



中国免疫学杂志
Chinese Journal of Immunology
ISSN 1000-484X, CN 22-1126/R

《中国免疫学杂志》网络首发论文

题目：铜绿假单胞菌群体感应代谢产物通过细胞表面脂质结构域溶解诱导宿主淋巴细胞死亡的机制

作者：祝司霞

网络首发日期：2020-08-17

引用格式：祝司霞. 铜绿假单胞菌群体感应代谢产物通过细胞表面脂质结构域溶解诱导宿主淋巴细胞死亡的机制. 中国免疫学杂志.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20200817.1052.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

铜绿假单胞菌群体感应代谢产物通过细胞表面脂质结构域溶解诱导宿主淋巴细胞死亡的机制

祝司霞（攀枝花学院医学院基础医学教研室，攀枝花 617000）

中图分类号：R512.91

文献标识码：A

【摘要】目的：探讨铜绿假单胞菌群体感应代谢产物通过细胞表面脂质结构域溶解诱导宿主淋巴细胞死亡的机制。**方法：**将 C57BL/6 野生型小鼠饲养在特定的无病原体（SPF）条件下并进行饲养。在 8 至 10 周龄时，铜绿假单胞菌感染，进行 3oc 治疗。通过用 AnnexinV / PI 凋亡检测法检测 T 细胞凋亡。免疫共沉淀和蛋白质印迹检测凋亡相关蛋白活性。通过 RT-qPCR 检测 IL-1mRNA 和 IL-6 mRNA 表达。将 H9 细胞与 500 μ m 3oc HSL 或 3-oxo-C8HSL 或 3-oxo-C10 HSL 孵育 5 或 10min，检测铜绿假单胞菌通过 3oc 诱导溶解诱导宿主淋巴细胞。**结果：**随着 3oc 浓度的增加，T 细胞活细胞降低（ $P<0.05$ ）。与对照组相比，3oc 处理的 CD4 T 细胞中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性降低，Cld caspase-3 和 Cld caspase-9 蛋白活性增加（ $P<0.05$ ），3oc 浓度和 caspase-3 和 caspase-9 表达负相关，3oc 浓度和 Cld caspase-3 和 Cld caspase-9 表达正相关。随着 3oc 浓度的增加，caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性降低，Cld caspase-3 和 Cld caspase-9 蛋白活性增加（ $P<0.05$ ）。与对照组相比，3oc 处理的 IL-1 和 IL-6 mRNA 表达增加，随着 3oc 浓度的增加，IL-1 和 IL-6 mRNA 表达增加（ $P<0.05$ ）。lasI 缺陷和 lasR 缺陷都会导致细胞数量减少（ $P<0.05$ ）。来自突变体感染小鼠的肺部提取物显示铜绿假单胞菌菌落形成单位减少（ $P<0.05$ ）。**结论：**绿假单胞菌使用 3oc 通过直接触发宿主自身的 TNFR1 信号来解除免疫。

【关键词】铜绿假单胞菌；群体感应；代谢产物；脂质结构域；淋巴细胞

【中图分类号】 R512.91

【文献标识码】 A

Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing metabolites inducing host lymphocyte death through lysis of cell surface lipid domains

ZHU Si-Xia (Department of Basic Medicine, Medical College of Panzhihua University, Panzhihua 617000, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of host lymphocyte death induced by colony-induced metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* dissolved in lipid domain on cell surface. **Methods:** C57BL / 6 wild-type mice were raised under specific pathogen free (SPF) conditions. At the age of 8 to 10 weeks, *Pseudomonas aeruginosa* was infected and treated with 3oc. Apoptosis of T cells was detected by annexin V / PI method. The activity of apoptosis related proteins was detected by immunoprecipitation and Western blotting. The expression of IL-1 mRNA and IL-6 mRNA was detected by RT-qPCR. H9 cells were incubated with 500 μ m 3oc HSL or 3-oxo-c8hsl or 3-oxo-c10 HSL for 5 or 10 min, and the host lymphocytes were induced to dissolve by 3 OC. **Results:** With the increase of 3oc concentration, the living T cells decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the activity of Caspase-3 and caspase-9 in CD4 T cells treated with 3oc decreased, the activity of CLD caspase-3 and CLD caspase-9 increased ($P<0.05$), the concentration of 3oc was negatively correlated with the expression of Caspase-3 and caspase-9, and the concentration of 3oc was positively correlated with the expression of CLD caspase-3 and CLD caspase-9. With the increase of 3oc concentration, caspase-3 and caspase-3 protein activity decreased, CLD caspase-3 and CLD caspase-9 protein activity increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of IL-1 and IL-6 mRNA in 3oc treatment increased. With the increase of 3oc concentration, the expression of IL-1 and IL-6 mRNA increased ($P<0.05$). Both Lasi and lasr defects resulted in the decrease of cell number ($P<0.05$). Lung extracts from mice infected with the mutant showed a decrease in colony forming units of *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0.05$). **Conclusion:** *Pseudomonas aeruginosa* uses 3oc to de-immunize by directly triggering the host's own TNFR1 signal.

【Keywords】 *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing; metabolites; lipid domains; lymphocytes

0 摘要

群体感应是原核生物中基于化学物质的交流机制^[1]。在基本模式下, 社区中

其他成员的胞内受体可以感应出某些个体释放的自体诱导剂,从而导致集体的等基因自体诱导剂合成和同步活动^[2]。该法规对于与宿主共生,毒力和社区生物膜形成很重要^[3]。铜绿假单胞菌是急性医院感染的最常见病原体之一,特别是影响免疫功能低下的个人或重症监护病房的患者^[4]。铜绿假单胞菌引起的感染包括呼吸机相关性肺炎,烧伤创面和手术部位感染以及尿路感染与很高的死亡率(即>30%)相关^[5]。此外,铜绿假单胞菌可引起患有囊性纤维化,慢性阻塞性肺病或支气管扩张的患者的慢性呼吸道感染^[6]。在铜绿假单胞菌中,有两个群体感应电路: LasR–LasI 和 RhIR–RhII^[7]。前者使用 N-(3-氧代十二烷基)高丝氨酸内酯(3OC12 HSL 或 3oc)作为自动诱导剂,后者使用 C4(丁酰基)HSL^[8]。3oc 是研究最多的群体感应自动诱导剂,在哺乳动物宿主中具有广泛的影响^[9]。已知 3oc 和类似酰基链长度的类似物会与模型和活细胞双层膜相互作用^[10]。在高浓度下,3oc 会破坏质膜的偶极电位,这可能会影响受体配体的结合^[11]。然而,在低至 5 μ mol/L 的浓度下,特别是对 T 淋巴细胞,嗜中性粒细胞和巨噬细胞的调节活性是明显的,这暗示着膜中更细微的变化足以实现所报道的作用^[12]。本文针对铜绿假单胞菌群体感应代谢产物通过细胞表面脂质结构域溶解诱导宿主淋巴细胞死亡的机制进行研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 实验小鼠

将 C57BL / 6 野生型小鼠饲养在无特定病原体 (SPF) 条件下并进行饲养。在 8 至 10 周龄时,铜绿假单胞菌感染,进行 3oc 治疗。简而言之,将小鼠转移到无菌笼中,在铜绿假单胞菌感染前三天用无菌水代替 3oc 治疗,而在另一组中,3oc 治疗一直持续到实验结束。性别和年龄相匹配的常规定植小鼠作为未经 3oc 治疗的对照组。

1.1.2 医学伦理学问题

所有实验程序均经动物保护和使用委员会批准的方案下进行,并根据实验动物护理和使用指南进行实验。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌菌株

MDR 铜绿假单胞菌分离株最初是由一名医院内肺炎患者的呼吸道材料培养而成。在感染之前,将铜绿假单胞菌在 37℃ 的有氧气氛中的 cetrimid 琼脂(Oxoid)上生长 24 h。

1.2.2 用 AnnexinV / PI 凋亡检测法检测细胞凋亡

用 HSL 刺激细胞或不对其进行处理。6 小时后,收集细胞并在室温下用膜联蛋白 V-FITC 和 PI 染色 15 分钟,通过流式细胞术测量其凋亡作用。在铜绿假单胞菌共培养试验中,从 C57BL / 6 小鼠中分离出骨髓淋巴细胞,并与 WT, 缺少 *lasI* 或缺少 *lasR* 的铜绿假单胞菌培养物的上清液一起孵育 6h。在明亮的显微镜下计数淋巴细胞的数目。

1.2.3 免疫共沉淀和蛋白质印迹

对于免疫沉淀,将 4 μ g 山羊抗小鼠抗体与 100 μ l 蛋白 A / G 琼脂糖在室温下孵育 2 小时。用 HSL 估计脾细胞(每毫升 300 万)或不进行治疗。收集细胞并用免疫沉淀裂解缓冲液(50mmol/L HEPES, pH 7., 150mmol/L NaCl, 1%NP-, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L 苯基甲基磺酰氟, 1mmol/L NaF, 1mmol/L NaVO₃ 和蛋白酶抑制剂混合物裂解)。将细胞裂解液在 4℃ 下加入抗体-珠子混合物中 3 小时。通过低速离心(1,000g, 5min)收集珠子,并用免疫沉淀裂解缓冲液(添加 300mmol/L NaCl)洗涤四次。最后一次洗涤后,将沉淀物用 70 μ l 2x SDS 上样缓冲液悬浮并煮沸 5 分钟。用兔抗 Caspase-3 和兔抗 Caspase-9 抗体(D35G2)检测 Caspase-3 和 Caspase-9。用 HSL 处理 THP-1 细胞(每毫升 300 万个)或不对其进行处理。对于交联测定,用 HSL 刺激或不处理从 C57BL / 6 小鼠脾脏或人 THP-1 细胞分离的 CD4 + T 细胞,收集细胞,并在室温下用 10mmol/L DTSSP 交联 30 分钟,并用 1M Tris-HCl 淬灭(pH 7.5)15 分钟。用来自 Bytotime Biotechnology 的 RIPA 缓冲液(50mmol/L Tris (pH 7.4), 150mmol/L NaCl, 1% Triton X-100、1%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L 苯甲基磺酰氟, 1mmol/L NaF, 1mmol/L NaVO₃ 和蛋白酶抑制剂混合物)并与非还原 SDS 上样缓冲液混

合。如前所述分离脂筏。简而言之，将 THP-1 细胞在 MN 缓冲液（25mmol/L 2-(Nmorpholino) 乙磺酸和 150mmol/L NaCl, pH 6.5）中的 1ml 1% Triton X-100 中于冰上溶解 20 分钟。将细胞裂解液用松散的 dounce 匀浆器匀浆（10 次），在 4℃ 下以 500g 离心 7 分钟。将核后上清液首先在 7,000g 下离心 12min，在 100,000g 下于 4℃ 离心 50 分钟。称为 DIG 分数。将所有样品与 3× SDS 上样缓冲液混合并煮沸 5 分钟，然后进行蛋白质印迹分析。

1.2.4 逆转录定量 PCR (RT-qPCR)

使用 miRVana miRNA 分离试剂盒从各组提取总 RNA，并使用 TRIzol 试剂分离 RNA。使用 miScript 逆转录试剂盒（Qiagen）在以下反应条件下进行 RT 反应：在 42℃ 孵育 60 分钟，在 85℃ 孵育 5 分钟。使用 SYBR green I Master Mix 试剂盒（因维创；赛默飞世尔科技有限公司）使用 7300 Real-Time PCR System（应用生物系统公司）在以下反应条件下进行实时 PCR：变性在 95℃ 下持续 3 分钟和 45 个 PCR 周期（95℃ 持续 15 秒，60℃ 持续 20 秒）。使用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 方法确定 IL-1 和 IL-6 的相对表达， β -actin 用作 mRNA 的内部对照。用于反应的引物序列如下：（表 1）

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primer sequence		
Gene	Upstream primer	Downstream primer
<i>IL-1</i>	CCCGTAGCATAGACCACTGATA	GCTGCGCTCCTCTAAGAAGGG
<i>IL-6</i>	GCTATATAGCCGCGTTATATAAA	AGCTCGTAGATAACCCCGGTA
<i>β-actin</i>	CGTCGTAGAGTCGCGCTAAAA	AATATTAGCGCGTACTCTCTAGA

1.3 统计分析

所有统计分析均使用 SPSS 17.0 软件和 Graph Pad Prism 进行。这些实验至少独立进行三次。学生 t 检验或单因素方差分析用于分析不同组之间的平均值。通过 χ 检验或 Fisher 精确检验计算 Ftx 表达和临床病理学变量。使用 Kaplan-Meier 方法建立存活曲线，并通过对数秩检验进行比较。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 3oc 依赖性降低细胞活性

通过用 AnnexinV / PI 凋亡检测法检测 T 细胞凋亡, 结果显示, 在 10、20 和 50 μ mol/L 的浓度下, 3oc 促进 T 细胞死亡。随着 3oc 浓度的增加, T 细胞活细胞降低 ($P<0.05$)。(图 1, 表 2)

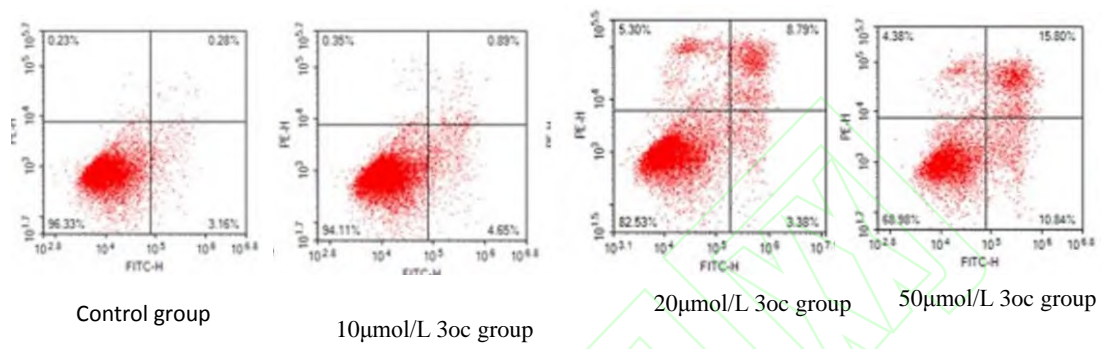


图 1 AnnexinV / PI 凋亡检测

Figure 1 Annexin V / PI apoptosis detection

表 2 3oc 抑制 T 细胞活化 ($\bar{x}\pm s$)

Fig. 2 Annexin V / PI apoptosis detection table 2 3oc inhibits T cell activation ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Living cell (%)
Control group	82.37 \pm 0.15
10 μ mol/L 3oc group	55.18 \pm 0.26
20 μ mol/L 3oc group	31.15 \pm 2.78
50 μ mol/L 3oc group	15.87 \pm 0.13
<i>F</i>	13.986
<i>P</i>	0.012

2.2 凋亡相关蛋白活性检测

检测各实验组小鼠中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性, 与对照组相比, 3oc 处理的 CD4 T 细胞中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白活性降低, Cld caspase-3 和 Cld caspase-9 蛋白活性增加 ($P<0.05$), 3oc 浓度和 caspase-3 和 caspase-9 表达负相关,

3oc 浓度和 Cld caspase-3 和 Cld caspase-9 表达正相关。随着 3oc 浓度的增加，caspase-3 和 caspase-3 蛋白活性降低，Cld caspase-3 和 Cld caspase-9 蛋白活性增加 ($P<0.05$)。(图 2，表 3)

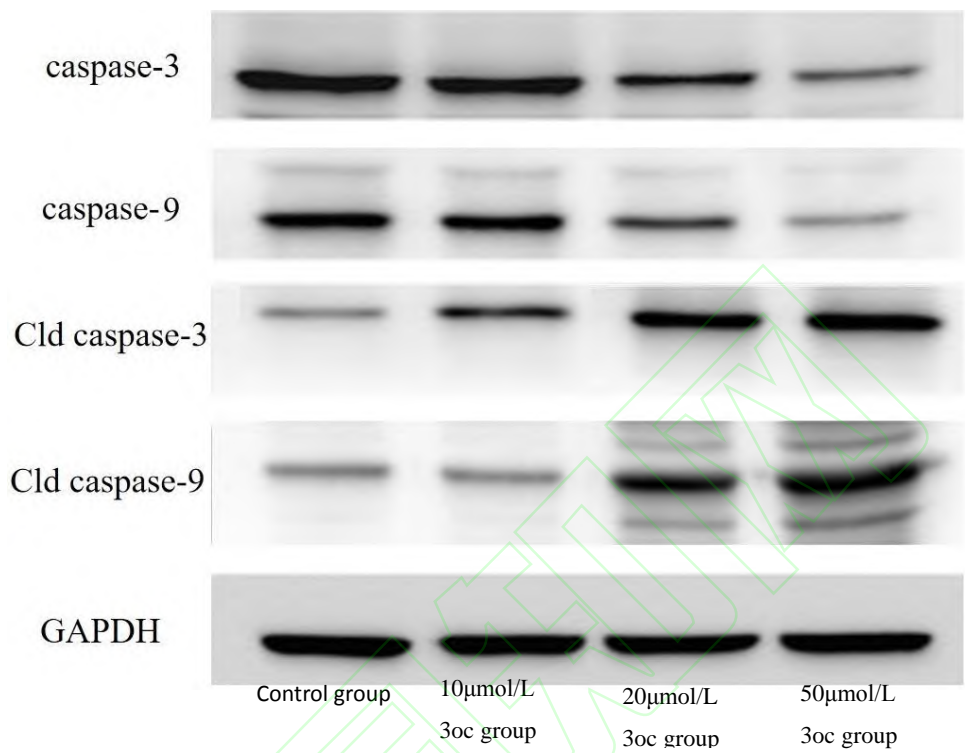


图 2 免疫印迹检测凋亡相关蛋白

Figure 2 Detection of apoptosis related proteins by Western blot

表 3 凋亡相关蛋白活性检测 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Detection of apoptosis related protein activity ($\bar{x}\pm s$)

Groups	caspase-3	caspase-9	Cld caspase-3	Cld caspase-9
Control group	1.13±0.12	3.37±0.31	0.28±0.06	0.05±0.01
10μmol/L 3oc group	0.78±0.13	2.58±0.15	0.54±0.13	0.27±0.11
20μmol/L 3oc group	0.47±0.06	1.74±0.13	1.27±0.18	0.68±0.19
50μmol/L 3oc group	0.15±0.03	1.05±0.12	2.15±0.19	1.39±0.16
<i>F</i>	12.342	25.187	13.946	14.128
<i>P</i>	0.013	0.017	0.018	0.012

2.3 炎症因子检测

通过 RT-qPCR 检测炎症因子 (IL-1 和 IL-6) mRNA 表达, 与对照组相比, 3oc 处理的 IL-1 和 IL-6 mRNA 表达增加, 随着 3oc 浓度的增加, IL-1 和 IL-6 mRNA 表达增加 ($P<0.05$)。(表 4)

表 4 IL-1 和 IL-6 mRNA 表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Expression of IL-1 and IL-6 mRNA ($\bar{x}\pm s$)

Groups	IL-1	IL-6
Control group	1.14 \pm 0.13	0.47 \pm 0.13
10 μ mol/L 3oc group	2.75 \pm 0.16	1.26 \pm 0.23
20 μ mol/L 3oc group	3.27 \pm 0.28	1.89 \pm 0.16
50 μ mol/L 3oc group	3.87 \pm 0.32	2.27 \pm 0.32
<i>F</i>	13.635	12.873
<i>P</i>	0.013	0.012

2.4 在有序脂质结构域中的 3oc

真核细胞质膜包含富含胆固醇和鞘糖脂的区域。由于 3oc 似乎介导了细胞表面受体的信号, 我们想知道 HSL 是否保留在质膜中。将 H9 细胞 (用于避免细胞死亡的干扰) 与 500 μ mol/L 3oc HSL 或 3-oxo-C8HSL 或 3-oxo-C10 HSL 孵育 5 或 10min。将细胞分级, 并按不同的方式提取和分离 3oc HSL 或 3-oxo-C8 或 3-oxo-C10 HSL (上清液, 细胞溶质和膜)。在质膜级分中发现了膜和上清液中 3oc 和 3-oxo-C10 含量更高。细胞溶质 3-oxo-C8 HSL 含量更高 ($P<0.05$)。(表 5)

表 5 在有序脂质结构域中的 3oc ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 3oc in the ordered lipid domain ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Groups	3oc	3-oxo-C8 HSL	3-oxo-C10 HSL
Supernatant	48.62 \pm 3.91	38.75 \pm 3.18	36.21 \pm 2.56
Cytosol	5.25 \pm 0.14	40.12 \pm 2.87	12.33 \pm 1.72
Cell membrane	46.13 \pm 3.26	21.13 \pm 2.26	51.46 \pm 3.82
<i>F</i>	12.287	13.254	11.175

2.5 铜绿假单胞菌通过 3oc 诱导感染宿主细胞的淋巴细胞凋亡

通过细菌的集体活动，HSL 被视为毒力因子。我们想知道其毒力是否也可以通过通过自动诱导剂介导的免疫抑制降低宿主防御来解释。我们用 WT（PAO1），lasI 缺陷型（ Δ lasI）和 lasR 缺陷型（ Δ lasR）铜绿假单胞菌培养物的上清液培养了 C57BL / 6 小鼠的淋巴细胞，lasI 缺陷和 lasR 缺陷都会导致细胞数量减少（ $P<0.05$ ），其作用可能为 3oc。（图 3，表 6）

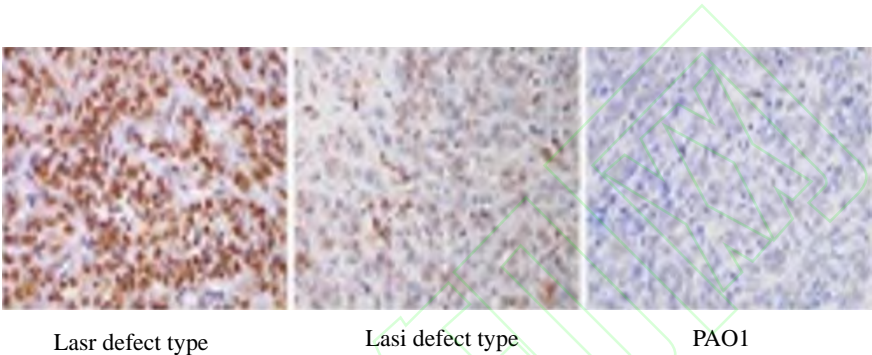


图 3 HE 细胞染色

Figure 3 HE cell staining

表 6 细胞 lasI 缺陷和 lasR 缺陷导致细胞数量减少 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Lasi and lasr defects of cells lead to the decrease of cell number ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Number of cells (%)
PAO1	8.56±0.13
Lasi defect type	25.33±2.18
Lasr defect type	27.26±2.47
<i>F</i>	9.456
<i>P</i>	0.011

为了进一步证实结果，我们在气管内用 WT PAO， Δ lasI 和 Δ lasR 突变体接种了 C57BL / 6 小鼠。来自突变体感染小鼠的肺部提取物显示铜绿假单胞菌菌落形成单位减少（ $P<0.05$ ）。（表 7）

表 7 3oc 抑制 T 细胞活化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Inhibition of T cell activation by 3oc ($\bar{x} \pm s$)	
Groups	Colony formation
PAO1	5.23 \pm 0.34
Lasi defect type	2.82 \pm 0.21
Lasr defect type	2.94 \pm 0.26
<i>F</i>	11.373
<i>P</i>	0.014

3 讨论

独立于 Tolllike 受体和 NOD 样受体的传统先天感应机制，已提出了几种基于蛋白质的 HSL 信号转导机制^[13]。其中，转录因子 X-box 结合蛋白 1 被建议介导内质网应激相关的胱天蛋白酶激活^[14]。在另一份报告中，建议 3oc 作为调节剂来微调 PPAR- β/δ 和 PPAR- γ 的转录活性，后者负责上皮细胞的炎症反应^[15]。在本报告中，我们提出了一种独立于直接蛋白质相互作用的机制。我们表明，这种细菌代谢产物的传感是通过膜干扰，从而广泛地改变了哺乳动物的细胞表面，其中凋亡在某些细胞中是最明显的结果。

由 3oc 诱导的免疫细胞凋亡极为有效。在大多数情况下，它比 TNF- α 本身触发的强度更高^[16]。在本报告中，我们提供了证据表明亚 $\mu\text{mol/L}$ 3oc 可以发生细胞死亡。在体内，尽管 3oc 的浓度在感染部位可能很高，例如在生物膜上达到数百 $\mu\text{mol/L}$ ，但它可能会形成扩散梯度，最终在大多数环境下测得的浓度都不超过几 $\mu\text{mol/L}$ 。对氧磷酶 2 (PON2) 是一种攻击 HSL 内酯环的内酯酶，在某些细胞类型中的表达可显著降低 3oc 的促凋亡作用^[17]。如我们在小鼠模型中所证实的，趋化性地吸引到感染部位的淋巴细胞可能暴露于比大多数临床测量值高的 3oc 水平。在铜绿假单胞菌中，Las 和 Rhl 群体感应可调节至少 600 个细菌基因^[18]。我们的结果表明，在急性肺部感染模型中，3oc 似乎至关重要，可以作为独立的毒力因子。在其他情况下，情况可能有所不同，在其他情况下，其他群体感应基因可能会导致铜绿假单胞菌的感染性。

膜结构域在真核细胞中是独特的，是鞘脂和胆固醇的微型晶体状聚集所支持

的功能^[19]。尽管发现了结构相关的类胡萝卜素，但细菌世界中却没有胆固醇和大多数真核固醇。在更高的顺序上，并与其他大多数饱和的磷脂结合，动态脂质结构域形成了栅栏样排列，受到长链磷脂粘附于潜在的皮质细胞骨架的约束^[20]。该分区为高度多样化的真核表面受体信号传导提供了通用平台。该特征使得真核膜对脂质结构域破坏特别敏感。以前曾使用粗粒度模型研究由饱和/不饱和磷脂和胆固醇形成的膜中的芳香族和脂肪族疏水分子，该膜在室温下表现出典型的有序与无序相分离。他们得出的结论是，芳族化合物可稳定相分离，而脂族结构可通过破坏其边界来促进脂质域混合。因此，具有 12 个碳的侧链的 HSL 属于后者，我们的结果与该预测相符。细菌群体感应自动诱导剂是释放的小化学物质，用于控制微生物群落的行为。N-（3-氧代十二烷酰基）高丝氨酸内酯，铜绿假单胞菌 LasI-LasR 电路的自诱导物，触发淋巴细胞大量死亡。我们发现该分子被并入哺乳动物的质膜并诱导真核脂质结构域的溶解。将肿瘤坏死因子受体 1 因其没有配体的自发三聚作用而进入无序脂质相，并驱动 caspase 3、caspase 9 介导的凋亡。在体内，铜绿假单胞菌释放 N-（3-氧代十二烷酰基）高丝氨酸内酯，以抑制宿主免疫力，从而获得更好的存活。相反，阻断胱天蛋白酶可大大降低感染的严重程度。这项工作揭示了微生物与哺乳动物宿主之间未知的交流方法，并建议通过拦截群体感应信号来干预细菌感染。

笔者分析，群集感应”指的是细菌中特有的，因受到个体数量影响而“开启”或“关闭”的转录调控机制。在绿脓杆菌中，存在一类叫做“N-oxo-dodecanoyl-L-Homoserine lactone (3oc)”的亲脂性群集感应分子。此前研究发现，该分子除了在细菌内部具有转录调控活性之外，还能够直接影响宿主的信号传导。主要分为抑制免疫信号以及促进细胞凋亡两个方面。3oc 的促凋亡活性是其“免疫调节”活性的本质，3oc 通过插入以及改变细胞膜的有序度，影响 TNFR1 的膜运动特性，从而促进 TNFR1 以及下游 caspase 9 与 caspase 3 的激活，最终引发细胞凋亡的发生，而 3oc 引发的中性粒细胞凋亡有助于抑制宿主天然免疫反应以及促进绿脓杆菌的体内增殖。

综上所述，铜绿假单胞菌使用 3oc 通过直接触发宿主自身的 TNFR1 信号来解除免疫。该结果揭示了直接与宿主细胞防御信号转导偶联的自动诱导剂的免疫调节机制，即细菌脂类分子能够通过改变膜结构间接性导致宿主细胞受体分子的

激活，从而揭示了细胞膜受体激活的新方式。这一发现以及细菌自动诱导剂使用以前未知的国际交流方法来调节宿主固有免疫力的启示，可能为我们将来对这类微生物代谢产物的研究提供重要线索。

参考文献

- [1] Ulloa-Ogaz AL, Piñón-Castillo HA, Muñoz-Castellanos LN, et al. Oxidative damage to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833 and *Staphylococcus aureus* ATCC 24213 induced by CuO-NPs[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(27):22048-22060. DOI: 10.1007/s11356-017-9718-6.
- [2] Bao L, Yu J, Zhong H, et al. Expression of toll-like receptors in T lymphocytes stimulated with N -(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *APMIS*, 2017, 125(6) :553-557. DOI: 10.1111/apm.12690. Epub 2017 Apr 18.
- [3] Ogawa M, Tomita Y, Nakamura Y, et al. Immunogenic cancer cell death selectively induced by near infrared photoimmunotherapy initiates host tumor immunity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6) :10425-10436. DOI: 10.18632/oncotarget.14425.
- [4] Roach DR, Leung CY, Henry M, et al. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen[J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 22(1):38-47. DOI:
- [5] Yang XY, Li ZQ, Gao ZQ, et al. Structural and SAXS analysis of Tle5 mil li5 complex reveals a novel inhibition mechanism of H2 mil 6SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Protein Sci*, 2017, 26(10) :2083-2091. DOI: 10.1016/ j.chom. 2017.06. 018.
- [6] Yan X, He B, Liu L, et al. Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: Proteomics approach[J]. *Metallomics*, 2018, 10(4):557-564. DOI: 10.1039/c7mt00328e.
- [7] Hermansen GMM, Hansen ML, Khademi SMH, et al. Intergenic evolution during host adaptation increases expression of the metallophore pseudopaline in

Pseudomonas aeruginosa[J]. Microbiology, 2018, 164(8):1038-1047. DOI: 10.1099/mic.0.000687. Epub 2018 Jul 3.

[8] Niepa THR, Wang H, Gilbert JL, et al. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* cells by cathodic electrochemical currents delivered with graphite electrodes[J]. Acta Biomater, 2017, 50:344-352. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.12.053. Epub 2016 Dec 31.

[9] Shafique M, Alvi IA, Abbas Z, et al. Assessment of biofilm removal capacity of a broad host range bacteriophage JHP against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. APMIS, 2017, 125(6):579-584. DOI: 10.1111/apm.12691. Epub 2017 Apr 18.

[10] Chakravarty S, Melton CN, Bailin A, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Magnesium Transporter MgtE Inhibits Type III Secretion System Gene Expression by Stimulating *rsmYZ* Transcription[J]. J Bacteriol, 2017, 199(23):e00268-17. DOI: 10.1128/JB.00268-17. Print 2017 Dec 1.

[11] Greene NG, Fumeaux C, Bernhardt TG. Conserved mechanism of cell-wall synthase regulation revealed by the identification of a new PBP activator in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(12): 3150-3155. DOI: 10.1073/pnas.1717925115. Epub 2018 Mar 5.

[12] Zheng L, Li J, Lenardo M. Restimulation - induced cell death: new medical and research perspectives[J]. Immunol Rev, 2017, 277(1):44-60. DOI: 10.1111/imr.12535.

[13] Saint-Criq V, Villeret B, Bastaert F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator–IL-6–antimicrobial–repair pathway[J]. Thorax, 2018, 73(1):49-61. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2017-210298. Epub 2017 Aug 8.

[14] Christopher J Jones, Daniel J Wozniak. Psl Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to the Establishment of Biofilms and Immune Evasion[J]. mBio, 2017, 8(3):e00864-17. DOI: 10.1128/mBio.00864-17.

[15] Deredge DJ, Huang W, Hui C, et al. Ligand-induced allostery in the interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* heme binding protein with heme oxygenase[J]. Proc

Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(13):3421-3426. DOI: 10.1073/pnas.1606931114. Epub 2017 Mar 13.

[16] Vimalnath S, Ravishankar H, Schwandt C, et al. Mechanistic studies on the biosorption of Pb(II) by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Water Sci Technol, 2018, 78(1-2):290-300. DOI: 10.2166/wst.2018.296.

[17] Liu X, Zou X, Li H, et al. Bypass of Abasic Site via the A-rule by DNA Polymerase of *Pseudomonas Aeruginosa* Phage PaP1[J]. Chem Res Toxicol, 2018, 31(1):58-65. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00287. Epub 2017 Dec 11.

[18] Li T, Wang D, Liu N, et al. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* by cinnamaldehyde [J]. Int J Food Microbiol, 2018, 269:98-106. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.023. Epub 2018 Feb 1.

[19] Ali SG, Ansari MA, Khan HM, et al. *Crataeva nurvala* nanoparticles inhibit virulence factors and biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Basic Microbiol, 2017, 57(3):193-203. DOI: 10.1002/jobm.201600175. Epub 2016 Nov 22.

[20] Aldrovandi M, Banthiya S, Meckelmann S, et al. Specific oxygenation of plasma membrane phospholipids by *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase induces structural and functional alterations in mammalian cells[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018, 1863(2):152-164. DOI: 10.1016/j.bbalip.2017.11.005. Epub 2017 Nov 14.

[21] Srivastava D, Seo J, Rimal B, et al. A Proteolytic Complex Targets Multiple Cell Wall Hydrolases in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mBio, 2018, 9(4):e00972-18. DOI: 10.1128/mBio.00972-18.

[22] Downey J, Pernet E, Coulombe F, et al. Dissecting host cell death programs in the pathogenesis of influenza[J]. Microbes Infect, 2018, 20(9-10) :560-569. DOI: 10.1016/j.micinf.2018.03.005. Epub 2018 Apr 18.