



基于RNA-Seq技术分析白藜芦醇对副溶血弧菌生物被膜的抑制作用

张芳, 朱军莉*, 冯立芳

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

摘要: 【目的】利用可食用植物素抑制致病菌生物被膜受到广泛的关注。本文研究分析白藜芦醇对水产品致病菌副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)生物被膜形成的影响及重要的调控基因。【方法】研究测定亚抑菌浓度白藜芦醇对*V. parahaemolyticus*生物被膜形成和胞外多糖分泌的影响, 采用RNA-Seq技术分析白藜芦醇作用下*V. parahaemolyticus*基因表达水平变化, 并利用荧光定量PCR方法验证部分差异表达基因。【结果】白藜芦醇对*V. parahaemolyticus*的最小抑菌浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 亚抑菌浓度5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用下能显著抑制该菌的生物被膜形成和胞外多糖产量($P<0.05$), 扫描电镜观察发现细菌的粘附量和胞外分泌物显著减少。*V. parahaemolyticus*在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇作用下共检测到106个基因表达量发生显著变化($P<0.05$), 其中上调基因约占22.6%, 下调基因约占77.4%。这些基因主要在7条代谢通路中被显著富集, 其中外膜蛋白(W, YedS, OmpK)、群体感应(LuxS)、鞭毛蛋白(FlaA)、菌毛蛋白(PilQ)、溶血素分泌蛋白等14个调控基因可能与*V. parahaemolyticus*生物被膜有关, 呈现显著下调表达。荧光定量PCR发现*luxS*、*trh*、*tlh*和*flaA* 4个基因在白藜芦醇作用后表现不同程度的显著下降, 与转录组结果一致。【结论】白藜芦醇抑制*V. parahaemolyticus*生物被膜形成是一个多基因参与、多个生物过程协同调控的过程, 其主要通过干扰*V. parahaemolyticus*新陈代谢过程、群体感应系统、膜蛋白分泌通路, 抑制细胞的粘附和生物被膜形成。研究为揭示白藜芦醇抗生物被膜的分子机制提供参考。

关键词: 副溶血性弧菌, 白藜芦醇, 生物被膜, RNA-Seq, 抑制

细菌生物被膜(Biofilm)是细菌粘附于一个物体(或人体组织)的表面, 通过分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等将自身包绕其中而形成的大量高度组织化、系统化的膜样聚合物^[1], 自然界

中大部分细菌以生物被膜这种多细胞的复杂结构形式而存在。研究表明, 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)等致病性弧菌能形成生物被膜, 成熟被膜能增强细菌的存活

基金项目: 国家自然科学基金(31271954); 浙江省自然科学基金(LY15C200001); 研究生科研创新基金项目(3100XJ1514134)

*通信作者。Tel: +86-571-88071024-8588; E-mail: junlizhu0305@163.com

收稿日期: 2015-08-05; 修回日期: 2015-11-30; 网络出版日期: 2015-12-11

能力、毒力因子表达以及对环境压力的耐受性^[2]。副溶血性弧菌 *V. parahaemolyticus* 是水产品中重要的食源性致病菌, 已发现该菌能分泌不同类型的粘附因子(包括鞭毛、菌毛等)定殖于鱼、虾、蟹和贝类等多种水产品表面, 形成生物被膜^[3], 造成食品安全隐患。然而, 目前对 *V. parahaemolyticus* 生物被膜的控制主要停留在抗生素^[4]或化学清洁剂疗法^[5], 在水产品工业中应用存在诸多问题, 如出现抗生素耐药型菌株^[6]等。

近年来, 利用可食用植物素抑制致病菌生物被膜形成逐渐成为国内外研究的热点。Packiavathy等^[7]发现天然无毒的植物化学成分姜黄素在亚抑菌浓度下能显著抑制 *V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus* 和哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 生物被膜形成及毒力因子产量。白藜芦醇(3,4,5-三羟基-二苯乙烯)是一种天然存在的植物多酚及植物抗毒素类物质, 主要存在于葡萄、浆果等果皮中, 是红酒中的主要活性物质, 具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗菌、神经保护以及潜在的抗癌效用^[8]。近年来, 部分研究显示白藜芦醇能有效抑制致病菌毒力因子的表达及生物被膜形成, Guo等^[9]首次报道亚抑菌浓度白藜芦醇能显著抑制 *V. cholerae* 生物被膜形成, Morinaga等^[10]发现白藜芦醇处理能显著干扰肾脏细胞中霍乱毒素诱导的cAMP累积, Lee等^[11]发现白藜芦醇能有效抑制大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 生物被膜形成。可见, 白藜芦醇是一种天然高效的抗生物被膜活性成分, 然而白藜芦醇对水产品中 *V. parahaemolyticus* 生物被膜的影响报道较少, 并且白藜芦醇抗食源性致病菌生物被膜的作用机制仍不明确。

近年来, 基于新一代高通量测序平台的转录组测序(RNA-Seq)技术成为大规模获取转录组相关生物信息的有效手段之一, 具有通量高、成本低、灵敏度高等优点。本研究首先分析亚抑菌浓度白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 生物被膜形成的

影响, 并采用RNA-Seq技术解析白藜芦醇作用下该菌的转录组信息变化, 旨在分子水平识别重要差异表达基因功能及其参与的代谢通路, 并利用荧光定量PCR进一步验证与生物被膜形成相关的重要差异表达基因, 初步探索白藜芦醇抑制 *V. parahaemolyticus* 生物被膜形成的分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

白藜芦醇(Resveratrol)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司; RNase-Free DNase购自Qiagen公司; TRIzol[®] Plus RNA Purification Kit和SuperScript[™] III First-Strand Synthesis SuperMix购自美国Invitrogen公司; LB、TSB等培养基购自青岛海博生物技术有限公司。主要仪器包括: TM-1000型台式扫描电镜; CFX384多重实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad); NanoDrop1000微量紫外可见分光光度计; Illumina HiSeq[™] 2000 测序平台(Illumina Inc., USA)。

1.2 菌株及其活化

1.2.1 菌株: *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) 购于中国普通微生物保藏管理中心。

1.2.2 菌株活化: 将-80 °C贮藏的甘油菌接种于含3% NaCl LB培养基中30 °C、200 r/min过夜活化后, 于3% NaCl LB培养基中二次活化, 离心收集菌体, 用无菌生理盐水将菌浓度调整到 10^8 CFU/mL待用。

1.3 最小抑菌浓度(MIC)测定

将白藜芦醇溶解于二甲基亚砜(DMSO), 经0.22 μm膜过滤后, 用无菌水稀释到合适浓度。参考Silván等^[12]方法, 取1%过夜活化的菌种接种于3% NaCl LB肉汤(菌体初始浓度约 10^5 CFU/mL), 分别加入终浓度为160.0、80.0、40.0、20.0、10.0、5.0、2.5 μg/mL的白藜芦醇, 在30 °C摇床培养24 h后, 测定600 nm处吸光值, 每个浓度梯度组设3个

平行。以添加等量溶剂DMSO为对照组，MIC是指经24 h培养后实验组无明显生长的最低浓度。

1.4 生物被膜的制备和测定

将上述菌悬液与含3% NaCl的胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)以1:3(V/V)混合后，加入24孔板，分别加入工作浓度为1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的白藜芦醇，以添加等量DMSO组作为空白对照，30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养36 h，采用结晶紫定量测定生物被膜^[13]。另一组相同条件下在24孔板中加入无菌玻璃片(1 cm \times 1 cm)，玻璃片用于扫描电镜观察。

1.5 胞外多糖的测定

参照Nithya等^[14]方法，*V. parahaemolyticus*分别接种于添加终浓度为1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇的3% NaCl TSB培养基中，以添加等量溶剂DMSO为对照组，在30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育36 h后采用苯酚硫酸法^[15]测定EPS。

1.6 电子扫描显微镜(SEM)观察

参照Kim等^[16]方法，1.4中制备的玻璃片经2.5%戊二醛溶液4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜后，用PBS溶液漂洗3遍后，在1%锇酸溶液中固定1–2 h。再用PBS溶液洗3遍后，分别用50%、70%、80%、90%、95%乙醇脱水各15 min后，用100%乙醇脱水2次，每次20 min。经50%醋酸异戊酯(醋酸异戊酯/乙醇)置换20 min后，最后加入醋酸异戊酯溶液过夜置换。CO₂临界点干燥仪干燥，喷金，TM-1000型扫描电镜观察被膜结构。

1.7 细菌总RNA提取

取过夜菌液1 mL接种至99 mL含3% NaCl LB培养基中30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养4 h (对数生长中期)，加入终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇，以添加等量DMSO为对照组，相同条件下继续培养3 h后离心富集菌体。根据TRIzol[®]试剂盒说明书提取RNA，总RNA用RNase-free DNase进行消化处理去除残留DNA。使用琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop1000微

量紫外分光光度计检测RNA样品的片段大小、浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和纯度(OD_{260}/OD_{280})。

1.8 RNA-Seq 及数据分析

将rRNA去除后，加入破碎缓冲液将mRNA打断成短片段后反转录，对获得的cDNA做末端修复、加PolyA并连接测序接头，琼脂糖凝胶电泳进行目的片段大小选择后，进行PCR扩增，建好的测序文库用Illumina HiSeq[™] 2000进行测序，所得序列通过比对(有参考基因组)形成全基因组范围的转录谱。实验中参考基因为*V. parahaemolyticus* RIMD 2210633基因组数据库(NCBI下载)。本研究中的序列信息已提交至NCBI Sequence Read Achieve数据库，登录号：SRX1074993。

转录组数据分析主要基于TopHat和Cufflinks软件处理样品的差异表达基因，根据基因的表达量(RPKM值)计算该基因的差异表达倍数，错误发生率(false discovery rate, FDR)多重检验校正P值。研究中将FDR \leq 0.01，且差异倍数在2倍及以上的基因定义为白藜芦醇处理后的差异表达基因。采用Gene Ontology、KEGG分析和SwissProt功能注释，分析差异表达基因生物学功能和分类汇总分析。

1.9 qRT-PCR

参照1.7方法培养获得菌体，分别提取总RNA，用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA，获得的cDNA在-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。荧光定量PCR反应体系(20 μL)：SDW 8 μL ；Power SYBR[®] Master Mix (2 \times)，10 μL ；上下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各0.5 μL ；模板cDNA 1.0 μL 。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min；40个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s；63 $^{\circ}\text{C}$ 25 s，收集荧光)；熔点曲线分析，55–95 $^{\circ}\text{C}$ 。每个样品重复3次，以16S rRNA基因作为内参基因，各个基因的相对表达水平以 $2^{-(C_{\text{T内参基因}} - C_{\text{T目的基因}})}$ 进行统计分析。引物序列如表1所示。

表1. 荧光定量PCR反应所用引物
Table 1. The used primers of real-time qRT-PCR

Gene	Primer (5'→3')	Size/bp
<i>luxS</i>	GGATTTTGTCTGGCTTTCCACTT	119
	GGGATGTCGCACTGGTTTTTAC	
<i>trh</i>	CCAGGGTCGGCTGAACTGTTA	94
	GGTTTGTCCAATAGTCCTCCACAA	
<i>tlh</i>	GACATCAACCGCTCATCGTCTGT	102
	CGTGACATCCCAGAACACAAACTT	
<i>flaA</i>	CGGACTAAACCGTATCGCTGAAA	128
	GGCTGCCCATAGAAAGCATTACA	
16S rRNA	GCCTTCGGGAAGCTCTGAGACAG	82
	GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA	

2 结果和分析

2.1 白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 抑菌活性分析

采用二倍稀释法测定白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 的抑菌活性, 结果见图1。经30 °C 培养24 h后, 白藜芦醇在20 μg/mL时能显著抑制细菌的生长($P < 0.05$), 浓度越高抑制活性越强(图1-A)。可见, 白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 的最小抑菌浓度为20 μg/mL。并分析白藜芦醇在1、5、10、20 μg/mL浓度下对该细菌整个生长过程的

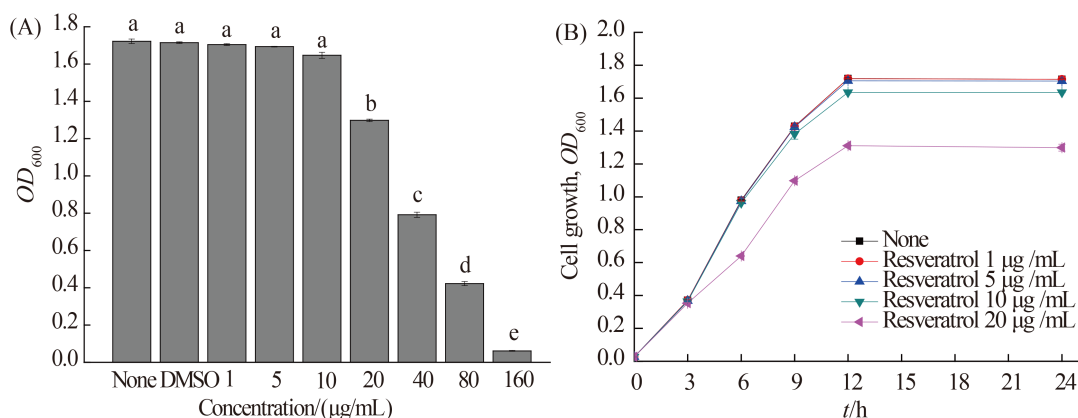


图1. 白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 抑菌活性

Figure 1. The antimicrobial activity of resveratrol against *V. parahaemolyticus*. None: containing no resveratrol and solvent DMSO. Means in the columns with the different letters were significantly differences ($P < 0.05$).

影响(图1-B)。结果发现, 在亚抑菌浓度下整个生长曲线过程中白藜芦醇均没有抑制菌体细胞生长($P > 0.05$), 而20 μg/mL白藜芦醇能显著减慢对数生长期和稳定期的细菌生长($P < 0.05$)。

2.2 白藜芦醇抗 *V. parahaemolyticus* 生物被膜能力评价

分析白藜芦醇在亚抑菌浓度下对 *V. parahaemolyticus* 生物被膜形成能力的影响, 如图2所示。结果表明, 白藜芦醇1、5、10 μg/mL对 *V. parahaemolyticus* 生物被膜形成抑制率分别为10.40%、21.03%和39.10% (图2-A), 而对其胞外多糖的抑制率分别为3.38%、36.09%和48.49% (图2-B)。白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 生物被膜和胞外多糖分泌的抑制表现相似的趋势, 均呈现浓度依赖效应。扫描电镜照片(图2-C、D)直观地显示10 μg/mL白藜芦醇处理后 *V. parahaemolyticus* 生物被膜结构的变化。对照组玻璃片表面粘附大量菌细胞, 且被细菌所分泌的一层厚厚胞外聚合物所包裹, 而处理组的菌群结构显得松散, 粘附量及胞外分泌物显著减少, 菌体裸露。

2.3 转录组测序分析差异表达基因

2.3.1 差异表达基因的功能分类: *V. parahaemolyticus* 在10 μg/mL白藜芦醇作用下共有106个基因发生明

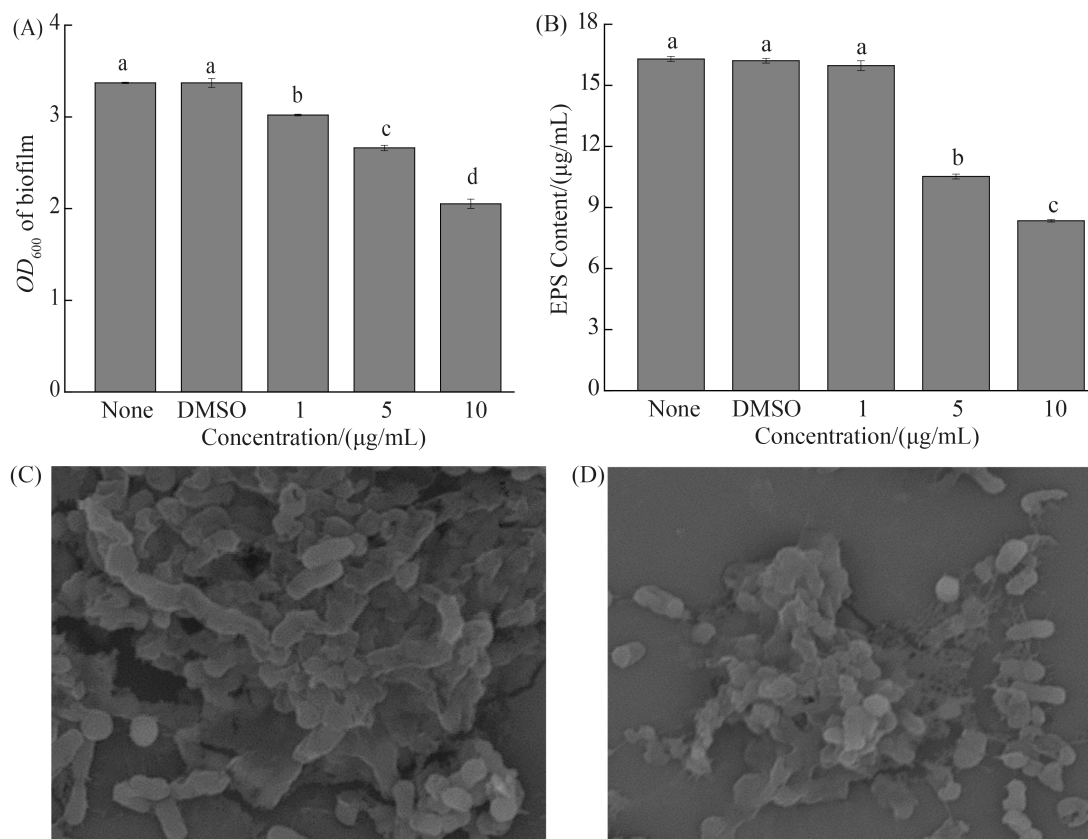


图 2. 亚抑菌浓度白藜芦醇对 *V. parahaemolyticus* 生物被膜及其胞外多糖产量的影响

Figure 2. The anti-biofilm capability of resveratrol at sub-MIC against *V. parahaemolyticus*. A: Quantitative assessment of biofilm biomass; B: Quantitative analysis of biofilm EPS; C: Scanning electron microscopy (SEM) images of untreated control; D: SEM images of treated sample by resveratrol at 10 µg/mL. Data was expressed as means± standard deviations ($n=3$). None: containing no resveratrol and solvent DMSO. Means in the columns with the different letters were significantly differences ($P<0.05$).

显变化，其中34个基因功能不明或者未知(占32%)，上调的基因约占22.6%，而下调的基因约占77.4%。基于Gene Ontology软件将已知的差异表达基因进行WEGO富集分析，按照细胞组分(Cell component)，分子功能(Molecular function)和生物学过程(Biological process)3大类进行聚类分析，结果如图3所示。细胞组分(图3-A)中细胞(27.1%)、细胞部分(27.1%)、膜(24.67%)，分子功能(图3-B)中结合(35.8%)、催化活性(32.39%)，生物学过程(图3-C)中细胞过程(18.85%)、代谢过程(15.2%)等7条代谢通路中差异表达基因所占的比例较高，推测他们可能在白藜芦醇抑制 *V.*

parahaemolyticus 生物被膜分子机制中发挥重要作用。

2.3.2 主要差异表达基因功能分析：对上述7条代谢通路差异表达基因经SwissProt功能注释、BLASTp比对和KEGG通路分析，主要差异表达基因功能和通路如表2所示。受白藜芦醇调控产生的差异表达基因中，14个可能参与 *V. parahaemolyticus* 生物被膜形成的基因出现显著下调，主要包括膜蛋白、*luxS*、溶血素分泌蛋白、菌毛蛋白及鞭毛蛋白等。其次，差异表达数量较多的功能类群为新陈代谢过程相关基因，包括细胞色素C蛋白、柠檬酸合成酶、乙酰乙酰辅酶A还

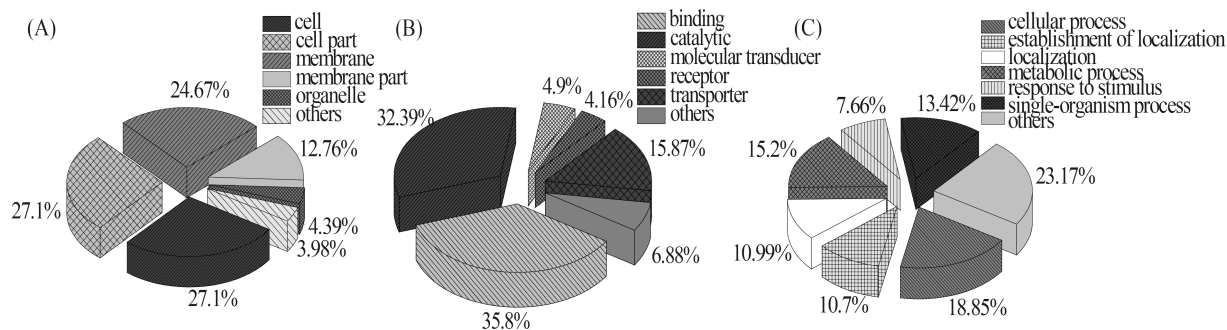


图 3. *V. parahaemolyticus* 转录组 unigene 的 GO 功能分类

Figure 3. Gene ontology of *V. parahaemolyticus* unigene in digital transcriptome. A, B and C represent cellular component, molecular function and biological process, respectively. The percent of each metabolic pathway was shown.

表 2. 白藜芦醇作用下 *V. parahaemolyticus* 重要差异表达基因和部分代谢通路

Table 2. Significant differentially expressed genes and partial metabolic pathways of *V. parahaemolyticus* in the presence of resveratrol

Gene ID	Log ₂ Ratio	Gene Description	KEGG Metabolic Pathways
VP_1112	-3.00710	Cytochrome c-type protein TorC	-
VP_1113	-2.69341	Trimethylamine-N-oxide reductase	Two-component system
VP_1892	-1.81043	Hemolysin secretion protein	Bacterial secretion system
VP_0129	-2.28820	Fimbrial assembly protein PilQ	-
VP_0762	-1.82068	Cysteine synthase (LuxS)	Cysteine and methionine metabolism
VP_3063	-1.57160	Outer membrane protein W	Protein export
VP_4536	-1.52727	Inner membrane protein YjiG	-
VP_0802	-1.52447	Citrate synthase	Citrate cycle (TCA cycle)
VP_0199	-1.48339	Flagellin A	Flagellar assembly
VP_1845	-1.42626	Cytochrome C-552	Oxidative phosphorylation
VP_1810	-1.39058	Hemolysin secretion protein	Bacterial secretion system
VP_4159	-1.31877	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis
VP_3132	-1.31142	Putative outer membrane protein YedS	Protein export
VP_4134	-1.24630	Acetoacetyl-CoA reductase	Pyruvate metabolism
VP_2724	-1.20616	Protein-export protein SecB	Protein export
VP_3215	-1.14407	Dipeptide and tripeptide permease A	-
VP_2265	-1.13771	Outer membrane protein OmpK	Two-component system
VP_0009	-1.08191	Putative amino-acid ABC transporter-binding protein PathH	Biosynthesis of amino acids
VP_0317	-1.06405	Malate dehydrogenase	Citrate cycle (TCA cycle)
VP_1526	-1.06218	Ribosome modulation factor	Ribosome
VP_2735	-1.04407	Fumarate reductase subunit D	Citrate cycle (TCA cycle)
VP_3756	-1.03448	Cystine-binding periplasmic protein	Cysteine and methionine metabolism
VP_3442	-1.01166	Hemolysin secretion protein	Bacterial secretion system
VP_3004	-1.00832	Sodium/glutamate symport carrier protein	-
VP_1450	1.14776	Chaperone protein TorD	Microbial metabolism in diverse environments
VP_3786	1.16511	Inner membrane protein YcdZ	-
VP_3064	1.45182	Multidrug resistance protein K	Bacterial chemotaxis
VP_3065	1.67500	Multidrug resistance protein B	Bacterial chemotaxis

原酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶等。此外,白藜芦醇作用还造成其他一些相关基因的改变,如下调约6.47倍的氧化三甲胺还原酶基因及上调2.22倍的伴侣蛋白TorD基因等。KEGG数据库进行代谢途径注释,发现在差异表达基因中注释到43条不同的代谢通路(表2),包括新陈代谢(核糖体、碳氮代谢、三羧酸循环、丙酮酸代谢、脂肪酸合成和代谢、氨基酸合成、糖酵解、嘌呤代谢、甘油磷脂代谢等)、蛋白运输和分泌(蛋白运输、细菌的分泌系统、双组分系统等)、氧化磷酸化、二级代谢物合成、细菌趋化性及鞭毛组装等通路,其中蛋白运输、细菌分泌系统、两组分系统、糖代谢、鞭毛组装通路的变化与生物被膜形成有关。

2.4 qRT-PCR 验证基因表达量变化

以16S rRNA基因作为内参基因,采用qRT-PCR检测白藜芦醇作用下与生物被膜密切相关的4个基因*luxS*、*trh*、*tlh*和*flaA*的转录水平变化,结果如图4所示。与对照组相比,白藜芦醇处理组4个基因*luxS*、*trh*、*tlh*和*flaA*的表达量均出现明显

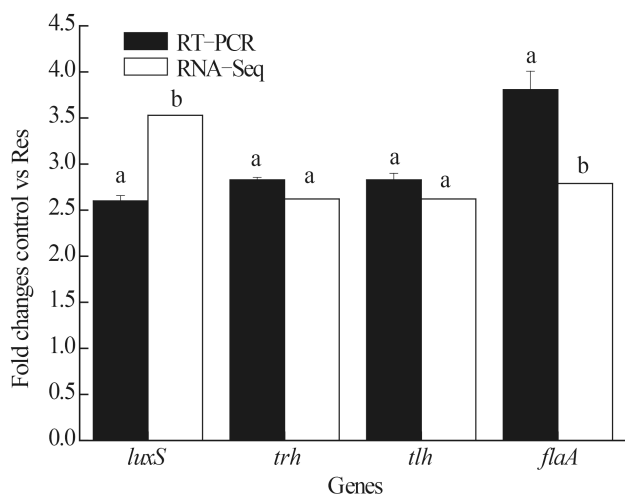


图4. RT-PCR检测*V. parahaemolyticus* 4个差异表达基因

Figure 4. Detection of four gene expression profiles by qRT-PCR. Means in the columns with the different letters were significantly differences ($P < 0.05$).

的下调($P < 0.05$),对照组与处理组相应基因表达量的比值分别为2.60、2.83、2.83、3.81,相应的RNA-Seq测定转录产物比值为3.53、2.62、2.62、2.79,两种方法分析所得基因表达水平趋势基本一致,表明RNA-Seq技术结果较可靠。

3 讨论

*V. parahaemolyticus*是海水养殖中的一种重要条件致病菌,食源性致病菌生物被膜的形成给食品安全控制带来不可忽视的潜在危害。近年来,研究发现香豆素、姜黄素、肉桂醛和丁香酚等多种可食用植物素均具有抗致病菌生物被膜的潜能^[17-20]。本研究发现白藜芦醇在亚抑菌浓度下对*V. parahaemolyticus*生物被膜和胞外多糖具有较强的抑制效果,表明该菌的生物被膜对白藜芦醇较为敏感。Lee等^[21]发现10 $\mu\text{g/mL}$ 白藜芦醇及其衍生物反式对二苯代乙烯能显著抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)溶血素分泌。

经RNA-Seq及GO功能、SwissProt功能注释和KEGG通路分析显示,白藜芦醇作用下*V. parahaemolyticus*基因水平发生明显的变化,差异表达基因主要参与物质合成与转运、新陈代谢、SOS应答反应等生物学过程。并发现在白藜芦醇作用下*V. parahaemolyticus*在蛋白运输、细菌分泌系统和双组分系统通路发生变化,在差异表达的5个膜蛋白基因中,编码外膜蛋白合成的*w*(VP_3063)、*yedS*(VP_3132)、*ompK*(VP_2265)呈现表达下调。而外膜蛋白Omp基因簇中*ompA*已经在很多细菌中被证实作为一种粘附素在生物被膜形成过程中促进细菌间及细菌与表面间的交流^[23-24]。除了细菌本身分泌的蛋白质,生物被膜基质还包括大量的周质蛋白、细胞质蛋白、内膜及外膜蛋白,其中膜蛋白已被发现是*V. cholerae*生物被膜的重要基质蛋白之一^[25]。Park等^[26]发现*V. vulnificus*中OmpA蛋白的上调表达可能受3', 5'-环

二鸟苷酸(cyclic di-GMP)调控, 进而促进其生物被膜形成过程。可见, 白藜芦醇的添加影响细菌蛋白运输和分泌通路, 导致细胞膜蛋白及一些重要基质蛋白的改变, 从而干扰细菌在宿主表面的粘附及生物被膜的成熟。

研究表明, 白藜芦醇的添加引起*V. parahaemolyticus* *luxS*的表达量显著下调。由*luxS*编码合成的AI-2信号分子是许多细菌进行种内和种间交流的群体感应(Quorum sensing, QS)语言^[27], 参与调控细胞毒力因子表达^[28]、生物被膜形成^[29]、毒素分泌^[30]等多种过程。已发现弧菌属(*Vibrio* sp.)存在*luxM/N*、*cqsA/S*、*luxS/AI-2*三种类型QS系统, 生物被膜的形成、毒力因子的诱导主要受到*luxS/AI-2*相关的QS系统调控^[31]。双组分系统通路也发现, 白藜芦醇不仅引起OmpR家族、NarL家族和NarC家族的变化, 还能影响Lux家族、LuxR家族及其他家族。可溶性的信号分子能影响RpfC和RpfG, 进而通过环二鸟苷酸抑制Clp和 δ 54调控生物被膜、运动性和毒力的活性, 该通路在分子层面部分解释了其在群体感应和生物被膜的表型变化及关联。相似地, Shafreen等^[19]已证实肉桂醛及其衍生物通过抑制*luxS*基因表达, 影响酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的生物被膜形成及毒素分泌。秦皮乙素能显著抑制*E. coli* O157: H7中志贺类毒素基因(*stx2*)表达, 并影响QS基因(*lsrA*, *luxS*)的表达^[17]。Qin等^[32]运用RNA-Seq分析发现白藜芦醇主要通过干扰*S. aureus* QS系统及毒力因子荚膜多糖的合成抑制其生物被膜的形成。因此, *luxS*基因可作为潜在的靶点来抑制致病菌生物被膜的形成及毒力因子的表达。

依赖于鞭毛调控的运动性可影响细胞与接触表面的交流与粘附, 与生物被膜形成密切相关^[33]。Rendón等发现*E. coli* O157: H7菌毛蛋白与其生物被膜的形成密切相关^[35], 已发现*V. parahaemolyticus*菌毛与黏附作用也有关^[34]。本研究中*V. parahaemolyticus*

在白藜芦醇作用下鞭毛蛋白A及菌毛组装蛋白PilQ出现显著下调, Lee等^[11]运用qRT-PCR分析发现20 μ g/mL白藜芦醇通过抑制*E. coli* O157: H7菌毛基因(*csgA*, *csgB*)及鞭毛运动性基因(*fimA*, *fimH*, *flhD*, *fliA*, *motB*, *qseB*, *qseC*)表达抑制生物被膜形成。因此, 白藜芦醇可通过干扰鞭毛的组装通路影响细菌的运动性^[7], 并抑制菌毛形成干扰*V. parahaemolyticus*的粘附过程。

外源白藜芦醇添加后, *V. parahaemolyticus*多个新陈代谢过程相关基因表达量明显下调, 其中细胞色素C类蛋白*torC*基因作为呼吸链中一个重要的电子载体下调表达最显著。此外, 三羧酸循环的多种酶等均参与糖脂代谢, 直接或间接影响细菌生理学状态。因此, 推测*V. parahaemolyticus*在外源生物被膜抑制剂胁迫下, 细胞可能出现代谢重构, 通过降低自身的新陈代谢水平以减弱对白藜芦醇的敏感性。Qin等^[31]也发现乌索酸在抑制抗甲氧西林*S. aureus*生物被膜形成的同时, 细菌自身与氨基酸代谢相关的*arcA*、*arcB2*、*arcD*和*aur*基因出现下调, 提示与代谢相关基因与生物被膜存活密切相关。此外, 转录表达上调的基因还有编码多药耐药相关蛋白(Mrp)和伴侣蛋白, 包括Mrp K (VP_3064), Mrp B (VP_3065), TorD (VP_1450), 可能与启动SOS应答, 通过激活Mrp表达抵御白藜芦醇渗透入细胞核内, 并调动热休克蛋白来修复可能出现的损伤。

qRT-PCR证实, 白藜芦醇作用下该弧菌中4个与生物被膜形成密切相关的*luxS*、*trh*、*tlh*和*flaA*基因表达量显著低于对照组, 与转录组测序分析结果相符。相似地, Lee等^[11]运用qRT-PCR测定白藜芦醇及其多聚物作用下与生物被膜相关基因的表达量变化, 发现其显著抑制了*E. coli* O157:H7中菌毛基因(*csgA*, *csgB*, *csgC*, *csgD*, *csgF*, *csgG*)、QS基因(*larA*, *luxS*, *tnaA*)及运动性基因(*flhD*, *motB*)。

4 小结

本研究发现亚抑菌浓度白藜芦醇能显著抑制 *V. parahaemolyticus* 生物被膜的形成。通过转录组数据的分析、挖掘及qRT-PCR验证,发现在白藜芦醇作用诱导下 *V. parahaemolyticus* 中新陈代谢、QS系统、膜蛋白分泌及溶血素分泌等通路可能参与调控生物被膜的形成,白藜芦醇可能主要通过干扰LuxS相关的QS系统、鞭毛合成及蛋白分泌通路,影响溶血素蛋白等毒力因子、鞭毛的运动性、胞外多糖合成,从而干扰细胞的粘附和定殖及胞外分泌物的产生,协调控制生物被膜形成,其深层机制仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ye XM, Lu C. Advance in quorum-sensing system to affect *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Journal of Microbiology*, 2010, 30(1): 80–83. (in Chinese)
叶晓敏, 陆春. 霍乱弧菌群体感应系统影响生物膜形成的研究进展. *微生物学杂志*, 2010, 30(1): 80–83.
- [2] Milton DL. Quorum sensing in *Vibrios*: complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296(2/3): 61–71.
- [3] Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(9): 881–890.
- [4] Mao ZJ, Yu L, You ZQ, Wei YW, Liu Y. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 567–575.
- [5] Elexson N, Afsah-Hejri L, Rukayadi Y, Soopna P, Lee HY, Tuan Zainazor TC, Nor Ainy M, Nakaguchi Y, Mitsuaki N, Son R. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*, 2014, 35(1): 378–385.
- [6] Zhang YB, Li Y, Sun XL. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(11): 2299–2307.
- [7] Packiavathy IASV, Sasikumar P, Pandian SK, Ravi AV. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10177–10187.
- [8] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(6): 493–506.
- [9] Guo YZ, Rowe-Magnus DA. Identification of a c-di-GMP-regulated polysaccharide locus governing stress resistance and biofilm and rugose colony formation in *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity*, 2010, 78(3): 1390–1402.
- [10] Morinaga N, Yahiro K, Noda M. Resveratrol, a natural polyphenolic compound, inhibits cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation in Vero cells. *Toxicon*, 2010, 56(1): 29–35.
- [11] Lee JH, Kim YG, Ryu SY, Cho MH, Lee J. Resveratrol oligomers inhibit biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(1): 168–172.
- [12] Silván MJ, Mingo E, Hidalgo M, De Pascual-Teresa S, Carrascosa AV, Martínez-Rodríguez AJ. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp.. *Food Control*, 2013, 29(1): 25–31.
- [13] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2950–2958.
- [14] Nithya C, Devi MG, Pandian SK. A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6–15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling*, 2011, 27(5): 519–528.
- [15] Yu W, Yang XM, Liu WM, Liu F, Ma HL. Assay study on content of polysaccharides in ficus carica by phenol-sulfuric acid method. *Food Science and Technology*, 2009, 34(10): 256–258, 262. (in Chinese)
郁玮, 杨小明, 刘伟民, 刘方, 马海乐. 苯酚-硫酸法测定无花果中多糖含量的研究. *食品科技*, 2009, 34(10): 256–258, 262.
- [16] Kim JE, Choi NH, Kang SC. Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 2007, 18(10): 1198–1203.
- [17] Lee JH, Kim YG, Cho HS, Ryu SY, Cho MH, Lee J. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Phytomedicine*, 2014, 21(8/9): 1037–1042.
- [18] Packiavathy IASV, Priya S, Pandian SK, Ravi AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin—an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 2014, 148: 453–460.
- [19] Shafreen RMB, Selvaraj C, Singh SK, Pandian SK. *In silico* and *in vitro* studies of cinnamaldehyde and their derivatives

- against LuxS in *Streptococcus pyogenes*: effects on biofilm and virulence genes. *Journal of Molecular Recognition*, 2014, 27(2): 106–116.
- [20] Packiavathy IASV, Agilandewari P, Musthafa KS, Pandian SK, Ravi AV. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*, 2012, 45(1): 85–92.
- [21] Lee K, Lee JH, Ryu SY, Cho MH, Lee J. Stilbenes reduce *Staphylococcus aureus* hemolysis, biofilm formation, and virulence. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(9): 710–717.
- [22] Song Z, Chen W, Zhang LY, Dong HB, Bai HL, Fu BD, Shen HQ, Wei XB. Research progress of outer membrane protein A of *E. coli*. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(5): 199–202. (in Chinese)
宋舟, 陈伟, 张立艳, 董海兵, 白换力, 付本懂, 申海清, 韦旭斌. 大肠杆菌外膜蛋白A研究进展. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(5): 199–202.
- [23] Barrios AFG, Zuo RJ, Ren DC, Wood TK. Hha, YbaJ and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(1): 188–200.
- [24] Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 273(1): 1–11.
- [25] Absalon C, Van Dellen K, Watnick PI. A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002210.
- [26] Park JH, Lim JG, Choi SH. Effects of elevated intracellular cyclic di-GMP levels on biofilm formation and transcription profiles of *Vibrio vulnificus*. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(2): 771–776.
- [27] Chen X, Schauder S, Potier N, van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, 415(6871): 545–549.
- [28] Lyon WR, Madden JC, Levin JC, Stein JL, Caparon MG. Mutation of *luxS* affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(1): 145–157.
- [29] McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS, Lamont RJ. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(1): 274–284.
- [30] Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(1): 171–179.
- [31] Silva AJ, Benitez JA, Wu JH. Attenuation of bacterial virulence by quorum sensing-regulated lysis. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(1): 22–30.
- [32] Qin N, Tan XJ, Jiao YM, Liu L, Zhao WS, Yang S, Jia AQ. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5467.
- [33] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 285–293.
- [34] Rendón MA, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(25): 10637–10642.
- [35] Chakrabarti MK, Sinha AK, Biswas T. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* to rabbit intestinal epithelial cells in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 84(1): 113–117.

Inhibition analysis of resveratrol against *Vibrio parahaemolyticus* biofilm based on RNA-Seq technology

Fang Zhang, Junli Zhu^{*}, Lifang Feng

College of Food Science & Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] Food phytochemicals as biofilm inhibitor of pathogens have been highlighted. Our study aimed to investigate the effects of resveratrol on biofilm formation of an aquatic pathogen *Vibrio parahaemolyticus*, and to elucidate the important regulatory genes. [Methods] In the subinhibitory concentrations, the inhibition of resveratrol against biofilm and exopolysaccharides of *V. parahaemolyticus* was detected, and the differentially expressed genes were analyzed based on RNA-Seq. Four genes involved in biofilm formation was validated by qRT-PCR. [Results] The minimum inhibitory concentration of resveratrol against *V. parahaemolyticus* was 20 µg/mL. Resveratrol at the subinhibitory concentration of 5 µg/mL and 10 µg/mL significantly decreased the biofilm development and exopolysaccharides production in *V. parahaemolyticus* ($P<0.05$). Scanning electron microscopy micrographs showed a significant reduction of adherence and extracellular polymeric substances. RNA-Seq analysis revealed that 22.6% up-regulated and 77.4% down-regulated gene ($P<0.05$) after treatment by 10 µg/mL resveratrol among 106 differential gene expressions. These differential genes in *V. parahaemolyticus* focused on 7 metabolic pathways, and 14 genes involved in biofilm formation were down-regulated by resveratrol, such as outer membrane protein (W, YedS, OmpK), quorum sensing (LuxS), flagellin (FlaA), fimbrial assembly protein (PilQ), hemolysin secreted protein. qRT-PCR confirmed that the expressions of *luxS*, *trh*, *tlh* and *flaA*, was significantly repressed in the presence of resveratrol, which was consistent with transcriptomics data. [Conclusion] Inhibitory activity of resveratrol on biofilm formation was associated with multiple genes and diverse cellular processes in *V. parahaemolyticus*. These findings suggest that resveratrol would disturb various metabolic pathways, particularly quorum sensing system, adhesion process and membrane proteins secretion, resulting in inhibition of attachment and biofilm development. The present work provided valuable information to explore molecular mechanism of resveratrol as a novel anti-biofilm compound.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, resveratrol, biofilm, RNA-Seq, inhibition

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271954), by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY15C200001), and by the Innovative Foundation of Postgraduate (3100XJ1514134)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-571-88071024-8588; E-mail: junlizhu0305@163.com

Received: 5 August 2015; Revised: 30 November 2015; Published online: 11 December 2015