

细胞微生物学

CELLULAR

郭晓奎 童善庆 主编

MICROBIOLOGY



第二军医大学出版社

细胞微生物学

主 编 郭晓奎 童善庆

第二军医大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞微生物学/郭晓奎编. —上海:第二军医大学出版社,2004.4

ISBN 7-81060-366-3

I.细... II.①郭...②童... III.微生物学:细胞学 IV.Q932

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 010940 号

责任编辑 邹 栩 李春德

细 胞 微 生 物 学

主 编 郭晓奎 童善庆

第二军医大学出版社出版发行

(上海翔殷路 818 号 邮政编码:200433)

全国各地新华书店经销

上海崇明裕安印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:12.25 字数:300 千字

2004 年 4 月第 1 版 2004 年 4 月第 1 次印刷

印数:1~3 500 册

ISBN 7-81060-366-3/Q·013

定价:20.00 元

序

细胞微生物学是近年兴起的一个微生物学分支,是研究病原体和宿主细胞相互作用的一门由微生物学和细胞微生物融合而成的交叉学科。1996年,美国《科学》(*Science*)杂志对这一新学科作了如下描述:“细胞微生物学是在细胞生物学和微生物学间的界面形成的。虽然传统的细胞生物学早已应用微生物感染宿主的策略来进行研究,但用病原体来研究细胞生物学问题,近来已获得很有价值的结果,并证明这是一条很有希望的途径。”细胞微生物学的主要内容包括微生物与宿主细胞表面、细胞骨架、细胞膜运行、胞内信号传递以及与宿主免疫系统等相互作用。

欲使人体发生微生物性感染或传染病,必须要有产毒和(或)侵袭力的微生物与易感宿主细胞两者的共同参与。关于此现象早就被专业人员发现和重视,并长期持续不断地从整体、组织、细胞、亚细胞等不同水平来探索其中微生物和宿主细胞间相互作用的本质。20世纪后期,由于分子生物学技术的介入,使这方面的研究深入到分子和基因水平。逐渐揭示了一批微生物基因的结构和功能、基因表达的调控、致病岛、分泌系统、微生物与宿主细胞相互作用的物质基础等等,从而使细胞微生物学应运而生。细胞微生物学的发展,大大有利于医学微生物学中病原体致病机制的阐明,将为研究新型疫苗、新型药物、预防和治疗感染性疾病带来新的突破。

在国际上,细胞微生物学的发展较快,1999年《细胞微生物学》(*Cellular Microbiology*)杂志创刊,之后陆续有专著问世。在国内,迄今尚未见有关这方面的专著出版。我校郭晓奎和童善庆两位教授有鉴于此,乃领衔、组织编写了这本《细胞微生物学》。该书系统地论述了细

胞微生物学的主要内容。全书共分 14 章,包括细胞生物学和微生物学的基本理论;微生物对宿主细胞的黏附、侵袭;微生物及其毒素、致病岛和分泌系统对细胞的影响;天然和获得性免疫以及细胞微生物学的技术方法。该书简明扼要,适合中级以上微生物学、病理学、药学、细胞生物学等和其他相关专业的教师、研究人员与学生阅读。

这本《细胞微生物学》专著的正式出版,深信定会推动和促进我国在该领域中的普及和发展。

陆德源

2004 年元旦
于上海第二医科大学

目 录

第一章 微生物学概论.....	程 芳 郭晓奎(1)
第一节 细菌.....	(1)
第二节 真菌	(14)
第三节 寄生虫	(16)
第二章 细胞生物学概论	何 平 郭晓奎(20)
第一节 细胞的结构	(20)
第二节 细胞信号转导和调节	(20)
第三节 膜转运	(24)
第四节 细胞骨架	(25)
第五节 细胞黏附与形态发生	(27)
第六节 细胞凋亡	(28)
第七节 细胞周期和细胞器遗传	(28)
第三章 细胞微生物学研究方法	袁建平 郭晓奎 童善庆(31)
第一节 突变分析	(32)
第二节 基因转移	(38)
第三节 蛋白表达方法	(38)
第四节 利用 cDNA 进行操作的分子生物学方法	(40)
第五节 体内表达技术	(43)
第六节 体内诱导的抗原技术	(44)
第七节 基因报告系统	(46)
第八节 基于基因组的方法	(48)
第九节 基因芯片在细菌基因组学和细胞微生物学研究中的应用	(53)
第十节 蛋白质组学研究	(57)
第十一节 噬菌体展示技术	(62)
第十二节 转基因动物研究	(65)
第十三节 显微技术	(65)
第四章 细菌致病岛	童善庆 袁建平(71)
第一节 致病岛的共同特征	(71)
第二节 由致病岛编码的主要毒力因子	(73)
第五章 细菌的分泌系统	吴琛耘 吴建和(80)
第一节 I 型分泌系统	(80)
第二节 II 型分泌系统和 V 型分泌系统	(80)
第三节 III 型分泌系统	(81)
第四节 IV 型分泌系统	(89)
第六章 细菌对宿主细胞的黏附	赵 蔚 郭晓奎(94)
第一节 与黏附有关的细菌结构和分子	(94)
第二节 与黏附有关的宿主细胞表面结构与分子	(96)

第三节	细菌的特异性黏附机制	(98)
第四节	黏附对细菌的影响	(99)
第五节	黏附对宿主细胞的影响	(101)
第七章	细菌与宿主细胞骨架的相互作用..... 张湘燕 郭晓奎	(107)
第一节	细菌侵袭的机制	(108)
第二节	细菌抗吞噬机制	(113)
第三节	细菌的非侵袭性黏附	(114)
第四节	细菌在细胞内的动力及播散	(115)
第八章	细菌蛋白毒素..... 王洪涛 童善庆 郭晓奎	(120)
第一节	概述	(120)
第二节	细菌毒素研究的历史	(120)
第三节	细菌毒素的分类及特点	(121)
第四节	细菌毒素的结构与功能	(130)
第五节	细菌毒素的生物学效应	(131)
第六节	细菌蛋白毒素与肿瘤	(133)
第七节	细菌毒素对细菌本身的意义	(133)
第八节	细菌毒素的治疗作用	(134)
第九章	细菌蛋白毒素在细胞生物学及药理学中的应用..... 王泽剑 陆 阳 陈红专	(137)
第一节	毒素与核苷酸结合蛋白	(138)
第二节	毒素与跨膜转运系统	(142)
第三节	梭菌神经毒素与胞吐	(143)
第十章	微生物与细胞凋亡	童善庆 李振红 (145)
第一节	细胞凋亡与细胞坏死的主要区别	(145)
第二节	细胞凋亡的信号转导途径	(146)
第三节	细菌与细胞凋亡	(149)
第四节	病毒与细胞凋亡	(153)
第十一章	天然免疫应答	童善庆 李振红 (158)
第一节	天然免疫识别的特征	(158)
第二节	天然免疫应答的组成和功能	(159)
第十二章	Toll 样受体与抗感染免疫	童善庆 袁建平 (164)
第一节	病原体相关分子模式结构与 Toll 样受体	(164)
第二节	TLRs 的信号转导途径	(165)
第三节	TLRs 在抗感染免疫中的作用	(166)
第十三章	获得性免疫应答	童善庆 李振红 (170)
第一节	细胞免疫	(170)
第二节	体液免疫	(172)
第十四章	细胞微生物学展望	李振红 郭晓奎 (176)
第一节	细菌生长中原核、真核细胞的相互作用	(176)
第二节	细菌对真核细胞生长和生存的影响	(179)
第三节	细胞微生物学应用和前景	(185)

第一章 微生物学概论

病原微生物引起临床疾病的细胞生物学机制是细胞微生物学的基础和重要组成部分。本章简要论述了主要的病原微生物及其与细胞成分间的相互作用。

第一节 细 菌

一、专性胞内菌

专性胞内菌不能在肉汤培养基中生长,只能在体内或者体外培养细胞中繁殖。

(一)衣原体

沙眼衣原体引起人类生殖道感染(沙眼亚种 B、Ba、D、Da、E、F、G、H、I、Ia、J 及 K)和眼部感染(沙眼亚种 A、B、Ba 及 C),也是性传播性疾病的主要病原体,可造成不孕、宫外孕、慢性输卵管炎和盆腔炎,还可导致流产、早产、宫颈炎,并可使 HIV 感染的危害性大大增加。衣原体具有双相的发育周期,可观察到两种不同的形态结构:一种称为原体,有感染性,无繁殖能力;另一种称为始体,也称网状体,代谢活泼,以二分裂方式繁殖,无感染性。

肺炎衣原体只有一个血清型,其代表株为 TWAR, 98 000 蛋白为其特异性抗原。肺炎衣原体引起一种获得性肺炎,主要通过呼吸道传播。人群中,50%以上在 50 岁以前肺炎衣原体抗体检测呈阳性,说明大多数人曾受到肺炎衣原体感染、重复感染或持续性感染。它还与呼吸系统以外的疾病如冠状动脉硬化和心脏病等有关。肺炎衣原体的致病物质是细胞壁成分——脂多糖(LPS),这种毒性作用可被特异性抗体中和。肺炎衣原体的 LPS 可促进脂质的沉积并激活凝血系统。研究发现,肺炎衣原体外膜蛋白中最重要的是热休克蛋白(HSP)。当环境改变时,HSP 起调节细胞代谢的作用。目前认为,肺炎衣原体至少存在两种 HSP,分子量分别为 57 000 和 70 000。初次感染可产生 HSP 抗体,再次感染可引起超敏反应,造成更严重的组织损伤如血管内膜损伤,促进动脉粥样硬化的形成。

鹦鹉热衣原体主要是一种动物病原体,极少数情况下引起人类呼吸道感染、口腔炎和非典型性肺炎。

沙眼衣原体基因组序列已被测定,找出了可能的致病基因,并鉴定出几种与真核生物染色质相关的蛋白结构域,发现衣原体核小体的浓缩与降解的机制可能类似真核生物。有些衣原体基因编码的蛋白在真核生物中同样存在,如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶或磷酸酶,看来这种严格胞内寄生物有一套复杂的进化机制。

(二)贝纳柯克斯体

贝纳柯克斯体又称 Q 热柯克斯体,引起人类 Q 热,可并发心内膜炎,感染性极强,是立克次体中惟一可不借助于媒介节肢动物而通过气溶胶使人及动物发生感染的病原体。农业牲畜是主要的储存宿主。和衣原体一样,贝纳柯克斯体的发育周期可观察到两种形态不同的结构。

该病原体感染真核宿主细胞后,进入成熟的吞噬体中,里面的低 pH 可刺激细菌的生长和繁殖。迄今为止已分离的贝纳柯克斯体基因达十多种:编码代谢及调节有关酶的基因、与毒力相关的基因、编码免疫保护性抗原的基因等。

(三)埃立克体

埃立克体是新发现的人类病原体之一,可导致人体急性发热、疲乏、肌痛、头痛、血象异常(白细胞减少,相对淋巴细胞增高),并伴有肝、脾、淋巴结肿大等。菌体一般呈圆形,但有时为多形性,平均长度为 $0.5\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 。它严格寄生于单核巨噬细胞内,在电镜下观察,存在于与宿主细胞膜相连的称为桑椹胚的胞质空泡内,在空泡内生长繁殖,复制过程中不同形态的埃立克体共存,形成在光镜下可见的包涵体。埃立克体感染细胞中的桑椹胚可被转铁蛋白受体的抗体染色,但不能被溶酶体的标记物标记。埃立克体进入宿主细胞是通过它们表面配体与受体的特异性结合由宿主细胞通过内吞作用将埃立克体摄入胞内,这可能也是不同的埃立克体感染不同的宿主和宿主细胞的一种主要原因。

(四)立克次体

立克次体属有两种主要群:一种是斑疹伤寒群,其中最重要的是普氏立克次体,引起流行性斑疹伤寒;另一种是斑点热群,包括引起洛矶山斑点热的立氏立克次体和引起地中海斑点热的康氏立克次体。两群都由节肢动物传播给人,斑疹伤寒群靠虱传播,斑疹热群则靠蜱传播。

该菌包涵体呈球形或椭圆形,有强嗜碱性和嗜酸性两种,电镜下观察到上皮细胞内充满了大量的立克次体,其形态结构及大小表现了极大的多样性。受感染的细胞具有明显的病理学变化:内质网膨大为泡状;核糖体脱落;线粒体溶解或固缩;核膜肿胀,染色质固缩并出现液泡结构。高度感染时,细胞核与大部分的细胞器消失。在上皮细胞中,观察到立克次体以二分裂和出芽方式进行繁殖。这些细菌能溶解吞噬泡而在胞液中复制。有报道说在这些细菌离开吞噬泡时磷脂酶 A2 发生了作用,但仍不清楚该反应是立克次体引起还是感染后宿主的迟发性磷脂酶活化引起。康氏立克次体和立氏立克次体都能聚合肌动蛋白,在细胞内及细胞间移动,其过程类似志贺菌属和李斯特菌。由于缺少基因工具,对毒力因子研究较少,仅发现一分子量为 56 000 的外膜蛋白与吸附和侵入有关。

二、能在吞噬细胞中生长繁殖的兼性胞内菌

这类细菌既能在细胞外生长,也能进入吞噬细胞并在其中繁殖。

(一)嗜肺军团菌

嗜肺军团菌于 1976 年发现,是军团病(首次在美国退伍军人协会会员中发现的一种非典型性肺炎,好发于免疫缺陷病人)的病原体。这种革兰阴性细菌能在人体肺泡巨噬细胞中生长而破坏吞噬作用。感染细胞中与胞膜相连的吞噬体中有嗜肺军团菌,它能使该吞噬体的酸度下降而阻止其与溶酶体融合。嗜肺军团菌入侵 2 h 被吞噬体吞噬逐渐与平滑囊泡、线粒体、内质网融合,最后吞噬体分布于核周,在电镜照片中显示犹如镶嵌着核糖体的囊泡,这标志着细菌复制的开始,于是此吞噬体成为“复制吞噬体”。

嗜肺军团菌可产生各种毒力因子,包括外膜孔蛋白、巨噬细胞感染增强蛋白(又称为 P 蛋白),Ⅱ型、Ⅳ型分泌系统,Ⅳ型菌毛蛋白、鞭毛和过氧化氢酶—过氧化物酶。细菌被巨噬细胞摄取后,吸附在 C3bi 表面,然后与靶细胞 CR3 受体结合,启动细胞内吞作用,然后侵袭素与整合素分子结合诱发吞噬机制。被吞噬的细菌在宿主细胞溶酶体内生存和繁殖,经 6~8 h 的迟

缓期和 18 h 的对数生长期,滤泡中的溶酶体相关膜蛋白(MMP-1)和组织蛋白酶 D 抑制了吞噬体内滤泡的酸化作用和成熟。细菌在溶酶体内大量繁殖,直至巨噬细胞溶解,子代成批释放,再侵入新的巨噬细胞。

已发现了部分与吞噬体生存繁殖及发挥功能有关的基因,其中 *dot/icm* 基因在建立复制吞噬体和之后的胞内活动方面很重要。它们位于染色体两个长约 20 kb 的区域,有 9 个操纵子被转录。该基因的编码蛋白可以形成一套多蛋白分泌装置,近来被称之为 IV 型分泌系统。此系统能分泌质粒、线性 DNA、蛋白毒素等一系列成分,帮助细菌将蛋白质或其他成分转移到寄生泡中来。近年来的研究发现,嗜肺军团菌的致病性与其毒力因子和铁代谢等密切相关。根据嗜肺军团菌 DNA 序列分析,嗜肺军团菌变种 NU216R 转座子插入位置有两个基因操纵子 *iraAB*:第一个开放阅读框架(ORF) *iraA* 编码 272 个氨基酸,类似转甲基酶序列;第二个 ORF *iraB* 编码 501 个氨基酸,类似原核生物和真核生物的 2-,3-肽运载蛋白。*iraA* 与嗜肺军团菌的毒力有关,是细胞内感染所必需;而 *iraB* 基因可能编码肽运载蛋白,可以促进铁的摄取,而铁则是嗜肺军团菌毒力和细胞内生长所必需的微量营养素。

(二)分支杆菌

结核分支杆菌(简称结核杆菌)和麻风分支杆菌分别是人结核病和麻风病的病原体。结核杆菌既可以引起慢性肺部感染,也能造成局部病变(结核瘤)或是中枢神经系统感染(脑膜炎和脑结核瘤)。治疗不当或免疫缺陷(AIDS 病人)会导致菌株对多种抗生素耐药,出现结核的反复发作。

结核杆菌可在体外生长。结核杆菌黏附于巨噬细胞并被巨噬细胞吞噬以后,在细胞内的持续生长取决于细菌是否能够逃脱被溶酶体酶类 RO1 和 RNI 的破坏作用。其阻止吞噬体与溶酶体融合的能力,无疑对其在细胞内的生长至关重要。近年,用电镜观察吞噬体-溶酶体融合的动力学和对人类感染巨噬细胞内细菌生长的影响,发现含有活的结核杆菌的囊泡有由吞噬体出芽的现象,而且以后未与溶酶体融合。结核杆菌能抑制空泡膜上 ATP 酶质子泵,防止空泡酸化。将等位基因交换和转座子突变等方法用于结核杆菌和很多非致病性分支杆菌的研究,鉴别出了第一个毒力因子 *Erp*,它是一个富含脯氨酸重复序列的表面蛋白,在一个鼠模型中 *erp* 基因的失活抑制了细菌在巨噬细胞中的繁殖和持续存在。

近年来,人们将分子生物学技术引入结核病的分子流行病学研究中,建立了多种结核杆菌基因分型方法,主要包括:探针分型、DRE-PCR 分型、脉冲场凝胶电泳分型、随机引物 PCR 分型、PCR 酶切分型、ML-PCR 分型、PCR 单链构象多态性分析和基因序列分析等。随着上述方法的应用,在结核杆菌菌种的分型和群体遗传结构分析,传染源和传播途径,以及耐药机制和检测方法等方面的研究均取得了较大的进展。最近,结核杆菌的全基因组序列已被测定,基因组揭示了 PE 和 PPE 这两个富甘氨酸的新家族的存在,它们的 N 端有重复的 Pro-Gln 或是 Pro-Pro-Gln 序列,可能代表了一种抗原性变异形式。

麻风分支杆菌是麻风病的病原体。这是一种慢性传染病,目前仍在一些发展中国家流行,引起皮肤和神经系统病变,终末靶器官是周围神经系统。此病可分为两型:结核样型和瘤型,前者患者细胞免疫正常,后者患者细胞免疫功能低下。麻风分支杆菌不能在体外生长,但可在小鼠足垫和狨猴类体内存活。麻风分支杆菌有特异性区域识别层黏连蛋白 α_2 的 G 结构域,后者随后又结合 α -肌营养不良蛋白聚糖(它又与 β -肌营养不良蛋白聚糖相互作用)和抗肌萎缩蛋白及肌动蛋白,从而导致此菌具有神经趋向性。麻风分支杆菌的基因序列正在测定中。

(三)诺卡菌属

诺卡菌属属于放线菌目。引起两种人体机会性感染:一是诺卡放线菌病,主要由星形诺卡菌,少数由巴西诺卡菌和豚鼠诺卡菌引起;二是足菌肿,由马杜拉诺卡菌引起。据报道星形诺卡菌常定植于非酸性的巨噬细胞囊泡中。诺卡放线菌病可导致一种慢性肺部感染,并由肺和血液播散到其他组织,好发于脑部。足菌肿是很严重的皮下组织慢性肉芽肿性肿瘤,病变可侵入到骨骼和皮下组织。病菌侵入最初病人并无疼痛,只是在创伤处形成结节,其后化脓坏死形成脓肿,并有血清渗出。

诺卡菌是条件致病菌,宿主免疫力低下时或有害气体刺激呼吸道时才能发病。器官移植病人及艾滋病患者等易发病。诺卡菌对抗生素敏感,足菌肿常需外科手术治疗。

三、能在非吞噬细胞内繁殖的兼性胞内菌

(一)巴通体

巴通体属有两种人类病原体:汉赛巴通体和五日热巴通体。汉赛巴通体引起的猫抓病可导致慢性肺淋巴结肿大。免疫亢进个体会出现心内膜炎;免疫功能不全病人临床症状严重,如产生杆菌性血管瘤可导致长期皮肤损伤,杆菌性紫癜可导致长期肝脏损伤等。五日热巴通体则是战壕热和部分杆菌性血管瘤病的病原体。

人们对汉赛巴通体入侵脐静脉内皮细胞机制进行了分析。大量以侵袭体结构存在的细菌内吞入内皮细胞,内吞过程是肌动蛋白依赖性的。与侵袭有关的基因尚未查明。近来产生的用质粒和转位子(Tn5)处理汉赛巴通体的技术,将有利于基因的检测。

(二)布鲁菌

布鲁菌属有6种细菌,其中羊布鲁菌、牛布鲁菌、猪布鲁菌和犬布鲁菌对人有致病性,且菌种多样,可引起全身感染和局部感染(败血症、骨髓炎和神经病变)。在感染一级宿主过程中(羊布鲁菌的宿主是山羊,牛布鲁菌的宿主是牛),它首先攻击吞噬细胞,随后在泌尿生殖道的上皮细胞中大量复制。在体外,牛布鲁菌在许多上皮细胞和纤维原细胞(HeLa、NIH 3T3、Vero、BHK、Hep-2等)中都可复制。细菌入侵可被松胞菌素D和诺考达唑抑制,说明肌动蛋白和微管参与了该过程。牛布鲁菌通过内体后,分布于多膜囊泡中,此时溶酶体相关膜蛋白LMP1和LMP2呈阳性。感染晚期,牛布鲁菌在宿主内质网中复制。

(三)土拉弗菌

土拉弗菌是兔热病的病原体,这种病原体主要感染野生动物,通过蜱咬或食入污染物传播给人,引起慢性腺溃疡并可播散入血产生内毒素血症。

在进行动物实验时,土拉弗菌可以侵入非吞噬细胞,特别是肝细胞并在其中生长。在体外,人们对此菌对巨噬细胞的感染机制分析得最为深入。在这些细胞中,土拉弗菌定居于一个酸性环境中,那里的低pH有利于获得对其生长很关键的铁。当存在于巨噬细胞中时,土拉弗菌能改变其LPS。正常的LPS不能刺激高浓度的NO产生,因此不影响巨噬细胞的胞内复制过程。该菌能自发地改变它的LPS,使巨噬细胞产生高浓度的NO,抑制巨噬细胞的生长。这是有关相变异现象调节胞内生长和先天免疫反应的首次报道。

(四)产单核细胞李斯特菌

革兰阳性的产单核细胞李斯特菌可导致人与动物严重的食源性感染。李斯特菌病是一种中枢神经系统感染和胎儿感染性疾病。易感者主要是免疫缺陷个体、老人、新生儿和孕妇。李

斯特菌作为研究鼠 T 细胞介导的免疫反应的模型,是目前了解最清楚的侵袭型细菌之一。李斯特菌属还有其他 5 个种类:斯氏李斯特菌(*L. seeligeri*)、无害李斯特菌(*L. innocua*)、威氏李斯特菌(*L. welshimeri*)、墨氏李斯特菌(*L. murrayi*)和伊氏李斯特菌(*L. ivanovii*),其中伊氏李斯特菌可引起动物疾病。

在体外,产单核细胞李斯特菌可以感染各种吞噬细胞或非吞噬细胞。细菌侵入由一种拉链型机制介导,需要一种有活性的肌动蛋白和至少一种酪氨酸激酶。最少有两种表面蛋白 InLA 和 InLB 介导细菌进入哺乳动物细胞。InLA 的受体是细胞黏附分子钙黏蛋白,InLB 的受体还不清楚,它可以活化磷酸肌醇 3-激酶(PI3-K),是侵入所必需的。细菌侵入时,PI3-K 至少与 3 种磷酸酰蛋白(Gab1、Shc、Cbl)相互作用而补充到质膜中。至于有关 3'-磷酸肽是如何引起细胞骨架重排的机制,目前尚不清楚。

细菌孔道毒素——李斯特溶素(LLO)(部分细胞是磷酸肌醇-磷脂酶 C 或磷脂酰胆碱-磷脂酶 C)使吞入的囊泡溶解,然后在细菌表面蛋白 ActA 的介导下,通过一种肌动蛋白的能动性,细菌在细胞内和细胞间运动。ActA 是使肌动蛋白聚合和发生运动的必需物质,其 N 末端作用与 Arp2-Arp3 复合物一致,可在体外刺激肌动蛋白聚合。其中央部位富含脯氨酸区域和 C 末端部分与肌动蛋白结合蛋白斑联蛋白同源,ActA 可类似斑联蛋白与 VASP(血管扩张磷酸蛋白)结合,募集 G 肌动蛋白结合蛋白和肌动蛋白来刺激蛋白质 N 末端的肌动蛋白聚合。

和志贺菌属一样,胞内运动可引起细胞与细胞间的伸展。当细菌从巨噬细胞进入肝细胞时,肝细胞可能发生此过程,通过一种不明机制诱导凋亡。与此不同,在内皮细胞防线中,凋亡由 LLO 介导。HeLa 细胞感染时,LLO 刺激 ERK1 和 ERK2,通过 MEK1/ERK2 途径活化(丝裂原)活化蛋白激酶(MAPK)。培养的上皮细胞或巨噬细胞感染可以活化 NF- κ B。此过程涉及胞壁和毒力因子的作用。大多数毒力相关基因都聚集于 15 kb 的毒力岛中。

(五)沙门菌

沙门菌属有很多种类,其中肠道沙门菌受到最广泛的关注。它有两种研究广泛的血清型:人伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌。伤寒沙门菌播散到肝脾可引起败血症,还可引起包括伤寒在内的一系列间接全身症状。鼠伤寒沙门菌是一种肠道病原菌,可导致人类胃肠炎,在鼠身上则可引起与伤寒类似的全身感染,因此常被用作伤寒病理学研究的模型。

侵袭性沙门菌至少以两种方式跨过黏膜屏障进入机体:一种为毒素依赖型;另一种为非毒素依赖型。

1. 毒素依赖型 肠上皮细胞特化的 M 细胞具有特殊的结构:缺乏整齐的刷状缘,很少或几乎无多糖包被,细胞表面有独特的糖酰化模式。这使它易与肠腔中大分子(尤其是一些颗粒成分和微生物)接近,并且通过滤泡相关上皮(FAE)选择性摄取和转运它们,到达富含 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突细胞(DC)的圆顶区。沙门菌的致病岛 1(SP II)所编码的 III 型分泌系统,可分泌一种毒素蛋白,将 SopE 中的小 GTP 酶作为一个交换因子进行转位,这个酶与细菌蛋白质相互作用,使 M 细胞骨架和细胞膜变形。沙门菌经 M 细胞进入派伊尔结(Peyer's patches),在圆顶区遇到 DC。因为上皮下的 DC 高水平表达 MHC II 类分子,能有效地将抗原递呈给幼稚 T 细胞,DC 可能在诱导体液、黏膜免疫方面起重要作用。另外,因 DC 能从外周组织迁移,所以它们也是胞内病原体扩散的有力运输工具。由 M 细胞介导的病原体进入能导致胃肠炎和黏膜抗体生成。

2. 非毒素依赖型 非毒素依赖型是指不依赖于致病岛产生的毒素蛋白,这种沙门菌能被

胃肠黏膜中表达 CD18 的单核-巨噬细胞吞噬,经血流进入脾后向全身扩散,引起败血症并诱发全身免疫反应。流式细胞仪鉴定结果表明,口服侵袭缺陷型沙门菌几分钟后,表达 CD18 的外周血单核-巨噬细胞就携带上标记的绿色荧光蛋白(GFP)。这个结果显示,单核-巨噬细胞可介导细菌的扩散,也为沙门菌作为 DNA 疫苗载体提供了理论依据。目前表达 CD18 的巨噬细胞吞噬细菌是发生在顶端的上皮表面,还是在发生固有层内尚不清楚。另外也有人证明,肠内表达 CD18 的细胞除可诱导全身免疫外,也可与黏膜下 T 细胞发生作用。

感染过程中,沙门菌激活丝裂原活化的蛋白激酶(MAPKs)ERK、JNK 和 p38,使转录激活因子 NF- κ B 和 AP1 的活化,从而调节 IL-8 和其他细胞因子基因的启动子的表达。这些核反应也可被 Cdc42 和 Rac 调节。

(六)志贺菌

志贺菌属可分为痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋内志贺菌 4 群。它们可引起细菌性痢疾。其致病特点为细菌侵入回肠末端和结肠黏膜的上皮细胞,引起严重的炎症反应并导致黏膜破损。

志贺菌感染的全过程是细菌通过胞饮作用进入上皮细胞,然后溶解吞噬体膜并进入细胞质中进行繁殖,尔后细菌在胞内肌动蛋白的动力作用下运动并穿入邻近的细胞。

感染开始于派伊尔结下的 M 细胞层,然后到达下面的固有层,侵犯肠细胞或定植的巨噬细胞,同时伴随 IL-1 的释放。IL-1 是一种致炎症细胞因子,能吸引中性粒细胞在感染处聚集。细菌进入上皮细胞的过程与沙门菌类似(膜绒毛的变化及大量的细胞骨架重排)。细菌进入膜包裹的液泡后,溶解液泡,开始运动。当细菌到达质膜后形成突起,使其能在细胞间扩散。大多数志贺菌毒力基因由毒性质粒携带,此质粒上有 2 个不同的操纵子,编码 III 型分泌系统,可分泌 4 种侵袭蛋白:IpaA、IpaB、IpaC 和 IpaD。在细菌中,IpaB 和 IpaD 阻止分泌。当与细胞接触引发分泌时,IpaB 和 IpaC 可插入哺乳动物细胞膜上,在早期 IpaB、IpaC 和 IpaD 与细胞接触过程中 β_1 -整合素发挥了作用,IpaB 也与透明质酸受体 CD44 交互作用。此受体被 rho 活化后与埃兹蛋白相互作用,使 IpaA 转位到真核细胞中,与纽带蛋白发生作用,招募 c-辅肌动蛋白,在内吞后一定程度地下调肌动蛋白细胞骨架重排。进入细胞需要小 GTP 酶 Cdc42 和 Rac 及 Src 激酶,它们是磷酸化的皮质肌动蛋白(cortactin)。

四、无芽胞胞外菌

(一)不动杆菌

鲍氏不动杆菌可引起人类医源性感染,重症监护病房插导尿管的病人特别易感。它还可引起泌尿道感染和败血症。

(二)气单胞菌

人气单胞菌属感染是最典型的机会性感染。它们多经过污水传播,可分为 4 种:嗜水斑点气单胞菌、嗜水气单胞菌、气单胞菌温、生物型和豚鼠气单胞菌。通常它们局限于消化道中,但也可导致败血症、脑膜炎、心内膜炎和骨髓炎。气单胞菌属产生黏附素、溶血素、肠毒素和蛋白酶等多种毒力因子。气溶素是一种分泌型的分子量为 48 000 的管道形成蛋白,可与特殊受体聚合形成直径 1.5 nm 的管道,导致细胞通透性增强和死亡。

(三)百日咳鲍特菌

百日咳鲍特菌是百日咳的病原菌。在疫苗产生前,百日咳是一种传播很广泛的疾病,其临

床表现通常分为3期:卡他期,有高度传染性,类似感冒;痉挛期,阵发性剧咳,伴大量黏液、呕吐和惊厥(神经系统损伤和肺支气管并发症);恢复期,阵咳减轻。多年来应用的死疫苗副作用很多,最为严重的是不可逆的脑损伤。现在已经开发出了新型非细胞性疫苗。百日咳鲍特菌有多种毒力因子,由中枢催化剂 BvgA-BvgS 双因子调节系统来调控。毒力因子有黏附素,如丝状红细胞凝集毒素和百日咳毒素(Ptx),二者都介导结合纤毛细胞和巨噬细胞,并且对细菌通过空气传播定居非常重要。Ptx 是一种 AB 型毒素,对大 G 蛋白有作用。Ptx 催化 G 蛋白发生 ADP-核糖基化作用,防止 Gi 复合物与受体作用。此复合物仍与 GTP 结合,不能抑制腺嘌呤环化酶,从而产生环磷酸腺苷(cAMP)。鲍特菌属产生腺苷酸环化酶(ACase),能进入宿主细胞,提高其 cAMP 水平,但只有在钙调蛋白存在下才有活性。Ptx 和 ACase 可灭活纤毛细胞和抑制黏蛋白分泌,产生临床症状;还可减轻 PMNs 和巨噬细胞的氧化爆发,使细菌存活。有证据表明,ACase 能导致巨噬细胞凋亡。其他一些毒素如皮肤坏死毒素和气管细胞毒素可杀死纤毛细胞,气管细胞毒素和 LPS 可以引发炎症反应。

近来,发现了一类 Bvg 控制的Ⅲ型分泌系统。

(四)伯氏疏螺旋体和苍白密螺旋体

伯氏疏螺旋体是莱姆病的病原体,莱姆病是温带森林由蜱(硬蜱属)传播的地方病。若未经治疗本病可分为3个连续阶段:①皮肤损伤期,叮咬处出现移行性红斑;②急性期伴关节、心脏、神经、肌肉骨骼系统和皮肤损伤;③慢性期伴慢性关节炎、慢性劳损、瘫痪和痴呆。

伯氏疏螺旋体是革兰阴性螺旋体,直径 $0.2\sim0.25\ \mu\text{m}$,长 $10\sim30\ \mu\text{m}$ 。它与梅毒螺旋体不同,可用人工培养基(BSK 培养基)培养。在 $30\sim34\ ^\circ\text{C}$ 、微需氧的最适条件下,传代时间为 $7\sim20\ \text{h}$,生长周期长,尚无有效的遗传系统。

伯氏疏螺旋体的超微结构与其他疏螺旋体属的螺旋体相似,有细胞壁和细胞膜。细胞壁外尚有包膜,细胞膜内为含细胞质和核质的螺旋型原生质圆柱体。圆柱体上紧绕着数根内鞭毛。伯氏疏螺旋体与其他细菌不同的是它有一线状染色体和数个线状质粒。外膜蛋白(OspA、OspB 和 OspC)基因位于质粒上。伯氏疏螺旋体其他重要的抗原还有鞭毛抗原(分子量为 41 000)和分子量为 60 000 的抗原,而分子量为 60 000 的抗原称为“共同抗原”,它与多种细菌的相应抗原(分子量为 58 000~65 000)有交叉反应,属于热休克蛋白家族。这两种抗原都是非种属特异的。

大量整合蛋白介导伯氏疏螺旋体黏附不同的哺乳动物宿主细胞及血小板。各种蛋白多糖均有助于伯氏疏螺旋体黏附于培养的内皮细胞和脑细胞。伯氏疏螺旋体还可以侵犯内皮细胞。此过程中,OspA 和 OspB 两种主要外膜脂蛋白可能发挥了作用。

苍白密螺旋体是梅毒的病原体。梅毒是一种性传播疾病,临床分为3期:以硬下疳为特征的Ⅰ期;Ⅱ期,细菌穿过黏膜入血,引起发热、皮疹及皮肤黏膜损害;Ⅲ期,细菌入侵心脏、肌肉骨骼系统和中枢神经系统。

苍白密螺旋体属于密螺旋体属,呈细长螺旋状,长 $6\sim20\ \mu\text{m}$,宽 $0.09\sim0.18\ \mu\text{m}$ 。苍白密螺旋体细胞末端尖,有外膜(含丰富脂类和少量蛋白质)、胞质膜(肽聚糖层)和内鞭毛。苍白密螺旋体基因是由 1 138 006 bp 组成的环状 DNA。

与伯氏疏螺旋体一样,苍白密螺旋体也可以黏附内皮细胞,刺激胞内的细胞黏附分子(ICAM-1)表达,从而吸引中性粒细胞破坏内皮屏障,这些细胞可引发剧烈的炎症反应。苍白密螺旋体不能在无活细胞的人工培养基上生长。它的基因组已被测序。潜在的毒力因子包括

22 种膜蛋白、内鞭毛蛋白和几种假定的溶血素。

(五)弯曲杆菌属

空肠弯曲菌是细菌性肠炎的主要病原体,轻者引起轻微的腹部症状,重者可导致侵袭性肠炎,还可发生关节炎和心内膜炎等消化道外症状。空肠弯曲菌能黏附和侵袭培养细胞。与其他几种肠道病原体(各种大肠杆菌菌株和一些志贺菌属)相似,空肠弯曲菌产生的细胞毒素可使中国仓鼠的卵巢细胞的肌动蛋白聚集,细胞分裂停滞在 G_2 期。空肠弯曲菌通过分子量为 37 000 的外膜蛋白与纤维结合素结合。有几种蛋白如 CBF1,鞭毛的结构性亚单位 FlaA 在黏附中起作用。空肠弯曲菌和费氏柠檬酸杆菌一样,通过微管而不是微丝侵袭上皮细胞,这一点从它对松胞菌素 D 的不敏感上可以表现出来。

(六)白喉棒状杆菌

白喉棒状杆菌是白喉的病原体,它是对上呼吸道的局部感染(膜的形成及炎症反应缘于细菌复制处中性粒细胞的聚集)和全身症状(心脏和神经系统)是因为可扩散的毒素——白喉毒素造成的。这种毒素表达由铁离子调节,属于 AB 毒素家族,可通过受体介导的胞饮作用进入敏感细胞。活化的 A 片段随后进入细胞液,使延伸因子 2 失活,从而抑制蛋白合成。白喉毒素受体是可结合肝素的表皮生长因子(EGF)。

(七)大肠杆菌

在人类,大肠杆菌是消化道正常菌群的主要组成部分。某些血清型可致轻重不等的消化道或泌尿道感染甚至败血症和脑膜炎,包括肠致病型大肠杆菌(EPEC)、肠出血型大肠杆菌(EHEC)、肠侵袭型大肠杆菌(EIEC)、肠产毒型大肠杆菌(ETEC)和肠集聚性大肠杆菌(EAggEC)。而大肠杆菌 K-12 也已作为研究细菌生理和遗传学一个通用模型。

最近备受关注的是 EPEC。EPEC 菌株是发展中国家引起腹泻的一个主要病因。EPEC 感染宿主后,与宿主上皮密切接触,产生以上皮刷状缘的变性和多肌动蛋白基座的形成为特征的附着抹平(attaching and effacing, A/E)损害。这些过程的第一步是通过束状菌毛形成黏着斑。然后导致经由Ⅲ型分泌系统的蛋白质包括 EspA 和 EspB 分泌,产生一系列信号,使紧密素(intimin)与它的受体 Tir 结合。紧密素与假结核耶氏菌的透明质酸酶类似。Tir 与紧密素的相互作用募集了 ct-辅肌动蛋白和埃兹蛋白,形成富肌动蛋白基座,细菌居留在此,可向细胞中传送更多的信号。基座的形成伴随着胞内 Ca^{2+} 水平的增高,激活蛋白激酶 C(PKC)和磷脂酶 C,并使肌球蛋白轻链磷酸化。这个过程在改变肠上皮细胞渗透性方面起关键作用。

第二个受到广泛关注的种类是 EHEC。它可导致血便和溶血性尿毒症。EHEC 最主要的血清型是 O157:H7。EHEC 与 EPEC 有很多致病因子相似,如强烈的细胞毒素志贺毒素或称为 Vero 的毒素,它由噬菌体编码,包括 1 个 A 亚单位和 5 个完全相同的 B 亚单位。B 亚单位与一个糖脂受体结合,A 亚单位发挥 N-糖苷酶活性,使一个腺嘌呤残基从 28SrRNA 上脱离下来,从而抑制宿主细胞蛋白质的合成。EHEC 除了产生志贺毒素外,还能产生 A/E 损害。它产生的紧密素除了 C 末端外,与 EPEC 很相似,有关它的受体还不清楚。EHEC 也有一个Ⅲ型分泌系统,分泌的蛋白与 Esp 蛋白相似。编码紧密素、Ⅲ型分泌系统、EspA、EspB 和 EspD 分泌蛋白的基因位于一个称为肠细胞抹平(effacement)的 35 kb 的致病岛上。可能还存在其他毒力因子,如一个分子量为 104 000 的蛋白质,与称为自身运输器的蛋白质家族有同源性,这个家族包括淋病奈瑟球菌的 IgA1 蛋白酶、幽门螺杆菌的细胞空泡毒素(VacA)以及百日咳鲍特菌黏附素。

(八) 流感嗜血杆菌和杜氏嗜血杆菌

流感嗜血杆菌是在 1892 年发现的一种重要病原体,人类是惟一自然宿主。它通常感染呼吸道黏膜,有时也感染女性生殖道。儿童比成人更易被感染,其原因至今不明。根据其有无荚膜可分为无荚膜、不能定型的流感嗜血杆菌和有荚膜、可定型的流感嗜血杆菌。不能定型的流感嗜血杆菌因为没有荚膜多糖,故不能与标准定型血清反应。可定型的流感嗜血杆菌有荚膜多糖,可分成 a、b、c、d、e、f 6 型。绝大多数个体被无荚膜的流感嗜血杆菌感染,不到 5% 的个体由有荚膜的流感嗜血杆菌感染。具有荚膜的 b 型流感嗜血杆菌除了产生无症状的黏膜感染外,还可能产生菌血症和侵袭性感染,如脑膜炎、咽喉炎、肺炎、关节炎和心包炎等。

虽然大多数流感嗜血杆菌感染不引起临床症状,但流感嗜血杆菌定植呼吸道黏膜是导致感染的第一步。黏膜、上皮破损和无纤毛的细胞等与流感嗜血杆菌定植能力密切相关,而且流感嗜血杆菌还可侵犯腺样组织的上皮细胞和单核-巨噬细胞,并在其中生存下来,这对流感嗜血杆菌长期定植呼吸道黏膜起着重要作用。已确定一种菌毛的红细胞的受体,是一种血型抗原(Anton 受体);也已制备一种高效的荚膜多糖疫苗。近来研究发现,流感嗜血杆菌的侵袭能力与两类黏附素有关:一类是菌毛或纤毛相关黏附素,可分为粗、有血凝作用的菌毛和细、无血凝作用的菌毛或纤毛;第二类是非菌毛相关黏附素:HMw₁ 和 HMw₂ 以及流感嗜血杆菌表面外膜蛋白 P₂、P₃。

流感嗜血杆菌可以侵入体外培养的人细胞。此过程涉及的因子 Hap 是一种丝氨酸型 IgA1 蛋白酶。神经节苷脂 GMS、GM2、GM3 和 CD19 抑制菌毛介导的红细胞凝集作用及对颊上皮细胞的结合。

流感嗜血杆菌基因组是第一个被测序的细菌基因组。

杜氏嗜血杆菌与流感嗜血杆菌联系并不紧密,它是软下疳的病原体,这种性传播疾病表现为生殖器溃疡和腹股沟淋巴结病。

(九) 幽门螺杆菌

幽门螺杆菌感染是最常见的人类细菌感染,在发展中国家尤为流行(90%,发达国家为 30%)。一般在儿童期感染细菌,还没有确切证据证实有动物储存宿主的存在。大量研究证实,幽门螺杆菌感染是慢性活动性胃炎(CAG)和消化性溃疡(PU)发病的主要原因,并与胃腺癌、MALT 淋巴瘤的发病密切相关。此外,流行病学研究表明,幽门螺杆菌感染与循环系统、呼吸系统、胃十二指肠消化系统疾病以及自身免疫疾病的发生也有关。幽门螺杆菌致病多样性可能与幽门螺杆菌菌株毒力差异、宿主对幽门螺杆菌感染的反应性不同及环境因素的协调作用相关,很有可能宿主、细菌和环境因素共同决定了最后的临床表现。

幽门螺杆菌的致病机制包括诸多环节,但以其黏附机制最为关键。文献报道的幽门螺杆菌黏附素较多,包括一些外膜蛋白、热休克蛋白等。对于该菌如何能不被宿主免疫系统清除而在胃内长期存在,了解还不清楚。可能各种不同的黏附素有不同的结合特性,使细菌能在机体中长期存在。在各种黏附素中, Lewis^b 血型抗原结合黏附素(blood group antigen-binding adhesin, BabA)近来被确定为一个大家族的成员,这个家族有 32 种外膜蛋白,可进行显性相变异。其他一些诱导炎症反应和细胞毒性的细菌因子也已确定,这些因子如空泡毒素 A(VacA)既可通过直接作用,也可通过间接作用(通过自身免疫、炎症及改变酸分泌)而导致胃部损害。Cag PAI 含 40 个基因,编码多种蛋白质,其中一些可通过 NF- κ B 机制诱导上皮细胞的 IL-8 分泌。Cag PAI 并非存在于所有临床分离株中,这种变异可能引起不同人种对特定的幽门螺杆菌

菌菌株的不同反应。

(十)肺炎克雷伯菌

肺炎克雷伯菌是引起医院获得性肺炎的病原菌。肺炎克雷伯菌通常对各种抗生素都有耐药性。毒力来自荚膜,它对中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬作用有抗性。菌毛黏附素通过与胶原蛋白结合也可介导毒性作用。

(十一)问号状钩端螺旋体

问号状钩端螺旋体是钩体病这种重要的动物源性疾病的病原体,人类通过与动物接触(主要是牛、猪和鼠)而被感染,具有季节性发病的特点。问号状钩端螺旋体直接通过皮肤、结膜或呼吸道进入人体后,引起出血热,病人出现发热、寒战伴肌痛,严重者还会有严重的出血和肝肾并发症。问号状钩端螺旋体诱导巨噬细胞发生凋亡还可侵犯 Vero 细胞。实验研究发现,钩体有一种鞘磷脂酶,它与金黄色葡萄球菌 β 溶素和蜡样芽胞杆菌的神经鞘磷脂酶类似,与其致病性相关。

(十二)支原体

支原体是性传播疾病的主要病原。它们是柔膜体门的一类没有细胞壁的特殊小细菌(长 $0.3\ \mu\text{m}$),属于胞外菌,但常与宿主细胞共生和共处。支原体感染一般潜伏期较长,它们弱的抵抗力经常掩盖了毒力。感染后致病机制和免疫反应比较复杂,宿主的免疫应答比其毒力作用要强。支原体有毒株通过其特殊结构,紧密黏附于易感宿主细胞膜上,通过与宿主细胞膜间相互作用,释放有毒代谢产物,使宿主细胞受损。有的支原体可引起宿主细胞膜抗原结构改变而产生自身抗体,还可因宿主组织中存在与支原体膜相似的抗原成分发生交叉反应而招致免疫病理反应。支原体侵犯呼吸道、泌尿生殖道黏膜及关节,确切致病机制还不清楚,宿主的年龄、性别、营养、遗传因素及环境条件等均对其有影响。支原体的致病机制除病原直接侵入外,还存在复杂的免疫学致病机制。支原体感染宿主后与其免疫系统相互作用,能发生广泛的异常免疫反应。主要致病菌是肺炎支原体,可引起几种严重的肺部疾病。其他支原体多是共生菌,如溶脲脲原体和引起性传播疾病的生殖器支原体可致机会感染。

肺炎支原体是引起小儿下呼吸道感染的重要病原体之一。肺炎支原体肺炎占肺炎发病率的 22%,仅次于链球菌肺炎发病率,占非典型性肺炎首位。同时,小儿下呼吸道肺炎支原体感染还呈现出发病年龄提前、肺外并发症多样等特点,更成为研究者们关注的热点。

肺炎支原体可借助特有的黏附结构紧密牢固地黏附于宿主细胞表面而逃避黏膜纤毛的清除作用及吞噬细胞的吞噬。在无特异性抗体调理前,吞噬细胞作用很差。且因为肺炎支原体与宿主细胞膜具有相似的抗原成分而逃避宿主免疫监视,得以长期存在于宿主体内。

肺炎支原体和生殖器支原体的基因组已经完成测序。生殖器支原体的基因组(468 个基因)是已知的细胞生物中最小的。支原体可以进行遗传学操作,但较繁琐(通过质粒进行转座子诱变)。黏附素可能是生殖器支原体和肺炎支原体的重要毒力因子。其他支原体的黏附性可能与脂多糖有关。大多数支原体能刺激巨噬细胞产生细胞因子。信号转导途径包括 MAPK 途径、NF- κ B 和 AP-1 途径。

(十三)奈瑟菌

奈瑟菌属中只有淋病奈瑟菌和脑膜炎菌两种对人类有致病性。这两种细菌在遗传学上高度相关,基因组同源性高达 98%,却引起完全不同的临床疾病。前者是最常见的性传播疾病——性病的病原体。性病是男女性接触时的一种生殖道感染,偶尔也会通过血行传播引起一