

• 专家论坛 •

我国结核病基础研究的回顾与展望

张俊仙 梁艳 吴雪琼

【摘要】 结核病基础科研围绕着人体与结核分枝杆菌斗争的方方面面全方位地展开,从结核分枝杆菌的基因组 DNA 到转录组 RNA,从其表达的蛋白质到其代谢的产物,再到结核分枝杆菌对人体的致病作用及人体对其产生的免疫应答,希望寻找出干预的措施、控制的手段。研究内容非常丰富,篇幅所限,难以面面俱到,笔者只是根据中文文献试图阐述我国在细菌学、免疫学、分子生物学、疫苗、新药方面的主要研究和取得的重要进展,也试图指出研究的前景和存在的问题。

【关键词】 结核/遗传学; 结核/免疫学; 细菌学技术; 疫苗

Review and prospect of basic research on tuberculosis in China ZHANG Jun-xian, LIANG Yan, WU Xue-qiong.
Army Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory, Institute for Tuberculosis Research, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Corresponding authors: WU Xue-qiong, Email: wu-xueqiong@263.net

【Abstract】 The basic research on tuberculosis carry out around all aspects of the struggle between the human body and *M. tuberculosis*, from the genomic DNA to the transcriptome RNA, from the protein expressed to the metabolites, and then to the pathogenic role of *M. tuberculosis* on human body and the immune response produced by human body. Try to find out the intervention measures and control methods on tuberculosis. The research content is very rich. Owing to the limited space, this paper attempts to describe the main researches and their important progresses in bacteriology, immunology, molecular biology, vaccine, and new anti-tuberculosis drug in China, and also tries to point out the research prospect and existing problems.

【Key words】 Tuberculosis/genetics; Tuberculosis/immunology; Bacteriological techniques; Vaccines

《中国防痨杂志》是我国惟一的中央性结核病防治专业高级学术期刊,在其创刊 80 周年之际,回顾我国结核病防治工作者与结核病不懈斗争的光辉历程,具有十分重要的现实意义。

结核病基础研究所获得的知识 and 取得的成果已经广泛渗透到结核病临床和防控的各个环节,为我国结核病疫情的控制提供了有力的科学支撑。我们为基础科学研究所取得的一些成绩而喝彩,为面临的困境而孜孜不倦地探索,对科技进步的希冀更激励我们奔向灿烂的未来。

我们从中国知网检索“结核”相关的论文,从 1917 年以来《中国防痨杂志》发表论文最多。虽然中国知网收录的论文并不全面,但也能部分地反映《中国防痨杂志》在结核病学术交流中发挥的作用,以及为结核病学科发展所做出的贡献。

1965 年之前基础科研薄弱,论文发表很少,主要是开展细菌学研究、抗结核药物的仿制、中药的开发。1966 年至 1973 年“文革”的 8 年间,结核病基础科研停滞,没有论文发表。1974 年至 1979 年基础科研复苏,但每年只有几篇论文问世,主要是对新出现的乙胺丁醇的临床应用及结核病免疫学的研究。1980 年至 1989 年基础科研恢复,每年发表论文几十篇,结核体液免疫研究很热门。1990 年至 1999 年基础科研稳步发展,每年发表论文 100~200 篇,结核细胞免疫研究受重视,并开辟了全新的分子生物学研究领域。2000 年之后我国才真正开始重视结核病基础研究,基金投入增多,尤其是国家重大传染病专项的支持,使结核病基础研究进入繁荣时期;紧跟国际形势,全面开花,硕果累累,论文逐年递增,目前每年发表论文 1000 多篇。

由于结核病基础研究内容非常丰富,篇幅所限,难以面面俱到,笔者只是根据中文文献试图阐述我国在细菌学、免疫学、分子生物学、疫苗、新药方面的主要研究和取得的重要进展,也试图指出研究的前景和存在的问题。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.09.003

作者单位:100091 解放军第三〇九医院全军结核病研究所 全军结核病防治重点实验室 结核病诊疗新技术北京市重点实验室

通信作者:吴雪琼,Email:wu-xueqiong@263.net

细菌学研究

20 世纪 80 年代之前,我国主要开展结核病细菌学方面的基础研究,但进展缓慢。

一、非结核分枝杆菌的分离和鉴定

我国自 1979 年第四次全国结核病流行病学调查后,尤其是发生多起非结核分枝杆菌(NTM)暴发感染后,NTM 感染引起重视。主要应用传统方法从标本中分离、鉴定 NTM,分离率南方高于北方,沿海高于内地,常见的有 20 多种(如龟、鸟、胞内、偶然分枝杆菌等),大多数 NTM 分离株对多种抗结核药物耐受^[1];从堪萨斯、龟和瘰癧分枝杆菌等中分离出质粒,表明质粒可能介导了 NTM 耐药。20 世纪 80 年代建立的 NTM 气相色谱和高效液相色谱鉴定法由于仪器、试剂昂贵,操作需专业技术人员,而逐步被分子鉴定方法所代替。

二、结核分枝杆菌的变异

20 世纪 50 年代结核分枝杆菌(Mtb)耐药问题引起关注,发现耐药 Mtb 毒力减弱^[2]、超微结构和形态变化(1985 年)、可能存在大分子量质粒(1994 年),初步探索了 Mtb 的耐药机制。耐药表型的测定以传统的药物敏感性试验(简称“药敏试验”)方法占主流,放射性方法被淘汰;21 世纪初建立于非放射性快速培养系统上的药敏试验在临床推广应用,噬菌体生物扩增法及 Mtb 快速微量直视培养药敏试验方法未推广应用,近年来分子药敏试验方法兴起。1960 年美国发现 Mtb 的 L 型变异株,揭示其细胞壁存在缺陷,是结核病迁延不愈、难治、复治的重要原因;1984 年国内诱导、培养出 L 型 Mtb,解决了其培养困难的问题;2003 年《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会组织有关专家制定了《结核分枝杆菌 L 型的检测方法(试行)》^[3],促进和规范了 L 型 Mtb 的检测,但 L 型 Mtb 产生的机制尚需进一步的研究。1989 年以来国内许多地区发现未经治疗、新分离的 Mtb 中强、中等毒力株占 90% 以上,Mtb 流行株的致病力、毒力引起关注。

三、细菌学检查

标本中分枝杆菌检查至今仍是结核病诊断的可靠依据,但临床实际的阳性率并不高(15%~20%),菌阴肺结核、肺外结核仍是临床诊断的难题。20 世纪 50 年代在直接涂片抗酸染色镜检法基础上,建立了浮游集菌法、集菌法、厚涂片法、荧光法,提高了检出率,部分方法沿用至今。2005 年我国研发的夹层杯离心涂片集菌法快速查抗酸杆菌,提高了检出率^[4];2010 年引入的发光二极管(LED)荧光显微镜

价格低廉,适用于基层^[5]。20 世纪 50 年代至今,我国对分枝杆菌培养基和培养方法的研发从未停止过,土豆汤培养基等只在少数实验室应用,近年来研发的变色培养基、双相培养基比较简便、价廉正在临床推广应用,但目前临床广泛应用的仍是改良罗氏鸡卵培养基、琼脂培养基及引进的 2 种分枝杆菌快速培养系统。20 世纪分枝杆菌复苏生长促进因子(如 Rv1009)的研发,有助于提高休眠 Mtb 的复苏和培养阳性率^[6]。由于分枝杆菌遗传的固有特性,决定了依靠培养至肉眼可见细菌的时间不可能太短,需借助其他的技术快速、敏感地检测细菌的存在。

结核病免疫学方面的研究

结核病既是细菌性疾病,也是一种免疫性疾病,20 世纪 80 年代起结核病免疫机制的研究成为热点,结核病免疫学飞跃发展。但 Mtb 感染后,机体的免疫应答很复杂,在感染的不同时期、不同个体也不尽相同,至今人们对于 Mtb 的致病机制和宿主的免疫保护机制还未完全搞清楚。

一、结核病体液免疫

抗结核抗体在抗结核免疫中也发挥着一定的作用,20 世纪 80 年代以来 IgG 一直是研究和临床检测的主要抗体类型。2011 年 WHO 不推荐将血清学检测结果作为可疑肺结核或肺外结核的诊断依据(HIV 感染除外);尽管国内开发的许多检测试剂盒敏感度和特异性差异很大,但国内研究的结果表明,抗体 IgG 对结核病尤其是肺外结核病和菌阴肺结核具有辅助诊断价值^[7]。国内外试剂盒在健康人群中均具有较高的特异性;假阳性主要出现在非结核呼吸疾病人群,关键在于 Mtb 抗原选择的合理性、产品质量的严格控制、实验室的定期评估选择。IgM 是近期感染的标志,可用于感染早期的筛查,但在活动性结核病患者中阳性率低。IgA 对于结核病的辅助诊断价值不大。IgE 与肺结核的严重程度相关,IgE 高水平表达的肺结核初治患者病情较严重,表现为痰菌阳性率高、肺空洞发生率高、辅助性 T 细胞(helper T cell, Th)2 免疫增强、Th1 和 CD8⁺T 淋巴细胞免疫反应严重削弱^[8]。

在抗体检测所用的抗原方面,20 世纪 80 年代主要用结核菌素、PPD,特异性差;20 世纪 90 年代采用纯化的细胞壁糖脂或蛋白等天然抗原;21 世纪初开始应用基因工程技术制备的重组蛋白^[9],解决了天然蛋白纯化烦琐、费时、得率低的难题,也提高了特异性;单一抗原逐步被多种抗原混合、融合或组

合检测所代替,提高了检测的敏感度。在检测方法方面,20 世纪 80 年代采用酶联免疫吸附试验(ELISA)半定量检测;20 世纪 90 年代,金标免疫渗滤法和免疫层析法以其简便、快速而在临床广泛应用;近年来化学发光技术的应用进一步提高了检测的敏感度^[10-11]。

分枝杆菌属细菌具有许多共同的抗原,影响了诊断的特异性。20 世纪 80—90 年代国内热衷于制备 Mtb 特异的单克隆抗体,用以检测、鉴定 Mtb 抗原,对于结核分枝杆菌复合群(*M. tuberculosis*-complex, MtbC)的菌种鉴定、分型、抗原提纯及结核病血清学诊断等都具有重要意义^[12]。

由于 Mtb 抗原检测可直接反映感染的存在,1980 年以来一直孜孜不倦地探索 Mtb 在机体免疫系统作用下,免疫清除后产生的体液标本中的 Mtb 抗原、巨噬细胞或单个核细胞内的 Mtb 抗原、血清中 Mtb 免疫复合物存在的诊断价值^[11]。但应用 ELISA 方法检测的敏感度和特异度各家报道高低不同,直至近年来快速检测 Mtb 抗原 MPT64 的金标免疫层析试剂盒问世^[13],才应用于临床,但敏感度还需进一步提高。

也陆续发现结核病患者体液标本中一些酶类(如乳酸脱氢酶及其同工酶、溶菌酶、腺苷脱氨酶、胆碱酯酶、淀粉酶及其同工酶、丙酮酸激酶等)的表达水平显著高于癌症患者^[11,14],20 世纪 80 年代腺苷脱氨酶常规用于临床结核病的辅助诊断和鉴别诊断。

20 世纪 90 年代开始关注活动性结核病患者体液免疫应答中高表达的一些与结核病患者病情程度呈正相关的多糖、多肽、糖蛋白(如 α -1-酸性糖蛋白)、蛋白酶(如基质金属蛋白酶-9)、蛋白生物素物质等,研究其作为结核病活动性标志物的临床意义^[14-15]。

二、结核病细胞免疫

抗结核免疫主要是细胞免疫,20 世纪 90 年代以后成为国内研究的热点。主要研究巨噬细胞、T 淋巴细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和中性粒细胞(PMN)抗结核的作用机制、免疫调控机制,肺结核患者细胞免疫变化规律及其与结核病发病、发展、转归的关系,并探讨其在结核病诊断、治疗、预防中的作用。但国内的研究不够系统、不深入,浅尝辄止。

通过对巨噬细胞功能的研究,部分阐明了 Mtb 感染后抵抗巨噬细胞吞噬、在胞内的生存机制,不同毒力 Mtb 株感染诱导巨噬细胞产生不同水平的凋

亡,诱导氮氧化物的产生、细胞因子分泌及对人巨噬细胞离子通道及其调控元件转录表达的影响;ESX-1 蛋白分泌系统与 Mtb 在巨噬细胞中存活、生长繁殖及致病密切相关,早期分泌靶抗原 6(ESAT-6)在细胞内可显著增强巨噬细胞的吞噬功能,细胞内低水平表达的 ESAT-6 还可以诱导巨噬细胞的凋亡^[16];肺结核患者肺组织中巨噬细胞和自然杀伤细胞的数量及分布;检测巨噬细胞内结核分枝杆菌 DNA。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)在宿主的抗结核免疫应答中发挥重要作用,尤其是巨噬细胞和树突状细胞上的 TLR2 在免疫应答的早期阶段识别肺结核 Mtb 抗原、介导巨噬细胞活化、启动天然免疫。TLR 介导的免疫调节信号通路受到多种蛋白[髓样分化因子 88(MyD88)、Toll 样受体相关的干扰素活化子(TRIF)、Toll 样受体相关分子(Tram)]的精确调控,活化核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)NF- κ B 信号通路,促进炎症细胞因子产生^[17]。

结核病患者外周血 Th1 与 Th2 细胞亚群的变化规律对于病情监控、疗效判定和预后判断都有重要意义。近年来发现一些新的 T 淋巴细胞亚群,形成新的免疫调控网络,其中 Th17 是分泌白细胞介素 17(interleukin 17, IL17)的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群, Th17 应答与结核分枝杆菌感染的转归及结核病病情的严重程度有关,活动性结核病患者 Th17 细胞应答受抑制^[18];MDR-TB 患者外周血 Th17 细胞比例增加,IL-17 水平升高。Th22 和 Th9 分别是分泌 IL22 和 IL9 的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群,上述各类 T 淋巴细胞亚群在结核性胸腔积液中显著高于非结核性胸腔积液,治疗后显著降低,提示参与结核性胸膜炎的发生、发展,有助于结核性和癌性胸腔积液的鉴别。CD4⁺CD25⁺ T 淋巴细胞是调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)家族中最主要的一群,结核病患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺[叉头-翼状螺旋转录因子(forkhead-winged helix transcription factor p3, Foxp3)]和 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 增多^[18],通过抑制患者细胞免疫反应,参与结核病的发病。NK 也参与抗结核免疫保护作用,初治肺结核患者外周血 NK 细胞数量明显低于健康人,但 NK 细胞分泌 IL-22、IL-17、干扰素(interferon, IFN)- α 和 IFN- γ 的水平均明显高于健康人。PMN 抗 Mtb 感染的作用很少被关注,近年来发现 PMN 能使 $\gamma\delta$ T 细胞产生 IFN- γ 减少,但不影响 IL17 的产生。

结核病患者越来越多的细胞因子及其膜受体对细胞免疫功能的调节作用及其抗结核生物学活性被

研究,近年来发现干扰素诱导蛋白 10(IP-10)、IL-9、IL-22 等在结核病患者中的水平也显著高于正常人或非结核性疾病患者^[19],检测其在体液中的水平,具有辅助诊断价值,对抗结核疗效和病情转归的评价具有一定的临床意义。

细胞免疫检测从方法、使用的抗原到产品的开发都取得显著进步。皮肤试验从 20 世纪 50 年代的旧结核菌素发展为 1980 年批准的卡介苗 PPD^[20]及 1984 年开发的人型 PPD,使效价更稳定。21 世纪初开发的 Mtb 表达而卡介苗不表达的基因工程重组抗原如卡介苗 RD1 缺失区的 ESAT6、CFP10 已进入临床试验或中试,克服了 PPD 特异性差、尤其是卡介苗接种导致假阳性的缺点,这对普种卡介苗的国家是非常有益的。早期通过 T 淋巴细胞增殖试验和双抗体夹心 ELISA 法,近年来应用酶联免疫斑点试验(ELISPOT)方法研究 Mtb 蛋白抗原刺激免疫细胞增殖、诱导产生细胞因子的水平^[21]。IFN- γ 释放试验(IGRA)作为一种新型的细胞免疫检测技术用于临床检测,已开发出结核效应 T 细胞 ELISPOT 法和 IFN- γ ELISA 法两类检测试剂盒^[21],两者并不完全一致,ELISPOT 检测的是分泌 IFN- γ 的效应 T 细胞,而 ELISA 检测的是免疫细胞分泌的 IFN- γ ;而且前者不受患者外周血淋巴细胞数差异的影响,比后者更能客观、准确地反映机体结核特异的免疫功能;前者需分离、计数外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),避免个体差异,较适合于临床辅助诊断;后者较简单,适合于体检、筛查;国外试剂盒应用多肽作为刺激抗原,而国内试剂盒应用重组蛋白。尽管 IGRA 试验不能鉴别结核潜伏感染(latent tuberculosis infection, LTBI)和活动性结核病,不能预测发展为活动性结核病的可能性,但对于临床上菌阴肺结核和肺外结核病的辅助诊断、鉴别诊断还是发挥了重要的作用。20 世纪 90 年代开始应用最先进的流式细胞术定量分析外周血或胸腔积液中免疫细胞表面抗原,对结核病的诊断、疗效监测、预后判断也起了重要作用。

三、蛋白质组学研究

2002 年国内开始 Mtb 蛋白质组学的研究,近年来定量蛋白质组学技术的发展相对定量地分析耐药菌和敏感菌之间蛋白质的差异表达,发现了一些差异蛋白,对 Mtb 蛋白质的性质、功能和相互关系进行鉴定,可作为新的抗结核靶位和耐药结核病诊断的分子标志物^[22]。研究感染后宿主免疫细胞蛋白质表达的变化,了解了 Mtb 与宿主的相互作用,

部分阐明了宿主抵御机制和 Mtb 致病机制。通过血清蛋白指纹图谱的研究发现了一些诊断标志物,并建立了结核病血清诊断模型。

四、Mtb 抗原的免疫学特性研究

21 世纪初 Mtb 蛋白抗原免疫学特性的研究在国内成为热潮,应用基因工程技术陆续制备了 100 多个 Mtb 重组蛋白,如 MPT64、ESAT6、CFP10、Ag85A、Ag85B,等等。宿主免疫细胞通过其表面受体识别蛋白质抗原表位,近年来进一步关注与 B 细胞、T 细胞(包括 Th 细胞、CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞等)和 NK 细胞免疫识别密切相关的抗原优势表位结构及其免疫机制^[23],为疫苗的发展、免疫诊断制剂的开发奠定了基础。

五、LTBI 的研究

潜伏(latency)、休眠(dormancy)和持留(persistence)从不同的角度诠释了 Mtb 感染的状态及固有的特性。LTBI 是宿主感染 Mtb 后、没有结核病临床表现的一种带菌状态;休眠是指 Mtb 处于低代谢、停止生长的一种静止状态,休眠 Mtb 在体内会不定期地复苏、增殖,内源性复燃导致发病或复发;持留是指 Mtb 在宿主体内能够长期生存的一种特性,它介导了宿主的潜伏感染和疾病的迁延不愈。2000 年全国结核病流行病学抽样调查结果显示, Mtb 感染率为 44.5%。2007 年以来 LTBI 成为研究的热点,建立了 IGRA 诊断 LTBI 新方法,我国目前报道的 LTBI 感染率约为 20%~30%。对 LTBI 人群免疫分子标识的筛选和验证发现,低 IFN- γ 释放水平的 LTBI 人群(LTB1)外周血 CD4⁺ T 细胞全基因组表达谱接近于结核菌素试验(TST)阴性的健康对照人群,与高表达 IFN- γ 的 LTBI 人群(LTB2)显著不同;Th17 相关基因 *RORc* 在 LTBI 和结核病患者人群明显下调;与 Th17 形成相关的 IL-6R 信号通路上的 IL6ST/gp130 在 LTBI 组表达也明显下调;Foxp3-Treg 在 LTBI 和结核病患者组明显下调;对 Treg 细胞生成有抑制作用的 S1PR1 在 LTBI、LTB2 和结核病患者中都明显下调^[24]。利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选到休眠 Mtb 和对数生长期 Mtb 的差异表达基因,发现 Mtb 休眠期高表达的基因,为潜伏 Mtb 休眠机制的研究奠定了基础。LTBI 者全血中 miR-29a-3p 和 miRNA144-3p 的表达明显高于活动性肺结核患者,可能成为诊断 LTBI 的标志物。已成功地建立了 LTBI 的体外及动物模型,发现异柠檬酸裂解酶(ICL) mRNA、Acr 蛋白 mRNA 高表达可作为持留菌存在的标志,应用液体

低氧培养并联合 mRNA 检测有可能检测到 Mtb 持留菌。Mtb 复苏因子蛋白及噬菌体 TM4 对潜伏的 Mtb 有复苏促进作用^[6]。LTBI 是结核病患者的主要来源,微卡菌苗能显著提高 LTBI 人群固有和获得性细胞免疫水平,对 LTBI 者发病可起预防性免疫治疗作用,追踪观察 4 年,微卡治疗组(0.30%,2/660)和化学治疗组的结核病发病率(0.61%,4/660)明显低于空白对照组(3.48%,23/660),微卡的不良反应发生率明显低于化学治疗^[25],对 LTBI 人群开展预防性治疗有可能成为今后一项重要的结核病控制措施。

结核分子生物学研究

自 20 世纪 80 年代末起,结核分子生物学的研究进展是最引人注目的,以基因工程技术的出现作为新的里程碑,标志着人类深入认识生命本质并能动地改造生命的新时期开始。从 Mtb 的基因组 DNA 到转录组 RNA,从其表达的蛋白质到其代谢的产物,再到人体对其产生的免疫应答,结核分子生物学揭示了结核病发生、发展的分子机制,使我们从分子水平更好地了解 Mtb 的基因和遗传本质。Mtb 全基因组的破译、先进的分子生物技术的建立、分子靶位的阐明等研究成果,为 Mtb 致病机制、耐药机制的阐明,快速、准确地诊断与鉴别诊断,有效药物的研制,新疫苗的构建与设计奠定了理论基础。

一、基因组学的研究

1998 年 Mtb H37Rv 基因组破译后,我国科学家对 Mtb H37Ra 和临床流行的北京基因型菌株也进行了全基因组测序,了解了菌株的遗传结构及北京基因型菌株的起源、进化和传播历史。Mtb H37Rv 与 H37Ra 比较基因组学的研究,筛选到这两种菌株间的差异基因,有助于寻找致病相关基因及特异性片段,可进行菌株分型,追踪菌株来源;Mtb H37Ra 与卡介苗基因组 DNA 小鼠皮内接种后,均能诱导小鼠腹腔巨噬细胞活化并产生较强的抗结核免疫效应,两者效果差异无统计学意义,同时鉴定了一些免疫保护基因^[26]。

Mtb 基因变异出现了多种具有不同毒力、传染性、传播性的 Mtb 菌株。1995 年我国通过 DNA 指纹技术发现了北京基因型家族^[27],国内也开展了一些 Mtb 毒力相关基因的研究,发现或证实一些基因如 *rv0494*、*ICL*、*pcaA* 和 *acr* 等与 Mtb 的感染、持留、增殖、播散密切相关,部分阐明了致病机制^[28]。

二、耐药分子机制的研究

1996 年起国内 Mtb 耐药分子机制的研究成为

热点,药物作用靶分子的改变是大部分 Mtb 耐药产生的原因。国内主要研究一、二线抗结核药物耐受相关基因(如 RNA 聚合酶的 β 亚单位的编码基因 *rpoB*、过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因 *katG*、烯酰基还原酶编码基因 *inhA*、阿拉伯糖基转移酶编码基因 *embB*、核糖体蛋白 S12 编码基因 *rpsL*、16S rRNA 编码基因 *rrs*、吡嗪酰胺酶编码基因 *pncA*、DNA 旋转酶的 A 亚单位编码基因 *gyrA*、*tlyA* 等)突变的位置、性质、发生率及其临床意义,发现 Mtb 耐多药是各种药物作用靶基因逐步突变累加所致^[28]。氟喹诺酮类耐药基因表达受 Mtb 五肽重复蛋白 MfpA 和 MfpB 调控。药物外排泵也是 Mtb 耐药的一种机制,目前已发现一些与 Mtb 耐药相关的外排泵蛋白如 Rv1747c 等^[29]。但 Mtb 耐药机制尚未完全搞清楚,某些耐药基因位点突变与耐药表型之间的关系仍需进一步研究,以确定其临床意义。

三、结核病易感性相关基因的研究

结核病具有家族聚集倾向,1995 年起 Mtb 感染和发病的遗传易感性研究在国内成为热点之一。目前,已发现了一些与结核病易感性相关的基因,如自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 1(*nramp1*)、人类白细胞抗原(HLA)、免疫调节激素维生素 D 受体(VDR)、甘露糖结合植物凝集素(MBL)、细胞因子(如 IFN- γ 、IL10、IL12 β 、IL-12R β 1、IL-12R β 2、IL18,等等)、TLR 等编码基因,这些基因大多数与免疫系统和炎症反应相关^[28]。结核病易感通路是非常复杂的,虽然其易感性与某些基因多态性相关联,但目前研究的候选基因较多,种族间存在差异,所用的方法、标准不统一,结论也不完全一致,也不系统。因此,目前尚不能提供令人信服的证据证明遗传与结核病的相关性。在我国进一步开展大样本量的比较研究,系统了解我国人群存在哪些抗性基因,哪些基因多态性对于患结核病的风险高,以便建立联合检测方法,早期发现结核病易感的高风险人群,早期干预或防护,降低结核病发病率。

四、抗结核药物所致肝损伤易感相关基因的研究

抗结核药物引起肝损伤是临床上常见的不良反应,遗传因素是肝损伤的危险因素之一。2004 年国内开始关注抗结核药物代谢酶基因的多态性与肝损伤之间的关系,陆续发现了多种肝损伤易感相关基因,如 N-乙酰基转移酶 2(NAT2)、细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)、醌氧化还原酶(NQO1)、羧酸酯酶基因 1(CES1)、尿苷葡萄糖醛酸转移酶

(UGT)等,部分阐明了抗结核药物引起肝损伤的分子机制^[30],但仍需深入研究药物代谢酶在抗结核药物性肝损伤(ATDILI)发生中的作用,在不同民族、不同区域、不同人群中采用统一 ATDILI 的诊断标准进行多中心、大样本量的病例-对照研究和临床验证,筛选出 ATDILI 的分子标志物,建立 ATDILI 相关基因型的快速检测方法,开发 ATDILI 发生的预警系统,以期在结核病患者化疗前进行 ATDILI 风险预测,对高风险患者的肝功能进行密切监测,为个体化护肝预防治疗及制定化疗方案提供科学依据。

五、分子流行病学的研究

1995 年以来,国内应用分子生物学技术分析 Mtb 临床株的基因差异,研究结核病暴发流行、近期传播、菌株分型、追踪传染源、内源性复燃、外源性再感染、实验室交叉污染等,确定中国 Mtb 具有明显的基因多态性,且存在主要流行菌群,Mtb 北京基因型菌株在中国呈较高水平的流行;但不同地区菌株具有不同的流行特点,如北京基因型菌株在上海地区有广泛分布,但广东地区成簇率和北京基因型所占比例均显著低于其他地区;结核病患者中有部分是由于近期传播而引起的^[31-32]。但还需全面、准确地了解我国结核病发病情况、流行菌株,建立分子流行病学监测体系,以阐明我国结核病的传播流行规律,为制定切实有效的结核病防控措施提供科学依据。

目前,国内常用的 Mtb 菌株基因分型方法主要有 4 种^[33]:(1)1995 年引入国内的 IS6110 DNA 指纹图谱分析方法,是基因分型的“金标准”,分辨率高,但操作繁琐;(2)2001 年建立的随机扩增(RAPD)DNA 指纹分型方法,操作简便,但未标准化;(3)2003 年引入国内的间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)方法,简便、快速,但分辨率低;(4)2004 年建立的 PCR-可变数目串联重复序列(VNTR)分型方法和 2005 年建立的分枝杆菌散在分布重复单位(MIRU)分型方法,分辨率高、操作简便、重复性好,可提供数字式的分型结果,易于分析、比较,但仍需进一步完善、标准化和规范化。

六、结核转录组学的研究

2003 年始,国内基因表达谱研究兴起,为在转录组水平较全面地了解机体免疫功能的变化提供了可能。应用基因芯片技术研究 Mtb 临床分离株感染人巨噬细胞后的表达变化,发现 Mtb 感染与其他细菌感染引起的免疫反应在转录水平具有共性,也有特性;研究结核病患者体内免疫相关基因的差异表达,揭示多个免疫相关基因的差异变化显著;研究

肺结核患者和健康人群 PBMC 基因表达谱差异,发现差异基因大部分位于细胞内,起连接功能,具有酶催化活性,在代谢中起着重要作用,并主要位于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路和趋化因子信号通路中^[34]。

近年来非编码的小分子 RNA(microRNA 或 miRNA)的作用受到重视,通过对肺结核患者和健康对照者的 PBMC miRNA 表达谱或循环 miRNA 水平的比较分析,发现活动性肺结核患者 miRNA 及其靶基因表达异常,有些 miRNA 表达上调如 miR-144*,有些 miRNA 表达下调,并对这些异常表达的 miRNA 在人类染色体基因组上进行了定位^[35],揭示 miRNA 参与 Mtb 的致病机制,在 Mtb 和宿主的相互作用中起重要作用,在人抗结核免疫反应中起调节作用;但对这些 miRNA 的功能了解较少,大多数尚不清楚,尽管通过不同计算方法预测了许多参与不同信号通路的靶基因,但只有少数预测的靶基因被证实。

七、结核代谢组学的研究

代谢组学是 1999 年新兴的“组学”,在药物毒理学研究中有广泛的应用前景。国内 2005 年才聚焦结核代谢组学研究领域,通过研究异烟肼、利福平灌胃后不同时段大鼠尿液的代谢表型改变,及其与组织病理学和血浆生化指标变化的相关性,发现大鼠尿液基于高频氢质子磁共振波谱(¹H-MRS)的代谢轨迹与异烟肼、利福平毒性作用时间密切相关,异烟肼、利福平引起的肝毒性与线粒体功能受损、三羧酸循环中能量代谢异常及葡萄糖代谢紊乱有关^[36]。应用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析结核性脑膜炎患者脑脊液中代谢组学的变化,发现其糖、脂肪酸及氨基酸代谢均发生改变,有的代谢物(如 L-苏氨酸、来苏糖等)表达下调,有的代谢物(如山梨醇)表达上调,可能作为诊断的分子标志物^[37]。结核代谢组学研究只是初步的,尚需进一步研究。

八、基因诊断

基因诊断是基因工程在医学领域迅速发展的一个重要体现,许多分子生物学新技术不断涌现,以其快速、敏感、特异的优势在临床应用,使结核病的诊断水平上了一个新台阶。

20 世纪 80 年代末,Mtb DNA 探针的研究拉开了我国结核病基因诊断的序幕,一系列非核素标记方法及不同的杂交方法的建立为 DNA 探针的开发应用奠定了坚实的基础。20 世纪 90 年代初,聚合酶链反应(PCR)技术的建立显著提高了检测的敏感度,而在临床较广泛地得到应用。特异的 DNA 探

针与敏感的基因扩增优势结合衍生出许多新的基因诊断技术;20 世纪 90 年代末,荧光定量 PCR 实现了从定性到定量的飞跃;2005 年应用逆转录-PCR 检测活 Mtb 中的 mRNA 可监测化疗效果;近年来恒温扩增试剂盒[恒温扩增-防污染核酸试纸条、DNA 环介导恒温扩增(LAMP)]开发成功,不需要特殊的仪器设备,使基层医疗机构也能享受到高科技发展的恩惠^[28,38]。建立于基因扩增技术基础之上的基因突变检测技术,诞生了新的分枝杆菌分子菌种鉴定技术和 Mtb 分子药敏试验方法(直接测序法、线性探针、基因芯片法等),使临床“结核病”的笼统诊断进一步细化到分枝杆菌菌种和耐药结核病成为可能^[28]。

结核病疫苗的研发

1921 年法国巴斯德研究所的 Calmette 和 Guérin 研制成功牛分枝杆菌减毒活疫苗——卡介苗(BCG),1933 年留法科学家王良从法国引进卡介苗在重庆生产;1937 年刘永纯开始在上海巴斯德研究院生产 BCG;1948 年陈正仁、魏锡华、朱宗尧从丹麦血清疫苗研究所引进丹麦亚株 823 在北京生产。1978 年卡介苗接种纳入儿童计划免疫,但并不能预防肺结核的发生,而且人类获得性免疫缺陷病毒(HIV)的感染可能导致卡介苗在体内播散,结核病新疫苗的研发迫在眉睫。我国结核病治疗性灭活疫苗陆续研发成功,如 1998 年母牛分枝杆菌菌苗(微卡菌苗)及从德国引进国内生产的草分枝杆菌制剂(乌体林斯)、2000 年卡介苗多糖核酸注射液(斯奇康)用于临床辅助结核病化疗,2006 年研发的无细胞耻垢分枝杆菌疫苗正在进行临床试验。为了克服灭活疫苗只能诱导短暂的体液免疫和 Th1 型细胞免疫应答,不能诱导特异性 CTL 免疫应答的缺点,国内新型结核病预防性、治疗性疫苗的研究层出不穷。如 2001 年首次出现的结核 DNA 疫苗、重组卡介苗,2007 年结核重组腺病毒疫苗,2008 年结核重组耻垢分枝杆菌菌苗、亚单位疫苗,2009 年结核重组母牛分枝杆菌菌苗和 2011 年重组痘苗病毒疫苗,均表达不同的 Mtb 增殖期、潜伏期保护性抗原或(和)人类细胞因子,筛选、比较其免疫原性、保护效力或治疗效果,目前部分疫苗在中试,没有进入临床试验,落后于国外的研究。2012 年报道的卡介苗 CpG DNA 复合佐剂-02 系统为结核亚单位疫苗提供了有效的佐剂。结核病新疫苗的研发方兴未艾,相信不久的将来新型结核病治疗性疫苗或加强型疫苗将问世,但替代卡介苗的新型结核预防性疫苗仍

任重而道远^[39]。

抗结核新药的研发

一、先导化合物和化学药物的研究

1944 年第一个有效抗结核药物链霉素的问世,标志着结核病治疗进入了有效化疗时代,使结核病的控制有了划时代的改变,全球结核病疫情迅速下降。我国目前常用的一、二线抗结核化学药物的研制主要是跟着国外的脚步,晚几年问世。也通过化合物筛选、新药设计合成及对现有药物的再修饰等途径,发现了一些有潜力的具有抗结核或分枝杆菌活性的先导化合物如多巴胺^[40],并研究了其药物作用靶位和作用机制,其中许多都值得从化学和生物学的角度进一步开发成新药,但只有少数自主研发的新药获得成功。如 1975 年上海医药工业研究院研制的青紫霉素,1976 年四川抗菌素工业研究所在利福平基础上研制的利福定(异丁基吡嗪力复霉素)。经纤维支气管镜介入治疗空洞型肺结核或耐多药肺结核的介入用制剂目前多为口服或静脉药物溶解于真溶液或混悬于凝胶中配制而成,滞留效果差,凝胶基质不能吸收;近年来研究缓释给药系统,如环丙沙星壳聚糖缓释微球,动物实验显示有较好的组织相容性、留滞性、黏附性、安全性,自身可降解^[41],尚需进一步进行临床实验证明其安全性和有效性。20 世纪 80 年代开始关注抗结核药物之间的相互作用,同时研究抗结核药物血浆、尿液中药物浓度、药物的代谢及药物的生物利用度^[42],为联合用药、合理用药奠定了基础。

二、中药抗结核有效成分及中药有效方剂的研究

中医药是中华民族的医学瑰宝,中医药治疗结核病已有 1000 多年的历史,具有抑制杀灭 Mtb、缓解化疗药物的不良反应、有效缓解结核中毒症状、增强机体免疫力、降低耐药结核病的发生率的优点。20 世纪 50 年代至今,我国结核病防治工作者一直孜孜不倦地挖掘、探索,取得了一些进展。对曾经用于治疗结核病的近千种中药的作用及其有效成分进行研究,发现了许多中药及其成分对 Mtb 的生长具有抑制作用,如鱼腥草、艾叶、百部等;还有许多中药及其成分通过提高机体免疫力发挥抗结核作用,如黄芪多糖、灵芝等^[43]。开发了许多中成药制剂用以辅助结核病化疗,如治疗颈淋巴结核的结核膏,治疗肺结核的结核丸、抗痨丸、肺泰胶囊、芪贝胶囊等,但由于其见效慢、抑菌作用不强、易复发、需辩证施治而未被重视,未在临床广泛应用。我国抗结核中药的研究、应用进展缓慢,主要存在下列问题:(1)研

究不够深入,大多数只是对天然药物的粗提取物进行研究,很少深入研究中药的主要活性成分,对其作用机制的研究更少。(2)缺乏综合评价,大多数研究只是评价中药对 Mtb 的抑菌或者杀菌作用,较少研究中药免疫作用对抗结核疗效的影响、中药对化疗药物的协同作用,等等。(3)传统的中医理论体系未能有效的传承,中医药成为西药的补充。因此,若中医、西医两大理论体系进行有机结合、共同发展,有望成为结核病脱困的一个有效路径。

展 望

人类对结核病的认识和研究是一个逐步发展的过程,上述一系列的研究成就使人类受益匪浅。但至今在传染源的发现、结核病的治疗和预防三大环节上仍有许多问题亟待解决。因此,基础科研围绕着人体与 Mtb 斗争的方方面面开展全方位的研究,从 Mtb 的基因组 DNA 到转录组 RNA,从其表达的蛋白质到其代谢的产物,再到 Mtb 对人体的致病作用及人体对其产生的免疫应答,希望寻找出干预的措施、控制的手段。

建国 65 年来,我国的基础研究比较薄弱,主要开展应用基础研究和应用研究,原始创新的研究少,大多数研究是跟着国外或其他学科研究的脚步走,引进、吸收、再创新。中国的结核病基础研究从细菌学研究、抗结核药物的仿制、中药的开发起步,到免疫学的发展、分子生物学的兴盛,硕果累累,使我国结核病的诊、防、治水平取得了长足的进步,新的免疫和基因检测技术使菌阴结核病、耐药结核病、分枝杆菌病的诊断不再束手无策,“组学”诊断也向临床伸出了橄榄枝;在化学药物的研发旷日持久、进展缓慢之时,治疗性疫苗和中医药的开发为结核病的辅助治疗提供了新武器,对于难治性结核病也不失为一条脱困的路径;我国的结核病防控策略重点放在“病”上,即发病后的诊断和治疗,而对于“防”重视不够,也缺乏有效的手段,应用治疗性疫苗预防治疗 LTBI 高危人群将是一个经济、可接受的控制策略,哨点前移,由治“已病”到防“未病”;卡介苗加强型疫苗接踵而至,新的预防接种策略在向我们招手,健康人群的保护将不再是镜花水月。在基础研究的科技支撑下,我们期待着我国的结核病疫情得到持续的大幅度下降。

随着生物医学研究新技术体系的建立与交叉融合,结核病的基础研究面临着机遇和挑战,我们仍需在基因组水平上深入研究其生命信息及其功能,认识其核酸、蛋白质组成的许多基本规律,彻底搞清楚

这些基因产物的功能、调控、基因间的相互关系和协调,深入研究蛋白质与蛋白质之间、蛋白质与其他生物大分子之间的相互作用和作用方式,以进一步揭示 Mtb 的致病机制、耐药机制,阐明人类对 Mtb 的免疫清除机制,发现新的抗结核靶标和结核病诊断的分子标志物,为研制新型诊断试剂、抗结核药物和结核病新疫苗奠定基础。

长风破浪会有时,直挂云帆济沧海!

参 考 文 献

- [1] 吴龙章,谭守勇,谭耀驹,等. 1819 株非结核分枝杆菌行药物敏感性试验的结果分析. 中国防痨杂志, 2012, 34(12): 821-824.
- [2] 陈聪敏,郑子颖. 结核杆菌对异菸肼、链霉素和对氨柳酸抗药的前后与其对豚鼠致病力的关系. 中国防痨, 1959, 2(3): 25-29.
- [3] 中华结核和呼吸杂志编辑委员会. 结核分枝杆菌 L 型的检测方法(试行). 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(2): 67-69.
- [4] 宋红焕,季明,唐国锋,等. 液基夹层杯技术用于基层实验室结核病诊断的可行性研究. 中国防痨杂志, 2012, 34(7): 441-444.
- [5] 尚美,刘冠,赵立平,等. 发光二极管荧光显微镜实验室诊断效果评价. 中国防痨杂志, 2010, 32(5): 275-279.
- [6] 阳幼荣,吴雪琼,韩跃松,等. 重组结核分枝杆菌 Rv1009 蛋白应用价值的研究. 中国现代医学杂志, 2009, 19(22): 3410-3413.
- [7] 闫国蕊,王勇鸣,杨萍,等. 结核抗体联合检测对结核病诊断价值分析. 中国防痨杂志, 2013, 35(4): 286-287.
- [8] 盛青,吕江清,邝浩斌,等. IgE 高水平初治肺结核患者细胞免疫及临床特征分析. 实用医学杂志, 2007, 23(11): 1655-1656.
- [9] 阳幼荣,王全立,吴雪琼,等. 结核分枝杆菌 12 种抗原在结核病血清学诊断中应用价值的研究. 中国防痨杂志, 2011, 33(8): 486-491.
- [10] 阳幼荣,吴雪琼,张俊仙,等. 化学发光法与酶联免疫吸附法检测血清抗结核抗体的比较研究. 中国医药导报, 2012, 9(13): 88, 91.
- [11] 刘树玲,杨秀旭,李浩,等. 结核分枝杆菌 ESAT-6 抗原鼠单克隆抗体的制备及初步鉴定. 生物技术通讯, 2011, 22(2): 258-260.
- [12] 黄明翔,张丽水,陈新朝,等. 胶体金法结合涂片形态学特征快速鉴别结核分枝杆菌复合群的应用评价. 中国防痨杂志, 2012, 34(12): 830-834.
- [13] 吴雪琼. 结核病的免疫学诊断. 中国防痨杂志, 2009, 31(9): 555-558.
- [14] 徐瑛,谢服役,毛倩倩. 脑脊液基质金属蛋白酶-9、腺苷脱氨酶及肿瘤坏死因子- α 检测对结核性脑膜炎诊断价值研究. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(10): 2014-2015.
- [15] 胡娟,邓松华,吕秀文,等. 活动性结核标志物 1H-多肽的实验与临床研究. 现代预防医学, 1997, 24(3): 341-344.
- [16] 屈野. 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白调控巨噬细胞功能的研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
- [17] 吴燕燕,王易,王莉新. 黄芩苷对结核分枝杆菌作用下 TLR2-MyD88 信号通路的影响. 中国免疫学杂志, 2011, 27(8): 714-717.
- [18] 张影,陆坚,侯志平,等. 肺结核患者疗程中外周血辅助性和调节性 T 细胞的动态研究. 中国防痨杂志, 2013, 35(6): 427-432.
- [19] 范梦柏,王秀娥,宋承平,等. 细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IP-10 对结核性胸腔积液诊断价值的研究. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 550-552.
- [20] 宋文虎,吴桂敏,宋雅茹,等. 卡介菌素纯蛋白衍化物的初步研究. 中国防痨通讯, 1979, (复刊号): 35-37, 封四.
- [21] 李岍珂,吴雪琼,阳幼荣,等. CFP10/ESAT6 融合蛋白-ELIS-POT 方法的建立及其在结核分枝杆菌感染诊断中的应用价

- 值. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(6): 551-554.
- [22] 朱传智. 基于 iTRAQ 技术的结核分枝杆菌定量蛋白质组学研究. 重庆: 西南大学, 2012.
- [23] 叶娟, 张舒林, 刘文第. 结核分枝杆菌 RD12 区 T 细胞表位分布情况预测及分析. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(1): 7-12.
- [24] 刘凯. 结核分枝杆菌潜伏感染者和初发结核病患者免疫分子标识的筛选. 北京: 北京协和医学院, 2010.
- [25] 孙照平, 刘辉, 刘荣. 母牛分枝杆菌预防性治疗潜伏性结核感染的效果评价. 现代预防医学, 2013, 40(15): 2894-2896.
- [26] 宛宝山, 张秋芬, 周爱萍, 等. 结核分枝杆菌基因组学与基因组进化. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(7): 595-604.
- [27] 孙蕾, 杨立军, 郑锦辉, 等. 北京基因型结核分枝杆菌的研究. 中国防痨杂志, 2008, 30(3): 223-226.
- [28] 吴雪琼. 结核分枝杆菌分子生物学的现状及展望. 实用医学杂志, 2010, 26(23): 4255-4257.
- [29] 裴豪, 张时良, 刘君, 等. ABC 外排泵基因 *Rv1747c* 在结核分枝杆菌中的表达与耐药相关性研究. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(22): 4668-4670, 4667.
- [30] 张俊仙, 吴雪琼. 抗结核药物所致肝损伤的分子机制. 中国防痨杂志, 2014, 36(1): 3-8.
- [31] 钟球, 钱明, 李建伟, 等. 广东省肺结核临床分离菌株 DNA 指纹分析. 中国防痨杂志, 2004, 26(1): 24-26.
- [32] 梅建, 沈鑫, 查佳, 等. 上海市 2000—2002 年 91 株结核分枝杆菌分子流行病学分析. 中华流行病学杂志, 2005, 26(9): 707-710.
- [33] 吕冰, 高守一, 万康林. 结核分枝杆菌分子分型技术研究进展. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(5): 487-490, 494.
- [34] 魏晶, 张晨晨, 张国良, 等. 高通量测序技术分析肺结核患者 PBMC 基因表达谱差异. 中国免疫学杂志, 2013, 29(6): 639-643, 648.
- [35] 钟球, 周琳, 钱明, 等. 结核病患者血清中 Small RNAs 表达谱分析. 中国防痨杂志, 2011, 33(6): 350-356.
- [36] 廖艳, 彭双清, 颜贤忠, 等. 抗结核药物异烟肼肝毒性时效关系的代谢组学. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 730-737.
- [37] 刘炳祥, 欧强. 基于气相色谱-质谱联用技术的结核性脑膜炎患者脑脊液代谢组学观察. 山东医药, 2014, 54(16): 4-6, 9.
- [38] 戴广明, 曹以诚, 杜正平. 结核分枝杆菌环介导恒温扩增 (LAMP) 快速检测方法的评价. 中国防痨杂志, 2011, 33(1): 47-51.
- [39] 吴雪琼. 新型结核病疫苗的研究现状与发展趋势. 中国防痨杂志, 2012, 34(3): 133-137.
- [40] 季兴跃, 吴林韬, 李思阳, 等. 基于吩噻嗪类化合物的新型抗结核小分子化合物的设计、合成及活性研究. 中国医药生物技术, 2013, 8(2): 107-113.
- [41] 孟丽娜. 环丙沙星壳聚糖缓释微球肺部靶向给药系统的研究. 北京: 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 2013.
- [42] 于杰, 杨荣珍, 张铁杰. 抗结核药固定剂量复合剂生物利用度的研究进展. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(5): 406-410.
- [43] 李思阳, 季兴跃, 李卓荣. 抗结核中药有效成分研究进展. 中国抗生素杂志, 2013, 38(10): 725-729.

(收稿日期: 2014-08-07)

(本文编辑: 薛爱华)

· 征文通知 ·

结核病诊治与防控新技术、新方法研讨会暨学习班征文

由解放军第三〇九医院全军结核病研究所、解放军总参医学会基础检验专业委员会、《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》编委会联合主办, 海南省预防医学会协办的国家继续教育项目“结核病诊治与防控新技术、新方法研讨会暨学习班”拟定于 2014 年 11 月 7—10 日在海南省海口市召开。本届会议将邀请国内著名结核病基础研究专家、临床检验专家与临床专家针对结核病基础研究新进展、诊断和治疗的新技术、新方法和新经验进行专题学术讲座、学术交流, 并共同研讨与会者在工作中遇到的新情况、新问题。现征集有关论文。

一、征文内容

结核病基础研究、临床应用基础研究新进展; 结核病诊断和治疗的新技术、新方法和新经验, 包括对结核病密切接触者进行结核菌素纯蛋白衍生物、卡介苗纯蛋白衍生物筛查的实践经验、结果及分析, 结核病 γ 干扰素释放试验(包括 ELISPOT 技术和 ELISA 方法)在临床应用的评价等相关的论著、专家论坛、综述、学术争鸣等均可投稿。

二、征文要求

1. 投稿形式为全文+800 字左右的摘要, 摘要包括目的、方法、结果和结论 4 个方面, 也可仅提供符合上述要求的摘要。
2. 会议征文请注明未公开发表, 未一稿二投或多投。
3. 联系方式: 作者姓名、工作单位、通信地址(包括邮政

编码)、电子邮箱和联系电话等内容置于文题下。

4. 入选论文将纳入会议《论文汇编》, 优秀论文将由大会学术委员会推荐刊登于《中国防痨杂志》或《结核病与肺部健康杂志》。参加会议者均可获得国家级医学继续教育学分证书。

5. 征文截稿日期: 2014 年 10 月 10 日(以 Email 投稿日期为准)。

三、投稿办法

本次会议征文不接受通过邮局邮寄的纸质版论文, 只接受以 Word 格式存档的符合上述要求的电子版论文(文件名请注明为“诊治新技术、新方法会议征文”), 通过 Email 发送给《中国防痨杂志》编辑部张晓进编辑, 邮箱: zgflxhzw@163.com。

四、其他

会议欢迎不准备投稿征文但是希望与会了解结核病诊治与防控领域新技术、新方法的专家积极报名参加会议, 报名联系人郭萌编辑, 邮箱: guomengggg@sina.com。会议盖章的纸质版正式通知将在会前 1 个月寄给征文投稿及报名参加会议的专家。

解放军第三〇九医院全军结核病研究所
解放军总参医学会基础检验专业委员会
《中国防痨杂志》期刊社