

结核分枝杆菌的复苏因子

刘忠泉 张宗德

【关键词】 结核分枝杆菌; 复苏因子

Resuscitation promoting factor of *Mycobacterium tuberculosis*
LIU Zhong-quan, ZHANG Zong-de. Department of Bacteriology and Immunology, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Resuscitation promoting factor

1998 年 Mukamolova 等^[1]在细菌因子一文中首先提出了复苏因子(resuscitation promoting factor, Rpf)的新概念,并证实复苏因子是由有活性的微球菌分泌的一种蛋白质,它在皮摩尔级浓度就能有效地促进休眠的非生长同源菌的复苏和生长。同时也证实微球菌复苏因子类似基因广泛地存在于富含 G+C 的革兰阳性菌中(如链霉菌、分枝杆菌、棒状杆菌),并找到了结核分枝杆菌复苏因子家族(RpfA、RpfB、RpfC、RpfD、RpfE)^[1,2]。打破了多年来认为细胞之间的信息是自身产生的,不需要外源性物质刺激的观点^[3]。在随后的几年中,Mukamolova 等^[1,2,4]对微球菌、结核分枝杆菌、牛型分枝杆菌的复苏因子基因进行了克隆、重组、并在大肠埃希菌中表达,获得了纯化的复苏因子蛋白。研究还证实,体外培养陈旧结核分枝杆菌(休眠菌)时,复苏因子能有效地促进其复苏,加入抗体中和复苏因子后,复苏促进作用消失^[1,5,6]。Yeremeev 等^[7]利用复苏因子亚蛋白疫苗在免疫鼠的试验中,发现有很高的免疫反应,它能诱导产生抗体 IgG、 γ -IFN、IL-10、IL-12,促进 T 细胞增殖。Biketov 等^[8]证实小鼠巨噬细胞内的结核分枝杆菌的体外复苏培养中,复苏因子能有效地促进巨噬细胞内的结核分枝杆菌在培养基中迅速生长,并快速进入对数生长期。目前,复苏因子的研究正向临床应用和分子生物学方面发展。

1. 结核分枝杆菌复苏因子的分子特征:

(1)结核分枝杆菌复苏因子的基因结构:分泌形式的微球菌复苏因子基因产物的 N 末端和其他 7 种复苏因子基因产物类似,其中 5 个和编码结核分枝杆菌复苏因子的基因产物类似,2 个和编码麻风杆菌复苏因子的基因产物类似^[1]。结核分枝杆菌编码的 5 种复苏因子类似基因,即: *rpfA* (*M. tuberculosis* H37Rv | Rv0867c | 1224 bp), *rpfB* (*M. tuberculosis* H37Rv | Rv1009 | 1089 bp), *rpfC* (*M. tuberculosis* H37Rv | Rv1884c | 531 bp), *rpfD* (*M. tuberculosis* H37Rv | Rv2389c | 465 bp), *rpfE* (*M. tuberculosis* H37Rv | Rv2450c | 519 bp)。它们与微球菌复苏因子基因具有高度的同源性。5 个复苏因子基因复苏作用

表型相互协同,单一基因敲除不能改变其表型,3/5 的基因敲除才能改变其表型^[9]。可见 5 种结核分枝杆菌复苏因子基因高度同源性的保守区很可能是编码复苏因子蛋白质的核心区。通过对 GenBank 检索可得到 5 个结核分枝杆菌复苏因子基因序列开放阅读框架(ORF)。

(2)复苏因子基因在染色体的位置:复苏因子基因分散在结核分枝杆菌染色体中,复苏因子 A 和 E 由单顺反子 ORF 组成,在染色体中排列成包含由铂蝶呤生物合成的基因簇状。它在复苏因子 B3' 粘末端和 *ksgA* 之间有一个 25 bp 的重叠。*ksgA* 可能编码二甲基腺苷转移酶。复苏因子 D 基因位于一个未知功能的双顺反子 ORF 的下游。位于 *hemN* 和 *nirA* 两基因之间,*hemN* 和 *nirA* 很可能分别编码与粪卟啉 III 去碳酸基化和硝酸盐减少有关的酶。复苏因子 C 位于 7 个 ORF 基因的第 3 个基因,它在真菌转移酶上游,可能是在脱氢酶、脂蛋白和细胞色素 P450 的下游。

2. 复苏因子蛋白质的特性:复苏因子是由生长活跃的富含碱基 G+C 的革兰阳性菌分泌的一种能使同源休眠菌重新活跃的蛋白质,相对分子量(M_r)在 $16 \times 10^3 \sim 17 \times 10^3$ 。它们在皮摩尔浓度级就能有效地促进陈旧菌的复苏、生长^[2,3]。Mukamolova 等^[1]证实复苏因子蛋白质在加热、透析或胰岛素处理后其活性消失,通过对重组复苏因子基因分析发现,重组、诱导表达产生一个 $M_r 19 \times 10^3 \sim 40 \times 10^3$ 的蛋白质。笔者所表达出蛋白质 M_r 分别约为 42×10^3 、 40×10^3 、 36×10^3 、 19×10^3 、 24×10^3 。多项研究证实,体外培养陈旧结核分枝杆菌(休眠菌)时,复苏因子能有效地促进其复苏,加入抗体中和复苏因子后,复苏促进作用消失^[2,4,6]。Zhang 等^[5]的研究显示,磷脂或特殊肽能有效地促进休眠的 H37Rv 生长,与对照组比较差异有统计学意义。Mukamolova 等^[1]的研究发现,复苏因子是一种分泌蛋白,由三个不同区域组成,即跨膜区,与细胞分泌有关;保守区,与促进细菌复苏和生长有关;可变区,由含脯氨酸-丙氨酸的序列组成,它是细胞膜脂蛋白的脂质结合位点。通过对公共数据库检索找到 32 个与 Rpf 同源的蛋白质,进行同源分析发现这些蛋白有一个高度保守的序列,这个序列均含有一段 75 个氨基酸残基。这很可能就是复苏因子蛋白的核心功能结构区。

3. 复苏因子的复苏机制:结核分枝杆菌分泌多种包含高保守区的复苏因子蛋白,保守区有非常相似的结构,即含有溶解酵素和可溶性细胞溶解转糖基酶^[10]。他们还证实复苏因子的作用主要是黏附肽聚糖,可见休眠菌的复苏是肽聚糖水解的结果,这个作用既改变促进细胞分裂的细胞壁的物理特性,又释放作为抗休眠信号功能的溶解产物。Telkov

等^[11]也证实复苏因子蛋白家族是肽聚糖水解酶, 研究中还发现在细胞中既有分泌型自身蛋白又有重组蛋白, 它们是通过水解 4-甲基伞形酮- β -D-N, N', N''-三乙酰基壳三糖(肽聚糖多酰胺酶合成底物, pH 值 6.0) 来促进细胞复苏; 同时它们又是通过水解 N-苄氧羰基-甘氨酸-甘氨酸-精氨酸- β -萘胺(类胰岛素酶底物) 来削弱水解 4-甲基伞形酮- β -D-N, N', N''-三乙酰基壳三糖的活性。当第 54 位的谷氨酸、蛋白质保守区与催化作用有关的物质发生改变时, 水解 4-甲基伞形酮- β -D-N, N', N''-三乙酰基壳三糖活性降低。因此可以认为复苏因子既有复苏作用又有抑制复苏的作用, 具有自我调控机制。也有研究证实, 复苏因子蛋白质有促复苏和促休眠的双重作用。研究表明 *relA* 基因具有编码 RelA 酶(3' 焦磷酸转移酶) 和 SpoT 酶(焦磷酸鸟苷裂解酶) 的双重功能, RelA 酶通过抑制 rRNA 基因、调控 DNA 合成基因, 从而导致 DNA 和蛋白质合成受到抑制, 使结核杆菌进入休眠; SpoT 酶则通过促使恢复 dNTP(三磷酸脱氧核苷) 浓度、DNA 修复和复制来解休眠。复苏因子正是通过水解和抑制水解细菌细胞内的肽聚糖来调控 *relA* 基因。

4. 复苏因子蛋白质的免疫学特性: Yermeev 等^[7]研究表明, Rpf 亚单位疫苗在小鼠试验中有很高的免疫反应, 除 RpfC 外, 均能诱导产生抗体 IgG1 和 IgG2a、 γ -IFN、IL-10、IL-12, 促进 T 细胞增殖, 而不产生 IL-4、IL-5。体液免疫和 T 细胞免疫显示出高度的交叉反应。复苏因子亚单位疫苗在接种大剂量的毒力结核杆菌 H37Rv 小鼠中表现出明显的保护水平, 在小鼠肺脏和脾脏中结核杆菌的繁殖和生存时间都受到抑制。Radaeva 等^[12]通过对结核病复燃的易感小鼠(I/st) 模型试验发现: 治疗型疫苗卡介苗(BCG) 对小鼠的结核病复燃没有保护力, 是因为科赫现象的原因; 但预防复燃型疫苗 Rpf 蛋白家族, 能诱导小鼠通过 CD4⁺ T 淋巴细胞产生 γ -IFN, 并且能轻微的减少小鼠脏器官内结核菌的增殖。但二种疫苗都不能阻止小鼠结核病的复燃。

5. 复苏因子与结核病流行病学: 结核分枝杆菌耐药性和滞留性(persistence) 是关系结核病临床疗效和结核病流行控制的两大课题^[13], 结核菌的滞留现象使得结核病病程延绵和复发, 甚至时隔十几年又复燃, 给结核病的治愈和控制流行带来很大的困扰。结核滞留菌在体内的复燃, 以及复苏信号的表达、调控, 除受宿主的免疫调控之外, 能使休眠菌重新活跃的复苏促进因子起着关键作用^[1, 2, 8]。Biketov 等^[8]研究发现, 在小鼠巨噬细胞内的结核分枝杆菌的体外复苏培养中, Rpf 发挥关键的作用。巨噬细胞内的结核杆菌在培养基中能迅速生长, 并快速进入对数生长期, 与对照组相比差异有统计学意义。对复苏因子的研究有助于了解机体内滞留菌复苏的机制, 从而为阻断因体内滞留菌复燃而导致的结核病提供一条线索。为结核病治疗和结核病流行控制提供切实可行的办法。几十年来 BCG 和结核杆菌纯蛋白衍生物(PPD) 的使用, 在控制结核病的流行和易感人群的筛选方面

发挥了重要作用。Yermeev 等^[7] 和 Radaeva 等^[12] 的研究表明, Rpf 亚单位疫苗在小鼠试验中产生高度的免疫保护力和一定的阻止结核病复燃作用, 很有可能替代 BCG 和 PPD, 成为新一代结核疫苗和结核蛋白衍生物, 用于结核病高危人群的筛查和监测, 以控制结核病的流行。

6. 复苏因子应用前景:

(1) 在临床标本结核杆菌体外培养和药物开发中的应用: 结核杆菌分离培养阳性率不高, 且培养时间长, 尤其是肺外结核标本阳性率极低, 一直是困扰临床结核病诊断和治疗的双重难题。复苏因子蛋白可促使休眠的结核杆菌迅速恢复生长, 有效地缩短标本培养时间, 提高培养阳性率^[2, 6]。为结核病的诊断和结核菌耐药性检查提供直接的证据。通过对与休眠菌解休眠相关的关键基因研究, 找到能阻断体内休眠菌复苏的分子靶位, 研究相关药物, 为慢性迁延性结核病治疗和控制结核病复发的研究提供一个新思路。

(2) 结核病疫苗的研究: BCG 一直是作为预防结核病的唯一疫苗, 但它的平均保护率仅 50%。鉴于复苏因子蛋白的免疫原性^[7, 12], 复苏因子蛋白作为结核病疫苗的研究开发有很好的前景, 很可能成为一种新一代抗结核疫苗成分。

参 考 文 献

- [1] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(15): 8916-8921.
- [2] Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(3): 623-635.
- [3] Kell BD, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3(3): 238-243.
- [4] Mukamolova GV, Turapov OA, Kazarian K, et al. The *rpf* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(3): 611-621.
- [5] Zhang Y, Yang YP, Woods A, et al. Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(2): 542-547.
- [6] Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov MV, et al. Formation and resuscitation of non-culturable cell of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology*, 2002, 148(pt 5): 1581-1591.
- [7] Yermeev VV, Kondratieva TK, Rubakova EI, et al. Proteins of the Rpf family: immune cell reactivity and vaccination efficacy against tuberculosis in mice. *Infect Immun*, 2003, 71(8): 4789-4794.
- [8] Biketov S, Mukamolova GV, Potapov V, et al. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 29(4): 233-240.
- [9] Katrina J, Downing, Vladimir V Mischenko, Margarita O Shleeva, et al. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect Immun*, 2005, 73(5): 3038-3043.
- [10] Keep NH, Ward JM, Cohen-Gonsaud M, et al. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends Microbiol*, 2006, 14(6): 271-276.
- [11] Telkov MV, Demina GR, Voloshin SA, et al. Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, 71(4): 414-422.
- [12] Radaeva TV, Nikonovniko BV, Kapina MA, et al. Experimental approaches to designing vaccines against tuberculous infection reactivation. *Probl Tuberk Bolezn Legk*, 2006, (5): 45-48.
- [13] 潘毓萱. 结核分枝杆菌滞留性和滞留菌的界定. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27(4): 264-266.

(收稿日期: 2006-08-16)

(本文编辑: 尹廉)