

斑马鱼-海分枝杆菌模型研究对结核病致病机理的启示

侯曼美, 谢建平*

(西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 重庆 400715)

摘要:全世界约三分之一的人口感染过结核分枝杆菌,其导致的结核病仍然是全球公共卫生的严重威胁。结核菌是典型的胞内致病菌。结核菌的致病性与其成功逃避和利用宿主免疫应答等密切相关。控制结核病需要深入了解致病菌和宿主之间的相互作用。不同的动物模型是揭示致病菌-宿主相互作用的关键。海分枝杆菌-斑马鱼模型是最近才得以发展并获得了不少新见解的研究系统之一。本文总结了该模型揭示的海分枝杆菌毒力因子 Erp、Esx-1、pmiA、Mec1 和 Mec2、KasB 等,以及该模型的优缺点。这些结果为大动物模型研究和深入了解结核分枝杆菌感染人体的致病机理提供了线索。

关键词: 斑马鱼;海分枝杆菌;结核病

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0015-08

全世界有近 20 亿人感染过结核分枝杆菌。其所导致的结核病仍然是全球公共卫生的重要威胁。深入研究结核分枝杆菌致病机理有助于控制结核病。然而,研究结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染机制的困难在于:结核分枝杆菌生长缓慢(代时约 24h),研究周期较长;较高的生物安全措施(BSL-3);动物模型少、成本高且没有任何一个模型适合研究结核菌致病机理的所有方面^[1]。其他非结核分枝杆菌往往能够提供结核分枝杆菌致病机理的部分线索。例如鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 等,而且还大大降低了试验室操作的安全要求^[2]。

海分枝杆菌是鱼类和两栖类的病原菌。基因组比较分析表明海分枝杆菌 (*M. marinum*) 与结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 的亲缘关系较近,核酸同一性高达 85%。它们具有共同的祖先,共同祖先通过

精简进化(reduction evolution)和基因水平转移进化成为不能在普通环境中生存、专门感染人类和其他灵长类的病原菌^[3],而海分枝杆菌保留了祖先的基因组特征,宿主范围大^[3]。这两种病原菌引起的疾病特征在某些方面相似,如形成肉芽肿。海分枝杆菌感染单层培养的巨噬细胞(cultured macrophage monolayers),发现巨噬细胞对其吞噬运输途径与其对结核分枝杆菌的吞噬运输途径相似^[4];两者的宿主体内生存、转移和繁殖所需的毒力因子相似度高,它们的体内生存机制也可能类似^[5]。海分枝杆菌可引起淡水鱼和咸水鱼类死亡,并且是导致游泳池肉芽肿(fish tank granulomas)的致病菌^[6],最近的研究还发现它还可引起人肺肉芽肿^[7]。海分枝杆菌是结核病致病机制研究的不错的模型^[8]。

斑马鱼是完美的胚胎研究模型^[9],最近斑马鱼越来越受到病原微生物学家的喜爱,作为感染性疾病的感染模型。海分枝杆菌感染斑马鱼,可形成与

基金项目:国家重要传染病科技重大专项(2008ZX10003-006,2008ZX1003-001);国家自然科学基金(90813019);国家科技平台项目(2005DKA2120610)

* 通信作者。Tel: +86-23-68367108; Fax: +86-23-68252365; E-mail: jianpingxie@yahoo.com

作者简介:侯曼美(1984-),女,河北卢龙人,硕士研究生,研究方向为微生物功能基因组学与新药靶标筛选。E-mail: qwxw Xiaoman@126.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期:2009-05-16;修回日期:2009-07-17

人结核病相似的感染过程和症状:巨噬细胞吞噬菌体,菌体在巨噬细胞内生长繁殖,并随巨噬细胞的运动而转移传播^[10],海分枝杆菌的生长也可能受到巨噬细胞的限制^[11],最后形成肉芽肿。

1 斑马鱼作为感染宿主

斑马鱼模型很早就用于生物医学研究,但最近30年来才成为普遍看好的研究工具。其优势为:(1)易繁殖,受精卵的直径约1mm,易于进行显微注射和细胞移植等操作。(2)胚胎体外发育,早期胚胎完全透明,便于试验观察和荧光技术的应用。(3)具有较完善的胚胎和遗传操作技术。在功能基因组学研究方面,已经应用了转基因技术、反义寡核苷酸沉默基因表达技术、基因过量表达技术等^[9]。

盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、斑马鱼(*zebrafish*)是结核病致病机理研究的替代模型宿主:盘基网柄菌用于替代宿主巨噬细胞,黑腹果蝇用于研究感染过程中保守的天然免疫机制,而斑马鱼在天然性免疫和获得性免疫研究中都适用。斑马鱼不仅具有天然免疫系统,还具有与哺乳动物相似的复杂的获得性免疫系^[12]。它填补了低等生物和脊椎动物研究之间的空白。

斑马鱼作为感染模型也存在许多不足^[13]。斑马鱼缺少免疫细胞表面标记,尚未获得针对免疫系统细胞表面标记的单克隆抗体。斑马鱼只在胚胎发育早期透明,此时可以进行细菌感染实时分析,然而5-6d后,胚胎变得不透明。所以现在急需研发出一种终生透明的斑马鱼。与鼠相比,无合适的靶基因缺失技术。斑马鱼肉芽肿似乎只含有少量的B细胞和T细胞。所以由海分枝杆菌-斑马鱼模型得到的毒力因子应该于结核分枝杆菌-鼠模型中再次验证后才有说服力。斑马鱼虽然具有复杂的免疫系统,但是,是否所有哺乳动物免疫系统组分在斑马鱼体内都能找到类似物?例如,不清楚斑马鱼体内是否具有树突状细胞(DC),而相反,在斑马鱼体内发现大量新的哺乳动物所缺乏的免疫受体家族(NITRs; novel immune-type receptors)。这些都不利于以斑马鱼做为感染模型获得的研究结果的外推。

2 海分枝杆菌作为结核病病原菌研究模型

海分枝杆菌是鱼、两栖动物等变温动物的病原菌,最适生长温度为25℃-35℃,减少了研究人员感

染的危险性。海分枝杆菌的基因组由6636827 bp的环状染色体和23 kb的汞抗性质粒组成,共有5424个CDS,10个原噬菌体^[3],与结核分枝杆菌基因组编码的氨基酸具有85%的相似性。海分枝杆菌基因组数据信息的完备为研究者提供了方便和指导性。因为海分枝杆菌的宿主主要是变温动物,可引起与结核分枝杆菌相似的感染症状,并且海分枝杆菌的生长速度快于结核分枝杆菌,这样海分枝杆菌成为人类结核病探索研究理想模型。

3 海分枝杆菌感染斑马鱼过程中菌体与宿主的相互作用

3.1 巨噬细胞转移并吞噬分枝杆菌

利用斑马鱼胚胎实时成像技术可以检测出,海分枝杆菌感染斑马鱼胚胎后,巨噬细胞立刻转移到感染位点并且吞噬分枝杆菌^[14]。Clay H采用巨噬细胞标记和粒细胞标记证明巨噬细胞是吞噬海分枝杆菌的主要细胞^[15]。宿主内环境中的哪类细胞(如内皮细胞、上皮细胞、间质细胞)感应到分枝杆菌的入侵,又是哪类细胞将感应到的信号转递给巨噬细胞使其发挥作用?这些问题到目前为止还没有明确的答案。也许通过对宿主和海分枝杆菌的遗传操作可以解决这些疑问。比如建立缺乏某种细胞的宿主模型,失活分枝杆菌的某个基因等。

3.2 感染的巨噬细胞转移到组织深部

细胞培养研究发现分枝杆菌可以通过两种方式跨过表皮屏障:(1)以巨噬细胞为载体的方式跨过表皮屏障(2)直接跨过表皮细胞^[16]。ESX-1/RD1毒力决定子在致病性分枝杆菌直接跨越上皮细胞时起作用^[10],但是分枝杆菌直接跨越表皮细胞的几率极低,Clay H等发现在缺失吞噬细胞系的斑马鱼胚胎中很少发生分枝杆菌的转移。目前亟待探索的是:什么信号介导被感染的巨噬细胞转移到组织深部?但目前还未找到海分枝杆菌胚胎抗原呈递细胞的细胞标记,很难分析抗原加工和呈递过程。

3.3 分枝杆菌在巨噬细胞内的生长

结核分枝杆菌感染后,第1周菌体呈指数生长,当宿主的获得性免疫出现后菌体停滞生长^[17]。所以人们以前认为没有被辅助性T细胞(Th)激活的天然巨噬细胞无控制分枝杆菌在宿主细胞内生长的能力。但是从斑马鱼模型研究发现天然巨噬细胞有抑制海分枝杆菌生长的能力。Clay H等利用吗啉代敲除髓样转录因子*PU-1*的斑马鱼胚胎(缺乏巨噬细胞的胚胎)进行感染研究,感染四天后胚胎中

的菌体比正常胚胎中的菌体高出 10 倍, 表明天然巨噬细胞抑制分枝杆菌生长。

3.4 被感染的巨噬细胞聚集及分枝杆菌在巨噬细胞间的传播

被感染的巨噬细胞聚集并且伴随着未被感染的巨噬细胞和免疫细胞的聚集, 形成的紧密且有结构分化的结构称为肉芽肿^[18]。形成肉芽肿是人类和鼠模型控制结核分枝杆菌的一个共同策略^[19]。虽然肉芽肿内部存在着强烈的免疫杀菌机制, 分枝杆菌依然不能被彻底清除, 反而巨噬细胞的聚集促进了结核分枝杆菌在巨噬细胞之间的传播, 加重了感染。Hannah E. Volkman 等利用显微镜直接计数的方法证明无巨噬细胞聚集时, 被感染的巨噬细胞的数量无变化, 但当巨噬细胞聚集后被感染的巨噬细胞的数量剧增^[20]。该现象难免引起人们的思考: 巨噬细胞原本是宿主的抗菌防御机制, 缘何又引起菌体的传播? 巨噬细胞到底是于宿主有利还是于病原体有利? 这些问题都亟待探索。

3.5 肉芽肿的成熟并且抑制分枝杆菌生长

细菌毒力因子在宿主肉芽肿形成时促进巨噬细胞的聚集, 表明肉芽肿不仅仅是宿主的保护结构, 也是分枝杆菌入侵宿主后的栖息地。Robin 等^[10], 先用绿色荧光标记的海分枝杆菌诱导肉芽肿形成, 再用红色荧光标记的海分枝杆菌进行超感染, 结果红色海分枝杆菌可以迅速的转移到已形成的肉芽肿。对此的一种解释是: 这是宿主控制分枝杆菌的最有效的方法; 然而超感染红色分枝杆菌可以在绿色分枝杆菌附近持续生长, 这就引出了另一种解释: 巨噬细胞的聚集为分枝杆菌的生存提供了一个为环境^[31], 分枝杆菌可能从肉芽肿获益以逃避宿主的获得性免疫。

4 海分枝杆菌感染斑马鱼所涉及的毒力因子

利用海分枝杆菌-斑马鱼模型发现许多毒力因子, 他们在海分枝杆菌的致病性上起着很大作用。这些毒力因子的概括见表 1, 总结了这些毒力因子在其他分枝杆菌中的分布情况 (“%”表示在 ncbi 的 blast 界面中以海分枝杆菌的序列对 27 种结核分枝杆菌比对得到的氨基酸序列同一性的值, 网址为: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) 以及其功能和可能具有的功能。

4.1 Esx-1 基因簇

Esx-1 基因簇编码 II 型分泌系统分泌机器及其

底物。分泌 3 种蛋白 ESAT-6、CFP-10 (即 Esx-B) 和 EspA (EST-1 secretion-associated protein A), 该基因簇大部分位于 RD1 区。Esx-1 在分枝杆菌直接跨越表皮细胞中发挥作用。用 Esx-1 突变的海分枝杆菌感染斑马鱼胚胎, 发现该突变株生存能力减弱^[10]。Ingrid C. Koo 等发现海分枝杆菌的 ESX-1 系统可以促进巨噬细胞分泌溶酶体和细胞因子 IL-1 β 和 IL-18^[31]。前者促进海分枝杆菌逃离吞噬体, 后者可能负责营造保护细菌的生境, 使其逃离宿主的免疫攻击, 招募新的巨噬细胞以促进分枝杆菌的传播^[31]。缺少 Esx-1 的突变株不能在培养的单层巨噬细胞中由原始感染细胞扩散到其他细胞^[21]。Esx-1 缺陷的海分枝杆菌不能引起巨噬细胞聚集形成肉芽肿, 但是向 Esx-1 缺陷型感染后的斑马鱼体内导入正常的海分枝杆菌, 则会引起感染了 Esx-1 缺陷型海分枝杆菌的巨噬细胞聚集形成肉芽肿, 揭示出野生型的海分枝杆菌能够传播引起巨噬细胞聚集的“种子”^[21]。Esx-1 缺失的分枝杆菌感染的巨噬细胞能够接受使其发生聚集的信号, 却不能发出使其聚集的信号^[21], 所以引入野生型的分枝杆菌可引起被缺陷型分枝杆菌感染的巨噬细胞聚集。

4.2 输出重复蛋白 Erp

Erp 是一种细胞表面组分, 目前只知道这种毒力因子的遗传和生物化学特性, 而其具体的毒力作用机制并不明晰^[22]。Erp 由 3 个结构域组成: 保守的具有分泌依赖性信号序列的 N-端结构域; 中央重复结构域; 保守的 C-端疏水结构域, 该结构域可能和 Erp 与细胞表面的松散结合有关^[23]。Christine. L 等利用 Erp 突变的海分枝杆菌感染培养的单层巨噬细胞发现菌体生长较野生型减弱, 之后又用 erp::aph 突变株感染斑马鱼胚胎, 实验组胚胎生活状况优于对照组^[24]。其后继试验得出 erp::aph 突变株对来福霉素、红霉素、氯霉素等亲脂性抗生素的敏感性增强, 并且该突变株对酯溶性药剂的透过性增强。渗透性的改变使得其对宿主活性氧和活性氮中间体、降解酶、防卫素等更敏感。推测 Erp 可能在维持海分枝杆菌细胞壁和外膜的完整性方面起重要作用。

4.3 吞噬体成熟抑制蛋白 PmiA

PmiA 是结核分枝杆菌所没有的海分枝杆菌毒力因子, 抑制吞噬体成熟。缺失 PmiA 的海分枝杆菌不能在巨噬细胞中正常生存, 用野生型的基因互补则使其毒力恢复^[25]。PmiA 基因与可能的羟化酶和可能的羧化酶相似, 通过转座子突变试验推测该基因在脂代谢及转移中起作用。

表 1 海分枝杆菌感染所涉及的毒力因子

Table 1 Virulence factors involved in *Mycobacterium marinum* infection

Virulence factor	Other mycobacteria that may posses similar virulence factor	Possible function or function domain of the coding protein	RE	
EspB (MMAR-5457)	M. bovis(65%)	ESX-1 secreted protein, Required for intracellular persistence	[3]	
	M. tuberculosis(67%)		[10]	
			[21]	
EspA (MMAR-4166)	M. tuberculosis(64%)	ESX-1 secretion-associated protein A, function unknown	[3]	
	M. bovis(64%)		[10]	
	M. bovis BCG(64%)		[21]	
	M. leprae(62%)			
EsxB (MMAR-0187)	M. tuberculosis(97%)	10 kDa culture filtrate antigen, a culture filtrate antigen that forms part of a novel secretion apparatus.	[3]	
	M. smegmatis(60%)		[10]	
	M. sp. JLS(55%)		[21]	
	M. sp. MCS/KMS(54%)			
ESAT-6 (MMAR-0188)	M. tuberculosis(90%)	6 kDa culture filtrate antigen, culture filtrate antigen forms part of a novel secretion apparatus.	[3]	
	M. Bovis(90%)		[10]	
	M. smegmatis(68%)		[21]	
	M. sp. MCS/KMS/JLS(64%)			
	M. ulcerans(82%)			
Erp (MMAR-5374)	M. tuberculosis(76%)	Exported repetitive protein precursor, surface-exposed protein required for multiplication and intracellular growth. seems to play a role in virulence	[3]	
	M. bovis(76%)		[22]	
	M. bovis BCG(76%)		[23]	
PmiA (MMAR-3386)	M. avium(58%)	Phagosome maturation inhibitor, Involved in synthesis of cell wall components that are required to inhibit phagosome maturation.	[3]	
	M. leprae(52%)		[25]	
	M. gilvum(52%)			
MelA (MMAR-2864)	M. ulcerans(99%)	Oxygenase, function unknown, probably involved in cellular metabolism.	[3]	
	M. tuberculosis(95%-96%)		[26]	
	M. vanbaalenii(93%)			
MelB (MMAR-2165)	M. tuberculosis(83% - 84%)	transglutaminase family protein, function unknown; possible proteolytic activity (cysteine protease).	[3]	
	M. vanbaalenii(77%)		[26]	
	M. smegmatis(78%)			
	M. sp. MCS/KMS/JLS(77%)			
	M. gilvum(76%)			
MelC (MMAR-2164)	M. abscessus(72%)	1 - 317aa; Transglutaminase-like enzymes, putative cysteine proteases. 143 - 262aa; Transglutaminase-like superfamily. 9-90aa; Bacterial transglutaminase-like N-terminal region		
	M. ulcerans(98%)			
	M. tuberculosis(81%)		hypothetical protein	[3]
	M. bovis(81%)			[26]
	M. bovis BCG(81%)			
	M. avium(77%)			
	M. leprae(73%)			
MelD (MMAR-2163)	M. sp. MCS/KMS/JLS(69%)	hypothetical protein, function unknown		
	M. vanbaalenii(67%)			
	M. smegmatis(67%)			
	M. gilvum(67%)			
	M. abscessus(61%)			
MelD (MMAR-2163)	M. ulcerans(98%)	hypothetical protein, function unknown	[3]	
	M. avium(81%)		[26]	
	M. tuberculosis(81%)			
	M. bovis(81%)			
	M. smegmatis(78%)			
	M. gilvum(74%)			
	M. vanbaalenii(74%)			
M. sp. MCS/KMS/JLS(75%)				
	M. abscessus(72%)			

续表 1

Virulence factor	Other mycobacteria that may posses similar virulence factor	Possible function or function domain of the coding protein	RE
MeIE (MMAR-2162)	M. ulcerans(99%) M. tuberculosis(85%) M. bovis(85%) M. avium(81%) M. leprae(79%) M. sp. MCS/KMS/JLS(74%) M. smegmatis(72%) M. gilvum(70%) M. vanbaalenii(68%) M. abscessus(63%)	hypothetical protein, function unknown, but contains Cdd transglutaminase-like enzymes, putative cysteine proteases	[3] [26]
MeIF (MMAR-2864)	M. ulcerans(99%) M. tuberculosis(95% -96%) M. bovis(96%) M. vanbaalenii(93%)	Oxygenase, function unknown, probably involved in cellular metabolism 1-356aa; Luciferase-like monooxygenase 1-255aa; Flavin-utilizing monooxygenases	[3] [26]
MeIG (MMAR-2865)	M. ulcerans(98%) M. tuberculosis(85%) M. bovis(85%) M. vanbaalenii(79%)	Oxygenase, function unknown, may be involved in electron transfer 6-336aa; anthranilate dioxygenase reductase 13-90aa; 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain 106-333aa; Benzoate dioxygenase reductase (BenDO) FAD/NAD binding domain. 386->698; 2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases	[3] [26]
MeIH (MMAR-2866)	M. ulcerans(99%) M. tuberculosis(86% -87%) M. bovis(87%) M. vanbaalenii(86%)	epoxide hydrolase EphB, this enzyme acts on epoxides (alkene oxides, oxiranes) and Arene oxides. plays a role in xenobiotic metabolism by degrading potential toxic epoxides. also determines steady-state levels of physiological mediators	[3] [26]
MeII (MMAR-2867)	M. ulcerans(99%) M. tuberculosis(78%) M. bovis BCG(78%) M. bovis(79%) M. vanbaalenii(76%) M. abscessus(54%) M. avium(53%) M. gilvum(54%) M. sp. JLS(55%) M. smegmatis(51%) M. sp. MCS/KMS(54%) M. eprae(59%) M. sp. JLS(57%)	Oxidoreductase, function unknown, probably involved in cellular metabolism	[3] [26]
MeIJ (MMAR-2868)	M. ulcerans(99%) M. tuberculosis(74%) M. bovis(74%) M. vanbaalenii(63%)	riboflavin biosynthesis protein RibA1, involved in riboflavin biosynthesis [catalytic activity : GTP + 3 H(2)O = formate + 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(5-phosphoribosylamino) pyrimidine + diphosphate]	[3] [26]
MeIK (MMAR-2869)	M. ulcerans(98%) M. tuberculosis(78%) M. bovis(78%) M. vanbaalenii(79%)	short-chain type dehydrogenase/reductase, function unknown, probably involved in cellular metabolism 1-256aa; short-chain type dehydrogenase/reductase 38-250aa; Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins	[3] [26]
KasB (MMAR-3339)	M. ulcerans(100%) M. tuberculosis(91%) M. bovis(91%) M. leprae(88%) M. avium(87%) M. sp. MCS/KMS/JLS(82%) M. smegmatis(80%) M. gilvum(81%) M. vanbaalenii(80%) M. abscessus(67%)	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] synthase 2, involved in fatty acid biosynthesis (mycolic acids synthesis); involved in meromycolate extension. catalyzes the condensation reaction of fatty acid synthesis by the addition to an acyl acceptor of two carbons from malonyl-accp	[30]

4.4 Mel1 和 Mel2 基因座

Mel 是 mycobacterium enhanced infection loci 的缩写。Mel1 和 Mel2 在海分枝杆菌与宿主巨噬细胞相互作用时起作用。Sahar H 指出这两个基因座可能具有 11 个基因, mel1 编码分泌蛋白, 包括可能的膜蛋白和可能的转谷氨酰胺酶; mel2 在次级代谢或脂肪酸生物合成中起作用^[26]。缺失这两个基因座的海分枝杆菌不能感染巨噬细胞, 表明他们在菌体感染宿主细胞时发挥重要作用。Sahar H 等将载有 mel1 或 mel2 片段的科斯质粒导入非致病性的耻垢分枝杆菌中, 发现转化后的耻垢分枝杆菌在鼠巨噬细胞内存活时间变长^[26]。目前 mel1 编码的五种蛋白中有三种功能未知, melA 可能编码膜蛋白, 参与其与宿主细胞相互作用; 另外两种可能的蛋白是转谷氨酰胺酶或半胱氨酸蛋白酶, 前者在真核生物信号转导和细菌的吸附中起作用。转谷氨酰胺酶在其他细菌的致病性中起重要作用^[27], 但是目前还不清楚转谷氨酰胺酶在海分枝杆菌中是否起相似的作用, 是通过什么机制起作用的。非致病性的分枝杆菌也具有转谷氨酰胺酶, 表明这些酶不只与致病性相关。转谷氨酰胺酶在致病性和非致病性菌中是表达量的区别, 还是结构和功能的细微差别有待于进一步的研究。Mel2 所编码蛋白的具体结构还不清楚, 似乎与脂肪酸和聚酮生物合成有关。

4.5 KasB

KasB (即酮酰-酰基载体蛋白合成酶 B), 在分枝杆菌脂肪酸合成系统 II (FAS II) 中起作用, 将酰基-ACP 与丙二酸单酰 ACP 缩合形成增加 2 个碳的酮酰-ACP^[27]。Apoorva Bhatt 等将结核分枝杆菌的 KasB 定向缺失, 发现分枝杆菌的抗酸染色消失, 进一步的生化和结构分析发现突变株合成的霉菌酸酯比正常菌株的短。同时他们还发现突变菌株可以长时间存留于具有正常免疫能力的小鼠体内而不引起疾病, 说明该基因对分枝杆菌的毒力具有重要影响^[28-29]。Lian-Yong Gao 等利用转座子插入 kasB 基因的方法突变海分枝杆菌, 发现海分枝杆菌在宿主巨噬细胞内的生活能力减弱。他们运用核磁共振 (NMR)、飞行时间质谱分析法和化学降解分析法等进一步研究海分枝杆菌宿主体内生存能力减弱的机制, 发现突变株合成的分枝酸比野生型菌株合成的分枝酸少 2-3 个碳原子^[30]。这导致突变菌株细胞壁渗透性的改变, 对脂溶性抗生素的敏感性增强, 对宿主杀菌分子防御素和溶菌酶等的抵抗能力减弱。

5 结论

海分枝杆菌-斑马鱼模型是对结核病进行探索研究的比较理想的替代模型。这些年来研究者利用该模型取得许多进展。该模型具有许多独特的优点, 使得其越来越受欢迎。海分枝杆菌-斑马鱼模型也具有不可避免的缺陷, 比如无法取代大动物实验等。但随着对其不断改进, 该模型的方便性将很可能揭示更多结核病相关的致病机理。

参考文献

- [1] Robin L, Lalita R. Insights into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(3): 277-283.
- [2] Nirmal R, Martina W, Karen E, et al. A Mycobacterial gene involved in synthesis of an outer cell envelope lipid is a key factor in prevention of phagosome maturation. *Infection and Immunity*, 2007, 75(2): 581-591.
- [3] Timothy PS, Tors TS, Harrison PF, et al. Insights from the complete genome sequence of Mycobacterium marinum on the evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Genome Research*, 2008, 18(5): 1088-9051/08.
- [4] Barker LP, George KM, Flakow S, et al. Differential trafficking of live and dead Mycobacterium marinum organisms in macrophages. *Infection and Immunity*, 1997, 65(4): 1497-1504.
- [5] Gao LY, Guo B, McLaughlin B, et al. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading, and ESAT-6 secretion. *Molecular Microbiology*, 53(6): 1677-1693.
- [6] Cosma CL, Humbert O, Ramakrishnan L. Superinfecting mycobacterium home to established tuberculous granulomas. *Nature Immunology*, 2004, 5: 828-835.
- [7] Lai CC, Lee NL, Chang YL, et al. Pulmonary infection due to Mycobacterium marinum in an immunocompetent patient. *Clinical Infection Disease*, 2005, 40(1): 206-208.
- [8] Gregory WB, Don GE. Mycobacterium marinum produce long-term chronic infections in medaka: A new animal model for studying human tuberculosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006, partC 145(1): 45-46.
- [9] Con S, Carol HK. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 341-350.
- [10] Robin L, Lalita R. Insight into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(3): 277-283.

- [11] Hilary C, Davis JM, Dana B, et al. Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host & Microbe*, 2007, 2(1): 29-39.
- [12] Tamara CP, Lalita R. New models for the study of *Mycobacterium*-host interactions. *Current Opinion in Immunology*, 2004, 16(4): 499-505.
- [13] Astrid MS, Ben JA. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(10): 451-457.
- [14] Davis JM, Clay H, Lewis JL, et al. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interaction leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, 2002, 17(6): 693-702.
- [15] Meijer AH, van der Sar AM, Cunha C, et al. Identification and real-time imaging of a myc-expressing neutrophil population involved in inflammation and mycobacterial granuloma formation in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(1): 36-49.
- [16] Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microbes Infection*, 2006, 8(1): 1-9.
- [17] Lazarevic V, Nolt D, Flynn JL. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune response. *The journal of Immunology*, 2005, 175(2): 1107-1117.
- [18] Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, et al. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*, 1999, 10(6): 641-650.
- [19] Lawn SD, Butera ST, Shinnick TM. Tuberculosis unleashed; The impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 2002, 4(6): 635-646.
- [20] Hannah EV, Hilary C, Dana B, et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a *Mycobacterium* virulence determinant. *PLoS Biology*, 2004, 2(11): 1946-1956.
- [21] Volkman HE, Clay H, Beery B, et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a *Mycobacterium* virulence determinant. *PLoS Biology*, 2004, 2(11): e367.
- [22] de Mendonca-Lima L, Bordat Y, Pivert E, et al. The allele encoding the mycobacterial Erp protein affects lung disease in mice. *Cell Microbiol*, 2003, 5(1): 65-73.
- [23] Kocincova D, Sonden B, L de Mendonca-Lima, et al. The Erp protein is anchored at the surface by a carboxyterminal hydrophobic domain and is important for cell wall structure in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS microbiology letters*, 2004, 231(2): 191-196.
- [24] Christine LC, Kathryn K, Rosa K, et al. *Mycobacterium marinum* Erp is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracellular survival. *Infection and Immunity*, 2006, 74(6): 3125-3133.
- [25] Nirmal R, Martina W, Karen E, et al. A mycobacterial gene involved in synthesis of an outer cell envelope lipid is a key factor in prevention of phagosome maturation. *Infection and Immunity*, 2007, 75(2): 581-591.
- [26] Sahar H, Selvakumar S, Suat LG, et al. Identification of two *Mycobacterium marinum* loci that affect interaction with macrophages. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 6902-6913.
- [27] Horiguchi Y, Senda T, Sugimoto N, et al. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *Journal of Cell Science*, 1995, 108(10): 3243-3251.
- [28] Merrill LS, Gautam A, Craig V, et al. Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* ketoacyl-acyl carrier protein synthases *kasA* and *kasB*. *The journal of biological chemistry*, 2001, 276(50): 47029-47037.
- [29] Apoorva B, Nagatoshi F, Kiranmai B, et al. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Microbiology*, 2007, 104(12): 5157-5162.
- [30] Gao LY, Françoise L, Elise HL, et al. Requirement for *kasB* in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival; implications for therapy. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(6): 1547-1563.
- [31] Ingrid CK, Wang C, Raghavan S, et al. ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(9): 1866-1878.

Insight into tuberculosis pathogenic mechanism from the Zebra fish-mycobacterium marinum model – A review

Manmei Hou, Jianping Xie*

(Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqi 400715, China)

Abstract: Tuberculosis remains a major global health threat. Nearly one-third of the world population infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of tuberculosis. *M. tuberculosis* is a typical and most successful intracellular pathogen. The pathogen can evade and manipulate the host immune response. Insights into the interplays between the pathogen and the host was pivotal to develop more sophisticated diagnosis methods and control measures to tuberculosis. No single model can address the full spectrum of this extraordinarily successful pathogen. Multiple models are urgently needed to explore diverse facets of this human being scourge. Zebrafish-*M. marinum* model was increasingly recognized as an ideal system for preliminary studies. Some key findings emerging from this model were summarized in this paper, such as the interactions between host and *M. marinum* when the bacterium invades and the contribution of the virulence determinants of *M. marinum* such as Erp, Esx-1, pmiA, Mel and KasB. Discoveries from different models will be complementary and conducive to find clues to eradicate Mycobacterium tuberculosis.

Keywords: zebrafish; *mycobacterium marinum*; tuberculosis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Infectious Disease Project (2008ZX10003 – 006, 2008ZX10003 – 001), the National Natural Science Foundation of China (90813019) and the National S&T Platform Project (2005DKA2120610)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68367108; Fax: +86-23-68252365; E-mail: jianpingxie@yahoo.com

Received: 16 May 2009/ Revised: 17 July 2009

1953年创刊以来所有文章全文上网

2008年1月中旬,《微生物学报》自1953年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文!由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化,变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

2010年1月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 – 1956	半年刊	1 – 4	1 – 2
1957 – 1958	季刊	5 – 6	1 – 4
1959	季刊	7	1 – 2
1959 – 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 – 4
1963 – 1965	季刊	9 – 11	1 – 4
1966	季刊	12	1 – 2
1966 – 1972	停刊6年半		
1973 – 1988	季刊	13 – 28	1 – 4
1989 – 2007	双月刊	29 – 47	1 – 6
2008	月刊	48	1 – 12
2009	月刊	49	1 – 12
2010	月刊	50	1 – 12