

## 军团菌巨噬细胞感染增强蛋白研究及其应用前景

邵祝军 万超群 徐建国

军团病是近 20 年来新发现的传染病之一, 主要是由嗜肺军团菌引起, 症状以肺炎为主。1976 年 7~8 月间, 在美国费城召开的第 58 届退伍军人年会上首次暴发流行, 故此以军团病或退伍军人病命名。迄今为止, 我国已发生 10 多起小规模暴发, 在肺部感染性疾病中, 军团菌肺炎占有很重要的比例。

军团菌是一种机会致病菌, 广泛存在于天然水和土壤中。目前研究表明, 军团菌属的细菌包含 40 多个种, 其中至少有 6 个种的细菌有 2 个以上的血清型, 19 个种可以引起人患军团病<sup>[1,2]</sup>。人因吸入含有军团菌的气溶胶而感染, 军团菌能侵入肺泡巨噬细胞以及其他的吞噬细胞内, 并在其中寄生而不被杀灭, 继续存活、繁殖, 从而导致细胞破裂, 释放出细菌及毒素和被破坏的细胞本身的有害物质, 造成组织破坏<sup>[3]</sup>。

80%~90% 的军团病是由嗜肺军团菌引起的, 嗜肺军团菌通过“缠绕吞噬”方式被吞噬, 能抑制吞噬体-溶酶体复合物的形成, 并抑制吞噬细胞吞噬体酸化作用<sup>[4]</sup>。

巨噬细胞感染增强蛋白 (microphage infectivity potentiator, Mip), 是军团菌明确的毒力因子之一。Mip 蛋白是一种强碱 (PI 9.8) 性蛋白, 在细菌表面表达, 在嗜肺军团菌抵抗宿主细胞内杀灭机制中发挥重要作用, 其通过影响肺巨噬细胞的有氧化及胞浆膜去极化而发挥作用。随着分子生物学技术的发展, 以 mip 基因、Mip 蛋白研究为基础的军团菌分类、诊断技术不断改进, 越来越多地应用于临床诊治及流行病学现场调查, 现综述如下。

### 一、Mip 蛋白分子生物学研究

1. Mip 蛋白结构: Engleberg 等<sup>[5]</sup> 1989 年研究了 Mip 蛋白多肽链结构, 根据 Mip 蛋白在 2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 中的溶解性质与主要外膜蛋白 (MOMP) 不同, 分离到较纯化的 Mip 蛋白。嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 菌株 Mip 蛋白多肽链由 233 个氨基酸组成, 富含赖氨酸 (约 25 个残基)。氨基酸序列起始的 20~24 氨基酸残基为分泌信号, 起始于一个短的带电荷的氨基酸, 临近序列富含疏水性核心和几个可能的分裂位点。

二级结构, Mip 蛋白多肽链起始部位的 20~24 氨基酸残基为  $\alpha$ -螺旋结构, 并具有强疏水性。其他的氨基酸序列可分为两个不同的区域, 第 1 个区域从 21 氨基酸至 114 氨基

酸残基, 富含  $\alpha$ -螺旋, 包括 1 个 60 个氨基酸残基组成的螺旋延伸序列。第 2 个区域从 115 氨基酸残基至 233 氨基酸区域, 形成  $\beta$  折叠和转角。第 1 个区域的疏水性高于第 2 个区域, 第 1 个区域中, 31% 的氨基酸带电荷, 24.5% 的氨基酸残基具有疏水性; 第 2 个区域中, 仅有 16.8% 的氨基酸残基带电荷, 32.8% 的氨基酸残基具有疏水性。

Mip 蛋白 C-端氨基酸序列与 FK 结合蛋白 (FKBPs) 的序列同源。FKBPs 存在于多种真核生物体内, 能够与免疫抑制剂大环内酯 FK506 结合, 这与 Mip 蛋白发挥其作用有关<sup>[6,7]</sup>。

1997 年, Rodney 等<sup>[8]</sup> 研究了 35 种军团菌的 Mip 蛋白及 mip 基因的序列, 表明 Mip 蛋白的一级结构为大约 232~251 个氨基酸的多肽, 富含赖氨酸残基。对 35 种军团菌的 mip 基因序列和编码的 Mip 蛋白氨基酸序列, 与已知的嗜肺军团菌 (*L. pneumophila*)、米克戴德军团菌 (*L. micdadei*)、长滩军团菌 (*L. longbeach*) 的序列进行比较, 核苷酸序列同源性为 69%~97%, 氨基酸序列 82%~99% 具有同源性。Mip 蛋白 N-端起始氨基酸多为丙氨酸、苏氨酸和天门冬氨酸。

2. Mip 蛋白功能: 亲免疫素是一种多种生物体内管家蛋白<sup>[9]</sup>, 在生物体内含量很高, 约占总蛋白的 1%。亲免疫素包括两类蛋白超家族: 亲环素 (Cyps) 和 FKBPs, 致病性病原体产生不同的 FKBPs 型亲免疫素。亲免疫素能够紧密结合免疫抑制性药物, 如环孢菌素 A (cyclosporin A)、FK506 以及纳巴霉素等, 这些药物常用作同种异体移植排斥反应中的免疫抑制剂。亲免疫素-药物的复合物能抑制 T 细胞活性<sup>[10]</sup>, 抑制 T 细胞信号的传导, 阻断特异的细胞免疫的发生, 对其他细胞成分产生毒性作用。细胞的亲免疫素是一种肽脯氨酰顺/反异构酶 (PPIase), 能催化蛋白和寡肽脯氨酰键  $\omega$  角周围产生慢性构象互变<sup>[11]</sup>。

Mip 蛋白具有亲免疫素的性质, 是一种 FKBPs, 能与巨噬细胞的 FK506 结合, 抑制巨噬细胞的活化。Mip 蛋白具有 PPIase 活性, 100nmol/L 的 FK506 能抑制其活性。Stephen 等<sup>[12]</sup> 发现, 人 FKBPs 的蛋白二级结构与 Mip 蛋白相似, C-端区域 5 个  $\beta$  键结构中插入了小的  $\alpha$ -螺旋, 80% 的参与了人类 FKBP 与 FK506 相互作用的氨基酸在 Mip 蛋白中是相当保守的。

军团菌的 Mip 蛋白表达于细菌细胞的表面<sup>[13]</sup>, Mip 蛋白的 N-端为大约 60 个氨基酸长度的  $\alpha$ -螺旋结构域, 其功能为锚定于细胞膜。C-端具有 PPIase 活性, 伸出细胞膜, 连接细菌和相应分子<sup>[9]</sup>。

mip 基因缺失菌株,不能合成 Mip 蛋白,其感染巨噬细胞的能力下降。在感染的过程中, Mip 蛋白以复合物的形式发挥作用。军团菌 Mip 蛋白的 PPIase 活性能使军团菌特殊的蛋白,包括一些毒力因子的构象发生改变,巨噬细胞膜蛋白或液泡表面本身有可能成为 PPIase 作用的靶位点。FK506 能部分抑制嗜肺军团菌在巨噬细胞内存活,说明在此过程中有 PPIase 的作用<sup>[14]</sup>。FK506 能够由 Mip 蛋白转送至巨噬细胞的 FKBP 位点,释放细胞信号。Mip 蛋白多半能结合巨噬细胞蛋白,避免了吞噬细胞的活化, Mip 蛋白也可作为吞噬细胞蛋白激酶 C 的抑制剂。未被结合的人类 FKBP 能与热休克蛋白相互作用,这些蛋白在激活的巨噬细胞产生免疫反应中起重要作用<sup>[15]</sup>。

Mip 蛋白使军团菌产生致病性,军团菌在入血液单核细胞、肺泡巨噬细胞和组织细胞内复制,一旦被吞噬,军团菌会降低细胞内的“氧化爆破”作用,抑制吞噬体-溶酶体复合物的形成和巨噬细胞的吞噬体酸化作用。这种蛋白在其他与致病性无关的过程中也具有重要的作用,这可以解释各种病原体以及军团菌不同种同样产生 24~30 kDa 的 Mip 样蛋白。氨基青霉素、红霉素、亚胺青霉素、利福平等最小抑菌浓度即能抑制 Mip 蛋白的表达<sup>[16]</sup>。

## 二、Mip 蛋白的应用前景

1. 军团菌 mip 基因: 1984 年 Engleberg 等<sup>[13]</sup>在大肠杆菌中克隆并表达了嗜肺军团菌 24kDa 表面抗原。1989 年, Engleberg 等<sup>[5]</sup>对 mip 基因进行了测序,在 mip 基因开放阅读框架中,存在限制性内切酶 Hind III 的酶切位点和 Ava I 的酶切位点。1990 年, Cianciotto 等<sup>[17]</sup>研究发现,除嗜肺军团菌外,军团菌属的其他种内存在着 mip 样基因(mip-like gene),它们的表达产物(24~31 kDa)都能与 Mip 蛋白的抗血清起反应。mip 基因也存在于除军团菌外的其他一些病原菌中,如沙眼衣原体、脑膜炎双球菌、铜绿色假单胞菌以及立克次体科的伯纳特氏立克次体等。所以 mip 基因以及 mip 样基因可能是细胞内寄生菌的共同特征。

2. PCR 检测技术的应用: 由于军团菌种、型较多,以 mip 基因为基础的多聚酶链反应(PCR)诊断方法目前广泛应用于军团菌的流行病学研究和临床诊断。

Mabubani<sup>[18]</sup>根据 mip 基因序列设计的引物分别扩增出 650 bp 的 DNA 片段,用于嗜肺军团菌种 1~10 血清型菌株的检测,特异性和敏感性都很高。

卢锡华<sup>[19]</sup>等根据 mip 基因设计的引物能扩增出 1 kb 左右的 DNA 片段,最低可检出 18 cfu/ml 的细菌,而非嗜肺军团菌均未扩增出阳性区带,可准确捕获环境标本中的嗜肺军团菌。

Youset 等<sup>[20]</sup>(1996 年),建立了差异显示 PCR (Differential Display PCR, DD-PCR) 技术,能够在感染早期鉴别出嗜肺军团菌。

邱琼等<sup>[21]</sup>根据军团菌 16S rRNA 基因和 mip 基因序列设计合成引物,可扩增 386 bp 16S rRNA 基因和 206 bp mip

基因片段,建立的双重 PCR 方法,通过一次 PCR 反应,不仅能检测军团菌属,而且能检测嗜肺军团菌种,该方法简便、快捷,为军团菌分子流行病学调查及临床早期诊断提供了有效的检测手段。

3. 以 mip 基因为基础的军团菌分型技术: 军团菌属中,种的分类和鉴定非常困难,由于一些新种的出现,传统的用于军团菌的分型的羟基脂肪酸分析技术,常常面临着区分单羟基或双羟基脂肪酸的问题<sup>[22]</sup>。通过分子生物学研究手段,利用 mip 基因在军团菌属中的保守性的特性,可开展以 mip 基因为基础的军团菌种的鉴别及分型的研究。

军团菌属研究中,以 700 bp 左右的 mip 基因核苷酸为基础的基因分型方法,除了 *Legionella geestiana* 种外,对其他种的军团菌能够很好区分并鉴别<sup>[23]</sup>。mip 基因行使管家基因的功能,比其他的基因更具稳定性,是一个理想的分型工具,通过以 mip 基因为基础的分型系统,不仅可以区分属、种,还可以比较不同的血清型。

Rodney 等<sup>[23]</sup>于 1998 年,建立了以军团菌 mip 基因序列为基础的分型系统。同样可以用来分析军团菌的进化历史,目前,许多微生物体的系统发育分析使用的核苷酸序列多为 rRNA 序列。然而,只使用一种基因,要区分系统发育历史和发育或/和基因水平传递之间的差别,比较困难。基因编码的蛋白序列与 rRNA 序列比较,特别是 rRNA 基因的特征,如多拷贝、区域的高度同源性等,这都可能引起基因的重组。研究使用军团菌属的 mip 基因和 16S rRNA 对发育系统进行比较,并同时使用了通常使用的表型和生化特征,如自动荧光、细胞壁辅酶 Q、脂肪酸构成等方法。

军团菌种间的 Mip 蛋白序列的差异,可以用于功能和进化关系的研究。与 16S rRNA 序列系统发育比较, *L. pneumophila*、*L. micdadei*、*L. longbeach* 的 mip 基因序列具有相似性。利用核酸杂交(Southern hybridization)方法,在军团菌属中可检测到 mip 样基因存在<sup>[1,23]</sup>。严格来讲,不同种的军团菌具有不同的功能,不同种的军团菌能够引起人的疾病,也许是因为 mip 基因的不同,所以军团菌 mip 基因可用于研究军团菌的进化关系。

4. 以 Mip 蛋白为基础的诊断试剂的研制与在监测工作中的应用前景: Kohler 等<sup>[24]</sup>,构建了由军团菌特异的 mip 基因启动子和来自李斯特细菌的 sod 基因的启动子组成的 gfp 复合体,转入嗜肺军团菌中,检测到了嗜肺军团菌绿荧光蛋白介导的荧光。当细菌复制时, mip 基因启动子表达, gfp 基因可作为一个便捷的报告基因,利用其在军团菌中绿荧光蛋白的表达,监测军团菌感染、存活和复制过程。

建立和应用嗜肺军团菌 Mip 蛋白单克隆抗体技术,可以用于军团菌的监测工作,以及军团菌快速分离和初步鉴定。我国的军团菌流行优势菌株与国外流行优势菌株不同,因此根据我国的军团菌流行病学调查与监测工作实际需要,开发以 Mip 蛋白为基础的系列军团菌单克隆抗体诊断试剂盒。

就临床诊断而言,目前临床上的肺炎可分为典型性肺炎

和非典型性肺炎, 典型性肺炎主要由肺炎球菌和流感嗜血杆菌引起, 而非典型性肺炎中, 军团菌引起的肺炎占重要的比例。典型性肺炎与非典型性肺炎相比, 诊断相对容易, 而由于存在细菌耐药问题, 治疗相对困难; 非典型性肺炎治疗相对容易, 而诊断困难, 故此临床上军团病的漏诊现象普遍存在, 滥用抗生素又会引发细菌的耐药问题。军团菌虽然存在多种血清型, 但临床上由军团菌引起的肺炎主要是嗜肺军团菌引起的。故此, 发展军团菌快速诊断技术, 既能准确诊断军团病病人, 减少病人疾苦和医疗费用, 又可减少细菌耐药的产生。

军团菌的诊断与检测目前主要凭藉血清学方法, 直接荧光抗体法(DFA)和间接荧光抗体法(IFA)为目前各国检测军团菌和抗体的重要手段。Mip 蛋白为嗜肺军团菌特异性蛋白, 可通过基因重组方法, 将 mip 基因克隆, 表达、纯化出 Mip 蛋白, 进一步开发与应用以 Mip 蛋白为基础的快速诊断试剂, 对于军团菌种的鉴别、临床诊断、鉴别诊断技术等有着极为广阔的发展和应用前景。

#### 参 考 文 献

- Harrison TG, Saunders NA. Taxonomy and typing of Legionellae. *Rev Med Microbiol*, 1994, 5: 79-90.
- O'Connell WA, Dhand L, Cianciotto NP. Infection of macrophage-like cells by Legionella species that have not been associated with disease. *Infect Immun*, 1996, 64: 4831-4834.
- Riffard F, Vandenesch F, Reyoue M, et al. Distribution of mip-related sequences in 39 species (48 serogroups) of Legionellaceae. *Epidemiol Infect*, 1996, 117: 501-506.
- Horwitz MA. The Legionnaires' disease bacterium inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med*, 1983, 158: 2108-2126.
- Engleberg NC, Carol C, David RW, et al. DNA sequence of mip, a Legionella pneumophila gene associated with Macrophage Infectivity. *Infect Immun*, 1989, 57: 1263-1270.
- Mak N, Sekiguchi J, Nishimaki J, et al. Complementary DNA encoding the human T-cell FK 506-binding protein, a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 5440-5443.
- Srandaert RF. Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature*, 1990, 346: 671-674.
- Rodney MR, Stephen CD, Janice AL, et al. Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus Legionella: implications for function and evolutionary relatedness. *Mol Microbiol*, 1997, 25: 1149-1158.
- Hacker J, Fisher G. Immunophilins' structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity. *Mol Microbiol*, 1993, 10: 445-456.
- Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive Ligands. *Science*, 1991, 251: 283-287.
- Lodish HF, Kong N. Cyclosporin A Inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1991, 266: 14835-14838.
- Stephen WM, Michael KR, Thomas JW. Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science*, 1991, 252: 836-839.
- Engleberg NC, Eric P, Barry E. Legionella pneumophila surface antigens cloned and expressed in E. coli are translocated to the host cell surface and interact with specific anti-Legionella antibodies. *J Bacteriol*, 1984, 160: 199-203.
- Gunter F, Holger B, Birgit L, et al. Mip protein of Legionella pneumophila exhibits peptidyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 1375-1383.
- Polla BS, Kantengwa S. Heat shock proteins and inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 167: 93-105.
- Luck PC, Schmitt JW, Hengerer A, et al. Subinhibitory concentrations of antimicrobial agents reduce the uptake of Legionella pneumophila into Acanthamoeba castellanii and U937 cells by altering the expression of virulence-associated antigens. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 2870-2876.
- Cianciotto NP, Bangsberg JM, Isenstein BI, et al. Identification of mip-like genes in the genus Legionella. *Infect Immun*, 1990, 58: 2912-2918.
- Mabubani MH. Detection of Legionella with polymerase chain reaction and gene probe method. *Molecul Cell Probe*, 1990, 4: 175-189.
- 卢锡华, 王琳, 万超群, 等. PCR 方法捕获环境水样中嗜肺军团菌 DNA. *中华流行病学杂志*, 1997, 18: 345-347.
- Youset AK, Lisa LP. The use of differential display-PCR to isolate and characterize a Legionella pneumophila locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Mol Microbiol*, 1996, 21: 543-556.
- 邱琼, 万超群, 刘双, 等. 军团菌双重 PCR 检测方法的建立及其应用研究. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(5): 13-16.
- Erik J, Anders S, Torill T, et al. Hydroxy-fatty acid profiles of Legionella species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis. *J Clin Microbiol*, 1997, 31: 1413-1419.
- Rodney MR, Janice AL, Paul AM, et al. Sequence-based classification scheme for the genus Legionella targeting the mip gene. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 1560-1567.
- Kohler R, Bubert A, Goebel W, et al. Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in Legionella pneumophila. *Mol Gen Genet*, 2000, 262: 1060-1069.

(收稿日期: 2000-11-26)