

• 综 述 •

棒状杆菌细胞壁中的主要成分的合成过程

苏瑞蕊 综述, 苏建荣 审校

(首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心, 北京 100050)

关键词: 棒杆菌属; 酶类; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.045**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)07-0853-03

棒状杆菌属由 Lehmann 和 Neumann 于 1896 年确立, 为革兰染色阳性、形态棒状的一类细菌, 具有一定致病性的独立群体, 隶属于细菌域, 放线菌门, 放线菌纲, 放线菌目, 棒杆菌亚目, 棒杆菌科。棒状杆菌广泛存在于自然界, 主要分离自人类、动物以及土壤、水等环境资源, 部分菌种属条件致病菌, 而大部分则为正常菌群。新近发布的“原核细胞一览表”显示, 该属目前含有 106 个菌种, 从致病性角度分类, 该属细菌主要包括三个类群: 人类致病菌; 动植物致病菌; 非致病性土壤源菌。其中, 人类致病菌以白喉棒状杆菌为代表, 其余致病性棒状杆菌均报道为条件致病菌^[1-2]。

1 棒状杆菌的致病性

其中与医学相关的有 40 个种。除白喉棒状杆菌外其余均为条件致病菌, 许多研究显示, 棒状杆菌在免疫力低下患者经常引起软组织、心内膜炎、呼吸道感染, 有文献报道, 人结膜囊感染类白喉棒状杆菌占 20%~36%, 结膜炎患者棒状杆菌分离率 16.8%^[3], 也有少量报道解葡萄糖苷棒状杆菌引起尿道炎^[4]、纹带棒状杆菌引起关节感染^[3], 也有报道经常引起口蹄类动物淋巴结感染的假结核棒状杆菌引起人的坏死性淋巴结炎^[5]。

谷氨酸棒状杆菌作为棒状杆菌的细胞壁结构和基因组成代表, 其拥有最基本细胞壁组成成分和脂质特点, 而相对于分枝杆菌却少有旁系基因和基因复制少, 更重要的是, 它可以耐受必须基因的缺失^[6]。

棒状杆菌的毒力因子: 白喉棒状杆菌特有白喉毒素, 分枝杆菌(MA)、丝氨酸蛋白酶、神经氨酸苷酶 H、ON 还原酶、侵入相关蛋白、Endo E、菌毛、核小体结合蛋白(RBP)、核糖内切酶、细胞表面相关水解酶、酰基辅酶 A、羧基甲基^[7], CAMP 通过转录调整 GLxR 毒力因子表达, 假结核棒状含有磷脂酶 D、鞘磷脂降解酶 E^[5]。

2 棒状杆菌的细胞壁结构

通过使用低温电子显微镜观察液氮冷冻后的棒状杆菌玻璃切片, 直接可视棒状杆菌细胞膜以外还有颗粒层(GL)、外周胞质层(PERI), 肽聚糖层(PG)、阿拉伯半乳糖层(AG)、外膜内层即 MA 层、外膜外层含有 TMCM 和 TDCM 含有糖脂、磷脂酰肌醇甘露糖(PIM)、硫脂。GL 存在于革兰阳性菌但不存在于革兰阴性菌中, 通过对肺炎支原体的研究表明 GL 可能有细胞膜结合蛋白组成。PERI 在以往研究中未发现, 因为以前使用脱水法将该层压缩, 因为该层主要含有水、无机盐离子和酶类, 为维持外膜稳定性的酶反应场所, 该层结构同样存在于革兰阴性和阳性菌中^[8-9]。

早在 1982 年 Minnikin 提出棒状杆菌的外膜双层结构, 一度时间该观点并不被承认, 在 1993 年通过 X 光衍射为这一观点提供了充分的证明。然而以往的外膜脂质提取方式不同往

往会被内膜污染, 目前使用反胶团萃取提取外膜脂质不会被内膜脂质成分污染, 再次证实了 Minnikin 的观点, 同时发现在和 MA 空间结构相同的位置上还有心磷脂, 这一观点在以前其他文章中表明不只 MA 一种脂类从在于外膜内层当中, 因为在不含有 MA 的无分枝菌酸棒状杆菌、非典型棒状杆菌、Kroppenstedtii 棒状杆菌外膜双层结构无法解释, 但一直不清楚其具体成分。这一观点也可通过药敏结果来验证, 因为分枝杆菌内层只含有 MA 所以对红霉素高度耐药, 而棒状杆菌却对红霉素敏感。心磷脂(2 个 C16:0, 2 个 C18:1)与 PG 通过共价键紧密相连, 通过酶水解内膜或去除 PG 层后才可提取出心磷脂。心磷脂占细胞干重的 0.22%, MA 0.35%, PG 0.97%, TDCM 0.5%, PIM 0.2%^[10]。

在对不含 MA 的 Kroppenstedtii 棒状杆菌的研究中发现, 基因组中缺乏 pks(MA 合成酶)、cmrA(MA 还原酶)、fadD 和 accD3(参与脂肪酸的合成), 缺乏 FAI 合成途径的酶类, 所以其表现出嗜脂性, 含有 lipA、lipE(酯酶)利用 FA 为底物用于细胞生长, 含有 glpF、glpT、ugpA/EBC 等脂类摄取系统用于对甘油、甘油-3-磷酸酯的摄取用于合成新的脂类或作为碳源用于糖酵解, 还有些基因序列用于外源性 FA 的活化和通过 β -氧化途径讲解 FA。所以该菌易在人体脂肪组织中致病, 最易导致乳腺炎, 定植在脂肪小叶中可以逃避中性粒细胞, 只有嗜脂性的多西环素可以在体内到达致病部位。该菌缺乏 nanI 编码神经氨酸苷酶 I, 所以致病性较低^[11]。

在出现热损伤时, NCgl2775 表达上调, 在温度升高到 42℃时, 棒状杆菌胞壁的脂质成分发生改变, MA 含量上升、磷脂含量下降, 饱和 MA 比非饱和 MA 下降, 这是棒状杆菌在面对热力损伤时通过脂类含量调节的自我保护机制。在脂后分枝杆菌中 Rv3802(MA 合成基因丛中之一)为必须基因, 而该等位基因在棒状杆菌中 NCgl2775 却为非必须基因, 在正常生长条件时该基因表达的蛋白却检测不到^[12]。

3 棒状杆菌细胞壁中的主要成分的分子结构、合成途径及关键酶的作用位点

通过荧光标记技术表明棒状杆菌先合成内膜, 再合成 PG, 然后合成 MA。使用乙胺丁醇作用于棒状杆菌, MA 的合成在细胞分裂处和极端受到明显的影响, 而细胞壁则受影响较小。棒状杆菌生长过程中 MA 和合成主要发生在分裂处和极端, 而 PG 的合成却在整个细胞上进行^[13]。

3.1 AG 的分子结构、合成途径及关键酶的作用位点 AG 是一个异质多聚糖, 大约含有 25 个阿拉伯糖和 30 个半乳糖, 半乳糖之间通过 b1-5 和 b1-6 键相连, 阿拉伯糖位于半乳糖的 8、10、12 位点上, 通过 a1-5、a1-3、b1-2 与半乳糖相连。阿拉伯糖通过阿拉伯糖基转移酶(AftA、Emb)转移至半乳糖上形成 AG, 目前已发现 5 个 AftA, 这都是药物作用靶点, 在结核中红

霉素作用于 Mt-EmbA 和 Mt-EmbB,在谷氨酸棒状杆菌中作用于唯一的 Emb。在结核和豚后分枝杆菌中,EmbA 和 EmbB 合成和 MA 结合的重要的末端阿拉伯糖 6,二者在一方发生突变时作用可以互补,而 EmbC 却合成阿拉伯糖区域的脂阿拉伯糖甘露糖。在谷氨酸棒状杆菌中敲除掉 Cg-emb,AG 中失去所以 A,唯独末端 A 存在,这代表一个新的截断的 AG^[6]。

目前共发现 5 个阿拉伯糖基转移酶:Emb、AftA、AftB、AftC、AftD。AftB 的作用是合成 b1-2AG, AftC 的作用是合成 a1-3AG。在 AftB 发生突变时,其中一半于 MA 结合的位点消失,但仍然可以形成外膜的 MA 层。使用电镜观察突变体的细胞壁结构,可见众多斑块,在整个生长期均可出现,这种现象也可出现在细胞失去 LPP、OmpA、Pal,因为失去外膜和 PG 骨架的连接。在突变体的培养基中可以检测到大量 TMCM,也有 PI、PIMs,相对于野生株 TDCM 减少,因为 TMCM 作为 MA 的前体将 MA 转移给 AG 和 TDCM,培养基中同时可以检测到三种 MA 转移酶和外膜蛋白 PorA 和 PS2^[14]。当两分子脂肪酸在缩合反应后形成 MA 前体,需要在还原酶 CmrA 的作用下合成完整的 MA,当 CmrA 发生突变时,含有两个 β -酮键的 MA 前体合成的 TMCM 只能将 MA 转移形成 TM-DM,而不能于 AG 结合,说明 MA 的模体对分枝菌酸转移酶有影响。上述的还原反应在 MA 转运出细胞外前已经发生,也有研究表明该还原反应发生在胞外在与 6-P-海藻糖结合之后^[15]。

3.2 MA 的分子结构、合成途径、关键酶的作用位点及作用

MA 的分类及合成酶类:MA 存在于放线杆菌目中的分枝杆菌属、诺卡菌属、麻风杆菌属、红球菌属、棒状杆菌属,在分枝杆菌中 MA 的 C60-90,诺卡菌属中 MA 的 C40-50,棒状杆菌属 MA 的 C32-36(C18 或 C16)。MA 的 a 链除了长度在不同菌种之间变化外在所有 MA 类型中很保守,而 b 链却变化多端,目前主要依靠 b 链上的丙烷环、甲氧基、酮基来分类。目前最多见的有 3 种 MA, a-MA、甲氧基-MA(m-MA)、酮基-AM(k-MA),依据近端丙烷环空间结构又分为正反两种 m-MA、k-MA, a-MA 的两个丙烷环都为正式^[16]。除此之外,还有 a'-MA 为一种不含有丙烷环但含有一个双键的 MA,环氧-MA 近端为一个丙烷环远端含有一个环氧基和环氧基下一个 C 原子上含有一个羟基,羧基-MA 近端为一个丙烷环而末端含有一个羧基, w-1-m-MA 是在 m-MA 的 w-1 位含有一个甲氧基^[17]。以上各种 MA 在不同菌体之间含量和类型不同,以此可以作为菌种分类和鉴别的指标。

MA 的丙烷环和甲氧基侧链是在依赖 S-腺苷蛋氨酸甲氧基转移酶家族作用下合成。这些酶在基本序列和空间结构极其相似,但每个酶作用位点单一。PcaA 和 MmaA2 分别合成 a-MA 的近端和远端的丙烷环, MmaA2 合成顺式 m-MA 和 k-MA 的近端丙烷环, CmaA2 合成反式 m-MA 和 k-MA 的近端丙烷环, MmaA4 合成 m-MA 和 k-MA 的远端的甲基, MmaA3 合成 m-MA 和 k-MA 的远端的甲氧基, MmaA1 合成的甲基位于反式 m-MA 和 k-MA 的近端丙烷环的下一个 C 原子在腐生分枝杆菌中 PcaA 随温度变化,在小于 37 度时 pcaA 出现表达,调整 MA 的环丙烷化,以适应环境变化^[18-19]。以上 PcaA、MmaA2、CmaA2 合称分枝菌酸丙烷环合成酶(CMASs), MmaA4、MmaA3、MmaA1 及 CMASs 统称为依赖 S-腺苷蛋氨酸甲酰基转移酶(SAM-MT),在结核分枝杆菌中共有 8 个 SAM-MT,在耻垢分枝杆菌中共有 7 个 SAM-MT。CMASs 可被氨硫脲抑制,但对菌体生长无抑制作用, MmaA4 起活化氨

硫脲作用^[20]。二辛胺抑制 CmaA2,对菌体影响较大,导致菌体耐酸度下降、胞壁通透性下降、死亡^[16]。

MA 转移酶:MA 为一种高度疏水的长链的 a 分支 b 羟基的脂肪酸,由两分子脂肪酸在 Pks13 的作用下缩合形成 a 分支 b 酮基 MA 前体,再由某一未知还原酶(CmrA)作用下还原 b 酮酯形成成熟的 MA,MA 转移出胞内,在胞外与磷酸化的海藻糖结合形成 TMCM, TMCM 为 MA 的一个载体, TMCM 中 MA 通过 MA 转移酶与 AG 共价键结合、也可将 MA 传递给另一个 TMCM 形成 TDCM^[15]。在棒状杆菌属中目前发现共有 6 个 MA 转移酶,分别为 Cop1/PS1、Cmt1、Cmt2、Cmt3、Cmt4、Cmt5,在结核杆菌和麻风杆菌中发现 3 个 MA 转移酶,分别为 Ag85A、Ag85B、Ag85C,也可以写作 FbpA、FbpB、FbpC,因为其在分枝杆菌与纤维蛋白结合以进入宿主细胞。在棒状杆菌中, Cop1、Cmt1、Cmt2 在合成 TDCM 中起作用,这三种转移酶可以互相替换; Cmt4 不参与 CM 的合成但可能参与其他 MA 转移和反应中,但无法构建 cmt4 突变体说明 Cmt4 在合成 MA 层中至关重要;在正常生长条件下 cmt3、cmt5 没有表达,其可能参与其他环境中参与 MA 转移反应;以上所述六种 MA 转移酶都包还有信号肽和保守的酯酶区域; Cop1 含有两个区域, N 区域为一个为 AM 转移酶,另一个 C 段区域功能没有完全清楚但在维持细胞形态起重要作用,当 Cop1 发生突变时谷氨酸棒状杆菌对碱敏感度上升、对红霉素和青霉素和利福平敏感度上升,而 Cmt1、Cmt2、Cmt3、Cmt4、Cmt5 都仅含有 Cop1 的 N 端区域^[21-25]。MA 的模体也影响转移酶的功能,当 MA 的模体中酮基未还原为羟基时,导致 MA 无法与 AG 结合,同时形成异常的 TDCM^[15]。不同研究表明,以上所述的还原反应发生在胞内还原为成熟的 MA 在转移至胞外再与 6-P-海藻糖结合,或转移出胞外与 6-P-海藻糖结合后才发生还原反应^[2]。在结核杆菌中,通过体外酶分析 Ag85A、Ag85B、Ag85C 参与 TDM 合成,通过突变法分析, Ag85A、Ag85B、Ag85C 直接或间接参与 MA-AG 合成。

MA 的作用:(1)维持细胞和菌落形态,与细菌生长率,生存率相关;(2)形成 MA 层对小分子营养物质和诸多抗菌药物低通透导致对众多抗菌药物天然耐药,从而可以保护细菌免受宿主抗细菌的化学损伤和抗菌药物;(3)感染力,MA 作为病原相关分子模式与宿主反应过程中可刺激宿主产生炎症因子可趋化白细胞导致宿主损伤,同时可以调整炎症活性致病性,不同 MA 致病力不同, m-MA 和 k-MA 比 a-MA 致病力强, cis-mMA 致病力最强并且呈剂量依赖型, cis-kMA 具有一定程度的致病力, trans-kMA 不具有致病力,含有反式丙烷环的 MA 具有弱化炎症的作用, a-MA 不会引起炎症反应,菌体的 MA 的类型比例决定炎症反应,在感染过程中调整 MA 的分类以达到最大作用刺激宿主作用,当使用药物抑制 SAM-MT 中的一种或几种, MA 分类差别较大,所引起的炎症反应也有很大差别;同时 MA 也可刺激宿主产生抗体, TDM 在结核中被称为索状因子;(4)抗酸,对碱敏感;(5)TDM 释放出游离的 MA 形成生物膜,参与病原体-宿主反应;(6)氨基酸分泌,当使用亚致死量的青霉素、浅蓝菌素、吐温 40 时 MA 含量下降,谷氨酸分泌量上升,当与 MA 结合的海藻糖完全失去时,菌体对抗菌药物更敏感对甘油通透性上升。

3.3 TMCM、TDCM 的分子结构、合成途径 海藻糖通过利用海藻糖-6-磷酸合成酶(OtsA)和海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(OtsB)催化葡萄糖(UDP-glucose)生成海藻糖;利用麦芽寡糖基海藻糖合成酶(TreY)和麦芽寡糖基海藻糖水解释酶(TreZ)催化葡聚糖(glucan)生成海藻糖;利用麦芽糖磷酸化酶(TreS)将

麦芽糖直接转化为海藻糖。众多细菌合成海藻糖只是利用以上 3 种途径中的一种,但是在结核和棒状杆菌中却同时存在以上 3 种途径。海藻糖被磷酸化后成为 6-P-海藻糖与 MA 合成 TMCM, TMCM 作为前体将 MA 转移至 AG 合成 mAGP, 将 MA 转移至 TMCM 合成 TDCM。6-P-海藻糖可以刺激 TMM 的合成。在结核中为 TMM、TDM, TDM 为索状因子具有致病性。海藻糖可以作为碳源和碳氢的储从,然而 TMCM、TDCM 却作为细菌形态维持、压力保护、温度保护。TMCM、TDCM 作为棒状杆菌的细胞壁的外膜,具有通透性屏障保护细菌免受抗菌药物等小分子物质的损伤,这一观点已被证实,当构建海藻糖的三条合成途径的突变体棒状杆菌时,细菌无法合成海藻糖,同时也无法合成 TMCM、TDCM,突变体细菌对红霉素、乙胺丁醇、甘油通透性上升,对赖氨酸、谷氨酸分泌量上升。

参考文献

- [1] 陈东科,孙长贵.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社;2011.
- [2] 韩清珍,全佳,赵阳,等.产丙酮酸棒状杆菌及痤疮丙酸杆菌对树突状细胞的免疫调节作用[J].免疫学杂志,2011,27(7):557-561.
- [3] 王智群,李然,李炜炜,等.眼部分离培养棒状杆菌属的分布及耐药性分析[J].眼科,2009,18(5):328-331.
- [4] Galan-Sanchez F, Aznar-Marin P, Marin-Casanova P, et al. Urethritis due to *Corynebacterium glucuronolyticum*[J]. J Infect Chemother, 2011, 17(5):720-721.
- [5] Trost E, Ott L, Schneider J, et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1):728.
- [6] Seidel M, Alderwick LJ, Sahm H, et al. Topology and mutational analysis of the single Emb arabinofuranosyltransferase of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Glycobiology, 2007, 17(2):210-219.
- [7] Trost E, Al-Dilaimi A, Papavasiliou P, et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1):383.
- [8] Zuber B, Chami M, Houssin C, et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state[J]. J Bacteriol, 2008, 190(16):5672-5680.
- [9] Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(10):3963-3967.
- [10] Bansal-Mutalik R, Nikaido H. Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(37):15360-15365.
- [11] Tauch A, Schneider J, Szczepanowski R, et al. Ultrafast pyrosequencing of *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM44385 revealed insights into the physiology of a lipophilic corynebacterium that lacks mycolic acids[J]. J Biotechnol, 2008, 136(1/2):22-30.
- [12] Meniche X, Labarre C, de Sousa-d'Auria C, et al. Identification of a stress-induced factor of *Corynebacterineae* that is involved in the regulation of the outer membrane lipid composition[J]. J Bacteriol, 2009, 191(23):7323-7332.
- [13] Kumagai Y, Hirasawa T, Hayakawa K, et al. Fluorescent phos-

- pholipid analogs as microscopic probes for detection of the mycolic acid-containing layer in *Corynebacterium glutamicum*; detecting alterations in the mycolic acid-containing layer following ethambutol treatment[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(11):2051-2056.
- [14] Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, et al. Deletion of Cg-emb in *corynebacterineae* leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core[J]. J Biol Chem, 2005, 280(37):32362-32371.
- [15] Bou Raad R, Méniche X, de Sousa-d'Auria C, et al. A deficiency in arabinogalactan biosynthesis affects *Corynebacterium glutamicum* mycolate outer membrane stability[J]. J Bacteriol, 2010, 192(11):2691-2700.
- [16] Alderwick LJ, Seidel M, Sahm H, et al. Identification of a novel arabinofuranosyltransferase(AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Biol Chem, 2006, 281(23):15653-15661.
- [17] Lea-Smith DJ, Pyke JS, Tull D, et al. The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan[J]. J Biol Chem, 2007, 282(15):11000-11008.
- [18] Barkan D, Liu Z, Sacchettini JC, et al. Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Chem Biol, 2009, 16(5):499-509.
- [19] Secanella-Fandos S, Luquin M, Perez-Trujillo M, et al. Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium confluentis* using thin-layer chromatography[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(26):2821-2826.
- [20] Beukes M, Lemmer Y, Deysel M, et al. Structure-function relationships of the antigenicity of mycolic acids in tuberculosis patients[J]. Chem Phys Lipids, 2010, 163(8):800-808.
- [21] Alibaud L, Alahari A, Trivelli X, et al. Temperature-dependent regulation of mycolic acid cyclopropanation in saprophytic mycobacteria: role of the *Mycobacterium smegmatis* 1351 gene(MS-MEG_1351) in CIS-cyclopropanation of alpha-mycolates[J]. J Biol Chem, 2010, 285(28):21698-21707.
- [22] Alahari A, Alibaud L, Trivelli X, et al. Mycolic acid methyltransferase, MmaA4, is necessary for thiacetazone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Mol Microbiol, 2009, 71(5):1263-1277.
- [23] Kacem R, De Sousa-D'Auria C, Tropis M, et al. Importance of mycolyltransferases on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 1):73-84.
- [24] Brand S, Niehaus K, Puhler A, et al. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes cop1, cmt1, and cmt2 can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope[J]. Arch Microbiol, 2003, 180(1):33-44.
- [25] Adindla S, Guruprasad K, Guruprasad L. Three-dimensional models and structure analysis of corynemycolyltransferases in *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebacterium efficiens*[J]. Int J Biol Macromol, 2004, 34(3):181-189.