

# 一种可用于中药抗感染研究的杆状线虫整体生物模型

宫毓静, 范 斌, 陈 岩, 周艳华, 孙明杰\*

(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 基于宿主免疫防御系统与病原体之间的相互影响, 以及药物的干预作用, 对线虫-病原体模型的特点及其在抗感染药物研究中的应用进行了综述。应用线虫-病原体模型可系统考察中药对宿主免疫功能、微生物毒力因子及药物对宿主的细胞毒性等多环节的影响, 为全面揭示中药抗微生物的作用机制提供科学的依据。

[关键词] 线虫-病原体模型; 抗微生物中药; 综述

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2009)04-0087-03

## A *Caenorhabditis Elegans* Host-Pathogen Model Used for Antimicrobial Traditional Chinese Medicine Study

GONG Yu-jing, FAN Bin, CHEN Yan, ZHOU Yan-hua, SUN Ming-jie\*

(The Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Based on the relationship between host immunity defense system and pathogen, and the intervention of drug, *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model is reviewed for the study in the immunity effect of traditional Chinese medicine (TCM) on the host, and in inhibition of the pathogen virulence and the cytotoxicity of TCM to the host. It will provide us the scientific evidence of the mechanism of antimicrobial TCM.

[Key words] *Caenorhabditis elegans*-pathogen models; antimicrobial traditional Chinese medicine; review

持续增长的抗生素耐药细菌和微生物及即将来临的生物战的威胁急需新的抗感染治疗。当前抗微生物药物研究瓶颈在于筛选和评价药物药效模型的局限性, 如化合物库中毒性化合物的高背景或者化合物具有较差的药物动力学性质, 多数合成的化合物不能穿透革兰氏阳性细菌的多种药物耐药屏障<sup>[1-2]</sup>, 即药物的体外实验结果和需要药物发挥功能的生物系统之间缺少必然的联系。因此, 建立高效的筛选系

统应包括对高毒性、药代动力学性质差或体内外相关性差的药物进行有效的剔除。“正气存内, 邪不可干”是中医药的基本思想, 一方面, 宿主在不断的进化中发展了对外侵微生物的免疫防御功能; 另一方面, 许多微生物的毒性特征只有在宿主中被诱导出来, 所以在研究药物特别是中药对病原体感染引起的疾病时, 应该同时考虑宿主和病原体之间的相互关系, 以及药物对二者的影响。

### 1 杆状线虫整体生物模型的特点

1.1 与哺乳动物基因的相似性 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是线形动物门, 线虫纲动物。英国 Brenner 于 1974 年发现线虫细胞数量不多, 功能也不复杂, 身体透明, 很容易在显微镜下对其细胞和组织进行跟踪观察, 是研究生物学理想的模型动物<sup>[3]</sup>。线虫作为模式生物具有

[收稿日期] 2008-08-14

[基金项目] 中国中医科学院自主选题(ZX-(ZZXT)-2006-008)

[通讯作者] \* 孙明杰, Tel: (010) 64014411-3324; E-mail: sunmj@mail.cintcm.ac.cn

饲养简单, 生命周期短, 繁殖发育快, 易繁殖等特点。已经有全部的基因组序列。长时间与土壤中的微生物接触使线虫进化了对病原微生物的防御反应, 某些病原体在线虫体内通过感染的过程分化繁殖后杀死线虫, 某些病原体是通过释放毒素杀死线虫<sup>[4-5]</sup>。线虫和微生物这种关系使线虫成为一个颇具吸引力的宿主-病原体模型。由于发现了哺乳动物和线虫基因以及病原体对哺乳宿主和线虫的发病机理具有很强的相似性<sup>[6-9]</sup>, 为发展应用活的线虫模型筛选微生物毒力因子奠定了基础。

**1.2 对人类致病菌具敏感性** 线虫是一种有用的和简单的模式宿主, 可以被非常多的人类致病菌感染和杀死, 其中包括革兰氏阴性细菌绿脓杆菌和沙门氏菌, 革兰氏阳性细菌粪肠球菌和金黄色葡萄球菌, 以及致病性微生物新生隐球菌等<sup>[10-11]</sup>。线虫模型可对多种病原体的感染进行实时简单的检测。因为引起此模型感染的致病因素与引起哺乳动物致病的因素明显交叠, 且二者的主要免疫反应特征具有一致性。哺乳动物的致病机制和杀死线虫的细菌毒力因素有广泛的叠加<sup>[12-13]</sup>。另外, 线虫的致病机制模型显示线虫和哺乳动物的固有免疫反应的主要特性被保存下来。应用该模型, 通过研究微生物毒力因子, 以及宿主和病原体之间的关系<sup>[14-21]</sup>, 可以随机筛选病菌的毒力因子, 发现宿主发病的分子机制和病原体如何侵入免疫系统, 用于联合阐明病原体和宿主的遗传性, 以说明发病机制和抵御机制的分子机理。

**1.3 在抗感染药物研究中的应用** 线虫整体生物模型可用于研究病原菌致病的分子基础和发现抗微生物化合物, 特别是体外实验不大可能发现的某些具活性的化合物。实验过程简单, 可控, 适用于高通量的筛选和遗传分析。Moy 等<sup>[22]</sup>用感染粪肠杆菌的线虫模型筛选了 6 000 个合成的化合物和 1 136 个天然提取物, 其中 16 个化合物和 9 个提取物具有提高线虫生存率的活性, 不仅可鉴定体外抑制粪肠杆菌复制的化合物, 而且鉴定了在体内实验中效应剂量小于体外最低抑菌浓度的分子。

绝大多数在体外具有抗微生物活性的化合物对哺乳动物细胞有毒性。而整体念珠菌感染线虫模型可同时评价药物的抗微生物活性和对宿主的毒性, 从而可以解决一些目前开发抗微生物药物的主要难题。Breger 等发现<sup>[23]</sup>白色念珠菌和其他种的念珠菌可以被线虫吃下, 并且在线虫的肠腔建立持久的致命性感染。念珠菌介导的线虫体内实验不仅能高通量筛选具有抗微生物活性的药物, 而且同时可筛选出对宿主有毒的化合物。在筛选中发现的影响体内念珠菌毒力因子的化合物可以被用作“探针化合物”, 可能具有抗其他微生物的活性。微生物对哺乳动物和非脊椎动物模型宿主(例如线虫)的致病机制的共同性的发现, 可在活体动物模型上微生物毒力因子的高通量遗传分析的发展提供基础。

总之, 线虫-病原体实验不仅可以发现在体外影响微生物生长和在体内影响致病菌毒力因子, 或影响宿主免疫调节能力的药物, 而且可考察不同类型化合物的不同作用机制,

进而为说明抗微生物联合应用可能会产生叠加或者协同的作用奠定基础。

## 2 线虫整体生物模型的优点

线虫易于培养, 和哺乳动物的基因具有相似性, 线虫整体生物模型的筛选结果与哺乳动物实验结果和临床疗效有较好的相关性; 线虫可被不同的病原微生物感染, 这适合于筛选广谱和窄谱抗生素的研究; 自动地进行宿主毒性的检测, 因为我们需要对线虫的正常生理没有副作用的药物; 自动检测药物体内的有效性; 自动检测到可以被宿主转化为有效抗微生物药物的前体化合物; 筛选发现以前没有发现的作用于毒力因子的药物(或者其他体内生存的重要功能), 与病原微生物的体外生长可能没有干扰; 筛选发现提高宿主免疫力的药物。总之, 整体线虫筛选模型可以帮助发现在体外筛选中不能被发现的活性化合物, 而用整体动物模型的方法代价太昂贵和效率太低。

## 3 线虫-病原体模型应用于中药抗微生物作用研究

对中药抗微生物的作用机制和活性评价是被关注的重要问题。国内外学者对中草药抗微生物试验作了大量筛选, 希望发现杀灭微生物的明确作用物质和作用机制。临床报道有效的中药在体外的抗微生物筛选中常常并没有表现出较强的抗微生物活性, 但一直以来研究的焦点仍放在对杀灭微生物或抑制微生物生长的单一有效物质寻找。体外的筛选实验没有考虑宿主的病理状态和免疫功能。单体化合物直接杀灭病原体可能是中药抗微生物的一个作用机制, 但不足以全面解释抗微生物中药的临床疗效和作用机制。

中药的抗微生物机理是非常复杂的, 中药的作用机制不仅是单纯直接对抗病原微生物, 也可能是间接地提高免疫力, 或是减低病原微生物的毒力因子等; 有人发现, 有些方剂中的各种单味药虽无明显抗微生物活性, 但其复方对某些实验性动物微生物感染则有一定治疗效果。

应用线虫-病原体模型, 研究中药单味药和复方对病原体和线虫的作用, 追踪中药中抗微生物的有效成分组群和有效成分, 并对有效成分进一步分离鉴定、进行作用机理的探讨, 与药物在体外抗浮游病原体的作用结果相结合, 从直接杀灭或抑制病原体和提高宿主机体免疫力方面综合探讨中药抗微生物的作用机制, 能同时评价药物的抗病原体活性和对宿主的细胞毒性, 能够发现与人类微生物感染相关的中药途径的靶点, 为全面解释中药抗微生物的作用机制和建立抗微生物药物评价标准提供可能, 而且该模型高通量特性使开展中药复方多成分及不同配伍研究成为现实可行。

然而, 线虫用于抗微生物的研究仍具有一定的局限性。首先, 应用线虫(或其他非脊椎动物宿主模型)不可能完全排除毒性化合物, 即使是在哺乳动物和线虫中不同的化合物的毒性之间有合理的联系。另外, 应用这种模型去研究药物动力学变量非常困难。再者, 线虫只有天然的免疫防御, 对于获得性免疫的研究还需要在脊椎动物模型上研究。

[参考文献]

- [ 1 ] Lewis K, Lomovskaya, O. Bacterial Resistance to Antimicrobials: Mechanisms, Genetics, Medical Practice and Public Health[M]. New York: Dekker, 2002. pp. 61-90.
- [ 2 ] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria[J]. *Drugs*, 2004, 64: 159-204.
- [ 3 ] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [ J ]. *Genetics*, 1974, 77( 1 ): 71-94.
- [ 4 ] Kurz CL, Ewbank JJ. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions[ J ]. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 142-144.
- [ 5 ] Ewbank JJ. Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*[ J ]. *Microbes Infect.* 2002, 4: 247-256.
- [ 6 ] The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology[ J ]. *Science*, 1998, 282: 2012-2018.
- [ 7 ] Harris TW, Chen N, Cunningham F, *et al.* WormBase: a multi-species resource for nematode biology and genomics [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: D411-D417.
- [ 8 ] Kuwabara PE, O'Neil N. The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease[ J ]. *J. Inherit. Metab Dis*, 2001, 24: 127-138.
- [ 9 ] Lai CH, Chou CY, Chang LY, *et al.* Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics [ J ]. *Genome Res*, 2000, 10: 703-713.
- [ 10 ] Ewbank JJ. Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*[ J ]. *Microbes Infect.* 2002, 4: 247-256.
- [ 11 ] Sifri CD, Begun J, Ausubel FM. The worm has turned—microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*[ J ]. *Trends Microbiol*, 2005, 13: 119-127.
- [ 12 ] Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions [ J ]. *Infect. Immun*, 2005, 73: 3833-3841.
- [ 13 ] Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, *et al.* A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98( 19 ): 10892-10897.
- [ 14 ] Labrousse A, Chauvet S, Couillault C, *et al.* *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*[ J ]. *Curr Biol*, 2000, 10( 23 ): 1543-1545.
- [ 15 ] Sifri CD, Begun J, Ausubel FM. The worm has turned—microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*[ J ]. *Trends Microbiol*, 2005, 13( 3 ): 119-127. Review.
- [ 16 ] Labrousse A, Chauvet S, Couillault C, *et al.* *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*[ J ]. *Curr Biol*, 2000, 10( 23 ): 1543-1545.
- [ 17 ] Sifri CD, Baresch-Bernal A, Calderwood SB, *et al.* Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model [ J ]. *Infect Immun*, 2006, 74( 2 ): 1091-1096.
- [ 18 ] Begun J, Sifri CD, Goldman S, *et al.* *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model [ J ]. *Infect Immun*, 2005, 73( 2 ): 872-877.
- [ 19 ] Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, *et al.* Long-lived *C. elegans* *daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens [ J ]. *Science*, 2003, 300( 5627 ): 1921.
- [ 20 ] 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.
- [ 21 ] Aballay A, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions[ J ]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5( 1 ): 97-101. Review.
- [ 22 ] Moy TI, Ball AR, Anklesaria Z, *et al.* Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103( 27 ): 10414-10419.
- [ 23 ] Breger J, Fuchs BB, Aperis G, *et al.* Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay [ J ]. *PLoS Pathog*, 2007, 3( 2 ): e18.