

单增李斯特菌感染过程中炎性体激活的研究进展

李文艳¹ 董明倩² 王亚光² 邵巧巧² 管越强^{2*}

(1. 河北大学基础医学院 河北 保定 071001)

(2. 河北大学生命科学学院 河北 保定 071002)

摘要: 单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)感染可导致人和动物李斯特菌病的发生, 当机体受到单增李斯特菌感染后, 胞质中的模式识别受体如 NOD 样受体和 DNA/RNA 感受器通过识别细菌的病原相关分子模式和毒力因子形成炎性体进行免疫防御。研究证实, 细胞内的 NLRP3、AIM2、NLRC4、RIG-I、NOD1/NOD2 炎性体可分别感知单增李斯特菌的溶血素 O、细菌 DNA、鞭毛蛋白、菌体 RNA 及细菌肽聚糖碎片后被激活, 促进促炎性因子白细胞介素(Interleukin, IL)-1 β 和 IL-18 的表达、成熟和分泌, 诱导组织炎症和细胞的免疫应答, 同时导致细胞快速死亡。本文对上述问题就国内外最新研究进展进行综述和探讨。

关键词: 单增李斯特菌, 先天免疫, 炎性体, 白细胞介素-1 β

Activation of inflammasome during *Listeria monocytogenes* infection—a review

LI Wen-Yan¹ DONG Ming-Qian² WANG Ya-Guang² SHAO Qiao-Qiao²
GUAN Yue-Qiang^{2*}

(1. College of Basic Medicine, Hebei University, Baoding, Hebei 071001, China)

(2. College of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: *Listeria monocytogenes* infection can cause listeriosis in human and animals. When organisms are infected with *L. monocytogenes*, pattern recognition receptors such as NLRs and DNA/RNA sensor in cytosol sense bacterial pathogen associated molecular patterns and bacterial virulence factors, and form multiprotein complexes called inflammasomes for immune defense. Recent studies confirm that NLRP3, AIM2, NLRC4, RIG-I and NOD1/2 inflammsomes can sense listeriolysin O, bacterial DNA, flagellin, bacteria RNA and protein peptidoglycan fragments, respectively. Subsequently, these inflammasomes are activated, which regulate the expression, maturity and secretion of proinflammatory factor including interleukin (IL)-1 β and IL-18 to cause tissue inflammation, cellular immune response. In addition, activated inflammasomes can induce caspase1-dependent pyroptosis. In this review, the above-mentioned issues were discussed based on the

Foundation item: Special Fund of Hebei University “Comprehensive Strength Improvement of Colleges and Universities in Central and Western of China”; Special Fund of Medical Subject of Hebei University (No. 2015A2002)

***Corresponding author:** Tel: 86-312-5079364; E-mail: guanyueqiang@hbu.edu.cn

Received: June 25, 2015; **Accepted:** September 02, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 04, 2015

基金项目: 河北大学中西部高校提升综合实力专项基金; 河北大学医学学科专项资金建设项目(No. 2015A2002)

***通讯作者:** Tel: 86-312-5079364; E-mail: guanyueqiang@hbu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-25; **接受日期:** 2015-09-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-04

recent research progress.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Innate immunity, Inflammasome, Interleukin-1 β

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 简称单增李斯特菌, 是人兽共患的食源性革兰氏阳性菌, 可导致人和动物胃肠道、脑膜炎、败血症等疾病的发生, 甚至危及生命^[1]。LM 一旦感染机体, 机体需要马上启动先天免疫系统和适应性免疫系统进行复杂的免疫反应, 来识别和清除病原菌, 保护机体免受病原的侵害。其中, 先天免疫系统通过调节促炎性细胞因子的产生在启动和组织宿主防御反应中起着关键的作用^[2]。因此, 关于 LM 感染过程中炎性体激活的研究成为当前动物学、微生物学和医学界研究的热点之一。

1 单增李斯特菌的感染和传播

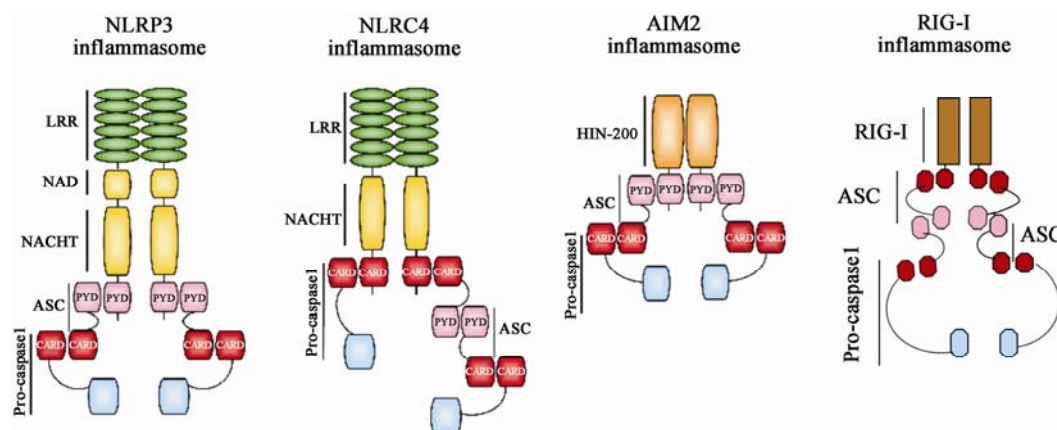
LM 既能感染吞噬细胞, 也能感染非吞噬细胞, 如巨噬细胞、肝细胞、上皮细胞及成纤维细胞等, 其感染过程可以分为 4 个阶段: 入侵、逃逸吞噬泡、增殖以及在细胞与细胞之间传播^[3-4]。在入侵过程中, 菌体的表面蛋白与细胞膜的表面蛋白受体结合使 LM 逐渐被膜包裹并陷入到胞内, 从而形成囊状吞噬泡^[3]; 吞噬泡很快与溶酶体结合, 溶酶体内的酸性环境可迅速酸化吞噬泡降解菌体, 但 LM 在被吞噬形成吞噬泡后, 会通过李斯特菌溶血素 O (Listeriolysin O, LLO) 的成孔毒性和磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 的裂解作用溶解吞噬体膜, 阻止或延长吞噬泡酸化的时间, 并使细菌尽快逃离吞噬体, 进入宿主细胞质基质^[3-5]; 在胞质中菌体快速增殖, 同时表达肌动蛋白聚合蛋白推动细菌向细胞膜移动^[4]; 当 LM 移动到细胞膜时, 在膜上形成“伪足”状突起, 突起被与之相邻的细胞内吞, 形成双层膜结构的二级吞噬体, 在 LLO 和 PLC 的作用下, 包裹有菌体的二级吞噬泡被破坏, LM 继续逃离再进入邻近细胞^[3], 传播过程中宿主细胞没有发生裂解, 从而避免菌体暴露在含有多种细胞因子和抗体的胞外环境中被杀伤。

2 炎性体的组成

炎性体是细胞内 NOD 样受体 (Nucleotide-binding oligomerization domain like receptor, NLR) 和 DNA/RNA 感受器感受病原体及危险信号后组装形成的多蛋白复合体, 它可激活半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase1), 进而使 IL-1 β 前体和 IL-18 前体转变为成熟的 IL-1 β 和 IL-18 发挥生物学效应, 参与机体的先天性免疫反应^[6-8], 导致 Caspase1 介导的细胞程序性的快速死亡^[7]。

炎性体的组成可以简单概括为感受器通过凋亡相关点样蛋白 (Apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 连接到 Caspase1。ASC 是所有炎性体的衔接蛋白, 包含两个死亡褶皱域: 一个热蛋白结构域 (Pyrin domain, PYD) 和一个 Caspase1 的激活和招募域 (Caspase-recruitment domain, CARD), PYD 可与上游的感受器互作引发 ASC 组装成一个大的含有 ASC 二聚体的多聚体蛋白复合体^[9], CARD 可与下游的 Caspase1 前体互作, 使 Caspase1 前体聚合、裂解形成有活性的 Caspase1 (图 1)^[10]。

目前报道较多的可引发炎性体形成的感受器是 NLR, 如含有 PYD-1 的 NLR (NLR containing PYD-1, NLRP1)、NLRP3、NLRP6、NLRP7、NLRP12 或含有 CARD-4 结构域的 NLR (NLR containing CARD-4, NLRC4)。除了 NLRP1, 其它的 NLR 蛋白质都由 3 个结构域组成, 包含一个氨基末端死亡褶皱域 (NLRPs 含有 PYD, 而 NLRC4 含有 CARD), 一个中央 NACHT (神经元凋亡抑制蛋白 NALP、MHC II 类分子反式激活因子 C II TA、柄孢霉不亲和位点蛋白 HET-E 和端粒酶相关蛋白 TPI 的第一、二个字母或首字母的缩写) 核苷结合域和一个羧基末端富含亮氨酸的重复域 (Leucine-rich repeats, LRR)^[6]。其中 NACHT 域有 ATP 酶活性, 具有蛋白质寡聚化的作用; LRR 有监管职能, 还可能参与了

图1 4种代表性炎性体的结构^[14]Figure 1 The structure of four respective inflammasomes^[14]

与配体的相互作用; NLR 蛋白质的死亡褶皱域如果是 PYD, 则通过衔接蛋白 ASC 连接到 Caspase1 前体, 如果死亡褶皱域为 CARD, 则直接与 Caspase1 前体相互作用^[6], 但也有可能是 NLR 首先与 ASC 通过 CARD-CARD 相互作用, 再通过另一个 ASC 的 PYD-PYD 相互作用^[11]。

最近发现, 细胞质 DNA 感受器黑色素瘤缺乏因子 2 (Absent in melanoma 2, AIM2) 和干扰素 γ 诱导蛋白 16 (IFN γ -inducible protein 16, IFI16) 也属于炎性体成员^[11], AIM2 含有一个招募 ASC 的 PYD 和一个结合 DNA 的 HIN-200 域(图 1), 而 IFI16 含有一个 PYD 和两个结合 DNA 的 HIN-200 域^[11-12]。另外, 视黄酸诱导基因 I (Retinoic acid-inducible gene-I, RIG-I) 蛋白也被认为是炎性体, 因为它可通过 CARD 与 ASC 相互作用后激活 Caspase1, 促进 IL-1 β 的成熟和释放(图 1)^[13]。

3 LM 对不同炎性体的激活

当单增李斯特菌感染宿主细胞进入细胞质后, 细菌的病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular pattern, PAMP)、菌体蛋白、毒力因子和核酸等可被宿主细胞质中的不同炎性体识别并激活, 进而活化 Caspase1, 促进 IL-1 β 和 IL-18 的成熟和分泌, 以及 Caspase1 依赖的细胞死亡^[15-16]。

3.1 LM 对 NLRP3 炎性体的激活

NLRP3 是第一个被鉴别出的 LM 激活的炎性体^[17], LM 激活 NLRP3 的机制可归纳为 3 个方面: (1) LM 被细胞吞噬裹入吞噬体后, LLO 介导的吞噬体膜破坏导致吞噬体中组织蛋白酶 B 释放到细胞质, 进而激活 NLRP3 炎性体^[17]; (2) LM 感染后, LLO 的成孔特性使 K⁺ 通过细胞膜外流, 从而诱导 NLRP3 的激活, 尤其是细胞外的 LLO 诱导 NLRP3 的激活不依赖于组织蛋白酶 B 的释放, 只与 K⁺ 外流有关^[18]; (3) LM 分泌的 P60 蛋白诱导宿主细胞产生大量活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 从而激活了 NLRP3 炎性体(图 2)^[19]。

LM 激活 NLRP3 的过程主要依赖于髓样分化因子 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88)——白介素-1 受体相关激酶 4 (Interleukin-1 receptor associated kinase 4, IRAK4)——白介素-1 受体相关激酶 1 (Interleukin-1 receptor associated kinase 1, IRAK1) 路径。实验证实, LM 感染 NLRP3 重建的 N1-8 巨噬细胞, 在没有 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 刺激物预刺激的前提下, Caspase1 也能被快速激活, 但在 MyD88-KO、IRAK4-KO 和 IRAK1-KO 细胞中, LM 对 NLRP3 炎性体的激活明显受阻, 说明 LLO 的释放激活了炎性体组装的

路径^[30]。

3.5 LM 对其它炎性体的激活

炎性体 NOD2 (NLRC2)主要是被 LM 细胞壁肽聚糖的降解产物 MDP 所感受和激活(图 2)^[31]。在细胞质中, LM 的肽聚糖碎片被 NOD1 和 NOD2 感知导致促炎症因子和抗菌肽的表达^[31-32]。这种 NOD1/2 激活的基因表达依赖受体互作蛋白-2 (Receptor-interacting protein-2, Rip-2)、核转录因子- κ B 和 p38 有丝分裂激活蛋白激酶^[32], 因此, 缺乏 NOD1 或者 Rip-2 的老鼠对 LM 的易感性增加。

NLRC5 作为 NLR 家族中最大的成员, 近来引起人们更多的兴趣。然而, NLRC5 在宿主防御和调节免疫信号路径中的作用还不清楚, 在 LM 感染 CD8+T 细胞过程中, NLRC5 参与 MHC I 抗原呈递作用, 而且 NLRC5 缺陷的小鼠 NLRP3 介导的炎性体激活部分受损^[33], 因此推测 NLRC5 可能与 LM 激活的 NLRP3 炎性体有关。

3.6 LM 对多种炎性体激活的比较

在 LM 感染过程中, 宿主细胞胞质中多种炎性体被激活, 在这些炎性体中, NLRP3 可能首先被激活, 随后 NLRC4 和 AIM2 被激活, 因为在 LM 感染过程中, 细菌破坏吞噬泡要早于鞭毛蛋白单体和细菌 DNA 释放到细胞质基质^[26]。

在 LM 激活炎性体诱导 IL-1 β 产生的过程中, 哪一种炎性体发挥最主要的作用, 目前还没有定论, 但讨论的焦点主要集中在 NLRP3 和 AIM2 炎性体之间。Meixenberger 等^[18]通过外周血单个核细胞的 RNA 干扰实验和骨髓来源的巨噬细胞的 NLRP3 和 Rip2 敲除实验都证实 LM 诱导的 IL-1 β 释放依赖于 NLRP3 炎性体, 而其它炎性体如 NOD2、Rip2、NLRP1、NLRP6、NLRP12、NLRC4 和 AIM2 则是非必要的, 并且进一步证实 LM 促进 IL-1 β 的产生与 AIM2 无关;但是 Wu 等用无鞭毛蛋白的 LM 感染巨噬细胞, 发现菌体只能被 AIM2 炎性体识别, 而不能被 NLRP3 炎性体识别, 说明 LM 诱导 IL-1 β 产生和 Caspase1 依赖的细胞死亡依赖 AIM2 炎性体, 而不是 NLRP3 炎性体^[21];还有部分

实验结果则证实在 LM 诱导 IL-1 β 和 IL-18 产生的过程中, LM 不但激活了 NLRP3 炎性体, 也激活了 AIM2 炎性体, 但 AIM2 炎性体占优势, 因为与野生型巨噬细胞相比, NLRP3 和 NLRC4 敲除的巨噬细胞在 LM 感染后, IL-1 β 和 IL-18 的分泌量只是轻微的减少, 而 AIM2 敲除的巨噬细胞 IL-1 β 和 IL-18 的分泌量则明显降低^[22-23]。在上述几种观点中, 大家比较认可的是 LM 既激活了 NLRP3 炎性体, 也激活了 AIM2 炎性体, 但 AIM2 炎性体的激活明显占优势。得到上述不同见解的原因可能是由于使用的 LM 菌株和细胞系的不同导致炎性体激动剂表达和释放的不同造成的;此外, 有的实验使用脂多糖 (Lipopolysaccharid, LPS)预刺激促进细胞使 IL-1 β 前体和 NLRP3 的表达, 而有的实验没有经过 LPS 预刺激, 这可能也是造成上述不同结果的原因之一。

4 结语

炎性体在机体抵御病原微生物感染过程中发挥着先天免疫的作用, 在 LM 感染宿主细胞的过程中, 宿主细胞中不同的炎性体分别识别细菌不同的 PAMPs 和毒力因子被直接或间接激活, 介导炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的产生, 改变免疫系统, 遏制细菌感染。

虽然已经发现 LM 可通过不同途径激活宿主细胞的多种炎性体, 但是尚有一些问题有待解决: (1) 这些炎性体的感受器是否能够直接与 LM 的不同成分结合, 即炎性体的感受器是否是真正的受体分子, 是否在识别 LM 的过程中需要宿主细胞中蛋白分子的辅助。(2) 炎性体感受 LM 后, 这些感受器是否进行翻译后修饰, 如磷酸化、泛素化和酶解等, 如果发生修饰, 那么细胞中的相关酶会发挥重要的作用, 这也可以作为李斯特病治疗的靶点。(3) LM 对不同炎性体激活并不是彼此孤立的, 它们之间存在着一定的“对话”机制, 但不同炎性体之间是如何进行“对话”还不清楚。(4) 目前关于 LM 激活炎性体的研究主要集中于体外实验, 但这不能完全代表体内水平, 只有了解 LM 如何在体内激活炎性体才

能真正预防和治疗 LM 相关的疾病。这些问题虽然具有挑战性, 但也是科研工作者和医学工作者今后努力的方向。

参考文献

- [1] Cheers C, McKenzie IF. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis[J]. Infection and Immunity, 1978, 19(3): 755-762
- [2] Geyer MB, Radhakrishnan K, van de Ven C, et al. Enhanced survival during experimental *Listeria monocytogenes* sepsis in neonatal mice prophylactically treated with Th1 and macrophage immunoregulatory cytokines and mediators[J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 2014, 33(12): e330-e337
- [3] Portnoy DA, Auerbuch V, Glomski J. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity[J]. Journal of Cell Biology, 2002, 158(3): 409-414
- [4] Li WY, Zhang YH, Lin HY, et al. Secretory expression of recombinant *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *E. coli* and analysis of its biological activity[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(8): 1278-1283 (in Chinese)
李文艳, 张永红, 林洪羽, 等. 重组单增李斯特菌溶血素 O 在大肠杆菌中的分泌表达及活性分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(8): 1278-1283
- [5] Lam GY, Fattouh R, Muise AM, et al. Listeriolysin O suppresses phospholipase C-mediated activation of the microbicidal NADPH oxidase to promote *Listeria monocytogenes* infection[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 10(6): 627-634
- [6] Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights[J]. Trends in Cell Biology, 2015, 25(5): 308-315
- [7] Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens[J]. Immunological Reviews, 2015, 265(1): 130-142
- [8] Li WY, Han DM, Liang S, et al. Molecular mechanism for the effects of *E. coli* heat-labile enterotoxin on mouse embryo survival[J]. Reproductive Toxicology, 2014, 45: 31-38
- [9] Vajjhala PR, Mirams RE, Hill JM. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(50): 41732-41743
- [10] Proell M, Gerlic M, Mace PD, et al. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling[J]. Biochemical Journal, 2013, 449(3): 613-621
- [11] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes[J]. Nature Reviews Immunology, 2013, 13(6): 397-411
- [12] Unterholzner L, Keating SE, Baran M, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA[J]. Nature Immunology, 2010, 11(11): 997-1004
- [13] Kell AM, Gale M Jr. RIG-I in RNA virus recognition[J]. Virology, 2015, 479/480: 110-121
- [14] Eitel J, Suttrop N, Opitz B. Innate immune recognition and inflammasome activation in *Listeria monocytogenes* infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 1: 149
- [15] Tsuji NM, Tsutsui H, Seki E, et al. Roles of caspase-1 in *Listeria* infection in mice[J]. International Immunology, 2004, 16(2): 335-343
- [16] Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, et al. Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages[J]. Cellular Microbiology, 2008, 10(1): 41-52
- [17] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP[J]. Nature, 2006, 440(7081): 228-232
- [18] Meixenberger K, Pache F, Eitel J, et al. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1 β , depending on listeriolysin O and NLRP3[J]. The Journal of Immunology, 2010, 184(2): 922-930
- [19] Schmidt RL, Lenz LL. Distinct licensing of IL-18 and IL-1 β secretion in response to NLRP3 inflammasome activation[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45186
- [20] Fernandes-Alnemri T, Kang S, Anderson C, et al. Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome [J]. The Journal of Immunology, 2013, 191(8): 3995-3999
- [21] Wu JH, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Clinical Immunology, 2010, 30(5): 693-702
- [22] Tsuchiya K, Hara H, Kawamura I, et al. Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*[J]. The Journal of Immunology, 2010, 185(2): 1186-1195
- [23] Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, et al. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome[J]. European Journal of Immunology, 2010, 40(6): 1545-1551
- [24] Witte CE, Archer KA, Rae CS, et al. Innate immune pathways triggered by *Listeria monocytogenes* and their role in the induction of cell-mediated immunity[J]. Advances in Immunology, 2012, 113: 135-156
- [25] Sauer JD, Witte CE, Zemansky J, et al. *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol[J]. Cell Host & Microbe, 2010, 7(5): 412-419
- [26] Zhao Y, Shao F. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus[J]. Immunological Reviews, 2015, 265(1): 85-102
- [27] Warren SE, Mao DP, Rodriguez AE, et al. Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during *Listeria monocytogenes* infection[J]. The Journal of Immunology, 2008, 180(11): 7558-7564
- [28] Imaizumi T, Sashinami H, Mori F, et al. *Listeria monocytogenes* induces the expression of retinoic acid-inducible gene-I[J]. Microbiology and Immunology, 2006, 50(10): 811-815
- [29] Abdullah Z, Schlee M, Roth S, et al. RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids[J]. The EMBO Journal, 2012, 31(21): 4153-4164
- [30] Hagmann CA, Herzner AM, Abdullah Z, et al. RIG-I detects triphosphorylated RNA of *Listeria monocytogenes* during infection in non-immune cells [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62872
- [31] Park JH, Kim YG, McDonald C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs[J]. The Journal of Immunology, 2007, 178(4): 2380-2386
- [32] Mosa A, Trumstedt C, Eriksson E, et al. Nonhematopoietic cells control the outcome of infection with *Listeria monocytogenes* in a nucleotide oligomerization domain 1-dependent manner[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(7): 2908-2918
- [33] Yao YK, Wang YL, Chen FX, et al. NLRC5 regulates MHC class I antigen presentation in host defense against intracellular pathogens[J]. Cell Research, 2012, 22(5): 836-847