $\mu$  L, 蒸馏水 90 mL, 充分搅拌混匀后高压灭菌, 待冷却后加入 10 mL OADC 混匀分装, 4℃保存备用。
- (4) 0.5×TBE 电泳缓冲液: 5×TBE 50mL, 加入 450mL 蒸馏水稀释 10 倍, 备用。
- (5) 1.5%琼脂糖凝胶: 称取 1.2g 琼脂糖粉, 加入 80mL 0.5×TBE 中, 加热溶解后加入 8  $\mu$  L 核酸染料, 充分混合后倒入凝胶槽, 待冷却成形后取出放入 0.5×TBE 电泳缓冲液中备用。
- (6) 酸性罗氏培养基的制备:

表 1 酸性罗氏培养基的成分

成分	用量
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.6 g
谷氨酸钠 (纯度 95%)	2.88g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.096 g
枸橼酸镁	0.24 g
甘油	4.8 mL
蒸馏水	120mL
新鲜鸡卵液	440mL
2%孔雀绿水溶液	8 mL

- 制备方法：① 基础液的制备：量取蒸馏水 120mL，加入已经称量好的各盐类成分，放入微波炉中加热溶解约 2 分钟，自然冷却。
- ② 新鲜鸡卵液的制备：取 10~12 个新鲜鸡蛋，洗净表面污物，在 70%乙醇中浸泡消毒 30 分钟后取出擦净，再经 4~8 层无菌纱布过滤收集鸡卵液，充分搅拌均匀。
- ③ 将基础液与新鲜鸡卵液混合，再加入 2 %孔雀绿水溶液 8mL，混匀，静置 1 小时。
- ④ 分装培养基于标准螺旋盖无菌培养管中，每管约 7mL，将培养管斜置于恒温水浴箱内搁架上，使斜面占培养管的 2/3，采用蒸汽加温法 85 °C 凝固灭菌 50 min，间歇 2 次，中间间隔 1 小时。制成的培养基表面光滑，颜色鲜艳，有一定的韧性和酸碱缓冲能力。
- ⑤ 待培养基冷却后放于 37°C 电热恒温培养箱中无菌培养 24 小时。4 °C 保存，一个月内使用。
- (7) 引物：按照引物合成说明将粉末状引物溶于适量蒸馏水中配制成引物母液，再按照 1:10 的比例将引物母液稀释成工作液，-20°C 保存备用。
- (8) 细胞完全培养基：RPMI 1640 176mL，胎牛血清 24mL，充分混合配制成含有 12%胎牛血清的完全培养基，每瓶 200mL，4°C 保存备用。
- (9) 10%SDS 溶液：取 10g SDS 加入到 70mL 蒸馏水中，加热到 60°C 溶解，然后定容至 100mL，室温保存备用。
- (10) 30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液 (Acr/Bic)：取 29g 丙烯酰胺，1g 甲叉双丙烯酰胺，加蒸馏水定容至 100mL，充分溶解，4°C 避光保存备用。
- (11) 10% 过硫酸铵 (AP) 溶液：取 0.1g AP 加入到 1mL 蒸馏水中，充分溶解，4°C 避光保存，1 周内使用。

- (12) 1.5mol/l Tris · Hcl (PH 8.8) : 取 45.43g Tris 加入到 200mL 蒸馏水中, 待充分溶解后用浓 HCL 调节 PH 值至 8.8, 最后用蒸馏水定容至 250mL, 高压灭菌后室温保存备用。
- (13) 1.0mol/l Tris · Hcl (PH 6.8) : 取 30.29g Tris 加入到 200mL 蒸馏水中, 待充分溶解后用浓 HCL 调节 PH 值至 6.8, 最后用蒸馏水定容至 250mL, 高压灭菌后室温保存备用。
- (14) 10×电泳缓冲液: 取30.3gTris、187.7g甘氨酸, 加蒸馏水定容至1000mL, 充分溶解, 室温保存备用。
- (15) 1×电泳缓冲液: 取100mL 10×电泳缓冲液、10mL 10%SDS, 用蒸馏水定容至1000mL, 室温保存备用。
- (16) 10×电转液: 取 58gTris、29g 甘氨酸、3.7gSDS, 用蒸馏水定容至 800mL, 充分溶解, 室温保存备用。
- (17) 1×电转液: 取 10 mL 10×电转液、20 mL 甲醇, 用蒸馏水定容至 100mL, 室温保存备用。
- (18) 10×TBS: 取 100mL 1mol/l Tris · Hcl (PH7.5)、87.66g NaCl, 用蒸馏水定容至 500mL, 待充分混合后用浓 HCL 调节 PH 值至 7.4, 再用蒸馏水定容至 1000mL, 4℃保存备用。
- (19) 1×TBST: 取 50mL 10×TBS、1mL Tween20, 用蒸馏水定容至 500mL, 4℃保存备用。
- (20) 封闭液: 将5g脱脂奶粉溶于100mL TBST中, 4℃保存备用。

## 方 法

### (Methods)

#### 2.1 结核分枝杆菌的分离培养与鉴定

采集体合格的结核病患者的痰液，按照《结核病诊断细菌学检验规程》说明对痰液进行碱处理。痰液中加入 4%NaOH 2~4 倍的量，室温下放置 30 分钟，期间振荡 2-3 次使其液化。吸取经过碱处理的痰标本 0.1mL 接种于酸性罗氏培养基斜面上，每个标本同时接种两管，置于 37℃ 恒温培养箱中培养。每周观察一次菌落生长情况，若第八周仍无菌落生长则可确定为阴性结果。

生长结果为阳性的菌落，于第 2~3 周接种于鉴别培养基 PNB（对硝基苯甲酸）和 TCH（噻吩-2-羧酸胍）上，进行分支杆菌的初步鉴定，PNB 培养基上生长阴性同时 TCH 培养基上生长阳性的为结核分枝杆菌<sup>[18]</sup>。对结核分枝杆菌进一步用 PCR 方法进行复合群鉴定。16SrRNA 可鉴别分支杆菌和非分支杆菌，MTP40 是分支杆菌种的特异蛋白基因可鉴别人型结核分枝杆菌。既可扩增出 16SrRNA 又能够扩增出 MTP40 的菌株为人型结核分枝杆菌<sup>[19]</sup>。北京/W 系结核分枝杆菌的鉴定采用 RD105 缺失基因检测法进行确认<sup>[20]</sup>。

#### 2.2 结核分枝杆菌目的基因克隆与测序

##### 2.2.1 结核分枝杆菌 DNA 的制备

将分离培养后的结核分枝杆菌用无菌接种环接种于新鲜酸性罗氏培养基上，置于 37℃ 电热恒温培养箱中培养 3~4 周。用标准接种环刮取 2~3 环菌落于装有 500  $\mu$ L 双蒸水的 EP 管中，85℃ 灭活 30min，8000r/min 离心 5min，弃去上清，加入 500  $\mu$ L TE 充分混合，85℃ 热浴 30min，12000r/min 离心 5min，取上清液于 -20℃ 保存备用。

##### 2.2.2 基因扩增及测序

- (1) 通过 GeneBank 查找目的蛋白 HspX、Hsp65 对应的编码基因 *hspX*、*groEL2* 的基因序列，应用 primer 5.0 软件设计特异性引物（见表 2）。

表 2 基因测序的引物序列  
Table 2 Primer sequences for gene sequencing

基因 Gene	序列 Sequence (5' -3')	产物长度 Product size
<i>hspX</i>	F: 5' - CGCGGATCCATGGCCACCACCCTTC -3'	453bp
	R: 5' - CCCAAGCTTTCAGTTGGTGGACCGG-3'	
<i>groEL2</i>	F: 5' -ATGGCCAAGACAATTGCGTA -3'	1623bp
	R: 5' -TCAGAAATCCATGCCACCC -3'	

(2) 两者的 PCR 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 16  $\mu$ l, Buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, 上下游引物各 0.5  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ l, DNA 模板 3  $\mu$ l, 共 25  $\mu$ l。

(3) HspX 基因 PCR 扩增条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min, 变性 94 $^{\circ}$ C 45s, 退火 62 $^{\circ}$ C 45s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 50s, 共 35 个循环, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

Hsp65 基因 PCR 扩增条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min, 变性 94 $^{\circ}$ C 45s, 退火 53 $^{\circ}$ C 45s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 90s, 共 35 个循环, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 扩增产物加入 1% 琼脂糖凝胶上样孔内电泳, 电泳后的凝胶于紫外线下成像, 产物验证正确后送公司测序, 检测目的基因有无突变。引物合成与基因测序均由上海生工生物技术有限公司完成。

## 2.3 结核分枝杆菌目的基因 mRNA 表达水平的检测

### 2.3.1 结核分枝杆菌总 RNA 的提取

(1) 取 7H9 液体培养基中处于对数生长期的菌液 1~3mL, 4000~5000 转/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5~10min。

(2) 去上清, 加入 1 mL 无 Rnase 酶污染的 PBS 充分混匀, 4000~5000 转/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5~10min。重复 2 次, 去掉上清。

(3) 加入 200  $\mu$ L 溶菌酶重悬浮菌液, 最大速度涡旋 30 S。

(4) 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 10min 或每 2min 涡旋 20 S。

(5) 于标本中加入 350  $\mu$ L Buffer BRK/ $\beta$ -ME 和 25~40mg Glass Powder, 涡旋 5min。15000 转/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5min (注意: 确保使用之前  $\beta$ -ME 加入到 Buffer BRK 中)。

- (6) 吸取 400  $\mu$ L 上清液到新的 1.5mL 反应管中，再加入 400  $\mu$ L 70%酒精，充分混匀。
- (7) 把 HiBind RNA 分离柱放入 2mL 收集管中，将全部样品转移到分离柱中。10000 转/min，4 $^{\circ}$ C 离心 30~60S。弃去液体，重复利用收集管。
- (8) 将分离柱重新放入收集管中，加入 300  $\mu$ L RNA Wash Buffer I。10000 转/min，室温条件下离心 30~60S，弃去液体。
- (9) 将分离柱放入新的收集管中，加入 500  $\mu$ L RNA Wash Buffer I。10000 转/min，室温条件下离心 30~60S，弃去液体。
- (10) 重复利用收集管，加入 500  $\mu$ L 用酒精(96%~100%)稀释的 RNA Wash Buffer II。10000 转/min，室温条件下离心 30~60S，弃去液体。
- (11) 重复上一步，然后 10000 转/min，室温下离心分离柱 2 分钟，充分干燥分离柱。
- (12) 洗脱 RNA，将分离柱转移到 1.5mL 反应管中，加入 30~50  $\mu$ L 经 DEPC 处理的水洗脱 RNA，确保水直接加到膜上。室温条件下，10000 转/min 离心 1min。
- (13) 用核酸蛋白仪检测总 mRNA 浓度和纯度，调整配平每个样本 mRNA 的量。
- (14) 取 2  $\mu$ L 总 RNA 用 1%变性琼脂糖凝胶检测其完整性，140V 电泳 20min，凝胶成像仪下观察结果（注意：RNA 的相关操作过程均在冰浴中进行，所用器材之前都需用 DEPC 水处理或选用无 RNA 酶的产品）。

### 2.3.2 RNA 逆转录

在无 RNA 酶的反应管中加入 2  $\mu$ L oligo(dT)、2  $\mu$ L dNTP、1  $\mu$ L 总 RNA、RNase-free ddH<sub>2</sub>O 定容至 14.5  $\mu$ L，70 $^{\circ}$ C 加热 5min 后迅速在冰上冷却 2min。然后再加入 4  $\mu$ L 5 $\times$ Buffer、0.5  $\mu$ L Rnasin 和 1  $\mu$ L MMLV，充分混匀。42 $^{\circ}$ C 温浴 50min，95 $^{\circ}$ C 加热 5min 终止反应，-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.3.3 实时荧光定量 PCR

- (1) 通过 GeneBank 查找结核分枝杆菌目的基因 *hspX*、*groEL2* 及内参基因 *Siga* 的基因序列。运用引物设计软件 Primer 5.0 设计扩增产物长度在 100~300bp 之间的特异性引物（见表 3），由上海生物工程有限公司合成。
- (2) 按照荧光定量试剂盒的操作说明构建实时定量 PCR 反应体系：ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L，上游引物 0.5  $\mu$ L，下游引物 0.5  $\mu$ L，cDNA 2  $\mu$ L，SYBR Green I mix 10  $\mu$ L，总体系 20  $\mu$ L。
- (3) 按照上述体系将样品加入到实时定量 PCR 八连管中，每个样品重复检测 3 次，充分混合后离心 30s 使样品全部聚集到管的底部，然后把八连管放入

Light Cycler480 实时荧光定量 PCR 仪中,设置反应条件:94℃ 预变性 1min; 变性 94℃ 15s, 退火 60℃ 25s, 延伸 72℃ 25s, 共 40 个循环。

- (4) 取每个样本的平均 Ct 值代入公式  $2^{-\Delta Ct}$ , 其中  $\Delta Ct$  为目的基因与内参基因表达量的差值, 计算出各样本的相对表达量。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物序列  
Table 3 Primer sequences for qRT-PCR

基因 Gene	序列 Sequence (5' -3')	产物长度 Product size
<i>hspX</i>	上游 5' -CGACAAGGACGTCGACATTA-3'	173bp
	下游 5' -CCTTGTCGTAGGTGGCCTTA-3'	
<i>groEL2</i>	上游 5' - GTAGTGGCTTACCCGTTCTG -3'	195bp
	下游 5' - TGGGCACCGAGTTGGAGT -3'	
<i>Siga</i>	上游 5' - TCGAGGTGATCAACAAGCTG -3'	254 bp
	下游 5' - CTGCAGCAAAGTGAAGGACA -3'	

## 2.4 总蛋白的制备

### 2.4.1 RAW264.7 巨噬细胞的培养

细胞在全培养基中于 37℃, 5%二氧化碳培养箱内培养, 通过计数板计数, 待细胞数达到  $3 \times 10^7$  个后, 1000 转/min, 离心 5min~10min 收集细胞, 重悬细胞后将细胞置于 6 孔板中培养。培养 48h 后, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次, 洗去未贴壁的细胞, 加入新鲜细胞全培养基准备感染。

### 2.4.2 细菌感染巨噬细胞

细菌感染细胞时按照细菌:细胞=10:1 的比例, 把处于对数生长期的菌液加入到六孔板中, 置于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24h。

### 2.4.3 总蛋白的提取

- (1) 被感染的巨噬细胞以 2000r/min, 4℃ 离心 10min, 去上清收集细胞沉淀。
- (2) 用 PBS 重悬细胞, 吹打洗涤 3 次。
- (3) 按照细胞裂解液:PMSF=100:1 的比例配制混合液, 然后把配制好的混合

液按照六孔板每孔细胞量加入 150~250  $\mu$ l 裂解液的比例加入到细胞中，充分混匀，静置 30min。

- (4) 设置超声破碎仪振幅 70%，超声 1S，停止 1S，超声破碎细胞 1min。
- (5) 14000r/min，4℃离心 25min，吸取上清到新的 EP 管中。
- (6) 用核酸蛋白检测仪检测总蛋白浓度，-80℃保存备用。

## 2.5 Western-blot 检测目的蛋白的表达水平

### 2.5.1 蛋白样品的处理

从-80℃冰箱中取出蛋白样品，4℃解冻，按照所测蛋白浓度计算出从每个样品中取出等量蛋白的体积，以最低浓度为标准用高效 RIPA 裂解液将各蛋白样品配平致一致浓度，再按照蛋白样品：4×上样缓冲液=3：1 的比例将两者充分混匀。最后将混合液置于 100℃沸水中煮 5min，使蛋白变性。分装蛋白-80℃保存备用。

### 2.5.2 凝胶的制备

- (1) 正确组装灌胶装置，倒入蒸馏水检漏，确保无误后把水倒净，用滤纸吸干。
- (2) 配制 12%的分离胶 10mL（见表 4）。

表 4 12%分离胶的配方

成分	所需体积 (mL)
蒸馏水	3.2
30% Acr/Bic	4
1.5mol/l Tris • Hcl (PH 8.8)	2.6
10% SDS	0.1
10% AP	0.1
TEMED	0.004

- (3) 将分离胶（每侧 4.5mL）加入到两块玻璃板的间隙，避免产生气泡，然后在分离胶上慢慢的加入蒸馏水覆盖，室温下静置凝固（约 30~60min）。待分离胶完全凝固后，倒掉覆盖的水，用滤纸吸净残余的水分。
- (4) 配制 5%的浓缩胶 4mL（见表 5）。

表 5 5%浓缩胶的配方

成分	所需体积 (mL)
蒸馏水	2.7
30% Acr/Bic	0.67
1.0mol/l Tris · Hcl (PH 6.8)	0.5
10% SDS	0.04
10% AP	0.04
TEMED	0.004

(5) 将浓缩胶（每侧 1.5mL）迅速加入到已凝固的分离胶上，插入 Teflon 梳子，确保孔底无气泡，室温下静置凝固（约 30~60min）。

### 2.5.3 蛋白的上样与电泳

- (1) 取下玻璃板安装至电泳架上（注意：小玻璃板朝向内，大玻璃板朝向外，向下压紧），再放入电泳槽中，往电泳架内倒满新鲜配制的 1×电泳缓冲液，往电泳槽内倒入一半回收的或新鲜电泳缓冲液。
- (2) 拔掉齿梳，往上样孔内加入蛋白样品与 MARK。（10 孔梳，蛋白上样量为 10~15  $\mu$ l，不少于 50  $\mu$ g，MARK 为 5  $\mu$ l）
- (3) 跑电泳：浓缩胶电压为 80V，待样品跑至分离胶后（约 25min），换电压为 110V，待指示剂跑到胶的底部（约 80min）即可停止电泳。（注：冰浴）

### 2.5.4 转膜

- (1) 准备滤纸和 PVDF 膜，用尺子测量好后剪成所需大小，并剪去一角做标记。
- (2) 把 PVDF 膜放于盛有甲醇的圆形皿中活化 3~5min，然后把准备好的滤纸、PVDF 膜以及切好的胶浸泡于电转液中 5~10min。
- (3) 擦净转膜仪，倒入适量的电转液，按照从下到上的顺序依次叠放滤纸、PVDF 膜、胶、滤纸，注意每放置一层都要用玻璃管把气泡赶尽，此外防止上下两层滤纸接触短路。
- (4) 安装好转膜仪，接通电源，23V，15min/60min（时间根据分子量来设定）。

### 2.5.5 免疫反应

- (1) 封闭：将转好的 PVDF 膜放于 5%的脱脂牛奶中封闭 2~3h。

- (2) 内参/一抗结合：将膜放于一抗封闭液中孵育，4℃过夜。
- (3) 洗膜：将膜放于 TBST 中摇洗 5 次，每次 5~10min。
- (4) 二抗结合：将膜放于二抗封闭液中，室温下在摇床上孵育 1h。
- (5) 洗膜：将膜放于 TBST 中摇洗 5 次，每次 5~10min。

### 2.5.6 显色与曝光

- (1) ECL 显色：进入暗室内先铺好保鲜膜和玻璃板，配好发光试剂 (A:B=1:1)，关灯环境下按照所需大小剪好胶片并做好标记（放抽屉袋子里防止曝光）。打开红灯，取出膜用滤纸吸干多余液体，平铺在玻璃板上，把配好的发光试剂充分涂于膜上，用保鲜膜包好，反应 1min 后关灯观察发光情况。
- (2) 曝光：取出胶片放于发光的膜上（一次放好切勿移位），放于暗盒中根据情况曝光。曝光完成后将胶片迅速浸入显影液中显影，待在红光下可见明显条带时，胶片过水，放于定影液中定影。最后，用自来水冲净定影液，室温下晾干。

## 2.6 MTB 在不同培养条件下生存能力的检测

选取罗氏培养基上生长旺盛的 MTB 标准株 H37Rv 和临床分离株北京/W 系及非北京/W 系菌株，接种到 7H9 液体培养基中（7H9 粉末 0.47g，Tween-80 50  $\mu$ L，丙三醇 200  $\mu$ L，蒸馏水 90ml，121℃ 高压 20min，待冷却后加入 10ml 10ADC 增菌液），于 37℃ 恒温摇床培养 7~10 天。将处于对数生长期的菌悬液调整至相同浊度，取等量菌液接种于以下两种等量的不同培养基中，致终浓度为  $10^6$  CFU/ml。

(1) 低氧培养：将上述培养条件的透气硅胶塞换成不透气的橡胶塞，并以封口膜封口进行低氧培养。(2) 营养饥饿培养：将菌液于 10000r/min 离心 5min，弃去上清用 PBS 洗涤 3 次，重悬浮于 PBS 中培养。在培养的不同时间点（2d, 4d, 7d, 10d）取等量菌液进行一系列 10 倍稀释后接种到罗氏培养基上，37℃ 培养 4 周观察有无生长并进行菌落计数。

## 2.7 MTB 感染巨噬细胞后生存能力的检测

将细胞于 RPMI 1640 培养基中（含有 10% 的胎牛血清），37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养，调整细胞终浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。按照细菌：细胞=107：106 的比例，取处于对数生长期的 MTB 感染巨噬细胞 RAW264.7，于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培

养。4h 后用温热的 RPMI 1640 培养液洗涤 6 孔细胞培养板 2 次，以去除未被巨噬细胞吞噬的细菌，此时作为细菌感染的零时。每孔加入 2ml 的培养液继续培养细胞，分别在不同时间点（0.5d, 1d, 1.5d, 2d, 3d, 5d）去除培养孔内的细胞培养液，每孔加入 250  $\mu$ l 高效 RIPA 裂解液（细胞裂解液：PMSF=100：1）充分混匀裂解 30min。取等量菌液进行一系列 10 倍稀释后接种到罗氏培养基上，37℃ 培养 4 周观察有无生长并进行菌落计数。

## 2.8 统计学分析

结果运用 SPSS17.0 软件进行统计学分析，目的基因 mRNA 和蛋白表达水平在北京/W系和非北京/W系结核分枝杆菌中的比较采用两个独立样本的 t 检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### (Results)

#### 3.1 结核分枝杆菌目的基因测序分析

结核分枝杆菌临床分离株北京/W系与非北京/W系菌株及标准株 H37Rv 的两个目的蛋白 HspX、Hsp65 对应编码基因 *hspX*、*groEL2* 的 PCR 扩增产物进行测序，用 DNAMAN 进行序列比对，结果与标准株同源率为 100%，未检测到基因突变。

#### 3.2 结核分枝杆菌目的基因 mRNA 的表达水平

##### 3.2.1 总 RNA 质量鉴定

结核分枝杆菌总 RNA 电泳图可见三条较为清晰的条带，分别为 23s rRNA、16s rRNA 和 5s rRNA（如图 1）。

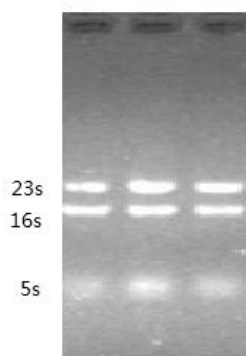


图 1. 结核分枝杆菌总 RNA 电泳图

• Fig1. Electrophoretogram of total RNA in *M. tuberculosis*

##### 3.2.2 荧光定量 PCR 扩增曲线

荧光定量 PCR 检测样本的循环数阈值 (CT) 与荧光信号阈值 (Rn) 的扩增图形呈现典型的 S 形曲线（如图 2）。

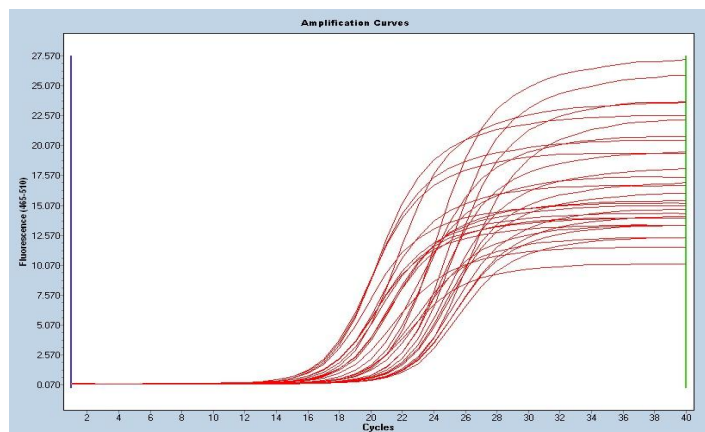


图 2. 实时荧光定量 PCR 扩增曲线  
Fig2. Amplification curve of qRT-PCR

### 3. 2. 3 目的基因 mRNA 水平的相对表达

实时荧光定量 PCR 的结果采用相对定量法  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值比较结核分枝杆菌临床分离株北京/W 系与非北京/W 系菌株不同基因 mRNA 的表达量（见表 6）。校正结果以非北京/W 系菌株 mRNA 的表达量为 1，北京/W 系菌株与之比较（见图 3）。结果显示北京/W 系菌株 HspX、Hsp65 对应的编码基因 *HspX*、*groEL2* mRNA 的表达水平与非北京/W 系菌株相比，差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 6 结核分枝杆菌 mRNA 的表达量  
Table 6 The mRNA expression level in MTB

菌株	表达量 ( $\bar{X} \pm S$ )	
	<i>hspX</i>	<i>groEL2</i>
北京/W 系	0.67 ± 0.18	1.10 ± 0.35
非北京/W 系	0.59 ± 0.20	1.01 ± 0.37
北京/W 系与非北京/W 系菌株比较	t= 1.60 ( $P > 0.05$ )	t= 1.01 ( $P > 0.05$ )

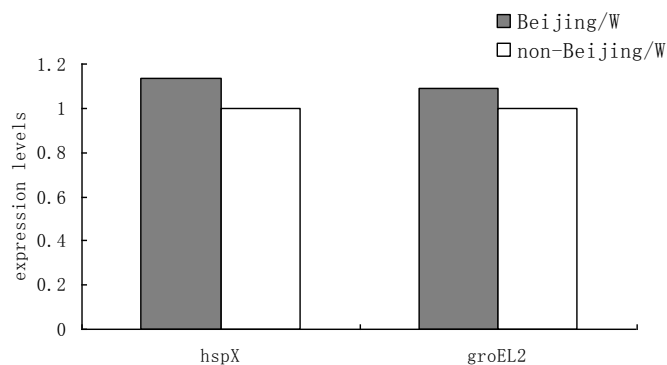


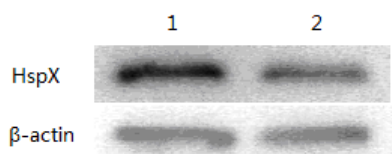
图3 北京/W系和非北京/W系 MTB mRNA 的相对表达水平

Fig3. The mRNA relative expression level in Beijing/W lineage and non-Beijing/W lineage of MTB

### 3.3 结核分枝杆菌目的蛋白的表达水平

细菌感染 RAW264.7 巨噬细胞 24h 后,应用 Western-blot 技术检测结核分枝杆菌临床分离株北京/W系与非北京/W系菌株目的蛋白 HspX、Hsp65 的表达水平。结果用 Quantity One 软件分析条带灰度值,以目的条带的灰度值和对应样本  $\beta$ -actin 的灰度值的比值代表蛋白的相对表达量(见图 4-6,表 7)。

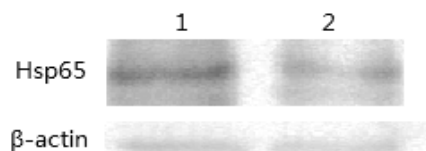
结果显示细菌感染细胞 24h 后,北京/W系菌株 HspX、Hsp65 的表达水平高于非北京/W系菌株,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: 1: 北京/W系 MTB; 2: 非北京/W系 MTB

图4 HspX 蛋白表达的 Western blot 分析

Fig4. HspX protein expression by Western blot analysis



注：1：北京/W系 MTB；2：非北京/W系 MTB

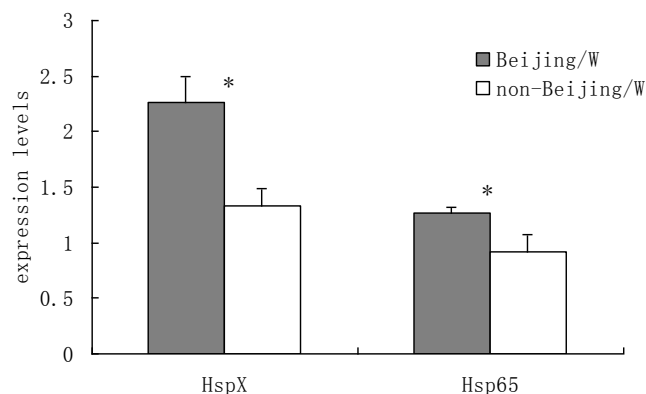
图 5 Hsp65 蛋白表达的 Western blot 分析

Fig5. Hsp65 protein expression by Western blot analysis

表 7 结核分枝杆菌蛋白的表达量

Table7 The protein expression level in MTB

菌株	表达量 ( $\bar{X} \pm S$ )	
	hspX	Hsp65
北京/W系	2.26 ± 0.23	1.27 ± 0.05
非北京/W系	1.33 ± 0.16	0.92 ± 0.15
北京/W系与非北京/W系菌株比较	t= 32.09 ( $P < 0.05$ )	t= 11.23 ( $P < 0.05$ )



注：\*表示北京/W系与非北京/W系结核分枝杆菌比较差异显著 ( $P < 0.05$ )

图 6 北京/W系和非北京/W系 MTB 蛋白表达水平的比较

Fig6. Comparison of expression level of the protein in Beijing/W lineage and non-Beijing/W lineage of MTB

### 3.4 MTB 在不同培养条件下的生长情况

两种不同的培养条件下，观察比较在不同时间点（2d，4d，7d，10d）北京/W系与非北京/W系的活菌数（见表8）。结果显示，北京/W系与非北京/W系菌株的生长差异没有统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

表8 不同培养条件不同培养时间结核分枝杆菌的活菌数

Table8 The numbers of living bacterium at different incubation time in varies culture condition

培养 天数	活菌数对数值（Log <sub>10</sub> CFU/ml）			
	低氧培养		营养缺乏	
	北京 /W系	非北京/W系	北京 /W系	非北京/W系
2d	6.89±0.35	6.89±0.18	5.43±0.07	5.39±0.07
4d	7.03±0.59	7.05±0.27	5.38±0.05	5.26±0.16
7d	6.98±0.27	6.81±0.39	5.07±0.10	5.07±0.10
10d	6.84±0.52	6.64±0.64	5.03±0.06	4.84±0.08

### 3.5 MTB 感染巨噬细胞后的生存能力

观察比较北京/W系与非北京/W系菌株感染巨噬细胞后的生存能力（Log<sub>10</sub>CFU/孔，见图7）。结果显示，随着时间的延长，在细菌感染细胞后2d、3d、5d，北京/W系菌株的菌量显著多于非北京/W系菌株（ $P < 0.05$ ）。

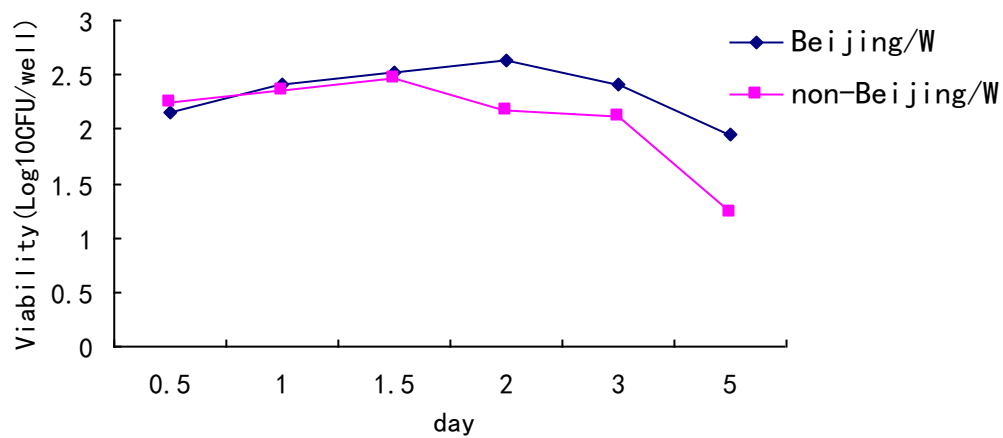


图 7 结核分枝杆菌在感染巨噬细胞后的生存能力 (Log10CFU/孔)

Fig7. Viability of MTB in the macrophages

## 讨 论

### (Discussions)

#### 4.1 结核病流行现状

结核病是一种由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的古老的慢性感染性疾病, 可侵犯全身多个器官系统, 对人类的健康构成很大的威胁。近年来, 由于耐药结核菌的增加、MTB 和 HIV 病毒的合并感染者增多、卡介苗效果的不确定性以及全球性的人口流动等因素导致结核病的流行呈抬头趋势, 再次成为了严重的公共卫生问题和重大的社会经济问题。结核病是仅次于艾滋病的全球第二大传染性疾病, 全球约有 1/3 的人口曾感染过结核菌, 平均每年新增患者约有 800 万, 并且年死亡人数近 300 万, 死亡率之高不容忽视。更为棘手的问题是结核菌日趋严重的耐药性, 自从抗结核药物开始使用, 有关结核菌耐药的报道便陆续出现, 直到上世纪 90 年代结核病的死灰复燃, 耐药现象才开始引起人们越来越多的关注。如今, 耐药结核病已成为全球结核病防控工作的重大挑战。

中国是全球 22 个结核病高负担国家之一<sup>[21]</sup>, 据世界卫生组织调查报告显示, 2010 年中国结核病发病人数达 100 万, 占全球年发病人数 (880 万) 的 11%, 位居世界第二位<sup>[1]</sup>。此外, 中国还是全球 27 个耐多药结核病重点流行国家之一。2001~2008 年全国结核病耐药基线调查结果显示, 结核菌耐多药率为 8.32%, 其中初治患者耐多药率达 5.71%, 均高于全球平均水平 (5.3% 和 2.9%)<sup>[22]</sup>。全国第五次结核病流行病学抽样调查结果显示, 我国结核病疫情存在显著的地域性差异, 西部地区的患病率和耐药率均高于中部和东部地区, 其中新疆地区又居全国之首。所以, 结核病的预防和控制迫在眉睫。

#### 4.2 新疆结核病疫情状况

新疆地区结核病疫情状况严重, 肺结核年发病患者近 5 万人次, 始终居于甲乙类传染病的前列。新疆地区活动性肺结核患病率、痰涂阳肺结核患病率及菌阳性肺结核患病率分别是全国平均水平的 3.3 倍、3 倍和 3.6 倍。由此推测, 目前新疆地区的结核病现患人数高达约 26 万例, 具有传染性的肺结核患者约 7 万例, 主要集中在和田地区、喀什地区、阿克苏地区及克孜勒苏柯尔克孜自治州等南疆地区<sup>[23]</sup>。近年来随着耐药结核菌的增加、MTB 和 HIV 病毒的合并感染者增多, 新疆地区结核病疫情不容忽视。WHO 新疆结核病耐药监测报告显示新疆耐药总率

为 26.4%，初始耐药率即从未用过抗结核药物或抗结核治疗小于 1 个月的病人的耐药情况为 25.9%，获得性耐药率即曾经接受过 1 个月以上的抗结核药物治疗的病人的耐药情况为 30.7%，耐多药率即结核分支杆菌至少对异烟肼、利福平两种及两种以上抗结核药物耐药为 4.6%<sup>[24]</sup>。新疆是一个多民族聚集的地区，其中以汉族和维吾尔族为主，北疆的汉族人口占全疆汉族总人口的 73.29%，南疆维吾尔族人口占全疆维吾尔族总人口的 88.15%<sup>[25]</sup>。新疆南疆地区的结核病疫情较北疆严重，有调查报告显示南疆地区的活动性肺结核患病率、痰涂阳肺结核患病率及菌阳性肺结核患病率均明显高于北疆地区，分别是北疆地区的 2.9、2.2 和 2.5 倍<sup>[26]</sup>。因此，新疆地区结核病疫情的监测和防控工作十分艰巨。

### 4.3 结核分支杆菌北京/W系家族分子特征

结核分枝杆菌北京/W系菌株是于 1995 年由 Van soelingen 等在中国北京地区首次分离发现而得名的<sup>[27]</sup>。北京/W系结核分枝杆菌是 MTB 的一个独特遗传谱系，具有相同的基因标记，即高度相似的 IS6110 限制片段长度多态性 (IS6110 RFLP)<sup>[28]</sup>和间隔寡核苷酸分型 (spoligotyping) 的特征。

目前，对北京/W系结核分枝杆菌的识别是通过其分子流行病学特征。分子流行病学是从分子和基因水平研究疾病的病因和致病机制，以为疾病的防治提供策略。分子分型技术是分子流行病学的核心技术，目前已广泛应用于结核病的基因分型研究中，可预测结核病的暴发流行及传播方式，此外还可用于研究结核分枝杆菌的遗传进化关系。结核分枝杆菌基因组具有高度保守性，但同时其基因组还存在着一定的多态性区域且这些区域与插入片段或重复序列相关，因此该特性成为了当今结核病基因分型研究的基础。20世纪90年代以来，随着分子分型技术的广泛应用，人们对MTB有了更加深入的了解。最常用的TB基因分型技术有 Spoligotyping、IS6110 RFLP、单核苷酸多态性(SNP)、可变数目串联重复(VNTR)、多态富含GC的重复序列(PGRS)等。借助这些分子技术，学者们将一大群遗传上相关的MTB菌株包括W4、W14、W82、W148、菌株210、纽约W株、北京菌株等统称为北京/W系家族菌株<sup>[29]</sup>。

Spoligotyping 是一种基因分型技术，该方法以结核分枝杆菌特有的重复序列多态性为基础，这些重复序列被大小不同的间隔序列所分离，特异性扩增这些间隔序列，与最后 9 个间隔寡核苷酸序列 (间隔序列 35~43) 均杂交的菌株被定义为北京/W系结核分枝杆菌<sup>[30]</sup>。该方法是鉴定北京/W系菌株的金标准，但实验步骤复杂、结果分析繁重，故需要一种简便、快速的检测方法。2005 年，Tsolaki AG 等将北京/W系结核分枝杆菌菌株杂交，比较整个基因组发现了 21 个长基因序列多态性位点 (Large Sequence Polymorphisms, LSPs)。其中 RD105 是结核分枝杆菌基因组中的一段缺失序列，在其研究的所有北京/W系菌株中都发现了这

段缺失序列，并提出 RD105 可作为识别北京/W 系菌株的分子标识物<sup>[31]</sup>。此外，依据另外四个缺失大片段 RD142、RD150、RD181 和 RD207 可将全球北京/W 系菌株进一步划分为表现型各异的 4 个亚型。对结核分枝杆菌北京/W 系家族的识别促进了对其流行播散特点的深入研究。

#### 4.4 结核分枝杆菌北京/W 系家族的分布

北京/W 系结核分枝杆菌在全球广泛分布，并造成多次爆发流行，是世界第二大流行的 MTB，现已达到全球结核分枝杆菌分离菌株的 13%<sup>[32]</sup>，全世界约有 1/3 的结核病由该型菌株导致，主要分布于亚洲和前苏联，尤其是在中国、俄罗斯、日本和东南亚等地区<sup>[33,34]</sup>。在中国、香港和日本神户地区，该菌株的比例分别占 86%、70%、77%。在台湾、越南、俄国和南韩地区，北京/W 系结核分枝杆菌的比例也分别达到 44.4%、54%、44.5% 和 43%，且与多耐药密切相关<sup>[35]</sup>。北京/W 系结核分枝杆菌在全球其他地区也有流行：在南美洲小于 2%，在中美洲、欧洲、非洲为 3%–5%，中东达 10%，大洋州为 13%，北美洲为 16%<sup>[36]</sup>。

我国北京/W 系结核分枝杆菌分布调查结果显示，该型菌株在我国北方占有绝对优势，在北京地区甚至可高达 90%，在其他地方也有不同程度的流行，天津市 91.5%，黑龙江 89.5%，山东 85.35%，甘肃 87.56%，宁夏 67%，上海市 89%，江苏省 80.4%，浙江省 70%，广西省 55.3%，福建 54.50%<sup>[37]</sup>。在结核疫情高发的新疆，北京/W 系 MTB 菌株所占比例为 65.36%，呈主要流行株<sup>[38]</sup>。本课题组前期采用 RD105 缺失基因检测法，对 2008~2012 年在新疆多地获得的上百株 MTB 临床分离株进行基因分型鉴定，结果显示北京/W 系结核分枝杆菌在南疆地区为非主要流行株，在北疆地区为主要流行菌株。因此，北京/W 系菌株的研究已成为结核分枝杆菌相关研究的热点之一。

#### 4.5 结核分枝杆菌北京/W 系家族的优势

北京/W 系结核分枝杆菌被认为具有一定的选择性优势，该家族菌株可适应人体免疫并引发疾病。欧洲、南北美洲和南非地区北京/W 系菌株的流行可能是 20 世纪人类大迁徙的结果<sup>[39]</sup>，亚洲大陆和美国不同地区的患者均可见北京/W 系菌株的成簇和传播，由此推测北京/W 系菌株具有致病的遗传学优势。结核分枝杆菌的传播与抗结核的两大措施包括卡介苗的接种及抗结核药物治疗有一定的相关性<sup>[40]</sup>。长期以来，卡介苗的接种被认为可能是北京/W 系结核分枝杆菌成功传播的一个优势。有研究表明，26% 的北京/W 系 MTB 患者有卡介苗接种史<sup>[41]</sup>，在北京/W 系结核分枝杆菌感染患者中，接种过卡介苗的患者比在感染其他菌株的患者中数量较多。与其他菌株感染的患者相比，接种卡介苗对北京/W 系菌株感

染患者的保护力较弱,结核抗体的治疗效果较差<sup>[42-44]</sup>。接种卡介苗可能促进了北京/W系菌株的传播,但尚需经流行病学调查和实验研究加以证实。另有观点认为,北京/W系菌株传播的优势源于其对抗结核药物的敏感性降低,该家族菌株可能具有较强的获得耐药性的能力,但由于资料有限,许多研究可能存在的偏性,目前尚难证实北京/W系家族菌株的广泛传播与耐药性有必然联系<sup>[45]</sup>。有遗传学相关研究显示,北京/W系结核分枝杆菌有克隆扩张的特性<sup>[46]</sup>。因此有学者猜测北京/W系菌株具有克隆扩张的选择性优势,可能是导致北京/W系家族菌株迅速增长的高耐药性突变的原因<sup>[47]</sup>。

北京/W系结核分枝杆菌被认为是一类传播速度更快、致病性更强、更容易形成耐药的菌株。北京/W系家族菌株已在世界范围内造成大规模的发病和死亡<sup>[48-50]</sup>,以医院和机构爆发、社区传播为流行特征,敏感菌株和耐药菌株均可传播。有调查报告显示,1992年至1999年间纽约的全部病例中44%的方便样本中含有26例北京/W系家族的一个独特群<sup>[51]</sup>。俄罗斯联邦全境各地的2100株MTB的方便样本中北京/W系菌株占45%。研究显示,北京/W系MTB的传播率为28.3%,明显高于非北京/W系菌株的传播率14.9%,表明北京/W系结核分枝杆菌较非北京/W系家族菌株具有更强的传播性<sup>[52]</sup>。北京/W系菌株210较CDC1551及其他临床分离株在巨噬细胞内的繁殖速度更快<sup>[53]</sup>。与感染H37Rv的小鼠相比,感染北京/W系菌株的小鼠更易引起广泛的肺炎,且死亡率明显增高<sup>[54]</sup>。北京/W系菌株诱导巨噬细胞凋亡的能力较H37Rv减低,且更多诱导的是表达抗凋亡分子bc1-2的含空泡的巨噬细胞<sup>[55]</sup>。比较北京/W系菌株在多药耐药菌株与敏感菌株中所占的比例发现,此类菌株与多药耐药有一定的相关性<sup>[56]</sup>。综上研究可见,北京/W系结核分枝杆菌具有更强的持留性、更高的毒力和更易引起非保护性免疫及逃避宿主免疫的能力。

北京/W系家族菌株分子表达的改变是导致其具有较强生存能力的重要因素。有研究发现北京/W系菌株在Rv3908、mutT2和ogt三种DNA突变修复基因上存在独特的错义突变,这些突变可能会增加细菌突变频率,其中mutT2可以减缓处于不利条件下MTB的新陈代谢率,部分解释了北京/W系结核分枝杆菌快速适应环境的能力<sup>[57]</sup>。北京/W系菌株中有一个与酚糖脂的生物合成相关的基因pks15/1,这种酚糖脂是MTB的一种毒力因子,Tsenova等人发现感染了北京/W系菌株的兔子其细菌更易从肺部扩散至脑脊液中,而脑脊液中菌量的增高与酚糖脂有一定的关系<sup>[58]</sup>。此外,体外有氧培养中发现北京/W系菌株中积累了大量的三酰甘油,一种DOSR休眠调节子Rv3130c表达增高,该调节子的上调可能使北京/W系家族菌株在低氧或无氧条件下具有较强的选择优势<sup>[59]</sup>。蛋白质组学研究表明,北京/W系菌株与其他临床分离株和H37Rv相比存在差异表达蛋白,如在北京/W系菌株中16kDa热休克蛋白呈高表达<sup>[60]</sup>,而65kDa热休克蛋白、磷酸盐转运蛋白PstS1和47kDa蛋白的表达降低<sup>[61]</sup>。其中16kDa热休克蛋白是结核分枝杆菌的一种毒力因子,65kDa热休克蛋白是一种免疫保护性蛋白,PstS1是一种

38kDa 的特异性磷酸脂蛋白, 是 T、B 淋巴细胞的刺激分子。综上所述, 北京/W系菌株分子表达的改变有助于增加细菌毒力或抑制宿主免疫保护机制, 以利于细菌的播散蔓延。

#### 4.6 结核分枝杆菌 HspX

HspX 又称  $\alpha$  晶体蛋白, 是由结核分枝杆菌的 *hspX* 基因编码的, 最初被认为是免疫显性抗原, 后来被确认为是一种重要的膜抗原, 它的表达与结核分枝杆菌的持留状态密切相关。结核分枝杆菌的持留性是指 MTB 于逆境下保持稳定和对环境无反应的特性, 是导致结核潜伏感染的根本原因<sup>[62]</sup>。因此, 全球约有 1/3 的人口存在 MTB 的潜在感染, 但只有 5%~10% 的感染者会最终发病。此外, MTB 的持留性也是导致结核病病程迁延和复发的重要原因, 而病程的迁延又增加了 MTB 产生耐药的机会, 故二者在某种程度上相辅相成。结核菌的持留性和耐药性也成为了结核病的流行防控和临床疗效面临的两大难题。当 MTB 处于不利环境时, 如低氧、饥饿、弱酸、热休克、药物处理、免疫杀伤等条件下, 它可以通过改变自身的发育状态和代谢途径, 以逃避免疫系统的识别和清除, 不断适应环境的变化而生存下来。如在不良条件下, 细菌在宿主体内以非增值方式存在, 保持其在组织内的稳定性而不易被清除。同时, 进入持留态的细菌对药物作用的敏感性降低<sup>[64]</sup>。对其生存机制的探究发现, MTB 为了适应胞内低氧和营养饥饿的环境, 关闭了氧呼吸代谢而启动乙醛酸代谢支路获取能量, 异柠檬酸酶是这一循环中的关键酶, 对 MTB 的持留性有着决定性的作用<sup>[63]</sup>。持留态结核分枝杆菌的一个重要标志就是热休克蛋白 HspX 的高度表达<sup>[64]</sup>。

HspX 具有分子伴侣的活性, 与 MTB 的持续感染有关, 是 MTB 在宿主巨噬细胞内存活所必需的一种膜抗原。有基因敲除实验表明, 如果没有 HspX 的表达, MTB 突变菌株与自然生长情况相同, 但是在骨髓衍生的巨噬细胞及人白血病巨噬细胞系 THP-1 中都将难以生存<sup>[65]</sup>, 说明 HspX 对于 MTB 的正常生长并不是必须的, 但是对于其与宿主免疫系统的斗争却是不可或缺的。在结核分枝杆菌潜伏期 HspX 大量表达积累, 成为休眠菌表达的主要蛋白质, 其对结核分枝杆菌的生存力和稳定性发挥着重要的调节作用, 这主要与其分子伴侣、抗凋亡和细胞骨架稳定等热休克蛋白的功能相关。此外该蛋白作为分子伴侣还可避免其他蛋白因热诱导而降解, 可能在 MTB 长期持留中起稳定细胞壁结构的作用, 与 MTB 缓慢生长有关<sup>[66, 67]</sup>。当 MTB 被巨噬细胞吞噬后, HspX 的表达活性可增至原来的 80 倍<sup>[68]</sup>, 它可抑制自噬体的形成<sup>[69]</sup>而利于细菌在巨噬细胞内的生存和生长。在低氧或缺氧环境下, HspX 有助于 MTB 诱导巨噬细胞胞质内脂滴的大量积累, 创造对其有益的生存环境, 还可利用宿主巨噬细胞内的三酰基甘油转化合成自身的脂质体<sup>[70]</sup>, 使 MTB 的细胞壁增厚, 稳定细胞结构, 以抵抗免疫因子及药物的杀伤

作用。HspX 上的甲硫酰胺残基能发生可逆的磺化氧化和去磺化氧化作用，可清除存在于巨噬细胞中的活性氧和活性氮，以保护 MTB 的自身成分不受损伤<sup>[71]</sup>。HspX 的过表达能使细菌的生存时间延长，说明 HspX 的有效表达可以提高 MTB 的生存能力<sup>[72]</sup>。此外，HspX 还被认为是一种毒力相关蛋白<sup>[73, 74]</sup>。

本研究结果显示，在正常生长状态下即细菌感染细胞前，北京/W系与非北京/W系结核分枝杆菌 HspX 基因水平和 mRNA 水平的表达没有差异，但在感染巨噬细胞 24h 后，HspX 蛋白在北京/W系菌株中的表达较非北京/W系菌株中明显升高。推测可能是因为热休克蛋白高度保守，在自然生理环境下表达水平较低，而在细菌进入巨噬细胞系统后处于应激状态，HspX 被大量诱导表达，发挥重要的作用。HspX 的高表达有助于北京/W系结核分枝杆菌在宿主体内生存和生长，赋予其更高的毒力和更强的抵抗力，有利于北京/W系菌株的广泛播散蔓延。

#### 4.7 结核分枝杆菌 Hsp65

Hsp65 是 Hsp60 家族成员之一，由 *gorEL2* 基因编码的分泌蛋白，定位于结核分枝杆菌的细胞壁上。有文献报道，大约有 20 多种感染性疾病能够被热休克蛋白诱发免疫反应，其中以 Hsp60 家族最多见。在结核病免疫反应中，Hsp65 较其他热休克蛋白具有更高的保守性。该蛋白具有很强的免疫原性，在结核分枝杆菌处于应激状态过程中，可产生大量的 Hsp65 和 Hsp70，它们具有较多的细胞表位，是宿主机体免疫识别的重要胞内抗原，用它们免疫小鼠均可诱导特异的细胞免疫应答。Hsp65 是机体对抗细菌入侵的重要的免疫保护性抗原，在结核分枝杆菌感染的小鼠体内，约有 20% 的反应性 T 细胞能够识别 Hsp65<sup>[75]</sup>。研究发现在结核病患者血清中存在结核分枝杆菌 Hsp65 抗体，约占抗体总量的 20%~40%。有学者采用 Hsp65 基因做真核表达，构建 pchsp65 于 HeLa 细胞中表达，免疫小鼠后能够检测出存在特异性的 IgG，充分表明 Hsp65 具备良好的抗原性<sup>[76]</sup>。Lowrie 等用含有 Hsp65 基因的质粒肌注免疫 BALB/c 小鼠后发现小鼠抵抗结核菌入侵的能力增强<sup>[77, 78]</sup>。Bonato 等用含有 Hsp65 基因的质粒肌注免疫 BALB/c 小鼠后发现小鼠脾 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞产生较高的 IFN- $\gamma$ ，提供了较强的保护力<sup>[79]</sup>。居巍等发现经含有 Hsp65 基因的质粒肌注免疫过的小鼠可产生特异性的抗体，当遭遇结核分枝杆菌的入侵时具备较强的抵抗力和较高的存活力<sup>[75]</sup>。

在免疫效应方面，Hsp65 DNA 疫苗可刺激机体产生 IL-2 和 IFN- $\gamma$  免疫因子<sup>[80]</sup>。将 Hsp65 DNA 疫苗接种到感染了结核分枝杆菌的小鼠体内，发现机体内的残留菌量减少，提示 Hsp65 可用于防治性疫苗的制备<sup>[81]</sup>。Hsp65 DNA 疫苗可诱导产生大量的 IFN- $\gamma$ ，促进 T 细胞向 CD8<sup>+</sup>T 细胞转化<sup>[82]</sup>。Hsp65 可促进 T 细胞免疫应答以控制结核菌的感染，它可直接活化单核细胞促进 TNF、IL-6、IL-8 的产生，这

些细胞因子在特异性 T 细胞介导的宿主免疫过程中有着重要的作用<sup>[83]</sup>。在结核患者外周血单个核细胞内发现 Hsp65 亦发生增殖反应, IFN- $\gamma$  呈高表达<sup>[84]</sup>。Hsp65 的免疫特性除了它的抗原性之外, 还因为它同时具有佐剂的特性。它可以通过 TLR 刺激树突状细胞进而促进细胞毒性 T 细胞的增值分化。它也可以通过 TLR 的非依赖途径刺激抗原交叉呈递, 并且作为一个伴侣蛋白, 通过热休克蛋白受体促进非相关性抗原的摄取和提呈。此外, 质粒表达的内源性 Hsp65 蛋白大部分以可溶的形式存在, 而可溶性蛋白能够明显增强抗原通过 MHC-I 类或 MHC-II 类途径的呈递, 这有利于 Hsp65 蛋白抗原特性的发挥。Hsp65 还能诱导某些非特异性免疫细胞的产生。

本研究结果显示, 在正常生长状态下即细菌感染细胞前, 北京/W 系与非北京/W 系结核分枝杆菌 Hsp65 基因水平和 mRNA 水平的表达没有差异, 但在感染巨噬细胞 24h 后, 北京/W 系菌株中 Hsp65 蛋白的表达量高于非北京/W 系菌株。对机体具有较强免疫保护作用的 Hsp65 在细菌感染细胞 24h 后在北京/W 系菌株中呈高表达, 其具体作用机制有待进一步研究。

## 4.8 展望

北京/W 系结核分枝杆菌的流行在抗结核药物治疗和疫苗接种很早之前就已经开始了, 在全球流行的四种遗传背景各异的菌株中发现, 北京/W 系家族菌株毒力最强, 并且能在一定程度上对宿主的免疫反应起到抑制作用, 提示该家族菌株可能存在内在生物学优势, 分子表达的改变是导致其高毒力和机体免疫抑制的重要因素<sup>[85]</sup>, 有助于其适应外界环境以更好的生存。

多项研究表明北京/W 系结核分枝杆菌于全球广泛分布, 曾多次引起暴发流行并且耐药情况严重, 是目前结核病研究的热点问题之一。国内研究也显示北京/W 系 MTB 为我国主要流行菌株, 部分地区甚至高达 90% 以上。结核分枝杆菌北京/W 系菌株的进化、流行与其分子表达的改变密切相关, 内在生物学优势赋予其广泛播散的能力、更高的毒力和更强的抵抗性。因此, 从分子水平对北京/W 系家族菌株进行研究, 发现其差异表达的分子, 揭示其在人群中的传播性、致病机制、与耐药的相关性以及寻找适当的药物靶标及治疗性疫苗靶点等都是未来我们需要努力的方向。

## 结 论

### (Conclusions)

1. 在结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的过程中，北京/W 系菌株中的 HspX、Hsp65 表达水平高于非北京/W 系菌株。
2. 结核分枝杆菌感染巨噬细胞后，北京/W 系菌株较非北京/W 系菌株具有较强的生存能力。

## 参考文献

### (Reference)

- [1] WHO. Global Tuberculosis Control Report [R] . Geneva: World Health Organization, 2011.
- [2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 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, 34(8):485-508.
- [3] 《全国结核病防治规划(2011-2015年)》. 中老年保健, 2012, 2:4-5.
- [4] Li WM , Wang SW, Li CY, et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in China: a nationwide random survey in 2000[ J ] . J Tuberc Lung Dis , 2005, 9( 12) : 1314- 9.
- [5] van Soolingen D, Qian L, de Haas PE et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of East Asia[ J ] . J Clin Microbiol. 1995, 33: 3234- 8
- [6] Brudey k, Driscoll JR, Rigouts L, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database(SpolDB4)for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol, 2006, 6: 23.
- [7] 贾卫, 吴卫东, 张伟. WHO新疆结核病耐药监测报告[J]. 中国防痨杂志, 2008, 30(4): 307-310.
- [8] 綦迎成, 刘洁, 鱼栓民, 等. 新疆结核分枝杆菌临床分离株Spoligotyping基因型的初步研究[J]. 疾病监测, 2010, 25(12):951-954.
- [9] 李君莲, 刘洁, 鱼栓民, 等. 新疆结核分枝杆菌临床分离株VNTR 基因型的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(12):1105-1109.
- [10] 吴长东, 米利古, 龚天美, 等. RD105 缺失基因检测法用于结核分枝杆菌新疆北京家族临床分离株的鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(3):161-167.
- [11] 张娟, 米利古, 王远志, 等. VNTR及RD105缺失检测法对新疆石河子市汉族MTB基因分型及其耐药的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2012, 30(2):220-224.
- [12] 黄艺, 张树青, 米利古, 等. 新疆北疆地区北京/W系结核分枝杆菌临床分离株的流行特征及耐药相关性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3): 212-6.
- [13] Pheiffer C, Betts JC, Flynn HR, et al. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv[J]. Microbiology, 2005, 151(4): 1139-50.
- [14] Geluk A, Lin M Y, van Meijgaarden K E, et al. T-cell recognition of the HspX

- protein of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with latent *M. tuberculosis* infection but not with *M. bovis* BCG vaccination. *Infect Immun*, 2007, 75: 2914—2921.
- [15] Lin M Y, Ottenhoff T H. Not to wake a sleeping giant: new insights into host-pathogen interactions identify new targets for vaccination against latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Biol Chem*, 2008, 389: 497—511.
- [16] Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Bacteriol*, 1987, 169(3): 1080-1088.
- [17] Lowrie DB, Silva CL. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine*, 2000(18):1712-1716.
- [18] 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(1):28-31; 1996, 18(2):80-85; 1996, 18(3):127-134.
- [19] Huard RC, Lazzarni C, Butler WR, et al. PCR based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1637-1650.
- [20] Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Clin Microbiol* 2005, 43(7): 3185-3191.
- [21] Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC . Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project [ J ] . *JAM A*, 1999, 282( 7 ) : 677- 686.
- [22] 肖东楼. 全国结核病耐药性基线调查报告(2001—2008) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [23] 新疆维吾尔自治区结核病防治规划 (2011-2015年) .  
<http://wenku.baidu.com/view/8f3402ea4afe04a1b071de7a.html>.
- [24] 贾卫, 吴卫东, 张伟, 等. WHO 新疆结核病耐药监测报告[J], 中国防痨杂志, 2008,30 (4): 307-310.
- [25] 童玉芬, 李建新. 新疆各民族人口的空间分布格局及变动研究[J]. 西北民族研究, 2001 (3): 11-20.
- [26] 金鑫, 范新春, 闫化奎, 等. 新疆维吾尔自治区第四次结核病流行病学抽样调查报告. 中国防痨杂志, 2004, 26 (5): 264-267.
- [27] van Soolingen D, Qian L, de Haas PE et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia[ J ] . *J Clin Microbiol*. 1995, 33: 3234- 8
- [28] Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a

- standardized methodology[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(2):406-409.
- [29] 杨本付,徐庵. 结核分枝杆菌W-北京家族菌株研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(2):178-180.
- [30] Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other Mycobacterium infections: main methodologies and achievements[J]. *J Intern Med*, 2001, 249: 1-26.
- [31] Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of Mycobacterium tuberculosis[J]. *J Clin Microbiol* 2005, 43(7):3185-3191.
- [32] Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 2006, 6: 23.
- [33] Li WM, Wang SM, Li CY, et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in China: a nationwide random survey in 2000[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9(12): 1314-1319.
- [34] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains[J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10(1):45-52.
- [35] 孙蕾,杨立军,郑锦辉,等. 北京基因型结核分枝杆菌的研究[J]. 2008, 30(3): 224-225.
- [36] 单万水,单金岚,李芳芳,等. 线性探针分析法检测结核分枝杆菌rpoB耐药基因突变的研究[J]. *中华检验医学*, 2005, 25(1):82-88.
- [37] Liu Q, Yang D, Xu W, et al. Molecular typing of mycobacterium tuberculosis isolates circulating in Jiangsu Province, China[J]. *Bmc Infect Dis*, 2011, 11:288.
- [38] 赵秀芹,董海燕,刘志广,等. 中国部分地区MTB北京基因型菌株分布初步分析[J]. *实用预防医学*, 2012, 19(5): 662-4.
- [39] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains. *Trends in Microbiology*, 2002;10:45-52.
- [40] Dvan S, Kremer K, Borgdorff M. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype, Thailand-reply to Dr Prodinger[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(4), 763-764.
- [41] van Crevel R, Nelwan RHH, de Lenne W, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(5), 880-883.
- [42] Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes[J].

- Clin Exp Immunol, 2003, 133(1), 30-37.
- [43] Tsenova L, Harbacheuski R, Sung N, et al. BCG vaccination confers poor protection against *M. tuberculosis* HN878-induced central nervous system disease[J]. Vaccine, 2007, 25(28), 5126-5132.
- [44] Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, et al. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex[J]. PloS Pathog, 2008, 4(9): e1000160.
- [45] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis, 2002, 8:843-849.
- [46] Smith NH, Dale J, Inwald J, et al. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100(25): 15271-15275.
- [47] Rad ME, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in Putative Mutator Genes of *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the W-Beijing Family[J]. Emerg. Infect. Dis, 2003, 9(7):838-845.
- [48] Agerton TB, Valway SE, Blinkhom RJ, et al. Spread of strain W, a highly drug resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* across the United States. Clin Infect Dis, 1999, 29: 85-92.
- [49] van Rie A, Warren RM, Beyers N, et al. Transmission of a multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain resembling 'strain W' among noninstitutionalized, human immunodeficiency virus-seronegative patients. J Infect Dis, 1999, 180:1608-1615.
- [50] Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. JAMA, 1996;276:1229-1235.
- [51] Bifani P, Mathema B, Campo M, et al. Molecular identification of streptomycin monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* related to multidrug-resistant W strain. Emerg Infect Dis, 2001, 7:842-848.
- [52] Nieoletta Lari, Laura Rindi, Daniela Bonanni, et al. Three-Year Longitudinal Study of Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Tuseany, Italy[J]. J clin Microbiol, 2007, 45(6):1851-1857.
- [53] Zhang, M., et al., Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. J Infect Dis, 1999. 179(5): p. 1213-7.
- [54] Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes

- [ J ] . Clin Exp Immunol, 2003, 133: 30- 7.
- [55] Rios-Barrera VA, Campos-Pena V, Aguilar-Leon D et al. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis : their relationship to mycobacterial virulence [ J ] . Eur J Immunol, 2006, 36: 345- 53.
- [56] Park YK, Shin S , Ryu S, et al. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non- Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Korea [ J ] . J Microbiol Methods , 2005, 63( 2 ) : 165- 72.
- [57] Rad ME, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family. Emerg Infect Dis, 2003, 9:838-845.
- [58] Tsenova L, Ellison R, Harbacheuski, et al. Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli[J]. J Infect Dis, 2005, 192:98-106.
- [59] Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, et al. The W-Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated[J]. J Bacteriol, 2007, 189(7):2583-2589.
- [60] Monahan IM , Betts J , Banerjee DR, Butcher PD. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages[ J ] . Microbiology, 2001, 147: 459- 471.
- [61] Stewart GR, Snewin VA, Walzl G, et al. Overexpression of heatshock proteins reduces survival of Mycobacterium tuberculosis in the chronic phase of infection[ J ] . Nat Med, 2001, 7: 732- 737.
- [62] Gomez JE, McKinney JD. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. Tuberculosis ( Edinb ) , 2004, 84: 29-44.
- [63] McKinney JD, Honer Zu, Bentrup K, et al. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. Nature, 2000, 406: 735-738.
- [64] Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton  $\alpha$ -crystallin homolog [J] . J Bacteriol, 1998, 180(4): 801-808.
- [65] Fu X, Zhang H, Zhang X, et al. A dual role for the N-terminal region of Mycobacterium tuberculosis Hsp16.3 in self-oligomerization and binding denaturing substrate proteins[J]. J Biol Chem, 2005, 80(8): 6337-6348.
- [66] 师长宏, 江鹰, 赵勇, 等. 结核分枝杆菌 Hsp16.3 蛋白影响小鼠巨噬细胞自噬形成的实验研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(12):

1301-1303.

- [67] Daniel J, Maamar H, Deb C, et al. Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PloS Pathog*, 2011, 7(6): e1002093.
- [68] Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG, et al. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(2): 861-868.
- [69] Shi CH, Jiang Y, Zhao Y, et al. Effects of Mycobacterium tuberculosis Hsp16.3 protein on the autophagy function of mice macrophages. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2011, 27(12): 1301-1303.
- [70] Daniel J, Maamar H, Deb C, et al. Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PloS Pathog*, 2011, 7(6): e1002093.
- [71] Abulimiti A, Qiu X, Chen J, et al. Reversible methionine sulfoxidation of Mycobacterium tuberculosis small heat shock protein Hsp16.3 and its possible role in scavenging oxidants. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(1): 87-93.
- [72] Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, et al. The 16-kDa alphacrystallin(Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(16): 9578-9583.
- [73] Monahan IM., Betts J, Banerjee DK, et al. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology*, 2001, 147(Pt2): 459-471.
- [74] Singhal N, Sharma P, Kumar M, et al. Analysis of intracellular expressed proteins of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Proteome Sci*, 2012, 10(1): 14.
- [75] Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination[J]. *Nature*, 1999, 400(6741): 269-271.
- [76] 居巍, 刘君炎, 庄玉辉, 等. 结核杆菌 pCHSP65 真核表达载体的构建及其 DNA 免疫实验 [J]. *中国免疫学杂志*, 2003, 19(1): 12-15.
- [77] Yang BF, Zhao HL, Xue C, et al. Recombinant heat shock protein 65 carrying hepatitis B core antigen induces HBcAg-specific CTL response[J]. *Vaccine*, 2007, 25(22): 4478-86.
- [78] Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination[J]. *Nature*, 1999, 400(6741): 269-271.
- [79] Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, et al. Identification and characterization of

- protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and M.tuberculosis infected mice[J].*Infect Immun*,1998,66(5):169-175.
- [80]戴五星, 黄海浪, 高红, 等. 结核分支杆菌 HSP70 和 HSP65DNA 疫苗免疫原性比较研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25700~701.
- [81]Yang BF, Zhao HL, Xue C, et al. Recombinant heat shock protein 65 carrying hepatitis B core antigen induces HBcAg-specific CTL response[J]. *Vaccine*, 2007, 25(22):4478-4486.
- [82]Silva, CL.,V.L. Bonato. Characterization of the Memory Activated T Cells that Mediate the Long-lived Host Response Against Tuberculosis after Bacillus Calmetteguerin or DNA Vaccination[J]. *Immunology*, 1999, 97(4):573281.
- [83]Friedland JS, Shattock R, Remick DG, Griffin GE. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. *Clin Exp Immunol*, 1993, 91: 58-62
- [84]Antas PR, Cardoso FL, Pereira KC, Franken KL, Cunha KS, et al. T cell immune responses to mycobacterial antigens in Brazilian tuberculosis patients and controls. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2005, 99: 699-707
- [85]Abebe F, Bjune G. The emergence of Beijing family genotypes of Mycobacterium tuberculosis and low-level protection by bacille Calmette - Guérin (BCG) vaccines: is there a link [J] . *Clin Exp Immunol*, 2006, 145(3):389-397.

## 文献综述

### (Review)

#### 结核分枝杆菌北京/W系菌株相关性研究

**【摘要】**结核病是一种由结核分枝杆菌引起的慢性感染性疾病，严重威胁着人类的健康，其致死率在感染性疾病中位于全球第二。北京/W系菌株是结核分枝杆菌的一个独特遗传谱系，在全球广泛分布，占全球分离株的13%，全世界约有1/3的结核病由该型菌株所致，具有更高的毒力和更强的抵抗性，可引起非保护性免疫并抑制和逃避宿主免疫。北京/W系家族菌株的研究已经成为了结核相关研究的热点，本文旨在综合国内外相关研究资料，对结核分枝杆菌北京/W系菌株作一简要阐述。

**【关键词】**结核分枝杆菌；北京/W系菌株；综述

#### **Studies on Beijing/W lineage *Mycobacterium tuberculosis***

**【 Abstract 】** Tuberculosis(TB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which is a serious threat to human health. The Beijing/W lineage strain is a unique genetic lineage of *M. tuberculosis*. It is widely spread in the world accounting for 13% of global isolates. It had higher virulent and stronger resistance and could cause non protective immunity, inhibit and evade the host immune. Studies on Beijing/W lineage *M. tuberculosis* has become a hot spot. According to relevant research at home and abroad, the review made a brief description.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Beijing/W lineage strain; Review

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的一种慢性感染性疾病，可累及全身多个器官系统，严重危害人类的健康。近年来由于多种原因，全球结核病的流行重新加剧。结核分枝杆菌北京/W系菌株是 MTB 的一个独特遗传谱系，在全球广泛分布，并造成多次爆发流行，是世界第二大流行的 MTB，占全球分离菌株的 13%，全世界约有 1/3 的结核病由该型菌株导致<sup>[1]</sup>。北京/W系结核分枝杆菌被认为是一类传播速度更快、致病性更强、更容易形成耐药的菌株。因此，北京/W系家族菌株的研究已经成为了结核相关研究的热点。

#### 1. 结核分枝杆菌北京/W系的起源与进化

结核分枝杆菌北京/W系菌株是由Van Soolingen等人于1995年首次在我国

北京及其周边地区发现而得名的<sup>[2]</sup>。这类菌株具有独特的遗传谱系和相同的基因标记,即相同的IS6110限制片段长度多态性(IS6110 RFLP)和间隔区寡核苷酸分型(spoligotyping)的特征。此后,北京/W系菌株被发现在东亚各国乃至全球多个国家都存在不同程度的流行<sup>[3,4]</sup>。早期在美国广泛流行的耐多药菌株W菌株根据Spoligotyping分型技术被鉴定为北京家族菌株,因此北京家族菌株被正式命名为北京/W系菌株。

北京/W系菌株被认为是一个遗传相似度极高的群体,即使变异速率极快的IS6110 RFLP图谱在北京/W系菌株间的平均相似度也高达80%以上。Mokrousov等于2002年发现,在俄罗斯传播的北京/W系菌株可根据基因组NTF区域IS6110插入多态性分为两个分支:一支被称为古老型,在NTF区无IS6110插入序列,反映了该位点祖先菌株的状态;另一支被称为现代型,在该区存在一个或两个IS6110转座子序列<sup>[5]</sup>。现代型北京/W系菌株在俄罗斯高度流行,占有北京家族菌株的96%左右。研究表明,现代型菌株的IS6110 RFLP图谱与早期Van Soolingen首次发现的北京/W系菌株以及在美国流行的W菌株RFLP图谱有很高的相似度,而古老型菌株的RFLP图谱却存在较大的差异。由于北京家族菌株序列相似度太高而缺乏多态性位点,北京家族菌株系统发生关系的研究进展缓慢。

## 2. 结核分枝杆菌北京/W系的分子流行病学特征

分子流行病学是从分子和基因水平研究疾病的病因和致病机制,以为疾病的防治提供策略。分子分型技术是分子流行病学的核心技术,目前已广泛应用于结核病的基因分型研究中,可预测结核病的暴发流行及传播方式,此外还可用于研究结核分枝杆菌的遗传进化关系。结核分枝杆菌基因组具有高度保守性,但同时其基因组还存在着一定的多态性区域且这些区域与插入片段或重复序列相关,因此该特性成为了当今结核病基因分型研究的基础。20世纪90年代以来,随着分子分型技术的广泛应用,人们对MTB有了更加深入的了解。最常用的TB基因分型技术有Spoligotyping、IS6110 RFLP、单核苷酸多态性(SNP)、可变数目串联重复(VNTR)、多态富含GC的重复序列(PGRS)等。借助这些分子技术,学者们将一大群遗传上相关的MTB菌株包括W4、W14、W82、W148、菌株210、纽约W株、北京菌株等统称为北京/W系家族菌株<sup>[6]</sup>。

Spoligotyping是鉴定北京/W系菌株运用最广泛的方法,该方法以结核分枝杆菌特有的重复序列多态性为基础,这些重复序列被大小不同的间隔序列所分离,特异性扩增这些间隔序列,与最后9个间隔寡核苷酸序列(间隔序列35~43)均杂交的菌株被定义为北京/W系结核分枝杆菌<sup>[7]</sup>。依据IS6110 RFLP方法,是指在结核分枝杆菌基因组dnaA-dnaN位点上含有IS6110核苷酸插入序列的菌株为北京/W系结核分枝杆菌。在常规IS6110 DNA指纹分析采用的Southern blot膜再杂交的基础上,Kurepina N等<sup>[8]</sup>人建立了一个更简便、准确的方法。建立杂交探针识别北京/W系家族菌株的3个染色体位点(dnaA-dnaN、NTF区域和直接重复序列)的特异PCR扩增片段。此外,2005年,Tsolaki AG等将北京/W系结核分枝杆菌菌

株杂交, 比较整个基因组发现了21个长基因序列多态性位点 (Large Sequence Polymorphisms, LSPs)。其中RD105是结核分枝杆菌基因组中的一段缺失序列, 在其研究的所有北京/W系菌株中都发现了这段缺失序列, 并提出RD105可作为识别北京/W系菌株的分子标识物<sup>[9]</sup>。此外, 依据另外三个缺失大片段RD142、RD150和RD181可将全球北京/W系菌株进一步划分为表现型各异的4个亚型。该方法能够准确快速的鉴定北京/W系结核分枝杆菌, 促进了其流行扩散特点的深入研究。

### 3. 结核分枝杆菌北京/W系的传播

北京/W系结核分枝杆菌在全球广泛分布, 并造成多次爆发流行, 是世界第二大流行的 MTB, 现已达到全球结核分枝杆菌分离菌株的 13%<sup>[10]</sup>, 全世界约有 1/3 的结核病由该型菌株导致, 主要分布于亚洲和前苏联, 尤其是在中国、俄罗斯、日本和东南亚等地区<sup>[11,12]</sup>。在中国、香港和日本神户地区, 该菌株的比例分别占 86%、70%、77%。在台湾、越南、俄国和南韩地区, 北京/W系结核分枝杆菌的比例也分别达到 44.4%、54%、44.5%和 43%, 且与多耐药密切相关<sup>[13]</sup>。对阿富汗和伊朗地区的结核分枝杆菌临床分离株进行分析发现 9.4%属于北京/W系菌株, 且这些菌株均与耐药性相关<sup>[14]</sup>。新加坡的北京/W系菌株同样与多耐药相关, 且更易造成传播<sup>[15]</sup>。印度也发现有北京/W系菌株的传播。北京/W系结核分枝杆菌在全球其他地区也有流行: 在南美洲小于 2%, 在中美洲、欧洲、非洲为 3%-5%, 中东达 10%, 大洋州为 13%, 北美洲为 16%<sup>[16]</sup>。

在我国北京/W系家族菌株的分布也有明显的地域性差异, 北部地区明显高于南部地区, 北京市 80%-90%, 天津市 91.5%, 黑龙江 89.5%, 甘肃 87.56%, 山东 85.35%, 宁夏 67%, 上海市 89%, 江苏省 80.4%, 浙江省 70%, 广西省 55.3%, 福建 54.50%<sup>[17]</sup>。国内也报道北京/W系家族菌株为我国的主要流行菌株, 不同地区北京/W系家族菌株分布不同, 北方地区比例高于南方地区, 北京地区北京/W系家族菌株所占的比例最高, 为 92.59%, 其后依次为西藏 90.38%, 吉林 89.88%, 陕西 80.00%, 新疆 65.36%, 广西 55.29%, 福建 54.50%, 平均水平 72.24%<sup>[18]</sup>。相关研究显示, 北京/W系家族菌株的传播率 (28.3%) 明显高于非“北京/W系”家族菌株的传播率 (14.9%), 表明北京/W系家族菌株较非北京/W系家族菌株具有更强的传播性<sup>[19]</sup>。

### 4. 结核分枝杆菌北京/W系的致病性

北京/W系结核分枝杆菌被认为是一类传播速度更快、致病性更强、更容易形成耐药的菌株。有研究显示, 北京基因型菌株 210 较 CDC1551 及其他临床分离株在巨噬细胞内的繁殖速度更快<sup>[20]</sup>。与感染 H37Rv 的小鼠相比, 感染北京/W系菌株的小鼠更易引起广泛的肺炎, 且死亡率明显增高<sup>[21]</sup>。北京/W系菌株诱导巨噬细胞凋亡的能力较 H37Rv 减低, 且更多诱导的是表达抗凋亡分子 bcl-2 的含空泡的巨噬细胞<sup>[22]</sup>。比较北京/W系菌株在多药耐药菌株与敏感菌株中所占的比例发现, 此类菌株与多药耐药有一定的相关性<sup>[23]</sup>。综上所述, 北京/W系 MTB 具有更强的持留性、更高的毒力和更易引起非保护性免疫及逃避宿主免疫的能

力。

北京/W系家族菌株分子表达的改变是导致其具有较强生存能力的重要因素。有研究发现北京/W系菌株在 Rv3908、mutT2 和 ogt 三种 DNA 突变修复基因上存在独特的错义突变,这些突变可能会增加细菌突变频率,其中 mutT2 可以减缓处于不利条件下 MTB 的新陈代谢率,部分解释了北京/W系结核分枝杆菌快速适应环境的能力<sup>[24]</sup>。北京/W系菌株中有一个与酚糖脂的生物合成相关的基因 pks15/1,这种酚糖脂是 MTB 的一种毒力因子,Tsenova 等人发现感染了北京/W系菌株的兔子其细菌更易从肺部扩散至脑脊液中,而脑脊液中菌量的增高与酚糖脂有一定的关系<sup>[25]</sup>。此外,体外有氧培养中发现北京/W系菌株中积累了大量的三酰甘油,一种 DOST 休眠调节子 Rv3130c 表达增高,该调节子的上调可能使北京/W系家族菌株在低氧或无氧条件下具有较强的选择优势<sup>[26]</sup>。蛋白质组学研究表明,北京/W系菌株与其他临床分离株和 H37Rv 相比存在差异表达蛋白,如在北京/W系菌株中 16kDa 热休克蛋白呈高表达<sup>[27]</sup>,而 65kDa 热休克蛋白、磷酸盐转运蛋白 PstS1 和 47kDa 蛋白的表达降低<sup>[28]</sup>。其中 16kDa 热休克蛋白是结核分枝杆菌的一种毒力因子,与 MTB 的持续感染有关,是 MTB 在宿主巨噬细胞内存活所必需的一种膜抗原。有基因敲除实验表明,如果没有 HspX 的表达,MTB 突变菌株在骨髓衍生的巨噬细胞及人白血病巨噬细胞系 THP-1 中都将难以生存<sup>[29]</sup>。在结核分枝杆菌潜伏期 HspX 大量表达积累,成为休眠菌表达的主要蛋白质,其对结核分枝杆菌的生存力和稳定性发挥着重要的调节作用,这主要与其分子伴侣、抗凋亡和细胞骨架稳定等热休克蛋白的功能相关。在低氧或缺氧环境下,HspX 有助于 MTB 诱导巨噬细胞胞质内脂滴的大量积累,创造对其有益的生存环境,还可利用宿主巨噬细胞内的三酰基甘油转化合成自身的脂质体<sup>[30]</sup>,使 MTB 的细胞壁增厚,稳定细胞结构,以抵抗免疫因子及药物的杀伤作用。65kDa 热休克蛋白是一种免疫保护性蛋白,该蛋白具有很强的免疫原性,是机体对抗细菌入侵的重要的免疫保护性抗原,在结核分枝杆菌感染的小鼠体内,约有 20% 的反应性 T 细胞能够识别 Hsp65<sup>[31]</sup>。PstS1 是一种 38kDa 的特异性磷酸脂蛋白,是 T、B 淋巴细胞的刺激分子,该蛋白以分泌蛋白和膜蛋白的形式存在,能介导宿主巨噬细胞的凋亡,与凋亡受体 TNFR1、TNFR2 和 Fas 的表达上调密切相关<sup>[32]</sup>。综上所述,北京/W系菌株分子表达的改变有助于增加细菌毒力或抑制宿主免疫保护机制,以利于细菌的播散蔓延。

#### 5. 结核分枝杆菌北京/W系的耐药性

结核分枝杆菌的耐药机制复杂<sup>[33]</sup>,包括 MTB 细胞壁结构改变与组成变化、MTB 的药物外排泵系统、MTB 药物靶编码基因突变等方面。MTB 细胞壁结构改变与组成变化,可以使细胞壁的通透性发生改变。在 MTB 中已经发现了活跃的药物外排泵系统,外排泵能将菌体内的药物泵出,使细胞内药物浓度不能有效抑制或杀死分枝杆菌,从而产生耐药性。MTB 耐药性的产生也多见于其基因组上编码药物靶的基因或与药物活性有关的酶的基因突变造成,也称基因型耐药。基因型耐药

是指在药物的选择压力下大量天然的 MTB 抗药突变株保留并繁殖,其后代菌株能保持并遗传其耐药性。

北京/W系结核分枝杆菌被怀疑是获得耐药性优势的进化谱系,将北京/W系菌株在多药耐药菌株中的比例与在药物敏感菌株中的比例进行比较发现,北京/W系结核分枝杆菌与多药耐药关系密切,但不同国家和地区各有不同。我国北京、天津、河南、香港等地区的报道显示,北京/W系家族菌株与耐药无明显相关性,而台湾地区的研究结果却显示,北京/W系家族菌株与耐药性有强相关性<sup>[34]</sup>。来自于阿富汗和伊朗的报道显示,北京/W系家族菌株与多药耐药相关;新加坡的耐药结核的总传播率虽然不高,但是北京/W系家族菌株也与多药耐药有明显相关性,更容易造成传播<sup>[35]</sup>。爱沙尼亚和韩国的研究结果也显示,北京/W系家族菌株与耐药有明显相关性,且北京/W系家族菌株的耐药性明显高于非北京/W系家族菌株<sup>[36,37]</sup>。

由于北京/W系家族菌株与多药耐药的相关性研究,各地结论不同,因此许多学者进一步研究了北京/W系家族亚系菌株与耐药性之间的联系。由于在不同的区域流行的北京/W系家族菌株的亚系可能不同,可能是在不同地区得出不同结论的原因之一<sup>[38,39,40]</sup>。因此,对于北京/W系 MTB 家族菌株的亚系进行长期的流行病学监测,对制定结核病预防控制策略具有指导意义。

## 6. 结语与展望

结核病严重危害人类的健康,近年来全球流行趋势日益加剧,再次成为严重的公共卫生问题和重大的经济社会问题。由于 MTB 菌株的多样性以及菌株突变产生的耐药性,使得抗结核药物治疗效果不理想。多项研究表明北京/W系结核分枝杆菌于全球广泛分布,曾多次引起暴发流行并且耐药情况严重,是目前结核病研究的热点问题之一。结核分枝杆菌北京/W系菌株的进化、流行与其分子表达的改变密切相关,内在生物学优势赋予其广泛播散的能力、更高的毒力和更强的抵抗性。因此,从分子水平对北京/W系家族菌株进行研究,发现其差异表达的分子,揭示其在人群中的传播性、致病机制、与耐药的相关性以及寻找适当的药物靶标及治疗性疫苗靶点等都是未来我们需要努力的方向。

## 参考文献:

- [1] Brudey k, Driscoll JR, Rigouts L, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol, 2006, 6: 23.
- [2] Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of East Asia[ J] . J Clin Microbiol. 1995, 33: 3234- 8.

- [3] Bifani, P.J., B. Mathema, et al. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains[J]. Trends in microbiology, 2002, 10:45-52.
- [4] Glynn, J.R., J. Whiteley, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. Emerging infectious diseases[J], 2002, 8:843-849.
- [5] Mokrousov, I., et al. Phylogenetic reconstruction within Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in northwestern Russia. Res Microbiol[J], 2002, 153:629-637.
- [6] 杨本付,徐庵.结核分枝杆菌 W-北京家族菌株研究进展[J].中华流行病学杂志,2004, 25(2):178-180.
- [7] Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other Mycobacterium infections: main methodologies and achievements[J]. J Intern Med, 2001, 249:1-26.
- [8] Kurepina N, Likhoshvay E, Shashkina E, et al. Targeted hybridization of IS6110 fingerprints identifies the W-Beijing Mycobacterium tuberculosis strains among clinical isolates[J]. J Clin Microbiol. 2005, 43(5):2148-54.
- [9] Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol 2005, 43(7):3185-3191.
- [10] Brudey k, Driscoll JR, Rigouts L, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol, 2006, 6: 23.
- [11] Li WM, Wang SM, Li CY, et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in China: a nationwide random survey in 2000[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9(12): 1314-1319.
- [12] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains[J]. Trends Microbiol, 2002, 10(1):45-52.
- [13] 孙蕾, 杨立军, 郑锦辉, 等. 北京基因型结核分枝杆菌的研究[J]. 2008, 30(3): 224-225.
- [14] Ramazanzadeh R, Farnia P, Amirzadeh N, et al. Comparison between molecular epidemiology, geographical regions and drug resistance in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from Iranian and Afghan patients [J]. Chemotherapy, 2006, 52(6): 316-20.
- [15] Sun YJ, Lee AS, Wong SY, et al. Genotype and phenotype relationships and

- transmission analysis of drug-resist ant tuberculosis in Singapore[ J ] . Int J Tuberc Lung Dis, 2007, 11( 4) : 436-42.
- [16]单万水,单金岚,李芳芳,等. 线性探针分析法检测结核分枝杆菌rpoB耐药基因突变的研究[J]. 中华检验医学, 2005, 25(1) :82-88.
- [17]Liu Q,Yang D,Xu W,et al.Molecular typing of mycobacterium tuberculosis isolates circulating in Jiangsu Province, China[J].Bmc Infect Dis,2011,11:288.
- [18]赵秀芹,董海燕,刘志广,等. 中国部分地区MTB北京基因型菌株分布初步分析[J].实用预防医学,2012,19(5):662-664.
- [19]Nioletta Lari,Laura Rindi,Daniela Bonanni,et al . Three-Year Longitudinal Study of Genotypes of Mycobacterium tuberculosis Isolates in Tuseany, Italy[J].J clin Microbiol,2007,45(6):1851-1857.
- [20]Zhang, M., et al., Enhanced capacity of a widespread strain of Mycobacterium tuberculosis to grow in human macrophages. J Infect Dis, 1999. 179(5): p. 1213-7.
- [21]Lopez B, Agu ilar D, Orozco H , et al . A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes [ J ] . Clin Exp Immunol, 2003, 133: 30- 7.
- [22]Rios-Barrera VA, Campos-Pena V, Aguilar-Leon D et al. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis : their relationship to mycobacterial virulence [ J ] . Eur J Immunol, 2006, 36: 345- 53.
- [23]Park YK, Shin S , Ryu S, et al. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non- Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Korea [ J ] . J Microbiol Methods ,2005, 63( 2) : 165- 72.
- [24]Rad ME, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family. Emerg Infect Dis, 2003, 9:838-845.
- [25]Tsenova L, Ellison, R Harbacheuski, et al. Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli[J]. J Infect Dis, 2005, 192:98-106.
- [26]Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, et al. The W-Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated[J]. J Bacteriol, 2007, 189(7):2583-2589.
- [27]Monahan IM , Betts J , Banerjee DR, Butcher PD. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages[ J ] . Microbiology, 2001, 147: 459- 471.

- [28] Stewart GR, Snewin VA, Walzl G, et al. Overexpression of heatshock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection[J]. *Nat Med*, 2001, 7: 732- 737.
- [29] Fu X, Zhang H, Zhang X, et al. A dual role for the N-terminal region of *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16.3 in self-oligomerization and binding denaturing substrate proteins[J]. *J Biol Chem*, 2005, 80(8): 6337-6348.
- [30] Daniel J, Maamar H, Deb C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PloS Pathog*, 2011, 7(6): e1002093.
- [31] Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination[J]. *Nature*, 1999, 400(6741): 269-271.
- [32] Sanchez A, Espinosa P, Esparza MA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is Apoptogenic for human monocyte-derived macrophages[J]. *Scand J Immunol*. 2009; 69(1): 20-28.
- [33] 闫雪梅,张朝霞. 结核分枝杆菌耐药机制研究进展[J].新疆医科大学学报, 2012, 35(2):249-254.
- [34] Jou R, Chiang CY, Huang WL. Distribution of the Beijing Family Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 95-100.
- [35] Sun YJ, Lee AS, Wong SY, et al. Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(4): 436-442.
- [36] Kruuner A, Hoffner SE, Sillastu H, et al. Spread of drug resistant pulmonary tuberculosis in Estonia[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9): 3339-3345.
- [37] Park YK, Shin S, Ryu S, et al. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(2): 165-172.
- [38] Hanekom M, van der Spuy GD, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2007, 45(5): 1483-1490.
- [39] Mokrousov I, Jiao WW, Sun GZ, et al. Evolution of drug resistance in different sub-lineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype[J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006, 50(8): 2820-2823.
- [40] Strauss OJ, Warren RM, Jordaan A, et al. Spread of a low-fitness drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain in a setting of high human immunodeficiency virus prevalence[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2008, 46(4): 1514-1516.

## 致谢

### (Acknowledgements)

回首三年来的硕士学习生活和科研工作,我满怀一颗感恩的心面对身边所有的老师、同学、朋友和家人,在此向他们致以最诚挚的谢意。

首先,我要衷心感谢我的导师袁俐教授,在课题研究过程中,帮助我开拓研究思路,为我指点迷津,当我面对各种问题的时候给予我最悉心的指导和鼓励。导师对科研孜孜不倦的追求和严谨的态度深深地影响了我,使我能够踏踏实实的完成这三年的学业,获得人生重要的财富,导师对我的教导使我受益匪浅。

衷心感谢张万江教授、潘泽民教授、王远志副教授、陈雪玲教授、章乐副教授在论文开题时提出的许多宝贵意见,他们的谦和严谨、认真负责、精益求精的态度值得我学习。

衷心感谢教研室的李永祥老师、吴万贵老师、邢建新老师、王仙老师、米利古老师、郭飞老师、侯隽老师对我实验操作给予极大的帮助和指导。

衷心感谢大学研究生处、医学院和医学院研招办的各位领导及老师提供的支持和帮助,使我的学业能够顺利进行。

感谢梁海燕师姐和黄艺师姐给予的理论与技术指导。感谢李华、印双红、张璘、李文娟、庄睿同学、申爱平、曹帅丽师妹对本研究的帮助。

感谢 2011 级的全体研究生同学,难以忘却的是我们共同度过人生中短暂、却不平凡的三年生活,虽然即将各奔东西,但留下的是我们之间的深深的友谊。

衷心感谢我的父母及我的其他家人朋友,在我三年的研究生生活中,给予了我无微不至的照顾和巨大的精神支持。

最后,感谢所有我关心的人和关心我的人!

## 作者简介

李枫, 女, 生于 1986 年 8 月, 籍贯山西。2011 年 7 月毕业于潍坊医学院临床医学专业, 获医学学士学位。同年 9 月起在石河子大学医学院免疫学专业学习。

### 在学期间主要参与的研究项目

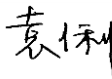
1. 参加了国家自然科学基金资助项目《MTB 新疆临床分离株的基因分型及多药耐药的相关性研究》(30960356) 的部分研究工作。
2. 参与国家自然科学基金资助项目《MTB 新疆临床分离株“北京/W 系”亚系及其蛋白抗原表达的研究》(81160368) 的部分研究工作。

### 在学期间发表的文章

1. 李枫, 袁俐. 热休克蛋白与结核病关系概述 [J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(10): 954-957.
2. 李枫, 李华, 梁海燕, 等. 新疆地区结核分枝杆菌北京/W 系和非北京/W 系间五种重要蛋白表达差异的初步研究. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(3): 244-249.

## 石河子大学硕士研究生学位论文

## 导师评阅表

研究生姓名	李枫	学制	三年
专业	免疫学	研究方向	感染免疫
学术评语:			
<p>李枫同学在攻读硕士研究生期间进行的课题“新疆地区北京/W系和非北京/W系 MTB 两个重要蛋白表达差异研究”，立足于新疆结核病研究的现状，应用 PCR-DNA 直接测序技术、实时荧光定量技术和 Western-blot 技术检测了新疆地区 MTB 临床分离株北京/W系和非北京/W系菌株各 60 株的 HspX、Hsp65 两个蛋白编码基因有无突变以及 mRNA、蛋白水平的表达差异。研究结果显示：新疆地区北京/W系和非北京/W系菌株 HspX、Hsp65 的编码基因 <i>hspX</i>、<i>groEL2</i> 均未发生突变；MTB 在自然生长状态下北京/W系和非北京/W系菌株 <i>hspX</i>、<i>groEL2</i> 的 mRNA 表达水平没有差异；MTB 感染巨噬细胞 24h 后，北京/W系菌株中 HspX、Hsp65 蛋白表达水平较非北京/W系菌株中升高。该生在读期间发表研究学术论文 2 篇。</p> <p>本课题设计科学严谨，方法准确可靠，数据资料完整、详实，分析透彻、针对性强，论文格式正确，书写规范，层次清晰。本课题研究可以在一定程度上解释北京/W系菌株在新疆地区的流行。</p> <p>综上所述，李枫同学的毕业论文符合硕士学位研究生培养目标的要求，达到硕士学位水平。同意该生提交学位论文，并进行论文答辩。</p>			
指导教师签字： 			
2014 年 06 月 10 日			