

中国 HIV 感染者 VPR 序列变异对细胞周期和致凋亡作用的影响

郑力文¹, 胡维新², 樊 星¹, 张 硕¹, 刘 纯³

(1 中南大学湘雅医学院临床八年制, 湖南 长沙 410013; 2 中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心, 湖南 长沙 410008; 3 中南大学湘雅二医院, 湖南 长沙 410011)

[摘 要] **目的** 研究带有不同变异位点的人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)*vpr* 基因对感染细胞周期和凋亡的影响, 以及其致细胞周期变化和致细胞凋亡的机制间的可能关系。**方法** 以 14 个带有 HIV-1 *vpr* 基因片段的 pcDNA3.1(+) 真核表达载体构建重组质粒, 将其转染 Hela 细胞, 并设立保守株 *vpr* 基因转染细胞、突变株 *vpr*-FS 基因转染细胞、空载体转染细胞和未转染细胞作为对照, 经逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测目的基因转染成功后, Pi 染色, 用流式细胞仪检测被转染细胞的细胞周期分布和细胞凋亡率。**结果** 14 个带有不同变异位点 HIV-1 *vpr* 基因片段的 Hela 细胞经流式细胞仪检测, 显示出不同的致细胞周期阻滞和致细胞凋亡的能力。发现转染保守片段 HIV-1 *vpr* 的 Hela 细胞, 其细胞周期出现 G2 期阻滞和细胞凋亡率明显升高, 但转染 *vpr* C 末端截断的 *vpr*-FS 片段的细胞、空载体 pcDNA3.1(+) 转染细胞和未转染的 Hela 细胞无此现象。转染了 HIV-1 *vpr* 基因序列相对应的 Vpr 蛋白中含有 70V、85P、86G、94G 突变的片段, 较 *vpr* 保守片段致感染细胞 G2 期阻滞和凋亡的能力明显下降。初步发现 *vpr* 诱导 G2 期阻滞百分率越高, 其所致凋亡率亦越高。**结论** HIV-1 *vpr* 基因有明显的致感染细胞 G2 期阻滞和致细胞凋亡的作用, 但 *vpr* C 末端截断的 *vpr*-FS 片段无此功能。说明中国感染者 HIV-1 *vpr* 基因表达蛋白的 70V、85P、86G、94G 位点突变能使其致感染细胞 G2 期阻滞和凋亡的能力下降。*vpr* 诱导 G2 期阻滞的程度与其致凋亡水平可能相关, 提示两者的发生机制可能有一定的关联。本研究为进一步探讨 HIV-1 致病机制和探索可能的基因干预措施打下了基础。

[关 键 词] 人免疫缺陷病毒; 艾滋病; HIV-1; 基因; *vpr*; 细胞周期; 细胞凋亡

[中图分类号] R512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)05-0306-06

Effect of HIV-1 Vpr on G2 arrest and apoptosis in Hela cell

ZHENG Li-wen¹, HU Wei-xin², FAN Xing¹, ZHANG Shuo¹, LIU Chun³ (1 Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China; 2 School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410008, China; 3 The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[Abstract] **Objective** To explore the ability of *vpr* gene in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1 *vpr*) to induce cell G2 arrest and apoptosis, and the influence when it mutated, the relationship between *vpr*-induced G2 arrest and apoptosis. **Methods** Fourteen mutated *vpr* fragments were selected from patients with HIV. Both eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) and PCR products were purified, double-cut by HindIII and BamHI, and the cut products were ligated and transformed into competent cells JM109. The 14 reconstructed plasmids were transfected into Hela cells. Cells with pcDNA *vpr*-wt, pcDNA *vpr*-Fs and pcDNA3.1 blank cells, and without pcDNA3.1 cell were established. *vpr* mRNA expression was detected by RT-PCR. The DNA content and percentage of apoptosis were monitored by flow cytometry. **Results** Transfected with 14 mutated HIV-1 *vpr* fragments, cells displayed different G2 percentage and apoptosis ratio. HIV-1 *vpr* induced cell cycle G2 arrest and apoptosis, whereas Vpr Fs with a C-terminal truncation, vector pcDNA3.1(+) and the blank cells can not. The G2 percentage and apoptosis ratio reduced when transfected with Vpr expressing mutation of 70V, 85P, 86G, 94G compared with the

[收稿日期] 2009-07-03

[基金项目] 中南大学米塔尔学生创业创新项目(08MX27)

[作者简介] 郑力文(1987-), 男(汉族), 湖南省长沙市人, 医学生, 主要从事分子生物学研究。

[通讯作者] 胡维新 E-mail: weixinhu@yahoo.com.cn

Vpr wild type. The higher G2 percentage, the higher ratio of apoptosis was induced. **Conclusion** HIV-1 vpr can induce cell cycle G2 arrest and apoptosis, whereas Vpr Fs with a C-terminal truncation can not. The mutated sites of 70V, 85P, 86G, 94G may reduce the ability of Vpr to induce cell cycle G2 arrest and apoptosis. The extent of Vpr-induced G2 arrest correlated with the levels of apoptosis. This study can make a good foundation for further research on gene therapy.

[Key words] human immunodeficiency virus; acquired immunodeficiency syndrome; HIV-1; gene; *vpr*; cell cycle; cell apoptosis

[Chin Infect Control, 2009, 8(5): 306-310, 314]

人免疫缺陷病毒 1 型(humam immunodeficiency virus type 1, HIV-1)的 *vpr* 基因是病毒的调节基因之一,其表达产物 Vpr 蛋白是一种多功能蛋白,在巨噬/单核细胞的病毒复制中发挥重要作用。其功能有 HIV-1 长末端重复序列(LTR)以及其他细胞启动子的反式激活,参与 HIV 在胞浆整合前复合体的核运输;此外,*vpr* 还能导致被感染细胞的 G2 周期阻滞、DNA 损伤和凋亡。

vpr 对获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的致病过程极其重要,但其氨基酸序列某些位点的变异可能会使病毒的复制能力减弱、疾病过程进展延缓,目前其具体的有临床意义的变异位点及其影响机制仍处于探索中。关于中国 HIV-1 感染者 *vpr* 变异情况及其临床影响的研究迄今未见报道。本院学者^[1-2]曾分析过 348 份中国 HIV-1 感染者 *vpr* 的基因变异情况,发现 HIV-1 *vpr* 序列的某些突变位点可能对感染者的临床过程有影响,其机制可能与其致感染细胞凋亡的作用改变有关。本研究将上述研究中发现的有代表性的 14 个 HIV-1 *vpr* 变异片段重组真核表达载体转染人 Hela 细胞,观察其致感染细胞的细胞周期和凋亡能力变化,为进一步探讨 HIV-1 *vpr* 的致病机制及多态性临床意义打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、质粒和细胞 人工合成的 HIV *vpr* 保守基因及 *vpr* 变异基因(*vpr*-FS)分别来自 BSXCYPYVPRXCTHY 质粒和 BSXCYPYVPRXCTHY(FS)质粒,由美国犹他州医学院 Planelles 博士惠赠;14 个带有不同 *vpr* 基因变异位点片段的 pcDNA HIV-1 *vpr* 质粒和 JM109 由中南大学湘雅二医院艾滋病研究室保存。人类宫颈癌 Hela 细胞系由中南大学湘雅二医院中心实验室提供,聚合酶链反应(PCR)试剂盒(高保真)、限制性内切酶、连接

酶购自大连宝生物公司,PCR 产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒(GK2002)购自上海捷瑞生物公司,脂质体转染试剂 Lipofectin 购自日本 TaKaRa 公司,AMV 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 主要仪器 PCR 扩增仪(GeneAmp®PCR System 2700)、高速离心机(eppendorf Centrifuge 5415D)、低温离心机(Thermo Electron Corporation JOUAN BR4i multifunction)、WH-2 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)、隔水式电热恒温培养箱(上海苏晋医疗器械厂)、凝胶摄影仪(Gel Doc2000, BIO-RAD)、凝胶水平电泳仪(Power PAC 200 BIO-RAD)、培养板(Costar)、超净台(SPEG AIR Tech)、摇床(Orbital Shaker, Forma Scientific)、细胞培养箱(Water-Jacked Incubator, Forma Scientific)、流式细胞仪(Beckman, EPICS XL-4)等。

1.3 挑选代表序列 根据我们以往的研究结果^[1-2],将 *vpr* 片段测序结果用 Clustalw 软件和 *vpr* 代表株相匹配。用 Kimura 两参法推算进化距离。NJ 法构建进化树,通过 bootstrap 法评判进化树的可靠性。均运行 1 000 次 bootstrap。对 *vpr* 分型,依据是否靠近 *vpr* 的某一特定亚型。应用统计学方法和生物软件,结合临床资料,挑选出 14 个中国地区 *vpr* 代表序列,准备重组质粒。

1.4 PCR 扩增目的基因 选取 14 份标本的 PCR 产物进行 PCR 扩增,扩增片段约 310 bp。所用引物为 *vpr*-上游: 5' - CCCagcttATGGAACAAGC-CCCAGAAGA - 3'; *vpr*-下游: 5' - CGCgatccTTAGGATCTACTGGCTCCA - 3'。在内引物上、下游分别设计 HindⅢ 和 BamH I 双酶切位点(黑体小写)及其各自的保护碱基(下划线),引物合成由上海捷瑞公司完成。PCR 反应条件:3 mL 产物加入反应体系中,95℃ 15 min,1 循环,-95℃ 1 min;50℃ 1 min;72℃ 1.5 min,30 循环,-70℃ 10 min,1 循环。PCR 完毕后,1.5%琼脂糖凝胶鉴定目的片段,并送测序公司测序。留样待测序结果回报。

1.5 重组质粒和细胞转染 按上海捷瑞生物公司试剂盒说明抽提 pCDNA 3.1 质粒、BSXCY-PYVPRXCTHY 和 BSXCYPYVPRXCTHY (FS) 质粒, Hind III、BamH I 双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 *vpr* 310 bp、*vpr*-FS 310 bp 的目的片段和 pCDNA3.1 的 5.5 kb 载体片段。回收的载体片段与回收的 PCR 产物片段的摩尔比为 1 : 10, 进行连接, 连接产物转化感受态细菌 JM109。将适当菌液涂布至含有氨苄西林的 LB 琼脂平板培养, 12 h 挑取单个菌落扩增后提取质粒 DNA, 测序鉴定 pCDNA-*vpr* 真核表达载体构建成功。用 TaKaRa 公司的 Lipofectin 转染人宫颈癌细胞系 HeLa。

1.6 逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR) 鉴定 *vpr* 基因在 HeLa 细胞中的转录 按 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。RT-PCR 先按 AMV 逆转录试剂盒操作步骤进行逆转录: 将总 RNA 1 μg 与 7.5 μL 的 RNase-free 水混匀, 70℃ 变性 10 min, 冰浴 5 min, 再加入 10 × 逆转录缓冲液 2 μL、25 mmol/L 的 MgCl₂ 4 μL、10 mmol/L dNTP 混合物 2 μL、RNA 酶抑制剂 20 U、Oligo(dT) 150.5 μg/μL 1 μL、AMV 逆转录酶 15 U, 总体积 20 μL, 42℃ 60 min, 95℃ 5 min 灭活, 冰浴骤冷。再取产物进行 PCR, 用上述设计的 PCR 引物按下述反应条件扩增基因: 95℃ 15 min, 1 循环; -95℃ 1 min; 50℃ 1 min; 72℃ 1.5 min, 30 循环; -70℃ 10 min, 1 循环。用 1% 琼脂糖凝胶电泳

检测扩增产物。

1.7 细胞周期及凋亡的检测 重悬细胞于 PBS 中, 密度为 5 × 10⁶/mL。乙醇固定过夜, 碘化丙啶液染色, 经 100 目尼龙网过滤后, 上 Beckman EP-ICS XL-4 型流式细胞仪测定细胞周期分布及细胞凋亡情况。G2 期阻滞是通过测定细胞内 DNA 的含量而将 G2/M 期 (4 倍体 DNA) 和 G1 期 (双倍体 DNA) 的细胞区分开。

1.8 统计学分析 采用 Excel 和 SPSS11.5 统计软件对数据库进行统计处理及图表分析。两组均数间比较采用 *t* 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 pcDNA-*vpr* 重组质粒和转染细胞的鉴定 将重组质粒送上海生工公司测序鉴定, 显示 pcDNA-*vpr* 真核表达载体构建成功 (图 1)。转染 pcDNA *vpr* (+) 后的 HeLa 细胞分别编号为 1~14 号, 对照细胞为 15~18 号 (其中 15 号和 16 号分别是人工合成的 HIV*vpr* 保守基因和 *vpr* 变异基因)。RT-PCR 和凝胶电泳检测细胞中 *vpr* 的表达, 可见各细胞 RT-PCR 产物均有明显的 *vpr* 条带。

各质粒的测序结果显示序列质量较好, 无明显重叠峰, 双向测定的序列一致性好, 经 BLAST 软件分析证实为目的基因序列。

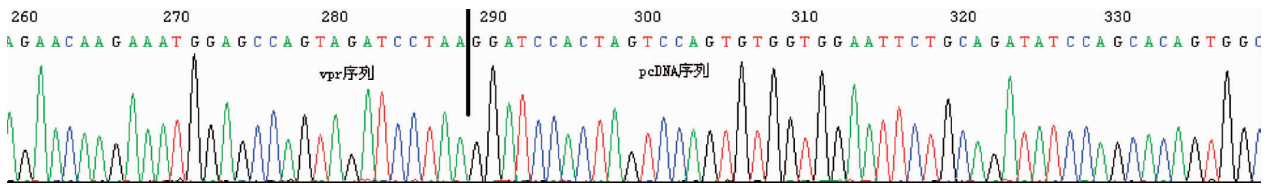
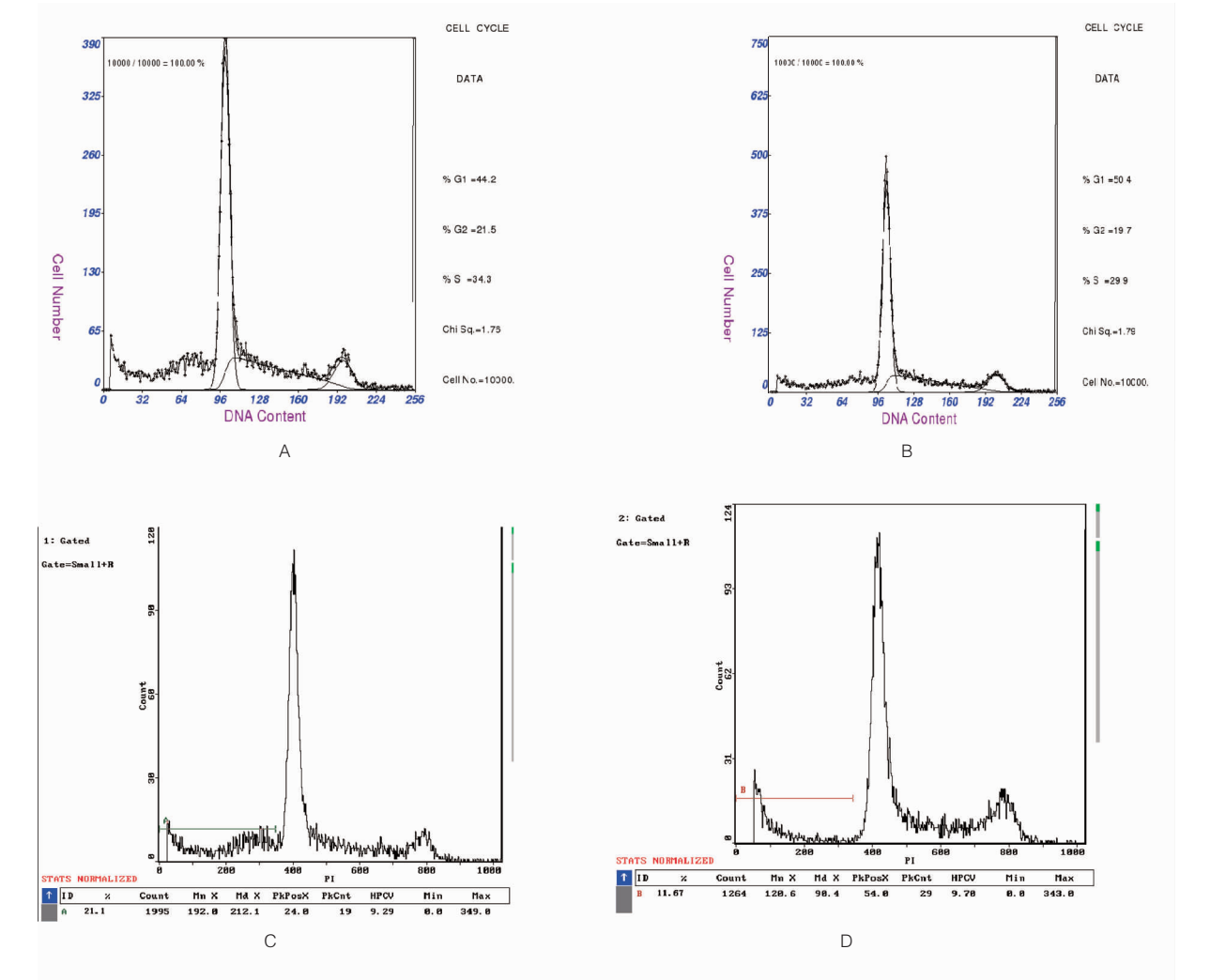


图 1 重组质粒测序鉴定图

Figure 1 Sequence map of recombinant plasmids

2.2 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡结果 将重组质粒瞬时转染 HeLa 细胞, 转染对照实验观察到各株细胞转染率相同, 均为 66%~71.5%。24 h 后

检测各株细胞的细胞周期和凋亡率。转染各重组质粒后 HeLa 细胞的周期分布及凋亡率见图 2 及表 1。



A:保守序列 *vpr* 转染的 HeLa 细胞 G2 期阻滞图;B:合成变异株 *vpr*-FS 转染的 HeLa 细胞 G2 期阻滞图;C:保守序列 *vpr* 转染的 HeLa 细胞凋亡图;D:合成变异株 *vpr*-FS 转染的 HeLa 细胞凋亡图

图 2 未转染以及转染 *vpr* 野生株 HeLa 细胞周期、凋亡率的变化

Figure 2 G2 arrest and apoptosis ratio in HeLa cells transfected with wild HIV-1 *vpr* or *vpr*-FS fragments

表 1 Jurkat 重组细胞的细胞周期阻滞和凋亡率

Table 1 G2 arrest and apoptosis ratio in HeLa cells transfected with different mutated HIV-1 *vpr* fragments

编号	主要变异位点	Vpr 分型	细胞周期阻滞 (G2, %)	凋亡率(%)	编号	主要变异位点	Vpr 分型	细胞周期阻滞 (G2, %)	凋亡率(%)
1	94G	AE	23.28 ± 1.08	19.82 ± 3.15	10	63T	C	31.65 ± 2.11	27.45 ± 1.29
2	70V	AE	24.26 ± 0.81	21.62 ± 2.42	11	63I	C	30.55 ± 1.41	26.46 ± 1.24
3	86G	AE	24.07 ± 0.85	20.66 ± 1.78	12	保守序列	BC	39.40 ± 2.17	34.14 ± 3.52
4	86G	AE	21.86 ± 1.61	19.23 ± 0.92	13	70I	C/BC	38.48 ± 1.37	30.12 ± 2.41
5*	70V	AE	19.85 ± 1.98	17.15 ± 1.53	14	89S	C/BC	36.39 ± 2.43	29.13 ± 0.96
6	94E	AE	21.33 ± 1.75	18.66 ± 2.35	15	合成保守序列	Vpr	32.67 ± 1.73	28.33 ± 2.33
7	85P	AE	20.31 ± 1.32	17.93 ± 0.94	16	合成变异株*	Vpr-FS	16.52 ± 1.62	13.53 ± 3.04
8	保守序列	B	35.21 ± 2.31	30.84 ± 1.75	17	转染空质粒细胞	pcDNA	16.32 ± 2.79	12.58 ± 2.71
9	89A	AB	32.41 ± 1.65	28.04 ± 2.87	18	未转染细胞	空白	14.67 ± 0.37	11.67 ± 0.24

* 人工变异株

3 讨论

HIV-1 基因组包括 9 个结构基因和辅助基因，各基因产物分别在组成病毒结构、调节各项功能和复制、发病机制中发挥作用。HIV-1 *vpr* 基因是病

毒的调节基因之一,其表达产物 Vpr 蛋白在病毒复制过程中具有多种功能:(1)影响反转录过程的准确性;(2)作为前融合复合体的一个组成部分参与病毒 DNA 转运至细胞核;(3)使感染细胞周期发生 G2 期阻滞;(4)诱导被感染细胞的凋亡;(5)与宿主基因共同反式激活 HIV-1 的 LTR^[3-4]。Vpr 对 AIDS 的致病过程极其重要,其氨基酸序列某些位点的变异可能会使病毒的复制能力减弱、疾病过程进展延缓,但具体的有临床意义的变异位点及其影响机制仍处于探索中。

研究发现^[5],Vpr 通过激活 ATR-Chk1 介导的检查点(checkpoint)通路,干扰细胞周期调节因子及 MEK2-ERK 通路而导致细胞 G2 期停滞。ATR 通路 with 检查点 DNA 损伤修复密切相关^[6],ATR 通过磷酸化与检查点激酶 1 (checkpoint kinase-1, Chk1)多种因子作用,使细胞分裂停止,从而进行 DNA 修复或诱导细胞凋亡。Vpr 可直接与 ATR 或 ATR 相关性蛋白质结合或诱导的核突起,影响染色体结构活化 ATR,使细胞在 G2 期停滞^[7]。此外,Vpr 也能直接结合细胞染色质,导致细胞 DNA 损伤,间接激活 ATR 通路。细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependant kinase, CDK)通过磷酸化和去磷酸化作用调控细胞周期^[8]。在细胞分裂的 G2 期,细胞周期调节蛋白依赖性激酶 p34、cdc2 与细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1)相互作用调节 G2 期向 M 期的转变。

Vpr 诱导的 G2 期阻滞在 HIV-1 的感染中为病毒提供了多种选择优势,包括在 G2 期通过增强 HIV-1 的 LTR 的激活提高病毒量,抑制宿主免疫应答。例如通过其诱导 G2 期阻滞和抑制 T 细胞增殖的能力来抑制 T 细胞克隆扩增,从而抑制病毒抗体的产生。然而,Vpr 诱导细胞周期阻滞和凋亡的相互关系尚不明了。支持这 2 种功能之间存在联系的是观察到:表达 *vpr* 的细胞通过 G2 期依赖的方式产生凋亡,而通过咖啡碱抑制细胞周期阻滞能极大地削弱 *vpr* 的凋亡诱导功能^[9]。G2 期阻滞和凋亡诱导同时需要 ATR 的这一发现为这种关系提供了较好的解释。Vpr 激活 DNA 损伤检查点激酶 ATR,然后依次传达这一激活信号到下游途径网络,从而实现 G2 期阻滞和细胞凋亡功能。这些结果与 Vpr 导致或模拟不可修复性 DNA 损伤,并导致 Vpr 表达细胞滞留在 G2 期,最终凋亡而死亡的结果一致^[10]。

本课题的序列研究中,我院学者^[1-2,11]曾观察

到 HIV-1 *vpr* 序列 C 末端某些位点变异对感染者的临床过程有所影响,并已通过实验证实了这些变异位点能使其致 HeLa 细胞凋亡的能力发生变化,但是否同时对其致 G2 期停滞能力发生类似变化未予观察。国外有报道认为^[1],Vpr 致感染细胞凋亡的功能与其致细胞周期阻滞功能相关。由于不同地区的 HIV-1 流行株有所差异,且不同人种有宿主特异性,而国内尚缺乏此方面的相关研究,因此观察中国感染者 HIV-1 *vpr* 基因多态性规律及其临床意义,为进一步探索基因干预的新位点打下了基础,具有重要的科学价值。

本文探讨了中国 HIV-1 *vpr* 变异序列致细胞周期阻滞和细胞凋亡的能力及两者之间的可能关系,发现 HIV-1 *vpr* 保守序列可明显地使 HeLa 细胞发生 G2 期阻滞,同时也导致细胞凋亡;而 C 末端截断的 *vpr* 基因却不能导致这些现象,并和转染空载体或未转染载体的 HeLa 细胞表现相似($P>0.05$)。另一方面,中国感染者 HIV-1 *vpr* 序列的 70V、85P、86G 或 94G 位点突变较 Vpr 保守序列致感染细胞 G2 期阻滞和凋亡的能力下降,有统计学意义($P<0.05$),但仍高于转染空载体或未转染载体的 HeLa 细胞。对本实验研究 *vpr* 基因多个变异的分析显示,*vpr* 诱导 G2 期阻滞的程度与其凋亡水平可能相互关联,提示两者的发生机制可能有一定的关联,是一个值得进一步探讨的方向。

[参考文献]

- [1] 丁佩佩,郑煜煌,龚国忠,等. HIV Vpr 稳定表达细胞株的建立及其促细胞凋亡作用的研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2008,28(6):545-549.
- [2] 李慧,冯铁建,郑煜煌,等. 中国 HIV-1 *vpr* 基因多态性及其临床意义的研究[J]. 中华传染病杂志,2009,27(1):35-40.
- [3] Lum J J, Cohen O J, Nie Z, *et al.* Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis [J]. Clin Invest, 2003,111(10):1547-1554.
- [4] Somasundaran M, Sharkey M, Brichacek B, *et al.* Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99(14):9503-9508.
- [5] Ou Y, Rather L. A novel inducible expression system to study trans-dominant mutants of HIV-1 Vpr [J]. Virology, 2001,287(1):133-142.
- [6] Bernstein C, Bernstein H, Payne C M, *et al.* DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis [J]. Mutat Res, 2002,511(2):145-178.

(EMB) > KM > 对氨基水杨酸钠(PAS) > 丙硫异烟胺(1321TH) > CPM, 结合本院 2003 年 7 月—2007 年 7 月间分离自 100 例结核患者的结核杆菌对 10 种抗结核药物的体外耐药性测定结果 SM > INH > RFP > AMK > EMB > L > 氧氟沙星(OFLX) > PAS > 1321TH > CPM, 可以看出 CPM 在本地区为较敏感的抗结核药之一, 与李辉等^[5]的研究相似。并且 CPM 对肝功能及听力影响较小, 明显优于 SM 和 KM; 对肾功能影响比较明显, 主要引起氮质潴留、肌酐清除率下降和电解质紊乱, 但本组未见严重肾损害病例。CPM 与 SM、AMK 均为单向耐药, CPM 与吡嗪酰胺(PZA)连用在细胞内外酸碱环境下都有杀菌作用, 是一种具备完整杀菌活性的组合。静滴型 CPM 由于是通过静脉途径用药, 避免了其肌肉注射后局部容易出现的硬结、疼痛。随着 SM 耐药率的不断升高^[6], 临床上有替代 SM 的可能。

左氧氟沙星(LVX)是氧氟沙星的 L-光学异构体, 其主要作用是抑制 DNA 旋转酶的活性, 阻碍细菌 DNA 的复制而发挥抗菌作用, 已有采用含环丙沙星或氧氟沙星方案治疗肺结核病成功的报道^[7]。LVX 对巨噬细胞内外的结核菌均有很好的杀菌抑制作用, 最低抑菌浓度(MIC)为 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 低于氧氟沙星的 MIC(0.5 $\mu\text{g/mL}$), 其强度为氧氟沙星的 2 倍, 此药正逐步取代氧氟沙星而成为 MDR-TB 的主要治疗药物, 在 WHO 耐多药结核的抗菌治疗中已被推荐^[8]。LVX 是第三代喹诺酮类抗菌药物, 作用强, 抗菌谱广, 与其他抗结核药无交叉耐药性; 属于浓度依赖型杀菌药物, 半衰期为 8 h, 按药代动力学日剂量应集中应用, 以达到较高的血药浓度, 优化抗菌活性, 加快杀菌速度, 并降低耐药性的发生; 但浓度越高, 其不良反应及毒性的发生率也越高。

PAS 可预防耐 INH 菌群的产生, 是 INH 的有效联用药物, 但其口服用量大, 且胃肠道反应明显,

患者不愿接受。静滴型 PAS 由于是通过静脉途径用药, 避免了上述不良反应。

本研究治疗组化疗方案采用了至少 3 种二线药物及其他可能敏感药物组成多药联合, 总疗程 16 个月, 与国内外报道的推荐方案^[9]基本相符。本治疗组患者取得了较好的疗效: 痰菌阴转率达 83.33%, 肺部病灶显著吸收率为 63.33%, 空洞闭合率 71.43%, 明显优于对照组, 与国内相关报道^[10-11]大体相近。说明 CPM、LVX 及 PAS 联合化疗方案在 MDR-PTB 的治疗中是有效的方案之一。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部新闻办. 卫生部公布 2004 年第三季度全国法定报告传染病疫情[S]. 北京, 2004: 66.
- [2] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996, 18(1): 28-31, 85.
- [3] 中华医学会结核病科学会. 肺结核化学疗法疗效考核[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1982, 5(6): 381-385.
- [4] 林善. CPM 在耐多药结核病治疗中的地位[J]. 临床肺科杂志, 2003, 8(3): 266-267.
- [5] 李辉, 孙秀玲, 张清华, 等. 结核杆菌对 9 种抗结核药物的体外敏感性测定[J]. 中国新药与临床杂志, 1999, 18(6): 406-407.
- [6] Tahaoglu K, Kizkin O, Karagoz T, *et al.* High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey [J]. Tuber Lung Dis, 1994, 75(5): 324-327.
- [7] 秦金陵, 丁占祥, 任宙辉. 氧氟沙星治疗耐多药肺结核近期疗效观察[J]. 临床肺科杂志, 2006, 11(1): 107-108.
- [8] 孙丽萍, 王庆枫, 吴晓光. 可乐比妥治疗肺结核的临床研究[J]. 中国防痨杂志, 2000, 22(4): 63-65.
- [9] 王琳. 耐多药结核菌感染的研究进展[J]. 国外医学内科学分册, 1999, 26(11): 485-487.
- [10] 张艳霞, 富新伟, 李青, 等. 耐多药肺结核 248 例近期疗效观察[J]. 临床肺科杂志, 2003, 8(5): 472-473.
- [11] 朱莉贞, 傅瑜, 初乃惠, 等. 利福类联合多种药物长疗程方案治疗耐多药肺结核[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(8): 520-524.

(上接第 310 页)

- [7] Furuta T, Takemura H, Liao Z Y, *et al.* Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes[J]. Bio Chem, 2003, 278(22): 20303-20312.
- [8] Wang X. Dual role of the HIV-1 vpr protein the modulation of the immunization response of T cells[J]. Genes Dev, 2001, 15(22): 2922-2933.
- [9] Zhou B B, Elledge S J. The DNA damage response: putting

- checkpoints in perspective[J]. Nature, 2000, 408(6811): 433-439.
- [10] Zhu Y, Gelbard H A, Roshal M, *et al.* Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes [J]. Virol, 2001, 75: 3791-3801.
- [11] 郑煜煌, 张春迎, 何艳, 等. 不同变异位点的 HIV-1 vpr 重组真核表达载体对转染细胞凋亡作用的观察[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(9): 614-619.