

the albumin cobalt-binding test after a marathon race[J]. Clin Chem, 2002, 48(7):1097-1100.

[19] Can M, Demirtas S, Polat O, et al. Evaluation of effects of ischaemia on the albumin cobalt binding (ACB) assay in patients ex-

posed to trauma[J]. Emerg Med J, 2006, 23(7):537-539.

(收稿日期:2010-07-01)

• 综 述 •

基因芯片在细菌及其耐药检测中的应用

季 芳 综述, 伍 勇 审校

(中南大学湘雅三医院外科教研室, 湖南长沙 410013)

关键词:寡核苷酸序列分析; 细菌; 抗药性, 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0240-03

广谱抗生素的广泛使用易导致菌株变异和产生耐药性,迫切需要新的技术来解决如何快速、准确诊断病原,正确选择药物和合理用药等问题。基因芯片不仅可以大量快捷地检测出耐药性菌株,进行细菌诊断、鉴别诊断、耐药性监测,而且可以检测引起细菌耐药的基因突变。本文就基因芯片技术在细菌鉴定及其耐药检测、耐药机制研究方面的应用进展作一综述。

1 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片、cDNA 微阵列或寡核苷酸微芯片,可一次性分析多种生物样品。基因芯片技术采用了集成的方式,改变了弥补过去只能孤立研究单个基因在某个特定位置、特定时间表达状况的不足,具有检测范围广、检测速度快、样品用量少等特点。基因芯片技术因其可快速、准确、高效地显示病原体的遗传信息,已广泛应用于基因序列分析、病原微生物的快速诊断、变异及耐药机制研究、基因分型、分子流行病学调查和抗感染药物研制等。

2 基因芯片在细菌诊断及耐药研究中的应用

2.1 细菌鉴定 目前采用的致病菌传统检测方法包括前增菌、选择性增菌、分离、鉴定等程序,一般需要 3~5 d 才能完成,对于一些非典型菌株,需要更长的时间。不同细菌有各自不同的检测程序,是一项繁琐、重复、费时、费力、相互独立的技术劳动。基因芯片具有大规模、高通量的特性,克服了传统分子生物学方法只能对一个或几个基因进行研究的局限性,用极少量的样品,在极短时间内即可获得大量信息。目前该技术已相继应用于不同病原体的诊断。将各种待检微生物基因的特异片段作为核酸探针固定于生物芯片表面,可以制备成微生物检测基因芯片^[1-4],通过一步检测即可确定待检样品中病原微生物的种、属、亚型、毒性、致病性和耐药性^[5-7]。采用基因芯片检测病原菌涉及到两个重要技术环节,其一是特异的基因扩增,其二是准确的基因鉴别。基因扩增依靠的是细菌基因中的保守片段,只有在高度保守的片段中选择引物序列才能在少数几次反应中同时扩增几十种不同细菌的基因。而基因鉴别依靠的是细菌之间互不相同的 SNP 位点,因此检测位点应在基因的高可变区中选择。几乎所有已知细菌 16S rRNA 基因的碱基序列已被测定并存入基因库。由于 RNA 易于降解,因此多采用检测 16S rRNA 所对应染色体上的 16S rDNA 序列。16S rDNA 基因的内部结构由可变区和保守区组成,保守区为所有细菌所共有,保守区之间存在 9~10 个变异区,不同种属间有不同程度差异,可变区与保守区交错排列。对 16S rDNA 而言,如果出现 3 个碱基以上的差异就可以断定细菌不属于同一种属,因此可用于细菌的分类和鉴别。16S rDNA 广泛存在

于细菌界,能为细菌的鉴定提供具有通用性和特异性的信息,已报导有多个以细菌 16S rDNA 为检测标准制作成功的微生物检测系统。

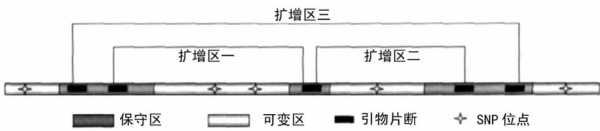


图 1 细菌 16S rRNA 基因的结构示意图

16S-23S rDNA 区间序列是继 16S rDNA 后的另一种分类及鉴别细菌的新方法,它集保守性和可变性于一身,不同种属间隔区的长度和序列有特异性,不但可以用于菌种间鉴别,还能将某些常见的不易用分子生物学方法加以有效区分的细菌鉴别开来,如大肠埃希菌和志贺菌或是葡萄球菌属内细菌^[7]。洪帮兴等^[8]扩增并测定了常见细菌的 23S rRNA 基因片段,并以生物信息学分析了不同种属细菌 23S rRNA 基因的保守序列、变异规律及菌株间种系进化关系,证实 23S rRNA 的保守序列与变异区在种系间呈间隔分布,变异区呈“马赛克”式分布,种系间进化关系与 16S rDNA 分析结果一致,为进行细菌的鉴别诊断及基因芯片的研制提供了重要的理论和实验基础。Carl 等^[9]对大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、空肠弯曲菌进行诊断和鉴别诊断时,采用了基因芯片法。在设计鉴别诊断芯片时,一方面从高度保守基因序列出发,即以各菌种间的差异序列为靶基因,另一方面选择同种细菌不同血清型所特有的标志基因为靶基因,同时以细菌所共有的 16S rDNA 保守序列为感染标志,其检测结果不仅敏感度高于传统方法,且操作简单、重复性好,明显提高了诊断效率。薛建亚等^[10]构建了细菌 16S rRNA 基因芯片,并将其应用于细菌检测,具有良好的特异性及敏感性,且耗时少。翟俊辉和韩俊^[11]建立了含有 20 种细菌探针的基因芯片模型,发现克隆探针具有广泛和灵敏的特点,但交叉反应明显;寡核苷酸探针特异性高,但灵敏度稍差,提示 cDNA 探针和寡核苷酸探针结合或以不同类型探针检测同一株细菌很可能是基因芯片发展的方向。Gingeras 等^[12]以 16S rRNA 基因序列及利福平耐药基因制备高密度寡核苷酸芯片,测定了 121 株分枝杆菌的类型及耐药性突变,并与常规序列测定方法比较,结果表明该寡核苷酸芯片不仅可以用于测序,还可直接鉴定菌种。Wang^[13]利用肺炎链球菌编码血清型和血清组标志蛋白的核酸序列作为探针,为肺炎链球菌的监测提供了一个新的具有更高特异性和灵敏度的血清快速分析方法。顾大勇^[14]针对 7 种肠道传染病病原体设计了特异性引物

和探针,并以链霉亲和素包被的磁珠为信号标记分子检测芯片上的杂交反应,对 27 例临床粪便样本分别进行 PCR 和芯片检测,芯片检测结果与 PCR 一致,且具有较好的特异性和重复性。利用“细菌感染通用基因芯片诊断”系统诊断细菌感染也已有报道^[15]。

2.2 细菌耐药性检测及耐药机制研究 对病原体耐药性的分子遗传学基础研究表明,细菌可通过不同机制产生耐药性的改变。找到耐药菌的耐药基因,可将耐药菌分成不同的亚型,实现针对性用药。

基因芯片对于耐药基因的检测可从两个方面实现:(1)以寡核苷酸芯片检测基因组序列的亚型或突变位点。Strommenger 等^[16]利用 9 种金黄色葡萄球菌抗性基因设计寡核苷酸芯片,对抗药性决定因子进行检测,为抗药性基因芯片的建立提出了一个轮廓。Gingeras 等^[12]用 RpoB 基因寡核苷酸制备的基因芯片不仅可以快速检测结核分枝杆菌,还可根据 RpoB 基因突变进行细菌基因分型和利福平耐药性检测。Hamels 等^[17]用葡萄球菌属保守的 femA 基因及金黄色葡萄球菌耐甲氧西林分子标记 mecA 基因扩增产物制备成低密度基因芯片,在 2 h 内即可完成细菌鉴定及耐药性检测。Sosnowski^[18]的研究证实,通过改变探针阵列区域的电场强度可检出单碱基突变,可用于微生物耐药性鉴定。利用商品化的革兰阳性菌细菌种鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒,可同时进行致病菌菌种鉴定和耐药基因检测。(2)以基因表达谱芯片检测药物诱导基因表达的改变。基因芯片技术可对用药前后细菌基因表达水平进行监测,分析在不同抗菌剂作用下在出现的差异基因,从而了解药物作用的靶基因、分子机制、基因调控网络和特征转录谱。Shaw 等^[19]应用芯片转录谱技术研究了利福平、卡那霉素、诺氟沙星与氨苄西林分别作用于大肠埃希菌的转录谱,证实细菌转录谱的改变与药物作用机制密切相关,利福平引起 RpoB 相关基因的改变,卡那霉素引起热休克反应相关基因的改变,诺氟沙星影响 SOS 反应相关基因,氨苄西林影响细菌细胞壁合成相关基因。

2.3 流行病学研究 基因芯片技术在细菌及分子流行病学中的应用已显示出广阔的前景。(1)菌株的地理流行病学分析:传统的病原地理流行病学分析一次只能对细菌的少数基因进行分析,在实际分析中极易导致重要数据的遗漏,使试验结论与实际结果出现偏差,而芯片技术从根本上解决了这个问题。(2)菌株分子流行病学及耐药分子机制研究:利用传统方法无法用有限的人力、物力对大样本量、多地区的信息在短时间内进行分析,基因芯片与传统流行病学方法相结合,可以解决仅明确细菌感染及药敏结果,但对相关分子机制了解甚少的问题。(3)快速初筛及诊断。

2.4 耐药药理学研究 基因芯片技术通过检测抗菌剂作用靶基因和耐药基因,分析抗菌剂作用的分子机制,一方面有可能揭示细菌出现耐药性的确切机制,为针对性用药提供依据,另一方面也可发现细菌生存所必需的基因,预测个体对药物的敏感基因,制定个体药物敏感谱,从而为开发新的抗菌剂及疫苗提供重要线索。King 和 Sinba^[20]利用此方法发现结核分枝杆菌中的脂肪酸合成酶 II、fbpC、efeA、FADe23、fadE24 和 ahpC 基因的改变与耐药性有关,提供了新的药物作用靶标。Bruant 等^[21]设计了检测大肠埃希菌毒力基因(或标志基因)和耐药性基因的寡核苷酸基因芯片,证实该芯片可以用于致病型菌株及其耐药性的检测和监测,可根据耐药基因设计新的抗菌剂,或将耐药菌株分成不同亚型,通过针对性用药改善治疗效果。比

较基因组杂交(CGH)虽是一种传统技术,但可与基因芯片结合形成基因芯片-CGH 技术,由于可高通量地比对基因组的结构和组成,已在新药研究、药物敏感性检测中发挥重要作用^[22]。

3 问题与展望

仅以基因突变和耐药性质粒介导来解释细菌耐药机制是不全面的。Hall 和 Stokes^[23]首次提出了与耐药基因水平传播有关的可移动基因元件:整合子。整合子本身不能转移,但其携带的耐药基因盒可在整合子间或不同细菌基因组间转移。基因芯片技术不仅可检测耐药菌的多个耐药基因盒,还可同时对多个耐药菌的多个耐药基因盒进行检测。

目前基因芯片技术本身还面临许多问题需要解决:(1)基因序列信息缺乏。(2)基因及基因芯片技术专利的限制。(3)相关技术急需改进与提高。(4)实验室操作过程需要标准化。(5)费用过高。上述问题不仅是国内外基因芯片技术研究的焦点,同时也是基因芯片能否从实验室研究推向临床应用的关键问题。尽管存在一定的不足和缺憾,但基因芯片技术与传统技术相比,有检测效率高、能同时分析多种基因的优势,同时还能检测宿主细胞基因组的转录情况,确定感染发生后基因的变化顺序,有利于分清原发和继发性干白,有助于揭示发病机制及感染性疾病的诊断和治疗,因此具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Suzuki S, Ono N, Furusawa C, et al. Experimental optimization of probe length to increase the sequence specificity of high-density oligonucleotide microarrays[J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 373-380.
- [2] Peng H, Yang LW, Song LW, et al. Screening the differential expression of adriamycin resistance related genes of breast cancer by cDNA microarray[J]. Zhonghua Yi Xue Zh Zhi, 2009, 89(25): 1745-1748.
- [3] Chen L, Zhao X, Surette MG, et al. Identification of pseudomonas aeruginosa genes involved in susceptibility to antibiotics[C]. Washington, USA: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008.
- [4] Palanisamy NK, Subramaniam GS, Mohd YY, et al. Microarray analysis of gene regulation in Streptococcus pneumoniae upon penicillin exposure[J]. Int J Infect Dis, 2008, Suppl 1 (12): E51-51.
- [5] Barl T, Dobrindt U, Yu XL, et al. Genotyping DNA chip for the simultaneous assessment of antibiotic resistance and pathogenic potential of extraintestinal pathogenic Escherichia coli[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32 (3): 272-277.
- [6] 陈建明, 韩俊, 董辰方, 等. 通用型病毒检测芯片在三种人类致病病毒属检测中的应用[J]. 中华实验和临床检验杂志, 2006, 20 (4): 327-330.
- [7] 温杰, 刘毅. 16S-23SrRNA 间区基因 RFLP 用于病原菌区分[J]. 大连医科大学学报, 2005, 27(4): 276-279.
- [8] 洪帮兴, 江丽芳, 胡玉山, 等. 23S rRNA 基因序列分析及其在细菌鉴别诊断中的应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24 (3): 241-244.
- [9] Carl F, Edman. Pathogen analysis and genetic predisposition testing using micro electronic arrays and isothermal amplification [J]. J Invest Med, 2000, 48(2): 93-101.
- [10] 薛建亚, 翁心华, 朱利平, 等. 细菌 16SrRNA 基因芯片的构建及其在细菌鉴定中的应用[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(8): 919-921.

- [11] 翟俊辉, 韩俊. 16SrDNA 基因芯片检测临床常见感染性细菌[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(08): 133-136.
- [12] Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA arrays[J]. Gene Res, 1998, 22(8): 43-52.
- [13] Wang Q. Development of a DNA microarray to identify the *Streptococcus pneumoniae* serotypes contained in the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine and closely related serotypes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 22(8): 128-136.
- [14] 顾大勇. 肠道传染病病原体可视化基因芯片检测技术的研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2009, 32(3): 317-323.
- [15] Ecker, C. Detecting functional nodes in large-scale cortical networks with functional magnetic resonance imaging: a principal component analysis of the human visual system[J]. Hum Brain Mapp, 2007, 28(9): 817-834.
- [16] Strommenger B, Schmidt C, Werner G, et al. DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*[J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(3): 161-170.
- [17] Hamels S, Gala JL, Dufour S, et al. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus* species, and met-hicillin resistance[J]. Biotechniques, 2001, 31(6): 1364-1366, 1368.
- [18] Sosnowski RG. Rapid determination of single base mismatch mutation in DNA hybrids by direct electric field control [J]. PNAS USA, 1997, 94(4): 1119-1123.
- [19] Shaw KJ, Miller N, Liu X, et al. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2003, 5(2): 105-122.
- [20] King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls [J]. JAMA, 2001, 28(6): 2280-2288.
- [21] Bruant G, Maynard C, Bekal S, et al. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5): 3780-3784.
- [22] Urzua U, Frankenberger C, Gangi L, et al. Microarray comparative genomic hybridization profile of a murine model for epithelial ovarian cancer reveals genomic imbalances resembling human ovarian carcinomas[J]. Tumour Biol, 2005, 26(5): 236-238.
- [23] Hall RM, Stokes HW. The structure of a partial duplication in the integron of plasmid pDGO100[J]. Plasmid, 1990, 23(1): 76-79.

(收稿日期: 2010-07-01)

Th17 细胞及其在神经免疫疾病中的作用

陈怡丽 综述, 姜 饶 审校

(中山大学附属第一医院检验医学部, 广东广州 510080)

关键词: 神经免疫调节; 神经系统自身免疫性疾病, 实验性; 多发性硬化; 自身免疫性脑脊髓炎, 实验性; Th17 细胞**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 02. 049**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)02-0242-03

研究者在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)和胶原蛋白诱导性关节炎的鼠类模型中,发现了一种白介素(IL)-23 相关的且能分泌 IL-17 的新的 Th 细胞亚群-Th17 细胞,为研究免疫调节、宿主防御、自身免疫性疾病和其他慢性炎症疾病的发病机理提供了全新途径。随着对 Th17 细胞的深入了解,研究者发现 Th17 细胞的免疫功能与神经免疫疾病密切相关,以下是详细介绍。

1 Th17 细胞

当原始 T 细胞被激活后,局部细胞因子通过激活特定转录因子决定细胞分化方向。原始 T 细胞在 IL-12 刺激下分化发育成 Th1 细胞,在 IL-4 刺激下变成 Th2 细胞;当机体处在稳定状态下或没有炎症反应时,转化生长因子(TGF)- β 1 抑制效应 T 细胞增殖,诱导形成调节性 T(Treg)细胞,从而维持机体的免疫耐受;但当存在感染时,急性期蛋白 IL-6 大量产生,抑制 Treg 细胞增殖,与 TGF- β 1 共同诱导 Th17 细胞的分化,表达特异性核转录因子 ROR- γ t。

1.1 Th17 细胞的分化调节 (1)促进因子:参与 Th17 细胞分化的细胞因子主要是 IL-1 β 。IL-6 和 IL-23 单独存在均可诱导产生少量的 IL-17,在 IL-1 β 存在下可明显促进 Th17 细胞的分化^[1]。TGF- β 和 IL-6 是 Th17 细胞分化的启动因子,在两者同时存在时,经由 STAT3 通路激活 ROR- γ t,活化的 CD4+T 细胞向 Th17 细胞分化^[2-3]。低浓度 TGF- β 能刺激 Th17 细胞的分化形成,而浓度较高时,无论是否存在 IL-6,均诱导 Treg

细胞分化^[4]。IL-21 是 Th17 细胞中高表达的一个细胞因子,通过自分泌途径调节 T 细胞的分化、发育和功能,扩大 Th17 细胞反应,诱导自身表达,并促进 Th17 细胞增殖^[5]。IL-23 由活化的髓系细胞,如树突状细胞和巨噬细胞产生,对初始 CD4+T 细胞无作用,其主要功能在于促进已分化 Th17 细胞的增殖和维持其存活^[6]。(2)抑制因子:Th1 细胞和 Th2 细胞分泌的干扰素(IFN)- γ 和 IL-4 等对 Th17 的分化和功能有一定影响。Harrington 等^[7]研究发现,同时给予 IFN- γ 和 IL-4 可明显抑制 Th17 细胞发育,阻断 IFN- γ 缺陷的 CD4+T 细胞分泌 IL-17。Th17 细胞分泌的 IL-27、IL-25(IL-17E)等也抑制 Th17 细胞的分化和功能。研究表明,IL-27 可以减轻或抑制 Th17 细胞引起的炎症反应,抑制了 IL-6 介导的 T 细胞增殖作用,从而抑制 Th17 细胞分化,而且此抑制作用依赖于 IFN- γ 和 STAT-1^[8-9]。IL-25 可以促进 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 以及 IL-13,这与其对 Th17 细胞分化的抑制作用是相一致的。

1.2 Th17 细胞分泌的细胞因子 分化成熟的 Th17 细胞分泌许多细胞因子,最具特征性的就是 IL-17(包括 IL-17A 至 IL-17F)。IL-17A 和 IL-17F 同源性最高,均可诱导多种促炎因子和趋化因子的表达,与多种免疫应答性疾病相关。IL-17D(即 IL-27)和 IL-17E(即 IL-25)则抑制 Th17 细胞的分化,减轻或抑制 Th17 细胞引起的炎症反应。除 IL-17 外,Th17 细胞也分泌 IL-21、IL-22 和 IL-26 等多种细胞因子。IL-22 属于 IL-10 家族,其受体表达于各种上皮组织,是介导免疫系统和上皮细