

李斯特菌感染宿主细胞过程中磷脂酶 D 活性变化的初步研究*

纪 蕾¹ 韩 黎^{2**} 徐培君¹ 王 菡³ 苏文莉² 宋 华² 吴旭琴¹ 胡小华²

(苏州大学基础医学院 病原生物学教研室 苏州 215123)

(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) (西北大学生命科学院 西安 710069)

摘要 磷脂酶 D (phospholipase, PLD) 在感染和炎症反应中发挥重要作用,然而其在单核增生李斯特菌(简称李斯特菌)感染非洲绿猴肾细胞(Vero)中是否被激活尚未见报道。对李斯特菌刺激下的 Vero 细胞内 PLD 的活性变化进行了初步研究。以李斯特菌、佛波醇 PMA 分别刺激正常细胞及高效表达 PLD₂-K758R 功能缺陷蛋白腺病毒预感染的 Vero 细胞,研究 Vero 细胞内 PLD 活性变化。结果发现,与对照组相比(不给予刺激),在李斯特菌和佛波醇 PMA 刺激正常 Vero 细胞过程中,胞内 PLD 活性增强非常显著。mPLD₂-K758R 蛋白的过度表达对 Vero 细胞的 PLD 基础活性无影响,但对李斯特菌和 PMA 诱导的 PLD 激活有明显抑制作用。这初步表明,在李斯特菌诱导的 Vero 细胞对其吞噬过程中的确伴有 PLD 的激活,并且可能主要是 PLD₂ 亚型被激活,但此吞噬过程中 PLD 的激活机制及激活后 PLD 的具体功能尚有待进一步研究。

关键词 李斯特菌, 磷脂酶 D, 侵袭

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)05-0914-03

Activation of Phospholipases D in Vero cells During Infection by *Listeria monocytogenes* *

Ji Lei¹ HAN Li^{2**} XU Pei-Jun¹ WANG Han³ SU Wen-Li² SONG Hua² WU Xu-Qin¹ HU Xiao-Hua²

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

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

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

Abstract Phospholipase D (PLD) may play an important role in the infection and inflammation process, but it is unknown whether cellular PLD was activated during the invasion of *Listeria monocytogenes* into Vero cells. Our study demonstrated that firstly the Vero cells either infected by *Listeria monocytogenes* or stimulated by PMA shows remarkable increase on PLD activity, compared to basal ones (no stimuli). Further, in the Vero cells with the overexpression of catalytically inactive PLD₂(mPLD₂-K758R), PLD activation by both *Listeria monocytogenes* and PMA were dramatically inhibited, leaving basal PLD activity unaffected. These results indicated that the PLD activities may increase while *Listeria monocytogenes* invade the Vero cells and PLD₂ is likely to be activated. The important physiological role of PLD in this pathogen-host interaction process need to be further studied.

Key words *Listeria monocytogenes*, Phospholipase D, Invasion

单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是一种人畜共患食物传播性病原菌。作为兼性胞内寄生菌,李斯特菌可内化侵入非吞噬细胞从而躲避宿主免疫攻击,穿越组织屏障,引起胃肠、中枢神经系统炎症及新生儿感染,其中新生儿患者病情一般极为严重,病死率可高达 50%。研究表明,李斯特菌对非吞噬细胞的内化侵入过程是细胞膜受体介导

的一系列信号转导途径调控的肌动蛋白骨架重排过程^[1]。磷脂酶 D (phospholipase D) 的激活作为胞内蛋白信号转导的重要效应体系,在一系列生理反应中起重要调控作用,如肌动蛋白的骨架重排,细胞分裂、分泌,免疫及炎症反应等^[2]。但其是否在李斯特菌感染非吞噬细胞过程中被激活尚不清楚。对这一问题的深入研究将有助于揭示 PLD 在李斯特

* 国家自然科学基金(No. 30500462)

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

收稿日期: 2006-12-20, 修回日期: 2007-04-03

菌诱导的非吞噬细胞肌动蛋白骨架重排中的重要生理作用,对探讨 PLD 激活对感染发生的调控作用及透彻理解细菌感染宿主细胞的分子机制具有重要意义,同时,也为利用 PLD 这一药物靶点而探索新一代抗菌药物提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞 单核增生李斯特菌和非洲绿猴肾(Vero)细胞均为军事医学科学院五所惠赠。李斯特菌接种于专用增菌肉汤培养基中,振荡培养至指数生长期, OD_{600} 约为0.8。4000r/min,离心5min,用PBS洗涤2次,然后再用PBS重悬。非洲绿猴肾(Vero)细胞于DMEM/F12培养基中(PH7.4,10%FCS,青链霉素各100U/mL),37℃,5%CO₂条件下培养。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 细胞培养基(Gibco公司)新生胎牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所)李斯特菌增菌肉汤培养基(北京陆桥公司),佛波醇 PMA 和磷脂酸 PA(Sigma公司),磷脂酰乙醇 PtdEtoH(Avanti公司)[$9,10-^3H$]油酸(PerkinElmer Life Sciences)其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 表达 GFP 蛋白的重组腺病毒感染 Vero 细胞

将 Vero 细胞以 5×10^5 /皿接种于 35mm 培养皿,待细胞单层生长至 80%,用无血清的 DMEM/F12 培养基饥饿 1h,加入不含双抗含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,取高效表达 PLD₂ 功能缺陷蛋白的重组腺病毒感染 Vero 细胞,36h 后荧光显微镜下观察绿色荧光的表达,并拍照。48h 后传代 1 次,用于放射性标记测 PLD 活性。

1.3 PLD 活性的测定^[3]

将 Vero 细胞传代至 60mm 培养皿中,37℃,5%CO₂ 条件下孵育 24h 后,加入放射性 [$9,10-^3H$]油酸(2 μ Ci/mL)孵育过夜以标记细胞内磷脂类化合物。细胞用 HBSS 洗涤两次后,收集于 50mL 离心管中并重悬细胞。PLD 活性测定体系包括经缓冲液平衡的细胞悬液、乙醇和相应的刺激因子(李斯特菌与细胞的比为 100:1,PMA 的终浓度为 0.1 μ mol/L,空白组用 HBSS 取代)。放射性 [$9,10-^3H$]油酸标记的总磷脂类化合物和 PLD 酶催化的特异产物磷脂酰乙醇,经甲醇、氯仿及水抽提后,上有机薄层层析分

离。用放射性液闪仪测定分离的各部分产物放射性强度。其中,PLD 活性指标为磷脂酰乙醇的形成率,表示为其占放射性标记的磷脂类化合物总量的百分比。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 PLD₂ 在 Vero 细胞中的表达

利用高效表达 PLD₂ 功能缺陷蛋白的重组腺病毒感染 Vero 细胞单层,36h 后荧光显微镜下观察,可见大量表达 GFP 蛋白发绿色荧光的 Vero 细胞(图 1)。

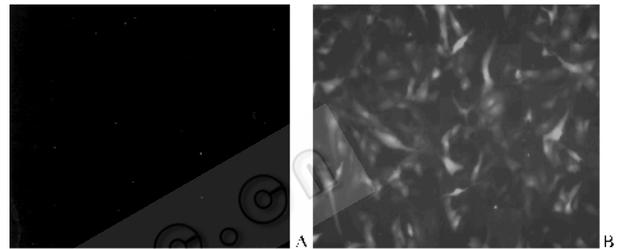


图 1 mPLD₂-K758R 重组腺病毒颗粒感染 Vero 细胞

A 空白对照组;B 高效表达 PLD₂ 功能缺陷蛋白的重组腺病毒感染组

2.2 李斯特菌刺激 Vero 细胞后 PLD 活性变化

分别以李斯特菌、佛波醇 PMA 刺激 Vero 细胞,放射性 [$9,10-^3H$]油酸标记后对细胞内的 PLD 活性进行测定比较,发现在李斯特菌刺激正常 Vero 细胞过程中,胞内 PLD 活性升高约一倍,而佛波醇 PMA 刺激诱导的正常 Vero 细胞 PLD 活性增强更为显著,约 4 倍左右。(图 2,control 组)。

2.3 PLD₂ 功能缺陷型重组腺病毒对李斯特菌诱导 PLD 活性变化的影响

用表达 PLD₂ 功能缺陷蛋白的 mPLD₂-K758R 重组腺病毒感染 Vero 细胞,48h 后传代一次,分空白组、李斯特菌及佛波醇 PMA 刺激组,同时设正常细胞为对照。图 2 显示,mPLD₂-K758R 蛋白的过度表达对 Vero 细胞的 PLD 基础活性(无李斯特菌刺激)无影响,但对李斯特菌诱导的 PLD 激活有明显抑制作用,约降低 50%;同样 PMA 刺激的 PLD 的激活也受 PLD₂-K758R 的显著影响(见图 2)。

3 讨论

哺乳动物细胞中,有两种 PLD 蛋白亚型,PLD₁ 和 PLD₂。它们可被多种胞外信号通过受体酪氨酸

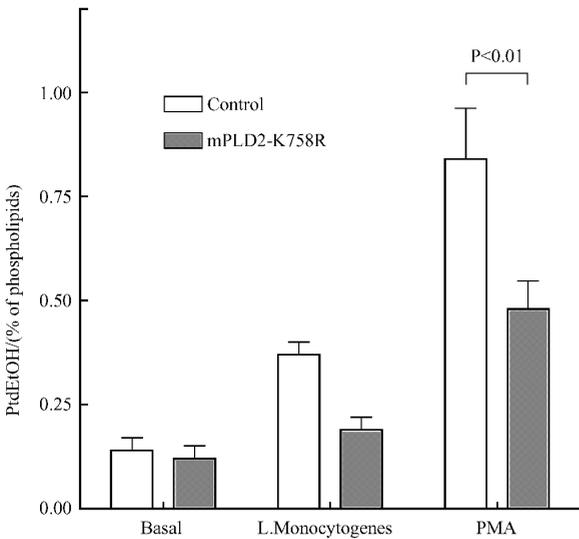


图2 mPLD₂-K758R 重组腺病毒感染对 Vero 细胞 PLD 活性变化的影响

激酶、异聚 G 蛋白受体激活。PLD 的活性变化与细胞肌动蛋白骨架重排密切相关,其参与了炎症相关的细胞脱颗粒,花生四稀酸等重要炎症因子的产生和释放并参与免疫细胞对病原体的免疫吞噬相关^[4]。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^[5]。Goldfine 也发现,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。该激活过程蕴含相当复杂的信号转导,蛋白激酶 C 和胞浆钙浓度变化均参与其中,并且 PLD 激活似乎是李斯特菌从吞噬小体中的逃逸的必要条件^[6]。然而,PLD 是否也参与了病原体对非吞噬细胞的内化侵入国内外却尚未见报道。

本试验以李斯特菌刺激非洲绿猴肾 Vero 细胞,建立细菌侵入非吞噬细胞的研究模型,测定李斯特菌感染对细胞内 PLD 活性的影响。结果发现,李斯特菌和 PMA 刺激后 Vero 细胞内 PLD 活性均明显高于无刺激组,这一现象说明,李斯特菌在侵入非吞噬细胞中可能伴随有 PLD 的激活,并且 Vero 细胞中

可能存在 PMA 诱导的蛋白激酶 C 相关的 PLD 激活经典途径。

此外,我们还发现含 GFP 的 mPLD₂ 功能缺陷型重组腺病毒感染 36h 后,荧光显微镜下可监测到大量发绿色荧光蛋白的 Vero 细胞,感染率达 80% 以上,并且 PLD₂ 功能缺陷蛋白 mPLD₂-K758R 蛋白的过度表达对李斯特菌和 PMA 诱导的 Vero 细胞内 PLD 的激活均有明显抑制作用。这表明李斯特菌刺激的 Vero 细胞 PLD 激活可能与 PLD₂ 有关。这一结果恰恰与 PLD₂ 的激活多由酪氨酸蛋白激酶及其胞内蛋白激酶介导的研究假设相符^[7]。

由此可见,在李斯特菌侵入非吞噬细胞过程中确实伴有 PLD 的激活。Bieme 等证实^[8],李斯特菌诱导的 Vero 细胞对其吞噬作用受肌动蛋白丝解聚蛋白 Cofilin 的磷酸化状态的严格调控,而德国 Jakobs 研究组发现磷酸化的 cofilin 可与 PLD₁ 结合(胞内或胞外)并刺激 PLD 活性增高^[9]。因此,李斯特菌在感染 Vero 细胞过程中 PLD 的活性变化规律和具体激活机制,以及是否同时造成肌动蛋白骨架重排并影响李斯特菌对 Vero 细胞的侵染效率等一系列问题尚需我们做进一步的研究。

参考文献

- [1] Bonazzi M, Cossart P. *Febs Letters* 2006, **580**: 2962 ~ 2967.
- [2] Exton J H. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002, **144**: 1 ~ 94.
- [3] Rumenapp U, Asmus M, Schablowski H, *et al.* *J Biol Chem* 2001, **276**: 2474 ~ 2479.
- [4] 卢韵碧, 周汉良. *生理科学进展* 2001, **32**: 121 ~ 124.
- [5] Melendez D J, Allen J M. *Semi Immun* 2002, **14**: 49 ~ 55.
- [6] Goldfine H, Wadsworth S J, Johnson N C. *Infect Immun* 2000, **68**: 5735 ~ 5741.
- [7] Cazzoli R, Shemon A N, Fang M Q, *et al.* *IUBMB Life* 2006, **58**: 457 ~ 461.
- [8] Bieme H, Gouin E, Roux P, *et al.* *J Cell Biol* 2001, **155**: 101 ~ 112.
- [9] Han L, Kindhäuser F, Caracciola P, *et al.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002, **365**: R50.