



研究报告

小肠结肠炎耶尔森菌对多粘菌素 B 的压力应答

赵彤 苏雅 孟娇 陈晶瑜*

中国农业大学食品科学与营养工程学院 食品质量与安全北京实验室 北京 100083

摘要:【背景】小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)是重要的人畜共患食源性病原菌。由于其生存环境与传染性生活方式,小肠结肠炎耶尔森菌暴露在各种生存压力中,而胞膜压力应答能力对维持其环境耐受性和毒力发挥着重要作用。【目的】探究小肠结肠炎耶尔森菌在胞膜压力应答中的调节机制。【方法】通过使用多粘菌素 B 破坏小肠结肠炎耶尔森菌细胞膜的稳定性,并从生长能力、运动能力、生物被膜形成能力以及相关基因表达的变化探讨 Rcs (Regulator of Capsule Synthesis) 系统对多粘菌素 B 产生的胞膜压力的应答。【结果】多粘菌素 B 引起的细胞胞膜压力抑制了小肠结肠炎耶尔森菌的运动和生物被膜形成能力;而阻断 Rcs 信号途径后,小肠结肠炎耶尔森菌的运动和生物被膜形成能力有所恢复。对 *flhC*、*hmsS*、*hmsT* 等关键下游表型基因的表达水平的分析结果表明 Rcs 双组分系统对由多粘菌素 B 诱导的胞膜压力作出响应,通过感知胞膜胁迫向胞内传递信号,积极地调控细菌增强对抗菌肽的抗性。【结论】明确了 Rcs 双组分系统在响应多粘菌素 B 压力胁迫中的特异性调控作用,加深了对小肠结肠炎耶尔森菌环境应答机制的认识。

关键词: 小肠结肠炎耶尔森菌, 多粘菌素 B, 胞膜压力, 压力应答, Rcs 双组分系统

Stress response of *Yersinia enterocolitica* to polymyxin B

ZHAO Tong SU Ya MENG Jiao CHEN Jingyu*

Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] *Yersinia enterocolitica*, an important food-borne zoonotic pathogen, is commonly exposed to cell envelope stresses due to its living environment and epidemic properties. The envelope stress responses of *Y. enterocolitica* play a very important role in maintaining its environmental tolerance and virulence. [Objective] Explore the role of *Y. enterocolitica* in regulation of cell envelope stress. [Methods] Polymyxin B was used to disrupt the cell membrane stability of *Y. enterocolitica*, and we explore the response of regulator of capsule synthesis (Rcs) system to the envelop stress by polymyxin B from the changes in growth, motility ability, biofilm formation ability and related gene expression of *Y. enterocolitica*. [Results] The cell membrane pressure caused by polymyxin B inhibited the motility and biofilm formation of *Y. enterocolitica*, which were restored after blocking the Rcs signaling pathway. The expression of genes regulated by Rcs system, such as *flhC*, *hmsS* and *hmsT*, were analyzed. The results

Foundation items: Beijing Natural Science Foundation (6202016); National Natural Science Foundation of China (31671830)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62737966; E-mail: chenjy@cau.edu.cn

Received: 01-12-2020; Accepted: 29-12-2020; Published online: 12-03-2021

基金项目: 北京市自然科学基金(6202016); 国家自然科学基金(31671830)

*通信作者: Tel: 010-62737966; E-mail: chenjy@cau.edu.cn

收稿日期: 2020-12-01; 接受日期: 2020-12-29; 网络首发日期: 2021-03-12

further confirmed the regulation of Rcs system in response to the membrane pressure induced by polymyxin B. After sensing the envelop stress signals, Rcs system could actively regulate gene expression and cause pleiotropic changes to improve the resistance of *Y. enterocolitica* to polymyxin B. **[Conclusion]** This study clarified the specific regulatory role of the Rcs system in response to membrane stress caused by polymyxin B, and will deepen the understanding of the environmental response mechanisms of *Y. enterocolitica*.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, polymyxin B, envelope stress, stress response, regulator of capsule synthesis (Rcs) phosphorelay system

小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)是一种典型的食源性致病菌,人感染后会引发耶尔森菌病,表现为胃肠道症状、呼吸和心血管系统受损,甚至能引起急性阑尾炎和败血症^[1-2]。在欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)的报告中,小肠结肠炎耶尔森菌被列为仅次于弯曲杆菌和沙门氏菌的第三大常见病原菌^[2]。小肠结肠炎耶尔森菌广泛分布于环境中,在土壤、水、动物和各种食品中均有检出,能在 4 °C 冰箱中生存,也能在真空包装的冷冻食品中生长和繁殖^[3-6],渗透压、pH、温度、光强度和营养供应等物理、化学和环境条件的变化使之暴露在各种生存压力中,这些变化均会威胁小肠结肠炎耶尔森菌的存活^[7-8]。

细胞胞膜(Cell Envelope)是革兰氏阴性细菌特有的结构屏障,由细胞内膜(Inner Membrane)、细胞外膜(Outer Membrane)及膜之间含有肽聚糖的粘性周质空间(Periplasm)组成^[9]。该结构不仅对细胞的结构完整性至关重要,而且还充当细菌与其周围环境相互作用的界面^[10]。细胞胞膜不是一个静态结构,而是会根据环境的变化进行主动重建^[11]。环境胁迫导致的膜损伤或者由自身膜组分的生物合成、组装及转运错误都会引起细胞胞膜压力(Cell Envelope Stress)^[12]。细胞胞膜压力应答(Envelope Stress Responses, ESRs)对于细菌尤其是病原菌的体外生存及毒力发挥尤为重要,细菌能感知胞膜损伤或缺陷并调节转录以减轻破坏性压力,这种环境应激能力通常由自身特定的双组分系统进行严格调控^[13]。

多粘菌素 B (Polymyxin B)是一种阳离子抗菌

肽类粘菌素,对革兰氏阴性菌具有较强的抗菌活性^[14]。多粘菌素的结构中含有氨基酸正电荷和肽环,该结构特点使多粘菌素与革兰氏阴性菌细胞外膜脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)有着高度的亲和性;通过与细胞外膜脂多糖分子的相互静电作用以及二价阳离子 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的竞争置换,多粘菌素 B 可破坏细胞外膜结构的稳定性,穿过细胞外膜到达周质空间与细胞内膜接触,从而与磷脂双分子层相结合形成孔洞,破坏细胞膜的通透性导致细胞膜紊乱的发生,使细胞内容物泄漏,进而导致菌体的死亡^[14]。

Rcs 系统是存在于肠杆菌中的非典型的双组分系统,在不同环境信号分子的作用下可以调控细菌的多种生命活动。该系统由 3 个核心蛋白组成,即跨膜传感器激酶 RcsC、跨膜蛋白 RcsD 和响应调节剂 RcsB,并且可以由外膜相关脂蛋白 RcsF 激活以响应压力^[15-16]。在渗透压、温度、pH、溶菌酶、细胞膜缺陷等多种环境信号分子的作用下,通过作用于鞭毛、生物被膜、毒力相关基因等多个靶标,进而调控运动、生物被膜形成、毒力等多种生命活动来启动应激调控^[17-19]。在细菌 Rcs 系统的研究中,可以发现 Rcs 系统在感受外界环境信号、调节自身基因表达方面发挥着重要作用,但是不同细菌中 Rcs 系统的调控模式存在差异。例如:在大肠杆菌中, Rcs 系统的突变导致菌株生物被膜形成能力有缺陷^[20];在植物软腐病原菌中, RcsB 的缺失导致细胞分裂和分化减慢^[21]。在 *Y. enterocolitica* 中, Rcs 双组分系统在胞膜压力应答中的调控机制在一定程度上是未知的。

本研究使用多粘菌素 B 破坏小肠结肠炎耶尔森菌细胞膜的稳定性,探究小肠结肠炎耶尔森菌应对胞膜压力时的调节机制。本研究有助于推动小肠结肠炎耶尔森菌环境应答机制的研究,完善对小肠结肠炎耶尔森菌中 Rcs 系统生理功能的认识,从而更好地控制小肠结肠炎耶尔森菌的传播和感染。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

Y. enterocolitica ATCC23715 (以下简称 Y.E ATCC23715),野生株,实验室保藏^[22-23]; Y.E- Δ rscB, Y.E ATCC23715 的 *rscB* 基因缺失突变株,实验室保藏^[22-23]。

1.1.2 主要试剂和仪器

多粘菌素 B,北京索莱宝科技有限公司;氯霉素(Chloramphenicol, CM)、头孢磺啉、三氯生、新生霉素,北京拜尔迪生物技术有限公司;罗丹明 123、N-苯基-1-萘胺(N-Phenyl-1-Naphthylamine, NPN),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RNA 提取试剂盒、RT-qPCR 试剂盒,北京全式金生物技术有限公司。

多功能酶标仪, BioTek 公司;梯度 PCR 仪, Eppendorf 公司;稳压稳流电泳, Bio-Rad 公司;凝胶成像系统, UVP 公司; NanoDrop, Thermo Fisher 公司;实时荧光定量 PCR 仪, Hoffmann-LaRoche 公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0;固体培养基加琼脂粉 20.0;如需氨苄青霉素抗性筛选,则添加氨苄青霉素至终浓度 100 μ g/mL。LNNS 培养基(g/L):胰蛋白胨 1.25,酵母提取物 0.625;半固体培养基需添加琼脂粉 0.07。CIN 选择性培养基(筛选 *Y. enterocolitica*):在 LB 培养基中添加终浓度为 15 μ g/mL 的头孢磺啉、终浓度为 4 μ g/mL 的三氯生和终浓度为 2.5 μ g/mL 的新生霉素。

1.2 方法

1.2.1 最小抑菌浓度的测定

参考文献[24]使用微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度。在 96 孔板除第一列每孔加入 100 μ L LNNS 培养基,将倍比稀释后浓度为 256 μ g/mL 的多粘菌素 B 吸取 200 μ L 加入第 1 孔,然后吸取 100 μ L 至第 2 孔,混匀后再吸取 100 μ L 至第 3 孔,连续倍比稀释至第 11 孔,并从第 11 孔吸取 100 μ L 弃去,第 12 孔作为不含药物的生长对照。用紫外可见分光光度计将培养过夜的小肠结肠炎耶尔森菌菌液调整 OD_{600} 为 0.10,将 OD_{600} 为 0.10 的小肠结肠炎耶尔森菌菌液用 LNNS 培养基按 1:100 稀释后,每孔加 100 μ L,吹吸混匀,密封后置 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱,18–24 h 后利用酶标仪判读结果,不同组别设置 3 组平行。

1.2.2 膜电位的测定

将生长到对数期(OD_{600} 约为 0.4 左右)的小肠结肠炎耶尔森菌菌液调整 OD_{600} 约为 0.50 后转接于含有终浓度为最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)的多粘菌素 B 培养基中,继续培养 1 h。菌液倒入无菌离心管,4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后重悬。吸取 200 μ L 细菌悬浮液加入到 96 孔板,加入 20 μ L 100 μ g/L 罗丹明 123,使其终浓度为 10 μ g/mL,用多功能酶标仪间隔 10 min 测一次,不同组别设置 3 组平行。多功能酶标仪参数设置为:激发光波长 480 nm、发射光波长 530 nm。

1.2.3 NPN 摄取的测定

将生长到对数期的小肠结肠炎耶尔森菌菌液,以起始 OD_{600} 约为 0.50 转接于含有终浓度为 MIC 值的多粘菌素 B 培养基中,培养 1 h。将菌液倒入无菌离心管,4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后重悬。吸取 200 μ L 细菌悬浮液加入到 96 孔板,加入 20 μ L 10 mmol/L NPN 荧光试剂,使其终浓度为 100 μ mol/L,用多功能酶标仪间隔 10 min 测一次,不同组别设置 3 组平行。多功能酶标仪参数设置为:激发光波长 350 nm、发射光

波长 420 nm。

1.2.4 核酸和蛋白质泄漏的测定

将生长到对数期(OD_{600} 约为 0.4)的小肠结肠炎耶尔森菌菌液倒入无菌离心管, 于 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液调节菌液。取 20 mL 菌液, 加入终浓度为 MIC 值的多粘菌素 B, 并设置空白对照组, 将各组分别摇晃混匀, 26 °C、180 r/min 持续培养。每 30 min 取出 1 mL 培养液, 用紫外分光光度计测量 260 nm 处吸光值, 记录核酸泄漏数值变化; 每 30 min 取出 1 mL 培养液, 用紫外分光光度计测量 280 nm 处吸光值, 记录蛋白质泄漏数值变化。不同组别设置 3 组平行。

1.2.5 泳动能力和生物被膜形成能力的测定

参照文献[23]方法, 使用游标卡尺测量不同菌株泳动圆环直径。

用酶标仪测定 OD_{595} 吸光值, 减去空白对照组的吸光值为每孔样品生物被膜的 OD_{595} 吸光值, 该值与生物被膜形成量成正比。

1.2.6 总 RNA 提取与 RT-qPCR 反应

使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用 NanoDrop 测量不同样品的总 RNA 浓度。根据 RT-qPCR 试剂盒说明书配制体系。以 *Y. enterocolitica* ATCC23715 的基因组为模板设计 RT-qPCR 的扩增引物, 序列如表 1 所示。PCR 采用实时荧光定量 PCR 仪设定在以下条件下进行: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 49 °C 15 s, 68 °C 15 s, 30 个循环; 68 °C 5 min; 4 °C 保存。最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法分析靶基因

的相对转录情况。

1.3 数据的统计分析

采用 GraphPad Prism 8.2.1 软件进行数据统计分析和数据作图。

2 结果与讨论

2.1 多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌细胞膜稳定性的破坏

为了确定多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌的最小抑菌浓度, 依据美国临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)推荐使用微量肉汤稀释法测定小肠结肠炎耶尔森菌中多粘菌素 B 的最小抑菌浓度, 在液体 LNNS 培养基中进行测定。实验结果表明多粘菌素 B 对 Y.E ATCC23715 的 MIC 值为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

膜电位(Membrane Potential, MP)是以细胞膜相隔的细胞内部和外部之间产生的一种电位差, 存在于细胞膜两侧。膜电位是细胞生命活动中一种非常重要的电现象, 在细胞膜感知外界环境扰动的过程中起着重要的作用。本实验通过使用亲脂性阳离子染料罗丹明 123^[25]检测细菌细胞膜电位的变化。罗丹明 123 可以通过跨膜电位进入到细胞基质中发出荧光, 通过罗丹明 123 荧光强度的大小可反映细胞膜电位的变化情况, 从而间接反映多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌造成的膜电位扰动变化情况。与对照组相比加入多粘菌素 B 溶液处理 10 min 后荧光强度显著降低, 随时间延长没有改变(图 1A)。说明多粘菌素 B 会导致小肠结肠炎耶尔森菌膜电位降

表 1 RT-qPCR 扩增引物

Table 1 Primers for RT-qPCR amplification

引物名称	引物序列	产物长度
Primers name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>flhC</i> -F	GGACCTTGGTTCGCTTTGTT	20
<i>flhC</i> -R	GGCAGATTGCGGAGAAAGTT	20
<i>hmsT</i> -F	TATAATCGCCGTGGGTGGA	20
<i>hmsT</i> -R	CACTAAGGCTTGGTCTCCCA	20
<i>hmsS</i> -F	AGCATGGAATGACGGGAGA	20
<i>hmsS</i> -R	TTAACGACCGGTGCAACTTC	20
16S rRNA-F	TACCGCATAACGTCTTCGGA	20
16S rRNA-R	TCTGGACCGTGTCTCAGTTC	20

低,影响细胞的正常代谢活动,结果会抑制其生长,甚至导致细菌死亡。

NPN (N-Phenyl-1-Naphthylamine)是一种疏水敏感的荧光染料,在疏水环境中会产生强烈的荧光,而在水环境中 NPN 则保持荧光淬灭状态^[26]。当细菌细胞外膜受损,NPN 就会进入到细菌外膜的疏水内部而发出荧光,通过使用荧光染料 NPN 检测荧光强度的变化可判断多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌细胞外膜的渗透能力的影响,测定结果如图 1B 所示。相比未添加多粘菌素 B 的小肠结肠炎耶尔森菌培养液,添加多粘菌素 B 使 NPN 荧光强度显著升高,表明多粘菌素 B 对细胞外膜有破坏作用。结果说明多粘菌素 B 影响了小肠结肠炎耶尔森菌的细胞外膜的稳定性,使得 NPN 荧光探针进入到细胞外膜的疏水内部。

由图 1C 和图 1D 可知,多粘菌素 B 处理后的

细菌泄漏的核酸吸光度值和蛋白质吸光度值均显著高于对照组,细胞核酸泄漏和蛋白质泄漏量均随时间增加而增加,说明多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌细胞内膜的完整性造成了一定的破坏。如图 1C 所示,随时间的增加,经多粘菌素 B 处理后的培养液核酸泄漏增长值为 19%。在 30 min 时核酸泄漏量是 0.088,150 min 时为 0.130。如图 1D 所示,经多粘菌素 B 处理后细菌泄漏的蛋白质的吸光度在 30 min 时为 0.059,在 150 min 时为 0.113。

抗菌肽多粘菌素 B 主要作用于革兰氏阴性菌细胞外膜脂多糖,通过对其膜电位测定、NPN 摄取测定、核酸泄漏以及蛋白质泄漏的分析,发现多粘菌素 B 破坏了小肠结肠炎耶尔森菌细胞膜的稳定性,其对细胞外膜的完整性造成了一定程度的破坏,表明多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌造成了胞膜压力。

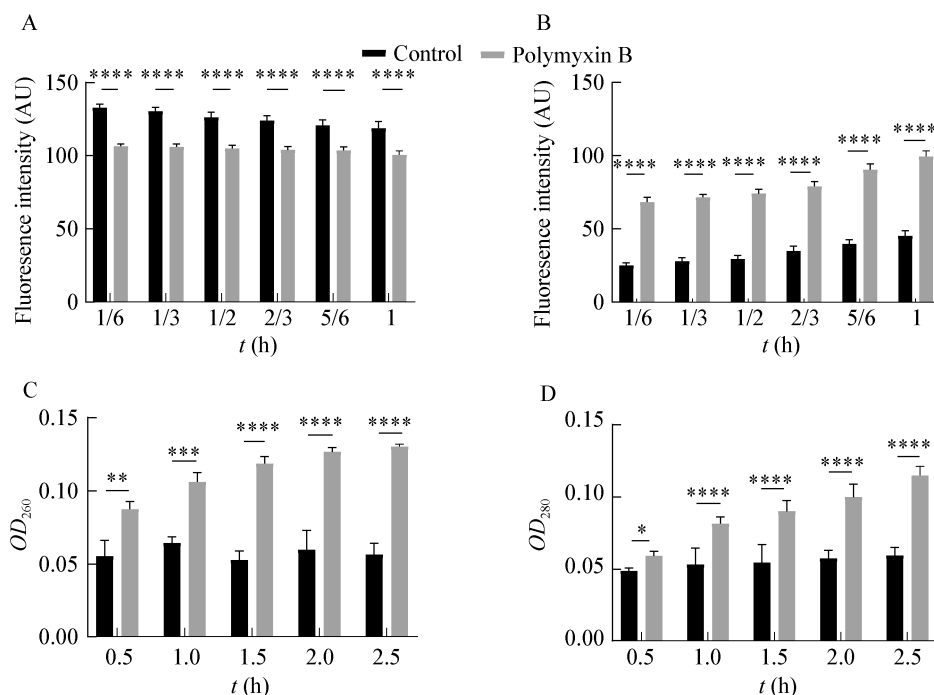


图 1 多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌细胞膜稳定性的破坏

Figure 1 Damage of polymyxin B to the stability of *Y. enterocolitica* cell membrane

注: A: 膜电位测定结果; B: NPN 测定结果; C: 核酸泄漏测定结果; D: 蛋白泄漏测定结果。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$

Note: A: Membrane potential measurement result; B: NPN measurement result; C: Nucleic acid leakage test result; D: Protein leakage test result. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$

2.2 Rcs 系统在胞膜压力应答中对菌体生长的影响

在 Rcs 系统中, *rcsF* 基因编码的外膜脂蛋白 RcsF 首先感受外界环境的变化然后将膜应激信号传递胞内, 最终传递至由基因 *rcsB* 编码的转录调控因子 RcsB。RcsB 形成同源二聚体或与 RcsA 形成异源二聚体, 从而激活或抑制靶标基因的转录, 调节细菌的生命活动。因此, 破坏 Rcs 双组分系统中的关键组件, 构建 *rcsF* 和 *rcsB* 突变株, 可造成感知外界环境 RcsF 蛋白与转录调控因子 RcsB 蛋白的差异表达, 从而探究 Rcs 双组分系统差异对多粘菌素 B 造成的胞膜压力的调控。实验室已构建和保藏 *rcsB* 突变株^[23], 本研究通过无痕同源重组技术构建了 *rcsF* 突变株。

通过预实验检测了 *rcsF* 和 *rcsB* 突变株对多粘菌素 B 的敏感性。当在培养基中添加多粘菌素 B 终浓度为 MIC 时, 会抑制 *rcsF* 和 *rcsB* 突变株的生长, 在低于 MIC 浓度时对 *rcsF* 和 *rcsB* 突变株有一定的抑制作用。因此, 设置 0.5 MIC 与 0.8 MIC 浓度梯度进行后续实验。

通过生长曲线测定比较了野生株和突变株的生长情况。图 2A 为不添加多粘菌素 B 的对照组, 在 LNNS 培养基中突变株与野生株相比生长只有很低程度的减弱, 野生株和突变株的生长几乎没有差

异, 说明破坏 Rcs 磷酸化系统后对小肠结肠炎耶尔森菌的生长并没有产生显著影响。图 2B 显示, 添加多粘菌素 B 后, 突变株的生长有了较大程度的降低, 说明突变株增加了对多粘菌素 B 的敏感性, RcsF 外膜蛋白的缺失使得小肠结肠炎耶尔森菌对多粘菌素 B 更加敏感。图 2C 显示, 将多粘菌素 B 在 LNNS 培养基中的终浓度从 0.5 MIC 增加到 0.8 MIC 后, 与对照组图 2B 相比, 菌株的生长受到了更大程度的阻碍, 多粘菌素 B 对小肠结肠炎耶尔森菌的生长产生抑制。通过对菌株生长曲线的测定, 结果表明 Rcs 系统对多粘菌素 B 造成的胞膜压力应答有一定的调节作用。

2.3 Rcs 系统在胞膜压力应答中对运动性和生物被膜形成能力的影响

菌株的运动能力和生物被膜形成能力对小肠结肠炎耶尔森菌的生存和毒力有重要意义。有报道显示, Rcs 系统能够通过调节菌毛、鞭毛和胞外多糖的结构影响细菌的毒力, 从而影响其运动能力、生物被膜形成能力和生长能力^[27]。为了探究在小肠结肠炎耶尔森菌中 Rcs 系统对多粘菌素 B 引起胞膜胁迫的响应, 本研究通过半固体平板培养的泳动实验的测定和生物被膜培养来评价 Rcs 系统在胞膜压力应答中对运动性和生物被膜形成能力的影响。

在不添加多粘菌素 B 的 LNNS 半固体培养基

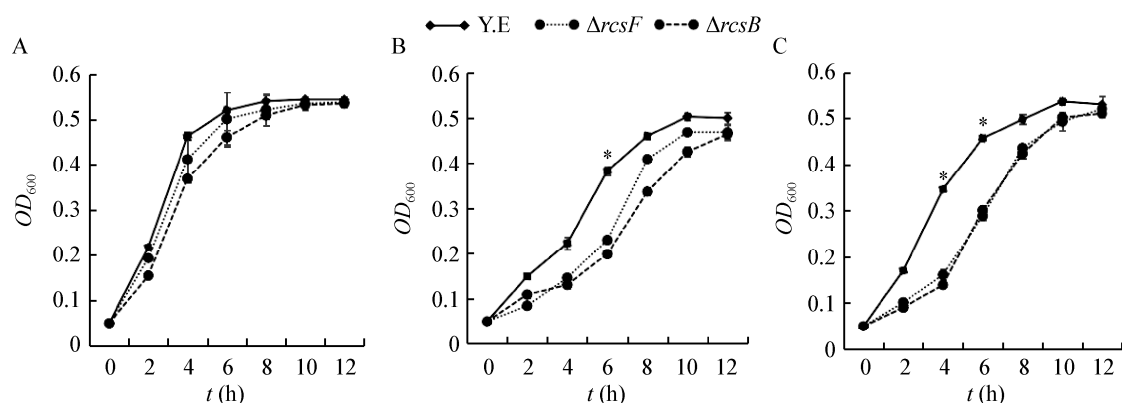


图 2 野生株、*rcsF* 和 *rcsB* 突变株在 LNNS 培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth curve of wild-type, *rcsF* and *rcsB* mutant strains in LNNS broth

注: A: 未添加多粘菌素 B; B: 添加 0.5 MIC 多粘菌素 B; C: 添加 0.8 MIC 多粘菌素 B

Note: A: No polymyxin B added; B: Add 0.5 MIC polymyxin B; C: Add 0.8 MIC polymyxin B

中,当 Rcs 途径被阻断后, *rcsF* 和 *rcsB* 突变株的泳动直径显著高于野生株,泳动圆环直径分别增加 21%与 26%,说明 Rcs 途径的存在抑制了小肠结肠炎耶尔森菌的泳动能力。在加入 0.5 MIC 浓度多粘菌素 B 的半固体 LNNS 培养基中,野生株的泳动圆环直径与未添加多粘菌素 B 的对照组相比较时显著降低,降低了 19%。在加入 0.8 MIC 浓度多粘菌素 B 的半固体 LNNS 培养基中,野生株与突变株泳动直径之间的差距更加明显(图 3A)。多粘菌素 B 的添加抑制了小肠结肠炎耶尔森菌的泳动能力,而 Rcs 系统的存在对其引起的泳动能力的改变有着一定的反向调节作用。

如图 3B 所示,在不添加多粘菌素 B 的半固体 LNNS 培养基中,当阻断 Rcs 途径后,突变株的生物被膜形成能力与野生株相比显著增加,说明 Rcs 途径对小肠结肠炎耶尔森菌生物被膜形成的影响与运动性一致。培养基中添加多粘菌素 B 后,野生株的生物被膜形成量明显降低,而突变株相比于野生株,其生物被膜形成量的变化较小。

通过比较泳动圆环直径与生物被膜形成能力的变化,结果表明在多粘菌素 B 作用于小肠结肠炎耶尔森菌后,引发了 Rcs 途径的胞内调控^[28]。Rcs 系统通过调节下游鞭毛与生物被膜形成,从而使鞭毛的运动性和生物被膜形成能力受到了抑制。

2.4 表型相关基因的相对转录水平分析

已知 Rcs 磷酸化系统能够激活或抑制表达鞭毛装置基因所需的 *flhDC* 操纵子编码激活剂和生物被膜形成所需的 *hmsT* 和 *hmsS* 操纵子,所以采用 RT-qPCR 方法比较 Y.E- $\Delta rcsB$ 、Y.E- $\Delta rcsF$ 和野生株之间的 *flhC*、*hmsT* 和 *hmsS* 基因的转录水平,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目标基因进行相对定量分析,结果如图 4 所示。

图 4A 为不添加多粘菌素 B 的对照组 *flhC*、*hmsS*、*hmsT* 的相对转录水平。以 Y.E ATCC23715 的相对转录水平为基准,当 Rcs 双组分系统被破坏后,Y.E- $\Delta rcsF$ 和 Y.E- $\Delta rcsB$ 中 *flhC* 基因的相对转录水平与野生株相比分别呈 2 倍和 3 倍增加;Y.E- $\Delta rcsF$ 和 Y.E- $\Delta rcsB$ 中 *hmsS*、*hmsT* 基因的相对转录水平与野生株相比也有明显的增长。证明在小肠结肠炎耶尔森菌中,Rcs 双组分系统对下游靶基因 *flhC*、*hmsS*、*hmsT* 存在负调控,从而抑制了其泳动能力及生物被膜形成能力。

如图 4B 所示,添加多粘菌素 B 的野生株中 *flhC*、*hmsS*、*hmsT* 的相对转录水平与不添加多粘菌素 B 的野生株相比下调,突变菌株 Y.E- $\Delta rcsF$ 和 Y.E- $\Delta rcsB$ 中 *flhC*、*hmsS*、*hmsT* 的相对转录水平也有所下降。证明在添加多粘菌素 B 后,野生株和突变株的泳动能力和生物被膜形成能力都受到了抑制。

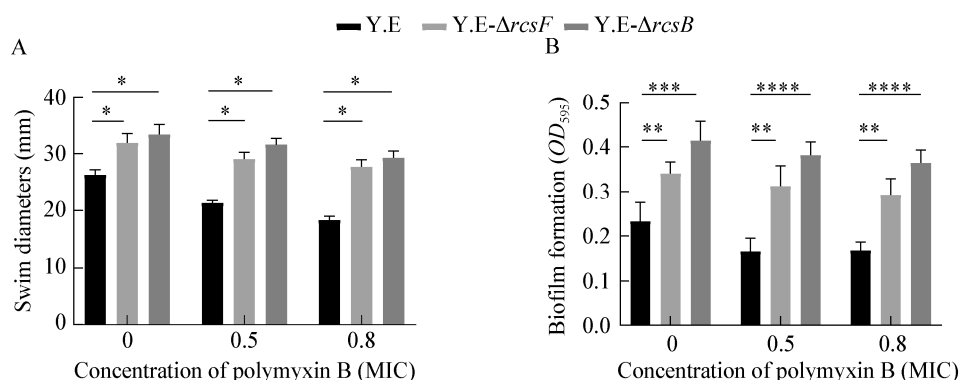


图 3 多粘菌素 B 对野生株、*rcsF* 和 *rcsB* 突变株泳动能力(A)和生物被膜形成能力(B)的影响

Figure 3 Changes in the levels of swim motility (A) and biofilm formation (B) in wild-type, *rcsF* and *rcsB* mutant strains in LNNS medium supplemented with different concentration of polymyxin B

Note: A: Swim motility; B: Biofilm formation

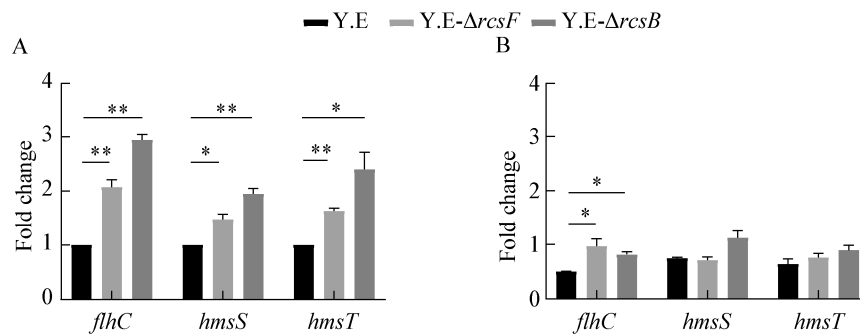


图4 表型相关基因的转录水平变化情况

Figure 4 Changes in transcript levels of related phenotypic genes

注: A: 未添加多粘菌素 B; B: 添加多粘菌素 B

Note: A: No polymyxin B added; B: Add polymyxin B

如 2.3 所述,在小肠结肠炎耶尔森菌中阻断 Rcs 系统后,菌株的运动能力和生物被膜形成能力都有显著提高,相应地,编码激活表达鞭毛装置的 *flhDC* 操纵子和生物被膜形成所需的 *hmsT* 和 *hmsS* 基因的转录表达水平也得到了显著提高。当添加多粘菌素 B 后,野生株的鞭毛形成能力和生物被膜形成能力明显降低,结合表型实验结果分析得到,多粘菌素 B 抗菌肽作用于小肠结肠炎耶尔森菌后引起了 Rcs 系统参与对下游靶基因的调控,从而在一定程度上抑制了菌株的运动能力和生物被膜的形成能力。

3 结论

胞膜应激是细菌内重要的调控方式。细菌通过胞内的不同系统快速调节,以适应环境胁迫造成的细菌胞膜结构和功能的障碍所造成的影响。双组分系统响应于革兰氏阴性菌的胞膜应激,对细菌快速适应环境及宿主细胞有着重要意义。抗菌肽多粘菌素 B 直接作用于细菌细胞外膜脂多糖,能对细菌造成一定的胞膜压力。本研究选取了多粘菌素 B 作用于小肠结肠炎耶尔森菌,通过对菌株生长能力、泳动能力和生物被膜形成能力的观察,探究小肠结肠炎耶尔森菌对多粘菌素 B 产生的胞膜压力的调控作用。

在小肠结肠炎耶尔森菌中,阻断 Rcs 双组分系统后,缺失突变株的泳动能力和生物被膜形成能力显著增高,证明 Rcs 双组分系统抑制了小肠结肠炎

耶尔森菌的泳动能力和生物被膜形成量。当加入多粘菌素 B 抗菌肽后,与缺失突变株相比,野生株的泳动能力和生物被膜形成能力进一步受到了抑制,表明了 Rcs 双组分系统在调控多粘菌素 B 抗菌肽引起的胞膜胁迫时起到一定的负调控作用。

通过对小肠结肠炎耶尔森菌中 Rcs 双组分系统所调控下游鞭毛合成和体外生物被膜合成相关基因 *flhC*、*hmsS*、*hmsT* 进行实时荧光定量逆转录 PCR (RT-qPCR),分析其相对转录水平。结果表明,Rcs 双组分系统抑制了小肠结肠炎耶尔森菌的泳动能力和生物被膜形成能力,并且在受到多粘菌素 B 所造成的外界胁迫时 Rcs 双组分系统能够感知并作出响应,小肠结肠炎耶尔森菌的泳动能力和生物被膜形成能力进一步受到抑制。然而同时因为野生株、突变株 Y.E-ΔrcsF 和 Y.E-ΔrcsB 中基因 *flhC*、*hmsS* 和 *hmsT* 的表达量下调程度不同,表明小肠结肠炎耶尔森菌对多粘菌素 B 所造成的胞膜紊乱不仅存在 Rcs 双组分系统的压力响应,同时也可能存在着多种途径的共同调节。有研究发现,包括 PhoPQ、PmrAB 和 Rcs 系统在内的多种双组分系统都可以调节细菌对抗菌肽所造成的胞膜压力。同时,细菌中还存在许多不同的 σ 因子,细菌会利用不同的 σ 因子识别不同的启动子,以此来应答复复杂多变的环境。因此,小肠结肠炎耶尔森菌在应对多粘菌素 B 所产生的胞膜压力过程中,可能还存在其

他调控机制。小肠结肠炎耶尔森菌抵抗抗菌肽的分子调节机制是一个复杂的过程,同时有多个基因共同参与,该胁迫抵抗机制仍有待于进一步的深入研究。

REFERENCES

- [1] Kamdar K, Khakpour S, Chen JY, Leone V, Brulc J, Mangatu T, Antonopoulos DA, Chang EB, Kahn SA, Kirschner BS, et al. Genetic and metabolic signals during acute enteric bacterial infection alter the microbiota and drive progression to chronic inflammatory disease[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(1): 21-31
- [2] Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W, Łaniewska-Trokenheim Ł. *Yersinia enterocolitica*: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen[J]. *Food Reviews International*, 2014, 30(1): 53-70
- [3] Sirghani K, Zeinali T, Jamshidi A. Detection of *Yersinia enterocolitica* in retail chicken meat, Mashhad, Iran[J]. *Journal of Pathogens*, 2018, 2018: 1286216
- [4] Shah J, Chan SW, Pitman TB, Lane DJ. Nucleic acid probes and methods for detecting *Yersinia enterocolitica*[J]. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(4): 755-756
- [5] Razzuoli E, Vencia W, Modesto P, Franzoni G, Giudici SD, Parisi E, Ferrari A, Amadori M. *Yersinia enterocolitica*-specific modulation of innate immune responses in jejunal epithelial cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 242: 108596
- [6] Zhang YJ, Xue Y, Gao L, Ouyang M, Xiao LX, Yang ZQ. Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* phage and its antibacterial effect in fresh-cut vegetables[J]. *Journal of Researches on Dietetic Science and Culture*, 2019, 36(2): 43-47 (in Chinese)
张羽嘉, 薛宇, 高璐, 欧阳敏, 肖丽霞, 杨振泉. 小肠结肠炎耶尔森氏菌噬菌体的分离鉴定及在鲜切蔬菜中的靶向抑菌作用[J]. *美食研究*, 2019, 36(2): 43-47
- [7] Li YY, Wang C, Tang T. Research progress on the signal response mechanism of *Salmonella* PhoP-PhoQ bi-component system[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2017, 44(22): 4168-4170, 4180 (in Chinese)
李泳榆, 汪川, 唐田. 沙门菌 PhoP-PhoQ 双组分系统信号响应机制研究进展[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(22): 4168-4170, 4180
- [8] Erhardt M, Dersch P. Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia* virulence[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 949
- [9] Cho SH, Szweczyk J, Pesavento C, Zietek M, Banzhaf M, Roszczenko P, Asmar A, Laloux G, Hov AK, Leverrier P, et al. Detecting envelope stress by monitoring β -barrel assembly[J]. *Cell*, 2014, 159(7): 1652-1664
- [10] Barchinger SE, Ades SE. Regulated Proteolysis: control of the *Escherichia coli* σ^E -dependent cell envelope stress response regulated proteolysis in microorganisms[J]. *Sub-cellular Biochemistry*, 2013, 66: 129-160
- [11] Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(5): a000414
- [12] Grabowicz M, Silhavy TJ. Envelope stress responses: an interconnected safety net[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(3): 232-242
- [13] Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(9): 2069-2089
- [14] Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2016, 48(6): 583-591
- [15] Majdalani N, Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59: 379-405
- [16] Clarke EJ, Voigt CA. Characterization of combinatorial patterns generated by multiple two-component sensors in *E. coli* that respond to many stimuli[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(3): 666-675
- [17] Clarke DJ. The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway[J]. *Future Microbiology*, 2010, 5(8): 1173-1184
- [18] Liang H. An osmoregulatory mechanism operating through OmpR-LrhA signal cascade reversely regulates biofilm and motility in *Pantoea alhagi*[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese)
梁宏. OmpR-LrhA 渗透压响应信号系统反向调控骆驼刺泛菌生物膜和运动性的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2019
- [19] Samanta P, Clark ER, Knutson K, Horne SM, Prüß BM. OmpR and RcsB abolish temporal and spatial changes in expression of *flhD* in *Escherichia coli* biofilm[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 1-13
- [20] Bontemps-Gallo S, Madec E, Dondeyne J, Delrue B, Robbe-Masselot C, Vidal O, Prouvost AF, Boussemart G, Bohin JP, Lacroix JM. Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3): 881-894

- [21] Chlebicz A, Ślizewska K. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(5): 863
- [22] Meng J, Huang C, Huang XN, Liu DY, Han BZ, Chen JY. Osmoregulated periplasmic glucans transmit external signals through Rcs phosphorelay pathway in *Yersinia enterocolitica*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 122
- [23] Meng J, Bai JQ, Xu JH, Huang C, Chen JY. Differential regulation of physiological activities by RcsB and OmpR in *Yersinia enterocolitica*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(17): fnz210
- [24] Molchanova N, Wang HZ, Hansen PR, Høiby N, Nielsen HM, Franzyk H. Antimicrobial activity of α -peptide/ β -peptoid lysine-based peptidomimetics against colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 275
- [25] Wang XL, Sheng HJ, Liu Y, Tao YY, Feng K. Effects of cadmium on membrane potential differences and membrane permeability of rice roots[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(4): 630-635 (in Chinese)
- 汪晓丽, 盛海君, 刘杨, 陶玥玥, 封克. 镉对水稻幼苗根系细胞膜电位和膜透性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(4): 630-635
- [26] Yin JF, Shi F, Wang XY. Synergistic antibacterial effect of lysozyme with cell permeabilizers on *Escherichia coli*[J]. *Food Science*, 2011, 32(11): 176-180 (in Chinese)
- 尹金凤, 史锋, 王小元. 蛋清溶菌酶与渗透剂对大肠杆菌的协同抑菌作用[J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 176-180
- [27] Stout V, Torres-Cabassa A, Maurizi MR, Gutnick D, Gottesman S. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(5): 1738-1747
- [28] Alenizi D, Ringwood T, Redhwan A, Bouraha B, Wren BW, Prentice M, McNally A. All *Yersinia enterocolitica* are pathogenic: virulence of phylogroup 1 *Y. enterocolitica* in a *Galleria mellonella* infection model[J]. *Microbiology*, 2016, 162(8): 1379-1387