

的局限性^[19]。虽然不同种类去铁剂联合应用可有效降低血清铁蛋白水平,减少心脏、肝脏等脏器的铁沉积,改善脏器功能,但除了增加患者经济负担外,治疗方式更为繁琐,影响了患者的治疗依从性。因此,有必要研发治疗方式简便、不良反应少的新型去铁剂。

参考文献

[1] 麦凤鸣,颜双鲤.地中海贫血筛查指标的分析评价[J].中华全科医学,2013,11(3):350.
 [2] Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine[J]. Haematologica, 2004, 89(10):1187-1193.
 [3] 季阳.保障我国输血安全的策略和措施[J].中国输血杂志,2007,20(5):359-360.
 [4] 黄建荣.如何提高成分输血的质量[J].哈尔滨医药,2013,20(4):302-303.
 [5] 伍曼仪.铁代谢的调控[J].中国小儿血液,2005,10(1):43-46.
 [6] 徐群清.轻型地中海贫血儿童血清中微量元素含量分析[J].微量元素与健康研究,2003,20(5):19-21.
 [7] 杨颖.β-地中海贫血的铁超载及去铁治疗[J].儿科科学杂志,2011,34(3):58.
 [8] Verfssimo MP, Loggetto SR, Fabron Junior A, et al. Brazilian thalassemia association protocol for iron chelation therapy in patients under regular transfusion[J]. Rev Bras Hematol Hemoter, 2013, 35(6):428-434.
 [9] Elalfy MS, Abdin IA, Elsafy UR, et al. Cardiac events and cardiac T2 in Egyptian children and young adults with β-thalassemia major taking deferoxamine [J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2010, 3(4):174-178.
 [10] 张进峰,黄海波.去铁酮治疗高量输血的重型β地中海贫

血患儿临床观察[J].北方药学,2016,13(9):196.
 [11] 叶龙英,胡彩汀.不同的红细胞制品输注治疗儿童重型地中海贫血的不良反应[J].实用临床医学,2015,16(7):698-700.
 [12] 陆华,程道海,雷小光,等.去铁酮片治疗广西重型β-地中海贫血患儿的临床指标观察[J].中国药房,2014,25(6):537-538.
 [13] Trad O, Hamdan MA, Jamil A, et al. Reversal of iron-induced dilated cardiomyopathy during therapy with deferasirox in β-thalassemia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2009, 52(3):426-428.
 [14] Choudhry VP, Naithani R. Current status of iron overload and chelation with deferasirox [J]. Indian J Pediatr, 2007, 74(8):759-764.
 [15] Pennell DJ, Udelson JE, Arai AE, et al. Cardiovascular function and treatment in β-thalassemia major: a consensus statement from the American Heart Association [J]. Circulation, 2013, 128(3):281-308.
 [16] 许燕,夏苏建,张思恒,等.铁螯合剂治疗重型β-地中海贫血疗效的 Meta 分析 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 31(21):1875-1880.
 [17] Grady RW, Galanello R, Randolph RE. Toward optimizing the use of deferasirox: potential benefits of combined use with deferoxamine [J]. Haematologica, 2013, 98(1):129-133.
 [18] 何丽红,孔慕贤,李猛,等.地拉罗司-去铁胺序贯疗法治疗重型β-地中海贫血铁过载的研究 [J]. 华夏医学, 2015, 21(6):45-48.
 [19] 黄铭辉,王云龙,李永曙.铁螯合剂在地中海贫血治疗中的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(16):1900.

(收稿日期:2017-01-13 修回日期:2017-03-20)

• 综 述 •

快速生长分枝杆菌研究进展

李胜蓝 综述,张 波[△]审校

(第三军医大学第一附属医院检验科,重庆 400000)

关键词:快速生长分枝杆菌; 表层结构; 生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1524-03

与体外培养时间超过 7 d 仍无法形成成熟菌落的缓慢生长分枝杆菌(SGM)不同,快速生长分枝杆菌(RGM)在 25~45℃条件下,不超过 7 d 即可在琼脂培养基上形成成熟的生长菌落。RGM 在土壤、灰尘和水中广泛分布,是自然环境中常见的一类致病力较弱的条件致病细菌。RGM 细菌不仅生长速度较 SGM 快,其菌体表层结构、生长相关因子及致病性等方面也与 SGM 有所不同。本文就 RGM 相关研究进展作一综述。

1 RGM 分类和生物学性状

RGM 属于放线菌门、放线菌纲、放线菌目、分枝杆菌科、分枝杆菌属、非结核分枝杆菌。根据热休克蛋白(hsp)65 基因、rpoB 基因及小的亚单位核糖体(16~23S rRNA)等碱基序列特征,可将 RGM 分为耻垢分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、龟分枝杆菌和偶发分枝杆菌等菌种^[1-3]。

RGM 为分枝或不规则杆菌,大小为(0.3~0.6)μm×(0.7~4.0)μm,革兰染色不易着色,抗酸染色为红色。除 M.

hassiacum 等少数 RGM 的适宜生长温度超过 50℃,大多数 RGM 在 25~45℃条件下生长。RGM 生长适宜的培养基包括含 15 g/mL 四环素的 LB(LBT)培养基、Middle brook 7H9 培养基等,一般不超过 7 d 即可在固体培养基上见到明显的成熟菌落,其中耻垢分枝杆菌的亚种古地分枝杆菌 X7Bs 培养不到 24 h 即可观察到明显菌落^[4-5]。RGM 菌落形态包括粗糙型、光滑型,以及介于二者之间的光滑型,大都产黄色色素,少部分菌种不产色或暗产色。RGM 对含氯消毒剂有抵抗力,其中脓肿分枝杆菌和偶发分枝杆菌抵抗力较强,80 mg/L 有效氯的 TC-101 溶液作用 10 min 方可杀灭。

2 RGM 表层结构特点

分枝杆菌表层结构通常由三部分组成:质膜主要由肽聚糖和阿拉伯半乳糖共价吸附的大分子构成的细胞壁骨架,以及多糖和蛋白质组成的外层。RGM 和 SGM 在表层成分和功能等方面有所异同,可能影响细菌生长速度和致病性。

2.1 肽聚糖 大多数细菌的肽聚糖由重复的通过 β -1,4-糖苷键连接的 N-乙酰胞壁酸(MurNAc)和 N-乙酰葡萄糖胺二糖单位构成,而分枝杆菌 MurNAc 常被 N-糖基化胞壁酸(GlcNAc)所取代,其中, GlcNAc 由二磷酸尿嘧啶(UDP)-N-乙酰胞壁酸羧化酶催化 UDP-MurNAc 形成^[6]。

namH 是分枝杆菌 UDP-N-乙酰胞壁酸羧化酶编码基因,但并不是耻垢分枝杆菌生长必需基因。敲除 namH 基因后,耻垢分枝杆菌失去 UDP-N-乙酰胞壁酸羧化酶活性,只能合成 N-乙酰化的胞壁肽前体,并且对 β -内酰胺类抗菌药物和溶菌酶敏感性增加,说明 UDP-GlcNAc 在稳定耻垢分枝杆菌细胞壁结构和抵御溶解酶方面有一定作用。GlcNAc 在休眠的分枝杆菌中尤为常见,说明 GlcNAc 可能与分枝杆菌代谢减缓相关。因此,缺乏 UDP-GlcNAc 的耻垢分枝杆菌生长速度可能加快^[7]。

2.2 脂阿拉伯甘露聚糖(LAM) LAM 是广泛存在于分枝杆菌细胞壁的一种脂聚糖,主要由磷脂酰肌醇甘露聚糖锚定物(PIMs)、帽子多糖和末端帽子 3 个结构域组成。根据帽子结构的不同,分枝杆菌 LAM 可分为 3 种类型:甘露聚糖作为帽子结构的 LAM(ManLAM),磷酸肌红蛋白肌醇作为帽子结构的 LAM(PILAM)和缺乏帽子结构的 LAM(AraLAM)^[8]。其中,SGM 中的结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌为 ManLAM, RGM 中的耻垢分枝杆菌、偶发分枝杆菌为 PILAM, 龟分枝杆菌为 AraLAM。PILAM 可诱导巨噬细胞分泌包括白细胞介素(IL)-8, IL-12 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在内的多种细胞因子,而 ManLAM 并无此功能,说明 RGM 和 SGM 帽子结构的差异可能导致不同的炎症前反应。

2.3 糖肽脂(GPL) GPL 是位于非结核分枝杆菌表层结构外层的一种糖基化脂,一般由 1 个三肽氨基醇核心和 1 个连接酰胺的长链脂肪酸组成^[9]。GPL 在脓肿分枝杆菌菌落光滑、非侵袭性、形成生物膜的基因型(390S)中表达水平较高,在 390S 转变的菌落粗糙、侵袭性、不形成生物膜的基因型(390V)中表达较少。此外,菌落粗糙的野生型脓肿分枝杆菌(390R)和 390V 均可在肉汤培养基中形成与结核分枝杆菌类似的索状因子,而 390S 并无这一表现^[10]。上述研究表明,GPL 可能与 RGM 菌落形态、致病性和生物膜形成力有关。

3 RGM 生长相关因子

3.1 碱性磷酸酶(PhoA) 磷酸盐是分枝杆菌生长必需营养物质,其获取过程受环境中的无机磷酸盐含量水平所调节。PhoA 是耻垢分枝杆菌获取 P(i)的必需酶,其表达水平由组氨酸激酶感受器(senX3)和结合 DNA 的反应调节器(regX3)组成的双组份调控系统(senX3-regX3 2CR)所调节。研究发现,当环境中 P(i)充足、regX3 存在而 senX3 缺乏时,PhoA 处于磷酸化的活化状态,说明 PhoA 的活化可能由 regX3-P 的形成和 senX3 的失活引起,而 senX3 可能催化 regX3 的去磷酸化和失活^[11]。

耻垢分枝杆菌生长过程中,regX3 表达水平低,可能有利于保证其获取足量的 P(i)。对于生长缓慢且缺乏磷酸盐的结核分枝杆菌而言,senX3 和 regX3 均非必需基因,因此结核分枝杆菌 regX3 表达水平极低,可能依赖于其他调控系统获取 P(i)以维持生长。

3.2 复苏促进因子蛋白(Rpfs) Rpfs 是广泛存在于放线菌门细菌的一类具有裂解细胞壁活性的酶,其裂解细胞壁后产生的胞壁肽可能在触发放线菌门细菌复苏的过程中发挥启动信号的作用。Rpfs 的保守区存在 1 个与溶菌酶类似的 C-型折叠,同时也具有与糖基转移酶群相似的裂解分枝杆菌 MurNAc 和 N-乙酰葡萄糖胺之间 β -1,4-糖苷键的能力。

分枝杆菌肽聚糖水解后形成的产物包括复苏促进因子蛋白 B(Rpfb)和复苏促进因子中介蛋白(RipA)。Rpfb 可裂解

肽聚糖的糖苷键,而 RipA 可能是一种能裂解肽聚糖肽链的内切酶,二者的协同作用导致肽聚糖的进一步水解。Nikitushkin 等^[12]根据 Rpfb 和 RipA 联合作用的产物 N-乙酰氨基葡萄糖- β (1 \rightarrow 4)-N-羟乙酰基-1,6-脱水胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸,合成了一种 1,6-脱水双糖二肽,后者在 9~100 ng/mL 浓度范围内具有复苏休眠的分枝杆菌的功能,也是目前发现的具有复苏分枝杆菌功能的最小结构。

3.3 脂肪酸 包括花生四烯酸在内的脂肪酸在 1.6~10 μ mol/L 水平可促使液体培养基中的耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌复苏。Shleeva 等^[13]认为,脂肪酸不仅可通过直接提供环磷酸腺苷(cAMP, 3~10 mmol/L),或利用双丁酰-cAMP 取代自身而间接提供 cAMP,而且可通过引起腺苷酸环化酶(MS-MEG_4279)活化而增加耻垢分枝杆菌胞内 cAMP 水平。伴随 cAMP 水平上调,处于停滞期的耻垢分枝杆菌代谢开始活跃,而逆转录聚合酶链反应分析表明,在耻垢分枝杆菌指数生长期初始阶段,复苏促进因子 A(Rpfa)表达水平随着 cAMP 的增加而上调,说明休眠的分枝杆菌可能首先通过脂肪酸活化 MS-MEG_4279,促使停滞期分枝杆菌代谢活化,积蓄足够能量后,再由活性增加的 Rpfa 刺激指数期分枝杆菌增殖^[14]。此外,脂肪酸的合成受到两种聚甲基化多糖(PMPs)的调节,即甲基葡萄糖脂多糖(MGLP)和甲基化甘露糖多糖(MMP)。其中,MMP 仅见于 RGM,说明脂肪酸和 MMP 可能皆与 RGM 的生长活动有关^[15]。

3.4 甘油葡萄糖苷水解酶(GgH) GgH 是分枝杆菌产生的一种能够水解甘油葡萄糖苷(GG)的酶。GG 是合成 MGLP 的必需物质,当环境中氮元素缺失时,GG 在 RGM 菌体内蓄积;当环境中氮元素增加时,GgH mRNA 显著上调,水解 GG,促使其消耗^[16-17]。GgH 可促使 *M. hassiacum* 从氮元素缺乏的状态恢复,而 SGM 并不存在 GgH 及其同源序列,说明 GgH 可能与 RGM 的生长活动有关。

4 RGM 的致病性

多数 RGM 为腐物寄生菌,致病性较弱,并可在人体某些部位定植,引起免疫力低下患者感染,例如外科操作相关的感染和肺部感染等^[18]。RGM 对含氯制剂、碱性戊二醛等常规消毒剂具有较强的耐受性,且 RGM 在自然环境中广泛存在,如多种嗜热分枝杆菌可在保温水箱、新生儿暖箱的保温水中生长。因此,如医院感染防控措施不到位,易出现 RGM 院内感染。近年来,RGM 感染病例越来越多,甚至出现医院感染爆发。因此,RGM 已经成为一类重要的临床病原菌,其致病性应引起高度重视。

4.1 脓肿分枝杆菌的致病性 脓肿分枝杆菌是引起人类感染的最常见 RGM,主要引起大范围的表皮和软组织感染,也可在免疫缺陷患者中引起严重的播散性感染^[19]。脓肿分枝杆菌有 3 种亚种,即脓肿分枝杆菌脓肿亚种(MAB),bolletii 亚种和马赛分枝杆菌^[20]。MAB 作为一种高度耐药的分支杆菌,不仅是 RGM 中最常见的呼吸道病原体,也是纤维囊泡症患者需延长多重抗菌药物治疗的最致命的病原体之一^[21]。马赛分枝杆菌则与肺部和软组织感染,以及外科操作和医疗设备有关的医院感染暴发相关^[22]。

4.2 其他致病性 RGM 的致病性 龟分枝杆菌常引起皮肤、软组织感染,如眼部手术和纹身导致的感染、肘部滑囊炎和牙龈病变等,还可引起免疫缺陷患者皮肤播散的非典型分枝杆菌病,较少导致肺部感染。偶发分枝杆菌常引起皮肤、软组织感染,较少引起肺部感染^[23-25]。耻垢分枝杆菌主要与淋巴管炎、蜂窝组织炎、骨髓炎和伤口感染有关。草分枝杆菌可引起免疫系统抑制患者感染,也可引起免疫功能正常的结膜炎、尿道炎和关节炎科患者关节液和组织感染。RGM 感染容易漏诊或误诊,治疗困难,疗程长,多采用联合疗法进行治疗。因此,准

确的鉴定结果对临床经验用药十分重要。

5 小 结

RGM 作为一类重要的临床病原菌,日益受到重视。RGM 与 SGM 同为分枝杆菌属细菌,然而二者致病性和生长速度存在较大差异。导致这些差异的原因,即不同的表层结构和功能,可导致不同的机体免疫反应。此外,RGM 和 SGM 可能分泌不同种类、数量的生长因子以促进自身生长,而促使 RGM 快速生长的相关因子是否可用来快速培养包括结核分枝杆菌在内的 SGM,仍有待进一步验证。

参考文献

[1] Pang H, Li G, Zhao X, et al. Drug susceptibility testing of 31 antimicrobial agents on rapidly growing Mycobacteria isolates from China [J/OL]. Biomed Res Int, 2015-08-13 [2016-07-11], <https://www.hindawi.com/journals/bm-ri/2015/419392/>.

[2] El Helou G, Viola GM, Hachem R, et al. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(2):166-174.

[3] Jonsson G, Rydberg J, Sturegard E, et al. A case of Mycobacterium goodii prosthetic valve endocarditis in a non-immunocompromised patient; use of 16S rDNA analysis for rapid diagnosis [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12(1):301-305.

[4] Getino M, Fernandez-Lopez R, Palencia-Gandara C, et al. Tanzawaic acids, a chemically novel set of bacterial conjugation inhibitors [J]. PLoS One, 2016, 11(1):e0148098.

[5] Evangelopoulos D, Gupta A, Lack NA, et al. Characterisation of a putative AraC transcriptional regulator from Mycobacterium smegmatis [J]. Tuberculosis, 2014, 94(6):664-671.

[6] Salem M, Seidelin JB, Eickhardt S, et al. Species-specific engagement of human nucleotide oligomerization domain 2(NOD) 2 and Toll-like receptor (TLR) signalling upon intracellular bacterial infection; role of Crohn's associated NOD2 gene variants [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179(3):426-434.

[7] Hansen JM, Golchin SA, Veyrier FJ, et al. N-glycosylated peptidoglycan contributes to the immunogenicity but not pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis [J]. J Infect Dis, 2014, 209(7):1045-1054.

[8] Chan CE, Gotze S, Seah GT, et al. The diagnostic targeting of a carbohydrate virulence factor from M. Tuberculosis [J]. Sci Rep, 2015, 5(1):10281-10293.

[9] Honda JR, Hess T, Malcolm KC, et al. Pathogenic nontuberculous mycobacteria resist and inactivate cathelicidin; implication of a novel role for polar mycobacterial lipids [J]. PLoS One, 2015, 10(5):e126994.

[10] Park IK, Hsu AP, Tettelin H, et al. Clonal diversification and changes in lipid traits and colony morphology in Mycobacterium abscessus clinical isolates [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(11):3438-3447.

[11] Glover RT, Kriakov J, Garforth SJ, et al. The two-component regulatory system senX3-regX3 regulates phosphate-dependent gene expression in Mycobacterium smegmatis [J]. J Bacteriol, 2007, 189(15):5495-5503.

[12] Nikitushkin VD, Demina GR, Shleeva MO, et al. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the

resuscitation of dormant mycobacteria [J]. FEBS, 2015, 282(13):2500-2511.

[13] Shleeva M, Goncharenko A, Kudykina Y, et al. Cyclic AMP-dependent resuscitation of dormant Mycobacteria by exogenous free fatty acids [J]. PLoS One, 2013, 8(12):e82914.

[14] Bergkessel M, Basta DW, Newman DK. The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology [J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(9):549-562.

[15] Mendes V, Maranha A, Alarico S, et al. Biosynthesis of mycobacterial methylglucose lipopolysaccharides [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29(8):834-844.

[16] Alarico S, Costa M, Sousa MS, et al. Mycobacterium hassiacum recovers from nitrogen starvation with up-regulation of a novel glucosylglycerate hydrolase and depletion of the accumulated glucosylglycerate [J/OL]. Nature, 2014-10-24 [2016-07-14], <http://www.nature.com/articles/srep06766>.

[17] Maranha A, Moynihan PJ, Miranda V, et al. Octanoylation of early intermediates of mycobacterial methylglucose lipopolysaccharides [J/OL]. Sci Rep, 2015-09-01 [2016-07-18], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4555173/>.

[18] Caierao J, Paiva JA, Sampaio JL, et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of rapidly-growing mycobacteria: an alternative tool for identification and typing [J]. Int J Infect Dis, 2016, 42(1):11-16.

[19] Heydari H, Wee WY, Lokanathan N, et al. MabsBase: a mycobacterium abscessus genome and annotation database [J]. PLoS One, 2013, 8(4):e62443.

[20] Wong YL, Choo SW, Tan JL, et al. Draft genome sequence of Mycobacterium bolletii strain M24, a rapidly growing mycobacterium of contentious taxonomic status [J]. J Bacteriol, 2012, 194(16):4475-4480.

[21] Miranda-Casoluengo AA, Staunton PM, Dinan AM, et al. Functional characterization of the Mycobacterium abscessus genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1):553-564.

[22] Ngeow YF, Wong YL, Tan JL, et al. Genome sequence of mycobacterium massiliense M18, isolated from a lymph node biopsy specimen [J]. J Bacteriol, 2012, 194(15):4125.

[23] Fica A, Soto A, Dabanch J, et al. Atypical mycobacterial infections in five adult patients without evidence of immunosuppression: making an experience [J]. Rev Chilena Infectol, 2015, 32(1):80-87.

[24] Edens C, Liebich L, Halpin AL, et al. Mycobacterium chelonae eye infections associated with humidifier use in an outpatient LASIK clinic-Ohio, 2015 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2015, 64(41):1177-1200.

[25] Michalek K, Lechowicz M, Pastuszczyk M, et al. The use of trimethoprim and sulfamethoxazole (TMP-SMX) in dermatology [J]. Folia Med Cracov, 2015, 55(1):35-41.