

革兰阴性菌结合蛋白 (Toll/GNBPs)和肽聚糖识别蛋白 (PGRPs)在无脊椎动物先天免疫应答中的作用

郑路平¹, 于淼¹, 邹向阳², 侯林¹

(1. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029; 2. 大连医科大学 生物技术系, 辽宁 大连 116044)

【摘要】 由于无脊椎动物没有专一的特异性免疫系统, 所以先天免疫系统是其抵御外来病原入侵的唯一方式, 无脊椎动物的先天免疫系统包括细胞和体液防卫机制, 这 2 种机制可被模式识别受体 (PRRs) 分子所触发, PRRs 可与微生物表面特异的物质识别并结合, 通过结合, 这些 PRRs 通过包囊和噬菌作用直接杀死微生物, 或者通过丝氨酸蛋白酶级联反应和细胞内免疫信号途径间接引发不同的防御反应以抵御病原微生物。革兰阴性菌结合蛋白 (GNBPs) 和肽聚糖识别蛋白 (PGRPs) 作为无脊椎动物先天免疫系统的一类重要模式识别受体, 在识别微生物病原并引发一系列级联反应做出免疫应答过程中起重要作用。本文主要对 GNBPs 和 PGRPs 在无脊椎动物中的研究进展及其在先天免疫应答过程中的作用机制进行综述。

【关键词】 革兰阴性菌结合蛋白; 肽聚糖识别蛋白; 模式识别受体; 先天免疫

【中图分类号】 R392.11 **【文献标识码】** A

Function of gram negative binding proteins and peptidoglycan-recognition proteins in invertebrate innate immune response

ZHENG Lu-ping¹, YU Miao¹, ZOU Xiang-yang², HOU Lin¹

(1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2. Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian, 116040, China)

【Abstract】 Since no specific immune system exists in invertebrates, the innate immune system functions as the unique mechanism for invertebrates to resist pathogenic microorganism. The innate immune system of invertebrates is composed of cellular and humoral defence mechanisms that are triggered by pattern recognition receptor (PRR) molecules which evolve to recognize conserved products of microbial metabolism produced by microbial pathogens. Upon specific binding to features on the surface of microorganisms, these PRRs can either directly mediate microbial killing through encapsulation and phagocytosis or indirectly trigger a variety of defence reactions through activating serine protease cascades and intracellular immune signalling pathways which regulate the transcription of effector genes such as antimicrobial peptides. GNBPs and PGRPs are important PRRs in innate immune system for invertebrates. This paper will mainly focus on recent research development in invertebrates and function mechanisms of innate immune response of GNBPs and PGRPs.

【Key words】 Gram-negative bacteria-binding proteins; Peptidoglycan-recognition proteins; Pattern recognition receptor; Innate immune system

无脊椎动物由于没有类似于 T 细胞和 B 细胞的专一的特异性免疫系统, 先天免疫系统就是其唯一的防御系统。先天免疫系统的非己识别在无脊椎动物中非常重要。因为一般认为无脊椎动物缺少适应性免疫。以前对无脊椎动物识别微生物并产生免疫应答机制了解很少, 近年来, 无脊椎动物先天免疫方面

的研究进展较快。无脊椎动物的先天免疫系统包括细胞和体液防卫机制, 这 2 种机制可被模式识别受体 (PRRs) 分子所触发, PRRs 可以与微生物表面特异的物质识别并结合, 称病菌结合分子模式 (pathogen associated molecular patterns), 通过结合, 这些 PRRs 可以通过包囊和噬菌作用直接杀死微生物, 或者通过丝氨酸蛋白酶级联反应和细胞内免疫信号途径间接引发不同的防御反应, 如控制抗菌肽效应基因的表达等^[1]。CHRISTOPHERS 等认为在果蝇和按蚊中发现的 PRRs 可分为 6 种类型, 包括肽聚糖种类型: 包括肽聚糖识别蛋白 (PGRPs)、磷脂蛋白 (TEPs)、革兰

【收稿日期】 2009-12-24

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (30271035)

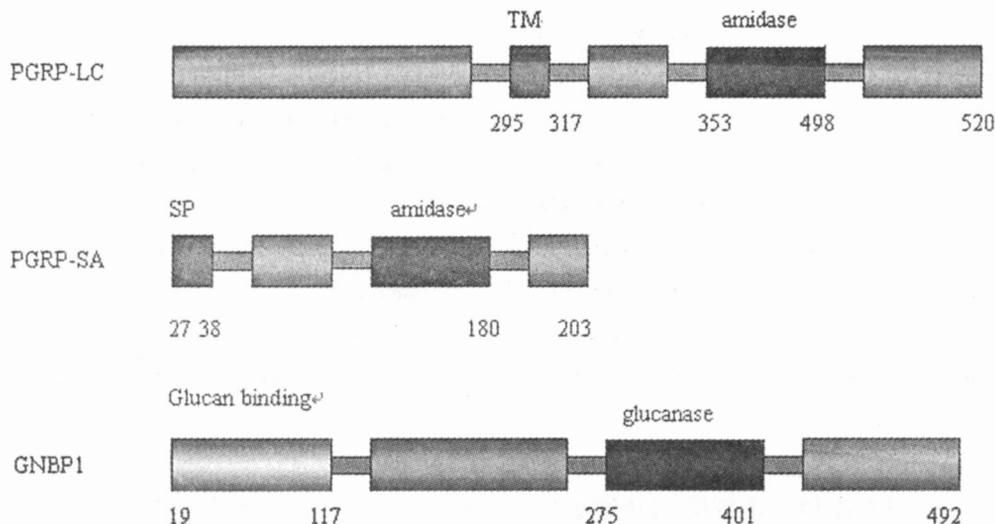
【作者简介】 郑路平 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 侯林, 通讯作者, Email: houlin01@126.com, 邹向阳, 并列通讯作者, Email: zouxiangyang@126.com

阴性细菌结合蛋白 (GNBPs)、清道夫受体 (SCRs)、C型凝集素 (CTLs) 和半乳糖凝集素 (GALE) [2]。HULTMARK将 Toll受体也归属为 PRRs。无脊椎动物模式识别受体识别革兰阴性菌和革兰阳性菌后可引发两条不同的信号通路, Toll途径和 Ind途径: 革兰阳性菌特异引发 Toll途径而革兰阴性菌特异引发 Ind途径 [3,4]。Toll和 Ind途径被激活后, 通过 NF- κ B 样转录因子调控抗菌肽基因的表达, 合成各种抗菌肽抵御和消灭外源入侵微生物。本文将主要针对家蚕、果蝇和按蚊这 3 个物种对 GNBPs 和 PGRPs 的研究进展进行综述。

1 革兰阴性菌结合蛋白 (GNBPs) 和肽聚糖识别蛋白 (PGRPs)

目前, 革兰阴性菌结合蛋白和肽聚糖识别蛋白作为这两条途径中主要的模式识别受体而被较为广泛的研究。革兰阴性菌结合蛋白 (GNBPs) 是其中一种模式识别受体, 其主要存在于昆虫等无特异性免疫的低等生物中, 在异物识别及后续的免疫信号转导引发抗菌肽基因表达中起重要作用。GNBP 的 C 末端含有 200 个左右残基的 葡聚糖酶样结构域 [5], 但由

于一些氨基酸在活性部位发生了替换, 所以并不具有酶活性, 而在 N 末端则结合有 β -(1,3) 葡聚糖的 100 个左右残基结构域, 在果蝇和按蚊等物种中已证实该区域为 GNBPs 的保守区, 可特异性识别脂多糖和 β -(1,3) 葡聚糖。基因长度平均在 2 kb 左右, GNPB 蛋白分子量大约为 50 kD。PGRPs 的 C 端含有一个 160 个氨基酸残基组成的保守结构域, 即 PGRP 结构域, 这是该蛋白家族所共同拥有的, 从昆虫到哺乳动物显示出高度的保守性。该结构域与抗菌素 T3 和 T7 溶解酶有高度同源性, 与细菌的酰胺酶 (切割肽聚糖) 有共同的保守结构特点 [6]。但在除保守序列外的其他位点在各物种间却并不保守。大部分 PGRPs 已不具有酰胺酶活性, 但也有部分基因仍保留着酶活性, 比如 PGRP-SC1。因此这个结构域在一些 PGRPs 中只起模式识别功能。PGRPs 蛋白家族分短亚族和长亚族, 前者属于分泌型胞外蛋白, 分子量一般为 20 kDa; 后者含有跨膜结构域, 分子量一般在 3090 kDa。一些 PGRP 基因含有若干 PGRP 结构域, mRNA 在转录拼接时能利用不同的 PGRP 结构域产生多种异构体 [7] (图 1)。



160 个氨基酸的 PGRP 结构域被标记出来 (amidase), PGRP-SA 和 PGRP-LC 中的酰胺酶催化作用的氨基酸残基区域却并不保守。果蝇 GNPB 家族成员包含一个保守的 N 末端结构域可以识别 β -(1,3) 葡聚糖, 另外还有一个和细菌葡聚糖酶同源的结构域。这个结构域的功能目前还不清楚。SP: 信号肽; TM: 跨膜结构域。

图 1 果蝇肽聚糖识别蛋白长型异构体、短型异构体和革兰阴性菌结合蛋白结构示意图

2 无脊椎动物先天免疫的 Toll 和 Ind 信号通路

无脊椎动物先天免疫的 Toll 和 Ind 信号通路较为复杂, 其级联过程与脊椎动物的相关通路基本相同, 都能激活下游的 NF- κ B 样转录因子, 调控免疫相关基因转录。果蝇的 Toll 途径信号通路是在受到真菌或革兰阳性菌感染后, 肽聚糖识别蛋白等模式识别

受体特异识别入侵微生物, 这一反应将引发膜外分泌蛋白 Spätzle 的成熟, 循环内源蛋白 Spätzle 一旦成熟便可作为配体与跨膜蛋白 Toll 受体的膜外区域结合, 膜内的 TL 结构域有 3 个配体, dMyD88、Pele 和 Tube。通过一系列信号传递, 使得 I κ B 样蛋白 Cactus 磷酸化, 释放 NF- κ B 样 DIF 和 Dorsal 转录因子, 调控

其下游抗菌肽基因的表达。Ind途径是另一个重要的信号通路,主要被革兰阴性菌特异引发免疫应答,革兰阴性细菌和杆状阳性细菌能通过跨膜蛋白PGRP-LC激活Ind信号途径^[8]。果蝇的*ind*基因(immunodeficiency gene)编码一个25 kDa的蛋白质,通过TAK1和IKK复合体(I κ B kinase complex)的磷酸化作用,使下游靶基因也是主要的转录因子Relish活化,裂解N末端Rel同源区和C末端锚定蛋白重复序列以使Rel蛋白进入核内激活抗菌肽基因的表达。

3 GNBPs在无脊椎动物先天免疫中的功能

第一个GNBP基因是在家蚕*Bombyx mori*发现,并从被细菌免疫过的家蚕脂肪体cDNA文库中分离且经过测序得到全长,该基因编码一个50 kDa的蛋白,其与革兰阴性菌的细胞壁有强烈的结合能力。通过氨基酸序列结构的对比发现其有一个区域与细菌-(1,3)葡聚糖酶和-(1,3-1,4)葡聚糖酶有明显的同源性。同时发现其氨基酸序列与脊椎动物脂多糖受体CD14具有相似性,并可以被抗CD14的抗体特异结合。*Bombyx* GNBP单一识别革兰阴性菌结合蛋白。果蝇的GNBP基因家族有3个成员,DmGNBP1、DmGNBP2和DmGNBP3,这些GNBP家族蛋白已被证实通过一个简单的离心过滤实验可以结合革兰阴性菌。其中DmGNBP1已在生化水平上被广泛研究,它已被证实可以作为一种模式识别受体来特异识别来自革兰阴性菌细胞壁上的脂多糖和真菌的-(1,3)葡聚糖,但对肽聚糖和-(1,4)葡聚糖和几丁质没有亲和性^[9]。此外,研究表明DmGNBP1突变体对革兰阴性菌和真菌所导致的感染具有一定的抵抗力,而对革兰阳性菌引发的感染表现出明显的易感性。遗传和生物化学实验方法显示DmGNBP1与PGRP-SA形成GNBP1-PGRP-SA复合体共同起模式识别受体的作用,特异识别革兰阳性菌并触发下游蛋白酶水解途径并最终激活Spätzle形成Toll通路^[10]。DmGNBP1以膜结合形式和细胞内可溶解形式存在。而DmGNBP3则在真菌引发的Toll途径激活过程中起模式识别受体的作用。比起GNBP家族其他成员,DmGNBP3在核苷酸序列水平上与鳞翅类GRPs具有更高的相似性。因此它可以作为一个有效的模式识别受体触发由真菌引发的Toll途径信号通路。实验显示DmGNBP3突变体在真菌感染过程中具有明显的易感性^[11]。在按蚊基因组中则包含6个GNBP

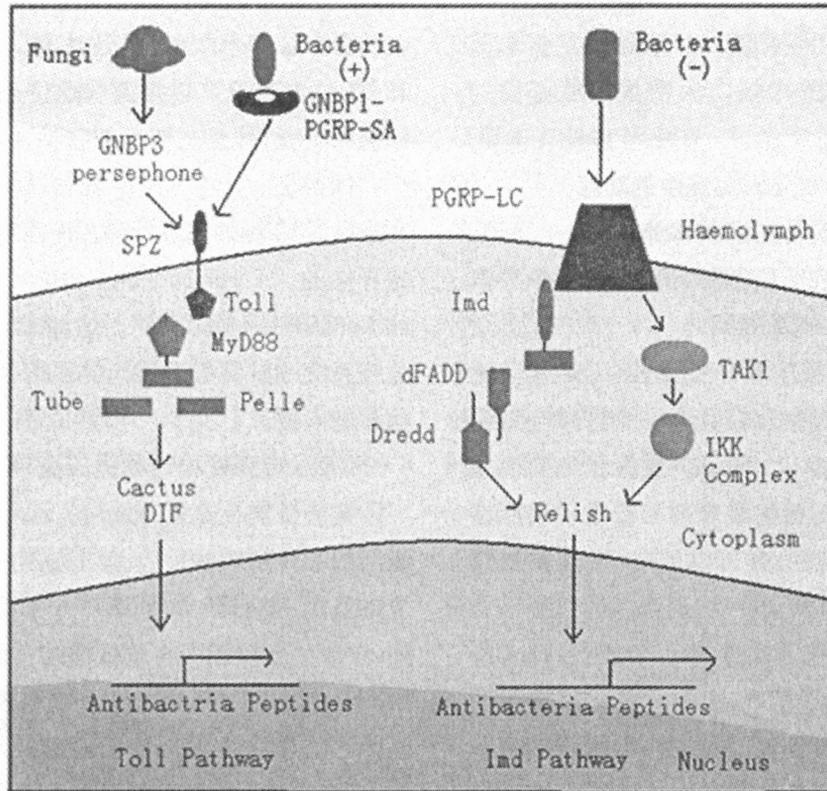
基因家族成员,GNBPA1,GNBPA2,GNBPB1,GNBPB2,GNBPB3和GNBPB4。所有的按蚊GNBPs在N末端均包含一个信号肽序列,并由此推断这些蛋白是分泌蛋白。只有GNBPA1在N末端有一个推测的跨膜区域,显示它为一个细胞表面分子。3个按蚊GNBPs成员GNBPB1、B2和B4含有GP I锚定序列,这些GP I锚定蛋白在功能上是不同的,但都能显示一种潜在的蛋白快速释放和分泌的机制。而且GNBPA1、B1和B3包含若干N连接糖基化位点,这说明GNBP可以被糖基化,这也是涉及细胞粘连或识别的蛋白的一个共同特征。其中GNBP亚族A可以与所有的果蝇和家蚕的GNBPs归为一类,而亚族B则为按蚊种属特异性的。*A. gambiae*的GNBPA2与*D. melanogaster*的DmGNBP-3是同源的。这些家族成员在按蚊先天免疫系统中分别起到不同的作用,以应答不同微生物病原的入侵。

4 PGRPs在无脊椎动物先天免疫中的作用

实验证明在家蚕*Bombyx mori*中,肽聚糖受体可激活酚氧化酶级联反应,其后这个受体被纯化并且相应的基因被克隆,这是第一个被发现的PGRP。*B. mori*PGRP已被证明与肽聚糖结合而不结合几丁质或游离-(1,3)葡聚糖。在果蝇基因组中,13个PGRP基因已被识别,6个属于长亚族,7个属于短亚族,其中PGRPSC1A和PGRPSC1B编码同样的蛋白。一些是跨膜蛋白,如PGRP-LA、LC和LD,它们中的大多数除PGRP-LB和LE外均包含一个典型的信号肽序列。多数PGRPs在果蝇脂肪体中表达,并且有5种是可被强烈诱导的(4个短亚族:SA,SB1,SC2,SD和一个长亚族LB)。已有实验证明果蝇先天免疫Toll信号通路中,可分泌型PGRP-SA是激活介导对革兰阳性菌起免疫反应的Toll信号转导系统的必需成分,但对真菌不起作用^[12],而在由革兰阴性菌激活的Ind途径中,PGRP-LC作为Ind的上游受体而起到重要作用,诱发相应抗菌肽基因的表达^[13]。但这一结果起初是出乎意料的,因为肽聚糖并不是这些细菌的主要成分并且肽聚糖层在细胞壁的里面而不在表面。但PGRP-LC突变体被证实仅对革兰阴性菌的感染敏感。而在按蚊基因组则含有7个PGRP基因,3个短亚族基因(S1,S2,S3),4个长亚族基因,PGRP2LA~LE。这些长亚族基因都有一个长的转录本,有几种剪接类型。如按蚊的PGRP-LA和PGRP-LC基因均含有多个PGRP结构域,且每个结构域都包含2个外显

子,外显子所在位置也相当保守。RT-PCR分析发现PGRPLA和PGRPLC基因分别有2种和3种不同的PGRP结构域剪切方式,这些结构域异构体可编码不同的蛋白。表达芯片结果进一步证明了不同的诱导因子能诱导表达不同的异构体。由此可见,PGRP结构域在识别外源微生物时起着至关重要的作用,不同

的PGRP结构域可能会识别不同种类的微生物而引发相应的免疫应答(图2)。从图2可以看出,果蝇免疫应答信号途径的激活并不是很严格,并且革兰阳性菌和真菌可以短期的激活Imd途径而革兰阴性菌同样可以在一定程度上激活Toll途径^[14]。



真菌激活Toll途径主要在GNBP3的介导作用下实现的,Persephone是真菌感染引发特异免疫应答从而导致一系列蛋白水解反应的关键因子。GNBP1-PGRP-SA复合体可以检测革兰阳性菌的感染并触发另一条蛋白水解途径,病原识别主要发生在血淋巴细胞中并将诱导Spätzle的成熟。Imd途径则可被革兰阴性菌和一些包含DAP型肽聚糖的革兰阳性菌所诱导。在脂肪体细胞中Imd途径的引发需要PGRP-LC的参与,而PGRP-LE则在血淋巴细胞中被发现,其过量表达一样可激活Imd途径。

图1 果蝇免疫应答信号通路示意图

5 问题与展望

无脊椎动物不具有脊椎动物特异性的免疫系统,所以先天免疫系统就是无脊椎动物抵御外界病原微生物入侵的唯一手段,作为引发免疫应答的上游因子,对无脊椎动物模式识别受体的研究就显得尤为重要,而GNBPs和PGRPs作为激活Toll和Imd这2条重要的信号通路的主要模式受体,更应进行深入的研究,但目前仍有很多问题需要探索,对GNBPs家族来说,GNBPs在各物种中均有若干成员,各个成员分别识别什么类型的微生物,怎样与这些微生物表面特异的物质结合,结合之后又会发生怎样的构象变化从而激活下游的其他基因,这些问题都没有得到很详细的解释。而对PGRPs家族而言,各个异构体的剪切机

制及调控机理,并且各个异构体之间的关系及其与其它模式识别受体的协同作用都需要进行进一步的研究。有研究报道,利用RNA干扰技术发现某些PGRPs如果蝇PGRP-LC在革兰阴性菌的吞噬作用中也起关键作用。另外,对其它物种的相关研究也将有利于加深对这两个模式识别受体的认识。在生产实践方面,由于二者与先天免疫相关,其表达量的高低将直接影响生物体抵御外来入侵病原微生物的能力,因此对其作用机制和防治病害方面的研究将在如水产养殖等领域发挥重要作用。

【参考文献】

- [1] JANEWAY C A Jr, MEDZHI TIOV R. Innate immune recognition[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20(1): 197-216 (下转第178页)

食品,目前在国外市场上有单独的灭活益生菌粉剂,由灭活益生菌和中药配成的混合制剂等。具有保健功能的灭活益生菌将为功能性食品工业的发展开辟更宽广的前景。

5.2 临床 由于长期滥用广谱抗生素及免疫抑制剂的大量使用,目前临床致病菌的耐药性普遍增加。灭活益生菌制剂通过屏障、增强免疫、抑制有害菌等途径,调节、恢复人体正常菌群平衡,从而达到预防和治疗疾病的目的,临床广泛用于治疗腹泻、消化性溃疡、细菌性阴道炎以及便秘等,且对肝、肾功能无不良影响,是一类安全、有效的生物制剂。

5.3 水产养殖业 灭活益生菌能够改善水产动物体内的微生态平衡,刺激机体的免疫系统,拮抗病源微生物,降解有机废物,从而减少疾病的发生,促进水产动物生长发育,改善养殖生态环境。

灭活益生菌对人体有着越来越重要的功效,灭活益生菌已被广泛的应用于食品、医药卫生和饲料等各个领域,具有极大的发展前景。

【参考文献】

- [1] 卢胜娟,陈祥贵. 益生菌的生理功能及其安全性[J]. 食品研究与开发, 2006(5): 122-124.
- [2] 李海燕,韩萍,侯长希,等. 益生菌的功效及其在食品中的应用[J]. 农业与技术, 2007(27): 80-82.
- [3] 刘大波,李文献,王少武,等. 益生菌与益生菌乳制品的研究现状及发展趋势[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2404-2405.

- [4] 杜鹏,霍贵成. 国内外益生菌制品发展现状[J]. 食品科学, 2004(5): 194-197.
- [5] 邓丽,芮汉明. 益生菌的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2003(77): 84-86.
- [6] 王海波,马微,钱程,等. 益生菌的研究现状及发展趋势[J]. 现代食品科技, 2006, 3: 286-288.
- [7] 沈萍. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2001: 154.
- [8] 黄秀梨. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2005: 160.
- [9] 费翅鲲,黄克文,张刚,等. 灭活益生菌制剂的保健功效研究进展[C]. 上海市预防医学会第二届学术年会, 2006: 234-237.
- [10] 王丽华,程佳月,杨昌文,等. 动物机体微生态系统和微生态制剂的研究进展[J]. 养殖技术顾问, 2008, 6: 138-139.
- [11] 张百川,孟祥晨. 益生菌抗肿瘤作用的分子机制的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21, 4: 28.
- [12] 董珂,刘晶星,郭晓奎. 益生菌增强机体免疫和抗肿瘤作用的分子机制[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(1): 79.
- [13] 胡学智. 益生菌的免疫调节[J]. 江苏调味副食品, 2006, 2: 1-3.
- [14] 张扬,袁杰利. 肠道益生菌对机体免疫功能的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(4): 246-248.
- [15] 李亚杰,赵献君. 益生菌对肠道黏膜免疫的影响[J]. 动物医学进展, 2006, 27(7): 38-41.
- [16] 李琴,张世春,曾晓燕,等. 益生菌营养及保健作用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(2): 106-108.
- [17] 陈有容,郑小平,方继东,等. 益生菌的健康功效及其应用[J]. 大连水产大学学报, 2001, 10(3): 270-274.
- [18] 吕密凯,陈燕芹,马淑霞,等. 灭活的双歧杆菌对抗生素脱污染小鼠肠道生理菌群的调整[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(3): 143-144.

(上接第 174 页)

- [2] CHR ISTOPH DES G K, ZDOBNOY E, BAR LLAS MUR Y C. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*[J]. Science, 2002, 298(5591): 159-165.
- [3] HOFFMANN J A, RECHHART J M, HETRU C. Innate immunity in higher insects[J]. Curr Opin Immunol, 1996, 8(1): 8-13.
- [4] HOFFMANN J A, RECHHART J M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective[J]. Nat Immunol, 2002, 3(2): 121-126.
- [5] OCH A IM, ASH DA M. A pattern-recognition protein for beta-1, 3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1, 3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. J Biol Chem, 2000, 275(7): 4995-5002.
- [6] WERNER T, L U G, KANG D. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*[J]. PNAS USA, 2000, 97(25): 13772-13777.
- [7] DZARSKI R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [J]. Mol Immunol, 2004, 40(12): 877-886.
- [8] RAMET M, MANFRUPELL I P, PEARSON A. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli* [J]. Nature, 2002, 416: 644-648.
- [9] KM YONG-SIK. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern

- recognition receptor for lipopolysaccharide and -1, 3-Glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32721-32727.
- [10] GOBERT V, GOTTAR M, MATSKEV ICH A A. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors[J]. Science, 2003, 302(5653): 2126-2130.
- [11] DOM N QUE FERRANDON, JEAN-LUC MLER, HOFFMANN J A. Sensing infection in *Drosophila*: Toll and beyond [J]. Seminars in Immunol, 2004, 16(1): 43-53.
- [12] MICHEL T, RECHHART J M, HOFFMANN J A. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein [J]. Nature, 2001, 414(6865): 756-759.
- [13] CHOE KM, WERNER T, STOVEN S. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila* [J]. Science, 2002, 296(5566): 359-362.
- [14] LEMA IRE B, RECHHART J M, HOFFMANN J A. *Drosophila* host defense: differential display of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms [J]. PNAS USA, 1997, 94(26): 14614-14619.