

# 志贺氏菌福氏 2a 301 株 *ipaH4.5* 突变株的构建及生物学功能分析

王芳<sup>1,2</sup> 赵江丽<sup>1</sup> 何湘<sup>1</sup> 姜铮<sup>1</sup> 刘大伟<sup>1</sup> 陈宣楠<sup>1</sup> 袁静<sup>1\*</sup> 黄留玉<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院疾病预防控制中心 北京 100071)

(2. 解放军第 309 医院 北京 100091)

**摘要:** 利用  $\lambda$ -Red 重组系统对福氏 2a 志贺氏菌 301 株 *ipaH4.5* 基因进行缺失突变, 构建了福氏 2a 志贺氏菌 301 株 *ipaH4.5* 基因缺失突变株  $\Delta ipaH4.5$ , 利用低拷贝质粒构建 *ipaH4.5* 缺失突变株的回复突变株  $\Delta ipaH4.5HF$ 。PCR 方法证实了 *ipaH4.5* 基因的缺失和回复。对野生株、突变株和回复突变株的生长代谢及细胞侵袭能力进行比较; ELISA 方法检测 3 株菌侵袭鼠 J774 巨噬细胞后培养上清中炎症因子的水平。生长代谢实验表明缺失和回复 *ipaH4.5* 不影响志贺氏菌的生长速度, 侵袭实验表明缺失和回复 *ipaH4.5* 也不影响志贺氏菌对 HeLa 细胞和鼠 J774 巨噬细胞的侵袭能力, 表明 *ipaH4.5* 基因与志贺氏菌的生长代谢和侵袭能力无关; 鼠 J774 巨噬细胞培养上清中细胞因子水平的改变提示该基因在志贺氏菌侵入细胞后抑制宿主细胞炎症反应。

**关键词:** 福氏志贺氏菌, *ipaH4.5*, 基因缺失, 生物学功能, 侵袭实验

## Construction and Function Analysis of the *ipaH4.5* Gene Deletion Mutant of *Shigella flexneri* 2a Strain 301

WANG Fang<sup>1,2</sup> ZHAO Jiang-Li<sup>1</sup> HE Xiang<sup>1</sup> JIANG Zheng<sup>1</sup> LIU Da-Wei<sup>1</sup>  
CHEN Xuan-Nan<sup>1</sup> YUAN Jing<sup>1\*</sup> HUANG Liu-Yu<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Disease Prevention and Control, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

(2. No. 309<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China)

**Abstract:** A  $\gamma$ -Red recombination system was used to construct an *ipaH4.5* deletion mutant of *S. flexneri* 2a 301. A recovery mutant was obtained by introducing a low-copy plasmid strain. PCR analysis confirmed that *ipaH4.5* was successfully deleted in the mutant and restored in the complementary strain. The growth curves of wild-type, deletion mutant and recover mutant were measured. Some biochemical tests were investigated. Invasion tests were performed to evaluate the virulence of these three strains. Quantities of cytokines in the culture supernatants of murine macrophages cell line J774 after being infected was measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). No significant difference of growth rates and basic biochemical events were observed among three strains, and no difference in invasion ability was observed either. However, More IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were observed in murine macrophages infected with

\* 通讯作者: 袁静: Tel: 86-10-66948434; ✉: yuanjing6216@163.com

黄留玉: Tel: 86-10-66948301; ✉: huangly@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2009-10-17; 接受日期: 2010-03-03

deletion mutant than wild type and recover mutant. So we conclude that *ipaH4.5* can inhibit inflammation response of the host after *Shigella flexneri* 2a 301 enter into the cell.

**Keywords:** *Shigella flexneri* 2a, *IpaH4.5* gene, Gene deletion, Biological function, Invasion assay

志贺氏菌感染人的肠道引起细菌性痢疾, 其致病性依赖于 III 型分泌系统<sup>[1]</sup>。志贺氏菌的 III 型分泌系统由毒力大质粒上 31 kb 的区域编码, 其编码蛋白构成 III 型分泌系统。志贺氏菌在与宿主上皮细胞接触后, 激活 III 型分泌系统, 向宿主细胞释放效应子蛋白, 这些效应子蛋白能使细胞皱膜、改变肌动蛋白骨架、激活宿主细胞信号通路、诱导巨噬细胞凋亡等。福氏志贺氏菌 III 型分泌系统分泌大约 20 多个效应子蛋白<sup>[1]</sup>, 其中 IpaA、IpaB、IpaC、IpaD 能介导细菌侵袭宿主细胞, 使用基因工程技术, 构建非极性突变的 *ipaABCD* 突变子, 试验证明 *ipaA*、*ipaB*、*ipaC*、*ipaD* 3 个基因中任何一个基因缺失, 均可导致志贺氏菌侵袭力的丧失<sup>[2]</sup>, IpaH4.5 作为志贺氏菌 III 型分泌系统分泌的效应子蛋白, 它在志贺氏菌致病过程中的功能尚不清楚。为此, 本研究利用  $\lambda$  噬菌体 Red 重组系统成功缺失了志贺氏菌福氏 2a 301 株的 *ipaH4.5* 基因, 同时构建回复突变株, 对野生株、突变株、回复突变株的生长代谢和侵袭力进行比较研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 志贺氏菌福氏 2a 301 标准株购自中国药品生物制品检定所, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 购自 TaKaRa 公司。pMD18-T 质粒购自 TaKaRa 公司; pET-22 (b)购自 Novagen 公司; pKD46 (温度敏感型, 含有受阿拉伯糖启动子调控的 *exo*、*bet* 和 *gam* 基因, Ap<sup>r</sup>)、pKD4 (含有两端带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因, Km<sup>r</sup>)、pCP20 (温度敏感型, 编码能够识别 FRT 位点的 FLP 重组酶, Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>)由 Hilary M 实验室馈赠, pAK 质粒(低拷贝质粒, 仅含 p15A 质粒复制子和卡那霉素抗性基因, Km<sup>r</sup>)由本实验室自行构建。

**1.1.2 实验细胞:** 人宫颈癌上皮细胞 HeLa 细胞系和鼠 J774 细胞系为本实验室保存。

**1.1.3 主要试剂:** Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA 分子量标准、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒购自天根公司; 胶回

收试剂盒购自 Promega 公司; L-阿拉伯糖、氨苄青霉素、卡那霉素购自 Sigma 公司。BHI 培养基购自陆桥公司, 细菌生化鉴定试剂盒购自生物梅里埃公司; 胎牛血清、胰蛋白酶、氨苄青霉素和链霉素双抗和 1640、DMEM/F12 培养基购自 HyClone 公司。

1.2 突变株的构建

**1.2.1 引物设计:** 本研究所用引物的设计是根据 NCBI 上福氏 2a 志贺氏菌 301 株毒力大质粒 pCP301 全基因组序列(GenBank accession No. AF\_386526)中 *ipaH4.5* 基因及上、下游同源臂序列, 由 Primer Premier 5.0 分析软件完成的(表 1)。

表 1 引物列表 Table 1 List of primers		
引物 Primer	核酸序列 Sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction site
ipaH4.5F	ATGATTAAATCAACCAATATACAG	
ipaH4.5R	TCAGGCCAGTACCTCGTCAGTCA	
ipaH4.5N1	CGGGATCCGAAGCCGGTGCACAGGTGATGCG	BamH I
ipaH4.5N2	GCGTTCGACTTATTAACCCCTCACATTCATATC	Sal I
ipaH4.5C1	CCAAGCTTACCGCCCCGGGAATCCTGGAGAC	Hind III
ipaH4.5C2	CCCTCGAGCAGCCAGTCATCGCGCTGCGCACG	Xho I
ipaH4.5HF1	CGGGATCCATGATTAAATCAACCAATATACAG	BamH I
ipaH4.5HF2	GCGTTCGACTCAGGCCAGTACTCGTCAGTCA	Sal I
K1	GCGTTCGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Sal I
K2	CCAAGCTTATGGGAATTAGCCATGGTCC	Hind III

**1.2.2 构建长同源臂突变盒:** 用引物 K1、K2 扩增 pKD4 质粒两端带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因, 经 Sal I 和 Hind III 双酶切后, 与 pET-22b 载体连接, 验证正确后命名为 pETkan。用引物 ipaH4.5N1、ipaH4.5N2 扩增上游同源臂 H1, 经 BamH I 和 Sal I 双酶切后, 与 pETkan 载体连接, 将上游同源臂导入 pETkan 质粒上卡那霉素抗性基因上游 FRT 位点之前。同样方法扩增下游同源臂后导

入 pETkan 质粒上卡那霉素抗性基因下游 FRT 位点之后, 获得含有长同源臂突变盒的目的质粒。以目的质粒为模板, 使用引物 ipaH4.5N1 和 ipaH4.5C2 大量扩增上述构建的长同源臂突变盒, 获得高浓度的含有 FRT 位点及卡那霉素抗性基因的线性打靶 DNA 片段<sup>[5]</sup>。

**1.2.3 同源重组:** 将含有 pKD46 质粒的志贺氏菌 301 株于 30°C 培养至  $OD_{600}$  值为 0.4–0.6, 制备电转化感受态, 并在  $OD_{600}$  值达到 0.4–0.6 前 1 h 加入浓度为 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖, 诱导 Red 重组系统的表达。通过 PCR 扩增上述构建的长同源臂打靶 DNA 片段, 电击转化至含有 pKD46 的 301 株感受态细胞中(电击参数: 电阻 200  $\Omega$ , 电容 25  $\mu$ F, 电压 1.8 kV)。复苏 1–2 h 后, 涂布含卡那霉素抗性的 LB 平板, 30°C 培养 24 h, 长出的阳性克隆即为带有卡那霉素抗性的缺失突变株。将筛选到的阳性克隆转入液体 LB 培养基中, 42°C 培养 12 h 去除 pKD46 质粒, 获得含卡那霉素抗性的 301 $\Delta$ ipaH4.5::Kan 突变株。

**1.2.4 去除卡那抗性基因:** 将编码 FLP 位点特异性重组酶的 pCP20 转入突变菌株 301 $\Delta$ ipaH4.5::Kan, 在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上筛选阳性克隆, 转入无抗性的液体 LB 培养基中, 于 42°C 培养 12 h, 获得不含 pCP20 质粒且去除了卡那霉素抗性基因的 301 $\Delta$ ipaH4.5 突变株<sup>[3]</sup>。

### 1.3 回复突变株的构建<sup>[4]</sup>

设计包含 ipaH4.5 基因的引物 ipaH4.5HF1、ipaH4.5HF2 (表 1), 两端分别加上 BamH I 和 Sal I 酶切位点, PCR 扩增 ipaH4.5HF 片段, 双酶切 pMD-ipaH4.5HF 后与 pAK 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 构建 pAK-ipaH4.5HF 质粒, 转化到突变株 301 $\Delta$ ipaH4.5 感受态中, 在卡那霉素抗性的 LB 平板上长出的菌落即为回复突变株 301 $\Delta$ ipaH4.5HF<sup>[4]</sup>。

### 1.4 ipaH4.5 突变株、回复突变株分子水平验证

将抗性筛选得到的  $\Delta$ ipaH4.5 突变株、回复突变株阳性克隆转接到新的 LB 平板, 培养一定时间后, 刮取少量菌, 洗脱到无菌水中, 沸水浴中煮沸 10 min, 室温条件下 10000  $\times$  g 离心 2 min, 取上清 3  $\mu$ L 作为模板进行 PCR 鉴定。ipaH4.5N1 与 ipaH4.5C2 作为外部鉴定引物, ipaH45F 与 ipaH4.5R 作为内部鉴定引物, 以野生型 301 株的 DNA 和水作为对照进行 PCR 鉴定。

### 1.5 野生株、突变株与回复突变株生长曲线测定<sup>[5]</sup>

从 LB 平板上挑取 301 野生株、301 $\Delta$ ipaH4.5 突变株与 301 $\Delta$ ipaH4.5HF 回复突变株单菌落, 分别接种于 5 mL 相应抗性的液体 BHI 培养基中过夜培养, 以 1:100 转接于 100 mL 含相应抗性的液体 BHI 培养基中, 于 37°C 同步培养, 每隔 0.5 h 取样测定  $OD_{600}$  值。

### 1.6 野生株、突变株与回复突变株生化实验比较<sup>[5]</sup>

从新鲜的 BHI 刚果红培养平板上挑取几个大小接近的菌落, 转接至 5 mL 含 0.85% NaCl 的培养基中, 仔细混匀制成菌液浓度相当于  $10^8$  CFU/mL 均一的菌悬液, 然后用吸管将此菌悬液滴入全自动细菌鉴定培养板中, 将培养板放入 Walkaway-960 型全自动细菌生化与药敏鉴定仪, 按仪器说明书设置使用参数, 培养 1–2 d 后观察结果。

### 1.7 野生株、突变株与回复突变株细胞侵袭能力比较<sup>[6]</sup>

人宫颈癌上皮 HeLa 细胞用含有 10% 胎牛血清、 $10^5$  IU/mL 青链霉素的 1640 培养液在 37°C、饱和湿度和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 每天换 1 次培养液。鼠 J774 细胞用含有 10% 胎牛血清、 $10^5$  IU/mL 青链霉素的 DMEM/F12 培养液培养。当细胞长至 80% 覆盖度时, 用 0.25% 的胰酶消化液消化贴壁细胞, 进行传代培养。在感染前一天以无抗生素的培养基将细胞以  $5 \times 10^5$  个细胞/mL 的密度接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔加入 1 mL 细胞悬液, 置于 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 孵箱中培养 16 h 使细胞贴壁。将 301、301 $\Delta$ ipaH4.5 和 301 $\Delta$ ipaH4.5HF 以 200:1 的 MOI (Multiplicity of infection) 分别侵染 HeLa 细胞和鼠 J774 细胞, 感染的 24 孔板在室温下 1000 r/min 离心 5 min, 然后在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 共孵育 30、60、90 min, PBS 漂洗 3 遍, 洗去培养液中未黏附的细菌, 然后在含有 80 mg/L 庆大霉素的培养基中再孵育 30 min 来杀死胞外菌, PBS 漂洗 3 遍, 用 0.1% (V/V) 的 Triton X-100 裂解细胞, 释放出胞内菌, 将裂解液倍比稀释后涂 BHI 平板, 计算 CFU, 比较野生株、突变株和回复株入侵 HeLa 细胞和鼠 J774 巨噬细胞的能力。实验重复 3 次, 计算平均值。

### 1.8 野生株、突变株与回复突变株感染鼠 J774 细胞后培养上清中细胞因子检测<sup>[7]</sup>

有报道志贺氏菌 III 型分泌系统分泌的一些效应子能调节宿主天然免疫、抑制宿主炎症反应<sup>[8–9]</sup>, 为了探索 ipaH4.5 是否也能抑制炎症反应,

我们分别用  $\Delta ipaH4.5$  缺失突变株、野生株和回复突变株侵袭鼠 J774 细胞, 检测细胞培养上清中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌情况。

鼠 J774 细胞( $1 \times 10^6$ )在 6 孔板培养 16 h 形成单层细胞, 将 301、301 $\Delta ipaH4.5$  和 301 $\Delta ipaH4.5HF$  分别以 200:1 的 MOI 侵染细胞, 作用 2 h 后, 取细胞培养上清, 用 ELISA 试剂盒检测鼠 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的含量。实验重复 3 次, 计算平均值和标准差。SAS 8.0 软件处理数据, 采用定量资料方差分析方法和两两比较的  $t$  检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 301 $\Delta ipaH4.5$ 突变株和回复突变株的构建与验证

将 *ipaH4.5* 缺失突变株和回复突变株 37°C 培养过夜, 分别以 *ipaH4.5N1* 与 *ipaH4.5C2* 为外部引物、*ipaH4.5F* 与 *ipaH4.5R* 为内部引物进行 PCR 鉴定, 结果见图 1。如果突变株与回复突变株构建成功, 当用外部引物进行检测时, 野生株的扩增产物大小应为 2825 bp; 抗性基因替换目的基因后获得的突变株(301 $\Delta ipaH4.5::kan$  株)的扩增产物大小应为 2612 bp; 去除抗性基因后的突变株(301 $\Delta ipaH4.5$  株)以及回复突变株扩增产物大小应为 1100 bp。而且, 当使用内部引物进行检测时, 只有野生株与回复突变株为阳性结果(1725 bp); 当使用卡那霉素抗性基因的引物进行检测时, 由于 pAK 质粒含有卡那霉素抗性基因,  $\Delta ipaH4.5::kan$  株与回复突变株为阳性结果(1512 bp)。从图中可以看出, 电泳结果与预期结果一致, 说明 *ipaH4.5* 基因缺失突变株和回复突变株构建成功。

### 2.2 突变株、回复突变株与野生株生长状态的测定

观察野生株、突变株与回复突变株在 LB 和 BHI 固体培养基上均生长良好, 大小形态无明显差异。使用 BHI 液体培养基, 将野生株、突变株和回复突变株在 37°C 条件下同步培养, 每隔 30 min 测定 1 次菌液  $OD_{600}$  值, 绘制生长曲线, 结果如图 2 所示, 突变株和回复突变株的生长曲线与野生株基本一致。

### 2.3 突变株、回复突变株与野生株在生化水平上的比较

利用 Walkaway-960 型全自动细菌生化鉴定仪器来检测野生株、突变株和回复突变株在生化水平

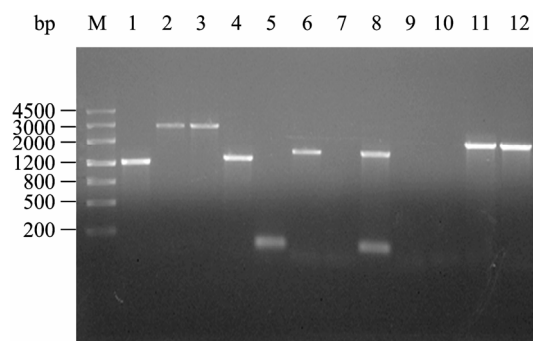


图 1 *ipaH4.5* 基因缺失突变株和回复突变株的 PCR 验证  
Fig. 1 PCR identification of *ipaH4.5* gene deletion mutant and recovery mutant

注: M: Marker; 1、5、9: 301 $\Delta ipaH4.5$  突变株; 2、6、10: 301 $\Delta ipaH4.5::kan$  突变株; 3、7、11: 301 野生株; 4、8、12: 301 $\Delta ipaH4.5$  回复突变株; 1-4: 外部引物; 5-8: 内部引物; 9-12: 卡那霉素抗性基因引物。

Note: M: Marker; 1,5,9: 301 $\Delta ipaH4.5$  mutant; 2,6,10: 301 $\Delta ipaH4.5::kan$  mutant; 3,7,11: 301 wide type; 4,8,12: 301 $\Delta ipaH4.5$  recovery mutant; 1-4: PCR products using external primers; 5-8: PCR products using internal primers; 9-12: PCR products using Kan primers.

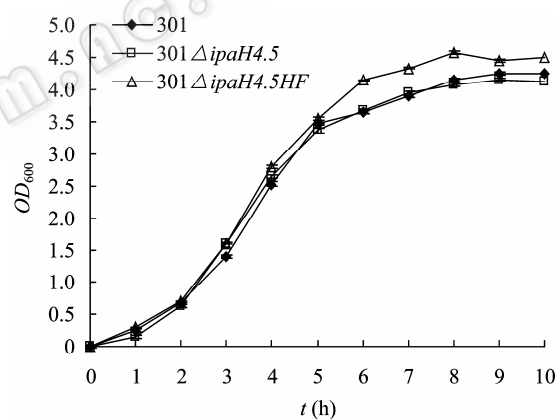


图 2 野生株、突变株与回复株的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of wild-type, mutant and recovery mutant strain

上的变化。结果表明突变株、野生株、回复突变株生化反应没有差异, 说明 *ipaH4.5* 基因对志贺氏菌生化代谢无影响。

### 2.4 突变株、回复突变株与野生株侵袭 HeLa 细胞能力比较

从图 3 可以看出, 在共孵育 30、60、90 min 后, 细胞内野生株、突变株和回复突变株的数量接近, 统计学分析无显著差异( $P > 0.05$ ), 说明 3 种菌株对 HeLa 细胞的侵袭力无差异。从图中还可以看出, 随着细菌和细胞共孵育时间的延长, 侵袭进入细胞内的细菌数量也在增加; 但是 60 min 以后, 细菌的

数量增加无显著差异( $P > 0.05$ ), 说明孵育 60 min 以后, 胞内的细菌数接近饱和。

## 2.5 突变株、回复突变株与野生株侵袭鼠 J774 细胞能力比较

从图 4 可以看出, 在共孵育 30、60、90 min 后, 细胞内野生株、 $\Delta ipaH4.5$  突变株和回复突变株的数量接近, 说明 3 种菌株对 J774 细胞的侵袭力也无差异( $P > 0.05$ )。

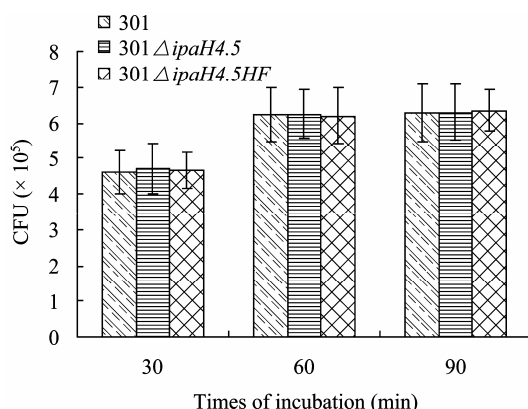


图 3 野生株、突变株和回复突变株对 HeLa 细胞侵袭能力比较

Fig. 3 Invasion ability into HeLa cell of wild-type strain, mutant strain and recovery mutant strain

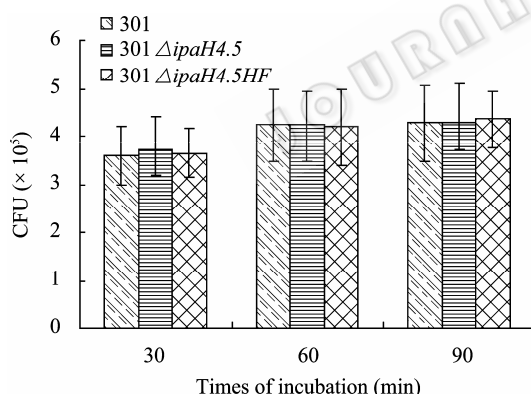


图 4 野生株、突变株和回复突变株对 J774 细胞侵袭能力比较

Fig. 4 Invasion ability into J774 cell of wild-type strain, mutant strain and recovery mutant strain

## 2.6 不同菌株感染鼠 J774 细胞后培养上清细胞因子检测

分别用野生株、 $\Delta ipaH4.5$  突变株和回复突变株侵袭鼠 J774 细胞, 作用 2 h 后, 检测细胞培养上清中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌情况, 结果见图 5、6。实验重复 3 次, 求平均值和标准差, 用 SAS 8.0 软件进

行单因素方差分析和  $t$  检验, 结果显示 3 组数据有显著性差异。突变株与野生株和回复突变株相比, 细胞培养上清中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量明显升高( $P < 0.05$ ), 而野生株与回复突变株相比, 两者无显著差异( $P > 0.05$ ), 说明志贺氏菌 *ipaH4.5* 基因能够抑制鼠 J774 细胞分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等炎症因子。

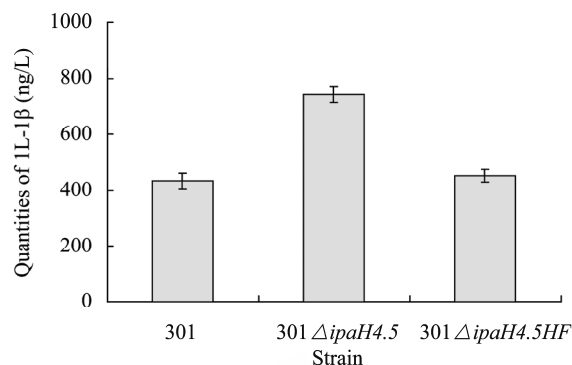


图 5 鼠 J774 细胞感染不同菌株后培养上清中 IL-1 $\beta$  ELISA 检测结果

Fig. 5 Quantities of IL-1 $\beta$  in the culture supernatants of infected murine macrophages cell J774 by ELISA

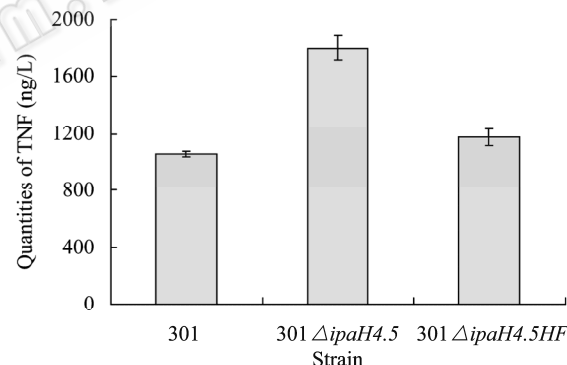


图 6 鼠 J774 细胞感染不同菌株后培养上清中 TNF- $\alpha$  ELISA 检测结果

Fig. 6 Quantities of TNF in the culture supernatants of infected murine macrophages cell J774 by ELISA

## 3 讨论

(1) 基因敲除是研究细菌基因功能经典和有效的方法, 是功能基因组学研究中的一个重要技术平台。在病原微生物的基因功能和致病性研究中, 基因缺失或置换是经典有效的手段, 也是阐明微生物致病机理必不可少的方法之一。国内学者曾利用  $\lambda$ -Red 系统在福氏志贺氏菌中进行基因敲除工作, 但早期的实验表明重组效率较低。本研究通过反复摸索对  $\lambda$ -Red 进行了改进, 将同源臂延长至

500–600 bp, 较好地解决了重组效率较低的问题, 建立了相对稳定的用于志贺氏菌研究的基因敲除技术平台, 成功缺失了 *ipaH4.5* 基因<sup>[3–5]</sup>。在病原微生物基因功能研究中, 仅有突变株是不能满足要求的, 因为基因突变后, 如果下游基因的转录起始位点存在于上游的目的基因中, 就有可能导致其下游相邻特别是相近基因出现转录水平的改变, 导致极性突变发生, 造成突变株出现的表型不止是单个目的基因敲除产生的, 而是几个相邻基因缺失的共同结果。因此, 回复突变株的构建就变得很重要, 如果回复突变株能够恢复突变株的表型, 说明构建的突变株为非极性突变, 可以作为目的基因功能研究的有力工具。本研究中利用 pACYC184 质粒构建了能够在志贺氏菌内复制的 pAK 质粒, 用来构建志贺氏菌回复突变株。利用 PCR 技术对突变株和回复突变株的转录水平进行鉴定, 结果表明两株菌构建成功, 为接下来的基因功能的研究奠定基础。

(2) 分别将福氏志贺氏菌 2a 301 野生株、 $\Delta$ *ipaH4.5* 突变株和回复突变株进行预培养, 转接相同浓度的细菌至新鲜 BHI 培养基中, 每 30 min 测定  $OD_{600}$  值, 直至细菌到达生长的平台期。从体外培养的生长曲线中(图 2), 我们发现 3 个菌株的生长曲线并无显著差异, 培养 2 h 后, 细菌开始对数期生长, 大约在 8 h 后, 细菌生长到达平台期。说明在体外培养条件下, 志贺菌福氏 2a 301 株缺失 *ipaH4.5* 基因并不会影响细菌的生长。我们利用全自动细菌生化鉴定仪器, 对 3 株菌的生化表型进行研究, 结果表明, 野生株、突变株和回复突变株的生化表型没有差异, 说明缺失 *ipaH4.5* 也不影响志贺氏菌的代谢。

(3) 致病菌对宿主细胞的侵袭是它能够在宿主细胞内生存、繁殖、损伤宿主细胞的重要前提条件。志贺氏菌经胃肠屏障到达结肠后, 首先粘附到肠道粘膜表面的 M 细胞上, 通过 M 细胞转运到上皮下游巴组织, 在那里被巨噬细胞吞噬, 志贺氏菌引起巨噬细胞死亡, 从死亡的巨噬细胞中释放出来, 从结肠上皮细胞的基底面侵入细胞。志贺氏菌对细胞的侵袭力由毒力大质粒上的基因编码, 与侵袭相关的基因被命名为侵袭性蛋白抗原基因(*ipa*)。最早被发现与侵袭有关的基因是 *ipaBCD* 基因簇。研究表明灭活 *ipaB*、*ipaC*、*ipaD* 3 个基因中任何一个基因, 均可导致志贺氏菌侵袭力的丧失。现已证明 *ipaBCD*

是构成志贺氏菌 III 型分泌系统分泌器结构的蛋白, 在侵袭过程中发挥重要作用。*IpaH4.5* 作为志贺氏菌毒力大质粒编码的蛋白, 由志贺氏菌 III 型分泌系统分泌, 其功能目前还不清楚。

为研究志贺氏菌缺失 *ipaH4.5* 对细菌侵入宿主细胞能力的影响, 我们利用侵袭实验比较了野生株、 $\Delta$ *ipaH4.5* 突变株与回复突变株侵袭 HeLa 细胞和鼠 J774 细胞的能力。细胞侵袭实验又称为庆大霉素保护实验, 由于庆大霉素不能渗透穿过真核细胞的细胞膜, 只能杀死细胞外游离的细菌, 保护侵入细胞内的细菌, 因此可以通过裂解细胞来计数侵入细胞内的菌数, 这种实验被广泛应用于定量侵袭。我们计数不同菌株感染后 HeLa 细胞和鼠 J774 细胞内存活的细菌数, 发现野生株、 $\Delta$ *ipaH4.5* 突变株和回复突变株的侵袭能力无显著差异。

上述研究结果表明, 志贺氏菌缺失 *ipaH4.5* 基因既不影响它的生长和代谢, 也不影响对 HeLa 细胞和鼠 J774 细胞的侵袭能力, 提示 *IpaH4.5* 有可能在细菌侵入细胞以后发挥功能。

(4) 志贺氏菌在巨噬细胞和上皮细胞中复制, 向宿主细胞胞浆内释放诱导强烈炎症反应的物质——脂多糖(LPS, lipopolysaccharides)和肽聚糖(PGN, peptidoglycan), 最近的研究表明, 志贺氏菌从巨噬细胞的吞噬体逃逸进入胞浆, 在胞浆内释放 LPS, LPS 能够活化炎症反应通路, 使巨噬细胞释放炎症因子, 激活体内的炎症反应。研究表明, 细菌在侵入宿主细胞后, 为了自身存活, 首先采取各种策略抑制宿主细胞的天然免疫, 下调炎症反应。志贺氏菌在进化过程中获得了一些干扰宿主免疫反应的策略, 有研究报道志贺氏菌 III 型分泌系统分泌的效应子蛋白 OspG、OspF 和 *IpaH9.8* 具有下调炎症反应的功能<sup>[9–11]</sup>。*IpaH4.5* 与 *IpaH9.8* 同属于 *IpaH* 家族蛋白成员, 我们因此推测 *IpaH4.5* 可能也会影响宿主的炎症反应, 为了证实这一猜想, 我们利用 ELISA 方法检测了志贺氏菌野生株、*ipaH4.5* 突变株和回复突变株侵袭鼠 J774 细胞后培养上清中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的分泌水平。结果表明, 与突变株比较, 野生株与回复突变株感染能明显抑制鼠 J774 巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ , 说明 *IpaH4.5* 进入宿主细胞后能够抑制宿主细胞的天然免疫。本课题组成员进一步通过激光共聚焦和荧光素酶报道基因等实



验证明, IpaH 进入细胞后定位于细胞质和细胞核, IpaH4.5 能够抑制细胞内的 NF- $\kappa$ B 途径, 研究结果与本研究的结论一致: IpaH4.5 在志贺氏菌侵入细胞后抑制细胞的炎症反应, 并通过抑制细胞内的 NF- $\kappa$ B 途径抑制炎症反应, 其详细机制还有待进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 王芳, 袁静, 黄留玉. 志贺氏菌 III 型分泌系统研究进展. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(3): 215–218.
- [2] Me'nard R, Sansonetti P, Parsot C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J*, 1994(13): 5293–5302.
- [3] 葛堂栋, 冯尔玲, 晏本菊, 等. 痢疾杆菌酸抗性系统相关基因缺失突变体的构建. 生物技术通讯, 2005, 16(5): 488–490.
- [4] 卜歆, 朱力, 刘先凯, 等. 福氏 2a 志贺氏菌 2457T *HtpG* 蛋白诱导小鼠炎症反应. 微生物学报, 2008, 48(7): 1–6.
- [5] 张影, 朱力, 袁静, 等. 弗氏 2a 志贺氏菌 2457T 株 *ycd* 基因缺失突变株的构建. 生物技术通讯, 2005, 16(5): 488–490.
- [6] Zurawski DV, Mitsuata C, Mumy KL. OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. *Infect Immun*, 2006, 74(10): 5964–5976.
- [7] Fernandez-Prada CM, Hoover DL, Tall BD. *Shigella flexneri* IpaH7.8 facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3608–3619.
- [8] Arbibe L, Kim DW, Batsche E, et al. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat Immunol*, 2007, 8(1): 47–56.
- [9] Kim DW, Lenzen G, Page AL, et al. The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(39): 14046–14051.
- [10] Zurawski DV, Mitsuata C, Mumy KL, et al. OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. *Infect Immun*, 2006, 74(10): 5964–5976.
- [11] Okuda J, Toyotome T, Kataoka N. *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF (35) to modulate host immune responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 531–539.
- [12] 王芳, 马红芳, 何湘, 等. 福氏志贺菌 III 型分泌系统效应子 IpaH4.5 功能的初步研究. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(2): 120–123.

## 稿件书写规范

### 论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ , 不用大写  $X$ , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写  $s$ , 不用 *SD*。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用 *SE*。 $t$  检验用英文小写  $t$ 。 $F$  检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希文小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。