

霍乱弧菌的致病性与流行性研究进展*

王洪敏¹⁾ 马文丽^{1)**} 郑文岭²⁾

(¹⁾第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515; ²⁾广州军区广州总医院, 广州军区肿瘤分子生物学研究所, 广州 510010)

摘要 综述了近年来霍乱弧菌的致病性和流行性的研究进展, 并讨论了流行性和致病性的关系. 编码霍乱毒素 CT 的基因 *ctxAB* 并不是霍乱弧菌基因组自身的成分, 而是 CTX Φ 噬菌体基因组的一部分. CTX Φ 能特异性地感染并整合至霍乱弧菌的基因组, 成为 CTX 原噬菌体; 携带有 CTX 原噬菌体的霍乱弧菌在环境因素的诱导下, 也能向外界分泌 CTX Φ 噬菌体. RS1 基因元件与 CTX 基因元件在染色体位置上紧邻, 它们在功能上也紧密相关, RS1 元件能利用 CTX Φ 的基因形成一个丝状噬菌体 RS1 Φ , 并能向细胞外分泌, 进行水平传播; VPI 来源于 VPI Φ , VPI Φ 能在霍乱弧菌的菌株之间传播; VPI 是霍乱弧菌获得 CTX 基因元件的桥梁. 最近, 又发现了两个与霍乱大流行相关的两个基因区域, VSP-I 和 VSP-II.

关键词 霍乱弧菌, 致病性, 流行性

学科分类号 R378.3, R516.5

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 是霍乱的病原菌. 霍乱在南亚地区流行了至少千年. 自 1817 年以来, 霍乱发生过七次世界大流行. 有人认为, 目前尚在第八次大流行的高危险期. 霍乱是世人瞩目的以腹泻为主要症状的烈性传染病, 其传播快, 发病急, 病死率高, 在我国被列为甲类传染病. 无论是自然流行的监测与预防, 还是生物战和恐怖活动的防范, 对霍乱弧菌的全面研究都有重大意义^[1].

1 霍乱弧菌的致病性

大量研究发现, 霍乱弧菌的主要致病因子有 3 个. a. CTX 基因元件, 其中的 *ctxAB* 基因编码霍乱毒素 (CT); b. TCP 致病性岛, 它编码 TCP 菌毛. 该菌毛是霍乱弧菌的一个肠道内定居因子, 也是 CTX Φ 的受体; c. *toxR*, 一个基本的毒力调节基因. 编码 CT 和 TCP 的基因都由基因 *toxR* 调控. 因此, 霍乱弧菌的致病性是由几个致病因子共同作用的结果^[1].

1.1 CTX 基因元件

在致病性霍乱弧菌中, CT 是由基因 *ctxAB* 编码的. 1996 年, Waldor 等^[2]发现, *ctxAB* 并不是霍乱弧菌基因组自身的成分, 而是 CTX Φ 噬菌体基因组的一部分. CTX Φ 是一个环状单链 DNA 型、温和的溶源性丝状噬菌体, 它的基因组可划分为核心区 and RS2 区两个区域^[3]. 核心区长 4.5 kb, 含

有 CT 基因和噬菌体形态相关的基因, 它直接与霍乱弧菌的致病性相关; RS2 区长 2.4 kb, 有 3 个基因 *RstA*、*RstB* 和 *RstR*, 主要功能是噬菌体的复制和位点特异性整合; RS2 区还包含两个基因间区域 (intergenic regions, *ig*) *ig-1* 和 *ig-2*, 功能待定. 对古典型和埃尔托型的 RS2 区域的比较发现, *RstA*、*RstB* 和 *ig-1* 高度保守, 而 *ig-2* 区域则变异非常大.

现在有人^[4]认为 CTX Φ 来源于 RS1. RS1 是霍乱弧菌基因组中存在于 CTX 原噬菌体之外, 但与其紧邻的区域, 长 2.7 kb. 与 RS2 类似, RS1 也有 *RstA*、*RstB*、*RstR*、*ig-1* 和 *ig-2*, 但多一个 *RstC*, 其确切功能待定^[3]. RS1 含有与 CTX Φ 复制和整合相关的基因, 但不含 CTX Φ 的 *ctxAB* 或其他核心区基因. 在致病性霍乱菌株中, 都存在两个或多个 CTX 原噬菌体的串联, 或 CTX 原噬菌体与 RS1 基因元件串联, 这种结构统称为 CTX 基因元件^[5]. 其中 CTX Φ /RS1 的组合排列形式, 因流行性致病株的不同而各异, 但两者总是相互紧邻, 尚未发现两者之间有染色体位点分隔的形式存在 (图 1).

* 国家自然科学基金资助项目 (39880032) 和广州市重点科技攻关项目 (990448022).

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.edu.cn

收稿日期: 2002-07-10, 接受日期: 2002-08-01

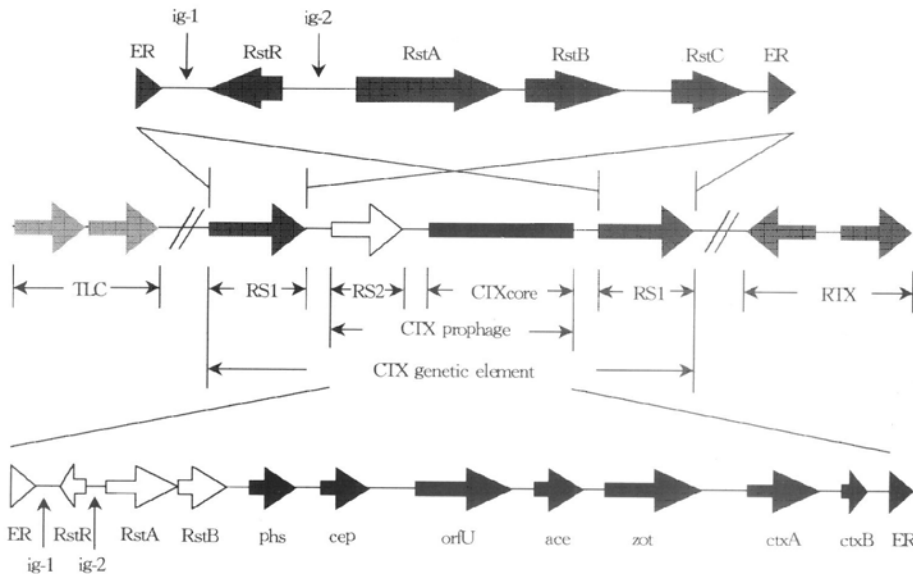


Fig. 1 Schematic representation of the genetic organization of CTX genetic element

图 1 CTX 基因元件模式图

CTX 基因元件由 RS1 和含有 RS2 与核心区的 CTX 原噬菌体组成, 其旁侧紧邻的是 TLC 和 RTX 基因簇. 实心箭头代表开放读码框. TLC: 毒性相关的隐形质粒; RTX: RTX 基因簇; ER: 末端重复序列.

CTX Φ 能特异性地感染并整合至霍乱弧菌的基因组, 成为 CTX 原噬菌体 (prophage), 形成一个稳定的溶源性细菌. 霍乱弧菌和 CTX Φ 上都有一个 18 bp 左右相同的末端重复序列 (end repeat, ER), CTX Φ 可以利用此序列通过重组的方式插入霍乱弧菌染色体上的位点 attRS. CTX Φ 在埃尔托型和 O139 型的染色体上仅一个整合位点; 而古典型有两个整合位点, 每个位点上仅有一个孤立的原噬菌体或两个残缺的原噬菌体融合联排, 其中一个位于大染色体上的 TLC 和 RTX 基因簇之间, 与埃尔托的 attRS 整合位点相同, 另一个位于小染色体上.

1.2 CTX Φ 病毒粒子的分泌

整合至霍乱弧菌染色体上的 CTX Φ 原噬菌体能产生有感染性的 CTX Φ 病毒粒子. 相邻的 CTX 原噬菌体与 CTX 原噬菌体串联, 或 CTX 原噬菌体与 RS1 基因元件的串联排列, 是分泌 CTX Φ 病毒粒子的必要条件. O1 群埃尔托型和 O139 型的 CTX 原噬菌体能产生 CTX Φ , 而 O1 群古典型却不能生成 CTX Φ , 因为后者的原噬菌体虽然能编码噬菌体 DNA 复制和病毒粒子包装的蛋白质, 但其翼侧无 RS1 基因元件, 这样的结构无法使原噬菌体产生染色体外的 CTX Φ ^[6]. 在环境和临床 CTX 阳

性的霍乱弧菌株中, 自然主动分泌 CTX Φ 的 CTX 阳性株较少, 多数要在环境因素的诱导下才大量分泌 CTX Φ ^[7]. CTX Φ 不是通过霍乱弧菌裂解死亡释放出来的, 而是活的霍乱弧菌分泌出体外的. 致病性霍乱弧菌所分泌的 CTX Φ 病毒粒子又可以感染环境中的非致病性霍乱菌株^[8], 使其获得致病性, 因此, 能分泌病毒粒子的溶源性霍乱弧菌比仅产生 CT 毒素的毒株的致病性更强, 在病人中更常见到, 而且能产生病毒粒子的致病株有更强的生存能力. 这可以解释不能分泌 CTX Φ 的古典型在后来被埃尔托型和 O139 型所取代的原因. 拟态弧菌与霍乱弧菌在基因型和表型方面都有许多差异, 但它们都属于弧菌属, 都可以引起腹泻性疾病. Boyd 等^[9]发现在拟态弧菌中也存在 CTX Φ 和 VPI Φ , 而且在其染色体上的整合位点也与霍乱弧菌的类似. 这说明 CTX Φ 和 VPI Φ 能在霍乱弧菌和拟态弧菌之间水平转移, 拟态弧菌也是霍乱致病因子的一个重要储库.

1.3 RS1 Φ

在致病性霍乱弧菌株中发现除了存在 CTX Φ 基因组之外, 还存在单链环状的 RS1 元件和相应的 RS1 元件的双链复制形式, 并能向细胞外分泌 RS1 Φ . 与 CTX Φ 一样, RS1 Φ 基因组也是通过

TCP受体进入宿主霍乱弧菌体内,而且也是通过宿主染色体的 attRS 序列整合至宿主染色体,但仅整合有 CTX ϕ 的霍乱弧菌才能向细胞外分泌 RS1 ϕ . 这提示 RS1 需要 CTX ϕ 的基因进行形态发生和包装. 总之,RS1 ϕ 能利用 CTX ϕ 的基因形成一个丝状噬菌体并进行水平传播^[4].

1.4 VPI 与 VPI ϕ

自然界许多天然致病菌如大肠杆菌、沙门氏菌、螺旋杆菌、志贺菌、耶尔森氏菌及霍乱弧菌等的基因组中都含有一个与其毒性相关的基因簇,现在被统称为致病性岛 (pathogenicity island, PAI). 霍乱弧菌的 PAI 称为 VPI (*V. cholerae* pathogenicity island, VPI), 仅在流行株或大流行株中存在,而在非致病株中不存在. VPI 长约 40 kb, 平均 GC 含量为 35%, 其中一个基因编码的 TCP, 具有双重作用, 它既是 CTX ϕ 进入霍乱弧菌的受体, 也是霍乱弧菌在人体肠壁粘膜定居的关键因子, 其中 TCP 的 TcpA 亚基还是 VPI ϕ 的衣壳蛋白.

研究发现, VPI 是一个丝状噬菌体 VPI ϕ 的基因组^[10]. VPI ϕ 的基因组为一个单股正链 DNA, 能在霍乱弧菌株之间转移. 现在一般认为无毒株要在获得 TCP 和 CTX ϕ 之后, 才能成为致病株. 而 TCP 是 CTX ϕ 进入霍乱弧菌的受体, 因此, 霍乱弧菌获得 TCP 应早于 CTX ϕ . 推测生存于外环境中的霍乱弧菌在获得了 VPI 之后, 便能在人体肠道壁定居生存, 而 VPI 能让霍乱弧菌进一步获得 CTX ϕ . 霍乱弧菌在获得这两种性状之后, 便能大量繁殖, 比一般的非致病株有更多的生存优势. 一种噬菌体为另一种噬菌体提供入侵宿主的受体, 这是细菌致病机理中病毒与病毒之间相互作用的一个新认识. 很有趣的是, 霍乱弧菌需要获得 CTX 元件和 VPI 元件后才有致病性, 而这两个元件在自然界都有相应的噬菌体存在. 但也有人认为, 通过分析霍乱弧菌基因组的测序结果, 在 VPI 岛上没有发现编码噬菌体结构蛋白和形态发生蛋白的基因, 因此, VPI 来源于 VPI ϕ 的结论尚需进一步的实验证实^[11].

1.5 pTLC

Rubin 等^[12]在 ctxAB 阳性霍乱弧菌株中发现了一个 4.7 kb 的隐形质粒, 毒性相关的隐形质粒 (toxin linked cryptic, pTLC). 杂交分析证实, 在所有的致病株中都存在这一序列或高度同源的序列, 而在环境中的非致病株中都不存在该序列. 值得注意的是, pTLC 在霍乱弧菌染色体上的整合位

点紧邻 CTX 原噬菌体 (图 1). pTLC 及其类似序列在霍乱弧菌株中以低拷贝数、共价闭合环状 DNA、串联双拷贝及染色体整合 DNA 等形式存在. pTLC 的 DNA 序列、在霍乱弧菌染色体上的整合位置及在霍乱弧菌株中的分布情况都提示它与 CTX 基因元件的功能密切相关.

1.6 RTX 基因簇

Lin 等^[13]在霍乱弧菌基因组的 CTX 原噬菌体的下游鉴定了一个 RTX 基因簇, 由 4 个基因 rtxA、rtxB、rtxC 和 rtxD 组成 (图 1). 埃尔托型和 O139 型的基因组在此区完整, 而古典型的基因组在此区有一个跨基因的片段缺失. 这个基因簇的表达产物可引起溶血性和白细胞毒性反应.

2 霍乱弧菌的流行性

2.1 整合子

在霍乱弧菌的基因组上发现了一类整合子, 它们都携带一个整合酶基因和一个特异性的附着位点, 能从其他微生物捕获外源性的开放读码框并把它们转化为有功能的基因^[14]. 外源性的开放读码框或基因盒以位点特异性重组的方式整合至受体整合子. 霍乱弧菌基因组上存在一类霍乱弧菌重复序列 VCRs (*V. cholerae* repeated sequences, VCRs), 它们是一类长 123 bp 至 126 bp 的 60~100 拷贝的重复序列, 约占霍乱弧菌全基因组的 10%, 能被整合酶 int14 识别, 它们构成另一类整合子. 到目前为止, 所发现的整合子多与抗生素抗性基因相关^[15], 因此与霍乱弧菌的流行性有一定关系.

2.2 VSP 岛

Dziejman 等^[16]用基因芯片的方法发现, 霍乱弧菌的基因组上从 VC0175 至 VC0185 的 16 kb 区域内的 11 个基因是大流行性埃尔托型所特有的. 这一区域的平均 GC 含量仅 40%, 显著低于全基因组的平均 GC 含量 47%. 认为它很可能是霍乱弧菌通过水平转移而获得的, 并将之命名为“弧菌第七次大流行岛 I (*Vibrio* seventh pandemic island I, VSP-I)”. 另一个第七次大流行株所特有的区域是 VC0490~VD0497. 其中含有 8 个基因. 该区域的 GC 含量仅为 41%, 与 VSP-I 类似, 所以被命名为 VSP-II.

Dziejman 等认为, 决定霍乱弧菌的流行性与大流行性的基因组分是 VSP-I 和 VSP-II. VSP 岛是导致埃尔托型第七次大流行的决定性因素. 因为 VSP 岛内的基因与霍乱弧菌的环境适应性相关,

这些适应性包括耐受环境营养缺乏、环境的物理及化学压力的能力,在非人的宿主如浮游生物、丝状海藻及甲壳类生物体内的定居、寄生的能力,从而能在水性环境中生存下来。另外,VSP 岛上的基因也可以增加对人体环境的适应性,例如,对人体胃酸的耐受性,在胃肠道壁的定居能力。霍乱弧菌的流行性是由对外环境的适应性和在人体内的定居能力二者共同决定的。对二者关系的进一步认识有助于对霍乱大流行的控制。

3 问题与展望

3.1 全基因组测序与功能区域分析

我们仍然不清楚霍乱弧菌的致病株与非致病株的确切演化关系。到目前为止,仅获得了 O1 群埃尔托型中的一株 N16961 的全基因组序列。对其他型如古典型和 O139 型及一些典型的非致病株的全基因组进行测序,可以帮助我们从 DNA 序列水平清楚地比较致病株与非致病株的差异来源。

3.2 流行性与致病性关系的研究

霍乱弧菌的致病性和流行性是两个对立的生物性状呢,还是相互之间有协同作用?从某种意义上讲,霍乱弧菌的流行性比致病性更重要。流行性反映了一个致病株的极强的环境适应能力,旺盛的生命力,生存范围广(或强流行性强)而非致病的细菌菌株也较多见。就致病性而言,如果一种细菌有非常强的致病性,但若它不能向外传染、扩散,就不会引起大社会危害性,而仅会出现孤立的病例,甚至会因为环境的复杂影响而变异或消亡。由此可见,就流行性和致病性本身而言,是两个相对独立的生物形状。但对霍乱弧菌来说,一方面,决定其定居和流行的一个重要因子 TCP,它还是霍乱弧菌首要的毒性因子 CT 的外源性来源 CTX Φ 的受体,因此其流行性因子对其毒性有促进作用,另一方面,霍乱弧菌利用其在宿主人体肠道内的毒性为其自身的生存和扩散起协助作用,因为霍乱毒素引起病人的腹泻有利于霍乱弧菌大面积的扩散。这从一个侧面说明,霍乱弧菌的致病性与其流行性是密切相关的。

3.3 环境因素的影响

就目前我们已掌握的霍乱弧菌知识来看,它与自然和人体环境的相互作用是一个动态的、可变的过程。环境因素包括体外的大自然环境和体内的肠道环境,它们对霍乱弧菌的致病性和大流行起决定性的作用。霍乱的发生有明显的季节性,暴发时常

出现几个不同的地方同时暴发^[17],提示环境中存在尚未被鉴定的诱发因子。霍乱弧菌通常生活在死水里,繁殖速度很慢,但到了人体肠道内,其数量就呈爆炸式增长,使病人产生严重腹泻,形成一个“超级传染状态”。Merrell 等^[18]发现,与体外环境相比,在人体肠道内定居的霍乱弧菌的基因转录谱明显不同。在人体内时,霍乱弧菌基因组中与获取营养和运动相关的基因表达水平很高,而与细菌趋化性相关的基因表达则很低。从七次世界大流行的变化和相应的致病株的演化过程可见,霍乱弧菌的基因型和表型都在发生着变化。因此我们可以推测,将来应该会有新的流行性致病株出现。我们在弄清楚霍乱弧菌的毒性与环境的变迁及自身进化的规律之后,我们就可以对霍乱进行有效的预防和控制。

参 考 文 献

- 1 Kaper J B, Morris J G Jr, Levine M M. Cholera. Clin Microbiol Rev, 1995, **8** (1): 48~ 86
- 2 Waldor M K, Mekalanos J J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science, 1996, **272** (5270): 1910~ 1914
- 3 Waldor M K, Rubin E J, Pearson G D, et al. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX Φ are encoded by region RS2. Mol Microbiol, 1997, **24** (5): 917~ 926
- 4 Faruque S M, Asadulghani, Kamruzzaman M, et al. RS1 element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXphi. Infect Immun, 2002, **70** (1): 163~ 170
- 5 Pearson G D, Woods A, Chiang S L, et al. CTX genetic element encodes a site specific recombination system and an intestinal colonization factor. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (8): 3750 ~ 3754
- 6 Davis B M, Moyer K E, Boyd E F, et al. CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. J Bacteriol, 2000, **182** (24): 6992 ~ 6998
- 7 Faruque S, Asadulghani M, Alim M A, et al. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of toxigenic *V. cholerae* O1 and O139. Infect Immun, 1998, **66** (8): 3752~ 3757
- 8 Faruque S M, Asadulghani, Saha M N, et al. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX Φ : molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. Infection and Immunity, 1998, **66** (12): 5819~ 5825
- 9 Boyd E F, Moyer K E, Shi L, et al. Infectious CTXPhi and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. Infect Immun, 2000, **68** (3): 1507~ 1513
- 10 Karaolis D K, Somara S, Maneval D R Jr, et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. Nature, 1999, **399** (6734): 375~ 379

- 11 DiRita V J. Genomics happens. *Science*, 2000, **289** (5484): 1488~ 1489
- 12 Rubin E J, Lin W, Mekalanos J J, *et al.* Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol*, 1998, **28** (6): 1247~ 1254
- 13 Lin W, Fullner K J, Clayton R, *et al.* Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (3): 1071~ 1076
- 14 Mazel D, Dychinco B, Webb V A, *et al.* A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*, 1998, **280** (5363): 605~ 608
- 15 Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, *et al.* Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **45** (11): 2991~ 3000
- 16 Dziejman M, Balon E, Boyd D, *et al.* Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (3): 1556~ 1561
- 17 Glass R I, Becker S, Huq M I, *et al.* Endemic cholera in rural Bangladesh, 1966~ 1980. *Am J Epidemiol*, 1982, **116** (6): 959 ~ 970
- 18 Merrell D S, Butler S M, Qadri F, *et al.* Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 2002; **417** (6889): 642 ~ 645

Advance of *Vibrio cholerae* Study on Pathogenicity and Pandemicity*

WANG Hong-Min¹⁾, MA Wen-Li^{1)**}, ZHENG Wen-Ling²⁾

⁽¹⁾ *Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;*

⁽²⁾ *Institute of Molecular Oncology, Liuhuaqiao Hospital, Guangzhou 510010, China)*

Abstract The advances of research on the pathogenicity and pandemicity of *Vibrio cholerae* in recent years are reviewed. The gene *ctxAB* encoding cholera toxin CT is not a native component of *Vibrio cholerae* genome, while it originally comes from a bacteriophage CTX Φ . CTX Φ can specifically infect *Vibrio cholerae* and integrate into its genome, forming a prophage; while it can also secrete CTX Φ under the induction of the environmental factors. RS1 and CTX gene elements not only closely located in chromosome position, but also closely related functionally. RS1 element can also transform into a filamentous phage RS1 Φ , secrete and transfer horizontally. VPI comes from VPI Φ , which can transmit between *Vibrio cholerae* strains, and it is the bridge for *Vibrio cholerae* to acquire CTX gene element. Two gene regions VSP- I and VSP- II closely related to pandemicity of the *Vibrio cholerae* were identified recently. The relationship between pathogenicity and pandemicity is discussed.

Key words *Vibrio cholerae*, pathogenicity, pandemicity

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39880032) and Guangzhou Key Science and Technology Program (990448022).

** Corresponding author. Tel: 86-20-61648210, E-mail: wenli@fimmu.edu.cn

Received: July 10, 2002 Accepted: August 1, 2002