

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20195327

· 论 著 ·

## PA1864 基因敲除对铜绿假单胞菌毒力及致病性的影响

张 鸿<sup>1</sup>, 胥志敏<sup>2</sup>, 陈 炜<sup>1</sup>, 何晓梅<sup>2</sup>, 熊浚智<sup>2</sup>, 盛哈蕾<sup>2</sup>, 邱 静<sup>2</sup>, 张克斌<sup>2</sup>

(陆军军医大学第二附属医院 1. 医院感染控制科; 2. 中心实验室, 重庆 400037)

**[摘要]** **目的** 评价 PA1864 基因在铜绿假单胞菌(PA)毒力及致病性中的作用。**方法** 比较野生菌株(PAO1)与 PA1864 基因敲除菌株( $\Delta$ PA1864)急性感染小鼠肺或 A549 肺癌细胞后细菌毒力表型及致病性的差异,包括小鼠的生存率、肺水肿、组织损伤,细胞活力,PAO1 和  $\Delta$ PA1864 菌株分泌性毒力因子、III 型毒力蛋白分泌系统(T3SS)及群体感应(QS)系统表达情况等。**结果** PA1864 基因敲除后,菌体对宿主的致病性及细胞毒性降低,细菌泳动能力、T3SS 相关蛋白(ExoS, PcrV)表达下调,而绿脓素合成量增加,喹诺酮 QS 系统信号分子合成增加。**结论** PA1864 基因可促进 PA 毒力,且该调节作用可能与喹诺酮 QS 系统有关。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌; PA1864 基因; 基因敲除; 致病性; 细菌毒力; 群体感应系统

**[中图分类号]** R378

## Effect of PA1864 gene knockout on virulence and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

ZHANG Hong<sup>1</sup>, XU Zhi-min<sup>2</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>, HE Xiao-mei<sup>2</sup>, XIONG Jun-zhi<sup>2</sup>, SHENG Ha-lei<sup>2</sup>, QIU Jing<sup>2</sup>, ZHANG Ke-bin<sup>2</sup> (1. Department of Healthcare-associated Infection Control; 2. Central Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the role of PA1864 gene in the virulence and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (PA). **Methods** Difference in virulence phenotype and pathogenicity between wild type (PAO1) and PA1864 gene knockout strain ( $\Delta$ PA1864) which acutely infected mice lung or A549 lung cancer cells was compared, including the survival rate of mice, pulmonary edema, tissue damage, cell viability, secretory virulence factors of PAO1 and  $\Delta$ PA1864 strains, type III secretion system (T3SS) of toxic protein and quorum sensing (QS) system and so on. **Results** When PA1864 gene was knocked out, pathogenicity and cytotoxicity of bacteria to host decreased, bacterial swimming motility and expression of T3SS-related proteins (ExoS, PcrV) were down-regulated, while synthesis of pyocyanin increased, synthesis of signal molecules in quinolone QS system increased. **Conclusion**

PA1864 gene can promote PA virulence, and this regulation may be related to quinolone QS system.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; PA1864 gene; gene knockout; pathogenicity; bacterial virulence; quorum sensing system

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种广泛存在于自然环境的革兰阴性条件致病菌<sup>[1]</sup>,也是医院感染最常见的病原体之一<sup>[2-3]</sup>。PA强大的环境适应能力及复杂的毒力调控机制是导致

其感染后高耐药、高死亡的重要原因。PA的毒力组分众多,包括菌体组分相关的菌毛、鞭毛及脂多糖<sup>[4]</sup>,胞外的分泌性毒力因子/蛋白,如绿脓素、绿色荧光素、蛋白酶、氰化物等<sup>[5-6]</sup>。此外,PA的III型毒

[收稿日期] 2019-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31872634)

[作者简介] 张鸿(1989-),女(汉族),重庆市铜梁人,主治医师,主要从事医院感染流行病学和微生物学方面研究。

[通信作者] 张克斌 E-mail: zhangkebin12@163.com

力蛋白分泌系统(type III secretion system, T3SS), 其可将毒性效应蛋白 ExoS、ExoT、ExoY 和/或 ExoU 注入宿主细胞, 促进宿主细胞的凋亡及炎症反应, 并在 PA 的急性感染中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。PA 的群体感应(quorum sensing, QS)系统根据其化学信号分子组成的不同, 可分为 3 类, 即 las、rhl 系统和喹诺酮(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)系统, 其信号分子分别为 N-3-氧代十二烷基-L-高丝氨酸内酯(N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, 3-oxo-C12-HSL)、N-丁酰基-L-高丝氨酸内酯(N-butyl-L-homoserine lactone, C4-HSL)和 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, PQS)<sup>[8]</sup>。

PA 具有目前已知的最大的细菌基因组, 其中大量基因功能仍不清楚<sup>[9]</sup>。根据 *Pseudomonas* Genome Database 数据库 (<http://www.pseudomonas.com>)提供的生物信息学预测, PA1864 蛋白

可能具有 DNA 结合能力, 并可能作为一种转录调节因子调节基因表达。然而, PA1864 基因及其基因编码蛋白的实际生物学功能与 PA 毒力及致病性间是否有关联, 目前仍无相关报道。本研究拟通过对比铜绿假单胞菌 PAO1 野生菌株及其 PA1864 基因敲除菌株( $\Delta$ PA1864)在细菌毒力表型及致病性中的差异, 探讨 PA1864 基因在 PA 毒力及致病性中的作用, 为进一步揭示 PA1864 基因的实际生物学功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验菌株与引物 PAO1/pUCP-Red、 $\Delta$ PA1864、*E. coli* JM109/pSB1075、*E. coli* JM109/pSB536 菌株均为本实验室前期构建及保存。试验所用的荧光定量引物见表 1。

表 1 荧光定量引物

Table 1 Fluorescence quantitative primers

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>rplU</i>	CGCAGTGATTGTTACCGGTG	GGTAACCTTCGCACCTTCGA
<i>exoS</i>	GACGCAAGCCCGAACT	CAGGCTGTCTGCCAGGTAC
<i>pcrV</i>	GATCGACGCTGGCGGTAT	TCATCGCTGAGGCCCTTG
<i>exsA</i>	GATGCTCGCCTGCCTGAA	CGAACTCGCGGGAGAAGT

1.1.2 试验细胞与动物 人非小细胞肺癌 A549 细胞购于中科院上海细胞库。试验动物 BALB/c 小鼠, 6~8 周, 雄性, 体重 20~25 g, 购于陆军军医大学实验动物中心。动物试验经过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审批, 符合动物伦理和动物福利要求。

1.1.3 主要试剂和仪器 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司, CCK8 细胞活性检测试剂盒购自于上海碧云天生物技术有限公司, Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购于 BD bioscience, 荧光定量 PCR 酶、RNAiosplus、逆转录试剂盒购自 TaKaRa, HPLC 色谱柱 TSKgelODS-100Z(4.6 × 250 mm, 5  $\mu$ m)购于日本东曹。电转仪、凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司, Nanodrop 微量核酸仪购于美国 Thermo fisher, 实时荧光定量 PCR 仪购于美国 ABI 公司, 流式细胞检测仪购于美国 Beckman, 高效液相色谱仪购自于美国 Waters 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 生长曲线测定 挑取 PAO1、 $\Delta$ PA1864 单菌落于 20 mL LB 液体培养基中 37℃, 200 r/min 培养至对数生长期。取活化后菌液用无菌 PBS 缓冲液调整细菌浓度至 OD<sub>600</sub>/mL = 1.0。以 OD<sub>600</sub>/mL = 0.005 的初始浓度, 将 PAO1 接种于 200 mL LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min 培养 36 h。培养期间, 每 2 h 取样测定吸光度值 OD<sub>600</sub>。

#### 1.2.2 宿主致病性研究

1.2.2.1 小鼠急性肺感染模型建立 取 30 只 6~8 周 BALB/c 小鼠, 按随机数字表法分为 PBS 对照组、PAO1 和  $\Delta$ PA1864 感染组, 每组 10 只小鼠。小鼠经乙醚麻醉后, 取 20  $\mu$ L 经 PBS 调整后的菌液(浓度为 3 × 10<sup>9</sup>/mL)进行小鼠滴鼻感染, 10  $\mu$ L/鼻孔。对照组使用无菌 PBS 缓冲液进行相同处理。各组小鼠分笼饲养, 每日记录小鼠的健康状况, 统计小鼠的死亡数。感染后 7 日为观察终点, 若 7 日内

死亡,则以死亡时间作为观察终点。

1.2.2.2 小鼠体重检测 感染前称量小鼠体重并标记为  $W_0$ ,观察终点时体重记为  $W_{last}$ 。小鼠体重变化 =  $W_{last}/W_0 \times 100\%$ 。

1.2.2.3 小鼠肺水肿检测 取小鼠肺组织,测定湿重(wet weight, WW),将肺组织置于 70℃ 烤箱内烘干后测定肺组织干重(dry weight, DW)。肺水肿表示为肺组织湿重与干重之比,即 WW/DW。

1.2.2.4 小鼠肺组织病变及炎症的检测 (1)HE 染色:采用 4% 多聚甲醛固定液固定小鼠肺部组织,经脱水、石蜡包埋、切片后,采用苏木素染细胞核 5 min,1% 盐酸乙醇分化 30 s 后温水返蓝。采用伊红复染 30 s 后,乙醇梯度脱水,二甲苯透明后使用中性的树胶封片。(2)免疫组化:取小鼠肺组织石蜡经脱蜡、水化、抗原修复后,3%  $H_2O_2$  封闭内源性过氧化物酶体。采用抗白细胞表面抗原 CD45 抗体和抗巨噬细胞 F4/80 抗体作为一抗(均购自 Abcam),以 1:200 比例,4℃ 孵化过夜。漂洗后二抗室温孵育,以 DAB 显色,苏木精染液复染后,1% 盐酸乙醇分化、温水返蓝、脱水、透明后封片。

### 1.2.3 细胞毒性检测

1.2.3.1 细胞活力 采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 A549 细胞,待其生长至 80% 汇合度,取细胞经 0.25% 胰酶消化后制备单细胞悬液。按照  $1 \times 10^4$  个细胞/100  $\mu$ L 每孔将细胞加入至 96 孔板中,37℃,5%  $CO_2$  培养至 80% 汇合度。菌体感染试验:按照感染复数 MOI = 50 的比例加入细菌;上清液感染试验:每孔加入 100  $\mu$ L 过滤后的细菌培养上清液处理细胞;对照组加入等体积的含 10% FBS 的 DMEM 培养基,每组设置 6 个平行孔。37℃,5%  $CO_2$  培养 2 h,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液培养 2 h,酶标仪检测  $A_{450}$  吸光度值,计算抑制率 =  $(1 - A_{处理}/A_{对照}) \times 100\%$ 。

1.2.3.2 细胞凋亡 A549 细胞按照  $1 \times 10^6$  个细胞/孔铺于 6 孔板,37℃,5%  $CO_2$  培养至 80% 汇合度。按照感染复数 MOI = 50 的比例加入细菌,37℃,5%  $CO_2$  培养 2 h。采用 0.25% 胰酶消化细胞获取单细胞悬液。采用 1  $\times$  binding buffer 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 染液,室温避光孵育 15 min 后加入 5  $\mu$ L PI 染液染色 5 min,应用流式细胞术检测菌株对细胞凋亡的影响。

### 1.2.4 毒力因子检测

1.2.4.1 细菌胞外蛋白酶活性 (1)细菌培养:挑取 PAO1、 $\Delta$ PA1864 单菌落于 10 mL LB 培养基中,37℃,200 r/min 振荡培养至对数生长期。将细菌接种于 200 mL LB 培养基中,至初始浓度  $OD_{600}/mL = 0.01$ 。37℃,200 r/min 振荡培养 24 h 并于第 3、6、9、12 和 24 h 收集细菌上清 - 80℃ 保存备用。(2)牛奶平板制备:称取叠氮钠 0.03 g、SDS 0.02 g、琼脂粉 1.0 g,溶解于 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.5) 中,121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min,加入 2.0 g 脱脂奶粉,充分混匀后倾倒平板,并打孔。(3)蛋白酶活性检测:取上述细菌培养上清,按照 100  $\mu$ L/孔加入至牛奶平板相应孔中,37℃ 放置 12 h,观察透明环形成情况。

1.2.4.2 绿脓素 取上述细菌上清 4 mL 加入等体积氯仿,充分振荡混匀,静置 2 h 后,取下层有机相 2 mL 加入 800  $\mu$ L 2 mol/L HCl 溶液。充分振荡后静置待其分层。取上层粉红色盐酸相测定  $A_{520}$  吸光度值。

1.2.4.3 绿色荧光素 (1)金氏 B 培养基制备:称取  $K_2HPO_4$  1.5 g、 $MgSO_4$  1.5 g、蛋白胨 20.0 g、琼脂粉 15.0 g,溶解于 ddH<sub>2</sub>O 并定容至 1 000 mL,调整 pH 至  $7.2 \pm 0.2$ 。(2)样品制备:将活化细菌接种于 20 mL 金氏 B 培养基中,至初始浓度  $OD_{600}/mL = 0.01$ ,37℃,200 r/min 振荡培养 12 h,取 4 mL 菌液,12 000 r/min 常温离心 5 min,分别收集细菌菌体和上清。菌体沉淀用于细菌浓度( $A_{600}$ )测定,上清用于绿色荧光素检测。(3)绿色荧光素检测:取上述细菌上清加入 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 稀释 3 倍。取稀释液后菌液测定其  $A_{405}$  吸光度值。按照  $A_{450}/A_{600}$  矫正细菌绿色荧光素含量。

1.2.4.4 细菌泳动能力 (1)泳动平板制备:称取胰蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、Difco 琼脂粉 5.0 g,加入 ddH<sub>2</sub>O 中溶解并定容至 1 000 mL。121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min,倾倒平板。(2)泳动能力检测:取 1.2.4.1 步骤中收集的 12 h 菌液上清 1  $\mu$ L 点于平板中央,30℃ 静置培养 12 h,观察细菌运动情况。

1.2.5 T3SS 系统 (1)RT-qPCR 检测基因表达:取 1.2.4.1 步骤获取的菌体沉淀,加入 1.0 mL RNAios plus 裂解菌体,提取细菌 RNA。RT-qPCR 检测 *exoS*、*pcrV* 基因表达水平,并设置 *rplU* 为内参基因。(2)Western blot 检测蛋白表达水平:

取 1.2.4.1 步骤获取的细菌沉淀加 1 mL mol/L RIPA 裂解液(PMSF 终浓度 1 mmol/L),冰上超声破碎(振幅 30%,超 5 s,停 10 s,超声 5 min),4℃,12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体蛋白。采用抗 ExoS 和 PcrV 多克隆抗体 Western blot 检测蛋白表达水平。

1.2.6 QS 系统 (1)信号分子提取:取 1.2.4.1 步骤获取的菌液上清 8 mL 与等体积乙酸乙酯(0.5%甲酸酸化)混合,涡旋振荡,静置分层后取有机相,蒸发干燥后,50%甲醇溶解,-20℃保存。(2)报告菌株平板法检测 3-oxo-C12-HSL 或 C4-HSL 含量:分别接种信号分子报告菌株 *E. coli* JM109/pSB1075(检测 3-oxo-C12-HSL)和 *E. coli* JM109/pSB536(检测 C4-HSL)于 LB 液体培养基中,30℃,200 r/min 振荡培养至对数生长期。取 70 mL 培养菌液,加入至 140 mL 含 2.1%琼脂的 LB 培养基中(终浓度 0.7%)。倾倒平板,凝固后打孔,每孔加入 50 μL 信号分子样品。30℃避光培养 12 h,凝胶成像仪曝光,检测报告菌株的生物发光环。(3)高效液相色谱法(HPLC)检测 PQS 含量:采用等度洗脱法进行检测。流动相:86%甲醇(1%冰醋酸酸化)和 14%超纯水(1%冰醋酸酸化),流速 1 mL/min,Waters 2998 Photodiode Array 检测器检测样品 A<sub>325</sub>吸光值。PQS 标准品进样浓度 250 μg/mL。通过比较标准品和样品峰面积,计算样品中 PQS 含量。

1.3 统计学分析 应用 GraphPad Prism 5.0 软件作图,应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PA 生长情况 检测 PAO1 及 ΔPA1864 菌株在 LB 液相培养条件下的菌体浓度,PA 细菌生长曲线结果显示,0~6 h 为生长迟缓期,6~16 h 为对数期,16~28 h 为稳定期,在 28 h 后细菌处于衰亡期。PAO1 与 ΔPA1864 的生长曲线无明显差别。见图 1。

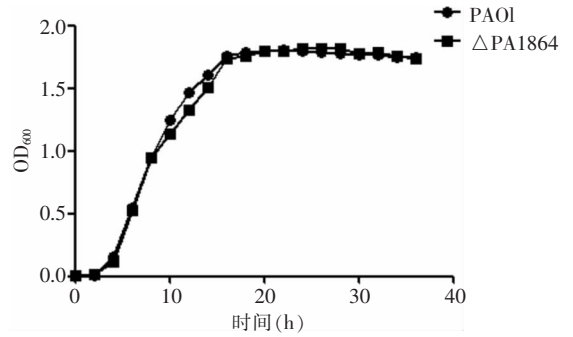
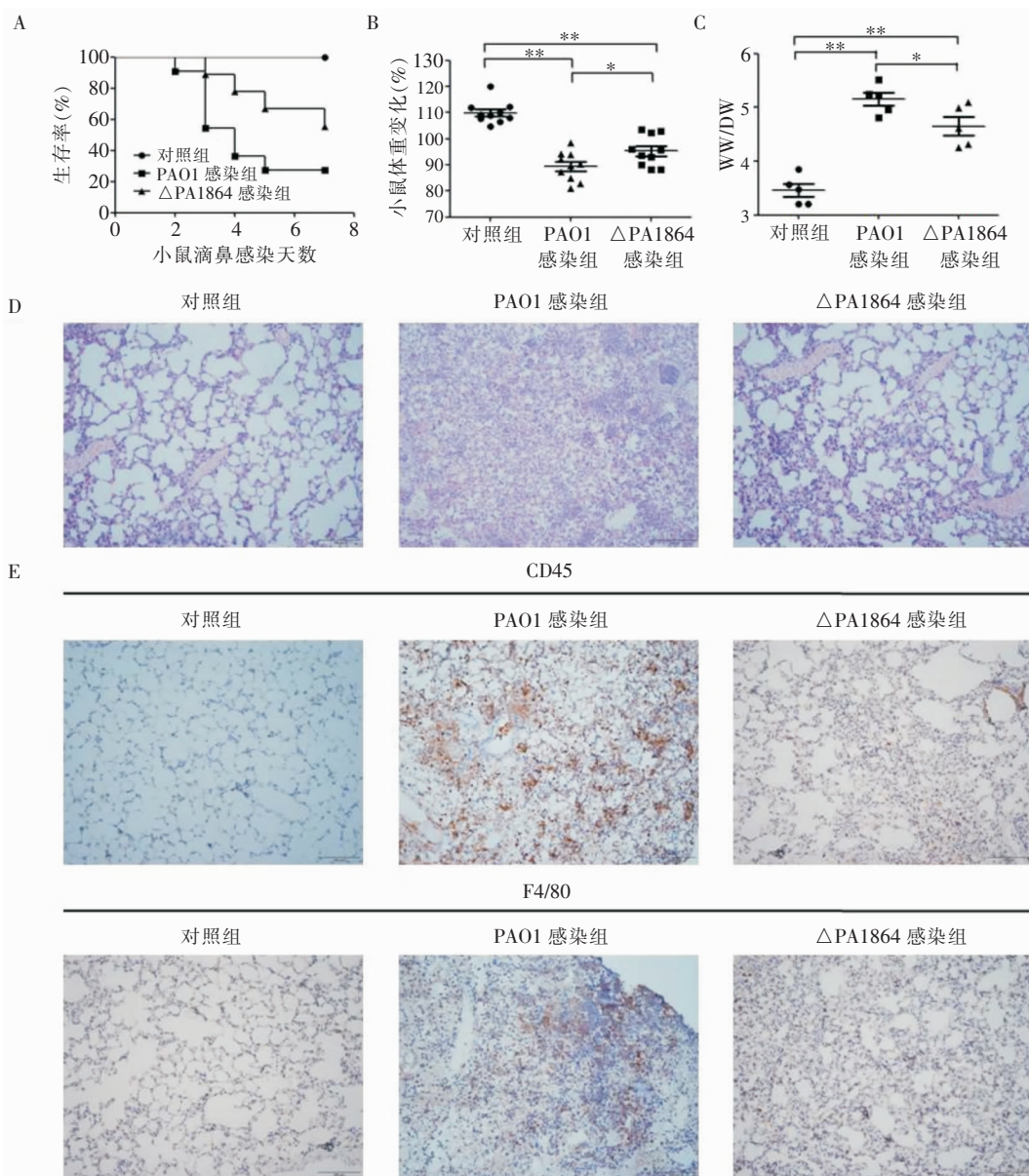


图 1 野生菌株 PAO1 与基因敲除菌株 ΔPA1864 生长曲线  
Figure 1 Growth curves of PAO1 wild type strain and gene knockout strain ΔPA1864

2.2 PA1864 基因敲除对 PA 宿主致病性的影响 与 PAO1 感染组相比,ΔPA1864 菌株感染组小鼠死亡率降低,体重降低减缓,肺水肿情况明显改善。HE 染色结果显示,ΔPA1864 感染小鼠肺组织炎症细胞浸润、组织损伤及肺泡腔内出血严重程度低于 PAO1 感染组。免疫组化检测白细胞表面抗原 CD45 及巨噬细胞表面抗原 F4/80,ΔPA1864 感染小鼠肺组织浸润的白细胞及巨噬细胞低于 PAO1 感染组。见图 2。

2.3 PA1864 基因敲除对 PA 细胞毒性的影响 采用 PAO1、ΔPA1864 细菌及其分泌上清分别感染 A549 细胞,并通过 CCK-8 法检测细胞活性,结果显示,与 PAO1 感染组相比,ΔPA1864 菌体感染组的细胞抑制率明显降低,差异具有统计学意义;ΔPA1864 分泌上清感染细胞组细胞活性略有下降,但不具有统计学意义。ΔPA1864 菌体感染的 A549 细胞凋亡(早期凋亡+晚期凋亡)情况较 PAO1 感染组更轻。ΔPA1864 菌体感染 A549 细胞的细胞凋亡率低于 PAO1 组,且差别具有统计学意义。见图 3。

2.4 PA1864 基因敲除对 PA 运动及分泌性毒力因子的影响 绿脓素含量检测结果显示,随着培养时间的延长,细菌产生的绿脓素逐渐增加,且在培养 24 h 后 ΔPA1864 菌株产生的绿脓素含量高于 PAO1 菌株。ΔPA1864 菌株在对数生长期产生的绿色荧光素略低于 PAO1 菌株,但差异无统计学意义。



A: 小鼠生存曲线; B: 小鼠体重变化; C: 小鼠肺组织水肿检测; D: 小鼠肺组织 HE 染色; E: 小鼠肺组织免疫组化染色 (CD45、F4/80);

\*\* :  $P < 0.01$ ; \* :  $P < 0.05$

图 2 PA1864 基因敲除对 PA 宿主致病性的影响

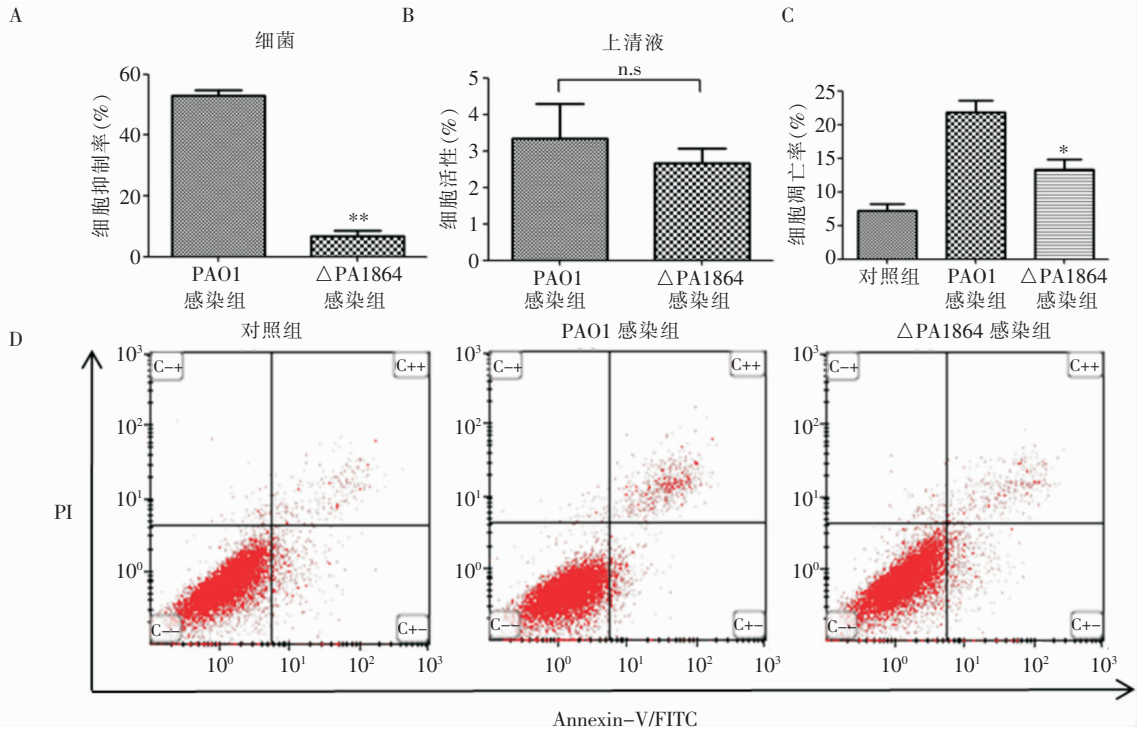
Figure 2 Effect of PA1864 gene knockout on pathogenicity of PA to host

ΔPA1864 与 PAO1 菌株分泌性蛋白酶(主要是弹性蛋白酶)的产生未见明显差别。观察细菌运动方式,试验结果显示,与 PAO1 菌株相比,ΔPA1864 菌株的泳动环直径明显减小,泳动环直径检测证实该差异具有统计学意义。见图 4。

### 2.5 PA1864 基因敲除对 PA T3SS 的影响 与

PAO1 野生株相比,ΔPA1864 的 *exoS*、*pcrV* 和 *exsA* 基因表达水平在细菌培养的早期(3 h 和 6 h)明显下调,而在细菌对数生长中晚期(12 h)未有明显变化。Western blot 也证实,在细菌生长的早期(3 h 和 6 h),ΔPA1864 菌株的 ExoS 和 PcrV 蛋白表达量低于 PAO1 野生菌株。见图 5。

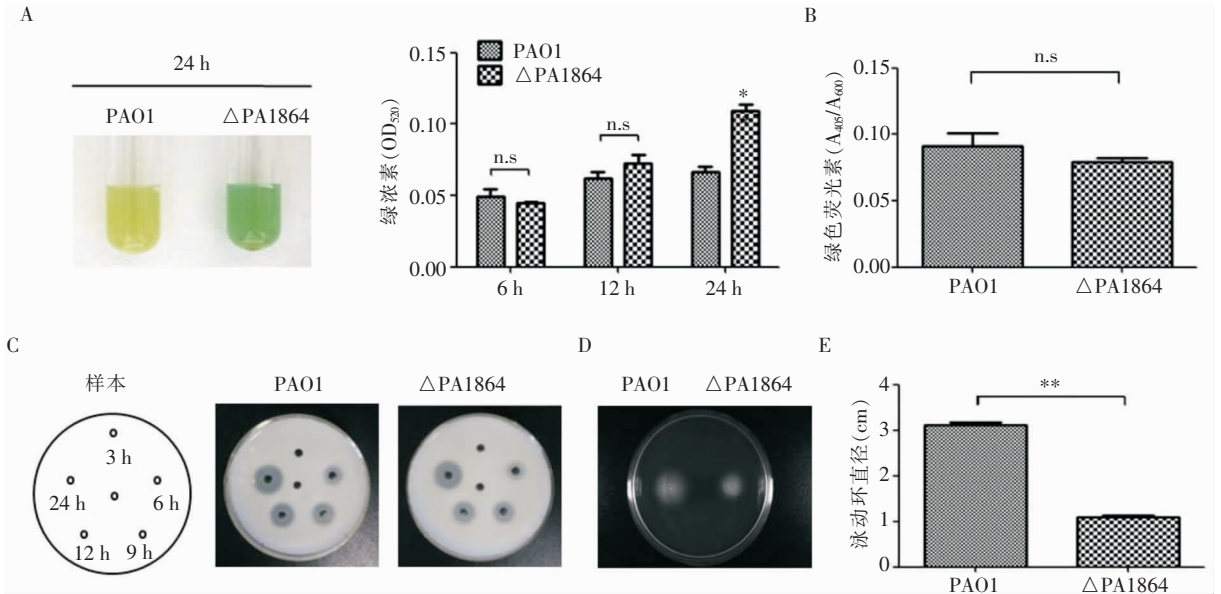




A: CCK-8 法检测菌体感染对细胞的毒性; B: CCK-8 法检测细菌培养上清液对细胞的毒性; C: 细胞凋亡比例统计; D: 流式细胞术检测细菌感染后细胞凋亡情况 (C-- 象限为活细胞, C+- 象限为早期凋亡细胞, C++ 象限为晚期凋亡细胞, C-+ 象限为坏死细胞); \* :  $P < 0.01$ ; \* :  $P < 0.05$ ; n. s. 与 PAO1 感染组相比, 差异无统计学意义

图 3 PA1864 基因敲除对 PA 细胞毒性的影响

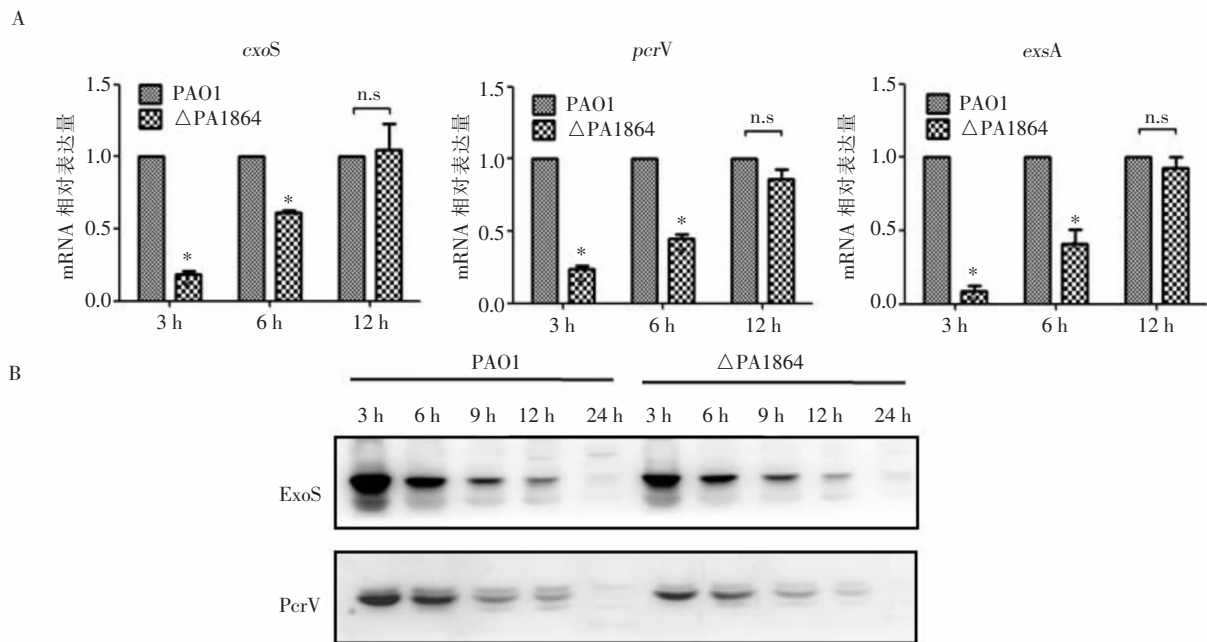
Figure 3 Effect of PA1864 gene knockout on cytotoxicity of PA



A: 绿脓素含量检测; B: 绿色荧光素含量检测; C: 牛奶平板法检测蛋白酶活性; D: 运动平板法检测细菌泳动能力; E: 泳动环直径测定; \* \* :  $P < 0.01$ ; \* :  $P < 0.05$ ; n. s. 与 PAO1 组相比差异无统计学意义

图 4 PA1864 基因敲除对 PA 毒力相关表型的影响

Figure 4 Effect of PA1864 gene knockout on PA virulence-related phenotypes



A: RT-qPCR 检测 T3SS 相关蛋白编码基因 *exoS*、*prcV* 和 *exsA* 的表达水平; B: Western blot 检测 ExoS 和 PcrV 蛋白表达情况; \*:  $P < 0.05$ ; n. s.: 与 PAO1 组相比差异无统计学意义

图 5 PA1864 基因敲除对 T3SS 相关基因及蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of PA1864 gene knockout on T3SS-related genes and protein expression

2.6 PA1864 基因敲除对 PA QS 系统信号分子合成的影响 检测 *las*、*rhl* 系统信号分子, 结果显示, 3-oxo-C12-HSL 含量在细菌培养至 6 h 时即可明显检测到, 而 C4-HSL 含量在细菌对数生长的中晚期 (12 h) 明显升高; 与野生株 PAO1 相比, ΔPA1864 菌株培养上清中 3-oxo-C12-HSL 和 C4-HSL 合成量无明显区别。见图 6。HPLC 法检测细菌培养上清中 PQS 信号分子的合成量, 结果显示, 在细菌培养至 12 h 即可明显检测到 PQS 产生, 且随着培养时间延长至 24 h, 其产量逐渐增加。与 PAO1 相比, ΔPA1864 菌株的 PQS 信号分子合成量明显高于 PAO1 菌株。见图 7。

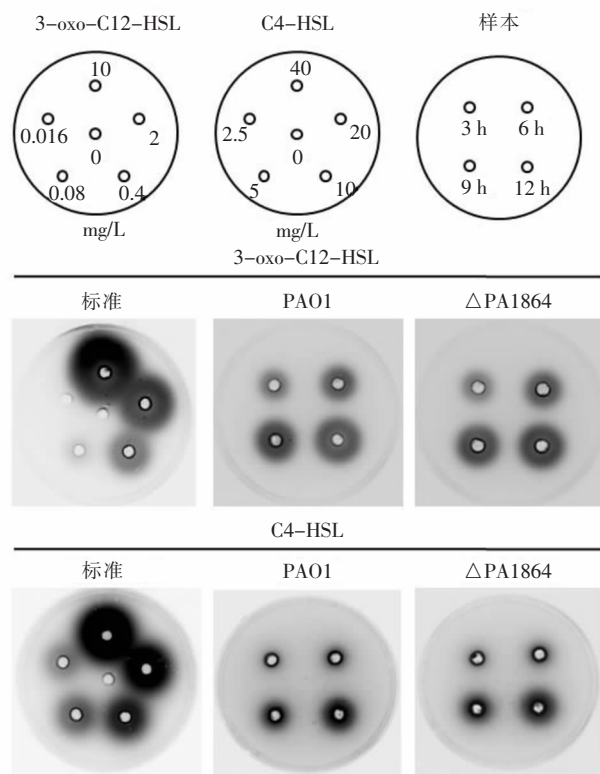
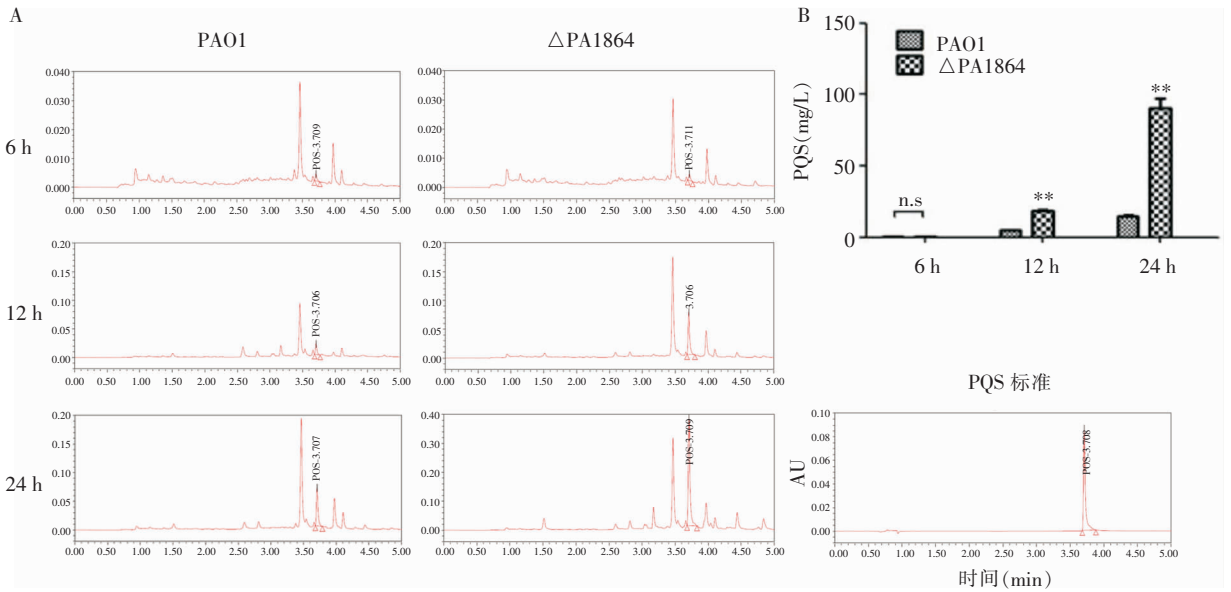


图 6 报告菌株平板法检测 AHL 信号分子合成情况  
Figure 6 Synthesis of AHL signal molecule detected by strain plate method

### 3 讨论

PA1864 基因是 PA 的一个未知功能基因, 位于 PA 基因组负义链上 (2023281~2023931), 编码基因长度为 648 bp, 基因编码蛋白由 216 个氨基酸组成, 分子量为 23.9 KDa。本研究使用的 ΔPA1864 菌株为课题组前期构建保存。构建方法是采用融合 PCR 方法获得含有四环素抗性基因的打靶片段, 基因测序证实融合成功后, 利用 Red 同源重组系统使



A: HPLC 检测 PQS 信号分子峰图; B: HPLC 检测后 PQS 信号分子含量计算结果; \* \*:  $P < 0.01$ ; n. s.: 与 PAO1 组相比差异无统计学意义

图 7 HPLC 法检测 PQS 信号分子合成情况

Figure 7 Synthesis of P QS signal molecule detected by high performance liquid chromatography

基因靶片段与目的基因发生同源重组,从而实现 PA1864 基因的原位敲除<sup>[10]</sup>。菌株构建后通过交叉 PCR 方法鉴定证实 ΔPA1864 菌株构建成功。

研究比较野生菌株 PAO1 与敲除菌株 ΔPA1864 对急性肺感染小鼠致病性的差异,发现与 PAO1 感染组相比,ΔPA1864 感染组的小鼠死亡率下降,肺部水肿和炎症细胞浸润降低,提示 PA1864 基因敲除可抑制 PA 急性感染。PA1864 基因敲除后 PA 的细胞抑制率明显下降,并且可抑制细菌感染诱导的细胞凋亡,提示 PA1864 基因敲除会导致 PA 细胞毒性下降,说明 PA1864 基因敲除在体内和体外环境中均可导致 PA 致病性下降。

细菌的致病性与其毒力密切相关。为进一步评价 PA1864 基因敲除对 PA 毒力因子/蛋白的分泌及泳动能力的影响,对 PA 分泌性毒力因子/蛋白和细菌泳动能力进行检测。PA 毒力相关表型检测发现,PA1864 基因敲除对 PA 绿色荧光素和分泌性弹性蛋白酶的合成及分泌无明显影响,但是可以抑制 PA T3SS 蛋白(如 ExoS 和 PerV)表达及泳动能力,可以促进 PA 绿脓素的分泌。尽管 PA 绿脓素分泌水平在 PA1864 基因敲除后有所上升,但由于绿脓素主要在细菌培养的中晚期产生,且其主要与 PA 的长期慢性感染相关。因此,推测 PA1864 基因敲除引起的绿脓素产量增加在 PA 的急性期感染中并

不起主要作用。T3SS 是加剧 PA 急性期感染最关键的毒力系统,PA1864 基因敲除后引起的 T3SS 下降很可能是导致 ΔPA1864 菌株急性期感染致病性及细胞毒性降低的关键。

QS 系统是细菌密度依赖性的基因调控系统,其可通过细菌分泌的化学信号分子彼此感知、交流、相互协调,与细菌的毒力及环境适应性密切相关。当 3-oxo-C12-HSLs、C4-HSLs 和 PQS 信号分子与其相应的转录调节因子 LasR、RhlR 和 PqsR 结合后可形成复合物,该复合物可通过调节 PA 毒力因子/蛋白合成相关基因,从而调节 PA 的毒力<sup>[11]</sup>。据报道,PA 多种毒力表型与 QS 系统调节有关,如弹性蛋白酶的分泌主要受 las 系统正向调节<sup>[12]</sup>,绿脓素的合成受 rhl、pqs 系统正向调节<sup>[13-14]</sup>,T3SS 可受 pqs 系统和 rhl 系统负向调节<sup>[15]</sup>。为探讨 PA1864 基因敲除对 PA QS 系统的影响,采用信号分子报告平板法分别检测 PAO1 和 ΔPA1864 细菌培养上清中 3-oxo-C12-HSL(las 系统)和 C4-HSL(rhl 系统)信号分子的含量,结果表明,PA1864 基因敲除对 PA las 及 rhl 系统无明显影响;采用 HPLC 检测 pqs 系统 PQS 信号分子合成情况,发现 PA1864 基因敲除可引起 PA 的 pqs 系统信号分子合成明显上调,与文献<sup>[11-14]</sup>报道一致。本组试验结果发现,PA1864 基因敲除可引起 pqs 系统上调的



同时,伴随 T3SS 的抑制和绿脓素合成的增加。因此,我们推测 PA1864 基因很可能是通过 pqs 系统影响 PA 毒力相关表型,从而最终影响 PA 的致病性,但其相关假设仍需进一步验证。

PA 是医院感染的重要病原体,在一般情况下不致病,但当患者机体免疫力低下、长期应用糖皮质激素/免疫抑制剂、肿瘤放射治疗、化学治疗、手术创伤以及侵入性诊疗后<sup>[2]</sup>,往往可造成致命性打击。PA 在环境中具有极强的适应性,且难以清除,与其具有庞大和复杂的调节调控网络密切相关。PA 毒力除受 QS 系统调节外,还受双组分调节系统(two-component regulatory systems, TCSs)、环二鸟苷酸(cyclic diguanylate, c-di-GMP)等多种因素及途径调节。本研究针对未知基因 PA1864 在 PA 急性感染中的毒力及致病性进行初步研究,并发现 PA1864 基因可能作为一种转录调节因子参与基因表达调节,但 PA1864 基因介导的具体调节机制以及与其他调节因素和途径的关联尚未深入,仍有待后续研究。

#### [参考文献]

[1] Bédard E, Prévost M, Déziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings[J]. *Microbiologyopen*, 2016, 5(6): 937-956.

[2] 文细毛,任南,吴安华,等. 2016 年全国医院感染监测网手术下呼吸道感染现患率调查[J]. *中国感染控制杂志*, 2018, 17(8): 653-659.

[3] 任南,文细毛,吴安华. 2014 年全国医院感染横断面调查报告[J]. *中国感染控制杂志*, 2016, 15(2): 83-87.

[4] Tognon M, Köhler T, Gdaniec BG, et al. Co-evolution with *Staphylococcus aureus* leads to lipopolysaccharide alterations in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ISME J*, 2017, 11(10): 2233-2243.

[5] Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(4): 1159-1168.

[6] Gilchrist FJ, Belcher J, Jones AM, et al. Exhaled breath hydrogen cyanide as a marker of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis[J]. *ERJ Open Res*, 2015, 1(2). pii: 00044-2015.

[7] Balasubramanian D, Schnepfer L, Kumari H, et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(1): 1-20.

[8] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(1): 26-41.

[9] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 959-964.

[10] 余华,熊浚智,何晓梅,等. 采用 Red 重组系统敲除铜绿假单胞菌弹性蛋白酶基因[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(2): 129-137.

[11] Francis VI, Stevenson EC, Porter SL. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2017, 364(11). doi: 10.1093/femsle/fnx104.

[12] Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, et al. Role of quorum sensing in bacterial infections[J]. *World J Clin Cases*, 2015, 3(7): 575-598.

[13] Lundgren BR, Thornton W, Dornan MH, et al. Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(9): 2087-2100.

[14] Welsh MA, Eiberger NR, Moore JD, et al. Small molecule disruption of quorum sensing cross-regulation in *Pseudomonas aeruginosa* causes major and unexpected alterations to virulence phenotypes[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(4): 1510-1519.

[15] 孔伟娜,梁海华,沈立新,等. 铜绿假单胞菌中Ⅲ型分泌系统受 Rhl 和 PQS 群体感应系统调节[J]. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1158-1164.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:张鸿,胥志敏,陈炜,等. PA1864 基因敲除对铜绿假单胞菌毒力及致病性的影响[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(6): 465-473. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20195327.

Cite this article as: ZHANG Hong, XU Zhi-min, CHEN Wei, et al. Effect of PA1864 gene knockout on virulence and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chin J Infect Control*, 2019, 18(6): 465-473. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20195327.