

• 综述 •

糖类微生物产物的天然识别

龚小卫 姜勇

【关键词】糖类；微生物产物；天然免疫；识别

抗感染免疫是由天然(先天)免疫(innate immunity)和获得性(adapted immunity)免疫(适应性)共同介导的。病原微生物侵入机体后,天然免疫系统作为宿主的第一道防御线,对微生物进行识别和清除。天然免疫模式从低等生物到人类都非常保守,主要通过模式识别受体(PRR)对病原微生物表面保守、共有的基团,即病原体相关分子模式(PAMPs)进行天然识别^[1-2]。

病原微生物被靶细胞识别是其产生致病作用的第一个步骤,靶细胞表面的糖类(carbohydrate)复合物大多数都属于 PAMPs,能在很大程度上影响病原体的侵袭,在疾病发生中起着极其关键的作用^[3]。宿主识别病原微生物后,能通过某些机制来吞噬和破坏微生物,从而对其进行早期防御。由于以往的研究主要集中于宿主对微生物表面的蛋白或脂质的识别^[1,4-6],以及糖链本身的复杂性,因此宿主通过识别微生物的糖类产物来介导天然免疫反应的机制一直未阐明。随着糖生物学研究的技术进步,目前该领域的研究已经有了很大的进展,现主要对这些进展予以介绍。

1 微生物表面糖类的特征

病原微生物表面具有多种不同的糖类复合物,包括多糖类、脂多糖类、脂低聚糖类等。其中,修饰病原微生物表面的糖类复合物通常是 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine)、葡萄糖(glucose)、岩藻糖(fucose)及甘露糖(mannose)等

糖类^[3]。而修饰哺乳动物蛋白的糖类主要是半乳糖(galactose)和唾液酸(sialic acid),这些糖类的 OH 基团的构型不能被宿主自身的糖类识别受体识别。而且,微生物表面的糖类一般具有高度重复性,因而宿主体内的模式识别分子可通过其表面的多个识别位点来识别这种重复结构。相反,高等动物糖蛋白上的糖类不会重复排列。另外,高等真核生物中与微生物类似的糖类(例如甘露糖)通常深埋于糖蛋白分子内部,因而也不会被自身识别^[7]。综上所述,宿主对病原微生物糖类的识别具有相当的特异性,从而避免了不能有效区分“敌我”以及产生自身免疫的可能性。

2 糖类微生物产物的天然识别

对微生物糖类的天然识别在进化上相当保守^[8]。例如,从某些相对低等的生物,如果蝇(Drosophila)和鲎(Limulus)等,到哺乳动物,都可通过识别微生物表面的一些糖类产物,来对微生物产生天然免疫反应^[9]。

2.1 低等生物对糖类微生物产物的识别:鲎的血液中存在着一个凝血级联。鲎的 G 因子可与病原微生物表面的糖类,如真菌的(1,3)- β -葡聚糖相互作用,形成一种活性丝氨酸蛋白酶来触发凝血级联的活化,形成的不溶性凝胶可将入侵的微生物局限化,最后血细胞释放出抗微生物物质来将其杀死^[10]。淡水螯蛄(Pacifastacus leniusculus)的血和淋巴中含有一种(1,3)- β -葡聚糖结合蛋白(BGBP)。这种 BGBP 与病原微生物表面糖类形成的复合物能与血细胞表面受体结合并通过调理机制增强吞噬作用,同时还可触发血细胞脱颗粒,从而进一步增强宿主对病原微生物的防御。美国蟑螂(Periplanta americana)的血和淋巴中含有一种与脂多糖(LPS)具有亲和力的凝集素。该凝集素并不识别脂质 A,而是识别 LPS 近端的四糖。由于不同细菌 LPS 的糖类化模式不同,因而该凝集素并不能识别所有的 LPS。在给成年蟑螂注射大肠杆菌后,这种凝集素的表达水

平能被短暂上调,并且作为一种急性期反应成分来发挥作用。麻蝇(Sarcophaga peregrina)的幼虫能诱导表达一种半乳糖结合凝集素。正常幼虫中不含该凝集素,但在体壁受到损伤时其表达被迅速上调,来增强血细胞的吞噬和杀伤能力。

2.2 高等生物对微生物表面糖类的识别:病原微生物进入机体的第一道免疫屏障是树突状细胞(DC)。DC 与巨噬细胞(M ϕ)等可通过其表面受体来识别微生物的糖类产物。除此之外,血清中的补体、某些凝集素(lectin)和 C-反应蛋白等可在感染后数小时内大量诱导生成或活化,通过识别微生物表面的糖类来指导吞噬和破坏微生物。

2.2.1 C 型凝集素:凝集素是一类能专一识别糖类并与之非共价可逆性结合的蛋白质。高等生物,如哺乳动物可利用凝集素来对病原微生物表面表达的糖类进行识别后,通过激活补体系统或将信号传递至其他效应细胞来将其清除。动物凝集素根据其一级结构和糖类识别结构域(CRD)的功能可分为 C、S、I 和 P 型凝集素,其中 C 型凝集素超家族成员的作用最为重要,目前研究得也最为透彻^[11-12]。胶原凝集素(collectin)属于可溶性 C 型凝集素,甘露聚糖结合蛋白(MBP)是其中的典型代表。

2.2.1.1 MBP:MBP 是存在于血清中的凝集素,又称为甘露聚糖结合凝集素(MBL),其结构与补体 C1q 非常相似。在所有的胶原凝集素中,MBP 识别的病原体范围最为广泛,能与细菌革兰阳性和阴性(G⁺和 G⁻)菌、酵母和病毒以及寄生虫表面以甘露糖、N-乙酰甘露糖胺、N-乙酰葡萄糖胺和岩藻糖等作为末端糖类的糖结构结合^[13-15]。

MBP 主要通过 CRD 来识别糖类配基^[16]。MBP 的 CRD 含有 5 个 β -折叠、2 个 α -螺旋和 4 个延伸环,同时还有 2 个二硫键和 2 个 Ca²⁺结合位点,其中 β -折叠和 α -螺旋形成一个 Ca²⁺结合口袋来识别糖类配基。在低 pH 值条件下,

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2002CB513005);国家自然科学基金资助项目(U0632004;30572151)

作者单位:510515 广东广州,南方医科大学病理生理学教研室,广东省蛋白质组学重点实验室

通讯作者:姜勇,教授,博士生导师
(Email: yjiang@fimmu.com)

作者简介:龚小卫(1976-),男(汉族),湖北省人,博士,讲师,主要从事炎症相关的细胞信号转导研究。

CRD 与 Ca^{2+} 结合减少, 导致 CRD 与糖类配基解离, 这种 pH 值依赖的解离是 CRD 的重要特征。CRD 内某些关键氨基酸点突变后会导致 MBP 的糖类识别特异性发生改变, 因此提示 CRD 可在不断的突变中进化形成不同的糖类识别特异性。

MBP 与病原微生物的糖类结合后产生的效应功能是由其保守的胶原尾巴介导的^[17]。一方面, 可通过 M ϕ 表面表达的特定细胞受体介导的调理作用来清除病原体, 另一方面, MBP 可以直接或通过与其连接的蛋白酶, 如 MBP 结合丝氨酸蛋白酶(MASP)的结合来激活补体的经典途径以及旁路途径。MASP 与 MBP 结合后直接切割 C3 或激活经典通路中的 C3 转换酶, 使 C3b 产生增加; 或催化 C4 和 C2, 形成 C4b2a。除此之外, MBP 还能在 C1q 与 C1r 和 C1s 的作用中替代 C1q, 并激活经典补体通路中的 C3 转换酶^[11]。

2.2.1.2 甘露糖受体(MR):MR 是一种分子质量约 180 ku 的 I 型跨膜受体, 存在于 M ϕ 、DC 和内皮细胞表面, 可以识别末端是甘露糖、岩藻糖或是 N-乙酰葡萄糖胺的糖链, 如酵母的甘露聚糖、细菌荚膜、LPS 和脂质阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomannan)^[18]。MR 以一种 Ca^{2+} 依赖的方式与这些糖类配基结合后将其内化。近来在未成熟 DC、某些内皮细胞亚群、气管平滑肌细胞、视网膜上皮细胞、肾血管系膜细胞和 Kaposi 肉瘤细胞等细胞表面也发现有 MR 的表达。MR 包括 1 个 N 端、1 个富含半胱氨酸的结构域、1 个 II 型纤维黏连素样的结构域、依次排列的 8 个 CRD、1 个单次跨膜区及 C 端 1 个 45 个残基的胞质尾巴。自从 MR 被克隆后, 又鉴定了许多与其具有显著同源性的分子, 称为 MR 样 C 型凝集素家族, 其特征是具有多个依次排列的 CRD 重复。

MR 的糖类结合活性由 CRD-4~CRD-8 介导, 该区域与天然糖蛋白配基的结合亲和力接近于完整的 MR, 其中仅 CRD-4 能与单糖结合, 例如毫摩尔级的 CRD-4 即可结合 D-甘露糖和 L-岩藻糖。CRD-5 则含有与 Ca^{2+} 结合所必需的残基。尽管 MBP、MR 都能识别和结合甘露糖, 但两者与甘露糖的结合方式存在明显的不同。MBP 只含有单个 CRD, 主要通过单体的多聚化进行丛集

来与甘露糖结合, 而 MR 中含有依次排列的多个 CRD, 可通过同时与多个甘露糖配基的结合进行簇集来获得与病原微生物的高亲和力结合。

MR 通过 CRD 捕获糖类配基后, 随后可利用其富含半胱氨酸的结构域来产生效应^[19]。例如, M ϕ 的 MR 识别病原体后, 细胞会发生活化, 超氧化阴离子释放增加, 并诱导细胞因子的合成。同时, M ϕ 可通过肌动蛋白细胞骨架重塑来变形, 包绕病原体或病原体感染的靶细胞, 随后形成吞噬小体并杀伤病原体。DC 表面的 MR 识别糖类配基后, 经过内化和加工而呈递给 T 细胞。MR 的拮抗剂可以抑制脂质阿拉伯甘露聚糖的内化和抗原呈递, 而且将 MR 缺陷小鼠清除甘露糖化 BSA 和 N-乙酰葡萄糖胺的能力显著下降。

2.2.1.3 DC-SIGN:DC 表面特异性 C 型凝集素 DC-SIGN 是分子质量为 44 ku 的 II 型跨膜糖蛋白^[19], 主要在外周组织中未成熟 DC 以及淋巴组织中成熟 DC 表面表达, 另外, M ϕ 可能也有表达。DC-SIGN 能够识别复杂的甘露糖, 其结合 N-乙酰葡萄糖胺-甘露糖的能力是结合甘露糖的 10~100 倍。DC-SIGN 的 C 端含有 138 个氨基酸组成的 CRD, 其中含有 2 个 Ca^{2+} 结合位点, 能选择性地与高甘露糖式糖链达到高亲和力结合。DC-SIGN 受体(DC-SIGNR)与 DC-SIGN 具有高度同源性, 主要在肝窦内皮细胞等细胞上表达。

由于 DC-SIGN 参与获得性免疫缺陷病毒(HIV)感染并介导免疫启动, 因而目前其研究备受关注^[19]。生殖道黏膜表面下的 DC 可通过 DC-SIGN 来高亲和力识别 HIV 的 gp120 糖蛋白中的高甘露糖式糖链, 并捕获微量的 HIV, 将其内吞至晚期溶酶体。随着 DC 的成熟并迁移到淋巴结 T 细胞居住区, 其携带的 HIV 可反式感染 CD4^+ T 细胞。DC-SIGN 不仅参与 HIV 感染, 而且还与其他多种病原微生物和寄生虫的感染有着密切联系, 例如丙型肝炎病毒、埃博拉病毒、巨细胞病毒、急性严重呼吸综合征(SARS)冠状病毒、结核杆菌、幽门螺旋杆菌以及利什曼原虫等。在上述病毒中, DC-SIGN 主要通过病毒表面高甘露糖式的包膜糖蛋白相互作用来黏附病毒, 促进病毒对靶细胞的感染, 因而在病毒的传播和致病中起着重要的作用。

DC-SIGN 除了能选择性识别高甘露糖式糖链外, 还与岩藻糖复合物路易斯寡糖 Lex、Lea 和 Leb 有很强的亲和力。如幽门螺旋杆菌表面有大量 Lex 糖链, DC-SIGN 能与其结合并且参与幽门螺旋杆菌的感染。单核源性 DC 可通过 DC-SIGN 识别利什曼原虫表面的甘露糖复合物并将其内吞, 发挥对利什曼原虫感染的免疫监视作用。DC-SIGN 对微生物表面糖类的识别可能在病原微生物的慢性感染中具有重要作用。

2.2.2 清道夫受体(SR)超家族:SR 超家族成员属于糖蛋白, 广泛分布于 M ϕ 、血管平滑肌细胞和内皮细胞等细胞表面。SR 可分为多个亚类, 其中 SR-A 亚类的配基识别谱非常广泛, 主要识别带有空间负电荷的多聚阴离子, 包括乙酰化或氧化的低密度脂蛋白(ox-LDL)、多聚肌苷酸、多聚鸟苷酸、马来酰小牛血清白蛋白、硫酸葡聚糖、角叉菜胶、磷脂酰丝氨酸、硫酸聚乙烯、细菌脂多糖和硫酸多糖等。SR 具有广泛的配基识别活性, 能参与多种细胞过程, 迄今为止人们仍很难对其功能下确切定义。但显然, SR 在宿主的非特异性免疫方面起着非常基础的作用。如循环中的 M ϕ 可以清除或吞噬内毒素, SR-A 就在其中起着关键性的作用。而且, SR-A 还可与 G^+ 菌表面的多聚阴离子结合, 并因此介导细胞对 G^+ 菌的清除。除此之外, SR 还可与分支杆菌结合来参与结核病的发病过程, 以及介导 M ϕ 对利什曼原虫的杀伤。这些作用在很大程度上都是通过其对病原微生物表面糖类的非特异性识别而完成的。

3 病原微生物糖类介导的免疫反应与免疫逃逸

某些病原微生物表面的糖类可模拟宿主细胞的糖类结构, 从而逃避宿主免疫系统的攻击。如 HIV 可合成与宿主相似的寡糖, 通过“糖生物学逃逸作用”来逃避宿主的免疫防御体系。而且, HIV 还可合成一种特殊的、具有很强的免疫抑制能力的寡糖链来抑制杀伤细胞对其的免疫应答。酵母等真菌感染时一般表现为免疫抑制, 原因就在于其可通过表面的甘露寡糖来逃避宿主免疫防御。另一方面, 某些 G^- 致病菌, 如幽门螺旋杆菌和空肠弯曲菌, 它们的 O-抗原结构与人细胞表面的糖链结构相同, 往往会导致严重的自身免疫疾病^[20]。

4 展望

尽管随着糖生物学研究的技术进步,目前我们对宿主对糖类微生物产物的天然识别机制及其在病原微生物致病中的作用的认知已经有了很大的进展,但仍有很多问题有待于解决,包括不同糖类识别受体或凝集素识别的特异性和功能区分,以及合适的糖拮抗剂药物的筛选和开发等。这些问题的阐明,将为糖拮抗剂的临床应用打下坚实的理论基础,从而最终为艾滋病、结核病、慢性肝炎和深部真菌感染等疾病的治疗开辟新的途径。

参考文献:

- 1 龚小卫,姜勇. TLR4 在哺乳动物对脂多糖反应中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(3): 300-303.
- 2 李志杰,刘靖华,姜勇. Toll 样受体的发现及其研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(11): 694-697.
- 3 Feizi T. Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity [J]. Immunol Rev, 2000, 173: 79-88.
- 4 Choe K M, Werner T, Stoven S, et al. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in drosophila [J]. Science, 2002, 296 (5566): 359-362.
- 5 Gottar M, Gobert V, Michel T, et al. The drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein [J]. Nature, 2002, 416(6881): 640-644.
- 6 章云涛,丁国娟,方强. 重症脓毒症患者血清脂多糖结合蛋白及其受体变化的临床研究[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(2): 78-81.
- 7 Takahashi K, Ezekowitz R A. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity [J]. Clin Infect Dis, 2005, 41 (Suppl 7): S440-S444.
- 8 Brown G D, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity [J]. Immunity, 2003, 19(3): 311-315.
- 9 Fabrick J A, Baker J E, Kanost M R. Innate immunity in a pyralid moth: functional evaluation of domains from a beta-1, 3-glucan recognition protein [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (25): 26605-26611.
- 10 Muta T. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1, 3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(32): 4155-4161.
- 11 Edelson B T, Stricker T P, Li Z, et al. Novel collectin/CIq receptor mediates mast cell activation and innate immunity [J]. Blood, 2006, 107(1): 143-150.
- 12 Rogers N C, Slack E C, Edwards A D, et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins [J]. Immunity, 2005, 22(4): 507-517.
- 13 Ezekowitz R A. Role of the mannose-binding lectin in innate immunity [J]. J Infect Dis, 2003, 187 (Suppl 2): S335-339.
- 14 Palma A S, Feizi T, Zhang Y, et al. Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides [J]. J Biol Chem, 2006, 281(9): 5771-5779.
- 15 Royle L, Roos A, Harvey D J, et al. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems [J]. J Biol Chem, 2003, 278(22): 20140-20153.
- 16 Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(5): 346-353.
- 17 Hirano M, Ma B Y, Kawasaki N, et al. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin alpha and beta [J]. J Immunol, 2005, 175(5): 3177-3185.
- 18 Lee S J, Evers S, Roeder D, et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis [J]. Science, 2002, 295(5561): 1898-1901.
- 19 Cambi A, de Lange F, van Maarseveen N M, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells [J]. J Cell Biol, 2004, 164(1): 145-155.
- 20 Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, et al. A role for fungal beta-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice [J]. J Exp Med, 2005, 201(6): 949-960.

(收稿日期: 2007-01-04)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64页,国际通用16开大版本,80克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期7.6元,全年45.6元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国中西医结合急救杂志》已经进入美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”以及国家中医药管理局“中国传统医药信息网”(http://www.Medicine China.com)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

《中国中西医结合急救杂志》开设有述评、专题讨论、博士论坛、论著、研究报告、经验交流、病例报告、治则·方剂·针灸、基层园地、临床病理(病例)讨论、消息、读者·作者·编者等栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。同时,本刊倡导学术争鸣,对所投稿件将予以重视,优先考虑。

2006年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订购:022-23042150。

地址:天津市和平区睦南道122号天和医院内;邮编:300050。

(期刊编辑部)