

布鲁氏菌胞内生存机制研究进展*

王玉飞 陈泽良 黄留玉**

(中国人民解放军军事医学科学院疾病预防控制中心 北京 100071)

摘要 布鲁氏菌是一种胞内寄生菌,可以在专业和非专业吞噬细胞内生存和复制。当布鲁氏菌与细胞接触时,细菌可以通过受体分子进入细胞。布鲁氏菌在细胞内首先定位于早期吞噬体,然后在胞内改变其运输方向,最终抵达其胞内复制部位内质网,开始大量复制。这种复制既不影响细胞的基本功能,也不诱导细胞的损伤。主要综述了布鲁氏菌对细胞的侵袭、胞内运输和复制的相关研究进展。

关键词 布鲁氏菌,细菌侵袭,胞内运输,胞内复制

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1218-04

Advances in the Research on the *Brucella* Intracellular Life*

WANG Yu-Fei CHEN Ze-Liang HUANG Liu-Yu**

(Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract *Brucella* organisms are facultative intracellular bacteria capable of surviving inside professional and non-professional phagocytes. Upon cell contact the bacteria is internalized via receptor molecules. Once inside cells, *Brucella* localizes in early phagosomes, where it avoids fusion with late endosomes and lysosomes. Then, the bacterium redirects its trafficking to autophagosomes and finally reaches the endoplasmic reticulum, the replicating niche. Once inside the endoplasmic reticulum, *Brucella* extensively replicates without restricting basic cellular functions or inducing damage to cells. Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes and the molecular determinants involving *Brucella* intracellular life are reviewed in this article.

Key words *Brucella*, Bacterial invasion, Intracellular trafficking, Intracellular replication

布鲁氏菌是一种胞内寄生菌,可以在专业和非专业吞噬细胞内生存和复制。Hela 细胞和 Vero 细胞被广泛的应用于布鲁氏菌在非专业吞噬细胞内的生存机制研究,而鼠 J774.A、鼠腹膜巨噬细胞、鼠骨髓细胞、人单核细胞则被应用于布鲁氏菌在专业吞噬细胞内的生存机制研究。布鲁氏菌没有典型的外毒素、Ⅲ型分泌系统等毒力元件,胞内生存复制能力是其致病的主要武器,因此,了解布鲁氏菌在细胞内的生存繁殖及其分子机制是理解布鲁氏菌致病性的关键^[1]。近几年来,许多重要的发现都在一定程度上说明了布鲁氏菌与宿主细胞之间的相互作用,人们对布鲁氏菌的胞内生存机制也有了一定的了解和认识。本文主要综述了布鲁氏菌对巨噬细胞和上皮细胞的侵袭、胞内运输和复制的相关研究进展,以期对布鲁

氏菌的胞内生存能力有进一步的了解和认识。

1 布鲁氏菌对细胞的侵袭作用

布鲁氏菌对细胞的侵染方式主要依赖于细胞的类型,此外还与使用的菌株有关。实验表明:布鲁氏菌对专业和非专业吞噬细胞的侵染方式存在明显的差异。布鲁氏菌与非专业吞噬细胞的结合力较低,主要表现为每个被感染的上皮细胞中的细菌数较低,而且被感染的细胞比例也较低^[2]。与之相反,布鲁氏菌与巨噬细胞的结合力较高,这主要归功于巨噬细胞的吞噬特性^[3]。

1.1 布鲁氏菌对巨噬细胞的侵袭作用

在调理状态下,巨噬细胞主要通过 Fc_γ 补体或纤连蛋白受体摄取布鲁氏菌。与其它细菌类似,调

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30600024)

** 通讯作者 Tel: 010-66933356, E-mail: huangly@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-03-14, 修回日期: 2007-06-05

理作用似乎与布鲁氏菌在巨噬细胞内的生存和复制率成反比^[4]。也就是说, Fc 或补体介导的吞噬作用似乎更有利于宿主细胞而不是细菌^[5]。未受到调理作用的布鲁氏菌也可以结合、入侵巨噬细胞,并在巨噬细胞内复制,这说明在巨噬细胞内还存在一个不依赖于 Fc 和补体受体的受体-配体机制^[6]。布鲁氏菌感染巨噬细胞后, cyclic-AMP/蛋白激酶 A 途径被激活^[7]。已报道的一些试验结果表明, cyclic-AMP/蛋白激酶 A 途径的激活对于布鲁氏菌在巨噬细胞内的生存及复制似乎是必需的^[8]。

受调理作用的布鲁氏菌可被巨噬细胞优先吞噬,与以其它形式侵染巨噬细胞的细菌相比,更易于被细胞消化降解^[22]。也就是说,对于专业吞噬细胞,布鲁氏菌内在化的模式与其在巨噬细胞内的命运密切相关。相反,在非专业吞噬细胞中,布鲁氏菌内在化的模式并不影响细菌的胞内运输,布鲁氏菌的胞内运输和内在化布鲁氏菌的最终命运是两个独立的事件^[9]。这种差别似乎与细胞的特性相关而与细菌的特性无关,但具体的分子机制目前并不清楚。

1.2 布鲁氏菌对上皮细胞的侵袭作用

尽管在非专业吞噬细胞和布鲁氏菌中还没有发现相应的细胞受体和细菌配体的存在,但已有证据表明某些特殊的分子参与了布鲁氏菌与细胞的结合。首先,布鲁氏菌对上皮细胞的侵袭作用需要适量肌动蛋白的参与^[10]。其次,布鲁氏菌对上皮细胞的侵袭作用还需要 Rho 小 GTP 酶(如 Rho、Rac、Cdc42)的激活。该组 GTP 酶,主要是一些细胞骨架调控子,参与了多种胞内寄生菌的内在化过程。当药物或 Rho 小 GTP 酶的糖基化作用抑制肌动蛋白多聚酶时,可阻止布鲁氏菌的内在化,但并不妨碍细菌与细胞的结合^[10]。用可激活 Rho、Rac、Cdc42 的细胞因子处理细胞以后,布鲁氏菌被摄入的效率大大提高。这些现象都说明了小 GTP 酶在布鲁氏菌内在化过程中的重要性^[11]。此外,增加 cyclic-AMP 水平的化学药物和毒素可以抑制布鲁氏菌的侵染,相反,增加 cyclic-GMP 水平的化学药物和毒物却可以促进布鲁氏菌的侵染作用。这表明在布鲁氏菌感染过程中,这两个二级信使之间存在对立的关系。同样,抑制 PIP3 激酶也可明显降低布鲁氏菌在上皮细胞内的内在化过程,表明由该酶介导的磷酸化作用也参与了该过程^[10]。其它的细胞激酶,如酪氨酸激酶和 MAP 激酶,似乎对布鲁氏菌在非专业吞噬细胞

内的内在化来说也是必需的。最后,上皮细胞对活/死布鲁氏菌的摄取作用还可被受体介导的内吞作用能量代谢抑制剂阻遏,也可被内吞体酸化抑制剂阻遏。在接种细菌的同时加入这些物质可以抑制细菌的侵袭,但是在细菌接种以后加入,这些物质则不发挥作用,表明感染过程的发生需要受体分子的参与,并且还需要来自宿主细胞的能量。

1.3 影响布鲁氏菌侵袭作用的相关分子

尽管粗糙型布鲁氏菌的侵袭能力较光滑型的弱,但是前者进入细胞的数量却远远大于后者。这说明 O-多聚糖及天然半抗原 NH 可能在布鲁氏菌的细胞侵袭中发挥重要作用。此外, O-多聚糖还与布鲁氏菌的毒力相关。

已经证实, BvrS/BvrR 双组分系统参与布鲁氏菌对专业和非专业吞噬细胞的侵袭作用。与野生株相比, BvrS/BvrR 突变株尽管可以与细胞结合,但是进入细胞的效率却明显降低,而且,这些突变体也不能刺激小 GTP 酶的表达。此外, BvrS/BvrR 突变株的外膜结构也发生了改变,同时还伴有外膜蛋白 Omp25 和 Omp22 的缺失以及 LPS 的缺陷^[12, 13]。这些改变使得细菌丧失入侵细胞的能力。

2 布鲁氏菌的胞内运输

2.1 布鲁氏菌的胞内运输

布鲁氏菌在巨噬细胞和上皮细胞内的运输途径存在一定差异。然而,不管是巨噬细胞还是上皮细胞,布鲁氏菌毒力株在被吞噬以后均可立即与细胞内的早期内吞网络相关环节发生作用,该相互作用可以通过含布鲁氏菌囊泡中特定标志物(如转铁蛋白受体、小 GTP 结合蛋白 rab5、早期内吞体抗原 EEA1)的存在而得到确认,不过这种相互作用持续时间很短。因为在内在化以后 10min,标记有 rab5 或 EEA1 的含布鲁氏菌的囊泡数量明显减少,在 30min 以后则几乎检测不到^[14]。早期内吞系统的完整性与布鲁氏菌在宿主细胞内的正常运输密切相关。此外,布鲁氏菌的胞内运输还依赖于囊泡的酸化^[15]。在经历了最初的这些步骤以后,大约在内在化以后 1h,通过获得溶酶体相关膜蛋白 LAMP-1 逐渐形成含布鲁氏菌的囊泡^[16]。在此之后直至到达其复制部位之前,布鲁氏菌在巨噬细胞和上皮细胞内的胞内运输途径存在明显的差异^[17]。在上皮细胞中,布鲁氏菌定位于具有自噬体特征的多膜部位;

而在巨噬细胞中,一直维持与内质网的相互作用。尽管存在这些差别,含有布鲁氏菌的囊泡最终都可以与内质网融合并在内质网建立其复制部位。

2.2 影响布鲁氏菌胞内运输的相关分子

最近,在布鲁氏菌中发现的由 *virB* 操纵子编码的 IV 型分泌系统与细菌的胞内运输密切相关^[17]。IV 型分泌系统是一个含有 12 个可跨越细菌被膜的多蛋白复合物家族,由同一启动子调控。布鲁氏菌的 *virB1* 和 *virB10* 极性突变株丧失了在小鼠中复制的能力,而且这些突变体还可被吞噬溶酶体破坏。已有的实验数据表明,野生株与 *virB* 突变株对巨噬细胞或上皮细胞的侵染模式和动力学并没有明显的区别,因此推测布鲁氏菌的 IV 型分泌系统在细菌刚开始进入细胞时并不发挥作用,而是主要调控布鲁氏菌从自噬体样部位到内质网的胞内运输过程。一旦布鲁氏菌到达其复制部位,该分泌系统即被关闭^[18]。不过,目前仍不清楚 IV 型分泌系统是如何调控胞内运输的^[19]。已有的文献报道表明,IV 型分泌系统主要是通过分泌各种效应分子来克服和逃避巨噬细胞的各种防御机制,但是具体分泌了哪些效应分子,它们又是如何在体内发挥作用的目前尚不清楚。目前,本实验室正在开展布鲁氏菌 IV 型分泌系统与毒力关系的研究,期望通过效应子蛋白的寻找来解析 IV 型分泌系统的作用和功能。除了 *virB*,布鲁氏菌的胞内运输还需要稳定期基因的充分表达,如 *hfg*、压力蛋白、铁捕获因子等。

3 布鲁氏菌的胞内复制

3.1 布鲁氏菌的胞内复制部位

布鲁氏菌胞内复制部位的特性可通过 *sec61β*、腔蛋白二硫化物异构酶、伴侣蛋白 *calreticulin* 和 *calnexin* 等内质网标记物的存在而确定^[2,14,17,20]。细菌在内质网内复制有一定的优点,首先细菌可以逃脱与溶酶体的融合;其次,布鲁氏菌可以从宿主细胞的内质网获得充足的营养来维持细菌的复制。布鲁氏菌细胞外膜的高度疏水性、外膜上大分子物质之间的紧密联系以及外膜蛋白的一些特性都是营养物质可以选择性的进入菌体的原因。已经证实,一些在外不能表达的外膜蛋白可在体内特异表达^[21]。而且,布鲁氏菌外膜对疏水物质的高度通透性使得细菌可以摄取需要的铁载体和激素。

当布鲁氏菌到达内质网后,它们便开始复制直

至细菌密度达到一定程度才停止。此时囊泡内的 pH 值上升^[22],这使得细菌的一些调节机制关闭而另一些开启。密度感应分子可以在体外下调 *virB* 的表达^[23],表明该小分子在调控 IV 型分泌系统表达中发挥一定的作用,但是它并不影响布鲁氏菌在内质网内的复制。一些稳定期基因的表达可以调节细菌的生理功能从而使其适应胞内生存^[22,24]。

3.2 胞内复制的布鲁氏菌对宿主细胞的保护作用

布鲁氏菌能够在细胞内广泛复制但并不影响细胞的基本功能,也不引起明显的细胞损伤^[25]。感染布鲁氏菌的细胞没有明显的表型改变^[26]。细胞毒性的缺乏还可表现为:高度感染的细胞仍然伴随着 DNA 的合成、微管蛋白的形成、染色体迁移、胞质分裂和核分裂等^[14]。这些实验现象表明,布鲁氏菌在专业和非专业吞噬细胞内均可抑制细胞的凋亡。而且,这种现象并不局限于被感染的细胞,因为邻近的未被感染的细胞同样也受到保护。因此,有人假设这种保护机制是正在复制的布鲁氏菌通过促使细胞释放一些可溶性物质来发挥保护作用的。被感染细胞的凋亡抑制需要 *A1* 基因(涉及造血细胞生成的 *bcl-2* 家族的成员之一)的过表达^[26]。而且抗凋亡特性是在感染的后期才出现的,这说明抗凋亡作用是由内质网内正在复制的细菌介导的,而不是由正在向内质网移动的细菌介导的^[27]。

3.3 调控布鲁氏菌胞内复制的细胞因子

在布鲁氏菌的感染过程中,一些细胞因子,如 *INFγ*、*TNFα*、*IL-2*、*IL-10* 和 *IL-12* 调控了布鲁氏菌在巨噬细胞内的生长,而 *IL-1α*、*IL-4*、*IL-6* 和 *GM-CSF* 却不发挥作用^[28]。在这些细胞因子中,*INFγ* 对于杀死胞内的布鲁氏菌发挥的作用最大^[29],*IL-2*、*IL-10* 和 *IL-12* 等细胞因子都是通过 *INFγ* 依赖的路径发挥作用^[30]。*TNFα* 在调控胞内布鲁氏菌复制的过程中发挥的作用还没有确切的结论。与在鼠巨噬细胞中观察到的相反,布鲁氏菌在人巨噬细胞中并不诱导 *TNFα*,而且活的布鲁氏菌能够抑制细胞因子的产生^[31]。然而,用同源性的 *TNFα* 对人巨噬细胞进行预处理,可以明显的抑制布鲁氏菌在胞内复制的速度。

4 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)的完整性对布鲁氏菌胞内生存能力的影响

布鲁氏菌 LPS 的生物学活性有别于传统的内毒

素,其特性与它特殊的化学结构相关^[32]。当布鲁氏菌 LPS 的 O-多聚糖或 NH 多聚糖缺失时,细菌的毒力消失,同时该缺陷导致布鲁氏菌从光滑型转变为粗糙型。与粗糙型布鲁氏菌相比,光滑型布鲁氏菌抵抗专业吞噬细胞杀菌作用的能力更强。此外,LPS 的脂质 A 存在缺陷的布鲁氏菌突变株同样也丧失了毒力,易于被巨噬细胞杀死,并且对作用于阳离子物质的细菌素(如溶菌酶)敏感性增加^[33,34]。这些结果都表明,细菌表面 LPS 分子的完整性决定了布鲁氏菌的胞内生存能力和毒力。布鲁氏菌细胞膜的高度疏水性以及外膜大分子之间的紧密联系是细菌可以选择性的摄取营养物质的主要原因。已经证实,疏水性物质阻碍物的缺乏与布鲁氏菌 LPS 的核心多糖和脂质 A 有关^[35]。这种结构将有利于营养物质的交换以及细菌的胞内生存。

最近的研究还表明,布鲁氏菌 2308 株的光滑型 LPS 还具有维持细菌在宿主细胞中长期生存的免疫调节活性。LPS 分子在宿主细胞内和 MHC-II 类分子形成复合物被转运到细胞表面。这种 MHC-II 和 LPS 的复合物可干扰巨噬细胞在 MHC-II 存在的条件下对抗原的提呈,这导致感染的宿主激活布鲁氏菌抗原特异性 CD4⁺ T 细胞的能力降低。细胞免疫是机体抗布鲁氏菌的主要免疫反应,因此,不难理解布鲁氏菌是如何通过削弱宿主的免疫反应而达到长期在宿主巨噬细胞内生存的目的。

5 展望

布鲁氏菌在宿主细胞中的生存和复制能力对于布鲁氏菌的毒力是非常重要的。已有的大量研究使我们对布鲁氏菌的胞内生存机制有了一个初步的了解和认识,但是对于真正认识布鲁氏菌的致病机制还远远不够。多株布鲁氏菌全基因组测序的完成,使很多新的高通量研究方法在布鲁氏菌的应用成为可能。例如,基于全基因组的比较基因组杂交已用于比较不同布鲁氏菌菌株基因组水平的差异,蛋白质组技术用于比较强毒株与弱毒株间蛋白质表达的差异,这些都大大促进了毒力基因的寻找和致病机制的阐述。相信这些高通量技术与传统分子生物学方法的有机结合,必将加速布鲁氏菌的致病机制,特别是胞内生存机制的研究。

参考文献

[1] Celli J. *Res Microbiol*, 2006, **157**, 93-98.

- [2] Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton R G, *et al.* *Infect Immun*, 1998, **66**, 5711-5724.
- [3] Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo M J, *et al.* *Mol Microbiol*, 1998, **29**, 125-138.
- [4] Jimenez B M P, Dudal S, Dornand J, *et al.* *Clin Immunol*, 2005, **114**, 227-238.
- [5] Gross A, Spiesser S, Terraza A, *et al.* *Infect Immun*, 1998, **66**, 1309-1316.
- [6] Gross A, Terraza A, Marchant J, *et al.* *J Leukoc Biol*, 2000, **67**, 335-344.
- [7] Gross A, Bouaboula M, Casellas P, *et al.* *J Immunol*, 2003, **170**, 5607-5614.
- [8] Billard E, Cazeveille C, Dornand J, *et al.* *Infect Immun*, 2005, **73**, 8418-8424.
- [9] Gorvel J P, Moreno E. *Vet Microbiol*, 2002, **90**, 281-297.
- [10] Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C, *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**, 44435-44443.
- [11] Celli J, Salcedo S P, Gorvel J P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**, 1673-1678.
- [12] Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**, 12375-12380.
- [13] Manterola L, Moriyon I, Moren E, *et al.* *J Bacteriol*, 2005, **187**, 5631-5639.
- [14] Chaves-Olarte E, Guzman-Verri C, Meresse S, *et al.* *Cell Microbiol*, 2002, **4**, 663-676.
- [15] Porte F, Liautard J P, Kohler S. *Infect Immun*, 1999, **67**, 4041-4047.
- [16] Bellaire B H, Roop R M, Cardelli J A. *Infect Immun*, 2005, **73**, 3702-3713.
- [17] Celli J, de Chastellier C, Franchini D M, *et al.* *J Exp Med*, 2003, **198**, 545-556.
- [18] Celli J, Gorvel J P. *Curr Opin Microbiol*, 2004, **7**, 93-97.
- [19] Paschos A, Patey G, Sivanesan D, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**, 7252-7257.
- [20] Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, *et al.* *Infect Immun*, 1998, **66**, 2387-2392.
- [21] Marquis H, Ficht T A. *Infect Immun*, 1993, **61**, 3785-3790.
- [22] Kohler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**, 15711-15716.
- [23] Taminiou B, Daykin M, Swift S, *et al.* *Infect Immun*, 2002, **70**, 3004-3011.
- [24] Roop R M, Gee J M, Robertson G T, *et al.* *Annu Rev Microbiol*, 2003, **57**, 57-76.
- [25] Pei J, Turse J E, Wu Q, *et al.* *Infect Immun*, 2006, **74**, 2667-2675.
- [26] Gross A, Terraza A, Ouahrani-Bettache S J, *et al.* *Infect Immun*, 2000, **68**, 342-351.
- [27] He Y, Reichow S, Ramamoorthy S, *et al.* *Infect Immun*, 2006, **74**, 5035-5046.
- [28] Golding B, Scott D E, Scharf O, *et al.* *Microbes Infect*, 2001, **3**, 43-48.
- [29] Murphy E A, Sathiyaseelan J, Parent M A, *et al.* *Immunology*, 2001, **103**, 511-518.
- [30] Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, *et al.* *J Immunol*, 2007, **178**, 5182-5191.
- [31] Caron E, Gross A, Liautard J P, *et al.* *J Immunol*, 1996, **156**, 2885-2893.
- [32] Rasool O, Freer E, Moreno E, *et al.* *Infect Immun*, 1992, **60**, 1699-1702.
- [33] Lopez-Goni I, Guzman-Verri C, Manterola L, *et al.* *Vet Microbiol*, 2002, **90**, 329-339.
- [34] Lapaque N, Forquet F, de Chastellier C, *et al.* *Cell Microbiol*, 2006, **8**, 197-206.
- [35] Velasco J, Bengoechea J A, Brandenburg, *et al.* *Infect Immun*, 2006, **74**, 210-218.