

药论坛杂志, 2010, 31(1): 51-52.

- [18] Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(8): 890-899.
- [19] Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells [J]. *Cytotherapy*, 2005, 7(3): 219-227.
- [20] Kaoru T, Tohru M, Haruhiro T, et al. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization [J]. *Circulation Research*, 2006, 98(9): 1194-1202.
- [21] Jeon O, Kang SW, Lim HW, et al. Synergistic effect of sustained delivery of basic fibroblast growth factor and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(8): 161-172.
- [22] Jun A, Hideya T, Kaori I, et al. Successful treatment of diabetic gangrene with topical application of a mixture of peripheral blood mononuclear cells and basic fibroblast growth factor [J]. *Journal of Dermatology*, 2006, 33(5): 349-352.
- [23] Rufaihah AJ, Haider HK, Heng BC, et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of human embryonic stem cell-derived CD133⁺ endothelial progenitor cells for cardiac repair [J]. *Regen*

Med, 2010, 5(2): 231-244.

- [24] 杨楠, 陆平, 何晓明, 等. 人自体干细胞移植在重症肢体缺血血流重建中的疗效与评价 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2009, 16(2): 115-118.
- [25] 曾昭凡, 唐新华. 自体骨髓干细胞移植治疗下肢慢性缺血性疾病的疗效观察 [J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(6): 646-650.
- [26] Ruiz-Salmeron, Cuesta-Diaz, Constantino-Bermejo, et al. Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischemia [J]. *Cell Transplantation*, 2010, 6(2): 14-17.
- [27] Gabriel P, Lasala, Jose A, et al. Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis [J]. *Angiology*, 2010, 61(6): 551-556.
- [28] 张海君, 谷涌泉, 郭连瑞, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗重症糖尿病足的效果 11 例报告 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(33): 116-118.

(收稿日期: 2011-09-08)

• 综 述 •

细菌群体感应及其研究进展

郭 静¹, 李慕岩¹, 孙 朋¹, 刘 涛¹, 王 雀¹综述, 邓少丽²审校

(1. 第三军医大学学员旅十三队, 重庆 400038; 2. 第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

关键词: 细菌; 群体感应; 信息交流

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 01. 025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0058-03

细菌利用信号分子感知周围环境中自身或其他细菌的细胞群体密度的变化, 并且信号分子随着群体密度的增加而增加。当群体密度达到一定阈值时, 信号分子将启动菌体中特定基因的表达, 改变和协调细胞之间的行为, 呈现某种生理特性, 从而实现单个细菌无法完成的某些生理功能^[1]。

1 群体感应系统的发现

长期以来, 人们一直认为仅在多细胞生物中存在着细胞与细胞之间的信息交流, 细菌则是单纯地以单个细胞的生存方式存在于环境中。20 世纪 70 年代, Neelson 在海洋细菌费氏弧菌(曾用名 *Vibrio fischeri*) 和夏威夷弧菌 (*Vibrio haverlyi*) 中发现了由群体感应控制的生物发光现象^[2]。费氏弧菌 (*P. fischeri*) 与一些海洋鱼类 (如 *Euprymna scolopes*, *Monocentris japonicus*) 共生, 为其提供光亮。其光线的强度与动物发光组织中 *P. fischeri* 的群体密度密切相关, 即该生物发光现象由群体感应系统调控, 且仅出现在细菌处于高密度生长的情况下。在实验室诱导的细菌发光实验过程中, 通过增加液体培养基降低细菌的细胞密度可终止细菌发光。信号分子调控 *P. fischeri* 的密度依赖型发光过程仅在鱼类的特定发光器官中发光, 而在海洋中游离的 *P. fischeri* 却不发光。究其原因主要有两点, 一是宿主发光器官丰富的营养促进了 *P. fischeri* 高密度生长; 二是细菌分泌的信号分子在狭小的宿主发光器官中达到了一定的浓度, 足以达到细菌检测能力水平^[3]。随后研究证实, 在细菌中, 无论革兰阳性菌还是革兰阴性菌, 都存在着细胞间的信息交流^[1-2]。

2 群体感应系统的类型及各类型的作用机制

群体感应系统是一个细胞与细胞在种内或者种间, 通过化学信号分子彼此感知、交流、相互协调的系统, 包括信号的产生、识别、传递和响应等环节。按其存在的细菌类型不同, 可分为革兰阴性菌群体感应系统、革兰阳性菌群体感应系统、杂合型群体感应系统、种间群体感应系统。按群体感应系统内调节蛋白的组成不同, 又可分为 *LuxI/LuxR* 型群体调节系统、*LasR/LasI* 型群体调节系统、*RhlI/RhlR* 型群体调节系统等多种类型。

2.1 革兰阴性菌的群体感应系统 革兰阴性菌中, 除了哈氏弧菌 (*V. harveyi*), 其余大部分细菌的群体效应都与费氏弧菌中由 *LuxI/LuxR* 蛋白调控的群体感应系统相似, 称 *LuxI/LuxR* 型群体调节系统, 由信号分子、*LuxI* 和 *LuxR* 蛋白 3 部分组成^[4]。革兰阴性菌通常使用 N-酰基高丝氨酸内酯类化合物 (AHL) 作为信号分子。*LuxI* 型蛋白是最广泛的一类 AHL 合成酶, 其氨基端保守性残基为酶活性中心, 而羧基端保守性氨基酸序列为酰基载体蛋白 (ACP) 的特异结合位点。*LuxR* 型蛋白位于细胞质中, 含约 250 个氨基酸, 两个功能域, 氨基端 AHL 的结合区域, 羧基端为 DNA 结合位点, 负责识别信号分子并激活下游靶基因的转录。该系统发挥效应时, 由 *LuxI*-acetyl-HSL 合成酶催化脂肪酸代谢途径中的酰基-酰基载体蛋白的酰基侧链与 S-腺苷甲硫氨酸中的高丝氨酸 (SAM) 部分结合形成氨基键, 并进一步内酯化而合成 AHL。AHL 分子都含有一个高丝氨酸内酯环, 不同的 AHL 分子含有不同的酰化支

链。酰化支链的差异是 AHL 群体感应系统保证种内特异性的分子基础。AHL 具有水溶性和膜透过性,能够自由通过细菌细胞膜到达胞外,并在周围环境中逐渐积累。当细菌密度增加到一定程度后,AHL 与胞质内的相应受体蛋白 LuxR 结合形成复合物,此复合物再结合到基因的启动子序列上从而启动基因的表达,以此来调节细菌的群体行为^[5]。

另外,在其他一些革兰阴性菌中,发现了与 LuxI 蛋白具有相同作用的 LuxM/AinS 样蛋白和 HtdS 样蛋白,其中,LuxM/AinS 与 LuxI 最大的差别就是其可利用 acyl-ACP 或 acyl-CoA 作为酰基供体合成 AHL。HtdS 类蛋白是一种乙酰基转移酶,能够将酰基转移到底物上,合成 AHL。

此外,有的细菌还具有多个群体感应调节系统,如铜绿假单胞菌。其主要包含两套群体感应体系,第一套群体感应体系 LasR/LasI 与 LuxR/LuxI 类似,LasR 可增强毒力因子的基因转录,LasI 则会产生活性 LasR 的自体诱导物,即血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1);第二套群体感应体系 RhlR/RhlI 可调节产生一种高丝氨酸内酯类自体诱导物 PAI-2。这两套群体感应调控体系在功能上具有顺序调控的关系,即 PAI-1 与 LasR 的结合能促进 RhlI 的表达并产生 PAI-2,而 RhlR 与 PAI-2 结合后,则启动相关调控基因的转录,包括形成生物膜^[6]。另外,LasR 还会促进第三种分子 PQS 的生成,PQS 是一种喹诺酮类信号分子,其虽然不是由 LasI 或 RhlI 生成的,本身也不直接参与群体感应,但其可通过 RhlR 调控弹性蛋白酶的合成,在 Las 和 Rhl 体系间起到传递信号的作用。

2.2 革兰阳性菌的群体感应系统 与革兰阴性菌以 AHL 作为信号分子的交流系统不同,革兰阳性菌的自体诱导剂为小分子的寡肽物质,这些肽结构的信号分子因细菌种类而异,其的群体感应系统则作为一种组氨酸蛋白激酶-响应调节蛋白系统。

革兰阳性菌的群体感应系统由两个部分组成,一个专一性的自体诱导肽转运系统和一个调节信号转导系统;后者由一个位于膜上的受体——组氨酸蛋白激酶和一个胞内响应调节子组成。在革兰阳性菌的核糖体中首先合成一些自体诱导蛋白(AIP)的前体肽段,这些前体肽段在向外运输的过程中,经过一系列转录后修饰与加工,形成有一定活性且较为稳定的自体诱导寡肽,并通过一种结合 ATP 的转运复合物分泌到胞外。当分泌到细胞外的自体诱导剂随细胞生长,其浓度达到阈值时,便激活特定的受体酶蛋白,并与细胞膜上的组氨酸激酶感受器结合,导致相应调控蛋白磷酸化,磷酸化后的调控蛋白与 DNA 的特定位置结合,从而调控靶基因的表达^[5]。

金黄色葡萄球菌是一种典型的革兰阳性菌,其 AIP 是一种环八肽,诱导物受体是一种可以跨膜的组氨酸蛋白激酶。大部分毒力因子都是由 agr 基因簇调控的,目前的推论是 agrB 将 agrD 的基因产物分解成环八肽,agrC 起跨膜转运受体蛋白的作用。AIP 和受体蛋白结合后,对 agrA 的编码产物进行磷酸化,从而启动许多与葡萄球菌毒力相关基因的转录。agr 缺失导致群体感应被破坏的表皮葡萄球菌的生物膜有所增加,说明低细菌浓度可以促进生物膜的形成,而高浓度时会导致细菌解离,从而发生侵袭。

2.3 杂合型的群体感应 杂合型回路中信号分子的产生方式与革兰阴性菌相似。哈氏弧菌的信号系统产生两种小分子的自体诱导剂,AI-1 是一种高丝氨酸内酯的结构类似物,而 AI-2 是一种新鉴定的呋喃硼酸二酯。已证实,自体诱导剂 AI-1 和 AI-

2 的合成分别需要 luxM 基因和 luxS 基因的参与,且在酶参与的 AI-2 前体转化过程中,LuxS 蛋白起着关键的作用。杂合型群体效应系统具有两条平行的感应途径,均能独立地将信息传递到 LuxO 感应调节子,先响应由 AI-1 提供的信号,然后响应 AI-2 提供的信号^[7]。

杂合型回路中其信号分子的接收、传递方式与革兰阳性菌类似。哈氏弧菌的信号分子 AI-1 由 LuxN 蛋白感受识别,AI-2 由 LuxP 蛋白感受识别。LuxN 和 LuxQ 都具有相应的感受激酶区和调节蛋白区,LuxN 和 LuxQ 共同作用于中间化合物磷酸转移酶 LuxU,LuxU 将磷酸化信号转移到响应调节子 LuxO 蛋白^[8]。当细胞密度较低,即自体诱导剂浓度尚未达到阈值时,自身磷酸化的 LuxO 蛋白诱导一种阻遏物的生成,抑制了下游靶基因 Lux 操纵子的表达;当自体诱导剂浓度达到阈值时,LuxO 蛋白去磷酸化失去活性,就能激活 Lux 操纵子的转录^[9]。

2.4 种间的群体效应 哈氏弧菌通过 AI-1 和 AI-2 这两种自体诱导剂来感应菌群密度,其中利用 AI-1 进行种内交流,利用 AI-2 进行种间沟通。在许多革兰阴性菌和革兰阳性菌中都发现了信号分子 AI-2,其生物合成途径及合成过程中的中间体都是一样的,且都需要 LuxS 蛋白的参与。因此,AI-2 可作为微生物种间交流的信息语言,即作为一种通用的信号分子来介导不同细菌间的信息交流。

肠出血性大肠杆菌(EHEC)经各种食物传播感而暴发严重的肠道疾病,如溶血性尿毒综合征和血栓性血小板减少性紫癜。出血性大肠杆菌的运动、黏附及其致病基因都受一个包括结构简单的自体诱导剂 3(AI-3)在内的群体感应机制的调节。由于肾上腺素/去甲肾上腺素也能诱导产生与肠出血性大肠杆菌有相同表达的毒力基因,加之肾上腺素受体阻断剂能够抑制 AI-3 的表达,因此可推断 AI-3 很有可能在结构上类似于肾上腺素/去甲肾上腺素。另外,肾上腺素/去甲肾上腺素本身也可充当群体感应的信号物质。这种群体感应系统跨越了菌群的界限,极大地加强了不同菌属间的信息交流和信号传导^[10]。

3 群体感应系统的应用

目前,群体感应系统的机制已基本明了,研究重点正在向其应用方面转移。邵圣文和张志智^[11]的研究发现,利用 siRNA 干扰铜绿假单胞菌的群体感应系统将会促使已经成熟的铜绿假单胞菌生物膜解体,生物膜 LasB 基因表达下调,但对生物膜内的细菌数目毫无影响,这可能与生物膜自身的代谢率有关。因此,将 siRNA 与青霉素等抗菌剂联合用药,则有可能抑制生物膜内的细菌增殖,使其数目减少,从而达到治疗的目的。

Las 系统和 Rhl 系统是两种重要的群体感应系统,Las 系统由 LasR 和 LasL 基因组成,分别编码转录激活蛋白 LasR 和自体诱导分子 3-氧十二烷酰高丝氨酸内酯(3-O-C12-HSL)^[12]。Rhl 系统由 RhlR 和 RhlI 基因组成,分别编码生成 RhlR 蛋白和丁基高丝氨酸内酯(C4-HSL)。刘晓岚和王立赞^[13]的研究发现,铜绿假单胞菌的 Las/Rhl 基因缺陷能够明显影响生物膜的形成及其对美罗培南(一种人工合成的广谱碳青霉烯类抗菌剂)的敏感性,从而使美罗培南能够更好地发挥抗菌剂的作用。

4 前景与展望

在抗菌剂生产方面,目前对沙雷菌属中 β -内酰胺类抗菌剂碳青霉烯的产生已经有了比较透彻的研究,但是因为得到的信

号分子和抗菌剂产量均比较少,无法准确地定量检测,以致信号分子对抗菌剂产量的影响没有量化,如果能够弄清楚群体感应系统与抗菌剂间的关系,那么在抗菌剂生产方面必将有一个大的飞跃^[14]。

另外,群体感应系统也在于真菌中,比如白色念珠菌、新生隐球菌等,但人们是对真菌中的群体感应系统研究还比较浅,尤其是对真菌群体感应系统的效应分子、效应分子受体、靶蛋白、相关信号转导通路以及靶基因的调控等方面的研究有待进一步深入^[15]。

最近,一种被称为 LED209 的分子被发现能够抑制 QseC 介导的致病基因激活及诸如 EHEC、鼠伤寒沙门菌和土拉弗朗西斯菌等细菌在活体哺乳动物体内所产生的不良反应,而且其对哺乳动物的不良反应很小,对这种分子的研究也许会有一个很好的前景^[10]。总之,不久的将来,随着研究人员的不断探索,人们将可能通过各种渠道来抑制群体感应系统中的各个环节,从而达到治疗一些细菌性疾病的目的。

参考文献

[1] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways[J]. *Science*, 2006, 311(24): 1113-1116.

[2] Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system[J]. *Bacteriology*, 1970, 104: 313-322.

[3] Edward JR. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association; the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50: 591-624.

[4] 崔艳华, 曲晓军, 董爱军, 等. 细菌群体感应系统的研究[J]. *生物技术通报*, 2009, 4: 50-54.

[5] 张晓兵, 府伟灵. 细菌群体感应系统研究进展[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(11): 1639-1642.

[6] 蓝镛. 生物膜与铜绿假单胞菌耐药相关性研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(10): 28-30.

[7] Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world[J]. *J R Soc Interface*, 2009, 6(40): 959-978.

[8] Christopher M Byrd, William E Bentley. Quieting cross talk—the quorum sensing regulator LsrR as a possible target for fighting bacterial infections[J]. *Cell Research*, 2009, 199: 1229-1230.

[9] Thomas B, Maria van Gennip, Tim HJ, et al. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect [J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(2): 283-293.

[10] Boyen F. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 135: 187-195.

[11] 邵圣文, 张志智. RNA 干扰铜绿假单胞菌群体感应系统对生物膜影响的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(3): 184-188.

[12] Gilles B, Shari C, Kartik B, et al. AI-2 quorum-sensing inhibitors affect the starvation response and reduce virulence in several *Vibrio* species, most likely by interfering with LuxPQ[J]. *Microbiology*, 2009, 155: 4114-4122.

[13] 刘晓岚, 王立赞. 美罗培南对 *las/rhl* 基因缺陷型铜绿假单胞菌早期生物膜的作用[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(23): 1833-1835.

[14] Swati C, Claudia SD. Applications of quorum sensing in biotechnology[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86: 1267-1279.

[15] 车付彬, 徐楠. 病原真菌中群体感应现象研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(4): 447-449.

(收稿日期: 2011-10-08)

• 综 述 •

脑源性神经营养因子在实验性糖尿病及其并发症中的表达和治疗研究进展

殷 娟 综述, 杨红英 审校

(昆明医学院第二附属医院检验科 650000)

关键词: 脑源性神经营养因子; 糖尿病; 治疗; 并发症; 表达

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 01. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0060-03

脑源性神经营养因子(BDNF)是神经营养因子家庭的主要成员之一,在神经元的生长、增殖、分化、可塑性以及认知和记忆功能中起着重要作用。1997年,Ono等^[1]率先报道BDNF除了对神经系统有调节作用外,对内分泌系统也起到一定的调节作用。现在,越来越多的研究表明,糖尿病及各种并发症中BDNF表达水平异常,提示其在糖尿病及相关并发症的发病机制中可能起着重要的作用,BDNF对糖尿病及预防并发症的治疗也进入了临床前研究阶段。

1 糖尿病时 BDNF 的表达水平

文献报道,糖尿病患者体内血清中 BDNF 表达水平下调^[2],而女性糖尿病患者 BDNF 的水平显著高于男性患者且与胰岛抵抗呈正相关^[3]。有报道,实验性糖尿病大鼠体内检测到 BDNF 在比目鱼肌和 L4、L5 背根节中 mRNA 表达水平上调^[4-6],胰岛素强化治疗可逆转背根节和比目鱼肌中 BDNF mRNA 的表达上调,经去坐骨神经处理后,同侧比目鱼肌 BD-

NF mRNA 先增加后下降,但腓肠肌无此变化。由于刺激坐骨神经引起糖尿病大鼠腿部肌肉强烈收缩时,比目鱼肌 BDNF mRNA 水平增加与血浆肌酸激酶活性升高呈现良好的相关性,认为比目鱼肌 BDNF mRNA 的表达上调实际是由神经启动的,是出于对神经肌肉结构损伤和功能修复的营养需要,表明此时虽然电镜下并未看到神经结构的改变,但糖尿病对神经的损伤可能已经存在,并由肌肉中 BDNF 的表达变化反映出来。比目鱼肌与腓肠肌中 BDNF 的表达差异是由肌肉的表型决定,而不是 BDNF 对肌肉损伤的反应本身所致。因此,比目鱼肌 BDNF mRNA 表达上调是机体针对伤害刺激产生的保护和修复反应,也是糖尿病周围神经和肌肉损伤的早期标志,而在去神经处理后这种保护机制不足以抵抗去神经损伤的作用,所以 BDNF 下降。

2 糖尿病各种并发症时 BDNF 的表达水平

糖尿病勃起障碍时 BDNF 表达水平降低^[7], Nitta 等^[8]和