

- [23] Hori Y, Oda Y, Kiyoshima K, et al. Oxidative stress and DNA hypermethylation status in renal cell carcinoma arising in patients on dialysis[J]. *J Pathol*, 2007, 212(2): 218-226.
- [24] Akan B, Böhmig G, Sunder-Plassmann G, et al. Prevalence of hypercalcitoninemia in patients on maintenance dialysis referred to kidney transplantation [J]. *Clin Nephrol*,

2009, 71(5):538-542.

- [25] Schwarz A, Vatandaslar S, Merkel S, et al. Renal cell carcinoma in transplant recipients with acquired cystic kidney disease[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2(4): 750-756.

(收稿日期:2010-02-26 修回日期:2010-06-13)

· 综 述 ·

## 结核分枝杆菌 RD1 区研究进展

彭 哲 综述, 朱朝敏<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科 400014)

关键词:分枝杆菌, 结核; 差别 1 区; ESX-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.042

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)01-0089-03

根据 WHO 的报告, 中国是全球结核病高发国家之一, 患者数位居世界第 2 位, 仅次于印度<sup>[1]</sup>。因此, 控制和预防结核病已成为当务之急。1999 年 Behr 等<sup>[2]</sup>用 DNA 芯片技术比较了结核分枝杆菌 H37Rv, 牛结核分枝杆菌和卡介苗(BCG)3 者的全基因组, 发现牛结核分枝杆菌基因组与结核分枝杆菌 H37Rv 相比, 有 11 个差别区(region of difference, RDs), BCG 则在牛分枝杆菌的基础上, 还多了 5 个差别区, 相对于结核分枝杆菌 H37Rv 共有 129 个开放读码框缺失。其中差别 1 区(region of difference 1, RD1)是唯一的 BCG 基因组缺失, 而且是致病性分枝杆菌存在的区域。RD1 区这一独特的遗传缺失区域, 不禁让人联想它在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)中的毒力机制和在宿主的免疫反应中所发挥的作用, 因此 RD1 区也成为目前结核研究的热点。

### 1 RD1 区的结构及其编码的蛋白

RD1 区基因全长 9 455 bp, 它包括 9 个开放读码框(Rv3871~3879c), 分别编码 9 种蛋白。Rv3871 蛋白含 591 个氨基酸, 基因生物信息学分析表明在核苷酸的第 250~273 和 1 126~1 149 位上具有 AAA ATP 酶结合结构域, 与 Rv3870 均可能为 FtsK-SpoIII E ATP 酶家族成员。Rv3872 基因编码 PE35 蛋白, 它与 Rv3873 编码的 PPE68 蛋白分别是 PE 和 PPE 蛋白家族成员。这两大富含甘氨酸的蛋白家族在基因组中广泛分布, 接近编码总量的 10%, 可能与抗原变异、干扰抗原提呈等过程相关, 具有重要的免疫学意义。Rv3874 和 Rv3875 分别编码两个低相对分子质量的分泌蛋白, 培养滤液蛋白 10(CFP-10)和 6 kD 早期分泌抗原靶(ESAT-6), 它们均是 ESAT-6/WXG100 家族成员。这两个基因以单拷贝形式分布于 MTB 中, 由同一个启动子调节转录, 转录后以紧密的 1:1 异二聚体高亲和性形式分泌出细胞壁, 是 RD1 区编码的关键毒力蛋白<sup>[3]</sup>。Rv3876 编码 N 端富含脯氨酸的蛋白。Rv3877 编码膜蛋白, 有 11 个转膜结构域, 可以穿过脂质双分子层, 提示其可能是跨膜转运的通道。Rv3878 编码 MTB27.4 蛋白, 只存在于 MTB H37Rv 株、Erdman 株和牛分枝杆菌中。该蛋白主要位于细胞质, 只有少量为分泌蛋白。Rv3879c 编码的蛋白包含 729 个氨基酸, 它在分枝杆菌中显示了其基因序列多态性, 该蛋白并未发现有跨膜结构和分泌信号。

### 2 RD1 区与 ESAT-6 分泌系统 1 类(ESX-1)蛋白质分泌转运

### 途径

Stanley 等<sup>[4]</sup>在筛选 RD1 区的毒力基因时, 发现由 RD1 区的部分基因及其扩展区构成了一套独特的结核杆菌毒力蛋白分泌系统, 其中包括 Rv3870、Rv3871、Rv3877 3 个组成元件和 ESAT-6、CFP-10 两个反应底物。将其命名为分枝杆菌分泌系统(SNM)独立分泌系统, 也被称为 ESX-1。在 RD1 区的基因中, Rv3873 和 Rv3876 并不影响 ESAT-6 和 CFP-10 分泌, 而且在一些临床分离的 MTB 毒力株中观察到 Rv3878 和 Rv3879c 处于不完整状态<sup>[5]</sup>, 因此认为这 4 个基因不是 ESX-1 的组成部分。其后实验发现, 为维持 ESX-1 的分泌功能, 除了 Stanley 等<sup>[4]</sup>所观察到的外, 可能还包括总量不少于 14 个的组成元件, 它们很多位于 RD1 区外, 并且根据不同的分枝杆菌种属有不同的数目<sup>[6]</sup>。ESX-1 怎样将蛋白分泌出极厚的 MTB 细胞壁, 具体过程现在并不清楚, 但已知 ESAT-6 和 CFP-10 并无经典分泌引导序列或信号肽, 因此其分泌表达肯定不依赖于经典的 Sec 途径。一些实验推测, 它们可能是多个蛋白质协同作用来完成分泌的。在它核心组成成分中, Rv3869、Rv3870 和 Rv3877 编码的蛋白, 分别有 1、3 和 11 个跨膜区域, 它们与 Rv3871、Rv3868 结合在一起, 形成一套利用 ATP 水解供能的膜结合分泌复合物。ESAT-6 和 CFP-10 被分泌前形成紧密的 1:1 异二聚体, 当 Rv3871 识别 CFP-10 无序羧基末端的 7 个氨基酸后, 与 Rv3870 在细胞膜上形成活性 ATP 酶, 同时将信号经 Rv3870 传递给膜结合分泌复合物, 打开通道(Rv3877 蛋白), 水解 ATP 后将 ESAT-6/CFP-10 异二聚体分泌出细胞膜<sup>[6]</sup>。目前还有很多蛋白只知道是这一分泌过程所必需的, 但功能未明。例如 Rv3883c 编码的类似枯草杆菌溶素的丝氨酸蛋白酶、Rv3872 编码的 PE35 等, 需要进一步研究<sup>[7]</sup>。

Rv3616c-Rv3614c 基因区是 ESX-1 分泌系统的关键调节部位。Rv3616c 编码蛋白产物 EspA, 能被 ESX-1 系统分泌, 它与 ESAT-6、CFP-10 分泌是互相依赖的, 缺少其中任何一个, 其余底物的分泌都将失败, 而 Rv3849 编码的 EspR 能活化 Rv3616c-Rv3614c 基因启动子, 同时 EspR 自身也能被 ESX-1 系统分泌。这样便形成了一个负反馈调节圈, 使 ESX-1 系统的分泌处于一个动态平衡的状态<sup>[8]</sup>。除了 EspR 外, 反应调节蛋白 PhoP 也是 Rv3616c-Rv3614c 的调节因子。如果 PhoP 基因发生点突变, 则 PhoP 不能同该 DNA 功能结合域结合, 从而

<sup>△</sup> 通讯作者, 电话:13648357117; E-mail:zhuchaomin@yahoo.com.cn。

降低 Rv3616c-Rv3614c 的表达,最终使 ESX-1 分泌失效<sup>[9]</sup>。

ESX-1 非常类似于革兰阴性杆菌中经典的 IV 型分泌系统。例如:与 CFP-10 分泌相似,IV 型分泌系统也是通过识别底物非结构化的羧基末端,直接将其分泌出细胞膜的。而且识别单位通常为成对的 FtsK-SpoIII E ATP 酶,并具有 2 个跨膜区和 1 个胞浆区。而 ESX-1 分泌系统的 Rv3870 和 Rv3871 特征与其吻合。但 ESAT-6 和 CFP-10 能存在于体外培养的培养液中,这与革兰阴性菌 IV 型分泌机制不同,它们是通过与宿主细胞的相互作用来促进分泌的。因此推测 ESX-1 并不仅仅是 MTB 的毒力系统,可能还具有其他生理功能。由于 ESX-1 由 1 组独特的蛋白构成,主要的分泌底物都是 ESAT-6/WXG100 蛋白家族成员,并且蛋白在分泌过程中是相互依存的,只存在于革兰阳性菌中,这使其不同于已知的 I~VI 型分泌系统,因此将这一新类型的分泌体系称为 VII 型分泌系统<sup>[6]</sup>。

### 3 RD1 区的毒力作用机制

研究发现引入 RD1 的 BCG 在动物实验上有与结核毒力株相类似的病理表现,而失去 RD1 的 MTB 其致病能力明显减弱<sup>[10]</sup>。Stanley 等<sup>[4]</sup>发现的 ESX-1 分泌系统,则合理的解释了 RD1 的毒力来源。ESX-1 对宿主的毒力作用表现在许多方面。实验表明,ESX-1 能够诱发肺表面上皮细胞和巨噬细胞溶解,这有助于结核杆菌侵入肺间质,主要机制可能是 ESAT-6 在宿主细胞膜表面形成通道,致死性的离子流最终导致细胞溶解坏死<sup>[11]</sup>。还有实验认为 ESX-1 分泌的 CFP-10/ESAT-6 复合物起分子信号的作用。它们通过与宿主细胞表面特异性受体结合以调节宿主细胞的行为<sup>[12]</sup>。Davis 和 Ramakrishnan<sup>[13]</sup>通过对感染斑马鱼的海分枝杆菌的研究发现也支持这一点,在早期感染阶段,ESX-1 的一个或多个的成分使感染的巨噬细胞分泌聚集信号,诱导未感染的巨噬细胞聚集,并吞噬新形成的肉芽肿,导致结核杆菌快速增长和扩散,而 ESX-1 缺失的海分枝杆菌在巨噬细胞间的扩散明显减弱。如果巨噬细胞内的吞噬溶酶体吞噬了 MTB,它分泌的 CFP-10/ESAT-6 复合物则在溶酶体内酸性条件下解离,ESAT-6 将结合到脂质体上并导致其溶解,MTB 从而逃入细胞质而避免被杀死<sup>[14]</sup>。ESX-1 其他的致病性效应还包括抑制巨噬细胞的信号传递,以此阻碍促炎症细胞因子的产生等<sup>[4]</sup>。以上研究表明,RD1 区编码的 ESX-1 对 MTB 的致病性发挥了重要作用。

### 4 RD1 区编码蛋白的免疫原性

随着 MTB 的许多 T 细胞抗原被鉴定,令人惊讶的是在 RD1 区的 9 个基因中,除 Rv3876、Rv3877 外,其余基因编码的蛋白都具有 T 细胞抗原决定簇,这可能形成了一个免疫原性岛。但不同的抗原诱发 T 细胞反应的能力并不一样,Brusasca 等<sup>[15]</sup>将 Rv3871~Rv3875、Rv3878 编码的 6 种蛋白测试感染结核豚鼠的迟发型超敏反应(DTH),发现只有 CFP-10 和 EAST-6 有明显的 DTH 反应,而 Rv3873(PPE68)仅引出 2~4 mm 的低水平反应,其余则为阴性。同时测试肺结核患者的血清抗体阳性率,也是以 EAST-6 和 CFP-10 最高。另外,Rv3873(PPE68 蛋白)在健康对照组中有阳性反应,考虑是受到广泛分布在分枝杆菌中 PPE 家族的交叉反应的干扰所致。Caroline 等<sup>[16]</sup>也发现 Rv3872(PE35)、Rv3878、Rv3879c 不能诱导 C57BL/6 小鼠体内出现明显的  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )。目前还没有证据表明伴侣蛋白 Rv3876、膜蛋白 Rv3877 具有抗原性。

### 5 RD1 区的相关应用进展

5.1 在疫苗方面 BCG 是现在预防结核病的惟一菌苗,但它在不同地区的保护效果差异显著,一些学者认为 BCG 在传代过程中过度减毒降低了其保护力,后有人将 RD1 片断引入

BCG,证实其产生的免疫保护力超过了未重组的 BCG,这为研究者提供了新的思路,即适当恢复 BCG 的毒力有助于提高疫苗的保护力<sup>[17]</sup>。在进一步研究 RD1 区编码的蛋白时又发现 ESAT-6 和 CFP-10 都是诱导 IFN- $\gamma$  分泌的优势抗原,而 IFN- $\gamma$  可显著活化巨噬细胞,提高对胞内结核菌生长的抑制作用和杀伤能力,并且 ESAT-6 是记忆性 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的靶分子,能诱导持续的免疫力<sup>[18]</sup>。但实验显示,只有具备完整 ESX-1 分泌系统的重组 BCG 才能诱发 EAST-6 特异性的 T 细胞反应,否则,即使重组 BCG 细胞质内具有 EAST-6,如不能分泌,也不能诱发相应的 T 细胞反应<sup>[7]</sup>。提示疫苗具有有效的抗原分泌是产生免疫保护作用的关键之一。MTB 的许多分泌蛋白都是重要的保护性抗原,通过对 ESX-1 分泌机制的研究,也许将对制备新型疫苗有重要帮助。目前丹麦哥本哈根血清研究所研发的结核菌 Ag85B-ESAT-6 融合蛋白疫苗正在进入临床实验,期望在不久的将来可以得到更多高效安全的新疫苗。

5.2 在诊断方面 RD1 区编码的蛋白中 PE35、PPE68、RV3878、RV3879c 都具有用于血清学诊断抗原的潜力,但它们的特异性或敏感性均较 CFP-10 和 ESAT-6 差。实验表明当 ESAT-6 和 CFP-10 联合使用检测 MTB 感染时,其敏感性和特异性均明显高于结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)<sup>[19]</sup>。它们不仅可将人或牛 MTB 感染、BCG 接种和环境中的非致病性分枝杆菌区别开,而且还可将由于 BCG 接种和接触非致病性分枝杆菌所造成的 PPD 假阳性区分开。由于增殖期和非复制期的 MTB 在细胞内生长期间都高度表达 ESAT-6。因此,无论是在活动性结核病还是在感染潜伏期,ESAT-6 均可诱导细胞免疫反应,这也为诊断潜伏结核感染提供了重要的手段。尤其重要的是,它们对 HIV 感染的潜伏结核病患者也有较高的敏感性和特异性,这有助于尽早对这些患者使用抗结核预防治疗<sup>[20]</sup>。现国际上已有将 ESAT-6 和 CFP-10 作为诊断抗原的 IFN- $\gamma$  体外释放检测商品试剂盒供应,如 Quanti-FERON-TB-GOLD (Cellestis Ltd., Carnegie, Victoria, Australia) 与 T-SPOT. TB test (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) 等。FDA 已批准将该方法用于结核病潜伏感染的检测。以上实验及检测方法为结核病的诊断提供了重要的临床和试验价值,值得进一步深入研究。

综上所述,目前对 RD1 区的研究和应用都已取得了长足的进展,但仍不清楚 ESX-1 的具体分泌机制,ESAT-6 和 CFP-10 作为毒力蛋白,如何作用于细胞表面及细胞内成分也尚未完全阐明,而且在 MTB 中还有与 ESX-1 同源的其他 4 个 ESX 分泌系统,它们之间的关系及各自的生理功能也需要进一步研究,如果能够解释这些难题,将可能帮助找到新的结核药物的靶向位点,以及获得更加安全有效的新疫苗。

### 参考文献:

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008[R]. Geneva:WHO,2008:393.
- [2] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray[J]. Science,1999,284(5419):1520-1523.
- [3] Tan T, Lee WL, Alexander DC, et al. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of mycobacterium marinum modulates phagosome maturation[J]. Cellular Microbiology,2006,8(9):1417-1429.
- [4] Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, et al. Acute infec-

- tion and macrophage subversion by mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(22): 13001-13006.
- [5] Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence [J]. Tuberculosis, 2008, 88(6): 510-517.
- [6] Abdallah A, Geyvan PN, Champion P, et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(11): 883-891.
- [7] Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence [J]. Infect Immun, 2006, 74: 88-98.
- [8] Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, et al. Secreted transcription factor controls mycobacterium tuberculosis virulence [J]. Nature, 2008, 454(7205): 717-721.
- [9] Wang S, Engohang-Ndong J, Smith I. Structure of the DNA-binding domain of the response regulator PhoP from mycobacterium tuberculosis [J]. Biochemistry, 2007, 46: 14751-14761.
- [10] Liu J, Tran V, Leung AS, et al. BCG vaccines; their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy [J]. Hum Vaccin, 2009, 5(2): 70-78.
- [11] Kaku T, Kawamura I, Uchiyama R, et al. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion [J]. Fems Microbiol Lett, 2007, 274(2): 189-195.
- [12] Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6 [J]. EMBO J, 2005, 24(14): 2491-2498.
- [13] Davis JM, Ramakrishnan L. The Role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection [J]. Cell, 2009, 136: 37-49.
- [14] De Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, et al. ESAT-6 from mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity [J]. J Bacteriol, 2007, 189(16): 6028-6034.
- [15] Brusasca PN, Colangeli R, Lyashchenko KP, et al. Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the mycobacterium tuberculosis genome [J]. Scand J Immunol, 2001, 54(5): 448-452.
- [16] Caroline D, Priscille B, Paul JC, et al. Cell envelope protein PPE68 contributes to mycobacterium tuberculosis RD1 immunogenicity independently of a 10-kilodalton culture filtrate protein and ESAT-6 [J]. Infection and immunity, 2004, 72(4): 2170-2176.
- [17] Kalra M, Grover A, Mehta N, et al. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice [J]. Clin Immunol, 2007, 125(2): 173-183.
- [18] Aagaard CS, Hoang TT, Vingsbo-Lundberg C, et al. Quality and vaccine efficacy of CD4+ T cell responses directed to dominant and subdominant epitopes in ESAT-6 from mycobacterium tuberculosis [J]. J Immunol, 2009, 183(4): 2659-2668.
- [19] Codecasa L, Mantegani P, Galli L, et al. An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 1944-1950.
- [20] Jiang W, Shao L, Zhang Y, et al. High-sensitive and rapid detection of mycobacterium tuberculosis infection by IFN-gamma release assay among HIV-infected individuals in BCG-vaccinated area [J]. BMC Immunol, 2009, 10(1): 31.

(收稿日期: 2010-02-06 修回日期: 2010-05-19)

• 综 述 •

## ERCC1、RRM1、 $\beta$ -tubulin III 在非小细胞肺癌化疗中作用的研究进展

盖 领 综述, 茅国新 审校  
(南通大学, 江苏南通 226001)

**关键词:** 核苷酸还原酶类; 微管蛋白质类; 癌, 非小细胞肺; 切除修复交叉互补基因 1

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)01-0091-03

肺癌是肿瘤导致死亡的最常见原因, 其中约 80% 为非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC), 在新诊断的患者中, 有 65% 已不能行手术治疗, 因此化疗是肺癌的主要治疗手段之一, 但治疗的有效率仅为 20%~40%, 中位生存期不足 10 个月。随着第 3 代化疗药物的出现和应用, 肺癌的治疗效果有了进一步的提高, 但并未取得突破性进展, 而这些第 3 代化疗药物与铂类联合的化疗疗效似乎已经达到一个平台。随着对功能性基因组研究的深入, 近年来提出了肿瘤个体化治疗的新理念, 在 2009 年美国临床肿瘤学会 (ASCO) 年会中提出 NSCLC 治疗更应遵循这一原则。个体化治疗是根据肿瘤生物

学和药物基因组学的改变进行针对性治疗。这是建立在循证医学基础上, 从而在分子、蛋白、基因水平上指导肺癌治疗, 是目前肺癌治疗的理想之路。本文将近年来切除修复交叉互补基因 1 (ERCC1)、核糖核苷酸还原酶 M1 (ribonucleotide reductase, RRM1)、 $\beta$  微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin) 这 3 个标志物与 NSCLC 的化疗进展作一综述。

### 1 ERCC1

**1.1 ERCC1 结构和基本功能** ERCC1 基因位于染色体 19q13.2-13.3 编码一种含有 297 个氨基酸的蛋白质, 参与 DNA 链的切割和损伤修复<sup>[1]</sup>, 其表达产物与 DNA 修复酶缺