

## 活体内磷脂酰胆碱替代磷脂酰乙醇胺影响 *E. coli* 细胞的功能

吴彬, 叶青, 李洋, 李昌瑜, 喻雪婧, 周舒, 王行国\*

(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

**摘要:**【目的】通过磷脂酰胆碱(PC)阳性大肠杆菌菌株与磷脂酰乙醇胺(PE)阳性野生型和PE阴性突变型菌株比较,并用PC<sup>+</sup>PE<sup>+</sup>双阳性菌株佐证,从细菌形态、生理生化以及巨噬细胞对细菌的吞噬作用等方面探讨活体内磷脂酰胆碱能否替代磷脂酰乙醇胺。【方法】光学和电子显微镜观察细菌形态和结构;不同条件培养细菌并使用分光光度计测定 $OD_{600}$ 值,评估细菌的生长情况;使用SDS-PAGE和2-D电泳法测定细菌间质蛋白组分;用小鼠RAW264.7巨噬细胞系检测细菌的粘附和吞噬作用。【结果】与短棒状的PE<sup>+</sup>野生型细菌AD93/pDD72相比,PC<sup>+</sup>细菌AD93/ptac67中仍有25%丝状体;与PE<sup>-</sup>突变体AD93一样,PC<sup>+</sup>细菌AD93/ptac67仍需要添加二价离子Mg<sup>2+</sup>或Ca<sup>2+</sup>才能生长;与野生型AD93/pDD72相比,PC<sup>+</sup>细菌AD93/ptac67的周质蛋白组分、粘附率与相对吞噬效率呈现明显的差异;与野生型细菌Top10/ptac85相比,PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>双阳性细菌Top10/ptac66的细胞壁外层、抗逆性和周质蛋白组分也显示差别。【结论】在活体内,膜磷脂中PC替代PE不能使PE<sup>-</sup>突变体细胞的功能完全恢复至野生型状态,PE和PC在功能上存在明显的差别,两者在功能上不能相互替代。

**关键词:** 磷脂酰胆碱; 磷脂酰乙醇胺; 大肠杆菌; 膜磷脂替换

**中图分类号:** Q936, Q73 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1494-09

磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)是兼性离子磷脂分子,它们都是构成细胞膜脂质双分子层的重要磷脂。磷脂酰胆碱是真核细胞膜磷脂的主要组分,而磷脂酰乙醇胺则是原核细胞膜磷脂的主要组分<sup>[1-2]</sup>。最近的离体研究发现,虽然在构建人工膜时PC和PE可以互相替换,但两者的生物学功能则不同。例如PE辅助蛋白质的折迭,而PC似乎起着相反的作用<sup>[3-4]</sup>;PE对某些膜相关蛋白如乳糖运输蛋白、苯丙氨酸渗透酶、 $\gamma$ -氨基丁酸渗透酶的结构拓扑学非常重要,并且PE的这种作用不能用PC替代<sup>[5-8]</sup>。本文利用实验室已构建的PE阴性PC阳性的大肠杆菌菌株<sup>[9]</sup>与PE阳性野生型和PE阴性突变型菌株比较并用PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>双阳性菌株加以佐证,试图从形态学、生理学、周质蛋白的构成以及巨

噬细胞对细菌的吞噬作用等方面说明在活体细胞内磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺在功能上不能相互替代。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:**实验菌株见表1,详细的构建过程和菌株的基本特性见参考文献<sup>[9-12]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**报春花碱、IPTG、胆碱、蛋白质分子量标准和磷脂标准品均购自Sigma公司;CHAPS、硝酸银、琼脂糖、SDS、卡那霉素和氨苄青霉素均购自Amresco公司;等电聚胶用的载体两性电解质购自Pharmalyte公司;硅胶-60板购自Merck公

**基金项目:**国家自然科学基金(30570009, 30970076)

\* 通信作者。Tel: +86-27-88661237 转 8066; E-mail: xgw569@hotmail.com

**作者简介:**吴彬(1984-),男,湖北罗田人,硕士,研究方向为生化与分子生物学。

**收稿日期:**2010-05-01; **修回日期:**2010-06-26

司;格兰氏染色试剂盒购自 BioChemika 公司;其它试剂均为国产分析纯。垂直电泳槽和等点聚焦电泳槽均为北京市六一仪器厂产品;凝胶成像分析系统(温州新芝科学仪器厂, Tanon GIS System);紫外分光光度计(日本岛津公司, UV-2550);光学显微镜(重庆光学仪器厂, XSD-1B);电子显微镜(日本日立公司, H-7000FR)。

表 1 实验用大肠杆菌菌株

Table 1 *E. coli* strains used in this study

Strain	Phonotype	Source	Reference
AD93/pDD72	PE <sup>+</sup> PC <sup>-</sup>	Dr. W. Dowhan's laboratory	[11]
AD93	PE <sup>-</sup> PC <sup>-</sup>	Dr. W. Dowhan's laboratory	[11]
AD93/ptac67	PE <sup>-</sup> PC <sup>+</sup>	Our laboratory	[9]
Top10/ptac85	PE <sup>+</sup> PC <sup>-</sup>	Our laboratory	[10]
Top10/ptac66	PE <sup>+</sup> PC <sup>+</sup>	Our laboratory	[10]

## 1.2 细菌培养

由于带有一个温敏质粒 pDD72 的菌株 AD93/pDD72 只能在 30℃ 条件下培养, 菌株 AD93 和 AD93/ptac67 仅在添加 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 LB 培养基中培养, 且 AD93/ptac67 还需在培养基中添加 0.5 mmol/L IPTG 和 0.5% 胆碱以便合成 PC<sup>[9]</sup>, 因此如无特殊说明, 3 种菌株都在含有 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5 mmol/L IPTG 和 0.5% 胆碱的 LB 培养基中 30℃、250 r/min 培养以避免不同培养条件造成实验误差。菌株 Top10/ptac85 和 Top10/ptac66 则在含有 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5 mmol/L IPTG 和 0.5% 胆碱的 LB 培养基中 37℃、250 r/min 培养。

## 1.3 细菌磷脂的 2D-TLC

按文献<sup>[10]</sup>报道的方法抽取细菌总磷脂。约 60 μg 样品点到硅胶 -60 板的原点处后开始薄层层析。一维 TLC 按文献<sup>[10]</sup>报道的方法进行。二维 TLC 中第一相展层剂为氯仿: 甲醇: 水 (65: 25: 4), 第二相展层剂为氯仿: 甲醇: 三乙胺 (65: 25: 10)。薄层层析结束后用报春花碱磷脂显色剂染色, 紫外灯下观察并拍照。

## 1.4 周质蛋白抽提与 2D 电泳

取 5 mL 活化过夜的细菌并接种到 500 mL 上述培养基中, 30℃ 培养至对数后期。4℃ 离心收获细菌并用 PBS (pH7.4) 洗 3 次。然后按照文献报道的方法<sup>[13]</sup>抽提周质蛋白并保存于 10 mmol/L TrisHCl (pH8.0), 并使用 Bradford 方法<sup>[14]</sup>测定蛋白质浓度。在 2D 电泳中, 采用 O' Farrell 报道的方法<sup>[15]</sup>进行第一相等电聚胶 (IEF) 凝胶电泳, 并使用 12% 凝胶进行第二相的 SDS 凝胶电泳, 最后使用银染法<sup>[16]</sup>染色。拍照 2D 电泳的结果并转成 TIFF 格式

并使用 ImageMaster 2D 软件进行分析。

## 1.5 细菌形态观察

将细菌培养至对数后期, 使用格兰氏染色试剂盒并按照使用说明进行细菌染色。在光学显微镜下观察染色后的细菌并拍照。将培养至对数后期的细菌送到中科院武汉病毒研究所做电镜切片, 使用透射电镜观察并拍照。

## 1.6 细菌吸附与巨噬细胞的吞噬实验

在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 使用含 10% 小牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基 37℃ 培养小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系。参照文献<sup>[17]</sup>报道的方法, 将 5 (10<sup>5</sup> 细胞接种到 6 孔板的每一个孔室内, 37℃ 培养 4-6 h。待细菌生长至对数后期时离心收集细菌并悬浮在含有 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 10% FBS 的 DMEM 培养基中使细菌浓度为 1.5 × 10<sup>7</sup> 细胞/mL。移去 6 孔板孔室内的全部培养液, 加入 2 mL 细菌悬液并在 37℃ 培养 1 h。吸出全部细菌悬液并用 PBS 洗 3 次。将 6 孔板分成两组, 在一组 6 孔板孔室内加入 1 mL 0.1% Triton X-100 并继续在 37℃ 培养 10 min, 然后用无菌的 PBS 稀释细胞裂解液并涂布含 0.5% 胆碱和 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 LB 平板。30℃ 培养过夜后计数细菌。这一组测得的细菌数包括粘附到细胞上的细菌和被细胞吞噬的细菌。在另一组 6 孔板孔室内加入 1 mL 含有 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 10 μg/mL 庆大霉素的 DMEM 培养液, 室温培养 30 min 杀死吸附在细胞外面的细菌。用 PBS 洗 3 次后再加入 1 mL 0.1% Triton X-100 并在 37℃ 继续培养 10 min, 然后按前述的方法涂布平板并计数。这一组测得的细菌数仅包括巨噬细胞吞噬的细菌。相对吞噬效率 (%) 按以下公式计算。

相对吞噬效率 (%) = (吞噬率/粘附率) × 100  
在公式中, 粘附率为每个巨噬细胞粘附和吞噬细菌的平均数, 吞噬率指每个巨噬细胞吞噬的细菌平均数。

## 2 结果

### 2.1 不同二价离子需求的比较

鉴于 AD93/ptac67 和 Top10/ptac66 细菌合成 PC 时需要在 LB 培养基中添加胆碱和使用 IPTG 诱导磷脂酰胆碱合酶 (Pcs) 基因表达, 我们首先检查胆碱和 IPTG 对细菌生长的影响, 结果见图 1。在含有 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 LB 培养基中 30℃ 培养时, 添加 0.5% 胆碱并不影响细菌的生长, 而添加 0.5 mmol/L IPTG 时则明显推迟细菌的生长。无论

是接种初期还是当细菌生长至  $OD_{600}$  值为 0.4 时加入 IPTG, 细菌的生长延迟 4 h (见图 1)。Top10/ptac66 细菌也显示类似的结果。细菌生长延迟说明 IPTG 分子可能对细菌有毒害作用, 也可能是 IPTG 诱导后表达的 Pcs 蛋白抑制细菌的增殖。为了弄清楚 IPTG 是否直接抑制细菌生长, 使用两组培养基 30°C 培养 AD93/pDD72 和 AD93。一组培养基中加入 0.5 mmol/L IPTG, 另一组则不加。结果发现 AD93/pDD72 和 AD93 在两组培养基中的生长曲线无明显的差异 (结果未显示), 说明 IPTG 分子本身并不抑制细菌的生长。AD93/ptac67 细菌生长的延迟应该是 IPTG 诱导后表达的 Pcs 蛋白的毒性作用。为了避免实验误差, 在不同条件下测定细菌的生长时培养时间定为 24 h。

为了检查在 50 mmol/L  $MgCl_2$ 、0.5 mmol/L IPTG 和 0.5% 胆碱的 LB 培养基中 30°C 培养 24 h 时细菌磷脂的状况, 3 种菌在相同条件下培养并抽取总磷脂。2-D TLC 分析表明, 仅 AD93/pDD72 细菌含有 PE, 仅 AD93/ptac67 细菌含有 PC, AD93 细菌既不含 PE 也无 PC (见图 2-A)。在培养基中加入 0.5 mmol/L IPTG 和 0.5% 胆碱并不影响 AD93/pDD72 和 AD93 细菌的磷脂组成。图 2-B 显示仅 Top10/ptac66 细菌含 PC。

在不添加  $Mg^{2+}$  离子的 LB 培养基中培养时, 野生型 Top10/ptac85 和  $PE^+ PC^+$  双阳性细菌 Top10/ptac66 都生长良好。获救的野生型 AD93/pDD72 细菌也能正常生长, 不需要在培养基中添加额外的

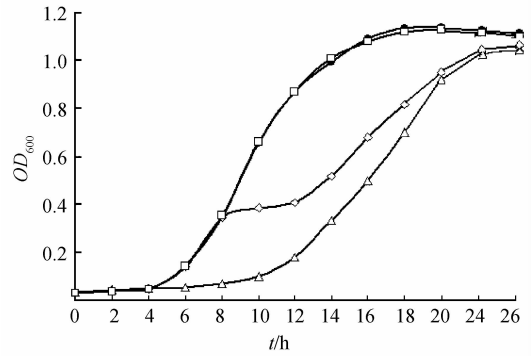


图 1 IPTG 诱导下培养的 AD93/ptac67 菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of the strain AD93/ptac67 growing at 30°C in LB broth containing (●) 50 mmol/L  $MgCl_2$ , (□) 50 mmol/L  $MgCl_2$  and 0.5% choline, (◇) 50 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.5% choline and 0.5 mmol/L IPTG added at  $OD_{600} = 0.4$ , and (△) 50 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.5% choline and 0.5 mmol/L IPTG added initially. All data are means from three independent experiments.

$Mg^{2+}$  离子。与之相反, AD93/ptac67 细菌需要添加 10 mmol/L  $Mg^{2+}$  才能生长而 AD93 则需要添加 20 mmol/L  $Mg^{2+}$  才能生长; 只有在培养基中添加 50 mmol/L  $Mg^{2+}$  离子, AD93/ptac67 和 AD93 细菌才能良好地生长 (见文献 9)。使用相同浓度 (50 mmol/L) 的  $CaCl_2$  或  $MnCl_2$  替代培养基中的  $MgCl_2$  时,  $Ca^{2+}$  与  $Mg^{2+}$  一样能满足 AD93/ptac67 细菌的生长, 而  $Mn^{2+}$  明显抑制细菌的生长 (见图 3)。这与文献<sup>[11]</sup>报道 AD93 细菌的持性一致。图 3 还

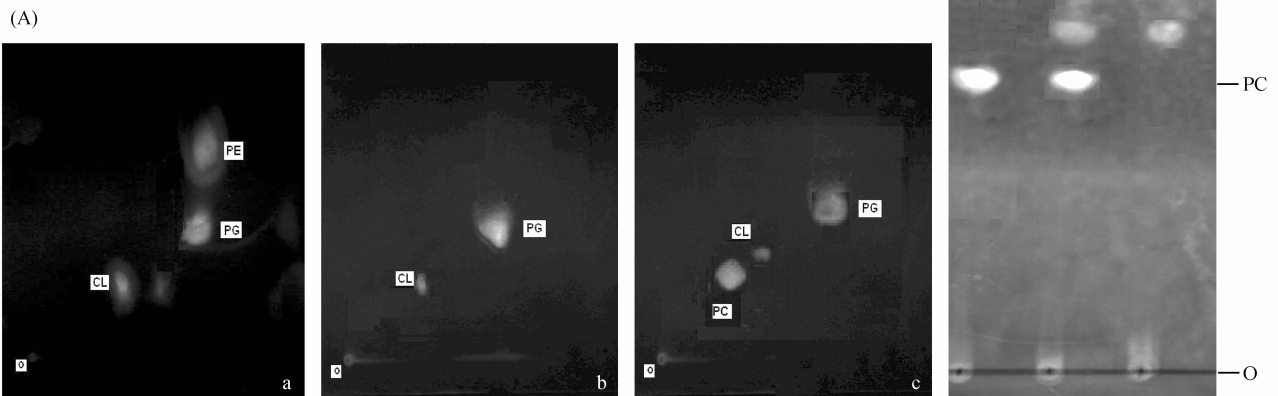


图 2 细菌总磷脂的 TLC 分析结果

Fig. 2 Analysis of total phospholipids extracted from different strains. A: 2D-TLC, (a) AD93/pDD72, (b) AD93 and (c) AD93/ptac67. B: One dimensional TLC, lane 1: standard PC, lane 2: Top10/ptac66, lane 3: Top10/ptac85.

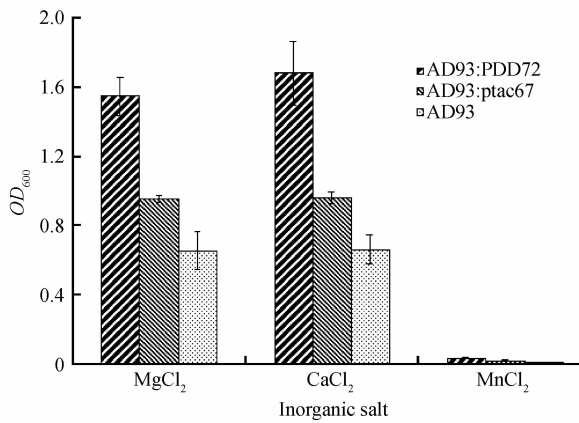


图3 在含不同二价离子培养基中培养24小时的3种细菌的生长比较

Fig. 3 Growth of three strains AD93/pDD72, AD93/ptac67 and AD93 at 30°C for 24 hours in LB broth containing 0.5% choline, 0.5 mmol/L IPTG and 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> or MnCl<sub>2</sub>. All data are means from three independent experiments.

显示,尽管 AD93/ptac67 细菌细胞中含有占总磷脂 50% 的 PC,但无论在添加 Ca<sup>2+</sup> 或 Mg<sup>2+</sup> 条件下生长 24 h 后 OD<sub>600</sub> 值仍明显低于野生型细菌,仅比 PE 菌株 AD93 稍高。这些结果说明 AD93/ptac67 细菌膜磷脂中 PC 替代 PE 后,细菌细胞并不能恢复到野生型状态。

## 2.2 细菌形态学比较

使用革兰氏染色法染色对数后期的细菌并用显微镜观察,3种细菌都呈革兰氏阴性。虽然3种菌体都呈杆状,但仅100%野生型AD93/pDD72菌体呈短棒形。缺少PE的AD93菌体中约75%的细菌呈细长的线状体,与文献报道<sup>[11,18]</sup>一致,而AD93/ptac67细菌大多为短棒状但仍有25%细菌为线状体(见图4-A)。在培养3种细菌时,AD93和AD93/ptac67细菌比AD93/pDD72细菌容易沉集到试管的底部,与形态学观察的结果吻合。从形态学

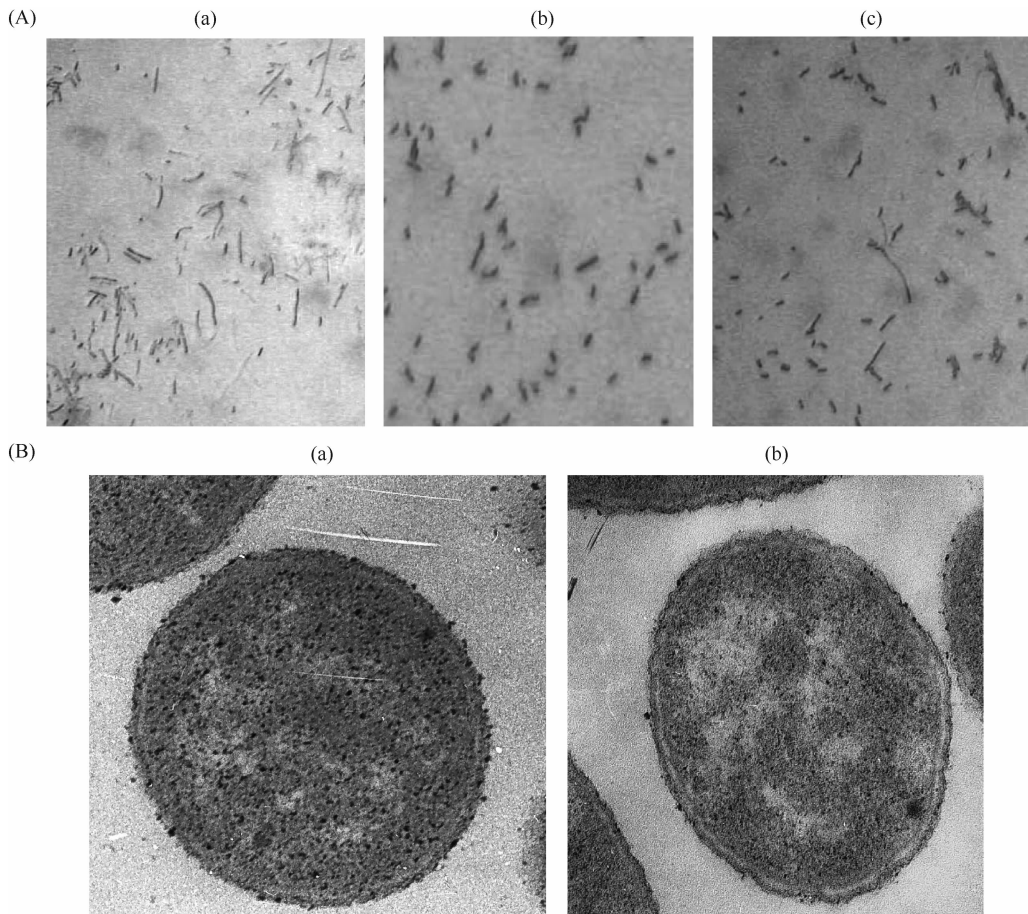


图4 细菌细胞形态的显微镜观察

Fig. 4 Microscopic observation of different bacterial cells. A: Optical micrographs of three strains AD93/pDD72, AD93 and AD93/ptac67 growing at 30°C for 24 hours in LB broth containing 0.5% choline, 0.5 mmol/L IPTG and 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. (a) AD93, (b) AD93/pDD72 and (c) AD93/ptac67. B: Electron micrographs (4000 ×) of the control Top10/ptac85 (a) and Top10/ptac66 (b) cells growing in LB broth with 0.5% choline, 0.5 mmol/L IPTG at 37°C to late-exponential phase. Longitudinal sections of *E. coli* cells are shown.

角度看,膜磷脂中 PC 替代 PE 后并未使 AD93/ptac67 细菌的形态恢复到野生型状态。在相同条件下培养 Top10/ptac66 和 Top10/ptac85 细菌至对数后期,光学显微镜检测革兰氏染色后的细菌。PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>双阳性 Top10/ptac66 细菌与野生型 Top10/ptac85 细菌形态相似,都呈短棒状。但是,电子显微镜则揭示两者存在明显的差异。野生型 Top10/ptac85 细菌细胞壁外层平滑,内外膜之间的间质区规则清晰,而 PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>双阳性 Top10/ptac66 细菌细胞壁外层呈波浪形,部分地方甚至呈钝锯齿状,间质区也不规则(见图 4-B)。细胞壁外层不规则显示细菌的抗逆性会发生变化。在培养基中加入不同浓度的变性剂 SDS 并在相同条件下培养 2 种细菌,结果发现 PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>双阳性 Top10/ptac66 细菌的 SDS 最低抑制浓度(MIC)为 0.02%,而野生型 Top10/ptac85 细菌的 MIC 则为 0.07%。由此可见,在野生型细菌磷脂中添加 PC 同样会改变细胞的形态和生理特性。

### 2.3 周质蛋白组分的比较

SDS-PAGE 或 尿素-SDS-PAGE 分析<sup>[9]</sup>显示 AD93、AD93/ptac67 和 AD93/pDD72 细菌的外膜蛋白组成没有明显的不同。但是 SDS-PAGE 分析发现 3 个菌株的周质蛋白条带存在明显的差异(见图 5-A)。为了弄清楚 Mg<sup>2+</sup> 离子对细菌周质蛋白的影响,在添加或不添加 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 LB 培养中培养 AD93/pDD72 细菌并抽提周质蛋白,结果发现两者的周质蛋白条带无显著差别(见图 5 SDS-PAGE 泳道 2 和 3),说明添加的 Mg<sup>2+</sup> 离子不会影响细菌周质蛋白的组成。为了进一步验证周质蛋白的

差异,将 3 种不同细菌的周质蛋白进行 2-D 电泳分离并使用银染法进行蛋白染色。图 5 的结果显示,3 种不同细菌的周质蛋白图谱的确存在差异。将 3 次独立进行的 2-D 电泳结果输入 ImageMaster 2D 软件进行分析,然后选择重复性好且呈现 2 倍差异的蛋白进行比较。从图 5 中圈示的 6 个蛋白点的分析结果来看,与 AD93/pDD72 菌株相比,AD93/ptac67 菌株中 2、3、5 号蛋白量分别减少了 85%、71% 和 65%,而 1、4 号蛋白则分别增加了 2.9 倍和 6.7 倍;AD93 菌株中 2、3 号蛋白仅为 AD93/pDD72 菌株对应蛋白含量的 27% 和 15%,而 1、4、5、6 号蛋白分别是 AD93/pDD72 菌株对应蛋白的 4.8、2.2、3.5 和 3.7 倍。与 AD93 菌株相比,AD93/ptac67 菌株中 1、2、5、6 号蛋白分别是其对应蛋白量的 31.8%、57.5%、9.8% 和 44.6%,而 3、4 号蛋白则是其对应蛋白量的 1.9 倍和 3.5 倍。2-D 电泳分析的结果说明膜磷脂中 PC 替代 PE 并不能使 PE<sup>-</sup>突变体细胞的功能完全恢复至野生型状态。使用二维电泳分析 PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>双阳性 Top10/ptac66 细菌的周质蛋白并与野生型 Top10/ptac85 比较。ImageMaster 二维电泳分析软件对比分析显示两块凝胶之间有 77 个蛋白质点可以相互配对,配对率为 81.5%。对高度配对的蛋白质点进行图像分析仅有少数几个蛋白质点在表达量上有所差异,软件自动编号分别为 46、56 和 89(如图 5-B 中箭头所示),3 个蛋白质点变化均在 2 倍以上,其中 89 号蛋白点达到了 4 倍的差距。

### 2.4 细胞粘附与吞噬的比较

比较 3 种菌株粘附哺乳类细胞以及被哺乳类细

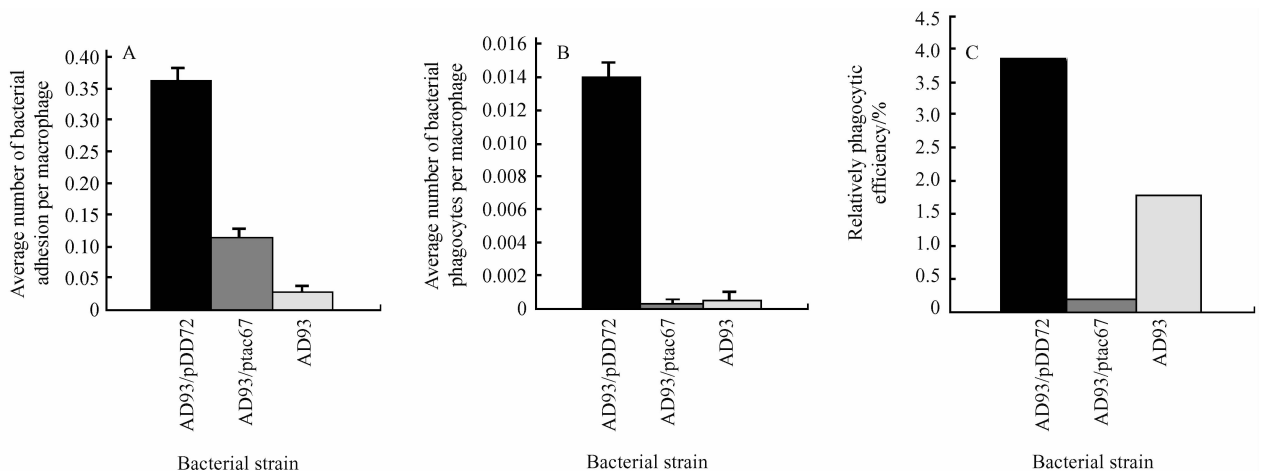


图 6 3 种细菌的粘附和吞噬试验结果

Fig. 6 The diagrams present those data obtained from the assay of bacterial adhesion and phagocytosis by RAW264.7 macrophage. A: the number of bacterial adhesion including the bacteria adhesive to and inside each macrophage; B: the number of bacterial phagocytes inside each macrophage; C: relatively phagocytic efficiency for each bacterial strain by macrophage. All data presented in A and B are mean calculated from triple experiments and each err bar indicates standard deviation.

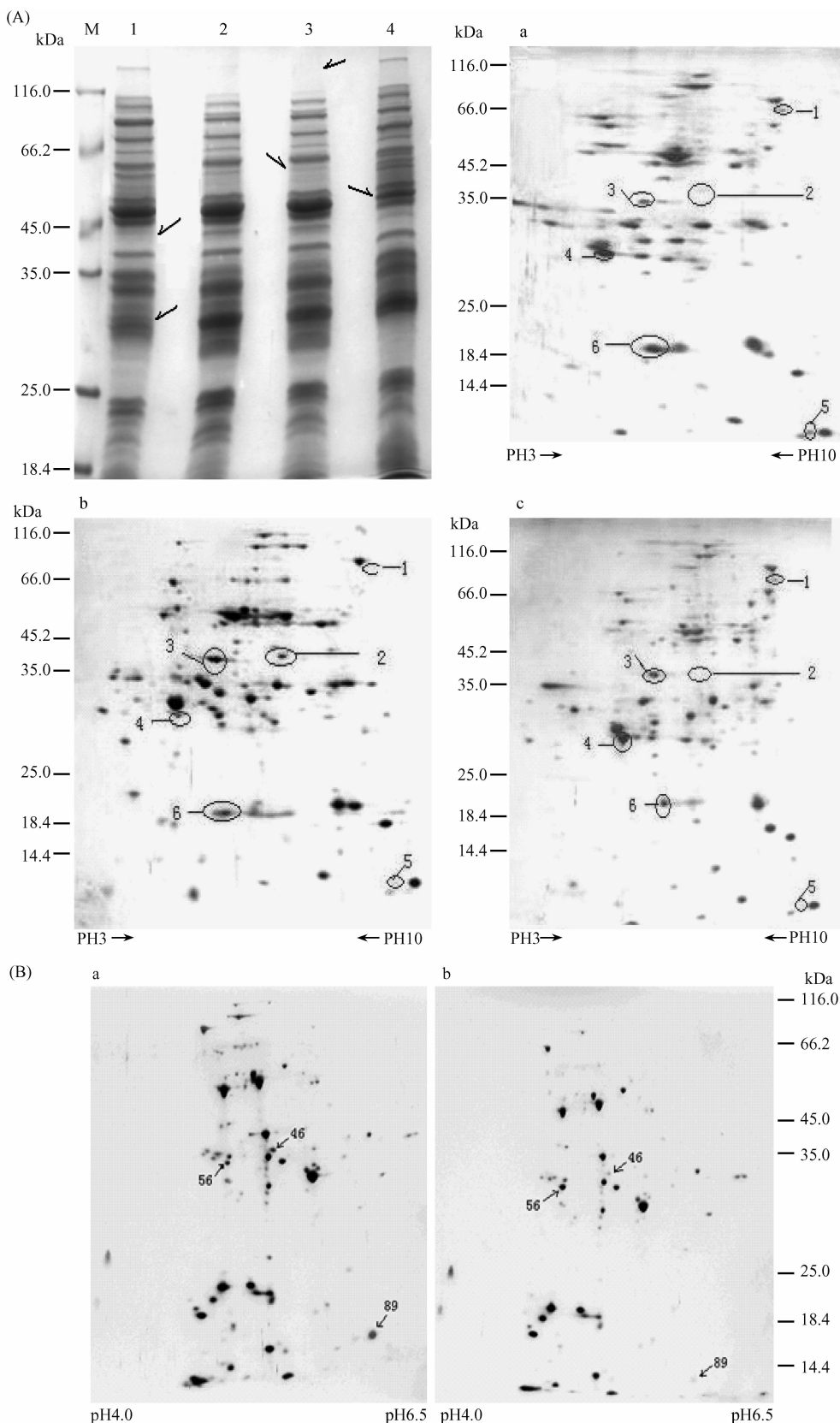


图5 细菌间质蛋白的 2-D 凝胶电泳

Fig. 5 2-D electrophoresis of bacterial periplasmic proteins. A: on the SDS-PAGE gel, lane1: AD93; Lane 2: AD93/pDD72 growing in the medium with 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; Lane 3: AD93/pDD72 growing in the medium without MgCl<sub>2</sub>; Lane 4: AD93/ptac67. For the 2-D gel, (a) AD93, (b) AD93/pDD72 and (c) AD93/ptac67. B: 2-D gel electrophoresis showing periplasmic proteins of Top10/ptac85 in (a) and Top10/ptac66 in (b).

胞吞噬的效率,发现粘附率大小依次为 AD93/pDD72 > AD93/ptac67 > AD93。AD93/pDD72 的粘附率( $0.37 \pm 0.02$ )比 AD93/ptac67( $0.12 \pm 0.02$ )大 3 倍,比 AD93( $0.03 \pm 0.008$ )大 12 倍(见图 6)。AD93/ptac67 的粘附率比 AD93 大 4 倍,说明 PC 掺入后使 PE<sup>-</sup> 突变体细胞有所恢复。理论上讲,含 PC 的细菌对以 PC 为主要磷脂的哺乳类细胞应该有更好的粘附作用。与 AD93/pDD72 相比,较小的粘附率可能与 AD93/ptac67 细菌的形态有关。当细菌粘附小鼠细胞时,瘦小且长的丝状体容易出现空间障碍。另外,AD93/pDD72 的吞噬率为  $0.014 \pm 0.001$ ,比 AD93( $0.0005 \pm 0.0001$ )大 28 倍,比 AD93/ptac67( $0.0004 \pm 0.0001$ )大 35 倍。AD93/pDD72、AD93/和 AD93/ptac67 的相对吞噬效率分别为 3.8%、1.7% 和 0.3%。AD93/pDD72 较大的相对吞噬效率说明膜磷脂中含 PE 的细菌容易被巨噬细胞吞噬,而 AD93/ptac67 较小的相对吞噬效率说明膜磷脂中含 PC 的细菌具有抵抗巨噬细胞吞噬的能力。我们曾用等量细菌腹腔注射小鼠,在注射后 12-24 h 内 Top10/ptac66 诱聚的巨噬细胞明显比 Top10/ptac85 诱聚的巨噬细胞少<sup>[12]</sup>。上述结果表明 PE 和 PC 分别具有不同的生物学功能,在活体细胞内两者在功能上是不能互相替代的。

### 3 讨论

磷脂磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺都是构成细胞膜脂质双分子层的重要磷脂成分。由于它们特定的分子构成和化学上的堕性,一直认为磷脂磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺除了构成细胞膜的脂质双分子层外没有其它的生物学功能。近年的研究发现除了它们在膜上的结构作用外还具有许多其它不同的生物学功能。例如,PE 具有分子伴侣的功能,辅助一些膜相关蛋白的正确折迭,而 PC 似乎起着相反的作用<sup>[3-4, 6-8]</sup>;在大肠杆菌膜磷脂中缺失 PE 影响碱性磷酸酶的胞外分泌<sup>[18-19]</sup>;在大肠杆菌膜磷脂中掺入 PC 则影响  $\beta$ -内酰胺酶从细胞质向细胞间质转运<sup>[10]</sup>;在大肠杆菌细胞膜磷脂中掺入 PC 改变细菌表面抗原性<sup>[12]</sup>。由此可见,虽然在构建人工膜时 PC 和 PE 可以互相替换,但两者的生物学功能则明显不同。为了进一步探讨 PE 与 PC 替代对活体细

胞的影响,本文利用实验室已构建的 PC<sup>+</sup> PE<sup>-</sup> 大肠杆菌 AD93/ptac67,在形态学、生理学、周质蛋白的构成以及巨噬细胞对细菌的吞噬作用等方面与 PE<sup>-</sup> 突变体 AD93 和 PE<sup>+</sup> 野生型 AD93/pDD72 进行比较。用 PC 替代 PE 后,AD93/ptac67 细菌仍有 25% 丝状体;与 AD93 一样仍需要添加二价离子 Mg<sup>2+</sup> 或 Ca<sup>2+</sup> 才能生长;与 AD93/pDD72 相比,周质蛋白的组分、粘附率与相对吞噬效率也呈现明显的差异,PC 替代 PE 后并未使大肠杆菌细胞回复到野生型状态。将 PC 导入野生型大肠杆菌的膜磷脂中同样引起细菌细胞壁外层的变化并改变细胞的生理功能,进一步表明磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的生物学功能是不同的,在活体内两者在功能上不能相互替代。含有 PC 的 AD93/ptac67 细菌需要添加二价离子 Mg<sup>2+</sup> 或 Ca<sup>2+</sup> 才能生长,似乎与蛋白的折迭或转运无关而与细菌细胞外层结构的稳定性有关。PE 分子的头部较小,可与其它分子形成氢键,而 PC 分子头部较大,不易与其它分子形成氢键。在大肠杆菌的外层,外膜上的 PE 分子的头部基团可与磷脂酰甘油(PG)或脂多糖分子形成氢键稳定外层的结构。由于 PC 头部基团不具备形成氢键的能力,磷脂酰甘油(PG)或脂多糖分子需要 Mg<sup>2+</sup> 或 Ca<sup>2+</sup> 才能形成一个网络系统,维持细菌外层结构的稳定<sup>[11]</sup>。由此可见,PE 和 PC 不仅仅影响蛋白质的折迭、转运或分泌,而且还涉及到细胞其它的生命活动。此外,含有 PC 的 AD93/ptac67 细菌的形态仍未完全恢复到野生型状态暗示不同的磷脂组分在细胞形态建成上的作用有差异,其具体的作用机制仍有待进一步深入研究。PC 替代 PE 后 AD93/ptac67 细菌有较好的抵抗巨噬细胞的吞噬作用,与流产杆菌(*Brucella abortus*)突变体<sup>[20]</sup> 分析的结果类似。这一结果不仅反映 PC 与 PE 分子在功能上的差异,而且暗示 PC 可能涉及共生、寄生或病原菌入侵真核生物的过程。研究发现 PC 渗入大肠杆菌膜磷脂后可改变细菌表面抗原性<sup>[12]</sup>。据报道大约占细菌总数 10% 细菌含有 PC,其中绝大部分都是共生、寄生或病原菌<sup>[2]</sup>。因此,研究 PC 在细菌共生、寄生或致病性方面的生物学作用,必将有助于深入了解细菌与真核生物之间的相互作用,揭开共生、寄生或病原菌含有磷脂酰胆碱之谜。

## 参考文献

- [ 1 ] Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annual Review of Biochemistry*, 1997, 66:199-232.
- [ 2 ] Sohlenkamp C, Lopez-Lara IM, Geiger O. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Progress in Lipid Research*, 2003, 42:115-162.
- [ 3 ] Bogdanov M, Umeda M and Dowhan W. Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 12339-12345.
- [ 4 ] Bogdanov M and Dowhan W. Lipid-assisted protein folding. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 36827-36830.
- [ 5 ] Wang X, Bogdanov M and Dowhan W. Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. *The EMBO Journal*. 2002, 21:5673-5681.
- [ 6 ] Bogdanov M, Heacock PN and Dowhan. WA. Polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *The EMBO Journal*. 2002, 21: 2107-2116.
- [ 7 ] Zhang W, Bogdanov J. Pi, A, Pittard, J and Dowhan W. Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 50128-50135.
- [ 8 ] Zhang W, Campbell HA, King SC, Dowhan W. Phospholipids as determinants of membrane protein topology. Phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the  $\gamma$ -aminobutyric acid permease ( GabP ) of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 26032-26038.
- [ 9 ] 李昌瑜、喻雪婧、叶青、吴彬、李洋、王行国. *E. coli* PC<sup>+</sup>PE<sup>-</sup>菌株 AD93/ptac67 的构建及其生物学性质。武汉大学学报(理学版)(*Journal of Wuhan University (Science Edition)*) 2009, 55:370-376。
- [ 10 ] 蔡雪丽、李洋、宣文静、王行国. 掺入 *E. coli* 膜中的磷脂酰胆碱(PC)影响青霉素  $\beta$ -内酰胺酶的分泌。微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(4):486-491.
- [ 11 ] DeChavigny A, Heacock PN, Dowhan W. Sequence and inactivation of the pss gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 5323- 5332
- [ 12 ] Chen F, Zhao Q, Cai X, Lv L, Lin W, Yu X, Li C, Xiong M, Wang XG. Phosphatidylcholine in membrane of *Escherichia coli* changes bacterial antigenicity. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009, 55: 1328-1334.
- [ 13 ] Ames GF, Prody C, Kustu S. Simple, rapid and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *Journal of Bacteriology*. 1984, 28: 1181-1183.
- [ 14 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.
- [ 15 ] O' Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, 250: 4007-4021.
- [ 16 ] Xu C, Wang S, Ren H, Lin X, Wu L and Peng X. Proteomic analysis on the expression of the outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics*. 2005, 5:3142-3152.
- [ 17 ] Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E. . *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. . *PLoS ONE*, 2007, 7: e631.
- [ 18 ] Mikhaleva NI, Golovastov VV, Zolov SN, Bogdanov, MV. , Dowhan, W. Depletion of phosphatidylethanolamine affects secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase and its transcriptional expression. *FEBS Letters*. 2001 493:85-90.
- [ 19 ] Anisimova EA, Badyakina AO, Vasileva NV, Nesmeyanova MA. Changes in the composition of anionic membrane phospholipids influence protein secretion and cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2005,74: 147-152.
- [ 20 ] Conde-Alvarez R, Grillo MJ, Salcedo SP, de Miguel MJ, Fugier E, Gorvel JP, Moriyón I, Iriarte M. . Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cellular Microbiology*. 2006, 8:1322-1335.



# *In vivo* replacement of phosphatidylethanolamine by phosphatidylcholine affects biological function of *E. coli*

Bin Wu, Qing Ye, Yang Li, Changyu Li, Xuejing Yu, Shu Zhou, Xingguo Wang\*  
(Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We investigated differences in morphology, physiology, periplasmic proteins and phagocytosis by macrophage among *E. coli* strains AD93(PE<sup>-</sup>PC<sup>-</sup>), AD93/ptac67(PE<sup>-</sup>PC<sup>+</sup>), Top10/ptac66(PE<sup>+</sup>PC<sup>+</sup>) and the wild types in order to understand if phosphatidylcholine (PC) can substitute phosphatidylethanolamine (PE) *in vivo*. [ **Methods** ] Bacterial cells were observed under microscope after staining with Gram-staining kit or by electron microscope. Bacterial growth under different conditions was monitored by measuring the absorbance at the wavelength of 600 nm. Periplasmic proteins were analyzed using SDS-PAGE and 2-D electrophoresis. Bacterial adherence and phagocytosis by macrophage were also examined by using murine RAW264.7 macrophage. [ **Results** ] 100% bacterial cells in AD93/pDD72 were bar-shaped but 25% AD93/ptac67 cells came out as long filaments. Different from AD93/pDD72, AD93/ptac67 and AD93 required Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> for growth. Moreover, AD93/ptac67 displayed a different pattern of periplasmic proteins on a 2-D gel and a low relatively phagocytic efficiency in the phagocytosis test when compared to AD93/pDD72 and AD93. Both Top10/ptac66 and the wild-type Top10/ptac85 cells were bar-shaped under microscope, but the former showed noticeably difference in the outer-layer structure of cell wall, and its stress resistance and periplasmic protein composition were also different from those of the latter. [ **Conclusion** ] Substitution of phosphatidylethanolamine with phosphatidylcholine in *E. coli* cells is unable to restore the phenotype of PE<sup>-</sup> mutant to the wild type. Biological functions of PE and PC are different, and phosphatidylcholine cannot substitute phosphatidylethanolamine *in vivo*.

**Keywords:** phosphatidylcholine; phosphatidylethanolamine; *E. coli*; phospholipid substitution

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570009, 30970076)

\* Corresponding author. Tel: +86-27-88661237Ext. 8066; E-mail: xgw569@hotmail.com

Received: 1 May 2010 / Revised: 26 June 2010

## 《微生物学报》综述文章投稿要求

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊提出以下几点要求,欢迎大家根据要求踊跃投稿。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 欢迎投送"能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义"的述评类文章。