

磷脂酶 D 与病原微生物感染

李 帅 韩雪琳 于仁涛 孙岩松* 韩 黎*

(军事医学科学院疾病预防控制中心医院感染监督中心 北京 100071)

摘 要: 磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)普遍存在于细菌、真菌以及哺乳动物中。在病原微生物中, PLD 作为毒力决定因子在减数分裂、孢子形成等过程中起作用; 在哺乳动物细胞中, PLD 主要在胞膜转运、调节有丝分裂和细胞肌动蛋白骨架等一些信号转导中起作用。在病原菌感染宿主细胞的过程中, 病原体和宿主细胞的 PLD 都被激活并发生级联反应, 病原菌 PLD 可调节自身肌动蛋白丝的聚合和重排, 并引起宿主细胞局部肌动蛋白丝的集聚, 诱导宿主细胞对其吞噬。深入探讨 PLD 激活对感染发生的调控作用对透彻理解病原菌感染宿主细胞的分子机制具有重要意义。

关键词: 磷脂酶 D, 信号转导, 病原微生物

Phospholipase D and Pathogenic Microorganisms Invasion

LI Shuai HAN Xue-Lin YU Ren-Tao SUN Yan-Song* HAN Li*

(Center for Hospital Infection Supervision, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract: Phospholipase D (PLD) is ubiquitous in bacteria, fungi, and mammal. In pathogenic microorganisms, PLD can be pathogenic determinant and play a role in spore generation. In mammalian cells, PLD functions in several signal transduction pathways, such as membrane transportation, mitosis regulation, and actin cytoskeleton regulation. In the process of pathogens invasion host cells, both of the pathogen and host cells' PLD will be activated and a series of cascade reaction will be generated. During this process, pathogen's PLD can regulate the polymerization and reorganization of its own actin filaments and induce the polymerization or reorganization of the host cell actin filaments near the foci, thus to promote the phagocytosis of the pathogen by host cell. Investigating the role of PLD activation in the infection will be significance for further understanding the molecular mechanism of pathogen-host cell interaction.

Keywords: Phospholipase D (PLD), Signal transduction, Pathogenic microorganisms

在哺乳动物细胞中 PLD 有 PLD1 和 PLD2 两种亚型, PLD1 是一个含有 1074 个氨基酸、分子量 124 kD 的蛋白质; 而 PLD2 是一个含 933 个氨基酸、分子量 106 kD 的蛋白质, 与 PLD1 有 50%~53% 的同源性, 但是其活性调节及亚细胞分布却存在很大差异。

PLD1 主要位于核周围, 如高尔基体、内质网、溶酶体及其分泌囊泡, 而 PLD2 主要位于质膜上, Czuarny 等^[1]认为 PLD2 位于富含小窝蛋白、TX-100 不溶性的低密度膜区。从低等细菌到哺乳动物, PLD 的基因结构呈现高度保守的核心结构。已被克隆的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30500462)

* 通讯作者: 孙岩松 Tel: 010-52203307; ✉: sunys1964@hotmail.com

韩黎 Tel: 010-66933338; ✉: hanlicdc@163.com

收稿日期: 2008-04-28; 接受日期: 2008-06-24

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

真核生物PLD均可分为 4 个基序, 其中IV区也被称为HKD基序(HXKX4DX5IGSXN), 保守程度甚高, 被认为是催化序列。

PLD 可被细胞外多种信号分子如生长因子、趋化因子、神经递质、激素等激活, 且 G 蛋白、蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)等均参与对 PLD 激活的调节。PLD 能水解膜甘油磷脂中 3 位的末端酯键产生磷脂酸 PA 和相应的碱基。PLD 的底物有磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰丝氨酸(PS)及溶血磷脂(LysoPL)等, 但其主要的底物为磷脂酰胆碱(PC)。在正常生理条件下, PLD 水解 PC 产生磷脂酸(PA)和胆碱, PA 可在磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphohydrolase, PAP)的作用下生成甘油二酯(DAG), PA 也可在磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)的作用下生成溶血磷脂酸(LPA); 但在短链伯醇存在的情况下, PLD 优先催化 PC 与短链伯醇发生转磷脂酰基(transphosphatidylatation)反应, 产生稳定的磷脂酰醇(phosphatidylalcohol)和水。转磷脂酰基反应是目前检测 PLD 活性的特异性反应, 许多研究也利用此反应抑制 PLD 的生理性产物 PA 的生成。激活后的 PLD 在病原体侵染宿主细胞过程中扮演着重要的角色。

1 病原细菌的 PLD

假结核杆菌、溃疡棒状杆菌、溶血性隐秘杆菌都是人—畜共患病原体。研究发现PLD是假结核棒状杆菌两个基本的致病基因之一, 可以通过提高血管的通透性, 在促成细菌从初始感染位置进入宿主细胞的扩散过程中起作用, 帮助假结核杆菌进入宿主细胞^[2]。相反, PLD特异性抗体反应可以保护绵羊免受假结核棒状杆菌感染, 而假结核棒状杆菌PLD等位突变株也不会引起假结核病。Paticka研究发现在假结核病中结核棒状杆菌PLD的定向诱变作用减弱了细菌原发感染的能力或在局部淋巴结中引起局部淋巴结慢性脓肿形成。这些结果都显示了PLD是假结核棒状杆菌的毒力决定子, 提高了细菌在宿主细胞的持久性和扩散能力。PLD缺陷的假结核棒状杆菌则会引起轻微的病变而且诱导强有力的蛋白表达来抵御炎症。在假结核棒状杆菌胞内PLD的过度表达展示了在感染巨噬细胞以后, 其存活率引起了

轻微减少。以上结果表明假结核棒状杆菌PLD的调节是一个复杂的过程, 在感染、迁移、定居、疾病进展过程中对病原体成功进入宿主细胞起着非常重要的作用。溃疡棒状杆菌、溶血性隐秘杆菌与假结核杆菌的PLD有相似的生理特性和活性, 这 3 种细菌产生相似的胞外PLD, 并且PLD起着毒力因子的作用。由此, PLD在某些细菌病原体致病过程中是必不可少的。

2 病原真菌的 PLD

酵母PLD由SPO14 编码, 其基本功能是在减数分裂中发挥作用, 然而有资料显示它直接或间接地参与酵母的致病过程。Simon等用丁醇预处理酵母细胞使PLD催化磷脂酰胆碱产生胆碱和磷脂酰丁醇, 阻断了孢子的形成, 表明酵母菌PLD活性与孢子的形成密切相关^[3]。在白色念珠菌中PLD的一级结构与SPO14 同源性达到 42%, 在 4 个保守区域中白色念珠菌PLD和SPO14 蛋白之间的同源性达 65%~71%。但白色念珠菌缺乏减数分裂, 这暗示白色念珠菌PLD可能有其它的功能。McLain和Dolan研究结果显示PLD在双相性转化过程中是一个重要的毒力决定子, 在白色念珠菌由酵母相向菌丝相转化的过程中受PLD的严格调控。Hube等研究也展示了当白色念珠菌由酵母相转换到菌丝相时PLD1 高度表达, 在几种培养基中当酵母相形成时, PLD也有组成型表达。研究发现, 白色念珠菌PLD对菌丝的形成也有促进作用, 由于菌丝相的白色念珠菌更有利于对上皮细胞的粘附, 因此白色念珠菌PLD有可能通过影响菌丝的形成而在白色念珠菌致病过程中发挥间接作用^[4]。Hube等将白色念珠菌PLD基因敲除后, 发现其在小鼠体内毒力大大减弱, 而对小鼠正常存活期没有明显影响^[5]。

3 哺乳动物细胞 PLD

哺乳动物 PLD 参与细胞内信号转导、囊泡运输、内吞作用、胞吐作用、肿瘤迁移、有丝分裂、细胞因子的释放和细胞骨架重排等一系列生理过程。

3.1 在胞膜运动以及细胞骨架重排中的作用

细菌侵袭宿主细胞是感染过程的重要步骤, 它与细菌触发的细胞骨架重排关系密切, 并且肌动蛋白骨架重排常伴有PLD的激活。Goldfine研究发现,

李斯特菌可诱导巨噬细胞内PLD的激活,而PLD的激活似乎是李斯特菌从巨噬细胞吞噬小体逃逸的必要条件。Melendez等研究表明,PLD参与调节了由抗体受体及补体受体介导的免疫细胞的主动吞噬^[6],由FcγRI受体介导的免疫应答中,细胞褶皱的形成取决于抗原刺激的PLD2 激活(产生大量PA)^[7]。PA对细胞骨架的重排也发挥着间接的调控作用,细胞局部的PIP2 可调节肌动蛋白及细胞骨架重排,而PIP2 的合成则依赖于来自PLD的PA。我们在李斯特菌诱导Vero细胞吞噬过程中也发现存在PLD的激活,并且Vero细胞PLD活性的降低对李斯特菌的内化侵入过程有抑制作用^[8]。

Mebarek 等证明早期肌原反应依赖于 PLD 调节的肌动蛋白紧张丝的形成,神经酰胺抑制剂可以促进肌形成,而 PLD 是公认的神神经酰胺的靶点。所以该研究组认为神经酰胺可能通过PLD的表达和活性调节肌动蛋白紧张丝的形成^[9]。肌动蛋白丝及其相关结合蛋白,如cofilin,可直接与PLD结合,从而抑制或增强其活性,细胞内调控肌动蛋白骨架重排的单体G蛋白也可激活PLD^[10]。肌动蛋白单体actin以及α-actinin(辅肌动蛋白)等也可直接与PLD结合,抑制其较强的基础活性。可见,活化PLD与肌动蛋白重排效应具有依赖性,单体G-肌动蛋白抑制PLD的活性,而聚合的F-肌动蛋白增加PLD的活性。另一方面,尽管PLD两个亚型在胞内分布及调控机制上有许多差异,但其活性变化均与细胞肌动蛋白骨架重排密切相关。宿主细胞吞噬外界病原体时常伴随着PLD激活。研究证明,激活后PLD与病原体侵入宿主细胞存在非常密切的关系,但这种联系不能提供两者之间的因果关系。PLD只是参与调节病原体侵入宿主细胞这个复杂的细胞生理过程中的一员。

3.2 肿瘤迁移

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌离子依赖的内肽酶,对细胞外基质(extra-cellular matrix, ECM)具有广泛的降解功能,在肿瘤的浸润和转移过程中起重要作用。有研究表明肿瘤细胞MMP29的分泌与PLD的活化有关。佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)作用于人纤维肉瘤细胞株HT1080 细胞后,以时间及剂量依赖的方式诱导MMP29的分泌,同时细胞内PLD的活性也增加。将短链脂肪酸加入HT1080 细胞培养基中同样刺

激MMP29 的分泌,而正丙醇抑制PLD活性产物PA产生的同时也抑制了MMP29 的分泌。在HT1080 细胞培养基中加入短链甘油二酯未能刺激MMP-9 的分泌,而且心得安(一种磷脂酸磷酸酶活性的抑制剂)对PMA或者PA诱导的MMP29 的分泌无明显抑制作用,这就表明在PMA诱导MMP29 分泌的过程中PLD起主要作用,并且这一效应是通过PLD的活性产物PA 介导的。Ho等的研究表明在HT1080 细胞中,BFA(一种ARF的活性抑制剂)能够阻断PMA 刺激的MMP29 的分泌效应,而且过度表达的arfaptin 1(一个39 kD的ARF结合蛋白,在体外能够抑制ARF对PLD的活化)在抑制PLD活化的同时也抑制了PMA诱导的MMP29 的分泌。这些结果从另一个侧面也反映了PLD参与肿瘤细胞分泌MMP29 的过程^[11]。在偏酸性的条件下培养B16 黑色素瘤细胞可以使MMP29 的表达增加,在这一过程中同样涉及PLD2 的活化,用正丁醇抑制PLD2 的活性后,以剂量依赖性的方式抑制B16 细胞MMP29 的表达水平,而且在培养基中加入外源性的PLD后,B16 细胞MMP29 的表达水平也提高。研究表明在MMP29 的启动子区含有NF2κB的结合位点,B16 细胞在pH值偏酸性的条件下培养可以导致PLD活化,随后激活ERK1P2 及p38,最终导致NF2κB活化,使得MMP29 的转录水平增加^[12]。以上结果都可以证明PLD与肿瘤的发生是密切相关的。

3.3 有丝分裂

PLD除了参与中性白细胞产生、MMP(间质金属蛋白酶)释放和前列腺素的生成等功能外,还有促进细胞增殖的作用^[13]。研究表明,有丝分裂与PLD复杂信号级联放大反应密切相关。1992 年有资料显示,外源添加PLD到血管平滑肌细胞使DNA合成增多,后续研究发现PLD在有丝分裂中的信号功能是通过刺激G蛋白偶联受体(GPCR)和受体蛋白酪氨酸激酶K(RPTK)来实现的,而且促成肿瘤的佛波酯十四烷酸和鞘氨醇增长也可以激活PLD。研究显示内皮素-1A处理血管平滑肌细胞可以引起细胞依赖于PLD活性的有丝分裂。另外,在伯醇存在的条件下来研究PLD的活性能够观察到丁醇可以抑制内皮素-1A介导的有丝分裂反应。Fukami和Takenawa进一步证明了在有丝分裂信号中涉及PLD,他们展示了在Balb/c3T3 细胞中,分裂素PDGF作用于血小板衍生的生长因子可以激活鞘氨醇和PLD。有研究

发现 PLD 的活化和 PA 分子量与 PDGF 的促有丝分裂作用是密切相关的。而且, 外源性添加细菌的 PLD, 结果产生 PA 的积聚和模拟 PDGF 方式的有丝分裂作用。以上结果暗示 PDGF 介导的有丝分裂信号途径与 PLD 有关。Moon 等检测了不同时期兔心脏的 PLD 水平, 发现在产后 0~3 d PLD1 蛋白表达增加, 而在产后 7 d 逐渐减少, 证明了在产后早期发育期间 PLD 与心肌细胞增殖和分化密切相关^[14]。然而, PLD 活化在有丝分裂信号途径中并不是普遍存在的, 它的发生与细胞类型和促有丝分裂的刺激密切相关。

4 展望

PLD 的激活与细菌、真菌及病毒的侵袭力密切相关。病原体自身的 PLD 或具有 PLD 活性的相关酶类在保护病原体本身和侵袭靶细胞时发挥重要的作用。PLD 在感染的发生和发展过程中扮演复杂而重要的角色。在已有研究的基础上, 本课题组正运用 RNA 干扰技术及亚细胞定位等方法来进一步探讨不同细胞在不同的生理条件下 PLD 激活后的下游事件, 希望能够彻底了解 PLD 激活与病原体侵袭宿主细胞功能的关系。

参 考 文 献

- [1] Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, *et al.* Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. *Biochem Biophys Acta*, 1999, **1439**(2): 245–263.
- [2] 吴 明, 卢韵碧, 陈如坤, 等. Changes in phospholipase D activity of leukocytes during human systemic inflammatory response syndrome induced by cardiopulmonary bypass. *Chinese Medical Journal*, 2003, **116**(6): 873–877.
- [3] Simon A Rudge, Vicki A Sciorra, Michelle Iwamoto, *et al.* Roles of phosphoinositides and of Spo14p (phospholipase

- D)-generated phosphatidic acid during yeast sporulation. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, **15**: 207–218.
- [4] McLain N, Dolan JW. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology*, 1997, **143**: 3521–3526.
- [5] Meijer HJ, Latijnhouwers M, Ligterink W, *et al.* A transmembrane phospholipase D in *Phytophthora* a novel PLD subfamily. *Gene*, 2005, **350**(2): 173–182.
- [6] Melendez DJ, Allen JM. Phospholipase D and immune receptor signalling. *Semi Immun*, 2002, **14**: 49–55.
- [7] O'Lunaigh N, Pardo R, Fensome A, *et al.* Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 3730–3746.
- [8] 纪 蕾, 韩 黎, 徐培君, 等. 李斯特菌侵袭宿主细胞过程中磷脂酶D活性变化的初步研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(5): 88–90.
- [9] Saida Mebarek, Hiba Komati, Fabio Naro, *et al.* Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. Published by The company of Biologists, 2007, **120**: 407–416.
- [10] Iyer SS, Barton JA, Bourgoin S, *et al.* Phospholipases D1 and D2 coordinately regulate macrophage phagocytosis. *J Immun*, 2004, **173**(4): 2615–2623.
- [11] Ho WT, Exton JH, Williger BT. Arfaptin 1 inhibits ADP-ribosylation factor-dependent matrix metalloproteinase-9 secretion induced by phorbol ester in HT 1080 fibrosarcoma cells. *FEBS Lett*, 2003, **537**(123): 91295.
- [12] Kato Y, Lambert CA, Colige AC, *et al.* Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 2005, **280**(12): 10938–10944.
- [13] Paul A, Plevin R. Evidence against a role for phospholipase D in mitogenesis. *Trends Pharmacol Sci*, 1994, **15**(6): 174–175.
- [14] Changjong MOON, Heechul KIM, Seungjoon KIM, *et al.* Transient expression of phospholipase D1 during heart development in rats. *J Vet Med Sci*, 2008, **70**: 411–413.