

李斯特菌诱导宿主细胞骨架重排与磷脂酶 D

韩 黎¹ 吴旭琴² 孟玉芬² 纪 蕾² 陈世平³

(¹ 中国人民解放军疾病预防控制中心医院感染监督中心 北京 100071)

(² 苏州大学医学院微生物教研室 苏州 215006)

(³ 中国人民解放军总医院感染管理研究科 北京 100853)

摘 要 无论是免疫细胞对病原体的主动吞噬,还是病原体诱导非吞噬细胞的被动吞噬,均是不同细胞膜受体介导的细胞肌动蛋白骨架重排过程,受到单体 G 蛋白和肌动蛋白骨架相关蛋白的精密调控。细胞内重要信号蛋白,磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 D (PLD) 的活性变化与细胞肌动蛋白骨架重排密切相关,其参与调节了由抗体受体 (FcγR) 及补体受体 (CR3) 介导的免疫细胞的主动吞噬,而细胞肌动蛋白骨架解聚蛋白 cofilin 被磷酸化后可与 PLD 结合并激活 PLD,进而调节肌动蛋白骨架重排。另一方面, cofilin 磷酸化状态严格调控李斯特菌感染细胞过程中的肌动蛋白骨架重排。因此,阐明 PLD 是否在李斯特菌感染细胞过程中被激活并参与调节肌动蛋白骨架重排,将有助于揭示 PLD 激活对感染发生的调控作用,对透彻理解细菌感染宿主细胞的分子机制具有重要意义。

关键词 肌动蛋白骨架重排;磷脂酶 D;李斯特菌

中图分类号: Q93 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)05-0852-04

细胞吞噬是机体天然免疫系统在抗感染生理过程中的重要细胞反应,它激发了细胞内一系列细胞毒性反应,如呼吸暴发、炎症因子释放以及抗原提呈等。而许多以胞内感染为特征的病原体,如结核杆菌、李斯特菌、志贺氏菌、立克次体等,则可诱导非吞噬细胞如粘膜上皮细胞、血管内皮细胞等对其吞噬,以躲避宿主免疫攻击,穿越组织屏障进而在宿主细胞内不断生长和繁殖。目前,人们对宿主细胞吞噬过程在时间和空间上的信号转导机制的理解仍十分有限,解码宿主细胞吞噬外源颗粒的调节机制很有挑战性。

1 李斯特菌感染与细胞肌动蛋白骨架重排

微生物病原体在长期进化过程中形成了两种侵入非吞噬细胞如粘膜上皮细胞、血管内皮细胞等的精妙机制^[1]。一种是“触发式”,指细菌与宿主细胞接触,向其胞质内注入入侵因子,如细菌的 III 型分泌蛋白,Exo S 蛋白(铜绿假单胞菌) Spt P、Sop E 蛋白(沙门菌),刺激细胞单体 G 蛋白家族-RhoA、Rac1 和 cdc42 蛋白活性,引起宿主细胞形态的明显改变,形成胞膜皱褶以吞噬细菌;另一种是“拉链式”,即细菌表面配体与宿主细胞膜受体结合,激活胞内信号通路,造成肌动蛋白骨架重排(聚合或解聚)引发细胞膜对菌体的渐进包裹吞噬而不是肌动蛋白骨架大规模重组^[2,3]。

其中,单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),简称李斯特菌,可侵入非吞噬细胞而穿越肠粘膜、胎盘及血脑屏障三种天然免疫屏障,引起胃肠、中枢神经系统等炎症,致死率高达 30%。李斯特菌即是以典型的“拉链式”侵入宿主

细胞,并以基于宿主肌动蛋白的运动方式,在细胞间穿梭感染^[4]。类似现象在志贺氏菌、立克次体、病毒等对细胞侵袭过程中也有报道。介导该过程的李斯特菌表面配体为内化素(Intestinalin, Inl),有两个亚型 InlA 和 InlB。其中 InlB 更为普遍,介导侵入的细胞类型也较多,与细胞膜受体的结合及引发的胞内信号转导机制相对比较清晰^[5]。

InlB 蛋白的 N 端为 LRR 重复序列,可与宿主细胞膜肝细胞生长因子受体(HGF-R/Met)结合;C 端序列可使 InlB 蛋白锚定在细菌主体表面,与侵袭性密切相关。InlB 的宿主细胞受体为 HGF-R/Met,是一种酪氨酸激酶。InlB 与其结合,可导致其胞内酪氨酸位点磷酸化,从而激活下游适配蛋白 Gab1, Cbl 和 Shc,以及 PI-3K(磷酸肌醇 3-磷酸激酶)^[6]。PI-3K 直接作用或催化细胞膜 PIP₂(磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸)磷酸化生成 PIP₃(磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸),进而刺激 Rac1 单体 G 蛋白的鸟苷酸交换因子(GEF),激活 Rac1。Rac1 通过其下游底物 PAK(p21 蛋白激酶),进而调控重要的细胞形态变化信号级联 LIM 激酶/cofilin 而诱发吞噬。

Cofilin 是一种肌动蛋白丝(F-actin)解聚蛋白,其可被 LIM 激酶磷酸化失活,促进的 F-actin 聚合和纤维束的形成;而特异性的 SSH 磷酸水解酶可使其去磷酸化而恢复活性^[7]。Cofilin 的这种磷酸化状态变化已被证明是许多生理过程的调节核心,如 T 细胞趋化性^[8]、Hela 细胞有丝分裂等。Bieme 等最近证实,李斯特菌诱导的 Vero 细胞对其吞噬受 cofilin 磷酸化状态的严格调控^[9]。Cofilin 的过度磷酸化会促使吞噬点附近 F-actin 纤维束过量形成而抑制李斯特菌的进入;而 cofilin

基金项目:国家自然科学基金(30500462)

作者简介:韩 黎(1973-),男,山东人,博士,副研究员,主要从事感染机理及信号转导研究。Tel 86-10-66933338, Fax 86-10-66949638;

E-mail: Lihan@301hospital.com

收稿日期:2005-10-13;接受日期:2005-12-12;修回日期:2006-04-20

活性过度增强(不可磷酸化诱变株 S3A 的过度表达),也导致吞噬小体无法形成而抑制吞噬。

2 细胞肌动蛋白骨架与 PLD

磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 D(PLD)催化水解磷脂酰胆碱(PC)动物细胞膜重要组成成分,生成磷脂酸 PA 和胆碱基。PLD 的激活是细胞信号转导中的重要效应体系,在一系列生理反应,如中性粒细胞呼吸暴发、白细胞脱颗粒、肿瘤迁移等起重要调控作用,已成为临床药物研发的重要治疗靶点之一^[10,11]。目前,已被分离鉴定的哺乳动物细胞 PLD 有 PLD1 和 PLD2 两亚型,两者享有 50% 的序列同源性,均包含有特征性 HXKX4DGG/S 序列。PLD 活性的调控机制相当复杂:多种生长因子、白细胞介素、神经介导因子、粘附因子、物理刺激因素等均可激活磷脂酶 D,如表皮生长因子(EGF)、血小板分化生长因子(PDGF)、胰岛素(Insulin)等通过受体酪氨酸激酶;乙酰胆碱、甲酰三肽(FMLP)等通过异聚 G 蛋白受体有效调控 PLD 活性。在细胞内,PLD 激活受到单体 G 蛋白(RhoA/Cdc42/Rac1、ARF、Ral/Ras 等)、磷脂酶 C、酪氨酸激酶、丝氨酸/缬氨酸激酶(蛋白激酶 C)、磷脂酰肌醇 3-磷酸激酶(PI-3K)等细胞内重要信号调节蛋白的调控^[12]。但细胞膜受体介导的 PLD 不同亚型的激活及其与许多胞内蛋白的相互作用机制还远未阐明。

尽管 PLD 两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。首先,许多细胞肌动蛋白骨架蛋白及其重组过程中的重要调控因子可直接与 PLD 作用而调控其活性。 α -actin(肌细胞肌动蛋白)、 β -actin(非肌细胞肌动蛋白)、 α -actinin(辅肌动蛋白)、fodrin 等与 PLD2, β -actin 与 PLD1 均可直接结合,抑制其较强的基础活性^[13];恰恰相反,肌动蛋白丝(F-actin)则可结合激活 PLD。这种双向调节特征在进化中相当保守^[14]。更多的,PIP₂ 和 PIP₃ 这两种肌动蛋白骨架重组的重要调节因子,可通过与 PLD 蛋白的 PH(pleckstrin homology)和 PX(phox homology)功能区的直接作用而显著调节 PLD 的胞内转位和活性,尤其是 PLD 与细胞膜的连接^[15]。另一方面,PLD 催化反应的产物 PA 做为细胞内第二信使分子在细胞肌动蛋白骨架重排中发挥重要作用^[16]。因此 PLD 极有可能直接参与伴有肌动蛋白骨架重组的胞吞、胞内各种小体的运输等生理过程。

另一方面,细胞膜受体介导的 PLD 激活受到重要的细胞肌动蛋白骨架调节中枢—单体 G 蛋白,如 RhoA、Cdc42、Rac1、ARF 等的调控。RhoA 调节细胞紧张纤维束的形成、Rac1 控制细胞片层足状改变、Cdc42 影响细胞刺突的形成^[17]。人胚胎肾细胞中,神经介质乙酰胆碱通过 M₃ 乙酰胆碱受体分别激活胞内酪氨酸激酶和 PI-3K,进而分别激活 RhoA 和 ARF1 两类单体 G 蛋白。RhoA 直接与 PLD 结合,也可通过其下游

效应蛋白 Rho 激酶强烈激活 PLD(前面已述,其下游为 LIM 激酶和 cofilin),并伴显著的细胞形态变化(肌动蛋白骨架的重组)^[18]。另一 Rho 蛋白家族的效应蛋白,蛋白激酶 N 虽可直接作用激活 PLD1,但其机制更有可能是直接与 α -actinin 结合,修正肌动蛋白骨架相关蛋白 α -actinin 对 PLD 活性的抑制作用^[19]。另外,在溶血磷脂酸 LPA 诱导的成纤维细胞紧张纤维束的形成过程中伴随 PLD 激活并且至关重要。这种激活受到 Rho 激酶的调节,还与 α -actinin 有关^[20]。

3 感染吞噬及炎症反应中的 PLD 活性变化

PLD 与感染吞噬和机体炎症密切相关^[21]。首先,PLD 与感染病原体,如细菌、真菌及病毒的侵袭力密切相关,即病原体自身 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作用。另一方面,PLD 激活与炎症反应,如细胞脱颗粒、花生四烯酸、细胞白三烯等重要炎症因子的产生和释放密切相关。如中性粒细胞呼吸暴发中,PLD 活性直接影响 NADPH 过氧化物酶的激活^[22]。更为重要的是,PLD 激活可能与细胞尤其是免疫细胞对病原体的免疫吞噬有关。研究表明,PLD 参与调节 Fc γ R 及 CR3 介导的免疫吞噬细胞对病原体的吞噬^[23]。O'Lunaigh 等利用转染效率较高的电转化法将带绿色荧光蛋白(GFP)的 PLD 融合基因导入 RBL 肥大细胞中,用抗二硝基苯酚-IgE 刺激 RBL 肥大细胞发现,由 Fc γ RI 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)。另外,在巨噬细胞对结核杆菌的吞噬过程伴有 PLD 激活,并且 PLD1 和 PLD2 两种亚型共同参与调节吞噬^[24]。而 Goldfine 则发现在巨噬细胞内李斯特菌可通过其表面蛋白—李斯特菌素诱导巨噬细胞内 PLD 激活,但该 PLD 激活过程蕴含相当复杂的信号转导,蛋白激酶 C 和胞浆钙均参与其中,而且这种 PLD 激活似乎是李斯特菌从巨噬细胞吞噬小体中逃逸的必要条件^[25]。另外,李斯特菌刺激的人单核细胞中 PLD1 亚型表达也显著升高。还有,在整合素 Integrin 介导的中性粒细胞对外源颗粒的吞噬过程早期 PLD 被激活,这种激活对后续吞噬过程的完成至关重要^[26]。但是,PLD 在这些生理过程中的具体功能及其下游目标蛋白的效应机制仍不十分清楚。

我们的研究证实,在人胚胎肾细胞中, M₃ 乙酰胆碱受体介导的 PLD 激活受到肌动蛋白骨架重排关键蛋白 LIM 激酶/cofilin 信号级联的显著调控^[27],被 LIM 激酶磷酸化的失去解聚活性的 cofilin 可在细胞内与 PLD1 结合而刺激 PLD 活性显著升高,而且我们的初步实验表明在李斯特菌感染 Vero 细胞过程中的确伴有 PLD 激活(未公开发表资料),但具体规律和机制尚有待进一步研究。

4 展望

无论是免疫细胞对病原体的主动吞噬,还是非吞噬细胞

被病原体的诱导吞噬,均是不同细胞膜受体介导的细胞肌动蛋白骨架重排过程,其在时间和空间上的信号转导机制仍不清楚。既然李斯特菌诱导非吞噬细胞对其吞噬是细菌表面蛋白介导的、LIM 激酶/cofilin 信号级联严格调控的肌动蛋白骨架重排过程,而细胞肌动蛋白骨架重组与 PLD 活性变化又是紧密相关、交互相联的生理过程,那么 PLD 是否在李斯特菌感染细胞过程中被激活并参与调节肌动蛋白骨架重排,如果参与,其激活机制和具体功能如何,成为探讨胞内感染病原体诱导非吞噬细胞对其吞噬的分子机制而亟待解决的关键问题。对这一问题的深入研究将对透彻理解微生物感染宿主细胞的分子机制具有重要意义;同时,也为寻找可能药物靶点、探索新一代抗菌药物提供一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Rottner K, Stradal TE, Wehland J. Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev Cell*, 2005, **9**: 3 – 17.
- [2] Niedergang F, Chavrier P. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, **291**: 43 – 60.
- [3] May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 2002, **114**: 1061 – 1077.
- [4] Cossart P, Pizarro-Cerdá J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends in Cell Biol*, 2002, **13**: 23 – 31.
- [5] Veiga E, Cossart P. *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**: 894 – 900.
- [6] Bierne H, Cossart P. InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci*, 2002, **115**: 3357 – 3367.
- [7] Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, *et al.* Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, 2002, **108**: 233 – 246.
- [8] Nishita M, Aizawa H, Mizuno K. Stromal cell-derived factor 1 activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 774 – 783.
- [9] Bierne H, Gouin E, Roux P, *et al.* A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J Cell Biol*, 2001, **155**: 101 – 112.
- [10] Steed PM, Chow AHM. Intracellular signaling by phospholipase D as a therapeutic target. *Curr Pharmaceut Biotech*, 2001, **2**: 241 – 256.
- [11] McDermott M, Wakelam MJ, Morris AJ. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*, 2004, **82**: 225 – 253.
- [12] Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 2005, **129**: 263 – 268.
- [13] Kusner DJ, Barton JA, Wen KK, *et al.* Regulation of phospholipase D activity by actin. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 50683 – 50692.
- [14] Lee S, Park JB, Kim JH, *et al.* Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 28252 – 28260.
- [15] Stahelin RV, Ananthanarayanan B, Blatner NR, *et al.* Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 54918 – 54926.
- [16] 黄颂敏, 张海燕, 徐 勇, 等. 磷脂酶 D 对高糖培养的肾小球细胞骨架的影响. *中华肾脏病杂志*, 2003, **19**: 49 – 52.
- [17] Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 2000, **348**: 241 – 255.
- [18] Schmidt M, Voss M, Oude Weernink PA, *et al.* A role for Rho-kinase in Rho-controlled phospholipase D stimulation by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 14648 – 14654.
- [19] LIM MA, Yang L, Zheng Y, *et al.* Roles of PDK-1 and PKN in regulating cell migration and cortical actin formation of PTEN-knockout cells. *Oncogene*, 2004, **23**: 9348 – 9358.
- [20] Kam Y, Exton JH. Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 4055 – 4066.
- [21] Iyer SS, Barton JA, Bourgoin S, *et al.* Phospholipases D1 and D2 coordinately regulate macrophage phagocytosis. *J Immunol*, 2004, **173**: 2615 – 2623.
- [22] Wang L, Cummings R, Usatuk P, *et al.* Involvement of phospholipase D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Biochem J*, 2002, **367**: 751 – 760.
- [23] Melendez DJ, Allen JM. Phospholipase D and immune receptor signaling. *Semi Immun*, 2002, **14**: 49 – 55.
- [24] O'Luanaigh 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.
- [25] Goldfine H, Wadsworth SJ, Johnson NC. Activation of host phospholipase C and D in macrophages after infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2000, **68**: 5735 – 5741.
- [26] Serrander L, Fallman M, Stendahl O. Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils. *Inflammation*, 1996, **20**: 439 – 450.
- [27] Han L, Woznicki M, Limper B, *et al.* Involvement of cofilin in the Rho-kinase/ Lim-kinase -dependent stimulation of phospholipase D by M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2002, **365**: R50.

Listeria-induced host cellular actin cytoskeleton rearrangement and phospholipase D

HAN Li^{1*} , WU Xu-qin² , MENG Yu-fen² , JI Lei² , CHEN Shi-ping³

(¹ Chinese PLA Center for Disease Control & Prevention , Beijing 100071 , China)

(² Department of Microbiology , College of Medicine , Suzhou University , Suzhou 215006 , China)

(³ Institute of Hospital Infection Control & Research , PLA General Hospital , Beijing 100853 , China)

Abstract : Either phagocytosis of macrophage to pathogen or pathogen-induced invasion into non-professional phagocytes , such as epithelial cells , require actin cytoskeletal rearrangements and remodeling of the plasma membrane , which are regulated precisely by monomeric GTPase and the correlated proteins. As a key signaling molecule in the cell , phosphatidylcholine-specific phospholipase D (PLD) regulates or interacts directly with cellular actin cytoskeleton rearrangement. Phospholipase D plays an important role in FcγRI and C-reactive protein-mediated phagocytosis and phosphorylated cofilin , a ADF (actin depolymerizing factor) is able to bind to phospholipase D and stimulate it ; meanwhile , the *Listeria*-induced actin cytoskeleton rearrangement during the infection is controlled by the phosphorylation of cofilin. Thus , it made challenge to disclose the function of PLD on the regulation of *Listeria*-induced actin cytoskeleton rearrangement during infection , furthermore , it may provide us more understanding on the role of PLD in the infection and inflammation , which is essential to dissect the molecular mechanism of bacterial-host interaction more thoroughly.

Keywords : Actin cytoskeleton rearrangement ; Phospholipase D ; Bacteria-host interaction

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30500462)

* Corresponding author. Tel : 86-10-66933338 ; Fax : 86-10-66949638 ; E-mail : Lihan@301hospital.com

Received : 13 October 2005 / Accepted : 12 December 2005 / Revised : 20 April 2006

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