

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.15.031

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190428.1039.022.html>(2019-04-30)

白色念珠菌与表皮葡萄球菌混合生物膜研究进展^{*}

杨继琛,黄云超 综述,叶联华[△] 审校

(昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院胸外科一病区,昆明 650118)

[摘要] 表皮葡萄球菌和白色念珠菌是目前医院感染的常见条件致病菌,表皮葡萄球菌常黏附在生物材料表面引起植入物相关感染,并形成细菌生物膜(BF),而 BF 耐药性极强,临床上难以治愈。患者免疫力低下时会并发白色念珠菌混合感染,并形成细菌-真菌混合生物膜,使感染的治愈率下降,患者病死率增加。明确白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜的结构及耐药机制对治疗有重要意义。本文主要从白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜的形成过程、信号转导、基因调控等综述其结构特点、耐药机制方面的最新进展,为进一步研究白假丝酵母菌-表皮葡萄球菌混合生物膜的形成机制及临床防治提供参考。

[关键词] 生物膜;白色念珠菌;表皮葡萄球菌;耐药性

[中图分类号] 446.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)15-2637-04

Advances in research on mixed biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*^{*}

YANG Jichen, HUANG Yunchao, YE Lianhua[△]

(Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650118, China)

[Abstract] *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* are common opportunistic pathogens of nosocomial infections. *Staphylococcus epidermidis* often adheres to the surface of biomaterials, causing implant-related infections and forming bacterial biofilm (BF), while the BF is extremely drug-resistant and clinically difficult to cure. The immunocompromised patients are often suffered from mixed infection of *Candida albicans* with the development of bacterial-fungal hybrid biofilms, which reduces the cure rate of infection and increases the mortality. It is important to clarify the structure and drug resistance mechanism of *Candida albicans-Staphylococcus epidermidis* mixed biofilms. This review summarized recent advances in research on the structural characteristics and mechanism of drug resistance of the *Candida albicans-staphylococcus epidermidis* mixed biofilms from the aspects of formation, signal transduction and gene regulation, so as to provide references for studies of the mechanisms of the biofilm formation and clinical prevention and treatment.

[Key words] biofilms; *Candida albicans*; *Staphylococcus epidermidis*; drug resistance

医用生物材料已在临床上广泛应用,但生物材料植入引起的感染成了困扰临床工作的难题。表皮葡萄球菌是院内感染常见的条件致病菌,其黏附在生物材料表面形成生物膜,引起植入物相关感染。细菌生物膜(bacterial biofilm, BF)是细菌附着于惰性或活性实体表面,并由自身分泌的细胞外基质包裹形成的结构性细菌群落^[1]。生物膜内的细菌耐药性极强,在感染部位难以彻底清除,临床上约 65% 的感染与微生物在组织、器官或医疗设备表面形成生物膜有关^[2]。患者在治疗过程中及免疫力低下时常并发白色念珠菌混合感染,形成细菌-真菌混合生物膜,耐药性更强,治疗难度更大。其病死率为单一病原微生物感染的 2 倍,临床治愈非常困难^[3],因此,对细菌-真菌混合生物

膜感染的控制成为临床亟待解决的问题。本文对白色念珠菌-表皮葡萄球菌细菌混合生物膜的形成相关因素、结构、特征、耐药机制等进行综述,总结其相关研究进展。

1 白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜的形成与结构

有关白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜的形成与结构的报道大多通过体外实验获得,陈颖等^[4]通过在聚氯乙烯(PVC)材料表面建立白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜体外模型来观察混合生物膜的形成与微观结构。将表皮葡萄球菌与白色念珠菌混悬液在 PVC 材料表面进行共培养,在培养 2、6、12、24、48、72 h 时用激光共聚焦显微镜及扫描电镜观察

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81460278);云南省创新强省重点项目(2014FA048);云南省高层次卫生计生人才培养项目(L-2017006)。

作者简介:杨继琛(1994—),在读硕士研究生,主要从事细菌真菌生物膜方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: Lhye1204@aliyun.com。

各时间点混合生物膜结构。研究表明,混合生物膜的形成主要分为初始黏附和细菌分泌外黏质聚集两个阶段。在共培养早期(2~6 h),表皮葡萄球菌黏附于真菌细胞上,二者通过菌体表面多糖黏附素、甘露糖蛋白、疏水性蛋白等与 PVC 材料表面发生界面效应并在表面黏附。之后病原菌相互聚集形成菌落,病原菌厚度增加并分泌大量黏液包裹菌体,48 h 时厚度达峰值,形成成熟生物膜。

48~72 h 时,由于生物膜内微生物代谢及营养物质逐渐消耗,生物膜主体收缩并趋于稳定。生物膜外层与主体连接不紧密并易脱落,脱落后可发生再次黏附,进入生物膜生长的下一周期循环。扫描电镜观察到生物膜主体中部分菌体固缩、崩解,呈现以单个或数个菌丝态酵母菌黏附多个表皮葡萄球菌的珠串形态;三维重建显示混合生物膜表面有较多活菌构成的凸起,随着培养时间延长,PVC 膜表面孢子状白色念珠菌逐渐伸长,变化为假丝状及菌丝状。成熟期白色念珠菌生物膜为具有有机三维结构的致密网状系统,在细胞外基质包裹下由孢子、菌丝体和假菌丝组成。表皮葡萄球菌附着于白色念珠菌菌丝四周,构成复杂多层次网状混合生物膜。

2 混合生物膜形成的影响因素

2.1 菌体蛋白对生物膜的影响 白色念珠菌细胞壁特别是细胞壁蛋白对于真菌的生长、毒性、致病性,尤其是细胞壁在提供对宿主组织的黏附和抵抗宿主的防御功能上非常重要。白色念珠菌凝集素样序列(agglutinin like sequence, ALS)基因家族成员中的 ALS3 是白色念珠菌菌丝特有基因,其编码的细胞壁糖蛋白 Als3P 诱导酵母菌对宿主的黏附,而且 Als3 与菌丝细胞壁蛋白 1(hyphal wall protein 1, Hwp1)、聚苯乙烯黏附增强蛋白 1(Eap1)构建一个具有互补黏附功能的网络,以便有效对宿主进行定植、黏附,在混合生物膜形成过程中,通过绑定葡萄球菌到 ALS3P 的 N-末端片段区域和异体表达 ALS3p 的酵母菌重组体上而使葡萄球菌黏附到白色念珠菌的菌丝上,而且白色念珠菌具有高度保守的淀粉样蛋白形成序列,能使白色念珠菌互相聚集。ALS3p 在促进白色念珠菌菌丝的内吞作用方面起着重要作用,ALS3 基因缺失的真菌株不能形成结构完整的生物膜^[5-6]。

白色念珠菌的 Hwp1 由 HWP1 基因编码,其促进细胞壁的形成、菌丝发育和对宿主细胞的黏附,对于细胞内信号传导有重要作用。Hwp1 能促进白色念珠菌与宿主上皮细胞在黏附早期的结合,HWP1 基因缺失株在体内外均不能形成完整生物膜^[7]。在高等真核生物中,酪蛋白激酶 1 (CK1)家族是 Wnt 信号通路的一部分,并调控细胞分化、跨膜运输、DNA 损伤反应等,近年来发现,酵母酪蛋白激酶 2(CaYck2p)是 CK1 家族的主要真菌同源物,在大多数真核生物中存

在高度保存的丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员。作为一种多功能激酶,它控制着酵母菌形态发生、生物膜形成、细胞壁的完整性和与宿主细胞的相互作用^[8],尤其是 CaYck2p 可能在调控菌丝特异性基因的遗传抑制和调节细胞壁的代偿性形成方面发挥重要作用。研究发现,当白色念珠菌在酵母诱导条件下生长尤其是在酵母到菌丝转变期间,CaYck2p 通过使转录因子 uMe6 mRNA 表达增加,其下游菌丝特异性基因 ALS3、HWP1 和 SUN41 表达下调来调节酵母菌形态发生、生物膜形成和对宿主细胞的损伤。增强菌丝生长基因(enhanced filamentous growth, efg)1 通过调节 RME1、STE12 基因的表达调控菌丝的形成及酵母菌细胞的形态转换,与生物膜形成密切相关^[9]。

在表皮葡萄球菌生物膜的形成过程中,表皮葡萄球菌纤维蛋白原结合蛋白(fibrinogen binding protein, fbe)基因编码的纤维蛋白原结合蛋白(Fbe)、细胞间黏附素 A (intercellular adhesion gene, ica) 基因编码的多糖胞间黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)、聚集相关蛋白(accumulation associated protein, aap)基因编码的聚集相关蛋白(Aap)等多种因子均有参与。

在黏附阶段,fbe 基因编码合成的 Fbe 与宿主纤维蛋白原相结合,使表皮葡萄球菌黏附于生物材料表面,从而介导生物膜形成^[10-11]。在细菌增殖和聚集阶段则通过 PIA、Aap 等蛋白起作用。Ica 基因在表皮葡萄球菌生物膜感染中起重要作用,其编码的蛋白 PIA 是表皮葡萄球菌生物膜形成聚集阶段的必需物质^[12],可促进 BF 三维立体结构的形成并增强 BF 耐药性,是目前发现的与表皮葡萄球菌致病性关系最为密切的因子^[11]。表皮葡萄球菌生物膜的形成是个动态过程,首先由细菌表面疏水性蛋白或细胞外多糖对生物材料初始附着,随后细菌通过 PIA 介导相互聚集,形成 BF。扫描电镜观察发现,ica 操纵子阳性表皮葡萄球菌在 PVC 材料表面可形成结构致密、高度组织化的 BF 结构;而 ica 操纵子阴性表皮葡萄球菌在 PVC 材料表面只有部分细菌附着,无成熟 BF 结构形成。这可能是因为后者含初始黏附相关基因(atl E、fbe),表现为初步黏附,但缺乏 ica 操纵子介导 BF 聚集,因而未能形成成熟的 BF。

Aap 是一种以锌依赖的方式自组装的细胞壁锚定蛋白,介导生物膜内的细胞间黏附,促进生物膜增厚并成熟^[13]。细胞壁锚定蛋白附着点附近存在低复杂性区域,Aap 蛋白的 C 终端部分包含一个 135 aa 长的脯氨酸/甘氨酸富集区(PGR),该区域包含一组 18 个几乎相同的 AEPGKP 重复序列。利用生物物理技术对 PGR 分析表明,该区域是一种高度扩展、本质上无序的多肽,具有异常高的多聚脯氨酸 II 型螺旋倾向。用超离心法分析和动态光散射法测定表明,PGR

在溶液中的整体构象状态与温度有最小的依赖关系。PGR 在加入渗透剂三甲胺 N-氧化物或助溶剂 2,2,2-三氟乙醇时,具有抗构象崩解或 α -螺旋形成的能力。这些结果表明,PGR 是一种有弹性的、延伸的长柄,可以从细菌细胞壁向外延伸,促进生物膜内细菌间的黏附,说明 Aap 作为聚集阶段的一个重要因子,在生物膜形成中发挥一定作用。

PAHARIK 等^[14]研究表明,Aap 的作用独立于 PIA,Aap 在发挥细胞间黏附作用时需要蛋白水解及裂解,金属蛋白酶 SepA 调控着与堆积相关的蛋白质处理和表皮葡萄球菌细胞间黏附的表面特性,应用重组蛋白研究表明,SepA 能够在 335 残基处裂解 Aap 的 A 区域,在 601 残基处裂解 A、B 之间的区域,进而使 Aap 发挥作用。在 PIA 阴性的表皮葡萄球菌 1457 Δ ica,金属蛋白酶 SepA 对 Aap 依赖的表皮葡萄球菌是必需的。调节剂 SarA 抑制 SepA 的活性,sarA 失活会增加 SepA 的产生,反过来增强生物膜的形成。因此,在 aap 基因介导的生物膜成熟过程中,分泌葡萄球菌蛋白酶是生物膜形成的一个重要因素。

研究者通过建立表皮葡萄球菌和白色念珠菌混合生长的体外生物膜模型研究表明,混合培养能形成比单一微生物结构更复杂的混合生物膜,在混合生物膜形成过程中,存在细菌与真菌不同水平的相互作用,使表皮葡萄球菌 icaA、fbcA、aap 基因表达上调,PIA、FbcA、Aap 蛋白生成增加;白色念珠菌 als3、hwp1、efg1 基因表达上调,相应蛋白表达增加。表皮葡萄球菌和白色念珠菌同时存在于生物材料表面后,表皮葡萄球菌黏附在白色念珠菌菌丝及孢子表面,混合生物膜较单一微生物生物膜更厚、生长动力学更高,结构更致密、更复杂。

2.2 密度感应与生物膜 细菌和真菌可以通过合成和释放细胞外信号分子即密度感应分子(quorum sensing molecule,QSM)以改变相邻细胞间的信号传递来调节自身的活动^[15]。白色念珠菌酵母态和丝状体生长两种形式相互转化的能力对其致病性非常重要。QSM 在生物膜的生长和调控中起着重要的作用,这些分子有一种独特的作用机制,它们在细胞生长过程中不断地产生与细胞质量成正比的物质,导致 QSM 靶基因的协同表达。用高浓度的法尼醇孵育白色念珠菌几乎完全抑制生物膜的形成。法尼醇也能减少表皮葡萄球菌生物膜的生成^[16]。法尼醇通过抑制 Ras 蛋白通路,诱导白色念珠菌凋亡;通过下调丝裂原活化蛋白(mitogen-activated protein,MAP)激酶和 PKA(cAMP-protein kinase A)激酶通路来抑制细菌胚管的形成,诱导菌丝向孢子转变以抑制菌丝形成,影响真菌的形态^[17]。近年来研究表明,法尼醇在白色念珠菌生成的起始阶段,通过对翻译和转录成分的调控,即针对真核起始因子 2B(eIF2B),影响其

mRNA 与小核糖体亚基的相互作用,降低启动核糖体复合物的水平,通过在翻译途径上的不同步骤抑制菌丝的合成,抑制白色念珠菌的丝状生长^[18]。王小燕等^[19]通过荧光定量 PCR 研究表明,用法尼醇处理过的混合生物膜中表皮葡萄球菌生物膜形成相关基因 icaA、aap、fbcA 和白色念珠菌生物膜形成相关基因 als3、hwp1、efg1 的表达均下调,进而影响生物膜的形成。

3 耐药机制

生物膜的形成与抗真菌药物的耐药性密切相关。研究表明,在生物膜形成的第 48 小时,生物膜内的白色念珠菌与浮游细胞相比,对抗真菌药的耐药性增加了 5~8 倍,这种耐药性的增加是很多因素综合作用的结果^[20]。

3.1 渗透屏障 生物膜由细胞外基质(extracellular matrix,ECM)及被其黏结的细菌组成。ECM 主要由多糖、蛋白质和核酸组成,有助于生物膜的形成,保护生物膜的结构,维持细胞之间和细胞表面与环境之间稳定的相互作用。胞外多糖(extracellular poly saccharide,EPS)是组成生物被膜结构的基质物,其中 β -葡聚糖能够绑定氟康唑和两性霉素 B,阻止药物渗透到生物膜;碱溶性多糖(alkali-soluble polysaccharides,ASPs)则对抗真菌药物起螯合作用或阻隔作用。胞外 DNA(eDNA)是真菌和 BF 的关键基质成分,能够附着在不同的表面,与其他大分子物结合,使生物膜具有结构完整性和稳定性,DNA 产物的增加促进了念珠菌生物膜的成熟及对抗真菌药物的能力^[21]。但混合生物膜内表皮葡萄球菌的 EPS 基质过量产生会干扰菌丝之间的黏附,增加生物膜的毒性和耐药性^[22]。

3.2 耐药基因表达 白色念珠菌 ATP 结合转运蛋白超家族(ATP-binding cassette,ABC)构成一个多基因耐药家族,其中白色念珠菌耐药(Candida drug resistance,CDR)基因 CDR1、CDR2 和多药耐药(multi-drug resistance,MDR)基因 MDR1 的过度表达是白色念珠菌耐药的重要机制之一,它们的过度表达可将进入白色念珠菌细胞内的药物泵出细胞外,起抗生素外排泵的作用。在白色念珠菌生物膜形成的早期阶段,CDR 和 MDR 基因表达上调,这种上调对抗真菌耐药性的形成是非常重要的,随着生物膜的成熟,甾醇成分的变化似乎更相关,且耐药性不仅仅依赖于一个单一的机制。近年来研究发现,在生物膜内部也发现一种持久细胞,该细胞是一种休眠的、对抗菌药物具有高度耐受性的非分裂细胞。收集幸存的持留菌细胞再培养后,药敏实验显示其最低抑菌浓度(MIC)并没有增高;并可以形成新的生物膜,再次接受高浓度抗真菌药物冲击后,绝大多数真菌细胞仍然被杀灭,仅有与原始菌株相似水平的极少数持留菌细胞幸

存。白假丝酵母菌持留菌是具有多药耐药性,不具备遗传特性的表型变异细胞,被认为是生物膜耐药的主要原因^[23]。培养这些生物膜中的持续细胞能检测出 CDR 基因的表达^[19]。ABC 蛋白参与真菌交配因子和聚量感应分子的分泌,这些分子会影响生物膜的结构和行为,从而导致耐药性的增加^[24]。在混合生物膜中,细菌真菌之间不同水平互相作用,使表皮葡萄球菌生物膜形成相关基因 *icaA*、*fbe*、*aap* 表达上调,从而使生物膜在形成过程中的黏附聚集能力增强,ECM 增厚,这是耐药性增强的一个重要原因。生物膜形成时发生接触诱导表达及转录活性的改变,使更多的基因表达,导致生物膜形成过程中白色念珠菌及表皮葡萄球菌代谢增强,耐药性增加^[10]。

4 小 结

白色念珠菌与表皮葡萄球菌混合生物膜是多种细胞共存的形式,其复杂的形成过程和形态决定了混合生物膜相关感染治疗极为困难。目前对白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜的结构和特性有了初步的了解,但仍存在很多问题有待探究,随着对混合生物膜研究的深入,可找到控制其感染的新方法。

参考文献

- [1] NOBILE C J, FOX E P, NETT J E, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*[J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 126-138.
- [2] 张慧,孙红英.生物膜中白念珠菌的耐药性研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2014, 14(4): 361-364.
- [3] VALLE J, SOLANO C, GARCIA B, et al. Biofilm Switch and immune response determinants at early stages of infection[J]. *Trends Microbiol*, 2013, 21(8): 364-371.
- [4] 陈颖,王小燕,赵光强,等.聚氯乙烯材料表面白色念珠菌-表皮葡萄球菌混合生物膜结构观察[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(5): 609-614.
- [5] HOYER L L, COTA E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: a review of Als protein structure and function[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 280.
- [6] SUI X, YAN L, JIANG Y Y. The vaccines and antibodies associated with Als3p for treatment of *Candida albicans* infections[J]. *Vaccine*, 2017, 35(43): 5786-5793.
- [7] ORSI C F, BORGHI E, COLOMBARI B, et al. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (HWP1) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells[J]. *Microb Pathog*, 2014(69/70): 20-27.
- [8] JUNG S I, RODRIGUEZ N, IRRIZARY J, et al. Yeast casein kinase 2 governs morphology, biofilm formation, cell wall integrity, and host cell damage of *Candida albicans* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187721.
- [9] HANSON S J, BYRNE K P, WOLFE K H. Flip/flop mating-type switching in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* is regulated by an Efg1-Rme1-Ste12 pathway[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(11): e1007092.
- [10] 王小燕,陈颖,黄云超,等.表皮葡萄球菌生物膜形成相关基因在表皮葡萄球菌和白假丝酵母菌混合生物膜形成中的作用研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(1): 63-68.
- [11] LIANHUA Y, YUNCHAO H, GUANGQIANG Z, et al. The effect of iatrogenic *Staphylococcus epidermidis* intercellular adhesion operon on the formation of bacterial biofilm on polyvinyl chloride surfaces [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2014, 15(6): 768-773.
- [12] 叶联华,黄云超,许赓,等.医源性表皮葡萄球菌胞间黏附素基因操纵子在聚氯乙烯材料表面细菌生物膜形成中的作用研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(4): 466-471.
- [13] YARAWSKY A E, ENGLISH L R, WHITTEN S T, et al. The proline/Glycine-Rich region of the biofilm adhesion protein Aap forms an extended stalk that resists compaction[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(2): 261-279.
- [14] PAHARIK A E, KOTASINSKA M, BOTH A, et al. The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Mol Microbiol*, 2017, 103(5): 860-874.
- [15] HARGARTEN J C, MOORE T C, PETRO T M, et al. *Candida albicans* Quorum Sensing Molecules Stimulate Mouse Macrophage Migration[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(10): 3857-3864.
- [16] PAMMI M, LIANG R, HICKS J M, et al. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin [J]. *Pediatr Res*, 2011, 70(6): 578-583.
- [17] KATRAGKOU A, MCCARTHY M, ALEXANDER E L, et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(2): 470-478.
- [18] EGBE N E, DORNELLES T, PAGET C M, et al. Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in *C. albicans* and *S. cerevisiae*[J]. *Microb Cell*, 2017, 4(9): 294-304.
- [19] 王小燕,杨堃,黄云超,等.真菌密度感应分子 Farnesol 在表皮葡萄球菌和白假丝酵母菌混合生物膜形成中的作用[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2015, 36(2): 153-158.
- [20] CAVALHEIRO M, TEIXEIRA M C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5: 28.
- [21] PANARIELLO B H D, KLEIN M I, PAVARINA A C, et al. Inactivation of genes *TEC1* and *EFG1* in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology [J]. *J Oral Microbiol*, 2017, 9(1): 1385372.

外流及 ATP 释放,钾离子外流使 NLRP3/ASC/caspase-1 通路激活,而 ATP 释放则与焦亡相关。除钾离子外,溶酶体中的组织蛋白酶 B 的释放也与 NLRP3 非经典炎症小体通路的激活相关,CHEN 等^[14]发现在 Kupffer 细胞中,LPS 可能会使溶酶体膜结构的稳定性遭到破坏,使其中的组织蛋白酶 B 从中释放,而组织蛋白酶 B 的释放使 caspase-11 的激活增强,从而通过上述途径激活非经典 NLRP3 炎症小体,但 LPS 是如何影响溶酶体膜的结构还有待进一步探索。

2 细胞内 LPS 诱导的 Kupffer 细胞焦亡

细胞内 LPS 通过上述信号通路将巨噬细胞或 Kupffer 细胞激活之后,除了能够分泌多种炎症介质参与促炎或抗炎反应外,这些细胞内 LPS 还可以诱导巨噬细胞发生一种炎症形式的程序性死亡,即细胞焦亡。焦亡分为 2 条途径:经典焦亡途径与非经典焦亡途径,而细胞内的 LPS 或革兰阴性菌诱导的 Kupffer 细胞焦亡属于非经典焦亡途径。以往的研究者不清楚 caspase-11(在人类细胞中则为 caspase-4/5)的下游关键分子机制,以至于无法很好解释 LPS 介导的 Kupffer 细胞死亡。KAYAGAKI 等^[15]和 SHI 等^[16]通过不同的方法找到了焦亡下游的关键分子 Gasdermin D(GSDMD)。KAYAGAKI 等^[15]通过小鼠基因的大量变异去筛选与 caspase-11 介导的焦亡相关的基因;SHI 等^[16]通过基因编辑技术找到了 caspase-1 和 caspase-11 介导的焦亡下游的共同分子。他们发现,被激活的 caspase-11 会去切割这个分子,从而使该分子的 N 端从自我抑制的 C 端中释放出来,释放出的 N 端是细胞发生焦亡的关键。随后,DING 等^[17]又说明了 N 端导致细胞死亡的原因^[17],他们发现被切割下来的 N 端可以结合脂质膜并能在细胞膜上形成由 16 个单元围成的直径约为 10~14 nm 的孔洞,因渗透压的作用而引起细胞肿胀死亡。除 GSDMD 介导的焦亡外,YANG 等^[13]发现,pannexin-1 和 P2X7 对于 Kupffer 细胞的焦亡也至关重要,因为在缺乏这两个蛋白时细胞内的 LPS 诱导的细胞焦亡程度会减弱,并且野生型小鼠相较于这两个基因被敲除后的小鼠更容易在 LPS 的刺激下死亡,机制上解释为,激活的 caspase-11 切割 pannexin-1 使 ATP 释放,ATP 的释放作用于细胞膜上的 P2X7,从而使非选择性阳离子通道开放,诱发细胞焦亡。

细胞焦亡作为一种炎症形式细胞死亡的方式,可以通过杀灭感染细胞及释放炎症因子两个手段达到使感染局限以抵抗感染的作用,除此之外,通过细胞内 LPS 激活非经典 NLRP3 炎症小体通路也能使炎症因子的释放增多。现在认为焦亡主要发生在一些具有吞噬功能的细胞中,比如 Kupffer 细胞、树突状细胞、内皮细胞等^[18],而 Kupffer 细胞作为人体巨噬细胞中最大的一个群体,专门针对 Kupffer 细胞的焦亡

或是炎症小体通路的研究却相对较少。因此,若进一步理解焦亡和炎症小体在 Kupffer 细胞中的作用,可能会为感染相关的疾病如脓毒血症、内毒素休克等提供新的治疗靶点。

3 Kupffer 细胞内毒素耐受机制的研究进展

3.1 内毒素耐受概念及 TLRs 通路上的负性调控因子

内毒素耐受指的是,当预先给予小剂量的 LPS 刺激之后,在随后的大剂量 LPS 作用下,机体会表现出较低的炎性反应或是不表现出炎性反应的现象。这种现象与许多脓毒血症患者感染的后期发生免疫麻痹在原理上有许多的相似之处。肝脏长期暴露在来源于肠道微生物刺激的环境下,却不表现明显炎症,其中,Kupffer 细胞的内毒素耐受发挥着至关重要的作用。内毒素耐受时可以发生 TLRs 受体的下调、信号分子的改变、转录因子的负性调控及染色质的组蛋白修饰^[19]等。在 TLR4 信号通路的各个环节上,内毒素耐受会使 TLR4 表达下调、TLR4 对 MYD88 及 TRIF 招募的降低、IRAK1/4 的活性降低及通过形成无活性的 p50 二聚体影响 NF- κ B 活性^[20-21]。除此之外,还包括一些作用于此条通路中负性调节因子的上调,现已被证实的包括 Pellinon3 负性调控 TLR4/TLR2 信号通路、IRAK-M 抑制 IRAK1/IRAK4 激酶、SHIP1 抑制 JNK 和 p38 磷酸化从而抑制 MAPK 信号通路、SCOS1 负调控 TLR4/MYD88 通路、Twist-2 阻断 NF- κ B 促炎症转录等^[22-26]。

3.2 TRAF3 的泛素化修饰在 Kupffer 细胞内毒素耐受中的作用

TRAF3 为肿瘤坏死因子受体家族成员之一,其生物学功能依赖于它的 K48 泛素化降解及 K63 自身泛素化激活,由于它在内毒素耐受中可以影响 JNK/p38 MAPK 通路及 TRIF 通路^[27],因此对于 TRAF3 泛素化修饰在内毒素耐受中相关的研究近年来有不少的报道。LI 等^[28]发现,内毒素耐受时 MAPK 通路发生了重编程,机制上是通过 Pellinon1 介导的 cIAP2 的 K63 泛素化抑制及 TRAF3 的 K48 泛素化降解的抑制来实现,并且还在胆管炎患者体内也验证了 Pellinon1 的上调及 TRAF3 的下调的现象。同一个团队中的 WEN 等^[29]也发现了在 Kupffer 细胞内毒素耐受时 USP25 这种专门针对 TRAF3 的去泛素化酶表达会出现上调,然后通过抑制 TRAF3 的 K48 泛素化连接从而抑制其降解,最终抑制 MAPK 通路实现内毒素耐受。

3.3 非编码 RNA 对 TLRs 信号通路的调控在 Kupffer 细胞内毒素耐受中的作用

3.3.1 微 RNA(microRNA,miRNA)对 Kupffer 细胞内毒素耐受的调控

miRNA 为一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小 RNA,可以与 mRNA 非翻译区的 3'端的多个位点结合,起到对 mRNA 转录后的负性调控作用。近年来,研究者发现 miRNA 对于 TLRs 信号通路的调控在内毒素耐受中十分重要。如 miR-