

· 述评 ·

加强结核病的科学研究

逢宇 赵雁林

我国结核病疫情严峻,如若不能有效控制结核病在我国的流行,那么 WHO 确定的在 2050 年基本消除结核病的目标将不能实现。

结核病的有效控制离不开科学研究提供的技术支撑;结核病的防治需要依靠日益进步的科学技术,就科学研究的应用性而言,亦需面向结核病防治;耐药结核病是人类与结核病长期斗争过程中,必须高度重视和着力解决的问题^[1]。

1948 年英国医学委员会组织的世界上第一个大规模临床试验(关于链霉素的临床应用治疗肺结核)开创了循证医学的先河,该研究被誉为世界上第一个发表的随机对照试验,为后来的相关研究奠定了方法学的参照和标准^[2]。英国于 1955—1956 年开展了世界上第一个全国结核病耐药性监测,结果提示耐药结核病在英国由于应用了抗结核药物而大量出现;随后学者们开始研究并尝试联合使用抗结核药物的治疗方案。自 1990 年起,WHO 推荐在全球应用以短程化疗为基础的 DOTS 策略,然而 DOTS 策略不能完全解决耐药、Mtb 与 HIV 双重感染、流动人口和脆弱人群等问题,于是专家们又致力于结核病防治政策和公平性的研究。

当前我国的结防工作迫切需要新诊断技术和新治疗手段,需要制定兼顾公平性的政策,并考虑生物-社会因素的复杂性等。我国结防“十二五”规划中明确提出加强基础研究和应用性研究,以及结合我国新医疗改革、疫情现状等具体情况加强科学研究和结防的进一步结合。然而,目前我国结核病研究总体上存在研究规模小、研究力量分散、研究课题重点不突出等问题,结核病研究需要进一步与结核病的防治需求有效地结合起来;需要围绕结防中的热点、难点,集中力量打歼灭战。

一、结核病预防与研究

目前,我国在不同人群中 Mtb 潜伏感染者的本底尚无客观、准确的数据,正在研发和应用的疫苗中

尚没有保护效力满意的候选疫苗,潜伏感染者(人群)中的结核病易感人群不易识别,预防性用药的依从性和远期效果观察尚无明确的科学结论;针对免疫力低下群体(HIV 感染者、糖尿病等慢性、消耗性疾病和免疫抑制剂使用者)尚缺乏有效的预防措施等。

结核病的病原体和其宿主间的关系无疑是复杂的,Mtb 感染人体后许多基因表达发生了改变。研究显示,这些基因可以分成不同种类的家族,可是目前仍然有许多关键环节不甚清晰。比如,哪些基因对宿主的防卫是不可缺少的? 哪些促进了微生物的侵入、存活和发病? Mtb(和它们的代谢产物)被认为是与宿主的不同细胞受体作用,刺激了共同的和特异性的信号途径,并激活了一些不同的基因的表达,Mtb 可以在人体长期潜伏感染,可能与诸如 *prcBA* 等编码蛋白酶体复合物的基因沉默有关^[3],但其具体的机制和其他基因的作用仍然需要进一步阐明。Mtb 入侵体内后,能够抵抗巨噬细胞中溶酶体的酸化作用^[4],使得 Mtb 可从巨噬细胞中逃逸,并且可以感染新的宿主细胞,从而在体内长期潜伏^[5]。

Mtb 全基因组序列测定确定了 4000 多个基因,但仅明确了与 Mtb 生长、致病性及耐药性等相关的部分基因的功能,仍然有一些基因功能及基因之间的相互关系不甚清晰,也没有找到特异性较强的抗原及有效的宿主免疫保护性抗原;新疫苗和简便、快速、敏感度和特异度高的新诊断技术的研发都将得益于 Mtb 不同基因功能的研究,以及找出特异性较强的抗原和有效的免疫保护性抗原;新药的研发同样需依赖于对 Mtb 基因结构和功能的深入理解。目前,对于结核病的宿主和病原体,以及两者的相互作用仍有许多方面的机制不清晰。诸如,为何并非所有感染者发病? 为何发病者临床归属各异? 为何 BCG 在人群中的保护性各异? 为何结核性保护性免疫的效率各异? 结核性潜伏感染的由来和本质? 结核性免疫反应的特异性本质? 结核性保护性免疫效率差异的本质? 个体行为差异的本质? 等等。

对 Mtb 脂质代谢组学的研究有着重要的意义。一方面,脂质作为 Mtb 的结构成分,在 Mtb 的生长速度、滞留状态转换、逆境胁迫、耐药性方面发挥着

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心国家结核病参比实验室

通信作者:赵雁林,Email:zhaoyanlin@chinatb.org

重要作用^[6];另一方面,许多释放到外周的脂质作为信号分子的一类,这些脂类分子对于 Mtb 的感染过程可能发挥了重要作用。因此,分析 Mtb 的脂类物质在各种不同状况(包括滞留状态、活跃状态,以及不同药物处理、一些活性氧或活性氮诱导)下的脂肪酸的代谢变化,特别是一些 Mtb 特异性的脂质的变化,对于阐明 Mtb 生物学及与宿主相互关系中起重要作用;此外,脂质代谢组学的研究可进一步指导针对新的靶位点开发新型药物。

Mtb 属于慢生长分枝杆菌,这种低速增殖使得细菌学检测受到很大的限制,即延长了患者的检测时间;非结核分枝杆菌中存在许多快生长分枝杆菌,两种类型的分枝杆菌在基因组水平上高度相似,然而繁殖速度相差较大。因此,研究两种类型的分枝杆菌的转录水平差异对于揭示生长速度的差异具有重要作用,Mtb 的复制速度与人体的免疫状况相关^[7]。进一步应用新技术确定与宿主免疫保护性抗原相关的 Mtb 的基因功能,明确 Mtb 在人体长期潜伏的机制,是研究结核病的免疫机理和发病机制的新方向。

二、结核病的诊断

早期、有效的诊断,特别是对涂阴和耐多药结核病(MDR-TB)的诊断,是全球结核病控制工作的优先领域。尽管在过去的 15 年间,通过结核病控制工作的有效实施,已经避免了近 600 万例患者因结核病而死亡^[8];然而有研究显示,绝大多数正在接受治疗的结核病患者,已经使社区中的另一些人感染了 Mtb^[9];因此,当前结核病诊断和治疗并不能有效地减少其在社区中播散,从而导致全球结核病患者数量仍逐年增多^[8]。

发达国家已经开始广泛使用新的结核病实验室诊断方法。 γ 干扰素释放试验对于 Mtb 感染,特别是区别自然感染和卡介苗接种等潜伏感染的诊断具有较强的特异性^[10]。

分子生物学在医学领域取得的飞速发展,核酸扩增检测(NAAT)、荧光原位杂交,以及噬菌体 FASTPlaque 和高压液相色谱(HPLC)等方法也被应用于结核病的诊断,使得诊断结果报告时间缩短至 2 d。目前对于结核病诊断有较高敏感度和特异度的方法有:核酸杂交、16S 核糖体基因的测序、应用 HPLC 对细胞壁脂质(分枝菌酸)的分析及核酸扩增法^[11-15]。

从全球来看,结核病的高负担国家主要集中在发展中国家,已经被使用了百余年的痰涂片显微镜检查技术,目前在许多发展中国家仍然作为发现传染源的主要手段,痰涂片显微镜检查在 HIV 高流行

地区敏感度不是很高,也不能鉴别耐药结核病;固体培养 Mtb 生长缓慢,出结果通常需要 4~6 周,考虑到生物安全因素,其操作不是很简单,至少需要恒温培养箱、生物安全柜等设备。

新的诊断技术虽然相对成熟,由于新诊断方法常常不是很昂贵就是需要较高水平的专门技术;开展免费检查项目的实验室或单位通常不能提供高新诊断方法;结核病实验室专家在经济欠发达地区特别匮乏,以上原因限制了新技术在发展中国家的广泛推广和使用。在我国的部分发达省份和地区的结核病实验室中,当前可应用的结核病诊断新技术和新方法,已经悉数得到了技术贮备和应用。

近年来国内一些学者对 Mtb 产生耐药性的分子机制研究取得了一些成果。本期重点号集中了部分学者的研究论文,分别就 Mtb 融合抗原 38F 和 64F 对于活动性肺结核的辅助诊断价值、Mtb 对氟喹诺酮类抗结核药物的耐药机制、Mtb 的基因多态性及药物敏感性试验、肺结核患者耐药性监测及基因水平耐药机制的研究、构建 Rv1733c 真核表达载体 pcDNA-Rv1733c 及对 TB 新型疫苗的研究意义、采用多中心对照实验方法评价 Mtb 特异性蛋白(tuberculosis specific antigen, TB-SA)抗体检测试剂在结核病中的应用价值、结核病患者外周血 IL-8 表达变化与肺结核病情进展中的表达变化对肺结核患者病情转归的相关性、检测血浆内毒素及 CRP 含量快速判断肺结核患者是否合并革兰阴性菌感染的意义等课题进行了有益的研究和探索^[16-27]。

结核病实验室工作是为国家结核病防治规划(NTP)服务的,结核病实验室检查是结核病诊断、治疗及预防等各个环节中不可或缺的。根据我国结核病防治规划的要求,需要加强如下几方面的工作,来提高结核病实验室的服务水平:(1)加快引入快速、可靠的结核病实验室诊断新方法和新技术;(2)完善实验室质量保证体系;(3)加强耐药机制的研究并实施耐药监测,建立具有全国代表性的我国分枝杆菌耐药突变位点的数据库、分枝菌酸数据库、基因分型数据库;(4)组织实验室网络中的专家参与全国实验室生物安全、相关学术团体的学术活动,加强能力建设;(5)通过国际交流和学术活动拓宽各级实验室工作人员的视野和知识面,了解国际相关学术动态,建立和加强对外交流与合作,进一步发挥 WHO 和其他国际合作伙伴专家优势,学习和鉴戒先进经验,开展积极的研究合作。

三、结核病治疗

目前抗结核药物新药少,部分抗结核药物的药

效尚不能确定,现在的药物体系中缺少实时监测、疗效评价手段与方法的指标,对不良反应的早期识别也缺乏客观指标。

基于当前可应用的抗结核化疗方案对初治失败和耐药患者的总体治疗效果欠佳(治愈率 50%~70%),而抗结核新药(OPC67683、PA824、TMC209 等)上市仍需等待一些时日。我国关于不同类型结核病的个体化治疗方案和标准方案,以及经验方案的系统疗效评估正在进行中。需要对结核病合并糖尿病、Mtb 与 HIV 双重感染、肺外结核病(骨结核等),以及儿童结核病的治疗进行深入、全面的研究。

Mtb 持留状态是导致结核病化疗疗程偏长、疗效不佳及化疗后易再次复发的主要原因之一。因而,研究 Mtb 的持留状态对于结核病的预防和治疗都有重要意义。一方面,关注持留状态与活跃状态下的 Mtb 在转录和转录后水平上的差异,有助于阐明 Mtb 的持留状态原理,并寻找持留状态的分子标识,为预防和诊断 Mtb 感染提供理论基础;另一方面,关注持留状态 Mtb 向活跃状态的转变过程,可以为 Mtb 携带者向活动性结核病患者的转变提供检测依据和参考^[28]。蛋白化学修饰在 Mtb 生长代谢中的作用研究表明,蛋白质磷酸化、甲基化、乙酰化等修饰对于蛋白质发挥功能有重要作用,通过蛋白质组学研究方法,可以初步建立不同状态下的 Mtb 的蛋白修饰谱,结合 Mtb 的表型特征,了解这种转录后的调控机理;金属离子在 Mtb 中的生长代谢过程中发挥着重要作用,铁离子和镁离子对于 Mtb 的生长是必需的。因此,确切阐明金属离子对 Mtb 生长的作用,对于新药开发将会开辟一个新思路。

四、结核病管理

加强对结核病患者的管理是现代结核病控制策略中的重要内容。结核病患者治疗成功的关键在于合理的化疗及科学的治疗管理。在肺结核患者管理中,传染性肺结核患者和耐药肺结核患者是治疗管理的重点。我国早在 1989 年颁布的《传染病防治法》将“结核病”列入法定传染病进行管理;1991 年卫生部发布《结核病防治管理办法》,明确规定对结核病患者实施归口管理。2004 年重新修订的《传染病防治法》正式将肺结核与艾滋病、血吸虫病、病毒性肝炎等列为乙类传染病管理。俄罗斯于 2003 年颁布了《俄罗斯防止结核病扩散法》,该法律的突出特点是规定了结核病患者和因疑似结核病而被观察者的权利和义务,确定了结核病患者或被观察者享有受医务作者尊重和人文关怀的权利,社会对该人群有援助的义务;在因结核病患者因病离岗(解职)

期间,按照俄罗斯法律发给其社会保险补助金等;法律规定对于不服从治疗的患者采取拘禁措施,警察和医生均有权利执行对患者的拘禁。日本于 1961 年修订的《结核病控制法》规定政府承担结核病的治疗费用比例达到 100%;该法律明确规定:首诊医生在发现结核病患者后必须向公共卫生中心报告,对结核病患者实施强制性管理措施,明确保护感染者和患者的人权,并确定了非歧视原则和保护原则等。

直接面视下的督导化疗(directly observed therapy, DOT)是 WHO 推荐的患者治疗管理方式。对患者治疗实施 DOT,一方面能提高患者的治疗依从性,另一方面能够及时发现和处理治疗过程中的不良反应。许多国家的经验证明,DOT 对于结核病的控制作用显著^[29]。我国自 1992 年开始逐步推行 WHO 推荐的医务人员面视下的短程督导化疗方式,提高了结核病的治愈率,降低了中断治疗率。纽约的研究经验证明,DOT 使耐药结核病的发病率明显下降。西班牙对那些可能不依从的人群,如吸毒、流浪、移民、无家可归的人群推荐采用 DOT,研究结果证明 DOT 能明显提高患者的依从性,与自服药相比,患者的治愈率明显提高。在一些卫生资源匮乏的地区,医务人员实施 DOT 受到了限制,但是许多国家的经验都证明通过开展家庭督导、社区督导能取得很好的效果。坦桑尼亚的研究显示,家庭督导能够取得与社区督导相同的效果;社区督导即通过选择患者的配偶或其他家庭成员作为督导员督导患者服药;以患者为中心的治疗方式实施 2 年后,除那些住院患者,患者选择医院督导的比例明显下降。尼泊尔的一篇文献研究地区为山区,卫生资源有限,交通不便,通过开展家庭督导和社区督导,结核病患者治愈率均超过了 85%的结核病控制目标,家庭督导和社区督导被认为是一种非常适合山区的患者管理模式^[30]。

五、结核病防治模式

我国的结核病防治工作取得了举世瞩目的成绩,然而结核病仍然是我国公共卫生面临的重大挑战之一。在新医疗改革背景下如何进一步有效实施结防模式,如何发挥医疗机构特别是公立医院在结防中的作用,如何在结核病定点医院集中治疗结核病患者?如何加强医疗机构和结防机构的高效合作?都是“十二五”期间创建我国新型结防服务体系值得研究的问题。

2002 年,WHO 提出了公立机构与私立机构合作的策略,即 PPM-DOTS 策略,其核心内容就是建立不同机构间合作开展结防工作。调查发现,大多

数结核病高负担国家中结核病患者首诊场所在私人机构,然而多数患者在私人机构得不到规范化的督导治疗而产生耐药。PPM 的合作形式多样,不仅仅局限于公立机构与私立机构合作,经过不同国家的探索其范围已经逐渐扩大,包括公立-公立机构合作,公立-私立机构合作,公立-非政府组织合作,私立-非政府组织合作。尼泊尔通过开展私人开业医生-非政府组织-结防机构(NTP)三方合作,提高了患者报告率和治愈率。在孟加拉国,全国有 75% 的人口都在农村地区,接受最多的医疗服务都来自于村医,然而村医医疗水平有限,可能会造成疾病诊断延迟及药物的不合理使用。基于此,达米思基金会在孟加拉国开展 PPM,将村医纳入到国家的结防规划中,通过对村医进行培训,由村医负责患者的转诊、督导治疗。PPM 合作期间,患者的治疗成功率达到了 90%,依从性达到了 98%。在中国 PPM 的主要形式还是公立-公立合作,即医疗机构与结防机构之间的合作(医防合作)。医防合作的模式为机构间建立协调小组,实施例会制度;专人负责收集医院结核病信息;结防机构培训医院的医生,保证医院药品供应、定期督导,开展患者追踪;机构间双向转诊制度;建立和规范门诊患者接诊和转诊程序等。总之,新型结防服务模式,需要利用医疗卫生资源,加强医疗、卫生和社区等机构的合作,共同开展结防工作。

总之,尽管结核病给人类生命带来如此巨大的负担,但人们现在对 *Mtb* 致病、耐药、毒力等的分子机制知之不多。科学技术的发展将继续为结核病控制带来新的前景,随着结核病相关研究的不断深入和发展,人类将继续受科学研究发展之惠,尽管征途坎坷,但人类将有望在本世纪内彻底控制、甚至消灭结核病。

参 考 文 献

- [1] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161-2170.
- [2] No authors listed. Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. A medical research council investigation. *Br Med J*, 1948, 2(4582): 769-782.
- [3] Gandotra S, Schnappinger D, Monteleone M, et al. *In vivo* gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. *Nat Med*, 2007, 13(12): 1515-1520.
- [4] MacMicking JD. *M. tuberculosis* passes the litmus test. *Nat Med*, 2008, 14(8): 809-810.
- [5] Demartino GN, Gillette TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*, 2007, 129(4): 659-662.
- [6] Darwin KH, Ehrt S, Gutierrez-Ramos JC, et al. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science*, 2003, 302(5652): 1963-1966.
- [7] Gill WP, Harik NS, Whiddon MR, et al. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*, 2009, 15(2): 211-214.
- [8] Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*, 1999, 282(7): 677-686.
- [9] Lönnroth K, Castro KG, Chakaya JM, et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *Lancet*, 2010, 375(9728): 1814-1829.
- [10] Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*, 2010, 328(5980): 856-861.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007—2008 年). 北京:人民卫生出版社, 2010.
- [12] Zhao YL, Liu YH, Jiang GL, et al. Variations in quality of carbol fuchsin stains collected from routine tuberculosis laboratories. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(1): 126-129.
- [13] World Health Organization. Diagnostics for tuberculosis: Global demand and market potential. Geneva: World Health Organization, 2006.
- [14] World Health Organization. Pathways to better diagnostics for tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [15] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [16] 郑霜, 张立, 戴振华, 等. 结核分枝杆菌融合抗原 38F 和 64F 诊断活动性肺结核的价值. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 643-648.
- [17] 袁小亮, 张天托, 朱家馨, 等. 江西地区结核分枝杆菌耐二线抗结核药的分子学特征. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 649-654.
- [18] 王晓平, 逢宇, 赵晓, 等. 宁夏地区结核分枝杆菌基因分型及与耐药性关系的研究. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 655-659.
- [19] 王婷, 赵雁林, 刘家云, 等. 结核性脑膜炎临床分离株基因型和耐药表型的特征分析. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 660-667.
- [20] 汪晓艳, 赵雁林, 逢宇, 等. 重庆市结核分枝杆菌临床分离株的基因分型及相关耐药性分析. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 668-672.
- [21] 蓝如束, 蓝兰, 黄曙海, 等. 广西壮族自治区涂阳肺结核患者的耐药性分析. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 673-678.
- [22] 段安虎, 张薇, 柏银兰, 等. 结核分枝杆菌休眠相关抗原 Rv1733c DNA 疫苗的构建及免疫学特性研究. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 679-685.
- [23] 王桂荣, 付育红, 梁倩, 等. 应用多重 PCR 方法快速鉴定结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌的研究. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 686-689.
- [24] 邝小佳, 谭守勇, 吴碧彤, 等. 39 株对克拉霉素耐药的结核分枝杆菌临床株 23SrRNA 检测结果分析. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 690-692.
- [25] 李强, 赵冰, 夏辉, 等. 结核分枝杆菌特异性蛋白(TB-SA)抗体检测试剂在结核病诊断中的应用研究. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 693-696.
- [26] 车南颖, 李雪莲, 张旭霞, 等. 40 例肺结核患者病情进展中白细胞介素-8 表达变化的初步研究. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 697-701.
- [27] 李成行, 李月翠. 检测内毒素与 C 反应蛋白在诊断肺结核合并革兰阴性菌感染中的意义. *中国防痨杂志*, 2013, 35(9): 702-705.
- [28] Lathem WW, Price PA, Miller VL, et al. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science*, 2007, 315(5811): 509-513.
- [29] Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med*, 2012, 367(10): 931-936.
- [30] Wares DF, Akhtar M, Singh S. DOT for patients with limited access to health care facilities in a hill district of eastern Nepal. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2001, 5(8): 732-740.

(收稿日期:2013-08-26)

(本文编辑:薛爱华)