维普资讯 http://www.cqvip.com

肺炎 卡氏肺孢子虫 分类学

第23卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.3
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

遗传多样性

312-315

37

肺孢子虫分类学的研究进展
——虫株的遗传多样性

寄生虫学教研室 叶 彬* 综述
传染病寄生虫病研究所 陈雅棠 审校

中图分类号 R382.3

R563.1
R382.3

卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*,Pc)是引起肺孢子虫肺炎(*Pneumocystis carinii* Pneumonia,PCP)的病原体，以往的研究表明人与其他哺乳动物感染的Pc在免疫学方面表现出宿主来源的特异性[1]，这种特异性是由其抗原的遗传多样性决定的。近年来，随着对Pc虫株，在染色体核型及部分基因位点也表现出遗传多样性。本文现就Pc虫株的遗传多样性综述总结。

1 染色体核型

鼠源Pc DNA的脉冲场凝胶电泳分析显示其基因组包含13～15条染色体，大小范围在300～1000Kb，基因组总的大小为7～16Mbp[2-5]。大鼠源和人源Pc的核型比较显示染色体大小范围相似，但带型不同。小鼠源和雪貂源Pc的核型型明显不同，小鼠源Pc为15条带，雪貂源Pc为9条带[6]。用Pc基因探针与不同宿主源Pc株的电泳分离核型所作的杂交也显示不同的基因型[6-7]。

Cushion等[2]对10株大鼠源Pc进行染色体核型分析发现多数Pc核型为13－15条带，少数多达24条带。所有分离带位于700－300Kb之间。10株大鼠源Pc可分为4个不同的核型。有5个鼠株的Pc属于核型Ⅰ，2个鼠株的Pc属于核型Ⅱ，属核型Ⅲ和核型Ⅳ的Pc分别来自另两个鼠株。在某一鼠群中，多数大鼠的Pc属于同一核型。根据选定鼠群的追踪调查发现来自一处的大鼠源Pc核型在2～3年内保持稳定。

2 具多样性的基因位点

2.1 rRNA基因

2.1.1 核内rRNA基因

Pc是低等真核生物，它的rRNA包括16S、5.8S、26S rRNA。5S rRNA基因与16S、5.8S、26SrRNA基因不是连接在一起[8]。16S、5.8S、26S rRNA基因的连接与其他真核细胞相似。Pc的5S rRNA基因最接近阿米巴或粘菌(Myxomycota)而不像子囊菌(Ascoycetes)[9]，人源、大鼠源Pc在5S rRNA基因上是相同的[10]。Pc的16S、5.8S、26S rRNA基因序列类似酿酒酵母[6,11]，但Pc的16S、26S中的自剪接内含子Group Ⅰ Intron不同于酿酒酵母。不同宿主来源Pc的Group Ⅰ内含子也不相同[6] Group Ⅰ Intron Group Ⅰ Intron内含子(Group Ⅰ self－splicing introns，GII)在有鸟嘌呤、二价阳离子、蛋白协同因子时能催化自身从初级转录产物上剪切下来。Pc基因中的GII不同于哺乳动物的GII[8]，研究发现两株大鼠(Sprague－Dewley，PC1，Hooded，PC2)及人源Pc(PC3)的rRNA基因中的GII显示不同的基因型，GII在三者的rRNA基因的分布不同，PC1的GII位于16S和26S rRNA基因当中，PC2、PC3的GII仅存在于26S rRNA基因中。序列分析显示三者的GII DNA序列存在差异，所有这些GII均能使自身从RNA转录产物上剪切下来。

2.1.2 ITS

Lu等[12]的研究表明rRNA基因中的内转录间隔(ITS)核酸序列在人源、鼠源Pc存在差异，此序列变化可作为人源Pc株的分类标准。序列的相关性分析人源、鼠源Pc的18S、5.8S、26SrRNA基因同源性分别为100%、93.7%、91.6%，是相当保守的，

* 男，1963－08出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

而ITS1、ITS2序列变化明显，同源性分别为56.3%、69.4%。在GC含量分析方面，人源、鼠源、鼠源Pc的18S、5.8S、26S rRNA基因的GC含量为40%，ITS的GC含量为30%。

2.1.2 线粒体rRNA基因

对线粒体rRNA大亚基(23S)基因分析显示人、大鼠、小鼠、雪貂、兔、马源的Pc存在14%－27%的差异[13-15]。

五种宿主(大鼠、小鼠、雪貂、兔、人)源Pc的线粒体rRNA小亚基基因的PCR扩增试验显示扩增产物大小不同[16]，人源、小鼠源Pc为388bp，兔源Pc为423bp、雪貂源Pc为455bp、大鼠源Pc(原型)为605bp、(变异型)为706bp。扩增片段序列存在8%－18%的差异。此外，大鼠源pc(原型)含有一约250bp的插入序列(内含子)，变异型含有约90bp内含子，其余Pc没有内含子。

2.2 TS基因

胸腺嘧啶合成酶(TS)是高度保守的酶，编码TS的基因称为TS基因。1989年，Edman等确定了大鼠源Pc的TS基因[17]。Mazars等[18]对大鼠、小鼠、兔及人源Pc株的TS基因进行PCR扩增，所用引物是根据大鼠源Pc的TS基因设计的，扩增产物均为400bp大小。用以大鼠源Pc TS基因可变区设计的探针与扩增产物杂交，结果探针可与大鼠源、小鼠源Pc发生了强烈杂交，而不与人源、兔源Pc杂交。若以人源Pc的TS基因设计的19bp引物，也只与人源Pc杂交。扩增产物序列分析发现大鼠源Pc的TS基因开放读码框连接，无引导间隔，两个可能的内含子所处位置相同。与大鼠源Pc的TS基因比较发现小鼠、兔、人源Pc的TS基因分别有24、86、81处突变，这些突变约有40%发生于两个内含子区域。四种动物的TS序列不富含GC，GC含量(33.9－35.5%)无明显区别，四种宿主源Pc的TS基因编码的肽约83%相同，与大鼠源Pc的TS氨基酸序列比较，小鼠、兔、人源Pc的TS分别有3、14、11个氨基酸差异。

2.3 arom基因 arom基因所编码AROM蛋白催化芳香族氨基酸合成过程中的前分支酸盐(pre－chorismate)途径的连续5步反应。Banerji等[19]用巢式PCR方法扩增并分析了大鼠、人、雪貂、兔、小鼠五种哺乳动物源Pc株的arom基因，结果均扩增到365bp的DNA片段。比较发现五种宿主间基因在DNA水平存在7%～22%差异，在氨基酸水平存在7%～26%差异，彼此表现出高度遗传差异。雪貂肺中的Pc还存在两种类型的arom基因型，彼此间DNA水平差异为15%，二者均与其他宿主源Pc的arom基因存在差异。

2.4 微管基因

所有真核生物细胞都具微管，微管由α、β微管二体聚合而成，α、β微管为50－55kDa蛋白。编码α、β微管的基因高度保守，多种生物的α、β微管在氨基酸水平有70－90%相同。微管上的GTP结合位点是一些药物作用的位点。

比较发现大鼠源、人源Pc的β微管基因在DNA水平有81%相同，但在氨基酸水平却完全相同[20]。氨基酸水平的相同表明鼠源、人源Pc的β微管蛋白在结构、功能的相同性，因此针对鼠源Pc微管的药物可以推广到人源Pc。weinberg等[21]用大鼠源、小鼠源Pc的β微管基因为探针与PFGE分离的大鼠、小鼠源Pc染色体相互杂交，在核苷酸水平表现93%相同，用雪貂、人源Pc的β微管基因作探针与大鼠、小鼠源Pc杂交，结果仅有81～84%相同。分析编码区发现大鼠、小鼠源Pc之间核苷酸序列96%相同;大鼠、小鼠、雪貂和人源Pc之间的核苷酸序列有85～87%相同。但这些样品的氨基酸序列即是完全相同。

大鼠源、人源Pc的α微管基因的序列在不含内含子的条件下有74%相同[6]。人源Pc的该基因富含GC(57%G＋C)，大鼠源Pc则只有37%。鼠源Pc的该基因有一个41bp内含子，人源Pc的内含子则为39bp，也在相应位置，人源、鼠源Pc的α微管蛋白基因产生的多肽有92%氨基酸残基相同，反映出两者基因的差别是密码子的第三位碱基，鼠源Pcα微管基因的密码子79%以A或T结尾，而人源Pc却是74%以G或C结尾。

3 几种主要肺孢子虫株

3.1 鼠源肺孢子虫分离株

鼠源肺孢子虫各分离株也有遗传多样性，但不及不同种类宿主来的虫株的差异大。从10群不同大

维普资讯 http://www.cqvip.com

鼠来的大鼠源Pc的核型分析显示4种不同的核型，并且在2－3年内保持稳定[2]。有部分大鼠同时拥有两种核型。这两种核型分别叫做"原型"(Prototype)和"变异型"(Variant)，可以通过电泳分离的染色体杂交或18SrRNA基因有无内含子来区分。原型和变异型的18SrRNA基因[23]、26SrRNA基因[23]，TATA－box结合蛋白基因[24]、线粒体rRNA大亚基基因[26]、线粒体rRNA小亚基基因[16]显示高度的遗传多样性。

原型和变异型的序列比较，121个位置中有8个不同，变异率为6.6%。8个不同核苷酸的7个集中在高度变异的36碱基区域。对包含两种类型18SrRNA基因的核型分析发现不同染色体上含有的原型和异型的量不相同，含变异型18SrRNA基因的染色体比含原型的染色体多。

多数大鼠种群感染的是原型Pc，变异型是与原型共同感染少数宿主，各种混合感染所包含的两种类型18SrRNA量的比例不同。原型肺孢子虫看来是感染大鼠肺的主要类型，变异型也在一些实验室存在[22,26]。据报告，变异型基本上是与原型共同感染，暗示两型间没有基因互换，每种基因型各自保守稳定。目前尚不清楚是否两种类型的肺孢子虫在感染过程中彼此合作。

3.2 雪貂源肺孢子虫分离株

雪貂肺感染的肺孢子虫已发现有两种遗传类型[19,27]。arom基因的DNA序列显示两种基因型存在15%差异，在氨基酸水平有18%差异。两型与大鼠源Pc的arom基因有17－18%差异，在氨基酸水平有23%差异。在单个肺中发现两类型肺孢子虫意味着雪貂可能同时感染遗传上不同的肺孢子虫。

3.3 人源肺孢子虫分离株

来自人肺的不同肺孢子虫分离株存在遗传差异，但基差异水平不及不同宿主源肺孢子虫间的遗传差异大。

Lee等[28]对12例肺孢子虫肺炎病人进行了线粒体rRNA大亚基基因序列分析，发现5份样品的序列与Sinclair等[14]报告的参照标准型一致；另6份样品在1至3个位置(第85位，第81位，第248位，第[illegible]位)存在单碱基变异，剩下一份样品象是人源和Pc序列的杂合体。其他的报告亦类似[29,30]。

Keely等[31]证实患肺孢子虫炎有两次病程的病人所感染的Pc株在遗传上是不相的，其变化发生在线粒体rRNA大亚基基因的第85位(T、C或A)、第248位(C或T)碱基。两次病程间隔在6个月以上者其Pc株遗传差异更为明显。在对4位病人PCP治疗始末跟踪显示治疗过程中该基因位点是稳定的，从而证明PCP的复发病程是由再感染引起的而非潜伏感染的激活。

不同地域人源Pc分离株的arom基因位点也没有多大遗传差异[19]，365bp的arom基因片段在两处，即第121位(C、T)和第208位(A、G、C)碱基存在单碱基多态性，可分类六个类型，但这种变化是无意义的(silent)，所翻译成的氨基酸序列没有改变。

Lu等[12]发现15位病人的肺孢子虫的18S、5.8S、26SrRNA基因序列是相同的，但内转录间隔(ITS)却有变化。位于18S与5.8SrRNA基因之间的ITS1可分为两类，位于5.8S与26SrRNA基因之间的ITS2可分为三类。在他们研究样品中发现了4种类型的ITS序列。

4 结语

对染色体核型、核内rRNA基因(包括Group I intron和ITS)、线粒体rRNA基因、TS基因、arom基因、微管基因的比较分析发现各种宿主源Pc在上述基因位点存在不同程度的差异。不同种类宿主来源Pc的差异明显大于同种而不同株宿主源Pc。大鼠源Pc有原型及变异型之分，雪貂源Pc的arom基因有两个类型，人源Pc的不同分离株也有多个类型。对PCP的病程研究进一步证明PCP复发是由再感染引起而非原先潜伏感染的激活。因此，今后在卡氏肺孢子虫的分类命名上应考虑宿主来源的问题，至少要表示不同株型。根据国外有关专题会议建议，目前的资料不能区别究竟是真正意义上的种还是克隆上的差异。暂时采用三名法(trinomal system)命名[32]，即加上表示宿主来源的名称。大鼠源Pc(原型):*P.carinii* sp.f.*carinii*;大鼠源Pc(变异型):*P.carinii* sp.f.*rattus*;人源P:*P.carinii* sp.f.*hominis*;雪貂源Pc:*P.carinii* sp.f.*mustelae*;小鼠源Pc:*P.carinii* sp.f.*muris*，等。然而，对于来自某种宿主的各株肺孢子虫还没有名称上的区别。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1.叶 彬.等.重庆医科大学学报(待发表)
2.Cushison MT,et al.Infect & Immun, 1993;61:4801
3.Hong ST,et al.J Clin Microbiol, 1992;28:1785
4.Lundgren B,et al.Infect & Immun, 1990;58:1705
5.Stringer JR, et al.J Euk Microbiol, 1993;40:733
6.Weinberg GA,et al. J Euk Microbiol, 1994;41:223
7.Weinberg GA, et al. J Euk Microbiol, 1994;41:117S.
8.Liu Y,et al. Nucleic Acids Res, 1992;20:3763
9.Watanabe J, et al. Mol Biochem Parasitol, 1989;32:163
10.Kitada K, et al.J Clin Microbiol, 1991;29:1985
11.Edman JC, et al.Nature, 1988;334:519
12.Lu JJ, et al. J Clin Microbiol, 1994;32:2904
13.Peters SE, et al. J Clin Microbiol, 1994;32:213
14.Sinclair K, et al. Mol Biochem Par isitol, 1991;45:183
15.Wakefield AE, et al. Mol. Microbiol, 1992;6:1903
16.Wakefield AE. Bailliere ' s Clin Infect Dis, 1995;2:431
17.Edman U, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989;86:6503
18.Mazars E, et al. J Euk Microbiol, 1995;42:26
19.Banerji S, et al. J Euk Microbiol, 1995;42:675
20.Edlind TD, et al. Mol Microbiol, 1992;6:3365
21.Weinberg GA,et al. J Euk Microbiol, 1994;41(5):118S.
22.Cushion MT, et al. J Clin Microbiol, 1993,31:127
23.Ortiz-Rivera M,et al. J Euk Microbiol, 1995;42:44
24.Sunkin SM, et al. J Euk Microbiol, 1995;42:12
25.Keely S, et al. J Euk Microbiol, 1994;41:94S
26.Liu Y, et al.Nucleic Acids Res, 1993;21'2415
27.Banerji S, et al. J Euk Microbiol, 1994;41:73S.
28.Lee CH, et al. J Clin Microbiol, 1993;31:754
29.Latouche S, et al. J Clin Microbiol, 1994;32:3052
30.Wakefield AE, et al. J Clin Microbiol, 1994;32:2959
31.Keely SP, et al. J Infect Dis, 1995,172:595
32.Bartlett MS, et al. J Euk Microbiol, 1994;41:121S

(收稿日期 1997-11-05)

恶性肿瘤，肿瘤转移，骨髓微小转移灶

315-317

(38)

恶性肿瘤骨髓微小转移灶检测的临床意义

临床学院胸外科 蒿明建* 综述 李良彬 审校

R73-37

中图分类号 R73-37

肿瘤病人的高死亡率与癌细胞发生异位隐匿性微小转移有关，而骨髓是癌细胞发生微小转移的重要部位，对恶性肿瘤患者骨髓中的微转移进行检测具有重要的临床意义。本文综述近年检测恶性肿瘤骨髓微转移的免疫学和分子学方法及其临床意义。

在癌症病程的早期阶段，癌细胞就可能播散到原发灶以外的远处部位，而传统的诊断方法往往不能检测到这种发生异位播散的隐匿性单个癌细胞或癌细胞集落。骨髓是最重要的转移部位之一，播散至其中的癌细胞能够被免疫学或分子学方法检测到。骨髓微转移(Bone Marrow Micrometastasis，BMM)是指存在于肿瘤病人的骨髓抽吸物或活检标本中能够被检测到的癌细胞，而此时病人往往没有发生远处或骨髓转移的临床或影像学证据。故对BMM进行检测具有重要意义，它可预测

*男，1970-02出生，硕士生