

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :251 - 260; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.001

细菌鞭毛的致病性及其免疫学应用的研究进展

郭志燕, 周明旭, 段强德, 朱国强*

扬州大学兽医学院, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要: 鞭毛是细菌体表重要的附属结构之一, 一直以来仅被简单地当做运动器官。但近几年来, 随着对鞭毛结构和致病性作用的深入研究发现: 鞭毛及其运动性可促进细菌对于宿主细胞的黏附与侵袭, 在细菌生物被膜形成过程中起重要作用, 与细菌毒力因子的分泌也密切相关, 并且鞭毛素蛋白能与细胞上 Toll 样受体 5 (TLR5, toll-like receptor 5) 结合而诱导机体促炎性反应。同时, 鞭毛也因其独特的免疫学效应而被应用于新型免疫佐剂的研发。本文主要就鞭毛的结构、对细菌致病性的影响及其免疫学应用等方面进行综述。

关键词: 鞭毛, 致病性, 毒力因子, 免疫佐剂

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0251-10

鞭毛 (flagella) 是广泛存在于细菌体表的一种直径约 20 nm、长 5 - 20 μm , 细长呈弯曲波浪状的特殊结构, 须经特殊染色才可于光学或电子显微镜下观察形态, 是细菌的运动器官, 又是大分子蛋白质输出/转运装置。鞭毛功能的发挥基于其复杂的结构、精密的组装以及高度有序的表达调控系统。其中, 由 FliC 蛋白构成的鞭毛丝是鞭毛结构中最大的组成部分。FliC 作为鞭毛丝的主要结构亚基, 参与了细菌鞭毛蛋白一系列致病过程^[1]。通过对细菌鞭毛丝的晶体构象研究发现, 它们都有一个高度保守的 N 端和 C 端, 通过 α 螺旋构成了鞭毛丝的核心区域 (D0、D1), 而中间可变区则通过 β 折叠结构组成了鞭毛丝的外表面 (结构域 D2、D3)^[2]。这些不同的结构域分别起着不同的作用。例如, 可变区决定大肠杆菌的 H 抗原类型, 而 Toll 样受体 5 则是与保

守区域相结合。鞭毛丝介导了大部分鞭毛的功能, 也是研究得最广泛深入的领域。

本文综合近年来国内外文献报道, 对鞭毛的复杂结构、作为毒力因子对细菌致病性的贡献及其作为免疫佐剂的应用前景等方面进行阐述。

1 鞭毛的结构

鞭毛主要由三部分组成: 基体部 (basal body)、鞭毛钩 (hook) 和鞭毛丝 (filament) (见图 1^[3])。基体部嵌埋于细胞壁和细胞膜内, 最为复杂, 主要由位于细胞壁外侧的 L 环、位于肽聚糖层的 P 环、固定于细胞壁与细胞膜之间的 S 环以及嵌于细胞膜中的 M 环组成。其中, L 环由 FlgH 构成, P 环由 FlgI 构成, 而 M 环与 S 环构成位于最靠内侧的 MS 环, 由单

基金项目: 国家自然科学基金 (30571374, 30771603, 31072136, 31270171); 江苏省属高校自然科学重大基础研究项目 (08KJA230002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 教育部创新团队; 科技部转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08006-004B); 重大动物疫病防控技术引进 (国家农业部 948 计划, 2011-G24)

* 通信作者。Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzqzhu@hotmail.com, yzqzhu@yzu.edu.cn

作者简介: 郭志燕 (1988 -), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 研究方向为病原微生物与免疫学。E-mail: guozhiyan1212@sina.com

收稿日期: 2013-06-07; **修回日期:** 2013-10-14

一蛋白 FliF 构成。革兰氏阳性菌只有 MS 环而无 L、P 环,这与其致密且厚的肽聚糖层有关。MS 环内侧有一个 C 环,是由 FliG、FliM、FliN 组成的一个转换复合体,其中 FliG 是直接包埋于 MS 环上。而这些环是共轴于由 FlgG、FlgB、FlgC、FlgF 蛋白构成的转动环 Rod。除此之外,基体部还有一个很重要的部分,由 4 个 MotA、2 个 MotB 组成的质子传导定子 (proton-conducting stator),每 10 - 12 个 MotA₄MotB₂ 定子复合体构成一个鞭毛动力马达,与 MS 环一起为鞭毛自转提供质子动能^[4]。MotB 将基体部锚定在肽聚糖层中,而 MotA 则与 FliG 的 C 末端区域直接接触。鞭毛钩 (也称钩型鞘) 的作用是连接基体部和鞭毛丝,由 FlgE 组成,在其与鞭毛丝的连接处有两个蛋白 FlgL、FlgK。鞭毛丝是 FliC 蛋白或 FljB 蛋白沿着中空管状结构螺旋性组装而成,直径约为 20 nm。在鞭毛丝的上端有一个由 FliD 构成的帽子结构,它通过自转机制促进鞭毛的自组装和聚合作用^[3]。

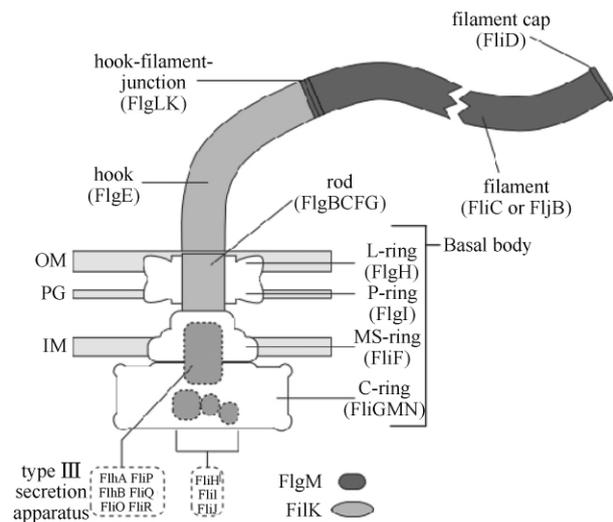


图 1. 革兰氏阴性菌鞭毛结构组成示意图^[3]

Figure 1. Structure and organization of the flagella of Gram-negative bacteria^[3]. A flagellum consists of three parts: the filament, the hook, and the basal body; the filament is mainly composed of FliC or FljB. The basal body contains L, P, MS, C ring from the outer membrane to the cytoplasmic membrane (Erhardt 2010).

有关鞭毛的生物合成与功能的基因在大肠杆菌与沙门氏菌中已被广泛研究,在这些肠道菌中,鞭毛包含一个复杂庞大的调节单元,包含 50 多个基因组成的至少 17 个操纵子。鞭毛的级联调控系统分成 3 个部分,FlhDC 是最重要的调控子,位于一级调控

单元,是其他鞭毛调节基因表达所必需的。由它激活的二级调控单元是编码鞭毛丝和基体部合成所需基因,以及三级调控单元的调节子 FliA (正调节 σ 因子) 和 FliM (负调节 σ 因子)。三级调控单元中包含编码鞭毛丝主要结构亚基的 *fliC* 基因和编码鞭毛动力马达的 *motA* 基因。不同于大部分肠道菌,铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 的鞭毛主要调控子是 FleQ,在与 RpoN (σ^{54}) 的共同作用下,激活包含一个双组份系统 FleSR 的二级调控单元^[5-6]。

2 鞭毛的致病性

2.1 鞭毛与细菌黏附、侵袭的相关性

作为细菌的黏附素,菌毛研究得较为详尽些,但近些年来,鞭毛作为黏附因子越来越受到关注。Barnich 等^[7] 从患有 Crohn 氏病患者体内分离的大肠杆菌 LF82 菌株中发现,缺失编码鞭毛蛋白的 *fliC* 基因后,细菌丧失了对肠上皮细胞的黏附和侵袭功能,并且下调了 I 型菌毛的表达量。Girón 等^[8] 通过构建肠致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) 的 *fliC* 突变株,发现其与野生株相比,黏附至 HeLa 细胞的能力显著降低且不能在 HeLa 细胞表面形成典型微菌落,从而首次证明 EPEC 的鞭毛直接参与黏附。在艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 中也发现了同一血清型有鞭毛菌株在小鼠肠道上的黏附与定植是无鞭毛株的 10 倍^[9]。Roy 等^[10] 发现肠毒性大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 的鞭毛高保守区域可以和一种胞外黏附素蛋白 (EtpA) 发生相互作用,从而介导其在肠内的黏附和定植。不仅是致病菌,在某些益生菌中,鞭毛同样也发挥了黏附素的作用。Troge 等^[11] 发现 Nissle1917 鞭毛介导了与产粘蛋白人肠道上皮细胞的结合。在体内实验中,EcN· Δ *fliC* (Nissle1917 鞭毛缺失株) 无法黏附至人体肠道,而通过 U 形管运动性实验分离的强运动性菌株黏附能力显著增强;在体外实验中,EcN· Δ *fliC* 丧失黏附至 LS174T 细胞 (产粘蛋白) 的能力,而强运动性菌株黏附能力显著增强。通过与 T24、Caco-2 (不产粘蛋白) 细胞的粘附结果做对比,表明了粘蛋白葡萄糖酸盐是 EcN 鞭毛蛋白与人肠道上皮细胞结合的受体,且这一黏附过程与鞭毛蛋白的 D3 结构域无关。益生菌 Nissle1917 这一强聚集能力赋予其良好的生物被膜

形成能力,有效地阻止了致病菌的粘附和侵袭,在肠道生态小境中具有强有力的竞争力,鞭毛在这一过程中自然扮演了关键的角色,这也为其作为肠道安全给药靶向载体奠定了基础。

作者同样发现在猪源 IPEC-J2 细胞上, F18ab Δ *fliC* 和 F18ac Δ *fliC* 两株 *fliC* 缺失突变株的黏附性能较野生株分别下降了 62%、83%,而在 IPEC-1 细胞上则分别下降 59%、65%,且利用纯化的鞭毛通过间接免疫荧光实验,证明了鞭毛自身可以作为黏附素直接参与对仔猪小肠上皮细胞的黏附^[12]。

许多细菌的鞭毛在侵袭肠道上皮细胞方面也发挥了至关重要的作用。例如,在产志贺氏菌毒素的大肠杆菌 (Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, STEC) O113:H21 中,对结肠上皮细胞 (HCT-8) 的侵袭主要是由鞭毛素介导的^[13]。我们最近发现在 F18ab⁺ *E. coli* 中, *fliC* 缺失株相比于野生株对于 IPEC-J2 的侵袭能力显著降低,从而证明鞭毛作为侵袭因子介导了 F18ab⁺ STEC 对于细胞的侵袭^[14]。许多其它肠道病原菌,包括 EPEC^[15]、单核细胞增生症李斯特杆菌 (*Listeria monocytogenes*)^[16] 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*)^[17], 在一定程度上都是利用鞭毛侵袭宿主细胞。然而,这些不同种致病菌鞭毛侵袭作用的精确机理仍然不明确。现在认为部分细菌可能是鞭毛作为 III 型分泌系统 (Type III secretion system, TTSS) 向细胞内分泌一些蛋白,导致部分膜肌动蛋白重排或聚合,亦或是直接调整了细胞膜骨架,从而促进细菌对宿主细胞的入侵。

然而,有关鞭毛运动性对于侵袭的作用仍未有定论。有研究发现运动性可以促进侵袭加速早期感染,但是其对于细菌的侵袭却不是必需的^[18]。Parthasarathy 等人也通过构建 *flhDC*, *fliI*, *fliC*, 和 *cheWE* 缺失株,证明了 *E. coli* K1 对人脑微血管上皮细胞的侵袭是由鞭毛本身而不是鞭毛的运动性导致的^[19]。值得注意的是,运动性 (*motA*) 的缺失反而增加了 F18ab⁺ *E. coli* 对于 IPEC-J2 细胞的侵袭^[20], 猜测一方面运动性可能会增加与宿主细胞接触进而粘附的几率,从而促进侵袭;另一方面,强运动性也可能使得刚刚粘附上的细菌游离出去,对粘附与侵袭作用存在抑制,从而降低感染概率。总而言之,细菌鞭毛在宿主细胞的侵袭过程中扮演了重要的角色,值得我们进一步研究。

2.2 鞭毛与生物被膜的相关性

生物被膜是细菌为适应环境、维持自身生存所发生的形态学的变化,形成了与浮游态细菌相对应的存在形式,从而增强了细菌对外环境的抵抗力。自从 Costerton^[21] 于 1978 年首先提出细菌生物被膜理论,并且由于它在临床上的耐药性以及对人体免疫系统的顽固抵抗力,越来越多的学者开始对生物被膜进行深入的研究,并对其形成过程得到了统一的认识^[22-23]。

研究发现,在 *Listeria monocytogenes*^[24]、胡萝卜软腐欧文氏杆菌属胡萝卜软腐亚种 (*Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*)^[25] 中,运动性是生物被膜形成初期与后期成熟过程中的决定性因素。通过对 8 株大肠杆菌的生物被膜形成能力与运动性的比较发现,运动性强弱与生物被膜形成能力的强弱呈正相关^[26]。当然,鞭毛不仅通过运动性介导生物被膜的形成,在生物被膜形成初期更是作为黏附因子促进表面的黏附^[27-31]。也有研究发现,鞭毛对于生物被膜的形成并不是必需的。在 *E. coli* MG1655 中,制备有 IncF 质粒 (可诱导生物被膜形成与成熟) 和无 IncF 质粒的缺失 *flhDC* (*flagella*⁻) 的菌株,结果发现,无 IncF 质粒的缺失株与野生株一样,只能形成断裂不规则状的细胞聚集物,而有 IncF 质粒的缺失株却能形成成熟的生物被膜^[32]。不仅如此,有时鞭毛的运动性对于细菌生物被膜的形成具有负调控的作用。例如,当抑制了产单核细胞李斯特菌的运动性后,其形成生物被膜的能力反而过度增加^[33]; Lee 等人发现在类鼻疽杆菌中,一种胞外信号分子环二鸟嘌呤核苷酸 (c-di-GMP) 会抑制鞭毛及其运动性,却可以促进生物被膜的形成^[34]。综上所述,鞭毛与细菌生物被膜的关系是一个复杂且颇具争议的研究热点,但可以确定的是,鞭毛及其运动性在一定程度上促进了细菌附着于表面物并形成具有强抵抗力的生物被膜。

2.3 鞭毛与细菌分泌系统的相关性

许多革兰氏阴性菌都需要借助 T3SS 将毒力蛋白分泌到细菌胞体外,并注入宿主细胞中发挥其毒性。鞭毛与 T3SS 在形态学上、序列上及其功能上的高度相似性,提示我们这两个系统有着共同的起源。有趣的是,有研究发现,鞭毛是所有 T3SS 的祖先。与一般 T3SS 不同,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中都存在有鞭毛 T3SS,且致病性 T3SS 是从鞭

毛特异性的 T3SS 变革而来^[3]。而一般的 T3SS 与鞭毛不同的是,在不同的家族中,它们的结构长度都有差别^[35]。鞭毛分泌系统作为 T3SS 家族的一员,其装配和调控涉及 60 多个基因的共同作用,有选择性地由胞质向外分泌蛋白。

鞭毛 T3SS 的内膜部分由 6 个膜内在蛋白质组成 (FlhA, FlhB, FlhP, FlhQ, FlhR, FlhO) (图 1, Erhardt 等^[3]), 存在于鞭毛基体部的 MS 环。胞质溶胶内的 3 个蛋白 (FliI, FliH, and FliJ) 在功能上也与 TTSS 有关。FliI ATP 酶和它的负调控子 FliH 一起,负责向 TTSS 输出酶作用底物,并调控它的初始进入和分选。FliJ 伴侣蛋白,负责鞭毛分泌底物^[36]。T3SS 的运转速度极快,它分泌蛋白的速率可以达到每秒 10000 个氨基酸残基。研究表明,鞭毛 T3SS 还可以分泌非鞭毛结构蛋白和一些毒力因子,如与弯曲杆菌侵袭抗原有关的蛋白 (Campylobacter invasion antigens, Cia proteins), 缺失鞭毛结构元件时,无论是编码鞭毛丝的基因还是与蛋白输出装置有关的基因,细菌都丧失了 Cia 蛋白的分泌能力,失去了对肠上皮细胞的侵袭能力,从而证明了 Cis 蛋白是通过鞭毛 T3SS 分泌的^[37]。Singer 等^[38] 近期也发现,肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌的鞭毛 T3SS 可以输出重组非鞭毛结构蛋白,将多种神经活性肽、来自蜗牛、蜘蛛、蛇、细菌的蛋白和鞭毛分泌底物 FlgM 融合,能通过细菌鞭毛 T3SS 分泌。而 FlgM 作为第一个被发现的鞭毛分泌系统分泌的非鞭毛结构蛋白^[39],是偶联鞭毛装配和相关基因表达的调节蛋白质。FlgM 的分泌需要有伴侣蛋白 σ^{28} 的参与^[40],是鞭毛启动子的一种特异性转录因子,在鞭毛钩和基体部完成后直接转录相关特异性基因,从而促进鞭毛丝和化学感应基因的表达。

2.4 鞭毛的免疫学应用

2.4.1 鞭毛介导的促炎性反应:鞭毛蛋白本身作为一种免疫刺激物,可诱导机体产生天然免疫应答和获得性免疫应答。研究发现,鞭毛蛋白具有两种可引起促炎性反应的受体,糖脂/神经节苷酯和跨膜蛋白 TLR5。然而,鞭毛蛋白是 TLR5 的唯一配体。作为一种模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), TLR5 在肺、肠上皮细胞、单核/巨噬细胞,和小肠的固有层未成熟树突状细胞上表达。TLR5 的信号分子传导机制和其他 Toll 样受体家族类似 (示

意图可参照文献^[2] 中 Figure 3b)。简单的说,鞭毛蛋白活化 TLR5 后,白细胞介素 1 受体相关激酶 (interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK) 磷酸化,并且触发髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 的激活,进而活化 MEK 激酶和 I κ B 激酶,最终激活核因子 (nuclear factor, NF) κ B 信号通路以及活化的促分裂素蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路后,产生大量前炎症细胞因子如 IL-8、TNF- α 等,从而介导促炎性反应,使宿主获得先天或被动免疫应答。这一复杂的信号通路中涉及 500 多个基因。我们前期试验发现,缺失鞭毛结构蛋白后, F18ab⁺ *E. coli* 诱导促炎性因子 IL-8 产生的浓度显著下降^[14]。Miao 等^[41] 发现了另外一条不同于 TLR5 胞外信号途径的鞭毛蛋白识别方式,这一途径包含了 2 个 NLR 家族的胞内模式识别受体:凋亡抑制蛋白 5 (apoptosis inhibitory protein 5, Naip5) 和白细胞介素转化酶蛋白酶活化因子 (interleukin-converting enzyme protease-activating factor, Ipaf), 它们和凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease activating factor, Apaf) 蛋白一样,都属于富含 NACHT 亮氨酸重复序列受体家族 (NACHT Leucine-rich repeat, NLR) 的成员。与 TLR5 不同, NLR 蛋白不依赖于 MyD88,但其被活化后同样激活 NF- κ B, 最终产生的最主要因子是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (caspases), 可以促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟,或者导致细胞凋亡^[42]。然而,它们识别鞭毛蛋白配体的机制仍需进一步阐明。

无论是哪种识别方式,它们都是与鞭毛蛋白的单体结合而不是多聚体,而鞭毛蛋白单体则可能是来源于多聚体的脱聚合作用。经 SDS-PAGE, 鞭毛单体和鞭毛丝的迁移速率是一样的,因为制备样品以及电泳时的加热过程会让鞭毛丝解聚;而用二硫代双 [琥珀酰亚胺基丙酸酯] (dithiobis [succinimidylpropionate], DSP) 稳定了鞭毛丝的交叉连接后,多聚体鞭毛丝蛋白则无法进入胶中。而用此种方法处理鞭毛丝,发现它们刺激 TLR5 的能力减弱了 99.5%^[43]。然而研究发现有些细菌,尤其是沙门氏菌,它们的鞭毛单体不是由细菌表面多聚体鞭毛的解聚而来,而是有一个独特的机制使得它

们能够感应宿主细胞的溶血磷脂,从而直接分泌单体鞭毛蛋白^[44]。

鞭毛蛋白的保守区域丢失将导致免疫原性的丧失,而将可变区替换却并不影响蛋白的免疫原性,证明了TLR5在鞭毛蛋白上的靶点位于保守区^[45],而这一特点也赋予了TLR5识别不同种细菌鞭毛蛋白的能力。有关鞭毛蛋白与TLR5的直接结合是由Mizel等^[46]利用一个已附加表位的TLR5表达系统来研究的,识别的区域位于其386-425位氨基酸。385-416位氨基酸序列和亮氨酸重复序列(Leucine-rich repeat, LRR)匹配,这一发现也是首次建立了LRR在TLR信号激活通路中的作用。近期的一项研究表明,鞭毛蛋白的D1结构域对于与TLR5的结合以及信号激活都有显著地作用,而D0结构域只对TLR5的激活有作用。进一步划分鞭毛蛋白的结构域D1、D2,试图发现它们识别的不同氨基酸序列^[47]。这一结果将鞭毛蛋白与TLR5的结合精细到氨基酸序列,为研究鞭毛蛋白对于促炎性反应的机制提供了重要的依据。

2.4.2 鞭毛作为免疫佐剂的应用价值:鞭毛蛋白除了自身的强免疫原性外,还具有增强外源抗原免疫原性的特性,包括体液免疫和细胞免疫。一直以来被广泛使用的铝胶佐剂虽能引起强有力的佐剂反应,但是却不能触发细胞免疫应答。近年来,鞭毛蛋白的佐剂活性越来越受到关注,它所特有的佐剂效应在疾病研究及疫苗研制中具有潜在的应用前景。McSorley等^[48]通过以鞭毛蛋白作为卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)的佐剂免疫小鼠,发现CD4⁺T细胞对OVA肽段(322-339)的反应提高了3-10倍。Pino等^[49]用FljB联合抗原共同免疫或抗原单独滴鼻免疫小鼠,前者产生更高水平的粘膜和系统性循环抗体,并且显示出更强烈的CD4⁺T细胞应答。通过滴鼻途径分别免疫野生、B7-1、B7-2和B7-1/2缺失小鼠,结果显示FljB增强B7-2的表达是其体内发挥佐剂效应的主要途径。Mizel等^[50]发现鞭毛蛋白与鼠疫耶尔森菌保护性抗原(F1和V)的融合蛋白(Flagellin-F1-V)可以在小鼠以及两种非人灵长类物种体内引发强抗原特异性体液免疫,且免疫小鼠体内的细菌在接种后3天即可完全清除。此融合蛋白具有很好的稳定性,在4℃可以稳定保存至

少297天,在25℃可以稳定保存至少168天。Lee等^[51]通过鼻内免疫小鼠途径,观测到嗜盐弧菌鞭毛蛋白FlaB和破伤风类毒素(tetanus toxoid, TT)同时给药时显著增加诱发产生的破伤风类毒素特异性抗体,用放射性标记的FlaB是直接和体外培养的人上皮细胞TLR5结合,从而促进NF- κ B和IL-8的激活与释放。Sun等^[52]用构建的鞭毛蛋白与一种细胞表面纤维蛋白PAC(变形链球菌*Streptococcus mutans*的主要致病因子)的融合蛋白(KF-rPAC)鼻内免疫家兔,并与PAC蛋白单独免疫(rPAC)以及PAC、鞭毛蛋白混合物免疫(KF+rPAC)的结果相比较,发现融合蛋白免疫后,无论是在血清中还是唾液中产生的特异性抗体水平都要显著高于另外两种免疫方法。在禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)的疫苗研究领域,鞭毛蛋白也起到了重要的佐剂作用。Chaung等人^[53]将单体鞭毛蛋白(mFliC)、多聚体鞭毛蛋白(pFliC)分别与灭活禽流感病毒融合,分别采用肌肉注射以及鼻内注射的方法免疫SPF鸡,结果显示无论是哪种给药途径,mFliC与AIV疫苗的融合蛋白刺激产生的IgA和IgG抗体水平均高于AIV疫苗单独免疫后所产生的抗体。Alan Shaw实验室先后构建了重组疫苗VAX125和VAX128a/b/c, VAX125是将H1N1流感病毒的HA1结构域与鞭毛蛋白融合,VAX128a是将鞭毛蛋白的C末端与HA1结构域融合,VAX128b是将鞭毛蛋白的D3结构域被HA1替换,VAX128c则是将C末端和D3结构域两部分都被HA1替换。选取不同年龄段的人作为受试对象,以不同剂量肌肉注射融合蛋白。结果发现以鞭毛蛋白作为佐剂的融合蛋白能够克服疫苗在年长者体内免疫原性弱的缺点,因此VAX125可以作为预防禽流感病毒的新型候选疫苗;而有关VAX128a/b/c融合蛋白的免疫结果表明,VAX128b/c与VAX128a有相同的免疫原性,却具有更好的机体耐受力,更加安全。可能是因为D3结构域即鞭毛的抗原部分被置换,导致反应力减弱,而免疫原性依旧保留^[54-55]。此外,Zaitseva等人^[56]还通过建立一个体外测定方法来预测佐剂应用与体内的毒性,以人MonoMac6(MM6)细胞为模型,测定经一系列Toll样受体刺激后的促炎性因子IL-1B, IL-6, TNF- α , IL-8的浓度,并以一个已知安全的内

毒素为对照来建立一个“安全阈值”。其中,鞭毛蛋白刺激产生的细胞因子浓度是在安全范围之内。

鞭毛作为疫苗研制的候选成分,有着其不可比拟的优点:低剂量发挥效用,预先存在的鞭毛蛋白抗体并不会引起佐剂活性的损伤,在 C 末端或者高变区插入抗原序列不会失去鞭毛蛋白激发 TLR5 的信号途径,给予小鼠或者家兔滴鼻注射免疫时无任何可检测的毒性,并且可以在药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice, GMP) 条件下大量生产等^[57]。然而,必须视其在人体内是否会产生反作用,例如引发全身性炎症反应,或者免疫接种部位的局部炎症。就鞭毛蛋白及其巨大的免疫佐剂潜力而言,或许可以通过减少鞭毛融合蛋白的使用剂量来避免上述副作用。尽管如此,鞭毛蛋白作为疫苗佐剂仍然有其限制性。在一些研究中,将序列插入鞭毛蛋白可变区能够得到高效疫苗^[58],可能原因是鞭毛蛋白可变区是引发产生自身抗体的部位,选择性去除可变区可降低抗体中和反应,提高佐剂活性。但是,也有研究发现,抗原序列插入的位置可能会影响其与融合蛋白之间的折叠,从而影响抗原抗体的识别^[57]。因此,对于不同的抗原序列,不同病原菌的鞭毛蛋白,需要不同的插入位点来获得高水平的免疫活性,也可能需要选择其他的蛋白佐剂来制备有效的融合蛋白疫苗。

综上所述,鞭毛蛋白作为疫苗佐剂能显著提高其免疫活性,对体液免疫、细胞免疫、粘膜免疫以及细胞因子都具有显著的调节作用,且给药方式灵活,成为新一代佐剂的候选者。

3 前景和展望

以往的诸多研究所发现的鞭毛主要功能是介导细菌在液体介质中的游动 (swimming) 和趋化性 (chemotaxis) 以及在固体表面的泳动 (swarming)^[59],而越来越多的研究数据表明鞭毛是细菌致病性的关键元素之一。在对细菌表面结构元件的探索中发现,鞭毛、各类菌毛、非菌毛粘附素之间是协调表达的^[60-61],对于不同的细菌不同的粘附素这种协调作用是不同的,它们共同作用的结果是使得细菌更易适应外界恶劣的环境,寻找合适的

宿主细胞,从而大量繁殖。但是它们相互之间究竟是如何相互感知并相互作用的,也是一个值得研究的领域。值得一提的是,鞭毛在行使其运动性时或者促进生物被膜形成时具有对细菌密度的依赖性,从而可能诱导与其相关的群体感应 (quorum sensing, QS) 现象,进而启动菌体中相关基因的表达,调控细菌的生物行为,但这一相关性仍未得到广泛证实。此外,鞭毛蛋白在作为免疫佐剂方面的潜在价值,为动物医学以及人类医学研究领域提供理论基础。但是,仍然有许多关键问题仍然未知,例如鞭毛作为一种特殊的 T3SS 与其他分泌系统间的关系,TLR5 是否可以辨别不同细菌鞭毛蛋白保守区的细微区别以及识别过程中的分子机制,鞭毛对细菌致病性是否必需,鞭毛与其他毒力因子间的关系等,鞭毛蛋白发挥佐剂效应的具体机制,以及鞭毛作为免疫佐剂在临床应用上面临的诸多问题等,都有待进一步研究与探索。

参考文献

- [1] He Y, Xu T, Fossheim LE, Zhang X-H. FlhC, a flagellin protein, is essential for the growth and virulence of fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *PLoS One*, 2012, 7 (9).
- [2] Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiology*, 2004, 12 (11): 509-517.
- [3] Erhardt M, Namba K, Hughes KT. Bacterial nanomachines: The flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2 (11).
- [4] Kojima S, Blair DF. The bacterial flagellar motor: Structure and function of a complex molecular machine. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, 2004, 233: 93-134.
- [5] Leon R, Espin G. FlhDC, but not fleQ, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiology (UK)*, 2008, 154: 1719-1728.
- [6] Soscia C, Hachani A, Bernadac A, Filloux A, Bleves S. Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (8): 3124-3132.
- [7] Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A.

- Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Molecular Microbiology*, 2003, 48 (3) : 781-794.
- [8] Giron JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 2002, 44 (2) : 361-379.
- [9] Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity*, 2001, 69 (12) : 7937-7940.
- [10] Roy K, Hilliard GM, Hamilton DJ, Luo JW, Ostmann MM, Fleckenstein JM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature*, 2009, 457 (7229) : 594-U103.
- [11] Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, Rund SA, Heuner K, Wehkamp J, Stange EF, Oelschlaeger TA. More than a marine propeller - the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *International Journal of Medical Microbiology*, 2012, 302 (7-8) : 304-314.
- [12] Duan QD, Zhou MX, Zhu XF, Yang Y, Zhu J, Bao WB, Wu SL, Ruan XS, Zhang WP, Zhu GQ. Flagella from F18⁺ *Escherichia coli* play a role in adhesion to pig epithelial cell lines. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 55 : 32-38.
- [13] Rogers TJ, Thorpe CM, Paton AW, Paton JC. Role of lipid rafts and flagellin in invasion of colonic epithelial cells by Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O113: H21. *Infection and Immunity*, 2012, 80 (8) : 2858-2867.
- [14] Duan Q, Zhou M, Zhu X, Bao W, Wu S, Ruan X, Zhang W, Yang Y, Zhu J, Zhu G. The flagella of F18ab *Escherichia coli* is a virulence factor that contributes to infection in a IPEC-J2 cell model in vitro. *Veterinary Microbiology*, 2012, 160 (1-2) : 132-140.
- [15] Sampaio SCF, Gomes TAT, Pichon C, du Merle L, Guadagnini S, Abe CM, Sampaio JLM, Le Bouguenec C. The Flagella of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain are required for efficient interaction with and stimulation of interleukin-8 production by enterocytes in vitro. *Infection and Immunity*, 2009, 77 (10) : 4406-4413.
- [16] Dons L, Eriksson E, Jin YX, Rottenberg ME, Kristensson K, Larsen CN, Bresciani J, Olsen JE. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (6) : 3237-3244.
- [17] Parker CT, Guard-Petter J. Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicks. *Fems Microbiology Letters*, 2001, 204 (2) : 287-291.
- [18] van Asten F, Hendriks H, Koninkx J, van Dijk JE. Flagella-mediated bacterial motility accelerates but is not required for *Salmonella* serotype enteritidis invasion of differentiated Caco-2 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294 (6) : 395-399.
- [19] Parthasarathy G, Yao Y, Kim KS. Flagella promote *Escherichia coli* K1 association with and invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (6) : 2937-2945.
- [20] Duan Q, Zhou M, Liang H, Zhu X, Guo Z, Li Y, Hardwidge PR, Zhu G. Contribution of flagellin subunit FliC to piglet epithelial cells invasion by F18ab *E. coli*. *Veterinary Microbiology*, 2013, (166) : 220-224
- [21] Costerton JW, Geesey G, Cheng K. How bacteria stick. *Scientific American*, 1978, 238 (1) : 86-95.
- [22] Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, Mahadik KR. Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 2009, 8 (2) : 159-168.
- [23] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (10) : 2675-2679.
- [24] Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (12) : 4418-4424.
- [25] Hossain MM, Tsuyumu S. Flagella-mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp carotovora. *Journal of General Plant Pathology*, 2006, 72 (1) : 34-39.
- [26] Wood TK, Barrios AFG, Herzberg M, Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72 (2) : 361-367.
- [27] Diaz C, Schilardi PL, Salvarezza RC, Fernandez Lorenzo de Mele M. Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2011, 82 (2) : 536-542.

- [28] Kim T-J, Young BM, Young GM. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (17) : 5466-5474.
- [29] Leid JG, Kerr M, Selgado C, Johnson C, Moreno G, Smith A, Shirliff ME, O'Toole GA, Cope EK. Flagellum-mediated biofilm defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* against host-derived lactoferrin. *Infection and Immunity*, 2009, 77 (10) : 4559-4566.
- [30] Nicholson TL, Conover MS, Deora R. Transcriptome profiling reveals stage-specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One*, 2012, 7 (11) .
- [31] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 1998, 30 (2) : 295-304.
- [32] Reisner A, Haagensen JAJ, Schembri MA, Zechner EL, Molin S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, 2003, 48 (4) : 933-946.
- [33] Todhanakasem T, Young GM. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (17) : 6030-6034.
- [34] Lee HS, Gu F, Ching SM, Lam Y, Chua KL. CdpA Is a *Burkholderia pseudomallei* cyclic di-GMP phosphodiesterase involved in autoaggregation, flagellum synthesis, motility, biofilm formation, cell invasion, and cytotoxicity. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (5) : 1832-1840.
- [35] Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(11) : 811-825.
- [36] Bange G, Kuemmerer N, Engel C, Bozkurt G, Wild K, Sinning I. FlhA provides the adaptor for coordinated delivery of late flagella building blocks to the type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (25) : 11295-11300.
- [37] Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11) : 3296-3303.
- [38] Singer HM, Erhardt M, Steiner AM, Zhang M-M, Yoshikami D, Bulaj G, Olivera BM, Hughes KT. Selective purification of recombinant neuroactive peptides using the flagellar type III secretion System. *Mbio*, 2012, 3 (3) .
- [39] Hughes KT, Gillen KL, Semon MJ, Karlinsey JE. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science*, 1993, 262 (5137) : 1277-1280.
- [40] Aldridge PD, Karlinsey JE, Aldridge C, Birchall C, Thompson D, Yagasaki J, Hughes KT. The flagellar-specific transcription factor, sigma (28), is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti-sigma (28) factor FlgM. *Genes & Development*, 2006, 20 (16) : 2315-2326.
- [41] Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 beta via Ipaf. *Nature Immunology*, 2006, 7 (6) : 569-575.
- [42] Steiner TS. How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (2) : 545-552.
- [43] Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SLR, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology*, 2003, 4(12) : 1247-1253.
- [44] Subramanian N, Qadri A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic *salmonella*. *Nature Immunology*, 2006, 7 (6) : 583-589.
- [45] Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB. *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *Journal of Immunology*, 2001, 167 (12) : 7009-7016.
- [46] Honko AN, Mizel SB. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 2005, 33 (1) : 83-101.
- [47] Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong MS, Gudkov AV, Osterman AL, Wilson IA. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*, 2012, 335 (6070) : 859-864.
- [48] McSorley SJ, Ehst BD, Yu YM, Gewirtz AT. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4 (+) T cells in

- vivo. *Journal of Immunology*, 2002, 169 (7): 3914-3919.
- [49] Pino O, Martin M, Michalek SM. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (10): 6763-6770.
- [50] Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, Ervin S, Lees CJ, Lively MO, Hantgan RR, Thomas MJ, Wood J, Bell B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009, 16 (1): 21-28.
- [51] Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, Lee JJ, Song HC, Kim JM, Choy HE, Chung SS, Kweon MN, Rhee JH. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infection and Immunity*, 2006, 74 (1): 694-702.
- [52] Sun Y, Shi W, Yang JY, Zhou DH, Chen YQ, Zhang Y, Yang Y, He BX, Zhong MH, Li YM, Cao Y, Xiao Y, Li W, Yu J, Li YH, Fan MW, Yan HM. Flagellin-PaC fusion protein is a high-efficacy anti-carries mucosal vaccine. *Journal of Dental Research*, 2012, 91 (10): 941-947.
- [53] Chaung H-C, Cheng L-T, Hung L-H, Tsai P-C, Skountzou I, Wang B, Compans RW, Lien Y-Y. *Salmonella* flagellin enhances mucosal immunity of avian influenza vaccine in chickens. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157 (1-2): 69-77.
- [54] Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, Kavita U, Liu G, Tussey L, Ozer K, Hofstaetter T, Shaw A. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine*, 2012, 30 (39): 5761-5769.
- [55] Taylor DN, Treanor JJ, Strout C, Johnson C, Fitzgerald T, Kavita U, Ozer K, Tussey L, Shaw A. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX128, STF2. HA1 SI). *Vaccine*, 2011, 29 (31): 4897-4902.
- [56] Zaitseva M, Romantseva T, Blinova K, Beren J, Sirota L, Drane D, Golding H. Use of human MonoMac6 cells for development of in vitro assay predictive of adjuvant safety in vivo. *Vaccine*, 2012, 30 (32): 4859-4865.
- [57] Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *Journal of Immunology*, 2010, 185 (10): 5677-5682.
- [58] Song L, Zhang Y, Yun NE, Poussard AL, Smith JN, Smith JK, Borisevich V, Linde JJ, Zacks MA, Li H, Kavita U, Reiserova L, Liu X, Dumuren K, Balasubramanian B, Weaver B, Parent J, Umlauf S, Liu G, Huleatt J, Tussey L, Paessler S. Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin. *Vaccine*, 2009, 27 (42): 5875-5884.
- [59] Harshey RM. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 249-273.
- [60] Lane MC, Simms AN, Mobley HL. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (15): 5523-5533.
- [61] Snyder JA, Haugen BJ, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, Welch RA, Mobley HLT. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (11): 7588-7596.

Advance on the pathogenicity and immunological application of bacterial flagella—A review

Zhiyan Guo, Mingxu Zhou, Qiangde Duan, Guoqiang Zhu*

College of Veterinary Medicine, Ministry of Education Key Lab for Avian Preventive Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: Being a surface structure of bacteria, flagella have been thought to simply act as the locomotive organelles for a long time. In recent years, as increasing information gathered from studies on the pathogenicity of flagella, we found flagella could contribute to invasion and adhesion to the host cells, playing an important role in the biofilm formation and being correlated with bacterial virulence secretion system. Binding of flagellin and toll-like receptor 5 may stimulate signaling pathway, resulting in the pro-inflammatory response. Meanwhile, flagella act as a new immune adjuvant as well, because of their good immunity character. This article summarizes the current knowledge of bacterial flagella, including their structure, contribution to the pathogenicity of the bacteria, and their potential application in immunity.

Keywords: flagella, pathogenicity, virulence factors, immune adjuvant

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571374, 30771603, 31072136, 31270171), by the Jiangsu High Education Key Basic Science Foundation (08KJA230002), by the Priority Academic Program of Development Jiangsu Higher Education Institutions, by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University "PCSIRT": IRT0978, by the Genetically Modified Organisms Technology Major Project of China (2009ZX08006-004B) and by the 948 programme grant (No. 2011-G24 from Ministry of Agriculture of the People's Republic of China)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@hotmail.com, yzgzhu@yzu.edu.cn

Received: 7 June 2013 / Revised: 14 October 2013

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2014 年 3 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2013	月刊	48 - 53	1 - 12
2014	月刊	54	1 - 3