

[12] Tim H. Holmstrom, Ingo Schmitz, Thomas S. Soderstrom, et al., 2000, *EMBO*, 19(20): 5418 - 5428.

[13] Jean - Marc Jacque, Angela Mann, Herve Enslin, et al., 1998, *EMBO*, 17(9): 2607 - 2618.

细菌利用宿主肌动蛋白细胞骨架进入非吞噬细胞的机制

张湘燕 郭晓奎 刘晶星

(上海第二医科大学病原生物学教研室 上海 200025)

随着现代细胞微生物学发展,细菌与宿主细胞之间的相互作用机制日益成为研究热点。细胞骨架是由蛋白丝构成的网状结构,决定细胞的形状、运动,同时也是信号转导和膜结构变化的场所。肌动蛋白是细胞骨架中的重要成分,在一些信号刺激下,肌动蛋白丝可发生聚合或重排。细菌正是利用肌动蛋白细胞骨架(actin cytoskeleton)对不同信号的反应性,以不同方式进入细胞。非吞噬细胞通常无法吞入细菌之类较大颗粒,于是一些细菌通过分泌一些因子,模拟真核细胞信号颗粒跨膜转导信号,引起宿主细胞局部肌动蛋白丝聚合或重排,诱使非吞噬细胞吞噬;另一些细菌则通过分泌特异的毒性因子作用于肌动蛋白丝以及与肌动蛋白细胞骨架相关的蛋白,这种作用方式为研究细菌致病提供了新方向。

目前的研究表明,细菌进入非吞噬细胞有两种机制,均为特异的细菌基因产物通过模拟或干扰宿主细胞正常信号,调节宿主细胞骨架中肌动蛋白丝的活性,利用宿主细胞骨架进入细胞。

一、拉链式机制(zipper mechanism)

细菌接触宿主细胞后,与宿主相应受体结合,激活宿主细胞信号转导系统,引发肌动蛋白细胞骨架重排。随后宿主膜包裹于菌体周围,细菌似陷入其中,此过程称为拉链式机制。采用此方式的典型致病菌为耶尔森菌和产单核细胞李氏菌(如图 1 所示)。

耶尔森菌外膜蛋白侵袭素(invasin),可与宿主细胞膜上含有 α_5, β_1 两个亚单位的整合素紧密结合。细菌与宿主细胞接触面上 β_1 整合素分子聚集,激活酪氨酸激酶,引起细胞骨架肌动蛋白重排,在细菌表面迅速形成由网格蛋白(clathrin)构成的网状结构,细菌随即陷入由宿主细胞膜形成的胞内膜包含体中,膜包含体周围包绕着肌动蛋白聚合体和其它蛋白如踝蛋白(talin)等。此为耶尔森菌进入细胞的拉链式机制。细菌侵袭素与宿主细胞整合素结合

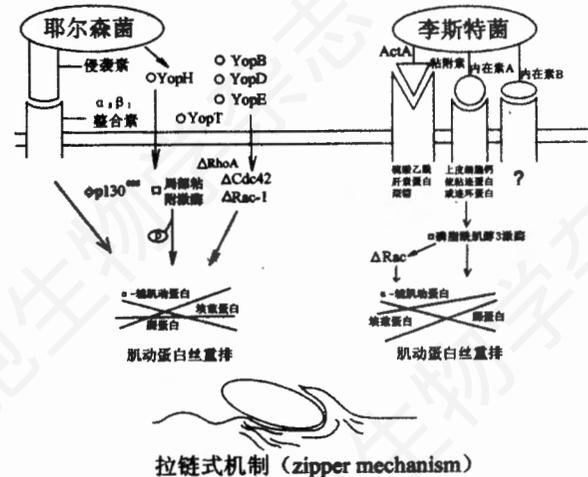


图 1 细菌利用宿主肌动蛋白细胞骨架侵入非吞噬细胞的拉链式机制

(此图主要引自文献[29],并经作者改动)

注:图中 Cdc42, Rac-1, Rho 为 GTP 酶 Rho 家族成员。

使细菌粘附于细胞上,两者的亲和力比整合素与其自然配体的亲和力高约 100 倍^[1]。整合素 β_1 亚单位的细胞内部分与宿主肌动蛋白结合蛋白如踝蛋白和 α -辅肌动蛋白(α -actinin)结合,故推测在细菌进入过程中,整合素可能与宿主细胞骨架直接作用,引起肌动蛋白重排。此外,由细菌毒性质粒编码的 YadA 黏附素亦可与 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合。耶尔森菌利用宿主细胞上的整合素进入细胞的过程与网格蛋白介导的细胞内吞作用相似^[2]。动物实验中,耶尔森菌通过侵袭素或 YadA 黏附素附着和侵入集合淋巴结处的微褶细胞(M 细胞),进而侵入上皮细胞^[3]。参与耶尔森菌侵袭的细菌毒力因子 Yops 是由质粒编码由 III 型分泌系统 Ysc 分泌^[4]。一些 Yops 直接影响细菌与宿主细胞的作用,如 YopE, YopH, YopM 和 YpkA(YopO)参与将效应分子跨膜运送至宿主细胞质中^[5]。YopH 作为酪氨酸磷酸化酶使黏附部位的 p130^{Cas}和局部黏附激酶(FAK)去磷酸化, YopE 激活低分子量 GTP 酶 Rho 家族成员包括

Cdc42 和 Rho,引起肌动蛋白细胞骨架重排^[6],另外 YopE 具 GTP 酶活性,可抑制低分子量 GTP 酶 Rac,通过阻断 Cdc42 激活 Rac 的途径而选择性地调节信号转导^[7]。目前发现一种新的细菌毒力因子 YopT,用缺乏 5 种已知 Yop 效应因子但产生 YopT 的突变株感染 HeLa 细胞,引起细胞骨架改变及肌动蛋白丝结构破坏^[8]。YopT 抑制 RhoA 与细胞效应分子作用可能是其作用机制^[9]。细菌进入细胞过程中需要激活宿主细胞信号转导系统,研究显示酪氨酸激酶抑制剂抑制耶尔森菌进入细胞。

产单核细胞李氏菌在培养细胞中,通过拉链式机制侵袭多种细胞。在最初的黏附阶段,细菌表面蛋白 ActA 参与黏附素与宿主细胞硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulphate proteoglycan) 受体结合。ActA 可联结 2 个肌动蛋白单体,与内源性 WASP 家族蛋白共同激活细胞内 Arp2/3 复合物,后者在肌动蛋白骨架重排中发挥枢纽作用^[10,11]。在肠上皮细胞中,细菌分泌一种称为内在素 A (Internalin A, InlA) 的细菌因子,InlA 受体为上皮细胞钙依粘连蛋白 (E-cadherin) 或相关的连环蛋白 (catenin)^[12]。两者结合后激活酪氨酸激酶和脂激酶,引起宿主细胞肌动蛋白重排,细胞膜形成伪足样结构,将细菌包裹入细胞中。若 InlA 基因中插入转座子可破坏李斯特菌的侵袭力,而在质粒上加入 InlA 基因可恢复细菌侵袭力。上皮细胞钙依粘连蛋白分子中胞质区可与细胞骨架成分作用,其跨膜区和胞外区结构域与黏附有关。研究表明,表达上皮细胞钙依粘连蛋白的细胞如 CaCo-2 或转染了鸡 L-CAM 的成纤维细胞允许一些通常不致病但表达内在素的细菌或包被了内在素的乳胶珠进入细胞,证实内在素与宿主细胞上皮细胞钙依粘连蛋白对于细菌进入细胞是必需的^[13]。另一种细菌因子 InlB,为产单核细胞李氏菌侵入培养细胞如肝细胞,CHO 细胞和 HeLa 细胞所必需^[14]。但尚未证实宿主细胞上有 InlB 受体。InlB 可引发信号转导过程中相关蛋白酪氨酸磷酸化,激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3-K)。PI3-K 激活可引发宿主肌动蛋白重排,其具体过程不明。但已证实 PI3-K 的脂质代谢产物直接参与肌动蛋白聚合。同时,PI3-K 可激活 Rac,引起肌动蛋白重排。细胞松弛素 D 通过抑制肌动蛋白聚合而阻断细菌进入细胞,但细胞松弛素 D 并不阻断 PI3-K 激活,表明 PI3-K 可能作用于细胞骨架信号系统上游。

细菌进入非吞噬细胞的拉链式机制中,通常需与宿主细胞黏附分子如整合素 (耶尔森菌侵袭素

受体)或上皮细胞钙依粘连蛋白 (李斯特菌内在素受体)结合,激活信号转导级联模式,引起宿主细胞肌动蛋白细胞骨架重排。此过程中宿主细胞膜不形成明显皱突,因而不引发肌动蛋白细胞骨架大规模重排。研究显示,耶尔森菌进入细胞数分钟后宿主细胞即恢复正常形态^[11]。

二、触发式机制 (trigger mechanism)

触发式机制比拉链式机制更为复杂,有更多细菌成分参与其中。细菌与宿主细胞接触后,迅速引发大规模的细胞骨架反应,胞质膜下的肌动蛋白聚合物伸出片状或伪足样结构,将膜包裹的细胞外细菌卷入细胞内。此过程又称为微胞饮,形成胞内膜包含体。与拉链式机制相比,触发式机制中宿主细胞形态发生明显改变。典型代表为志贺菌和沙门菌 (如图 2 所示)。

目前研究最多的是志贺菌中福氏志贺菌的侵袭机制。福氏志贺菌对宿主细胞的侵袭与其携带的 220kb 的毒性质粒有关,此质粒上侵袭相关基因的表达受质粒及细菌染色体上多个基因调控。与宿主细胞表面接触后,细菌可通过脂多糖与宿主细胞整合素受体结合而黏附于细胞上。同时,福氏志贺菌膜上的 III 型分泌系统 Mxi-spa (membrane expression of ipa-surface presentation of antigen) 被激活。其中 mxi-spa 基因编码蛋白分泌系统^[15],ipa 基因编码分泌蛋白包括志贺菌侵袭所必需的 IpaA, IpaB, IpaC 和 IpaD^[16]。Ipa 复合物与宿主细胞膜 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合,激活信号转导系统,宿主细胞膜形成伪足状突起,将细菌包裹形成膜包含体,细菌随即进入细胞。参与细菌与上皮细胞黏附的细菌黏附素尚不清楚。近来发现福氏志贺菌的一种刚果红结合蛋白具有黏附素作用,但其上皮细胞受体仍未知^[1]。宿主细胞膜在细菌黏附部位形成皱突,其中富含肌动蛋白以及相关蛋白:纽带蛋白 (vinculin),埃兹蛋白 (ezrin)和丝束蛋白 (plastin),局部黏附激酶,桩蛋白 (paxillin), α -辅肌动蛋白和踝蛋白等。而细菌因子 IpaA 可直接连结并激活纽带蛋白,引起 α -辅肌动蛋白和踝蛋白在膜上聚集,形成细菌侵袭所必需的局部黏附样结构^[17]。细菌分泌至胞外的 IpaB 和 IpaC 形成可溶性复合物,与宿主细胞膜作用后,在膜上形成孔结构,使其他 Ipa 蛋白能够进入宿主细胞质中^[18]。细菌与宿主细胞膜上 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合后,IpaB-IpaC 复合物引起上皮细胞形成伪足样结构。同时,IpaB-IpaC 复合物激活低分子量 GTP 酶 Rho

家族成员(包括 Cdc42, Rac 和 Rho),引起宿主细胞骨架重排。其中 IpaC 可能通过激活 Cdc42,引起宿主细胞膜肌动蛋白聚合形成伪足样结构^[19]。实验显示 GTP 酶 Rho 活性抑制剂可抑制宿主细胞膜形成突起,从而阻断志贺菌侵袭。而沙门菌不受 Rho 活性抑制剂影响^[1]。另一参与志贺氏菌进入细胞过程中宿主肌动蛋白细胞骨架重排的信号分子为酪氨酸酶 pp60^{c-src}, c-src 使其主要底物之一的皮质肌动蛋白(cortactin)磷酸化,后者是一类皮质区肌动蛋白细胞骨架成分,为肌动蛋白结合蛋白,可能参与激活 c-src 酪氨酸蛋白激酶以及激活肌动蛋白细胞骨架的过程。近来报道,皮质肌动蛋白可通过调节 Arp2/3 复合物活性作用于肌动蛋白细胞骨架^[11]。

沙门菌与志贺菌一样,与宿主细胞作用后引起宿主细胞膜形成伪足样结构,通过触发式机制进入宿主细胞。沙门菌通过甘露糖特异的 I 型菌毛与肠上皮细胞黏附,细菌表面形成侵袭结构(invasome),而不形成侵袭结构的突变株可黏附但无法进入上皮细胞^[1]。已知沙门菌许多基因位点与侵袭有关,其中有至少 25 个位点位于染色体上,组成了 40kb 的毒力岛目前已知为 SPI-1 (Salmonella pathogenicity island 1)。SPI-1 中的一个位点 inv/spa 编码细菌效应蛋白如 SptP 及其他因子如 SipA, SipB, SipC 和 SipD (与 IpaA, IpaB, IpaC 和 IpaD 具同源性,故推测其作用机制与后者相似),它们可激活宿主细胞信号转导途径,引起肌动蛋白细胞骨架重排或解离^[20]。SptP 可激活 Cdc42, Rac-1。同时,其 C 端与酪氨酸磷酸化酶具同源性故具很强的逆转活性,在细菌进入细胞后又可在上游调控这些低分子量 GTP 酶活性^[21,22],通过抑制 Cdc42 和 Rac,又可恢复已重排的肌动蛋白细胞骨架^[23]。另外 Spt 可与波形蛋白(vimentin)作用,引起细胞膜形成伪足样结构^[24]。SipA 和 SipC 可直接与宿主细胞肌动蛋白结合,SipC 使肌动蛋白聚集成束状或索状^[25],SipA 则抑制肌动蛋白丝解聚^[26],两者使宿主细胞膜形成皱突而利于细菌进入细胞,此过程不需要宿主细胞效应分子参与,表明沙门菌可不经宿主信号转导途径直接作用于宿主细胞骨架^[27]。另一种效应分子 SopE 通过激活 GDP/GTP 核苷酸转换而激活 Cdc42, Rac-1,从而扩展宿主细胞膜皱突^[21,28]。另一些 SPI-1 基因编码 III 型分泌系统及其分泌的蛋白。沙门菌毒力因子主要来自 III 型分泌系统。其中重要的细菌外膜成分 InvG,可在外膜上形成通道供效应分子通过。此过程与一种转运系统有关,涉

及到膜蛋白 SpaP, SpaQ, SpaR 和 SpaS。胞质膜蛋白 InvA 功能类似 InvG。转运过程所需能量由 ATP 酶 InvC 供给。另一些蛋白参与调控分泌系统及其分泌过程,如 InvE。细菌黏附后激活宿主细胞信号转导系统,引起 PI3-K 水平升高。在培养的 HeLa 细胞中,沙门菌激活上皮细胞生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶,受体激活后又激活有丝分裂原活性蛋白酶,使磷脂酶 A2(PLA2)活化。PLA2 产物可影响宿主细胞肌动蛋白细胞骨架改变。如 PLA2 产物之一花生四烯酸通过与 Rho 家族中调节蛋白如 Cdc42 作用,影响肌动蛋白调节蛋白。实验证实,转染对信号不反应的突变型 Cdc42 可阻断沙门菌进入细胞。另外花生四烯酸的衍生物十二烷基三烯(LTD4)可通过引起细胞内钙离子浓度增高而激活细胞信号转导途径,从而改变肌动蛋白细胞骨架。同时,许多肌动蛋白调节因子如胶溶素蛋白(gelsolin),绒毛蛋白(villin)和丝束蛋白均受钙离子调节。另一些重要途径如沙门菌侵袭 HeLa 细胞过程中,激活细胞中 PLC- γ 形成三磷酸肌酸(IP3),引起细胞内库中钙离子释放,从而引起明显的肌动蛋白细胞骨架变化(如图 2)。

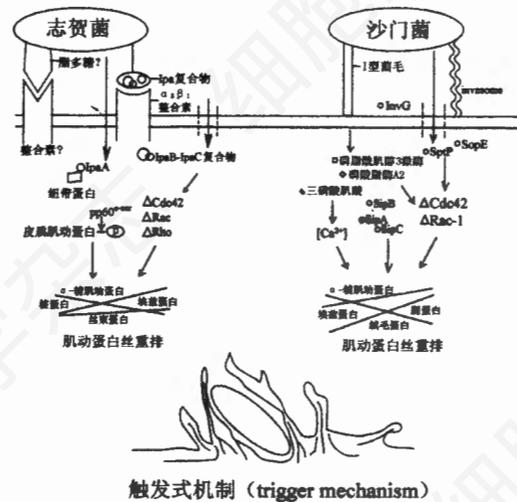


图 2 细菌利用宿主肌动蛋白细胞骨架侵入非吞噬细胞的触发式机制

(此图主要引自文献[29],并经作者改动)

注:图中 Cdc42, Rac-1, Rho 为 GTP 酶 Rho 家族成员。

细菌进入非吞噬细胞的拉链式机制和触发式机制在形态学和原理上存在差异,但一般均需胞外细菌刺激宿主细胞信号跨膜转导进而激活肌动蛋白聚合,同时激活宿主细胞内已有的信号转导级联模式。两种机制中均有细菌基因表达的特异性毒力因子参与。宿主细胞肌动蛋白细胞骨架重排后,细菌以不

同方式进入细胞,细菌与宿主细胞之间的相互作用始终贯穿其中。同时,在进入宿主细胞过程中细菌所分泌的一些毒力因子已成为进行细胞微生物学研究的工具,有助于人们进一步探索肌动蛋白细胞骨架系统的功能,同时也为发现新一代抗菌药物靶点提供了方向^[29]。

摘 要

细菌进入非吞噬细胞的机制包括拉链式机制和触发式机制。细菌的效应因子或毒力因子激活宿主细胞信号转导系统,引起肌动蛋白细胞骨架改变,从而进入非吞噬细胞。拉链式机制中,细菌通常需与宿主细胞相应受体结合,且不引发宿主细胞骨架大规模重排;触发式机制中,有更多细菌成分参与其中,且迅速引发大规模宿主细胞骨架反应,引起宿主细胞形态发生明显改变。两种机制中均贯穿着细菌因子与宿主细胞肌动蛋白细胞骨架成分之间的相互作用。这些机制为研究细菌致病以及探索新一代抗菌药物提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Brian H, et al., 1999, *Cellular Microbiology*:223-272.
- [2] Van Nhieu G T, et al., 1996, *J Biol Chem*, **271**:7665.
- [3] Clark M A, et al., 1998, *Infect Immun*, **66**(3):1237-43.
- [4] Cornelis G R, et al., 1997, *Mol-Microbiol*, **23**(5):861-7.
- [5] Hartland E L, et al., 1998, *FEMS-Microbiol-lett*, **162**(2):207-13.
- [6] Hall A. 1998, *Science*, **279**:509-15.
- [7] Andor A, et al., 2001, *Cell Microbiol*, **3**(5):301-10.
- [8] Iriarte M, et al., 1998, *Mol-Microbiol*, **29**(3):915-29.
- [9] Sorg I, et al., 2001, *Infect Immun*, **69**(12):7535-43.
- [10] Zalevsky J, et al. 2001, *J Biol Chem*, **276**(5):3468-75.
- [11] May RC. 2001, *EMBO J*, **20**(19):2131-9.
- [12] Mengaud J, et al., 1996, *Cell*, **84**:923-32.
- [13] Cossart P, et al., 1998, *EMBO-J*, **17**(14):3797-806.
- [14] Dramsi S, et al., 1997, *Infect Immun*, **65**:1615-25.
- [15] Cornelis G R, et al., 2000, *Annu-Rev-Microbiol*, **54**:735-74.
- [16] Sansonetti P J, et al., 1999, *Clin Infect Dis*, **28**(3):466-75.
- [17] Van Nhieu G T, et al., 1997, *EMBO J*, **16**:2717-29.
- [18] Davis R, et al., 1998, *Biochim-Biophys-Acta*, **1429**(1):45-56.
- [19] Van Nhieu G T, et al., 1999, *EMBO J*, **17**:3249-62.
- [20] Fu Y X, et al., 1998, *Mol Microbiol*, **27**:359-68.
- [21] Hardt W D, et al., 1998, *Cell*, **93**:815-26.
- [22] Fu Y X, et al., 1999, *Nature*, **284**:1322-28.
- [23] Zhou D. 2001, *Microbes Infect*, **3**(14-15):1293-8.
- [24] Murli S, et al., 2001, *Cell Microbiol*, **3**(12):795-810.
- [25] Hayward R D, et al., 1999, *EMBO J*, **18**:4956-34.
- [26] Zhou D, et al., 1999, *Science*, **283**:2092-95.
- [27] McGhie E J, et al., 2001, *EMBO J*, **20**(19):2131-9.
- [28] Danika L, et al., 1999, *Emerg Infect Dis*, **5**:216-23.
- [29] Finlay B B, et al., 1997, *Science*, **276**(5313):718-25.

单个活细胞分析技术进展*

肖松山 范世福

(天津大学生物医学工程与科学仪器系 天津 300072) (中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

李小兵 江丕栋

一、单个活细胞分析的重要意义

一切生物从单细胞到高等动、植物都是由细胞组成的,细胞是生物体和生命活动的基本单位。因此,研究生命活动过程的本质,需要从生命有机体的基本单位——细胞着手。1665年英国物理学家 Robert Hooke 发现细胞结构,将人类的认知视野史无前例地带进细胞这个微观世界^[1]。随着生命科学的不断发展,人们不仅可以在“死”的状态下研究细胞的结构和组成,而且已经开始在“活”的状态下研

究细胞的功能以及生命活动现象。细胞的新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传递、跨膜运输等生命活动都与细胞“活”的状态有关^[2]。研究活细胞的性质是研究生命活动规律和本质的关键所在。单个活细胞分析对于研究细胞的结构和功能、生命活动的规律和本质、疾病的诊断、药物的设计具有十分重要的意义,甚至有望回答生命的起源等一些悬而未决的问题。单个活细胞分析不论对细胞生物学基本理

* 国家重点自然科学基金资助项目(397301760-II)。