

[12] 闵福援,王健.前 S1 抗原在诊断乙肝病毒复制时的临床价值[J].中华检验医学杂志,2005,28(6):584-586.

[13] 敖必蓉,卢元全.血清 HBV 标志物、前 S2 抗原与 HBV DNA 检测结果的相关性[J].临床输血与检验,2009,11(1):38-40.

[14] 蔡常辉,陈桂山,梁锦胜.乙肝病毒前 S2 抗原的临床应用[J].实用预防医学,2006,13(4):864-865.

[15] 乐爱平,万腊根,郭萌萌,等.乙型肝炎病毒前 S2 抗原抗体系统检测的临床意义[J].江西医学检验,2003,21(5):323-326.

[16] 李程,王永康,王昌源,等.乙型肝炎病毒 X 抗原表达与肝细胞凋亡的相关性[J].中华肝脏病杂志,2013,21(4):252-256.

[17] 诸亚君,李学汤,李文广,等.HBxAg 在肝癌高发人群的表达[J].肿瘤防治研究,2000,27(3):163.

[18] 薛亮.纳米技术在肝脏疾病诊疗中的应用[J].临床肝胆病杂志,2013,29(7):558-560.

[19] 朱锦宏,吴晓蔓.乙肝患者血清 HBV cccDNA 的临床意义[J].实用医学杂志,2013,29(3):395-397.

[20] 陈晷,吴峰,窦晓光,等.慢性 HBV 感染者肝脏 HBV cccDNA 含量相关因素分析[J].临床肝胆病杂志,2013,29(6):434-437.

[21] 李菲菲,任万华,丁贵航,等.肝组织 cccDNA 水平与血清病毒学应答后治疗时间的关系[J].中华肝脏病杂志,2009,17(3):167-170.

[22] 任伟宏,赵素玲,李延卿,等.乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 定量关系的分析[J].检验医学,2010,25(6):438-441.

[23] 朱中梁,汪宏良,马娟.乙型肝炎病毒基因分型及耐药突变基因检测研究[J].中国基层医药,2013,20(8):1203-1205.

[24] 许金金.乙型肝炎病毒标志物临床应用价值探讨[J].国际检验医学杂志,2012,33(19):2354-2356.

[25] 俞杨,邹兰,焦杰,等.乙型肝炎病毒耐药突变对病毒表面抗原编码区的影响[J].国际检验医学杂志,2013,34(12):1518-1520.

(收稿日期:2014-05-15)

• 综 述 •

# 急性心肌梗死的新型标志物循环 microRNAs 的研究

杨立顺 综述,沈兴娅 审校

(天津中医药大学附属北辰中医院,天津 300400)

**关键词:**急性心肌梗死; 循环 microRNAs; 标志物

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.037

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2014)20-2804-04

冠状动脉疾病(CAD)无论在发达国家还是在发展中国家都是一个很常见的健康问题。急性心肌梗死(AMI)是全球死亡的主要原因之一,在美国高居第一位<sup>[1]</sup>。快速、准确的诊断 AMI 对它的治疗和预后起着重要作用。在过去 20 年中,AMI 的生物标志物的发展在诊断、治疗及预后方面已取得了巨大的进步。目前,心肌肌钙蛋白是临床实践中最常用的诊断 AMI 的生物标志物。近年又发现了一种新的生物标志物 MicroRNAs(miRNAs)能够在入院时就能可靠地排除或诊断 AMI 患者<sup>[2]</sup>。在过去的几年发现组织中 miRNAs 表达水平与心脏病有关,miRNAs 在血清、血浆、尿液以稳定的形式存在,不受 RNase 的干扰。在 AMI、急性冠状动脉综合征(ACS)、稳定的冠状动脉疾病、心脏衰竭、冠状动脉粥样硬化、心律失常、心肌肥厚和心脏病患者中已发现了循环的 miRNAs 的浓度变化<sup>[3-6]</sup>。

## 1 miRNAs 的特点

miRNAs 是内源性非编码单链的小分子 RNA,平均长约 22 个核苷酸,具有高度的保守性、时序性和组织特异性。它被认为是基因表达的负面调节器,通过与其目标 mRNA 分子的 3'端非编码区互补匹配导致该 mRNA 分子的翻译转录抑制。目前大约有三分之一的基因受 mRNA 的调控。miRNA 在心血管高度表达,在调控心血管的发育和疾病方面具有重要意义,这给心血管疾病的治疗带来了希望。miRNAs 参与多种生物学过程,如细胞增殖、迁移、分化、分泌、激发、传导,细胞周期和细胞凋亡、老化,通过改变靶基因来表达<sup>[7]</sup>。

在血清或血浆中检测到 miRNAs,被称为循环 miRNAs。尽管大量的研究认为循环 miRNAs 起源是未知的,但一些研究报告表明,miRNAs 在微泡或其他不同类型的细胞中主动分

泌。大约 121 个 miRNAs 被确定来源于肥大细胞<sup>[8]</sup>,神经酰胺生物合成途径中的限速酶鞘磷脂酶 2,控制外来体分泌到细胞外基质<sup>[9]</sup>。此外,微泡或外来体,微粒和脂蛋白复合物(高密度脂蛋白复合物)可能是其他循环 miRNAs 的来源。微粒大于外来体,包含 miRNAs,并积极控制细胞的通信过程。高密度脂蛋白(HDL)运输 miRNAs 并将其传递到受体细胞的功能定位,运送细胞内胆固醇。人类的 HDL 不仅运输内源性 miRNAs,还可以显示不同的功能,在基因调控和细胞间通讯方面存在潜在介质。血浆和血清循环 miRNAs 的检测表明,miRNAs 可能发挥细胞外的生物学功能,可以作为疾病的潜在生物标志物。来自健康受试者被确认的人类基因组的估计编码多达 1 000 个 miRNAs,在血清中有 100 个 miRNAs。

## 2 循环 miRNAs 的性质

从血浆中分离的 miRNAs 高度稳定抗高温耐强酸和强碱。血浆中的浓度稳定,长时间室温放置和多次反复冻融均无影响。据报道,内源性 miRNAs 是以抵抗 RNase 活性形式存在<sup>[10]</sup>。相对于内源性 miRNAs 而言,人血浆合成 miRNAs 在几分钟内被快速降解。失活的 RNase 加入之前,外源性 miRNAs 逃脱降解。因此,外源性 miRNAs 在血浆中是不稳定的,容易迅速降解,而内源 miRNAs 是稳定和耐 RNase 活性。循环 miRNAs 对抗 RNase 的降解是多方面的。例如,循环 miRNAs 在血中不是游离的,它通常被包在微泡或外来体里。此外,循环 miRNAs 可以用一些特殊的蛋白质(如核仁 RNA 结合蛋白,核磷蛋白 1)形成 miRNAs 的配合物来抵抗降解<sup>[11]</sup>。

虽然循环 microRNAs 是稳定的,但高纯度的 miRNAs 分离技术存在挑战。首先,血浆或血清中含有极少量的 RNA,从血浆或血清(通常小于 1mL)中用常规的方法严格的质量控制

分离出极少量的 RNA。其次, 血浆或血清中的高浓度蛋白质可能会干扰样品的制备和检测。最后, 繁多的小 RNA 的类型被当作参考基因(如 U6 RNA, cel-mir-39), 规范 qPCR 数据造成血清或血浆中的极低浓度水平。因此, 必须非常小心的进行标准化控制。

### 3 与急性心梗相关的循环 miRNAs

快速、正确的诊断是治疗和预后的关键。到目前为止, AMI 最常用的生物标志物就是心肌肌钙蛋白、肌酸激酶(MB)。miRNAs 由心肌细胞分泌至血液中, miRNAs 可能反映心血管危险因素和各种病理条件造成的心肌损伤。因此, 心脏特异性强且水平丰富的 miRNAs (如 miR-208、miR-499、miR-133 与 miR-1) 为 AMI 的诊断、治疗和干预提供了唯一的生物标志物。

**3.1 循环 miR-208** 循环 miR-208 是一个心脏水平丰富的 miRNAs, 在心肌组织损伤时高水平表达。它参与心肌细胞的应激反应、激素调节, 与电刺激有关。心脏发育过程中, miR-208 在肌球蛋白重链的产生中发挥了调节作用<sup>[12]</sup>。异丙肾上腺素所致大鼠心肌损伤后, 血浆中循环 miR-208 浓度水平显著增加。但这种现象不是在肾损伤之后, 表明循环 miR-208 是心肌损伤特异性标志物。血浆 miR-208 和心肌肌钙蛋白之间有良好的相关性, 心肌肌钙蛋白又是 AMI 经典的生物标志物。

**3.1.1 miR-208a** 通过微阵列分析, miR-208a 在人心脏是特异表达。miR-208a 在健康者或非 AMI 患者(如急性肾损伤、慢性肾衰竭、中风、创伤等)血浆中无法检测, 90.9% 的 AMI 患者及 100% 胸痛发作 4 h 的 AMI 患者血浆中能检测, 但在这阶段心肌肌钙蛋白未必检测出来。表明 miRNAs 在心肌损伤早期释放入血液。Xiao 等<sup>[13]</sup> 研究显示: 在心肌梗死后的 4 h 和 24 h 血清 miR-208a 分别增加 36 倍和 51 倍。因此可推测, 早期诊断 AMI 患者, 循环 miR-208a 优于心肌肌钙蛋白。成年小鼠循环 miR-208a 在 AMI 后持续升高, 这可能是由于在人类和小鼠之间不同的 miRNAs 表达模式。miR-208a 编码在  $\alpha$ -心肌肌球蛋白重链基因(MYH6)内, miR-208b 是 miR-208 亲密的家庭成员, 编码在  $\beta$  心肌肌球蛋白重链基因(MYH7)内。小鼠和人类存在 miR-208a 和 miR-208b 间的高度同源性。AMI 后, 血浆 miR-208a 持续升高的可能原因是 miR-208b 干扰。

**3.1.2 miR-208b** 急性 ST 段抬高心肌梗死(STEMI)患者, 在梗死发生后的 12 h 内, 血浆 miR-208b 的水平比健康者增加了 3 000 倍。miR-208b 的峰值、肌钙蛋白的峰值以及相关的射血分数有很好的相关性, 表明循环 miR-208b 可能是诊断或预测 STEMI 的生物标志物<sup>[14]</sup>。AMI 患者, 血浆 miR-208b 比健康者增加 1600 倍。受试者工作特征 ROC 曲线分析显示, ROC 曲线下面积(AUC)为 0.94, 表明 miR-208b 是 AMI 理想的生物标志物。在 miR-208b 血浆水平变化与血浆肌钙蛋白 T 的一致, 表明 miR-208b 同肌钙蛋白 T 一样从心肌损伤细胞释放<sup>[15]</sup>。然而, 并不是所有研究都支持 miR-208 作为 AMI 的生物标志物。Adachi 等<sup>[16]</sup> 报道, 循环 miR-208b 出现在 AMI 患者中的浓度者是非常低的, 只是 AMI 诊断的生物标志物之一。另一项研究表明, 循环 miR-208b 可作为 AMI 生物标志物, 但它并不显示优于肌钙蛋白<sup>[17]</sup>。

**3.2 miR-499** miR-499 基因编码在心室特异肌球蛋白重链基因内, 其几乎只在心脏中表达<sup>[18]</sup>。miR-499 血浆水平在 AMI 患者明显增加, 但在急性冠脉综合征、充血性心脏衰竭和健康者低于检测限。这些结果表明, 循环中 miR-499 可能是 AMI 诊断的一个有用的生物标志物。已被证明急性 STEMI

和 AMI 患者的 miR-499 血浆水平与健康者相比增加 250 倍或 100 倍。有研究显示, 在心肌梗死后的 4 h 和 24 h, miR-499 升高 103 倍和 95 倍。在心肌梗死区比较偏远的组织或假手术组 miR-499 的表达水平显著降低, 证明 miR-499 可能是从受损的心脏组织释放到血液。ROC 曲线下面积为 0.92, 这是与循环心肌肌钙蛋白相关。AMI 患者胸痛小于 3 h, miR-499 阳性率 93%, 超敏心肌肌钙蛋白阳性率为 88%, 这表明 miR-499 是诊断 AMI 的敏感生物标志物<sup>[19]</sup>。循环 miR-499-5p 是 miR-499 的家庭成员, 在老年组急性非 ST 段抬高心肌梗死(NSTEMI)中比健康者增加超过 80 倍。ROC 曲线分析表明, miR-499-5p 诊断的准确性高于肌钙蛋白(miR-499-5p、心肌肌钙蛋白及超敏心肌肌钙蛋白的 AUC 分别是: 0.86、0.68 和 0.70)。老年 miR-499-5p 在诊断急性 NSTEMI 时比传统的心肌肌钙蛋白准确度高, 因此, 循环 miR-499-5p 是一个潜在的生物标志物<sup>[20]</sup>。最近一项研究表明, miR-499-5p 在 AMI 患者中明显升高, 与左室射血分数值呈负相关, 进一步表明循环 miR-499-5p 可作为死亡风险评估的指标<sup>[21]</sup>。

**3.3 miR-133** 在大鼠 AMI 模型中, 冠状动脉结扎后, miR-133a 的血浆水平在 1~3 h 增加, 3~12 h 高峰, 12~24 h 下降。急性心肌梗死患者的 miR-133 血浆水平比健康者明显升高。同时血浆心肌肌钙蛋白与 miR-133 之间呈正相关。这些结果证明, miR-133 是诊断 AMI 的生物标志物。然而, 也有一些对循环 miR-133 不同的报告。在一份报告中, 被发现 AMI 患者 miR-133 血浆水平与健康者无显著差异<sup>[22]</sup>。在心动过速、心动过缓和心律失常的 AMI 患者中循环 miR-133 无明显变化。据报道, 血浆中的 miR-133b 和 miR-133a 是 miR-133 的家庭成员, 在急性 STEMI 患者血浆中比健康者水平高, 在发生急性 STEMI 后 156 min 左右达到高峰, 与心肌肌钙蛋白水平变化的时间过程呈一致性<sup>[23]</sup>。

**3.4 miR-1** 有报道, miR-1 的血浆水平在 AMI 的人或老鼠中明显增加, 非心肌梗死冠心病或其他心血管疾病患者仅轻度增高。在冠脉结扎致大鼠 AMI 模型中, 血清 miR-1 水平迅速增加约 200 倍, AMI 后 6 h 达峰值, 在 AMI 后 3 d miR-1 水平恢复到基础水平, 与心肌梗死面积呈正相关。在临床研究中, AMI 患者循环 miR-1 的水平比健康者增加了近 100 倍, 并与血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平呈正相关。在另一个单独的临床研究中, AMI 患者与非 AMI 组血浆 miR-1 水平相比明显升高, 在出院后药物治疗恢复正常。血浆 miR-1 的增加与年龄、性别、高血压、糖尿病及 AMI 生物标志物如 cTnT 和 CK-MB 均无关。此外, 在培养心肌细胞的坏死模型, miR-1 被释放到培养基中, 至少稳定 24 h。总的来说, 这些结果强烈支持循环 miR-1 可能是诊断 AMI 的一个新的敏感的生物标志物<sup>[24]</sup>。

### 4 其他循环 miRNAs

在理论上, 循环 miRNAs 变化是 AMI 后由于心肌受损 miRNAs 释放到血液中的。然而, 有证据表明, 循环 miRNAs 许多变化可能不是来源于受损心肌。在最近的研究中, AMI 患者和健康者外周血标本进行了全基因组分析, 结果发现, AMI 患者 121 个 miRNAs 失调。在检测组中 miR-30c 和 miR-145 的水平被认为与梗死面积相关, 在疾病的控制方面敏感特异的指标是 miR-1291 和 miR-663b, 20 个 miRNAs 的特征标志对 AMI 有很强的预测价值<sup>[25]</sup>。这些结果表明, miRNA 来源于外周血细胞, 可作为一种新型的 AMI 诊断的敏感的生物标志物。

miR-126 在人内皮细胞高度表达。它可能在血管内皮的

完整性、内皮细胞的稳态调控和血管新生方面起作用<sup>[26]</sup>。循环血浆 miR-126 在 AMI 时与健康者比较明显下降。在 AMI 时 miR-126 的血浆浓度与心肌肌钙蛋白的血浆浓度存在良好的相关性<sup>[27]</sup>。心肌损伤患者循环 miR-126 水平与非冠状动脉疾病的患者相比明显降低<sup>[28]</sup>。最近一项前瞻性研究报道,循环 miR-126 与致命性心肌梗死呈正相关<sup>[29]</sup>。

到目前为止,越来越多的心源性或非心源性循环 miRNAs 被报道为 AMI 的潜在生物标志物。在文献综述中与 AMI 相关的循环 miRNAs,至少 13 个 miRNAs 作为 AMI 的潜在生物标志物。其中,心脏特异及富含的 miRNA(如 miR-208、miR-499、miR-133 和 miR-1)吸引了更多的关注<sup>[15-16,22]</sup>。miR-499 和 miR-208 在心脏很难检测到,miR-133 和 miR-1 在骨骼肌和心肌高度表达,在理论上 miR-499 和 miR-208 在诊断 AMI 上比 miR-133 和 miR-1 占优势。实际上,有研究对大鼠 AMI 模型和人 AMI 时血浆 miR-208、miR-499、miR-133 及 miR-1 的水平比较和分析后,认为这 4 种 miRNAs 中 miR-208 是诊断 AMI 的一个更可靠的生物标志物。然而,Devaux 等<sup>[19]</sup>的研究表明,循环 miR-499 明显优于 miR-208 检测心脏损伤。因此,还需要进一步的研究来确定 miR-208 与 miR-499 谁是 AMI 的诊断最有潜力的生物标志物。

## 5 小 结

总之,循环 miRNAs 是抗内源性核糖核酸酶活性。可以在人血浆或血清中以非常稳定的形式存在。循环 miRNAs 为 AMI 的诊断提供一个新的和微创的生物标志物。直到现在,大约 20 个 miRNAs 被视为 AMI 潜在的生物标志物。然而,大部分的结果都是基于相对小的样本,从而导致不同的报道之间有许多分歧。因此,有必要进行独立的大型队列研究,以确定这些循环 miRNAs 对 AMI 的诊断价值。到目前为止,大多数研究侧重于循环 miRNAs 作为生物标志物在 AMI 诊断中的作用。循环 miRNAs 在对 AMI 预后的影响依然缺乏。

## 参考文献

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2011, 123(4): 18-209.
- [2] Lindahl B. Acute coronary syndrome—the present and future role of biomarkers[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(9): 1699-1706.
- [3] Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(5): 872-875.
- [4] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2010, 107(5): 677-684.
- [5] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure[J]. *Circ Res*, 2010, 106(6): 1035-1039.
- [6] Pan ZW, Lu YJ, Yang BF. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(1): 1-9.
- [7] Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 336-342.
- [8] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9): 838-848.
- [9] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17442-17452.
- [10] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7223-7233.
- [11] Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(20): 7248-7259.
- [12] Malizia AP, Wang DZ. MicroRNAs in cardiomyocyte development[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2011, 3(2): 183-190.
- [13] Xiao J, Shen B, Li J, et al. Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(1): 136-141.
- [14] Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, et al. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples[J]. *Cardiology*, 2011, 118(4): 217-226.
- [15] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3(6): 499-506.
- [16] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(7): 1183-1185.
- [17] Li YQ, Zhang MF, Wen HY, et al. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction[J]. *Clinics*, 2013, 68(1): 75-80.
- [18] Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, et al. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): 19481.
- [19] Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(3): 559-567.
- [20] Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(2): 531-536.
- [21] Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2013, 13(12): 12.
- [22] Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 73-77.
- [23] D'alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(22): 2765-2773.
- [24] Cheng Y, Tan N, Yang J, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 119(2): 87-95.
- [25] Meder B, Keller A, Vogel B, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(1): 13-23.
- [26] Mocharla P, Briand S, Giannotti G, et al. Angiomir-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PB-MCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetes[J]. *Blood*, 2013, 121(1): 226-236.
- [27] Long G, Wang F, Duan Q, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocar-

dial infarction[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(6): 811-818.

[28] De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, et al. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs[J]. Circulation, 2011, 124(18): 1936-1944.

[29] Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, et al. Prospective study on cir-

culating MicroRNAs and risk of myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(4): 290-299.

(收稿日期: 2014-06-15)

• 综 述 •

## 革兰阴性杆菌中应激反应机制对细菌耐药调控的研究进展

周丽芳 综述, 赵 虎 审校

(复旦大学附属华东医院, 上海 200040)

**关键词:** 革兰阴性杆菌; 抗菌药物; 应激; 耐药; 进化

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.038

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)20-2807-04

随着抗菌药物的广泛应用, 革兰阴性杆菌的耐药率不断升高, 并已成为医院感染的主要致病菌。近年来, 国内外的学者从基因层面揭示了革兰阴性杆菌的耐药机制新特点, 对致病性革兰阴性杆菌进行靶点治疗提供了新的方向。革兰阴性杆菌的耐药机制非常复杂, 目前被认知的有九种机制<sup>[1]</sup>:  $\beta$ -内酰胺酶的产生、外排泵的激活、opr 孔蛋白的缺失、青霉素结合蛋白结构的改变、抗菌药物修饰酶的产生、位点突变、核糖体的突变或修饰、代谢旁路机制以及脂多糖的突变等。虽然许多研究报道已经从基因乃至晶体结构方面研究了革兰阴性杆菌的耐药特点, 但多数医院甚至许多大型医疗机构进行的医院感染控制与监测所取得的效果并不甚好, 革兰阴性杆菌的耐药现状依然严峻。因此, 单从分子层面研究细菌的耐药性显然不够。革兰阴性杆菌的耐药性难以消除, 在应用分子靶点对抗耐药菌株的同时可以通过发现影响细菌耐药性的其他机制去寻求更为有效稳定的治疗方式。根据新的研究报道<sup>[2]</sup>, 细菌对外部不利环境产生的保护性应激机制会对革兰阴性杆菌的耐药性产生显著影响, 这为临床上的抗感染治疗提供了更广阔的思路。据研究者所知, 目前国内对革兰阴性杆菌的保护性应激机制的研究报道甚少, 因此, 革兰阴性杆菌中的保护性应激机制对菌株耐药性产生的影响是首次进行综述。

### 1 应激反应的定义

自然界中或寄生在人体中的细菌在生长过程中会经历多种不利因素, 这种生存压力多数情况下可激活细菌的保护性应激反应, 以提高自身的生存率。应激反应是指机体(这里是指细菌)在受到各种内外环境因素刺激时所出现的非特异度全身反应。细菌的保护性应激反应机制会影响菌株对抗菌药物的灵敏度——抗菌药物作为施压因素激活细菌的压力应激机制, 进而促使细菌的耐药机制进化<sup>[2]</sup>。

### 2 革兰阴性杆菌中保护性应激机制的激活因素

研究表明, 外部因素如营养缺乏、氧化或硝酸化、细菌包膜(包括细胞壁和细胞膜)的破坏、抗菌药物的作用以及其他生长不利因素均与革兰阴性杆菌耐药机制的进化有关, 前者激活的应激机制可以改变细菌的生理功能、激活细菌的耐药机制、增强细菌的耐药能力、诱导细菌的耐药突变<sup>[2]</sup>。在药敏试验中, 细菌的体内敏感率与体外敏感率有所不同, 且在无抗菌药物的条件下, 细菌的诱导性突变亦可发生<sup>[3]</sup>。这些结论亦表明, 外部环境可对细菌的耐药性产生影响。以往有研究报道, 缺镁会

导致铜绿假单胞菌对阳离子药物如多黏菌素耐药<sup>[4-5]</sup>; 缺铁会导致大肠杆菌对  $\beta$ -内酰胺类耐药<sup>[6]</sup>。最近又有研究表明<sup>[7]</sup>, 缺磷将使大肠杆菌对氟喹诺酮类耐药; 氨基酸缺乏将导致大肠杆菌对氟喹诺酮和阿米西林的耐药; 若同时缺乏氨基酸和葡萄糖将使大肠杆菌对氧氟沙星和阿米西林的耐受性更为持久。以上压力因素均可改变细菌的生理功能, 进而改变细菌对抗菌药物的灵敏度。抗菌药物本身亦可激发细菌的保护性应激机制, 如氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物可破坏细菌核糖体的翻译, 阻断 DNA 表达, 进而激活保护性应激机制(耐药决定子可参与其中)。总之, 在经历多种生长抑制性后, 细菌的保护性应激机制得到了很好的进化, 进而巩固了细菌的耐药机制。

### 3 革兰阴性杆菌中保护性应激机制的激活对菌株耐药的调控与影响

#### 3.1 氧化、硝化应激机制与革兰阴性杆菌耐药

**3.1.1 氧化应激(OS)的定义** 绝大多数的耐药决定因子及其调控蛋白均会受到氧化和硝化的压力作用, 氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡, 倾向于氧化, 导致细胞炎症浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。硝化应激是氧化应激的一种。

**3.1.2 SoxRS 应激调节因子** 在氧化应激作用过程中一种关键应激调节因子叫做 SoxRS, 最初该调节因子被称为“超氧反应双重调节系统(TCS)”<sup>[8]</sup>, 调节大肠杆菌及其他肠杆菌科的超氧化应激机制。在需氧细胞里, 它可被氧化还原循环药物(如百草除, 一种除草剂)超氧化。但目前, 上述细菌已对氧化还原循环药物形成了适应性应激<sup>[9]</sup>。除菌剂作为普遍的氧化物, 可直接激活 SoxRS 控制的基因的表达。SoxRS 可以调控 RND 家族(细菌外排系统四大组成家族之一)的 acrAB-TolC 多药外排系统, 该系统是保护性应激机制的重要组成部分。在此外排系统中, acrAB 基因的表达可被 SoxS 调控, 而外排系统的突变可导致 SoxS 的持续高表达, 从而使 acrAB 的表达量增加, 最终导致细菌耐药性的增强<sup>[10-11]</sup>。

**3.1.3 mexR 操纵子** 铜绿假单胞菌中存在另外一种多药外排系统调节因子-mexAB-oprM 多药外排系统的操纵子 mexR, 可对氧化作用产生应激。在体外, 对 mexR 的过氧化或氢过氧化可以导致该抑制性操纵子从其靶点 mexAB-oprM 的启动子 DNA 游离出来。因此, 体内的铜绿假单胞菌若暴露在氧化抗菌药物条件下将使 mexAB-oprM 的表达量增加。RND 家族的