



假定调控蛋白 STM14_3514 可降低鼠伤寒沙门菌对上皮细胞的侵袭力

蒋玲艳^{1,2,3*}, 周启星¹, 王培胜^{2,3}, 江小涵^{2,3}, 冯露^{2,3}

¹南开大学环境科学与工程学院, 天津 300350

²南开大学泰达生物技术研究院, 天津 300457

³天津市微生物功能基因组学重点实验室, 天津 300457

摘要:【目的】研究鼠伤寒沙门菌致病岛 1(SPI-1)内部的假定调控蛋白 STM14_3514 的功能及其作用机制。【方法】以鼠伤寒沙门菌模式菌株 ATCC 14028 为亲本株, 构建了 *STM14_3514* 基因的缺失突变体及互补菌株, 通过小鼠实验、细胞侵袭实验、Western blot 及实时荧光定量 PCR (*qRT-PCR*)等实验技术, 深入研究了 *STM14_3514* 基因对鼠伤寒沙门菌致病过程的影响。【结果】STM14_3514 突变提高了细菌对小鼠的致病能力, 突变体在小鼠肠道、肝和脾中的定殖能力均增强; 细胞实验揭示, 突变体致病力提升主要由于 STM14_3514 突变能显著增强细菌对上皮细胞的侵袭力(>2 倍, $P<0.05$)。qRT-PCR 及 Western blot 分析表明, STM14_3514 显著抑制 SPI-1 内部主要调控因子 *hilA* 及侵袭相关基因的表达。此外, STM14_3514 对 *hilA* 的抑制由 HilC 介导。【结论】STM14_3514 是鼠伤寒沙门菌 SPI-1 内部的负调控因子, 能通过 HilC 抑制 *hilA* 及 SPI-1 其他入侵基因的表达, 该基因的生物学意义可能与细菌进入细胞后对 SPI-1 的负调控相关。

关键词: 鼠伤寒沙门菌, STM14_3514, 侵袭力, HilA, HilC

沙门菌(*Salmonella*)是一种重要的人畜共患肠道致病菌, 能引起肠胃炎、菌血症和伤寒等多种疾病^[1]。全球每年沙门菌感染的病例超过 9000 万, 造成约 15 万人死亡^[2], 给社会经济和人类健康带来巨大威胁。深入研究沙门菌的致病机制具有重要的公共卫生意义。鼠伤寒沙门菌(*S. enterica* serovar Typhimurium, *S. Typhimurium*)是引起人类

肠胃炎的主要血清型, 它对小鼠致死、小鼠感染后症状类似于人伤寒症^[3-4]。因此, 鼠伤寒沙门菌感染小鼠及小鼠细胞常被用作典型模型, 用于研究沙门菌的致病因子及调控机制。

侵袭宿主的肠道上皮细胞是鼠伤寒沙门菌成功致病的第 1 个关键步骤, 该过程所依赖的毒力因子由沙门致病岛 1(*Salmonella* pathogenicity

基金项目: 中国博士后科学基金(2016M591381); 国家国际科技合作专项(2012DFG31680)

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-65333286; E-mail: jianglingyan@nankai.edu.cn

收稿日期: 2016-07-21; 修回日期: 2016-11-04; 网络出版日期: 2016-11-29

island-1, SPI-1)编码^[5]。SPI-1 毒力蛋白会引起宿主细胞发生一系列变化,例如:诱导细胞骨架重排促使细菌进入细胞、诱导细胞凋亡、刺激细胞因子分泌和引起炎症等^[6-7]。SPI-1 的表达及其相关的侵袭过程受到严格的调控,涉及到许多调控蛋白复杂的相互作用。其中,SPI-1 内部的 HilA 是最主要的调控因子,几乎控制 SPI-1 所有效应基因的表达,其他的调节蛋白多数通过 HilA 来控制 SPI-1^[8]。目前,已经发现了 HilA 的多个上游调控因子,其中最主要的几个分别为激活因子 HilD、HilC 和 RtsA,以及抑制因子 HilE;HilD 和 HilC 由 SPI-1 内部基因编码,RtsA 和 HilE 由 SPI-1 外部基因编码^[9-10]。

本实验室前期研究鼠伤寒沙门菌 Fis 蛋白对 SPI-1 调控的工作中发现,Fis 蛋白对 SPI-1 大多数基因都是正调控,只有少数基因是负调控,其中

包括假定的调控蛋白编码基因 *STM14_3514*^[11]。由于 Fis 蛋白对侵袭的正调控作用,推测 *STM14_3514* 可能是与侵袭相关的负调控因子。本文通过基因敲除、突变体毒力研究、Western blot 以及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)等手段,对 *STM14_3514* 基因的调节功能进行了深入研究。结果证实基因 *STM14_3514* 是鼠伤寒沙门菌 SPI-1 内部的负调控因子,能通过 HilC 抑制 *hilA* 基因的表达。这个负调控因子在细菌侵入细胞后,在抑制 SPI-1 的表达过程中发挥作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞系和培养条件:本实验所用到的菌株及质粒见表 1。鼠伤寒沙门菌野生型

表 1. 本文所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Plasmids or strains	Description	Sources
Plasmids		
pKD46	Red recombinase system under an arabinose-inducible promoter; Ap ^R	Lab collection
pKD3	Template plasmid containing the Cm cassette for λ Red recombination; Cm ^R	Lab collection
pKD4	Template plasmid containing the Km cassette for λ Red recombination; Km ^R	Lab collection
pCP20	A temperature-sensitive replicon expressing the FLP gene to remove antibiotic resistance of mutant strains; Ap ^R	Lab collection
pWSK129	Low-copy-number expression vector; Km ^R	Lab collection
pWSK 3×FLAG	pWSK129 carrying 3×FLAG sequence and Cm cassette; Cm ^R , Km ^R	Lab construction
p3514	pWSK129 carrying the 14028 <i>STM14_3514</i> gene; Km ^R	This study
pHilC	pWSK129 carrying the 14028 <i>hilC</i> gene; Km ^R	This study
Strains		
14028	Wild-type <i>S. Typhimurium</i> strain	Lab collection
14028 pKD46	14028 contain plasmid pKD46; Ap ^R	Lab construction
Δ <i>STM14_3514</i>	14028 <i>STM14_3514</i> gene deleted	This study
ΔHilC	14028 <i>hilC</i> gene deleted	This study
Δ <i>STM14_3514</i> ΔHilC	14028 <i>STM14_3514</i> and <i>hilC</i> gene deleted	This study
Δ <i>STM14_3514</i> +p3514	Δ <i>STM14_3514</i> complemented by plasmid p3514; Km ^R	This study
Δ <i>STM14_3514</i> ΔHilC+p3514	Δ <i>STM14_3514</i> ΔHilC complemented by plasmid p3514; Km ^R	This study
Δ <i>STM14_3514</i> ΔHilC+pHilC	Δ <i>STM14_3514</i> ΔHilC complemented by plasmid pHilC; Km ^R	This study
14028 <i>hilA</i> -3×FLAG	14028 <i>hilA</i> gene added with 3×FLAG tag; Cm ^R	This study
Δ <i>STM14_3514</i> <i>hilA</i> -3×FLAG	Δ <i>STM14_3514</i> <i>hilA</i> gene added with 3×FLAG tag; Cm ^R	This study
Δ <i>STM14_3514</i> +p3514 <i>hilA</i> -3×FLAG	Δ <i>STM14_3514</i> +p3514 <i>hilA</i> gene added with 3×FLAG tag; Cm ^R , Km ^R	This study

Ap^R: ampicillin resistance; Km^R: kanamycin resistance; Cm^R: chloramphenicol resistance.

菌株 ATCC 14028 以及质粒 pKD3、pKD4、pKD46 和 pCP20 均为本实验室收集保存。本实验所用其他菌株皆通过 ATCC 14028 构建。LB 培养基或琼脂平板用于菌株的培养及保存, 实验中所用抗生素浓度为: 氨苄青霉素(Ap) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素(Km) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素(Cm) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 庆大霉素(Gm) 10 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。HeLa 细胞系和小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自上海中国科学院细胞库。细胞培养采用 RPMI-1640 细胞培养基, 补充 10% 的胎牛血清, 于 75 cm^2 细胞培养瓶、5% CO_2 恒温培养箱中传代培养。细胞用胰酶消化后接种于 24 孔细胞培养板中, 继续孵育约 24–48 h, 待细胞铺满后直接用于实验。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、*Taq* 酶、dNTPs、T4 连接酶、cDNA 反转录试剂盒及 SYBR Green Mix 购自 TaKaRa 公司; RPMI-1640 培养基、胰酶和胎牛血清购自 Gibco 公司; 24 孔细胞培养板购自 Corning 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; RNA 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; DL2000 DNA Marker、阿拉伯糖及 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工; 鼠源单克隆 FLAG 标签抗体购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自康为世纪。

1.2 菌株构建

缺失及标签菌株的构建: 通过 λ Red 重组酶系统构建缺失菌株^[12]。设计含有被缺失基因同源序列(38–40 bp)的正反向引物, 引物由北京英骏生物技术有限公司合成, 序列见表 2。STM14_3514 和 *HilC* 的缺失分别以 pKD3 和 pKD4 为模板, 扩增出含有同源序列的 Cm 及 Km 抗性基因片段。将扩增片段分别电转至 14028 pKD46 感受态细胞, 使抗性片段同源重组至基因组上替换相应基

因, 通过 Cm 和 Km 平板筛选阳性克隆, PCR 以及测序验证缺失菌株的正确性。抗性片段的消除通过 pCP20 质粒完成, pCP20 可在 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 FLP 重组酶, 重组删除 FRT 位点之间的抗性片段。构建 *hilA* 3 \times FLAG 标签菌株的原理与缺失菌相同, 引物设计稍有差异。上游同源臂设计在 *hilA* 基因的终止密码子 TAA 之前, 下游同源臂设计在 TAA 之后, 以实验室前期构建好的质粒 pWSK 3 \times FLAG 为模板扩增 3 \times FLAG 标签和 Cm 片段的组合序列, 产物经纯化后电转至相应菌株的感受态细胞, 从而通过同源重组方式在 *hilA* 基因的终止密码子前加入 3 \times FLAG 标签序列, Cm 平板筛选阳性克隆, PCR 以及测序方法验证标签序列的正确性。

回补菌株的构建: 设计回补引物, 以 14028 基因组为模板, PCR 扩增 *hilC* 及 *STM14-3514* 基因; 扩增产物经 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切后连接至低拷贝表达载体 pWSK129; 电转化相应缺失菌株的感受态细胞; Km 抗性平板筛选阳性克隆; 通过测序验证基因序列的准确性。

1.3 小鼠感染模型

实验用鼠为 6–8 w 的 BALB/c 小鼠, 小鼠实验依照国家研究委员会(美国)规定的法则进行。存活实验中, 被感染的小鼠 20 只分为 4 个组, 其中 2 组感染 14028 野生型菌株, 另 2 个组感染 STM14_3514 突变菌株。每只小鼠经口感染(灌胃)约 5×10^7 的野生型 14028 或者 STM14_3514 突变菌株, 监测被感染的小鼠的存活率, 监测时长为 8 d。

肝、脾及肠道中的细菌计数, 被感染的小鼠分为 4 组, 每只小鼠经口感染约 5×10^6 的野生型 14028 或者 STM14_3514 突变菌株, 感染后 5 h, 处死 2 组小鼠, 分离回肠打碎匀浆, 稀释涂板统

表 2. 本文所用引物序列
Table 2. Primers used in this study

Target genes	Primer sequences (5'→3')	
Construction of mutants and <i>hilA</i> 3×FLAG-tagged strain *		
<i>STM14_3514</i>	F	<u>TTGACAGTAAAGGAGCTCGCCATGCTCAATTTGCAGCG</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	R	CTACGATGATGGGGCGTGCTCCCCGCAATCCCATTGCG CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>hilC</i>	F	<u>ATGGTATTGCCTTCAATGAATAAATCAGTTGAGGCCAT</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	R	<u>TCAATGGTTCATTGTACGCATAAAGCTAAGCGGTGTA</u> CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>hilA</i>	F	<u>AAAGATGGAAACAGGATCCCCGCTTGATTAATACGG</u> GACTACAAAGACCATGACGGTG
	R	<u>CGATGATAAAAAATAATGCATATCTCCTCTCTCAGATT</u> TTACGCCCCCGCCTGCCACTCA
Identification of the mutants and <i>hilA</i> 3×FLAG-tagged strain		
<i>STM14_3514</i>	F	AAACCACTGCCACTTTACTGC
	R	CGTTACTGCCGATTGTTGTT
<i>hilC</i>	F	TGGTGTAGCGATACTGAAAT
	R	GTGCATAAAGTTTGTAAGGGTA
<i>hilA</i>	F	TTCTGGAAAGTGAACAGCGT
	R	TGGGCGATAGCGTAAAGTAG
Construction of complementation strain #		
<i>STM14_3514</i>	F	CG <i>GGATCC</i> GTATGCAGATCCACGGAC
	R	G <i>GAATTC</i> CTACGATGATGGGGCGTG
<i>hilC</i>	F	CG <i>GGATCC</i> ATTAATATTGTAAGCTTTCAT
	R	G <i>GAATTC</i> TCAATGGTTCATTGTACGC
qRT-PCR primers		
<i>16S rRNA</i>	F	GAAAGCGTGGGGAGCAAAC
	R	ACATGCTCCACCGCTTGTG
<i>STM14_3514</i>	F	ATTACCACTACGCCGAGTTT
	R	AACGACTCCAGCGACGACA
<i>hilA</i>	F	CGCTGGCAGAATGCTACCTC
	R	TGTTTGAATAGCAAACCTCCCGA
<i>hilC</i>	F	TTTTCATGCGGACTTGTTGC
	R	CTCAGCCTGTGACCATTTC
<i>hilD</i>	F	GCTTTCGGAGCGGTAAACTG
	R	CCAAGTCGTTGCGTCGGTAT
<i>hilE</i>	F	GCTTACAACCACAACCCGAC
	R	CAGCACGCCTTCTTTCACC
<i>rtsA</i>	F	TATTACGGCATCAGGGCCA
	R	ACTCTTGCTACGCCTGTTTCTA
<i>sipA</i>	F	CTGCCAGAAACAAAGAAAGCG
	R	CTTGTCAACAAGGTGCGTAAG
<i>spaQ</i>	F	GGTAGGGTTATTCCAGACGGT
	R	ACTTCGCCATACCAGCCAGA
<i>invI</i>	F	GAGGCGATCCTTGAACAAATAG
	R	GCGAACAATAGACTGCTTACGT

* Primers were designed carry extensions homologous to 38–40 bp (underlined) of the target gene; # Restriction enzyme cutting site were marked in italics, *EcoR* I : *GAATTC*, *BamH* I : *GGATCC*. F: forward; R: reverse.

计细菌数目。5 d 后，处死另外 2 组小鼠，分离肝脏和脾脏打碎匀浆，稀释涂板统计细菌数目。

1.4 粘附及侵袭力检测

细菌对上皮细胞的粘附及侵袭力检测参考文献[13]中的方法。对数中期($OD_{600}=0.6-0.8$)的细菌用细胞培养基重悬，平板计数初始菌量。细菌按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10 加入至细胞培养板， $1000\times g$ 离心 5 min，然后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 恒温培养箱中共培养 1 h。吸去菌液，用磷酸(PBS)缓冲液洗 3 次，加入 1 mL 0.1% SDS 裂解细胞，裂解液梯度稀释后涂板计数。细菌粘附率(%)=粘附细菌数/每孔中加入的细菌数 $\times 100$ 。

侵袭力检测方法基本同上。细菌与细胞共培养 1 h，吸去菌液并用 PBS 洗 3 遍，然后在含细菌和细胞的 24 孔板中加入含有浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ Gm 的培养基，继续培养 1 h，以杀死未进入细胞的细菌。裂解细胞，稀释后涂平板计数。细菌侵袭率(%)=细胞内细菌数/粘附细菌总数 $\times 100$ 。

1.5 复制能力检测

在巨噬细胞内的复制力检测参考文献[14]中的方法。对数中期的细菌用细胞培养基重悬，按照 MOI=10 加入至细胞培养板， $1000\times g$ 离心 5 min， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 恒温培养箱培养 30 min。PBS 洗 3 遍，此时的时间点定为 T_0 。向孔板中加入终浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ Gm 的细胞培养基，继续孵育 2 h，裂解部分细胞，涂板计数，此时即 T_2 的细菌数目为初始胞内菌量。将培养基换成新的含 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 1640，继续孵育 14 h，裂解剩余细胞涂板计数细胞内 T_{16} 时的胞内菌量。细菌复制力= T_{16} 胞内菌量/ T_2 胞内菌量。

1.6 qRT-PCR

提取各测试样品的 RNA 并用 RNA 纯化试

剂盒纯化，进行反转录，程序为： $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min， $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。反转录得到的 cDNA 进行 qRT-PCR 检测，反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行，反应程序为： $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s， $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min，40 个循环。以 16S rRNA 作为内参基因。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的差异表达倍数。

1.7 Western blot

参考文献[15]和[16]中的方法进行 Western blot 实验。应用构建好的 FLAG 标签菌株，收集细胞侵袭阶段的细菌，通过测定 OD_{600} 及平板计数检测各样品中细菌含量，PBS 稀释最终使各样品的菌浓度保持一致。对浓度调节后的样品进行超声破碎，与 $4\times$ 载样缓冲液混合后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 煮 10 min， $12000\times g$ 离心 10 min，收集上清中蛋白样品。电泳前测定总蛋白浓度，确保各样品蛋白浓度一致，取 $18\text{ }\mu\text{L}$ 样品进行 SDS-PAGE 电泳(5%浓缩胶，电压 80 V；10%分离胶，电压 120 V，电泳时间 2-3 h)，电转移至醋酸纤维素膜上，丽春红染色观察蛋白质转移情况。经水冲洗后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h，后加入 500 倍稀释的鼠源 FLAG 抗体， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次，每 5 min 换液 1 次；加入 1000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗，室温孵育 1.5 h 后显影分析。

2 结果和分析

2.1 STM14_3514 突变增强鼠伤寒沙门菌对小鼠的致病性

比较野生型 14028 和 ΔSTM14_3514 对小鼠的毒性，发现与野生型 14028 相比，STM14_3514 突变体对小鼠的毒性明显增强。如图 1-A 所示，

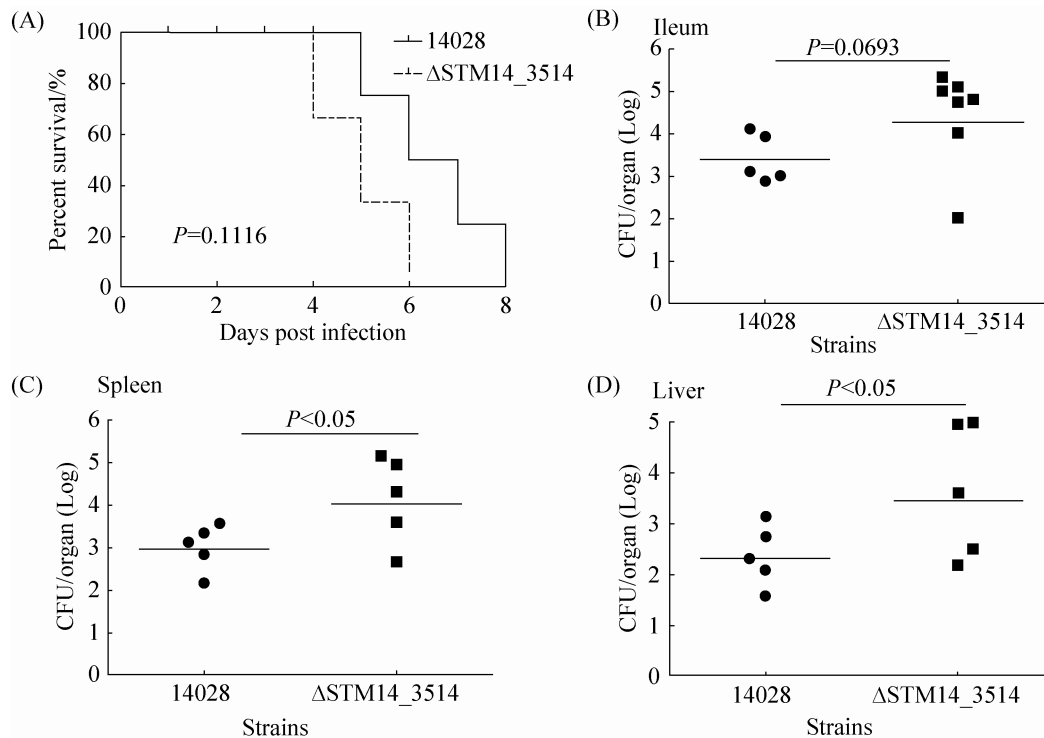


图 1. *STM14_3514* 突变增强鼠伤寒沙门菌对小鼠的致病性

Figure 1. $\Delta STM14_3514$ are more virulent to BALB/C mice than wild-type *S. Typhimurium* 14028. A: survival plots of mice intragastrically inoculated with 5×10^7 CFUs *S. Typhimurium* 14028 or $\Delta STM14_3514$ strains. Data are representative of at least two independent experiments. B-D: bacterial counts recovered from ileum and systemic organs. Mice were intragastrically inoculated with 5×10^6 CFUs *S. Typhimurium* 14028 or $\Delta STM14_3514$ strain. Five hours post-infection ileum were harvested and homogenized for colony enumeration; five days post-infection liver and spleen were harvested and homogenized for colony enumeration. Data are representative of three independent experiments. Bars represent mean CFUs of all mice, with data significance determined by student's *t* test.

感染 14028 野生型菌株的小鼠在感染后第 5 天开始死亡, 8 d 内全部死亡; 感染 $\Delta STM14_3514$ 菌株的小鼠在感染后 4 d 开始死亡, 6 d 内全部死亡; 说明 *STM14_3514* 突变导致鼠伤寒沙门菌对小鼠的致死能力提高。由于小肠末端、肝、脾是鼠伤寒沙门菌感染后的主要定殖位点, 定殖能力越强, 相应的菌株毒力越强, 因此我们比较了野生型和突变体在这些位点的定殖细菌数目。结果如图 1-B-D, 突变株 $\Delta STM14_3514$ 在回肠、肝和脾的定殖细菌量均高于野生型。以上结果综合表明, *STM14_3514* 突变能增强鼠伤寒沙门菌对小鼠的

致病性, 因此 *STM14_3514* 基因对鼠伤寒沙门菌的毒力起抑制作用。

2.2 *STM14_3514* 突变增强鼠伤寒沙门菌对上皮细胞的侵袭力

粘附并侵入宿主的肠道上皮细胞以及在宿主巨噬细胞内进行生存复制是鼠伤寒沙门菌致病过程中的关键因素^[4-6], 我们检测了 *STM14_3514* 突变对这些过程的影响。为避免由缺失菌生长能力差异造成的实验误差, 我们首先检测了基因缺失及回补对细菌生长的影响。如图 2-A 和 2-B 所示, *STM14_3514* 突变株及回补菌株 $\Delta STM14_3514+p3514$ 在普通

LB 培养基和细胞培养基 1640 中的生长能力都与野生型 14028 类似。沙门菌对 HeLa 细胞的粘附侵袭力能反映该细菌在体内对肠道上皮细胞的粘附侵袭能力^[17]，已被广泛用于沙门菌的侵袭实验^[18-20]，因此本研究以 HeLa 细胞系为模型检测缺失菌的粘附及侵袭力变化。对 HeLa 细胞的粘附及侵袭结果表明：在生长情况基本一致的前提下，STM14_3514 突变不影响细菌的粘附率(图 2-C)，

但显著增强细菌侵入细胞的能力($P < 0.05$)，回补 STM14_3514 后细菌的侵袭力又回复到野生型水平(图 2-D)，说明确实是由于 STM14_3514 突变导致的侵袭力提高。此外，巨噬细胞内生存复制实验结果显示，突变株在鼠巨噬细胞 RAW264.7 内的复制能力略低于野生株，但差异不显著(图 2-E)。以上结果表明，STM14_3514 基因突变主要影响致病过程中对上皮细胞的侵袭阶段，因此 Δ STM14_3514

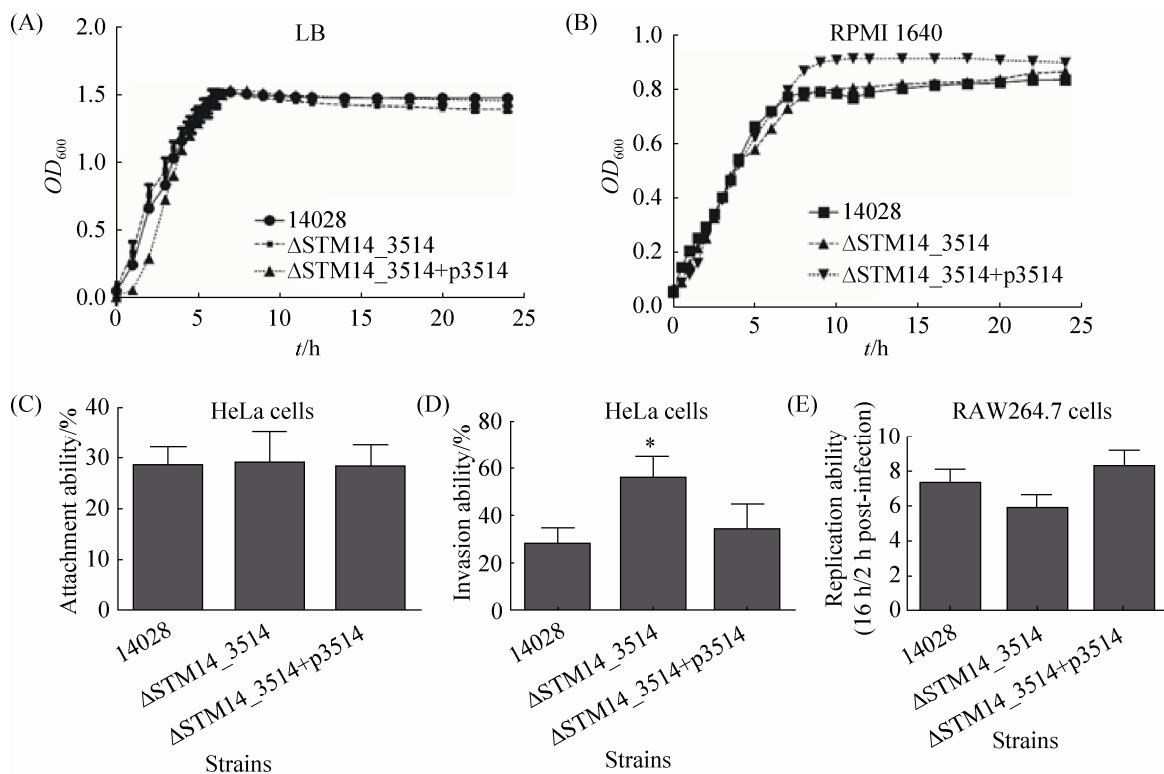


图 2. STM14_3514 突变增强鼠伤寒沙门菌对上皮细胞的侵袭力，对粘附及巨噬细胞内复制力影响不显著

Figure 2. STM14_3514 mutant increased bacterial invasion ability to epithelial cells, while did not significantly affect attachment ability and replication ability in macrophages. The growth assay for 24 h time frame in LB (A) and RPMI-1640 (B) mediums were determined for the strains used. For cell attachment (C) and invasion assays (D), HeLa cells were infected with bacteria strains at the multiplicity of infection (MOI) of 10. Attachment ability=attached bacteria/input bacteria $\times 100$; invasion ability= intracellular bacteria at 1 h post-infection/attached bacteria $\times 100$. For the intracellular replication assays (E), bacteria were added to RAW264.7 macrophages at the MOI of 10. Bacterial replication was determined by the ratio of the number of intracellular bacteria at 16 h post-infection to the initial number of bacteria at time 2 h. Data from each graph represent the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations of the mean, with data significance determined by student's *t* test. * $P < 0.05$.

对小鼠毒力的提高源于其增强的上皮细胞侵袭能力。由于 *STM14_3514* 基因是位于 SPI-1 内部的假定调控因子, 并能抑制侵袭, 推测 *STM14_3514* 基因可能对与侵袭密切相关的 SPI-1 基因具有调控作用。

2.3 *STM14_3514* 基因抑制 *HilA* 表达

为检验 *STM14_3514* 基因是否对 SPI-1 有调控作用, 我们选择了 SPI-1 的中心调节因子 *hilA* 及其下游 3 个侵袭相关蛋白编码基因(*sipA*, *spaQ* 和 *invI*), 通过 *qRT-PCR* 检测了 *STM14_3514* 基因缺失后这些基因的表达变化。收取 HeLa 细胞侵袭阶段的细菌进行 RNA 提取及 *qRT-PCR* 分析, 以野生型菌株侵袭阶段的基因表达水平为参照。如图 3-A 所示, *STM14_3514* 基因缺失显著增强 4 个检测基因的转录($P < 0.05$), *STM14_3514* 基因回补后被检测基因的转录回复到野生型水平, 说明 *STM14_3514* 基因能抑制 *hilA* 及其他 SPI-1 基因的转录表达。此外, 为进一步证明 *hilA* 与 *STM14_3514* 基因的表达相关性, 我们检测了在 HeLa 细胞整个感染阶段(包括侵袭及胞内生存), 14028 野生型菌株中 *hilA* 与 *STM14_3514* 基因的表达变化。收取 14028 侵袭阶段(0 h)及侵染细胞后 2 h 和 6 h 的细菌进行 RNA 提取和 *qRT-PCR* 分析, 以细胞悬浮液中的细菌 RNA 样品为对照。如图 3-B 所示 *hilA* 与 *STM14_3514* 的转录呈负相关性, *STM14_3514* 在侵袭时表达最低, *hilA* 表达最高, 这一表达方式也最利于细菌入侵。细菌进入细胞后, *STM14_3514* 基因表达提高, *hilA* 表达相应降低, 这种表达趋势在整个胞内阶段基本趋于一致。另外, 我们通过 Western blot 检测了缺失菌在侵袭阶段的 *HilA* 蛋白表达水平, 通过 λ Red 重组酶系统构建了带有 3 \times FLAG 标签的 14028 野生型、*STM14_3514* 缺失菌及互补菌株, 收取在侵袭阶段的不同类型

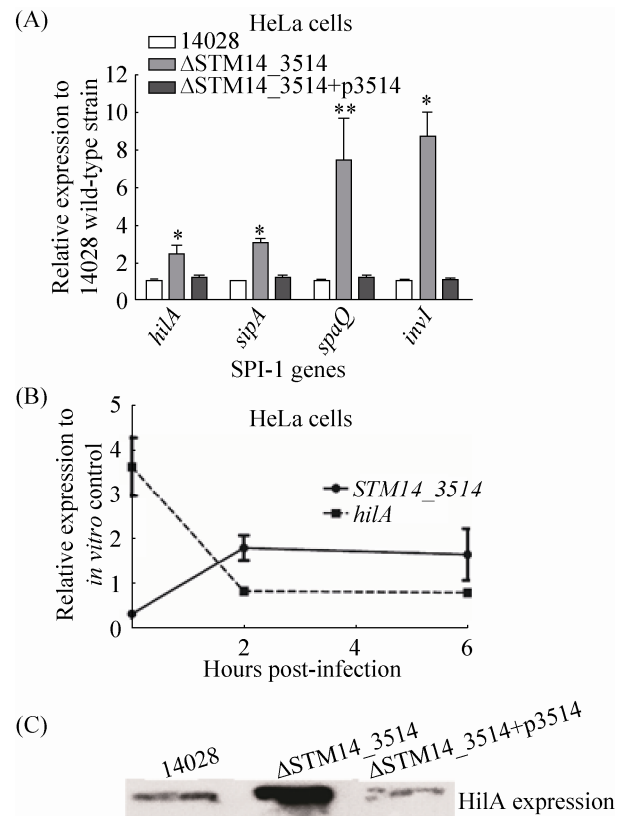


图 3. *STM14_3514* 抑制 *HilA* 表达

Figure 3. Expression levels of *hilA* gene and other SPI-1 genes are significantly repressed by the mutation of *STM14_3514*. A: *hilA* and other SPI-1 genes transcript in 14028, Δ STM14_3514 and Δ STM14_3514+p3514. RNA was harvested from bacteria at the invasion stage. B: *hilA* and *STM14_3514* genes transcript in 14028 wild-type strain during the infection course. RNA was extracted from the intracellular bacteria at 0 h, 2 h and 6 h post-infection of HeLa cells. RNA extracted from bacteria in the cell suspension was used as *in vitro* control. For A and B, the expression was normalized using the 16S rRNA gene as the internal control. The data represents the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations of the mean. Student's *t*-test was used to calculate *P* value. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. C: Western blot result of the HilA protein in different strains. Bacteria proteins were extracted from strain 14028 *hilA*-3 \times FLAG, Δ STM14_3514 *hilA*-3 \times FLAG and Δ STM14_3514+p3514 *hilA*-3 \times FLAG at the invasion stage, respectively.

3×FLAG 标签菌株进行总蛋白提取及 Western blot 检测。如图 3-C 所示, STM14_3514 缺失菌的 HilA 蛋白表达水平显著高于野生型 14028, STM14_3514 基因回补菌株 HilA 表达水平与野生型相似。以上结果从 RNA 及蛋白水平综合表明, STM14_3514 基因能抑制 HilA 表达, 并且通过抑制 HilA 抑制 SPI-1 其他基因的表达。

2.4 STM14_3514 基因通过 HilC 调控 HilA 表达

为了进一步了解 STM14_3514 基因对 HilA 的调控方式, 是直接调控还是间接调控, 我们通过 qRT-PCR 检测了 STM14_3514 基因缺失后对几个熟知的 HilA 上游调节因子(*hilC*, *hilD*, *hilE* 和 *rtsA*) 的表达影响。收取 HeLa 细胞侵袭阶段的细菌进行 RNA 提取及 qRT-PCR 分析, 以野生型菌株侵袭阶段的基因表达水平为对照。如图 4-A 所示, STM14_3514 基因缺失显著增强了 *hilC* 基因的转录($P < 0.01$), 对其他 3 个调节基因的转录没有影响, 说明 STM14_3514 能抑制 *hilC* 的转录表达, 并可能通过 *hilC* 抑制 HilA。为进一步证实上述结论, 我们构建了 *hilC* 基因的缺失菌株 Δ HilC, *hilC* 和 STM14_3514 基因的双缺失菌株 Δ STM14_3514 Δ HilC, 以及相应的回补菌株, qRT-PCR 检测了这些菌株中 *hilA* 基因的转录表达变化。结果如图 4-B 所示, STM14_3514 基因缺失能显著增强 *hilA* 转录, *hilC* 和 STM14_3514 双缺失后 *hilA* 转录水平与 *hilC* 单缺失菌类似, 说明 HilC 不存在的情况下, STM14_3514 基因不影响 *hilA* 的转录。另外, 双缺菌回补 STM14_3514(Δ STM14_3514 Δ HilC+p3514) 不能调控 *hilA*, 而回补 HilC(Δ STM14_3514 Δ HilC+pHilC) 才能影响 *hilA* 的转录。以上结果表明, STM14_3514 在 HilC 存在的条件下才能调控 HilA 表达, 因此 STM14_3514 基因是通过 HilC 来调控 HilA。

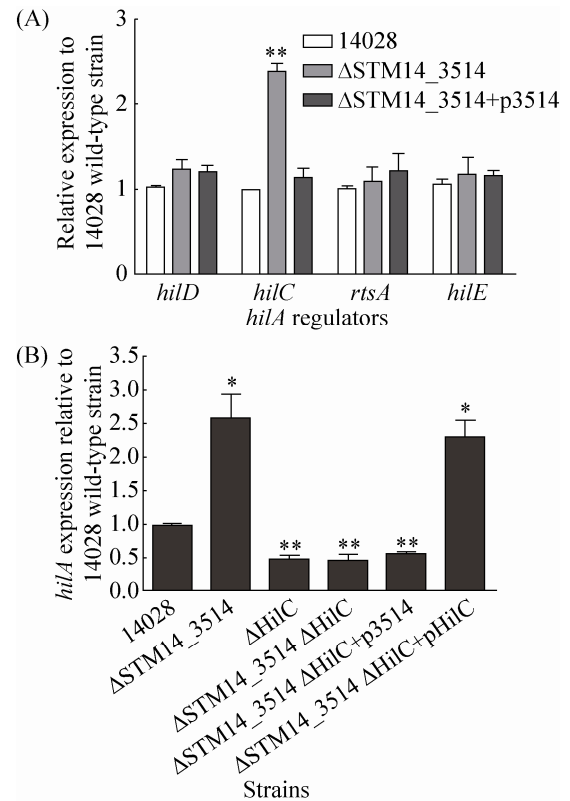


图 4. STM14_3514 基因通过 HilC 调控 HilA 表达
Figure 4. The repression of *hilA* by STM14_3514 gene is mediated by HilC. A: The transcript levels of *hilA* regulators (*hilC*, *hilD*, *hilE*, and *rtsA*) in 14028, Δ STM14_3514 and Δ STM14_3514+p3514. RNA was harvested from bacteria at the invasion stage. B: *hilA* transcript in different strain at the invasion stage. The expression was normalized using the *16S rRNA* gene as the internal control. The data represents the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations of the mean. Student's *t*-test was used to calculate *P* value. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

作为致病过程中的主要毒力因子之一, 鼠伤寒沙门菌的 SPI-1 表达受到多种环境因素和调节因子的调节, 从而保证入侵系统能适时适地地表达^[9-10]。目前已经发现的 SPI-1 调控因子主要包括 HilA、HilC、HilD、HilE 和 RtsA。最近一些研究

发现, 某些调节其他代谢的调节因子也加入至 SPI-1 的调控网络, 它们对 SPI-1 的调控大多数是通过调节上述几个调控因子控制 SPI-1 侵袭位点的表达。如: 调控蛋白 Fur 和鞭毛调控基因 FlhZ 都能通过控制 HilD 来调控 SPI-1^[21-22]; 糖代谢的调节基因 Mlc 通过抑制 HilE 调节 SPI-1 表达^[23]。这些调节因子新调控功能的发现无疑证明了 SPI-1 及其入侵系统调控机制的复杂性, 可能仍有许多未知的 SPI-1 调节机制等待研究发掘。

本文为了研究 SPI-1 内部假定调控因子 STM14_3514 的功能, 构建了 STM14_3514 的突变株, 检测了 STM14_3514 突变对鼠伤寒沙门菌毒力的影响及其作用机制。研究结果证明 STM14_3514 是负调控因子, STM14_3514 突变能增强细菌对肠道上皮细胞的侵袭力, 提高细菌对小鼠的致病性。进一步研究 STM14_3514 调控侵袭的机制, 我们发现 STM14_3514 能通过 HilC 抑制 *hilA* 及 SPI-1 其他入侵基因的表达(图 5)。该研究首次发现并证实了 SPI-1 内部负调节因子的存在。

基于沙门菌致病过程的精确调控, STM14_3514 负调控因子的存在也必然有其特定

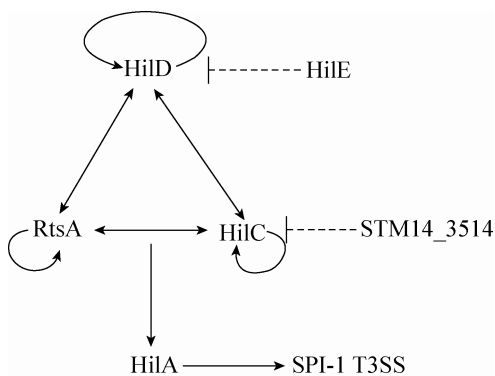


图 5. STM14_3514 通过 HilC 调节 SPI-1 模式图
 Figure 5. Model for STM14_3514 regulation of SPI-1, STM14_3514 acts through HilC to control HilA function.

的生物学意义。值得注意的是, *STM14_3514* 基因的表达在致病过程中能被很好地调控(图 3-B), 在侵袭时被抑制, 此时促进 *hilC*、*hilA* 及其他入侵相关基因的表达, 有利于细菌侵入细胞。细菌进入细胞后, 开启细胞内的生存模式, 这时 SPI-1 的大部分基因已经不再需要, *STM14_3514* 基因在侵入细胞后上调, 能适时降低 SPI-1 基因的表达。细菌进入细胞后, 对 SPI-1 侵袭基因的降低可能具有重要的意义, 推测有以下两方面原因: (i) 减少合成不必要的 SPI-1 效应蛋白而造成的能源浪费。在不需要的情况下如果合成大量的“无用”蛋白, 会造成能源浪费, 可能降低细菌的生存力。Sturm 等发现, SPI-1 的表达本身会降低沙门菌的生长速率。在体外, 表达 SPI-1 的沙门菌个体呈现出缓慢生长的状态, 他们推测这可能与表达 SPI-1 过程中大量的能量消耗相关, 这些消耗对生长造成负担^[24]。对乳糖操纵子的转录表达研究也证明上述结论。一般来讲, 乳糖操纵子的转录表达受到严格的调控。Stoebel 等研究发现, 当环境中没有乳糖时, 组成型表达乳糖操纵子会显著降低大肠杆菌的生存力, 这是由于不必要的转录和翻译过程造成了大量的能源浪费^[25]; Jiang 等发现沙门菌表达乳糖操纵子会降低其对上皮细胞的侵袭力, 一部分原因也是因为能源浪费^[26]。在体外, H-NS 能有效抑制 SPI-1 等毒力基因的表达, 从而消除了毒力基因的无意义表达对细菌生长的不利效应^[27-28]。相应的, 宿主细胞尤其是巨噬细胞内部存在巨大的选择压力, 鼠伤寒沙门菌进入细胞后有效抑制“无用的”SPI-1 可能有利于致病菌在胞内的生存复制行为。本研究结果中 STM_3514 突变株在巨噬细胞内的复制力稍微低于野生型(图 2-E), 证明由于 STM_3514 突变造成的 SPI-1 过度表达确实不利于细菌的胞内生存复制。(ii) SPI-1 效应蛋白包括

SopB、SopE、SopE2、SipA、SipC 和 SopA 是刺激被感染的细胞分泌白细胞介素等炎症因子的主要蛋白^[29-30]，因此 STM14_3514 基因对 SPI-1 的抑制作用可能与细菌介导的降低细胞炎症因子的释放，从而降低免疫细胞的募集及杀伤相关，该假设需要进一步研究证实。

综上所述，本实验研究了鼠伤寒沙门菌 STM14_3514 突变对鼠伤寒沙门菌致病过程的影响，证实了 STM14_3514 是 SPI-1 内部的负调控因子，通过 HilC 抑制 HilA 和 SPI-1 入侵基因表达，推测该基因在细菌侵袭后抑制 SPI-1，此过程具有重要的生物学意义。但是 STM14_3514 对 HilC 的调控方式以及 STM14_3514 的上游调控因子目前并不清楚，仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fàbrega AF, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2): 308–341.
- [2] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 50(6): 882–889.
- [3] Kröger C, Colgan A, Srikumar S, Händler K, Sivasankaran SK, Hammarlöf DL, Canals R, Grissom JE, Conway T, Hokamp K, Hinton JCD. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(6): 683–695.
- [4] Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 2007, 85(2): 112–118.
- [5] LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(4): 191–205.
- [6] Valdez Y, Ferreira RBR, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance//Sasakawa C. Molecular mechanisms of bacterial infection *via* the gut. Berlin Heidelberg: Springer, 2009, 337: 93–127.
- [7] Schlumberger MC, Hardt WD. *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(1): 46–54.
- [8] Lostroh CP, Lee CA. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and Infection*, 2001, 3(14/15): 1281–1291.
- [9] Altie C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43(1): 85–92.
- [10] Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(3): 691–705.
- [11] Wang H, Liu B, Wang Q, Wang L. Genome-wide analysis of the *Salmonella* Fis regulon and its regulatory mechanism on pathogenicity islands. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64688.
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [13] Isberg RR, Falkow S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature*, 1985, 317(6034): 262–264.
- [14] Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(1): 193–217.
- [15] Yang B, Feng L, Wang F, Wang L. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* senses low biotin status in the large intestine for colonization and infection. *Nature Communications*, 2015, 6: 6592.
- [16] Marshall JM, Gunn JS. The O-antigen capsule of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium facilitates serum resistance and surface expression of FliC. *Infection and Immunity*, 2015, 83(10): 3946–3959.
- [17] Giannella RA, Washington O, Gemski P, Formal SB. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *The Journal of Infectious*

- Diseases*, 1973, 128(1): 69–75.
- [18] Elhadad D, Desai P, Grassl GA, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O. Differences in host cell invasion and *Salmonella* pathogenicity island 1 expression between *Salmonella enterica* serovar paratyphi A and nontyphoidal *S. Typhimurium*. *Infection and Immunity*, 2016, 84(4): 1150–1165.
- [19] Gong H, Vu GP, Bai Y, Chan E, Wu RB, Yang E, Liu FY, Lu SW. A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002120.
- [20] Winter SE, Winter MG, Poon V, Keestra AM, Sterzenbach T, Faber F, Costa LF, Cassou F, Costa EA, Alves GES, Paixão TA, Santos RL, Bäumlér AJ. *Salmonella enterica* serovar typhi conceals the invasion-associated type three secretion system from the innate immune system by gene regulation. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(7): e1004207.
- [21] Ellermeier JR, Slauch JM. Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 476–486.
- [22] Chubiz JEC, Golubeva YA, Lin DX, Miller LD, Slauch JM. FlhZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(23): 6261–6270.
- [23] Lim S, Yun J, Yoon H, Park C, Kim B, Jeon B, Kim D, Ryu S. Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hilE* repression. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(6): 1822–1832.
- [24] Sturm A, Heinemann M, Arnoldini M, Benecke A, Ackermann M, Benz M, Dormann J, Hardt WD. The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella Typhimurium* cells expressing type III secretion system 1. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002143.
- [25] Stoebel DM, Dean AM, Dykhuizen DE. The cost of expression of *Escherichia coli lac* operon proteins is in the process, not in the products. *Genetics*, 2008, 178(3): 1653–1660.
- [26] Jiang LY, Ni ZW, Wang L, Feng L, Liu B. Loss of the *lac* operon contributes to *Salmonella* invasion of epithelial cells through derepression of flagellar synthesis. *Current Microbiology*, 2015, 70(3): 315–323.
- [27] Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(8): e81.
- [28] Navarre WW, Porwollik S, Wang YP, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science*, 2006, 313(5784): 236–238.
- [29] Zhang SP, Santos RL, Tsolis RM, Stender S, Hardt WD, Bäumlér AJ, Adams LG. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3843–3855.
- [30] Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 795–809.

Putative regulatory protein STM14_3514 decreases *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells

Lingyan Jiang^{1,2,3*}, Qixing Zhou¹, Peisheng Wang^{2,3}, Xiaohan Jiang^{2,3}, Lu Feng^{2,3}

¹ College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China

² TEDA Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, Tianjin 300457, China

³ Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] To study the function and mechanism of *STM14_3514* gene that encoded in *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-1 of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain ATCC 14028. [Methods] We constructed *STM14_3514* mutant strain and a complemented strain of the mutant. Through mice experiment, attachment assays, invasion assays, macrophage replication assays, Western blot, and Quantitative real-time PCR analysis (*qRT-PCR*), we compared the virulence of the mutant strain to that of the wild-type 14028. [Results] *STM14_3514* mutant shows increased virulence to mice, and the bacterial number of *STM14_3514* mutant in liver, spleen, and ileum was more abundant than that of the wild-type strain. The increased virulence of *STM14_3514* mutant is caused by its elevated invasion ability to epithelial cells (>2-fold and $P < 0.05$). *qRT-PCR* and Western blot results show that *STM14_3514* reduced the expression of *HilA* and another SPI-1 invasion locus. Moreover, the repression of *HilA* by *STM14_3514* is mediated by *HilC*. [Conclusion] *STM14_3514* is a negative regulator in SPI-1, which can repress *HilA* and SPI-1 invasion locus through *HilC*, and possibly contribute to the repression on SPI-1 after bacterial invasion.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, *STM14_3514*, invasion ability, *HilA*, *HilC*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2016M591381) and by the International Science & Technology Cooperation Program of China (2012DFG31680)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-65333286; E-mail: jianglingyan@nankai.edu.cn

Received: 21 July 2016; Revised: 4 November 2016; Published online: 29 November 2016