

Toll 样受体在烟曲霉感染宿主细胞过程中作用的研究进展*

韩 黎^{1**} 纪 蕾² 王 菡³ 胡小华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) (苏州大学医学院 微生物教研室 苏州 215006)

(西北大学 生命科学学院 西安 710069)

摘要 烟曲霉感染宿主细胞时伴有明显的细胞肌动蛋白骨架重排,而重要模式识别受体 PRRs(pattern recognition receptors)之一,Toll 样受体(Toll-like receptors,TLR)参与调节病原细菌诱导的宿主细胞肌动蛋白骨架重排,其中 TLR2 和 TLR4 两亚型可以识别烟曲霉的病原相关分子模式 PAMP(pathogen-associated molecular patterns),并诱发炎症因子表达等一系列效应信号,在宿主细胞抗烟曲霉天然免疫中发挥重要作用,但在烟曲霉内化侵入过程中 TLR 能否特异性介导细胞肌动蛋白骨架重排尚不清楚。因此,研究揭示 TLR 激活在烟曲霉侵入宿主细胞的调控作用,对寻找可能的抗真菌药物作用靶点具有重要意义。

关键词 Toll 样受体,烟曲霉,细胞肌动蛋白骨架

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:10253-2654(2007)05-0973-03

Advance in Study on the Role of Toll-like Receptors During the Invasion of *Aspergillus fumigatus* into Host Cell*

HAN Li^{1**} JI Lei² WANG Han³ HU Xiao-Hua¹

(Center for Hospital Infection Control, Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071)

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

(College of Biology, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract During invasion of *Aspergillus fumigatus* into host cells, there is an obvious cellular actin cytoskeleton rearrangement. Toll-like receptors (TLRs), one of the most important PRRs (pattern recognizing receptors), can trigger the intracellular signaling transduction to induce the innate immunity, meanwhile be involved in regulating bacteria-associated cellular actin cytoskeleton rearrangement. The PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) of *Aspergillus fumigatus* can be recognized by TLR2 and TLR4, nevertheless, the role of TLRs in the regulation of cellular actin cytoskeleton rearrangement during invasion remains unclear. Further studies on the internalization of *Aspergillus fumigatus* through TLRs will contribute significantly to our understanding of regulation on invasion of *Aspergillus fumigatus*, eventually provide some ways to cure the fungal infection.

Key words TLR, *Aspergillus fumigatus*, Cellular actin cytoskeleton

近年来,由于器官移植的大量开展、抗肿瘤药物及化疗的广泛应用、广谱抗菌素及皮质类固醇激素的滥用、以及免疫缺陷病,尤其是艾滋病感染人数上升,主要由烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)引起的曲霉病在人群中的发病率不断上升^[1],已成为仅次于念珠菌感染的系统性真菌病。尤其是侵袭性肺曲霉病的致死率很高(未治疗患者>90%、经治疗患者50%~70%),对人类生命安全威胁极大^[2],但对其致病机理的研究,与病毒和细菌相比仍相当薄

弱^[3]。天然免疫系统在机体抵御真菌感染中至关重要^[4]。在感染宿主初期,未经补体或抗体调理的烟曲霉分生孢子既可被吞噬细胞(巨噬、单核、中性粒细胞)吞噬,也可内化侵入非吞噬细胞,如肺上皮细胞、血管内皮细胞等,进而在呼吸系统组织中定植或延血管扩散,从而逃避宿主免疫攻击^[5]。目前,人们对这种吞噬或内化侵入过程在时间和空间上的信号转导机制的理解十分有限。

* 国家自然科学基金项目(No. 30500462)

** 通讯作者 Tel: 010-66933338, E-mail: hawklhan@yahoo.com

收稿日期: 2006-12-20, 修回日期: 2007-04-03

1 烟曲霉感染与细胞肌动蛋白骨架重排

细胞肌动蛋白骨架,也称微丝,由肌动蛋白丝(F-actin)、肌动蛋白(单体)及其相关结合蛋白组成。肌动蛋白骨架重排(装配和解聚)是细胞形态改变及胞内运输的动力基础之一,在细胞吞噬、黏附、迁移及胞囊运输等生理过程中发挥重要作用^[6]。多种膜受体、胞内小G蛋白Cdc42/Rac1、cofilin蛋白以及磷酸脂质分子均可介导调控细胞肌动蛋白骨架重排,机制十分复杂。烟曲霉广泛分布于土壤、空气中,其分生孢子直径约 $2\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$,易在空气中悬浮而被吸入肺中。体外实验表明,烟曲霉分生孢子可内化侵入A549肺上皮细胞、HUVEC人脐静脉内皮细胞以及J774鼠巨噬细胞,该过程受到能解聚肌动蛋白骨架的细胞松弛素D和秋水仙素的显著抑制,而且侵入细胞的烟曲霉分生孢子位于肌动蛋白包裹的吞噬小体内。这有力证明,烟曲霉分生孢子的内化侵入宿主细胞过程中伴有明显的肌动蛋白骨架重排^[7],包括肌动蛋白紧张纤维束的消失、肌动蛋白凝集以及细胞与基质粘附的解离等,而且这种宿主细胞形态及结构的改变与其它细胞骨架结构(微管和中间丝)无关^[8]。另外,烟曲霉分生孢子生成的菌丝也可诱导细胞肌动蛋白骨架重排,内化侵入血管内皮细胞造成细胞损伤,引发烟曲霉菌丝血栓的形成^[9]。上述细胞肌动蛋白骨架重排也发生在其他重要致病真菌侵染宿主过程中,如白色念珠菌的假菌丝内化侵入血管内皮细胞^[10]、新生隐球菌穿越人脑微血管内皮细胞^[11]等。

另外,尽管抗体受体FcγR或补体受体CR可诱发细胞肌动蛋白骨架重排,从而介导吞噬细胞对IgG或C3b补体调理的白色念珠菌孢子或假菌丝的吞噬^[12],而且CR有可能识别真菌细胞壁表面的β-葡聚糖^[13],但在未经调理的烟曲霉分生孢子内化侵入宿主细胞过程中FcγR与CR的作用可能有限,也未见报道。另一类可能参与的重要细胞膜受体是模式识别受体,其可识别微生物表面的病原相关分子模式PAMP(pathogen associated molecular pattern),如细菌脂多糖LPS、真菌β-葡聚糖等,在天然免疫反应中发挥重要作用。已有报道,β-葡聚糖、甘露糖受体可能介导了吞噬细胞对白色念珠菌及新生隐球菌的吞噬过程^[14,15],但它们在烟曲霉内化侵入宿主细胞过程中的作用,以及其他模式识别受体是否参

与该过程,仍不清楚。

2 TLR与细胞肌动蛋白骨架重排

TLR是近年发现的重要模式识别受体家族之一,在多种哺乳动物组织细胞中,如吞噬细胞(单核、巨噬、中性粒细胞等)、树突状细胞、消化道及呼吸道上皮细胞、血管内皮细胞以及心肌细胞等均有表达。TLR共有10个亚型,可识别来自细菌、真菌以及病毒的不同PAMP^[16]。目前,对TLR的研究集中在阐明其对许多炎症因子表达的调控机制,而对其在感染初期病原微生物内化侵入宿主细胞过程中的作用知之甚少。最近研究证实在细菌内化侵入宿主细胞过程中,TLR可以介导调节肌动蛋白骨架重排。首先,当TLR2、TLR4或MyD88基因缺陷时,巨噬细胞对经补体调理或未经调理的大肠杆菌及伤寒沙门氏菌的吞噬作用受到抑制,但细菌与细胞间的黏附不受影响。其次,吞噬过程发生在感染早期30min内,与TLR诱导的基因表达变化(炎症因子的释放)无关,但受TLR的下游信号效应蛋白,p38-MAPK丝裂原激活蛋白激酶和小G蛋白Rab的调控,而这两者均可影响肌动蛋白骨架重排^[17]。再者,TLR介导的树突状细胞DC对抗原的巨胞饮作用(内化过程)与肌动蛋白骨架重排密切相关。LPS刺激TLR可显著增加DC细胞膜褶皱并可在30min内解聚富含肌动蛋白丝的细胞假足,使其消失^[18]。最后,肺炎克雷伯氏菌在内化侵入A549肺上皮细胞过程中的细胞肌动蛋白骨架重排,也与TLR的激活密切相关^[19]。

TLR在抗烟曲霉感染免疫中的功能研究,主要集中在不同宿主细胞受到不同生长形态的烟曲霉刺激时,不同TLR对宿主细胞炎症因子表达的调控机制^[20]。首先,主要是TLR2和TLR4两亚型识别烟曲霉PAMP,如β-葡聚糖、角质素、甘露糖蛋白及其他细胞壁成分^[21],通过胞内下游信号转接蛋白MyD88髓样分化蛋白或非MyD88转接蛋白^[22],激活NFκB等转录因子,引起多种细胞因子的表达分泌,如IL-1、IL-6、IL-10、和TNF-α等,进而激活并募集单核/巨噬细胞、中性粒细胞至感染发生部位并杀伤烟曲霉。其次,不同生长形态的烟曲霉通过不同TLR激发不同信号效应。分生孢子通过TLR4刺激TNF-α、IL-1的产生,菌丝则可刺激TLR2上调抗炎信号因子IL-10的释放,从而抑制宿主细胞对其的免疫

攻击^[23]。这就提示菌丝的形成(转变形态)可能是烟曲霉的一种免疫逃避机制。

综上所述,TLR2 和 TLR4 可以识别烟曲霉 PAMP,诱发炎症因子表达等一系列效应信号,在宿主细胞抗烟曲霉天然免疫中发挥重要作用;TLR 已被证实参与调节细菌内化侵入宿主细胞过程中的肌动蛋白骨架重排,因此 TLR 也有可能特异性介导细胞肌动蛋白骨架重排从而调控烟曲霉内化侵入过程,但目前机制仍不清楚。Mambula 等认为 TLR2、TLR4 以及 MyD88 可能不参与调节巨噬细胞对烟曲霉分生孢子以及菌丝的吞噬^[24];而 Bellocchio 则指出 TLR4 和 MyD88 调控鼠中性粒细胞对烟曲霉分生孢子的吞噬过程^[25]。本研究组以人肺上皮细胞 A549 为模型,用抗 TLR4 抗体阻断进行实验发现,TLR4 信号的阻断对烟曲霉内化侵入 A549 细胞有一定抑制作用,提示 TLR 有可能参与了烟曲霉内化侵入宿主细胞过程。因此,研究阐明烟曲霉内化侵入宿主细胞过程中的肌动蛋白骨架重排以及内化侵入效率与 TLR 激活的关系,对透彻理解 TLR 在真菌侵染宿主细胞过程中的作用,寻找可能的抗真菌药物作用靶点具有重要意义。

参考文献

- [1] 任南,文细毛,徐秀华,等. 中华流行病学杂志,2004,25: 549~550.
- [2] 吴绍熙,郭宁如. 中国皮肤性病杂志,2005,19: 49~51.
- [3] Brakhage A A. Curr Drug Targets, 2005,6: 875~886.
- [4] Brennan C A, Anderson K V. Annu Rev Immunol, 2004,22: 457~483.
- [5] Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, et al. Infect Immun, 1997,65: 1510~1514.

- [6] Tilney L G, DeRosier D J. Proc Natl Acad Sci USA, 2005,102: 18785~18792.
- [7] Wasylanka J A, Moore M M. Infect Immun, 2002,70: 3156~3163.
- [8] Kogan T V, Jadoun J, Mittelman L, et al. Infect Dis, 2004,189: 1965~1973.
- [9] Lopes-Bezerra L M, Filler S G. Blood, 2004,103: 2143~2149.
- [10] Fratti R A, Ghannoum M A, Edwards-Jr J E, et al. Infect Immun, 1996,64: 4714~4718.
- [11] Chen S H M, Stins M F, Huang S H, et al. J Med Microbiol, 2003,52: 961~970.
- [12] Brandhorst T T, Wuthrich M, Finkel-Jimenez B, et al. J Immunol, 2004,173: 7444~7453.
- [13] Gelderman K A, Lam S, Sier C F, et al. Eur J Immunol, 2006, Mar [Epub ahead of print]
- [14] McCann F, Carmona E, Puri V, et al. Infect Immun, 2005,73: 6340~6349.
- [15] Cross C E, Collins H L, Bancroft G J. Infect Immun, 1995,63: 2604~2611.
- [16] 杨清武,牟玲,朱佩芳,等. 第三军医大学学报,2005,27: 20~23.
- [17] Blander J M, Medzhitov R. Science, 2004,304: 1014~1018.
- [18] West M A, Wallin R P A, Matthews S P. Science, 2004,305: 1153~1157.
- [19] Regueiro V, Campos M A, Pons J, et al. Microbiology, 2006,152 (Pt 2): 555~566.
- [20] 韩黎,纪蕾,陈世平. 微生物学通报,2006,33: 158~162.
- [21] Roeder A, Carsten J, et al. Med Mycol, 2004,42: 485~498.
- [22] Marr K A, Balajee S A, Hawn T R, et al. Infect Immun, 2003,71: 5280~5286.
- [23] Netea M G, Warris A, Van Der Meer J W, et al. J Infect Dis, 2003,188: 320~326.
- [24] Mambula S S, Sau K, Henneke P, et al. J Biol Chem, 2002,277: 39320~39326.
- [25] Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, et al. J Immunol, 2004,172: 3059~3069.