

# 炭疽杆菌致病性研究进展

何 湘 黄留玉\*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

**摘 要:** 炭疽杆菌是人类历史上第一个被发现的病原菌。炭疽杆菌的研究在近几年取得了较大进展,特别是本年度其基因组序列测定已完成并向全世界公布,进一步深化了对炭疽杆菌的研究。炭疽杆菌致病性的研究一直是炭疽杆菌研究的重点,近年来此方面的研究取得了很多新进展,从基因组、致病物质及致病机制 3 个方面对此作一个简单的介绍。

**关键词:** 炭疽杆菌,致病性

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0101-05

## Advanced in Pathogenesis of *Bacillus anthracis*

HE Xiang HUANG Liu-Yu\*

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

**Abstract:** *Bacillus anthracis*, the aetiological agent of anthrax, was the first discovered pathogenic bacterium in history. Rapid progresses have been made on this field in recent years, especially; *Bacillus anthracis* has been sequenced successfully early this year and published on the Internet. The anthrax pathogenesis is always central to the study and there has been an enormous amount of work to elucidate it. In this review, we will focus on the latest findings that concern three aspects of anthrax pathogenesis: *Bacillus anthracis* genome, pathogenic substances and pathogenesis mechanism.

**Key words:** *Bacillus anthracis*, Pathogenesis

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 简称炭疽杆菌,是炭疽病的病原体。炭疽杆菌是人类历史上第一个被发现的病原菌,由于其致病性较强以及可作为生物战剂,受到各国的广泛重视,对其致病性及生物学性质有了深入的认识。近年来由于生物恐怖的出现及炭疽毒素在肿瘤治疗等方面的应用,世界各国特别是美国加大了对炭疽杆菌研究的投入,组织一些科研机构,联合多个学科的力量,共同推进对炭疽杆菌的研究,取得了很大的进展。2003 年炭疽杆菌的全基因组序列向全世界发布,意味着炭疽杆菌的研究进入了一个新的发展阶段。本文仅对近年来炭疽杆菌致病性方面的主要研究进展作简要介绍。

## 1 炭疽杆菌基因组研究

炭疽杆菌的基因组包括染色体和两个大质粒 (pXO1 和 pXO2)。为了全面研究炭疽杆菌,美国基因组研究中心 (TIGR) 计划对世界上 20 个炭疽杆菌的菌株进行测序,这样既能够代表炭疽杆菌的多样性,又能够对不同株系的基因组进行比较研究,以更好地揭示不同菌株的致病性和生物学特征差异的成因。目前, TIGR 已经完成了对炭疽杆菌 Ames 株全基因组的测序工作<sup>[1]</sup>。通过基因组研究炭疽杆菌的致病性尚处在起步阶

\* 联系人 Tel: 010-66948835, E-mail: Huangly@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-09-29, 修回日期: 2003-11-20

段,基因组的进一步分析将为致病性研究带来更多的启示。

## 2 炭疽杆菌致病物质

炭疽杆菌的致病物质主要是荚膜和炭疽毒素,近些年主要围绕着这些致病物质的基因表达调控、分子结构与功能开展了研究工作,取得了一些新的认识。

**2.1 荚膜** 1993年,Fadyean首次描述了炭疽杆菌的荚膜。荚膜是 $\gamma$ -D-谷氨酸的多聚物。多聚谷氨酸链在体外分子量为20~50 kD,在体内为215 kD。这种多肽荚膜并不常见,仅见于枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌中。

控制荚膜的合成与降解的基因位于pXO2上。*capB*、*capC*、*capA*编码3个合成荚膜所必需的酶CapB、CapC、CapA。通过序列分析推断它们均属于膜相关蛋白。*dep*基因与荚膜的降解相关,通过水解多肽荚膜来控制荚膜的大小。由于荚膜是单一线形 $\gamma$ -D-谷氨酸的多聚物,它的免疫原性较弱。但Schneerson等人发现,将 $\gamma$ -D-谷氨酸多聚物与载体蛋白(BSA、PA和绿脓杆菌毒素A)相连,注射入小鼠体内,可诱发小鼠产生抗谷氨酸多聚物IgG抗体。这一研究结果可能会加速炭疽疫苗的研究<sup>[2]</sup>。

**2.2 炭疽毒素** 1955年,Smith和他的同事通过过滤炭疽杆菌感染的豚鼠的血清,首次证明了炭疽毒素的存在。炭疽毒素包括保护性抗原(PA)、致死因子(LF)和水肿因子(EF)。在致病时,炭疽毒素的单一成分不能发挥作用,水肿因子或致死因子必须与保护性抗原结合成水肿毒素(EF+PA, edema factor, EdTx)或致死毒素(LF+PA, lethal factor, LeTx)才具有活性。编码毒素的3个基因*pagA*、*cya*和*lef*位于pXO1质粒的“致病岛”(pathogenicity island)上,该“致病岛”长44.8kb,两侧有插入元件IS1627,说明毒素可进行水平转移。

**2.2.1 保护性抗原:**保护性抗原有735个氨基酸,分子量为83 kD。共有4个结构域,执行特定的功能<sup>[3]</sup>。

结构域1包括蛋白水解片段PA20及推测的位点PA1'。这段区域有弗林蛋白酶切割位点,该点被切开后,PA产生2个片段:N-端PA20和C-端PA63。结构域2与孔道形成和PA63插入膜有关。此区域包括一个大的糜蛋白酶敏感的嗜喋(loop)。在低pH值时,七聚体的七个嗜喋重排,构象发生改变,形成14条 $\beta$ 片层组成的离子选择性通道。结构域3是四个结构域中最小的一个,与EF和LF结合于PA上有关。结构域4(488~595位氨基酸)参与PA与膜受体的结合。

**2.2.2 致死因子:**致死因子长776个氨基酸<sup>[3]</sup>,分子量为90kD,也有4个结构域<sup>[4]</sup>。结构域1的N-端与PA结合。结构域2参与形成“结合口袋”,与芽孢杆菌ADP-核糖基化毒素(VIP2)相似,但是由于突变不具备VIP2的活性。结构域3由5个序列相同的螺旋组成,插入到结构域2中,负责底物特异性地结合到“结合口袋”。结构域4是结合锌的催化中心,与嗜热菌蛋白酶家族的蛋白酶活性相似。结构域4的折叠方式与结构域1相似,但在结构域1中缺少几个催化残基。

**2.2.3 水肿因子:**水肿因子的研究较PA和LF滞后。直到2002年才获得了水肿因子的催化部分EF58的晶体结构<sup>[5]</sup>。水肿因子767个氨基酸<sup>[3]</sup>,分子量为89 kD。

水肿因子有3个结构域。催化活性中心在结构域1、2中间,结构域2插入到结构域1中,结构域3形成钳状结构包绕钙调蛋白。结构域3与钙调蛋白结合后,EF发生重排,与底物正确结合。与钙调蛋白接触的氨基酸残基分散于EF的一级结构上,所以

研究钙调蛋白的结合位点比较困难。水肿因子与致死因子的 PA 结合区相同<sup>[3]</sup>。

位于 *pagA* 和 *cya* 之间的转录激活子 *atxA* 可能是炭疽杆菌调控的总调控子<sup>[6]</sup>。*atxA* 可以上调 3 个毒素和荚膜基因的转录, *atxA* 的表达不受 CO<sub>2</sub> 的调控, 但是 *atxA* 对其他基因的调控与 CO<sub>2</sub> 密切相关。目前 *atxA* 与 CO<sub>2</sub> 调控的关系还不清楚。

**2.2.4 毒素受体:** PA 的受体存在于多种细胞上, Bradley 等人找到了 PA 受体突变的 CHO 细胞, 通过对 cDNA 文库的筛选, 鉴定出炭疽毒素受体 (anthrax toxin receptor, ATR)<sup>[7]</sup>。目前, Scobie 等人用 PA 受体突变的 CHO 细胞和体外与 PA 直接结合实验验证 CMG2 (capillary morphogenesis protein 2) 也是 PA 受体蛋白。但是哪一个受体更重要还不清楚<sup>[8]</sup>。

### 3 炭疽杆菌致病机制

炭疽感染是从芽孢进入宿主开始的。在动物模型研究中, 通常采用呼吸道和皮内注射两种途径。不论哪种途径的感染, 芽孢都会被巨噬细胞吞噬并转运到局部淋巴结。如果超过了局部淋巴结的吞噬能力, 感染会继续蔓延到下一个淋巴结, 然后进入血液。早期观察发现, 炭疽杆菌是细胞外感染的病原菌, 需要胞内的活化过程。吸入炭疽杆菌后, 芽孢可在肺泡巨噬细胞中发芽。Matthew 研究小组对此提出了不同意见, 他们根据实验结果推测炭疽杆菌芽孢可能在被巨噬细胞吞噬前, 就在其附近发芽<sup>[9]</sup>。炭疽杆菌的发芽调节需要很多 *ger* 操纵子识别复杂的较低浓度的发芽子 (germant) 信号。位于染色体上的 *gerA* 家族 (*gerAA*、*gerAB*、*gerAC*) *gerS*、*gerH*<sup>[9]</sup> 和 *pXO1* 上的发芽基因 *gerX* 编码发芽子识别蛋白。发芽子包括肌苷-组氨酸、肌苷-甲硫氨酸、肌苷-苯丙氨酸等, 统称为肌苷-组氨酸发芽反应通路。目前, 发芽基因识别发芽子后的一系列事件还不清楚。发芽后的炭疽杆菌在体内可以产生荚膜。由于荚膜是单一线形  $\gamma$ -D-谷氨酸的多聚物, 故其免疫原性弱, 可帮助细菌逃避宿主的免疫防御, 阻止巨噬细胞吞噬, 有助于菌血症的发生。

炭疽芽孢杆菌发芽入血后, 分泌保护性抗原、致死因子和水肿因子。炭疽毒素与宿主细胞的相互作用一直是炭疽杆菌致病性研究的核心问题, 炭疽毒素进入宿主细胞的一般过程和主要致病机制见图 1。首先, 保护性抗原与细胞表面的受体结合, 保护性抗原被弗林蛋白酶水解成两部分, 导致 PA20 从 PA63 上分离下来, PA63 暴露出与水肿因子和致死因子结合的位点, 并聚合成七聚体。然后, 水肿因子和致死因子与受体竞争性结合。至少两个 PA 分子才能与一个致死因子或水肿因子结合, 所以实际上七聚体最多可以与 3 个致死因子或水肿因子分子结合<sup>[10]</sup>。接下来, 复合体进入细胞内。复合体进入细胞的方式一直困扰着研究者, 直到最近 Abrami 等人证实: 七聚体促使 ATR 聚集于细胞膜上富含胆固醇和鞘糖脂的脂筏 (lipid rafts), 然后通过笼形蛋白途径内化<sup>[11]</sup>。内化后, 在酸性 pH 值时七聚体发生构象的改变, 形成阳离子选择性通道并插入膜中。水肿因子和致死因子通过孔道进入细胞质, 致死因子与膜脱离, 而水肿因子始终与膜相连<sup>[6]</sup>。最后水肿因子和致死因子到达它们各自作用的靶蛋白。

水肿因子可与各种类型的细胞作用, 把真核细胞内的 ATP 催化成 cAMP, 使细胞内的 cAMP 异常增多。水肿因子的催化能力很强, 每毫克蛋白质可催化 cAMP 的最大速率为 1.2 mmol/min, 类似于百日咳腺苷酸环化酶。

致死因子是锌金属蛋白酶。致死因子通过识别丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸位点切割促有

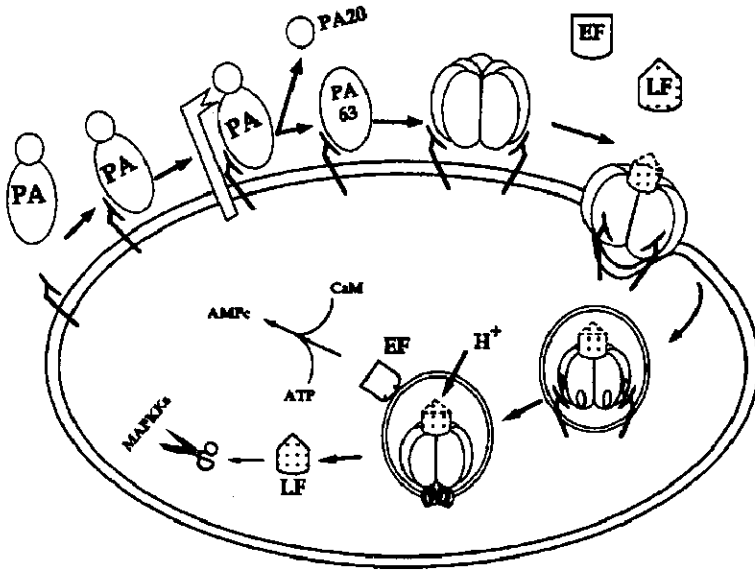


图 1 炭疽毒素作用模型

丝分裂原活化蛋白激酶 1、2、3、4、6、7 (MAPK1、2、3、4、6、7) 和促有丝分裂原活化蛋白激酶激酶 (MAPKK) 的 N-端<sup>[12]</sup>。MAPK 调节通路的生理功能主要是接受环境中的转录信号, 通过一系列蛋白的磷酸化, 调节基因的表达, 促进细胞的有丝分裂, 调节细胞对应激的反应, 最终控制细胞周期和程序性死亡<sup>[12]</sup>。致死因子与水肿因子不同, 它的宿主细胞范围窄。定位于鼠 11 号染色体的基因 *Ltx1* 决定了鼠细胞巨噬细胞对致死毒素的敏感性<sup>[13]</sup>。

早期的研究主要集中于致死因子与巨噬细胞宿主的相互作用, 最近, Pulendran 研究小组发现, 致死因子也能通过 MAPK 途径作用于树突细胞。在培养树突细胞中加入致死毒素, 再加入脂多糖后, 树突细胞的共刺激因子不上调, 分泌的细胞因子大大降低; 体内实验表明抗原特异性的 T 细胞不能被激活, 注射致死因子后抗原特异性的体液免疫和细胞免疫都受到严重损伤。这一发现为宿主对炭疽杆菌的免疫不应答提供了线索<sup>[14]</sup>。

致死因子切割 MAPK 和 MAPKK 对炭疽杆菌的致病机制很重要, 但是切割后发生的一系列事件还不清楚。此外, MAPK 和 MAPKK 的活性丧失, 不能完全解释细胞的变化和溶解死亡。致病因子的致病机制还有待进一步阐明。

巨噬细胞是导致休克的主要原因, 但引起死亡的分子机制还不清楚。MAPK1、2、3 相关的信号传导系统在巨噬细胞的激活中起重要作用, 直接关系到巨噬细胞细胞因子 TNF、IL-1、IL-6 等的产量。另有报道表明去除巨噬细胞的小鼠对 *LeTx* 不敏感, 所以推断巨噬细胞在对付 *LeTx* 时释放出的细胞因子, 可能是它导致休克的主要原因。同时, *EdTx* 通过增加 cAMP 也可以影响细胞因子的产量<sup>[15]</sup>。在培养的单核细胞中, *EdTx* 大大降低脂多糖刺激所产生的 TNF- $\alpha$ , 阻止细胞的吞噬能力和氧化爆发能力, 并刺激中性粒细胞的趋化作用。据此推断, 早期水肿毒素和致死毒素有协同作用。水肿毒素可以减少炎症介质的释放, 促进了细菌的增殖。其后的菌血症阶段, 炭疽杆菌产生大量的致死毒素, 导致中毒性休克和宿主死亡。

## 4 其它

近几年炭疽杆菌致病性的研究取得了很大的进展,这也为炭疽的治疗和预防提供了新思路。例如, Mourez 和 Sellman 研究小组设计的药物可以阻断 PA 和 ATR 的结合或阻断 PA 的寡聚化及毒素复合物的形成;鉴于 AtxA 对致病物质调节的重要性, AtxA 可以作为治疗炭疽药物的靶标。

今后的研究将进一步揭示炭疽毒素与致病机理的关系。由于 LeTx 在炭疽致病中的重要作用及它在肿瘤和艾滋病等应用方面的潜力, LeTx 对细胞的 MAPK 通路调节将成为研究的热点之一。2001 年美国“9.11 事件”后的炭疽恐怖事件,是炭疽杆菌第一次被运用于恐怖袭击。这次事件引起了美国人民的极大恐慌,也使世界各国政府和研究人员进一步认识到了炭疽杆菌检验、预防、治疗研究的重要性。致病机制的阐明将为治疗和预防提供更多的线索。

## 参考文献

- [1] Read T D, Peterson S N, Tourasse N, *et al.* Nature, 2003, **423** (6935): 81 ~ 86.
- [2] Schneerson R, Kubler-Kielb J, Liu T Y, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, **100** (15): 8945 ~ 8950.
- [3] Mourez M, Lacy D B, Cunningham K, *et al.* 2002, **10** (6): 287 ~ 293.
- [4] Pannifer A D, Wong T Y, Schwarzenbacher R, *et al.* Nature, 2001, **414** (6860): 229 ~ 233.
- [5] Drum C L, Yan S Z, Bard J, *et al.* Nature, 2002, **415** (6870): 396 ~ 402.
- [6] Mock M, Mignot T. Cell Microbiol, 2003, **1**: 15 ~ 23.
- [7] Bradley K A, Mogridge J, Mourez M, *et al.* Nature, 2001, **414** (6860): 225 ~ 229.
- [8] Scobie H M, Rainey G J, Bradley K A, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, **100** (9): 5170 ~ 5174.
- [9] Weiner M A, Read T D, Hanna P C. J Bacteriol, 2003, **185** (4): 1462 ~ 1464.
- [10] Cunningham K, Lacy D B, Mogridge J, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, **99** (10): 7049 ~ 7053.
- [11] Abrami L, Liu S, Cosson P, *et al.* J Cell Biol, 2003, **160** (3): 321 ~ 328.
- [12] Bodart J F, Chopra A, Liang X. Cell Cycle, 2002, **1** (1): 10 ~ 15.
- [13] Agrawal A, Lingappa J, Leppla S H, *et al.* Nature, 2003, **424** (6946): 329 ~ 334.
- [14] Sebolt-Leopold J S, Dudley D T, Herrera R, *et al.* Nat Med, 1999, **7**: 810 ~ 816.
- [15] Koo H M, VanBrocklin M, McWilliams M J, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, **99** (5): 3052 ~ 3057.