

牛分支杆菌与肺结核分支杆菌基因组的比较^{*}

徐广贤 赵德明

(中国农业大学国家动物传染性海绵状脑病实验室 北京 100094)

摘要:通过比较基因组学的方法研究发现,牛分支杆菌与肺结核杆菌基因组的同源性为 99.95%,但在牛分支杆菌基因组中有 11 个缺失区,大小从 1kb 到 12.7kb,遗传信息的缺失引起牛分支杆菌的基因组减小;牛分支杆菌与肺结核分支杆菌 H37Rv 间存在着 2437 个单核苷酸多态性(SNPs),与肺结核分支杆菌 CDC1551 间存在着 2423 个单核苷酸多态性(SNPs),牛分支杆菌与肺结核分支杆菌在编码细胞壁和分泌蛋白上变异程度也是巨大的。研究结果揭示了牛分支杆菌与肺结核分支杆菌的遗传关系,为研究分支杆菌疫苗和诊断试剂提供理论依据,对牛肺结核病的防治有着非常重要的意义。

关键词:牛分支杆菌;肺结核分支杆菌;比较基因组学;单核苷酸多态性(SNPs)

中图分类号:S855.1 **文献标识码:**A

Comparison of genome between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*

XU Guang-xian, ZHAO De-ming

(National Animal TSE Laboratory, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: Through the comparison of genome between the *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*, it is concluded that the homology of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* are 99.95% respectively, but there are 11 deletants(range, from 1kb to 12.7kb in the genome of the *Mycobacterium bovis*. The absence of genetic information resulted in reduction of genome in *Mycobacterium bovis*. There are 2437 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) between the *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, 2423 SNPs, between the *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551. The extent of variation is obvious on Codocyte cellwall and secreted protein between the two. The finding reveals the genetic relationship between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*, which offers a theoretical basis for *Mycobacterium* vaccine and diagnostic reagent, and is of great significance for the prevention and treatment of Bovine pulmonary tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium bovis* ; *Mycobacterium tuberculosis* ; Comparative genomics; Single-nucleotide polymorphism (SNPs)

1 引言

牛结核病严重影响了动物的健康,并对牧场造成惨重的经济损失,世界范围内有 5000 万头牛感染了结核,造成了经济损失每年达 30 多亿美元^[1]。2000 年,对 2.8% 的英国国立牛场调查显示,在过去的 10 多年,牛结核发病率在英国西南部呈指数增长,2003 年在英国,就有十万例牛结核发生,仅政府补贴和检测费用就达 8800 万英镑。目前对动物结核的控制方法是“检验和扑杀”,即对于分枝杆菌抗原皮肤反应阳性的动物被视为感染动物而扑杀。在英国和爱尔兰,认为獾是牛结核重要的传染源^[2]。在 Kruger 国家公园中有多种动物也感染了牛分枝杆菌,如水牛、捻(一种非洲大羚羊)、狮子、羚羊,说明了该地区感染的生物多样性^[3]。密西根州白尾鹿感染牛分枝杆菌的出现,对美国控制和根除牛肺结核的计划造成了严重的威胁。若要根除牛肺结核对世界的威胁,必须制定新的控制策略^[4]。2005 年我国的结核病防治调查结果显示:我国目前有近半数人口感染过结核菌,现有肺结核病人 450 万,还

有新发肺结核病人 145 万人,其中约有 15% 的结核病人是饮用了患牛结核病的奶而发病。目前我国每年养牛的存栏数达到 1 亿 3 千万头,我国一些省区牛结核病的发病率呈现上升趋势,已达到 9% 的阳性率^[5]。

牛分支杆菌与肺结核分支杆菌有高度的遗传关系。尽管人和牛结核杆菌可以通过宿主范围、毒力和生理特性的不同来区分,但是这些差异的遗传根据还不清楚。对牛结核杆菌和其它分枝杆菌基因组的比较分析,对分枝杆菌的演化和致病机理具有重要意义。

2 牛分支杆菌与肺结核分支杆菌基因组的比较

1998 年,英国 Sanger 中心和法国 Pasteur 研究所联合首次完成了肺结核分支杆菌 H37Rv 全基因组序列图,肺结核分支杆菌 H37Rv 的基因组大小为 4,411,532bp,约 3995 个开放阅读框架,占整个基因组编码容量的 91%,其中大多数用于编码脂类代谢酶,10% 编码两类大的,不相关的富含甘氨酸的酸性蛋

* 基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(项目编号:20050019031)资助

作者简介:徐广贤(1973-),男,宁夏盐池人,在读博士研究生。研究方向:分子免疫学与病理学。

E-mail: xuguangxian@cau.edu.cn

通讯作者:赵德明(1958-),男,教授,博士生导师,E-mail: zhaodm@cau.edu.cn; Tel/Fax: 010-62732975。

(收稿日期:2006-03-13 接受日期:2006-04-12)

白质,可能与产生抗原变异,免疫逃避有关;40%蛋白有功能,44%可能有功能,16%是孤儿蛋白质(Ophan protein:指首次发现,在蛋白质数据库中尚无相应位置的蛋白质)^[6]。另外,分枝杆菌属的 *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551(4,403,836bp)菌株和麻风杆菌 *Mycobacterium leprae*(3,268,203bp)菌株基因组全序列也已经完成。牛分枝杆菌的全基因组序列于2003年完成,牛分枝杆菌 AF2122/97 株是1997年从肺部和支气管纵膈淋巴结有干酪样损伤的病牛身上分离到的英国菌株。基因组序列4,345,492 bp,平均G+C含量为65.63%,共有3,951基因编码蛋白质,包括一个原噬菌体和42个插入序列(IS)(表1)^[7]。惊人的是,基因组在核苷酸水平上99.95%与肺结核分枝杆菌相同,但是遗传信息的缺失已经引起基因组的减小。与麻风分枝杆菌的对照揭示出大量的公共基因的丢失,表明功能冗余的切除。细胞壁的成分和分泌蛋白显示出巨大的变化,表明他们在与宿主相互作用中或免疫逃避中可能担当重要的角色。此外,牛分枝杆菌没有独一无二的基因,暗示不同的基因表达可能对人和牛分枝杆菌的宿主取向有重要意义。基因组测序表明牛分枝杆菌有11个缺失区,大小从1kb到12.7kb,这些已经通过测序被证实。值得注意的是,在牛分枝杆菌基因序列中包含一个基因座TbD1,现有的肺结核分枝杆菌菌株的大多数都不含有该基因座。因此,总体水平上,缺失是修整牛分枝杆菌基因组的主要机制。

3 牛分枝杆菌与肺结核分枝杆菌单核苷酸多态性分析(SNPs)

在牛分枝杆菌和肺结核分枝杆菌 H37Rv 间存在着2437个单核苷酸多态性(SNPs),与肺结核分枝杆菌 CDC1551 间存在着2423个单核苷酸多态性 SNPs^[8]。SNPs 在以前曾说明许多分枝杆菌的个性特点。例如:在牛分枝杆菌 *pncA* 基因的一个点突变使得其具有抵抗吡嗪酰胺的能力,并能阻止肺结核分枝杆菌中烟酸的积聚。三个分枝杆菌同一长度的基因组编码2504个蛋白(CDS)的比较,揭示出牛分枝杆菌有1629个编码序列与肺结核分枝杆菌 H37Rv 是相同的,1656个蛋白编码序列 CDC1551 是相同的^[9,10]。通过对编码2082个蛋白序列的比较显示,H37Rv 和 CDC1551 两种肺结核分枝杆菌菌株中没有区别。在所选的编码序列中,与肺结核分枝杆菌 H37Rv 相比,牛分枝杆菌有506个同义和769个非同义单核苷酸多态性。与肺结核分枝杆菌 CDC1551 相比,牛分枝杆菌有506个同义和800个非同义单核苷酸多态性。H37Rv 和 CDC1551 两种肺结核分枝杆菌菌株相比,各自显示出339个非同义和241个同义单核苷酸多态性。这个分析不仅强调了肺结核分枝杆菌复合组成员的基因序列的守恒,也说明牛分枝杆菌与肺结核分枝杆菌的差异。高频率非同义到同义的改变可能是这两个肺结核分枝杆菌菌株的紧密进化关系的产物。

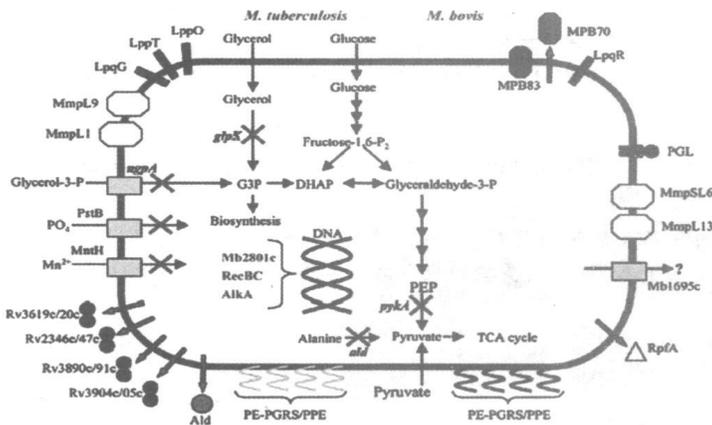
4 细胞膜和抗原变异

致病菌的细胞壁显示,编码蛋白质和合成大分子的基因

序列发生了变异,选择压力的变化反映在结构上的变化。人和牛分枝杆菌间,编码细胞壁和分泌蛋白的基因序列变异程度是巨大的(图二)。编码脂蛋白 *lppO*, *lppI*, *lppG*, *lppM* 基因在肺结核杆菌中缺失或移码,而在牛分枝杆菌却只有 *lppA* 基因多个重复拷贝。同样,牛分枝杆菌 *rfpA* 基因——编码五个分泌蛋白其中之一,促进了静止或不生长的分枝杆菌繁殖^[11]。在基因编码 PE- PGRS 和 PPE 蛋白家族中有广泛地变异。尽管开始对功能不清,但是现在有足够的证据说明至少这些蛋白中的一部分被暴露在表面,并且在粘附和免疫调节中起到一定作用。在牛分枝杆菌 AF2122/97 和肺结核分枝杆菌 H37Rv 间,在基因编码的29种不同的 PE- PGRS 和28种 PPE 蛋白上,在编码框内有由插入和缺失产生的大量的序列变异,而其他都是移码。因为这些蛋白中有60%不同,很明显,大部分基因相同的基因组的剩余部分是不一致的,表明这些基因家族序列广泛的多态性,变异来源于选择压力。肺结核分枝杆菌 PE- PGRS 家族中的一个蛋白(Rv1759c)是纤维锚定结合蛋白,这反过来说明 PE- PGRS 指令所有组成改变能影响宿主或组织取向^[12]。

ESAT-6 家族是一组已知的通过从牛分枝杆菌的缺失而受到影响的抗原。ESAT-6 蛋白起初被描述为肺结核分枝杆菌分泌的有效 T 细胞抗原,属于一个小于20个成员的蛋白家族,该家族包含其他 T 细胞抗原如 CFP-10 和 CFP-7^[13]。ESAT-6 和 CFP-10 之间的交互作用,表明了家族中的其他成员也可能是成对作用,也可能呈一种混合配对的排列^[14]。然而,由在肺结核分枝杆菌中的 Rv2346c, Rv2347c, Rv3619c, Rv3620c, Rv3890c (Mb3919c), 和 Rv3905c (Mb3935c) 编码的六种 ESAT-6 蛋白,在牛分枝杆菌中消失或被改变了(图2)。该结果和预计的不相同,尽管他们可能会以单独或结合的形式影响抗原装配。

在牛分枝杆菌中,细胞分泌蛋白变异程度最大的是两个血清优势抗原 MPB70 和 MPB83 的表达的升高^[15]。MPB83 是一个被糖基化的细胞壁联合蛋白质,而 MPB70 是一个分泌蛋白,占牛分枝杆菌培养上清蛋白的10%^[16]。编码聚酮化合物和复合脂质(含有一半聚酮化合物)的合成(*pks*)和运输(*mmpSL*)的基因也不相同(图2)。这些脂质能为病原体创造良好的环境从而使宿主致病。基因 *pks1*, *mmpL13*, 和 *Mb1695c*(一个推定的大环内酯运载体,邻近 *pks10/7/8/17/9/11* 群)能够被翻译成牛分枝杆菌的功能产物,但在肺结核分枝杆菌中被破坏。相反的情况如基因 *pks6*, *mmpL1* 和 *mmpL9* 在牛分枝杆菌中被破坏。研究表明,*pks1* 编码牛分枝杆菌的大多数石炭酸糖脂类的生物合成,但在 *pks1* 被破坏的肺结核分枝杆菌中,没有类似脂质生成。现认为许多在无异种生物混杂的环境下不能产生的 *pks* 基因产物可能只能在宿主内的肺结核分枝杆菌中产生。在肺结核分枝杆菌小鼠模型中,敲除 *pks6* 基因的肺结核分枝杆菌和牛分枝杆菌毒力减弱^[17]。



(引自 Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100(13): 7877- 82)

图 2. 牛分支杆菌 AF2122- 97 和肺结核分支杆菌 H37Rv 比较。蓝线和红线表示细胞壁, 蓝线表示肺结核分支杆菌, 红线表示牛分支杆菌。每种杆菌特殊的暴露的表面和运输分子被表示为植入到细胞壁。不同的分泌蛋白(橙色箭头) 在两边分别表示。图表的内侧显示出碳水化合物代谢的主要步骤, 红色十字表示牛分支杆菌的损伤位置。牛分支杆菌中被抑制的与 DNA 相互作用的蛋白用蓝色表示。PGL, 石炭酸糖脂类; G3P, 3- 磷酸甘油; DHAP, 磷酸二羟丙酮; PEP, 磷酸烯醇丙酮酸盐; Ald, 丙氨酸脱氢酶。

Figure 2 The comparison of mycobacterium bovis AF2122- 97 and mycobacterium tuberculosis H37Rv. The blue and red lines on the map correspond to cell walls, the blue, mycobacterium tuberculosis; the red, mycobacterium bovis. The special and exposed surface of every kind of mycobacterium and transport molecules are corresponded to implanted in cell walls. The orange arrows in each side of the diagram correspond to different secreted proteins. The main procedures of carbohydrate are shown in diagram. The red cross corresponds to injury location of mycobacterium bovis; the blue, the proteins which are inhibited in mycobacterium bovis interact with DNA.

PGL: Phenol glycolipid; G3P: Glycerol 3- phosphate; DHAP: Dihydroxy acetone phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate carboxylate; Ald: Alanine dehydrogenase.

TbD1 基因座包括基因 MmpS6 和 mmpL6 的 5' 区, 大多数肺结核分支杆菌菌株缺少此基因座^[18]。TbD1 的缺失可能会阻止特殊脂质向肺结核分支杆菌细胞壁运输。Rv1373 基因类似物(Mb1407/8) 的破坏说明包膜中硫酸盐脂质的缺乏, 因为被编码的是一个糖脂类转硫酶^[19]。总之, 这些不同对表型和宿主相互作用有重要影响。对牛分支杆菌基因组序列的比较分析, 可以说明牛分支杆菌主要表型特点的遗传依据, 遗传信息的缺失是修整基因组的主要方式。

基因的缺失对于在一个特殊的微生态环境的病原的生活方式是有害的。通过分析, 尽管适应过程不依赖特殊毒力基因的存在, 但基因表达和细胞膜暴露成分的改变起到了主要作用。因此, 基因序列比较分析对于分枝杆菌的进化、宿主适应性和肺结核的病理学的理解具有重要意义, 为研究分支杆菌疫苗和诊断试剂提供理论依据。

参考文献

- [1] Smith R M, Drobniewski F, Gibson A, et al. Mycobacterium bovis infection, United Kingdom [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10: 539- 541
- [2] Krebs J R, Anderson R M, Clutton- Brock T, et al. Badgers and bovine TB: conflicts between conservation and health [J]. Science, 1998, 279: 817- 818
- [3] Weyer K, Fourie P B, Dunheim D, et al. Mycobacterium bovis as a zoonosis in the Kruger National Park, South Africa [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 1999, 3: 1113- 1119
- [4] Payeur J B, Church S, Mosher L, et al. Bovine tuberculosis in Michigan wildlife [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 969: 259- 261
- [5] JIANG Xi- yun, WANG Chun- fang, HE Zhao- yang. Cloning and expression of Mycobacterium bovis secreted protein MPB51 in Escherichia coli [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45: 298- 300
- [6] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence [J]. Nature, 1998, 393: 537- 544
- [7] Garnier T, Eiglmeier K, Camus J C, et al. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100: 7877- 7882
- [8] Fleischmann R D, Alland D, Eisen J A, et al. Whole- genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains [J]. J Bacteriol, 2002, 184: 5479- 5490
- [9] Scorpio A and Zhang Y. Mutations in prcA, a gene encoding pyrazinamidase/ nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus [J]. Nat Med, 1996, 2: 662- 667
- [10] Boshoff H I, Mizrahi V and Barry C E. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I [J]. J Bacteriol, 2002, 184: 2167- 2172
- [11] Mukamolova G V, Turapov O A., Young, D.I. A family of autoocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis [J]. Mol Microbiol, 2002, 46: 623- 635
- [12] Espitia C, Lacleite J P, Mondragon- Palomino M, et al. The PE- PGRS glycine- rich proteins of Mycobacterium tuberculosis: a new family of fibronectin- binding proteins? [J]. Microbiology, 1999, 145: 3487- 3495
- [13] Sorensen A L, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low- molecular- mass T- cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 1995, 63: 1710- 1717

毛发成片脱落^[10],也就是说脱发与肝脏有密切关系。斑秃的中医辨证一般可分为肝郁气滞、肝肾阴虚、血虚生风、血瘀毛窍证^[11, 12, 13]等。一般认为精神神经因素、免疫紊乱等与斑秃的发生密不可分,但精神神经因素是斑秃的常见诱因,如用脑过度、精神刺激、紧张、焦虑、抑郁、悲伤或惊恐等均可诱发该病^[14, 15, 16]。大多数斑秃患者的中医辨证属肝证,且多数斑秃患者存在不同程度的焦虑和抑郁,因此心理治疗和药物治疗同样重要,而斑秃患者心理变化十分复杂。不良的心理刺激可使中枢神经调节机能失调;可通过下丘脑影响神经内分泌系统,还可通过下丘脑及其控制分泌的激素影响免疫功能,从生理上改变人体原来的各种动态平衡,导致机体发病^[17, 18, 19]。不同个体在不同环境条件下以及疾病不同阶段,其心理反应不同。我们在接诊时应通过观察和了解患者的气质、态度,通过提问等方式及时准确地把握其心理状况;在制定治疗计划时要因人因病因时因地而异针对不同心理特点,有的放矢地进行心理疏导。同时强调这种治疗一定要贯彻始终,才会取得明显而持久的效果。

参考文献

- [1] 邹德明. 复方斑秃灵搽剂治疗斑秃疗效观察[J]. 广西中医学院学报, 2002, Vol. 5, No. 3
- [2] 李继宏. 七宝生发汤治疗斑秃[J]. 山东中医杂志, 1994; (4): 32
- [3] 潘藩, 任启龙. 乌鸡白凤丸治疗斑秃 43 例[J]. 山东中医杂志, 1994; (4): 22
- [4] 席长征. “生发酊”治疗斑秃 110 例[J]. 江苏中医, 1994; 19(4): 349
- [5] 南万青. 斑秃治愈[J]. 中医外治杂志, 1998; 7(6): 6
- [6] 李小衡. 养真生发冲剂治疗斑秃 251 例临床观察[J]. 湖南中医杂

志, 1995; 11(1): 17

- [7] 赵志付, 刘仲喜. 中医心身医学理论与临床[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 143- 144
- [8] 王金道, 刘勇, 郭念峰. 临床疾病心理学[M]. 北京师范大学出版社, 1994
- [9] 忻志鹏. 实用临床心理医学. 第 1 版[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1991: 40- 63
- [10] 王坤山, 吴立群, 全选甫, 等. 中西医临床皮肤病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 374- 378
- [11] 朱学骏, 顾有守, 沈丽玉. 实用皮肤病性病治疗学[M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 416- 417
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 第三辑. 1997: 94- 95
- [13] 国家中医药管理局. 脱发临床指导原则. 《中药新药指导原则·第三辑》[J], 1999: 259
- [14] 秦万章, 朱仁康, 梁剑辉等. 脱发证治[J]. 中医杂志, 1986, 27(12): 10
- [15] 倪容之主编. 现代皮肤病治疗学[J]. 北京: 人民军医出版社. 第一版. 1997: 556
- [16] 朱润横节译, 黄绛珠、沈仲文校. 斑秃的病因与治疗[J]. 国外医学·皮肤病学分册, 1999, (4): 73
- [17] 邱家全, 程浩, 孙国均, 等. 斑秃患者新喋呤水平测定[J]. 中华皮肤科杂志, 1996, (5): 371- 372
- [18] 侯玉波. 人格、社会心理因素与健康老龄化[J]. 中国临床康复, 2002; 6(17): 2523- 5
- [19] 梁浩材, 刘筱嫻, 罗金玉, 等. 行为因素与疾病的关系初步探讨[J]. 医学与哲学, 1983, 3(5): 20

(上接第 69 页)

- [14] Renshaw P S, Panagiotidou P, Whelan A, et al. Conclusive evidence that the major T- cell antigens of the Mycobacterium tuberculosis complex ESAT- 6 and CFP- 10 form a tight, 1: 1 complex and characterization of the structural properties of ESAT- 6, CFP- 10, and the ESAT- 6* CFP- 10 complex. Implications for pathogenesis and virulence [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 21598- 21603
- [15] Hewinson R G, Mitchell S L, Russell W P, et al. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of Mycobacterium tuberculosis with homology to MPT70 [J]. Scand J Immunol, 1996, 43: 490- 499
- [16] Nagai S, Matsumoto J and Nagasuga T. Specific skin- reactive protein from culture filtrate of Mycobacterium bovis BCG [J]. Infect Immun,

1981, 31: 1152- 1160

- [17] Camacho L R, Ensergueix D, Perez E. Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature- tagged transposon mutagenesis [J]. Mol Microbiol, 1999, 34: 257- 267
- [18] Brosch R, Gordon S V, Mammiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99: 3684- 3689
- [19] Rivera- Marrero C A, Ritzenthaler J D, Newburn S A, et al. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in Mycobacterium tuberculosis [J]. Microbiology, 2002, 148: 783- 792