

鼠伤寒沙门菌 VI 型分泌系统效应因子 Rhs 生物学特性分析

董震^{1,2,3}, 陈启伟¹, 吴锦燕¹, 尚佑军¹, 兰喜^{*1}, 刘永生^{*1}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

2 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642

3 甘肃省定西市安定区畜牧兽医局, 甘肃 定西 743000

董震, 陈启伟, 吴锦燕, 尚佑军, 兰喜, 刘永生. 鼠伤寒沙门菌 VI 型分泌系统效应因子 Rhs 生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2160-2173

Dong Zhen, Chen Qiwei, Wu Jinyan, Shang Youjun, Lan Xi, Liu Yongsheng. Biological characterization of Rhs effectors of type VI secretion system of *Salmonella typhimurium*[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2160-2173

摘要: 【背景】细菌的 VI 型分泌系统作为杀死真核捕食者或原核竞争对手的“武器”, 其杀伤作用是通过释放有毒物质即效应因子来实现。尽管已发现一些效应因子, 但大多数效应因子的功能仍然未知。【目的】研究 *rhs* 基因编码的效应因子 Rhs 对鼠伤寒沙门菌生物学特性的影响。

【方法】利用 Red 同源重组的方法构建鼠伤寒沙门菌 *rhs* 基因缺失株及相应的基因回补株。通过试验分析比较亲本株与缺失株、回补株在生化特性、生物被膜形成、耐药性、细菌间竞争、抗血清补体杀菌能力、组织载菌量及感染小鼠后炎症因子 IL-18、IL-1 β 释放量上的差异。【结果】效应因子 Rhs 不影响鼠伤寒沙门菌的生化代谢、生物被膜形成、耐药性及抗血清补体杀菌能力。细菌种间竞争试验中, 基因缺失株 CVCC541 Δ *rhs1*、CVCC541 Δ *rhs2* 和 CVCC541 Δ *rhs1-2* 的竞争指数 (competition index, CI) 值分别为 0.85、0.77 和 0.87, 毒力均被轻度致弱。体内组织载菌量试验中, CVCC541 Δ *rhs1*、CVCC541 Δ *rhs2* 和 CVCC541 Δ *rhs1-2* 基因缺失株在小鼠肝脏和脾脏中的细菌数均较亲本株明显下降 ($P < 0.05$); 机体分泌 IL-1 β 、IL-18 的能力与鼠伤寒沙门菌效应因子 Rhs 具有相关性 ($P < 0.05$)。【结论】鼠伤寒沙门菌 Rhs 效应因子能在细菌间的竞争及细菌在宿主器官内的定殖上发挥作用, 同时参与调控宿主体内炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的分泌。

关键词: 鼠伤寒沙门菌; 基因缺失; 效应因子 Rhs; 生物学特性

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500703, 2018YFD0502006)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500703, 2018YFD0502006)

*Corresponding authors: E-mail: LAN Xi: lanxi@caas.cn; LIU Yongsheng: liuyongsheng@caas.cn

Received: 2021-08-30; Accepted: 2021-10-20; Published online: 2022-04-11

Biological characterization of Rhs effectors of type VI secretion system of *Salmonella typhimurium*

DONG Zhen^{1,2,3}, CHEN Qiwei¹, WU Jinyan¹, SHANG Youjun¹, LAN Xi^{*1},
LIU Yongsheng^{*1}

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

3 Animal Husbandry and Veterinary Bureau of Anding District in Dingxi City, Dingxi 743000, Gansu, China

Abstract: [Background] The type VI secretion system of bacteria acts as a weapon to kill eukaryotic predators or prokaryotic competitors by releasing toxins, known as effectors. Although some effectors have been identified, the functions of most effectors remain unknown. **[Objective]** To study the role of the effector Rhs encoded by *rhs* gene in *Salmonella typhimurium*. **[Methods]** The *rhs*-deleted mutants of *Salmonella typhimurium* CVCC541 were constructed via Red recombination, including single gene deletion strains CVCC541 Δ *rhs1* and CVCC541 Δ *rhs2* and the double genes deletion strain CVCC541 Δ *rhs1-2*. Meanwhile, the corresponding gene complemented strains C- Δ *rhs1*, C- Δ *rhs2* and C- Δ *rhs1-2* were constructed. The biochemical characteristics, biofilm formation, antibiotic resistance, competition between bacteria, bactericidal ability of complement in antiserum, dynamic distribution *in vivo* and the amounts of IL-18 and IL-1 β released by host after infection were compared among the wild-type strain, gene-deleted strains and gene-complemented strains. **[Results]** Rhs did not affect the metabolism, biofilm formation, antibiotic resistance or complement bactericidal ability of *Salmonella typhimurium*. The competition index (CI) of CVCC541 Δ *rhs1*, CVCC541 Δ *rhs2* and CVCC541 Δ *rhs1-2* was 0.85, 0.77 and 0.87, respectively, which indicated slightly weakened virulence. Compared with the wild-type strain, CVCC541 Δ *rhs1*, CVCC541 Δ *rhs2* and CVCC541 Δ *rhs1-2* showed decreased number in the liver and spleen of mice ($P < 0.05$). The host secretion of IL-1 β and IL-18 was correlated with the Rhs of *Salmonella typhimurium* ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The Rhs effectors of *Salmonella typhimurium* play a role in the competition between bacteria, the colonization of bacteria in host organs, and the regulation of the secretion of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 in the host.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; gene deletion; Rhs effectors; biological characteristics

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)是一种兼性细胞内寄生的革兰氏阴性致病菌,通过受病菌污染的饮水、牛奶、肉类和加工后的食物传播给人,该菌主要定殖于宿主的肠道中,可使宿主罹患严重的食物中毒^[1-2]。目前鼠伤寒沙门菌是世界各国分离率最高的菌型之一,对该菌的研究具有重要的公共卫生意义^[3]。

细菌为了争夺生存空间和营养物质,进化出了接触性抑制机制^[4]。例如,在大肠杆菌中报道的接触依赖性生长抑制(contact-dependent growth inhibition, CDI)系统和 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)^[5-6]。CDI 系统参与细菌间的竞争,并通过细胞间的直接接触抑制邻近竞争者的生长^[7]。同一种细菌具有多种机制获得竞争优势, T6SS 广泛存在于革兰

氏阴性细菌中,其结构与噬菌体的尾部相似,作用是通过直接接触(横跨细菌内膜-周质-外膜)将分泌的效应蛋白转运到原核和真核细胞中^[8-9]。T6SS的分泌蛋白主要包括具有转运功能的结构蛋白和具有生物活性的效应蛋白。T6SS的效应蛋白通常对真核或原核细胞具有细胞毒性^[10-11]。

鼠伤寒沙门菌的 *rhs* (rearrangement hotspot) 基因由一个 *rhs* 核心基因和一个与之相邻的“孤儿” *rhs* 毒素基因组成^[12]。*rhs* 基因编码的蛋白折叠形成锥形壳状结构,包裹高度可变的 C-末端毒素结构域^[13-14]。这些 C-末端毒素在细胞与细胞接触时被输送到靶细胞内^[15]。在革兰氏阴性细菌中,效应因子 Rhs 由 T6SS 分泌和动员^[16-17]。研究表明,Rhs 蛋白是 CDI 毒素之一,Rhs 效应因子可以抑制蛋白质合成^[18]。此外,研究人员在假单胞菌中发现了一种类似 *rhs* 的基因参与了细菌素的产生^[19]。Rhs 蛋白已被证明可以调节宿主的炎症反应^[20]。上述研究结果表明,效应因子 Rhs 与细菌的感染及致病力有联系。本研究利用 Red 同源重组的方法构建鼠伤寒沙门菌 *rhs* 基因缺失株和相应的回补株,并通过试验探究效应因子 Rhs 在鼠伤寒沙门菌生物学特征及致病性的作用,以期为进一步研究 T6SS 分泌的效应蛋白对鼠伤寒沙门菌的致病机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

伤寒沙门菌标准菌株 CVCC541 及载体质粒 pKD46、pKD4 和 pCP20 均为实验室保存;pSTV28 质粒购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂及试验动物

质粒提取试剂盒, Omega 公司;高保真酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、长链高保真酶

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase、DNA 凝胶回收试剂盒、DL5000 DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III, TaKaRa 公司; L-(+)阿拉伯糖, 生工生物(上海)股份有限公司; 沙门氏菌生化鉴定盒, 广东环凯微生物科技有限公司; 药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司; QuantiCyto[®] Mouse IL-18 ELISA Kit (小鼠白细胞介素-18)、QuantiCyto[®] Mouse IL-1 β ELISA Kit (小鼠白细胞介素-1 β), 欣博盛公司; 雌性 6 周龄 18–20 g SPF 级昆明(KM)小鼠, 兰州兽医研究所实验动物中心。

1.3 引物的设计

根据 NCBI 鼠伤寒沙门菌 14028S 基因组序列 (GenBank 登录号为 CP001363.1), 使用 Premier 5.0 软件设计相关引物。分别取目的基因前后各 45 bp 为该引物的同源片段, 并且在引物 3'端添加扩增 pKD4 质粒的卡那霉素抗性基因。设计敲除 *rhs1* (STM14_0340) 基因的引物对 P1-F/P1-R; 敲除 *rhs2* (STM14_0341) 基因的引物对 P2-F/P2-R; 并用 *rhs1* 基因上游引物 P1-F 和 *rhs2* 基因下游引物 P2-R 作为 *rhs1-2* 双基因敲除引物。此外, 分别在位于 *rhs1*、*rhs2*、*rhs1-2* 基因同源臂的外侧设计引物对 P3-F/P3-R、P4-F/P4-R、P3-F/P4-R 用于缺失株的鉴定。P5-F/P5-R、P6-F/P6-R、P5-F/P6-R 引物对用于扩增 *rhs1*、*rhs2*、*rhs1-2* 基因完整开放阅读框, 构建回补质粒。鉴定回补株引物对 pSTV28-F/pSTV28-R (表 1), 引物由西安擎科泽西生物科技有限责任公司合成。

1.4 *rhs1*、*rhs2* 和 *rhs1-2* 基因缺失株及回补株构建

利用 Red 同源重组系统原理及方法^[21], 将质粒 pKD4 作为模板, 分别以 P1-F/P1-R、P2-F/P2-R 和 P1-F/P2-R 为引物对进行 PCR。PCR 反应体系(50 μ L): PrimeSTAR Max Premix (2 \times)

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	产物大小
Primer name	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
P1-F	GGCTTTCAGCCGGATAAAAACGAATAATCACACGGAGGTGTGACCGAGCGATTGT <u>GTAGGCTGGAG</u>	1 567
P1-R	TTACCGTATAATCAGTATGTTTGTCTACCCACAATTAAATTTATTTAACGGCTGAC <u>ATGGGAATTAG</u>	
P2-F	ATCAATCCGGAGACGCGCTACCGGTACGATGCGCTGGGCAGGCGGGAGCGATTGT <u>GTAGGCTGGAG</u>	1 567
P2-R	TAATCGCATTCTCCAGTTCGATTCTAAGTTCAGACATATTTGAATTTAACGGCTGAC <u>ATGGGAATTAG</u>	
P3-F	TGACCAGTCCCCGTCCTTT	535
P3-R	GAACCCCTCCCACACAAAAG	
P4-F	AAGGATGGGCAAAAATAGTAGG	1 131
P4-R	ATTGCTGTTTCCCCTGCC	
P5-F	CCGgaattcGGAGGAAGTGAAGTTCACG	5 971
P5-R	CCCaaagcttGATTGATGCTCCAGGATAGC	
P6-F	CCGgaattcCGTACTTTCACCAGCCGCTG	2 719
P6-R	CCCaaagcttTGTGCGCTGGGATCTGTTCG	
pSTV28-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	93
pSTV28-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	

注: 下划线为卡那霉素抗性基因序列; gaattc 为 *EcoR* I 酶切位点; aagctt 为 *Hind* III 酶切位点

Note: Underline kanamycin resistance gene sequence; gaattc is the restriction site of *EcoR* I; aagctt is the *Hind* III restriction site.

25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , ddH₂O 21 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。扩增含有 *rhs1*、*rhs2* 和 *rhs1-2* 基因同源臂的卡那霉素抗性片段, 然后将其电转入含有 pK46 质粒的 CVCC541 感受态细胞中进行敲除。筛选得到阳性重组子 $\Delta rhs1::kan$ 、 $\Delta rhs2::kan$ 和 $\Delta rhs1-2::kan$ 并以 pCP20 质粒 42 $^{\circ}\text{C}$ 进行消抗, 用 P3-F/P3-R、P4-F/P4-R、P3-F/P4-R 作为引物对, PCR 反应体系及反应条件同上, 对构建的 *rhs1*、*rhs2*、*rhs1-2* 基因缺失株 CVCC541 $\Delta rhs1$ 、CVCC541 $\Delta rhs2$ 和 CVCC541 $\Delta rhs1-2$ 进行 PCR 鉴定并测序。

以 CVCC541 基因组 DNA 为模板, 分别利用回补引物 P5-F/P5-R、P6-F/P6-R、P5-F/P6-R, PCR 反应体系(50 μL): 5 \times PrimeSTAR GXL Premix

(1 \times) Buffer 10 μL , dNTP Mixture 4 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (25 U/mL) 1 μL , ddH₂O 33 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。扩增含有酶切位点的 *rhs1*、*rhs2* 和 *rhs1-2* 基因片段, 并构建回补质粒 pSTV28-*rhs1*、pSTV28-*rhs2*、pSTV28-*rhs1-2* 将回补质粒电转入基因缺失株感受态细胞 CVCC541 $\Delta rhs1$ 、CVCC541 $\Delta rhs2$ 、CVCC541 $\Delta rhs1-2$ 中, 通过 pSTV28-F/pSTV28-R 引物鉴定测序, 构建基因回补株 C- $\Delta rhs1$ 、C- $\Delta rhs2$ 、C- $\Delta rhs1-2$ 。

1.5 细菌生化特性试验

挑取经纯化鉴定的亲本菌株 CVCC541、基因缺失菌株 CVCC541 $\Delta rhs1$ 、CVCC541 $\Delta rhs2$ 、

CVCC541 Δ *rhs1-2* 和基因回补菌株 C- Δ *rhs1*、C- Δ *rhs2*、C- Δ *rhs1-2* 单菌落悬浮于培养基中,制成 0.5 麦氏浊度的均一菌悬液,分别接种至生化反应管中,将接种后的鉴定条和反应管静置于 37 °C 培养 24 h,观察并记录结果。

1.6 细菌生物被膜形成能力的测定

采用 96 孔微孔板法测定细菌生物被膜形成能力,将亲本株、基因缺失株和基因回补株过夜培养,分别按 1:10 转接于 LB 液体培养基并以 200 μ L/孔加入 96 孔板中,同时以 LB 作阴性对照,每组 6 个重复,静置于 37 °C 培养 72 h,弃培养基并用无菌 PBS 洗涤 3 次后晾干,用结晶紫染色 30 min,用 95% 无水乙醇溶解,酶标仪测定其 OD_{600} 吸光度。每次试验重复 3 次,取平均值,计算统计学差异。

1.7 亲本株、基因缺失株和回复株对抗生素敏感性的比较

参照 national committee for clinical laboratory standards (NCCLS) 标准,使用 Kirby-Bauer 纸片扩散法(K-B 法)进行抗生素敏感性试验^[22]。分别将鼠伤寒沙门菌亲本株、基因缺失株和基因回复株,37 °C、180 r/min 振荡培养过夜,将培养物调整至 0.5 个麦氏浊度,涂布于无抗性的 LB 固体培养基上,并贴上药敏纸片,培养 24 h 测定药敏纸片的抑菌圈直径,以毫米计,判定被检细菌对每种药物的敏感性:敏感(susceptible, S)、中敏(intermediate, I)和耐药(resistance, R),以检测抗生素对该菌的抑制程度。试验重复 3 次。

1.8 亲本株与 *rhs* 基因缺失株的体外竞争试验

为测定 *rhs* 基因调控的效应因子 Rhs 对鼠伤寒沙门菌竞争性生长能力的影响,进行体外竞争试验。将亲本株 CVCC541 及含卡那霉素抗性的缺失株 Δ *rhs1::kan*、 Δ *rhs2::kan* 和 Δ *rhs1-2::kan*

分别按 1:100 接种于 LB 培养基中,以 37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.7,分别将亲本株与缺失株细菌浓度调至 1×10^8 CFU/mL 以 1:1 比例混匀,接种于 LB 液体培养基 37 °C 静置培养 4 h,培养结束后,经 10^6 稀释,分别用 kanamycin 抗性和无抗性的 LB 固体培养基进行细菌计数,37 °C 培养 18 h 观察结果,按照参考文献[23]的方法计算竞争指数(competition index, CI)值。

1.9 血清杀菌试验

为了测定鼠伤寒沙门菌亲本株、基因缺失株和回复株抗血清补体杀菌能力,参照副猪嗜血杆菌抗血清杀伤试验方法^[24]进行。采集 SPF 级小鼠全血分离血清,以 90 μ L/孔加入 96 孔细胞板备用,将培养至对数生长期的各菌用无菌 PBS 调整至 OD_{600} 为 0.3,取 10 μ L 菌液至 100% 血清中混匀,同时以 60 °C 灭活的小鼠血清作为阴性血清对照,重复 3 个孔,37 °C 静置培养 1 h,培养结束后用无菌 PBS 倍比稀释,取 10^2 – 10^4 倍稀释液涂于 LB 平皿上,37 °C 培养 18 h 后计数菌落。试验重复 3 次,计算亲本株、基因缺失株和基因回复株的相对存活率。

1.10 体内载菌量试验

为了测定亲本株、基因缺失株和基因回复株在小鼠脾脏和肝脏内的定殖,分别将鼠伤寒沙门菌亲本株 CVCC541 及基因缺失株 CVCC541 Δ *rhs1*、CVCC541 Δ *rhs2*、CVCC541 Δ *rhs1-2* 和基因回复株 C- Δ *rhs1*、C- Δ *rhs2*、C- Δ *rhs1-2* 接种于 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.7,3 000 \times g 离心 10 min 弃上清,收集菌体用无菌 PBS 调整至 OD_{600} 为 1.0,将菌液稀释至 1×10^6 CFU/mL,腹腔注射 6 周龄 SPF 级昆明小鼠,每组 5 只,攻毒剂量为 0.1 mL,分别在攻毒 48 h 后处死,无菌条件取小鼠肝脏和脾脏称量并加入无菌 PBS 匀

浆, 10 倍比稀释后取 100 μL 涂布于 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养进行菌落计数, 测定不同菌株在小鼠肝脏和脾脏的定殖生存能力。

1.11 细菌感染小鼠后炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的测定

为了测定小鼠感染细菌后体内相关炎症因子分泌量的差异。将 40 只小鼠随机分为 8 组 (7 组试验组和 1 组对照组), 按体内载菌量试验方法培养细菌, 采用腹腔注射攻毒方式, 试验组以每毫升菌液中含有的细菌群落总数为 1×10^6 CFU/mL 的菌液注射小鼠, 剂量为 0.1 mL/只, 对照组给予同等剂量灭菌 PBS, 分别于攻毒后 48 h 时眼球采血。按 ELISA 商品试剂盒说明分别测定各组细菌对小鼠 IL-1 β 和 IL-18 释放量的影响。

1.12 数据统计分析

试验数据使用 SPSS2.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件分析, 试验数据差异性分析采用 t 检验或者 ANOVA 分析, 各组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *rhs1*、*rhs2*、*rhs1-2* 基因缺失株、回补株的构建及鉴定结果

利用 Red 同源重组系统, 首先由 pKD4 提供模板 PCR 扩增带 FRT 位点的抗药性基因; 其次将该线性打靶基因转入含 pKD46 表达 Red 重组酶的 CVCC541 菌株中进行同源重组; 最后利用 pCP20 表达的 FLP 翻转酶消除抗药性基因构建基因缺失株。采用引物对 P1-F/P1-R、P2-F/P2-R 和 P1-F/P2-R, 以 pKD4 质粒为模板进行 PCR 扩增, 分别得到 1 567 bp 带有 *rhs1*、*rhs2*、*rhs1-2* 同源臂的卡那霉素抗性基因片段 *rhs1*-pKD4、*rhs2*-pKD4 和 *rhs1-2*-pKD4 (图 1),

将同源片段分别电转入含 pKD46/CVCC541 的感受态菌株, 得到 $\Delta rhl1::kan$ 、 $\Delta rhl2::kan$ 和 $\Delta rhl1-2::kan$ 菌株并以 pCP20 质粒进行消抗, 以最终获得的菌株为模板, 同时以亲本株作为阴性对照, 分别以鉴别引物对 P3-F/P3-R、P4-F/P4-R 和 P3-F/P4-R 进行 PCR 鉴定。结果显示, *rhl1*、*rhl2* 和 *rhl1-2* 基因缺失株扩增出 535、1 131 和 633 bp 的 DNA 片段, 亲本株作为阴性对照则分别扩增出 4 316、1 855 和 5 918 bp 的 DNA 片段(图 1)。测序结果表明缺失株构建成功, 将新菌株分别命名为 CVCC541 $\Delta rhl1$ 、CVCC541 $\Delta rhl2$ 和 CVCC541 $\Delta rhl1-2$ 。用引物对 P5-F/P5-R、P6-F/P6-R、P5-F/P6-R 扩增含有酶切位点、启动子、开放阅读框的 *rhl1*、*rhl2*、*rhl1-2* 回补基因片段并构建回补质粒 pSTV28-*rhl1*、pSTV28-*rhl2*、pSTV28-*rhl1-2*, 双酶切鉴定结果得到 5 971、2 719、6 005 bp 的回补基因片段和 2 999 bp 的 pSTV28 载体片段(图 2)。将回补质粒电转入基因缺失株感受态细胞 CVCC541 $\Delta rhl1$ 、CVCC541 $\Delta rhl2$ 、CVCC541 $\Delta rhl1-2$ 构建得到相应的回补株, 以 pSTV28-F/pSTV28-R 为引物对筛选得到的回补株进行 PCR 扩增获得 5 971、2 719、6 005 bp 的 DNA 片段(图 2)。结果表明回补质粒被导入缺失株中, 回补株分别命名为 C- $\Delta rhl1$ 、C- $\Delta rhl2$ 、C- $\Delta rhl1-2$ 。

2.2 细菌生化特性试验结果

为了研究效应因子 Rhs 在细菌生长代谢中发挥的作用, 利用生化反应试剂盒进行试验。结果显示, 亲本株 CVCC541、缺失株 CVCC541 $\Delta rhl1$ 、CVCC541 $\Delta rhl2$ 、CVCC541 $\Delta rhl1-2$ 和回补株 C- $\Delta rhl1$ 、C- $\Delta rhl2$ 、C- $\Delta rhl1-2$ 的甘露醇、山梨醇、卫矛醇、水杨苷、ONPG、丙二酸盐、尿素、赖氨酸、硫化氢、靛基质、氰化钾等多个生化反应的结果均相同(表 2), 表明

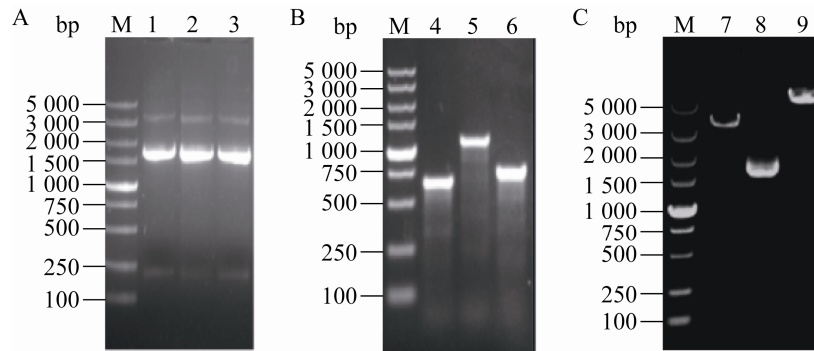


图 1 基因缺失菌株 CVCC541 Δ *rhs1*、CVCC541 Δ *rhs2*、CVCC541 Δ *rhs1-2* 的 PCR 鉴定结果 M: DL5000 DNA Marker; 1: *rhs1*-pKD4 同源片段 PCR 鉴定结果; 2: *rhs2*-pKD4 同源片段 PCR 鉴定结果; 3: *rhs1-2*-pKD4 同源片段 PCR 鉴定结果; 4: CVCC541 Δ *rhs1* PCR 结果; 5: CVCC541 Δ *rhs2* PCR 结果; 6: CVCC541 Δ *rhs1-2* PCR 结果; 7: *rhs1* 基因未敲除 PCR 结果; 8: *rhs2* 基因未敲除 PCR 结果; 9: *rhs1-2* 基因未敲除 PCR 结果

Figure 1 PCR identification results of gene deletion strains CVCC541 Δ *rhs1*, CVCC541 Δ *rhs2*, CVCC541 Δ *rhs1-2*. M: DL5000 DNA Marker; 1: PCR identification result of *rhs1*-pKD4 homologous fragment; 2: PCR identification result of *rhs2*-pKD4 homologous fragment; 3: PCR identification result of *rhs1-2*-pKD4 homologous fragment; 4: CVCC541 Δ *rhs1* PCR result; 5: CVCC541 Δ *rhs2* PCR result; 6: CVCC541 Δ *rhs1-2* PCR result; 7: PCR results of *rhs1* gene not knockout; 8: PCR results of *rhs2* gene not knockout; 9: PCR results of *rhs1-2* gene without knockout.

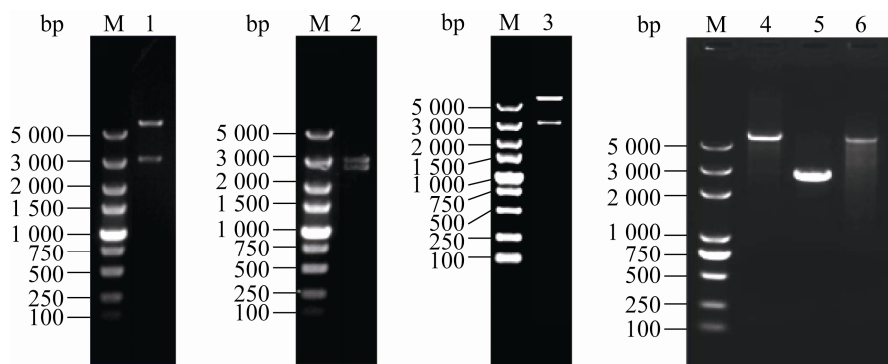


图 2 基因回补菌株 C- Δ *rhs1*、C- Δ *rhs2*、C- Δ *rhs1-2* 的鉴定结果 M: DL5000 DNA Marker; 1: 双酶切鉴定回补质粒 pSTV28-*rhs1*; 2: 双酶切鉴定回补质粒 pSTV28-*rhs2*; 3: 双酶切鉴定回补质粒 pSTV28-*rhs1-2*; 4: *rhs1* 基因回补菌株 C- Δ *rhs1* PCR 鉴定结果; 5: *rhs2* 基因回补菌株 C- Δ *rhs2* PCR 鉴定结果; 6: *rhs1-2* 基因回补菌株 C- Δ *rhs1-2* PCR 鉴定结果

Figure 2 Identification results of gene-replenishing strains C- Δ *rhs1*, C- Δ *rhs2*, C- Δ *rhs1-2*. M: DL5000 DNA Marker; 1: Double restriction digestion to identify the supplementary plasmid pSTV28-*rhs1*; 2: Double restriction digestion to identify the supplementary plasmid pSTV28-*rhs2*; 3: Double restriction digestion to identify the supplementary plasmid pSTV28-*rhs1-2*; 4: PCR identification result of *rhs1* gene-replenishing strain C- Δ *rhs1*; 5: *rhs2* gene-replenishing strain C- Δ *rhs2* PCR identification result; 6: *rhs1-2* gene-replenishing strain C- Δ *rhs1-2* PCR identification result.

表 2 生化特性比较结果

Table 2 Comparison of the biochemical characterization

项目 Item	菌株 Strains						
	CVCC541	CVCC541 Δ <i>rhs1</i>	CVCC541 Δ <i>rhs2</i>	CVCC541 Δ <i>rhs1-2</i>	C- Δ <i>rhs1</i>	C- Δ <i>rhs2</i>	C- Δ <i>rhs1-2</i>
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
卫矛醇 Dulcose	+	+	+	+	+	+	+
水杨苷 Salicin	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐 Malonate	-	-	-	-	-	-	-
尿素 Urea	-	-	-	-	-	-	-
赖氨酸 Lysine	+	+	+	+	+	+	+
赖氨酸对照 Lysine control	+	+	+	+	+	+	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	+	+	+	+	+	+	+
靛基质 Indigo	-	-	-	-	-	-	-
氰化钾 Potassium cyanide	+	+	+	+	+	+	+
氰化钾对照 Potassium cyanide control	+	+	+	+	+	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

rhs 基因编码的效应因子 Rhs 不影响鼠伤寒沙门菌的生化代谢过程。

2.3 细菌生物被膜形成能力测定结果

为了研究效应因子 Rhs 对于鼠伤寒沙门菌生物被膜形成能力的影响, 用结晶紫染色法对各菌株的生物被膜进行定量。结果显示, 缺失株和回补株与亲本株 CVCC541 相比, 形成生物被膜的厚度无显著差异($P < 0.05$) (图 3), 提示效应因子 Rhs 不参与鼠伤寒沙门菌生物被膜形成的调控。

2.4 亲本株、基因缺失株和回补株对抗生素敏感性的比较结果

为了评价鼠伤寒沙门菌效应因子 Rhs 在细菌耐药性方面是否发挥作用, 采用 K-B 纸片琼脂扩散法, 选择氨苄西林、头孢唑林、环丙沙星、诺氟沙星、链霉素、克拉霉素、四环素、万古霉素、复方新诺明、呋喃妥因、氯霉素、利福平、庆大霉素、多粘菌素 B 等 14 种抗生素对亲本株、基因缺失株和回补株的耐药性进行检测。根据 NCCLS 判定标准进行判定, 结果

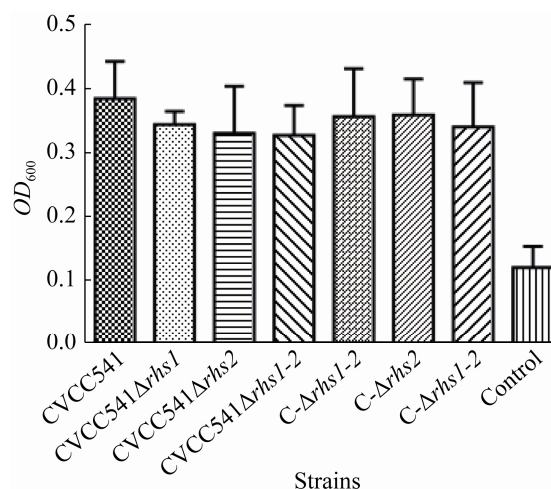


图 3 细菌生物被膜形成能力测定

Figure 3 Determination of the bacterial biofilm formation.

显示, 鼠伤寒沙门菌对万古霉素和利福平具有耐药性, 对克拉霉素中等敏感, 对其他抗生素敏感。亲本株、*rhs* 基因缺失株和回补株对抗生素的敏感性无显著差异(表3), 表明效应因子 Rhs 不会改变鼠伤寒沙门菌的耐药性。

表 3 药物敏感性结果(抑菌圈直径)

Table 3 Results of drug sensitivity (Antimicrobial zone diameter (mm))

抗生素 Antibiotics	菌株 Strain							抗生素敏感性判断标准 Standard for antibiotic sensitivity
	CVCC541	CVCC541 Δ <i>rhs1</i>	CVCC541 Δ <i>rhs2</i>	CVCC541 Δ <i>rhs1-2</i>	C- Δ <i>rhs1</i>	C- Δ <i>rhs2</i>	C- Δ <i>rhs1-2</i>	
氨苄西林 Ampicillin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 13 ; I: 14–16; S: ≥ 17
头孢唑林 Cefazolin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 14 ; I: 15–17; S: ≥ 18
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 15 ; I: 16–20; S: ≥ 21
诺氟沙星 Norfloxacin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 12 ; I: 13–16; S: ≥ 17
链霉素 Streptomycin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 11 ; I: 12–14; S: ≥ 15
克拉霉素 Clarithromycin	I	I	I	I	I	I	I	R: ≤ 13 ; I: 14–17; S: ≥ 18
四环素 Tetracycline	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 14 ; I: 15–18; S: ≥ 19
万古霉素 Vancomycin	R	R	R	R	R	R	R	R: ≤ 14 ; I: 15–16; S: ≥ 17
复方新诺明 Compound sulfamethoxazole	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 10 ; I: 10–16; S: ≥ 16
呋喃妥因 Nitrofurantoin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 14 ; I: 15–16; S: ≥ 17
氯霉素 Chloramphenicol	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 12 ; I: 13–17; S: ≥ 18
利福平 Rifampicin	R	R	R	R	R	R	R	R: ≤ 16 ; I: 17–19; S: ≥ 20
庆大霉素 Gentamicin	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 12 ; I: 13–14; S: ≥ 15
多粘菌素 B Polymyxin B	S	S	S	S	S	S	S	R: ≤ 8 ; I: 8–11; S: ≥ 12

注: R: 耐药; I: 中等敏感; S: 敏感

Note: R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible.

2.5 细菌体外竞争试验结果

通过亲本株与基因缺失株的体外竞争试验,验证效应因子 *Rhs* 在细菌间竞争的功能。所得结果按照竞争指数(CI)方法进行计算分析,竞争指数(CI)计算方法:输出量的比率(缺失株/亲本株)除以输入量的比率(缺失株/亲本

株)。CI 值在 0.1–1.0 之间,表明缺失株的毒力被轻度致弱;CI 值在 0.01–1.00 之间,表明缺失株的毒力被中度致弱;CI 值在 0.00–0.01 之间,表明基因缺失株的毒力被高度致弱。计算得到亲本株 CVCC541 和含卡那霉素抗性的缺失株 Δ *rhs1*::kan 的 CI 值为 0.85, CVCC541

和 $\Delta rhs2::kan$ 的 CI 值 0.77, CVCC541 和 $\Delta rhs1-2::kan$ 的 CI 值 0.87。体外竞争试验结果表明, 基因缺失株毒力被轻度致弱, 缺失菌株竞争力低于亲本株, 效应因子 Rhs 在鼠伤寒沙门菌间竞争中发挥了作用。

2.6 血清杀菌试验结果

将鼠伤寒沙门菌亲本株、*rhs* 基因缺失株及回补菌株与 SPF 级健康小鼠血清混合同时以灭活的小鼠血清作为阴性对照, 评测细菌对抗血清补体杀伤的能力。细菌存活率=(当前菌数/初始菌数) \times 100%。血清杀菌结果显示(图 4), 以亲本株 CVCC541 在小鼠血清的存活率为标准, *rhs* 基因缺失株和相应的回补株在血清中的相对存活率较亲本株均无显著差异($P>0.05$)。表明效应因子 Rhs 不影响鼠伤寒沙门菌抗血清杀菌能力。

2.7 小鼠体内载菌量测定结果

分别对感染 48 h 后的小鼠器官组织进行平板计数, 统计肝脏和脾脏中的细菌数量, 计算器官组织内的载菌量 \log_{10} (CFU/g), 载菌量(CFU/g)=[3 个平板的 CFU 的平均数 \times 匀浆液体积(mL) \times 稀释倍数]/组织重量(g)。在小鼠脾脏中, 亲本株 CVCC541 的 \log_{10} (CFU/g)

平均值为 6.51, 缺失株 CVCC541 $\Delta rhs1$ 、CVCC541 $\Delta rhs2$ 和 CVCC541 $\Delta rhs1-2$ 的 \log_{10} (CFU/g) 分别为 6.38、6.40 和 6.37, 回补株 C- $\Delta rhs1$ 、C- $\Delta rhs2$ 和 C- $\Delta rhs1-2$ 分别为 6.45、6.47 和 6.46。在肝脏中亲本株 CVCC541 的 \log_{10} (CFU/g) 平均值为 5.96, 缺失株 CVCC541 $\Delta rhs1$ 、CVCC541 $\Delta rhs2$ 和 CVCC541 $\Delta rhs1-2$ 分别为 5.70、5.74 和 5.68, 回补株 C- $\Delta rhs1$ 、C- $\Delta rhs2$ 和 C- $\Delta rhs1-2$ 分别为 5.93、5.84 和 5.90 (图 5)。结果显示, 缺失株感染小鼠后在肝脏和脾脏中的细菌量均低于亲本株($P<0.05$), 其中, 缺失株 CVCC541 $\Delta rhs1-2$ 在肝脏中的定殖能力显著下降($P<0.01$)。表明效应因子 Rhs 缺乏导致鼠伤寒沙门菌在小鼠脾脏和肝脏组织中的定殖力降低。

2.8 细菌感染小鼠后细胞因子分泌的测定结果

7 株细菌分别感染小鼠后的细胞因子分泌量均显著高于空白对照组($P<0.01$), 其中 3 株基因缺失株细菌与亲本株 CVCC541 相比, 小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-18 含量有所下降($P<0.05$), 而亲本株与回补株相比无显著差异($P<0.05$) (图 6), 说明鼠伤寒沙门菌 *rhs* 基因编码的效应因子 Rhs 能够调控宿主分泌 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子。

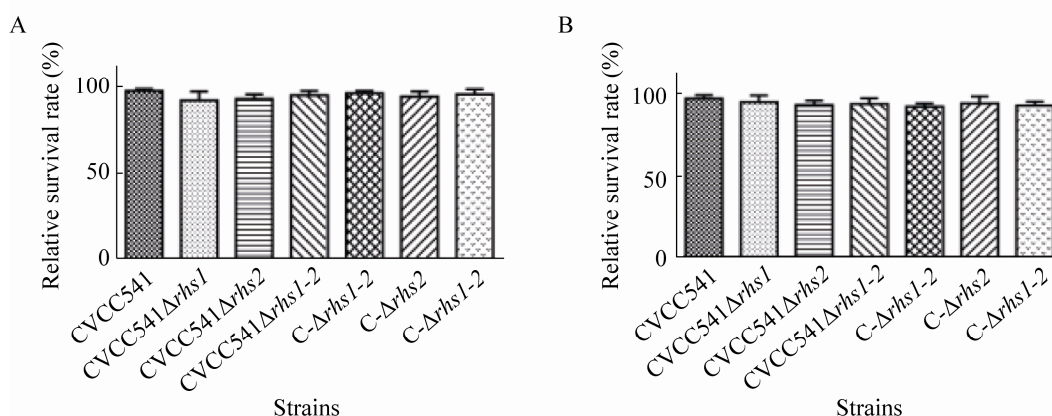


图 4 各菌株抗小鼠血清杀菌能力的比较 A: 小鼠血清存活; B: 阴性对照

Figure 4 Comparison of bacterial resistances to serum. A: Survival in mouse serum; B: Negative control.

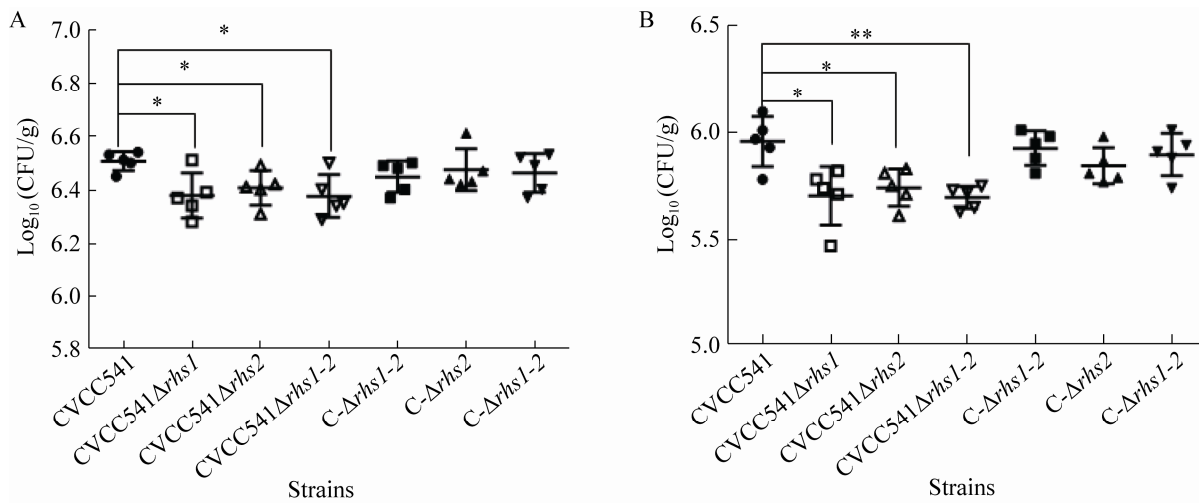


图5 各菌株在小鼠脾组织和肝组织的细菌载量 A: 脾; B: 肝

Figure 5 Bacterial loads in spleen and liver of infected mice. A: Spleen; B: Liver. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

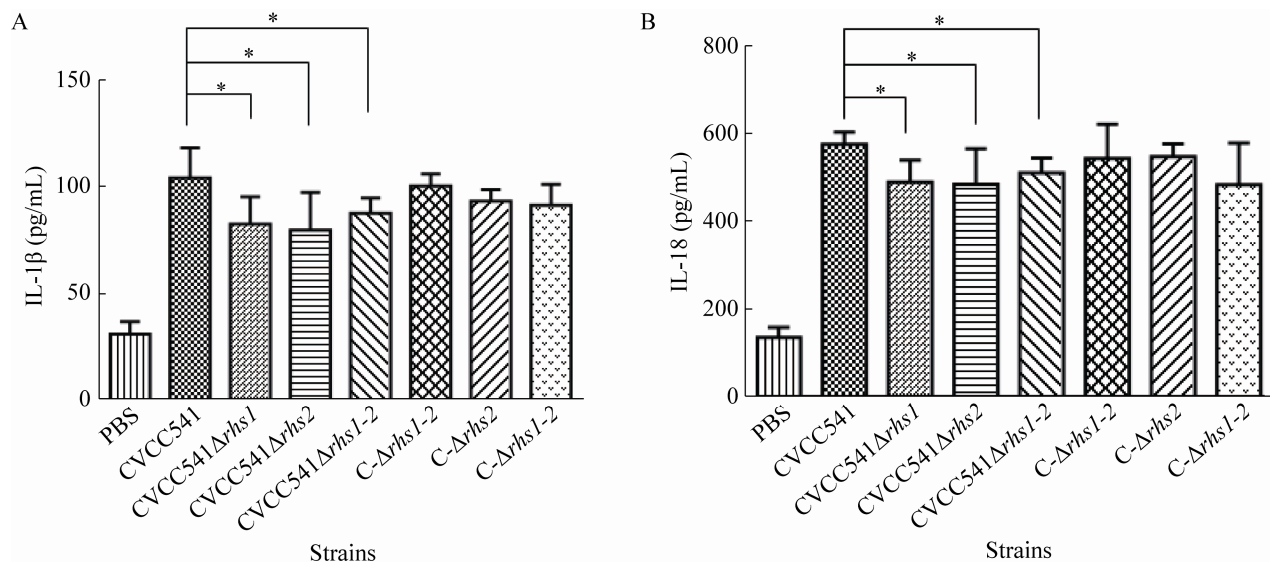


图6 各菌株感染小鼠后血清中 IL-1 β (A)和 IL-18 (B)的变化

Figure 6 Changes of IL-1 β (A) and IL-18 (B) in the serum of mice infected with each strain. *: $P < 0.05$.

3 讨论与结论

鼠伤寒沙门菌能够侵入宿主细胞并在胞内存活,这与细菌通过 T6SS 释放到胞内的效应因子功能密切相关。近年来对细菌效应因子功能的研究取得了重要进展,效应因子能够影

响宿主的炎症反应、重塑细胞骨架和促进沙门菌在宿主体内的存活^[25]。因此,对细菌效应因子的研究备受人们关注。

rhs 基因广泛存在于革兰氏阴性菌中,为了更进一步探究该基因编码的效应因子 Rhs 的作用,本试验通过 Red 同源重组技术构建 *rhs* 基

因缺失株及回补株, 并对其生物学特性进行研究。试验结果表明, *rhs* 基因的缺失不影响鼠伤寒沙门菌的生化特性和细菌生物被膜的形成; 与亲本株相比, 缺失株和回补株对抗生素的敏感性无变化; 各菌株抗小鼠血清杀菌的能力无明显差异。细菌间竞争试验结果显示, 基因缺失株的竞争指数(CI)值分别在 0.1–1.0 之间, 基因缺失株种间竞争能力下降, 这提示鼠伤寒沙门菌效应因子 Rhs 参与细菌间竞争, 之所以出现缺失株的种间竞争能力减弱, 是因为物理性的穿透并不能对细胞产生致死性伤害, 细菌之间会通过 T6SS 向靶细胞转运蛋白, 而分泌的蛋白则决定了 T6SS 的杀伤功能^[9,26]。有研究发现, Rhs 家族蛋白和同源免疫蛋白与细菌接触依赖的生长抑制(CDI)有关^[27]。以上报道表明效应因子 Rhs 具有一定的毒性并且在细菌的竞争中发挥作用, 本研究结果也与文献报道一致。小鼠组织载菌量试验中, 缺失株在小鼠脾脏和肝脏中的定殖菌量均少于亲本株且差异显著 ($P < 0.05$)。利用 ELISA 方法检测细菌感染小鼠血清中促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 的水平, 结果显示, 相较于亲本株, 基因缺失株感染宿主后血清中炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的水平降低。炎症因子是宿主天然免疫系统的一部分, 炎症因子的激活与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (caspase-1, casp-1) 的激活有关, casp-1 的激活促使细胞因子 IL-1 β 、IL-18 的加工和释放^[28]。虽然在感染早期, IL-1 β 和 IL-18 的激活通常起到清除病原体的作用, 但某些微生物可以利用促炎因子引起宿主过度炎症反应而加重感染^[29]。例如, 志贺氏菌、肠道沙门氏菌和梭状芽胞杆菌分别分泌 IpaB、SipB 和毒素 TcdA/B, 以激活 casp-1 并导致 IL-1 β 释放, 随之而来的是宿主过度炎症, 这一机制被认为是这些细菌致病

的关键一步^[29-32]。本研究中亲本株感染小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平、组织载菌量均高于缺失株, 猜测效应因子 Rhs 可能激活了蛋白酶 casp-1, 激活的 casp-1 进一步切割加工白介素 IL-1 β 、IL-18 的前体, 使其成为成熟形式并且分泌到胞外, 随着促炎因子 IL-1 β 、IL-18 的释放引起小鼠过度炎症反应, 导致脾和肝组织中亲本株细菌数量增加。

目前对鼠伤寒沙门菌效应因子 Rhs 的生物学研究仅是开始, 找出效应因子 Rhs 在宿主内的靶蛋白, 并阐明效应因子如何通过对靶蛋白的修饰来影响宿主细胞的正常活动, 这是下一步重要的研究方向。

REFERENCES

- [1] Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(1): 53-66
- [2] Haselbeck AH, Panzner U, Im J, Baker S, Meyer CG, Marks F. Current perspectives on invasive nontyphoidal *Salmonella* disease[J]. Current Opinion in Infectious Diseases, 2017, 30(5): 498-503
- [3] 石永琼. 沙门氏菌的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(25): 37-38, 41
Shi YQ. Advance on *Salmonella*[J]. World Latest Medicine Information, 2016, 16(25): 37-38, 41 (in Chinese)
- [4] Chassaing B, Cascales E. Antibacterial weapons: targeted destruction in the microbiota[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(4): 329-338
- [5] Hayes CS, Aoki SK, Low DA. Bacterial contact-dependent delivery systems[J]. Annual Review of Genetics, 2010, 44: 71-90
- [6] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system[J]. PNAS, 2006, 103(5): 1528-1533
- [7] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J].

- Science, 2006, 312(5779): 1526-1530
- [8] Guérin J, Bigot S, Schneider R, Buchanan SK, Jacob-Dubuisson F. Two-partner secretion: combining efficiency and simplicity in the secretion of large proteins for bacteria-host and bacteria-bacteria interactions[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 148
- [9] Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(1): 9-21
- [10] 陈君逸, 邹清华. 细菌VI型分泌系统的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(8): 158-161
- Chen JY, Zou QH. Advances in bacterial type VI secretion system-A review[J]. *Journal of Medical Research*, 2013, 42(8): 158-161 (in Chinese)
- [11] Kapitein N, Mogk A. Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 52-58
- [12] Starsta M, Hammarlof DL, Waneskog M, et al. RHS-elements function as type II toxin-antitoxin modules that regulate intra-macrophage replication of *Salmonella Typhimurium*[J]. *PLoS Genet*. 2020, 16(2): e1008607.
- [13] Jackson AP, Thomas GH, Parkhill J, Thomson NR. Evolutionary diversification of an ancient gene family (*rhs*) through C-terminal displacement[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 584
- [14] Busby JN, Panjikar S, Landsberg MJ, Hurst MRH, Lott JS. The BC component of ABC toxins is an RHS-repeat-containing protein encapsulation device[J]. *Nature*, 2013, 501(7468): 547-550
- [15] Koskiniemi S, Lamoureux J G, Nikolakakis K C, et al. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition[J]. *PNAS*. 2013, 110(17): 7032-7037.
- [16] Whitney JC, Beck CM, Goo YA, Russell AB, Harding BN, De Leon JA, Cunningham DA, Tran BQ, Low DA, Goodlett DR, et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(3): 529-542
- [17] Alcoforado Diniz J, Coulthurst SJ. Intra species competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(14): 2350-2360
- [18] McNulty C, Thompson J, Barrett B, Lord L, Andersen C, Roberts IS. The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(3): 907-922
- [19] Sisto A, Cipriani MG, Morea M, Lonigro SL, Valerio F, Lavermicocca P. An Rhs-like genetic element is involved in bacteriocin production by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98(4): 505-517
- [20] Kung VL, Khare S, Stehlik C, Bacon EM, Hughes AJ, Hauser AR. An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome[J]. *PNAS*, 2012, 109(4): 1275-1280
- [21] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *PNAS*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [22] 王圣花. 副猪嗜血杆菌的药敏试验[J]. *山东畜牧兽医*, 2018, 39(1): 4-5
- Wang SH. Drug sensitivity test of *Haemophilus parasuis*[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018, 39(1): 4-5 (in Chinese)
- [23] 薛涛, 陈先亮, 高崧, 刘秀梵. 产志贺毒素大肠杆菌 O18 XZ113 株主要毒力基因 *eaeA*、*stx2*、*ehxA* 突变株的构建及其对小鼠的致病作用[J]. *微生物学报*, 2011, 51(12): 1655-1662
- Xue T, Chen XL, Gao S, Liu XF. Construction of the XZ113 $\Delta eaeA$, XZ113 $\Delta stx2$ and XZ113 $\Delta ehxA$ mutants of STEC O18 XZ113 and their pathogenicity in mice[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(12): 1655-1662 (in Chinese)
- [24] 瑾瑾, 张禄滑, 文心田, 李英, 代科, 周鹏, 赵玉佳, 曹三杰, 黄小波, 伍锐, 等. 副猪嗜血杆菌 *potD* 基因缺失株的构建及其部分生物学特性[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(11): 2274-2279
- Jin J, Zhang LH, Wen XT, Li Y, Dai K, Zhou P, Zhao YJ, Cao SJ, Huang XB, Wu R, et al. Construction and characterization of a *Haemophilus parasuis potD* mutant strain[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2016, 47(11): 2274-2279 (in Chinese)
- [25] 王佐强, 姚玉峰. 沙门菌效应蛋白对宿主细胞的影响及分子机制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(7): 1158-1166
- Wang ZQ, Yao YF. Roles of *Salmonella* effectors in manipulating host cell function[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(7): 1158-1166 (in Chinese)
- [26] Dong TG, Dong SQ, Catalano C, Moore R, Liang XY,

- Mekalanos JJ. Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes[J]. PNAS, 2015, 112(7): 2181-2186
- [27] Poole SJ, Diner EJ, Aoki SK, Braaten BA, t'Kint De Roodenbeke C, Low DA, Hayes CS. Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition (CDI) and rearrangement hotspot (Rhs) systems[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(8): e1002217
- [28] 邵峰. 病原细菌和宿主天然免疫系统相互拮抗的机制研究[J]. 中国基础科学, 2012, 14(1): 7-13.
Shao F. Study on the antagonistic mechanism between pathogenic bacteria and host natural immune system[J]. China basic science, 2012, 14(1): 7-13 (in Chinese)
- [29] Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize peyer's patches in a murine typhoid model[J]. Journal of Experimental Medicine, 2000, 192(2): 249-258
- [30] Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1[J]. PNAS, 1999, 96(5): 2396-2401
- [31] Schroeder GN, Jann NJ, Hilbi H. Intracellular type III secretion by cytoplasmic *Shigella flexneri* promotes caspase-1-dependent macrophage cell death[J]. Microbiology, 2007, 153(9): 2862-2876
- [32] Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A, Potentier MS, Schenck LP, Vilaysane A, Seamone ME, Feng HP, et al. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome[J]. Gastroenterology, 2010, 139(2): 542-552.e3