

动物鼠疫流行静息期与鼠疫质粒 变异关系的探讨

高少坤¹, 杜国义²

1 蠡县疾病预防控制中心检验科, 河北 保定 071000; 2 河北省鼠疫防治所, 河北 张家口 075000

摘要: 10、74、107 kb 3 种质粒形成了我国各鼠疫自然疫源地内鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)主要质粒图谱, 在国内不同疫源地又陆续发现了不同质粒, 有 16 种不同类型, 这些质粒分别具有不同的功能。质粒在自然界中容易自然缺失或丢失而使鼠疫菌性状发生变异, 也是每次鼠疫流行末期自然终止流行和鼠疫流行静息期存在的原因之一。该文就鼠疫菌质粒变异对鼠疫流行的影响进行了探讨, 以供人们对鼠疫流行规律进行研究。

关键词: 静息期; 鼠疫; 质粒; 变异; 鼠疫耶尔森菌

中图分类号: R516.8; R378.6⁺¹ 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2017)05-0512-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2017.05.029

Study on the relationship between the resting phase of animal plague and the variation of the plague plasmid

GAO Shao-kun¹, DU Guo-yi²

1 Lixian Center for Disease Control and Prevention, Baoding 071000, Hebei Province, China;

2 Anti-plague Institute of Hebei Province

Corresponding author: DU Guo-yi, Email: dgyhbs@163.com

Supported by the Key Medical Projects of Hebei Province in 2016 (No. 20170446) and National Major Research and Development Plan (No. 2016YFC1201304)

Abstract: There are three plasmids of 10, 74, 107 kb which are main plasmids of *Yersinia pestis* in the plague natural foci of China. Different plasmids have been found in China and there are 16 different types. Plasmid in nature is easy to be lost and *Y. pestis* is therefore altered. This is also the cause of natural death at the end of plague and circulating of the plague. Plasmid variation of the *Y. pestis* is discussed for the plague epidemic. The study of the law of epidemic plague is useful for public health.

Key words: Resting phase; Plague; Plasmid; Variation; *Yersinia pestis*

动物鼠疫流行静息期也称为鼠疫间歇期, 是指在鼠疫自然疫源地内鼠疫发生一次流行间隔一段时间后重新流行, 这段未发生鼠疫流行的时间称之为鼠疫静息期或鼠疫间歇期。质粒是细菌染色体外的重要遗传物质, 质粒为共价、闭合、环状的双链 DNA 分子, 即所谓的 CCC 结构, 编码很多重要的遗传物质, 鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, 鼠疫菌)的质粒决定毒力因子、毒力强弱、侵袭力等表现型性状。李敏等^[1]研究发现在动物鼠疫流行末期, 鼠疫菌的毒力明显减弱, 并且与鼠疫菌质粒的丢失有关。在不同鼠疫自然疫源地, 鼠疫菌所携带的质粒种类不同, 大部分鼠疫菌通常携带规范的质粒, 即携带 10、74 和 107 kb 3 种质粒。在自然条件下, 质粒可以丢失或获得, 人工处理也可使其发生变化, 从而使得鼠疫菌发生变异、影响或丢失对主要宿主动物的侵袭能力^[2]。Harrison

和 Gerstein^[3]研究发现, 鼠疫菌在鼠疫自然疫源地内流行过程中, 会与同一菌属中的假结核耶尔森菌(*Y. pseudotuberculosis*)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. enterocolitica*)发生交替出现, 鼠疫疫情由流行期进入鼠疫静息期。

1 质粒的分子结构

1.1 74 kb 质粒 该质粒为鼠疫菌、假结核耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌所共有, 也是我国各鼠疫自然疫源地内均存在的质粒, 其长度约 70.5 kb。Perry 等^[4]对鼠疫菌 KIM5 株的低钙反应(Low-Ca²⁺ response, LCR)质粒 PCD1 DNA 进行了序列分析, 该质粒总长度为 70 599 bp, GC 含量为 44.8%, 含有 60 个开放阅读框(Open reading frame, ORF)、3 种 IS(IS100、IS1616、IS1617)和大量的缺失和转位元件, 其中 47 个 ORF 被

基金项目: 2016 年河北省医学重点项目(20170446); 国家重点研发计划重点专项(2016YFC1201304)

作者简介: 高少坤, 男, 副主任医师, 从事鼠疫防治工作, Email: 530258017@qq.com

通信作者: 杜国义, Email: dgyhbs@163.com

网络出版时间: 2017-08-09 16:08 网络出版地址: http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

证实与LCR的结构组成有关,有35个ORF连在一起构成LCR基因簇。

1.2 107 kb质粒 是鼠疫菌中最大的一个质粒,也是鼠疫自然疫源地内变异性最大的鼠疫菌质粒。该质粒可高频出现并整合到鼠疫菌的染色体上,具有很强的毒性。国外报道其长度变化从90~288 kb不等^[5],国内报道其分子质量变化有51~110 kb不等。目前已完成该质粒的全基因测序,但不同国家不同菌中的测序结果不同,以KIM5鼠疫菌株为例,其质粒总长度100 984 bp(GenBank存取号:AF053947),GC含量为50.2%^[6]。

1.3 10 kb质粒 该质粒DNA总长度为9 610 bp(GenBank存取1个IS100插入序列、鼠毒素基因、鼠毒素免疫蛋白(Pim)基因、纤维蛋白溶酶因子基因和1个与大肠埃希菌(*Escherichia coli*)高度同源的CoIE1复制子(3 199~3 899 bp)),分别编码鼠毒素(Pst)、Pim、纤溶酶原激活因子(Plasminogen activator, Pla)等^[7]。该质粒上没有能编码>50个氨基酸的ORF。Pla是鼠疫菌经皮下途径感染所必需的毒力侵袭因子。在Pst基因和Pim基因之间有一个富含GC回文结构形成的发夹。在所含的1个IS100序列中,推测有2个转座酶基因的存在。Pim、Pla和IS100的2个转座酶均是以同一方向转录,只有Pst基因的转录方向与之相反。3个质粒分别编码了一些与毒力有关的基因。另外,据有关报道发现的质粒分布有大部分鼠疫菌携带分子质量分别为10、74、107 kb的质粒^[8];而6.4、20.8、36.8、57.6、83.2、147.2、177.6 kb等在某些自然疫源地内的鼠疫菌存在。董兴齐等^[9]报道20.8 kb质粒实际上为10 kb质粒的2倍体,有些质粒为某一地区鼠疫菌所特有的质粒,如在云南省澜沧江下游地区发现的6.4 kb质粒、云南省梁河县的36.8 kb等。目前,对于鼠疫菌质粒的研究主要集中在致病性、毒性质粒PYV/PCD1、pFra/pMT1和PST/pPCD1 3种质粒,而pFra/pMT1和PST/pPCD1为鼠疫菌所独有的质粒。

2 鼠疫质粒功能

鼠疫菌的质粒,公认的有10、74、107 kb 3种质粒。对此研究较多,它们与鼠疫菌的致病性、侵袭力、毒力因子有关。鼠疫菌携带的10 kb质粒决定鼠疫菌素(PstI)的产生^[10],质粒编码PstI、Pla、血浆凝固酶(Cog);74 kb质粒决定鼠疫菌的致病性^[11],鼠疫菌Ca²⁺依赖和VWa抗原的产生,74 kb质粒能编码多种耶尔森菌膜外蛋白;107 kb质粒决定荚膜抗原和鼠毒素的表达。Fursova等^[12]将控制鼠疫菌产生F1抗原的fra操纵子转导到大肠埃希菌、伤寒杆菌等,并检测了重组质粒的特性。

3 不同鼠疫自然疫源地质粒分布存在的差异

我国各类型鼠疫自然疫源地鼠疫菌的质粒图谱各不相同,差异较大。1995年李敏等^[1]对我国各鼠疫自然疫源地内的2006株鼠疫菌的质粒图谱进行了研究,共观察到13种质粒,分子质量分别为3.2、11.2、20.8、25.6、35.2、36.8、43.2、48.0、74.0、83.2、107.0、116.8、147.2 kb,说明在我国鼠疫自然疫源地内鼠疫菌的质粒种类复杂。最多见的含有3种质粒类型,即10、74、107 kb 3种质粒,约占总数的88.73%;含有4种的约占10.07%;含有2种或5种质粒的较少,约占1.20%。

董兴齐等^[13]检测云南省828株鼠疫菌质粒DNA,共发现6.3、9.7、36.6、11.2、57.0、97.6、72.6、103.7、119.3、178.1、207.3 kb 11种质粒,其中99.15%的菌株具有9.7、72.6、103.7 kb质粒。徐菲莉等^[14]在新疆四大片鼠疫自然疫源地内不同宿主、不同年代的109株鼠疫菌质粒中,发现1株分离自玛纳斯灰旱獭(*M. baibacina*)的菌株自然缺失10 kb质粒,只携带74 kb和107 kb两种质粒。除10、74、107 kb 3种基本质粒外,广西隆林县分离的鼠疫菌还携带6.4 kb质粒^[15]。云南省黄胸鼠(*Rattus tanezumi*)鼠疫疫源地部分菌株分别含有6.4、36.8、57.6、177.6 kb质粒的一种;内蒙古长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)鼠疫疫源地的菌株多携带20.8 kb质粒;青海省个别菌株多携带36.8 kb质粒。宁夏长爪沙鼠鼠疫源地的菌株普遍携带10、21、74、107 kb 4种质粒^[16]。青藏高原喜马拉雅旱獭(*M. himalayana*)鼠疫疫源地的少数菌株携带3.2、36.8、43.2、48.8 kb 4种质粒,其他图谱有10.0、43.2、48.0、97.6 kb。总之我国鼠疫自然疫源地主要为3种质粒(10、74、107 kb),但是不同的疫源地差异很大,自然缺失率很高。

4 质粒的缺失与毒力降低的关系

质粒是菌细胞内染色体外的遗传因子,能自主地进行复制,控制着寄主细胞的一定遗传性状。在自然界中质粒缺失的现象曾有报道,多数菌株缺失的是74、107 kb质粒,偶见丢失10 kb质粒的现象^[17]。孙利仁等^[18]研究鼠疫菌攻击媒介蚤后,其质粒发生了变异,由原来107 kb质粒变异为147.2 kb质粒。不同鼠疫自然疫源地的鼠疫菌质粒差别较大,丢失情况多见,尤其是其大分子质粒最易丢失,致鼠疫菌毒力减弱。彭何碧等^[19]研究发现,鼠疫107 kb质粒在自然状态下容易丢失,在云南省也发现了自然缺失的野生菌株。该菌株毒素含量明显降低,其对敏感动物的侵袭力降低。河北省对分离于1971—1972年动物鼠疫流行时的5株鼠疫菌毒力进行了研究,发现5株鼠疫菌全部属于强毒菌,但是毒力差异较大,其中7220号菌株毒力最强^[20],分离于1972年5月4日,宿主为达乌尔黄鼠(*Spermophilus dauricus*),感染100个鼠疫菌,实验动物全部死亡;728号菌株分离于1972年3月9日,宿主为长爪沙鼠,毒力中等;而7212号菌株分离于1972年4月7日,宿主为长爪沙鼠,感染10⁶个鼠疫菌,只能致死1只小白鼠,毒力相差10 000倍以上。结果显示该研究的鼠疫菌分为高毒力(728和7220)、中毒力(7213和7219)和弱毒(7212)。可以看出,强毒菌分离于流行前期,弱毒菌分离于流行末期,达乌尔黄鼠鼠疫菌株的毒力要强于长爪沙鼠菌株。研究还发现鼠疫菌在人工培养基上传代过程中其毒力发生明显的变化,这也是动物鼠疫疫情能够自然熄灭的原因,河北省鼠疫自然疫源地内分离到的鼠疫菌存在这种情况,鼠疫流行前期,鼠疫菌毒力很强(728菌株),当鼠疫流行一段时间,鼠疫菌的质粒发生变异而丢失,鼠疫菌的毒力会减弱(7212菌株),刘建芳^[21]研究发现7212菌株表现为VW⁻,缺失74 kb质粒。

5 鼠疫与同属的假结核耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌发生互变

对鼠疫菌与其同属的假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶

尔森菌的比较基因组学研究表明,在遗传水平上三者的亲缘关系很近。从生物进化和群体遗传学的角度,比较鼠疫菌和假结核耶尔森菌的基因片段和历史上出现的 3 次世界范围的人间鼠疫大流行状况,发现鼠疫菌和假结核耶尔森菌在鼠疫的暴发和间歇期交互出现,其可能为同一菌种的两个亚种。在鼠疫流行期,鼠疫菌在外界条件的作用下获得某些基因,而毒力重新获得引起鼠疫的流行。Pakhill 等^[22]研究发现鼠疫菌在水平获得外源基因的同时,也存在着自身基因的丢失和突变而形成的假基因,在其染色体上含有 150 个假基因,其中 51 个是由于被 IS 分隔开所形成的,58 个假基因是由于移码突变所造成,32 个是由于缺失所致,余者可能为阅读框中插入终止密码子或是在其进化过程中适宜于小肠内的残留基因。假结核耶尔森菌具有运动功能,而鼠疫菌没有,通过分析发现其原因可能是在鼠疫菌的 2 个鞭毛基因簇和趋化基因簇中,鞭毛基因簇 II 存在 6 个基因突变所致。

6 结 论

鼠疫流行静息期普遍存在于我国各鼠疫自然疫源地内,每次鼠疫流行后期,鼠疫菌的毒力发生明显的降低,鼠疫菌质粒发生变异或丢失,尤其是在鼠疫间歇期内,可能引起了鼠疫菌耶尔森菌属的 3 种同属菌交互出现,这些现象应引起重视,进一步研究其变异变化规律。在鼠疫流行末期,由于自然因素,鼠疫菌的质粒丢失,使得鼠疫菌变为假结核耶尔森菌或小肠结肠炎耶尔森菌从而丧失了鼠疫菌的能力,鼠疫流行结束。

参考文献

- [1] 李敏,于晓涛,黎莉,等. 我国鼠疫菌质粒种类及组成特征的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,1995,15(5):341-343.
- [2] Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, et al. Patho-genicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution[J]. Mol Microbiol, 1997,23(6):1089-1097.
- [3] Harrison PM, Gerstein M. Studying genomes through the Aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution[J]. J Mol Biol, 2002,318(5):1155-1174.
- [4] Perry RD, Straley SC, Fetherston JD, et al. DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5[J]. Infect Immun, 1998,66(10):4611-4623.
- [5] Lindler LE, Plano GV, Burland V, et al. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding *Murine toxin* and *Capsular antigen* [J]. Infect Immun, 1998,66(12):5731-5742.
- [6] Youngren B, Radnedge L, Hu P, et al. A plasmid partition system of the P1-P7 Par family from the pMT1 virulence plasmid of *Yersinia pestis* [J]. J Bacteriol, 2000,182(14):3924-3928.
- [7] Hu P, Elliott J, McCready P, et al. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis* [J]. J Bacteriol, 1998,180(19):5192-5202.
- [8] Welkos S, Pitt MLM, Martinez M, et al. Determination of the virulence of the pigmentation - deficient and pigmentation - / plasminogen activator-deficient strains of *Yersinia pestis* in non-human primate and mouse models of pneumonic plague [J]. Vaccine, 2002,20(17/18):2206-2214.
- [9] 董兴齐,叶枫,彭何碧,等. 云南省鼠疫菌质粒特征及地理分布[J]. 中华流行病学杂志,2001,22(5):344-347.
- [10] Schubert S, Rakin A, Karch H, et al. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans [J]. Infect Immun, 1998,66(2):480-485.
- [11] Putzker M, Sauer H, Sobe D. Plague and other human infections caused by *Yersinia* species [J]. Clin Lab, 2001,47(9/10):453-466.
- [12] Fursova NK, Krasil'nikova VM, Gremiakova TA. Recombinant plasmids carrying *Yersinia pestis* fra-operon: specific features of genetic transmission, inheritance and expression in attenuated enterobacterial cells [J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 1997(6):44-47.
- [13] 董兴齐,彭何碧,叶枫,等. 云南省鼠疫疫源地鼠疫菌质粒 DNA 种类及分子流行病学研究[J]. 地方病通报,1994,9(4):58-63.
- [14] 徐菲莉,杨子平,李蕾,等. 新疆鼠疫自然疫源地鼠疫菌质粒图谱分析[J]. 地方病通报,1997,12(1):12-15.
- [15] 林新勤,杨进业,梁江明,等. 广西隆林县首起鼠疫暴流行的特征及原因分析[J]. 中国地方病学杂志,2002,21(3):205-207.
- [16] 王自存,赵建华,张涛,等. 宁夏鼠疫菌质粒生物学特征研究[J]. 中华地方病学杂志,2003,22(5):407-409.
- [17] 辛有全,魏柏青,杨晓艳,等. 中国 11 个鼠疫自然疫源地鼠疫耶尔森菌质粒谱类型及其分布特征[J]. 中华预防医学杂志,2015,49(1):9-12.
- [18] 孙利仁,张春华,丛显斌,等. 鼠疫菌质粒及变异分析[J]. 中国地方病防治杂志,2002,17(3):185-186.
- [19] 彭何碧,董兴齐,叶枫. 鼠疫菌 65 Mdal 质粒自然缺失株的发现与讨论[J]. 中国地方病防治杂志,1993,8(4):210-211.
- [20] 刘合智,杜国义,白雪薇,等. 河北省鼠疫耶尔森菌毒力测定[J]. 中国地方病学杂志,2007,26(5):478-480.
- [21] 刘建芳. 鼠疫耶尔森菌的分子生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(11):994-997.
- [22] Pakhill J, Wren BW, Thomson NR, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague [J]. Nature, 2001,413(6855):523-527.

收稿日期:2017-05-15