



研究报告

钼酸盐转运体 ModABC 促进肺炎克雷伯菌肌肉感染及其治疗新思路

王慧¹ 卢慧改¹ 徐丽² 王萌¹ 张福升¹ 田玉姣¹ 李蓓² 李默然^{*1}¹ 湖北医药学院基础医学院 湖北 十堰 442000² 湖北医药学院生物医药研究院 湖北 十堰 442000

摘要:【背景】肺炎克雷伯菌(肺克)是医院感染和社区获得性感染的重要病原菌,由于近年来肺克菌株耐药情况越来越严重,使得其感染在临床治疗上更加棘手。目前肺克感染引起化脓性肌炎的罕见病例越来越多,而深层肌肉组织感染可能会形成厌氧环境,钼酸盐转运体 ModABC 是细菌厌氧硝酸盐呼吸所必需。前期研究发现 ModA 可能与肺克毒力正相关。【目的】研究钼酸盐转运体 ModABC 对肺克肌肉感染的作用及钼酸盐治疗的可能性。【方法】构建 *modA* 无痕缺失突变株与回补株,通过检测体外厌氧生长、硝酸还原酶活性和小鼠肌肉感染实验分析 ModABC 对肺克肌肉感染的作用及机制;通过钼酸盐处理(体外、体内)探讨钼酸盐治疗肺克肌肉感染的可能性及疗效。【结果】成功构建了 *modA* 无痕缺失突变株与回补株,发现 *modA* 基因敲除后肺克体外厌氧生长明显被极大地抑制、硝酸还原酶活性显著降低,小鼠肌肉脓肿模型显示敲除株 $\Delta modA$ 感染肌肉脓肿大大消减,并且在肌肉内生长及侵袭受限;体外钼酸盐处理能够抑制野生株 WT 厌氧硝酸盐呼吸,在肌肉脓肿模型中也能显著抑制 WT 生长,但对敲除株 $\Delta modA$ 无影响。【结论】钼酸盐转运体 ModABC 通过增强侵袭力和促进厌氧硝酸盐呼吸来提供适应优势而促进肺克肌肉感染,钼酸盐可以降低由 ModA 赋予的适应优势而对肺克肌肉感染具有一定的治疗作用。本研究有助于阐明钼离子对肺克致病性的作用机制及其治疗提供新思路,为深入研究肺克尤其是耐碳青霉烯高毒力肺克感染的治疗奠定基础。

关键词: 肺炎克雷伯菌, 钼酸盐转运体, ModA, 硝酸还原酶, 肌肉感染, 钼酸盐

Molybdate transporter ModABC contributes to *Klebsiella pneumoniae* muscle infection and new insight into its treatmentWANG Hui¹ LU Huigai¹ XU Li² WANG Meng¹ ZHANG Fusheng¹ TIAN Yujiao¹
LI Bei² LI Moran^{*1}¹ School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China² Biomedical Research Institute, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract: [Background] *Klebsiella pneumoniae* (Kp) is a major pathogen that causes nosocomial

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81902034); Innovative Research Program for Graduates of Hubei University of Medicine (YC2020004)

***Corresponding author:** Tel: 86-719-8891088; E-mail: moranli@whu.edu.cn

Received: 25-11-2020; **Accepted:** 24-12-2020; **Published online:** 25-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81902034); 湖北医药学院研究生科技创新项目(YC2020004)

***通信作者:** Tel: 0719-8891088; E-mail: moranli@whu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-25; **接受日期:** 2020-12-24; **网络首发日期:** 2021-03-25

infections and community-acquired infections. In recent years, drug resistance in *Kp* has become more and more serious, making its treatment less effective. So it becomes a challenge in clinical treatment. At present, more unusual cases of pyomyositis caused by *Kp* have been reported. Infection in deep muscle may form an anaerobic environment. The molybdate transporter ModABC is essential for bacterial anaerobic nitrate respiration. Previous studies showed that ModA might be positively correlated with *Kp* virulence. **[Objective]** To investigate the effect of molybdate transporter ModABC on *Kp* muscle infection and the potential use of tungstate in treatment. **[Methods]** The *modA* traceless deletion mutant and complementary strain were constructed. Then the effect and mechanism of ModABC on *Kp* muscle infection were analyzed by monitoring anaerobic growth, nitrate reductase activity *in vitro* and mouse muscle infection experiments *in vivo*. The possibility and efficacy of tungstate treatment for *Kp* muscle infection were discussed in this study. **[Results]** The *modA* traceless deletion mutant and complementary strain were successfully constructed. This study found that deletion of *modA* led to significantly inhibited anaerobic growth of *Kp* and reduced nitrate reductase activity *in vitro*. The knockout strain $\Delta modA$ showed greatly reduced muscle abscess, intramuscular growth and invasion in mouse muscle abscess model. *In vitro* tungstate treatment inhibited the anaerobic nitrate respiration of wild strain WT, and also significantly inhibited the growth of WT in muscle abscess model, but had no influence on strain $\Delta modA$. **[Conclusion]** The molybdate transporter ModABC contributes to *Kp* muscle infection by providing fitness advantage through enhancing invasiveness and promoting anaerobic nitrate respiration. Tungstate can reduce the fitness advantage conferred by ModA and has a certain therapeutic effect on *Kp* muscle infection. This study is helpful to elucidate the mechanism of molybdenum's effect on the pathogenicity of *Kp*. It also provides new insight into the treatment, laying a foundation for further studies, especially carbapenem-resistant hypervirulent *Kp* infection.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, molybdate transporter, ModA, nitrate reductase, muscle infection, tungstate

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, 简称肺克)主要定植于宿主肠道、呼吸道、泌尿生殖道黏膜表面, 目前已成为仅次于大肠杆菌的第二大机会致病菌, 是医院感染和社区获得性感染的重要病原菌之一^[1-2]。肺克主要引起住院患者败血症、呼吸道、泌尿道和创伤感染, 而高毒力肺克引起的严重社区获得性感染则造成健康人肺炎、肝脓肿甚至并发脑膜炎、筋膜炎、眼内炎和前列腺脓肿^[2-3]。近年来有越来越多关于肺克感染引起四肢复杂性皮肤及软组织感染、髂腰肌脓肿、闭孔内肌脓肿、腰大肌脓肿等化脓性肌炎的罕见病例不断被报道^[4-9]。目前临床上对肺克感染的治疗主要还是依赖抗生素, 然而, 在过去 10 年中肺克耐药情况越来越严重, 尤其是产超广谱 β -内酰胺酶和耐碳青霉烯肺克菌株的日益流行使得其临床治疗越来越棘手^[3,10]。因此, 探究肺克感染治疗的新方法新思路迫在眉睫。

肺克是兼性厌氧菌, 研究发现其感染可以形成皮下脓肿, 说明可能有厌氧环境^[4]; 肺克肝脓肿中含气腔的比例要高于其他类型的肝脓肿, 分析气体成分发现 O_2 含量为 1.2%–7.3%^[11]; Wakabayashi 等发现一例肺克相关慢性肉芽肿患者, 而肉芽肿为厌氧环境^[12]。硝酸盐呼吸是厌氧条件下能量产生的主要来源, 依赖硝酸还原酶等金属酶的作用^[13]。硝酸还原酶是含钼的黄素蛋白, 将硝酸盐转化为亚硝酸盐, 参与厌氧条件下硝酸盐的呼吸途径^[14]。因此, 钼离子与硝酸盐还原相关, 对细菌在厌氧条件下的生存至关重要。钼酸盐(MoO_4^{2-})是微量元素钼的可用形式, 细菌主要通过钼酸盐转运体 ModABC 从胞外吸收钼离子, 活化的钼离子参与钼辅因子 MoCo 的合成, 其对于钼酶的活性是必需的^[15-16]。已有研究报道, 铜绿假单胞菌厌氧生长所需的所有硝酸还原酶都需要 MoCo^[16]; 在结核分枝杆菌(Mtb)中, 研

究最透彻的 MoCo 依赖性酶是由 *narGHI* 编码的硝酸还原酶 NR, 该酶是体外和体内缺氧条件下 Mtb 存活所必需的^[17]; Levillain 等发现 Mtb 通过水平基因转移获得基因簇 *moaA1-D1* (参与 MoCo 合成) 有利于 Mtb 致病性进化, 其允许 Mtb 在缺氧性肉芽肿中进行硝酸盐呼吸和持续处于休眠状态^[18]; 此外, 肠道炎症可导致肠道菌群生态失调, 其特征是专性厌氧菌数量显著减少而兼性厌氧菌数量扩增和暴发, 这是因为宿主炎症反应产生硫化物、氮氧化物和硝酸盐, 包括肠杆菌科的兼性厌氧菌表达含钼的二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、氧化三甲胺(Trimethylamine N-Oxide, TMAO)和硝酸还原酶而利用这些副产物进行厌氧呼吸^[19]。生物信息学分析显示, 肺克中存在完整的 MoCo 合成途径, 并且有 9 个硝酸还原酶编码基因。以上这些内容提示钼离子可能通过影响肺克的厌氧生长促进其感染, 而皮下及深部肌肉组织的感染可能与其存在的缺氧环境紧密相关。

Lin 等研究发现敲除 *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 染色体上编码 CRP 的基因后 ModA 表达量下调, 而 CRP 是全局调控因子, 对肺克体外生长、菌毛生成、生物膜形成和小鼠致死是必需的^[1], 因此 ModA 可能与肺克毒力正相关。ModA 是钼酸盐转运体 ModABC 中的溶质结合蛋白, 对钼(Mo)/钨(W)具有高亲和力, 负责结合 Mo/W^[20]。研究发现钼酸盐的摄取与 Mtb 的毒力相关, 证据是 *modA* 转座子插入突变株在小鼠肺内增殖和毒力均减弱^[17,21]。铜绿假单胞菌 ModA 对纳摩尔浓度下 Mo 的吸收起关键作用, 但胞外高浓度 W 存在时其竞争结合 ModA 而大大降低 Mo 的摄取, 敲除 *modA* 基因抑制该菌硝酸盐还原、厌氧生长和生物膜形成^[22]以及毒力, ModABC 对铜绿假单胞菌慢性肺部感染十分重要^[23]。总之, 这些独立研究都显示了 ModA 在细菌致病性中的重要性。虽然早期有研究报道肺克 *mod* 突变体厌氧硝酸还原酶活性及生长均受抑制^[24], 但该

突变体为 Mu 噬菌体插入突变体, 并且其对肺克致病性的作用尚不清楚。W 可通过竞争结合 ModA 结合位点进而取代 MoCo 中的 Mo, 使得 MoCo 在肠杆菌科中失活^[25]。2018 年, Zhu 等首次报道钨酸盐处理可以选择性抑制仅在炎症发作期间出现的 MoCo 依赖性微生物呼吸途径, 防止肠道菌群有害菌的扩张从而改善肠道炎症^[26]。这一研究结果提示肺克肌肉感染也可以尝试通过钨酸盐处理进行治疗, 对于易产生多重耐药性菌株感染的治疗十分重要。因此本研究构建了 *modA* 无痕缺失突变株与回补株, 通过体内、体外实验研究钼酸盐转运体 ModABC 对肺克肌肉感染的作用以及钨酸盐治疗的可能性, 结果表明 ModABC 通过增强侵袭力和促进厌氧硝酸盐呼吸来提供适应优势而促进其肌肉感染, 钨酸盐对肺克肌肉感染具有一定的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

本研究所用菌株及质粒详见表 1, 所用引物详见表 2, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司武汉分公司合成。*Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 (GenBank 登录号 AP006725, 野生株 WT)分离自肝脓肿患者, 由军事医学科学院微生物流行病研究所惠赠, 已完成全基因组测序。

1.1.2 实验动物

健康雌性无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)级 C57BL/6 小鼠(8 周龄左右) 15–30 只, 湖北医药学院实验动物中心。所有小鼠均 22±1 °C 恒温饲养, 12 h 光照, 12 h 避光, 自由进水和饮食, 每 2 日更换饲料和饮水, 保证小鼠生活环境通风及清洁卫生。

1.1.3 主要试剂和仪器及培养基

2×Phusion Master Mix、限制性内切酶, New England Biolabs 公司; *FastPfu* DNA 聚合酶、Marker, 北京全式金生物技术有限公司; 2×*Taq*

表 1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strain or plasmid	描述 Description	来源 Reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F-φ80d/lacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 hsdR17</i> (rk- mk-) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Our lab
<i>K. pneumoniae</i>		
NTUH-K2044	A capsular serotype K1 strain with hypermucoviscosity phenotype, wild type, Amp ^R	Our lab
Δ <i>modA</i>	NTUH-K2044 mutant with an in-frame deletion of <i>modA</i> , Amp ^R	This study
C- <i>modA</i>	Complemented <i>modA</i> deletion mutant, Amp ^R , Kan ^R	This study
Plasmids		
pKO3-Km	Suicide plasmid, Kan ^R , <i>sacB</i> (sucrose-lethal gene), pSC101 temperature-sensitive origin	Our lab
pKO3- <i>modA</i> Δ <i>ud</i>	Knockout plasmid for the open reading frame (ORF) region of <i>modA</i>	This study
pGEM-T-Easy	pGEM-T easy with insertion of a Km cassette from pUC4K into the <i>Nde</i> I site for trans-complementation, Kan ^R	Our lab
pGEM- <i>modA</i>	pGEM-T-Easy-derived vector containing the promoter, ORF and terminator region of <i>modA</i>	This study
pLac-EGFP	An <i>E. coli</i> expression plasmid with gene of enhanced green fluorescent protein, Kan ^R	Our lab
pBBR1MCS2-Tac-mCherry	Broad-host-range expression plasmid with gene of red fluorescence protein, Kan ^R	Our lab

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
Gene knockout	
<i>modA</i> -A	GTATGCGGCCGCATCCACCAACGGATGTTTCGC
<i>modA</i> -B	GCCCTTTCAGGTAGTCATAGCTTACTCTCCTGTCAATGCG
<i>modA</i> -C	CGCATTGACAGGAGAGTAAGCTATGACTACCTGAAAGGGC
<i>modA</i> -D	GTATGCGGCCGCCAACGGCAACGTAATGGTC
<i>modA</i> -F	ATGGCAGGTTCTTGGTTACG
<i>modA</i> -R	ACTTCTGATGCGAGGCTTC
Gene complementation	
C- <i>modA</i> -F	ATGGGCCCCGAGATGGCCGCCAGCAGG
C- <i>modA</i> -R	TAAAGCGGCCGCTCAGCGGGTGGTAAATCCGT
Sequencing	
pKO3-Km-F	AATAAGCGGATGAATGGCAG
pKO3-Km-R	TCCCTCACTTTCTGGCTGG
pGEM-T-Easy-km-F	GCGAATTGGGCCCCGACGTC
pGEM-T-Easy-km-R	CGCAGCCGAACGACCGAG
RT-PCR	
<i>modA</i> -RT-F	CCATTGATGAGAAAACCGAC
<i>modA</i> -RT-R	CATCGGAGCCATAGACAATC
16S rRNA-RT-F	ATGACCAGCCACACTGGAAC
16S rRNA-RT-R	CTTCCTCCCCGCTGAAAGTA
<i>modE</i> -RT-F	GGTGCTGGTCCTGCTCAAAG
<i>modE</i> -RT-R	ATCGCCTCCGTTCTTCCG
<i>modB</i> -RT-F	CTGGCTGTATGACTGGTTCG
<i>modB</i> -RT-R	CGGCAGAGTCAACGGCAACG

注: 下划线表示限制性内切酶位点

Note: Underlined indicate restriction enzyme sites

PCR Master Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司; T4 DNA 连接酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 回收试剂盒、RNeasy Mini Kit (RNA 提取试剂盒)、RNA Protective、RNase-Free DNase Set 及 QuantiNova™ Reverse Transcription Kit (反转录试剂盒), QIAGEN 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 溶菌酶, Aresco 公司; 蔗糖, BioFroxx 公司; 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、硫酸卡那霉素(Kanamycin, Kan), 北京博奥拓达科技有限公司; 硝酸钾, 天津市天力化学试剂有限公司; 甲基紫精, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 连二亚硫酸钠, 天津市大茂化学试剂厂; 磺胺, 天津市光复精细化工研究所; α -萘胺, 上海展云化工有限公司; 钨酸钠, 天津市北联精细化学品开发有限公司。多功能生物分子成像仪, General Electric 公司; 厌氧培养箱, Don Whitley Scientific 公司; 酶标仪、紫外-可见分光光度计, Gene 公司。

Luria-Bertani (LB)培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 琼脂粉 15.0 (固体培养基添加); LD 固体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 蔗糖 50.0, 琼脂粉 15.0^[27]。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

Escherichia coli DH5 α 是构建重组质粒的宿主, 根据需要在添加 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基中于 37 °C、180 r/min 培养。*K. pneumoniae* 菌株在添加 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中于 37 °C、180 r/min 培养, 必要时添加 50 μ g/mL Kan 以培养含有 Kan 抗性质粒的菌株。对于含有质粒 pKO3-Km 和 pKO3-*modAud* 的菌株于 30 °C、180 r/min 培养。当测生长曲线时, 先将菌株 WT、 Δ *modA*、C-*modA* 于 37 °C、180 r/min 培养过夜活化, 然后分别以 1:100 比例接种到新鲜 LB 培养基中培养至 OD_{600} 约为 1.2, 再转接入 5 mL 新鲜 LB 中连续培养, 每隔一

段时间取样检测 OD_{600} 值。对于厌氧培养, 在 LB 中额外添加 20 mmol/L KNO₃, 根据需要添加 10 mmol/L Na₂WO₄, 将其静置于厌氧培养箱中连续培养。

1.2.2 构建重组质粒

本研究所用质粒及引物分别详见表 1 和表 2。*K. pneumoniae* 基因组 DNA 提取、质粒提取、PCR 产物纯化等均依据试剂盒进行操作。为构建用于敲除 *modA* 开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)区域的敲除质粒 pKO3-*modAud*, 以 WT 菌株基因组 DNA 为模板, 分别用引物对 *modA*-A/*modA*-B 和 *modA*-C/*modA*-D 进行 PCR 扩增 *modA* ORF 上游 639 bp 和下游 498 bp 区域。PCR 反应体系(20 μ L): 细菌基因组 DNA 0.5 μ L, 引物 *modA*-A/B (或 *modA*-C/D, 10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 2 \times Phusion Master Mix 10.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。利用引物对 *modA*-A/*modA*-D 通过重叠延伸 PCR 将上下游片段融合, 然后克隆到自杀载体 pKO3-km 的 *Not* I 酶切位点之间。PCR 反应体系(50 μ L): 上述 *modA* ORF 上、下游片段 DNA 各 1 μ L, 引物 *modA*-A/D (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 \times Phusion Master Mix 25 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 5 min, 2 个循环; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。为构建回补载体 pGEM-*modA*, 以 WT 菌株基因组 DNA 为模板, 用引物对 C-*modA*-F/C-*modA*-R 通过 PCR 扩增 *modA* 启动子、ORF 和终止子区域(1 594 bp), 然后克隆到载体 pGEM-T-Easy 的 *Apa* I 和 *Not* I 酶切位点之间。PCR 反应体系(50 μ L): 细菌基因组 DNA 1 μ L, 引物 C-*modA*-F/R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 5 \times FastPfu Buffer 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, FastPfu DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 32 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.3 构建 *modA* 基因缺失突变株与回补株

K. pneumoniae NTUH-K2044 中 *modA* 基因敲除采用同源重组的方法进行^[27]。具体如下: 将敲除质粒 pKO3-*modA* 电转入 WT 菌株中, 转化子在 43 °C 下培养, 筛选到发生第一次同源重组 pKO3-*modA* 整合到细菌染色体上的重组子, 然后将挑选的重组子转接 LD 平板上于 30 °C 培养, 反向筛选发生第二次同源重组 pKO3-*modA* 从染色体上切离的突变株, 挑取 Amp 抗性 LB 平板上能生长而 Kan 抗性平板不能生长的单菌落, 用 *modA* 内部引物对 *modA*-F/*modA*-R 和外部引物对 *modA*-A/*modA*-D 分别对上述单菌落进行 PCR 鉴定, 并将 *modA*-A/*modA*-D 扩增的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 即得到 *modA* 基因无痕缺失突变株 Δ *modA*。将回补质粒 pGEM-*modA* 电转入菌株 Δ *modA* 中, 筛选得到阳性克隆, 即为回补株 C-*modA*。

1.2.4 RNA 提取和 RT-PCR

将菌株 WT、 Δ *modA*、C-*modA* 培养至稳定期 (OD_{600} 为 1.2–1.6), 利用 RNeasy Mini Kit (RNA 提取试剂盒) 提取 WT 菌株总 RNA, 期间加入 RNA Protective 保护 RNA 不被降解, 然后用 RNase-Free DNase Set 去除基因组 DNA, 之后立即用 QuantiNova™ Reverse Transcription Kit (反转录试剂盒) 将所提 RNA 反转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, 16S rRNA (16S rRNA-RT-F/16S rRNA-RT-R) 为内参基因, 通过 RT-PCR 检测 *modA* (*modA*-RT-F/*modA*-RT-R) 及其上游基因 *modE* (*modE*-RT-F/*modE*-RT-R) 和下游基因 *modB* (*modB*-RT-F/*modB*-RT-R) 的表达情况。PCR 反应体系 (20 μ L): cDNA 0.5 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 25 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.5 检测硝酸还原酶活性

硝酸还原酶活性检测方法按照文献[22]进行, 具体如下: 将菌株 WT、 Δ *modA*、C-*modA* 在

含 20 mmol/L KNO₃ 的 LB 培养基中 37 °C 厌氧培养 24 h 后取 1 mL 菌液, 加入终浓度为 25 μ g/mL 的氯霉素后孵育 5 min, 2 250 r/min 离心 5 min 弃上清, 用 50 mmol/L PBS 充分洗涤菌体 2 次, 然后重悬于 1 mL PBS 中, 测定 OD_{600} 值。取 100 μ L 甲基紫精(质量体积分数: 0.5 g/L)作为电子供体, 加入 800 μ L 重悬后的菌体, 充分混匀后加入 100 μ L 混合液(4 g/L Na₂S₂O₄, 4 g/L NaHCO₃, 100 mmol/L KNO₃), 阴性对照不加 Na₂S₂O₄。上述反应样品于 37 °C 静置 5 min, 呈蓝色, 然后取出反应体系振荡至无色, 反应停止。立即向反应体系中顺序加入 1 mL 1%磺胺酸(溶于 25%盐酸)终止反应, 涡旋振荡 15 s 后加入 1 mL 0.2% α -萘胺以形成粉红色的偶氮染料; 样品反应 13 min 后 2 250 r/min 离心 5 min 取上清, 用酶标仪测定 OD_{540} 和 OD_{420} 。硝酸还原酶活性以任意单位表示, 计算公式如下:

$$\text{硝酸还原酶活性} = \frac{OD_{540} - (0.72 \times OD_{420})}{T \times V \times OD_{600}} \times 100\%$$

其中 $T=5$ min, $V=3$ mL。

1.2.6 C57BL/6 小鼠肌肉感染实验

将质粒 pLac-EGFP 和 pBBR1MCS2-Tac-mCherry 分别电转入菌株 WT (绿色荧光) 和 Δ *modA* (红色荧光) 中, 然后将这 2 株菌分别培养至 OD_{600} 约 1.2, 用无菌 PBS 洗涤菌体 2 次, 并稀释至活菌数约 1×10^6 CFU/mL 备用。将 8 周龄左右健康雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠随机分成 4 组, 利用剪趾法分别对每组小鼠进行标记。将小鼠两侧后肢的毛发剔除, 皮肤用酒精棉球消毒。第 1 组小鼠分别在左侧后肢肌肉内注射 0.1 mL 菌株 WT 和 Δ *modA* 等量均匀混合菌液(约 1×10^5 CFU/菌株), 同时在对侧右侧后肢肌肉内注射 0.1 mL 无菌 PBS 作为对照(竞争性实验); 第 2 组小鼠分别在左侧后肢肌肉内注射 0.1 mL Δ *modA* 菌液(约 1×10^5 CFU), 同时在对侧右侧后肢肌肉内注射 0.1 mL WT 菌液(约 1×10^5 CFU); 第 3 组小鼠分别在左侧后肢肌肉内注射 0.1 mL 菌株 WT 和 Δ *modA* 等量均匀混合菌液(约 1×10^5 CFU/菌

株), 同时在对右侧后肢肌肉内注射 0.1 mL 重悬于 0.2% 钨酸钠的等量混合菌液作为治疗组; 第 4 组小鼠操作与 2 组相同, 但菌株均重悬于 0.2% 钨酸钠中, 同样作为治疗组; 其中第 3 组、第 4 组小鼠中治疗组分别在感染后 1、2、3 d 同一时间同一部位注射 0.1 mL 0.2% 钨酸钠。在整个过程中注意观察小鼠状态及后肢肌肉脓肿情况并拍照记录。感染 3 d 后对小鼠分别予以安乐死后解剖, 切开后肢肌肉, 观察脓腔大小、脓液状态并记录, 分别取后肢脓肿肌肉、肝脏、脾脏组织放入无菌 PBS 中匀浆后倍比稀释涂布 LB 平板(50 μ g/mL Kan), 通过不同荧光分别对各组织中菌株 WT 和 $\Delta modA$ 进行活菌计数, 计算各菌株的 CFU/g。对于竞争性实验, 通过将最后各组织中恢复的菌株 WT 的 CFU/g 除以菌株 $\Delta modA$ 的 CFU/g, 然后再除以初始接种混合菌液中的相应比例来计算竞争性指数(Competitive Index, CI)。

1.2.7 统计分析

数据分析使用 Microsoft Excel 进行, 除了采用双尾配对 t 检验来确定同一动物同一部位内菌株 WT 和 $\Delta modA$ 种群之间的统计差异(竞争性实验), 其他均采用双尾非配对 t 检验来检测两组之间的统计学差异。当 $P < 0.05$ 时被认为差异显著, 除非另有说明: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, 无统计学意义。在所有小鼠实验中, n 是指采集样本的动物数量。

2 结果与分析

2.1 *crp* 基因敲除使 ModA 表达下调

对野生株 K2044 (WT) 与其 *crp* 基因敲除株 Δcrp 的蛋白组学进行了比较分析, 发现与菌株 WT 相比, 敲除株 Δcrp 中蛋白 ModA 的表达水平降低了 63.5% (图 1), 而 CRP 是全局调控因子, 对肺克体外生长、菌毛生成、生物膜形成和小鼠致死都是必需的, 与肺克致病性十分相关^[1,28], 因此敲除 *crp* 基因后蛋白 ModA 表达下调提示 ModA 可能与肺克的毒力正相关。

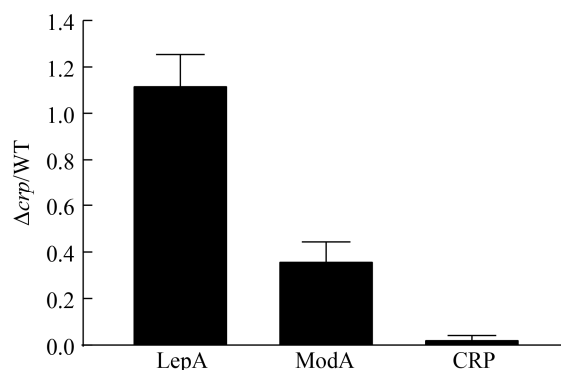


图 1 *crp* 基因敲除后肺克蛋白表达水平变化情况

Figure 1 The expression level of proteins in *K. pneumoniae* after *crp* gene knockout

注: LepA 为延伸因子 4, 作为对照

Note: LepA is elongation factor 4, as a control

2.2 生物信息学分析肺炎克雷伯菌钼辅因子 MoCo 合成途径及相关基因簇

生物信息学分析结果显示, 在菌株 K2044 的基因组中 *modA* (KP1-1721) 与另 2 个基因 *modB* (KP1-1722)、*modC* (KP1-1723) 聚集在同一个假定操纵子(*modABC* 操纵子)中(图 2B), 其编码产物分别为 ModA (钨酸盐结合周质蛋白前体)、ModB (跨膜通道蛋白)和 ModC (ATPase), 这 3 个亚基共同构成一个典型的钨酸盐 ATP 结合盒转运体(ATP-Binding Cassette Transporter, ABC 转运体) ModABC。研究发现在 *E. coli* 中 ModA 是钨酸盐转运体 ModABC 中的溶质结合蛋白, 对钨(Mo)/钨(W)具有高亲和力, 负责结合 Mo/W^[20], 而肺克 ModA 与 *E. coli* 的 ModA 蛋白氨基酸一致性达 82%。钨酸盐(MoO_4^{2-})是微量元素钨的唯一生物可用形式, 细菌主要通过高亲和力钨酸盐转运体 ModABC 从胞外吸收 Mo, 活化的钨离子插入到亚钨蝶呤(Molybdopterin, MPT)中合成钨辅因子(Molybdenum Cofactor, MoCo), 这是一个既普遍又高度保守的过程^[29]。MoCo 插入到钨酶活性中心对于其发挥催化功能是必需的, 硝酸还原酶(厌氧硝酸盐呼吸的关键酶)就是一种钨酶^[30]。进一步分析发现菌株 K2044 基因组中存在 MoCo 合成中的另一个关键基因簇 *moaABCDE* 操纵子(图 2B), 肺



克中存在着完整的 MoCo 合成途径, 并且有 9 个硝酸还原酶编码基因(图 2C)。以上这些信息提示 ModA 可能通过影响硝酸还原酶活性而对肺克的厌氧生长起作用。

2.3 构建 *modA* 无痕缺失突变株与回补株

为了探究 ModA 的生理功能, 采用同源重组的方法敲除菌株 K2044 染色体上 *modA* 编码区(图 3A), 将所获得的 *modA* 无痕缺失突变株命名为 $\Delta modA$ 。然后通过使用外部引物对(*modA*-A/*modA*-D)和内部引物对(*modA*-F/*modA*-R)进行菌落 PCR 鉴

定, 结果如图 3B 所示, 同时测序结果进一步证实敲除株构建成功。为了排除可能存在的极性效应, 将 *modA* 启动子、ORF 和终止子区域克隆到载体 pGEM-T-Easy 上并转入敲除株 $\Delta modA$ 中, 构建了回补株 C-*modA* 并通过 RT-PCR 进行验证。结果如图 3C 所示, 在菌株 WT、 $\Delta modA$ 和 C-*modA* 中均能检测到内参基因 16S rRNA 基因的扩增产物, 而 *modA* 特异性引物(*modA*-RT-F/*modA*-RT-R)仅在菌株 WT 和 C-*modA* 中能扩增到同样大小的相应产物, 在敲除株 $\Delta modA$ 中则没有, 说明只有敲

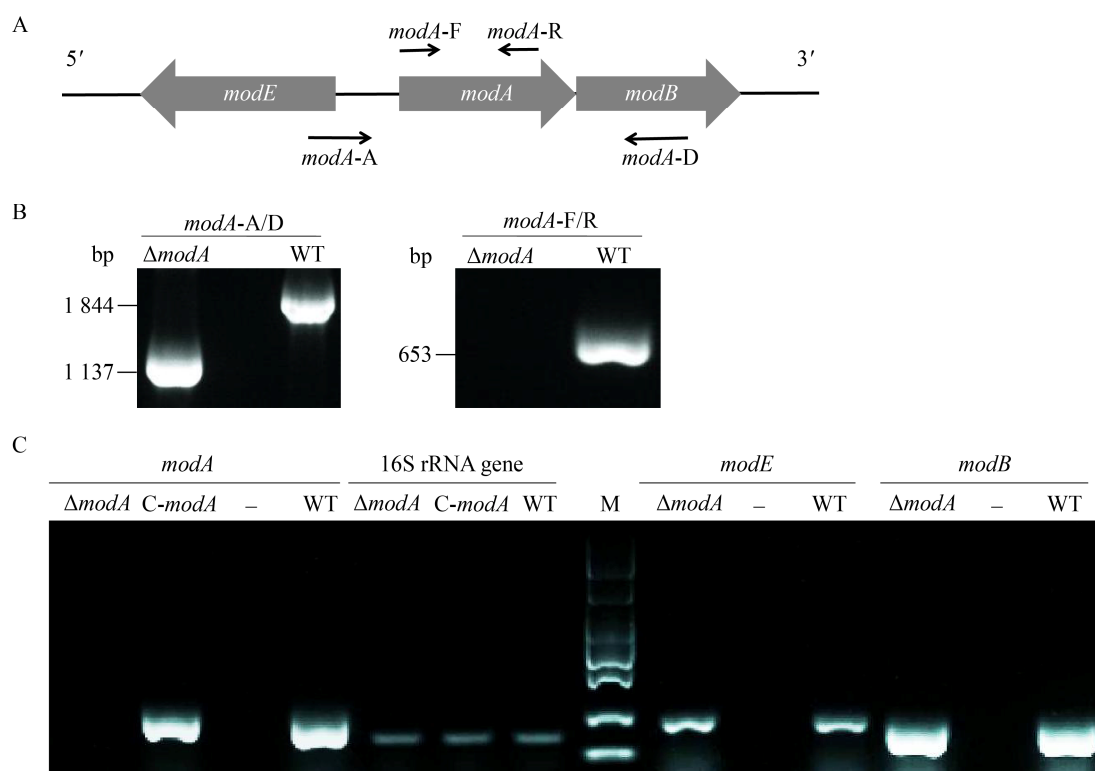


图 3 *modA* 无痕缺失突变株与回补株的鉴定

Figure 3 Identification of *modA* traceless deletion mutant and complementary strain

注: A: *modA* 与两侧基因结构及引物位置示意图, 灰色箭头表示基因的 ORF 区域, *modA* 的外部引物对(*modA*-A/*modA*-D)和内部引物对(*modA*-F/*modA*-R)分别被标出; B: PCR 鉴定 *modA* 编码区的敲除, 左侧为外部引物 PCR 的结果, 右侧为内部引物 PCR 的结果; C: RT-PCR 鉴定 *modA* 基因的敲除、回补及对邻近基因表达的影响, 从左到右使用的引物对依次为 *modA*-RT-F/*modA*-RT-R、16S rRNA-RT-F/16S rRNA-RT-R、*modE*-RT-F/*modE*-RT-R 和 *modB*-RT-F/*modB*-RT-R

Note: A: Schematic view of structure of *modA* and flanking genes and primer positions. The gray arrows indicate the gene ORF. The external primer pair (*modA*-A/*modA*-D) and the internal primer pair (*modA*-F/*modA*-R) of *modA* are marked respectively; B: PCR identification of knockout of *modA* coding region. The left side shows the results of external primer PCR and the right side shows the results of internal primer PCR; C: RT-PCR identification of the knockout and complement of *modA* gene and its effect on the expression of adjacent genes. The primer pairs used from left to right are *modA*-RT-F/*modA*-RT-R, 16S rRNA-RT-F/16S rRNA-RT-R, *modE*-RT-F/*modE*-RT-R and *modB*-RT-F/*modB*-RT-R

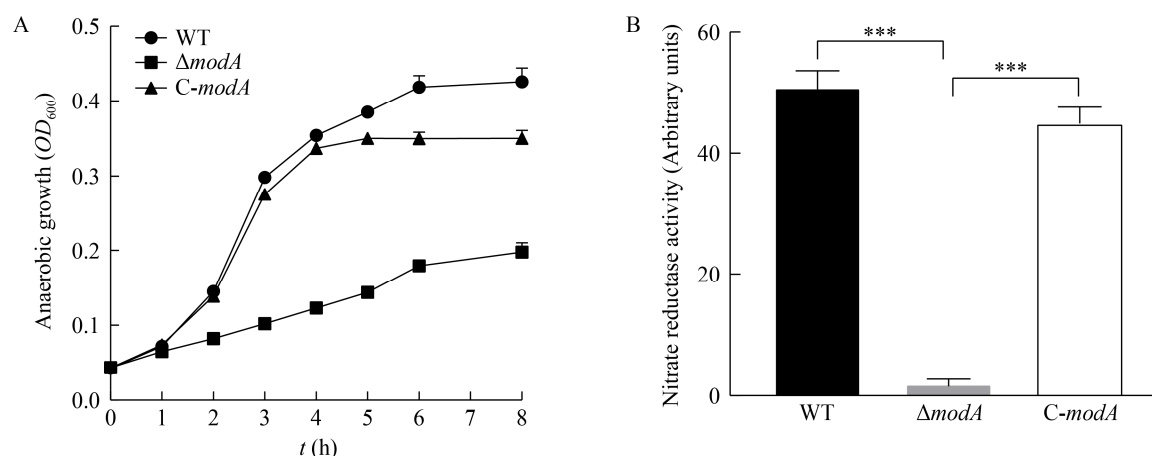


图4 不同菌株的厌氧生长曲线(A)和硝酸还原酶活性(B)

Figure 4 Anaerobic growth curve (A) and nitrate reductase activity (B) of different strains

注: A: 将菌株 WT、 $\Delta modA$ 和 $C-modA$ 分别在补加 20 mmol/L KNO_3 的 LB 培养基中厌氧静置培养 24 h, 通过 OD_{600} 的变化监测生长曲线; B: 厌氧培养 24 h 后取上述各菌株培养物进行硝酸还原酶活性测定; 图中数值表示为 3 次独立实验的平均值和标准偏差(误差线), 每组通过双尾非配对 t 检验来确定统计显著性, ***: $P < 0.001$

Note: A: Strains WT, $\Delta modA$ and $C-modA$ were grown anaerobically in LB medium supplemented with 20 mmol/L KNO_3 for 24 h, and the growth was monitored by the change in OD_{600} ; B: After 24 h of anaerobic culture, the nitrate reductase activity of above-mentioned strains were measured. Values are expressed as the means and standard deviation (error bars) of three independent experiments. In each panel, statistical significance was determined using a two-tailed unpaired Student's t test, where *** represents a P value of < 0.001

除株 $\Delta modA$ 不表达 $modA$ 基因, 进一步证实敲除株 $\Delta modA$ 和回补株 $C-modA$ 均构建成功。同时, 对 $modA$ 上游基因 $modE$ 和下游基因 $modB$ 也进行了 RT-PCR, 分别用 $modE$ 特异性引物($modE$ -RT-F/ $modE$ -RT-R)和 $modB$ 特异性引物($modB$ -RT-F/ $modB$ -RT-R)均能在敲除株 $\Delta modA$ 中扩增到与野生株 WT 中同样大小的相应产物(图 3C), 说明敲除 $modA$ 并不影响其邻近基因的表达。由于 ABC 转运体需要结合蛋白将底物呈递给跨膜通道蛋白才能完成转运过程^[31], 因此钼酸盐转运体 ModABC 预计在菌株 $\Delta modA$ 中是无功能的。

2.4 ModA 对肺炎克雷伯菌的厌氧生长和硝酸盐还原十分重要

钼离子在硝酸盐还原途径的第一步(即 NarGHI 将 NO_3^- 还原为 NO_2^-)中作为钼辅因子的成分起重要作用, 对细菌在厌氧条件下的生存至关重要^[22,32-33]。将肺炎克雷伯菌 ModA 基因敲除株 $\Delta modA$ 与野生株 WT、回补株 $C-modA$ 分别在添加 20 mmol/L KNO_3 的 LB 培养基中于厌氧条件下培养, 比较生

长曲线发现: 在以 NO_3^- 为末端电子受体的厌氧条件下, 与野生株 WT 相比, 敲除株 $\Delta modA$ 生长明显被极大地抑制, 而回补株 $C-modA$ 的厌氧生长则基本与野生株 WT 一致(图 4A), 这一结果进一步排除了敲除 $modA$ 产生极性效应的可能性, 说明 $modA$ 的敲除是厌氧条件下菌株 $\Delta modA$ 表型变化的原因, 证实钼酸盐转运体 ModABC 对肺炎克雷伯菌的厌氧生长至关重要。为了确认上述这种厌氧生长缺陷是由于一种或所有硝酸还原酶功能障碍所致, 检测了厌氧培养 24 h 后菌株 WT、 $\Delta modA$ 和 $C-modA$ 的硝酸还原酶活性(测量亚硝酸盐的产生), 发现野生株 WT 与回补株 $C-modA$ 均检测到高水平的硝酸还原酶活性且活性相当, 而敲除株 $\Delta modA$ 硝酸还原酶的活性则基本丧失($P < 0.001$, 图 4B)。仍能在敲除株 $\Delta modA$ 中检测到极低水平的硝酸还原酶活性, 这可能是因为肺炎克雷伯菌可以通过硫酸盐转运体和非特异性阴离子转运体低效转运钼酸盐^[34]。Garzón 等也报道了肺炎克雷伯菌 mod 突变体在厌氧条件下检测不到硝酸还原酶活性并且生长受

抑制^[24]。实验中敲除株 $\Delta modA$ 的厌氧生长并没有被完全抑制(OD_{600} 约 0.18), 并且在不添加 KNO_3 厌氧培养时菌株 WT、 $\Delta modA$ 和 $C-modA$ 表现出相似的低水平生长, 因此推测可能有 2 个原因: (1) 菌株 $\Delta modA$ 中存在其他非特异性通道低效率转运硝酸盐; (2) 菌株 $\Delta modA$ 可以利用 LB 培养基中其他末端电子受体进行非依赖性厌氧呼吸。以上这些结果表明, 硝酸盐转运体 ModABC 对肺炎克雷伯菌厌氧生长至关重要。

2.5 ModA 促进肺炎克雷伯菌肌肉感染

研究发现肺炎克雷伯菌可以形成皮下脓肿, 说明可能有厌氧环境^[4]。实验证明硝酸盐转运体 ModABC 对肺炎克雷伯菌体外厌氧生长至关重要, 研究还

发现 ModA 可能与肺炎克雷伯菌正相关, 而且近年来有越来越多关于肺炎克雷伯菌引起化脓性肌炎的病例被报道^[5-9], 因此本文进一步研究了 ModA 对肺炎克雷伯菌肌肉感染的作用。使用野生株 WT 和敲除株 $\Delta modA$ 等量混合液在小鼠肌肉脓肿模型中进行了体内竞争性实验(混合感染), 发现 3 d 后小鼠左侧后肢(肺炎克雷伯菌感染组)可见明显肿胀而右侧后肢(PBS 对照组)无明显变化, 解剖后肉眼可见左侧后肢多个肌肉脓肿, 挤压可渗出较黏稠脓液, 而右侧肌肉无脓肿(图 5A)。取肌肉组织匀浆进行活菌计数, 结果显示野生株 WT 的活菌数是敲除株 $\Delta modA$ 的 5.06 倍, 显著高于敲除株 $\Delta modA$ ($P < 0.001$, 图 5B), 说明 ModA 为肺炎克雷伯菌在肌肉组织中的生存

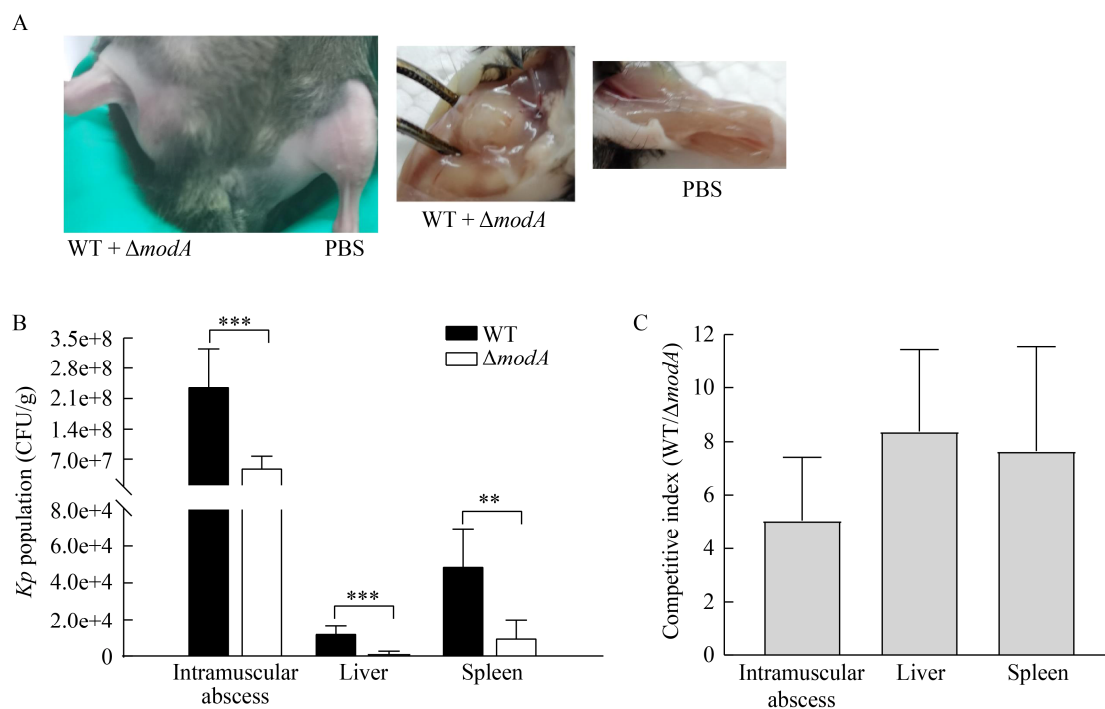


图 5 肺炎克雷伯菌在小鼠肌肉中的竞争性实验

Figure 5 In vivo competitive experiment of *Klebsiella pneumoniae* in mouse muscle

注: 用菌株 WT 和 $\Delta modA$ 等量混合物感染第 1 组 C57BL/6 小鼠($n=6$)左侧后肢肌肉组织, 同时在右侧注射 PBS 作为对照, 于感染 3 d 后观察后肢肌肉脓肿情况(A), 并计算肌肉、肝脏、脾脏组织中的细菌载量(B)和竞争力指数(C); 图中数值表示为平均值和标准偏差(误差线), 每组通过双尾配对 t 检验来确定统计显著性, ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$

Note: Group 1 of C57BL/6 mice ($n=6$) were infected with the equivalent mixture of strains WT and $\Delta modA$ in the left hind limb muscle tissue, and PBS was injected into the right side as control. The intramuscular abscesses were observed 3 days after infection (A) and bacterial load (B) and competitive index (CI, C) in muscle, liver and spleen tissues were calculated. Values are expressed as the means and standard deviation (error bars). In each panel, statistical significance was determined using a two-tailed paired Student's t test. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$

提供了适应优势。同时,也检测了小鼠肝脏、脾脏中的细菌载量,发现这种适应优势更加明显(竞争性指数分别为 8.38、7.63,图 5B 和 5C),说明 ModA 有利于肺克从肌肉组织中侵袭扩散至其他器官组织。

为了进一步确认 ModA 对肺克肌肉感染的作用,分别在小鼠左、右侧后肢肌肉内接种等量敲除株 $\Delta modA$ 和野生株 WT (单独感染),发现小鼠右侧后肢肿胀巨大而左肢仅轻微肿胀,解剖后观察到右肢有多个大小不等的脓肿且几乎充满整个后肢肌肉而左肢仅有两三个很小的脓肿(图 6A),同时活菌计数结果显示,感染 3 d 后与野生株 WT 相比,敲除株 $\Delta modA$ 在肌肉、肝脏、脾脏组织中的细菌载量显著减少(图 6B),这些结果表明 ModA 对肺克的毒力十分重要。综上所述,ModA 通过增强侵袭力和提供适应优势而促进肺克肌肉感染。

2.6 钨酸盐治疗肺炎克雷伯菌肌肉感染

研究发现 W 可取代 MoCo 中的 Mo,使得 MoCo 在肠杆菌科中失活^[25];W 可与 Mo 竞争结合

ModA 而抑制铜绿假单胞菌的硝酸还原酶活性和厌氧生长^[22];2018 年,Zhu 等首次报道钨酸盐处理对肠道菌群组成的精确编辑可以改善结肠炎^[26]。为了探究钨酸盐是否可以治疗肺克肌肉感染,研究了钨酸盐对肺克体外厌氧呼吸及生长的影响。结果显示,添加 10 mmol/L Na_2WO_4 (W)对于敲除株 $\Delta modA$ 的厌氧生长(图 7A)和硝酸还原酶活性(图 7B)均无影响,而野生株 WT 和回补株 *C-modA* 的厌氧生长被明显抑制($P<0.001$,图 7A),硝酸还原酶活性也显著降低($P<0.001$,图 7B),这些体外实验结果表明钨酸盐能够抑制肺克 MoCo 依赖性厌氧呼吸及生长。

为了研究钨酸盐是否能够抑制哺乳动物肌肉中的 MoCo 依赖性过程,在小鼠肌肉脓肿模型中连续注射 0.2% Na_2WO_4 (+W)观察其治疗作用及疗效。先用菌株 WT 和 $\Delta modA$ 混合感染小鼠两侧后肢肌肉,同时在右侧注射钨酸钠作为治疗组,活菌计数结果显示,钨酸盐处理对敲除株 $\Delta modA$ 在肌肉组织中的细菌载量基本无影响,而野生株

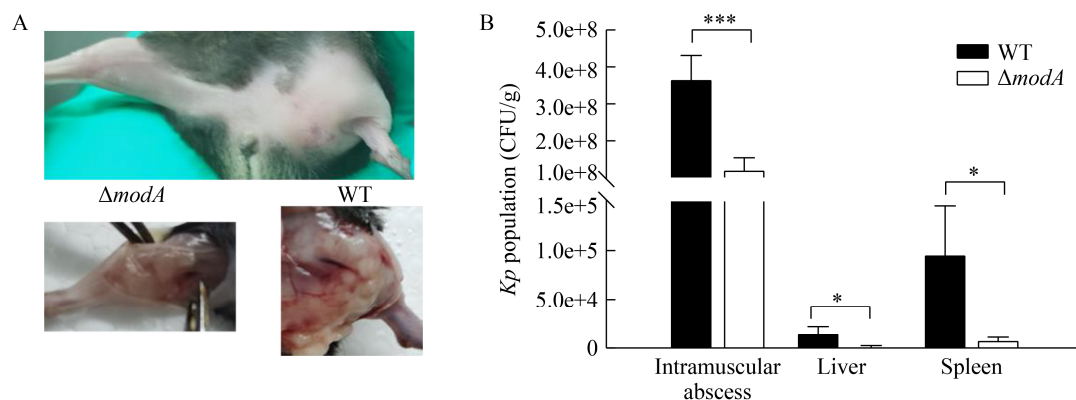


图 6 ModA 对肺炎克雷伯菌肌肉感染的影响

Figure 6 Effect of ModA on *Klebsiella pneumoniae* muscle infection

注:用菌株 $\Delta modA$ 感染第 2 组 C57BL/6 小鼠($n=4$)左侧后肢肌肉组织,同时用等量菌株 WT 感染右侧肌肉,于感染 3 d 后观察后肢肌肉脓肿情况(A),并计算肌肉、肝脏、脾脏组织中的细菌载量(B);图中数值表示为平均值和标准偏差(误差线),每组通过双尾非配对 *t* 检验来确定统计显著性,***: $P<0.001$; *: $P<0.05$

Note: Group 2 of C57BL/6 mice ($n=4$) were infected with the strain $\Delta modA$ in the left hind limb muscle tissue, and the equivalent strain WT was injected into the right side as control. The intramuscular abscesses were observed 3 days after infection (A) and bacterial load in muscle, liver and spleen tissues were calculated (B). Values are expressed as the means and standard deviation (error bars). In each panel, statistical significance was determined using a two-tailed unpaired Student's *t* test. ***: $P<0.001$; *: $P<0.05$

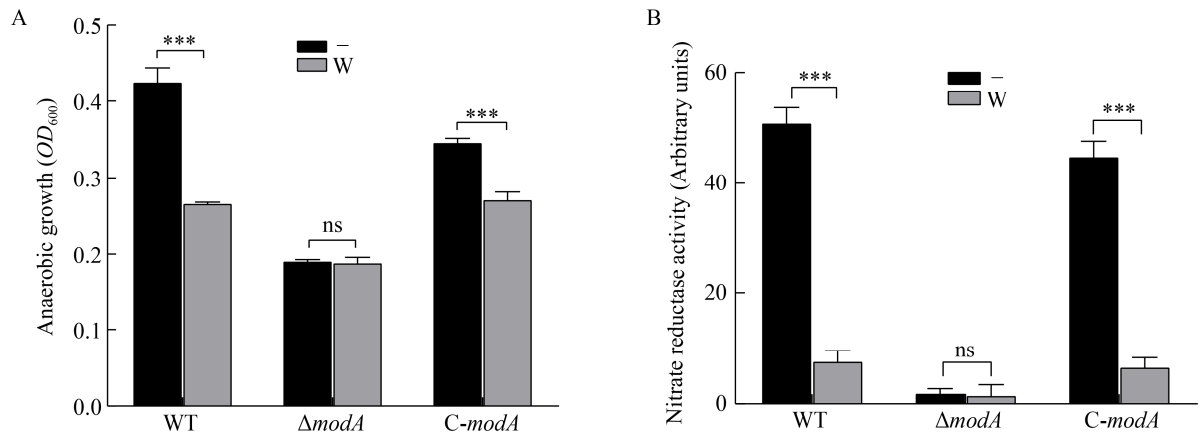


图7 钨酸盐对肺炎克雷伯菌体外厌氧生长(A)和硝酸还原酶活性(B)的影响

Figure 7 Effect of tungstate on anaerobic growth (A) and nitrate reductase activity (B) of *Klebsiella pneumoniae* in vitro

注: 将菌株 WT、 $\Delta modA$ 和 *C-modA* 分别在 ± 10 mmol/L Na_2WO_4 的含有 20 mmol/L KNO_3 的 LB 培养基中厌氧静置培养 24 h, 取上述各菌株培养物测定 OD_{600} (A) 和硝酸还原酶活性(B); 图中数值表示为 3 次独立实验的平均值和标准偏差(误差线), 每组通过双尾非配对 *t* 检验来确定统计显著性, ***: $P < 0.001$; -: 不添加 Na_2WO_4 ; W: 添加 Na_2WO_4 ; ns: 无统计学意义

Note: Strains WT, $\Delta modA$ and *C-modA* were grown anaerobically in LB medium containing 20 mmol/L KNO_3 with or without 10 mmol/L Na_2WO_4 for 24 h, and the above-mentioned strains were taken to determine OD_{600} (A) and nitrate reductase activity (B). Values are expressed as the means and standard deviation (error bars) of three independent experiments. In each panel, statistical significance was determined using a two-tailed unpaired Student's *t* test. ***: $P < 0.001$; -: Without Na_2WO_4 ; W: With Na_2WO_4 ; ns: Not statistically significant

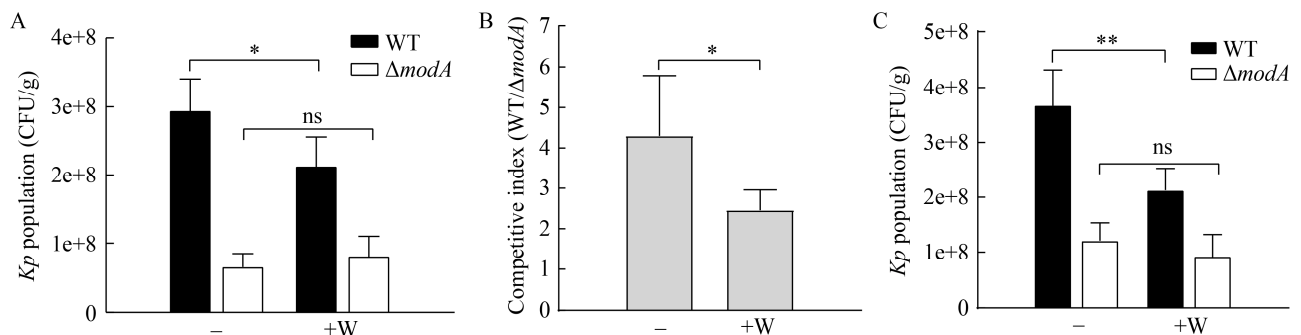


图8 钨酸盐治疗肺炎克雷伯菌肌肉感染

Figure 8 Tungstate treatment of *Klebsiella pneumoniae* muscle infection

注: 用菌株 WT 和 $\Delta modA$ 混合感染第 3 组 C57BL/6 小鼠($n=5$)两侧后肢肌肉组织, 同时在右侧注射 0.2% Na_2WO_4 作为治疗组, 此后每天在治疗组的同一部位注射 0.2% Na_2WO_4 , 3 d 后计算肌肉组织中的细菌载量(A)和竞争性指数(B); 用菌株 WT 和 $\Delta modA$ 分别单独感染第 4 组 C57BL/6 小鼠($n=4$)两侧后肢肌肉组织, 同时注射 0.2% Na_2WO_4 同样作为治疗组, 3 d 后计算肌肉组织中的细菌载量(C); 图中数值表示为平均值和标准偏差(误差线), 每组通过双尾非配对 *t* 检验来确定统计显著性, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; ns: 无统计学意义; -: 不注射 Na_2WO_4 ; +W: 注射 Na_2WO_4

Note: Group 3 of C57BL/6 mice ($n=5$) were infected with the equivalent mixture of strains WT and $\Delta modA$ in both sides of the hind limb muscle tissue, and meanwhile 0.2% Na_2WO_4 was injected into the right side as treatment group. Thereafter, the treatment group was injected with 0.2% Na_2WO_4 at the same site every day. The bacterial load (A) and competitive index (B) in muscle tissues were calculated 3 days after infection. Group 4 of C57BL/6 mice ($n=4$) were separately infected with strain WT and $\Delta modA$ in both sides of the hind limb muscle tissue respectively, and meanwhile 0.2% Na_2WO_4 was also injected as treatment group. The bacterial load (C) in muscle tissues were calculated 3 days after infection. Values are expressed as the means and standard deviation (error bars). In each panel, statistical significance was determined using a two-tailed unpaired Student's *t* test. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; ns: Not statistically significant; -: Without Na_2WO_4 ; +W: With Na_2WO_4

WT 的细菌载量则显著降低($P<0.05$, 图 8A), 竞争性指数也显著降低(4.83–2.76, $P<0.05$, 图 8B), 这一结果表明钼酸盐降低了 ModA 赋予肺克在肌肉组织中的适应优势。钼酸盐处理野生株 WT 和敲除株 $\Delta modA$ 单独感染也得到了类似的结果, 即钼酸盐处理只使野生株 WT 的细菌载量显著降低($P<0.01$, 图 8C)。以上这些体内、体外实验结果说明钼酸盐通过抑制肺克在肌肉组织中的 MoCo 依赖性厌氧生长而降低由 ModA 赋予的适应优势, 对肺克肌肉感染具有一定的治疗作用。

3 讨论与结论

钼是一种重要的微量过渡元素, 以钼酸盐的形式通过高亲和力转运体 ModABC 被生物体吸收后, 与亚钼喋呤 MPT 结合形成钼辅因子 MoCo, 与铁硫簇结合形成铁钼辅因子 FeMoCo。除了固氮酶以 FeMoCo 为活性位点外, 其他钼酶均以 MoCo 为活性位点, 结合不同形式 MoCo 的钼酶被分为 3 个家族: DMSO 还原酶家族、黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO)家族和亚硫酸盐氧化酶(Sulfite Oxidase, SO)家族^[29-30]。硝酸还原酶属于 DMSO 还原酶家族, 催化 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 同时释放能量供细菌在厌氧条件下生长^[13-14]。虽然早期对肺克 *mod* 突变体的研究发现, 其厌氧硝酸还原酶活性及生长均受抑制, 然而, 该突变体并非无痕突变体^[24], 不能排除 *mod* 附近基因可能受噬菌体插入影响而产生极性效应的可能性, 此外, 钼酸盐转运体 ModABC 对肺克致病性的影响仍然是未知的。本文构建了 *modA* 无痕缺失突变株, 发现钼酸盐转运体 ModABC 通过促进肺克硝酸盐呼吸而有利于其厌氧生长, 类似的现象在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中已有报道。大肠杆菌 *mod* 突变体缺乏硝酸还原酶活性, 生化特征研究表明其通过 ModA 结合钼酸盐^[35]。铜绿假单胞菌 *modA* 基因的缺失降低了细胞内钼酸盐浓度, 并抑制了厌氧生长和硝酸盐还原, 证明 Mo 的获取与其体外生长的厌氧硝酸盐还原直接相关^[22]。ModABC

转运体使细菌能够在环境中以纳摩尔 Mo 浓度的浓度梯度主动吸收钼酸盐并合成有活性的钼酶, 因此, *modABC* 突变体不能在 Mo 限制条件下使用钼酶, 除上述大肠杆菌和铜绿假单胞菌外, 在 *Anabaena variabilis*、*Azotobacter vinelandii* 和 *Rhodobacter capsulatus* 中也是如此, 然而, 环境中高浓度的 Mo 支持 *modABC* 突变体中活性钼酶的合成, 表明这些细菌中存在低亲和力的钼酸盐摄取系统^[36]。研究发现大肠杆菌可通过 3 种转运系统吸收钼酸盐: 高亲和力的 ModABC 系统、亲和力较低的硫酸盐转运体 CysPTWA 和需要高浓度钼酸盐的低效率非特异性阴离子转运系统^[37]。在 *Rhodobacter capsulatus* 中发现了一种新的渗透酶 PerO, 其在微摩尔浓度下转运钼酸盐^[36]。Grunden 等认为肺克会产生 4 个单独的钼酸盐摄取系统: 天然系统 ModABC; 在固氮条件下产生的高亲和力摄取系统, 可同时转运钼酸盐和硫酸盐; 硫酸盐转运系统, 也可以转运钼酸盐; 低亲和力的非特异性阴离子转运系统^[34]。但是, 硫化物已被证明会抑制硫酸盐转运系统^[37], 因此在蛋白质丰富的培养基(如 LB)中, 敲除株 $\Delta modA$ 很可能通过亚硝酸盐敏感的非特异性阴离子转运系统低效率吸收钼酸盐, 因而可以进行少量厌氧硝酸盐呼吸而低水平生长。根据实验结果和已知文献, 一般在自然环境和人体中钼离子浓度很低, 肺克主要通过高亲和力钼酸盐转运体 ModABC 吸收钼酸盐, 然后产生有活性的硝酸还原酶来进行硝酸盐呼吸而促进其厌氧生长。

考虑到近年来临床上不断有肺克感染引起化脓性肌炎的罕见病例被报道, 而深层肌肉组织感染可能会形成厌氧环境, 本文利用小鼠肌肉脓肿模型探究了钼酸盐转运体 ModABC 对肺克肌肉感染的作用, 发现 ModA 通过提供适应优势和增强侵袭力而促进肺克肌肉感染。据目前所知, 这是钼酸盐稳态相关基因对肺克致病性影响的首次报道。不论是混合感染还是单独感染, ModA 缺失均

导致肌肉组织中肺克载量显著降低(图 5B 和图 6B), 表明 ModA 为肺克在肌肉组织中的生存提供了适应优势; 此外, ModA 缺失导致小鼠后肢肌肉脓肿大大消减(图 6A), 表明 ModA 对肺克毒力十分重要。这不仅与 ModA 赋予肺克的适应优势有关, 也与侵袭力增强有关, 因为接种野生株 WT 的后肢肌肉脓肿从注射点扩散至整个后肢, 并且肝、脾中野生株 WT 活菌数远高于敲除株 $\Delta modA$ (图 5B 和图 6B)。研究发现铜绿假单胞菌 *modA* 基因敲除后生物膜形成和毒力都降低, ModABC 对其慢性肺部感染十分重要^[23]。铜绿假单胞菌 PA1006 在钼稳态中发挥作用, 是硝酸盐利用、生物膜形成和毒力所必需的^[38]。结核分枝杆菌 *modA* 转座子插入突变株在小鼠肺内增殖和毒力均减弱^[21], 其他几个与钼利用和转运有关的基因(*moe*、*moa*)也已被证实对其致病性十分关键^[17-18]。大肠杆菌可利用宿主来源的硝酸盐(炎症反应的副产物)进行厌氧硝酸盐呼吸而在炎症肠道中产生生长优势^[39]。同样, 鼠伤寒沙门菌也可以通过厌氧硝酸盐呼吸来促进其在炎性肠腔内的繁殖, 噬菌体介导的 III 型分泌系统效应蛋白 SopE 可以增加宿主来源硝酸盐的产生^[40]。因此, 本文认为肺克通过钼酸盐转运体 ModABC 吸收宿主体内钼酸盐进行厌氧硝酸盐呼吸而产生适应优势和增强侵袭力来促进肌肉感染, ModABC 对其他毒力因子的作用及机制仍有待进一步研究。

由于钨酸盐与钼酸盐结构相似, W 可通过竞争结合 ModA 结合位点进而取代 MoCo 中的 Mo 而使硝酸还原酶失活^[22,25,37]。2018 年 Zhu 等发现钨酸盐可以消除 MoCo 依赖性厌氧呼吸赋予的适应优势而选择性抑制肠杆菌科细菌的扩张来改善肠道炎症^[26]。本文也探究了钨酸盐治疗肺克肌肉感染的可能性, 发现钨酸盐可以抑制肺克厌氧硝酸盐呼吸而降低由 ModA 赋予的适应优势(图 7 和图 8), 因而对肺克肌肉感染具有一定的治疗作用。肉眼观察钨酸盐治疗组, 发现小鼠后肢脓肿

情况没有减轻, 推测是因为肺克可能通过非特异性阴离子转运系统吸收钼酸盐, 因而生长并不能被完全抑制。但是, 该结果对于肺克这种易产生多重耐药菌株^[41]感染的治疗具有重要意义。目前临床上使用第三代头孢菌素和碳青霉烯类等抗生素对肺克感染进行治疗, 然而产超广谱 β -内酰胺酶和耐碳青霉烯肺克菌株的流行率正在上升, 其中最令人担忧的是临床上已经出现的耐碳青霉烯高毒力肺克的感染, 其最佳治疗方案仍然未知^[2,10]。因此, 钨酸盐处理的浓度以及与抗生素联用对于肺克尤其是耐碳青霉烯高毒力肺克感染的治疗值得深入研究。

REFERENCES

- [1] Lin DS, Fan JM, Wang JJ, Liu L, Xu L, Li FY, Yang J, Li B. The fructose-specific phosphotransferase system of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by global regulator CRP and linked to virulence and growth[J]. Infection and Immunity, 2018, 86(8): e00340-18
- [2] Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*-clinical and molecular perspectives[J]. Journal of Internal Medicine, 2020, 287(3): 283-300
- [3] Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(6): 344-359
- [4] Chang CM, Lee HC, Lee NY, Lee IW, Wu CJ, Chen PL, Lee CC, Ko NY, Ko WC. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* complicated skin and soft-tissue infections of extremities: emphasis on cirrhotic patients and gas formation[J]. Infection, 2008, 36(4): 328-334
- [5] Yahalom G, Guranda L, Meltzer E. Internal obturator muscle abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Infection, 2007, 54(3): E157-E160
- [6] Wang T, Wong S, Woo P. Two cases of pyomyositis caused by *Klebsiella pneumoniae* and review of the literature[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2001, 20(8): 576-580
- [7] Liao WH, Lai CC, Huang SH, Lin SH. Rectus femoris pyomyositis caused by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Surgical Infections, 2014, 15(4): 464-465
- [8] Liao PY, Chiang WC, Chen SY, Su CP, Wang JT, Hsueh PR. Rapidly fatal gas-forming pyogenic psoas abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Clinical Infectious Diseases, 2007, 44(9): 1253-1254
- [9] Cheng SP, Chang WW, Tsao YT. Gas-forming iliopsoas abscess: a *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive

- syndrome[J]. *Journal of Emergency Medicine*, 2016, 51(5): E127-E128
- [10] Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 483
- [11] Lee HL, Lee HC, Guo HR, Ko WC, Chen KW. Clinical significance and mechanism of gas formation of pyogenic liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(6): 2783-2785
- [12] Wakabayashi Y, Jubishi D, Okamoto K, Ikeda M, Tatsuno K, Mizoguchi M, Sato T, Okugawa S, Moriya K. A rare case of a prostatic abscess, bacteremia and chronic granulomatous disease associated with *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2019, 25(5): 365-367
- [13] Cole J. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation?[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 136(1): 1-11
- [14] Shi TY, Xie JP. Molybdenum enzymes and molybdenum cofactor in mycobacteria[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(10): 2721-2728
- [15] Hagen WR. Cellular uptake of molybdenum and tungsten[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, 255(9/10): 1117-1128
- [16] Zhang Y, Rump S, Gladyshev VN. Comparative genomics and evolution of molybdenum utilization[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, 255(9/10): 1206-1217
- [17] Williams M, Mizrahi V, Kana BD. Molybdenum cofactor: a key component of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis?[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 40(1): 18-29
- [18] Levillain F, Poquet Y, Mallet L, Mazères S, Marceau M, Brosch R, Bange FC, Supply P, Magalon A, Neyrolles O. Horizontal acquisition of a hypoxia-responsive molybdenum cofactor biosynthesis pathway contributed to *Mycobacterium tuberculosis* pathoadaptation[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(11): e1006752
- [19] Winter SE, Lopez CA, Bäumlér AJ. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation[J]. *EMBO Reports*, 2013, 14(4): 319-327
- [20] Self WT, Grunden AM, Hasona A, Shanmugam KT. Molybdate transport[J]. *Research in Microbiology*, 2001, 152(3/4): 311-321
- [21] Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(2): 257-267
- [22] Pederick VG, Eijkelkamp BA, Ween MP, Begg SL, Paton JC, Mcdevitt CA. Acquisition and role of molybdate in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(21): 6843-6852
- [23] Périnet S, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Ouellet MM, Charette SJ, Levesque RC. Molybdate transporter ModABC is important for *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection[J]. *BMC Research Notes*, 2016, 9(1): 23
- [24] Garzón A, Li J, Flores A, Casades J, Stewart V. Molybdenum cofactor (chlorate-resistant) mutants of *Klebsiella pneumoniae* M5al can use hypoxanthine as the sole nitrogen source[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(19): 6298-6302
- [25] Gates AJ, Hughes RO, Sharp SR, Millington PD, Nilavongse A, Cole JA, Leach ER, Jepson B, Richardson DJ, Butler CS. Properties of the periplasmic nitrate reductases from *Paracoccus pantotrophus* and *Escherichia coli* after growth in tungsten-supplemented media[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220(2): 261-269
- [26] Zhu WH, Winter MG, Byndloss MX, Spiga L, Duerkop BA, Hughes ER, Büttner L, De Lima Romão E, Behrendt CL, Lopez CA, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis[J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 208-211
- [27] Gao YS, Feng T, Qiu JF, Yang RF, Zhou DS, Li YL. A method for constructing unmarked deletion mutants of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Military Medical Sciences*, 2013, 37(6): 431-434 (in Chinese)
高钰双, 冯甜, 邱景富, 杨瑞馥, 周冬生, 李迎丽. 肺炎克雷伯菌基因无痕敲除方法的建立[J]. *军事医学*, 2013, 37(6): 431-434
- [28] Liu L, Li FY, Xu L, Wang JJ, Li MR, Yuan J, Wang H, Yang RP, Li B. Cyclic AMP-CRP modulates the cell morphology of *Klebsiella pneumoniae* in high-glucose environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2984
- [29] Leimkühler S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors in *Escherichia coli*[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(6): 2007-2026
- [30] Zupok A, Iobbi-Nivol C, Méjean V, Leimkühler S. The regulation of Moco biosynthesis and molybdoenzyme gene expression by molybdenum and iron in bacteria[J]. *Metallomics*, 2019, 11(10): 1602-1624
- [31] Holland IB. Rise and rise of the ABC transporter families[J]. *Research in Microbiology*, 2019, 170(8): 304-320
- [32] Arai H. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 103
- [33] Iobbi-Nivol C, Leimkühler S. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(8/9): 1086-1101
- [34] Grunden AM, Shanmugam K. Molybdate transport and

- regulation in bacteria[J]. Archives of Microbiology, 1997, 168(5): 345-354
- [35] Imperial J, Hadi M, Amy NK. Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli* mod molybdate transport system[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1998, 1370(2): 337-346
- [36] Gisin J, Müller A, Pfänder Y, Leimkühler S, Narberhaus F, Masepohl B. A *Rhodobacter capsulatus* member of a universal permease family imports molybdate and other oxyanions[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22): 5943-5952
- [37] Aguilar-Barajas E, Díaz-Pérez C, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Cervantes C. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions[J]. Biometals, 2011, 24(4): 687-707
- [38] Filiatrault MJ, Tomblin G, Wagner VE, Van Alst N, Rumbaugh K, Sokol P, Schwingel J, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* PA1006, which plays a role in molybdenum homeostasis, is required for nitrate utilization, biofilm formation, and virulence[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55594
- [39] Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Keestra AM, Laughlin RC, Gomez G, Wu J, Lawhon SD, et al. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut[J]. Science, 2013, 339(6120): 708-711
- [40] Lopez CA, Winter SE, Rivera-Chávez F, Xavier MN, Poon V, Nuccio SP, Tsolis RM, Bäumlér AJ. Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration[J]. mBio, 2012, 3(3): e00143-12
- [41] Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 45: 131-139