

## 肠杆菌共同抗原的研究进展

沈雪刚, 杨玉莹, 李沛, 罗洪艳, 孔庆科

西南大学 动物医学院, 重庆 400715

沈雪刚, 杨玉莹, 李沛, 等. 肠杆菌共同抗原的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1081-1091.

Shen XG, Yang YY, Li P, et al. Advances in the research of enterobacterial common antigen. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1081-1091.

**摘要:** 肠杆菌共同抗原 (Enterobacterial common antigen, ECA) 是由多糖重复单元组成的多聚糖, 几乎表达于所有肠杆菌细菌外膜, 具有生物学功能。ECA 由多基因协同作用而合成, 这些基因在肠杆菌细菌基因组上成簇存在, 形成 ECA 抗原基因簇。ECA 是重要的毒力因子, 在肠杆菌细菌入侵宿主、体内存活等过程中有一定作用。同时, ECA 在维持细菌外膜渗透屏障、鞭毛表达、群集运动及抗胆酸胆盐等方面也有重要作用。此外, 锚定在细菌脂多糖核心区的 ECA<sub>LPS</sub> 还是细菌重要的表面抗原, 能激发宿主产生高水平抗体, 可以作为疫苗研究的靶点。结合笔者的研究, 文中对 ECA 纯化、基因结构和合成、免疫特性、生物学功能及应用等方面进行了综述。

**关键词:** 肠杆菌, 肠杆菌共同抗原, 生物合成, 免疫特性, 毒力

## Advances in the research of enterobacterial common antigen

Xuegang Shen, Yuying Yang, Pei Li, Hongyan Luo, and Qingke Kong

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** The enterobacterial common antigen (ECA) is a polysaccharide composed of polysaccharide repeats that are located in the outer membrane of almost all Enterobacteriaceae bacteria and has diverse biological functions. ECA is synthesized by the synergistic action of multiple genes that are present in clusters on the genome of Enterobacteriaceae bacteria, forming the ECA antigen gene cluster, an important virulence factor that plays a role in host invasion and survival of Enterobacteriaceae *in vivo*. ECA also plays an important role in the maintenance of the bacterial outer membrane permeability barrier, flagella gene expression, swarming motility, and bile salts resistance. In addition, ECA<sub>LPS</sub>, anchored in the core region of bacterial lipopolysaccharide, is an important surface antigen for bacteria, stimulating high levels of antibody production in the host and could be a target for vaccine research. This review summarizes ECA purification, genes involved in ECA biosynthesis, its immunological characteristics, biological functions and clinical applications.

**Keywords:** Enterobacteriaceae, enterobacterial common antigen (ECA), biosynthesis, immunological characteristics, virulence

**Received:** June 9, 2020; **Accepted:** December 21, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31970874).

**Corresponding author:** Qingke Kong. E-mail: kongqiki@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31970874) 资助。

网络出版时间: 2021-03-04

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210304.1107.001.html>

肠杆菌科细菌是革兰氏阴性细菌,其表面分布多种抗原,如K抗原、H抗原、O抗原及肠杆菌共同抗原(Enterobacterial common antigen, ECA)。前3种抗原在细菌定位、化学本质、生物合成及功能等方面均有深入研究,但ECA的系统研究还不够全面。本文主要综述肠杆菌科细菌ECA的研究进展。

Kunin等在尿道感染研究中,用间接血凝法测定大肠埃希氏菌*Escherichia coli*抗体时发现各种大肠埃希氏菌O血清型之间有交叉反应;抗大肠埃希氏菌O14(*Escherichia coli* O14, *E. coli* O14)抗血清不仅能被包被任何一种大肠埃希氏菌O-抗原的红细胞吸收,还保留与相应包被*E. coli* O14 O-抗原的红细胞发生红细胞凝集的能力<sup>[1-2]</sup>。因此,抗*E. coli* O14抗血清中有一种针对所有大肠埃希氏菌的共同抗体。除大肠埃希氏菌外,其他肠杆菌科细菌中也有这种交叉反应现象,但非肠杆菌科革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌中没有<sup>[2]</sup>。目前认为这是肠杆菌科细菌的共同特性,引起交叉反应的抗原是肠杆菌共同抗原ECA。它是肠杆菌科细菌的一种表面抗原,几乎存在于所有肠杆菌科细菌,如克雷伯氏菌属*Klebsiella*、变形杆菌属*Proteus*、沙门菌属*Salmonella*、痢疾志贺氏菌属*Shigella*、耶尔森菌属*Yersinia*及沙雷氏菌属*Serratia*等<sup>[3-6]</sup>,而非肠杆菌科一般没有,其中类志贺毗邻单胞菌*Plesiomonas shigelloides*除外<sup>[7]</sup>。此外,ECA在肠杆菌科细菌中具有交叉反应的抗原特性,也可以成为鉴定肠杆菌科细菌的依据。

ECA是肠杆菌家族细菌表面第二类主要糖脂结构,由三糖重复单元聚合而成,呈链状结构表达于细胞外膜,或呈链状和环状结构表达于细胞周质。它在肠杆菌科细菌中具有多样性,表现为组成多糖聚合物的三糖重复单位数量不同,以及其在细胞内存在形式不同。ECA多样性可能是在宿主免疫系统和其他环境因素的长期选择压力下逐步形成的,对肠杆菌科细菌的存活具有重大意

义。ECA是肠杆菌科细菌重要的毒力因子,比如在鼠伤寒沙门氏菌中,ECA突变株能显著降低细菌的毒力,并在宿主体内长时间停留,形成持续感染<sup>[8-9]</sup>。研究表明,ECA参与肠杆菌科细菌一系列生物学过程,如强化细菌抗胆盐能力和参与细菌群集运动<sup>[10-11]</sup>。此外,ECA具有一定的免疫原性,是一种重要的保护性抗原,其能诱导产生阻止和清除细菌入侵和感染的特异性抗体,因此可以作为疫苗研究的重要靶点。本文从ECA纯化、基因结构和合成、免疫特性、生物学功能及ECA作为免疫性抗原的应用前景等方面系统阐述ECA的研究进展。

## 1 ECA 纯化

为了更好地研究ECA的免疫和化学特性,需要对其分离纯化。ECA是多糖聚合物,与O-抗原多糖有一定相似性,在纯化方式上也可以借鉴O-抗原多糖。目前的分离纯化方法主要可以归结为两类:传统纯化法和经典纯化法。

### 1.1 传统纯化法

传统纯化法主要是热酚-水法和乙醇分级分离法两种。最早是Kunin等利用热酚-水法提取大肠埃希氏菌ECA,并进行了免疫和化学特性分析<sup>[2]</sup>。热酚-水法程序是将菌体悬浮于蒸馏水中,68℃保持15min,后加入适量的90%苯酚搅拌15min,待冷却到室温后离心(14 600×g, 20min),取出水相透析,再把透析后的溶液在50℃条件下浓缩,最后用10倍体积的乙醇沉淀,沉淀用水溶解后经DEAE纤维层析,再用氯化钠梯度洗脱。而乙醇分级分离法是依据分子量大小差异而能互相分离原理,利用超速离心或葡聚糖凝胶层析分离<sup>[12]</sup>。这两种方法虽能分离出ECA,但分离物中存有一定量的LPS,会影响ECA的化学分析。

### 1.2 经典纯化法

经典纯化法主要是丙酮-苦味酸-碳酸盐法和苯酚-水/苯酚-氯仿-石油醚结合法两种。丙酮-苦

味酸-碳酸盐法程序是先用丙酮灭活细菌,室温蒸馏水提取,混合苦味酸至 90%饱和,后加两倍体积的丙酮沉淀抗原物质。最后沉淀物溶于碳酸盐溶液中,经透析、浓缩,过葡聚糖凝胶柱,可分离出 ECA 组分,在此基础上可用凝胶电泳进一步纯化。而苯酚-水/苯酚-氯仿-石油醚结合法是对 Kunin 热酚-水法的优化,解决了 ECA 分离纯化不完全的问题<sup>[12]</sup>。程序是将热酚-水法得到的洗脱液悬浮于苯酚-氯仿-石油醚中,经超声处理后离心,50 °C下使氯仿和石油醚蒸发,后在苯酚中加蒸馏水,使苯酚中的 LPS 沉淀并离心去除,重复操作此步骤使 LPS 尽量去除。最后蒸馏水透析,冰干,悬浮于少量蒸馏水中,超速离心(105 000×g, 4 h),上清液即为纯化的 ECA。这两种方法纯化得到的 ECA 有更高的纯度,为目前为止最常用的方法。

在测定纯化 ECA 纯度及浓度前,通常用 DEAE-纤维素离子交换层析柱处理样品<sup>[12]</sup>。有几种方法可以检测纯化的 ECA 的纯度,包括血凝实验<sup>[13-14]</sup>、血凝抑制实验<sup>[12-13]</sup>、免疫扩散沉淀实验<sup>[12,15]</sup>等。同时,也有方法对 ECA 进行定量分析,如 ELISA 检测<sup>[14-15]</sup>。经典法纯化得到的产量较传统法相比少,通常为细菌干重的 0.3%,但是纯度

更高<sup>[12]</sup>。经典法纯化获得的样品具有抗原所有血清学特性,包括红细胞包被能力、与抗血清的血凝作用、对红细胞凝集系统的抑制作用以及高滴度抗 ECA 血清琼脂凝胶沉淀等<sup>[12,15]</sup>。与之不同,传统法所获得的样品纯度不够,如能与抗 O 抗原抗体发生轻微凝集。最后,在分离纯化步骤上,经典法较传统法更烦琐。

## 2 ECA 生物合成

### 2.1 ECA 的化学组成和结构

ECA 由寡糖重复单位组成,每个重复单位又由 3 个单糖组成,形成链状或环状结构。组成寡糖重复单位的 3 个单糖分别为 N-乙酰基-D-甘露糖醛酸、N-乙酰基-D-葡萄糖胺以及 4-乙酰氨基-4,6-二脱氧-D-半乳糖<sup>[12,16]</sup>。大部分细菌的 ECA 呈链状分布,只有少数几种细菌 ECA 是环状结构(ECA<sub>CYC</sub>)<sup>[6]</sup>,并且同一种细菌也可同时存在两种结构。链状与环状的寡糖重复单位数量不同,环状结构通常为 4-6 个寡糖重复单位<sup>[17-19]</sup>,链状结构则更多<sup>[17-19]</sup>。因此,ECA 在肠杆菌细菌中具有一定的差异性(图 1)。这种差异性有可能是由细菌不断进化、适应环境导致的。图 1 所示为 2 种不同结构的 ECA 化学结构。

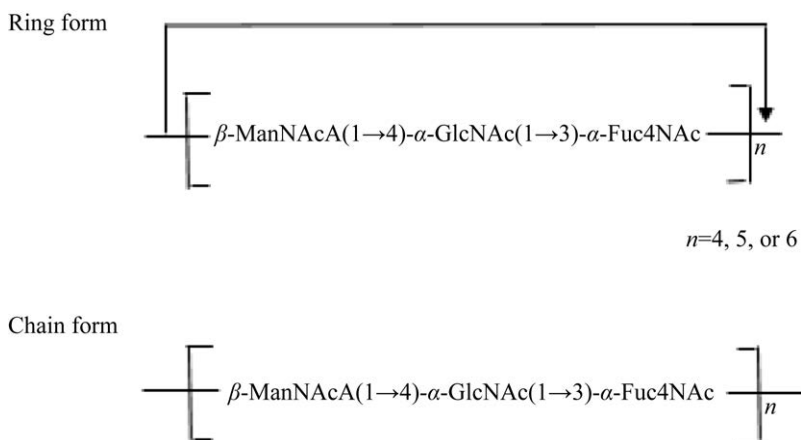


图 1 ECA 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of ECA. ManNAcA: N-acetyl-D-mannosaminuronic acid; GlcNAc: N-acetyl-D-glucosamine; Fuc4NAc: 4-acetamide-4,6-dideoxy-D-galactose.

## 2.2 ECA 合成相关基因

O-抗原多糖由寡糖重复单位组成, 每个重复单位通常由 2 到 8 个单糖组成。研究证实, 多基因协调调控 O-抗原多糖的合成, 这些基因成簇存在, 形成 O-抗原基因簇, 一般位于基因组的 *galF* 和 *gnd* 基因位点之间<sup>[20]</sup>。近年来研究表明, ECA 生物合成也是多基因协调作用的结果, 这些基因也成簇存在, 通常位于 *wecA* 和 *wecG* 基因位点之间<sup>[21]</sup>。有两套基因分别合成 O-抗原和 ECA, 且两套基因中有功能可以互换的基因, 如合成 O-抗原中的 Rhamnose (Rha) 及合成 ECA 中的 Fuc4NAc 都需要 RmlA、RmlB 两种酶, 编码这两种酶的基因都存在于 O-抗原基因簇和 ECA 基因簇中<sup>[8,22]</sup>。但也有研究表明, 删除 O-抗原基因簇或 ECA 基因簇中的某个基因不影响另一抗原合成, 如在沙门菌中敲除 *wecA* 基因, 沙门菌的 O-抗原合成不受影响<sup>[9]</sup>。ECA 合成基因簇一般由 3 类基因组成: 单糖合成基因、糖基转移酶基因以及三糖单位处理基因 (图 2)。单糖合成基因负责合成 ECA 中的单糖, 如甘露糖。糖基转移酶基因负责将合成的单糖转移到细菌内膜胞质侧的脂质载体十一异戊烯醇一磷酸 (Undecaprenyl-phosphate, Und-P) 上, 如起始的第一个单糖通过糖基转移酶 *WecA* 将 GlcNAc 转移并链接到 Und-P, 形成 Und-PP-GlcNAc (Lipid I)<sup>[23]</sup>; 而后三糖重复单位内其他单糖 N-乙酰基-D-甘露糖醛酸、4-乙酰氨基 4,6-二脱氧-D-半乳糖陆续被相应的糖基转移酶 *WecG* 和 *WecF* 转移并链接, 最后在内膜的胞质侧合成三糖重复单位 Und-PP-GlcNAc-ManNAcA-

Fuc4NAc (Lipid III)<sup>[24]</sup>。三糖单位处理基因负责合成 ECA 转运酶和聚合酶, 完成 ECA 的加工和转运。与大多数肠道细菌 O-抗原合成转运途径相似, ECA 合成转运也是通过 *Wzx/Wzy* 途径。在该途径中, 完整的三糖重复单位被翻转酶 *WzxE* 从内膜胞质侧翻转到内膜周质侧<sup>[25]</sup>, 在内膜周质侧被聚合酶 *WzyE* 聚合成多糖。聚合过程 *WzzE* 对多糖链长有一定的调控, 一般聚合为 14 个重复单位<sup>[26]</sup>。聚合后多糖链从脂质载体被转移到尚未识别的受体以磷酸二酯键与磷酸甘油酯连接<sup>[27]</sup>; 或多糖链被寡糖基转移酶 *WaaL* 转运到 LPS 的核心低聚糖区<sup>[28]</sup>; 形成完整的 ECA 分子, 最后完整的 ECA 被转移到外膜 (图 3)。但是目前对聚合后多糖链连接到磷酸甘油酯以及 ECA 被运送到外膜过程中涉及的基因和机制缺乏认知<sup>[29-30]</sup>。图 3 所示为链状结构 ECA 组装的生物合成途径。与此相似, 环状结构 ECA 三糖重复单元生物合成过程与链状结构相同<sup>[31]</sup>, 但是对后续环化的机理或催化该过程需要的酶则缺乏认识。

## 3 免疫特性

### 3.1 免疫原性形式

研究表明, ECA 的免疫原性与其在细菌中的存在形式有关, 不同存在形式的 ECA 之间免疫原性差异明显。ECA 在细胞内有链状和环状 (ECA<sub>CYC</sub>) 2 种结构, 且每种结构在细菌中存在的形式不同。其中链状结构在细胞内有 3 种形式: 游离态、LPS 共价结合态 (ECA<sub>LPS</sub>)、甘油磷脂共价结合态 (ECA<sub>PG</sub>); 而环状结构只有游离态<sup>[32]</sup>。

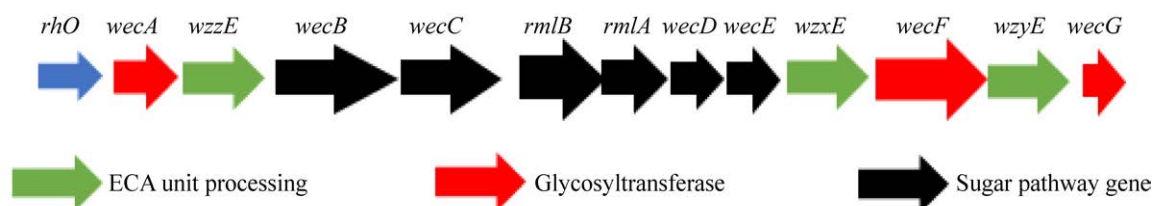


图 2 ECA 合成基因簇

Fig. 2 The gene clusters for the biosynthesis of ECA. Open arrows represent the location and orientation of putative genes.

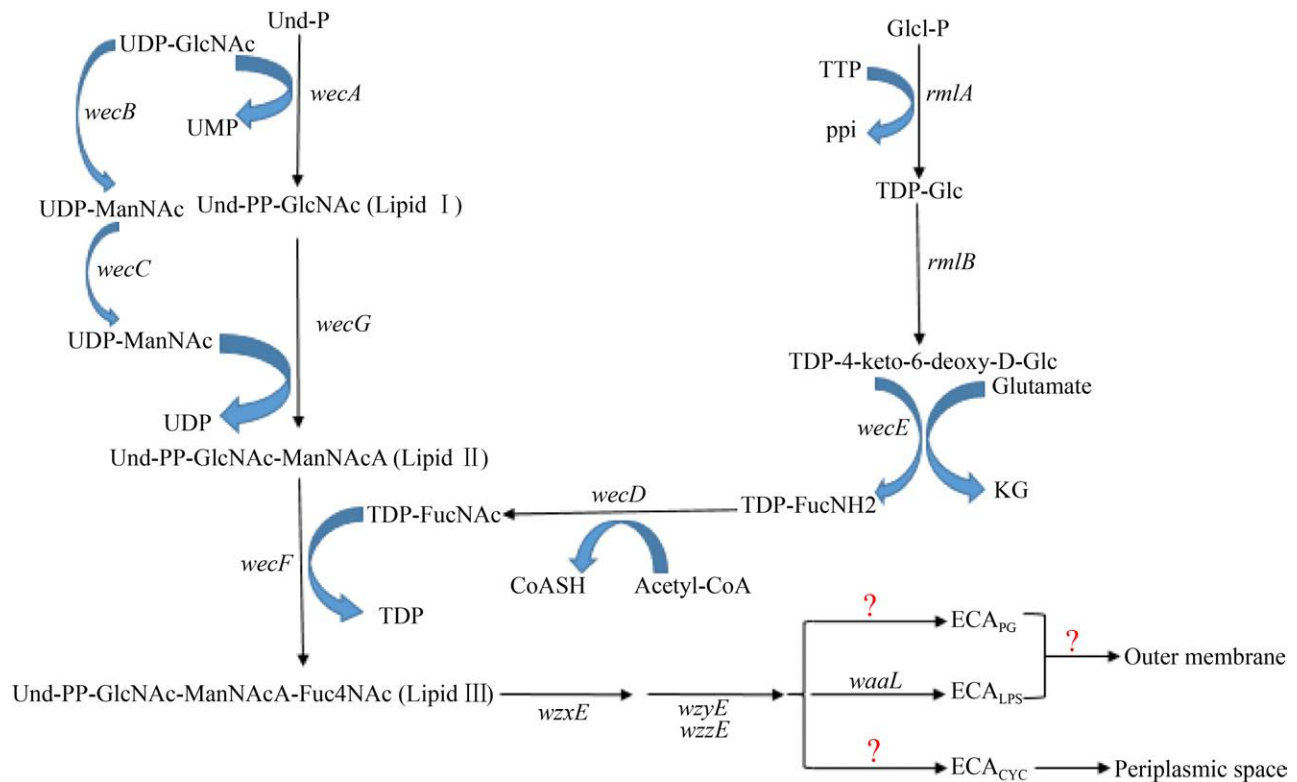


图3 ECA 组装的生物合成途径<sup>[31]</sup>

Fig. 3 Biosynthetic pathway for the assembly of ECA<sup>[31]</sup>. Enzyme reactions and genetic loci involved in ECA biosynthesis. The structural genes of enzymes that catalyze individual reactions are expressed in italics; Abbreviation: Und-P: undecyl monophosphate; Und-PP: undecyl triphosphate; TTP: thymidine triphosphate; PPi: inorganic pyrophosphate; KG: ketoglutarate; Acetyl-CoA: acetyl coenzyme A; CoASH: coenzyme A; Amino sugar alone is abbreviated as described above.

游离态存在的 ECA 不与任何其他组分联系,只游离于细菌周质空间。LPS 是革兰氏阴性菌的主要表面抗原,也是重要的毒力因子。它由 3 部分组成: O 特异性多糖(光滑型菌)、核心低聚糖、类脂 A (Lipid A)<sup>[33]</sup>。ECA<sub>LPS</sub> 形式特点是 LPS 中原 O 抗原占据的核心位置被 ECA 的 1-4 个三糖重复单位取代,共价结合于核心低聚糖类脂 A<sup>[34]</sup>。ECA<sub>PG</sub> 是大多数细菌的存在形式,其多糖链与磷脂酰甘油共价结合,定位在细菌表面。

虽然肠杆菌科细菌几乎都有 ECA,但只有少数细菌能产生 ECA 抗体,如 *E. coli* O14、O56、O124 和 O144<sup>[35]</sup>。此外,一些细菌的 R 突变株也有免疫原性,如大肠杆菌和志贺氏菌的 R1 和 R4 核心型突变株<sup>[28,36-37]</sup>。但是大肠杆菌 R2、R3 核

心型突变株、沙门氏菌 Ra 核心型突变株及光滑型菌株(S)无免疫原性。分析发现,有免疫原性菌株均存在 ECA<sub>LPS</sub> 形式,如 *E. coli* O14 和一些 R 型突变株。*E. coli* O14 菌体存在 2 种形式 ECA, ECA<sub>LPS</sub> 和 ECA<sub>PG</sub>,但前者数量上占优势。R 型突变株是一种粗糙型细菌,特点是细菌外膜 LPS 无 O 抗原多糖。其中 R1、R4 型原 O 抗原多糖被 ECA 共价取代,形成 ECA<sub>LPS</sub> 形式,具有免疫原性,而其他 R 型突变则无。研究证实,在 ECA 三种存在形式中只有 ECA<sub>LPS</sub> 具有很好的免疫原性,并能产生 ECA 特异性抗体。非 ECA<sub>LPS</sub> 形式 ECA 类似一种半抗原,单独不能诱发免疫反应。因此,人们通过化学方法将 ECA 与载体蛋白共价结合,制备多糖-蛋白结合物。研究证实,通过化学方法将

纯化后的 ECA 与碱性疏水性蛋白或细胞壁蛋白连接而制备的多糖-蛋白结合物,能激发兔子产生特异性抗体,证明其有良好的免疫原性<sup>[38]</sup>。

### 3.2 免疫保护能力

ECA 的发现提出了一种可能——用单一抗原免疫进而起到抵抗不同类型肠杆菌细菌感染的作用。一直以来,关于肠杆菌科的疫苗研制都比较艰难,主要原因是多血清型间的交叉保护效果不好,而 ECA 对于肠杆菌的疫苗研究具有一定的意义。

研究表明,抗 ECA 的兔抗体能促进多形核白细胞对大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的吞噬作用,而对铜绿假单胞菌无明显作用<sup>[39]</sup>。用加热灭活的鼠伤寒沙门氏菌上清液和乙醇可溶性 ECA 接种家兔,对引起实验性肾盂肾炎的奇异变形杆菌有免疫保护作用,对铜绿假单胞菌无保护作用<sup>[40]</sup>。所以这种作用被认为是特异性的,因为铜绿假单胞菌不是肠杆菌科家族的一员,缺乏 ECA。同时,将从大肠杆菌 0111 分离的乙醇可溶性组分 ECA 用于人体静脉免疫,结果表明抗 ECA 抗体滴度介于 160 和 1 280 之间,且免疫组的血清较未免疫组有更高的调理活性<sup>[41-42]</sup>。因此,ECA 抗体可能对含 ECA 的细菌感染具有保护作用。此外,一些实验结果也证实了 ECA 的免疫原性和 ECA 抗体明显的保护能力。将腹腔注射过从大肠杆菌 0111 分离的 ECA 或者 *E. coli* O14 的小鼠,用鼠伤寒沙门氏菌攻毒,显示了短暂但有统计学意义的明显保护作用<sup>[43-45]</sup>。相似的实验还有用包裹 ECA 的马红细胞对小鼠进行预处理以及用家兔 ECA 抗血清进行被动免疫,均可以观察到鼠伤寒沙门氏菌感染后的寿命有所延长<sup>[44,46]</sup>。这些实验结果在一定程度上肯定了 ECA 在免疫保护方面的能力,对于肠杆菌的疫苗开发具有一定的意义。

### 3.3 可能抑制 ECA 免疫原性的物质

近年来,对 ECA 免疫抑制效应也有初步了解。就目前研究而言,对 ECA 免疫原性有抑制作用的物质可以总结为 3 类:与 ECA 发生凝聚反应的

LPS、能与 ECA 复合的膜活性物质及其他有机酸类物质。实验表明,无免疫原性菌株在 85%乙醇溶液中溶解部分 (ECA) 具有免疫原性,能引发机体产生特异性抗体,而可溶于水部分 (LPS) 无免疫原性;若将两者混合,免疫原性显著下降<sup>[47]</sup>。若将两者分开,免疫原性又恢复。此外,一些膜活性化合物,如心磷脂、去污剂、甲基软脂酸及神经节苷脂等对 ECA 免疫原性也有一定的抑制作用,如每毫升含 54-540  $\mu\text{g}$  的心磷脂与 ECA 混合,能显著影响 ECA 的初次应答。最后,还有证据显示酸处理后的 ECA 免疫原性降低,如用乙酸处理 R1、R4 型突变体 (R1、R4 型均有免疫原性),R1 型 ECA 免疫原性几乎完全丧失,R4 型部分丧失。分析认为在无免疫原性菌株中,ECA 与 LPS 相互作用,发生凝聚反应,使 ECA 丧失免疫原性。而膜活性物质,如心磷脂,显示与双亲性物质 ECA 融合特性,两者复合会形成小的凝聚体,改变 ECA 分子大小,进而影响其免疫原性<sup>[3]</sup>。至于酸性物质对 ECA 免疫原性的影响,可能与 ECA 本身的化学组成有关。

综上,免疫抑制作用的产生,绝大部分与 ECA 发生凝聚有关;在某些情况下,凝聚形式的产生可能起决定性作用。另外,影响其本身化学组分稳定的物质对免疫原性也有一定影响。

## 4 生物学及临床意义

ECA 是肠杆菌家族重要的一类表面抗原,其在细菌毒力<sup>[48]</sup>、抗胆酸胆盐<sup>[10,49]</sup>、肠道定殖及体内存活,如泳动能力<sup>[50]</sup>、维持外膜渗透屏障<sup>[32]</sup>等诸多生物学过程中发挥显著作用。研究表明,野生鼠伤寒沙门氏菌在小鼠腹腔感染中比 ECA 突变体更具毒性<sup>[48]</sup>;沙雷氏菌  $\Delta wecA$  突变体和野生菌株引起脓疱所需的剂量,前者是后者 2.5 倍,证明其是细菌毒力因子<sup>[51]</sup>。缺乏 ECA 的泌尿系大肠杆菌在小鼠泌尿道感染的能力减弱等<sup>[52]</sup>;在鼠伤寒沙门氏菌中,ECA 突变株能够有效减毒并长时



间停留在宿主体内,形成持续感染<sup>[8-9]</sup>,这与笔者的实验数据吻合<sup>[8]</sup>;通过比较口服和腹腔注射  $\Delta wec$  突变株的毒力特性,发现口服较腹腔注射减毒更多<sup>[10]</sup>,分析 ECA 可能与粘膜相关免疫有关。有人比较沙门菌 ECA 突变株和野生株抗胆盐能力,结果表明前者较后者敏感,且发现  $\Delta wecD$  突变株较  $\Delta wecA$  突变株更敏感<sup>[10]</sup>。另外,分泌志贺毒素的 *E. coli* O157:H7 在有机酸条件下生长需要 ECA 的充分表达,这可能是该食源性致病菌的重要致病机制<sup>[53]</sup>。群集运动与单个细胞运动不同,不仅要形态变化,还需细胞外物质(润湿剂),如表面活性剂或脂多糖,以增加表面湿度,从而促进移动<sup>[11]</sup>。有证据支持 ECA 对细菌群集的促进,如 Inoue 等发现 ECA 增强了大肠杆菌 K-12 的群集效应,其原因可能是 ECA 在大肠杆菌中发挥润湿剂的作用<sup>[50]</sup>。此外, ECA 与细菌鞭毛合成联系紧密<sup>[54]</sup>。Castelli 等发现沙雷氏菌  $\Delta wec$  突变株鞭毛合成受阻;可能的机制是  $\Delta wec$  突变株磷脂酶(PhIA)的分泌或者表达受到抑制<sup>[55]</sup>,导致鞭毛组装阶段阻断,进而鞭毛合成受阻<sup>[56]</sup>。还有, Mitchell 等发现  $ECA_{Cyc}$  在维持外膜渗透屏障中也有积极作用,其活性由 YhdP 蛋白调控<sup>[32]</sup>。因此, ECA 的有无对细菌的生物学特性有重要影响,可见其在细菌完成生活史的过程中具有无可替代的作用。

一般情况下,在正常或由肠杆菌科细菌引起急性感染的人群中,血清 ECA 抗体滴度较低<sup>[2]</sup>,如因肠杆菌科引起的急性尿路感染、大肠杆菌或沙门氏菌引起的肠炎等。有研究表明,反复静脉注射肠杆菌光滑型野生菌株到家兔体内,只产生很低的 ECA 抗体滴度,而注射粗糙型(R型)突变株能产生较高的抗体滴度<sup>[42]</sup>。由于肠杆菌感染通常是由光滑菌株引起的,这也就解释了为什么在这类患者的血清中仅出现低滴度的 ECA 抗体。与之相反,在志贺氏菌病、腹膜炎和慢性尿道感染人群中却又有较高的滴度<sup>[57-61]</sup>。研究发现,光滑型志贺氏菌(S型)正常状态下易转化为粗糙型

(R型);而 R 型志贺氏菌具有免疫原性,能产生高滴度的 ECA 抗体,这或许是志贺氏菌病患者血清中出现高滴度抗体的原因。此外,腹膜炎患者体内也可产生高滴度抗体,且体内 ECA 抗体能持续两年以上<sup>[61]</sup>,原因或许也是出现 R 型突变。还有,在慢性肾盂肾炎病人体内也发现 ECA 抗体滴度持续显著增高。日本学者 Saito I 提出,检测 ECA 抗体水平,对这类疾病的诊断有一定参考价值<sup>[62]</sup>。同时也有研究者认为,即使是在低 ECA 抗体滴度的情况下,对 ECA 抗体的检测也可能比对 O 抗体检测能更好地反映尿路大肠杆菌感染的血清学参数<sup>[63]</sup>。大多数肠杆菌科细菌是重要的致病菌,尤其是易对器官及腹腔造成感染,因此,肠杆菌共同抗原 ECA 有可能发展成为此菌科疾病诊断的一种特有抗原。

## 5 总结与展望

ECA 是肠杆菌科细菌细胞膜的重要组成部分,研究其基因结构与功能对剖析肠杆菌科细菌的致病机理有重要意义。摸索优化 ECA 纯化方法,对研究其化学组成与特性有推动作用。一些化学特性已被阐明,如 ECA 呈负电荷(pH 6)<sup>[3]</sup>、具有热稳定性(120 °C)<sup>[11]</sup>、耐胰蛋白酶或链霉菌蛋白酶及抗原性耐碱。分析 ECA 的分子基础、化学成分及生物合成过程,有利于揭示细菌体内不同形式 ECA 的产生机制,也有利于通过分子生物学方法改变其寡糖聚合度,掌握 ECA 结构与其免疫原性之间的关系。随着研究的深入, ECA 生物合成过程虽被发现,但聚合后多糖如何链接到磷酸甘油酯、ECA 如何被运送到外膜及环状 ECA 如何环化等仍未研究清楚。近年来,随着测序技术的发展, ECA 抗原基因簇已被揭示,这对研究细菌基因与毒力之间的关系有重要意义。虽然现在已发现基因突变株影响细菌毒力,但仍局限于个别细菌或者个别基因,还需要对更多细菌及基因进行广泛而深入的研究。此外,对生物学功能的

研究能很好剖析细菌生长、运动及感染途径等之间的联系, 从而对 ECA 毒力有客观全面的认识。另外, 鉴于 ECA 的免疫原性, 如何精准改造 ECA 基因使得细菌减毒的同时又保持其免疫原性; 鉴于 ECA 是肠杆菌共同抗原特性, 如何发挥抗 ECA 抗体在细菌分型及疾病检测中的作用应成为未来的重要研究内容。

预防性疫苗是控制疾病最有效的手段。某些肠杆菌科细菌严重危害人类及动物的健康, 凸显了疫苗开发与疾病诊断的紧迫性。安全有效是筛选疫苗候选株首要考虑的, 笔者的研究表明, 基于阿拉伯糖调控 *rfbB* 基因表达的突变株是很好的尝试<sup>[8]</sup>。此外, 多糖-蛋白结合疫苗也是一种可选的方向, 如共价结合 ECA 与碱性疏水性蛋白能激发免疫保护反应。虽然载体蛋白能提高 ECA 免疫原性, 但可能会引起超负荷或免疫抑制。因此筛选安全有效的载体蛋白也是疫苗多糖-蛋白结合疫苗研发关键。考虑 ECA 抗体水平的差异, 尤其集中在几种疾病中。因此, 利用 ECA 抗体水平差异的特点, 开发用于检测这几种疾病的有效试剂盒也是可行的。

## REFERENCES

- [1] Whang HY, Neter E. Immunological studies of a heterogenetic enterobacterial antigen (Kunin). *J Bacteriol*, 1963, 84(6): 1245-1250.
- [2] Kunin CM, Beard MV, Halmagyi NE. Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of *E. coli* and other Enterobacteriaceae. *Exp Biol Med*, 1962, 111(1): 160-166.
- [3] Mayer H, Schmidt G. Chemistry and biology of the enterobacterial common antigen (ECA)//Arber W, ed. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1979, 85: 99-153.
- [4] Ramia S, Neter E, Brenner DJ. Production of enterobacterial common antigen as an aid to classification of newly identified species of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. *Int J Syst Evolut Bacteriol*, 1982, 32(4): 395-398.
- [5] Böttger EC, Jürs M, Barrett T, et al. Qualitative and quantitative determination of enterobacterial common antigen (ECA) with monoclonal antibodies: expression of ECA by two Actinobacillus species. *J Clin Microbiol*, 1987, 25(2): 377-382.
- [6] Kuhn HM, Meier-Dieter U, Mayer H. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol Rev*, 1988, 4(3): 195-222.
- [7] Kuhn HM, Basu S, Mayer H. Comparison of enterobacterial common antigen from different species by serological techniques. *Eur J Biochem*, 1987, 162(1): 69-74.
- [8] Huang C, Liu Q, Luo YL, et al. Regulated delayed synthesis of lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen of *Salmonella* Typhimurium enhances immunogenicity and cross-protective efficacy against heterologous *Salmonella* challenge. *Vaccine*, 2016, 34(36): 4285-4292.
- [9] Gilbreath JJ, Dodds JC, Rick PD, et al. Enterobacterial common antigen mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium establish a persistent infection and provide protection against subsequent lethal challenge. *Infect Immun*, 2012, 80(1): 441-450.
- [10] Ramos-Morales F, Prieto AI, Beuzoón CR, et al. Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bileresistance and virulence. *J Bacteriol*, 2003, 185(17): 5328-5332.
- [11] Harshey RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 249-273.
- [12] Männel D, Mayer H. Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen. *Eur J Biochem*, 1978, 86(2): 361-370.
- [13] Mc Laughlin JC, Dominique GJ. The immunologic role of the ethanol-soluble enterobacterial common antigen versus experimental renal infection. *Immunol Commun*, 1974, 3(1): 51-75.
- [14] Basu S, Kuhn HM, Neszmelyi A, et al. Chemical characterization of enterobacterial common antigen isolated from *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029. *Eur J Biochem*, 1987, 162(1): 75-81.



- [15] Lugowski C, Romanowska E. Enterobacterial common antigen: isolation from *Shigella sonnei*, purification and immunochemical characterization. *Eur J Biochem*, 1978, 91(1): 89-97.
- [16] Lugowski C, Romanowska E, Kenne L, et al. Identification of a trisaccharide repeating-unit in the enterobacterial common-antigen. *Carbohydr Res*, 1983, 118: 173-181.
- [17] Dell A, Oates J, Lugowski C, et al. The enterobacterial common-antigen, a cyclic polysaccharide. *Carbohydr Res*, 1984, 133(1): 95-104.
- [18] Erbel PJA, Barr K, Gao NG, et al. Identification and biosynthesis of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2004, 185(6): 1995-2004.
- [19] Paunova-Krasteva TS, Pavlova VA, De Castro C, et al. Cyclic enterobacterial common antigens from *Escherichia coli* O157 as microbe-associated molecular patterns. *Can J Microbiol*, 2014, 60(3): 173-176.
- [20] Wang XY, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*, 2010, 49(2): 97-107.
- [21] Mäkelä PH, Schmidt G, Mayer H, et al. Enterobacterial common antigen in *rfb* deletion mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1976, 127(3): 1141-1149.
- [22] Li P, Liu Q, Haug C, et al. Reversible synthesis of colanic acid and O-antigen polysaccharides in *Salmonella Typhimurium* enhances induction of cross-immune responses and provides protection against heterologous *Salmonella* challenge. *Vaccine*, 2017, 35(21): 2862-2869.
- [23] Barr K, Nunes-Edwards, Rick PD. *In vitro* synthesis of a lipid-linked trisaccharide involved in synthesis of enterobacterial common antigen. *J Bacteriol*, 1989, 171(3): 1326-1332.
- [24] Rahman A, Barr K, Rick PD. Identification of the structural gene for the TDP-Fuc4NAc: lipid II Fuc4NAc transferase involved in synthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 2001, 183(22): 6509-6516.
- [25] Rick PD, Barr K, Sankaran K, et al. Evidence that the *wzxE* gene of *Escherichia coli* K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 16534-16542.
- [26] Barr K, Klena J, Rick PD. The modality of enterobacterial common antigen polysaccharide chain lengths is regulated by *o349* of the *wec* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1999, 181(20): 6564-6568.
- [27] Kuhn HM, Neter E, Mayer H. Modification of the lipid moiety of the enterobacterial common antigen by the "Pseudomonas factor". *Infect Immun*, 1983, 40(2): 696-700.
- [28] Schmidt G, Mannel D, Mayer H, et al. Role of a lipopolysaccharide gene for immunogenicity of the enterobacterial common antigen. *J Bacteriol*, 1976, 126(2): 579-586.
- [29] Rinno J, Golecki JR, Mayer H. Localization of enterobacterial common antigen: immunogenic and nonimmunogenic enterobacterial common antigen-containing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1980, 141(2): 814-821.
- [30] Acker G, Bitter-Suermann D, Meier-Dieter U, et al. Immunocytochemical localization of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* cells. *J Bacteriol*, 1986, 168(1): 348-356.
- [31] Kajimura J, Rahman A, Rick PD. Assembly of cyclic enterobacterial common antigen in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 2005, 187(20): 6917-6927.
- [32] Mitchell AM, Srikumar T, Silhavy TJ. Cyclic enterobacterial common antigen maintains the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* in a manner controlled by YhdP. *mBio*, 2018, 9(4): e01321-18.
- [33] Xiao XR, Sankaranarayanan K, Khosla C. Biosynthesis and structure-activity relationships of the lipid a family of glycolipids. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 40: 127-137.
- [34] Gozdziwicz TK, Lugowski C, Lukasiewicz J. First evidence for a covalent linkage between enterobacterial common antigen and

- lipopolysaccharide in *Shigella sonnei* phase II ECA<sub>LPS</sub>. J Biol Chem, 2018, 293(29): 11652-11653.
- [35] Kunin CM, Beard MV. Serological studies of O antigens of *Escherichia coli* by means of the hemagglutination test. J Bacteriol, 1963, 85(3): 541-548.
- [36] Mayer H, Schmidt G. Haemagglutinins against a common Enterobacteriaceae antigen in *E. coli* R 1-antisera. Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskrankh Hyg, 1971, 216(3): 299-313.
- [37] Mayer H, Schmidt G, Whang HY, et al. Biochemical basis of the immunogenicity of the common enterobacterial antigen. Infect Immun, 1972, 6(4): 540-544.
- [38] Kuhn HM, Adamus G, Romanowska E, et al. Effect of proteins on the immunogenicity of enterobacterial common antigen. Infect Immun, 1981, 34(2): 373-377.
- [39] Domingue GJ, Neter E. Inhibition by lipopolysaccharide of immune phagocytosis of latex particles modified with common antigen of enteric bacteria. Proc Soc Exp Biol Med, 1966, 121(1): 133-137.
- [40] Domingue G, Salhi A, Rountree C, et al. Prevention of experimental hematogenous and retrograde pyelonephritis by antibodies against enterobacterial common antigen. Infect Immun, 1970, 2(2): 175-182.
- [41] Van Oss CJ, Ambrus JL, Gorzynski EA, et al. The opsonin response of human subjects to common enterobacterial antigen. Immunol Commun, 1972, 1(1): 69-75.
- [42] Gorzynski EA, Van Oss CJ, Ambrus JL, et al. Hemagglutinin response of human subjects to common enterobacterial antigen. Infect Immun, 1972, 5(4): 625-626.
- [43] Braun V. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1975, 415(3): 335-377.
- [44] Gorzynski EA, Krasny SA. Effect of erythrocytes treated with enterobacterial common antigen on experimental *Salmonella typhimurium* infection of mice. Med Microbiol Immunol, 1975, 161(3): 163-170.
- [45] Galanos C, Lüderitz O, Westphall O. Preparation and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides. Eur J Biochem, 1971, 24(1): 116-122.
- [46] Gorzynski EA, Ambrus JL, Neter E. Effect of common enterobacterial antiserum on experimental *Salmonella typhimurium* infection of mice. Proc Soc Exp Biol Med, 1971, 137(4): 1209-1212.
- [47] Suzuki T, Gorzynski EA, Neter E. Separation by ethanol of common and somatic antigens of Enterobacteriaceae. J Bacteriol, 1964, 88(5): 1240-1243.
- [48] Valtonen MV, Larinkari UM, Plosila M, et al. Effect of enterobacterial common antigen on mouse virulence of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun, 1976, 13(6): 1601-1605.
- [49] Monack MD, Bouley DM, Falkow S. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1<sup>+/+</sup>* mice and can be reactivated by IFN $\gamma$  neutralization. J Exp Med, 2004, 199(2): 231-241.
- [50] Inoue T, Shingaki R, Hirose S, et al. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol, 2007, 189(3): 950-957.
- [51] Banks KE, Fortney KR, Baker B, et al. The enterobacterial common antigen-like gene cluster of *Haemophilus ducreyi* contributes to virulence in humans. J Infect Dis, 2008, 197(11): 1531-1536.
- [52] Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockatell CV, et al. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. Mol Microbiol, 2002, 45(4): 1079-1093.
- [53] Barua S, Yamashino T, Hasegawa T, et al. Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol, 2002, 43(3): 629-640.
- [54] Castelli ME, Fedrigo GV, Clementín AL, et al. Enterobacterial common antigen integrity is a

- checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*. J Bacteriol, 2008, 190(1): 213-220.
- [55] Givskov M, Eberl L, Christiansen G, et al. Induction of phospholipase-and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. Mol Microbiol, 1995, 15(3): 445-454.
- [56] Schmiel DH, Young GM, Miller VL. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. J Bacteriol, 2000, 182(8): 2314-2320.
- [57] Neter E, Merrin C, Surgalla MJ, et al. *Shigella sonnei* bacteremia. Unusual antibody response from immunosuppressive therapy following renal transplantation. Urology, 1974, 4(2): 198-200.
- [58] Sanford BA, Thomas VL, Forland M, et al. Immune response in urinary tract infection determined by radioimmunoassay and immunofluorescence: serum antibody levels against infecting bacterium and Enterobacteriaceae common antigen. J Clin Microbiol, 1978, 8(5): 575-579.
- [59] Tamayo FG, Carrillo J, Sosa MS. Enterobacterial common antigen in the urine from children with cancer. Arch Invest Med (Mex), 1989, 20(2): 137-142.
- [60] Männel D, Mayer H. Serological and immunological properties of isolated enterobacterial common antigen. Eur J Biochem, 1978, 86(2): 371-379.
- [61] Griffiths EK, Jewett TC Jr, Neter E. Duration of antibody responses to common enterobacterial and O antigens of children with pyogenic peritonitis. Infection, 1976, 4(2): 1-4.
- [62] Saito I. Serological study of chronic pyelonephritis, especially on the diagnostic value of the estimation of enterobacterial common antibody response. Fukushima J Med Sci, 1967, 14(1): 45-53.
- [63] Thomsen OF, Hjort T. Antibodies against *E. coli* O-antigens and common enterobacterial antigen in kidney-transplant recipients. Comparison of antibody findings with evidence of urinary tract infection. Acta Pathol Microbiol Scand B, 1977, 85B(6): 455-461.

(本文责编 郝丽芳)