

· 综述 ·

秀丽隐杆线虫在抗感染研究中的应用

胡滢海^{1,2}, 李德东², 赵兰雪^{1,2}, 王彦², 姜远英² (1. 福建中医药大学药学院中药学教研室, 福建福州 350108; 2. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 介绍秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)作为模式生物宿主在抗感染研究中的应用,为秀丽隐杆线虫在抗感染研究领域的进一步应用提供参考。方法 参阅近年来国内、外相关文献,对其进行分析、整合及归纳。结果 发现秀丽隐杆线虫具有生长周期短、成本低等特点,被广泛用于病原微生物致病机制的研究以及抗感染药物的研发。结论 秀丽隐杆线虫在病原微生物致病机制研究和抗感染药物研发中有广阔的应用前景。

[关键词] 秀丽隐杆线虫;病原微生物;致病机制;抗感染药物

[中图分类号] R931.74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0005-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.002

Application of *Caenorhabditis elegans* in anti-infective research

HU Ganhai^{1,2}, LI Dedong², ZHAO Lanxue^{1,2}, WANG Yan², JIANG Yuanying² (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350108 China; 2. New Drug Research and Development Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To update the application of *Caenorhabditis elegans* as a model host of infection in anti-infection research field, and provide references for the further application of *C. elegans* in the research field. **Methods** The related literatures at home and abroad in recent years were analyzed, integrated and concluded. **Results** *C. elegans* had been widely used to study pathogenesis of microorganisms and to screen anti-infective agents, since the nematodes had short life cycle and cost low. **Conclusion** *C. elegans* would be promising to be further more widely used to study pathogenesis and anti-infective agents.

[Key words] *Caenorhabditis elegans*; pathogenic microorganisms; pathogenesis; anti-infective agents

长期以来,医药领域的科研人员大多应用哺乳动物研究病原微生物的致病机制,然而哺乳动物(如小鼠)作为宿主涉及到伦理学问题,实验周期长且成本高,无法满足大规模高通量、低成本的筛选要求。无脊椎动物模型为病原微生物致病机制研究和抗感染药物研发提供了新方案。目前比较成熟的无脊椎动物模型包括秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*,简称线虫)^[1]、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[2]、斑马鱼(zebra fish)^[3]等。线虫模型用于高通量筛选方面有得天独厚的优势,本文重点对线虫在抗病原微生物方面的研究进行综述。

1 线虫的生理学特点

20世纪60—70年代, Brenner^[4]率先将线虫作

为模式生物用于科学研究。线虫成虫长约1 mm,直径约50 μm,分为雌雄同体和雄性个体。每条雌雄同体的成熟期线虫由959个细胞组成,其中包括302个神经细胞,213个皮下细胞和34个肠道细胞。一条雌雄同体的野生型线虫可生育大约300个后代,若与雄虫交配则后代更多,可多达上千个。线虫的平均寿命为2~3周,3~5 d繁殖一代^[5]。幼虫在经历L1, L2, L3, L4这4个阶段后长成成虫。每个阶段都需经历蜕皮^[6],当食物供给不足时,幼虫会进入一种叫作"dauer"的状态,这种状态下的幼虫可在干燥及缺乏食物等极端恶劣条件下长时间存活,环境改善后(如食物供给恢复),它们经蜕皮可恢复为正常的成虫^[6,7]。

2 线虫在病原菌致病机制研究中的应用

近年来,线虫在病原菌研究中的应用越来越广泛,目前已证实有大约35种人类致病菌(包括G⁺菌, G⁻菌和真菌)会对线虫造成感染^[8],其致病机制和致病因子与其在哺乳动物中的表现有极大的相似

[基金项目] 国家自然科学基金(81273558, 81072678, 90913008); 国家重点基础研究发展计划(2013CB531602); 国家科技部科技重大专项(2011ZX09102-002-01); 上海市科技重点项目(10431902200)。

[作者简介] 胡滢海,男,硕士研究生。E-mail: ganhaihu1988@163.com。

[通讯作者] 王彦。E-mail: wangyansmmu@126.com。

之处。

2.1 线虫在细菌致病机制研究中的应用

2.1.1 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种常见的 G⁺ 菌, 易造成机体局部感染, 严重者可危及生命^[9]。Garsin 等发现金黄色葡萄球菌可在线虫 (N2 strain) 肠道内形成菌落破坏宿主肠道上皮细胞, 进而破坏组织器官, 导致线虫死亡^[10-12]。科学家们已经开始用线虫研究金黄色葡萄球菌的关键致病因子。agr 和 sarA 是金黄色葡萄球菌感染哺乳动物的重要毒力因子, 其缺失菌对线虫的致病力显著降低, 与在哺乳动物模型中的表现相似^[12]。

2.1.2 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 是一种存在于人体消化道内的条件致病菌, 可引起多种疾病, 包括感染性心内膜炎^[13]。Garsin 等建立了线虫 (N2 strain) 的粪肠球菌持久感染模型^[10]。极少量的粪肠球菌即可造成线虫肠道感染, 并导致严重的肠道肿胀, 在 4 d 左右的时间里约 50% 的线虫死亡^[10]。溶菌素 cyl 是该菌感染线虫的重要毒力因子^[10]。此外, 粪肠球菌群体感应调节因子 fsr/geIE-sprE 也是导致线虫感染的重要因素, fsr 缺失菌在同样的实验条件下对线虫的致病力大大降低^[10,14,15]。粪肠球菌的感染还可导致线虫体内活性氧增加。有研究显示, 线虫在被感染粪肠球菌的部位有脂褐质累积, 而脂褐质是由氧化损伤产生的天然色素^[16,17]。

2.1.3 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种人类生活环境中普遍存在的 G⁻ 菌。Mahajan-Miklos 等发现该菌导致线虫发病的机制与环境因素有关^[18,19]。在营养丰富的培养基中, 绿脓杆菌 PA14 菌株是通过释放一种酚嗪类化合物在数小时之内杀死线虫 (N2 strain), 被称为“快速致死”^[18]。在营养匮乏的培养基中, 绿脓杆菌 PA14 可导致线虫一种类似哺乳动物肠道感染的病理状态, 在数天后杀死线虫, 称为“缓慢致死”。“缓慢致死”主要依赖于绿脓杆菌在肠道中的累积, 当感染的细菌数量达到一定阈值时导致永久性感染, 如果感染达不到一定的细菌数量, 线虫可以恢复健康状态^[11]。

2.2 线虫在真菌致病机制研究中的应用

2.2.1 白念珠菌 (*Candida albicans*) 是一种普遍存在于人体内的条件致病真菌, 当机体免疫力明显下降时可导致全身感染, 严重感染时危及生命^[20]。白念珠菌可对线虫 (*glp-4; sek-1 strain*) 造成持续的、致死性的感染^[21]。“酵母态-菌丝态相互转换”是影响白念珠菌对哺乳动物致病的关键因素^[22]。酵母态和菌丝态的白念珠菌对线虫

(*glp-4; sek-1 strain*) 均有致病力^[23,24]。Pukkila-Worley 等发现白念珠菌的菌丝态生长可导致线虫死亡^[24,25]。Gantner 等发现, 把被感染的白念珠菌的线虫 (N2 strain 和 *fer-15, fem-1 strain*) 继续放在固体培养基中培养, 而不是转移到液体培养液中, 白念珠菌以酵母态存在于线虫的肠道, 造成肠道膨胀而使线虫死亡^[26-28]。

线虫 (*glp-4, sek-1 strain*) 感染模型还可用于研究致病菌之间的相互作用, 例如白念珠菌与众多原核生物感染的相互作用^[29]。线虫可在被白念珠菌感染 4 h 后, 再被鲍曼不动杆菌、绿脓杆菌^[29] 或鼠伤寒沙门菌^[30] 感染。在上述情况下, 某些 G⁻ 菌可抑制白念珠菌菌丝的形成, 而菌丝形成能力的下降, 这意味着白念珠菌致病力的降低^[29,30]。由此可见, 不同的致病菌同时感染线虫, 病原菌之间存在相互作用和相互制约, 而线虫模型为体内研究致病菌的相互作用提供了研究平台。

2.2.2 新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 是一种普遍存在于环境中的具有荚膜的条件致病真菌, 它一般呈酵母态, 可致多种动物感染真菌病, 尤其在免疫力低下的人群易感^[31,32]。将新型隐球菌留存在线虫 (N2 strain) 的肠道内, 可在感染 2~7 d 后导致线虫死亡^[31,32]。如果在短接触新型隐球菌后就将线虫转移至正常线虫培养环境, 新型隐球菌可从线虫肠道内清除, 避免发生感染。荚膜是体现新型隐球菌的关键因素, 但有意思的是 Mylonakis 等发现, 无荚膜的新型隐球菌对线虫同样有致病力, 而且在营养丰富的 BHI 培养基中, 即使热灭活的新隐球菌 H99 也可导致线虫的寿命缩短^[31]。新型隐球菌导致线虫感染的机制目前尚不清楚, 但其致病机制与对哺乳动物的致病机制存在相通之处^[31-33]。gps1 或者 pkal 基因缺失的新型隐球菌在哺乳动物模型上的致病力降低, 而 pkr1 基因缺失的新型隐球菌在哺乳动物模型上的致病力增强; 在线虫感染模型中, 各基因缺失菌的结果与在哺乳动物模型上的结果一致^[32]。

3 线虫在抗感染药物筛选中的应用

3.1 线虫在抗细菌药物筛选中的应用 如上所述, 由于多种人类病原体可导致线虫感染^[8-34], 因此可以利用线虫感染模型来筛选抗菌药物。Moy 等^[35] 建立了线虫 (*glp-4, sek-1 strain*)-粪肠球菌感染模型, 高通量筛选了 6 000 个人工合成的化合物以及 1 136 个天然产物单体化合物, 发现 16 个合成化合物以及 9 个天然产物可显著延长被感染线虫的存活率。有意义的是, 有些化合物在体内比

体外显示出更好的活性,可以推测这些化合物可能作用于细菌的毒力因子或者可以改善宿主的免疫应答。16个化合物中15个没有毒性,仅有1个化合物能使线虫的生长滞后^[35]。Moy等^[36]运用改进的筛选方法,对33 931种合成化合物以及3 283种天然产物单体化合物进行了筛选,发现28种化合物及天然产物具有抗粪肠球菌活性,其中6个化合物虽然能延长线虫的存活率,但在体外不具有抑制粪肠球菌的活性,这些药物的作用机制可能与目前的抗生素不同,它们更可能是以一种免疫调节剂或者是毒力因子的抑制剂而发挥作用的^[36]。

绿脓杆菌的耐药性问题日益引起研究人员的关注。Zhou等^[37]建立了线虫(*glp-4, sek-1 strain*)-绿脓杆菌感染模型,高通量筛选了1 300种提取物,发现36个提取物能够延长感染绿脓杆菌线虫的寿命,其中仅有4个在体内、体外对耐药绿脓杆菌均具有活性。运用线虫感染模型来筛选抗菌药物可发现很多在体外筛选中落选的候选药物^[37]。

3.2 线虫在抗真菌药物筛选中的应用 常用的抗真菌药物对白念珠菌感染的线虫有显著的保护作用^[21],可以利用线虫(*glp-4, sek-1 strain*)-白念珠菌感染模型来高通量地筛选具有抗真菌活性的化合物^[21-38]。Breger等^[21]筛选了1 266种化合物,其中15个化合物对白念珠菌感染线虫有保护作用,线虫的存活率显著提高,白念珠菌在线虫体内的菌丝形成能力被明显抑制。Okoli等^[38]对线虫(*glp-4, sek-1 strain*)-白念珠菌感染筛选模式进行了改进,筛选了3 228个化合物,其中有1 948个为FDA批准的药物,其余的1 280个为小分子化合物,研究发现其中19个化合物对白念珠菌感染线虫有保护作用,可显著提高线虫的存活率。

Coleman等^[39]运用线虫(*glp-4, sek-1 strain*)-白念珠菌感染模型观察了2 560种天然皂苷类化合物的抗真菌活性,12种皂苷被证实具有抗真菌活性。研究者对其中2个皂苷A16和A19进行了深入研究,发现皂苷A16和A19可以抑制白念珠菌菌丝和生物被膜的形成。溶血实验显示,A16和A19皂苷没有溶血毒性,因此有进一步研发的价值^[39]。

4 结语

线虫实验成本低、周期短,不受伦理学制约,不需要哺乳动物实验所必需的、烦琐的审批过程。在筛选具有抗感染活性的化合物研究中,线虫模型综合考虑了宿主、病原微生物和药物三者之间的相互作用,与体外模型相比更有助于发现高效、低毒的候选新药。当前,利用线虫模型筛选抗感染新药已经

实现了自动化、高通量^[21],其筛选效率与体外高通量筛选接近。线虫模型在抗感染研究领域必将有广泛的应用前景。

【参考文献】

- [1] Millet A, Ewbank JJ. Immunity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16(1):4-9.
- [2] Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, et al. The drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(11):862-874.
- [3] Trede NS, Langenau DM, Traver D, et al. The use of zebra fish to understand immunity [J]. *Immunity*, 2004, 20(4):367-379.
- [4] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1):71-94.
- [5] Byerly L, Cassada R, Russell R. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction [J]. *Devel Biol*, 1976, 51(1):23-33.
- [6] Cassada RC, Russell RL. The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Devel Biol*, 1975, 46(2):326-342.
- [7] Albert PS, Brown SJ, Riddle DL. Sensory control of dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Compar Neur*, 1981, 198(3):435-451.
- [8] Sifri CD, Begun J, Ausubel FM. The worm has turned-microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Trends Microbiol*, 2005, 13(3):119-127.
- [9] Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus* [J]. *Intern J Med Microbiol*, 2010, 300(2):98-103.
- [10] Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(19):10892-10897.
- [11] Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, et al. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus* [J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(7):1-24.
- [12] Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, et al. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(4):2208-2217.
- [13] Ogawa T, Sato M, Yonekawa S, et al. Infective endocarditis caused by enterococcus faecalis treated with continuous infusion of ampicillin without adjunctive aminoglycosides [J]. *Intern Med*, 2012, 52(10):1131-1135.
- [14] Maadani A, Fox KA, Mylonakis E, et al. Enterococcus faecalis mutations affecting virulence in the *Caenorhabditis elegans* model host [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(5):2634-2637.
- [15] Sifri CD, Mylonakis E, Singh KV, et al. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(10):5647-5650.
- [16] Chávez V, Mohri-Shiomi A, Maadani A, et al. Oxidative stress enzymes are required for DAF-16-mediated immunity due to generation of reactive oxygen species by *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2007, 176(3):1567-1577.

- [17] van der Hoeven R, McCallum KC, Cruz M R, *et al.* Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans* [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(12):1-14.
- [18] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, *et al.* Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans*. *Pathogene Model*[J]. *Cell*, 1999, 96(1):47-56.
- [19] Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel F M. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96(2):715-720.
- [20] Kabir MA, Hussain MA. Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview [J]. *Expert Rev Anti-infect Ther*, 2009, 7(1):121-134.
- [21] Breger J, Fuchs B B, Aperis G, *et al.* Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay [J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(2):0168-0178.
- [22] Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms [J]. *Virulence*, 2013, 4(2):119-128.
- [23] Pukkila-Worley R, Ausubel F M, Mylonakis E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(6):1-13.
- [24] Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, *et al.* *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model [J]. *Eukary cell*, 2009, 8(11):1750-1758.
- [25] Pukkila-Worley R, Mylonakis E. From the outside in and the inside out: antifungal immune responses in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Virulence*, 2010, 1(3):111-112.
- [26] Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments [J]. *EMBO J*, 2005, 24(6):1277-1286.
- [27] Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, *et al.* An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(1):67-78.
- [28] Jouault T, Sarazin A, Martinez - Esparza M, *et al.* Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans* [J]. *Cellular Microbiol*, 2009, 11(7):1007-1015.
- [29] Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, *et al.* Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105(38):14585-14590.
- [30] Tampakakis E, Peleg AY, Mylonakis E. Interaction of *Candida albicans* with an intestinal pathogen, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. *Eukary Cell*, 2009, 8(5):732-737.
- [31] Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, *et al.* Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(24):15675-15680.
- [32] van den Berg MC, Woerlee JZ, Ma H, *et al.* Sex-dependent resistance to the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* [J]. *Genetics*, 2006, 173(2):677-683.
- [33] Tang RJ, Breger J, Idnurm A, *et al.* *Cryptococcus neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans* progeny-based approach [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(12):8219-8225.
- [34] Powell JR, Ausubel FM. Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens [J]. *Meth Mol Biol*, 2008, 415:403-427.
- [35] Moy T I, Ball A R, Anklesaria Z, *et al.* Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(27):10414-10419.
- [36] Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, *et al.* High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model [J]. *ACS Chem Biol*, 2009, 4(7):527-533.
- [37] Zhou YM, Shao L, Li JA, *et al.* An efficient and novel screening model for assessing the bioactivity of extracts against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(9):1746-1751.
- [38] Okoli I, Coleman J J, Tempakakis E, *et al.* Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay [J]. *PLoS One*, 2009, 4(9):1-8.
- [39] Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, *et al.* Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans* [J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(3):321-332.

[收稿日期] 2013-07-04 [修回日期] 2013-11-17

[本文编辑] 李睿昊

(上接第4页)

- [26] Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100:14327-14332.
- [27] Phillips AJ, Crowe JD, Ramsdale M. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103:726-731.
- [28] Cao YY, Huang S, Dai BD, *et al.* *Candida albicans* cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism [J]. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46:183-189.
- [29] Clancy CJ, Wingard JR, Hong-Nguyen M. Subcutaneous phaeohyphomycosis in transplant recipients: review of the literature and demonstration of invitro synergy between antifungal agents [J]. *Med Mycol*, 2000, 38(2):169-175.
- [30] Ellis M, Watson R, McNabb A, *et al.* Massive intracerebral aspergillosis responding to combination high dose liposomal amphotericin B and cytokine therapy without surgery [J]. *J Med Microbiol*, 2002, 51(1):70-75.

[收稿日期] 2013-03-12 [修回日期] 2013-09-02

[本文编辑] 李睿昊