

副溶血弧菌的Ⅲ型分泌系统

俞盈, 吴蓓蓓, 方维焕*

浙江大学浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310029)

摘要: 副溶血弧菌是一种嗜盐性革兰氏阴性短杆菌, 主要引起食物中毒性肠胃炎, 还可引起水生动物疾病。除了耐热直接溶血毒素和耐热直接溶血相关毒素外, 近年发现的副溶血弧菌两套Ⅲ型分泌系统也与该菌的致病性密切相关。Ⅲ型分泌系统 1 位于染色体 1 上, 主要贡献对宿主细胞的细胞毒性, 介导宿主细胞的自体吞噬作用, 最后导致细胞死亡。Ⅲ型分泌系统 2 位于位于染色体 2 的毒力岛上, 具有肠毒性。本文扼要介绍副溶血弧菌Ⅲ型分泌系统的组成、功能及相关转录调控机制。

关键词: 副溶血弧菌; Ⅲ型分泌系统; 致病性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0848-05

副溶血弧菌是一种嗜盐性的革兰氏阴性短杆菌, 广泛存在于海洋环境中, 能够引起人急性肠胃炎、伤口感染和败血症^[1-3], 对动物主要引起水生动物疾病, 如海鲷、对虾、九孔鲍、文蛤等。耐热直接溶血毒素 (thermostable direct hemolysin, TDH) 和耐热直接溶血相关毒素 (TDH-related hemolysin, TRH) 被认为是副溶血弧菌引起腹泻的主要致病因子, 但其产生的 TDH 或 TRH 的量不足以引起严重的临床症状^[4-5]。所以学者们认为, 副溶血弧菌中可能还存在与 TDH 或 TRH 协同作用的其他毒力因子, 如 *toxRS* 操纵子、乙酰转移酶基因、Ⅲ型分泌系统等^[6-7]。Ⅲ型分泌系统与许多革兰氏阴性病原菌的毒力因子分泌有关, 它能将细菌胞外蛋白直接运输到宿主细胞中^[8]。对志贺菌和沙门菌而言, Ⅲ型分泌系统是关键的毒力因子。本文介绍副溶血弧菌Ⅲ型分泌系统的分布、组成及其主要结构蛋白和分泌蛋白的功能。

1 副溶血弧菌Ⅲ型分泌系统的发现与分布

2002 年 Tagomori^[9] 完成第一株副溶血弧菌全基因组测序, 并发现该菌含有两套Ⅲ型分泌系统 (T3SS)。一套位于染色体 1 上, 称为 T3SS1, 距复制起点 1.77~1.81 Mb, 有 30 个开放阅读框的序列与其他革兰氏阴性菌的 T3SS 相关基因有一定同源性。副溶血弧菌 T3SS1 的基因序列与耶尔森氏菌的相似^[9], 因此, 其中的基因命名也参考耶尔森氏菌。与耶尔森氏菌 T3SS 相比, 副溶血弧菌 T3SS1 有如下特点: 第一, 副溶血弧菌 T3SS1 的 *vscL1* 和 *vscU1* 之间存在 12 个功能未知蛋白, 而耶尔森氏菌或其他细菌中没有; 第二, 有 13 个基因 (包括 *vscA1* 到 *vscL1*、*virG1* 到 *virF1*) 与耶尔森氏菌的方向相反。T3SS1 的 GC 含量与基因组的其它区域相似, 存在于所有的副溶血弧菌分离株中, 被认为是该菌的一个遗传标记^[10]。另一套 T3SS 系统位于染色体 2 的毒力岛上 (PAI), 称为 T3SS2, 认为它只存在于 KP⁺ 的副溶血

基金项目: 国家自然科学基金 30571436)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-86971242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

作者简介: 俞盈 (1984-), 女, 浙江人, 博士研究生, 主要从事微生物与食品安全研究。E-mail: yuyingye@zju.edu.cn

收稿日期: 2008-12-06; 修回日期: 2009-01-03

弧菌中^[10-11], 但 Meador^[12]对 34 株含有 T3SS2 的副溶血弧菌进行溶血素 (包括 *tdh*、*trh*、*tlh*) 调查, 发现了 2 个 KP⁻ (*tdh*⁻、*trh*⁻、*tlh*⁺) 菌株, 其中一株含有一套不完整的 T3SS2 系统。在 T3SS2 的附近以及相关基因之间存在多个功能未知蛋白, 该系统距离复制起始位点 1.38 ~ 1.47 Mb, GC 含量为 39.8%, 显著低于基因组 (45.4%), 表明这个区域可能来源于基因的水平转移。我们对分离自浙江沿海地区的 543 株临床、水产品 and 环境副溶血弧菌分离株进行的调查结果显示, 临床株的 T3SS2 阳性率为 87.5% (28/32), 在环境株中也发现了 T3SS2 阳性菌株 (6/511), 国内外未见报道。在 6 个 T3SS2 阳性的环境株中, 3 株为 *tdh* 阳性, 另 3 株为 *tdh* 阴性, 这也与目前的报道不同^[10-11]。

2 T3SS 在副溶血弧菌感染中的作用

副溶血弧菌的 T3SS 包括由多个结构蛋白组成的一个分泌装置和由该装置分泌的一些效应蛋白。效应蛋白通过Ⅲ型分泌系统分泌到宿主细胞内, 对宿主产生致病性^[13]。其可能的感染和作用途径如图 1 所示^[14]: 副溶血弧菌感染细胞时, 通过 T3SS 分泌蛋白和毒素进入宿主细胞 (A), 先诱导急性自体吞噬作用并形成自体吞噬小体 (B), 感染的宿主细胞形成原生质体, 发生皱缩 (C), 细胞裂解, 释放胞内物质 (D)。细胞裂解后释放被降解的蛋白质, 可能被细菌所利用 (E), 此外, 释放的炎性物质可促使机体产生非特异性免疫反应, 如巨噬细胞活化等 (F)。副溶血弧菌也可能杀灭免疫细胞 (G), 从而逃避机体的免疫反应。

2.1 T3SS1—细胞毒性

2.1.1 T3SS1 的结构蛋白: T3SS1 的分泌装置由一

系列结构蛋白组成 (如 *vscA1*-*vscY1*、*vcrD1*、*vcrG1*、*vcrR1*、*vcrV1* 等)。目前, 研究较多的是编码内膜蛋白的 *VcrD1*, 编码外膜蛋白的 *VscC1* 以及编码细胞周质蛋白的 *VscN1*^[11]。T3SS1 具有细胞毒性, 即裂解细胞、释放胞内物质。Park 等^[11]发现, 细菌敲除 *VcrD1* 后丧失对 HeLa 细胞毒性降低; 而将 *VcrD1* 互补表达后细胞毒性回复到与亲本菌株相似。其他结构基因也具有类似的细胞毒性, 如敲除了 *VscC1* 和 *VscN1* 之后, 突变株对 HeLa 细胞毒性降低到原来的 17% 和 21%, 与 $\Delta VcrD1$ (8%) 相似。而敲除 T3SS2 的 *VscC2* 和 *VscN2* 之后, 细胞毒性也几乎不发生变化; 将亲本株与突变株 $\Delta VcrD2$ 感染细胞 5 h 后, HeLa 细胞质与细胞核发生皱缩, 而 $\Delta VcrD1$ 株不引起细胞形态上的变化。上述结果表明 *VcrD1*、*VscC1* 和 *VscN1* 可能与效应蛋白分泌相关的若干个主要结构蛋白。说明 T3SS1 对 HeLa 细胞具有细胞毒性, 而 T3SS2 与细胞毒性无关。除了 HeLa 细胞, T3SS1 对 Caco-2、J774、T84、HT-29 和巨噬细胞也具有细胞毒性^[14-16]。T3SS1 所引起的感染是一种促炎性反应, 能使 HeLa 或者 Caco-2 细胞释放胞内物质^[14-15]。

T3SS1 能够介导宿主细胞的自体吞噬。Burdette^[14]以 2 个 *tdh* 基因缺失的副溶血弧菌突变株作为亲本菌株, 再敲除 *VcrD2* 基因构建成突变株 POR-3, 将 POR-3 感染能稳定表达 GFP-LC3 的 HeLa 细胞 (LC3 是一种自体吞噬标记, 通过诱导自体吞噬使吞噬小体吞噬 LC3-I, 并代谢成与细胞膜相关的 LC3-II), 用荧光显微镜观察副溶血弧菌介导的细胞自体吞噬作用。结果显示, POR-3 感染的细胞在 1 h 内快速发生自体吞噬作用, 电镜观察发现在细胞质、细胞器、膜以及各种小泡中存在多种自体吞噬小体。免疫印迹试验显示 LC3-II 在感染后 1 h 内显著增

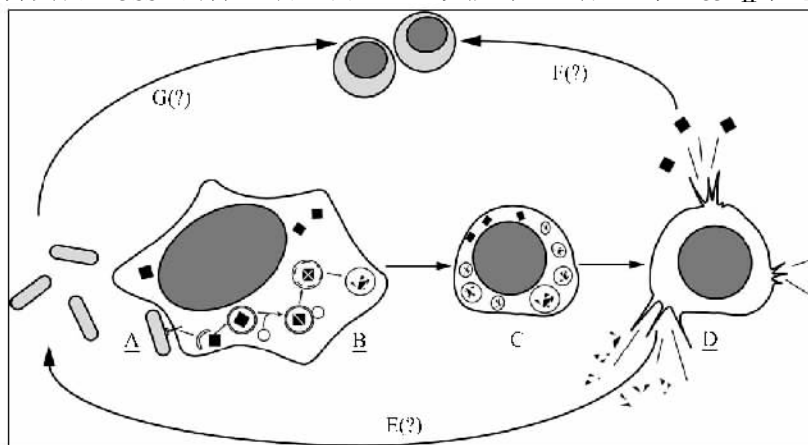


图 1 副溶血弧菌感染宿主细胞并最终导致宿主细胞死亡^[14]

Fig. 1 *Vibrio parahaemolyticus* induces a series of events that culminates in the efficient death of host cells.

加。这一试验证明,副溶血弧菌能使宿主细胞发生急性自体吞噬作用。另外,副溶血弧菌感染 HeLa 细胞时,LC3- I 代谢成 LC3- II 早于乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放。由此推测,在细胞发生坏死并释放细胞内物质之前,就已经发生了急性自体吞噬作用,表明 T3SS1 介导副溶血弧菌对宿主细胞的感染是一个复杂的过程。

2.1.2 T3SS1 的分泌蛋白: Ono 等^[7]用二维凝胶电泳对 T3SS1 突变株及其亲本株的分泌蛋白进行了对比分析,发现 T3SS1 系统的 4 个分泌蛋白 VP1656 (VopD)、VP1680、VP1686 和 VPA450。VP1680 和 VP1686 位于 *vscL1* 和 *vscU1* 之间,是 12 个功能未知蛋白中的两个蛋白, VopD 位于 T3SS1 结构基因的上游,与 *VcrD1* 基因相邻,而 VPA450 位于染色体 2 上。由此可见,并非所有与 T3SS1 相关的基因都位于染色体 1 上。

VP1680 是 T3SS1 介导真核细胞毒性的最主要蛋白。Ono 等^[7]还比较了不同缺失株对 HeLa 细胞的毒性,与亲本株相比, $\Delta VcrD1$ 下降了 65%, 对 VP1680、h-3 (包括 VP1680 和附近的 VP1682)、h-1 (整个 12 个功能未知蛋白区域)进行缺失后,细菌对 HeLa 细胞的毒性也显著降低,而缺失 VP1686、VPA450、h-2 (VP1676 ~ VP1679) 和 h-4 (VP1683 ~ VP1687) 的细菌对 HeLa 细胞的毒性没明显变化。表明 VP1680 具有对 HeLa 细胞的细胞毒性。

VopD 也具有细胞毒性,使感染的 HeLa 细胞死亡。此外,它还具有溶血活性。在耶尔森氏菌中, VopD 和 VopB 能介导效应蛋白 VopS 跨越靶细胞膜,与溶血活性直接相关。副溶血弧菌中也存在 *vopD* 和 *vopB* 基因,且其缺失株的溶血活性和细胞毒性均大大降低。但是,在 T3SS1 的分泌蛋白中,只发现了 VopD,没有发现 VopB,这可能是 VopB 蛋白的表达量比较低,在二维电泳中检测不到^[7]。

VP1686 能通过抑制 NF- κ B 的活性介导巨噬细胞死亡^[8]。它还能通过抑制 RhoB 的鸟苷三磷酸酶及下游的信号传导,阻止被感染细胞肌动蛋白的聚集和抑制巨噬细胞肌动蛋白的快速重排,这一变化有助于抵抗巨噬细胞对病原菌的吞噬作用^[9-21]。此外,VP1686 对 HeLa 细胞也具有一定的细胞毒性^[8]。

2.1.3 T3SS1 的调控: Zhou 等^[2]发现, ExsA 与 ExsD 能够调控 T3SS1 基因簇的转录表达, ExsA 为正向转录调控, ExsD 为负向转录调控。T3SS1 的基因能在 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培养基中被

转录,而在 LB (Luria-Bertani) 培养基中转录量显著降低 (除 *exsD* 外,低于检测限)。*exsA* 缺失株的 T3SS1 基因转录水平和对 HeLa 细胞的毒性降低,而互补表达 *exsA* 后, T3SS1 基因的转录水平和对 HeLa 细胞毒性得到恢复。在野生菌株中过量表达 ExsA, 也能够启动 T3SS1 基因在 LB 中转录。说明 ExsA 对 T3SS1 的表达起正调控作用。凝胶迁移试验发现, ExsA 蛋白直接结合 VP1668 和 VP1687 上游区域, 推测 ExsA 很有可能直接作用于 T3SS1 的启动子序列。对 *exsD* 进行缺失后, T3SS1 基因能在 LB 中转录, 而回复 *exsD* 后, T3SS1 基因在 LB 中的表达则受到抑制。过量表达 ExsD 甚至能使 T3SS1 基因在 DMEM 中的转录受到抑制, 说明 ExsD 对 T3SS1 的表达起到负调控作用。

2.2 T3SS2—肠毒性

2.2.1 T3SS2 的结构蛋白: T3SS2 位于染色体 2 的毒力岛上, 距离复制起始位点 1.38 至 1.47 MB。与 T3SS1 一样, *vcrD2*、*vscC2* 和 *vscN2* 分别编码了内膜蛋白, 外膜蛋白和细胞周质蛋白^[1]。

T3SS2 具有肠毒性。Park 等对 T3SS1 和 T3SS2 系统中的不同结构基因缺失后进行兔回肠结扎试验, 结果发现, $\Delta VcrD2$ 、 $\Delta VscC2$ 和 $\Delta VscN2$ 的回肠液积聚量明显低于亲本株, 而 $\Delta VcrD1$ 、 $\Delta VscC1$ 和 $\Delta VscN1$ 的回肠积液量则与亲本株差别不大。对兔回肠进行镜检, 发现亲本株与 $\Delta VcrD1$ 株感染的回肠绒毛被破坏, 肠上皮细胞黏膜下层伴随着大量的出血和中性粒细胞浸润。而 $\Delta VcrD2$ 株感染的回肠绒毛结构则无变化。

T3SS2 也具有一定程度的细胞毒性。副溶血弧菌主要由 T3SS1 系统贡献细胞毒性, 但也有试验证实 T3SS2 对 Caco-2 (结肠癌细胞) 和 HCT-8 细胞 (人回盲肠腺癌细胞) 具有一定的细胞毒性^[6]。

2.2.2 T3SS2 的分泌蛋白: VopA/P (VPA1346) 与耶尔森氏菌的 YopJ 具有 55% 的同源性, 是一种乙酰转移酶, 能够通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 的启动和生物学活性来抑制 MAPKs 的信号传导途径, 从而抑制细胞分裂。这是一种新的抑制 MAPKs 信号传导的机制。VopA 能活化激酶催化环结构中保守的赖氨酸乙酰化, 阻止 ATP 的结合, 最终阻止激酶的磷酸化^[23]。

VopT (VPA1327) 具有核糖转移酶活性, 部分贡献 T3SS2 对 Caco-2 的细胞毒性^[23]。VopL (VPA1370) 能诱导肌动蛋白抗压纤维的形成并加速肌动蛋白纤维丝的聚集^[24]。VopC (VPA1321) 与大肠杆菌的细胞

毒性坏死因子的同源性达 38%^[3]。

VopB2 (VPA1362)和 VopD2 (VPA1361)是 T3SS2 的 2 个分泌蛋白,它们对于 T3SS2 的肠毒性是必需的。在缺失 *verD2* 的突变株上清中,SDS-PAGE 找不到这 2 个蛋白的条带。同时,VopB2 和 VopD2 也是 T3SS2 的转位蛋白。在缺失了 *vopB2* 或 *vopD2* 的细菌中,检测不到 T3SS2 分泌蛋白 VopT 的分泌^[5]。

3 结束语

副溶血弧菌中的 2 套Ⅲ型分泌系统自发现以来,国外学者对其结构蛋白和分泌蛋白的组成及功能、相关调控基因等方面的研究不断深入。但仍然有很多问题有待深入探索,如分泌系统中效应蛋白的输出机制、环境因素对 T3SS 分泌的影响、效应蛋白与宿主细胞的相互作用、相关调控基因及其调控机制等,特别是对副溶血弧菌 T3SS2 调控机制的研究目前尚处于空白。这些研究对于探明副溶血弧菌的致病机理具有重要意义。

参考文献

- [1] Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973 – 1998. *The Journal of Infectious Disease*, 2000, 181: 1661-1666.
- [2] Blake PA, Weaver RE, Hollis DG, et al. Diseases of humans (other than *cholera*) caused by *Vibrios*. *Annual Review of Microbiology*, 1980, 34: 341-367.
- [3] Morris JG Jr, Black RE. *Cholera* and other *Vibrioses* in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 1985, 312: 343 – 350.
- [4] Park KS, Ono T, Rokuda M, et al. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48: 313 – 318.
- [5] Lynch T, Livingstone S, Buenaventura E, et al. *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 1275 – 1283.
- [6] DiRita VJ. Co-ordinate expression of virulence genes by *toxR* in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 1992, 6: 451 – 458.
- [7] Park KS, Arita M, Iida T, et al. *vpaH*, a gene encoding a novel histone-like nucleoid structure – like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* TH3996. *Infection and Immunity*, 2005, 73: 5754 – 5761.

- [8] Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 379 – 433.
- [9] Tagomori K, Iida T, and Honda T. Comparison of genome structures of *Vibrio*, bacteria possessing two chromosome. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184: 4351 – 4358.
- [10] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 2003, 361: 743 – 749.
- [11] Park KS, Ono T, Rokuda M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 2004, 72: 6659 – 6665.
- [12] Meador EC, Parson MM, Bopp CA, et al. Virulence gene and pandemic group specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45: 1133 – 1139.
- [13] Caron E, Crepin VF, Simpson N, et al. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 19: 40 – 45.
- [14] Burdette DL, Yarbrough ML, Orvedahl A, et al. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 12497 – 12502.
- [15] Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, et al. Modulation of pathogenicity with norepinephrine related to the type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Infectious Disease*, 2007, 9: 1353 – 1360.
- [16] Kodama T, Rokuda M, Park KS, et al. Identification and characterization of VopT, a novel ADP – ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion 2. *Cellular Microbiology*, 2007, 9: 2598 – 2609.
- [17] Ono T, Park K, Ueta M, et al. Identification of protein secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infection and Immunity*, 2006, 74: 1032 – 1042.
- [18] Bhattacharjee RN, Park KS, Kumagai Y, et al. VP1686, a *Vibrio* type III secretion protein, induces toll-like receptor-independent apoptosis in macrophage through NF-kappaB inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 36897 – 36904.
- [19] Bhattacharjee RN, Park KS, Chen X, et al. Translocation of VP1686 upregulates RhoB and accelerates phagocytic activity of macrophage through actin remodeling. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18: 171 – 175.
- [20] Casselli T, Lynch T, Southward CM, et al. *Vibrio parahaemolyticus* inhibition of Rho family GTPase activation

- requires a functional chromosome I type III secretion system. *Infection and Immunity*, 2008, 76: 2202 – 2211.
- [21] Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, et al. AMPylation of Rho GTPase by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science*, 2009, 323: 269 – 272.
- [22] Zhou X, Shah DH, Konkel ME, et al. Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Molecular Microbiology*, 2008, 69: 747 – 764.
- [23] Trosky JE, Li Y, Mukherjee S, et al. VopA inhibits ATP binding by acetylating the catalytic loop of MAPK kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 34299 – 34305.
- [24] Liverman AD, Cheng HC, Trosky JE, et al. Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 17117 – 17122.
- [25] Kodama T, Hivoshi H, Gotoh K, et al. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Infection and Immunity*, 2008, 76: 4282 – 4289.

Type III secretion system of *Vibrio parahaemolyticus* - A review

Ying Yu, Beibei Wu, Weihuan Fang*

Zhejiang Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a halophilic gram-negative bacterium that causes food borne acute gastroenteritis in human being or certain diseases in aquatic species. In addition to thermostable direct hemolysin (*tdh*) and *tdh*-related hemolysin (*trh*), two sets of type III secretion systems (T3SS) were recently found to be associated closely with virulence. T3SS1 located on chromosome 1 is involved in cytotoxicity to host cells and orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and eventual cell lysis. T3SS2 in chromosome 2 is enterotoxic. In this we address the composition of the two T3SS, their functions and regulation in *Vibrio parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; type III secretion system; pathogenicity

(本文责编 张晓丽 谷志静)