

· 专论与综述 ·

HBHA 在结核病研究中的应用 *

江 鹰 赵善民 师长宏[△]

(第四军医大学实验动物中心 陕西 西安 710032)

摘要: 结核分枝杆菌 hbaA 编码基因是目前发现的与肺外结核转移相关的基因, 其表达产物结核分枝杆菌肝素结合血凝黏附素 (HBHA), 是结核分枝杆菌表面表达和分泌的一种糖蛋白。HBHA 具有介导肺结核和肺外结核的发生, 参与实现 MTB 逃逸吞噬体进入细胞质中生存和繁殖, 引起巨噬细胞凋亡等重要生物学功能, 同时 HBHA 作为特异性抗原, 用作免疫学检测具有较好的效果, 并且动物实验证实 HBHA 具有明确的免疫治疗作用。因此, HBHA 在结核病的免疫学诊断及免疫治疗方面, 具有广阔的应用前景。

关键词 结核分枝杆菌; HBHA 生物学功能 应用

中图分类号 R378.911 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 17-3347-03

Application of Mycobacterium Tuberculosis Adhesion HBHA in Tuberculosis Research*

JIANG Ying, ZHAO Shan-min, SHI Chang-hong[△]

(Laboratory Animal Center, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: The hbaA Gene of *M. tuberculosis* mediates extra-pulmonary dissemination and its expression product, the Heparin-Binding Haemagglutinin (HBHA), is a bacterial glycoprotein exposed on the surface of *M. tuberculosis*. HBHA can involve in the extra-pulmonary dissemination, participate in the escape of mycobacteria from the phagosome, cause apoptosis of macrophages and other important biological functions. Meanwhile, HBHA as the specific antigen used for the detection of antibodies had good results and positive therapeutic effect in laboratory animals. Therefore, HBHA has a broad application prospect in tuberculosis research, especially in the immunological detection and immunotherapy.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; HBHA; Biological functions; Application

Chinese Library Classification (CLC): R378.911 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 17-3347-03

结核分枝杆菌肝素结合血凝黏附素 (Heparin-binding haemagglutinin adhesion, HBHA) 是结核分枝杆菌表面表达和分泌的一种糖蛋白, 可在菌体和培养液中同时出现。结核分枝杆菌复合群所有成员均可分泌 HBHA, 如 BCG^[1]、致病性分枝杆菌属、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)^[2] 和鸟分枝杆菌 (*M. avium*)^[3]。而非致病的耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) 则不能分泌^[4]。对于致病性分枝杆菌属, HBHA 的主要作用是与非吞噬细胞的黏附, 并介导结核分枝杆菌的肺外传播。

1 HBHA 结构特点

结核分枝杆菌黏附素 HBHA 的编码基因是 Rv0475c, 全长约 600 bp, 由 199 个氨基酸组成, 相对分子质量约 28 kDa。HBHA 含有三个功能域: 由 18 个氨基酸残基构成的靠近 N 端的跨膜结构域; 由 81 个氨基酸构成的卷曲螺旋型 α -螺旋区; 在翻译后进行甲基化修饰的富含赖氨酸-脯氨酸-丙氨酸的 C-末端结构域^[5,6]。其中 N 端跨膜结构域可以插入表面膜内, 将

HBHA 蛋白固定于细菌外表面的脂膜上^[7], 并能够触发 HBHA 的折叠及二聚体形成^[8], α -螺旋区可能介导菌体间以及菌体与宿主组织的聚集, 从而增强毒力^[9], C 末端结构域中含有硫酸糖复合物相互作用的位点, 可介导与硫酸化多糖受体的结合, HBHA 蛋白质的纯化正是依靠其与肝素的结合力^[1]。此末端功能区与人体非吞噬细胞 (如上皮细胞等) 上含硫酸乙酰肝素的受体结合, 从而介导肺结核和肺外结核的发生^[9]。

MTB 和 BCG 等分泌的 HBHA 在 159-199 号氨基酸残基上具有 20-26 个甲基化。nHBHA 合成期间, 大部分重复区域的赖氨酸经过可能位于分枝杆菌细胞壁上的氨基转移酶的催化作用形成单甲基或二甲基^[10]。另一个参与细胞粘连的分枝杆菌黏附素, 即层粘连蛋白 (LBP) 有存在相似的甲基化修饰^[11]。而大肠杆菌表达的 HBHA 则没有甲基化结构。HBHA 翻译后的甲基化作用, 对诱导 T 细胞的反应及对结核分枝杆菌感染的保护性免疫反应是极其重要的。耻垢分枝杆菌只能产生层粘连蛋白 (LBP) 参与细胞粘连, 缺乏 HBHA 基因。但是结核分枝杆菌和

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (30972767)

作者简介 江鹰 (1967-), 男, 博士, 副教授, 研究方向 感染性疾病动物模型

[△] 通讯作者 师长宏 (1973-), 男, 副教授, E-mail: changhong@fimmu.edu.cn

(收稿日期 2012-02-02 接受日期 2012-02-28)

耻垢分枝杆菌的细胞裂解液均能使大肠杆菌表达的无甲基化的 HBHA 实现甲基化,由此可见耻垢分枝杆菌虽然缺乏 HBHA 基因,但是仍然含有能使 HBHA 甲基化的氨基转移酶。此外,重组耻垢分枝杆菌中表达的 HBHA 同样可以形成甲基化结构。Delogu 等人^[12]用 pMV206 载体构建了在耻垢分枝杆菌中表达的带有 HIS 标签的融合 HBHA 蛋白,并得到了大量的纯化蛋白,质谱分析结果显示耻垢分枝杆菌中表达的 HBHA 有 16 个甲基化结构,且甲基化结构与天然 HBHA 甲基化结构相似,并且证实了该 HBHA 可用于区分 RD1 区反应者中活跃性和非活跃性结核病人^[13]。

2 HBHA 主要生物学功能

2.1 介导肺结核和肺外结核的发生

编码 HBHA 蛋白的 *hbha* 基因是目前发现的惟一与肺外结核转移相关的基因。HBHA 是结核分枝杆菌分泌的一种黏附素,它是由结核分枝杆菌产生的一种糖蛋白,通过其赖氨酸丰富的碳末端功能区与非吞噬细胞(如上皮细胞等)上含硫酸乙酰肝素的受体结合,肺结核和肺外播散性结核的发生^[9,14]。通过基因敲除技术发现,HBHA 基因阻断的 MTB 菌株,显著影响 MTB 与上皮细胞之间的作用,但并不影响与巨噬细胞之间的相互作用,用 HBHA 基因阻断的 MTB 菌株经鼻感染小鼠,发现其在脾脏的增殖严重受影响,但不影响在肺部的增殖。用抗 HBHA 抗体包被的野生分枝杆菌经鼻感染后其播散也受损。这些证据提示,HBHA 与非吞噬细胞之间的相互作用,在肺外结核的发病机制上起重要作用,其对 MTB 的肺外播散是必要的。

2.2 参与实现 MTB 逃逸吞噬体进入细胞质

天然 HBHA 可以结合 G 肌动蛋白,有调节肌动蛋白的作用,但是除去甲基化结构的碳末端功能区后,则不能结合 G 肌动蛋白。HBHA 可能位于细菌表面,通过控制肌动蛋白的聚合和解聚来调节细胞骨架的动态过程,实现 MTB 逃逸吞噬体进入细胞质中生存和繁殖^[15]。

2.3 可以引起巨噬细胞凋亡

巨噬细胞内线粒体是 HBHA 的作用靶点,重组耻垢分枝杆菌表达的 HBHA 能够将 Bax (一种 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白) 迁移到线粒体,引起线粒体损伤产生氧化应激,导致巨噬细胞的凋亡^[16]。因此推测 HBHA 可能是新的结核病治疗的靶点。

2.4 免疫学检测和免疫保护作用

在结核分枝杆菌感染中,HBHA 可以通过激活 NF- κ B 及 PI3-K/Akt-p38-ERK1/2 MAPK 等信号通路诱发炎症反应,抵抗结核病的发展^[17]。Masungi 等^[18]的研究发现 82% 的活动性结核病患者可检测到抗 HBHA 抗体,而潜伏感染者的 HBHA 抗体阳性率为 36 % ($P < 0.01$),HBHA 产生的免疫保护作用可能是潜伏感染者未发病的原因。同时利用 HBHA 有较强烈的抗原性,通过细胞免疫结合体液免疫的检测方法,研究 HBHA 在诊断中的作用,可用于区分结核患者、潜伏感染、健康者及肺外结核患者,尤其是在 LTBI 的诊断中具有重要意义。Temmerman 等人^[19]的研究显示,外周血淋巴细胞在体外受到 nHBHA 刺激时,81.8% 的潜伏感染者外周血 T 细胞可以产生的 IFN- γ 高于 0.1 ng/ml,而只有 17.3% 的结核病人外周血 T 细胞可以产生的 IFN- γ 高于 0.1 ng/ml,无结核菌感染的健康者产生的 IFN- γ 不

会高于 0.1 ng/ml。Hougardy 等人^[19]用 HBHA 作为诊断抗原,同时比较了 HBHA、PPD、ESAT-6 对结核分枝杆菌潜伏感染者的区分效果。在诊断潜伏感染者上 HBHA、PPD、ESAT-6 的敏感性分别为 92.06%、90.00% 和 40.47%,特异性分别为 93.88%、70.00% 和 90.91%。由此可见 HBHA 在区分潜伏感染者中显示了较高的敏感性和特异性,并且检测结果不受接种 BCG 的影响。Delogu 等^[20]用耻垢分枝杆菌表达的 HBHA 蛋白作用抗原蛋白,可以导致结核病人的外周血中产生高 TNF- α 表达、低 IFN- γ 表达的特异性的 HBHA 外周血 T 细胞反应,而结核病潜伏感染者则产生低 TNF- α 表达、高 IFN- γ 表达的特异性的 HBHA 外周血 T 细胞反应。

2.5 抗结核疫苗的候选者

用天然 HBHA 免疫小鼠后,不但能诱导小鼠产生高水平 IFN- γ ,并且能够有效减轻感染小鼠的肺脏、脾脏的器官荷菌量及病理损伤,其产生的免疫效果甚至能够达到 BCG 的水平^[10,21]。然而使用大肠杆菌表达的 HBHA (rHBHA) 以及耻垢分枝杆菌表达的 HBHA 不能提高小鼠抵抗气溶胶形式的 MTB 感染的保护力^[10,21]。因此,天然 HBHA 是发展免疫保护作用疫苗的有前景的候选者。当采用 BCG 初次免疫,nHBHA 加强免疫的异源免疫策略,可以在小鼠体内产生强于单纯用 BCG 免疫产生的保护力,并且 Rahman 等^[21,22]已证实了大肠杆菌表达的没有甲基化的 rHBHA 加强免疫同样可以产生强于单纯用 BCG 免疫产生的保护效果,Guerrero 等^[23]用 BCG 初次免疫 BALB/c 小鼠 4 周后用 rHBHA 加强免疫一次,分别用鼻腔接种和气溶胶感染的方式感染结核分枝杆菌,结果显示鼻腔接种感染小鼠 rHBHA 加强免疫后,肺脏和脾脏的结核分枝杆菌荷菌量显著低于单纯 BCG 免疫组 ($P < 0.05$),而气溶胶感染小鼠 rHBHA 加强免疫后,脾脏细菌荷菌量显著低于单纯 BCG 免疫组,但肺脏细菌荷菌量并无变化。由此可见经通过鼻腔接种的感染,HBHA 的甲基化结构对于提高 BCG 的保护作用并非必需,但是对于气溶胶感染途径,HBHA 的甲基化结构则必不可少。由此可见 HBHA 同样是有前景的异源免疫策略的候选者。

3 展望

HBHA 是目前已报道的具有明确治疗效果的 MTB 靶抗原,其可诱导机体产生保护性的免疫应答,有效减少感染动物主要脏器荷菌数^[24,25]。HBHA 可诱导潜伏感染患者特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞反应,并产生穿孔素、TNF- α 及 IFN- α 等细胞因子。CD8⁺ T 细胞一方面可通过这些因子发挥细胞毒作用,另一方面这些细胞因子可诱导感染巨噬细胞合成 NO 以杀灭胞内细菌,因此 HBHA 在治疗结核分枝杆菌潜伏性感染 (LTBI) 方面具有其独特的优势。

参考文献(References)

- [1] Menozzi F D, Rouse J H, Alavi M, et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria[J]. J Exp Med, 1996, 184 (3): 993-1001
- [2] Cole S T, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus[J]. Nature, 2001, 409(6823): 1007-1011
- [3] Reddy V M, Kumar B. Interaction of Mycobacterium avium complex with human respiratory epithelial cells [J]. J Infect Dis, 2000, 181(3):

- 1189-1193
- [4] Pethe K, Puech V, Daffe M, et al. Mycobacterium smegmatis laminin-binding glycoprotein shares epitopes with Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin[J]. Mol Microbiol, 2001, 39(1): 89-99
- [5] Delogu G, Brennan M J. Functional domains present in the mycobacterial hemagglutinin, HBHA[J]. J Bacteriol, 1999, 181(24): 7464-7469
- [6] 聂理会, 李传友. 结核分枝杆菌肝素结合血凝黏附素与结核病[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(6):382-385
- Nie Li-hui, Li Chuan-you. Heparin-binding hemagglutinin adhesion of Mycobacterium tuberculosis and tuberculosis[J]. Int J Respir, 2008, 28(6):382-385
- [7] Brennan P J, Nikaido H. The envelope of mycobacteria [J]. Annu Rev Biochem, 1995, 64: 29-63
- [8] Lomino J V, Tripathy A, Redinbo M R. Triggered Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin adhesin folding and dimerization[J]. J Bacteriol, 2011, 193(9): 2089-2096
- [9] Menozzi F D, Bischoff R, Fort E, et al. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(21): 12625-12630
- [10] Temmerman S, Pethe K, Parra M, et al. Methylation-dependent T cell immunity to Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 935-941
- [11] Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, et al. A 21-kDa surface protein of Mycobacterium leprae binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(17): 9857-9862
- [12] Delogu G, Bua A, Pusceddu C, et al. Expression and purification of recombinant methylated HBHA in Mycobacterium smegmatis [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 239(1): 33-39
- [13] Delogu G, Chiacchio T, Vanini V, et al. Methylated HBHA produced in M. smegmatis discriminates between active and non-active tuberculosis disease among RD1-responders[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18315
- [14] Krishnan N, Robertson B D, Thwaites G. The mechanisms and consequences of the extra-pulmonary dissemination of Mycobacterium tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2010, 90(6): 361-366
- [15] Esposito C, Marasco D, Delogu G, et al. Heparin-binding hemagglutinin HBHA from Mycobacterium tuberculosis affects actin polymerization[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(2): 339-344
- [16] Sohn H, Kim J S, Shin S J, et al. Targeting of Mycobacterium tuberculosis Heparin-Binding Hemagglutinin to Mitochondria in Macrophages[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12): e1002435
- [17] Kim K H, Yang C S, Shin A R, et al. Mycobacterial Heparin-binding Hemagglutinin Antigen Activates Inflammatory Responses through PI3-K/Akt, NF-kappaB, and MAPK Pathways [J]. Immune Netw, 2011, 11(2): 123-133
- [18] Masungi C, Temmerman S, Van Vooren J P, et al. Differential T and B cell responses against Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin adhesin in infected healthy individuals and patients with tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2002, 185(4): 513-520
- [19] Hougardy J M, Schepers K, Place S, et al. Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic tool for latent tuberculosis[J]. PLoS One, 2007, 2(10): e926
- [20] Mollicotti P, Bua A, Cubeddu M, et al. Tuberculosis patients are characterized by a low-IFN-gamma/high-TNF-alpha response to methylated HBHA produced in M. smegmatis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71(4): 449-452
- [21] Parra M, Pickett T, Delogu G, et al. The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin is a protective antigen in the mouse aerosol challenge model of tuberculosis[J]. Infect Immun, 2004, 72(12): 6799-6805
- [22] Rahman M J, Fernandez C. Neonatal vaccination with Mycobacterium bovis BCG: potential effects as a priming agent shown in a heterologous prime-boost immunization protocol [J]. Vaccine, 2009, 27(30): 4038-4046
- [23] Guerrero G G, Loch C. Recombinant HBHA boosting effect on BCG-induced immunity against Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011: 730702
- [24] Temmerman S, Pethe K, Parra M, et al. Methylation-dependent T cell immunity to Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 935-941
- [25] Li Z, Howard A, Kelley C, et al. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4780-4786