

· 综述 ·

单核细胞增生性李斯特菌脑膜炎免疫应答机制的研究进展

王月^{1,2}, 王晓娟², 关鸿志³, 王芳^{2,4}, 马海畅^{2,5}, 秦灵芝², 金珂^{1,2}, 贾亚珍^{1,2}, 周珂珂^{1,2}, 李玮²

1. 郑州大学人民医院, 河南 郑州 450003

2. 河南省人民医院神经内科, 河南 郑州 450003

3. 中国医学科学院北京协和医院神经内科, 北京 100730

4. 新乡医学院, 河南 新乡 453003

5. 河南大学人民医院, 河南 郑州 450003

摘要: 李斯特菌脑膜炎是单核细胞增生性李斯特菌感染引起的脑膜炎, 具有极高的致死率。对李斯特菌病的发病机制的研究目前主要集中在细菌如何跨肠道屏障、胎盘屏障方面。而免疫学机制及炎症通路有待表征。研究发现在感染早期宿主就能识别细菌 DNA 启动先天性免疫反应, 随后引起相应靶细胞分泌炎症因子启动适应性免疫反应。该文从固有性免疫、适应性免疫反应、补体系统等方面综述了单核细胞增生性李斯特菌脑膜炎发病机制的研究进展。

关键词: 脑膜炎; 单核细胞增生性李斯特菌; 免疫学机制

中图分类号: R742; R517.7

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.04.015

Research advances in immune response mechanism of *Listeria monocytogenes* meningitis

WANG Yue^{1,2}, WANG Xiao-Juan², GUAN Hong-Zhi³, WANG Fang^{2,4}, MA Hai-Chang^{2,5}, QIN Ling-Zhi², JIN Ke^{1,2}, JIA Ya-Zhen^{1,2}, ZHOU Ke-Ke^{1,2}, LI Wei². 1. People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Department of Neurology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China; 3. Department of Neurology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 4. Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 5. People's Hospital of Henan University, Zhengzhou, Henan 450003, China

Corresponding author: LI Wei, Email: liwei71@126.com

Abstract: *Listeria monocytogenes* meningitis is caused by infection with *Listeria monocytogenes* and has a high mortality rate. The research on the pathogenesis of listeriosis is currently focused on how the bacteria cross the intestinal barrier and the placental barrier; however, the specific immunological mechanisms and inflammatory pathways involved in the crossing of the blood-brain barrier need to be characterized. The current studies have shown that the host can recognize bacterial DNA and initiate innate immune response in the early stage of infection and then cause the corresponding target cells to secrete inflammatory factors to initiate adaptive immune response. This article summarizes the research advances in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes* meningitis from the aspects of innate immunity, adaptive immune response, and complement system.

Key words: meningitis; *Listeria monocytogenes*; immunological mechanism

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种食源性致病菌, 能引起人、畜的李斯特菌病。既往研究发现, 细菌使用其毒力因子

内化素 A (internalin A, InlA)、内化素 B (internalin B, InlB) 引起宿主相应受体的聚集、磷酸化及泛素化, 从而跨肠道屏障、血脑屏障进入细胞内。一旦

基金项目: 河南省医学科技攻关计划省部共建项目 (SBGJ2018077)

收稿日期: 2019-11-27; 修回日期: 2020-07-04

作者简介: 王月 (1991-), 女, 住院医师, 硕士, 专业方向神经感染与免疫。

通信作者: 李玮 (1971-), 男, 主任医师, 博士, 主要从事神经感染与免疫方面的研究。Email: liwei71@126.com。

内化入细胞液泡,即可通过分泌李斯特菌溶血素 O (Listeriolysin O, LLO) 和两种磷酸酶破裂液泡逃逸从而避免被宿主清除。但跨血脑屏障的一系列炎症反应尚不清楚。在此,我们总结了 LM 脑膜炎发病机制的最新发生过程及研究进展。

1 流行病学

1.1 流行病学现状

2009 年—2015 年,美国食源性疾病暴发监测系统共收集了 5760 例爆发病例报告,其中感染李斯特菌的人数占住院治疗和死亡总人数的 80%。但由于李斯特菌病发病率的确切数据较少,李斯特菌病在全球范围内的影响仍存在很大的不确定性^[1]。LM 脑膜炎发病率为 3/10 万~6/10 万,但致死率高达 20%~30%^[1-2],且多需经过重症监护治疗,给个人、家庭、国家带来了沉重负担。

1.2 病原学特征

LM 是一种革兰阳性菌,厚壁菌门属,共分为 1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4c、4b、4d、4e、7 和未定义的等 13 种血清型^[3],其中以血清型是 1/2a (谱系 II) 和血清型 1/2b、4b (谱系 I) 最常见,4b 菌株致病性最强。主要毒力因子包括 LLO、磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)、转录调节因子 PrfA (positive regulatory factor A, PrfA)、InlA、InlB 及 InlF。

1.3 生物学特性

LM 是一种人兽共患的胞内寄生菌,广泛分布在自然界中,在家禽、野生动物、鸟类、植物、土壤等动植物或环境中均可检出。LM 最初是一种土壤中的腐生菌,经历了一系列未知过程,逐渐变成机会致病菌^[4,5],其易感人群包括免疫功能缺陷者、器官移植后患者、胎儿、新生儿、孕妇、老年人等。人类主要通过食用受污染的食物致病,但也可通过血液途径、神经逆行途径感染发病^[4]。人体被感染后可出现恶心、呕吐、腹泻、流产、头痛、发热、颈部僵硬及精神状态改变等症状,引起胃肠炎、流产、死胎、败血症及脑膜炎、脑炎等急、危重症疾病。

2 中枢神经系统李斯特菌感染发病机制

中枢神经系统 LM 感染多累及背侧脑干、小脑及第四脑室。《2016 年欧洲急性细菌性脑膜炎诊治指南》中指出成人脑膜炎感染中重要的致病菌就是李斯特菌^[6]。抑制和清除 LM 需要有效的先天性和适应性免疫应答。

LM 可感染多种细胞类型^[7]。单核细胞和中性粒细胞向感染部位的募集对宿主防御 LM 至关重

要。研究发现 LM 通过趋化因子受体 (chemokine receptor, CCR) 显著改变骨髓的造血区室,促进单核细胞的增多,但尚不清楚具体的促迁徙途径,可能需要趋化因子 CCR2 先促单核细胞入血。LM 引起脑膜炎的关键就在于能否通过血脑屏障。其可激活血管内皮细胞中的核因子 kappaB (nuclear factor-kappa B, NF- κ B),促进 P-选择蛋白和 E-选择蛋白、细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附蛋白 1、IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白 1 的表达,而所有这些物质都有助于破坏血脑屏障。体内外实验证明,目前 LM 可能通过以下几种途径进入颅内发挥致病性作用:①寄生在白细胞内由白细胞运输跨过血脑屏障;②血行播散途径;③经口感染后通过神经轴突逆行播散^[8]。其中细菌表面的 InlA、InlB、InlF、Plc、LLO 等在其中发挥重要作用^[9]。InlA、InlB 可分别通过与宿主细胞表面的跨膜分子钙黏连蛋白的第一个细胞外结构域、间叶内皮转化因子及糖胺聚糖相互作用促进细菌侵入肠道屏障、血脑屏障^[8,10-11]。InlF 通过与脑血管内皮细胞上的波形蛋白结合侵入大脑。LM 一旦内化入细胞液泡就能利用 LLO、PlcA 和 PlcB,破裂液泡逃逸从而避免被宿主清除。在此期间 LLO 使吞噬体破裂引起线粒体形态和功能发生短暂的片段化而发挥致病作用。

2.1 先天性免疫反应的启动

血源性细菌通过与血脑屏障相互作用、直接侵入、破坏细胞^[12]或特洛伊木马机制侵入 CNS。特洛伊木马机制是指病原体受到白细胞攻击后通过宿主外周血单核细胞侵入血脑屏障。因此,单核细胞在抗感染的同时也成为了细菌的避难营^[13]。用绿色荧光蛋白标记的细菌感染小鼠发现白细胞内携带的活菌有致中枢神经系统感染的作用^[14]。小鼠病理实验也证实相较于直接侵袭途径,LM 通过吞噬细胞途径更能侵入神经元^[15]。

在 LM 感染人体后,宿主可表达模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 快速识别细菌。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 作为一种 PRR 可通过识别来自细菌和病毒的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMPs) 及细胞损伤相关分子模式在免疫应答中发挥核心作用^[16]。研究发现用 LM 去感染巨噬细胞后,抗 TLR2 单克隆抗体 (TLR2 monoclonal antibody, TLR2MAb) 组能够显著降低细菌的内化,证明了 TLR2 在巨噬细胞吞噬细菌中的关键作用^[17]。白细胞介素 1 受体关联激酶 4

(interleukin 1 receptor associated kinase 4, IRAK4) 是 TLR 通路的中心酶。Pattabiraman 等^[18]发现在用 LM 感染缺乏 IRAK4 的巨噬细胞后, IRAK1、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及 NF- κ B 的激活受损, 最终导致宿主无法启动有效的细胞因子反应。

另外, 胞质传感器也能在数小时后识别胞内细菌。宿主细胞溶质 DNA 传感器 Sox2 识别细菌 DNA 后诱导中性粒细胞表达促炎因子 TNF、IL-6 及 IL-1 β , 启动固有免疫反应进行宿主防御^[19]。细胞内核苷酸结合寡聚化结构域受体 (nucleotide-binding oligomerization domain receptor, NLR) 在中性粒细胞、巨噬细胞中高表达。与家族中的其他成员 NOD1、NOD2、NLRC4 和 NLRP3 不同, NLRP6 主要通过下调 NF- κ B 和 MAPKs 负性调节先天性免疫反应从而抑制细菌的清除^[20]。

LM 感染早期, 干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 同样必不可少。嗜中性粒细胞分泌大量 IFN- γ 以消除细菌^[21]。IL-18 也通过诱导自然杀伤树突状细胞 (natural killing of dendritic cells, NKDC) 产生大量 IFN- γ 起到抗 LM 的作用。通过将 B6 小鼠的 NK 细胞及 NKDC 细胞分选后经静脉迁移至 IFN- γ -/- 受体的小鼠发现, NKDC 是抗 LM 先天性免疫反应的参与者, 同时还能将抗原呈递给幼稚 T 细胞^[22]。与之类似, 在结核性脑膜炎 (tuberculous meningitis, TBM) 感染期间, DC 可通过多种受体, 如 TLR9、树突状细胞相关性 C 型植物血凝素 1 识别 PAMPs 进行抗原呈递, 引起 T 淋巴细胞的活化和增殖, 从而将固有免疫与适应性免疫反应连接起来。

2.2 适应性免疫应答

先天性免疫反应只能清除小剂量的 LM 并限制其在 C57BL/6 小鼠中指数增殖, 因此, 适应性免疫反应在实现保护性免疫方面就显得非常有必要了^[23]。参与抗 LM 适应性免疫应答的细胞主要是 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞, 其中 CD8⁺细胞毒性 T 细胞在控制李斯特菌感染方面比 CD4⁺细胞发挥着更重要的作用。T 辅助细胞因分泌的效应因子不同分为 Th1 和 Th2 效应细胞。Th1 细胞产生 IL-2、IFN- γ 及 TNF- β 介导细胞免疫促炎功能, Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等增强体液免疫。IFN- γ 由 NK、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞产生, 通过激活不同的反应防止细菌、寄生虫和病毒等引起的侵入性感染, 是先天性和适应性免疫反应的潜在纽带。

最近有研究通过对鸟苷三磷酸酶超家族进行功能丧失筛选, 发现鸟苷酸结合蛋白 (guanylate-binding protein, Gbps) 与其他 IFN (IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 和 IFN- γ) 及 TLR 配体相比被强烈诱导。siRNA、DNA 沉默和染色体缺失技术都证实了 Gbps 是一类感染条件下宿主防御激活蛋白^[24]。IFN- γ 受体缺失小鼠表现上没有明显的异常, 免疫系统发育似乎也正常, 但其对 LM 的易感性增加^[25]。LM 感染宿主后, CD8⁺T 细胞数量先增加, 之后急剧缩减, 留下所谓的“记忆细胞”。该细胞在杀死受感染细胞的同时清除 LM 并保持对它的记忆, 为第二次免疫应答做准备^[26]。Badovinac 等^[27]发现, 在 LM 感染前使用抗生素可以在细胞无收缩的情况下促进功能抗原特异性记忆 CD8⁺T 细胞的发育。CD8⁺T 细胞收缩的缺失与早期感染后炎症、IFN- γ 和抗原 CD8⁺T 细胞表达的 IL-7R 相关。

2.3 补体系统的贡献

补体系统的 3 种途径最终汇聚于补体 3 (complement 3, C3), 并最终生成 C3b、C3a、C5a 以及膜攻击复合物。LM 的调理作用主要取决于经典补体途径。C3b 与多种受体结合, 如 CR1、CR3 和 CR4, 促使单核巨噬细胞系和中性粒细胞吞噬细菌^[25]。C3b 受体通过提高吞噬体-溶酶体融合能力、增加吞噬体中氯离子浓度和酸化, 促进胞内细菌的快速被吞噬^[25]。C3a 和 C5a 是免疫调节剂及重要的过敏毒素, 可将吞噬细胞吸引到感染部位激活细胞吸收细菌, 同时募集抗体并启动抗 LM 脑膜炎适应性免疫反应。C5a 过敏毒素受体通过降低 IFN- α 和 IFN- β 的表达保护宿主^[26]。2014 年, 一项前瞻性队列研究中分析了 LM 脑膜炎患者的脑脊液成分, 发现预后不良患者的脑脊液中 C3a 水平升高^[27]。因此, 仍需更深入的研究明确补体各组在人类 LM 脑膜炎中的总体效应。

3 结语及展望

在 LM 感染早期, 宿主胞质传感器识别细菌 DNA 启动先天性免疫反应, 减缓细菌感染的进程。随后补体系统募集抗体启动适应性免疫反应。CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞分泌炎症因子也在适应性免疫反应中发挥作用。过去的几十年间, 虽然蛋白组学、基因组学、转录组学的应用揭示出 LM 的许多发病机制, 但仍有许多问题尚待解决。问题涉及 LM 入侵的 CNS 的关键靶标、LM 感染状态下肠道屏障和血脑屏障的关联性、LM 与肠道菌群的关系。

系以及它由土壤菌株到临床菌株的转变问题等等。新的微生物纪元已经到来,将来我们必能找出这些问题的答案。

参 考 文 献

- [1] de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Inf Dis*, 2014, 14(11): 1073-1082.
- [2] Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States[J]. *Inf Genet Evol*, 2015, 35: 172-183.
- [3] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(1): 32-46.
- [4] Tiensuu T, Guerreiro DN, Oliveira AH, et al. Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing *Listeria monocytogenes* to transition from a saprophyte to a killer[J]. *Microbiology*, 2019, 165(8): 819-833.
- [5] Freitag NE, Port GC, Miner MD. *Listeria monocytogenes*-from saprophyte to intracellular pathogen[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9): 623-628.
- [6] van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(Suppl 3): S37-S62.
- [7] Lam JGT, Vadia S, Pathak-Sharma S, et al. Host cell perforation by listeriolysin O (LLO) activates a Ca^{2+} -dependent cPKC/Rac1/Arp2/3 signaling pathway that promotes *Listeria monocytogenes* internalization independently of membrane resealing[J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(3): 270-284.
- [8] Al-Obaidi MMJ, Desa MNM. Mechanisms of blood brain barrier disruption by different types of bacteria, and bacterial-host interactions facilitate the bacterial pathogen invading the brain[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(7): 1349-1368.
- [9] Osborne SE, Brumell JH. Listeriolysin O: from bazooka to Swiss army knife[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol*, 2017, 372(1726): 20160222.
- [10] Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(12): 926-937.
- [11] Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(6): 430-436.
- [12] Tuomanen E. Entry of pathogens into the central nervous system[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1996, 18(4): 289-299.
- [13] Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(3): 584-640.
- [14] Drevets DA, Jelinek TA, Freitag NE. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1344-1350.
- [15] Prats N, Briones V, Blanco MM, et al. Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with *Listeria monocytogenes*[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992, 11(8): 744-747.
- [16] Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins[J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6).
- [17] ShenY, Kawamura I, Nomura T, et al. Toll-like receptor-2 and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(6): 2857-2867.
- [18] Pattabiraman G, Murphy M, Agliano F, et al. IRAK4 activity controls immune responses to intracellular bacteria *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium smegmatis*[J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 104(4): 811-820.
- [19] Xia P, Wang S, Ye B, et al. Sox2 functions as a sequence-specific DNA sensor in neutrophils to initiate innate immunity against microbial infection[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(4): 366-375.
- [20] Anand PK, Malireddi RK, Lukens JR, et al. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 389-393.
- [21] Wang G, Lin A, Han Q, et al. IFN- γ protects from apoptotic neutrophil-mediated tissue injury during acute *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(9): 1470-1480.
- [22] Plitas G, Chaudhry UI, Kingham TP, et al. NK dendritic cells are innate immune responders to *Listeria monocytogenes* infection[J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4411-4416.
- [23] D'Orazio SEF. Innate and Adaptive Immune Responses during *Listeria monocytogenes* Infection[J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(3).
- [24] Kim BH, Shenoy AR, Kumar P. A family of IFN- γ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection[J]. *Science*, 2011, 332(6030): 717-721.
- [25] Huang S, Hendriks W, Althage A. Immune Response in Mice That Lack the Interferon- γ Receptor[J]. *Science*, 1993, 259(5102): 1742-1745.
- [26] Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8 $^{+}$ T cell effector mechanisms in resistance to infection[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 275-308.
- [27] Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. CD8 $^{+}$ T cell contraction is controlled by early inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(8): 809-817.