

盘基网柄菌——研究致病机制的宿主模型

陈颖盈 侯连生*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 盘基网柄菌作为致病菌宿主模型的研究主要有: 筛选致病菌株及相应突变菌株毒性; 鉴别对致病菌易感性和抗性的突变细胞宿主; 宿主细胞的有效标记、已完成的基因组计划以及宿主细胞与致病菌间信号转导通路的相互作用; 这些都表明盘基网柄菌是致病机制研究的理想宿主模型。

关键词 宿主模型; 致病机制; 盘基网柄菌

致病菌能否感染宿主不仅取决于宿主与致病菌的生理条件, 更是两者基因组互相作用的结果。以往对致病机制的研究大都集中于致病菌, 近年来随着对模式生物的深入探究, 包括盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)、秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*), 发现致病菌感染宿主的能力不仅受细菌致病力的影响, 更取决于宿主的易感性^[1], 特别是感染人的致病菌也能感染模式生物, 便促使人们从分子水平来研究后者在致病机制中所扮演的角色。实验发现致病菌与盘基网柄菌共同培养后, 毒性会进一步增强; 随着培养时间的增加, 致病菌又会产生一系列新的毒理特性, 重新适应环境^[2]。可见盘基网柄菌是某些致病菌毒性发展的温育者, 因此可通过建立宿主模型来分析这些致病菌的致病机制。本文主要讨论盘基网柄菌与绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、分支杆菌(*Mycobacterium spp.*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)和嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)这四类环境致病菌的相互作用以及可以用于相关研究的宿主模型的选择。

1 盘基网柄菌是理想的宿主模型

1.1 盘基网柄菌细胞的特点

盘基网柄菌是“社会变形虫”, 24.5 °C时生长情况良好, 可吞噬多种颗粒物包括乳滴、酵母、良性细菌及不同的致病菌。实验室内常喂以克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*): 营养充足时盘基网柄菌二分裂繁殖; 饥饿时单细胞分泌 cAMP 信号诱导形成多细胞体, 最后分化成由柄细胞和孢子细胞组成的子实体。

由于盘基网柄菌是单倍体基因组, 相比于其他模式生物在基因操作方面具有更大的优势。单基因的突变不会被等位基因所掩盖, 即使是隐性性状也很容

易鉴别, 拥有非常丰富的突变型细胞^[3]。将完成的基因组测序工作(<http://dictybase.org>)无疑将加速这些领域的研究。现估计全基因组大小为 34~40 Mb, 6 条染色体携带约 11 000 个基因^[4], 内含子含量少且具有高等生物特有的剪接点, 因此可广泛用于生物化学、细胞生物学和分子遗传学的研究。可通过目标基因破坏、RNA 干扰沉默基因、抗致敏、基因移位、绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)融合、限制性内切酶介导整合(REMI)等技术来获得突变细胞。

全基因组测序结果和细胞易处理性为致病机制的研究创造了许多机会。其细胞骨架表面识别位点、信号转导系统及运动方式与哺乳动物细胞十分相似; 其吞噬过程与巨噬细胞极其相似, 有趋药性^[5,6]; 两种细胞的膜运输、内吞转运和分选功能也十分相近^[7,8], 因此所得研究结果具有可比性。下面我们就盘基网柄菌野生型细胞和突变型细胞在致病菌毒性有效筛选系统中的应用价值展开讨论。

1.2 筛选毒性菌株的宿主模型

绿脓杆菌是一种在临床上容易造成感染的环境致病菌, 当宿主防御系统功能受损时, 会引发患者其他组织的感染。这是烧伤患者和囊性纤维化病人受感染的主要原因。它具有广谱的毒性因子, 可感染多种宿主, 包括植物、昆虫和线虫。绿脓杆菌有自己独特的代谢途径和分泌机制。平板实验发现绿脓杆菌至少利用两种侵入途径感染盘基网柄菌细胞, 即细胞密度感受(quorum sensing)系统和毒性因子分泌 III 型系统^[3]。将宿主和不同的致病菌菌株在营养琼脂平板上进行共培养, 结果毒性菌株杀死宿主留下完

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-10-12

国家自然科学基金资助项目(No.30470200)

* 通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

整菌苔; 无毒菌株则被吞噬留下噬菌斑。该实验可鉴定不能致病宿主的菌株。分析发现, 无毒菌株有 3 个位点发生了突变——分泌 III 型的一个结构组分 (PscJ)、细胞外毒素 U (ExoU) 和 *las* 细胞密度感受毒性调节的转录激活子 (LasR), 其中 *exoU* 和 *lasR* 突变菌株可通过引入 *exoU* 和 *lasR* 的重组质粒来恢复菌株毒性^[3], 可见这对于绿脓杆菌毒性因子的释放起到关键作用。

用肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 指示盘基网柄菌吞噬作用的平板实验证明, 当绿脓杆菌的 *rhl* 细胞密度感应系统表达调控因子 *rhlR* 时, 强毒性绿脓杆菌 PAO1 菌株才会抑制宿主生长, 而此时 *las* 系统并不起作用^[9]。这实际上是胞外毒性因子鼠李糖脂诱导了宿主细胞的溶解。绿脓杆菌能表达多种具有多重耐药性的主动外排系统, 其中由转录激活子 MexT 正向调控的 MexEF-OprN 外排系统降低菌体内弹性蛋白酶、绿脓菌素和鼠李糖脂的生成量。用喹啉诺氟沙星 (quinolone norfloxacin) 处理绿脓杆菌 PAO4009 菌株得到 *nfxC* 型突变细胞, 其 MexEF-OprN 外排系统过表达^[10]。该外排泵的作用底物可能是 *rhl* 细胞密度感应系统的自诱导分子 (autoinducer), 所以 *nfxC* 型突变细胞会消耗大量自诱导分子, 并导致毒性因子生成量大大减少^[11]; 结果该突变细胞不能抑制盘基网柄菌的生长。Pukatzki 等^[3] 和 Cosson 等^[9] 曾采用昂贵费时的急性肺炎大鼠模型来研究鼠李糖脂与 *las* 细胞密度感受系统的相互作用, 尽管两者的相关数据因实验材料而存在一些差异, 但结果再次证实盘基网柄菌野生型细胞完全适合作筛选强毒性菌株的模型。

1.3 致病毒性增强的相关组分的作用分析

宿主防御系统能力下降会导致机会感染, 如艾滋病、外伤或接受免疫抑制治疗的病人。经典的病例是环境分支杆菌感染和隐球菌脑膜炎。利用各种突变细胞可以分析相关组分与致病菌毒性增强之间的关系。

研究发现, 盘基网柄菌细胞溶解形成小泡的过程与人体内巨噬细胞相似^[12]。成熟白细胞的溶酶体膜上有天然抗性相关巨噬蛋白 (natural resistance-associated macrophage protein 1, Nramp1)^[13]。盘基网柄菌的 Nramp1 (分子量为 53 kDa, 有 11 个跨膜区^[13]) 与人体内铁离子转运蛋白同源, 其多态变体与肺结核及麻风病易感性的增强有关。实验证明盘基网柄菌 Nramp1 通过一个依赖 ATP 的过程将金属离子转运出吞噬溶酶体^[13]。侵袭实验中虽然宿主 Nramp1 缺失

细胞吞噬鸟分支杆菌 (*Mycobacterium avium*) 的能力下降, 但致病菌在宿主细胞内的生长能力却有所增加, 故盘基网柄菌 Nramp1 缺失细胞比野生型细胞更适用于宿主模型的建立^[12]。

引起鱼类类肺结核和人类皮肤感染的海分支杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 也能在盘基网柄菌内生长繁殖。筛选得到一种在宿主细胞内的存活能力下降的突变株; 究其原因是基因 *mag24-1* 中插入了一个片段, 该基因具多态 GC 重复序列, 编码富含甘氨酸的蛋白质^[7]。在盘基网柄菌冠蛋白缺失细胞中致病菌生长能力增加, 可见宿主冠蛋白是海分支杆菌胞内生长的抑制因子^[14]。因此盘基网柄菌冠蛋白缺失细胞更适于担当宿主模型的角色。

新型隐球菌是一种荚膜真菌, 多糖荚膜是其重要的毒性因子。在无免疫应答的病人体内, 真菌到处散布并引发危及生命的脑膜炎。荚膜菌株能在人体巨噬细胞和盘基网柄菌细胞内存活, 而荚膜缺陷株无法存活^[11]; 荚膜菌株被宿主吞噬后, 对实验小鼠的毒性明显增加。毒性增加受到荚膜大小和菌体黑色素合成的影响: 荚膜越大黑色素合成量越大, 荚膜菌株的毒性越大^[15]。有趣的是, 将隐球菌荚膜缺陷株与盘基网柄菌 VII 型肌球蛋白合成缺陷细胞共培养时, 会引发致病菌增殖并导致宿主细胞死亡^[11]。

上述结果说明: 从健康宿主转到体弱宿主可使无毒菌株转变成机会致病菌。因此研究机会感染机制的重点是鉴别保护宿主的细胞结构。当务之急是筛选突变细胞来研究这些问题。盘基网柄菌 LvsB (large volume sphere) 突变细胞能模拟溶酶体缺陷相关的白细胞异常白化综合征 (Chediak-Higashi syndrome), 和 Nramp1 突变细胞以及下文提到的突变细胞都能成为该研究的理想宿主模型^[16]。

2 嗜肺军团菌感染途径的宿主模型

嗜肺军团菌感染盘基网柄菌的模型已得到较为广泛的应用。军团菌广泛存在于水生环境中, 在不同种类自由生活的原生动细胞内都能繁殖生长。如果吸入粉尘状军团菌, 会患上严重的非典型肺炎——军团病 (Legionnaires' disease)。当人受到感染后, 军团菌会入侵肺泡巨噬细胞和上皮细胞并在细胞内生长繁殖^[17,18], 其繁殖能力决定引发军团病的能力^[10]。军团菌通过 IV 型 Dot/Icm 分泌系统来阻止细胞吞噬, 其机制是释放细菌效应分子调控宿主细胞内吞作用的成熟。利用盘基网柄菌突变细胞、军团菌突变株、

GFP标记的致病菌和宿主蛋白的研究发现宿主细胞因子在军团菌摄入和生长过程中有重要作用^[19]。

2.1 感染模型的建立

分析军团菌在盘基网柄菌内的生长情况、亚细胞结构定位和不同菌株各种活性的研究发现军团菌毒性野生株生活在与细胞膜结合的泡状结构内, 泡外还附着大量的粗面内质网^[1,7]。军团菌的鞭毛蛋白(FlaA)、巨噬细胞传染性增强因子(Mip)、选择性 σ 因子(FliA)突变株和*dot/icm*突变菌株的生长率显示盘基网柄菌和巨噬细胞两者的感染结果具有可比性^[7,20], 因此可用盘基网柄菌作为军团菌感染特异性研究的宿主模型。

2.2 军团菌的摄入

宿主是以传统方式吞噬军团菌, 涉及G蛋白和磷酸脂酶C(PLC)通路^[19]。此外细胞内钙浓度、细胞骨架相关蛋白(冠蛋白、 α -辅肌动蛋白/细丝蛋白、DAip1、Lim C/D、villidin)以及内质网的钙结合蛋白(钙网蛋白和钙连接蛋白)都能特异性地影响吞噬细菌的过程^[19]。为了生存和繁殖, 军团菌必需对吞噬体的转运特性进行修饰, 以防止吞噬体与溶酶体融合并促进吞噬体的酸化^[21]。在感染后期, 与吞噬泡相关的两种钙结合蛋白被修饰, 现推测它们可能影响钙浓度的空间分布或影响与感染有关的蛋白质的正确折叠。

2.3 吞噬泡的发生

GFP标记细菌和盘基网柄菌溶酶体特异标记物抗体的共定位实验研究吞噬成熟途径。感染30 min后, 被内吞的细菌并未和单抗染色的宿主细胞共定位。由IV型Dot/Icm系统分泌的选择性 σ 因子FliA和细菌毒性因子(FlaA、Mip等)对引发军团菌毒性有关键作用^[20,22,23]。多*dot*突变株(*dotA*, *dotB*, *dotE*, *dotG*, *dotH*, *dotI*, *dotO*, *icmVWX*)无法在宿主内生长留下噬菌斑^[7]。

内质网是细胞器中主要的Ca²⁺储存结构, 两种钙结合蛋白的浓度变化都会影响内质网的功能^[19]。被内吞的军团菌转运至吞噬小体内进行生长, 在小体表膜周围结合有粗面内质网, 但缺少与胞吞途径相关的组分^[7]。军团菌在吞噬小体内繁殖能力的强弱影响其致病能力, 所以搞清内质网对致病菌在宿主细胞内存活能力的影响, 在溶酶体内军团菌如何进行复制等一些热点问题对致病机制有重要作用, 这些都可通过盘基网柄菌模型的研究得到解决^[24]。

2.4 军团菌的胞内生长及释放

宿主细胞经过重新程序化后阻断了转运泡成熟途径, 不能把军团菌运输到溶酶体内, 转染的军团菌分化成高度复制形式^[25]; 这个精细调控的过程具有多性状交互表达的特征, 即营养充足时个体以繁殖为主并抑制菌体离开宿主, 而营养缺乏时个体停止繁殖并迅速离开宿主细胞^[22]。尽管宿主分化信号尚不太清楚, 但可确定某些宿主细胞因子正向调控宿主内军团菌的生长率, 包括钙结合蛋白、细胞骨架相关蛋白、I型肌球蛋白(*myoA/B*)以及G-肌动蛋白螯合蛋白(*profilin*)^[1,7,20]。

GFP标记盘基网柄菌*Nramp1*的研究发现, 在军团菌的入侵过程中*Nramp1*将金属离子转运到胞饮小泡和吞噬小体表面并修饰这些结构。它们的过表达可防止宿主细胞受到军团菌的感染^[13]; 军团菌内存在多种机制来削弱*Nramp1*的这种作用, 因此*nramp1*基因剔除的宿主细胞是一个很理想的宿主模型^[13]。

人体巨噬细胞和不同卡氏棘阿米巴(*Acanthamoeba castellanii*)的实验结果提示军团菌可能采用不同机制杀死并逃离哺乳动物或原生动细胞^[26]。感染12 h后, 巨噬细胞和多棘阿米巴(*Acanthamoeba polyphaga*)中分别有71%和74%含军团菌的吞噬小体破裂, 但质膜仍保持完整^[27]。此外军团菌还可诱导巨噬细胞凋亡或坏死, 后者涉及成孔泄漏的细胞毒性。在盘基网柄菌内, 军团菌利用成孔活性逃出并杀死细胞或利用胞吐小泡逸出细胞^[17]。显微水平发现宿主细胞的自溶也可能是军团菌释放的一种途径^[1]。尽管盘基网柄菌会经历某种凋亡, 但和释放机制关系不大。利用盘基网柄菌胞吐突变细胞将有助于了解致病菌释放的胞吐途径。

3 展望

盘基网柄菌作为研究不同致病菌致病机制的宿主模型还存在一定局限性, 例如温度超过27 °C时盘基网柄菌生长缓慢, 但某些致病菌在37 °C甚至更高的温度环境中才表达毒性, 因此温度可能成为相关研究的瓶颈。与哺乳动物细胞一样, 盘基网柄菌也有一些冗余蛋白质, 例如肌动蛋白结合蛋白的功能重叠(围绕初生吞噬体的肌动蛋白结合蛋白在嗜肺军团菌被吞噬后会立即解体), 这也应引起研究者的注意。因此只有将这些问题考虑进去, 建立的宿主模型才更具灵活性。功能基因组学和蛋白质组学方面的分析研究有助于更全面的理解致病菌与宿主之间的关系; 高通量筛选技术为转录组和蛋白质关系图的精细研

究铺平了道路;低温电子断层X光扫描三维影像技术将为被感染的盘基网柄菌宿主细胞和分子结构的研究搭起桥梁,这些都将成为致病机制研究提供坚实的分子基础。

参考文献(References)

- [1] Hägele S *et al.* *Cell Microbiol*, 2000, **2**: 165
- [2] Greub G *et al.* *Clin Microbiol Rev*, 2004, **17**: 413
- [3] Pukatzki S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 3159
- [4] Eichinger L *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 1941
- [5] Noegel AA *et al.* *J Cell Sci*, 2000, **113**: 759
- [6] Rupper A *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 2001, **1525**: 205
- [7] Solomon JM *et al.* *Trends Microbiol*, 2000, **10**: 478
- [8] Cardelli J. *Traffic*, 2001, **2**: 311
- [9] Cosson P *et al.* *J Bacteriol*, 2002, **184**: 3027
- [10] Köhler T *et al.* *J Bacteriol*, 2001, **183**: 5213
- [11] Steenbergen JN *et al.* *Infect Immun*, 2003, **71**: 4862
- [12] Skriwan C *et al.* *Int J Med Microbiol*, 2002, **291**: 615
- [13] Peracino B *et al.* *Traffic*, 2006, **7**: 22
- [14] Solomon JM *et al.* *Infect Immun*, 2003, **71**: 3578
- [15] van Duin D *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**: 3394
- [16] Harris E *et al.* *Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 656
- [17] Gao LY *et al.* *Environ Microbiol*, 2000, **2**: 79
- [18] Köhler R *et al.* *Infect Immun*, 2003, **71**: 4389
- [19] Fajardo M *et al.* *Microbiology*, 2004, **150**: 2825
- [20] Heuner K *et al.* *Int J Med Microbiol*, 2003, **293**: 133
- [21] Lu H *et al.* *Cell Microbiol*, 2005, **7**: 995
- [22] Molofsky AB *et al.* *Mol Microbiol*, 2004, **53**: 29
- [23] Hilbi H *et al.* *Mol Microbiol*, 2001, **42**: 603
- [24] Roy CE *et al.* *J Cell Biol*, 2002, **158**: 415
- [25] Haas A. *Mol Membr Biol*, 1998, **15**: 103
- [26] Swanson MS *et al.* *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**: 567
- [27] Molmeret M *et al.* *Infect Immun*, 2004, **72**: 4040

Dictyostelium discoideum as a Host Model in Pathogenesis Research

Ying-Ying Chen, Lian-Sheng Hou*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract As a host model for pathogens, *Dictyostelium discoideum* has been studied in following fields: the use of *Dictyostelium* wild-type cells as screening system for virulence of pathogens and their corresponding mutants; the use of *Dictyostelium* mutant cells as identifying host susceptibility and resistance to infection; the availability of host cell markers, the completion of the genome project, and the interaction of signaling pathways between host and pathogens, which qualified *Dictyostelium* for the study of fundamental cellular processes of pathogenesis.

Key words host model; pathogenesis; *Dictyostelium discoideum*

Received: May 8, 2006 Accepted: October 12, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470200)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn