

# 果胶杆菌侵染果蝇肠道致死机制的研究

完成人

张凌华

指导小组成员

蔡亮 研究员

# 目 录

摘 要.....	3
Abstract.....	4
一、前言.....	5
二、材料与amp;方法.....	8
2.1 材料.....	8
2.2 试剂.....	8
2.3 引物.....	9
2.4 仪器与amp;设备.....	10
2.5 软件及amp;数据库.....	10
2.6 实验方法.....	10
三、研究结果.....	14
3.1 免疫缺陷果蝇 Duox 表达量和amp;功能均减弱 .....	14
3.2 高剂量 Pcc 感染下免疫缺陷果蝇生存率超过免疫正常果蝇 .....	16
3.3 高剂量 Ecc15 感染下免疫缺陷果蝇生存率超过免疫正常果蝇 .....	17
3.4 高剂量 Bacillus safensis 感染不影响免疫缺陷果蝇和免疫正常果蝇的生存率 .....	18
3.5 果蝇肠道 ROS 产生量随 Pcc 感染剂量的升高而增加.....	18
四、讨论.....	20
参考文献.....	23
致谢.....	25

# 摘要

之前的研究表明，果蝇肠道上皮细胞表达的 NADPH 氧化酶 Duox 会在肠道感染革兰氏阴性病原菌时产生并释放活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）至肠腔，以清除病原菌，起到免疫保护作用；全身或肠道特异性敲低 Duox 表达的果蝇成为免疫缺陷型果蝇，不能抵御果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum* ssp.

*carotovorum* 或 *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* 15（Ecc15）的侵染。本研究则发现了免疫缺陷果蝇对大剂量果胶杆菌侵染的耐受性以及免疫正常果蝇对大剂量果胶杆菌侵染的不耐性，并初步探究了免疫正常果蝇肠道产生的 ROS 与其受果胶杆菌侵染而死亡之间的相关性。结果表明本实验采用的免疫缺陷果蝇肠道表达的 Duox 仍能在果胶杆菌侵染时产生一定量的 ROS，并提示免疫正常果蝇肠道受大剂量果胶杆菌侵染时，因免疫系统作用而产生的 ROS 对其自身存在毒性。本研究扩展了现有对果蝇肠道免疫机制的认识，也有助于深入理解病原菌侵染导致的慢性炎症和组织损伤的生物学机制。

关键词：

果胶杆菌，果蝇肠道免疫，Duox，ROS

# Abstract

Previous research has revealed that in the Gram-negative bacterial invasion of *Drosophila* gut, the intestinal epithelial cell-expressing NADPH oxidase, Duox, will produce reactive oxygen species (ROS) to clear pathogen in the gut lumen, playing an important role in *Drosophila* gut immunity. Knocking down Duox in whole body or specifically in gut results in immunosuppression of fly, and this kind of immunosuppressed fly cannot survive *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* or *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* 15 (Ecc15) invasion. However, our research discovered that immunosuppressed flies were resistant to high dose of Ecc15 infection, whereas immunocompetent flies could die from Ecc15 infection. We further explored the correlation between the fatality of immunocompetent flies and the level of reactive oxygen species (ROS) generated in their guts, and found that immunosuppressed flies' guts can still produce certain amount of ROS during bacterial infection, and that the ROS produced in immunocompetent flies' guts for defending large amount of bacterial infection could also be toxic to flies' tissue itself. These results have enhanced the understanding on the consequences of *Drosophila* gut defense against Ecc15, and will serve as a hint on exploring the mechanisms of chronic inflammation and tissue injuries caused by bacterial pathogen infection.

Key words,

*Pectobacterium carotovorum*, *Drosophila* gut defense, Duox, ROS

# 一、前言

## 1 病原菌-宿主互作机制研究的模式生物：黑腹果蝇

固有免疫系统（the innate immune system）是机体对抗病原体的第一道防线。生物体由于肠道时常接触来源于食物中的细菌，已经发展出一套复杂的肠道免疫机制，而这一机制的很多细节还没有被阐明，细胞间连接和细胞骨架在细菌侵入细胞过程中所起的作用并未得到深刻揭示。

黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）是经典的遗传学研究的模式生物，具有体型小、生活周期短、饲养容易、子代数多、遗传手段多样等优点。自然条件下果蝇在腐烂的水果上进行繁殖和取食，暴露在充满细菌的环境中，具有完善的肠道免疫应答机制。而果蝇编码蛋白质的基因与哺乳动物的基因有 50% 同源性，加之固有免疫的机制在生物进化过程中十分保守，使得果蝇成为研究肠道免疫机制的理想模式生物。很多固有免疫的信号通路如 Toll pathway 和 Imd pathway，都在果蝇中得到深入的研究<sup>[1-2]</sup>。

## 2 果蝇肠道免疫应答机制：Toll 通路，Imd 通路和 Duox-ROS 通路

果蝇是研究肠道固有免疫的重要生物模型，许多关于先天性免疫的研究结果都是从果蝇实验中发现的。自然条件下果蝇由于取食特点，肠道暴露在充满细菌的环境中，除了全身性免疫反应外，具有一套肠道特异性的免疫应答机制。果蝇在感染革兰氏阴性细菌后，细胞膜上的 PGRP-LC 受体识别细菌的一种蛋白多糖 DAP-type PGN，激活细胞的 Imd 信号通路，导致 NF- $\kappa$ B 转录因子 Relish 转位进入细胞核，激活抗菌肽（antimicrobial peptides, AMPs）基因的编码，之后抗菌肽释放并参与清除细菌。在受到革兰氏阳性细菌和真菌感染时，Toll 通路被激活，也能促进 AMP 的释放<sup>[3]</sup>。然而研究表明，Imd 通路缺陷，不能激活 AMP 应答机制的果蝇，仍然能在多种细菌感染的条件下存活，表明肠道具有一套额外的免疫机制<sup>[4]</sup>。已有研究证实通过果蝇肠道的 Dual NADPH oxidase (Duox) 产生的 ROS 对于肠道上皮细胞的正常免疫是不可或缺的<sup>[5-7]</sup>。肠道上皮细胞在感知病原菌释放出的信号后，可

通过 Duox 产生 ROS 释放到肠腔中，抑制细菌的增殖。Duox-ROS 通路还参与肠上皮细胞的更新、机体对共生菌和病原菌的区别反应，此外还通过氧化还原作用对多种信号通路进行调控。这一通路对于慢性炎症的发生和炎症的稳态调控起着重要作用<sup>[7]</sup>。Duox<sup>RNAi</sup> 的果蝇成为免疫缺陷型，不能抵御病原菌的侵袭。若以果胶杆菌饲喂这种免疫缺陷型果蝇，果蝇寿命相比于野生型会显著缩短，染菌果蝇的肠道中可检测到该病原菌的大量存在<sup>[5]</sup>。

正常情况下果蝇肠道中存在共生菌群，而非致病性的共生菌不会引起机体的免疫反应，只有在受到致病菌感染时才会做出迅速的免疫应答。果蝇的肠道在对共生菌群的免疫耐受性和对致病菌的免疫应答之间存在着平衡。如果免疫反应持续过度激活，将导致果蝇寿命大大缩短。研究显示肠道中的 Imd 信号通路可被 PGLP-LC 的抑制子 PIMS 所抑制<sup>[8]</sup>，AMP 的合成可被转录调控因子 Caudal 特异性抑制<sup>[9]</sup>。这些都表明果蝇肠道的固有免疫系统受到严格的调控以维持稳态。

### 3 果胶杆菌 Ecc15

在成体果蝇中肠，肠道干细胞（intestinal stem cells, ISCs）可增殖并分化为肠上皮细胞（enterocyte, EC）或肠内分泌细胞（enteroendocrine, ee）来维持肠道稳态。在果蝇肠上皮细胞因细菌侵染而受损后，肠道干细胞会进行增殖分化，补充肠上皮细胞<sup>[10-12]</sup>。一些能够侵染并破坏果蝇肠道的致病菌多为革兰氏阴性菌，如胡萝卜软腐病欧文氏杆菌（*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*）<sup>[13]</sup>，铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*），粘质沙雷菌（*Serratia marcescens*）等。其中，胡萝卜软腐病欧文氏杆菌 Ecc15 即为胡萝卜软腐果胶杆菌（*Pectobacterium carotovorum*）的一个菌株。果胶杆菌 Ecc15 作为一种植物致病菌，其感染果蝇肠上皮的详细机制至今仍未被阐清。Ecc15 对于野生型果蝇是一种非致命性的病原菌，能强烈诱发肠道的 Imd 和 Duox 两条免疫应答通路，并使得肠上皮受损，激发肠道干细胞的增殖和分化，补充肠上皮细胞，因此是较理想的研究倡导病原菌-宿主关系的材料<sup>[14]</sup>。Ecc15 及其他一些肠道病原菌 *Vibrio fluvialis*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Serratia marcescens* 的代谢产物尿嘧啶会激活肠上皮细

胞上相应的受体（目前研究人员推测为一种 GPCR），进而激活 *Duox* 基因的转录 [15]。

本实验通过免疫缺陷果蝇在不同浓度的果胶杆菌感染下的生存检测，意外发现了在全身进行 *Duox* 敲低的免疫缺陷果蝇在大剂量果胶杆菌感染后仍能存活，而 *Duox* 表达正常的免疫正常果蝇在大剂量果胶杆菌感染数天后死亡的现象，并初步探究了这一现象背后的生物学机制。实验发现果蝇死亡情况与肠道 ROS 产生量之间具有相关性，并提示果蝇肠道上皮细胞表达的 *Duox* 所产生的 ROS 对果蝇自身具有一定的毒性。该研究扩展了现有的对果蝇肠道免疫和稳态调控机制的认识，并可为今后该领域的研究提供一个新的视角。

## 二、材料与amp;方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 果蝇株:

w<sup>1118</sup> (来自闫致强老师实验室)

Tester line: UAS-DuoxRNAi da-GAL4 UAS-tdTomato/TM6, tubP-GAL80 (来自 PSU Thomas Graham 实验室)

UAS-X<sup>RNAi</sup>, X 代表细胞骨架相关基因。(来自 Vienna Drosophila Resource Center, VDRC)

#### 2.1.2 菌株:

胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (Pcc)

胡萝卜软腐病欧文氏杆菌 *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* 15 (Ecc15, 表达 GFP)

沙福芽孢杆菌 *Bacillus safensis*

### 2.2 试剂

LB 培养基 (胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, NaCl 10g/L; 用 NaOH 调 Ph 至 7.0。若配制固体培养基, 再加入 15g 琼脂)

5% 蔗糖溶液

PBS 缓冲液 (称取 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 溶于 800mL ddH<sub>2</sub>O 中, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 最后用蒸馏水定容至 1L)

TRIzol (Invitrogen)

三氯甲烷 (国药集团化学试剂公司)

异丙醇 (上海生工生物公司)

乙醇 (国药集团化学试剂公司)

DEPC 水 (每 1 L 水中加入 1 mL DEPC, 搅拌至其完全溶解, 或摇床振摇过夜, 高温高压灭菌 30min)

ROS 荧光探针: DCF-DA 荧光染料 (Invitrogen)

N-乙基马来酰亚胺 (N-Ethylmaleimide, NEM. Sigma)

cDNA 反转录试剂盒 (Vazyme 公司)

### 2.3 引物

由上海生工生物公司合成, 通过 PAGE 纯化。

#### ① 细菌 16S 序列检测:

27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

#### ② Pcc 菌株特异性序列检测:

EXPCCR (5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3')

EXPCCF (5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3')

INPCCR (5'-GG CCAAGCAGTGCCTGTATATCC-3')

INPCCF (5'-TTCGATCACGCAACCTGCATTACT-3')

#### ③ 果蝇 Duox mRNA 检测:

rp49-7\_23 (5'-ATCCGCCCAGCATAACAG-3')

rp49-442\_424 (5'-TCCGACCAGGTTACAAGAA-3')

Duox4156\_F (5'-TTTGGCACCAAGTACCAATCG-3')  
Duox4577\_R (5'-AACTTGCGCGTCTTGTTCAC-3')  
Duox2142\_F (5'-GCGCACCTTTAGTTTGAAGC-3')  
Duox2587\_R (5'-TCTTGCGCACAAACATGTTCG-3')

## 2.4 仪器与设备

果蝇 CO<sub>2</sub> 麻醉设备

Olympus 荧光体视镜

Olympus 宽场倒置荧光显微镜

## 2.5 软件及数据库

FlyBase: <http://flybase.org/>

Bloomington Drosophila Stock Center: <http://flystocks.bio.indiana.edu/>

ATCC (美国典型培养物保藏中心): <https://www.atcc.org/>

中国典型培养物保藏中心: [www.cctcc.org](http://www.cctcc.org)

NCBI BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

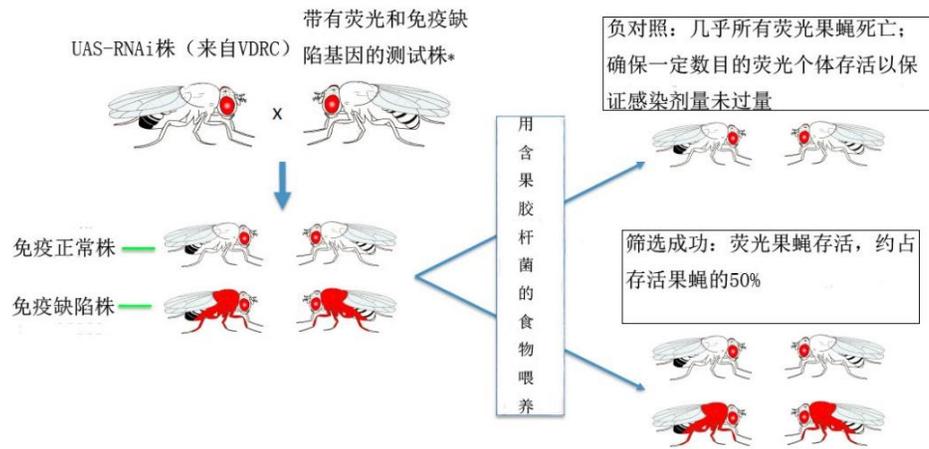
## 2.6 实验方法

### 2.6.1 果蝇感染

① 将 w1118×UAS-Duox<sup>RNAi</sup> da-GAL4 UAS-tdTomato/TM6, tubP-GAL80 的 F1 后代按有无红色荧光表达和有无 Hu 基因表达分为 UAS-Duox<sup>RNAi</sup> da-GAL4 UAS-tdTomato/+ (免疫正常) 和 TM6, tubP-GAL80/+ (免疫缺陷) 两种基因型。在空指管中放入两种基因型果蝇各 10 只, 饥饿 2 h。







\*UAS-DuoxRNAi da-GAL4 UAS-tdTomato  
TM6, tubP-GAL80

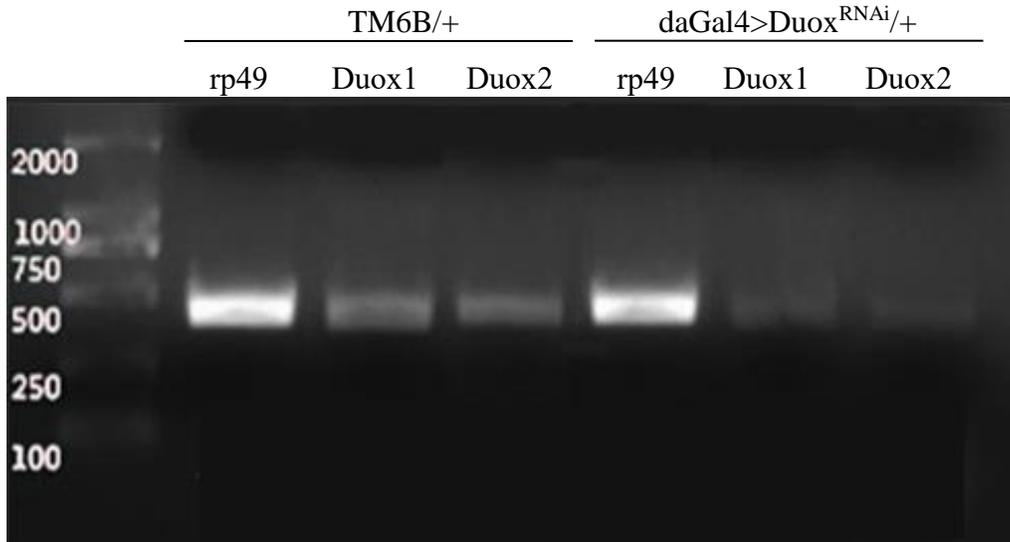
雌雄果蝇插图引自:  
Brain Development: Meth. Mol. Biol. 57 1082 2014

序图 筛选过程图解 (修改自 Thomas Graham, Penn State University)

## 三、研究结果

### 3.1 免疫缺陷果蝇 Duox 表达量和功能均减弱

#### 3.1.1 免疫缺陷果蝇全身 Duox mRNA 表达量下降

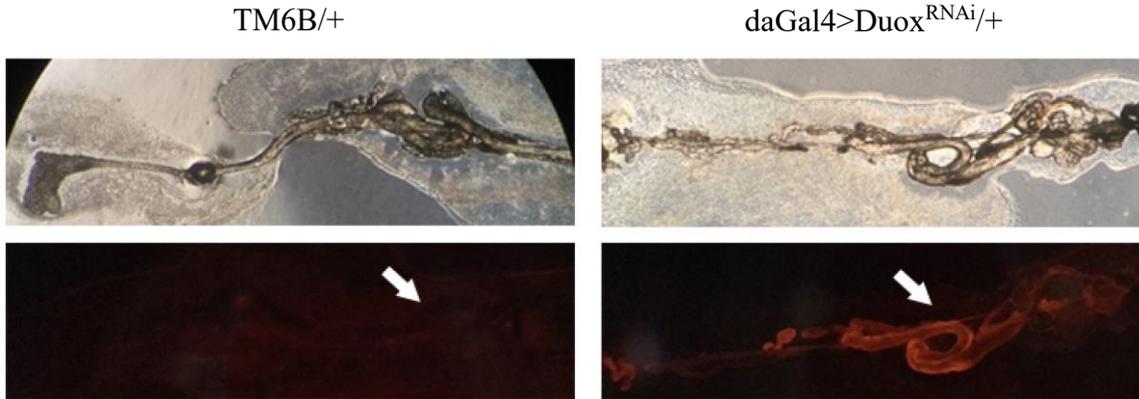


图一 daGal4, UAS-tdTomato, UAS-Duox<sup>RNAi/+</sup>果蝇 Duox mRNA 表达水平降低 (RT-PCR 结果)

分别提取免疫正常和免疫缺陷果蝇的总 RNA 并进行 RT-PCR。泳道 1 为 DNA marker，2、3 分别为正常个体和免疫缺陷个体管家基因 *rp49* (ribosomal protein 49) 的 mRNA 片段的扩增，作为模板上样量参比。4、6 分别为正常个体 Duox mRNA 上两不同片段的扩增，5、7 分别为免疫缺陷个体 Duox mRNA 上两不同片段的扩增。条带亮度通过 ImageJ 软件进行定量分析。

由图一，RT-PCR 结果显示，Duox-RNAi 果蝇中 Duox mRNA 含量远低于免疫正常果蝇，验证了 RNAi 的敲低效果，但仍能检测到 Duox mRNA。

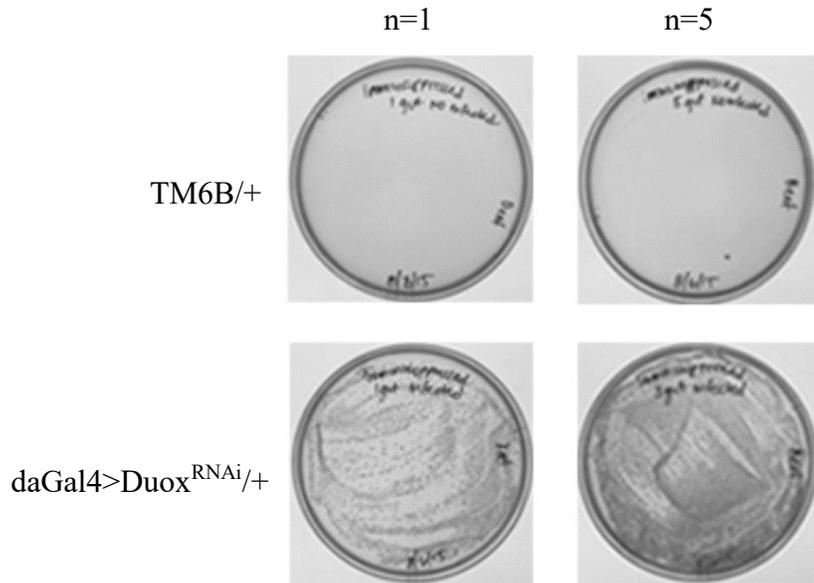
### 3.1.2 免疫缺陷果蝇肠道中 Gal4-UAS 系统有效表达



图二 daGal4, UAS-tdTomato, UAS-Duox<sup>RNAi/+</sup> 果蝇肠道表达红色荧光蛋白 tdTomato

由图二，解剖两种基因型果蝇，取肠道进行荧光成像，可见 Duox-RNAi 果蝇肠道有红色荧光蛋白 tdTomato 表达，间接验证了 Gal4-UAS 系统的表达情况，提示 UAS-Duox<sup>RNAi</sup> 在免疫缺陷果蝇中也有表达。

### 3.1.3 免疫缺陷果蝇肠道对外来菌群的清除能力下降

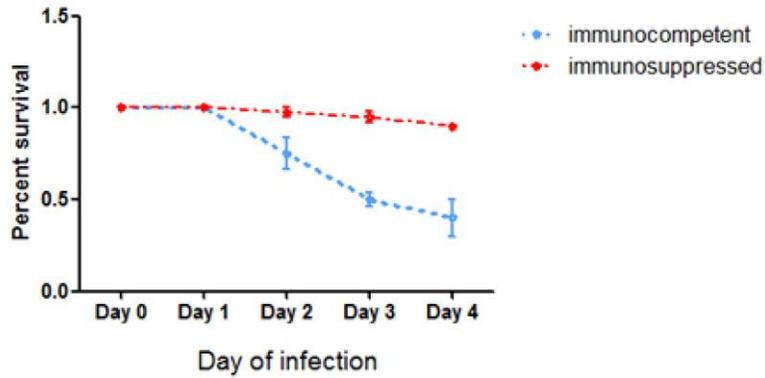


图三 Pcc 在 daGal4, UAS-tdTomato, UAS-Duox<sup>RNAi/+</sup> 果蝇肠道中大量存活

(a, 1 只免疫正常果蝇肠道研磨液涂板结果；b, 5 只免疫正常果蝇肠道研磨液涂板结果；c, 1 只免疫缺陷果蝇肠道研磨液涂板结果；d, 5 只免疫缺陷果蝇肠道研磨液涂板结果)

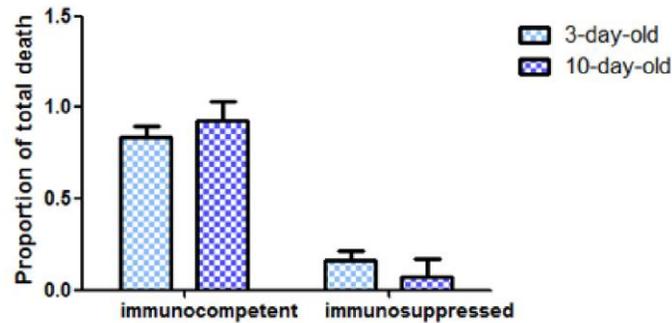
由图三，低剂量（ $OD_{600}=20$ ）Pcc 感染两种基因型果蝇 24 h 后，Pcc 能够在免疫缺陷果蝇肠道中大量存活。提示在感染剂量较低时，免疫缺陷果蝇肠道不能产生足够的 ROS 清除 Pcc，而免疫正常果蝇有足够能力清除较低剂量的 Pcc。

### 3.2 高剂量 Pcc 感染下免疫缺陷果蝇生存率超过免疫正常果蝇



图四 两种基因型果蝇在 Pcc 感染下的生存曲线

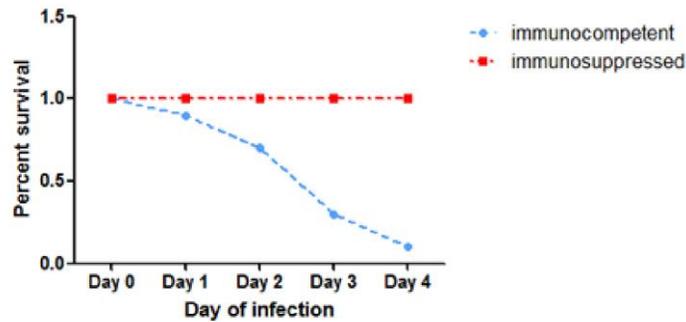
由图四，高剂量（ $OD_{600}=200$ ）Pcc 感染时，与预期的实验结果相反，免疫正常果蝇大量死亡，其生存率远低于免疫缺陷果蝇。实验具有很强的可重复性。



图五 不同年龄的两种基因型果蝇在 Pcc 感染下的死亡率

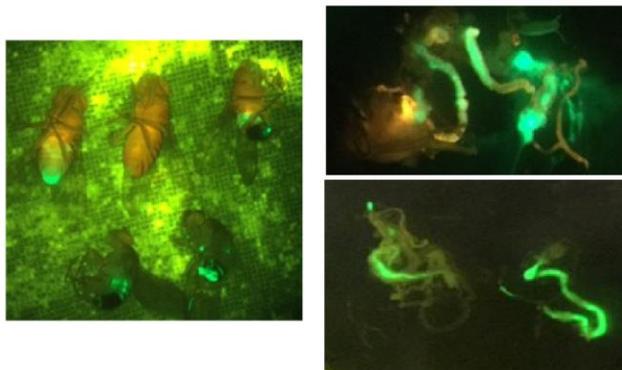
由图五，高剂量（ $OD_{600}=200$ ）Pcc 感染时，不同基因型果蝇的生存率与其感染时的年龄没有明显关系，均表现出免疫正常果蝇受感染而死亡，免疫缺陷果蝇生存情况较好的状态。

### 3.3 高剂量 Ecc15 感染下免疫缺陷果蝇生存率超过免疫正常果蝇



图六 两种基因型果蝇在 Ecc15 感染下的生存曲线

由图六，高剂量（ $OD_{600}=200$ ）Ecc15 感染时，免疫正常果蝇生存率远大于免疫缺陷果蝇，与 Pcc 感染结果类似。Ecc15 和 Pcc 属于同种细菌的不同菌株，二者的实验结果可相互佐证。

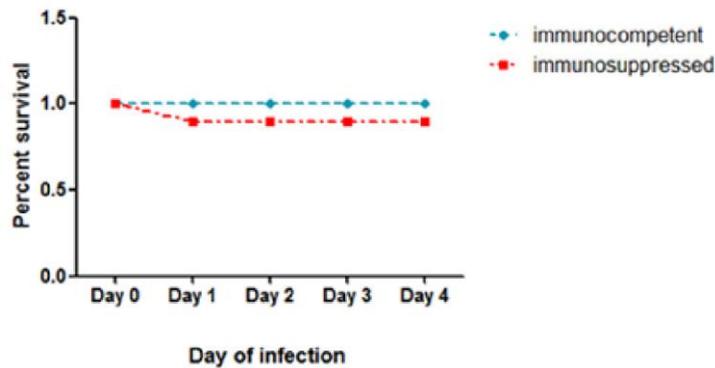


图七 存活的免疫缺陷果蝇的肠道解剖（肠道内可见表达 GFP 的 Ecc15）

(左图: 荧光体视镜下, 经 Ecc15-GFP 感染的免疫缺陷果蝇和免疫正常果蝇成像; 右上: 免疫缺陷果蝇肠道解剖成像, 可见果蝇肠道表达的红色荧光蛋白 tdTomato 及肠道中的 Ecc15-GFP; 右下: 免疫正常果蝇肠道解剖成像, 可见肠道中的 Ecc15-GFP)

由图七，高剂量（ $OD_{600}=200$ ）Ecc15 感染时，免疫缺陷果蝇生存状态较好，而免疫正常果蝇死亡；两种果蝇肠道内均可见未清除的 Ecc15-GFP 的存在。对比图三可得结论，低剂量 Pcc 感染果蝇时免疫正常的果蝇肠道具有将 Pcc 完全清除的能力，而高剂量该细菌感染时，免疫正常果蝇不能完全将其清除。

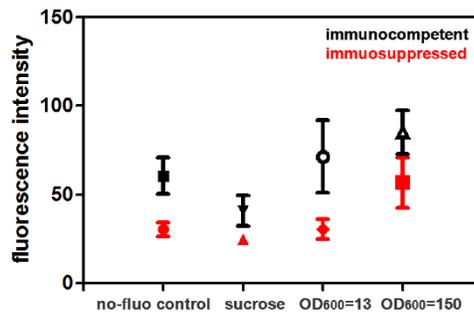
### 3.4 高剂量 *Bacillus safensis* 感染不影响免疫缺陷果蝇和免疫正常果蝇的生存率



图八 两种基因型果蝇在 *Bacillus safensis* 感染下的生存曲线

由图八，高剂量（ $OD_{600}=200$ ）*Bacillus safensis* 感染下，免疫缺陷果蝇和免疫正常果蝇均有 95% 以上的生存率，二者之间没有明显差异。对于果蝇，*Bacillus safensis* 是非致病性革兰氏阳性菌，不会感染果蝇肠道，因此本实验可作为阴性对照验证实验方法的可靠性。

### 3.5 果蝇肠道 ROS 产生量随 Pcc 感染剂量的升高而增加



图九 不同感染条件下果蝇肠道 ROS 水平检测

由图九，随着感染剂量增加，免疫缺陷果蝇和免疫正常果蝇的肠道 ROS 产生量也会增加，提示免疫缺陷果蝇中的 Duox 并未被完全消除，仍有一定量的 Duox 发挥正常的免疫清除的功能。此外，实验中  $OD_{600}=150$  可作为免疫正常果蝇死亡的感染阈值；与之相应，在此感染剂量下免疫正常果蝇产生的 ROS 水平高于其他感染条件下的 ROS 产生水平，提示果蝇肠道存在一个 ROS 毒性阈值，当 ROS 水平超过此阈值时会对果蝇自体组织造成损伤。

## 四、讨论

本实验使用在果蝇全身表达靶向 *Duox* mRNA 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的方法构造免疫缺陷果蝇。按照文献中的数据和理论推测, 全身或肠道中 *Duox* 被 RNAi 敲低的果蝇在受到 *Ecc15* 感染后会在5天之内死亡, 而野生型或 *Duox* 通路未受影响的免疫正常果蝇在 *Ecc15* 感染后仍能正常存活。本实验尝试了多种实验条件, 如: 不同种菌株类型、不同年龄段果蝇、不同感染温度及不同菌液浓度等, 均未能重复出文献中的实验结果。

在微生物分类系统中, *Pectobacterium carotovorum* 与 *Erwinia carotovora* 曾属于同一属, *Ecc* 属于 *Pectobacterium carotovorum* 中的一个菌株。Pcc 和 *Ecc15* 感染实验的结果非常相似, 均为免疫缺陷果蝇存活, 而免疫正常果蝇死亡。虽然本实验所用 *Duox*<sup>RNAi</sup> 果蝇是一种改造过的 shRNA 介导的 TRiP RNAi 品系, 与文献中的 *Duox*<sup>RNAi</sup> 果蝇构造方法不同, 但实验中所用免疫缺陷果蝇全身的 *Duox* 基因表达敲低情况也在分子 (RT-PCR) 和功能 (肠道菌群生存力检测) 两个层面得到了验证。基于果蝇肠道 ROS 的检测数据: 免疫缺陷果蝇肠道的 ROS 产量随感染剂量上升而升高, 联想到 RT-PCR 实验中在免疫缺陷果蝇中检测到的低表达量 *Duox* mRNA。这些结果提示我们本实验所用免疫缺陷果蝇的 *Duox* 只是被有条件地敲低了, 在受到革兰氏阴性细菌如果胶杆菌感染后, 肠道还会释放出一定量的 ROS 发挥免疫清除作用。

本实验与文献所描述的感染实验还有一点不同, 即本实验所采用的有效感染剂量约为文献所报道的十倍。而在本实验中, 使用文献报道的有效感染剂量时, 免疫正常果蝇能够正常存活, 很好地起到负对照的作用; 这一低感染剂量对免疫缺陷果蝇却是无效的。由前述分析, 这一无效性很可能是因为 *Duox* 没有被完全敲除、仍能发挥免疫功能所导致的。

*Bacillus safensis* 作为一种革兰氏阳性细菌, 不会激发果蝇肠道的 Imd 免疫信号通路和 *Duox* 信号通路, 而是会激发 Toll 信号通路, 达到与 Imd 通路相似的释放

抗菌肽的效果。实验中 *Bacillus safensis* 的感染不会导致免疫正常和免疫缺陷果蝇生存率的下降，一方面说明 *Bacillus safensis* 并不是果蝇致病菌，另一方面说明实验的操作体系是可行的。在 Pcc 和 Ecc15 感染实验中，确实是由于细菌感染导致免疫正常果蝇死亡，而不是由于实验操作方法有缺陷而人为导致免疫正常果蝇死亡。

在经过感染条件的摸索和改良后，本实验自身具有很强的可重复性，且在低感染剂量下 Duox 正常果蝇的生存情况与文献所述一致，只是在高感染剂量下 Duox 正常果蝇一致死亡，提示我们一定存在某种生物学机制介导了这一现象。由于 Duox<sup>RNAi</sup> 果蝇的生存情况刚好可以作为 Duox 正常果蝇的负对照，而这两种基因型果蝇之间的区别只在于 *Duox* 基因是否正常发挥功能，所以我们猜测 Duox 正常果蝇的死亡原因应该与 *Duox* 基因的作用有关，即在感染剂量过大时，通过 Duox 产生的 ROS 过多，对果蝇自身组织产生了损伤，反而影响到果蝇自身的生存状况。对比 Duox<sup>RNAi</sup> 果蝇在大剂量果胶杆菌感染时的高生存率，我们很容易想到阻断或削弱 Duox 功能的药物可以作为果蝇受大量革兰氏阴性菌感染时提高存活率的药物。这一现象使人联想到人体在免疫系统被过度激活时产生的细胞因子风暴（cytokine storm）。机体感染致病菌后，体液中多种细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1 和 IL-8 会迅速大量产生，这会进一步引起一氧化氮的大量释放，使血管壁通透，血液和血浆从动静脉及毛细血管中渗出。细胞因子风暴是引起急性呼吸窘迫综合症和多器官衰竭的重要原因。类似地，果蝇肠道中过度诱发的免疫反应很可能起到和细胞因子风暴同样的自杀式效应，在攻击病原菌的同时对自身造成不可逆损伤和炎症反应。而果蝇的 Duox 通路是否存在与细胞因子风暴一样的正反馈过程，还需要进一步探讨。

本实验有三点缺陷：一是没有对大剂量 Ecc15-GFP 感染的免疫正常果蝇进行深入的肠道解剖和成像。若其相比于 Duox<sup>RNAi</sup> 果蝇，肠上皮细胞或粘膜出现明显组织损伤，说明免疫正常果蝇产生的 ROS 确实对果蝇自身组织造成了损伤。二是没有使用在肠道中过表达 Duox 的果蝇进行感染实验。若使用较低感染剂量能使过表达 Duox 的果蝇死亡，也能间接证明 ROS 对果蝇自身组织的损伤是免疫正常果蝇死亡的原因。三是进行 ROS 检测时未设置一系列感染梯度，以精确验证肠道

ROS 毒性阈值的存在，厘定肠道所产生的 ROS 的安全剂量、危险剂量（过渡剂量）和致死剂量的相对值，并阐明中等剂量（如 $OD_{600}=100$ ）果胶杆菌感染是否会  
导致 ROS 对组织毒性的缓慢积累和慢性炎症的发生。进一步探究 ROS 对果蝇自身  
组织的损伤机制时，可以分析细胞因子的表达情况，以及 JAK-STAT 通路、细胞  
坏死或细胞凋亡通路的激活情况。

## 参考文献

1. Fauvarque MO. Small flies to tackle big questions: assaying complex bacterial virulence mechanisms using *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol.* 2014; 16(6): 824-833.
2. Vodovar N, Acosta C, Lemaitre B, Boccard F. *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 2004; 12(5): 235-242.
3. Buchon N, Broderick NA, Lemaitre B. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 615-626.
4. Ryu JH, *et al.* An essential complementary role of NF- $\kappa$ B pathway to microbial oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO J.* 2006; 25: 3693-3701.
5. Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for Dual Oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science.* 2005; 310: 847-850.
6. Ha EM, *et al.* Regulation of DUOX by the G $\alpha$ q-phospholipase C $\beta$ -Ca<sup>2+</sup> pathway in *Drosophila* gut immunity. *Dev Cell.* 2009; 16(3): 386-397.
7. Kim SH, Lee WJ. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: article 116.
8. Lhocine N, *et al.* PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. *Cell Host Microbe.* 2008; 4(2):147-158.
9. Ryu JH, *et al.* Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science.* 2008; 319(5864): 777-782.
10. Ohlstein B, Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature.* 2006; 439: 470-474.
11. Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell host Microbe.* 2009; 5(2): 200-211.
12. Leulier F, Royet J. Maintaining immune homeostasis in fly gut. *Nat Immunol.* 2009; 10:936-938.
13. Basset A, *et al.* The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 3376-3381.
14. Buchon N, Broderick NA, Kuraishi T, Lemaitre B. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology.* 2010; 8:152.

15. Acosta Muniz C, Jaillard D, Lemaitre B, Boccard F. *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cell Microbiol.* 2007; 9(1):106-19.

# 致谢

本实验的最初目的，是要构建免疫缺陷果蝇进行遗传筛选，找到参与细菌-宿主互作的细胞骨架相关组分。然而在进行预实验时，我们无法得到预期的感染效果，也就无法继续进行筛选实验。感谢蔡亮老师对我转变课题研究方向的支持，使我最终解答了对于实验阴性结果的心头疑惑。这一课题不仅使我喜欢上了果蝇这一模式生物，还锻炼了我的自主探究能力。感谢实验室的师兄师姐给予我无私的帮助，在我课程紧张的时候，帮我摇菌、取菌，才不至于耽误实验的时间节点。特别要感谢的是Penn State University 的博士生 Kristen Browder对我的耐心指导，是她帮我建构了我对果蝇遗传学的基本认识，也是她帮助在实验室建立了果蝇实验平台。感谢韩国首尔国立大学的 Won-Jae Lee 教授向我们提供 Ecc15 果蝇株。感谢清华果蝇模式动物平台、维也纳果蝇资源中心和中国典型培养物保藏中心向我们提供果蝇株或菌株。

虽然这一课题并未达到预期的筛选目标，但毕竟产生了一个意想不到的发现，让人兴奋不已。我们对此进行了初步探究并提出了一个可能的理论解释，希望果蝇肠道免疫机制的研究者们能够在其中发现更多的可能性。