

研究报告

空肠弯曲菌 Cia 效应蛋白参与黏附侵袭细胞和激活炎性细胞因子的研究

武金亮^{1,2}, 崔一芳², 郭芳芳², 胡格^{*1}, 徐福洲^{*2}

1 北京农学院 动物科学技术学院, 北京 102206

2 北京市农林科学院 畜牧兽医研究所 畜禽疫病防控技术北京市重点实验室, 北京 100097

武金亮, 崔一芳, 郭芳芳, 胡格, 徐福洲. 空肠弯曲菌 Cia 效应蛋白参与黏附侵袭细胞和激活炎性细胞因子的研究[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 679-689.

WU Jinliang, CUI Yifang, GUO Fangfang, HU Ge, XU Fuzhou. *Campylobacter jejuni* Cia effectors are involved in adhesion and invasion of host cells and activation of inflammatory cytokines[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 679-689.

摘要:【背景】空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是世界范围内最重要的食源性病原菌之一, 在家禽盲肠内通常共生定殖, 成为感染人的主要来源, 目前该菌在家禽肠道内的定殖机制尚未阐明。【目的】探究空肠弯曲菌不同效应蛋白在参与黏附侵袭肠上皮细胞、免疫细胞及激活炎性细胞因子中的作用, 解析该菌在鸡肠道内定殖的机制, 为其防控提供潜在的作用靶标。【方法】首先利用同源重组技术构建空肠弯曲菌 NCTC 11168 菌株不同效应蛋白 CiaB、CiaC、CiaD 和 CiaI 的基因缺失突变株, 测定突变株对细菌生物膜形成和自身凝集能力的影响, 进而测定突变株对肠上皮细胞 Caco-2 的黏附和侵袭能力, 以及对鸡巨噬细胞系 HD11 的侵袭能力, 最后利用 RT-qPCR 鉴定突变株感染 HD11 细胞对炎性细胞因子表达的影响。【结果】构建空肠弯曲菌不同效应蛋白 CiaB、CiaC、CiaD 和 CiaI 的基因缺失突变株; Δ ciaD 突变株生物膜形成能力降低, Δ ciaC、 Δ ciaD 和 Δ ciaI 突变株自身凝集能力增强; Δ ciaB 突变株黏附侵袭 Caco-2 细胞能力增强, 而 Δ ciaC、 Δ ciaD 和 Δ ciaI 突变株黏附侵袭 Caco-2 以及侵袭 HD11 细胞能力均显著降低; 空肠弯曲菌感染 HD11 显著提高不同炎性细胞因子表达水平, Δ ciaB、 Δ ciaC 和 Δ ciaD 突变株显著降低不同炎性因子表达水平, 而 Δ ciaI 突变株显著增强不同炎性因子表达水平。【结论】空肠弯曲菌不同 Cia 效应蛋白在黏附侵袭肠上皮细胞、免疫细胞及激活炎性细胞因子表达中发挥不同的作用, 本研究为解析空肠弯曲菌与宿主肠道上皮相互作用机制提供了理论依据, 并为该菌的防控提供了潜在靶标。

关键词: 空肠弯曲菌; Cia 效应蛋白; 黏附; 侵袭; 炎性细胞因子

资助项目: 北京市农林科学院创新能力建设专项(KJCX20220422); 北京市农林科学院畜牧兽医研究所改革与发展基金(XMS202408)

This work was supported by the Special Program on Science and Technology Innovation Capacity Building of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20220422), and the Research and Development Foundation of Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (XMS202408).

*Corresponding authors. E-mail: HU Ge, bnhuge@126.com; XU Fuzhou, fuzhouxu@163.com

Received: 2024-08-30; Accepted: 2024-10-24; Published online: 2024-11-16

Campylobacter jejuni Cia effectors are involved in adhesion and invasion of host cells and activation of inflammatory cytokines

WU Jinliang^{1,2}, CUI Yifang², GUO Fangfang², HU Ge^{*1}, XU Fuzhou^{*2}

1 Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

2 Beijing Key Laboratory for Prevention and Control of Infectious Diseases in Livestock and Poultry, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: [Background] *Campylobacter jejuni*, one of the major foodborne pathogens worldwide, can colonize the cecum of poultry, becoming the main source of infection in humans. Currently, the mechanism of *C. jejuni* colonization in avian intestine has not been elucidated. [Objective] To investigate the roles of different Cia effectors of *C. jejuni* in the adhesion and invasion of intestinal epithelial cells and immune cells, as well as the activation of inflammatory cytokines, thus elucidating the mechanism of *C. jejuni* colonization in chicken intestine and providing potential targets for the prevention and control of this pathogen. [Methods] Firstly, homologous recombination was employed to construct gene knockout mutants of different effectors (CiaB, CiaC, CiaD, and CiaI) of the wild-type strain (WT, *C. jejuni* NCTC 11168). The effects of *cia* knockout on the biofilm formation and autoagglutination were determined. Subsequently, the adhesion and invasion of *cia* mutants on intestinal epithelial cell line Caco-2, as well as their invasion in the chicken macrophage line HD11, were determined. Finally, RT-qPCR was employed to determine the expression levels of inflammatory cytokines in HD11 cells infected by the mutants. [Results] The *cia* gene knockout mutants of *C. jejuni* were successfully constructed. Compared with WT, Δ *ciaD* showed reduced biofilm formation, while Δ *ciaC*, Δ *ciaD*, and Δ *ciaI* demonstrated enhanced autoagglutination. The mutant Δ *ciaB* showcased enhanced adhesion and invasion of Caco-2 cells, while Δ *ciaC*, Δ *ciaD*, and Δ *ciaI* exhibited reduced abilities to adhere and invade Caco-2 cells and invade HD11 cells. The infection of HD11 cells by *C. jejuni* WT significantly up-regulated the expression levels of different inflammatory cytokines, while Δ *ciaB*, Δ *ciaC*, and Δ *ciaD* showed down-regulated expression levels of different inflammatory cytokines. In contrast, Δ *ciaI* presented up-regulated expression levels of different inflammatory cytokines. [Conclusion] Different Cia effectors of *C. jejuni* play different roles in the adhesion and invasion of intestinal epithelial cells and immune cells, as well as the activation of inflammatory cytokine expression. The findings provided a theoretical basis for understanding the interaction mechanism between *C. jejuni* and host intestinal epithelium, and mining potential targets for the prevention and control of this bacterium.

Keywords: *Campylobacter jejuni*; Cia effector; adhesion; invasion; inflammatory cytokine

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是最常见的食源性病原细菌之一, 在世界范围内广泛流行^[1]。该菌感染家畜出现腹泻、母畜流产等临床表现^[2]; 感染家禽后在肠道内共生定殖,

通常不会引起任何临床症状,通过家禽或制品等途径传播,成为人感染的主要来源^[3]; 感染者引发自限性胃肠炎、腹泻、腹痛及发热,且与人体自身免疫性疾病如 Guillain-Barré 综合征等密切相关^[4]。为降低该菌感染人的风险,通常认为降低家禽肠道内带菌量是最有效的途径,虽然也尝试疫苗、抗体、益生菌、噬菌体、有机酸、天然活性物质等多种途径,但尚未找到生产中可有效实施的措施^[5-8]。目前认为,空肠弯曲菌在家禽肠道内生长和定殖的机制尚不明确,特别是定殖家禽肠道内与上皮及免疫细胞作用激活炎症和免疫反应的机制尚未解析^[3,9],成为研制其防控策略的主要障碍,因而解析该菌在家禽肠道内定殖的机制对其防控具有重要意义。

研究显示,细菌可通过不同类型分泌系统释放效应蛋白(bacterial effector),直接注入宿主细胞内,调控细胞炎症和免疫功能,促进细菌在宿主体内生长和定殖,在细菌与宿主互作过程中发挥重要作用^[10-12]。空肠弯曲菌自身没有 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS),但可通过其独特的鞭毛 III 型分泌系统(flagella type III secretion system, FT3SS)分泌效应蛋白,注入宿主细胞内,参与该菌与宿主细胞的互作^[13]。目前鉴定的空肠弯曲菌效应蛋白包括弯曲菌入侵抗原(*Campylobacter* invasion antigen, Cia)、鞭毛共表达决定簇(flagellar co-expressed determinants, Feds)、鞭毛样蛋白(flagellin-like protein, FlaC)以及鞭毛分泌蛋白(flagellar secreted protein A, FspA)等几种^[13],其中 Cia 是空肠弯曲菌中最早鉴定的效应蛋白,主要包括 CiaB、CiaC、CiaD 和 CiaI 等 4 种,目前研究显示这些效应蛋白参与细菌入侵、细胞内信号传导、细胞骨架重排、肠道内定殖等多种功能^[14-19]。

空肠弯曲菌黏附细胞是通过 FT3SS 注入效

应蛋白的结构基础,而侵袭细胞的能力受到效应蛋白与细胞内靶蛋白结合、启动信号传导、导致细胞骨架重排等一系列级联反应的影响^[20]。

目前研究显示, CiaB 缺失突变后空肠弯曲菌侵袭 INT-407 细胞的能力显著降低^[14]; FlaC 缺失突变后空肠弯曲菌侵袭 Hep-2 细胞的能力也显著降低^[21]。然而目前空肠弯曲菌效应蛋白参与家禽细胞黏附侵袭及激活炎症和免疫反应尚未见报道。

本试验通过构建空肠弯曲菌 Cia 效应蛋白基因缺失突变株,鉴定不同 Cia 效应蛋白在黏附侵袭宿主细胞以及激活炎性因子表达中的作用,以期解析空肠弯曲菌在家禽肠道中定殖的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

空肠弯曲菌参考菌株 NTCT 11168,中国疾病预防控制中心张茂俊博士惠赠;鸡巨噬细胞系 HD11,北京市农林科学院畜牧兽医研究所王晶博士惠赠;人肠上皮细胞系 Caco-2 由本实验室保存;质粒 pCE2 TA/Blunt-Zero 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

弯曲菌培养用 Mueller-Hinton (MH)培养基, Oxoid 公司;细胞培养用 DMEM 培养基和 1640 培养基及胎牛血清, Gibco 公司。DNA/RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及分子生物学试剂,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。三气培养箱和细胞计数仪, Thermo Fisher 公司;电击仪和荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司;多功能酶标测定仪, Bio-Tek 公司。

1.3 细菌培养

空肠弯曲菌培养参考文献[22]的方法,接种 MH 肉汤或琼脂平板,于 42 °C 三气培养箱(5%

O₂、10% CO₂ 和 85% N₂)中培养。

1.4 构建突变株所用引物的设计

针对 4 个 Cia 效应蛋白基因(*ciaB/C/D/I*), 设计第一对引物(F1/R1)用于扩增该基因及其两侧的同源臂片段, 第二对引物(F2/R2)用于反向 PCR 扩增, 敲除目的基因。引物序列如表 1 所示, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5 构建基因缺失突变株

空肠弯曲菌 Cia 效应蛋白基因缺失突变株构建流程如图 1 所示。首先利用 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit-BOX2 试剂盒抽提 NCTC 11168 基因组 DNA 为模板, 利用引物对

表 1 构建 Cia 效应蛋白基因缺失突变株的引物信息

Table 1 Primers information for construction of Cia effectors mutant

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
CiaB F1	ATCCCTTGGTGGGACTTTCT
CiaB R1	TCCCAAATCTGCACAAATCA
CiaB F2	<u>AACTCGAG</u> TGTAAGTTCTAAGGCGGGCA
CiaB R2	<u>AGGTCGAC</u> TCCGCCACATCTTCTTTGTC
CiaC F1	GTTGTGGGGCTCAATTTGTT
CiaC R1	GGCTTCCGAAAAATCCTATT
CiaC F2	<u>AACTCGAG</u> TATACAAATCAATCAAAACTC
CiaC R2	<u>AGGTCGAC</u> TTTCTCCTCCTTTATTTAAC
CiaD F1	AGTGGCGCAATAGAAACGAT
CiaD R1	CTCTCAAAGCCGAAAACCTG
CiaD F2	<u>AACTCGAG</u> TCCCGATTTACAGTTTATCG
CiaD R2	<u>AGGTCGAC</u> CATATTTTTATCAACCACCTT
CiaI F1	CATAGGCTCCCCAACTACCC
CiaI R1	CCCAAACGAATCTTCTCCA
CiaI F2	<u>AACTCGAG</u> TCTTTACGCTTAAATCATATAAT
CiaI R2	<u>AGGTCGAC</u> TTCTTCCCCTTATATTTATAGT
Chl F	<u>TGCTCGAG</u> TTTAAGGGCACCAATAAC
Chl R	<u>AGGTCGAC</u> AAATACCTGTGACGGAAGA

序列中下划线表示添加的 *Xho* I 和 *Sal* I 酶切位点。
The underlined sequences indicates the added restriction enzymes of *Xho* I and *Sal* I.

F1/R1 扩增效应蛋白基因及上下游同源臂, 将扩增片段克隆入质粒 pCE2 TA/Blunt-Zero 中, 以重组质粒 DNA 为模板, 利用反向引物对 F2/R2 进行 PCR 扩增^[22], 敲除目的基因, 扩增产物经 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后, 与同样双酶切的氯霉素抗性基因连接。参照文献^[22]方法, 抽提含氯霉素抗性基因重组质粒 DNA 15 μg, 以 2.5 kV、200 Ω、25 μF 电击条件转化入 NCTC 11168 感受态菌株中, 涂布于无抗性 MH 琼脂平板, 三气培养箱中培养 5 h, 洗下菌体涂布于含氯霉素(6 μg/mL)的 MH 平板上, 三气培养箱中 42 °C 培养 2-4 d 后挑取单菌落进行 PCR 和测序鉴定。

1.6 生物膜形成能力试验

参考文献^[23]的方法测定空肠弯曲菌不同效应蛋白缺失突变对生物膜形成能力的影响。将空肠弯曲菌 WT 和突变株于 42 °C 三气培养箱 (5% O₂、10% CO₂、85% N₂) 中培养过夜至对数生长后期, 调整 OD₆₀₀ 至 0.1, 加入 200 μL 菌液于 96 孔聚苯乙烯培养板中, 置三气培养箱中 42 °C 培养 24 h, 弃去菌液后用 PBS 洗涤, 100 μL 甲醇固定后加入 100 μL 1% 结晶紫染色液, 染色洗涤后室温干燥, 加入 100 μL 33% 冰乙酸溶液溶解结晶紫, 利用多功能酶标测定仪测定 OD₅₉₀ 吸光值。

1.7 细菌自身凝集试验

参考文献^[24]的方法测定空肠弯曲菌不同效应蛋白缺失突变对自身凝集能力的影响。将空肠弯曲菌 WT 和突变株培养至对数生长后期, 调整 OD₆₀₀ 至 0.1, 取 2 mL 菌悬浮液加入培养试管中, 42 °C 微需氧条件下孵育 24 h, 吸取 1 mL 上层菌液混匀后测定 OD₆₀₀ 值。最后计算不同菌株 OD₆₀₀ 值占 WT 菌株 OD₆₀₀ 平均值的百分比, 百分比值低的菌株表示凝集能力强。

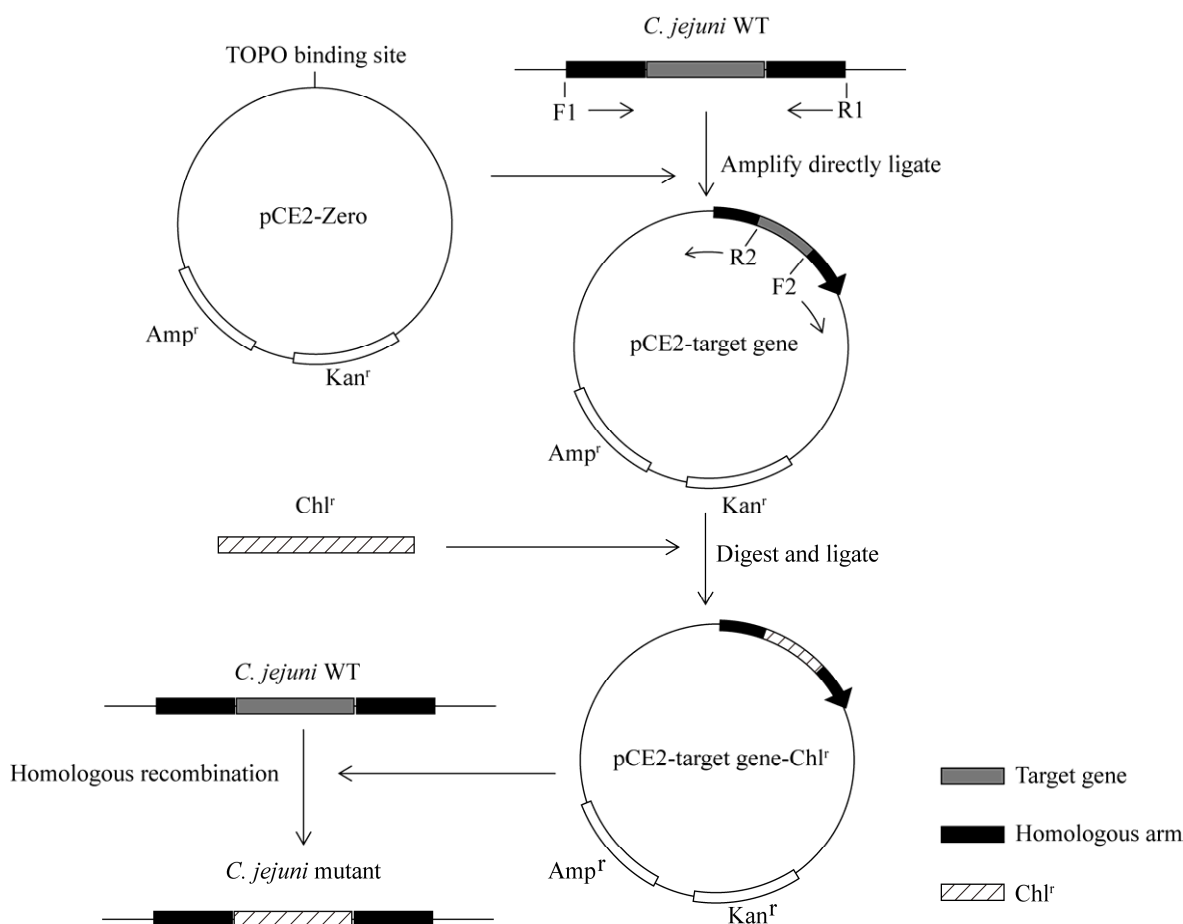


图 1 空肠弯曲菌效应蛋白基因缺失突变株构建流程

Figure 1 Diagram for construction of Cia effectors gene knockout mutants of *C. jejuni*.

1.8 黏附侵袭细胞试验

空肠弯曲菌 WT 和 Cia 效应蛋白基因缺失突变株黏附侵袭 Caco-2 上皮细胞的试验参照文献[23]进行, 即将生长良好的 Caco-2 细胞接种于 6 孔细胞板, 培养至细胞单层约 80% 时, 将处于对数生长期(约 10^8 CFU/mL)的空肠弯曲菌培养液经离心(室温, 12 000 r/min, 2 min)洗涤后, 重悬于含 1% FBS 的 DMEM 培养液中, 按照 MOI 约为 100 接种细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 3 h, 经 PBS 洗涤和 Triton X-100 裂解后, 涂布 MH 平板(WT)或含 6 μg/mL 氯霉素 MH 平板(突变株), 细菌计数结果为黏附量和侵袭量之和。为测定侵袭量, 在同样条件下细菌感染

Caco-2 细胞并经 PBS 洗涤后, 利用 250 μg/mL 庆大霉素杀灭细胞外细菌, 进而利用 Triton X-100 裂解细胞, 通过平板计数细菌侵袭量。由于鸡巨噬细胞系 HD11 主要以悬浮培养形式存在, 因而在测定空肠弯曲菌黏附侵袭 HD11 细胞时, 仅按照上述方法测定细菌侵袭量。

1.9 RT-qPCR

为测定不同 Cia 效应蛋白对细菌感染鸡巨噬细胞 HD11 后激活炎性细胞因子表达的影响, 设计不同炎性细胞因子 qPCR 引物(表 2), 利用 RT-qPCR 测定不同炎性细胞因子表达量的变化, 即使用生长良好的 HD11 细胞, 经细胞计数后加入 MOI 约为 100 的空肠弯曲菌, 37 °C、5%

表 2 炎性细胞因子引物信息

Table 2 Primer information for inflammatory cytokines

Primer	Sequence (5'→3')
iNOS F	TTGAGCATTGTTGGCCAAGGC
iNOS R	AAACTGCACAGACTGTTGGC
IL-1 β F	GTGAGGCTCAACATTGCGCTGTA
IL-1 β R	TGTCCAGGCGGTAGAAGATGAAG
IL-6 F	AAATGCCTGACGAAGCTCTC
IL-6 R	ACTCGACGTTCTGCTTTTCG
CxCLi1 F	ACCTCACTGCAAGAATGTGG
CxCLi1 R	TCTGCCTTGTCCAGAATTGC
CxCLi2 F	ATGGAAGAGAGGTGTGCTTGG
CxCLi2 R	GTGGTGCATCAGAATTGAGCTG
IL-10 F	AGTCATCAGCAGAGCATGGG
IL-10 R	TCTGCTTGATGGCTTTGCTC
GAPDH F	TGCTGGCATTGCACTGAATG
GAPDH R	TCAAGTCCACAACACGGTTG

CO₂ 培养箱内孵育 4 h, 洗涤后收集细胞, 利用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit 抽提细胞总 RNA, 然后用 HiScript III RT SuperMix for qPCR 将 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 分别利用 qPCR 引物检测。qPCR 反应体系: 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, cDNA 1 μ L, 不同炎性细胞因子上下游引物对 F/R (10 μ mol/L) 0.4 μ L (表 2), 加 ddH₂O 补足 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。利用计算的 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 值比较效应蛋白基因缺失突变株与 WT 之间的差异。每个样品设置 3 个重复, 并重复 3 次。

1.10 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 数据以平均数 \pm 标准差进行统计, 采用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *cia* 缺失突变株的鉴定

利用不同效应蛋白基因引物对 F1/R1 和氯

霉素抗性基因引物对 ChIF/R (表 1) 分别对空肠弯曲菌 WT 和效应蛋白基因缺失突变株进行 PCR 扩增, 通过扩增产物鉴定突变株。结果显示, 利用 2 个引物对分别进行 PCR 扩增结果均与预期相符(图 2), 即引物对 F1/R1 自 WT 中扩增出包含效应蛋白基因的片段, 而突变株中扩增出氯霉素抗性基因替换效应蛋白基因的片段; 引物对 ChIF/R 自 WT 中无扩增产物, 而突变株中均扩增出氯霉素抗性基因片段。证实空肠弯曲菌效应蛋白 Δ *ciaB*、 Δ *ciaC*、 Δ *ciaD* 和 Δ *cial* 基因缺失突变株构建成功。

2.2 *cia* 缺失突变对细菌生物膜形成和自身凝集的影响

生物膜形成能力比较结果显示, Δ *ciaD* 基因缺失突变株较 WT 显著降低, 而其他突变株与 WT 相比无显著差异(图 3A)。细菌自身凝集结果显示, Δ *ciaC*、 Δ *ciaD* 和 Δ *cial* 基因缺失突变株自身凝集能力较 WT 显著增强, Δ *ciaB* 基因缺失突变株与 WT 相比无显著差异(图 3B)。

2.3 *cia* 缺失突变对细菌黏附侵袭细胞的影响

空肠弯曲菌 WT 和不同 *cia* 缺失突变株对 Caco-2 细胞黏附侵袭结果显示, WT 黏附量和侵袭量分别约为 10⁷ CFU/mL 和 10⁴ CFU/mL; Δ *ciaB* 突变株黏附量和侵袭量分别约为 10^{7.5} CFU/mL 和 10⁵ CFU/mL, 显著高于 WT; 而 Δ *ciaC*、 Δ *ciaD* 和 Δ *cial* 突变株黏附量和侵袭量分别约为 10⁶ CFU/mL 和 10³ CFU/mL, 显著低于 WT (图 4A、4B)。

空肠弯曲菌 WT 和不同 *cia* 缺失突变株对 HD11 细胞侵袭量测定呈现类似的结果, 即 WT 和 Δ *ciaB* 突变株侵袭量约为 10⁶ CFU/mL, 两者之间无显著差异, 而 Δ *ciaC*、 Δ *ciaD* 和 Δ *cial* 突变株侵袭量约为 10⁵ CFU/mL, 显著低于 WT (图 4C)。

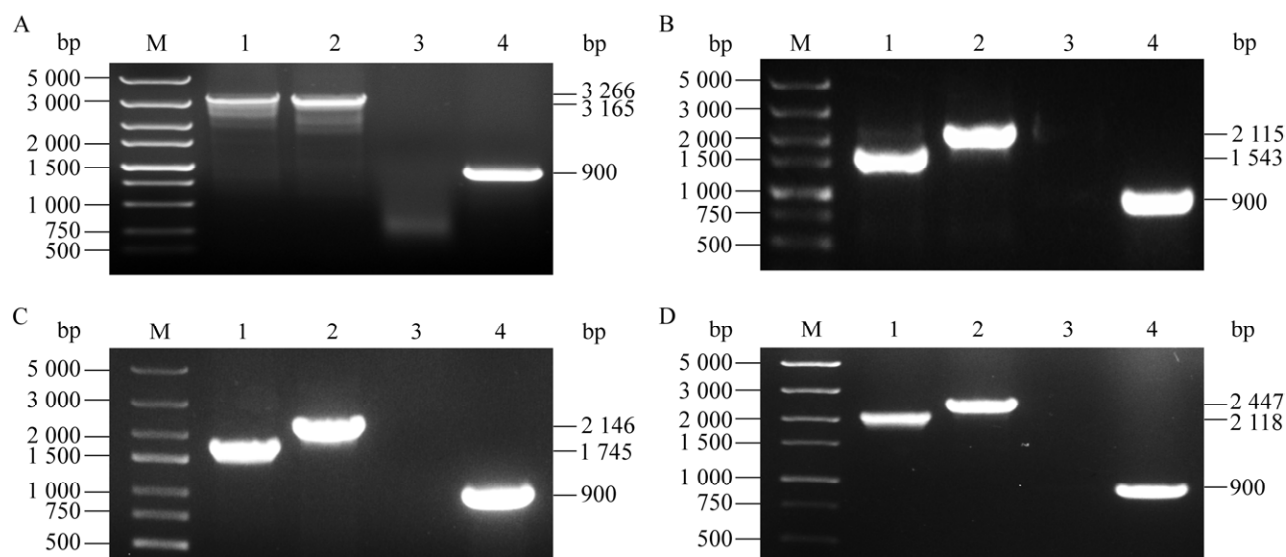


图2 *cia* 基因缺失突变株 PCR 鉴定结果 A: *ciaB*; B: *ciaC*; C: *ciaD*; D: *ciaI*。M: DNA marker; 1 和 3: WT 为模板; 2 和 4: 突变株为模板。1 和 2: 引物对 F1/R1 扩增效应蛋白基因片段; 3 和 4: 引物对 ChIF/R 扩增氯霉素抗性基因。

Figure 2 PCR amplification for identifying *cia* gene knockout mutants of *C. jejuni*. A: *ciaB*; B: *ciaC*; C: *ciaD*; D: *ciaI*. M: DNA marker; 1 and 3: Parental strain using as PCR template; 2 and 4: Mutant strains using as PCR template. 1 and 2: The *cia* gene fragments amplified by primer pairs F1/R1; 3 and 4: The chloramphenicol resistant gene fragment amplified by primer pairs ChIF/R.

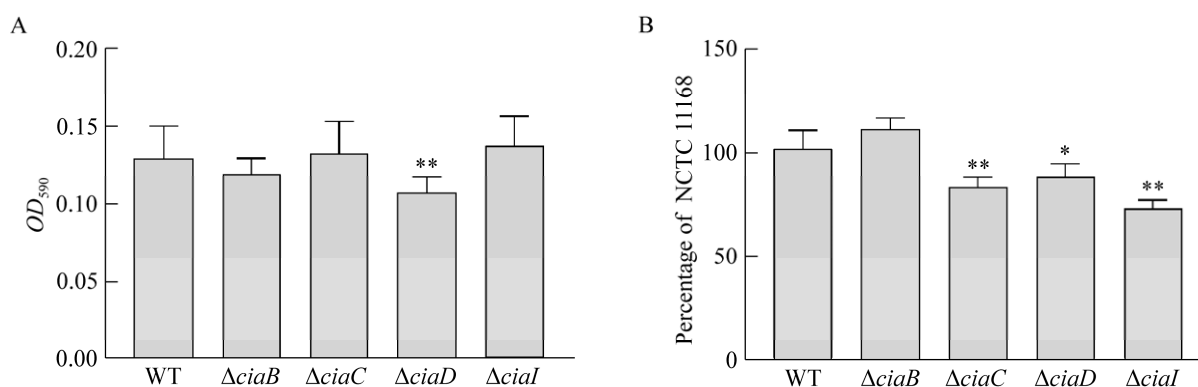


图3 *cia* 缺失突变影响细菌生物膜形成(A)及自身凝集(B)的测定结果

Figure 3 Effects of *cia* deletion mutants on biofilm formation (A) and autoagglutination (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.4 *cia* 缺失突变对 HD11 表达炎性细胞因子的影响

空肠弯曲菌 WT 和不同 *cia* 缺失突变株感染 HD11 细胞后, 检测不同炎性细胞因子转录

水平的差异。以未感染 HD11 细胞作为对照, 不同菌株感染后各个炎性因子的相对表达差异倍数计算结果如图 5 所示。结果显示, WT 菌株感染 HD11 后不同炎性因子表达水平均显著

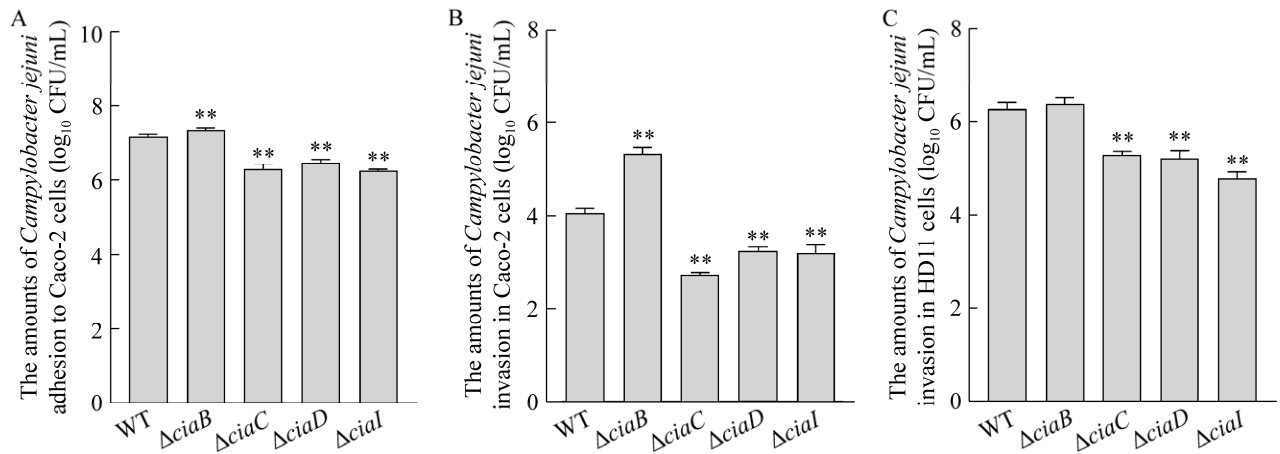


图4 *cia* 缺失突变影响细菌黏附侵袭 Caco-2 和 HD11 细胞的测定结果 A: 细菌对 Caco-2 细胞黏附量测定结果; B: 细菌对 Caco-2 细胞侵袭量测定结果; C: 细菌对 HD11 细胞侵袭量测定结果。

Figure 4 Effects of *cia* deletion mutants on adhesion and invasion of Caco-2 and HD11 cells. A: Adhesion results of Caco-2 by *C. jejuni*; B: Invasion results of Caco-2 by *C. jejuni*; C: Invasion results of HD11 by *C. jejuni*. **: $P < 0.01$.

升高,其中 IL-1 β 、Cxcli-1 和 Cxcli-2 升高 19.4、11.4 和 9.5 倍,而 iNOS、IL-6 和 IL-10 仅升高 2–3 倍;不同效应蛋白基因缺失突变后,炎症因子表达水平出现显著变化,Δ*ciaB*、Δ*ciaC* 和 Δ*ciaD* 菌株与 WT 相比,除个别因子外(iNOS 中 WT 为 2.3 倍,而 Δ*ciaB* 为 3.0 倍),呈现显著降低的变化,特别是 Δ*ciaB* 和 Δ*ciaD* 菌株的 IL-1 β 、Cxcli-1 和 Cxcli-2 较 WT 极显著降低(如 IL-1 β 、Δ*ciaB* 和 Δ*ciaD* 菌株由 WT 的 19.4 倍降至 2.4 倍和 1.5 倍);另外,Δ*ciaI* 菌株与未感染对照相比,所有测定因子均呈显著升高的变化,特别是 IL-1 β 、Cxcli-1 和 Cxcli-2 分别升高 70.5 倍、44.8 倍和 22.0 倍。

3 讨论

细菌通过不同类型分泌系统分泌效应蛋白,直接注入宿主细胞内,与细胞内蛋白结合,激活细胞信号通路,抑制较强的炎症和免疫反应,为该菌的生长和定殖提供适宜的环境^[10-12]。空肠弯曲菌利用 FT3SS 分泌效应蛋白,同样注

入宿主细胞内,参与该菌入侵细胞、与细胞内蛋白结合、激活信号通路、导致细胞骨架重排等反应,影响该菌在肠道内生长和定殖^[13-20]。目前空肠弯曲菌效应蛋白研究主要集中于与人源肠上皮细胞的相互作用,而作用于家禽细胞的研究尚未见报道,本试验探究效应蛋白参与家禽免疫细胞侵袭和激活炎症细胞因子的反应,对深入解析该菌在鸡肠道内的定殖机制将具有重要意义。

空肠弯曲菌通过生物膜形成和自身凝集,可在菌体周围形成屏障,逃避宿主炎症和免疫反应,是该菌在宿主肠道内定殖的重要策略^[25-26]。目前研究认为,群体感应(quorum sensing, QS)相关基因是影响该菌生物膜形成和自身凝集的最主要因素^[25-26];研究也显示,空肠弯曲菌 T6SS 效应蛋白 Hcp1 参与生物膜的形成^[27]。目前尚未见 Cia 效应蛋白参与空肠弯曲菌生物膜形成和自身凝集的报道。本试验结果显示, Cia 效应蛋白对生物膜形成影响较小,仅 *ciaD* 缺失降低生物膜形成能力;而 *ciaC*、*ciaD* 和 *ciaI* 缺

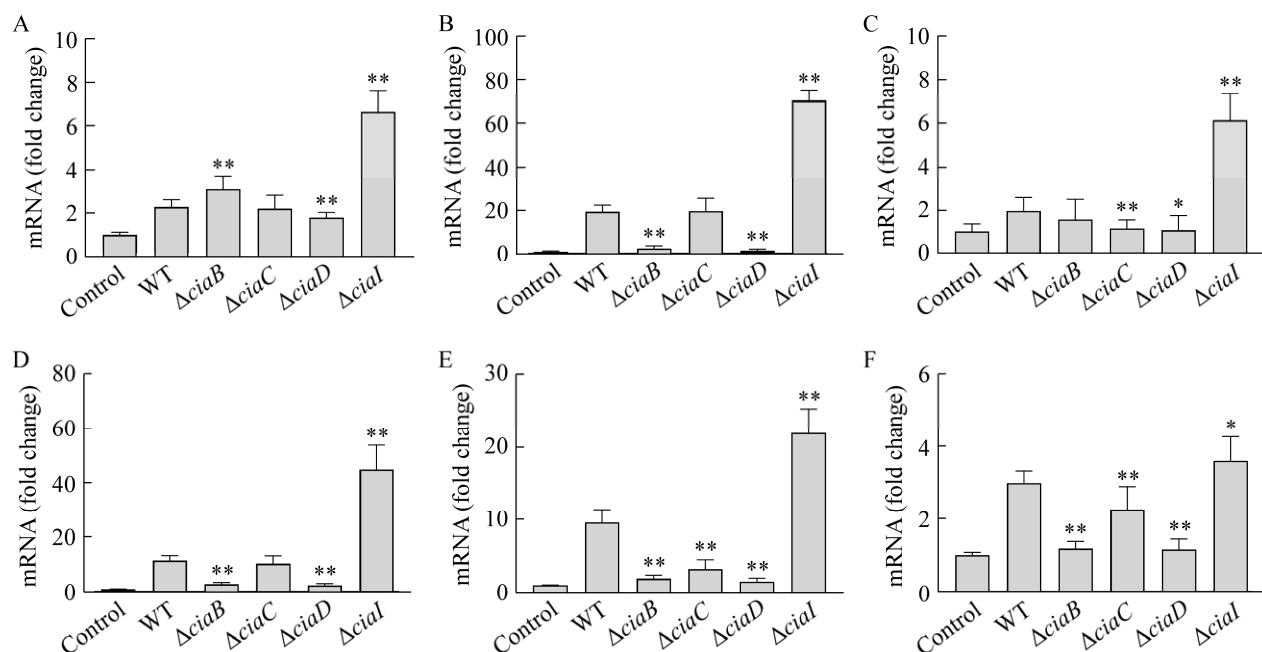


图 5 RT-qPCR 检测 *cia* 缺失突变影响 HD11 表达炎性细胞因子的结果

Figure 5 Effects of *cia* deletion mutants on inflammatory cytokines expression of HD11 by RT-qPCR. A: iNOS; B: IL-1 β ; C: IL-6; D: Cxcli-1; E: Cxcli-2; F: IL-10. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

失可增强自身凝集能力，但具体影响的机制尚不清楚。

空肠弯曲菌通过鞭毛运动与宿主细胞接触，表达黏附素 CadF 和 FliA 与细胞纤维连接蛋白(fibronectin)结合，进而分泌效应蛋白，激活细胞信号通路，引起细胞骨架重排和膜皱缩，促进细菌的侵袭^[20]。研究显示，*ciaB* 和 *ciaC* 缺失突变对人 INT407 上皮细胞的黏附无影响，但可显著降低侵袭能力^[14,16]；*CiaD* 同样参与侵袭细胞，作用机制显示其可取代 RacGAP1 与宿主蛋白 IQGAP1 特异性结合，导致骨架重排，促进空肠弯曲菌侵袭^[19]；*CiaI* 介导空肠弯曲菌形成含弯曲菌囊泡(*Campylobacter*-containing vacuole, CCV)，提高该菌在细胞内存活能力^[15]。本试验结果显示，*ciaC*、*ciaD* 和 *ciaI* 缺失突变后显著降低对 Caco-2 细胞的侵袭能力，与文献报道一致，但黏附能力也出现显著降低，同时 *ciaB* 缺失突变

后空肠弯曲菌黏附侵袭 Caco-2 细胞能力显著升高，与发表文献^[16]存在差异，这种差异是否与空肠弯曲菌菌株、宿主细胞、培养条件等不同造成尚未可知，需要进一步深入探究。

细菌效应蛋白进入宿主细胞后，可与靶蛋白结合激活细胞信号通路，调控炎性细胞因子的表达^[10-12]。研究显示，空肠弯曲菌 *CiaD* 可激活人上皮细胞中 MAP 激酶信号通路分子 p38 和 Erk1/2，促进细菌侵袭和炎性因子 IL-8 的分泌^[28]；利用猪肠道感染模型同样证实 *ciaD* 缺失后炎症反应减弱，IL-8 分泌减少^[29]。空肠弯曲菌感染人巨噬细胞 THP-1 可诱导细胞凋亡和 IL-1 β 的分泌，而 *ciaB* 缺失突变会降低该活性^[30]。目前尚未见 *Cia* 效应蛋白影响鸡巨噬细胞表达炎性因子的研究。本试验结果显示，空肠弯曲菌感染 HD11 显著提高不同炎性细胞因子表达水平，*ciaB*、*ciaC* 和 *ciaD* 缺失突变显著降低不

同炎症因子表达水平, 而 *ciaI* 缺失突变显著增强不同炎症因子表达水平, 其中的作用机制尚不清楚。

4 结论

本试验结果显示, 空肠弯曲菌 *Cia* 效应蛋白参与该菌黏附侵袭宿主细胞以及激活炎症细胞因子等功能, 并且不同的效应蛋白发挥的效应存在显著差异, 提示效应蛋白进入宿主细胞后通过不同的机制发挥作用。总体上, 本研究为解析空肠弯曲菌与宿主肠道上皮互作提供理论基础, 对该菌的防控提供潜在靶标。

REFERENCES

- [1] FACCIOLÀ A, RISO R, AVVENTUROSO E, VISALLI G, DELIA SA, LAGANÀ P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention[J]. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 2017, 58(2): E79-E92.
- [2] HEREDIA N, GARCÍA S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 250-255.
- [3] AL HAKEEM WG, FATHIMA S, SHANMUGASUNDARAM R, SELVARAJ RK. *Campylobacter jejuni* in poultry: pathogenesis and control strategies[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2134.
- [4] FINSTERER J. Triggers of Guillain-Barré syndrome: *Campylobacter jejuni* predominates[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 14222.
- [5] JOHNSON TJ, SHANK JM, JOHNSON JG. Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 487.
- [6] CUI YF, ZHU JJ, LI PX, GUO FF, YANG B, SU X, ZHOU HZ, ZHU K, XU FZ. Assessment of probiotic *Bacillus velezensis* supplementation to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in chickens[J]. *Poultry Science*, 2024, 103(8): 103897.
- [7] WANG CW, ZHOU HZ, GUO FF, YANG B, SU X, LIN J, XU FZ. Oral immunization of chickens with *Lactococcus lactis* expressing *cjaA* temporarily reduces *Campylobacter jejuni* colonization[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(6): 366-372.
- [8] CUI YF, GUO FF, GUO J, CAO XY, WANG HW, YANG B, ZHOU HZ, SU X, ZENG XM, LIN J, XU FZ. Immunization of chickens with the enterobacter conjugate vaccine reduced *Campylobacter jejuni* colonization in the intestine[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 747.
- [9] AWAD WA, HESS C, HESS M. Re-thinking the chicken-*Campylobacter jejuni* interaction: a review[J]. *Avian Pathology*, 2018, 47(4): 352-363.
- [10] SANCHEZ-GARRIDO J, RUANO-GALLEGO D, CHOUDHARY JS, FRANKEL G. The type III secretion system effector network hypothesis[J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(6): 524-533.
- [11] LARA-TEJERO M. The type III secretion system sorting platform[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2020, 427: 133-142.
- [12] SCOTT NE, HARTLAND EL. Post-translational mechanisms of host subversion by bacterial effectors[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2017, 23(12): 1088-1102.
- [13] BURNHAM PM, HENDRIXSON DR. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(9): 551-565.
- [14] KONKEL ME, KIM BJ, RIVERA-AMILL V, GARVIS SG. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(4): 691-701.
- [15] BUELOW DR, CHRISTENSEN JE, NEAL-MCKINNEY JM, KONKEL ME. *Campylobacter jejuni* survival within human epithelial cells is enhanced by the secreted protein CiaI[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(5): 1296-1312.
- [16] CHRISTENSEN JE, PACHECO SA, KONKEL ME. Identification of a *Campylobacter jejuni*-secreted protein required for maximal invasion of host cells[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(4): 650-662.
- [17] BARRERO-TOBON AM, HENDRIXSON DR. Identification and analysis of flagellar coexpressed determinants (Feds) of *Campylobacter jejuni* involved in colonization[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(2): 352-369.
- [18] NEAL-MCKINNEY JM, KONKEL ME. The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012, 2: 31.
- [19] NEGRETTI NM, GOURLEY CR, TALUKDAR PK, CLAIR G, KLAPPENBACH CM, LAURITSEN CJ, ADKINS JN, KONKEL ME. The *Campylobacter jejuni* CiaD effector co-opts the host cell protein IQGAP1 to promote cell entry[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1339.
- [20] KEMPER L, HENSEL A. *Campylobacter jejuni*: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(9): 2725-2754.
- [21] SONG YC, JIN S, LOUIE H, NG D, LAU R, ZHANG Y, WEERASEKERA R, AL RASHID S, WARD LA, DER SD, CHAN VL. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 541-553.
- [22] DAVIS L, YOUNG K, DiRITA V. Genetic manipulation of *Campylobacter jejuni*[J]. *Current Protocols in Microbiology*, 2008, 10(1): 8A.2.1-8A.2.17.

- [23] 郭家卉, 崔一芳, 李鹏祥, 申学阳, 曹晓亚, 马洪海, 郭芳芳, 丁保安, 徐福洲. 不同宿主源弯曲菌黏附侵袭肠上皮细胞及在鸡肠道内定殖的比较[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5150-5158.
GUO JH, CUI YF, LI PX, SHEN XY, CAO XY, MA HH, GUO FF, DING BA, XU FZ. Comparison on adhesion and invasion to intestinal epithelial cells and chicken intestine colonization of *Campylobacter* strains from different hosts[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5150-5158 (in Chinese).
- [24] FIELDS JA, LI JQ, GULBRONSON CJ, HENDRIXSON DR, THOMPSON SA. *Campylobacter jejuni* CsrA regulates metabolic and virulence associated proteins and is necessary for mouse colonization[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0156932.
- [25] TIKHOMIROVA A, McNABB ER, PETTERLIN L, BELLAMY GL, LIN KH, SANTOSO CA, DAYE ES, ALHADDAD FM, LEE KP, ROUJEINIKOVA A. *Campylobacter jejuni* virulence factors: update on emerging issues and trends[J]. Journal of Biomedical Science, 2024, 31(1): 45.
- [26] PÜNING C, SU YL, LU XN, GÖLZ G. Molecular mechanisms of *Campylobacter* biofilm formation and quorum sensing[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2021, 431: 293-319.
- [27] NOREEN Z, JOBICHEN C, ABBASI R, SEETHARAMAN J, SIVARAMAN J, BOKHARI H. Structural basis for the pathogenesis of *Campylobacter jejuni* Hcp1, a structural and effector protein of the Type VI Secretion System[J]. The FEBS Journal, 2018, 285(21): 4060-4070.
- [28] SAMUELSON DR, EUCKER TP, BELL JA, DYBAS L, MANSFIELD LS, KONKEL ME. The *Campylobacter jejuni* CiaD effector protein activates MAP kinase signaling pathways and is required for the development of disease[J]. Cell Communication and Signaling, 2013, 11: 79.
- [29] NEGRETTI NM, YE YY, MALAVASI LM, POKHAREL SM, HUYNH S, NOH S, KLIMA CL, GOURLEY CR, RAGLE CA, BOSE S, LOOFT T, PARKER CT, CLAIR G, ADKINS JN, KONKEL ME. A porcine ligated loop model reveals new insight into the host immune response against *Campylobacter jejuni*[J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1-25.
- [30] SIEGESMUND AM, KONKEL ME, KLENA JD, MIXTER PF. *Campylobacter jejuni* infection of differentiated THP-1 macrophages results in interleukin 1 beta release and caspase-1-independent apoptosis[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 3): 561-569.