

结核分枝杆菌毒力相关因子研究进展

董海燕 张建中 万康林

结核病 (tuberculosis) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染引起的传染病,也是单一致病菌感染导致病死率最高的疾病。近年来由于艾滋病的流行、人口流动、耐药结核病的增多,全球结核病发病率呈现出上升的趋势,结核病对人类的生命威胁仍旧十分严峻。据 WHO 报道,目前全世界约 1/3 的人口感染了结核分枝杆菌,每年约有 800 万新病例发生,约有 300 万死于结核病。因此,对结核分枝杆菌致病机制的研究日益引起世界范围的重视。现代分子生物学技术的发展以及结核分枝杆菌全基因组测序的完成为结核分枝杆菌致病机制的研究奠定了基础。关于结核分枝杆菌致病机制方面的文献报道也日益增多,本文就结核分枝杆菌的主要毒力相关因子做一简要综述。

一、细胞表面分子及分泌蛋白

结核分枝杆菌的细胞壁除了含有细胞膜、肽聚糖层外,还富含疏水分枝菌酸,长链脂肪酸及其特殊的脂类和糖脂等,这些特殊的成分使得结核杆菌表面具有很强的疏水性,并在其致病性中具有特殊作用。

Ag85 复合物是结核杆菌主要的分泌性蛋白,包括 Ag85A、Ag85B、Ag85C 3 个组分,分别由 *fbpA*、*fbpB*、*fbpC* 3 个基因编码。它能选择性的和宿主细胞上的纤维结合素 (FN) 相结合,提高结核杆菌在组织中的聚集或播散能力。此外,Ag85 复合物还具有分枝菌酸转移酶活性,在细胞壁合成的晚期起重要作用^[1]。

脂阿拉伯甘露聚糖 (LAM) 是结核杆菌细胞壁的重要组成部分,其核心骨架为甘露聚糖、侧链为甘露糖、阿拉伯糖单位,以磷脂酰肌醇锚定在胞质膜上。包括 ManLAM、AraLAM、PILAM。AraLAM 是一种强有力的趋化因子诱导剂,PILAM 也可在巨噬细胞和

树突状细胞中诱导有力的炎性反应。ManLAM 参与阻碍吞噬体成熟、细胞凋亡及细胞因子分泌的过程,可能对结核杆菌的早期感染和细胞内存存具有重要作用^[1]。

mmaA4 是结核杆菌中的一个基因簇,编码 4 个密切相关的甲基转移酶,其功能是向分枝菌酸引入环丙烷和甲基分支,修饰结核杆菌细胞壁的分枝菌酸。利用两步质粒法构建结核杆菌 mmaA4 基因突变株,突变株生长正常但不能产生甲基和酮式分枝菌酸,细胞壁发生明显改变,与野生型菌株相比,突变株对甘油、脱氧胆酸盐等化合物的渗透性降低,而对氧化应激反应的耐受性增高。突变株在小鼠模型中表现为毒力减弱^[1]。

PcaA 是一种环丙烷合成酶,仅存在于致病性分枝杆菌中,在非致病性分枝杆菌中不存在。其功能是在分枝菌酸上加入一个环丙烷基,在形成分枝菌酸的索状结构中具有重要作用。在一项致死性试验中,结核杆菌 *pcaA* 基因缺失突变株与野生型菌株相比,在小鼠中表现为毒力减弱。这表明 PcaA 对结核杆菌的致病性具有一定的作用^[1]。

结核菌醇二分枝菌酸 (phthiocerol dimycocerosate, PDIM) 是结核杆菌细胞壁的主要脂类成分之一,仅存在于致病性分枝杆菌中。与之相关的基因主要有 *drnC*、*fadD26*、*fadD28*、*mas*、*mmpL7* 等。*Mas*、*FadD26* 和 *FadD28* 对于 PDIM 的合成是必需的,而 *DrrC* 和 *MmpL7* 对 PDIM 在细胞壁上的定位具有重要作用。相关研究表明,参与 PDIM 代谢及其在细胞内转移的基因突变后可导致结核杆菌的致病力下降。PDIM 缺失突变株在静止巨噬细胞和树突状细胞内可长期存活,在活化巨噬细胞中对产生的活性氮中间产物的敏感性增加,表明 PDIM 可能有助于结核杆菌抵抗巨噬细胞的氮氧杀菌作用^[1]。

二、细胞代谢相关因子

许多病原菌在感染过程中可由于某些必需的营养物质或辅助因子的影响而丧失其致病性,如碳源、氨基酸、嘌呤、嘧啶、镁离子和铁离子等。研究人员系

基金项目:国家“十一五”重大传染病防治科技重大专项基金资助项目 (2008ZX100/03-010-02)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

通讯作者:万康林,电子信箱:wankanglin@chinatb.org

统地构建了结核分枝杆菌中参与生物合成和降解途径中的酶的编码基因的突变株,来研究与结核分枝杆菌致病性有关的基因。

fadD33 基因编码乙酰辅酶 A 合成酶,由于该基因在结核杆菌有毒株 H37Rv 中的表达量比在无毒株 H37Ra 中高。因此有研究构建了结核杆菌 fadD33 基因突变菌株,并检测突变株对小鼠的毒性作用,结果显示突变株在肺脏和脾脏中生长能力与野生株相似,但在肝脏中的生长能力下降。目前对 fadD33 基因突变菌株产生的这种组织特异性表型的机制还不清楚^[2]。

异柠檬酸裂解酶(Icl)是结核杆菌乙醛酸代谢途径的关键酶。有研究表明,用结核杆菌 icl 基因缺失突变株感染小鼠时,突变株不能进入持续感染阶段,在感染 2 周后即被进行性清除,而野生型菌株却能进入潜伏感染期。在突变株中重新导入 icl 基因,突变株即可恢复野生型表型。这表明 Icl 在结核杆菌的持续性感染中具有重要作用^[3]。

分枝杆菌酯酶 F (LipF) 受酸性环境的诱导,在 pH 值降低时其表达量增高。功能可能是水解干酪坏死性结核病灶中的有毒脂肪酸,或作为对酸性损伤的适应性反应修复结核杆菌细胞壁^[4]。

脂类是结核杆菌细胞壁的主要成分,其代谢与结核杆菌的生长繁殖密切相关。辅酶 A 和酰基载体蛋白是脂类合成的两个必要物质,而泛酸又是它们合成所必需的前体物质。结核杆菌 PanC 和 PanD 均参与泛酸生物合成。研究表明用结核杆菌 panC 和 panD 基因缺失突变株感染小鼠,发现突变菌株感染的小鼠比野生型菌株感染的小鼠的存活时间长^[5]。

结核杆菌磷脂酶 C 由 plcA、plcB、plcC 和 plcD 4 个基因编码,能够水解鞘磷脂和卵磷脂。已经构建了单独或者多个 plc 基因删除的突变株。所有这些突变株均显示了低磷脂酶活性,每个基因对酶活力的改变具有同等作用。而且,突变株在感染小鼠后期都表现为生长动力学减弱,表明了磷脂酶 C 对结核杆菌毒力的具有重要作用^[6]。

HspX 具有分子伴侣活性,与结核杆菌的持续性感染有关。HspX 在 RNI 应激条件下诱导,是结核杆菌在巨噬细胞内生存所必需的一种免疫抗原。此外,该蛋白还有助于结核杆菌在低氧环境下长期生存维持细胞结构的稳定性^[7]。

proC 和 trpD 基因分别参与脯氨酸和色氨酸的合成,利用两步质粒法构建结核杆菌 proC 和 trpD 基因

突变株,并感染小鼠,结果发现这两种基因的突变菌株在小鼠中的毒力均减弱,提示 proC 和 trpD 是结核分枝杆菌的毒力因子^[8]。

MgtC 为沙门菌 MgtC 蛋白同族体,由于在沙门菌中 MgtC 为细菌在巨噬细胞和低 Mg^{2+} 条件下生存所必需。故有研究构建了结核杆菌 Erdman mgtC 基因突变株,研究结果显示突变株在低 Mg^{2+} 条件下及在巨噬细胞内生长能力下降。但是又有研究发现结核杆菌 H37Rv mgtC 基因突变株在感染巨噬细胞及在低 Mg^{2+} 条件下生存时,生长能力不发生改变。目前对 MgtC 的确切作用机制还不是很清楚,有待于进一步研究^[9]。

glnA1 基因编码谷氨酸合成酶,在氮代谢中具有重要作用。研究发现 glnA1 突变株在巨噬细胞及小鼠模型上均表现为毒力减弱,提示其与结核杆菌毒力相关^[10]。

三、转录调节因子

由于转录因子控制许多基因的转录,利用定点突变技术使某些转录基因失活,可以发现许多对结核分枝杆菌致病性具有重要作用的基因。

在结核杆菌基因组中,已经有 13 个 sigma 因子得到了注释。与结核分枝杆菌持续感染中有关的主要有 SigA、SigF 和 SigH。SigA 又称 RpoV,是结核杆菌必不可少的 sigma 因子,为多数结核杆菌管家基因转录所必需。它通过与 whiB3 相互作用而活化毒力相关基因的表达。有研究表明牛分枝杆菌 sigA 突变菌株的毒力较野生型菌株下降。SigF 控制细菌对环境应激的反应,sigF 相关基因包括多种调控基因以及参与细胞壁生物合成的基因。用结核杆菌 sigF 突变株和野生株感染小鼠,在感染的第 12 周,两者引起的病变程度几乎一致,之后,突变株在小鼠脾肺中引起的损伤和炎症比野生型要轻。SigH 主要参与热休克和氧化应激反应,在翻译后水平 SigH 的活性受反 sigma 因子 RsrA 调节,虽然在小鼠模型中 SigH 的表达不是结核杆菌生长所必需的,但是感染了 sigH 突变株的小鼠比感染了野生型菌株的小鼠存活时间要长^[11]。

phoP 是各种胞内致病菌在宿主细胞内转录的关键基因。将 phoP 基因整合入弱毒株 H37Ra 后发现,重组后的 H37Ra 能够分泌 ESAT6 蛋白且毒力增强。提示 phoP 基因是结核杆菌的一种毒力因子,PhoP 通过影响 Rv3614c - Rv3616c 的表达进而影响 ESAT6 蛋白分泌^[12]。

铁是多种酶的辅助因子,在结核杆菌的生长过程中发挥了重要作用。在铁存在时,ideR 通过结合在一段特定的 DNA 保守序列上控制基因转录。它既是铁获得基因的抑制物,又是铁储藏基因的激活子和氧化应激反应的正调节因子^[13]。

四、双组分调节系统

双组分调节系统广泛的分布于细菌中,使有机体基因表达能随环境刺激而做出相应的改变。结核分枝杆菌的基因组序列中包括 11 个完整的双组分系统,其中一部分与结核分枝杆菌的致病性相关。

DevR - DevS 是由传感器激酶和反应调节子组成的一种双组份调节系统。在结核杆菌的 11 个双组分调节系统中,有 5 个是以磷酸信号为基础的,分别是 RegX3 - SenX3、TrcR - TrcS、MprA - MprB、PrrA - PrrB、DevR - DevS。DevR - DevS 在氧化应激与低氧时被激活,控制整体反应,在氧饥饿诱导的分枝杆菌休眠反应中起调节作用^[14]。

MprB 作为传感器激酶能够进行磷酸化,给转录因子 MprA 提供磷酸基团。MprAB 作为双组分调节系统在结核杆菌的持续性感染中发挥作用。研究发现结核杆菌 mprAB 基因缺失突变菌株的应激反应表型发生改变,对 SDS 和细胞壁抗生素的敏感性增加^[15]。

五、分泌系统

致病菌和宿主细胞相互作用的一个特点是将毒力因子分泌到胞外或定位到细菌表面。目前,已经对革兰阴性菌的蛋白分泌机制进行了广泛研究,并确认了细菌 I ~ VI 型分泌系统。有研究表明,结核杆菌的培养滤液中含有缺少传统信号序列的蛋白,表明在结核杆菌中存在新的蛋白分泌系统。这种蛋白分泌系统被命名为 ESX/T7SS 分泌系统,即 VII 型分泌系统。

ESX - 1 分泌系统负责 ESAT6/CFP - 10 的分泌,这两种蛋白能够形成 1:1 的二聚体,是结核杆菌中重要的毒力因子。两者的基因位于结核杆菌基因组 RD1 区,而 RD1 区仅存在于致病性分枝杆菌中,在卡介苗 (BCG) 及环境分枝杆菌中缺失,将完整的 RD1 区导入 BCG 后,ESAT6 蛋白能够分泌。研究表明, RD1 区的某些基因是结核杆菌的毒力因子,敲除 Rv3870、Rv3871、Rv3877 基因可阻断 ESAT6 和 CFP - 10 的分泌,并且其突变菌株在表型上和 RD1 区缺失株一致,对巨噬细胞的毒力减弱。Rv3614c - Rv3616c 基因区域也参与 ESX - 1 分泌系统,研究发现 Rv3614c - Rv3616c 中的任何一个基因发生破坏,

突变株在小鼠肺部和脾脏的毒力均会减弱^[16]。

ESX - 5 分泌系统参与结核杆菌在巨噬细胞间的传播,研究发现 ESX - 5 分泌系统为海分枝杆菌生存所必需,对感染巨噬细胞后 PPE 家族蛋白的分泌具有一定作用。把完整的 ESX - 5 分泌系统基因簇重组入耻垢分枝杆菌,耻垢分枝杆菌能够异源性表达 PPE41 蛋白^[17]。

六、应激蛋白

katG 基因编码过氧化氢 - 过氧化物酶,在结核杆菌抵抗 ROI 及 RNI 杀伤中起重要作用。有 50% 的异烟肼耐药株 katG 基因突变或缺失,使氧化氢 - 过氧化物酶活性丧失,导致无活性的异烟肼中间产物产生,这些耐药株在感染小鼠时表现为毒力比减弱,而将外源 katG 基因导入耐药株中可以恢复其毒力^[18]。

ahpC 基因编码烷基过氧化物酶。在结核杆菌抗氧化应激和氮化应激中具有重要作用。研究发现结核杆菌 H37Rv 的 ahpC 基因缺失突变株对亚硝酸盐的敏感性增加,在静止巨噬细胞中生长能力下降^[19]。

SodA 是一种铁依赖超氧化物歧化酶,有助于结核杆菌在细胞内生存。sodC 基因编码铜、锌超氧化物歧化酶,负责结核杆菌中部分超氧化物歧化酶活性, sodC 基因突变株易被超氧化物和 IFN - γ 杀死,提示其在结核杆菌抗氧化作用中具有一定的作用^[20]。

七、其 他

erp 基因编码输出重复蛋白,与细菌在宿主细胞内繁殖有关。包含 3 个不同结构域,中心是基于 PGLTS 基序的重复区,含有信号序列高度保守的 N 末端以及富含脯氨酸、丙氨酸保守的 C 末端。有研究表明结核杆菌 erp 基因缺失突变株在小鼠巨噬细胞内的生长繁殖受到抑制,而重新在突变株中引入 erp 基因可恢复其复制能力^[21]。

PE/PE - PGSR 家族成员根据 N - 末端 Pro - Glu 基序以及 C - 末端 Gly - Gly - Ala 或 Gly - Gly - Asn 序列重复程度命名。一些 PE 家族成员可促进抗原的多样性,有助于结核杆菌的免疫逃逸。还有一些 PE 家族成员与结核杆菌的毒力相关;有些位于细胞表面,对维持细胞结构具有作用,还有一些对结核杆菌的持续性感染具有作用^[22]。

结核杆菌肝素结合血凝素 HBHA 是结核杆菌的一种菌体成分,它与宿主上皮细胞的相互作用与肺外结核发病密切相关。小鼠实验表明,破坏 hbbA 基因,会减少脾脏而不是肺脏的结核杆菌菌落,提示它

可能与结核杆菌的肺外播散有关^[23]。

八、展 望

虽然目前对结核分枝杆菌的致病机制的研究很多,这些研究也确定了一些与结核分枝杆菌致病相关的基因,但是我们对结核分枝杆菌的致病机制还所知甚少。结核分枝杆菌的致病机制可能与多方面的因素有关,但是也不排除有可能存在某一关键因素。分子生物学技术的发展,有助于我们发现更多的与结核分枝杆菌致病相关的因子。这些结核分枝杆菌致病相关因子的研究为抗结核药物的选择以及更有效更全面以保护作用的新型疫苗的研究提供了关键的靶标。这对结核病的防治工作具有重要的意义。

参考文献

- 1 Takayama K, Wang C, Besra GS. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1):81-101
- 2 Trivedi OA, Arora P, Sridharan V, *et al.* Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature*, 2004, 428(6981):441-445
- 3 Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(3):463-496
- 4 Saviola B, Woolwine SC, Bishai WR. Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based *in vivo* expression technology. *Infect Immun*, 2003, 71(3):1379-1388
- 5 Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, *et al.* A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med*, 2002, 8(10):1171-1174
- 6 Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, *et al.* Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2002, 45(1):203-217
- 7 Desjardin LE, Hayes LG, Sohaskey CD, *et al.* Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 2001, 183(18):5311-5316
- 8 Smith DA, Parish T, Stoker NG, *et al.* Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun*, 2001, 69(2):1142-1150
- 9 Buchmeier N, Blanc-potard A, Eht S, *et al.* A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 2000, 35(6):1375-1382
- 10 Tullius MV, Harth G, Horwitz MA. Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. *Infect Immun*, 2003, 71(7):3927-

3936

- 11 Manganelli R, Prowedi R, Rodrigue S, *et al.* Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 2004, 186(4):895-902
- 12 Ludwiczak P, Gilleron M, Bordat Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant: lipoarabinomannan molecular structure. *Microbiology*, 2002, 148:3029-3037
- 13 Rodriguez GM, Smith I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Mol Microbiol*, 2003, 47(6):1485-1494
- 14 Saini DK, Malhotra V, Dey D, *et al.* 2004. DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR. *Microbiology*, 2004, 150(4):865-875
- 15 Zahrt TC, Wozniak C, Jones D, *et al.* Functional analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* MprAB two-component signal transduction system. *Infect Immun*, 2003, 71(12):6962-6970
- 16 Abdallah AM, Gey van pittius NC, Champion PA, *et al.* Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(11):883-891
- 17 Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, *et al.* A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol*, 2006, 62(3):667-679
- 18 Ng VH, Cox JS, Sousa AO, *et al.* Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol*, 2004, 52(5):1291-1302
- 19 Master SS, Springer B, Sander P, *et al.* Oxidative stress response genes in mycobacterium tuberculosis role of ahpC in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages microbiology. 2002, 148(10):3139-3144
- 20 Spagnolo L, Törö I, D'Orazio M, *et al.* Unique features of the sodC-encoded superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*, a fully functional copper-containing enzyme lacking zinc in the active site. *J Biol Chem*, 2004, 279(32):33447-33455
- 21 De Mendonca-Lima L, Picardeau M, Raynaud C, *et al.* 2001. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria. *Microbiology*, 2001, 147(8):2315-2320
- 22 Delogu G, Pusceddu C, Bua A, *et al.* Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol*, 2004, 52(3):725-733
- 23 Pethe K, Bifani P, Drobek H, *et al.* Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllsines that confer resistance to proteolysis. *Proc Natl Aca. Sci USA*, 2002, 99(16):10759-10764

(收稿:2010-12-28)

(修回:2011-05-29)