

· 综述 ·

结核分枝杆菌北京/W 基因家族研究进展

李琳琳 朱朝敏

【关键词】 结核分枝杆菌; 北京/W 基因家族

The advance on the study of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W family strains XING Lin-lin, ZHU Chao-min. Affiliated Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Beijing/W family strains

结核分枝杆菌是一个全球性的病原菌,全球约有 1/3 的人受到感染,同时每年造成将近 300 万例死亡。目前世界结核病流行主要是由几种特殊的结核分枝杆菌家族引起的,如北京/W 基因家族、LAM 家族、Haarlem 家族、X 族群以及其他未定名的菌株群。北京/W 基因家族是结核分枝杆菌复合群中一个重要的分支,北京/W 基因家族可引起医院、社区结核病的暴发,同时也与耐药及结核病的治疗失败和复燃有关,具有很强的致病力^[1,2]。因此近年来引起人们极大的关注。

1. 北京/W 基因家族及遗传学特征:20 世纪 90 年代初,耐多药结核分枝杆菌“W”菌株在纽约被发现。“W”菌株引起公共机构内结核病的爆发性流行,并导致许多结核病患者死亡。随后在美国的其他地方也发现该菌的存在。1995 年 van Soolingen 首次报道北京基因型菌株,因其最初是在北京地区的结核病患者中分离培养到优势结核分枝杆菌(89.0%),被命名为北京基因家族^[3]。随着分子流行病学的进展,在 90 年代中后期,通过 IS6110 RFLP 指纹序列和/或多重 PCR 定向检测某一特殊插入序列鉴别结核分枝杆菌,发现 W 家族的菌株同北京基因家族的菌株拥有高度相似的 IS6110 序列,因此 W 株被认为是北京基因家族的一员,被统称为“W-北京基因家族”或者“北京/W 基因家族”^[4]。

北京/W 基因家族是一个独特高度保守的遗传家族。拥有以下生物学特征的菌株可以划分为北京/W 基因家族^[1,5]:①属于主遗传群 1[katG463CTG(Leu)和 gyrA95ACC(Thr)];②高度相似的 IS6110 RFLP 序列;③特征性的间隔寡型 S0034(即在 35~43 之间的 9 个间隔区中用 Spoligotyping 分型方法中至少有 3 个杂交带,在直接重复序列(DR)染色体位点上拥有 1~34 间隔区的缺失);④NTF 位点至少有一个特殊的 IS6110 插入,而 W 株在这个位点有 2 个 IS6110 插入;⑤在 IS6110 元件起始复制区(oriC)从 dnaA~dnaN 区有个特殊的 A1 插入;⑥特殊多序列多态性(LSP)RD105 缺失。

2. 北京/W 基因家族的分布:该菌株自 20 世纪 50 年代中期就已在我国流行^[6],并且可能在一些地区的流行至少经

历一个世纪。由于宿主和病原菌是相互进化的,在家庭中结核杆菌的传播方式是垂直传播,因此不同环境中菌群同宿主之间的联系也随之变化,因而可以根据人群所属地区的不同来预计其所感染的临床菌株类型。

自第一篇报道北京/W 基因家族的菌株在北京、蒙古地区流行以来,随即的诸多分子流行病学研究显示,该菌株在全球大范围传播,尤其在亚洲。在中国,这个家族的菌株呈高水平的流行(北京市 92.0%^[4],河南省 59.14%^[7])。在俄罗斯的发病率也很高(45.0%~76.0%),而在爱沙尼亚流行的结核分枝杆菌中北京/W 基因家族占 1/3^[8]。在马来西亚半岛,结核分枝杆菌也是北京/W 基因家族占主导^[9]。在 Tuscany 的研究中发现,北京/W 基因家族的菌株在这个地区所占的比例呈稳定性增长^[10]。第四次国际 Spoligotyping 数据库(SPOLBD4)将从 41 个国家收集的 39 295 株结核分枝杆菌分为 62 个谱系,结果表明北京/W 基因家族在东南亚占 50%^[11]。而报道北京/W 基因家族的菌株在儿童中的发病率不多,仅在南非开普敦的儿童结核病患者中以北京/W 基因家族为主(33.2%)^[12]。

北京/W 基因家族的菌株在世界大范围的流行,一方面是由于 20 世纪移民热潮;另外一方面可能因为其具有某种特殊的分子学特征,使最初感染这个家族菌株的患者极易发病(有可能为重症结核病)和/或其获得耐药性从而使患者的治疗效果降低及治疗时间延长。

3. 北京/W 基因家族的致病力:感染结核杆菌是否发病取决于两个方面,宿主自身的抵抗力 and 病原菌本身。最初人们认为所有临床型结核分枝杆菌的毒力和传播分布都是相同的,但随着分子流行病学的发展,这个观点正在慢慢地改变。

在动物结核杆菌感染的模型中发现,机体免疫保护性反应是由高产量的 Th1 细胞因子和高表达的肿瘤坏死因子(TNF- α)以及一氧化氮合成酶(iNOS)控制。在感染北京/W 基因家族菌株的小鼠模型中发现, γ -干扰素(IFN- γ)的表达延迟并且微弱,早期在肺上大量表达 TNF- α 和 iNOS,显示出巨噬细胞在感染早期就有活性,然而却很快失去活性,并不能有效的刺激 Th1 细胞的活力,从而不能阻止细菌的大量增殖,导致大面积组织损伤和宿主早期死亡。由此提示北京/W 基因家族的菌株与机体免疫系统相互作用,可以导致宿主免疫反应失去其保护功能^[13]。而在兔结核性脑膜炎模型中,感染北京/W 基因家族菌株的动物脑脊液(CSF)细菌负荷量和持续时间比感染其他菌株的兔都要高,并易扩散到其他组织,如肺、肝脏、脾脏等;而且在疾病初期(3 周内)就表现出严

重神经系统受损的疾病征象,如协调障碍、局部麻痹、四肢麻痹等^[14,15]。由此证明北京/W 基因家族的菌株相对于其他菌株(如 H37Rv、CDC1551 等)具有更强的致病力,因而推测其可能具有特殊的分子学特征来获得强的致病力。

Reed 等^[16]发现在试管实验中,北京/W 基因家族的一个亚群能产生一种特定的酚糖酯(PGL),PGL 的产生受到北京/W 基因家族菌株上的一个完整开放读码框 *pkis1* 区域的影响。PGL 能抑制先天性免疫反应。感染后,在细菌接种量没有明显变化的情况下,分解和扰乱 PGL 合成物可以引起致病力降低,使致炎细胞因子和 TNF- α 、IL-6、IL-12 增加,从而不能产生足够的细菌引起感染。但产生过量的 PGL 或纯化 PGL 都可抑制剂量依赖关系的巨噬细胞释放炎症介质。在动物试验中发现,敲除 *pkis15/1* 基因从而不能产生 PGL 的北京/W 基因家族菌株感染兔模型中,这个菌株的毒力明显降低^[14]。由此说明 PGL 对北京/W 基因家族的致病力有重要作用。

虽然 PGL 脂类介导的免疫抑制可以间接地引起鼠和兔的早期死亡,并且在北京/W 基因家族的 4 个亚群(根据 LPSs 可以将这个家族的菌株分为 4 个亚群)中均拥有完整的 *pkis15/1* 开放读码框^[14],但是通过研究证明在所有北京/W 基因家族中产生的 PGL 并不是完全一致。因此 PGL 可能是这个家族致病力的一个因素但并不是惟一的因素^[17]。在体外有氧培养实验中,和脂类产生相比,北京/W 基因家族的菌株蓄积了大量的 TG, TG 的蓄积和 Rv3130c 的增量调节是一致的。Rv3130c 的产物即 TG 合成酶。Rv3130c 是 DOSR 控制调节子的一员,并且这个调节子的几个成员在所有北京/W 基因家族中都是正调节。DOSR 调节子正调节可能使这个基因家族成员比其他杆菌在低氧/无氧环境中具有选择优势^[18]。

卡介苗(BCG)是目前惟一预防结核病有一定作用的减毒活疫苗。BCG 对于儿童播散性结核病以及结核性脑膜炎有一定作用,然而其在成年人肺结核病中的作用却不确定,尽管可以用接种个体的遗传变异性以及不同的结核病环境来解释,但是对于不同致病力菌株引起的结核病 BCG 作用不同。动物模型显示,BCG 对感染 HN878 菌株(属于北京/W 基因家族)兔的保护作用明显减弱,并且不能有效阻止结核菌株向肝脏和脾脏的扩散^[15]。而 Anh 等^[19]在越南地区的研究也发现这个家族的菌株更易感染接种 BCG 的人群。虽然经过校正并不具有统计学意义,但是由于北京/W 基因家族的菌株在东南亚是优势菌株,并且 BCG 在东南亚普遍推广,因此人们推测 BCG 可能就是使北京/W 基因家族遗传表型发生突变的一个选择压力,从而导致这个家族的菌株成为该地区的优势菌株。

虽然动物模型中北京/W 基因家族的菌株与其他菌株相比具有更强的毒性,但是人体感染结核菌的遗传变异性对致病力的作用至今仍不清楚。研究显示,感染北京/W 基因家族菌株和感染其他结核菌患者的病情没有明显区别,但是在

抗痨治疗初感染这个家族菌株的患者比感染其他菌株患者更易出现短暂的一过性发热现象。而疾病严重程度、药物毒性以及对药物产生耐药性都不能解释此现象,由此推测这个家族的菌株可以引起不同的宿主反应^[20]。患者的免疫反应决定临床表现和 X 线胸片的结果,但 Kong 等^[21]报道,感染北京/W 基因家族菌株的患者与感染其他菌株患者的胸片并没有明显差异,却发现这个家族的菌株同胸外结核病有紧密联系。由于人体是个复杂的机体,且成年人易并发许多其他的基础疾病,这为研究北京/W 基因家族的致病力造成一定的困难,而儿童多在初次感染后 12 个月内发展成原发性结核病,且大多为重症结核病,因此如果能在儿童结核病中研究北京/W 基因家族分布情况以及与临床表现的联系,将对深入了解北京/W 基因家族致病力有极大帮助。

4. 北京/W 基因家族的耐药性:结核菌株耐药性同结核病患者的治疗成功与否以及结核病传播有着重大的联系。结核菌株产生耐药性主要由于治疗的不规范引起,而北京/W 基因家族的菌株同耐药性有着极其重要的联系。自 20 世纪 90 年代初在美国纽约发现耐药“W”株以来,研究人员发现在 3 年里纽约出现的 265 例耐多药结核(MDR-TB)菌株中属于北京/W 基因家族的超过 95%^[22];在俄罗斯的耐药菌株主要属于北京/W 基因家族和 LAM 家族^[8];在世界其他地区也有陆续报道成年人结核病中北京/W 基因家族同结核菌耐药性有关。在南非开普敦进行的儿童结核病调查中发现,感染北京/W 基因家族和 Haarlem 家族比感染其他菌株的儿童结核病更易发展为耐药性结核病。并且北京/W 基因家族亚群 220 已被证实为耐药菌株^[12]。

由于北京/W 基因家族同耐药性联系紧密,因此这个家族的菌株可能具有特殊的生物学特征从而比其他的菌株更易获得耐药性。*katG315* 基因的变异同获得耐药性有关,北京/W 基因家族耐异烟肼(INH)菌株中 *katG* 基因发生的 S315T(Arg \rightarrow Leu)突变频率十分高^[23,24],可以部分地解释这个家族的菌株同耐多药(MDR)的关系。而在耐利福平(RMP)上则颇有争议,Jiao 等^[25]发现北京/W 基因家族的菌株在 *rpoB* 基因上发生的变异明显高于非北京/W 基因家族的菌株(分别为 77.0% 和 28.0%);在我国的一篇报道中基本上持平(分别为 52.0% 和 50.0%);而在韩国的报道中则正好相反(分别为 41.0% 和 66.0%),这有可能是 *rpoB* 基因的多态性与地理差异有关,和/或与收集菌株的量有关^[24]。在其他的报道中显示,在耐多药北京/W 基因家族的菌株中可发现 *mutT2*、*mutT4*、*ogt* 位点的突变,而在其他的非北京/W 基因家族耐多药菌株中却不曾发现^[26]。这些检测到的特殊突变频率可以反映随机突变和后来的克隆扩增结果,或者是某个基因家族可能在所谓的突变热点特定位置上优先发生耐药突变,包括在 DNA 修复中的基因独特多态现象。

但是在耐药性上北京/W 基因家族的菌株显示出不均一性。在香港发现这个家族的菌株比其他菌株更不易发展为耐药菌株^[4]。而在我国最近的一篇文献中报道,在耐多药菌

株中北京/W 基因家族占 92.0%^[25]。这可能因为北京/W 基因家族并不是一个完全同种的家族,如 *katG* 基因中的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的变异(AGA→ACA, Ser→Thr)在 W 株及其后代来说是独一无二的^[1],而且随着研究的深入其感染的人口结构也越来越复杂,因此这些结果并不能完整的反映整个北京/W 基因家族的耐药性。

5. 小结:近年来的研究表明,人们对于北京/W 基因家族的相关分子流行病学、耐药性以及致病力的了解都有长足进步,这对研究北京/W 基因家族的发展史有一定帮助。但我们尚不知晓,对于北京/W 基因家族是否存在不同的人群结构,如在儿童中其发病率与成年人是否相同;北京/W 基因家族是不是具有特殊的分子学特征从而使其具有更强的致病力以及更易获得耐药性,并且应该根据耐药结核菌的特殊分子学标记,设计新的快速诊断耐药结核病的实验方法,这将为早期控制耐药结核病的传播以及提高其治疗疗效都有极大帮助;BCG 是否在一定程度上推动北京/W 基因家族的传播还有待进一步研究。提示,在以后的疫苗研制中不仅要针对 H37Rv 而且更应该针对北京/W 基因家族。

参 考 文 献

- [1] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol*, 2002, 10: 45-52.
- [2] Lan NT, Lien HT, Tung le B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9: 1633-1635.
- [3] 杨本付, 徐飞. 结核分枝杆菌 W-北京家族菌株研究进展. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 178-180.
- [4] 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.
- [5] Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 3185-3191.
- [6] Qian L, van Embden JD, van Der Zanden AG, et al. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 471-474.
- [7] 祖燕, 张国龙, 闫国蕊, 等. 河南省结核病分子流行病学调查研究. *医药论坛杂志*, 2006, 27: 29-31.
- [8] Toungousova OS, Bjune G, Caugant DA. Epidemic of tuberculosis in the former Soviet Union: social and biological reasons. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, 86: 1-10.
- [9] Dale JW, Nor RM, Ramayah S, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1265-1268.
- [10] Lari N, Rindi L, Bonanni D, et al. Three-year longitudinal study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Tuscany, Italy. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 1851-1857.
- [11] Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (Spol DB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 2006, 6: 23.
- [12] Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, et al. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape province of South Africa. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 3539-3543.
- [13] Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133: 30-37.
- [14] Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, 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 Infect Dis*, 2005, 192: 98-106.
- [15] Tsenova L, Harbacheuski R, Sung N, et al. BCG vaccination confers poor protection against *M. tuberculosis* HN878-induced central nervous system disease. *Vaccine*, 2007, 25: 5126-5132.
- [16] Reed MB, Domenech P, Mañica C, et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 2004, 431: 84-87.
- [17] Chairprasert A, Yorsangsuksamol J, Prammananan T, et al. Intact pks15/1 in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 772-774.
- [18] 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 Bacteriol*, 2007, 189: 2583-2589.
- [19] Anh DD, Borgdorff MW, van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis*, 2000, 6: 302-305.
- [20] van Crevel R, Nelwan RH, de Lenne W, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7: 880-883.
- [21] Kong Y, Cave MD, Zhang L, et al. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 409-414.
- [22] 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.
- [23] Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, et al. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7: 1097-1103.
- [24] 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 Microbiol Methods*, 2005, 63: 165-172.
- [25] Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120: 814-819.
- [26] 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.

(收稿日期: 2007-11-22)

(本文编辑: 尹廉)