

· 综 述 ·

军团菌毒力因子研究及在分子流行病学的应用

卢锡华 万超群

军团病是一种潜在的传染性疾病,人类因吸入含有军团菌的气溶胶而感染,一般以爆发和散发为主。老年人和免疫抑制者最为易感且病死率高,军团菌感染还与吸烟、饮酒、旅游及住院等因素有关。迄今尚未发现军团菌在人与人之间传播的现象。西方国家军团病发病率为 2%~10.6%^[1],因其发病症状不易与一般肺炎相区别,故临床上常致误诊、漏诊、病死率较高,一些国家已将其列入法定传染病。

自军团菌被发现并命名后,许多学者就着力于研究其致病机制,以期寻找军团病的有效防治措施。一些研究者运用现代分子生物学技术对军团菌毒力因子进行了深入的研究,并应用于军团病分子流行病学中,现已取得不少进展。

一、军团菌研究的动物模型和细胞模型:

1. 动物模型:感染动物模型的建立对细菌毒力因子的研究具有非常重要的意义。嗜肺军团菌可以感染许多动物,但迄今为止,研究表明豚鼠对嗜肺军团菌最为易感,是实验性军团病的最佳动物模型^[2]。不论气雾吸入、气管内接种或其它途径感染嗜肺军团菌都能使其产生与人极为相似的军团病特征,表现为细菌在肺泡巨噬细胞繁殖并扩散至肺脏,引起急性纤维蛋白化脓性支气管肺炎,发热,体重减轻,血清学变化等。不过,经肺接种和经腹膜内接种其引起疾病的过程有显著的差异。大白鼠和仓鼠也能为嗜肺军团菌所感染,但相对豚鼠而言,它们很少因感染而死亡。Collins 等认为小鼠能抵抗嗜肺军团菌感染,因而不适合作为军团菌感染的动物模型。不过,免疫抑制的小鼠则较易感而被用来作为研究嗜肺军团菌免疫反应的动物模型。近年来,有的研究者发现,A/J 小鼠对军团菌感染较为敏感^[3]。其它动物如兔子、猕猴、狨等对嗜肺军团菌都不大易感。

2. 细胞模型:早先用以研究嗜肺军团菌毒力及致病机制的细胞包括离体的人类血液单核细胞和肺泡巨噬细胞^[4],以及猴子、小鼠、豚鼠的肺泡巨噬细胞和腹膜巨噬细胞。在组织培养的条件下,军团菌只

局限在这些细胞的胞内生长。嗜肺军团菌有毒株能够在人类单核细胞内繁殖并将它们杀死,而嗜肺军团菌无毒株则既不能在其中繁殖也不能杀死它们。通过应用这些细胞,研究者们对嗜肺军团菌进入细胞并在细胞内生存、繁殖的过程进行了初步研究,证明有血清而无抗体的情况下,补体成分 C3 位于细菌的表面,细菌粘附在吞噬细胞表面的 CR1 和 CR3 上^[5],然后被细胞伸出的单伪足缠绕而吞噬。在有免疫抗体存在时,细菌则可能以一般的由 Fc 受体介导的细胞膜内陷方式吞噬进入细胞。细菌被吞入后存在于吞噬体的囊泡内,后者不与初级及次级溶酶体融合,也没有象吞入其它物质时那样发生酸化。相反,加热杀死的嗜肺军团菌在被缠绕吞噬后,吞噬体很快酸化并与溶酶体融合,使细菌被破坏。同时嗜肺军团菌不同的致病株其进入细胞的方式也有所不同,有以缠绕吞噬方式,也有常规的吞噬方式。由此可见,吞噬方式的不同并不与嗜肺军团菌在细胞内的命运有必然的关系。

虽然离体的人类吞噬细胞提供了一个相对简易的嗜肺军团菌感染细胞模型,但费用昂贵且不方便。因此,有人便在组织培养基上建立了一些由人类白血病中衍化而得的细胞系,它们与巨噬细胞相似,是嗜肺军团菌研究的良好模型。其中 U937 细胞系^[6]是嗜肺军团菌感染的较好的细胞模型,嗜肺军团菌能在其内生长繁殖,补体也可以增强 U937 细胞对嗜肺军团菌的吞噬作用,嗜肺军团菌在细胞内的生长同样受 IFN- γ 的抑制。可用于军团菌感染研究的细胞还有 Hela 细胞, H160 单核细胞等。另外,原核细胞模型,如卡氏真菌属棘突阿米巴在区分军团菌有毒株和无毒株时尤有价值^[7]。

二、军团菌毒力因子的基因研究方法:军团菌成为致病菌至少要经过四个阶段,即:在宿主细胞表面

吸附(或结合)、被吞噬、抗杀灭和在宿主细胞内存存繁殖。影响这四个阶段的任何因素都会导致军团菌毒力的改变。影响军团菌在宿主细胞内存存繁殖的因素很多,目前已得到研究的有:军团菌肽毒素、酶类(磷酸酶、磷酸脂酶 C、蛋白酶、蛋白激酶等)、表面蛋白(MOMP、Mip、热休克蛋白等)。

研究军团菌毒力因子的方法一般有两类:一是分离和纯化军团菌的各种成分,通过一定的动物模型和/或细胞模型来鉴定其毒力作用;二是应用分子生物学方法构建军团菌特定基因缺失株,再根据其感染能力的改变来确定该基因在毒力和致病机制中的作用。

军团菌毒力因子的研究,通常由比较军团菌有毒株和无毒株(或弱毒株)之间的差异来进行。包括两者的细菌表型、蛋白组成、基因结构、质粒的有无等等。获得无毒株的途径可以是环境中分离、特殊培养基传代以及通过基因工程方法人工构建、化学物致突变等。

基因工程方法研究军团菌毒力因子,一般先构建军团菌基因库,然后通过一系列的工作筛选出所需要的目的基因。到目前为止,已有不少研究者报道了军团菌基因库的构建情况^[8],同时应用抗血清或表型检测,如溶血作用及蛋白水解作用等对重组的 *E. coli* K-12 克隆子分析其嗜肺军团菌特异抗原的表达情况。在 *E. coli* K-12 中表达的嗜肺军团菌的各种不同特异蛋白由此得到克隆并分析。已经克隆了的军团菌基因有^[9]: *acn*、*htpB*、*mip*、*pplA*、*msp*、*lly*、*ompS*、*ompM*、*recA*、*sodB*、*flaA* 等。其中已分析了 DNA 序列的有 *mip*、*recA*、*htpB*、*pplA*、*ompM*、*acn* 等。*mip* 基因及其表达产物 Mip 蛋白是目前研究较多且较为明确的毒力因子之一。

得到特定的克隆子后,可以通过基因等位交换、转座子插入突变等方法来构建变异株,一旦获得无毒、弱毒和毒力不变的变异株就可以初步判断该基因片段所表达的产物与军团菌毒力之间的关系。

在基因水平上军团菌毒力因子的研究还可以通过无毒株基因互补复活来获得有关的信息。其原理是,将已克隆了嗜肺军团菌特定基因片段的质粒再转入无毒株内,检验其毒力的变化,从而确定该克隆子内的基因在军团菌毒力中的作用。为了获得表达特定蛋白的基因克隆子以用于进一步研究,有的研究者先将所需研究的蛋白分离纯化,测定其氨基酸序列,再根据氨基酸序列合成寡核苷酸作为探针来筛选克隆子,如主要含铁蛋白(MICP)的研究^[11]。

三、军团病分子流行病学:军团菌亚型分类方法是军团病流行病学研究的重要问题之一,目前已报道的有:嗜肺军团菌血清群、质粒分析、蛋白图谱、抗血清和单克隆抗体、同种异型酶分析,以及全 DNA 的内切酶图谱分析等。至今尚未发现军团菌的嗜菌体。

军团菌全蛋白电泳图谱一般只能看出种的特异性,对区别同一血清型中不同菌株则没有很大的价值。而军团菌外膜蛋白电泳图谱可以显示出不同型不同株之间的差异。

Bender 等^[12]于 1990 年测得嗜肺军团菌染色体 DNA 的大小约为 4Mb。他们将嗜肺军团菌费城 I 株的染色体 DNA 用一稀有酶切位点内切酶(NotI)消化,然后通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析其片段。他们还发现不同株的军团菌的 PFGE 图谱有明显的差异。因而,利用 PFGE 法分析军团菌染色体 DNA 可以鉴定单独的军团菌株,这对军团菌分子流行病学研究极有价值。1991 年, Ott 等^[13]应用此法确定了一次医院军团病爆发的病原。

Bej 等^[14]利用 PCR 方法扩增嗜肺军团菌 14 个型的 *mip* 基因后,用不同的限制性内切酶进行酶切,比较其电泳酶谱,认为对嗜肺军团菌的分型鉴定有一定的作用,且相对简便,但要求较高。

一些嗜肺军团菌分离株含有质粒,但其在致病机制中的作用尚未明确,除去质粒后的一些菌株,其毒力并不发生变化。另外,当将粘性质粒 pCH1 (120kb) 转入军团菌毒株及非毒株内后,细菌在 U937 细胞和阿米巴内的生长特性并无改变。1991 年 Tully^[15]报道从一嗜肺军团菌毒株内分离得一隐性质粒(69kb),该质粒能转入军团菌的其它株内,表达抗紫外线杀伤的特性。有人推测,质粒编码的功能可能仅限于适应环境而生存的能力,对其致病机制则可能无作用。因此,军团菌质粒与军团病流行病学的关系还有待研究。

四、小结:军团菌广泛存在于环境淡水中,在一些人工蓄水器(如冷却塔、城市供水系统)内也常见。尤其当水温处于 20℃~40℃ 之间,水中富含半胱氨酸及铁离子或存在原生生物阿米巴和/或蓝绿藻时,军团菌可以大量繁殖。随着城市建设的不断发展,军团菌感染已成为一个越来越严重的问题。

笔者就军团菌毒力因子研究及军团病分子流行病学作了扼要的阐述,无容置疑,军团菌毒力因子与军团菌致病机制有着密切的关系。从基因水平上研究军团菌毒力因子,将有助于对军团病的流行病学、

生态学、微生物学等有更加深入的了解,同时可以为军团病防治提供可靠的科学依据。

参 考 文 献

- 1 Skogberg K, Ruutu P, Koivula I, et al. Effect of Immunosuppressive Therapy on the Clinical Presentation of Legionellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1994, 7 : 535.
- 2 Collins MT. Legionella infections in animals. *Isr J Med Sci*, 1986, 22 : 662.
- 3 Yamamoto Y, Klein TW, Newton CA, et al. Growth of Legionella pneumophila in thioglycolate — elicited peritoneal macrophagys from A/J mice. *Infect Immun*, 1988, 56 : 370.
- 4 Horwitz MA and Silverstein SC. Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest*, 1980, 66 : 441.
- 5 Payne NR and Horwitz MA. Phagocytes of Legionella pneumophila is mediated by human monocyte complement receptors. *J Expt Med*, 1987, 166 : 1377.
- 6 Pealman E, Jiwa AH, Engleberg NC, et al. Growth of Legionella pneumophila in a human macrophage — like (U937) cell line. *Microbiol Pathogen*, 1988, 5 : 87.
- 7 Mffat JF and Tompkins LS. A quantitative model of intracellular growth of Legionella pneumophila in Acanthameoba castellanii. *Infect Immun*, 1992, 60 : 296.
- 8 Engleberg NC, Pealman E and Eisenstein BI. Legionella pneumophila surface antigens cloned and expressed in Escherichia coli are translocated to the host cell surface and interact with specific anti-Legionella antibodies. *J Bacteriol*, 1984, 160 : 199.
- 9 Ott M. Genetic approaches to study Legionella pneumophila Pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 14 : 161.
- 10 Cianciotto NP and Fields BS. Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 : 5188.
- 11 Mengaud JM and Horwitz MA. The major iron — containing protein of Legionella pneumophila is an aconitase homologous with the human iron — responsive element — binding protein. *J Bacteriol*, 1993, 175 : 5666.
- 12 Bender L, Ott M, Marre R, et al. Genome analysis of Legionella spp. by orthogonal field alteration gel electrophoresis (OFAGE). *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 72 : 253.
- 13 Ott M, Bender L, Marre R, et al. Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial Legionella pneumophila in hospital water supplies. *J Clin Microbiol*, 1991, 29 : 813.
- 14 Bej AK, Mahbubani MH and Atlas RM. Detection and molecular serogrouping of Legionella pneumophila by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. In: Legionella, Current Status and Emerging Perspectives. (Barbaree JM, Breiman RF and Dufour AP ed. pp. 173. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1993).
- 15 Tully M. A plasmid from a virulent strain of Legionella pneumophila is conjugative and confers resistance to ultraviolet light. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 90 : 43.

(收稿: 1995-04-26 修回: 1995-05-11)