

新生隐球菌多糖荚膜的动态学研究进展

赵 卓, 廖万清* (第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

[摘要] 新生隐球菌是一种重要的条件致病性真菌,其细胞壁外层包裹的多糖荚膜是第一个被明确的新生隐球菌重要的毒性因子。本文总结了新生隐球菌荚膜的特性和动态学方面的研究进展,包括新生隐球菌荚膜的形态结构变化、组织构成、生长发育和出芽繁殖等,旨在给新生隐球菌相关性疾病的研究提供一个新的思路和依据。

[关键词] 新生隐球菌;多糖荚膜;动态学

[中图分类号] R 379.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0726-03

Advancement in capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*

ZHAO Zhuo, LIAO Wan-qing* (Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] *Cryptococcus neoformans* is an important conditional pathogenic fungus; the capsular polysaccharide surrounding its outer wall is the first identified major toxic factor of *Cryptococcus neoformans*. This review summarizes the progress in the research of capsule characteristics and dynamics of *Cryptococcus neoformans*, including the structural changes, tissue constitution, development and growth, etc, hoping to provide a basis and new ideas for studying *Cryptococcus neoformans* related diseases.

[KEY WORDS] *Cryptococcus neoformans*; polysaccharide capsule; dynamics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7): 726-728]

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)是一种重要的条件致病性真菌,主要存在于养鸟场或被鸟类排泄物污染的土壤中,在 AIDS 和 HIV 相关隐球菌病患者房间的灰尘和空气中也能够找到新生隐球菌的病原体^[1]。它常感染免疫低下或免疫缺陷的患者,从而引起临床症状,甚至危及生命。最近廖万清等^[2-3]发现我国非爱滋病感染的隐球菌病以新生变种为主,在此基础上提出隐球菌性脑膜炎分期综合疗法和中枢神经系统外隐球菌诊断治疗原则,显著提高了治愈率。新生隐球菌不同于人类的其他致病性真菌,它被一种多糖荚膜的动态组织结构包裹着,具有能穿过和存活于哺乳动物免疫系统的特性,会在出芽繁殖时经历其基因数量、大小和序列重组的改变。目前关于新生隐球菌荚膜的合成、构造、组装等还不是很明确,所以关于荚膜的形态结构、生长发育、出芽以及基因重组等动态学研究和相关的概念性评论是非常重要的。

1 新生隐球菌多糖荚膜的独特性和重要性

多糖荚膜是新生隐球菌的最显著特点。目前已知的荚膜基因 CAP59、CAP64、CAP60 及 CAP10 等^[4],经研究表明均与新生隐球菌在小鼠体内的毒性有关,证实了荚膜是新生隐球菌重要的毒性因子。最近 McClelland 等^[5]鉴定了荚膜上多糖的脱落,并发现了许多作为致病因子的相关表型。新生隐球菌的多糖荚膜不同于那些经典的有荚膜的细菌(如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎双球菌等),它具有抑制吞噬和激活补体的作用,是仅有的一种有荚膜的人类真核生物病原菌,正是这种多糖荚膜结构的存在使新生隐球菌具有了致病性,成为新生隐球菌重要的毒性因子。新生隐球菌的多糖荚膜作为一个被真核酵母菌合成的巨大结构,无论是其大

小还是结构的复杂程度上都远高于其他细菌。

新生隐球菌多糖荚膜是重要的生物被膜结构。Martinez 和 Casadevall^[6]通过比较有荚膜和无荚膜菌株形成生物被膜结构的差异,来研究荚膜在其中的作用。所用菌株分别为 CAP59 基因的有荚膜菌株(C538)、新生隐球菌有荚膜的野生株 B3501 和 CAP59 基因缺失型的无荚膜突变体(C536)。通过二甲氧喹黄色法(XTT 法)测定新生隐球菌 CAP59 无荚膜突变体的生物被膜结构,发现未显色,该突变体在动物模型中也不具有致病性。相反,新生隐球菌野生株 B3501 和 CAP59 基因的有荚膜菌株(C538)的生物被膜结构都能显现,并且在动物模型中具有毒性作用。这一发现证实,多糖荚膜在新生隐球菌的致病性方面具有重要作用;同时,也为我们研究新生隐球菌抵抗外界吞噬作用、保护防御宿主免疫机制和抗真菌的药物治疗等提供了参考。

2 新生隐球菌多糖荚膜的结构变化

2.1 新生隐球菌荚膜结构中的主要多糖 新生隐球菌的荚膜主要是由两种多糖结构组成的,即葡萄糖醛酰木糖甘露聚糖(glucuronoxylomannan, GXM)和半乳糖木糖甘露聚糖(galactoxylomannan, GalXM)。GXM 是新生隐球菌的荚膜多糖中含量最多的, GXM 的每个侧链 $\alpha(1,3)$ -甘露聚糖上都有 $\beta(1,2)$ -葡萄糖醛酰残基和数量不定的 6-O-乙酰基来修

[基金项目] 国家自然科学基金(30370082)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30370082)。

[作者简介] 赵 卓, 硕士, 医师。E-mail: karen2005_ziqing@163.com

* Corresponding author. E-mail: liaowanqing@sohu.com

饰。主链上的每个三糖都被1~4个木糖取代,可以是 $\beta(1,2)$,也可以是 $\beta(1,4)$ 。木糖化的甘露糖容易发生乙酰化^[7]。GXM形成的复杂的高相对分子质量的结构,引起分子自联作用以及纤维的自我缠绕^[8]。在感染期间,GXM也从荚膜中释放,并在相应组织内聚集。机体有效的免疫反应被GXM破坏,无疑增加了新生隐球菌的致病性。组织内高浓度的GXM曾被认为能导致细胞代谢进程中黏滞度相关的功能紊乱。然而,近来McFadden等^[8]关于黏滞度的研究指出:体内阴离子多糖的浓度并不会引起阴离子溶液的粘滞度升高。而且,GXM对周围阴离子强度的敏感性造就了新生隐球菌固有的有延展性的荚膜结构特征^[9]。另一种荚膜多糖GalXM由半乳糖、甘露糖、半乳糖及少量的吡喃半乳糖组成的。新生隐球菌基因中已鉴定出具有编码功能性UDP半乳糖吡喃糖变位酶的基因,该酶能将吡喃半乳糖转化为吡喃半乳糖^[10]。GalXM的相对分子质量(1.01×10^5)比GXM的相对分子质量 $[(1.7 \sim 7.4) \times 10^6]$ 小得多,因此,在荚膜中出现的GalXM摩尔数比GXM要多^[8]。

2.2 新生隐球菌荚膜的结构变化 新生隐球菌菌株根据血清的抗原性可分为5个血清型:A、B、C、D和AD。血清型A和D是与人类疾病最密切的血清型,而血清型B和C菌株的GXM比其他血清型更具有高度特异性。Garcia-Hermoso等^[11]和Charlier等^[12]研究荚膜结构及其变化,荚膜结构的多样性可能会在同一菌株繁衍的子代中出现。同一群体中的荚膜抗原决定簇也存在着异质性,它们在感染和培养期间改变它们的表达^[11-12]。假设抗原变异必须反映出荚膜结构的异质性,那么这种现象或许是有益的,因为这将使得新生隐球菌能够在宿主的免疫系统作用下或者自然环境中微生物间的相互作用中存活,或者允许其在宿主体内播散和定居。

GXM免疫定位于贯穿细胞壁的小囊泡,这与以小囊泡为基础的输出机制是相符的^[12]。近来发现了一个重要的荚膜基因Cap59(荚膜构造中所必需的基因),是与分泌和运送作用有关的^[13]。通过mAb来标记荚膜并诱导其扩大,结果mAb被移至荚膜边缘。在此基础上,研究者正试图建立一个合适的模型,以研究新合成的多糖贴近细胞壁和陈旧的多糖向荚膜边缘移位导致荚膜扩大的机制。但是,多糖荚膜结构的合成途径还未被描绘出来,在这个领域的大部分知识必须通过多方面的深入研究和推断才能得到。

3 新生隐球菌多糖荚膜的生长发育和形态变化

3.1 新生隐球菌多糖荚膜的生长发育 近年来对新生隐球菌荚膜生长机制的研究显示,荚膜增大时需要大量的原料物质运至荚膜表面,以保证能包绕迅速增长的体积和表面积^[13]。多糖分子的回旋半径实际上比荚膜厚度小得多,这提示荚膜的装配与生长并不是单个分子生长的结果。而且,这提示荚膜多糖有自我聚集的特性,暗示GXM分子可能包含了许多荚膜装配所必需的信息。荚膜装配过程中更复杂的是对GXM可能在细胞内合成并通过小囊泡运送至细胞外围这一过程的观测^[13]。因而,可以推测有一套小泡运输机制来将荚膜多糖成分运至荚膜,或者可能是荚膜外围区域。为此,Garcia-Rivera等^[13]做了荚膜生长的体外实验研

究,免疫组织学研究支持GXM作为若干个单元合成,因为识别不同表位的单克隆抗体沉积于细胞质和细胞壁的不同部位。如果成熟的GXM是通过连接各个单元来合成的,那么细胞就应当有相当的灵活性来造成荚膜结构的不同。然而,将这个合成物呈现于细胞外面需要荚膜中的酶作用机制,而且不同部位的GXM单元可能需要不同的分子转运机制来将他们运至细胞外围和荚膜的特定部位。

最近Zaragoza等^[14]对C3补体成分标记的荚膜生长研究显示,在荚膜增大期间其并没有迁移。这个结果提示这种新的多糖是外来加入到C3位置上去的。实验中,在荚膜增长过程中以代谢性放射标记荚膜多糖,结果是外层荚膜随着 γ 射线移动^[14]。C3的补体成分通过共价键结合荚膜多糖,和大多数放射性标记物在荚膜外侧结合对比,暗示其正在荚膜边缘生长发育。与此一致的是,在荚膜生长的体内实验中观察到新的抗原决定簇出现于荚膜边缘^[15]。

3.2 新生隐球菌多糖荚膜的形态变化 新生隐球菌根据外界环境的变化调整自身荚膜的厚度。在体外实验标准状态下,荚膜厚度通常是1~2 μm ,而在体内状态时,荚膜可以厚达30 μm 。20世纪50年代,Littman^[16]首次描述了其荚膜厚度对外界环境具有依赖性;到80年代,许多研究者发现:(1)二氧化碳导致的荚膜调整变化与其毒力直接相关;(2)缺铁现象和微碱性的血浆以及低营养培养基可以诱导荚膜的增长。

近年来新的研究结果推测一些转导途径诱导荚膜的生长,包括cAMP和细胞分裂素活化蛋白激酶途径等^[17-19]。这个调控网络的详情仍有待于进一步研究,但蛋白激酶A(cAMP途径中的主要成分)亚型的血清分型特异性功能说明血清分型差异确实存在^[20]。cAMP途径的突变株无法使荚膜增大,因而表现出毒力的降低,而使荚膜过度生长的突变株则表现出毒力的增高^[19]。尽管这些突变株有多种不同的表型,但他们的毒力特性可能与荚膜生长有直接的联系。荚膜的生长似乎有严格的调节过程,例如:在标准真菌培养基中生长的静止期新生隐球菌能释放大量的GXM^[21]。Gates等^[9]诱导荚膜增大后发现荚膜内出现密度差,最致密的区域出现于靠近细胞壁部分,然后向外逐渐减低。通过对荚膜不同区域的与之结合的Fab(Fab是木瓜蛋白酶消化后的免疫球蛋白[抗体]片段,上面包含有抗原结合位点)以及直接多糖测量显示,荚膜内层的密度比外层高了将近6倍。这些荚膜中的密度差起着分子筛的作用,可以阻止那些大分子物质如抗体的进入^[9]。Gates等^[1]的最新研究表明,荚膜大小同样也影响荚膜中的补体沉积,从而影响其调理作用。另外,增大的荚膜似乎有复杂的空间结构,垂直分布于高密度区域的出芽点处生成环状通道^[12]。最值得关注的是,荚膜的增大是不可逆的,至少在研究中的情况下是这样的。具有增大的荚膜的新生隐球菌在营养丰富的培养基上复制后依然保持了其荚膜大小,而他们的子代则拥有较小的荚膜。这说明了荚膜缺乏退化机制,其对新环境条件的适应是不依赖于最初的荚膜大小的^[20],这也提示菌株下一代的繁衍与荚膜的大小以及对新环境条件的适应能力关系密切。

4 新生隐球菌多糖荚膜的遗传研究

随着隐球菌基因组的获得,其他荚膜相关的基因家族也被鉴定。许多荚膜形成必需的基因在此之前已被鉴定并综述过^[17]。在产生 GXM 特殊结构改变的荚膜突变体互补作用过程中也发现与荚膜形成有关但不是必需的基因。另外, CAS1 菌株毒力研究表明, GXM 上的乙酰基降低了真菌的毒性^[22]。研究认为 CAS3 编码单程 N 端跨膜蛋白, 这对 CAS31 表达缺乏的新生隐球菌的 GXM 完全乙酰化是必需的^[8]。CAS3 和 5 个相似的基因与荚膜形成必需的 CAP64 基因具有同源性, 都包含有在脂酶和酯酶中发现的 SGNH 水解酶保守区域^[22]。CAS31、CAS32、CAS33、CAS34 及 CAS35 都与 CAS3 同源, 与 GXM 上木糖替代物的增加或抑制有关。对荚膜乙酰化缺陷株的生物分析证实, 乙酰基在隐球菌的抗体识别、补体活化、清除和抑制血清和组织中性粒细胞聚集等方面有重要作用^[22]。荚膜最开始出芽时, 在其边缘先出现荚膜基因的重排。Zaragoza 等^[14]通过研究 C3 补体的缺失情况来研究新生隐球菌荚膜开放扩增的机制, 得出荚膜在出芽时经历局部基因的重排, 可能会产生一个为了出芽而形成的通道, 需要指出的是, 为了观察荚膜子细胞芽体完整和有效地从母细胞体内分离出来这一过程, 他们运用了扫描电子显微镜技术。

目前新生隐球菌多糖荚膜的研究日益受到人们的关注, 已经深入到蛋白质、分子水平以及基因鉴定和基因工程等研究领域。目前人们对荚膜结构的生化合成装配进行了探讨, 已知 GXM 上的乙酰基降低了真菌的毒性^[23], 但对 GXM 在荚膜结构中的运送机制和纤维网络装配时所需的 GXM-GXM 相互作用类型还不了解。虽然已经在荚膜的内层区域鉴定出 GalXM^[24], 但对于 GalXM 在荚膜装配中的作用目前仍不明确。尽管荚膜的合成和构造等方面的研究有了巨大进展, 但对荚膜的结构、装配、生长发育的研究仍存在许多未解决的难题。要解决这些难题, 可能还需要运用遗传学、生物化学、物理化学等相关学科的技术。

【参考文献】

- [1] Gates M A, Kozel T R. Differential localization of complement component 3 within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans*[J]. Infect Immun, 2006, 74: 3096-3106.
- [2] Yao Z R, Liao W Q. Fungal respiratory disease[J]. Curr Opin Pulmon Med, 2006, 12: 222-227.
- [3] Yao Z R, Liao W Q, Chen R G. Management of cryptococcosis in non-HIV-related patients[J]. Med Mycol, 2005, 43: 245-251.
- [4] 潘炜华, 廖万清, 顾菊林, 等. 新生隐球菌荚膜基因 CAP60 对菌体荚膜形成的影响[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 1339-1341.
- [5] McClelland E E, Bernhardt P, Casadevall A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes[J]. Infect Immun, 2006, 74: 1500-1504.
- [6] Martinez L R, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy[J]. Infect Immun, 2005, 73: 6350-6362.
- [7] Moyrand F, Chang Y C, Himmelreich U, et al. Cas3p belongs

- to a seven-member family of capsule structure designer proteins[J]. Eukaryot Cell, 2004, 3: 1513-1524.
- [8] McFadden D C, De Jesus M, Casadevall A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction[J]. J Biol Chem, 2006, 281: 1868-1875.
- [9] Gates M A, Thorkildson P, Kozel T R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule[J]. Mol Microbiol, 2004, 52: 13-24.
- [10] Beverley S M, Owens K L, Showalter M, et al. Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens[J]. Eukaryot Cell, 2005, 4: 1147-1154.
- [11] Garcia-Hermoso D, Dromer F, Janbon G. *Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution *in vitro* and during murine infection[J]. Infect Immun, 2004, 72: 3359-3365.
- [12] Charlier C, Chretien F, Baudrimont M, et al. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood brain barrier[J]. Am J Pathol, 2005, 166: 421-432.
- [13] Garcia-Rivera J, Chang Y C, Kwon-Chung K J, et al. *Cryptococcus neoformans* CAP59 (or Cap59p) is involved in the extracellular trafficking of capsular glucuronyloxymannan[J]. Eukaryot Cell, 2004, 3: 385-392.
- [14] Zaragoza O, Fries B C, Casadevall A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂[J]. Infect Immun, 2003, 71: 6155-6164.
- [15] Janbon G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation[J]. FEMS Yeast Res, 2004, 4: 765-771.
- [16] Littman M L. Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*[J]. Trans N Y Acad Sci, 1958, 20: 623-648.
- [17] Wang P, Cox G M, Heitman J. A Sch9 protein kinase homologue controlling virulence independently of the cAMP pathway in *Cryptococcus neoformans*[J]. Curr Genet, 2004, 46: 247-255.
- [18] Hicks J K, D'Souza C A, Cox G M, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunits have divergent roles in virulence factor production in two varieties of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*[J]. Eukaryot Cell, 2004, 3: 14-26.
- [19] Zaragoza O, Casadevall A. Antibodies produced in response to *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in mice have characteristics of nonprotective antibodies[J]. Infect Immun, 2004, 72: 4271-4274.
- [20] Zaragoza O, McClelland E E, Telzak A, et al. Equatorial ring-like channels in the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule[J]. FEMS Yeast Res, 2006, 6: 662-666.
- [21] Zaragoza O, Telzak A, Brya R A, et al. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding[J]. Mol Microbiol, 2006, 59: 67-83.
- [22] Kozel T R, Levitz S M, Dromer F, et al. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O-acetylation or xylosyl side chains[J]. Infect Immun, 2003, 71: 2868-2875.
- [23] Akoh C C, Lee G C, Liaw Y C, et al. GDSL family of serine esterases/lipases[J]. Prog Lipid Res, 2004, 43: 534-552.
- [24] Bryan R A, Zaragoza O, Zhang T, et al. Radiological studies reveal radial differences in the architecture of the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans*[J]. Eukaryot Cell, 2005, 4: 465-475.

【收稿日期】 2007-01-16

【修回日期】 2007-04-09

【本文编辑】 尹 荼