

高毒力肺炎克雷伯菌分子致病机制研究进展*

张 颖¹, 李 轶¹综述, 郭 思^{1,2△} 审校

1. 河南大学人民医院/河南省人民医院检验科, 河南郑州 450003; 2. 华中阜外医院检验科, 河南郑州 450003

关键词:高毒力; 肺炎克雷伯菌; 铁载体; 荚膜多糖; 菌毛; 毒力因子**中图分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)09-1298-04

1882 年,肺炎克雷伯菌(KP)首次从死于肺炎的患者的肺中被分离出来^[1]。KP 属于肠杆菌科,是人类胃肠道菌群的一部分。它们携带多种毒力基因,并且具有获得抗菌药物抗性基因的能力,同时可以引起局部和播散性感染^[2],是临床常见的条件致病菌之一。大多数“经典”肺炎克雷伯菌(cKP)能够引起肺炎、尿路感染、腹腔感染、血管内装置感染、手术部位感染、软组织感染、菌血症等,常发生于住院需长期护理或免疫功能低下的患者,一般常规用 β -内酰胺类和其他有效对抗肠杆菌科的抗菌药物进行治疗^[3]。临床变异的高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)在过去 20 年中逐渐出现^[4]。与 cKP 不同,hvKP 所致感染常发生在健康的流动性人群中,通常引起社区获得性感染,并伴有远处转移或扩散,严重者可危及生命。除此之外,hvKP 感染的肝脓肿患者通常无肝胆病史^[5]。目前,尚无统一标准定义 hvKP,对 hvKP 的鉴定大部分通过拉丝试验,在琼脂平板上培养的菌落过夜后,用接种环轻触菌落,若有黏液丝且拉丝长度 >5 mm,即可初步判断为 hvKP。hvKP 的高黏性特征与其毒力有密切的关系,因而被认为是鉴定 hvKP 的有效指标。但是也有研究发现不是所有的 hvKP 菌株都表现为高黏性特征^[5]。控制细菌荚膜多糖(cps)合成的基因可在不同菌株间通过水平传递的方式转移,使不具备 hvKP 特征的菌株也表现出高黏性特征,这使得 hvKP 与细菌菌落高黏性特征间的相关性大大降低。因此,不能仅凭高黏性特征和血清型鉴定 hvKP,而应明确菌株的表型和基因型特性是否符合 hvKP 的特性以鉴定菌株的毒力^[6]。本研究就 hvKP 的毒力相关因子及分子致病机制进行了综述。

1 hvKP 的毒力相关因子

hvKP 的高毒力与多种毒力因子密切相关,例如铁载体、荚膜血清型、菌毛等。其中 cps 的合成增加与摄取铁能力的增强共同组成 hvKP 毒力增强的主要因素^[7]。

1.1 铁载体 铁是一种对细菌生长至关重要的元

素,获取铁的能力对细菌的生长和复制尤为重要。这种特性在感染过程中起着至关重要的作用^[1]。KP 必须从宿主获取铁,以便在哺乳动物感染期间存活和繁殖。许多病原体(包括 KP)获取铁的主要方法是通过铁载体的分泌,铁载体比宿主转运蛋白对铁有更高的亲和力,可以从宿主铁螯合蛋白中获取铁元素或从环境中清除铁^[8-9]。另外,铁载体的分泌也诱导炎症和细菌传播。KP 可分泌多种类型的铁载体,包括气杆菌素、肠杆菌素、沙门菌素和耶尔森杆菌素。不同铁载体的产生可以使 KP 定植并传播到宿主内的不同位点,在加入人类腹水的培养基或贫铁的基本培养基上培养 hvKP 和 cKP,通过铁载体定量试验(CAS 检测法)测得 hvKP 可分泌数量更多、活性更强的铁载体,这可能是 KP 毒力增强的重要机制之一^[7]。研究还发现 hvKP 菌株的铁载体活性为 cKP 菌株的 6~10 倍^[7]。肠杆菌素在 cKP 和 hvKP 菌株中几乎无处不在,被认为是 KP 的主要铁摄取系统,相比之下,耶尔森杆菌素、沙门菌素和产气杆菌素的表达水平在 hvKP 中比在 cKP 中高得多^[8]。RUSSO 等^[10]通过使野生型 hvKP(hvKP1)基因位点突变,发现无论是在体内及体外培养都不能单独合成沙门菌素、耶尔森杆菌素、肠杆菌素,都不能使 hvKP 的毒力减低,而不能合成产气杆菌素的菌株毒力会明显下降,因此产气杆菌素被认为是 hvKP 最重要的铁载体,也是其重要的毒力因子。目前产气杆菌素的水平在 hvKP 中明显增多的机制尚不清楚,但已经确定的是,在铁缺乏的条件下,hvKP 铁载体总含量得以增加的主要原因是产气杆菌素的存在^[11]。另外,耶尔森杆菌素的分泌和利用也与患者的呼吸道感染有关,hvKP 强大的铁摄取系统使得细菌在缺乏铁的情况下也能保证足够的铁来源。

1.2 cps

1.2.1 荚膜 临床资料表明,具有高黏性特征的 KP 菌株更易引起一些特殊的侵袭性感染,例如肝脓肿、脑膜炎、脓胸、眼内炎等,高黏性特征在这些菌株引起感染的过程中可能发挥了重要作用^[6]。hvKP 的高黏

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81600944);河南省医学科技攻关计划项目(201203094)。

△ 通信作者, E-mail: iamgxy@163.com。

液性和高毒力特征与其增厚的荚膜有关。荚膜是一种包裹细菌的细胞外多糖基质,是细菌的一种特殊结构。荚膜的结构与细菌的黏附、抗血清杀菌、抗吞噬和远处定植的特性密切相关^[12]。hvKP 菌落黏稠的性状正是 cps 合成旺盛的直接表现。cps 由位于染色体上的 cps 基因簇编码,cps 基因簇全长 21~30 kb,包括 16~25 个基因。cps 基因簇中 wzi、wza、wzb、wzc、gnd、wca、cpsB、cpsG、galF 与 cps 合成相关,wzy (orf4)、cpsB、cpsG 与 cps 聚合相关,wza、wzc、orf5、orf6 与装配相关,wzi 编码荚膜黏附相关的表面蛋白^[13]。有研究者用分离自患肝脓肿小鼠的 KP 制成一系列浓度梯度的菌液,注入小鼠体内,以半数致死量(LD50)评估菌株的毒力,结果显示 K1 型野生型菌株 LD50(<10 CFU)远小于不产荚膜的 K1 型突变株 LD50(>1×10⁶ CFU),以此证实了 cps 的毒力作用^[14]。

1.2.2 血清型 根据 cps 的不同,KP 被分为 82 种血清型^[15],hvKP 菌株由于扩增荚膜物质的产生,产生更加坚固的荚膜,其中 K1 和 K2 血清型与细菌的高毒力密切相关,是导致临床细菌性肝脓肿的主要致病菌。K1 型常继发于远处转移。最近有研究表明 K1、K2、K5、K6、K20、K54、K57 及新发现的 KN1 血清型与 hvKP 有关^[12]。LIU 等^[16]对北京朝阳医院 2008—2012 年检测出的 hvKP 进行 PCR 及多位点基因分析,发现 hvKP 荚膜分型中常见的是 K1、K2、K20 和 K57,并且 hvKP 阳性患者更易发生社区获得性感染,且多集中于 K1 及 K2 型。有研究对 2013—2014 年北京 3 家教学医院肝脓肿病例进行回顾性研究,发现引起肝脓肿的 hvKP 以 K1 型为主(53.9%),其次为 K2 型(32.2%)^[13]。那么,为什么 K1 和 K2 血清型在 hvKP 中如此普遍?主要有以下几个原因:(1)K1 和 K2 菌株缺乏被宿主因子识别的特定甘露糖残基重复序列,例如巨噬细胞上的甘露糖结合受体和肺分泌的表面活性蛋白 A(SP-A);(2)K1 和 K2 菌株表面具有宿主特异性单糖唾液酸,可模拟宿主细胞,从而可逃避宿主免疫细胞;(3)与其他血清型菌株相比,K1 和 K2 菌株可诱导嗜中性粒细胞释放更小的活性氧物质,从而可以更好地存活于人体组织中;(4)与其他 K 血清型的菌株相比,K1 和 K2 菌株具有更多样的 O 血清型,其可以帮助 K1 和 K2 菌株逃避宿主免疫系统。K1 及 K2 型荚膜最初被认为是 hvKP 的主要毒力因子,也被定义为 hvKP 最初的主要特征。但是,并非所有的 hvKP 引起的社区获得性肝脓肿都是 K1 及 K2 型,在非社区性获得性肝脓肿的小鼠模型中也检测出 K1、K2 型,并且表现出较低的毒性^[10]。TAN 等^[17]对 129 株分离出的 hvKP 进行 PCR 测定,发现超过一半和肝脓肿有关的血清型不是 K1 及 K2 型。所以,hvKP 的毒力强弱并非仅仅

是 K1、K2 荚膜血清型分型导致的,可能与其毒力基因有关。

1.2.3 高黏性表型 参与调控胞外 cps 合成的主要荚膜转录激活因子有 RmpA 及 RmpA2。目前认为位于染色体上的 c-rmpA 基因和质粒上的 p-rmpA、p-rmpA2 基因在 hvKP 中参与编码 RmpA、RmpA2^[18]。

RmpA 可激活荚膜产生,导致高黏液表型和毒力增加。在 KPCG43 中,p-rmpA 和 p-rmpA2 均有助于增加荚膜产生,而在 NTUH-K2044(ST23、K1 血清型)中,第一个基因组测序的 hvKP,只有 p-rmpA 促成荚膜基因表达的增加。因此,说明每种 RmpA 在超毒力中的作用也是十分必要的。最近,吴桂立^[19]在临沂地区 hvKP 的分子致病机制研究中发现,69 株 KP 中具有高黏液表型的 hvKP 为 37 株,其中收集的 hvKP 菌株全部表达 RmpA,因此,RmpA 可以作为实验室诊断 hvKP 的辅助参考指标。此外,有研究表明,RmpA 以 RcsB 依赖性方式激活 cps 表达,并且其 DNA 结合基因序列是发挥调节作用所必需的^[20]。

黏液相关基因 A(magA)于 2004 年被发现,magA 存在于 K1 型 KP 的 cps 体生物合成区内,被认为与细菌高黏性、血清抵抗及细胞吞噬抗性有关,作为 KP cps 聚合酶 wzy 负责 K 抗原的合成,现将 magA 重命名为 wzykDk。台湾的一项研究显示,83%来自化脓性肝脓肿患者的 KP 菌株为 magA 阳性,从其他侵袭性感染患者中分离的菌株中只有 3%为 magA 阳性^[15]。但是,最近有研究发现,许多高黏性 KP 菌株并未检测出 magA 基因,一些表达 magA 的菌株也并未表现出高黏性特征,表明 magA 基因与高黏性特征两者之间可能并没有特定的联系^[6]。在对 77 株已明确血清型的 KP 菌株的研究中发现,magA 仅存在于 K1 血清型的菌株中,因此,认为 magA 基因是编码 K1 血清型菌株 cps 的主要基因,而非特定的毒力基因,即 magA 基因是一个编码 KP 的荚膜血清型而非高黏性特征的 cps 基因^[6],在 K1 血清型 KP 中是重要的毒力因子,与其致病性有很大的联系。

1.3 菌毛 细菌黏附于宿主细胞表面是其进展至感染的关键步骤之一,在 KP 中,这通常通过菌毛来实现^[3]。目前,已知两种类型的菌毛存在于 KP 中,即 1 型和 3 型菌毛。虽然已知 3 型菌毛能与气管上皮细胞、肾小管细胞等不同人类细胞结合,但 1 型菌毛似乎更具有特异性。另外,KP 菌株产生生物膜的能力增强导致 KP 对宿主防御因子和抗微生物剂的抗性增加,并且生物膜越来越多地被认为是重要的毒力因子。影响生物膜形成的因素有很多,如荚膜、菌毛、数量感知系统等,其中菌毛在生物膜的形成过程中起到至关重要的作用^[21]。而 1 型和 3 型菌毛也与 KP 中的生物膜形成有关(3 型菌毛比 1 型菌毛作用更

强)^[22]。hvKP 比 cKP 产生更多的生物膜,这可能也是其毒力增强的原因之一。

1.4 序列类型 序列分型是用于菌株分类的分子流行病学方法,并且已经用于 KP 的分型筛选^[1]。hvKP 菌株具有特定的 MLST 序列型别,如 ST23 与 K1 荚膜血清型和肝脓肿密切相关,另外,ST57 与 K1 型相关,ST86、ST375、ST380 与 K2 型相关。常见的 cKP 序列分型为 ST11、ST15、ST65 和 ST258,另外,K1/ST23 更可能含有与高黏液表型和铁摄取相关的毒力基因,与这些毒力基因共同促成 hvKP 的发病机制。与 K1 血清型相比,K2 和其他血清型在 ST 方面遗传多样性差异更大,并且获得毒力基因(kfu,irp,iuc,iro,rmpA)的可能性较小^[2]。虽然 hvKP 的序列分型与其高毒力及致病性没有直接的关系,但是对可能引起感染流行的 hvKP 进行序列分型有助于早期干预^[23]。

2 hvKP 的定植与感染

hvKP 的定植是获得内源性感染的第一步,但是 hvKP 定植感染发病率及感染机制并不明确。hvKP 在胃肠道、口咽、皮肤均可定植,但是胃肠道是定植的主要部位。细菌进入到肠道以外的组织或器官以继续生长是整个感染的重要步骤,cKP 和其他肠杆菌科感染的途径包括从会阴部进入膀胱,破坏肠道使细菌进入腹膜腔,口咽部定植进入呼吸道,以及破坏皮肤屏障等。虽然 hvKP 进入机体的途径并不明确,但是可以明确的是 hvKP 感染通常发生在宿主抵抗力无明显缺陷的患者中。而且,hvKP 进入宿主体内并不一定会引起感染,细菌还需要应对宿主的抵抗力并在宿主体内存活。研究表明 hvKP 菌株的存活能力明显高于 cKP 菌株^[24]。hvKP 可以导致化脓性肝脓肿、脾脓肿、自发性细菌性腹膜炎、肺炎、眼内炎、脑膜炎、尿路感染等。另外,糖尿病、恶性肿瘤、肺炎、肾脏疾病被认为是 hvKP 感染的高危因素。此外,hvKP 感染导致的化脓性肝脓肿通常发生在无肝胆病史的人群中,定植在肠道的细菌通过侵犯肠黏膜进入门静脉,继而到达肝脏引起感染。通过对 hvKP 感染的小鼠模型的研究已经证实 hvKP 可以穿过肠黏膜屏障导致肝脓肿。此外,吞噬了 hvKP 的中性粒细胞通过血液循环可将 hvKP 带至机体的多个部位,导致皮下组织、肺、肝形成脓肿^[5]。另外,hvKP 感染存在一定的区域易感性,在亚洲人群中高发,这可能与宿主基因易感性或不同地域病原体暴露水平不同有关。

3 小 结

目前对 hvKP 的研究有限,铁载体、荚膜血清型、高黏液表型、菌毛等被认为是 hvKP 的高毒力因子,并与其致病能力有关。但目前对其分子致病机制尚无法完全阐明,hvKP 进入机体的途径及发生转移性播散的机制仍需要进一步研究,转移性感染为何易发

生于糖尿病患者,亚裔群体中 hvKP 为何具有较高的肠道携带率,其与免疫系统是如何相互作用,这些问题都亟待解决。但是,目前国内对 hvKP 的研究还主要集中于 hvKP 的耐药性。临床工作者必须提高对 hvKP 的认识,深入研究 hvKP 的致病机制对于正确认识 hvKP 所致感染,降低 hvKP 的危害具有重要意义^[25]。

参考文献

- [1] SHON A S,BAJWA R P,RUSSO T A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Virulence*,2014,4(2):107-118.
- [2] CHEW K L,LIN R T P,TEO J W P. *Klebsiella pneumoniae* in Singapore:hypervirulent infections and the carbapenemase threat[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2017,7:515.
- [3] MARTIN R M,BACHMAN M A. Colonization, infection,and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2018,8:4.
- [4] SHON A S,RUSSO T A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*:the next superbug? [J]. *Fut Microbiol*,2012,7(6):669-671.
- [5] 王丽凤,沈定霞.高毒力肺炎克雷伯菌的致病机制研究进展[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*,2016,36(6):468-471.
- [6] 杨继勇,罗艳萍.高毒力肺炎克雷伯菌表型与基因型特征研究进展[J]. *中华临床感染病杂志*,2014,7(2):179-182.
- [7] 陈杨,刘嘉琳,瞿洪平.铁载体对肺炎克雷伯菌毒力增强的机制研究[J]. *中国感染与化疗杂志*,2016,16(6):804-807.
- [8] JUN J. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess [J]. *Infect Chemother*,2018,50(3):210-218.
- [9] HARADA S,DOI Y. Hypervirulent *klebsiella pneumoniae*:a call for consensus definition and international collaboration[J]. *J Clin Microbiol*,2018,56(9):00959-18.
- [10] RUSO T A,SHON A S,BEANAN J M,et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence[J]. *PLoS ONE*,2011,6(10):e26734.
- [11] 贺晓珊.肺炎克雷伯菌耐药机制的研究进展[J]. *西部医学*,2014,26(1):124-126.
- [12] 吴翰欣,丁家伟,高凌,等.高毒力肺炎克雷伯菌的毒力机制研究进展[J]. *生物技术通讯*,2018,29(1):119-122.
- [13] 徐水宝,金嘉琳.高毒力肺炎克雷伯菌的分子致病机制[J]. *微生物与感染*,2017,12(5):320-326.
- [14] 管红艳,刘瑛.引起肝脓肿的肺炎克雷伯菌毒力因子研究进展[J]. *检验医学*,2018,33(9):839-843.
- [15] LEE C,LEE J H,PARK K S,et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *klebsiella pneumoniae*:epidemiology, hypervirulence-associated determinants,and resistance mechanisms[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2017,7:118-125.

- [16] LIU Y M, LI B B, ZHANG Y Y, et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent klebsiella pneumoniae bloodstream infections in Mainland China [J]. *Antimicrob Agen Chem*, 2014, 58(9): 5379-5385.
- [17] TAN T Y, ONG M, CHENG Y, et al. Hypermucoviscosity, rmpA, and aerobactin are associated with community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2019, 52(1): 30-34.
- [18] 邱世洁, 余广超, 温旺荣. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展 [J]. *国外医药(抗菌药物分册)*, 2018, 39(2): 129-134.
- [19] 李桂立. 临沂地区高毒力肺炎克雷伯菌的分子特征分析 [J]. *山东医学高等专科学校学报*, 2018, 40(3): 199-201.
- [20] CHENG H Y, CHEN Y S, WU C Y, et al. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in Klebsiella pneumoniae CG43 [J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(12): 3144-3158.
- [21] 魏丹丹, 李喜红, 王莲慧, 等. 血液分离高黏液表型肺炎克雷伯菌的毒力基因检测及生物膜形成测定 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(5): 622-626.
- [22] FOLLADOR R, HEINZ E, WYRES K L, et al. The diversity of Klebsiella pneumoniae surface polysaccharides. [J]. *Microb Genom*, 2016, 2(8): e000073.
- [23] 孙运芳, 沈定霞. 高毒力肺炎克雷伯菌的实验室检测标志 [J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(9): 677-678.
- [24] 周薇, 黄文芳. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(6): 800-803.
- [25] GUO Y, WANG S, ZHAN L, et al. Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous klebsiella pneumoniae isolates associated with invasive infections in China [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 24.

(收稿日期: 2019-09-23 修回日期: 2020-01-12)

• 综述 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 09. 048

脑震荡诊断研究新进展*

杨以平, 曹冠柏, 黎勇夫 综述, 夏祖伟[△] 审校

重庆市九龙坡区人民医院创伤外科, 重庆 400051

关键词: 脑震荡; 评估工具; 新进展; 生物标志物

中图分类号: R651

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)09-1301-04

脑震荡属于轻度脑损伤的一种, 运动是造成脑震荡的常见原因, 在美国每年由于运动和娱乐活动导致脑震荡者有 1 600 万至 3 800 万人, 并且这还是在 50% 的脑震荡没有被报道的情况下统计的数据^[1]。大多数脑震荡患者能完全康复, 但高达 30% 的脑震荡患者可能会出现长期躯体症状、认知和情绪问题, 包括头痛、头晕、记忆障碍、情绪障碍等^[2]。

反复发生的脑震荡是慢性创伤性脑病的高危因素。作为运动员, 可能不想退出运动事业, 报告受伤的意愿可能会降低, 因此, 有足够的诊断工具来准确地确定是否有脑震荡发生尤其重要。目前没有普遍认同的脑震荡定义^[3]。大多数脑震荡定义的元素包含在《运动团体脑震荡 2012 共识》中^[4], 此定义如下: (1) 导致神经系统症状, 包括或者不包括意识丧失。(2) 症状快速出现, 持续时间短, 随后消失; 可能表现为短暂的平衡、协调丧失, 记忆/认知、力量或者灵敏度下降。(3) 可能会导致神经生理学改变, 但是急性临床症状仅表现为神经功能改变, 一般不会造成结构改变。(4) 临床和认知特征通常遵循一个连续的过程。(5) 神经影像学检查显示脑结构正常。但是此定

义还存在争议, 例如脑震荡是否会造成长久影响, 脑震荡是否需要与其他疾病鉴别。本文就脑震荡诊断研究新进展进行综述如下。

1 脑震荡病理生理学

脑震荡的症状可归因于大脑损伤后发生的病理生理变化。病理生理学研究的资料主要来自动物模型, 利用侵入性监测对严重脑损伤动物模型的病理变化和功能进行观察, 包括对神经递质的释放、大脑血流的改变、线粒体功能障碍和自由基形成的研究。生物机械应力可以导致神经元细胞膜破裂与轴突拉伸, 导致离子和神经递质在受干扰的膜上不加选择地运动。谷氨酸从突触前末端释放, 并激活 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体, 进一步加重这些离子移动。钾离子在细胞外释放, 以及钠/钾 ATP 依赖泵试图重新建立离子与能量储存消耗平衡引起细胞外钾离子增加, 导致神经元进一步去极化, 钙在细胞内积聚, 最终引起线粒体钙超载, 线粒体功能障碍和氧化应激^[5]。

除了发生离子和神经递质失调外, 大脑葡萄糖代谢的变化也在动物和人类脑震荡的研究中被发现。当轻度脑损伤发生后, 最初葡萄糖摄取快速增加, 随

* 基金项目: 重庆市医学科研计划项目(2016MSXM138)。

[△] 通信作者, E-mail: 250982470@qq.com。