专论与综述

病原菌与哺乳动物细胞的相互作用

陈怀青 陆承平
(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

病原菌与哺乳动物细胞的相互作用，首先表现在细菌特异性粘附于细胞的表面。细菌根据环境条件及宿主的不同，可表达不同的粘附分子。细菌特异性粘附于不同的宿主细胞，不仅对病原与宿主的早期接触，而且对整个感染过程都很重要。许多细菌都可粘附于宿主粘膜的上皮细胞，并在局部增殖，而且在感染全过程中都停留在细胞表面。这种粘附作用大多与细菌的菌毛(pili)有关。菌毛能与宿主细胞的受体分子特异性结合，特别是与细胞表面的多糖侧链结合。此外，有些细菌表面尚有一些受体，能与宿主细胞的分泌的纤粘连蛋白(fibronectin)等细胞外基质(ECM)结合，而ECM又能与细胞上相应的整合素(integrin)结合。这样，细菌就通过ECM的桥梁作用间接地结合在宿主细胞的表面。然而，有些细菌在粘附于细胞表面之后，还要进一步内化入胞(internalization)，即通常说的侵袭[1~3]。本文将着重讨论细菌内化入胞的机制及其后果。

1 细菌内化入胞的机制

细菌内化入胞的方式大体上可分为两种。①以肠致病性耶氏菌为代表，它仅仅要求细胞表面有合适的受体，能与细菌表面的配体紧密结合；②以沙门氏菌为代表，它是细菌与细胞相互间信号转导后，细胞膜调变的结果[3]。

1.1 肠致病性耶氏菌： 肠致病性耶氏菌有3种成份可独立地介导耶氏菌内化入胞，它们是侵袭素(invasin)、Ail蛋白和YadA蛋白。侵袭素由986个氨基酸组成，位于细菌的外膜，其C末端的192个氨基酸对介导细菌内化入胞必不可少，而且只要具备这192个氨基酸也就足以完成内化作用。YadA则在细菌表面形成一种纤丝样结构。它除与侵袭素一样能与细胞的整合素结合外，尚能与ECM结合。而Ail蛋白虽然能与许多细胞结合，但仅能介导细菌进入少数几种细胞(如CHO)。此外，Ail蛋白尚能赋予细菌抗补体能力[1]。

细胞的β_1整合素是侵袭素的受体。在正常情况下，整合素主要与ECM结合，在细胞粘连中发挥重要作用。然而，由于侵袭素对整合素的亲和力远大于ECM(相差2个数量级)，因而侵袭素就能强夺细胞表面的整合素，而且整合素-侵袭素复合体的解离很慢，使得细胞膜能长时紧贴在细菌表面，完整包裹细菌，从而完成类似吞噬的过程[4]。

耶氏菌的内化入胞需细菌表面相关分子与细胞上相应受体紧密结合。没有这些相关分子，细菌就无法与整合素结合，也无法进入细胞。因此耶氏菌的内化是个体行为。菌群中表达了侵袭素等分子的细菌可内化入胞，没有表达这些分子的细菌则无此功能。

1.2 沙门氏菌： 沙门氏菌内化入胞的机制远比耶氏菌复杂，目前尚未找到确切的相关分子。沙门氏菌与细胞接触后，导致粘附位点细胞表面发生调变(modulation)，局部的微绒毛崩解，形成一个凹陷，并逐渐向四周扩散，类似于向平静水面扔入一颗石子所致的"涟漪"。其主要特征就是出现细胞皱膜(ruffle)。细菌随皱膜而进入到细胞内。在此过程中细胞质内钙离子大量增加，导致一系列的信号转导，细胞骨架发生重排[1,3]。这一机制类似于细胞受生长因子刺激后的应答[5]。其不同之处在于生长因子诱导的皱膜遍及细胞整个表面，而沙门氏菌诱导的皱膜则局限于细菌结合部位。实际上，表皮生长因子受体(EGFR)参与了沙门氏菌的内化。细菌与细胞接触后，在其表面形成许多临时性的附件。而细菌一旦被细胞膜包裹，这些附件就随之消失[6]。由此推测这些附件是细菌在细胞指导下临时合成的，其功能是向细胞发放某种信号，使出现细胞皱膜。

由于沙门氏菌的内化入胞是胞内信号转导所致细胞皱膜的结果，因而菌群中只要有一个细菌具备导致细胞皱膜的能力，其他相邻细菌即使无此能力也可随

1996-12-13收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

细胞皱膜活动而被连带入胞。也就是说，沙门氏菌的内化体现了一种群体行为。

1.3　细菌内化入胞的普遍规律：除耶氏菌和沙门氏菌外，志贺氏菌、肠致病性大肠杆菌、爱德华氏菌、李氏杆菌、军团菌、衣原体、百日咳杆菌等均可内化入胞[7]。比较这些细菌内化入胞机制，可找出细菌内化入胞的一些普遍规律。其中首要一点就是细胞骨架在细菌粘附部位重排。就目前已研究过的细菌而言，破坏细胞的微丝或微管，可抑制细菌内化入胞，由此不难看出细胞骨架重排是细菌内化入胞的关键环节。其次，整合素是许多病原菌粘附的受体，细菌除通过侵袭素、紧密素等直接与整合素结合外，还可通过 YadA 结合 ECM 或 C3bi 结合 CR3 而间接与整合素结合。有趣的是，通过整合素进入巨噬细胞内的细菌不被杀死，而通过 Fc 受体吞入的细菌则被杀死。再者，细菌内化入胞明显受环境的调节，沙门氏菌、志贺氏菌及耶氏菌等均有表现，如沙门氏菌在低氧条件下能内化入胞，而在稳定期则不易入胞。最后，许多细菌的内化入胞是细菌与细胞主动通讯的结果，细菌在细胞诱导下可合成一些临时的大分子复合物来发放信号，并影响菌群中其他细菌的命运。

2　细菌内化后的命运

2.1　进入路径对细菌内化后命运的影响：介导细菌进入宿主细胞的受体，能显著地影响细菌内化后的命运。其中最明显的例子就是吞噬过程中巨噬细胞与病原菌的相互关系。众所周知，巨噬细胞的杀菌机制有氧化途径和非氧化途径，呼吸爆发是其杀菌的主要方式。细菌与相应抗体结合后，通过 IgG Fc 受体结合至巨噬细胞表面并随之被吞入胞内，导致显著的呼吸爆发，细菌最终被杀灭。然而，如果细菌是通过整合素(包括 CR3)进入巨噬细胞，则不能引致呼吸爆发，细菌则可在巨噬细胞内生存乃至增殖。嗜肺军团菌及结核杆菌就是通过整合素进入巨噬细胞，随后它们就停留在空泡内，空泡也不能与溶酶体融合，这样细菌就不被杀灭[2,8]。这表明细菌进入巨噬细胞的路径不同，其命运也完全不同，并且与受体密切相关。

对粪地弓形虫的研究结果更能说明问题。在没有相应抗体时，活的弓形虫可进入巨噬细胞的空泡内，但空泡不酸化，也不与溶酶体融合。然而，当弓形虫已死亡或结合了 IgG 后，它也进入巨噬细胞的空泡内，但这些空泡马上酸化，并与溶酶体融合。将巨噬细胞-淋巴细胞的 IgG Fc 受体基因转染 CHO 细胞，用该细胞研究弓形虫内化时发现，结合了抗体的弓形虫定位于空泡内，空泡可酸化并与溶酶体融合。然而，如果细胞上的 Fc 受体缺失了其留在细胞质内的尾部，结合了抗体的弓形虫虽然仍定位于空泡内，但空泡不能与溶酶体融合。这一结果表明弓形虫内化后的命运是由受体介导的[9]。至于其机理如何，而且这一结果是否有普遍性，仍有待研究。

2.2　在空泡内生长：　衣原体、结核杆菌、布氏杆菌、沙门氏菌、耶氏菌及军团菌等兼性胞内菌都可在细胞空泡内定居或生长。然而，由于空泡对大多数细菌而言并不是一个好的环境，因此细菌欲在其中增殖，就需要有一些特殊的结构和功能。虽然有些细菌能内化入胞，但却并不能在细胞中增殖，如小肠结肠耶氏菌对培养的上皮细胞具有高度的侵袭性，但却不能在空泡内明显增殖。同样大肠杆菌 K12 被类似于巨噬细胞的 J774 细胞吞入后可在其中存活数小时，却未见生长。究其原因，可能是细胞内有许多抑制因子，如空泡的酸性 pH，存在溶酶体酶，缺少铁等营养成份。因此那些需要在空泡内增殖的病原菌，要么能防止空泡酸化，要么能抑制空泡与溶酶体融合。

(1) 鼠伤寒沙门氏菌：尽管鼠伤寒沙门氏菌对巨噬细胞而言是兼性胞内病原菌，但它能否真正在巨噬细胞内增殖仍有些疑问。然而，无论如何鼠伤寒沙门氏菌都可持续在巨噬细胞内存在，并在其中合成蛋白质，在上皮细胞的空泡内亦可生长。此外，业已证实，沙门氏菌在体内亦可定居于细胞内，而且能阻止巨噬细胞中吞噬体和溶酶体融合。

与沙门氏菌在细胞内生存有关的基因为 phoP，其产物 PhoP 和 PhoQ 为两个调节蛋白，可在低 pH 及饥饿条件下激活一系列基因表达。phoP 基因缺失突变株没有毒力，不能在巨噬细胞内持续存在[7]，对中性粒细胞防御素(defensin)的杀菌作用敏感。

(2) 耶氏菌：肠致病性耶氏菌的致病性与其毒性质粒有关。质粒基因的表达受温度和钙浓度的调节，耶氏菌在 37℃ 无钙情况下，质粒编码合成并分泌大量的 Yops。Yops 是其外膜的组成部分，但也分泌至培养基中。Yops 在致病中的作用是多方面的，它与抗吞噬及细胞毒性有关，其中 YopE 具有细胞毒素的作用，能破

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

坏肌动蛋白纤维,但这种活性只有 YopE 在直接与细胞接触或直接分泌到细胞质中才行。而 YopH 则与抗吞噬有关,并且具有酪氨酸磷酸酶的活性,能阻止宿主 PTKase 的活性,从而破坏宿主细胞正常的信号转导[1]。

(3) 嗜肺军团菌:嗜肺军团菌是一种兼性胞内寄生菌,可寄居于人单核细胞、巨噬细胞及其他体外培养细胞的空泡内。人单核细胞内化该菌是补体受体介导的,其内化方式为卷曲样吞噬。含有嗜肺军团菌的空泡不与溶酶体融合,空泡内的 pH 值也相对较高。在感染后 1h,线粒体环绕含菌的吞噬体,随后 4～8h 之内宿主细胞的核糖体也粘贴至吞噬体膜上,从而导致细胞蛋白合成显著下降。嗜肺军团菌 mip 基因缺失后,对巨噬细胞的感染性明显下降,即使细菌被 IgG 调理后也是如此[11]。这表明 mip 基因编码的细胞表面蛋白 Mip 对其胞内生存有重要意义。有趣的是,沙眼衣原体含有一种与 Mip 同源的蛋白质,而沙眼衣原体则是一种专性胞内寄生菌,亦可在空泡内增殖。

2.3 在胞质中增殖:志贺氏菌、李氏杆菌及立克次氏体等内化入胞后,并不停留在空泡内,而是进一步从空泡内逸出,直接在宿主细胞质中增殖[2,8]。而它们进入胞质与其溶血活性密切相关,其中立克次氏体是由磷脂酶 A 破坏空泡膜的,志贺氏菌则与 i-paB 基因表达的一种接触性溶血素有关。李氏杆菌的溶血素称为李氏溶素 O(LLO),是该菌重要的致病因子。LLO 基因(hly)缺失菌株则不能在小鼠巨噬细胞及非巨噬细胞系中生长[12]。电镜观察发现缺失株位于空泡内,而亲本菌株则在胞质内增殖。此外李氏杆菌卵磷脂酶也与它从空泡内逸出有关。

2.4 细胞间的扩散:对志贺氏菌、李氏杆菌等而言,进入细胞质固然重要,但仍不足以表现其毒力。有些志贺氏菌及李氏杆菌突变株,能正常进入细胞质,却不能完成细胞间的扩散,也没有毒力。由此可见,细胞间的扩散能力是其毒力机制的重要组成。它们都是利用细胞肌动蛋白纤维来完成细胞内的运动和细胞间的扩散。

(1) 李氏杆菌:电镜观察发现李氏杆菌进入细胞质后不久就快速增殖,并且被短的肌动蛋白微丝包裹。增殖几代之后,细菌在细胞质内就以 1.5μm / sec 的速度移动。加入细胞松弛素 D 可导致细菌移动停止,而除去后细菌又继续运动。在运动细菌的一端可见由肌动蛋白组成的"尾巴"。肌动蛋白单体逐个加入到细菌和肌动蛋白尾巴之间的介面上,并随之聚合,从而推动细菌运动。也就是说,肌动蛋白尾巴在细胞内保持不动,而细菌则随着尾巴上肌动蛋白的聚合不断向前移动[13]。肌动蛋白聚合为细菌移动提供了动力。细菌的 actA 基因与肌动蛋白聚合有关,其产物为细菌表面蛋白,由 610 氨基酸的组成,分子量 90Ku。

胞质内的细菌在肌动蛋白聚合力的推动下移向细胞的内表面,并进入到类似于伪足的结构内。这些伪足可以伸得很长,并被邻近的细胞识别和内化。因此,在第二个细胞内,细菌被两层膜所包裹。细菌通过卵磷脂酶及 LLO 将这两层膜溶解后,进入到细胞质内,开始新一轮循环。

(2) 志贺氏菌:志贺氏菌被吞噬入胞后,通过其接触性溶血素溶解空泡的膜结构,进入细胞质并在其中生长。尽管它们没有鞭毛,却也能在细胞质内运动。目前已发现它有两种运动方式,第一种为鞭毛样运动,志贺氏菌能沿肌动蛋白纤维滑行。第二种为胞内及胞间扩散,细菌随着分裂而快速运动,从而定居于整个细胞质[14]。其中有些细菌又到了细胞内表面,并形成一个很长的突起,伸至邻近细胞内。此时细菌被两层膜包裹,细菌破坏这两层膜后,就进入邻近的细胞。

细菌在细胞内的运动与细菌分裂密不可分。在处于分裂状态的细菌的一端,包裹细菌的肌动蛋白聚合并组合在一起形成微丝。这些肌动蛋白纤维在延伸的同时,又被 fimbrin(一种微丝结合蛋白)紧束而收缩,共同推动细菌运动。

与志贺氏菌胞内运动的基因座位为 ics。它编码 IcsA 和 IcsB 两种蛋白质,IcsA 的分子量约 120Ku,其本质是分泌性的 ATPase。IcsA 只有当细菌分裂时才会出现在细菌的一端,它与肌动蛋白在该处的聚合有关。因此细菌只有在分裂时才会出现胞内运动。而 IcsB 的分子量为 54Ku,它能溶解包裹细菌的两层细胞膜,对细菌扩散极为重要。

细胞和细胞的紧密连接也是细菌在细胞间扩散的必要条件之一。细胞粘附分子(CAM)在其中起了非常重要的作用。志贺氏菌虽可在 S_{180} 细胞中增殖,并能向外形成长的突起,但因 S_{180} 细胞没有 CAM,因此这些突起不能被邻近细胞内化,细菌也无法在细胞间扩散。但当 S_{180} 细胞转染了钙粘连蛋白(cadherin)cDNA 并表达

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

后,细胞之间形成紧密连接,细菌所致细胞突起就可被邻近细胞内化,从而完成细胞间扩散[14]。

参 考 文 献

[1] Bliska J B, Galan J E, Falkow S. Cell, 1993, 73: 903~920.
[2] Finlay B B, Falkow S. Microbiol Rev, 1989, 53: 210~230.
[3] Isberg R R, Nhieu G T V. Annu Rev Genet, 1994, 27: 395~422.
[4] Isberg R R. Science, 1991, 252: 934~938.
[5] Francis C, Ryan T A, Jones B D, *et al*. Nature, 1993, 364: 639~642.
[6] Ginocchio C C, Olmsted S B, Wells C L, *et al*. Cell, 1994, 76: 717~724.
[7] 陈怀青、陆承平. 国外医学微生物学分册, 1996, 19: 16~19.
[8] Moulder J W. Microbiol Rev, 1985, 49: 298~337.
[9] Joiner K A, Fuhrman S A, Miettinen H M, *et al*. Nature, 1990, 249: 641~646.
[10] Miller S I, Mekalanos J J. J Bacteriol, 1990, 172: 2485~2490.
[11] Dowling J N, Saha A K, Glew R H. Microbiol Rev, 1992, 56: 32~60.
[12] Portnoy D A. Chakraborty T, Goebel W, *et al*. Infect Immun, 1992, 60: 1263~1267.
[13] Theriot J A, Mitchison T S, Tilney L G, *et al*. Nature, 1992, 357: 257~260.
[14] Sansonett P J, Mounier J, Prevost M C, *et al*. Cell, 1994, 76: 829~839.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn