

# 志贺菌与大肠杆菌进化关系的研究进展

王林 徐建国

【中图分类号】R378.2<sup>+</sup>1 【文献标识码】B 【文章编号】1003-9961(2005)05-0275-03

志贺菌属 (*Shigella*) 细菌(旧称痢疾杆菌), 是一类具有高度传染性、危害严重的革兰阴性肠道致病菌, 由其临床感染所导致的志贺菌性痢疾 (*shigellosis*) 是世界上, 尤其是发展中国家重要的传染病之一。全球每年的志贺菌性痢疾病例近 1.65 亿, 其中 1.63 亿发生在发展中国家, 并导致 110 万患者死亡, 60% 以上为 5 岁以下的儿童<sup>[1]</sup>。

志贺菌最早由 Kiyoshi Shiga 于 1898 年分离并命名<sup>[2]</sup>, 20 世纪 40 年代被确立为志贺菌属, 分为四个种/群; 痢疾志贺菌(A 群)、福氏志贺菌(B 群)、鲍氏志贺菌(C 群)和宋内志贺菌(D 群)<sup>[3]</sup>。鉴别志贺菌属与大肠埃希菌属 (*E. coli*) 的传统方法主要靠生化代谢表型, 如多数大肠杆菌有动力(鞭毛), 可发酵乳糖、赖氨酸, 吲哚试验阳性等, 以及大肠杆菌多为非致病菌, 而志贺菌在这些方面与其相反<sup>[4]</sup>。然而现代分子生物学的研究发现, 在表现型和致病性方面差异显著的志贺菌与 *E. coli* 在基因组水平上

却有着高度的同源性和相似性, 二者很有可能是由共同的原始祖先进化而来。

志贺菌与 *E. coli* 进化关系的证据, 首先来自于比较基因组学的研究。近几年来, 志贺菌与大肠杆菌多个菌株的基因组测序<sup>[5-8]</sup>, 为这一研究提供了基础。福氏志贺菌(Sf 301 菌株)与 *E. coli* K-12 (MG 1655 菌株)及 O157:H7 (EDL 933 菌株)的全基因组序列比较<sup>[7]</sup>显示: 三者具有约 3.9 Mb 的保守的共有“骨架”序列, 并基本上呈共线性关系, 提示三者之间存在密切的亲缘关系, 而单从全基因组序列的相似性来看, Sf 301 菌株甚至比大肠杆菌 O157:H7 EDL 933 菌株更接近大肠杆菌 K-12。不过, 由于各基因组中包含的大量基因组岛(分别称为 S 岛、K 岛和 O 岛)的存在, 这一“骨架”序列的共线性表现出多次中断。除此之外, 志贺菌基因组中还存在着大量 DNA 片段的移位或倒置, 以及其他来源与功能未知的插入序列(IS)。如图 1 所示。

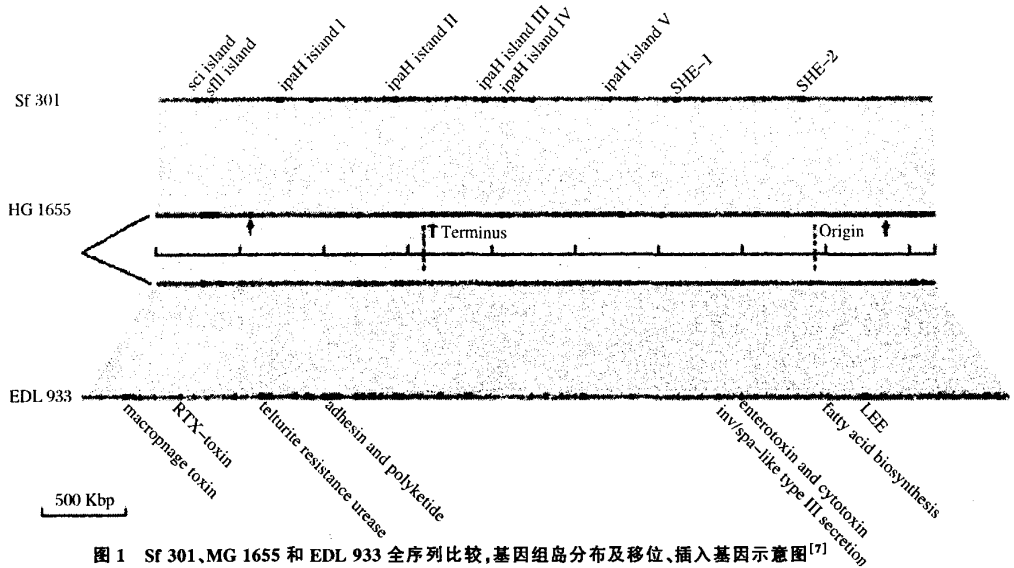


图 1 Sf 301、MG 1655 和 EDL 933 全序列比较, 基因组岛分布及移位、插入基因示意图<sup>[7]</sup>  
箭头分别代表 *cadA* (左) 和 *ompT* (右)——其缺失与志贺菌的毒力进化密切相关(见后述)

[作者单位] 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206

[通讯作者] 王林(1979-), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究。Email: violi0222@sina.com

近几年来, 其他多种分子生物学方法的研究也为志贺菌与大肠杆菌的亲缘关系提供了佐证, 包括多位点酶电泳 (Multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)<sup>[9]</sup>、rDNA 基因限制片段长度多态性

(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)<sup>[10]</sup>、MLEE 与 *mdh* 基因(编码苹果酸盐脱氢酶)联合分析<sup>[11]</sup>、16S rRNA 和 *gyrB* 基因(编码 DNA 促旋酶 B 亚单位)<sup>[12]</sup> 序列分析以及新兴的比较基因组杂交(Comparative genomic hybridization, CGH)微阵列分析<sup>[13]</sup> 等,这些不同方法的研究尽管其得到的结果并不完全相同,但是至少有一个结论是完全一致的;所有志贺菌均未被排除在 *E. coli* 的种系发生群之外,而是构成了整个埃希菌属种系进化树中不可或缺的一个分支。有学者认为,二者应属于同一菌属,志贺菌与致病性大肠杆菌一样,均是由原始的 *E. coli* 进化而来<sup>[9-12]</sup>。

在原始的非致病性 *E. coli* 向致病菌进化的漫长过程中,最为关键的一环是某一种特殊毒力因子的获得<sup>[14]</sup>,而对于志贺菌来说,其致病性依赖于一个 210~230 kb 大小的大质粒的存在,这一质粒决定了志贺菌的侵袭力及致病的能力,被称为 pINV 质粒<sup>[15]</sup>。侵袭性质粒的获得,被认为是志贺菌毒力进化的决定性因素和前提<sup>[16]</sup>。但是,已有研究证实,仅仅获得质粒,并不能使普通的大肠杆菌(K-12)产生与志贺菌同样的致病性<sup>[17]</sup>。志贺菌毒力的进化,除获得毒力因子之外,还要依赖于另一种重要的机制——即通过缺失原有的一些基因或进行功能的调整,适当改变细菌的表型,使突变株在新的环境中能够适应选择压力而生存,或使已获得的毒力因子能够得到充分的表达,我们称之为致病适应性突变(Pathoadaptive Mutation)<sup>[18,19]</sup>。以往的研究已经揭示,在 *E. coli* 向志贺菌进化的过程中,至少发生过三次这样的突变:

1 *ompT* 基因编码一种胰蛋白酶样的蛋白酶,这一基因在志贺菌中缺失,而在 *E. coli* K-12 中存在, Nakata 等人<sup>[20]</sup> 曾将 *E. coli* K-12 的 *ompT* 基因导入福氏志贺菌,通过空斑形成试验和豚鼠角膜试验发现 VirG 蛋白减少,细胞间或细胞内扩散能力减弱。同时,免疫印迹分析发现带有了 *ompT* 基因的志贺菌 VirG 蛋白表达受到阻断,而这一蛋白是细菌扩散所必需的,由此推测,可能是 *ompT* 基因编码的表面蛋白酶降解了 VirG 蛋白。因此, *ompT* 基因的缺失,对志贺菌的致病性来说似乎是必要的<sup>[20]</sup>。

2 志贺菌与普通 *E. coli* 的一个显著生化代谢差异是志贺菌不表达赖氨酸脱羧酶(LDC),不发酵赖氨酸,有研究<sup>[21]</sup> 显示:将 *cadA* 基因导入福氏 2a 野生株后,带有 *cadA* 基因的菌株能够表达赖氨酸

脱羧酶(LDC),与野生株相比,带有 *cadA* 基因的菌株对 HeLa 细胞无侵袭和空斑现象,兔肠段结扎试验不产生积液, Ussing chamber 试验中 ShET1 和 ShET2 的表达量均低于野生株,同时,该实验证实了赖氨酸脱羧酶(LDC)的发酵产物——尸胺是志贺菌肠毒素活性的抑制因子。张晶波等<sup>[22]</sup> 研究发现,在志贺菌的 4 个群 42 个血清型中, *cadA* 基因均发生了部分或全部缺失。因此, *cadA* 基因在志贺菌基因组中的缺失是普遍现象,这对于志贺菌的毒力表达是至关重要的。

3 除以上直接影响毒力表达的基因缺失以外, Sakellaris 等<sup>[23]</sup> 又发现了一个新的致病适应性突变现象,即 *curli*\* 位点的失活。Curli 是一种“淀粉样”纤维蛋白,其表达对于肠道细菌在肠道中的定居和粘附侵袭都有一定的作用,但是,对于营细胞内寄生的志贺菌来说, *curli* 蛋白的表达,却为机体免疫防御清除系统提供了标靶,因此,通过插入失活或缺失编码 *curli* 蛋白的 *csf* 基因,抑制其表达,可以使细菌逃脱机体免疫系统的攻击。

以上三个基因在普通的 *E. coli* 中广泛存在,而在志贺菌中均缺失或失活,这一现象显示:致病适应性突变机制是由非致病菌向致病菌进化的结果,并在这一进化中扮演着重要的角色。

综上所述,以上资料显示志贺菌是可能由原始的 *E. coli* 进化而来的。在进化过程中,毒性质粒的获得和原有基因功能的丢失均起着重要的作用;质粒的获得使细菌获得新的特征,并得以进入和适应新的环境;而基因(或功能)的缺失,则使细菌在新的环境中达到基因组的更优化,适应性或生命力更强。二者相辅相成,又互为补充,缺一不可。但是,在以往的进化研究中,细菌获得基因或功能通常容易被发现,而缺失基因对细菌适应力和致病性的作用却往往被忽略,比较基因组学已经揭示,志贺菌基因组相对于 *E. coli* K-12 存在 1 030 个基因的缺失,这些缺失基因包括:代谢酶类基因、外膜结构蛋白基因、调控基因、转运系统和噬菌体基因等<sup>[5-8,24]</sup>。然而在这 1 000 多个基因中,到目前为止被证实为致病适应性突变的却仅有 3 个。这可能是由于方法学的缘故。因此,对于研究者来说,这是一个值得探索和研究的领域。例如:推动志贺菌进化的压力或动力是什么;进化过程中,功能的获得和丢失在时间上的顺序;在已知的致病菌缺失的许多基因中是否还有其他致病适应性突变现象的存在;如何检测致病菌在长期进化期间出现的致病适应突变株;以及

现有的致病菌基因组是否已经达到了所谓的“最优化”,是否还有继续进化的可能等等,这一系列的问题,仍然有待于进一步的探索与求证。

#### 参考文献

- Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. W. H. O.* 1999, 77: 651 - 666.
- Trofa AF, Ueno - Olsen H, Oiwa R, et al. Dr . Kiyoshi Shiga: discovery of the dysentery bacillus [J]. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29 (5): 1303 - 1306.
- Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of Shigella clones of Escherichia coli and convergent evolution of many of their characteristics [J]. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 2000, 97 (19): 10567 - 10572.
- James R. Johnson. Shigella and Escherichia coli at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? [J]. *J. Med. Microbiol.* 2000, 49(7): 583 - 585.
- Plattner FR, Plunkett G III, Bloch, CA, et al. The complete genome Sequence of Escherichia coli K12 [J]. *Science.* 1997, 277 (5331): 1453 - 1474.
- Perna, NT, Plunkett G III, V. Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 [J]. *Nature.* 2001, 409(6825): 529 - 533.
- Jin, Q, Yuan Z, Xu J, et al. Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157 [J]. *Nucleic. Acids. Res.* 2002, 30(20): 4432 - 4441.
- Wei J, Goldberg MB, Burland V, et al. Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of Shigella flexneri Serotype 2a Strain 2457T [J]. *Infect. Immun.* 2003, 71(5): 2775 - 2786.
- Ochman H, Whittam TS, Caugant DA, et al. Enzyme polymorphism and genetic population structure in Escherichia coli and Shigella [J]. *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129(9): 2715 - 2726.
- Karine. R, Lambert - Zechovsky. N, Picard B, et al. Shigella and enteroinvasive Escherichia coli strains are derived from distinct ancestral strains of E. coli [J]. *Microbiology.* 1998, 144(9): 2667 - 2672.
- Pupo, GM, Karaolis DK, Lan R, et al. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies [J]. *Infect. Immun.* 1997, 65(7): 2685 - 2692.
- Masao F, Kenichi K, and Ryuji K. Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence [J]. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 (8): 2779 - 2785.
- Fukuya S, Mizoguchi H, Tobe T, et al. Extensive genomic diversity in pathogenic Escherichia coli and Shigella strains revealed by comparative genomic hybridization microarray [J]. *J. Bacteriol.* 2004, 186(12): 3911 - 3921.
- Reid SD, Herbeline CJ, Bumbaugh AC, et al. Parallel evolution of virulence in pathogenic Escherichia coli [J]. *Nature.* 2000, 406 (6791): 64 - 67.
- Hale TL. Genetic basis of virulence in Shigella species [J]. *Microbiol. Rev.* 1991, 55(2): 206 - 224.
- Sansonetti PJ, Hale TL, Dammin GJ, et al. Alternations in the pathogenicity of Escherichia coli K12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from Shigella flexneri [J]. *Infect. Immun.* 1983, 39(3): 1392 - 1402.
- Nakata N, Tobe T, Fukuda I, et al. The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of shigella: the relationship between the ompT and kcpA loci [J]. *Molecular Microbiology.* 1993, 9(3): 459 - 468.
- Ochman H, Moran NA. Genes Lost and Genes Found; Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis [J]. *Science.* 2001, 29 (5519): 1096 - 1098.
- Sokurenko EV, Hasty DL, Dykhuizen DE. Pathoadaptive Mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens [J]. *Trends. Microbiol.* 1999, 7(5): 191 - 195.
- Nakata N, Tobe T, Fukuda I, et al. The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of Shigella: the relationship between the ompT and kcpA loci [J]. *Mol. Microbiol.* 1993, 9(3): 459 - 468.
- Anthony TM, Reinaldo EF, Craig AB, et al. "Black holes" and bacterial pathogenicity: A large genomic deletion that enhances the virulence of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli [J]. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95(7): 3943 - 3948.
- 张晶波, 李新军, 王敏, 等. 志贺菌属编码赖氨酸的基因簇缺失情况分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 11(23): 837 - 839.
- Sakellaris H, Hannink NK, Rajakumar K, et al. Curli loci of Shigella spp [J]. *Infect. Immun.* 2000, 68(6): 3780 - 3783.
- 张笑兵, 刘红, 杨帆, 等. 福氏 2a 志贺菌 301 基因组水平的缺失基因分析 [J]. *科学通报*, 2003, 48(6): 587 - 592.

(收稿日期: 2005 - 01 - 27)

(修定日期: 2005 - 04 - 20)