

黑腹果蝇吞噬细胞对金黄葡萄球菌与 大肠埃希菌的不同吞噬作用

王 微, 朱 斐

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 吞噬作用是一种对抗微生物病原体的重要机制, 但许多细菌均有抗吞噬作用。利用透射电镜和激光共聚焦显微镜结合细胞生物学技术, 对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* S2 细胞吞噬热灭活大肠埃希菌(heat inactivated *Escherichia coli*, HIEC)和热灭活金黄葡萄球菌(heat inactivated *Staphylococcus aureus*, HISA)的作用进行了研究。结果表明: S2 细胞能够在接种后 1 d 内有效清除 HIEC, 但不能清除 HISA; 经聚肽糖(PG)或脂多糖(LPS)激活的 S2 细胞同样不能有效地清除 HISA, HISA 能够在 S2 细胞内至少存活 4 d。在接种细胞酸性指示剂(pHrodo)标记的细菌 1 h 后, HIEC 处于酸化环境中, 而 HISA 没有; 检测 S2 细胞的吞噬百分率显示 S2 细胞吞入活细菌与灭活细菌的敏感度没有显著差异。PG 处理后的 S2 细胞防御素(defensin)与抗真菌肽(drosomycin)均显著上调表达, 但仍无法消化 HISA。结果证实: 灭活金黄葡萄球菌表面具有抑制吞噬作用中消化步骤的成分, 而灭活大肠埃希菌没有。研究揭示了在 S2 细胞对抗革兰氏阳性菌时, 吞噬作用在清除该类病原体时所起到的重要作用以及金黄葡萄球菌抑制消化过程从而抵御细胞吞噬的策略。图 7 表 1 参 38

关键词: 免疫生物学; 吞噬作用; 黑腹果蝇; 金黄葡萄球菌; 大肠埃希菌; 防御素; 抗真菌肽

中图分类号: S856; R392

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2017)03-0381-08

Differential phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by *Drosophila melanogaster* S2 phagocytes

WANG Zhi, ZHU Fei

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Phagocytosis is an important defense mechanism against microbial pathogens, but many pathogens get the ability to subvert it. This research was aimed at discovering the potential mechanism of the gram positive and negative bacteria to survive from phagocytosis. In this study, *Drosophila melanogaster* S2 cells were applied as the host, and active/heat-inactivated *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were applied as invaders. Cultured S2 cells were incubated with *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA), heat-inactivated *Escherichia coli* (HIEC) or *Staphylococcus aureus* (HISA), separately. After incubation, S2 cells were collected for transmission electron microscopy (TEM) analysis, confocal laser scanning microscopy analysis, flow cytometry (FCM) analysis and real time quantitative PCR analysis. Results showed that S2 cells could phagocytose HIEC efficiently at 1 d post-inoculation, but they could not clear HISA. HISA could survive within S2 cells for at least 4 d, and peptidoglycan (PG) and lipopolysaccharide-activated S2 cells could not digest HISA efficiently either. Comparing S2 cells, intracellular HISA did not destroy the S2 cells even at 4 d post-inoculation. The pHrodo-labeled HIEC was observed in an acidified environment at 1 h post-inoculation, but HISA was not. In addition, the percentage of phagocytized pHrodo-labeled bacteria showed no great differences

收稿日期: 2016-04-18; 修回日期: 2016-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370050)

作者简介: 王微, 从事甲壳动物抗病免疫研究。E-mail: jiu.jingli@qq.com。通信作者: 朱斐, 副研究员, 博士, 从事水产动物免疫与疾病研究。E-mail: zhufei@zju.edu.cn

whether the bacteria were engulfed alive or heat-killed. Defensin and drosomycin were up-regulated in the HISA + PG treatment, but S2 cells could not digest HISA. Also, results confirmed that antiphagocytic properties were located on the surface of heat-inactivated *S. aureus* but not on that of heat-inactivated *E. coli*. Thus, cellular immunity is important for *Drosophila melanogaster* S2 cells fighting gram-positive bacteria, and the role of phagocytosis shed light on clearing of the bacterial pathogens. [Ch, 7 fig. 1 tab. 38 ref.]

Key words: immunobiology; phagocytosis; *Drosophila melanogaster*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; defensin; drosomycin

无论是脊椎动物还是无脊椎动物, 先天性免疫都是第一线防御机制, 对抗着各类病原体的侵染。吞噬作用作为一种高度保守进程的先天性免疫机制, 能够为许多细胞用来消化微生物病原体以及凋亡或坏死的细胞残骸^[1-3]。在吞噬作用中, 外来物质被细胞识别并结合到细胞表面, 被吞噬小体吞入, 并在被吞入的物质周围形成细胞器^[4]。吞噬小体经过裂变以及与核内体、溶酶体, 或是两者共同的限制性融合后形成成熟的吞噬溶酶体。进入吞噬溶酶体内部的病原体则被低 pH 值、水解作用以及自由基所消灭^[5]。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 是最常见的果蝇, 因拥有与哺乳动物相近的先天性免疫系统, 而被认为是研究宿主与微生物相互作用的最佳基因模式生物^[6-7]。近年来, 果蝇 Schneider 细胞株(S2)细胞已被确认是一种非常适合研究细胞感染的宿主模型, 在对抗衣原体 *Chlamydia*, 单胞增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes*, 查菲埃立克体 *Ehrlichia chaffeensis*, 白念珠菌 *Candida albicans*, 大肠埃希菌 *Escherichia coli* 以及金黄葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等病菌^[6,8-14]的体外感染过程中, S2 细胞与哺乳动物巨噬细胞的作用机制非常相近。金黄葡萄球菌是一种主要的人类病原体, 致病率显著, 研究显示金黄葡萄球菌可能是一种兼性胞内病原体^[15], 并认为金黄葡萄球菌可以在巨噬细胞中存活数日而不影响细胞的生存情况^[16]。笔者就果蝇 S2 细胞对热灭活大肠埃希菌(heat inactivated *Escherichia coli*, HIEC)及热灭活金黄葡萄球菌(heat inactivated *Staphylococcus aureus*, HISA)的吞噬模式展开研究, 揭示了在 S2 细胞对抗革兰氏阳性菌时, 吞噬作用在清除该类病原体时所起到的重要作用以及金黄葡萄球菌抑制消化过程从而抵御细胞吞噬的策略。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑腹果蝇 S2 细胞株从初代培养 24 h 的胚胎中分离获得, 在体积分数为 10% 的小牛血清的果蝇培养基(Ivitrogen, 美国)中 28 ℃培养^[17]。为了确认脂多糖(LPS, Sigma, 美国)或聚肽糖(PG, Sigma, 美国)的活化作用是否会增强吞噬作用, 将 S2 细胞以 10^6 个·孔⁻¹ 铺开在 6 孔板中并粘附 30 min, LPS 或 PG 经超声处理 1 h 后, 按 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的剂量加入到每个孔中孵育 1 h, 备用。

大肠埃希菌 ATCC 14948 菌株在 LURIA-BERTANI 培养基(LB)37 ℃培养 24 h 后, $10\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min 收集细菌。金黄葡萄球菌 ATCC 25923 菌株在含 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠的哥伦比亚培养基中培养过夜, 在盐溶液中重悬。热灭活大肠埃希菌(HIEC)或热灭活金黄葡萄球菌(HISA)以 5×10^9 个·L⁻¹ 的密度接种于 S2 细胞, 28 ℃孵育 1 h。不同时间段收集 S2 细胞分析。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备与透射电子显微镜(TEM)分析 收集感染后的果蝇 S2 细胞($5.0 \sim 10.0 \mu\text{L}$), 在含体积分数 2% 多聚甲醛与 2% 戊二醛的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲酸钠缓冲液(pH 7.4)固定剂中浸泡 16 h, 室温下不断旋转。以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二钾磷酸钠缓冲液清洗, 3 次·样品⁻¹, 5 min·次⁻¹, 保持室温下旋转。随后加入体积分数 2% 锇(Osmium), 并以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二钾磷酸钠缓冲液清洗 3 次, 5 min·次⁻¹, 保持室温下旋转。样品固定, $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸双氧铀缓冲液(pH 5.2)进行染色, 室温避光染色 1 h, 保持旋转, 随后以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二钾磷酸钠缓冲液清洗 3 次, 5 min·次⁻¹ 并不断旋转。通过逐级增加的丙酮溶液(体积分数依次为 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%)对样品进行脱水, 室温下旋转处理, 随后在 100% 环氧丙烯中毒处理 10 min。以 EMBED 812 或 502 树脂黏结剂进行最终的渗透处理, $V(\text{环氧丙烯}):V(\text{黏合剂})=1:1$, 室温旋转处理 10 min; $V(\text{环氧丙烯}):V(\text{黏合剂})=1:2$, 室温旋转处理 20 min; 100% 黏合剂处理

10 min。最终，样品中加入新的 100% 黏合剂，渗透 16 h 后，在干燥烘箱中以 60 ℃聚合 24 ~ 48 h。Hitachi 7650 透射电镜(Hitachi, 日本)在 70 kV 下采集图像^[10]。

1.2.2 激光共聚焦显微镜分析 果蝇 S2 细胞用体积分数 10%胎牛血清(FBS)的施耐德培养基 12 孔板中铺板培养，并将密度为 5×10^9 个 $\cdot\text{L}^{-1}$ 异硫氰酸荧光素标记(FITC, Invitrogen, 美国)的热灭活大肠埃希菌(HIEC)/热灭活金黄葡萄球菌(HISA)，加入到 S2 细胞中 28 ℃共培养 1 h。以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后，将混合细胞移植到多聚赖氨酸预处理的载玻片(Sigma, 美国)上固定。之后，分别使用罗丹明鬼笔环肽(Invitrogen, 美国)和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, Sigma, 美国)一同孵育，用以标记肌动蛋白或细胞核 DNA^[18]。

1.2.3 流式细胞仪检测分析 细胞培养与处理见 1.2.2 节。果蝇 S2 细胞接种细菌后，以 PBS 清洗，将混合细胞收集到流式管中，通过流式细胞仪检测 S2 细胞内的 FITC 荧光信号，统计 S2 细胞对 HIEC 和 HISA 的吞噬能力。为了研究细胞的吞噬作用对活细菌和热灭活细菌的敏感度，以胞内有 1 个以上 FITC 标记细菌的细胞在所有细胞中所占的百分比为参考值来予以评价。

1.2.4 细胞酸性指示剂(pHrodo)标签检测溶酶体酸化 在果蝇 S2 细胞(培养方法见 1.2.2 节)中加入 LPS 或 PG，孵育 S2 细胞 1 h，从而激活 S2 细胞；激活后的 S2 细胞以 1×10^9 个 $\cdot\text{L}^{-1}$ 在 6 孔板中铺开，分别接种 pHrodo 标记的灭活病原菌(5×10^9 个 $\cdot\text{L}^{-1}$)，28 ℃共孵育 1 h。收集混合细胞，立刻在共聚焦显微镜下观察。分别统计不同处理组中，吞入 pHrodo 标记病原菌的 S2 细胞在全部细胞中所占百分比^[18]。不同处理组间的差异以 *t* 检验进行统计学分析，*P*<0.05 为显著。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 果蝇 S2 细胞经过不同实验处理后，以 PBS 清洗，收集细胞，使用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)提取总 RNA，操作步骤依据产品使用说明书^[18]。即刻使用 5.0 μg 总核糖核酸，以 M-MLV 反转录酶(Takara, 日本)合成为 20.0 μL cDNA。实时荧光定量的检测采用基因特异引物与 *TaqMan* 探针(表 1)，反应体系包括 10.0 μL Premix Ex *Taq*(Takara, 日本)，1.0 μL cDNA 样品，7.2 μL 无酶水，各基因对应 *TaqMan* 探针 0.3 μL，以及各特异性引物 0.4 μL。聚合酶链式反应(PCR)程序如下：95 ℃，30 s；90 ℃，5 s，60 ℃，30 s，循环 50 次。数据分析使用 iQTM5 软件。

1.2.6 统计学分析 本研究中每组试验均使用 3 个生物学重复。统计学显著性分析使用 *t* 检验，判断对照组与实验组的差异性，*P*<0.05 为显著，*P*<0.01 为极显著。

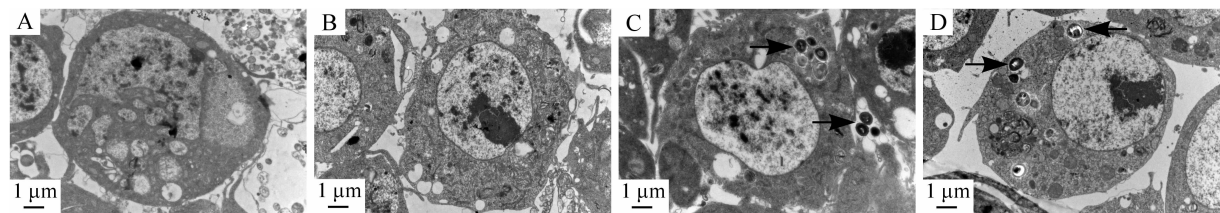
表 1 实时荧光定量 PCR 反应中引物与 *TaqMan* 探针序列
Table 1 Primers and *TaqMan* probe sequences in qRT-PCR

寡核苷酸探针	引物与探针序列	寡核苷酸探针	引物与探针序列
Rp49-F	5'-CCGCTTCAAGGGACAGTATCTG-3'	Def-F	5'-CCACATGCGACCTACTCTCCA-3'
Rp49-R	5'-CACGTTGTGCACCAGGAAC TT-3'	Def-R	5'-AGCCGCCTTTGAACCCCT-3'
Rp49-探针	FAM-GGCAGCATGTGGCGG GTGCGCTT-Eclipse	Def-探针	FAM-ACCACACCGCCTGCGCCG-Eclipse
Rel-F	5'-GCCAGAAAAACCGTGACTC-3'	Drs-F	5'-CTGGTGCTCCTGGGAGCC-3'
Rel-R	5'-AGGTACTTCCCGATGTTTCG-3'	Drs-R	5'-AGCGTCCCTCCTCCTTGC-3'
Rel-探针	FAM-CGACGTGGCCGCCGAGA-Eclipse	Drs-探针	FAM-CCGATGCCGACTGCCTGTCC-Eclipse

2 结果与分析

2.1 透射电镜观察黑腹果蝇 S2 细胞对 HIEC 或 HISA 的吞噬作用

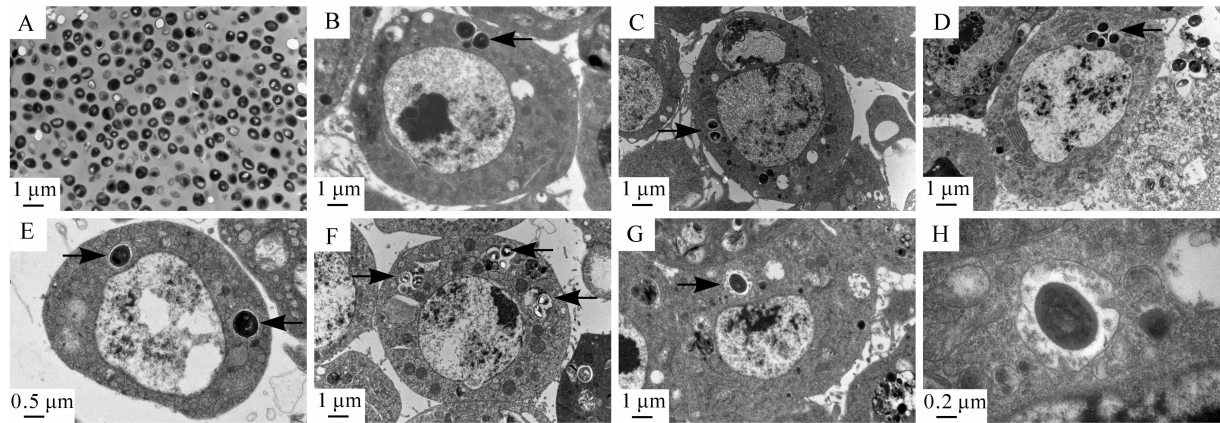
透射电镜下观察黑腹果蝇 S2 细胞对灭活大肠杆菌(HIEC)或灭活金黄葡萄球菌(HISA)的吞噬过程，发现孵育 1 h 后 S2 细胞即可顺利吞噬 HIEC(图 1A)，孵育后第 1 天 S2 细胞内 HIEC 已消失(图 1B)；但共孵育 1 h 后 S2 细胞未能吞噬 HISA(图 1C)，HISA(图 2A)与 S2 细胞共孵育 4 d，仍保持形态完整(图 1D，图 2B，图 2C，图 2D，图 2E)。在 PG 或 LPS 激活后，S2 细胞也不能有效地吞噬 HISA(图 2F，图 2G，图 2H)。与健康的 S2 细胞相比，在接种后第 4 天，S2 细胞吞入的 HISA 依然形态完整(图 2E，图 2F，图 2G，图 2H)；吞入 HISA 的 S2 细胞没有出现凋亡或破裂，表明细胞内的 HISA 并没有对 S2 细胞造成明显的损伤。



A. S2 细胞吞噬 HIEC(孵育后 1 h); B. S2 细胞吞噬 HIEC(孵育后 1 d); C. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 1 h); D. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 1 d)。箭头指示胞内的 HISA。

图 1 透射电镜观察黑腹果蝇 S2 细胞对 HIEC 或 HISA 的吞噬作用

Figure 1 Transmission electron microscopy of phagocytosis of HIEC or HISA by S2 cells



A. HISA; B. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 1 d); C. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 2 d); D. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 3 d); E. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 4 d); F. LPS 激活 S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 4 d); G. PG 激活 S2 细胞吞噬 HISA; H. PG 激活 S2 细胞(孵育后 4 d), 胞内 HISA 被内化。箭头指示胞内的 HISA。

图 2 透射电镜观察黑腹果蝇 S2 细胞对 HISA 的吞噬作用

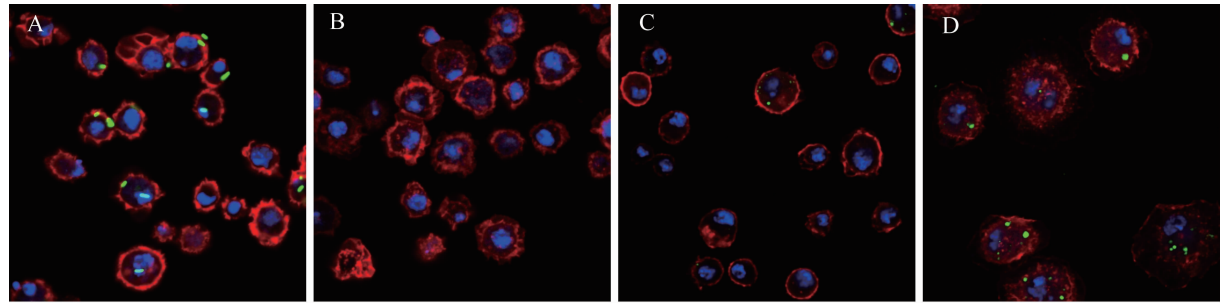
Figure 2 Transmission electron microscopy of phagocytosis of HISA by S2 cells

2.2 激光共聚焦显微观察黑腹果蝇 S2 细胞对 HIEC 或 HISA 的吞噬作用

激光共聚焦显微观察发现, 在 S2 细胞吞噬热灭活大肠杆菌 HIEC 1 h 后, 胞内可观察到 HIEC 发出的绿色荧光(图 3A); 吞噬发生 1 d 后, S2 细胞内观察不到绿色荧光粒子(图 3B); 表明 HIEC 已经被 S2 细胞清除。同样处理下, 热灭活金黄色葡萄球菌 HISA 没有被 S2 细胞清除。由图 3C 和图 3D 可知, HISA 被吞噬后, 被 S2 细胞内化到细胞内继续存在。由此可知, 在 S2 细胞接种灭活菌后, HIEC 与 HISA 均被 S2 细胞吞入, 但 HIEC 被 S2 细胞清除, 而 HISA 则没有被清除。

2.3 流式细胞仪检测 S2 细胞对 HIEC 或 HISA 的吞噬作用

流式细胞仪的检测结果显示由图 4 可知: 接种 1 h 后, 吞入了至少 1 个 HIEC 粒子的 S2 细胞在所有 S2



A. S2 细胞吞噬 HIEC(孵育后 1 h); B. S2 细胞吞噬 HIEC(孵育后 1 d); C. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 1 h); D. S2 细胞吞噬 HISA(孵育后 1 d)。绿色荧光表示胞内灭活菌(HIEC 或 HISA), 蓝色荧光表示细胞核, 红色荧光表示肌动蛋白。 $\times 100$ 。

图 3 激光共聚焦显微镜观察黑腹果蝇 S2 细胞对 FITC 标记的 HIEC 或 HISA 的吞噬作用

Figure 3 Confocal microscopy of phagocytosis of FITC-labeled HIEC or HISA by S2 cells

细胞中所占的比例接近 40%，与 S2 细胞吞噬大肠埃希菌的结果相近；吞入至少 1 个 HISA 粒子的 S2 细胞在所有 S2 细胞中所占的比例接近 25%，与 S2 细胞吞噬金黄葡萄球菌的结果相近。说明 S2 细胞吞入活细菌和热灭活细菌的敏感度并没有显著差异。

2.4 吞噬溶酶体酸化观察和吞噬率检测结果

细胞内的酸性环境可诱导 pHrodo 标记的病原菌激发出红色荧光，从而指示吞噬溶酶体的形成。激光共聚焦显微镜观察发现，接种 HIEC 1 h 后，S2 细胞内可观察到红色荧光，表明 S2 细胞对 HIEC 的消化程序被激活，细胞内形成了酸性环境(图 5A)；图 5B 中未能观察到红色荧光，表明 HISA 未能激活 S2 细胞的酸化过程。使用 LPS 或 PG 激活 S2 细胞，再进行接种观察，可发现在接种 HISA 1 h 后，未能观察到红色荧光，说明 S2 细胞的酸化过程仍未被激活。

为揭示 LPS 或 PG 的刺激对 S2 细胞吞噬活性的影响，用共聚焦显微镜观察 S2 细胞吞噬 pHrodo 标记菌并统计吞噬率。结果表明：共孵育 1 h 后，只有接种 HIEC 的 S2 细胞内呈现酸性环境，其他的处理均不能诱导 S2 细胞酸化(图 6)。检测吞噬百分比发现，只有 HIEC 处理组的吞噬率显著高于对照组($P<0.01$)。使用 LPS 或 PG 激活 S2 细胞后再接种，S2 细胞对 HISA 的吞噬率仍没有显著增加。这表明溶酶体酸化过程只发生在 S2 细胞吞噬 HIEC 的过程中，而 LPS 或 PG 刺激并不能诱导 S2 细胞吞噬 HISA 后的酸化过程(图6)。

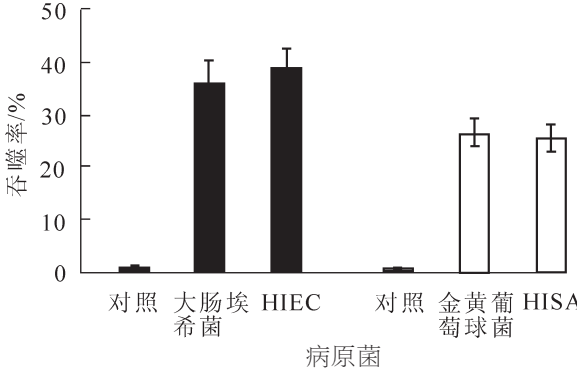
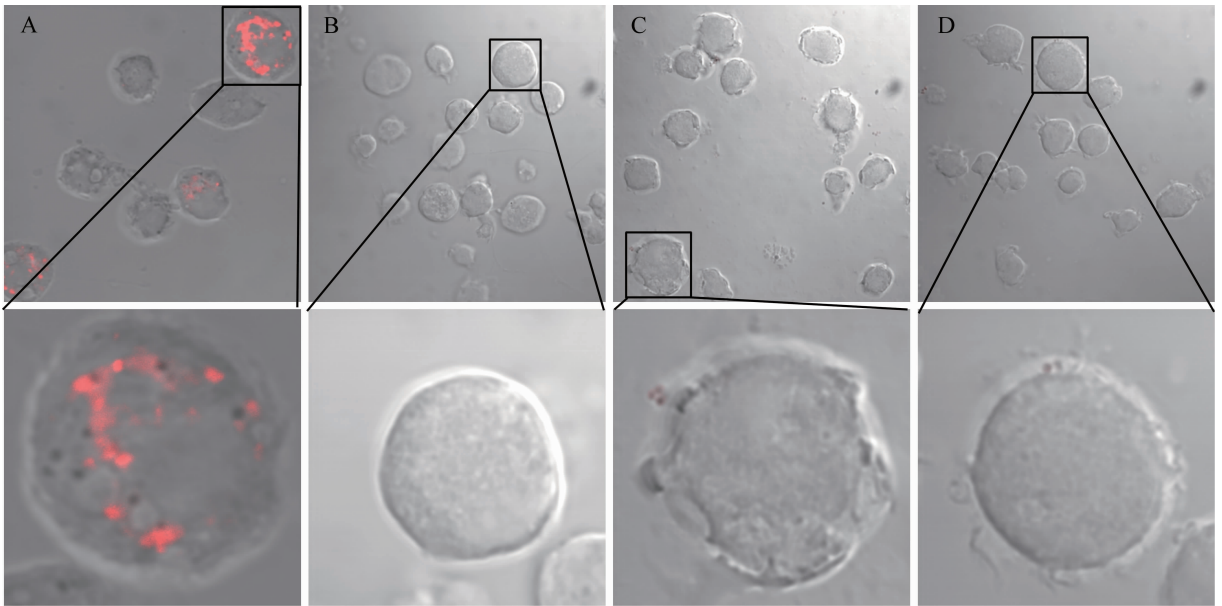


图 4 孵育 1 h 后黑腹果蝇 S2 细胞对 FITC 标记的病原菌的吞噬率

Figure 4 Quantification of phagocytosis of FITC-labeled microbes by S2 cells at 1 h post-inoculation



A.S2细胞吞噬pHrodo标记的HIEC；B.S2细胞吞噬pHrodo标记的HISA；C.LPS激活S2细胞吞噬pHrodo标记的HISA；D.PG激活S2细胞吞噬pHrodo标记的HISA。上：×100；下：×400。

图 5 激光共聚焦显微观察孵育 1 h 后黑腹果蝇 S2 细胞对 pHrodo 标记的 HIEC 及 HISA 的吞噬作用

Figure 5 Confocal microscopy of phagocytosis of pHrodo-labeled HIEC or HISA by S2 cells at 1 h post-inoculation

2.5 实时荧光定量 PCR 检测基因表达

实时荧光定量 PCR 反应中引物与 TaqMan 探针序列如表 1 所示。通过实时荧光定量 PCR 检测不同处理条件下 S2 细胞内的防御素(defensin)，抗真菌肽(drosomycin)和 Relish 的表达量变化。结果发现：防御素的表达量在 HISA，HISA+LPS 和 HISA+PG 等 3 个处理组中，均发生显著上调($P<0.01$)；抗真菌肽的表达量仅在 HISA+PG 处理组中发生显著上调($P<0.01$)(图 7)；Relish 的表达量在 HIEC 处理组中发

生显著上调($P<0.01$),但在 HISA 处理组中无显著变化。

3 讨论与结论

吞噬作用是动物对抗微生物病原体的一种重要免疫防御机制,由吞噬细胞来执行具体的功能^[19-20]。本研究对黑腹果蝇 S2 细胞吞噬热灭活大肠埃希菌(HIEC)和金黄色葡萄球菌(HISA)的异同进行了研究。结果表明:S2 细胞能够在接种后 1 d 有效吞噬并清除 HIEC,但却无法清除 HISA;即使到了接种后 4 d, S2 细胞仍不能有效地清除 HISA,而是任由它存在于细胞内。经 PG 或 LPS 诱导激活的 S2 细胞同样不能有效地清除 HISA。与健康的 S2 细胞相比,存在于细胞内的 HISA 在接种 4 d 后并没有明显破坏 S2 细胞。许多研究证明在细胞培养模式下,金黄色葡萄球菌能够逃逸宿主细胞的免疫系统,具有隐藏的潜能^[21],可在胞内坚持存活一段时间^[22-23]。在本研究中,热灭活金黄色葡萄球菌存在于 S2 细胞中达 4 d 以上,说明灭活后的金黄色葡萄球菌仍存在抗吞噬的成分,这与金黄色葡萄球菌存在多个抗吞噬因子有关^[24-26]。统计细胞吞噬率发现,热灭活并不会影响吞噬作用对灭活细菌的敏感性,这一点已被另一项研究所证实^[11]。

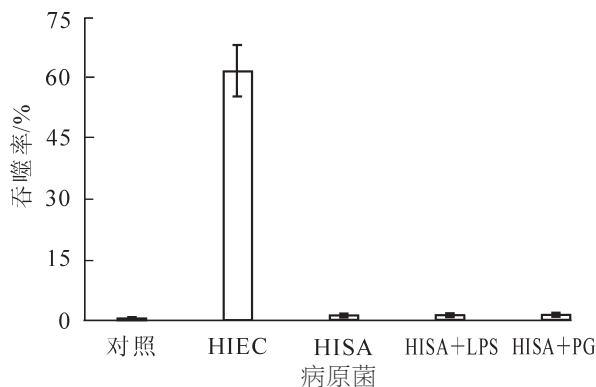


图 6 共孵育 1 h 后 S2 细胞对 pHrodo 标记的 HIEC 及 HISA 的吞噬率

Figure 6 Phagocytic percentages of the pHrodo-labeled HIEC or HISA

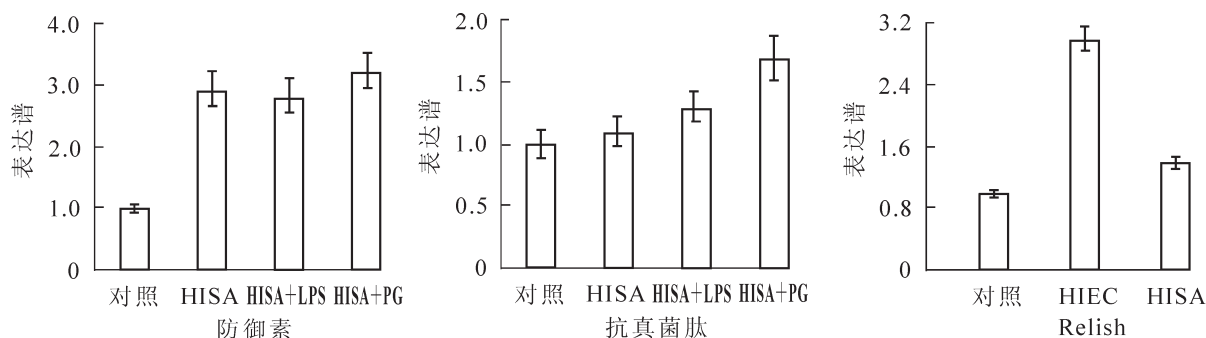


图 7 黑腹果蝇 S2 细胞吞噬 HISA 作用中防御素, 抗真菌肽及 Relish 的表达谱

Figure 7 Expression profiles of drosomycin, defensin and relish in phagocytosis of HISA

在消化进程中,吞噬溶酶体的 pH 值降低,细胞内环境酸化,可帮助吞噬作用的进行,并能够通过 pHrodo 染料的使用进行检测^[27]。LPS 是革兰氏阴性菌的主要的细胞膜成分,可以通过 Imd (immune deficiency) 免疫信号通路激活巨噬细胞; PG 是革兰氏阳性菌细胞壁上的主要成分,可以通过 Toll 信号通路激活巨噬细胞。使用 LPS 或 PG 刺激接种 HISA 的 S2 细胞,细胞并未形成酸化环境。通过透射电镜与激光共聚焦显微镜的观察,明确了即使 S2 细胞经过 LPS 或 PG 的激活也不能有效地吞噬 HISA 的结果;检测 S2 细胞对 pHrodo 标记的病原菌的吞噬百分比也表明,吞噬溶酶体的酸化只发生在 S2 细胞对 HIEC 的吞噬过程中,其他处理并不能引起 S2 细胞的酸化。

黑腹果蝇 S2 细胞的吞噬作用中包括了 Toll 与 Imd 等 2 条信号通路,其中 Toll 通路参与到抗革兰氏阳性菌的免疫作用中,该免疫应答机制中包含 *Defensin* 基因^[28-29]的表达,而已知的防御素 (defensin) 是一类由小肽甘氨酸富集而成,可被诱导的抗微生物肽,有利于宿主对真菌的防御应答^[30]; *Drosomycin* 基因表达的 Drosomycin 是一类可诱导的抗真菌肽,同样由 Toll 通路调节,并在全身脂肪体中均有表达^[31-32]。观察发现防御素的表达量在 HISA, HISA+LPS 以及 HISA+PG 处理中,均发生显著上调;抗真菌肽的表达量在 HISA+PG 处理中显著上调;由此可以推断, Toll 通路在 HISA+PG 的刺激下被激活。但是也看到 PG 虽然能激活 S2 细胞的 Toll 通路,但却无法有效清除 HISA,同样,胞内的 HISA 也不会诱导 S2 细胞

凋亡。由此可知, 金黄葡萄球菌作为一种人类病原体, 对黑腹果蝇来说也是高致病的病原, 与其他革兰氏阳性菌相比, 它表现出了更强的对防御素的抵御能力^[36]。在黑腹果蝇中, Imd 通路调节着对革兰氏阴性菌的免疫应答, Relish 作为 NF- κ B 通路的转录因子, 是 Imd 通路的终极目标^[28]。本研究结果发现: Relish 在 HIEC 处理中显著上调($P < 0.01$), 说明 Imd 通路在 HIEC 处理中被激活, 而激活的 Imd 通路最终诱导 S2 细胞吞噬 HIEC, 说明 Relish 的表达量与 S2 细胞吞噬 HIEC 的百分率呈正相关。

有研究表明: 金黄葡萄球菌能够迅速地逃避溶酶体/吞噬体的捕获, 在细胞液泡内存活可长达 4 d, 之后逃入细胞质中^[16, 37-38]。有趣的是, 我们发现灭活金黄葡萄球菌同样能够在 S2 细胞内存活 4 d, 其细胞表面物质具有抗吞噬消化的活性。该结果同时暗示着无脊椎动物吞噬细胞对清除部分革兰氏阴性及革兰氏阳性菌均有所帮助, 但细胞免疫对这些胞内细菌的清除效力胜于体液免疫。

4 参考文献

- [1] RAVICHANDRAN K S, LORENZ U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, **7**(12): 964 – 974.
- [2] FLANNAGAN R S, COSIO G, GRINSTEIN S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(5): 355 – 366.
- [3] NIZET V. Bacteria and phagocytes: mortal enemies [J]. *J Innate Immun*, 2010, **2**(6): 505 – 507.
- [4] STUART L M, EZEKOWITZ R A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, **8**(2): 131 – 141.
- [5] KINCHEN J M, RAVICHANDRAN K S. Phagosome maturation: going through the acid test [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, **9**(10): 781 – 795.
- [6] ELWELL C, ENGEL J N. *Drosophila melanogaster* S2 cells: a model system to study *Chlamydia* interaction with host cells [J]. *Cell Microbiol*, 2005, **7**(5): 725 – 739.
- [7] CHERRY S. Genomic RNAi screening in *Drosophila* S2 cells: what have we learned about host-pathogen interactions? [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, **11**(3): 262 – 270.
- [8] CHENG L W, PORTNOY D A. *Drosophila* S2 cells: an alternative infection model for *Listeria monocytogenes* [J]. *Cell Microbiol*, 2003, **5**(12): 875 – 885.
- [9] CHENG L W, VIALA J P M, STUURMAN N, *et al.* Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling compartmentalization of an intracellular pathogen [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, **102**(38): 13646 – 13651.
- [10] LUCE-FEDROW A, von OHLEN T, BOYLE D, *et al.* Use of *Drosophila* S2 cells as a model for studying *Ehrlichia chaffeensis* infections [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(6): 1886 – 1891.
- [11] STROSCHEIN-STEVENSON S L, FOLEY E, O'FARRELL P H, *et al.* Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans* [J]. *PLoS Biol*, 2006, **4**(1): e4. doi:10.1371/journal.pbio.0040004.
- [12] LOHSE M B, JOHNSON A D. Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and mouse phagocytes [J]. *PLoS One*, 2008, **3**(1): e1473. doi: 10.1371/journal.pone.0001473.
- [13] GARVER L S, WU Junlin, WU L P. The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(3): 660 – 665.
- [14] HASHIMOTO Y, TABUCHI Y, SAKURAI K, *et al.* Identification of lipoteichoic acid as a ligand for draper in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes [J]. *J Immunol*, 2009, **183**(11): 7451 – 7460.
- [15] SENDI P, PROCTOR R A. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants [J]. *Trends Microbiol*, 2009, **17**(2): 54 – 58.
- [16] KUBICA M, GUZIK K, KOZIEL J, *et al.* A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages [J]. *PLoS One*, 2008, **3**(1): e1409. doi: 10.1371/journal.pone.0001409.
- [17] NEEDHAM A J, KIBART M, CROSSLEY H, *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection [J]. *Microbiol*, 2004, **150**(7): 2347 – 2355.
- [18] ZHU Fei, ZHANG Xiaobo. The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in

- Drosophila* [J]. *Sci Rep*, 2013, **3**(6): 2069 – 2078.
- [19] HOFFMANN J A, REICHHART J M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective [J]. *Nat Immunol*, 2002, **3**(2): 121 – 126.
- [20] HOFFMANN J A. The immune response of *Drosophila* [J]. *Nature*, 2003, **426**(6962): 33 – 38.
- [21] LOWY F D. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? [J]. *Trends Microbiol*, 2000, **8**(8): 341 – 343.
- [22] GARZONI C, KELLEY W L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence [J]. *Trends Microbiol*, 2009, **17**(2): 59 – 65.
- [23] CLEMENT S, VAUDAUX P, FRANCOIS P, *et al.* Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis [J]. *J Infect Dis*, 2005, **192**(6): 1023 – 1028.
- [24] MERINO N, TOLEDO-ARANA A, VERGARA-IRIGARAY M, *et al.* Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus* [J]. *J Bacteriol*, 2009, **191**(3): 832 – 843.
- [25] THURLOW L R, HANKE M L, FRITZ T, *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo [J]. *J Immunol*, 2011, **186**(11): 6585 – 6596.
- [26] HIGGINS J, LOUGHMAN A, van KESSEL K P, *et al.* Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **258**(2): 290 – 296.
- [27] BERGER S B, ROMERO X, MA Chunyan, *et al.* SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2010, **11**(10): 920 – 927.
- [28] de GREGORIO E, SPELLMAN P T, TZOU P, *et al.* The *Toll* and *Imd* pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila* [J]. *EMBO J*, 2002, **21**(11): 2568 – 2579.
- [29] RUTSCHMANN S, KILINC A, FERRANDON D. Cutting edge: the *Toll* pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila* [J]. *J Immunol*, 2002, **168**(4): 1542 – 1546.
- [30] DIMARCQ J L, HOFFMANN D, MEISTER M, *et al.* Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin [J]. *Eur J Biochem*, 1994, **221**(1): 201 – 209.
- [31] COHEN L, MORAN Y, SHARON A, *et al.* Drosomycin, an innate immunity peptide of *Drosophila melanogaster*, interacts with the fly voltage-gated sodium channel [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(35): 23558 – 23563.
- [32] ZHANG Z T, ZHU S Y. Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila* [J]. *Insect Mol Biol*, 2009, **18**(5): 549 – 556.
- [33] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults [J]. *Cell*, 1996, **86**: 973 – 983.
- [34] RUTSCHMANN S, JUNG A C, HETRU C, *et al.* The Rel protein DIF mediates the antifungal, but not the antibacterial, response in *Drosophila* [J]. *Immunity*, 2000, **12**(5): 569 – 580.
- [35] MENG Xiangjun, KHANUJA B S, IP Y T. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor [J]. *Genes Dev*, 1999, **13**(7): 792 – 797.
- [36] TZOU P, REICHHART J M, LEMAITRE B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2002, **99**(4): 2152 – 2157.
- [37] BAYLES K W, WESSON C A, LIOU L E, *et al.* Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 1998, **66**(1): 336 – 342.
- [38] GIESE B, GLOWINSKI F, PAPROTKA K, *et al.* Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin [J]. *Cell Microbiol*, 2011, **13**(2): 316 – 329.