

Notch 信号途径中的 *Su(H)*和 *E(spl)*基因 对果蝇天然免疫的影响*

汪晓纯 金丽华**

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要 天然免疫系统是多细胞生物抵抗各种入侵微生物的第一道防线。Notch 途径介导相邻细胞之间的相互作用, 调节细胞、组织、器官的分化和发育。为了进一步探索 Notch 信号途径在果蝇天然免疫中的功能, 利用 Notch 途径下游基因 *Su(H)* 和 *E(spl)* 的低表达突变体果蝇, 通过体外注射病原体分析了生存率、血细胞的噬菌功能和抗菌肽的表达量以及突变体的血细胞数量。结果表明, 革兰氏阴性细菌和真菌感染后果蝇 *E(spl)* 突变体的生存率、噬菌能力及抗菌肽的表达量明显降低, 而且幼虫期血细胞出现异常增殖; *Su(H)* 突变体只对真菌表现出敏感性, 抗菌肽的表达量降低, 但是对真菌的噬菌能力正常。此结果表明, Notch 途径不仅影响个体的生长发育, 而且在果蝇天然免疫中也起重要的调节作用。

关键词 天然免疫, 黑腹果蝇, Notch 信号途径, *Su(H)*, *E(spl)*

学科分类号 Q352

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00455

昆虫等无脊椎动物没有类似哺乳动物的 B 和 T 淋巴细胞, 个体的防御仅仅依赖于天然免疫, 这表明天然免疫对机体抵抗各种病原微生物的感染和侵袭能起重要的防护作用^[1]。果蝇的天然免疫系统主要分为体液免疫和细胞免疫两大类^[2]。体液免疫的主要特点是受免疫原感染以后能合成大量的抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP), 目前在果蝇体内已发现 Attacin、Drosomycin 等 7 大类型抗菌肽, 大约有 20 种。抗菌肽的表达主要受两种信号转导途径调控, 即 Toll/Dif 途径和 Imd/Relish 途径。Toll/Dif 途径主要被革兰氏阳性细菌和真菌激活, 而 Imd/Relish 途径主要被革兰氏阴性细菌激活。所有这些信号转导途径能诱导特定 NF- κ B 的活性, 从而启动抗菌肽等免疫相关基因的表达。除了体液免疫外, 由血细胞引起的防御系统也发挥重要作用, 主要包括通过血细胞的吞噬和包围作用清除入侵的病原微生物^[3]。果蝇在幼虫期包含几千个血细胞, 可根据它们的形态和功能分为 3 种: 浆细胞 (plasmatocytes)、晶细胞 (crystal cells) 和薄层细胞

(lamellocytes)^[2,4]。

Notch 受体最早发现于果蝇, 它的突变影响果蝇翅、眼、刚毛的形成, 并造成神经系统发育障碍^[5]。Notch 受体与配体结合后释放出活化的胞内段 NICD, 然后转移至细胞核内, 与转录抑制因子 RBP-Jk/Su(H) 结合, 并招募共活化物成为转录激活因子, 从而激活下游的 *HES/E(spl)* 等基因^[6]。研究表明, Notch 调节果蝇晶细胞和薄层细胞的增殖, 不影响浆细胞的分化^[7]。

目前对 Notch 蛋白在天然免疫中的功能及作用机制进行了广泛而深入的研究, 但对于 Notch 信号途径下游的 *Su(H)* 和 *E(spl)* 在天然免疫中的作用机制报道较少, 特别是对不同病原体的防御作用, 血

* 国家自然科学基金(31270923)和高等学校博士学科点专项科研基金博导类资助课题(20130062110011)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-82190242, E-mail: lhjin2000@hotmail.com

收稿日期: 2013-10-31, 接受日期: 2014-01-02

细胞的功能和血细胞的分化等未见报道. 本研究利用 *Su(H)* 与 *E(spl)* 两种基因的低表达突变体, 分析了病原微生物感染时的生存率、噬菌作用和抗菌肽的表达量, 以及幼虫期血细胞的数量. 其结果表明, Notch 途径中的 *Su(H)* 和 *E(spl)* 基因在果蝇的体液免疫和细胞免疫中起重要的调节作用.

1 材料与方法

1.1 果蝇与菌种

野生型黑腹果蝇 *WT* (W^{1118}) 为本实验室保存; *E(spl)* (*BL199*, *In(3R)E(spl)^{ml}*、*E(spl)m8-HLH^{ml}/TM6B*, *Tb¹*)^[8] 和 *Su(H)* (*BL417*, *Su(H)¹In(2L)Cy*, *In(2R)Cy*, *Cy¹pr¹*)^[9] 突变体果蝇购自 Bloomington *Drosophila* Stock Center. 果蝇培养温度 25℃、相对湿度 60%. 白僵菌 *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) 和 *Erwinia carotovora carotovora 15* (*Ecc15*) 为实验室保存.

1.2 主要试剂

台盼蓝, 购自 Sigma 公司; Trizol 试剂盒和荧光标记的 *E. coli* (K-12), 购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs, 均购自 TakaRa 公司. 其他试剂均为分析纯.

1.3 果蝇生存率

分别随机收集野生型和突变体羽化 3~5 天的雌、雄果蝇各 15 只. 利用微量注射仪向果蝇腹部注射 *Ecc15* 和 *B. bassiana* 孢子, *A* 值分别为 0.2 和 0.05, 注射 60 nl, 注射后果蝇放回培养基内. 每 24 h 记录果蝇死亡数, 每隔 3 天更换 1 次培养基, 计算生存率, 共记录 7 天, 每组实验重复 3 次.

1.4 噬菌作用

分别随机收集野生型与突变体羽化 3~5 天的雄果蝇各 20 只. 用微量注射仪注射荧光标记的 *E. coli* (K-12) 或 *B. bassiana* 孢子 60 nl, 注射后放回培养基内. 1 h 后注射 0.4% 台盼蓝 200~300 nl, 掩盖没有被血细胞吞噬的荧光病原体, 然后利用 Axioskop 2 plus (ZISS) 荧光显微镜照相^[10].

1.5 分析浆细胞数量

分别挑选野生型及突变体 3 龄幼虫各 6 只, 利用尖细的镊子完全撕开幼虫表皮, 使其体腔液溶于 20 μ l PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 6.7 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄) 中, 用血细胞计数板在显微镜下计数, 每组至少重复 10

次^[10].

1.6 抗菌肽的表达

随机收集野生型及突变体羽化 3~5 天的雄果蝇 15~20 只, 注射 *B. bassiana* 孢子 6 h 后, 提取果蝇的总 RNA, 反转录成 cDNA, 利用 LightCycler 480 (Roche) 定量 PCR 仪检测多种抗菌肽的表达量. 抗菌肽的表达量以 *tp49* 基因为内参, 每组实验重复 2 次.

2 结 果

2.1 病原体对突变体果蝇生存率的影响

本实验选择 2 种病原体 *Ecc15* (革兰氏阴性菌) 和 *B. bassiana* (真菌) 作为感染源. 注射 *Ecc15* 细菌 5 天后野生型果蝇 *WT* 的生存率维持在 95.5%, 而 *E(spl)* 基因突变体的生存率降低到 48.3% (图 1a). 但是 *Su(H)* 突变体与 *WT* 相似, 生存率为 92.2%. 注射 *B. bassiana* 孢子后, *Su(H)* 和 *E(spl)* 突变体的生存率明显降低. 注射 6 天后野生型果蝇的生存率为 88.8%, 而突变体 *Su(H)* 和 *E(spl)* 的生存率 4 天后分别为 60% 和 30%, 6 天后仅为 38.8% 和 15.5% (图 1b). 为了进一步证明生存率降低是由于 2 种病原体引起的, 我们利用加热灭活的病原体注射野生型和突变体果蝇, 其结果生存率都高于 90% (图 1c 和 d). 此结果说明 *Su(H)* 和 *E(spl)* 生存率降低是由于 2 种病原体引起, 并且对 2 种病原体表现出不同的敏感性的原因可能是由于突变体对细胞免疫和体液免疫缺陷程度不同所致.

2.2 对浆细胞噬菌功能的影响

浆细胞的主要功能是吞噬入侵的外来病原体或其他物质. 为了检测 *Su(H)* 和 *E(spl)* 对浆细胞功能的影响, 我们分析了成体果蝇浆细胞的噬菌功能. 注射荧光标记的 *E. coli* (K-12) 后, 与 *WT* 相比较突变体 *Su(H)* 和 *E(spl)* 的吞噬能力均有所下降, 分别为野生型果蝇的 57.5% 和 32.7% (图 2a, b), 其中 *E(spl)* 的吞噬能力显著降低. 注射荧光标记的 *B. bassiana* 孢子后, *E(spl)* 突变体的吞噬能力也表现出下降趋势, 为野生型果蝇的 50.7%, 而 *Su(H)* 突变体与野生型果蝇相似 (图 2c, d). 此结果表明 *E(spl)* 突变体浆细胞对 2 种病原体的噬菌能力降低是导致生存率降低的原因之一. *Su(H)* 注射白僵菌后噬菌作用没有发生变化, 但是生存率降低, 此降低的原因可能是由于其他因素引起的.

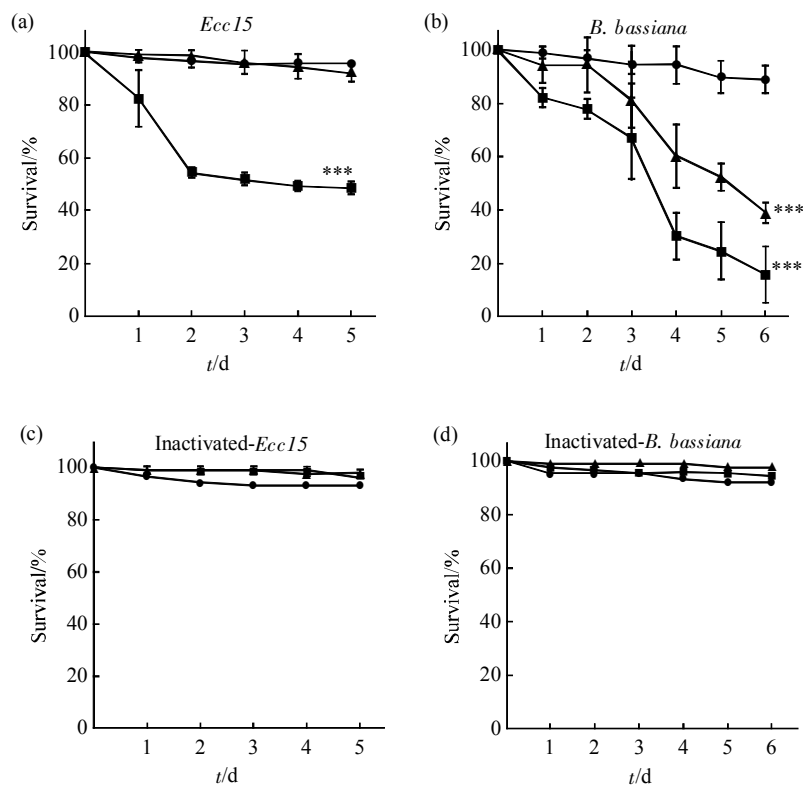


Fig. 1 Survival rate of WT and *Su(H)*, *E(spl)* mutants infected by *Ecc15* and *B. bassiana*

(a) Septic infection with *Ecc15*. (b) Septic infection with spore of *B. bassiana*. (c) Septic infection with inactivated *Ecc15*. (d) Septic infection with inactivated spore of *B. bassiana*. *** $P < 0.0001$. ●—●: WT; ▲—▲: *Su(H)*; ■—■: *E(spl)*.

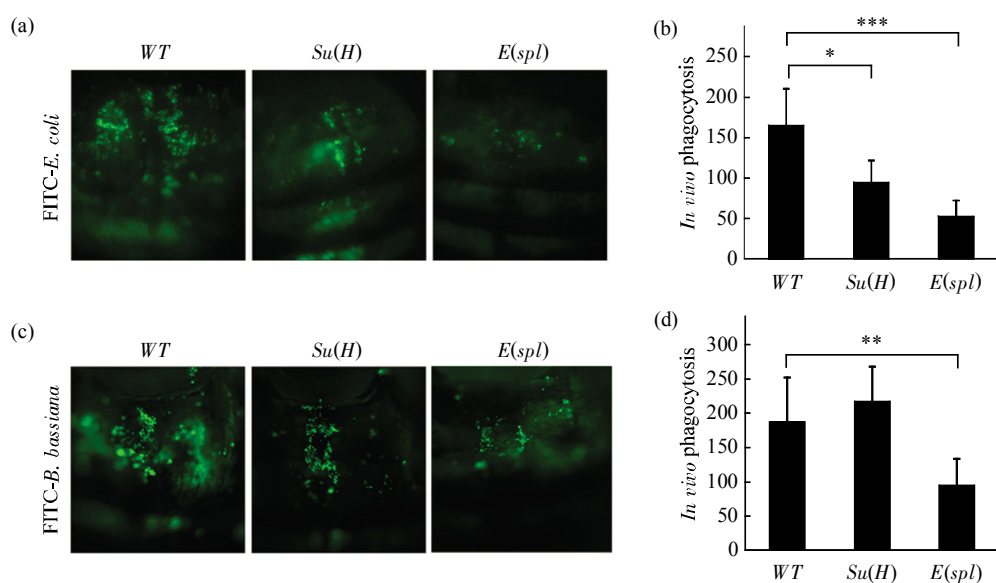


Fig. 2 *In vivo* phagocytosis in adult flies

(a, c) Adult males of the indicated genotypes were injected with Alexa Fluor marked heat killed *E. coli* and *B. bassiana*. (b, d) Quantitation of *in vivo* phagocytosis of spore and bacteria. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.004$, * $P < 0.04$.

2.3 分析突变体果蝇的浆细胞数量

血细胞中主要起到吞噬作用的细胞为浆细胞, 因此浆细胞的数量和功能将会影响果蝇个体的噬菌功能, 故本实验进一步分析了突变体果蝇的浆细胞数量. 野生型黑腹果蝇在三龄幼虫后期游离的浆细胞个数为 2 000 个左右, 而 *E(spl)* 突变体的浆细胞数量为 9 637 个, 是野生型果蝇的 4.9 倍. *Su(H)* 基因突变体的浆细胞数量为 2 728 个, 与野生型果蝇相比没有显著差异 (图 3). 虽然 *E(spl)* 中浆细胞数量增加, 但是浆细胞的总噬菌能力明显低于野生型果蝇, 此结果说明 *E(spl)* 中异常增殖的浆细胞不能发挥其正常的吞噬功能.

2.4 抗菌肽的表达

体液免疫的主要特点是受免疫原刺激以后能合成大量的抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs). 本实验分析了具有代表性的 6 种抗菌肽的表达. 注射 *B. bassiana* 孢子 6 h 后, 与野生型果蝇相比较, *Su(H)* 突变体的抗菌肽 *AttA*、*Dpt* 和 *CecA2* 表达量明显降低 (图 4a, c, d), 在 *E(spl)* 突变体中 *CecA2*

表达量显著下降 (图 4c, e). 另外, 抗菌肽 *AttB*、*Mtk* 和 *Drs* 在两种突变体果蝇中的表达量均无明显变化. 该实验表明 *Su(H)* 注射白僵菌后抗菌肽 (*AttA*、*Dpt* 和 *CecA2*) 表达量减少可能会导致突变体果蝇生存率降低.

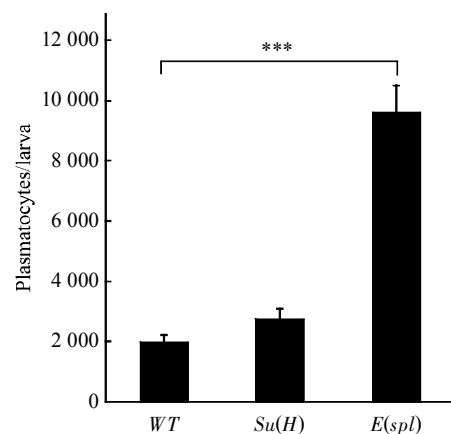


Fig. 3 Analysis of *Drosophila* circulating plasmacytes

*** $P < 0.0001$, $n=10$.

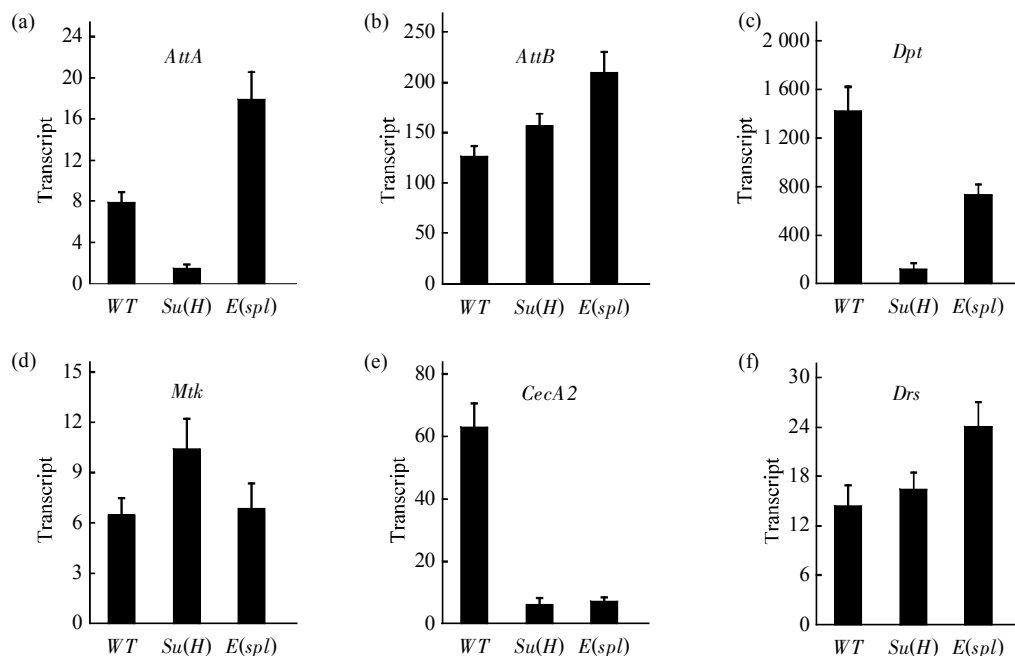


Fig. 4 Analysis of antimicrobial peptides expression in adult flies infected by *B. bassiana*

AttA: Attacin A; *AttB*: Attacin B; *Dpt*: Diptericin; *Mtk*: Metchnikowin; *CecA2*: Cecropin A2; *Drs*: Drosomycin.

3 讨 论

近几年来, 对果蝇天然免疫的研究已取得了较

大进展. 果蝇和哺乳动物有着相似的参与免疫反应的受体和信号转导途径, 说明两者的天然免疫机制具有相似性, 在抗菌肽的产生上有着共同的进化关

系^[11]. Notch 是一个十分保守的跨膜蛋白家族, 同时 Notch 也是脊椎和无脊椎动物在发育过程中一类重要的信号受体蛋白家族. 其主要通过与相邻细胞之间相互作用从而调控细胞的分化以及发育过程^[12]. 近年的研究还发现, Notch 信号与个体发育、肿瘤、遗传性疾病、神经退行性疾病以及心血管病变等多种疾病的发生发展有密切关系^[13-15]. *Su(H)*和 *E(spl)*作为 Notch 信号转导通路下游的重要组成部分, 也发挥着其独特的作用.

本研究利用 *Su(H)*和 *E(spl)*的低表达突变体果蝇, 分析在细胞免疫和体液免疫中的功能. 突变体 *Su(H)*注射革兰氏阴性菌后, 生存率与野生型果蝇相似 (图 1a), 而且噬菌功能与野生型果蝇相比较没有明显的变化 (图 2a), 此结果说明 *Su(H)*对革兰氏阴性菌没有抵御作用. *Su(H)*注射孢子后, 生存率明显下降, 比野生型果蝇降低了 50%. 为了进一步分析孢子感染后突变体果蝇死亡的原因, 我们分析了浆细胞的噬菌功能和抗菌肽的表达量. 其结果表明, 突变体的噬菌功能没有变化 (图 2c, d), 但是 3 种抗菌肽的表达量明显下降 (图 4), 这个结果可能导致突变体 *Su(H)*被白僵菌感染后生存率降低. 突变体 *E(spl)*注射革兰氏阴性菌和白僵菌后, 生存率明显下降. 其生存率降低的原因表现为对 2 种病原体的噬菌功能显著降低 (图 2), 并且注射孢子后 1 种抗菌肽的表达量明显减少. 虽然突变体 *E(spl)*的浆细胞数量是野生型果蝇的 4.9 倍, 但是浆细胞的总噬菌能力明显低于野生型果蝇, 此结果说明, *E(spl)*中异常增殖的浆细胞不能发挥其正常的吞噬病原体的功能. 因此, *E(spl)*和 *Su(H)*在果蝇的体液免疫和细胞免疫中起至关重要的作用, 但是其调控机制还不是很清楚, 有待进一步深入研究.

参 考 文 献

- [1] Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway C A, *et al.* Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999, **284** (5418): 1313-1318
- [2] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 2007, **25**: 697-743
- [3] Evans C J, Hartenstein V, Banerjee U. Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell*, 2003, **5**(5): 673-690
- [4] Kurata S. Extracellular and intracellular pathogen recognition by *Drosophila* PGRP-LE and PGRP-LC. *Int Immunol*, 2010, **20** (3): 1-6
- [5] 周庆军, 胡若真, 邵健忠, 等. Notch 信号转导与调控. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(3): 198-203
Zhou Q J, Hu R Z, Shao J Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(3): 198-203
- [6] Bray S J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**(9): 678-689
- [7] Duvic B, Hoffmann J A, Meister M, *et al.* Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr Biol*, 2002, **12**(22): 1923-1927
- [8] Christiansen A E, Ding T, Fan Y, *et al.* Non-cell autonomous control of apoptosis by ligand-independent Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Cell Death Differ*, 2013, **20**(2): 302-311
- [9] Lee K A, Kim S H, Kim E K, *et al.* Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 2013, **153**(4): 797-811
- [10] Jin L H, Shim J, Yoon J S, *et al.* Identification and functional analysis of antifungal immune response genes in *Drosophila*. *PLoS Pathog*, 2008, **4**(10): e1000168
- [11] 段云, 温硕洋, 邓小娟, 等. 果蝇的天然免疫. *免疫学杂志*, 2004, **20**(3): 24-27
Duan Y, Wen S Y, Deng X J, *et al.* *Immunological Journal*, 2004, **20**(3): 24-27
- [12] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, **284**(5415): 770-776
- [13] 赵梅, 韩伟. Notch 信号传导通路相关疾病的研究进展. *生物化学与生物物理学进展*, 2006, **33**(12): 1154-1160
Zhao M, Han W. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(12): 1154-1160
- [14] Girard L, Hanna Z, Beaulieu N. Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev*, 1996, **10**(15): 1930-1944
- [15] Weng A P, Aster J C. Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**(1): 48-54

The *E(spl)* and *Su(H)* of Notch Signaling Are Required for Regulating of *Drosophila* Innate Immunity*

WANG Xiao-Chun, JIN Li-Hua**

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract The innate immune system is the first line of the multicellular organism against the various pathogens invading. The Notch signaling plays a significant role in maintaining the balance among cell proliferation, differentiation, apoptosis and development. To further investigate the function of Notch signaling pathway in *Drosophila* innate immunity, *Drosophila* mutants, *E(spl)* and *Su(H)*, which are located in the downstream of Notch signaling pathway, were utilized to analyze the survival rate, *in vivo* phagocytosis and production of antimicrobial peptides after pathogen infections. In addition, the number of circulating plasmatocytes in third instar larvae of mutant and wild type flies was also measured. The results indicate that the *E(spl)* mutant showed lower survival rate, phagocytosis and the expression of AMP genes after pathogen infections. Furthermore, an abnormal increase in the number of plasmatocytes in *E(spl)* mutant larvae was also observed. Compared with *E(spl)* mutant, the mutant of *Su(H)* only showed sensitive to fungi, however, phagocytic ability of hemocytes was normal in fungi infection. At the same time, the expression of antimicrobial peptides was decreased in *Su(H)* mutant. These results show that the Notch pathway not only affects the growth and development of individuals, but also plays an important role in regulating innate immunity of *Drosophila*.

Key words innate immunity, *Drosophila melanogaster*, Notch pathway, *Su(H)*, *E(spl)*

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00455

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31270923) and The Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20130062110011).

***Corresponding author.

Tel: 86-451-82190242, E-mail: lhjin2000@hotmail.com

Received: October 31, 2013 Accepted: January 2, 2014