

- [15] Matsuzawa Y, Funa hashi T, Kihara S, et al. Adiponectin and Metabolic syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1):29-33.
- [16] 罗素新, 雷寒, 柳青, 等. 脂联素基因 +45 位核苷酸 T/G 多态性与冠心病的相关性研究 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(12):1517-1522.
- [17] Andersson SE, Edvinsson ML, Bjork J, et al. High Nt-proBNP is a strong predictor of outcome in elderly heart

failure patients [J]. *Am J Geriatr Cardiol*, 2008, 17(1):13-19.

- [18] 姜红峰, 彭少蓉, 缪希莉, 等. 老年慢性心力衰竭患者血清脂联素与严重程度关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(5):494-496.

(收稿日期:2012-06-12)

基因敲除技术在结核分枝杆菌研究中的应用

王 蕾 综述, 董志玲 审校(河北省邯郸市中心医院检验科 056001)

【关键词】 基因敲除; 结核分枝杆菌; 结核病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.23.045 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)23-2994-03

随着结核分枝杆菌全基因组被测序, 功能基因组学成为时下结核分枝杆菌研究的热点。研究基因功能的方法主要有两种思路: 一是通过增强其表达, 取得表达产物进行研究; 二是减弱或者终止其表达, 观察整体功能的变化, 进而推测相应的基因功能。前者因为不能反映基因产物的真实表达情况, 而逐渐被抛弃。后者将基因与生物的整体功能联系起来考察, 并能对基因的功能提供直接证据, 因而其技术不断得到发展和完善, 其中最常用的就是基因敲除技术^[1]。

1 基因敲除技术

基因敲除技术又称基因剔除, 是自 20 世纪 80 年代开始发展起来的, 通过一定途径使机体特定基因失活或缺失的一种分子生物学技术。基因敲除利用基因同源重组原理, 用含有已知的外源性 DNA 片段与受体细胞基因组中序列相同或非常相近的基因发生同源重组, 整合至受体细胞基因组中并得以表达, 从而改变细胞的基因型, 以研究该基因的体内功能或相关疾病的致病机制^[2-3]。

基因敲除的技术路线如下: 第 1 步, 构建重组基因载体, 其构建的成功与否是进行基因敲除的关键。第 2 步, 转染质粒载体导入待敲除的靶细胞中, 方法有磷酸钙 DNA 共沉淀法、电穿孔法、逆转录病毒感染法等。第 3 步, 用选择培养基筛选已转染好的细胞。第 4 步, 观察被击中细胞的生物学特征, 将已击中的胚胎干细胞转入胚胎使其生长, 对转基因动物进行形态学及分子生物学检测。

2 基因敲除技术在结核分枝杆菌研究中的应用

2.1 寻找新的抗结核药物的作用靶点 结核分枝杆菌的细胞壁结构独特, 对细菌的生命、形态、毒性传播等非常重要, 也是目前多种抗结核药物作用的靶点。结核分枝杆菌细胞壁中具有两种主要成分, 即分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖(mAGP)和脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)^[4]。mAGP 是细胞壁的核心结构, 为一种复杂的脂多糖肽, 由分枝菌酸、阿拉伯聚糖半乳糖和肽聚糖 3 种成分组成。阿拉伯聚糖半乳糖通过 L-鼠李糖-D-N-乙酰葡萄糖胺二糖衔接分子, 共价连接到肽聚糖大分子上; 分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖(mAGP)直接影响了细胞壁的完整性, 是药物作用良好的靶点。在细胞壁的核心结构 mAGP 中, 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)是其中必需的组成成分, 主要参与组成肽聚糖和 L-鼠李糖-D-N-乙酰葡萄糖胺二糖衔接分子。GlcNAc 的活性前体是 UDP-GlcNAc^[5]。GlmU 是 UDP-GlcNAc 合成过程的一种重要酶, GlmU 是双功能酶, 具

有乙酰基转移酶活性和尿嘧啶转移酶活性。在结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)中, 编码 GlmU 的基因是 GlmU, 在基因组上的定位为 Rv1018c。现已构建了 GlmU 基因敲除的菌株 mc2155GlmU 敲除(KOT), 此菌株与结核分枝杆菌亲缘关系近、细胞壁结构相似, 且无致病性, 可被用于对 *M. tuberculosis* 的研究; 通过对此菌株生长曲线的测定, 已证实 GlmU 基因为分枝杆菌生长所必需。由于 GlmU 在细菌生长过程中具有必不可少的作用, 并且对细胞壁完整性具有重要影响, 当缺失活性 GlmU 时, 阿拉伯糖含量增加, 且其增加是来自于具有分支的阿拉伯糖末端的增多。由此推断, 在活性 GlmU 缺失的 mc2155GlmU KOT 菌株中, 负责合成聚阿拉伯糖末端分支的阿拉伯糖基转移酶(embA)和 embB 功能可能异常, 因而造成 mAGP 中聚阿拉伯糖末端的改变, 故对造成聚糖结构改变的原因继续进行研究、分析, 将能更进一步地认识 GlmU 的功能以及当 GlmU 功能异常时对细菌造成的影响, 这些都将有助于对研究以 GlmU 为靶点的药物对细菌的影响提供支持。

2.2 为提高 BCG 的免疫活性提供新方向 通过 BCG 接种免疫是预防结核的一个主要的可行性手段。BCG 是减毒活疫苗, 可引起淋巴肿大和化脓等异常反应, 在接种 BCG 的过程中, 除了会干扰纯蛋白衍生物(PPD)诊断结核分枝杆菌感染的价值, 最主要的禁忌之一就是当接种者有免疫缺陷, 特别是细胞免疫缺陷时, 不能进行疫苗接种, 且 BCG 的免疫性不能完全控制结核的效果。有研究表明, 不同地区、不同年龄的人群接种了 BCG 后的有效率在 0%~80%, 因此提高 BCG 的免疫性成为迫切的需要。

分布在分枝杆菌细胞膜上的 LAM 被认为主要与细菌导致的免疫应答及毒性的传播等有关。纯化后的甘露糖帽脂阿拉伯甘露聚糖(ManLAM)参与了结核分枝杆菌体内感染时抑制某些细胞因子分泌的作用如白细胞介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-8, 使诱发的巨噬细胞凋亡减少并调节树突状细胞的抗原呈递过程, 对结核杆菌的毒力和免疫逃避作用可能有大的影响^[6]。而通过分离纯化得到了 BCG 细胞壁上的 ManLAM, 在体外攻击巨噬细胞实验中, 发现抑制了巨噬细胞分泌的 IL-8 和 TNF- α 。脂甘露聚糖(LM)是 LAM 的前体, 由 embC 基因编码的蛋白酶帮助阿拉伯糖链的聚合并转移至甘露糖链上, 最终形成脂阿拉伯甘露聚糖。乙胺丁醇(emb)基因簇编码的蛋白酶是一类参与了阿拉伯糖苷的聚合和转移的酶类。通过置换型基因打靶使 embC 基因功能失活, 发现分枝杆

菌胞壁上的 LAM 合成停止。而纯化的 LM 与 LAM 作用相反,在体外攻击巨噬细胞实验中发现诱导了细胞凋亡和 IL-12 的分泌。IL-12 能活化自然杀伤细胞,刺激 Th1 细胞成熟,形成优势 Th1 应答。二者都产生了 γ -干扰素 (IFN- γ),进一步活化巨噬细胞,显著抑制病原菌生长。分析表明,LAM 上的阿拉伯糖链可能掩盖了 LM 上甘露糖核心的诱发 Th1 型细胞因子作用,反而抑制了感染时发生的细胞免疫应答。文献中提到 BCG 胞壁上的 LM/LAM 大约为 1.0 : 2.5,使 BCG 的 embC 基因失活可以使胞壁上 LAM 合成停止,改变胞壁上的 LM/LAM 的比例后可能会使其免疫活性提高^[7]。为验证这一推想,采用基因敲除技术构建结核疫苗 BCG embC 基因缺失株,以便进一步用于细胞实验研究重组卡介苗的免疫活性和功能。首先根据结核分枝杆菌 H37RV 基因组上 embC 基因序列设计引物,再在已构建好的重组质粒上插入方向正确的筛选标记片段,通过聚合酶链反应 (PCR) 鉴定和酶切分析得到重组自杀质粒 pccG。将这一质粒通过电穿孔引入生长状态良好的卡介苗中,利用抗性筛选和蔗糖负相筛选得到 BCG 的 embC 基因缺失株,并通过 PCR 鉴定。将重组卡介苗与卡介苗感染 Ana-I 细胞后,检测不同时间点细胞内一氧化氮 (NO) 含量^[8],发现重组卡介苗比未重组株诱导 Ana-I 细胞分泌的 NO 量有较明显增加,提示 embC 基因在提高卡介苗免疫活性方面有一定影响,这为下一步 embC 基因功能的研究奠定了基础。

2.3 探讨结核分枝杆菌相关的生长基因 人类结核病的病原菌结核分枝杆菌系缓慢生长菌,其在人工培养基或感染动物体内生长增殖一代约 18~24 h。Matsumoto 等在体外研究发现分枝杆菌 DNA 结合蛋白 1 (MDP1) 在卡介苗菌中约占蛋白总量的 8%~10%,相对分子质量约为 28×10^3 ,MDP1 蛋白既能抑制基因的转录效率又能在翻译水平干扰蛋白质的合成速度,同时转染 MDP1 基因至耻垢分枝杆菌和大肠杆菌细胞内均发现,宿主菌的生长速度明显下降。基因敲除技术对载体质粒的基本要求就是能在大肠杆菌中进行复制,但由于缺乏分枝杆菌的复制起点,因此在分枝杆菌中不能自主扩增,同时要携有可供筛选的抗性标志。pKO 质粒具有以上这些特征,可用来作为分枝杆菌中基因敲除的良好载体。此研究拟应用基因敲除技术将卡介苗株中的 MDP1 基因敲除,观察 MDP1 基因敲除菌株与原代菌株的生长速度。此研究中,MDP1 基因敲除菌株的生长速度与原代菌株相比并没有显著的增加^[9],分析原因可能有如下:(1)卡介苗菌生长速度的影响因素很多,除了 MDP1 以外,还有别的因素^[10],诸如 ITR 操纵子数量的因素;(2)Matsumoto 等的研究是体外试验,在体外就去除了很多干扰基因的转录和翻译的因素;(3)结核分枝杆菌是经过长期的进化,参与调节的因素相对复杂。因此,尚不能得出结论认为 MDP1 是分枝杆菌生长缓慢的主要原因。但本研究通过 MDP1 基因的敲除,建立了一种分枝杆菌基因的体内研究手段,为以后更多的基因功能的研究提供一种可能的方法。现已证实结核分枝杆菌 rmlB 和 rmlC (结核分枝杆菌的生长相关基因) 基因是分枝杆菌生长相关基因^[11]。

2.4 分析结核分枝杆菌相关的毒力基因 随着结核杆菌全基因组测序工作的完成,结核杆菌一系列毒力相关基因相继得到克隆与鉴定^[12]。目前研究发现部分毒力基因,如 erp 基因、katG 基因同时也存在于卡介苗中,在人体免疫功能低下时(如患艾滋病),这些基因的编码产物可能使卡介苗的毒力回复,导致播散性结核病的发生。因此,敲除卡介苗内的这些毒力基因,去除这些毒力基因的潜在威胁,将可能大大提高卡介苗使用的安全性。

最近,一组结核杆菌膜蛋白基因引起关注,其中尤以 Rv0901 基因较为重要。Rv0901 在人、牛型毒力结核杆菌广泛存在,而在无毒或减毒株中普遍有缺失、错位和突变现象,其确切功能有待阐明。利用基因敲除技术建立人型结核分枝杆菌标准毒力株 HRv37 的 Rv0901 基因缺失的结核杆菌缺陷株模型,并进一步对 Rv0901 基因缺失株的毒力、Rv0901 蛋白表达、Rv0901 蛋白功能进行研究。

Rv0901 基因编码的蛋白是尚未确定其生物特征和功能的假想蛋白,属于结核杆菌特异性蛋白成分,位于结核杆菌胞膜表面,呈表面暴露或属分泌蛋白质。位于细胞壁和细胞活动基因组及其调节蛋白的下游,受同一操纵子控制,其编码产物是构成结核细胞壁的重要构件^[13]。初步研究表明,在结核杆菌强毒和无毒株之间,在结核杆菌毒力消减的过程以及人工诱使其突变后,皆可发现毒力结核杆菌的表型变化和致病能力变化。因此在此实验中,自杀载体 pRKS10 含有用于同源重组的 2.4 kb 的同源 DNA 序列。在靶片段中没有加入阳性筛选标志,而是在载体上引入了双重筛选标志,从而成功构建了自杀载体 pRKS10。目前正利用这个自杀质粒进行结核杆菌 HRv37 和我国野生毒力株电穿孔转染,进一步的工作正在进行中^[14]。

3 结 语

基因敲除技术是否成功有 2 个重要的影响因素:(1)要求基因同源重组率高,能把真正发生同源重组的胚胎干细胞筛选出来。现在最常用正负筛选法增加重组后阳性克隆的数量。(2)要求弄清种系生长发育过程中的重要基因,非特异性的基因的失活可能破坏重要基因而导致实验动物死亡,因而无法研究基因功能。运用高度精细的重组酶介导 2 个 Loxp 位点间的重组 (Cre-Loxp) 系统,条件性基因敲除技术能在某一特定细胞类型或细胞发育的特定阶段敲除某一特定基因,Cre-Loxp 系统为组织特异性基因打靶提供了手段。

虽然基因敲除技术的广泛使用使其成为研究基因功能重要的技术手段,但目前仍然存在一定的不足:(1)操作复杂,实验周期长,费用偏高;(2)在敲除过程中,被破坏的常常只是靶基因的部分外显子而并不是整个编码区,残留的编码序列有可能组合出新的未知的功能,这将给表型分析带来麻烦;(3)对于某些必需基因,敲除后会造成细胞死亡,也就无法研究这些必需基因的功能;(4)由于基因功能上的冗余,敲掉一个基因并不能造成容易识别的表型基因家族的其他成员可以提供同样的功能;(5)同一个打靶载体在不同遗传背景下进行基因敲除,获得的表型差异很大^[15]。

基因敲除技术是近年来发展起来的新兴分子生物学技术,在特定基因功能的研究中正显示出越来越重要的意义^[16-17],可以预见基因敲除技术将会为生命科学领域特别是微生物的研究带来新的突破。

参考文献

- [1] Dye C. Global epidemiology of tuberculosis [J]. Lancet, 2006,367(9514):938-940.
- [2] 李令煜,陈健铭,彭振坤,等. 几种常用的基因敲除技术 [J]. 武夷科学,2007,23(12):187-190.
- [3] 苏涛,孙农晨,郑长玉,等. AdTERT-TRAIL 对腺样囊性癌细胞株 SACC-83 靶向基因作用的研究 [J]. 华西口腔医学杂志,2007,25(2):202-205.
- [4] Kato Y, Kubo Y, Iwata D, et al. Gene Knockout and Metabolome Analysis of Carnitine/Organic Cation Trans-

- porter OCTN1[J]. *Pharmaceutical Research*, 2010, 3(1): 1-9.
- [5] Alderwick LJ, Birch HL, Mishra AK, et al. Structure, function and biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis cell wall; arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, 35(5): 1325-1328.
- [6] Lee RE, Li W, Chatterjee D, et al. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed[J]. *Glycobiology*, 2005, 15(2): 139-151.
- [7] Leemans JC, Thepen T, Weijer S, et al. Macrophages play a dual role during pulmonary tuberculosis in mice[J]. *Infectious Disease*, 2005, 191(1): 65-74.
- [8] Singh A, Gupta R, Vishwakarma RA, et al. Requirement of the *mymA* operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of Mycobacterium tuberculosis in the spleens of guinea pigs [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187: 4173-4186.
- [9] Santiago Y, Chan E, Liu PQ, et al. Targeted gene knock-out in mammalian cells using engineered zinc-finger nucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5809-5814.
- [10] Chen XY, Li CY, Ma Y, et al. Study on Gene Knock out in Mycobacterium BCG[J]. *Tuber Thor Tumor*, 2004, 9(3): 187-192.
- [11] Cheruvu M, Plikaytis BB, Shinnick TM, et al. The acid-induced operon Rv3083-Rv3089 is required for growth of Mycobacterium tuberculosis in macrophages [J]. *Tuberculosis*, 2007, 87(1): 12-20.
- [12] Beste DJV, Espasa M, Bonde B, et al. The Genetic Requirements for Fast and Slow Growth in Mycobacteria [J]. *BCG Growth Rate Control*, 2009, 4(4): 1-9.
- [13] Kana BD, Ghordhan BG, Downing KJ, et al. The resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro [J]. *Mol Microbiol*, 2008, 67(3): 672-684.
- [14] Qu YQ, Bao L, Zhao JL, et al. Construction of the targeting vector of Rv0901 gene in Mycobacterium Tuberculosis [J]. *Sichuan physio-science magazine*, 2003, 25(1): 21-24.
- [15] Pang X, Vu P, Byrd TF, et al. Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an *mprAB* deletion mutant of Mycobacterium tuberculosis [J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 4): 1229-1242.
- [16] Yao GH, Linsong Yang, Yayi hou, et al. Phenotype and functions of spleen dendritic cells in rick-knockout mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2010, 10(2): 130-133.
- [17] Kerkhofs S, Denayer S, Haelens A, et al. Androgen receptor knockout and knock-in mouse models [J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 42(1): 11-17.

(收稿日期: 2012-06-15)

三阴性乳腺癌研究和治疗进展

陈宇综述, 张献全 审校(重庆医科大学附属第二医院肿瘤科 400010)

【关键词】 三阴性乳腺癌; 原发性乳腺癌; 靶向治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.23.046 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)23-2996-03

乳腺癌是美国妇女最常见的恶性肿瘤和第 2 大癌症死因, 2009 年中估计有 192 370 个新发诊断病例同年死亡 40 170 人。尽管从 1990 年以来乳腺癌的病死率已经有了明显的下降, 但在年龄 20~59 岁的女性中乳腺癌仍然是癌症死亡的主要原因^[1]。三阴性乳腺癌 (TNBC) 在乳腺癌中大致占到 15%^[2]。TNBC 是指雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体 2 均阴性的乳腺癌。到目前为止还没有特别有效的针对 TNBC 的靶向药物治疗^[3], 在绝经前的妇女和非洲裔的妇女有较明显的偏聚性^[4], BRCA1 相关的乳腺癌与 TNBC 表型的乳腺癌有明显的重叠。

1 流行病学

全球每年估计有 100 万妇女被诊断出患有乳腺癌, 其中大致有 17 万患有 TNBC^[3]。在这些 TNBC 病例中有 75% 是 basal-like 型。TNBC 在绝经前的非洲裔美国妇女中患病率最高, 最近一份报道指出 39% 的绝经前的非洲裔美国妇女被诊断出患有 TNBC。而在同年龄组的非非洲裔美国妇女中的患病率则要低得多, 大约占 15%。种族的不同或绝经与否导致患病率不同情况并没有在 ER+/HER2+ 亚型或 ER+/

HER2-亚型的乳腺癌中有所发现^[5]。多个其他不同的研究也显示出 TNBC 在非洲裔美国妇女中有更高的比例。而在这些 TNBC 中 75% 是 basal 型。在 2006 年 San Antonio 乳腺癌专题讨论会上, 1 项三阴性侵袭性乳腺癌在不同种族中患病率的研究中就指出非洲裔美国妇女患病率是白人妇女的两倍多。他们还进一步指出 47% 的非洲裔乳腺癌患者是 TNBC, 而白人妇女其比例只有 22%。经过对年龄和诊断分级的调整后, 非洲裔美国妇女罹患 TNBC 的比例是白人妇女的 3 倍多^[2]。

种族的不同导致患病率的差异, 使得作者思考是否是基因的突变导致绝经前的非洲裔美国妇女更易罹患 TNBC。研究发现乳腺癌的妇女中当有种族 BRCA1 突变时就更容易患 TNBC 同时肿瘤分级较高^[6]。基因表达的研究证实了这种现象, 同时发现 BRCA1 相关的乳腺癌在 basal 型乳腺癌中表现出了聚集性^[7]。

2 病理学与分子特征

TNBC 是指对 ER、PR 和 HER2 均无免疫反应的一类乳腺癌。在 TNBC 中 75% 是基底细胞样乳腺癌 (basal 型)。Perou 等^[8]描述了乳腺癌的不同分子亚型。它们根据 cDNA 微点