



## 专论与综述

## c-di-AMP 在细菌感染与免疫中的作用

宁唤唤<sup>1,2</sup> 徐志凯<sup>\*1</sup> 柏银兰<sup>\*1</sup>

1 空军军医大学基础医学院 微生物与病原生物学教研室 陕西 西安 710032

2 西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069

**摘要:** 环二腺苷酸(Cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是细菌中广泛存在的第二信号分子。c-di-AMP 在细菌中的代谢受二腺苷酸环化酶(Diadenylate cyclase, DAC)和磷酸二酯酶(Phosphodiesterase, PDE)的精密调控。c-di-AMP 不仅调节细菌生长、细胞壁稳态、离子转运等多种生理过程,而且能够被真核宿主胞内多种感应子/受体蛋白识别,从而调控抗感染免疫。细菌 c-di-AMP 参与调控宿主 I 型干扰素应答、NF- $\kappa$ B 信号通路活性、自噬以及炎症小体应答等固有免疫应答。此外, c-di-AMP 作为黏膜佐剂可诱导宿主适应性免疫。c-di-AMP 被认为是一种新发现的病原体相关的分子模式(Pathogen associated molecular pattern, PAMP),已成为细菌疫苗和药物研究中的新靶点。

**关键词:** 环二腺苷酸, 细菌, 感染, 免疫, 固有免疫

## Role of c-di-AMP in bacterial infection and immunity

NING Huan-Huan<sup>1,2</sup> XU Zhi-Kai<sup>\*1</sup> BAI Yin-Lan<sup>\*1</sup>

1 Department of Microbiology and Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

2 College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China

**Abstract:** Cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP) is a ubiquitous class of second messenger molecule in bacteria, whose metabolism is finely tuned by diadenylate cyclase (DAC) and phosphodiesterase (PDE). c-di-AMP is not only involved in many essential processes such as cell growth, cell wall homeostasis and ion transport, but also in host anti-bacterial immunity through being sensed by eukaryotic sensors/receptors of host cells. In particular, c-di-AMP has been found to play important roles in regulating host innate immunity such as type I interferon response, activation of NF- $\kappa$ B signal pathway, autophagy and inflammatory response. Acting as a mucosal adjuvant, c-di-AMP induces host adaptive immune response as well. Thus c-di-AMP is now considered to be a newly identified pathogen associated molecular pattern (PAMP), which becomes a new target in bacterial vaccines and drug research.

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81671638, 81371774); National Science and Technology Major Project (2018ZX10302302002004); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2017ZDXM-SF-022)

**\*Corresponding authors:** Tel: 86-29-84774527

E-mail: XU Zhi-Kai: zhikaixu@fmmu.edu.cn; BAI Yin-Lan: yinlanbai@fmmu.edu.cn

**Received:** 11-10-2018; **Accepted:** 18-12-2018; **Published online:** 28-01-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(81671638, 81371774); 国家“十三五”重大传染病专项课题(2018ZX10302302002004); 陕西省重点研发计划(2017ZDXM-SF-022)

**\*通信作者:** Tel: 029-84774527

E-mail: 徐志凯: zhikaixu@fmmu.edu.cn; 柏银兰: yinlanbai@fmmu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-10-11; **接受日期:** 2018-12-18; **网络首发日期:** 2019-01-28

**Keywords:** c-di-AMP, Bacteria, Infection, Immunity, Innate immune response

细菌通过第二信号分子感知细胞表面的信号并激活胞内靶标分子,将原始信号放大从而激活胞内一系列特异性基因的表达,最终影响细菌多种生理生化过程。环二腺苷酸(Cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是2008年发现的一种细菌第二信号分子<sup>[1]</sup>。目前已在多种细菌中发现了c-di-AMP,它不仅调节细菌生长代谢等多种生理学过程,而且能够被宿主识别并诱导免疫应答。因此,c-di-AMP成为了细菌性感染药物和疫苗研究的新靶点。本文主要对c-di-AMP的生理功能及其在宿主抗感染免疫中的作用进行综述。

## 1 c-di-AMP 概述

2008年,Witte等在解析枯草芽胞杆菌DNA完整性扫描蛋白A(DNA integrity scanning protein A, DisA)晶体结构时发现了c-di-AMP分子,因此将DisA命名为二腺苷酸环化酶(Diadenylate cyclase, DAC),并将其具有催化活性的结构域命名为Dac结构域<sup>[1]</sup>。c-di-AMP是由两分子ATP经二腺苷酸环化酶A(DacA)催化合成的环状核苷酸分子。枯草芽胞杆菌的DisA是第一个被发现的c-di-AMP合成酶<sup>[1]</sup>。枯草芽胞杆菌中的二鸟苷酸环化酶(Diguanylate cyclase)YybT可降解细菌环状核苷酸信号分子环二鸟苷酸(Cyclic dimeric guanosine monophosphate, c-di-GMP)。YybT含有GGDEF结构域,可催化GTP合成c-di-GMP,将YybT与其他菌属中含有GGDEF结构域的蛋白命名为GGDEF结构域蛋白(GGDEF domain protein containing PDE, GdpP)<sup>[2]</sup>。随后发现,YybT含有的DHH/DHHA1结构域具有磷酸二酯酶(Phosphodiesterase, PDE)活性,可水解c-di-AMP为pApA,是c-di-AMP的水解酶。本课题组成员发现结核分枝杆菌中的Rv2837c仅含有DHH/DHHA1结构域,可将c-di-AMP降解为AMP,并将其命名为CnpB(Cyclic nucleotide phosphodiesterase, CnpB)<sup>[3]</sup>。随后课题组成员发现肺炎链球菌中存在2种含有DHH/DHHA1结构域

的PDE酶:Pde1将c-di-AMP降解为pApA,Pde2可将c-di-AMP和pApA降解为AMP<sup>[4]</sup>。

目前研究表明c-di-AMP仅存在于细菌中,主要在厚壁菌门(如:芽胞杆菌、李斯特菌、葡萄球菌、链球菌)、放线菌门(如:结核分枝杆菌)和支原体中,见表1。

## 2 c-di-AMP 调控宿主固有免疫应答

固有免疫是机体抵御微生物尤其是胞内菌感染的重要防线。哺乳动物细胞通过模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR)识别微生物的病原体相关的分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMP),启动固有免疫反应<sup>[23]</sup>。一些致病菌产生的c-di-AMP可被宿主细胞识别并启动下游免疫反应,被认为是固有免疫中新发现的PAMP<sup>[12]</sup>。细菌感染宿主后c-di-AMP可能同时被真核细胞中多个感应子/受体识别,从而网络式精确调控机体抗感染状态。迄今为止,在真核细胞中发现4个c-di-AMP感应子/受体(Sensor/receptor)或接头蛋白(Adaptor):干扰素基因刺激分子(Stimulator of interferon genes, STING)<sup>[24]</sup>、一种RNA解旋酶DDX41(D-E-A-D [aspartate-glutamate-alanine-aspartate]-box polypeptide 41, DDX41)<sup>[25]</sup>、NF- $\kappa$ B控制还原酶(Reductase controlling NF- $\kappa$ B, RECON)<sup>[26]</sup>以及内质网膜接头蛋白(Endoplasmic reticulum [ER] membrane adaptor, ERApP)<sup>[27]</sup>(图1)。细菌感染后,c-di-AMP被宿主的感应子/受体识别,从而网络式调控宿主免疫状态,进而影响细菌在宿主体内的生长及传播。因此,c-di-AMP与宿主免疫的相互作用的研究有利于细菌性疾病新疫苗的研制。

### 2.1 c-di-AMP 激活 I 型干扰素应答

胞质监督途径(Cytosolic surveillance pathway, CSP)是机体抵抗病毒、细菌感染的重要免疫防御机制。细菌感染宿主后,其DNA被宿主DNA感受器环鸟-腺苷酸合酶(Cyclic-GMP-AMP synthase, cGAS)识别,活化的cGAS合成环鸟-腺苷酸

表 1 不同细菌中 c-di-AMP 的合成酶与分解酶及相关生理功能<sup>[5]</sup>Table 1 Synthetases and degrading enzymes of c-di-AMP in different bacteria and their physiological functions<sup>[5]</sup>

细菌 Bacteria	合成酶 Synthetases	分解酶 Degrading enzymes	表型 Phenotypes	参考文献 References
枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	DisA, CdaA, CdaS	GdpP, PgpH	c-di-AMP 水平降低: DNA 完整性降低, 钾离子通道系统受损, 细胞壁受损, 抗生素敏感性增强, 芽胞形成延迟 c-di-AMP reduced: decreased DNA integrity, impaired potassium ion channel system, weakened cell wall, increased resistance to antibiotics, delayed sporulation	[5-7]
单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	CdaA	PdeA, PgpH	c-di-AMP 水平降低: 抗生素敏感性增强, 细胞壁稳定性降低 c-di-AMP 水平升高: 酸胁迫敏感性降低, 宿主细胞 IFN- $\beta$ 应答增强, 诱导细胞焦亡增加 c-di-AMP reduced: increased sensitivity to antibiotics, reduced cell wall stability c-di-AMP elevated: sensitivity towards acid stress, enhanced IFN- $\beta$ response in host cells, increased cell pyroptosis	[8-9]
结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mtb DisA	Mtb PDE	c-di-AMP 水平降低: 生长略慢, 毒性增强, 宿主细胞 IFN- $\beta$ 应答降低, 诱导宿主细胞自噬降低 c-di-AMP 水平升高: 细菌长度变短, 毒性降低, 宿主细胞 IFN- $\beta$ 应答增强, 诱导宿主细胞自噬增加 c-di-AMP reduced: slightly slower growth rate, increased virulence, decreased IFN- $\beta$ response of host cells, reduced autophagy of host cells c-di-AMP elevated: smaller cell size, decreased virulence, induced increased IFN- $\beta$ response in host cells, increased induction of autophagy in host cells	[3,10-12]
耻垢分枝杆菌 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Ms DisA	Ms PDE	c-di-AMP 水平降低: C12-C20 脂肪酸合成下调 c-di-AMP 水平升高: 菌落变小, C12-C20 脂肪酸合成上调 c-di-AMP reduced: reduced C12-C20 fatty acids production c-di-AMP elevated: formed small colonies, increased C12-C20 fatty acids production	[13]
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	CdaA	GdpP, Pde2	c-di-AMP 水平升高: 细菌变小, 肽聚糖交联增加, 对靶向细胞壁、细胞膜的抗生素耐感性降低, 钾离子通道系统受损 c-di-AMP elevated: smaller cell size, increased peptidoglycan cross-linking, reduced sensitivity against cell wall and membrane targeting antibiotics, impaired potassium ion channel system	[14-16]
变形链球菌 <i>Streptococcus mutans</i>	CdaA	PdeA, Pde2	c-di-AMP 水平降低: 对过氧化氢敏感性增加, 胞外多糖产生增加 c-di-AMP 水平升高: 生物被膜形成增加 c-di-AMP reduced: increased sensitivity to hydrogen peroxide and enhanced polysaccharide synthesis c-di-AMP elevated: increased biofilm formation	[17-18]
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	CdaA	Pde1, Pde2	c-di-AMP 水平升高: 细菌长链形成受损, 生长降低, 钾离子通道功能受损 c-di-AMP elevated: impaired ability of long chain formation, decreased growth, and imbalance in the potassium ion channel	[4,19]
化脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	CdaA	GdpP, Pde2	c-di-AMP 水平升高: 半胱氨酸蛋白酶(SpeB)活性降低, 毒性降低, 对抗生素敏感性降低 c-di-AMP elevated: impaired biogenesis of SpeB, decreased virulence and increased antibiotic resistance	[20]
猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i> (SS2)	CdaA	GdpP, Pde2	c-di-AMP 水平升高: 生长变慢, 生物被膜形成增加, 毒性降低 c-di-AMP elevated: reduced growth, increased biofilm formation and reduced virulence	[21]
B 群链球菌 Group B <i>Streptococcus</i>	NudP	CdnP	c-di-AMP 水平升高: 诱导 IFN- $\beta$ 应答增强, 毒力降低 c-di-AMP elevated: increased induction of IFN- $\beta$ response in host cells and decreased virulence	[22]

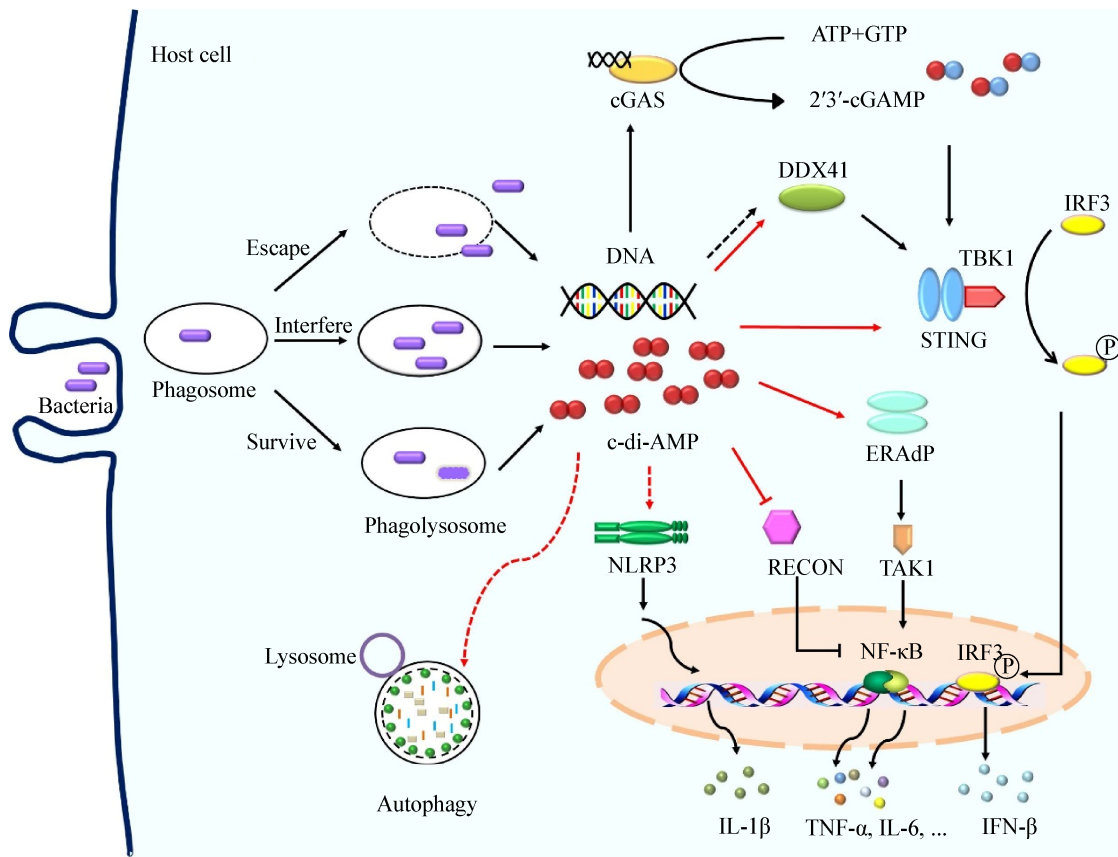


图 1 c-di-AMP 调控宿主固有免疫应答

Figure 1 c-di-AMP regulates host innate immune response

注: 病原菌感染后, 细菌自身释放的或细菌被机体杀伤后“泄露”的 c-di-AMP 和 DNA 参与调节宿主固有免疫应答. 病原菌被巨噬细胞吞噬后, 细菌 DNA 通过 cGAS 或者 DDX41 介导 STING 依赖的 I 型干扰素应答, c-di-AMP 也可通过 DDX41 和 STING 激活宿主 IFN-β 应答. c-di-AMP 通过激活 ERAdP 或者解除 RECON 对 NF-κB 的抑制效应从而激活 NF-κB 通路活性. c-di-AMP 可诱导 NLRP3 依赖的炎症小体应答. 此外, c-di-AMP 也可激活宿主细胞自噬.

Note: After the bacteria infect the host, c-di-AMP and DNA that are released by the bacteria themselves or killed by host are involved in regulating the host innate immune response. After phagocytosis by macrophage, bacterial DNA mediates STING-dependent type I interferon responses via cGAS or DDX41, and c-di-AMP also induces IFN-β responses via DDX41 and STING. c-di-AMP activates NF-κB pathway by activating ERAdP or inhibiting RECON. c-di-AMP induces NLRP3-dependent inflammasome response. In addition, c-di-AMP activates host cell autophagy.

(Cyclic-GMP-AMP, cGAMP)并将感染信号传递至 STING, 接头分子 STING 募集 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)并激活干扰素调节因子 3 (Interferon regulatory factor 3, IRF3), 诱导 I 型干扰素产生<sup>[28]</sup>. STING 是调控 I 型干扰素表达的关键分子之一, 在机体抵抗病毒及细菌感染中发挥重要作用. 多个研究证明 STING 是 c-di-GMP 的直接受体分子<sup>[29-31]</sup>. c-di-GMP 与 DDX41 也存在直接相互作用, 而 DDX41 相比于 STING 对

c-di-GMP 具有更高的亲和力, 同时 c-di-AMP 也可与 DDX41 结合<sup>[25]</sup>. STING 不仅参与细菌 DNA 诱导的固有免疫, 还可识别细菌特有的环状核苷酸分子 c-di-AMP 和 c-di-GMP 从而调控抗感染免疫<sup>[28]</sup>.

2010 年, Woodward 等<sup>[9]</sup>首次报道 c-di-AMP 能够直接激活宿主 IFN-β 应答. 敲除李斯特菌 c-di-AMP 分解酶突变株感染巨噬细胞后 IFN-β 表达显著上调, 而 c-di-AMP 合成酶的条件性去除 (Conditional depletion)株感染巨噬细胞后也可诱导

IFN- $\beta$  应答<sup>[11]</sup>。本课题组成员前期首次报道, 结核分枝杆菌 Rv3586 是与 DisA 同源的 c-di-AMP 合成酶<sup>[32]</sup>, 随后采用 c-di-AMP 分解酶敲除的结核分枝杆菌感染巨噬细胞, 发现 IFN- $\beta$  应答水平升高, 而该过程不依赖于 NOD2<sup>[3]</sup>。Dey 等发现过表达 c-di-AMP 合成酶或敲除 c-di-AMP 分解酶的结核分枝杆菌均可激活 IRF, 从而诱导宿主 IFN- $\beta$  应答水平上升, 且该过程依赖于 STING 的激活<sup>[12]</sup>, 同时 STING 蛋白对于 c-di-GMP 诱导的 I 型干扰素反应也是必需的<sup>[33]</sup>。用过表达 Rv3586 的重组卡介苗感染巨噬细胞, 发现 IFN- $\beta$  表达显著增加<sup>[34]</sup>。上述研究表明, c-di-AMP 通过 STING 通路介导了宿主以 I 型干扰素 IFN- $\beta$  释放为特征的固有免疫应答。

此外, c-di-AMP 能够显著诱导树突状细胞 (Dendritic cell, DC) IFN- $\beta$  应答, 但是当 c-di-AMP 持续刺激 DC 时, 可引发钙蛋白酶介导的 STING 蛋白的降解, 使得 IFN- $\beta$  分泌减少<sup>[35]</sup>。提示细菌来源的 c-di-AMP 虽然可诱导宿主细胞免疫应答, 但是这种作用可能是自限性的、不连续的, 推测宿主具有相应的调控机制, 以避免 c-di-AMP 诱导过度的免疫应答导致免疫病理损伤。

## 2.2 c-di-AMP 促进 NF- $\kappa$ B 通路活性

NF- $\kappa$ B 是广泛存在的多功能核转录因子, 其调节包括免疫识别受体、细胞因子、抗原提呈蛋白、黏附分子、趋化因子等多种靶基因表达, 这些分子在抗感染及炎症反应中发挥重要作用。

NF- $\kappa$ B 控制还原酶 RECON 是 NF- $\kappa$ B 通路抑制子。研究发现, c-di-AMP 抑制 RECON 活性从而促进了炎症细胞因子 IFN- $\beta$ 、趋化因子 CCL5、CXCL11 的表达, 限制了李斯特菌、衣原体在宿主免疫细胞及非免疫细胞(肝脏细胞系)内的存活<sup>[26]</sup>。c-di-AMP 通过抑制 RECON 酶活性增强促炎因子的产生, 这种抗感染方式与依赖 STING 激活的抗感染应答是不同的。然而, 李斯特菌感染肝脏细胞后, 其分泌的 c-di-AMP 抑制了 RECON 活性, 增强 NF- $\kappa$ B 活性及一氧化氮(NO)产生, 但 NO 却促

进了细菌在细胞间的传播(Cell-to-cell spread), 这不同于以往的 c-di-AMP 有助于宿主清除病原菌感染机制, 推测不同细菌感染宿主后 c-di-AMP 作用时间、方式及与宿主细胞相互作用存在差异<sup>[36]</sup>。

最新发现, 内质网膜接头蛋白 ERAdP 缺陷小鼠感染李斯特菌后, 促炎细胞因子产生减少, 感染小鼠对细菌清除能力降低, 小鼠生存率降低, 表明 ERAdP 介导促炎细胞因子产生对于机体控制细菌感染至关重要<sup>[27]</sup>。c-di-AMP 与 ERAdP 蛋白 C 端结合, 使 ERAdP 形成二聚体并激活转化生长因子  $\beta$  激活酶 1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1, TAK1), 启动下游 NF- $\kappa$ B 活化, 诱导促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 释放增加, 促进了机体抗感染免疫<sup>[27]</sup>。ERAdP-TAK1 通路为清除李斯特菌感染所必需。ERAdP 是 c-di-AMP 的直接感应子, 而且 c-di-AMP 与 ERAdP 亲和力强于 STING<sup>[27]</sup>。

## 2.3 c-di-AMP 激活炎症小体

NOD 样受体(NOD like receptor, NLR)是一类分布于胞浆中的识别病原体的 PRR 分子, 招募多种蛋白质组成炎症小体(Inflammasome), 炎性小体激活后活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1), 活化的 Caspase-1 剪切 IL-1 $\beta$ 、IL-18 使其成熟, 并发挥促炎作用<sup>[37]</sup>。以 IL-1 $\beta$ 、IL-18 产生为特征的炎症小体的激活是宿主防御多种病原体所必需<sup>[38]</sup>。

细菌感染宿主后, 适度的炎症应答可促进机体对病原菌清除。NLR 家族 NLRP1、NLRP3、NLRC4 以及 HIN200 结构域家族的黑素瘤缺乏因子 2 (Absent in melanoma 2, AIM2)炎症小体可识别病原体上的 PAMP, 产生防御性炎症反应。其中 NLRP3 主要分布于巨噬细胞、中性粒细胞胞质及胞膜, 与病毒和胞内菌感染关系密切, 也是 NLR 家族研究最为深入的成员<sup>[37]</sup>。研究发现, c-di-AMP 和 c-di-GMP 均可诱导巨噬细胞系 THP-1 和小鼠骨髓来源巨噬细胞(Bone marrow derived macrophage, BMDM) Caspase-1 的表达增加, 并释放高水平的

IL-1 $\beta$ ; NLRP3<sup>-/-</sup>小鼠的 BMDM 对 c-di-AMP 和 c-di-GMP 刺激的反应性缺失, 表明 c-di-AMP 和 c-di-GMP 激活炎症小体应答是 NLRP3 依赖的, 且该过程不依赖于 STING 分子<sup>[39]</sup>。课题组前期研究表明 c-di-AMP 能够诱导巨噬细胞 NLRP3、IL-1 $\beta$  转录上调, 而且过表达 Rv3586 的重组卡介苗可促进炎症小体关键分子 NLRP3、NLRC4、IL-1 $\beta$  表达上调(待发表数据)。因此, c-di-AMP 对炎症小体的激活作用有助于机体抗感染免疫。

#### 2.4 c-di-AMP 激活宿主细胞自噬

自噬(Autophagy)是真核细胞中普遍存在的免疫防御机制。促进自噬有助于宿主对入侵病原菌(如: 结核分枝杆菌、沙门氏菌、李斯特菌)的清除。微管相关蛋白质轻链 3 (LC3)的表达被认为是自噬发生的金标准<sup>[40]</sup>, 而 p62 蛋白水平与自噬活性负相关<sup>[41]</sup>。

Dey 等<sup>[12]</sup>首次报道, 过表达 c-di-AMP 合成酶的重组结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 自噬小体标志性分子 LC3 表达显著增加, 同时 LC3II 蛋白水平显著增加, 表明 c-di-AMP 激活了自噬, 且自噬的激活抑制了感染细胞内细菌的生长。本课题组成员发现 c-di-AMP 能够诱导巨噬细胞自噬相关基因 LC3、Beclin1、Atg5 及 Atg7 转录水平上调, 但是过表达 c-di-AMP 合成酶的重组卡介苗并不影响 LC3 蛋白表达水平<sup>[37]</sup>。自噬是多基因协同完成的精密调控过程, 营养匮乏、感染等因素均可诱导自噬发生<sup>[42-43]</sup>, 而自噬信号的缺乏和抑制是胞内菌免疫逃逸的重要原因之一, 因此提高 c-di-AMP 水平促进细胞自噬, 有助于机体抵抗病原菌感染<sup>[12]</sup>。

### 3 c-di-AMP 诱导的黏膜免疫应答

黏膜免疫系统广泛分布于呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道黏膜下及一些外分泌腺体处的淋巴组织, 是执行局部非特异性免疫功能的主要场所, 对呼吸道、胃肠道及泌尿生殖道等抗感染免疫非常重要。

Ebensen 等<sup>[44]</sup>将 c-di-AMP 作为佐剂, 与  $\beta$ -半乳糖苷酶联合滴鼻免疫小鼠, 可促进 IgA 和 IgG,

及 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-17、IL-4 分泌, 表明 c-di-AMP 作为黏膜免疫佐剂可诱导强烈的适应性免疫应答。以 c-di-AMP 及 cGAMP 与白蛋白联合免疫小鼠, 也可诱导黏膜免疫应答, 并且 c-di-AMP 相比于 cGAMP 能够诱导更强的体液和细胞免疫应答<sup>[45]</sup>。对其机制研究表明, c-di-AMP 可促进 DC 成熟相关分子 CD80、CD86、MHC-II 类分子的表达<sup>[45]</sup>。DC 细胞膜上的 CD80、CD86 是 T 细胞表面共刺激分子 CD28 的配体, 因此, c-di-AMP 可促进 T 细胞的增殖和活化, 进而发挥特异性免疫。课题组研究发现, c-di-AMP 与结核分枝杆菌抗原联合经黏膜免疫小鼠, 可诱导高水平的黏膜免疫应答, 并可抵抗一定数量的结核分枝杆菌感染(待发表数据)。因此, c-di-AMP 与亚单位疫苗联合用于黏膜免疫, 可能获得免疫效果更好的黏膜免疫疫苗。

### 4 结语

细菌 c-di-AMP 激活宿主固有免疫在抗感染中的积极作用备受关注<sup>[3,11-12,22,46]</sup>。在宿主与细菌的长期作用中, 宿主具备了 c-di-AMP 的识别、感应机制以监控感染。一方面, 细菌分泌的 c-di-AMP 能够激活以 I 型干扰素释放为特征的固有免疫应答; 另一方面, 细菌通过控制释放到宿主细胞中 c-di-AMP 的含量, 逃避免疫识别而加剧感染的发生。c-di-AMP 可诱导机体 I 型干扰素应答、炎症因子激活及自噬发生, 有助于机体抗感染免疫; 但同时, c-di-AMP 诱导产生的 NO 促进细菌的细胞间播散<sup>[36]</sup>。因此, 需要进一步借助多种研究方法进行多层次深入的研究, 全面审视 c-di-AMP 在宿主感染中发挥的作用。本课题组研究表明, c-di-AMP 作为免疫佐剂单独使用时免疫效能较低, 与抗原联合免疫可显著增强抗原免疫效能, 同时通过提高卡介苗内源性 c-di-AMP 的水平, 可显著提高卡介苗诱导的免疫应答水平, 这将有助于新型细菌疫苗的设计<sup>[34]</sup>。此外, 鉴于多种细菌采用 c-di-AMP 为信号分子, 若用于疫苗或免疫调节剂, 需要进一步研究 c-di-AMP 对机体正常菌群的可能

的调节作用。目前对细菌 c-di-AMP 的研究仍处于早期阶段, c-di-AMP 在宿主固有免疫和适应性免疫中的作用机制仍需进一步深入探究。

## REFERENCES

- [1] Witte G, Hartung S, Büttner K, et al. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30(2): 167-178
- [2] Rao F, See RY, Zhang DY, et al. YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(1): 473-482
- [3] Yang J, Bai YL, Zhang Y, et al. Deletion of the cyclic di-AMP phosphodiesterase gene (*cnpB*) in *Mycobacterium tuberculosis* leads to reduced virulence in a mouse model of infection[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(1): 65-79
- [4] Bai YL, Yang J, Zarrella TM, et al. Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(3): 614-623
- [5] Fahmi T, Port GC, Cho KH. c-di-AMP: An essential molecule in the signaling pathways that regulate the viability and virulence of Gram-Positive bacteria[J]. *Genes*, 2017, 8(8): 197
- [6] Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, et al. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *EMBO Reports*, 2011, 12(6): 594-601
- [7] Luo Y, Helmann JD. Analysis of the role of *Bacillus subtilis*  $\sigma^M$  in  $\beta$ -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(3): 623-639
- [8] Witte CE, Whiteley AT, Burke TP, et al. Cyclic di-AMP is critical for *Listeria monocytogenes* growth, cell wall homeostasis, and establishment of infection[J]. *mBio*, 2013, 4(3): e00282-13
- [9] Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response[J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1703-1705
- [10] Manikandan K, Sabareesh V, Singh N, et al. Two-step synthesis and hydrolysis of cyclic di-AMP in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86096
- [11] Dey RJ, Dey B, Zheng Y, et al. Inhibition of innate immune cytosolic surveillance by an *M. tuberculosis* phosphodiesterase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(2): 210-217
- [12] Dey B, Dey RJ, Cheung LS, et al. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(4): 401-406
- [13] Tang Q, Luo YC, Zheng C, et al. Functional analysis of a c-di-AMP-specific phosphodiesterase MspPDE from *Mycobacterium smegmatis*[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2015, 11(7): 813-824
- [14] Corrigan RM, Abbott JC, Burhenne H, et al. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002217
- [15] Dengler V, McCallum N, Kiefer P, et al. Mutation in the c-di-AMP cyclase *dacA* affects fitness and resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73512
- [16] Moscoso JA, Schramke H, Zhang Y, et al. Binding of cyclic di-AMP to the *Staphylococcus aureus* sensor kinase KdpD occurs via the universal stress protein domain and downregulates the expression of the Kdp potassium transporter[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 98-110
- [17] Peng X, Zhang Y, Bai GC, et al. Cyclic di-AMP mediates biofilm formation[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(5): 945-959
- [18] Cheng XQ, Zheng X, Zhou XD, et al. Regulation of oxidative response and extracellular polysaccharide synthesis by a diadenylate cyclase in *Streptococcus mutans*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(3): 904-922
- [19] Bai YL, Yang J, Eisele LE, et al. Two DHH subfamily 1 proteins in *Streptococcus pneumoniae* possess cyclic di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(22): 5123-5132
- [20] Cho KH, Kang SO. *Streptococcus pyogenes* c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, influences SpeB processing and virulence[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69425
- [21] Du B, Ji WH, An HT, et al. Functional analysis of c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, in *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(9/10): 749-758
- [22] Andrade WA, Firon A, Schmidt T, et al. Group B *Streptococcus* degrades cyclic-di-AMP to modulate STING-dependent type I interferon production[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(1): 49-59
- [23] Kumar S, Ingle H, Prasad DVR, et al. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, 39(3): 229-246
- [24] Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP[J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 515-518
- [25] Parvatiyar K, Zhang ZQ, Teles RM, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(12): 1155-1161
- [26] McFarland AP, Luo SK, Ahmed-Qadri F, et al. Sensing of bacterial cyclic dinucleotides by the oxidoreductase RECON promotes NF-kappaB activation and shapes a proinflammatory antibacterial state[J]. *Immunity*, 2017, 46(3): 433-445
- [27] Xia PY, Wang S, Xiong Z, et al. The ER membrane adaptor ERAdp senses the bacterial second messenger c-di-AMP and initiates anti-bacterial immunity[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(2): 141-150
- [28] Marinho FV, Benmerzoug S, Oliveira SC, et al. The emerging roles of STING in bacterial infections[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(11): 906-918
- [29] Yin Q, Tian Y, Kabaleeswaran V, et al. Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING[J]. *Molecular Cell*, 2012, 46(6): 735-745
- [30] Ouyang SY, Song XQ, Wang YY, et al. Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding[J]. *Immunity*, 2012, 36(6): 1073-1086

- [31] Shang GJ, Zhu DY, Li N, et al. Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19(7): 725-727
- [32] Bai YL, Yang J, Zhou X, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35206
- [33] Sauer JD, Sotelo-Troha K, von Moltke J, et al. The *N*-ethyl-*N*-nitrosoourea-induced *Goldenticket* mouse mutant reveals an essential function of *Sting* in the *in vivo* interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(2): 688-694
- [34] Ning HH. Biological and immunological characteristics of a recombinant BCG vaccine based on c-di-AMP[D]. Xi'an: Master's Thesis of the Fourth Military Medical University, 2018 (in Chinese)  
宁唤唤. 环二腺苷酸(c-di-AMP)为基础的重组 BCG 疫苗的生物及免疫学特性研究[D]. 西安: 空军军医大学硕士学位论文, 2018
- [35] Rueckert C, Rand U, Roy U, et al. Cyclic dinucleotides modulate induced type I IFN responses in innate immune cells by degradation of STING[J]. *The FASEB Journal*, 2017, 31(7): 3107-3115
- [36] McFarland AP, Burke TP, Carletti AA, et al. RECON-dependent inflammation in hepatocytes enhances *Listeria monocytogenes* cell-to-cell spread[J]. *mBio*, 2018, 9(3): e00526-18
- [37] Wawrocki S, Druszczynska M. Inflammasomes in *Mycobacterium tuberculosis*-driven immunity[J]. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2017, 2017: 2309478
- [38] Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives[J]. *Journal of Inflammation Research*, 2015, 8: 15-27
- [39] Abdul-Sater AA, Tattoli I, Jin L, et al. Cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP activate the NLRP3 inflammasome[J]. *EMBO Reports*, 2013, 14(10): 900-906
- [40] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(2): 453-458
- [41] Hu D, Wu J, Zhao RP, et al. ESAT6 inhibits autophagy flux and promotes BCG proliferation through MTOR[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 477(2): 195-201
- [42] Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(10): 1014-1024
- [43] Ning HH, Xu ZK, Bai YL. Progress in molecular mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* regulating autophagy in host cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2017, 33(6): 849-853 (in Chinese)  
宁唤唤, 徐志凯, 柏银兰. 结核分枝杆菌调控宿主细胞自噬的分子机制研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(6): 849-853
- [44] Ebensen T, Libanova R, Schulze K, et al. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant[J]. *Vaccine*, 2011, 29(32): 5210-5220
- [45] Škrnjug I, Guzmán CA, Ruecker C. Cyclic GMP-AMP displays mucosal adjuvant activity in mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110150
- [46] Zhang Y, Yang J, Bai GC. Cyclic di-AMP-mediated interaction between *Mycobacterium tuberculosis*  $\Delta$ *cnpB* and macrophages implicates a novel strategy for improving BCG vaccination[J]. *Pathogens and Disease*, 2018, 76(2): fty008