



T3SS1 和 T3SS2 影响副溶血弧菌生物学特性及细胞致病性的比较

白雪瑞^{1,2}, 王权¹, 凌娇², 万莹², 陈永军¹, 方维焕³, 孙卫东², 蒋蔚^{1*}

¹ 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

² 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

³ 浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

摘要:【目的】探究两套III型分泌系统 T3SS1 和 T3SS2 影响副溶血弧菌生物学特性及细胞致病性的差异和相关性。【方法】以 T3SS1 和 T3SS2 主要结构基因 *vcrD1* 和 *vcrD2* 为研究对象, 利用同源重组技术分别构建单基因和双基因缺失株 $\Delta vcrD1$ 、 $\Delta vcrD2$ 、 $\Delta vcrD1-vcrD2$, 以及互补株 $C\Delta vcrD1$ 和 $C\Delta vcrD2$; 分析各菌株的生长特性、生物被膜形成能力、运动性的差异; 比较各菌株对细胞毒性以及对细胞炎性因子转录水平的影响。【结果】与野生株相比, 各缺失株的生长速度无显著差异。缺失株 $\Delta vcrD1$ 生物被膜形成能力、运动性和细胞毒性均极显著下降; 缺失株 $\Delta vcrD2$ 主要表现为细胞炎性因子 IL-1 β 和 IL-6 转录水平的显著上调, 同时对细胞毒性作用下降。双基因缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 在缺失株 $\Delta vcrD1$ 的基础上, 生物被膜形成能力、运动性、细胞毒性均进一步显著下降, 但在细胞炎性因子的转录水平上, 则与 $\Delta vcrD1$ 一致, 与野生株相比均无显著差异。【结论】T3SS1 和 T3SS2 对副溶血弧菌生物学特性和细胞致病性的影响存在差异。T3SS1 主要影响细菌的生物被膜形成、运动性及细胞毒性作用; T3SS2 不影响生物被膜形成、运动性等生物学特性, 参与细菌对细胞炎性反应中的负调控作用, 同时具有一定的细胞毒性作用。T3SS1 有助于副溶血弧菌在环境中的生存, 而 T3SS2 可有利于细菌在宿主体内免疫逃避的过程。T3SS1 和 T3SS2 对副溶血弧菌生物学特性和细胞致病性的影响可能存在一定的相关作用, 具体机制有待进一步研究。

关键词: 副溶血弧菌, III 型分泌系统 1 和 2, 基因缺失株, 生物学特性, 细胞致病性

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)作为革兰氏阴性嗜盐短杆菌, 普遍存在于鱼类、虾贝类等水产品中, 能引发细菌食源性疾病, 对人和动

物的健康构成严重威胁^[1-2]。副溶血弧菌主要利用毒力因子在宿主中发挥致病作用, 包括耐热直接溶血毒素(Thermostable direct hemolysin, TDH)、

基金项目: 上海市自然科学基金(17ZR1437200); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016JB02)

*通信作者。Tel/Fax: +86-21-34293397; E-mail: jiangweijw99@163.com, jiangwei@shvri.ac.cn

收稿日期: 2017-05-08; 修回日期: 2017-07-09; 网络出版日期: 2017-07-17

TDH 相关溶血毒素(TDH-related hemolysin, TRH)、III 型分泌系统(The type III secretion systems, T3SSs)及 VI 型分泌系统(The type VI secretion systems, T6SS)等^[3]。TDH 是一种淀粉样蛋白毒素,是公认的重要致病因子,主要通过破坏红细胞或宿主细胞的脂质微区,增大细胞膜通透性,进而发挥溶血活性和细胞毒性^[4]。TRH 被证实类似于 TDH,能通过激活氯离子通道,改变离子通量而导致细胞溶血^[5-6]。

T3SSs 作为与致病性密切相关的毒力因子,主要由蛋白复合物形成跨膜分泌管道,似针状结构,刺入宿主细胞内,将效应蛋白直接注入细胞质中,从而发挥细胞毒性作用^[7]。副溶血弧菌 T3SSs 在两条染色体上各有一套,分别命名为 T3SS1 和 T3SS2。T3SS1 系统由结构蛋白(如 VscA1-VscY1、VcrD1、VcrG1、VcrR1 和 VcrV1)和效应蛋白(VopQ、VopR、VopS 和 VPA0450 等)构成,主要发挥对宿主细胞的细胞毒性,介导宿主细胞自噬凋亡等作用^[8-10]。T3SS2 位于染色体 II 的毒力岛上,由类似 T3SS1 的结构蛋白和 7 个效应蛋白(VopA/P、VopL、VopC、VopT、VopV、VopZ 和 VPA1380)构成,主要引起细菌肠毒性和一定的细胞毒性作用^[11-14]。通过建立动物模型试验,证实 T3SS1 对小鼠具有一定的致死性,而 T3SS2 能致使兔回肠肠液聚集,引发其腹泻^[14-15]。

VcrD1 和 *vcrD2* 基因是 T3SS1 和 T3SS2 中具有代表性的结构基因,然而,两者在临床分离株和环境分离株的分布不同。*VcrD1* 基因存在于所有菌株中,*vcrD2* 基因在临床分离株中的阳性率高于环境分离株^[16]。推测 T3SS1 在副溶血弧菌的环境生存性或是生物特性中起主要作用,而最近的研究表明,*vcrD1* 缺失株会导致鞭毛蛋白表达量下调而显著降低副溶血弧菌的运动性^[17],证实

T3SS1 在生物学特性中的作用,但 T3SS2 是否有类似的作用尚无明确报道。同时,III 型分泌系统 T3SS1 和 T3SS2 在副溶血弧菌生物特性中是否存在一定关联,研究甚少。

本文在已有的研究基础上,进一步系统性地研究 T3SS1 和 T3SS2 在细菌生物学特性和细胞致病性的差异和相关关系,为副溶血弧菌的致病机制的研究和疫苗开发等提供重要资料。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和试剂

副溶血弧菌临床分离株 SH112 (*tdh*⁺, 血清型 O3 : K6), 同源重组质粒 pYAK1 及互补质粒 pMMB207、大肠杆菌 HB101 (pRK2013) 和 CC118λpir, 均由本实验室保存。细菌基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自上海天根生化公司。限制性内切酶、DNA *Taq* 聚合酶、T4 连接酶,以及 PrimeScript[®] 反转录试剂盒和 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II 购自大连 TaKaRa 公司。Trizol[®] 试剂购自 Invitrogen 公司, CytoTox 96[®] 非放射性细胞毒性检测试剂盒购自 Promega 公司, DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司, 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)购自广东环凯微生物公司, 其他生化试剂均为进口或国产分析纯。细胞计数仪购自 Bio-Rad 公司, 紫外分光光度计购自 Thermo 公司, 普通 PCR 仪和高速低温离心机购自 Eppendorf 公司, Biosystems[®] 7500 荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 上副溶血弧菌 RIMD2210633 标准株的 *vcrD1* 和 *vcrD2* 基因序列, 用 Primer 5 软件设计以下引物, 见表 1。

表 1. 本研究中所用引物
Table 1. Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5'→3') ^a	Restriction site
<i>vcrD1</i> -A	CAGGGATCCTTTTCAGTGGGCGATAGT	<i>Bam</i> H I
<i>vcrD1</i> -B	TGAACGCAGCACTTGTACAATCGTTTGAAC	
<i>vcrD1</i> -C	CAAGTGCTGCGTTCATATGTAAAGATTGCAGATAG	
<i>vcrD1</i> -D	ACAGCATGCGCGAAGCCAAACTGAACCA	<i>Sph</i> I
<i>vcrD1</i> -E	TTTCTTTCATCCGCATTTC	
<i>vcrD1</i> -F	GTGACGCTTCCGACACTC	
<i>vcrD1</i> -pMMB-F	AAAGGATCCATTACATCCCTACCCGTCCAAG	<i>Bam</i> H I
<i>vcrD1</i> -pMMB-R	CCAGAGCTCGTGAATCTCATGAATAAGTTGA	<i>Sac</i> I
<i>vcrD2</i> -A	TTAGCATGCCTGACTAACTTTAAGAGTG	<i>Sph</i> I
<i>vcrD2</i> -B	ATGACTTTTAGGAGGATATGATGGCAGAAGAAT	
<i>vcrD2</i> -C	CCTCCTAAAAGTCATATCGAGTCTAATCCTCTTTT	
<i>vcrD2</i> -D	TTTGGATCCTGAGGAACAAGTGCTC	<i>Bam</i> H I
<i>vcrD2</i> -E	ACTGACTACCCAATACATCC	
<i>vcrD2</i> -F	ATCAACCAGACTAAACGAAA	
<i>vcrD2</i> -pMMB-F	TCTGAATTCATGATGGCGAAGTTACGT	<i>Eco</i> R I
<i>vcrD2</i> -pMMB-R	GGGGGATCCTTAAATATGAATTGTATCTGT	<i>Bam</i> H I
<i>sacB</i> -F	ACGGCACTGTGCGAAACTAT	
<i>sacB</i> -R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT	

^a Restriction enzyme sites are underlined.

1.3 缺失株及互补株的构建

1.3.1 *ΔvcrD1* 构建以及 *ΔvcrD1* 互补株的构建:

ΔvcrD1 缺失株的构建: 以副溶血弧菌 SH112 为野生株(Wide type strain, WT), 待细菌长至生长对数期时, 利用细菌基因提取试剂盒提取其 DNA, 用两对引物 *vcrD1*-A/B、*vcrD1*-C/D 分别扩增 *vcrD1* 基因的上下游同源臂片段 AB 和 CD, 再以 *vcrD1*-A/D 为引物, 利用融合 PCR 扩增片段 AB 和 CD, 获得 *vcrD1*-AD 片段。将 *vcrD1*-AD 片段与 pYAK-CC118 质粒同时进行双酶切, 经 T4 连接酶连接后转入到 CC118λpir 感受态细胞中, 在 10 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上培养, 挑取疑似阳性的单菌落进行 PCR 鉴定, 扩增产物送至上海英骏生物技术公司测序, 命名阳性重组质粒为 pYAK1-*vcrD1*。以含有同源重组质粒的 CC118λpir

为供体菌, 副溶血弧菌 SH112 株为受体菌进行接合转移。通过 10 μg/mL 氯霉素的 TCBS 平板和 20%蔗糖 LB 平板进行传代筛选, 挑取在氯霉素抗性平板中无法生长的单菌落进行培养鉴定, 若用 *vcrD1*-E/F 引物进行检测, 只获得缺失片段, 同时用引物 *sacB*-F/R 扩增, 无目的条带, 则获得基因缺失株 *ΔvcrD1*。

ΔvcrD1 互补株的构建: 以野生株 DNA 为模板, 用引物 *vcrD1*-pMMB-F/R 扩增获得 *vcrD1* 整个 ORF 片段, 并与 pMMB207 质粒同时进行双酶切, 经连接后再转入 CC118λpir 感受态细胞中, 同样于 10 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上培养, 挑取单克隆菌培养, 经 PCR 和测序鉴定后的阳性互补质粒, 称为 pMMB-*vcrD1*。分别以含互补质粒 pMMB-*vcrD1* 的 CC118λpir 为供体菌, *ΔvcrD1* 缺

失株为受体菌, pRK2013-HB101 为辅助菌进行接合转移试验, 利用引物 *vcrD1*-pMMB-F/R 进行 PCR 鉴定, 其阳性株命名为互补株 *CΔvcrD1*。

1.3.2 *ΔvcrD2* 缺失株的构建与 *ΔvcrD2* 互补株的构建: *ΔvcrD2* 缺失株和 *CΔvcrD2* 互补株的构建方法同于 1.3.1 中的构建方法。

1.3.3 *ΔvcrD1-vcrD2* 双缺失株的构建: 以 *ΔvcrD2* 缺失株为亲本菌, 将 1.3.1 中构建成功的含有 pYAK1-*vcrD1* 的 CC118 λ pir 为供体菌, 进行接合转移, 同源重组后, 获得双缺失株 *ΔvcrD1-vcrD2*。

1.4 各缺失株生长曲线的测定

挑取野生株、各缺失株 *ΔvcrD1*、*ΔvcrD2*、*ΔvcrD1-vcrD2* 及互补株 *CΔvcrD1*、*CΔvcrD2* 的单菌落分别接种到 3% NaCl-LB (pH 7.2) 液体培养基中, 37 °C 培养至 $OD_{600}=0.20 (\pm 0.02)$, 将各菌液的 100 μ L 接种于新鲜 5 mL 3% NaCl-LB 液体培养基中混悬, 取 100 μ L 加于 96 孔的酶标板孔中, 重复 3 个孔, 空白孔为 3% NaCl-LB 液体培养基, 将酶标板放置 37 °C 温箱温育, 每隔 1 h 测其 OD_{600} , 连续监测 12 h, 并绘制各菌株的生长曲线。试验重复 3 次。

1.5 生物被膜的测定

同 1.4 方法中, 将各菌液调其浓度至 $OD_{600}=0.20 (\pm 0.02)$, 并稀释于 3% NaCl-LB 液体培养基中。在酶标板中, 各实验孔加 200 μ L 的菌液, 空白孔加培养基, 然后放置 37 °C 温箱内静置培养 48 h。随后, 弃去菌液上清, 用 1 \times PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 加 200 μ L 纯甲醇固定 10 min, 再用 200 μ L 的 1% 结晶紫染色 15 min, 弃去结晶紫后用 1 \times PBS 洗涤 3 次, 空气干燥。最后, 加入 200 μ L 95% 乙醇作用 10 min, 用酶标仪测量 595 nm 处的吸光值 (OD_{595})。每株细菌重复 10 个孔, 重复 3 次实验,

取平均值。

1.6 运动性测定

先配制含 0.3% 琼脂的 LB 平板培养基(运动培养基), 室温放置, 过夜待用。同 1.4 方法中, 将单菌落培养好的各菌株培养至浓度为 $OD_{600}=0.20 (\pm 0.02)$, 取 1.5 μ L 的菌液轻轻垂直点在运动培养基的表面, 放置 37 °C 温箱内培养 5 h。每小时观察 1 次, 测量细菌圆形运动直径的大小并记录。将 4.5 h 运动培养基的运动情况进行拍照。实验重复 3 次, 取其平均值。

1.7 细胞毒性检测

用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将 RAW264.7 巨噬细胞培养于 96 孔细胞板上, 待单层细胞布满, 吸去培养上清, 用 PBS 洗 1 遍备用。将野生株、缺失株和互补株培养至对数生长期, 测定其 $OD_{600}=0.20 (\pm 0.02)$, 用无酚红 DMEM 洗 1 次, 按感染率(Multiplicity of infection, MOI)=10 : 1 (细菌数 : 细胞数) 感染 RAW264.7 细胞, 每孔对应加入 100 μ L 的菌液作为实验孔, 重复 4 个孔; 加入 100 μ L 无酚红 DMEM 作为细胞自发对照孔; 加入 90 μ L 的 DMEM 为最大释放孔; 加 90 μ L 的 DMEM 和 10 μ L 裂解液(无细胞孔)为体积对照孔, 分别置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 1、2、3 h。利用 CytoTox96 试剂盒检测细胞上清中乳酸脱氢酶(LDH)的释放, 在收集细胞上清前 45 min, 在最大释放孔中加入 10 μ L 裂解液。到收集上清时, 从每孔取出 50 μ L 转移到 96 孔酶标板中, 避光加入 50 μ L 配好的底物, 用锡箔纸盖住平板, 室温孵育 30 min, 然后快速向每孔加入 50 μ L 终止液, 参照说明书计算各细菌感染 RAW264.7 细胞后 LDH 释放的百分比。

同样方法,用含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液将 Caco-2 细胞培养至 90%左右,将各细菌按感染率 MOI=1 : 1 感染 Caco-2 细胞,同样的条件作用 1、2、3 h,检测各细菌感染 Caco-2 细胞后 LDH 释放的百分比。

1.8 RNA 水平检测细胞因子转录水平

将 RAW264.7 巨噬细胞(10%胎牛血清的 DMEM 培养液)在 24 孔细胞板上培养至 90%时,弃上清培养基,加入 200 μ L 的完全培养基,待用。将培养好的野生株、各缺失株的 OD_{600} 调整到一致 ($OD_{600}=0.20\pm 0.02$),用完全培养基洗 2 遍,按 MOI=10 : 1 分别将各菌加到 RAW264.7 细胞孔和 Caco-2 细胞孔中,每实验孔加 500 μ L,重复 3 个实验孔,并设立阴性对照孔(不加细菌),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱孵育。分别在作用 1 h 和 2 h 时,将每孔上清离心后的细胞沉淀和孔底细胞用 1 mL 的 Trizol 完全裂解细胞混合。根据 Trizol 法提取每孔细胞的 mRNA,按照 PrimeScript[®] RT 试剂盒反转录成 cDNA。最后根据试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II,利用荧光定量 PCR 法检测细胞炎症因子 IL-6 和 IL-1 β 转录水平的表达情况。荧光定量所用的引物^[18]如表 2 所示。

表 2. 荧光定量 PCR 中所用引物

Table 2. Primers used for qRT-PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Function
IL-1 β -F	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	Fragment for mouse IL-1 β gene
IL-1 β -R	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	
IL-6-F	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	Fragment for mouse IL-6 gene
IL-6-R	GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC	
β -actin-F	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	Fragment for mouse β -actin gene
β -actin-R	GCTGGAAGGTGGACAGTGAG	

2 结果和分析

2.1 基因缺失株 $\Delta vcrD1$ 、 $\Delta vcrD2$ 、 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 及互补株 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 的鉴定

以疑似阳性单菌落的基因组 DNA 为模板,分别用引物 *vcrD1*-E/F (3447–1320 bp)、*vcrD2*-E/F (3252–1365 bp)对缺失株中相应的缺失基因进行鉴定,用引物 *sacB*-F/R 鉴定缺失菌株中重组质粒的消失情况。 $\Delta vcrD1$ 缺失株的鉴定结果如图 1-A,用引物 *vcrD1*-E/F 扩增后,在 1320 bp 处有明显短条带(图 1-A 泳道 1),用引物 *vcrD2*-E/F 扩增得 3252 bp 的完整片段(图 1-A 泳道 2),用 *vcrD1*-pMMB-F/R (2146 bp)扩不出来目的片段(图 1-A 泳道 3),用 *vcrD2*-pMMB-F/R(1902 bp)能扩增 *vcrD2* 的整个 ORF 片段(图 1-A 泳道 4),且用引物 *sacB*-F/R 没有扩增任何条带(图 1-A 泳道 5),证明已成功缺失 *vcrD1* 基因,且抗性质粒已凋亡;同理,用 *vcrD2*-E/F 引物扩增 $\Delta vcrD2$ 缺失株的 *vcrD2* 基因能得到缺失片段 1365 bp,用引物 *vcrD2*-pMMB-F/R 未能扩增出片段,且用引物 *sacB*-F/R 没有任何条带,证明 $\Delta vcrD2$ 缺失株已成功缺失 *vcrD2* 基因; $\Delta vcrD1-vcrD2$ 双缺失中 *vcrD1* 基因和 *vcrD2* 基因的扩增片段均为小片段,且未扩增出互补 pMMB-FR 片段和 *sacB* 片段,证明 *vcrD1-vcrD2* 双基因缺失成功。

用引物 *vcrD1*-pMMB-F/R、*vcrD2*-pMMB-F/R 对 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 互补株进行鉴定,结果如图 1B。 $C\Delta vcrD1$ 互补株能扩增出 *vcrD1*-EF 的缺失片段 1320 bp (图 1-B 泳道 1)和 *vcrD1*-pMMB-FR 互补片段(图 1-B 泳道 3),同时也能扩增出 *vcrD2*-EF (图 1-B 泳道 2)和 *vcrD2*-pMMB-FR (图 1-B 泳道 4)的完整片段,说明在 $\Delta vcrD1$ 缺失株中 *vcrD1* 基因质粒已互补成功。同理, $C\Delta vcrD2$ 互补株的鉴定结果表明 *vcrD2* 基因互补成功。

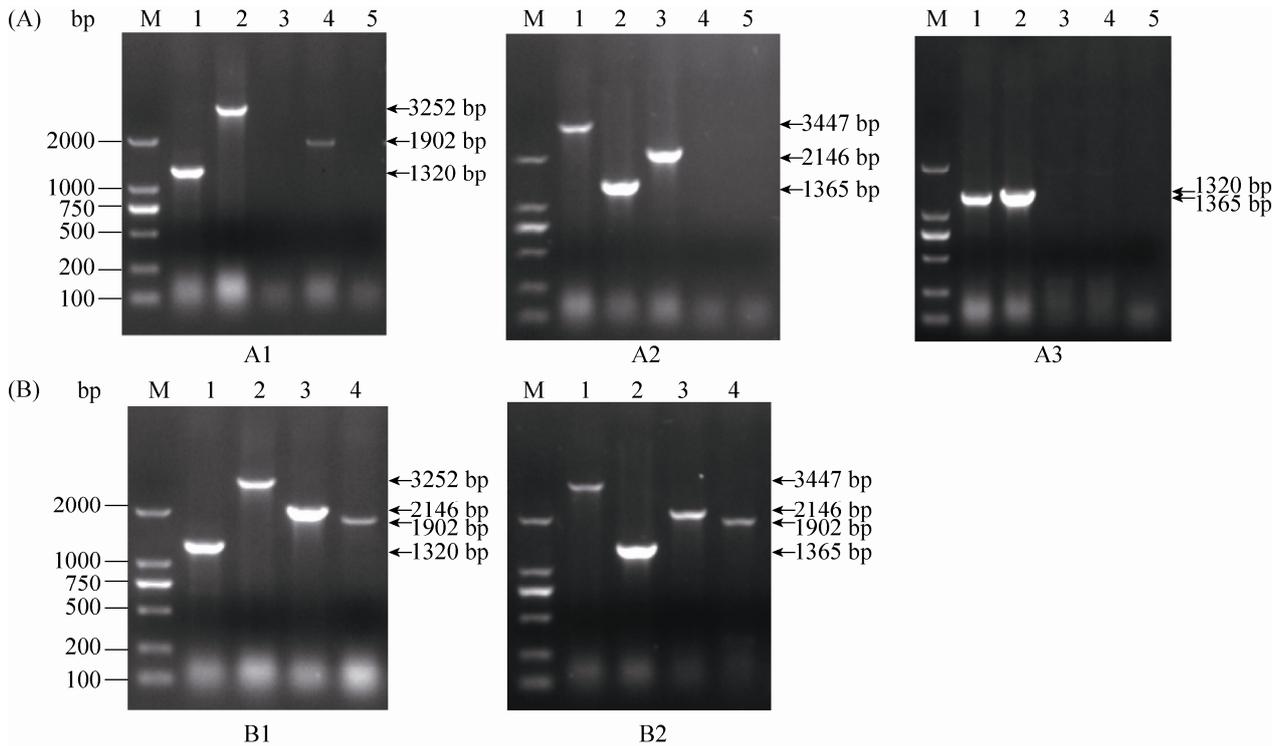


图 1. 副溶血弧菌 $\Delta vcrD1$ 、 $\Delta vcrD2$ 、 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 基因缺失株及 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 互补株的鉴定

Figure 1. PCR identification of mutant and complement strains of *V. parahaemolyticus*. A1: $\Delta vcrD1$, A2: $\Delta vcrD2$, A3: $\Delta vcrD1-vcrD2$. M: DL2000; lane 1–5: Primers of *vcrD1*-E/F, *vcrD2*-E/F, *vcrD1*-pMMB-F/R, *vcrD2*-pMMB-F/R, *sacB*-F/R. B1: $C\Delta vcrD1$, B2: $C\Delta vcrD2$. M: DL2000; lane 1–4: Primers of *vcrD1*-E/F, *vcrD2*-E/F, *vcrD1*-pMMB-F/R, *vcrD2*-pMMB-F/R.

各缺失株和互补株经连续培养 20 代后, 通过以上 PCR 方法同样可扩增出相应片段, 证明构建成功的缺失株和互补株具有较好的遗传稳定性。

2.2 生长曲线测定

对缺失株 $\Delta vcrD1$ 、 $\Delta vcrD2$ 、 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 和野生株 WT 以及互补株 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 的生长曲线分析表明(图 2), 各缺失株的生长特性基本一致, 无明显差异($P>0.05$)。

2.3 运动性测定

通过监测各菌株在运动培养基上的运动情况, 结果显示, 菌株在 2 h 开始从接种点向周围扩展运动, 在 4–5 h 有明显的运动现象(图 3-A)。在 4.5 h 时, 野生株、 $\Delta vcrD2$ 缺失株以及 2 个互补

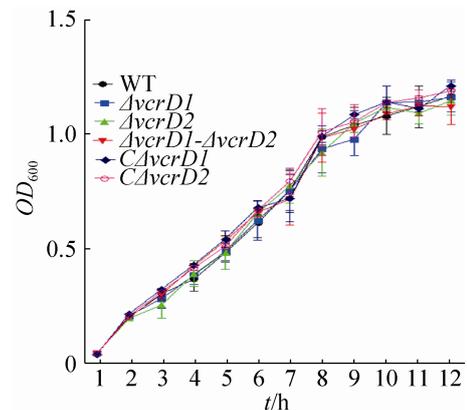


图 2. 副溶血弧菌野生株、各缺失株及互补株的生长曲线图

Figure 2. The growth curve of the wild-type (WT) mutant strains ($\Delta vcrD1$, $\Delta vcrD2$, $\Delta vcrD1-vcrD2$) and complement strains ($C\Delta vcrD1$, $C\Delta vcrD2$). The graph shows means standard errors of values originated from three independent assays.

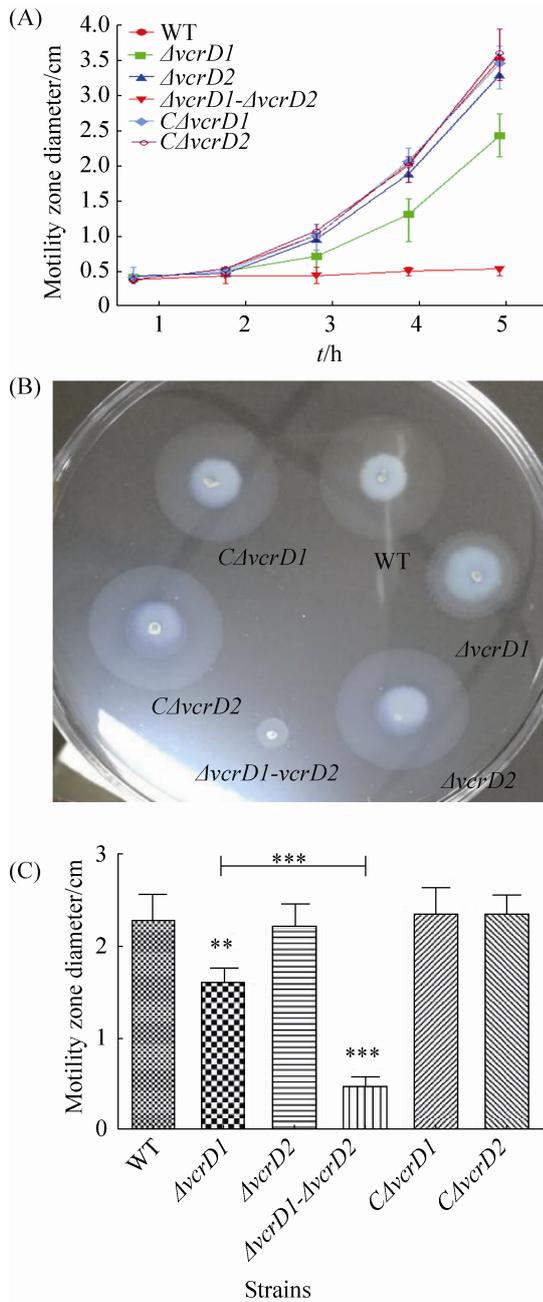


图 3. 各细菌株在 0.3% 琼脂 LB 平板的运动情况

Figure 3. The results of motilities of the strains in 0.3% agar-LB plates. A: Dynamic monitoring quantification of the motorial ability from 1 to 5 hours by measuring motility zone diameter (cm) made by the strains; B: The swimming patterns of various strains was exhibited in 0.3% agar-LB plates for 4.5 h; C: Motility zone diameter (cm) was used to compare the differences in the movement of the strains for 4.5 h.

株均表现出明显的运动性, 呈半透明圆形运动轨迹(图 3-B); 同时, 菌株圆形运动半径测量统计结果(图 3-C)表示, 缺失株 $\Delta vcrD1$ 的运动能力明显降低(**, $P \leq 0.01$), 为野生株的 0.75 倍, 缺失株 $\Delta vcrD2$ 无显著性差异($P > 0.05$), 而双缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 的运动性表现极显著抑制, 仅为野生株的 0.21 倍(***, $P \leq 0.001$)。互补株 $C\Delta vcrD1$ 和 $C\Delta vcrD2$ 均恢复到野生株的运动能力。结果表明, $vcrD1$ 基因对副溶血弧菌的运动性起重要作用; $vcrD2$ 基因单独在副溶血弧菌的运动过程中无显著作用, 但与 $vcrD1$ 基因一起可对其运动性发挥协同作用。

2.4 生物被膜测定

将各菌株经 48 h 温箱孵育, 用结晶法检测生物被膜形成能力, 结果显示(图 4), 与野生株相比, 缺失株 $\Delta vcrD1$ 和双缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 生物被膜形成能力均显著下降(**, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$), 而缺失株 $\Delta vcrD2$ 的生物被膜形成能力则无显著差异($P > 0.05$)。互补株 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 均恢复了细菌的生物被膜形成能力($P > 0.05$)。此外, 与缺失株 $\Delta vcrD1$ 相比, 双缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 的生物被膜形成能力进一步显著下降(*, $P \leq 0.05$)。结果表明, $vcrD1$ 基因在副溶血弧菌的生物被膜形成能力起重要作用, 而 $vcrD2$ 基因单独对细菌生物被膜无明显影响, 但可协同增强 $vcrD1$ 基因对副溶血弧菌在生物被膜形成方面的作用。

2.5 细胞毒性测定

细胞毒性结果显示(图 5-A), 以 MOI=10 : 1 感染 Caco-2 细胞 1-3 h, 缺失株 $\Delta vcrD1$ 和双缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 较野生株均有显著降低(***, $P \leq 0.001$), 在 2 h 时, 仅为野生株的细胞毒性的 0.27 倍和 0.17 倍, 而 $\Delta vcrD2$ 是野生株的 0.91 倍

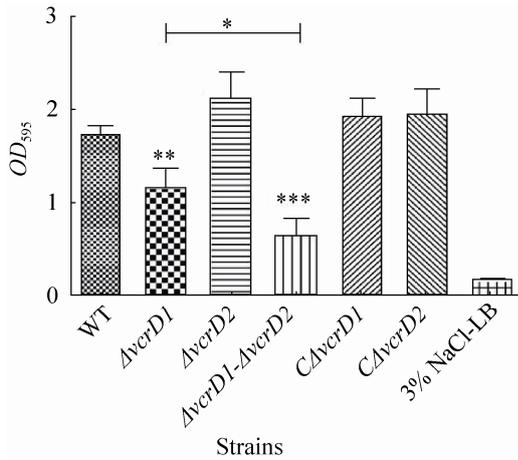


图 4. 各菌株的生物被膜形成

Figure 4. Biofilm formation of the strains grown in 3% NaCl-LB at 48 hours by crystal violet staining. Data are analysed using two-way ANOVA and showed as the means±standard deviation from three independent experiments, meanwhile, differences in values between the wild-type and mutant strains, single gene deletion strains and double gene deletion strain were indicated with asterisks (*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$).

(*, $P \leq 0.05$)。在感染 3 h 时, $\Delta vcrD1$ 和 $\Delta vcrD2$ 缺失株之间,以及 $\Delta vcrD1$ 缺失株和 $\Delta vcrD1$ - $vcrD2$ 双缺失株之间均出现显著差异(**, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$)。互补株 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 细胞毒性作用均恢复到野生株的水平($P > 0.05$)。各菌株对 RAW264.7 巨噬细胞的细胞毒性的结果见图 5-B, 与对 Caco-2 细胞细胞毒性的结果相似。研究表明, $vcrD1$ 和 $vcrD2$ 基因对副溶血弧菌在细胞毒性方面均有显著影响, 且具有协同作用, 其中 $vcrD1$ 基因为主导作用。

2.6 细胞因子 mRNA 水平转录情况

各菌株对 RAW264.7 巨噬细胞炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 转录水平分析显示(图 6), 与野生株相比, 缺失株 $\Delta vcrD2$ 的 IL-1 β 和 IL-6 炎症因子的转录表达水平显著性增强(***, $P \leq 0.001$);

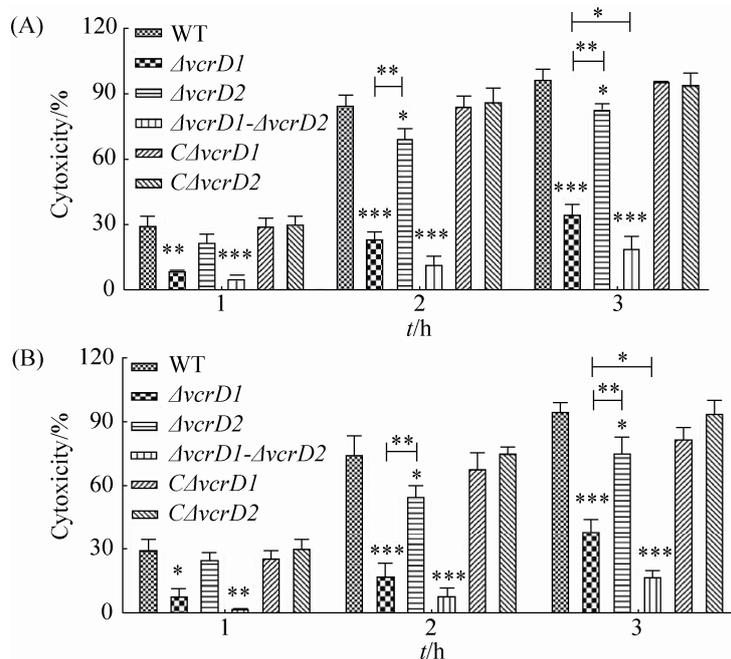


图 5. 各细菌株细胞毒性的比较

Figure 5. Comparison of cytotoxic effects of the strains. With Caco-2 cells (A) and RAW264.7 macrophages (B) attacked by the strains at an MOI (1:10) for 1–3 h, the cytoplasmic LDH release were collected and measured with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Statistically significant differences were indicated with asterisks (*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$).

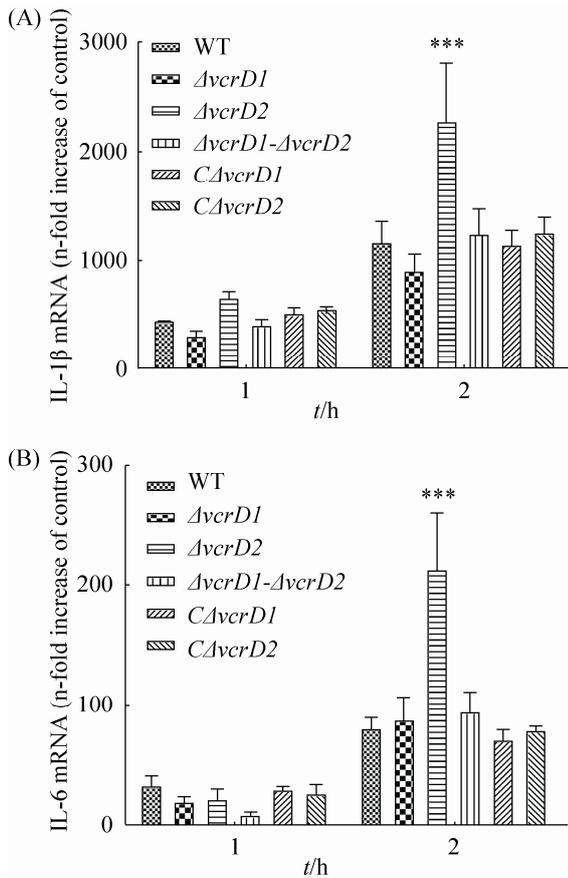


图 6. 各缺失株诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎性因子相对表达的差异

Figure 6. Differences of *V. parahaemolyticus*-induced cytokine expressions in RAW264.7 macrophages. Infected with the strains at an MOI of 10:1, RAW264.7 macrophages were harvested at 1 h and 2 h, and the cytokine expression of IL-1 β (A) and IL-6 (B) were measured by Real-time PCR. Data analyses were performed using two-way ANOVA to evaluate the statistical significance of the results (***, $P \leq 0.001$).

而缺失株 $\Delta vcrD1$ 和双缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 引起炎性因子的转录水平均无明显变化 ($P > 0.05$); 互补株 $C\Delta vcrD1$ 、 $C\Delta vcrD2$ 均恢复到野生株水平 ($P > 0.05$)。结果表明, 缺失 $vcrD2$ 基因能显著上调副溶血弧菌对靶细胞炎性因子 IL-1 β 、IL-6 的表达, 缺失 $vcrD1$ 基因则无显著作用, 同时缺失 $vcrD2$ 和 $vcrD1$ 基因对宿主细胞炎性因子的表达水平也无

显著影响, 提示 T3SS2 在抑制宿主细胞免疫应答水平上起主导作用。

3 讨论

自 2002 年 Tagomori K^[19] 等发现副溶血弧菌有两套 III 型分泌系统以来, 研究表明 T3SS1 系统主要发挥对宿主细胞的细胞毒性, 介导宿主细胞自噬凋亡等作用^[9], 而 T3SS2 系统可增加细菌感染的组织受损程度和回肠积液量, 具有肠毒性作用^[15,20]。然而, 关于这两个系统在细菌运动性、生物被膜形成等生物学特性和致炎作用中的差异和相关性的研究报道甚少。本文选用副溶血弧菌 T3SSs 分泌系统内膜蛋白基因 $vcrD1$ 和 $vcrD2$ 作为研究对象, 分析单基因和双基因缺失株的生物学特性和细胞致病性, 进而深入探究 T3SS1 和 T3SS2 之间的功能关系。

生物被膜是细菌为适应环境而聚集形成的一种膜样物, 被黏性基质包裹的菌体对抗生素及宿主免疫等不利因素有较强的抵抗能力, 从而有利于细菌的生存及致病性^[21]。弧菌的运动性主要与鞭毛系统有关, 在细菌感染宿主的粘附、侵入及扩散过程中起至关重要的作用^[22-23]。本文研究结果显示, $vcrD1$ 基因缺失能够显著降低副溶血弧菌的运动性和生物被膜形成能力, $vcrD2$ 基因缺失则对运动性和生物被膜形成能力无显著影响。结果提示, 在副溶血弧菌环境存活中起主要作用的是 T3SS1。我们在 $vcrD2$ 基因缺失的基础上进一步缺失 $vcrD1$ 基因, 结果发现双基因缺失株的运动性和生物被膜形成能力均表现为极显著降低, 且显著低于 $\Delta vcrD1$ 缺失株, 研究结果表明, T3SS2 可协同增强 T3SS1 在生物特性中的功能, 发挥间接作用。

副溶血弧菌感染宿主后, 主要引起组织细胞裂解受损等细胞毒性作用, 进而有利于细菌在体内繁殖扩散。我们通过细胞毒性试验发现, *vcrD1* 和 *vcrD2* 基因的缺失均可影响副溶血弧菌对 Caco-2 细胞和 RAW264.7 巨噬细胞的细胞毒性作用, 但 T3SS1 和 T3SS2 对细胞产生毒性的能力不同, 且有显著差异, 其中 T3SS1 对宿主细胞产生显著的细胞毒性作用, 而 T3SS2 起较弱的毒性作用, 结果表明在副溶血弧菌对细胞产生毒性作用的过程中, T3SS1 起主要作用, 与已有研究报道结果相似^[14,20]。我们进一步研究发现, *vcrD1* 和 *vcrD2* 双基因缺失株的细胞毒性作用在单基因缺失株的基础上进一步降低, 提示在细胞毒性作用中 T3SS1 起主要作用, 且 T3SS2 与 T3SS1 可能存在协同作用。

巨噬细胞主要通过 IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 等炎性因子发挥免疫细胞募集、共刺激分子调控和 B/T 细胞亚群分化中的作用, 进而调节宿主炎症反应和免疫反应^[24]。本研究利用 RAW264.7 巨噬细胞来检测不同菌株诱导宿主细胞因子的转录水平的情况。结果发现, *vcrD2* 能显著抑制巨噬细胞炎性因子 IL-1 β 和 IL-6 的表达水平, 提示 T3SS2 能够抑制宿主的炎症反应及免疫应答反应, 从而利于细菌在宿主体内的免疫逃避及生存, 进而产生致病作用^[25]。*vcrD1* 并未影响宿主细胞因子的表达水平, 然而, 双基因缺失株 $\Delta vcrD1-vcrD2$ 并没有同单基因缺失株 $\Delta vcrD2$ 一样表现为抑制宿主细胞因子的转录水平, 表明 T3SS1 虽不直接参与宿主免疫反应, 但可能影响 T3SS2 发挥免疫逃避作用。以上研究进一步提示尽管副溶血性弧菌 T3SS1 和 T3SS2 在引起宿主炎症反应中发挥不同的作用, 然而两者之间存在着紧密的联系。

本研究通过对 T3SSs 中 *vcrD1* 和 *vcrD2* 的单

基因缺失株及双基因缺失株进行生物学分析, 表明 T3SS1 和 T3SS2 在环境适应性和细胞致病中扮演不同的角色, 但两者之间存在一定的协同关系。另有研究表明某些副溶血弧菌菌株 T3SS1 和 T3SS2 的基因在不同温度条件下表达量存在一定的差异, 副溶血弧菌 ATCC17802 菌株的 *vcrD1* 基因在 16 °C 表达量最高, *vcrD2 β* 基因在 25 °C 表达量最高; 而副溶血弧菌 JA21 菌株的 *vcrD1* 基因和 *vcrD2 β* 基因均在 25 °C 表达量最高^[26]。本文试验对副溶血弧菌的培养温度均为 37 °C (模拟人体温度), *vcrD1* 基因和 *vcrD2* 基因对副溶血弧菌生物学特性和细胞致病性中的不同作用是否与温度有关, 有待进一步研究。值得注意的是, 有报道显示 T3SS1 存在于副溶血性弧菌所有的分离株中, 而 T3SS2 仅在致病性临床株(KP 阳性)中^[27], 并有研究推测 T3SS1 单独不足以引起人类发病, 但可协同其他毒力因子产生致病作用^[9]。结合本研究结果推测, 副溶血弧菌可通过 T3SS1 和 T3SS2 之间的协助作用, 增强致病菌株对环境的适应能力和细胞致病作用。本文为探明副溶血弧菌 T3SS1 和 T3SS2 分泌系统的致病机制提供重要依据, 然而对副溶血弧菌 T3SS1 和 T3SS2 功能关系的研究仍然浅显, 亟需深入系统地研究具体机制。

参 考 文 献

- [1] Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45–55.
- [2] Wang RZ, Fang S, Wu DL, Lian JW, Fan J, Zhang YF, Wang SH, Lin WX. Screening for a single-chain variable-fragment antibody that can effectively neutralize the cytotoxicity of the *Vibrio parahaemolyticus* thermolabile hemolysin. *Applied and Environment Microbiology*, 2012, 78(14): 4967–4975.
- [3] Yu Y, Fang LH, Zhang Y, Sheng HX, Fang WH. VgrG2 of

- type VI secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus* induces autophagy in macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 168.
- [4] Matsuda S, Kodama T, Okada N, Okayama K, Honda T, Iida T. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infection and Immunity*, 2010, 78(2): 603–610.
- [5] Takahashi A, Kenjyo N, Imura K, Myonsun Y, Honda T. Cl⁻ secretion in colonic epithelial cells induced by the *Vibrio parahaemolyticus* hemolytic toxin related to thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 2000, 68(9): 5435–5438.
- [6] Raghunath P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 805.
- [7] Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(11): 811–825.
- [8] Ono T, Park KS, Ueta M, Iida T, Honda T. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system. *Infection and Immunity*, 2006, 74(2): 1032–1042.
- [9] Zhou XH, Konkel ME, Call DR. Type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus* induces oncosis in both epithelial and monocytic cell lines. *Microbiology*, 2009, 155(3): 837–851.
- [10] Bhattacharjee RN, Park KS, Kumagai Y, Okada K, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Iida T, Honda T, Takeuchi O, Akira S. VP1686, a *Vibrio* type III secretion protein, induces toll-like receptor-independent apoptosis in macrophage through NF- κ B inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(48): 36897–36904.
- [11] Kodama T, Hiyoshi H, Okada R, Matsuda S, Gotoh K, Iida T. Regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2 gene expression and function of T3SS2 effectors that modulate actin cytoskeleton. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(2): 183–190.
- [12] Paranjpye R, Hamel OS, Stojanovski A, Liermann M. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8631–8638.
- [13] Ham H, Orth K. The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(5): 719–725.
- [14] Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxigenicity, and lethality in mice. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1772–1780.
- [15] Piñeyro P, Zhou XH, Orfe LH, Friel PJ, Lahmers K, Call DR. Development of two animal models to study the function of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems. *Infection and Immunity*, 2010, 78(11): 4551–4559.
- [16] Mala W, Alam M, Angkititrakul S, Wongwajana S, Lulitanond V, Huttayanant S, Kaewkes W, Faksri K, Chomvarin C. Serogroup, virulence, and molecular traits of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical and cockle sources in northeastern Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 39: 212–218.
- [17] Noh HJ, Nagami S, Kim MJ, Kim J, Lee NK, Lee KH, Park SJ. Role of vcrD1 protein in expression and secretion of flagellar components in *Vibrio parahaemolyticus*. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(3): 397–410.
- [18] Wang ZF, Guo CM, Xu YN, Liu GJ, Lu CP, Liu YJ. Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infection and Immunity*, 2014, 82(6): 2615–2625.
- [19] Tagomori K, Iida T, Honda T. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(16): 4351–4358.
- [20] Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659–6665.
- [21] Shafique M, Alvi IA, Abbas Z, Ur Rehman S. Assessment of biofilm removal capacity of a broad host range bacteriophage JHP against *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2017, 125(6): 579–584.
- [22] Chaban B, Hughes HV, Beeby M. The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 46: 91–103.
- [23] Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 291(8): 605–614.
- [24] Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 451–483.
- [25] Zhu Q, Li C, Yu ZX, Zou PF, Meng QX, Yao CL. Molecular and immune response characterizations of IL-6 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 50: 263–273.
- [26] Ding XY, Qu LY, Wang C, Tian XX, Sun CJ, Wang MQ. Effect of temperature on T3SS gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*. *Advances in Marine Science*, 2016, 34(2): 250–259. (in Chinese)
丁晓燕, 曲凌云, 王琛, 田欣欣, 孙承君, 王敏强. 温度对副溶血弧菌 T3SS 中相关基因表达的影响. 海洋科学进展, 2016, 34(2): 250–259.
- [27] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet*, 2003, 361(9359): 743–749.

Comparison of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS1 and T3SS2 in *Vibrio parahaemolyticus*

Xuerui Bai^{1,2}, Quan Wang¹, Jiao Ling², Ying Wan², Yongjun Chen¹, Weihuan Fang³, Weidong Sun², Wei Jiang^{1*}

¹ Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

² College of Animal Medical, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

³ College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To elucidate differences of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS1 and T3SS2 in *Vibrio parahaemolyticus*. **[Methods]** With the main structural protein genes *vcrD1* and *vcrD2* as the research object, we used the homologous recombination technique to construct a series of deletion mutants $\Delta vcrD1$, $\Delta vcrD2$, $\Delta vcrD1-vcrD2$, and complementary strains $C\Delta vcrD1$, $C\Delta vcrD2$ of *V. parahaemolyticus* SH112 strain, then analyzed the differences of growth, biofilm, motility, cytotoxicity to RAW264.7 macrophages and Caco-2 cells, and transcriptional regulation of pro-inflammatory cytokine IL-1 β , IL-6 in RAW264.7 macrophages between mutant strain and wild strain. **[Results]** Compared to the wild strain, the mutant strains had no difference on growth rate, however, the *vcrD1* mutant obviously weakened biofilm formation, motility, cytotoxicity of *V. parahaemolyticus*; the *vcrD2* mutant positively upregulated the transcriptional levels of pro-inflammatory cytokines, and significantly attenuated cytotoxicity to cells. The $\Delta vcrD1-vcrD2$ double deletion mutant showed weaker biofilm, motility, cell toxicity than *vcrD1* mutant strain, and as similar to the *vcrD1* mutant, in the mRNA levels of inflammatory cytokines when compared with the wild strain. **[Conclusion]** Contributions of two T3SSs to biological characteristics and cytopathogenicities of *V. parahaemolyticus* are different. The T3SS1 was mainly involved in biofilm formation and motility of *V. parahaemolyticus*, but also has a significant cytotoxic effect; T3SS2 did not affect bacterial biofilm formation and motility, but played a negative regulation on cell inflammatory reaction, potentially contributing to bacterial immune evasion in host. T3SS1 contributed to bacterial survival in the environment; T3SS2 may help *V. parahaemolyticus* to evade the host immune response. Moreover, T3SS1 and T3SS2 may play related functions on biological characteristics and cytopathogenicities of *V. parahaemolyticus*, but the specific mechanism still needs further study.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, T3SS1 and T3SS2, gene mutants, biological characteristics, cytopathogenicities

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Shanghai Natural Science Foundation (17ZR1437200) and by the Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes (2016JB02)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34293397; E-mail: jiangweijw99@163.com, jiangwei@shvri.ac.cn

Received: 8 May 2017; Revised: 9 July 2017; Published online: 17 July 2017