

研究报告

毒力基因 *yqeH* 功能分析及对禽致病性大肠杆菌致病性的影响

郑倩倩, 姜楠, 李倩文, 傅丹丹, 涂健, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗*

安徽农业大学动物科技学院 兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036

郑倩倩, 姜楠, 李倩文, 傅丹丹, 涂健, 宋祥军, 邵颖, 祁克宗. 毒力基因 *yqeH* 功能分析及对禽致病性大肠杆菌致病性的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 217-228

Zheng Qianqian, Jiang Nan, Li Qianwen, Fu Dandan, Tu Jian, Song Xiangjun, Shao Ying, Qi Kezong. Functional analysis and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* of virulence gene *yqeH*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 217-228

摘要:【背景】禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可引起禽类急性或亚急性感染, 在近年新发现的大肠杆菌III型分泌系统 2 (*Escherichia coli* type III secretion system 2, ETT2)中, 毒力基因 *yqeH* 对其致病性的影响尚不明确。【目的】探究 *yqeH* 在 APEC 致病过程中的作用, 为后期深入研究 ETT2 致病机制奠定基础。【方法】利用 Red 同源重组技术构建 *yqeH* 缺失株 $\Delta yqeH$ 及其回复株 $C\Delta yqeH$, 通过运动性、生物被膜形成能力、抗逆性、抗血清杀菌能力等试验分析 *yqeH* 对 APEC 生物学功能的影响, 并通过细胞黏附、侵袭试验、致病力测定及荧光定量 PCR 检测细胞炎症因子转录水平, 探究 *yqeH* 对 APEC 感染宿主的影响。【结果】构建了缺失株 $\Delta yqeH$ 和回复株 $C\Delta yqeH$; 生物学特性试验结果表明, 与野生株 APEC81 相比, 缺失株 $\Delta yqeH$ 生物被膜形成能力、运动能力降低, 对酸、碱、渗透压、氧化应激的耐受力降低, 抗血清杀菌能力及致病力显著降低; 与野生株 APEC81 相比, 缺失株 $\Delta yqeH$ 对鸡气管黏膜上皮细胞的黏附及侵袭能力显著下降; 同时, 经 $\Delta yqeH$ 感染的鸡气管黏膜上皮细胞炎症因子转录水平显著降低。【结论】*yqeH* 可调控 APEC 的生物被膜形成、运动性、抗逆性、黏附侵袭能力、细胞炎症因子转录水平及对血清的敏感性等, 进而调控 APEC 对宿主细胞的致病力。

关键词: 禽致病性大肠杆菌; 大肠杆菌III型分泌系统 2; *yqeH*; 炎症因子; 致病性

基金项目: 国家自然科学基金(31772707)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31772707)

*Corresponding author: E-mail: qkz@ahau.edu.cn

Received: 2021-05-26; Accepted: 2021-08-13; Published online: 2021-10-12

Functional analysis and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* of virulence gene *yqeH*

ZHENG Qianqian, JIANG Nan, LI Qianwen, FU Dandan, TU Jian, SONG Xiangjun, SHAO Ying, QI Kezong*

Anhui Provincial Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: [Background] Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) can cause avian acute or subacute infection, *E. coli* type III secretion system 2 (ETT2) is a new type III secretion system found in recent years. The effect of virulence gene *yqeH* on APEC pathogenicity in APEC is unclear. [Objective] To explore the role of *yqeH* in the pathogenesis of APEC, so as to lay a foundation for further research on the pathogenesis of ETT2. [Methods] The *yqeH* deletion strain $\Delta yqeH$ and its complementary strain $C\Delta yqeH$ were constructed by Red homologous recombination technology. The effects of *yqeH* on the biological function of APEC were analyzed by motility test, biofilm formation ability, stress resistance tests and serum resistance test. The effect of *yqeH* on host infection of APEC was investigated by cell adhesion and invasion test, pathogenicity test and inflammatory factor expression level detected by fluorescence quantitative PCR. [Results] The deletion strain $\Delta yqeH$ and the complementary strain $C\Delta yqeH$ were successfully constructed. Compared with the wild APEC81 strain, $\Delta yqeH$ strain showed lower biofilm formation ability and movement ability, lower tolerance to acid, alkali, osmotic pressure and oxidative shock, lower serum resistance and lower pathogenicity. The adhesion and invasion ability of $\Delta yqeH$ to the epithelial cells of chicken trachea mucosa were significantly decreased. Compared with wild strain APEC81, the transcription level of inflammatory factors in chicken tracheal epithelial cells infected by $\Delta yqeH$ significantly reduced. [Conclusion] *yqeH* can regulate biofilm formation, motility, stress resistance, adhesion and invasion ability, inflammatory factor expression, and serum resistance of APEC, thereby regulate the pathogenicity of APEC.

Keywords: avian pathogenic *E. coli*; ETT2; *yqeH*; inflammatory factors; pathogenicity

禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)可引起禽类急性或亚急性感染,引发一系列的临床症状,如肝周炎、心包炎、腹膜炎和出血性肠炎等,已对全球养禽业造成巨大的经济威胁^[1-3]。

大肠杆菌III型分泌系统 2 (*Escherichia coli* type III secretion system 2, ETT2)是 2001 年在肠出血性大肠杆菌 O157:H7 基因组中发现的一种新型III型分泌系统^[4]。ETT2 广泛存在于多种大肠杆菌菌株中,参与细菌致病并在其中发挥非常

重要的作用^[5]。研究表明,ETT2 对禽致病性大肠杆菌的侵袭能力、细胞内存活能力和毒力都有着一定的贡献^[6-7]。转录调节因子一般作为细菌毒力岛中调控多数下游表型基因的重要调控开关,介导 APEC 在外界环境变化和感染宿主细胞的过程中产生表型应答,促进其存活、感染及定殖,对 APEC 的发病作用至关重要。*yqeH* 是位于 ETT2 毒力岛开放阅读框的第一个基因,同时也是 LuxR 家族转录调节因子,其对 APEC 致病性可能具有重要影响。本实验室曾研究了 *yqeH*

在含有不完整 ETT2 基因簇的 APEC40 菌株中的生物学特性及致病作用^[8]。为了探究 *yqeH* 在 APEC 致病过程中的普遍性作用, 本实验对含有完整 ETT2 基因簇的 APEC81 中 *yqeH* 的生物学特性及致病性进行研究。通过构建 $\Delta yqeH$ 基因缺失株, 进行运动性、生物被膜检测、荧光定量 PCR 检测、血清杀菌、细胞黏附侵袭、宿主致病力、细胞炎性因子表达检测等试验, 以期为进一步解析 *yqeH* 基因功能、探究 *yqeH* 在 APEC 致病过程中的作用及调控 APEC 致病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

禽致病性大肠杆菌 APEC81 和质粒 pKD46、pKD3、pCP20、pSTV28 及鸡气管黏膜上皮细胞等均由安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室保存。根据 NCBI 公布的 O157:H7 ETT2 毒力岛中的 *yqeH* 基因序列 (NC_002695.2), 使用软件 Primer Premier 5 设

计引物(表 1), 由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

1.2 缺失株 $\Delta yqeH$ 及其回复株 $C\Delta yqeH$ 的构建

利用 Red 同源重组系统^[9]将同源臂片段电转化到携带 pKD46 质粒的 APEC81 感受态细胞中替换目的基因。将筛选得到的阳性重组子制成感受态细胞并电转入 pCP20 质粒, 42 °C 培养过夜消除氯霉素抗性片段, 用表 1 中引物序列 *yqeH*-out-F/R 进行 PCR 验证, 经测序验证后的缺失株命名为 $\Delta yqeH$ 。将 *yqeH* 基因片段连接到 pSTV28 载体上, 重组质粒 pSTV28-*yqeH* 电转入 $\Delta yqeH$ 感受态细胞中, 通过 M13-F/R 引物鉴定。测序验证后的回复株命名为 $C\Delta yqeH$ 。

1.3 生长曲线的测定

从平板上挑取单菌落到 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜。次日将 3 株菌的 OD_{600} 调整到相同, 按 1:100 比例将菌液转接至 96 孔板, 每隔 1 h 用酶标仪测定 OD_{620} , 根据 OD_{620} 数值绘制生长曲线。

表 1 缺失株及回复株引物

Table 1 Primers used in the gene deletion and complemented strains

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>yqeH</i> -in-F	CCAAATAATGCCAGAAG
<i>yqeH</i> -in-R	TTGCGGTCGCTGACTAA
<i>yqeH</i> -out-F	TTTCTATTCCACCTTCG
<i>yqeH</i> -out-R	GTGCGTCTGTTGATGAG
<i>yqeH</i> -up-F	CAAAACAACACTACAGCAGGT
<i>yqeH</i> -lap-cm-up-R	CCAGCCTACACGACTACAAAGCCCCAT
<i>yqeH</i> -lap-cm-down-F	TATTCATATGGGTCCAACATTGATACT
<i>yqeH</i> -down-R	AATCCTCTTCTCGGCAC
pkd3-cm-lap- <i>yqeH</i> -F	GGAGGTTCTTAACATGGGGCTTTGTAGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCT
pkd3-cm-lap- <i>yqeH</i> -R	TGGCAGATTGTTGAGTATCAATGTTGGACCCATATGAATATCCTCCTTAGTT
<i>yqeH</i> Co-F	CCCAAGCTTTTTTCATAATGTGCATTTG
<i>yqeH</i> Co-R	CGCGGATCCTGGCAGATTGTTGAGTATCA
M13-F	CAGGAAACAGCTATGA
M13-R	GTTTTCCCAGTCACGA

1.4 运动能力的检测

APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 接种至 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养至对数生长期 ($OD_{600}=0.8$, 下同)。无菌 PBS 洗涤、重悬。取 2 μ L OD_{600} 为 2.0 的菌液滴加于琼脂粉含量为 2.5 g/L 的半固体培养基, 37 °C 静置培养 8 h 后观察。

1.5 生物被膜形成的检测

培养 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 至对数生长期, 菌液调整到 OD_{600} 为 0.03, 阴性对照为无菌 LB 培养基, 每组 3 个重复。37 °C 静置培养 18 h 后弃培养基, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 晾干后用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 无菌 PBS 洗涤后加入 33% 乙酸, 酶标仪测定 OD_{595} 数值。

1.6 运动性和生物被膜形成相关基因的转录水平检测

参照文献[8], 选取与细菌运动性、生物被膜形成相关的基因, 将 3 株菌在 LB 液体培养基中培养至对数期, 参照 Trizol 法提取细菌的总 mRNA。核酸蛋白浓度测定仪检测 RNA 浓度。采用反转录试剂盒对 RNA 进行反转录。细菌 16S RNA 基因作为内部参考基因。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相对表达水平。

1.7 抗逆性试验测定

将 3 株菌培养至对数生长期, PBS 重悬洗涤 3 次, 将菌液浓度调整一致。将细菌分别重悬于 pH 3.0、pH 10.0、4.8 mol/L NaCl、10 mmol/L H_2O_2 溶液, 37 °C 孵育 1 h 后梯度稀释, 挂板计数法计数。

1.8 抗血清杀菌能力的检测

在 LB 培养基中将 3 株菌培养至对数生长期, PBS 洗涤 3 次, 调整细菌数量为 1×10^8 CFU/mL。取 10 μ L 菌液至 190 μ L 不同浓度血清或 56 °C、40 min 的热灭活血清中, 混匀, 37 °C 静置 30 min, 取处理后菌液梯度稀释, 挂板计数法计数。

1.9 细胞黏附、侵袭试验

将 3 株菌培养至对数生长期, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 用不含胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和抗生素的培养基重悬菌体, 备用。

将鸡气管黏膜上皮细胞接种至 6 孔细胞培养板, 37 °C、5% CO_2 生长过夜, 待细胞铺满板底时弃培养基, 用无菌 PBS 洗涤 3-4 次, 备用。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100 感染鸡气管黏膜上皮细胞, 以等体积不含 FBS 和抗生素的培养基为对照, 每个菌株重复 3 孔, 37 °C 细胞培养箱中继续孵育 1 h。弃细胞培养液, 用无菌的 PBS 洗涤 3 次, 侵袭试验组再加入含有 1% (体积分数) 庆大霉素的培养基, 37 °C 细胞培养箱中继续孵育 1 h。最后均加入 0.5% TritonX-100 裂解细胞, 静置作用 10 min, 吹吸至无黏稠感。依次倍比稀释, 挂板计数法计数。

1.10 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 感染对细胞炎性因子转录水平的影响

将 3 株菌培养至对数生长期, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 用不含 FBS 和抗生素的培养基重悬菌体, 备用。将鸡气管黏膜上皮细胞接种至 6 孔细胞培养板, 37 °C、5% CO_2 生长过夜, 待细胞铺满板底时弃培养基, 用无菌 PBS 洗涤 3-4 次, 备用。以 MOI=100 感染鸡气管黏膜上皮细胞, 以等体积不含 FBS 和抗生素的培养基作为对照, 每个菌株重复 3 孔, 37 °C 细胞培养箱中继续孵育 2 h。弃细胞培养液, 用无菌的 PBS 洗涤 3 次, 用试剂盒提取总 mRNA, 采用反转录试剂盒对 RNA 进行反转录。 β -actin 作为内部参考基因。参照文献[10]选取部分炎性因子相关的基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相对表达水平。

1.11 致病力测定

参照文献[11]方法, 将 7 日龄雏鸡进行随机分组, 每组 8 只。对 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$

所对应的各组分别气管注射 200 μL 含 10^9 菌落形成单位(CFU)相应菌株的培养物, 对照组每只气管注射等量无菌 PBS。每天监测死亡率, 第 7 天取感染动物的气管和肝脏, 用 4%多聚甲醛固定制作病理切片。

1.12 数据统计分析

利用 GraphPad Prism 8.0 软件 Student's *t*-test 方法分析数据。

2 结果与分析

2.1 缺失株 $\Delta yqeH$ 、回复株 $C\Delta yqeH$ 的鉴定

对挑取的疑似阳性缺失株进行 PCR 鉴定, 用引物对 *yqeH*-out-F/R 和 *yqeH*-in-F/R 进行鉴定并测序确认。鉴定结果显示, 野生株扩增片段大小分别为 2 256 bp 和 252 bp, 缺失株扩增片段大小分别为 1 623 bp、无扩增条带, 表明缺失株构建成功, 见图 1A。同时, 回复株用 M13 引物进

行验证, pSTV28 空质粒作为对照结果显示回复株出现 1 100 bp 条带, 显示基因回复株构建成功, 见图 1B。

2.2 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 生长曲线测定

如图 2 所示, 野生株 APEC81、缺失株 $\Delta yqeH$ 、回复株 $C\Delta yqeH$ 在 LB 培养基中的生长速度无显著差异。

2.3 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 运动能力的检测

运动性检测结果显示 $\Delta yqeH$ 的运动能力显著低于野生株 APEC81 ($P < 0.01$), 回复株运动能力未恢复, 见图 3。

2.4 *yqeH* 基因缺失影响生物被膜的形成

生物被膜形成能力检测结果表明, $\Delta yqeH$ 的生物被膜形成能力较野生株显著减弱 ($P < 0.01$), 回复株生物被膜形成能力基本恢复, 见图 4。

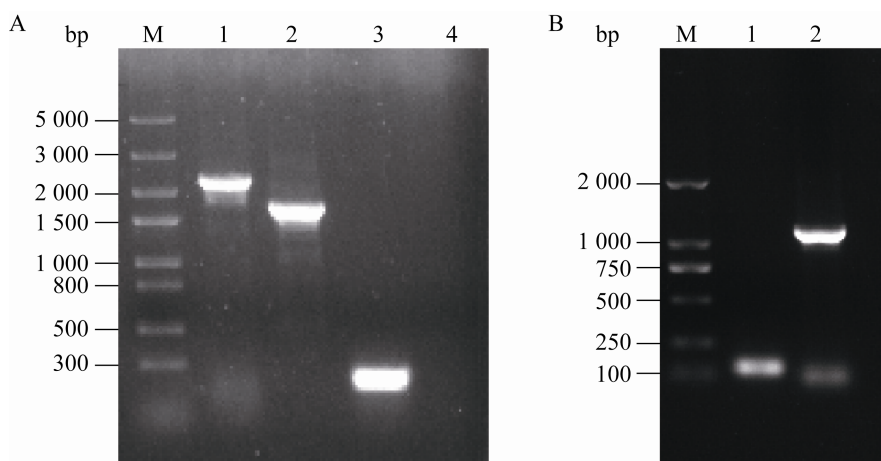


图 1 基因缺失株(A)和回复株(B)的 PCR 鉴定 A: M: Trans 5k DNA Marker I; 1、3: APEC81 野生株基因扩增; 2、4: 缺失株基因扩增。B: M: Trans 2k DNA Ladder; 1: pSTV28 空质粒基因扩增; 2: 回复株基因扩增

Figure 1 Identification of gene deletion strain (A) and complementary strain (B) by PCR. A: M: Trans 5k DNA Marker I; 1, 3: Amplification of *yqeH* genes of APEC81 wild strain, 2, 4: Amplification of APEC81 deletion strain. B: M: Trans 2k DNA Ladder; 1: Amplification of pSTV28 empty plasmid, 2: Amplification of *yqeH* genes of APEC81 complement strain.

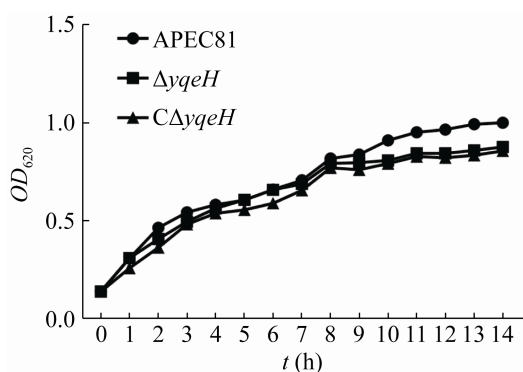


图2 不同菌株的生长曲线

Figure 2 Bacterial growth kinetics of each strain.

2.5 APEC81、ΔyqeH 运动性和生物被膜相关基因的荧光定量分析

运动性和生物被膜相关基因的荧光定量结果如图5所示, ΔyqeH 较 APEC81 生物膜相关基因和鞭毛相关基因转录水平极显著下降 ($P < 0.001$)。

2.6 APEC81、ΔyqeH 和 CΔyqeH 抗逆性的检测

如图6A、6B所示, 与野生株 APEC81 相比, ΔyqeH 在酸、渗透压应激条件下存活率极显著

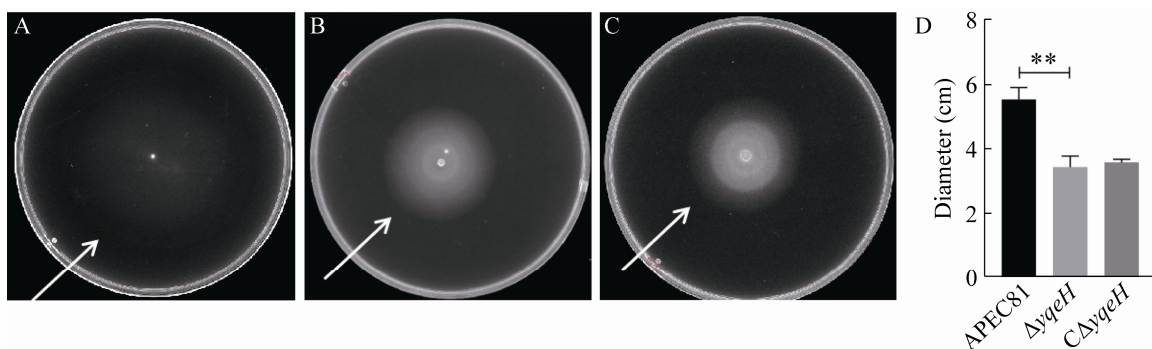


图3 APEC81、ΔyqeH 和 CΔyqeH 运动能力的测定 A: APEC81 运动圈; B: ΔyqeH 运动圈; C: CΔyqeH 运动圈; D: APEC81、ΔyqeH 和 CΔyqeH 运动圈直径测定, **: $P < 0.01$

Figure 3 Analysis of motility of APEC81, ΔyqeH and CΔyqeH strains. A: APEC81 movement circle; B: ΔyqeH movement circle; C: CΔyqeH movement circle; D: APEC81, ΔyqeH and CΔyqeH movement circle diameter measurement. **: $P < 0.01$.

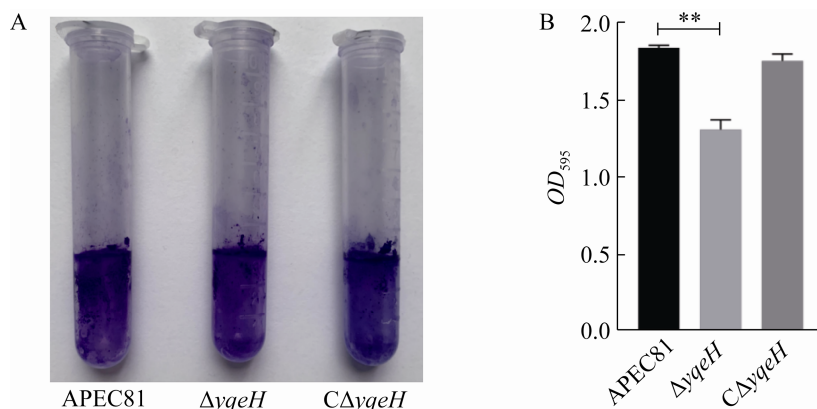


图4 APEC81、ΔyqeH 和 CΔyqeH 菌株生物被膜形成能力的测定 A: 生物膜形成情况; B: 生物膜测定, **: $P < 0.01$

Figure 4 Determination of biofilm formation ability of APEC81, ΔyqeH and CΔyqeH strains. A: Biofilm formation; B: Biofilm measurement. **: $P < 0.01$.

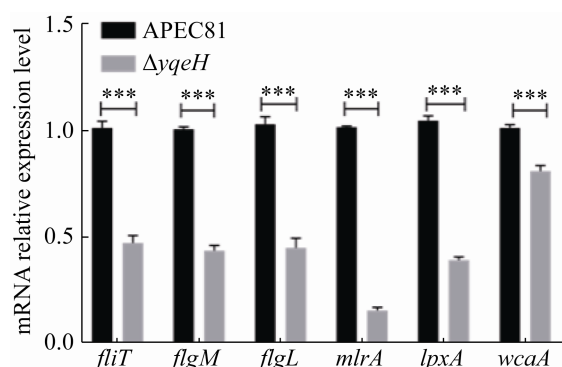


图5 运动性、生物被膜形成能力相关基因的转录水平

Figure 5 Transcription level of genes related to motor and biofilm formation ability. ***: $P < 0.001$.

下降($P < 0.001$); 如图 6C 所示, 在氧化休克应激条件下存活率显著下降($P < 0.01$); 如图 6D 所示, 在碱应激条件下存活率下降($P < 0.05$)。在回复株中, 抗酸、抗渗透应激能力未恢复, 抗碱、抗氧化应激能力有所恢复。

2.7 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 菌株血清补体杀菌能力的检测

体外血清杀菌实验结果表明, $\Delta yqeH$ 在不同浓度(100%、50%、30%、10%)的血清中抗血清杀菌能力均低于野生株。当血清含量分别为 100%、50%、30%时, $\Delta yqeH$ 的抗血清杀菌能力显著低于野生株($P < 0.01$); 在血清含量为 50%、

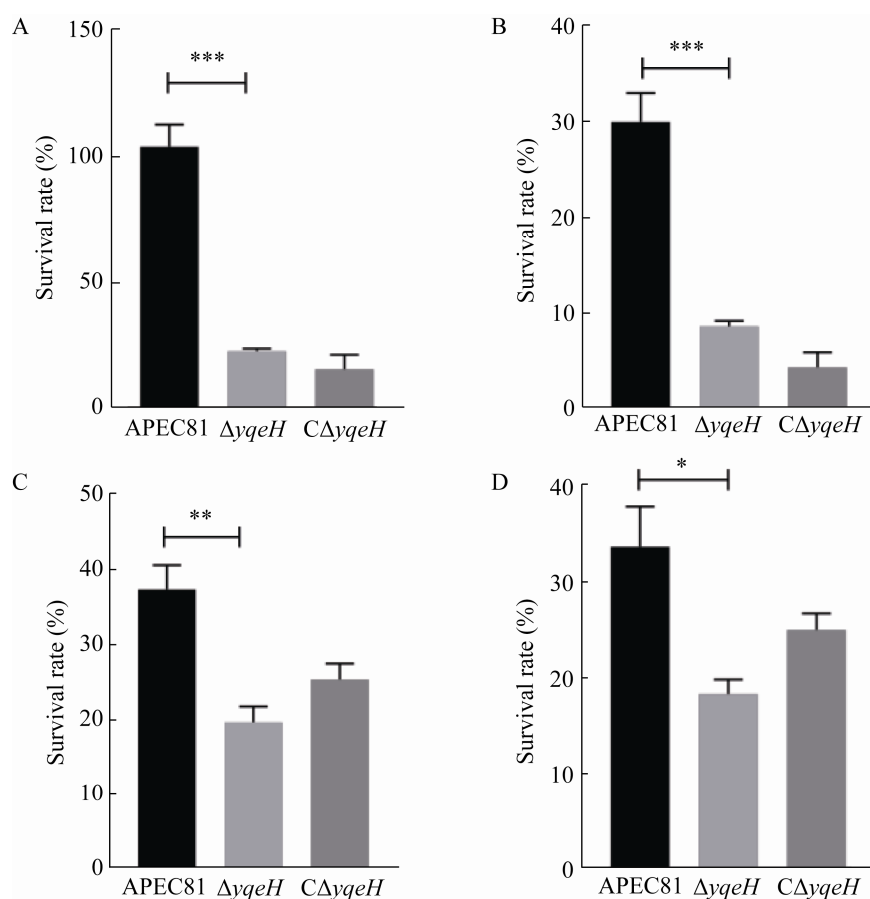


图6 各菌株在不同环境下的存活率测定 A: 酸休克; B: 渗透压休克; C: 氧化休克; D: 碱休克。

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 6 The survival rates of each strain in different environment. A: Acid-shock; B: Osmotic-shock; C: Oxidative-shock; D: Alkali-shock. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

30%时回复株抗血清杀菌能力有所恢复,见图 7。

2.8 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 的黏附与侵袭能力的检测

如图 8 所示,与野生株相比, $yqeH$ 的缺失极显著地降低了 APEC 对鸡气管黏膜上皮细胞的黏附能力($P<0.001$);同时, $yqeH$ 的缺失也显著降低了 APEC 对鸡气管黏膜上皮细胞的侵袭能力($P<0.001$);在回复株中黏附、侵袭能力均有所恢复。

2.9 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 感染对炎性细胞因子转录水平的影响

如图 9 所示,与野生株相比, $yqeH$ 缺失株和回复株感染细胞 2 h 后,炎性细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 的转录水平显著降低。

2.10 YqeH 致病力的测定

7 日龄雏鸡分别感染 3 株菌后,野生株组第 1 天死亡 1 只,第 2 天死亡 2 只,第 3、4 天各死亡 1 只,第 5 天开始无死亡;感染缺失株组第 1 天无死亡,第 2、3 天各死亡 1 只,第 4 天开始无死亡;感染回复株组第 1 天死亡 2 只,第 2、3、4 天各死亡 1 只,第 5 天开始无死亡。各组雏鸡存活情况见图 10。

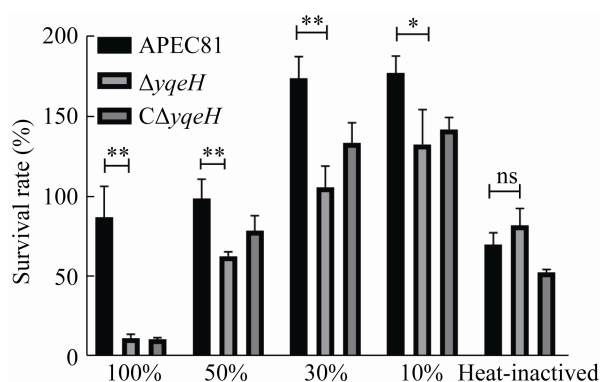


图 7 抗血清杀伤能力 *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无统计学意义

Figure 7 Resistance to bactericidal activities of serum. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No statistical significance.

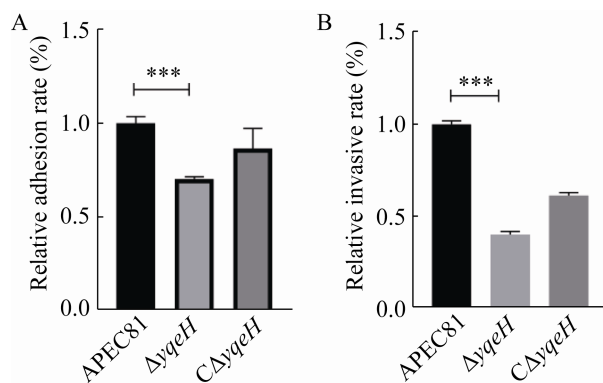


图 8 $\Delta yqeH$ 对鸡气管黏膜上皮细胞黏附(A)及侵袭(B)的实验结果

Figure 8 Results of adhesion (A) and invasion (B) of $\Delta yqeH$ to chicken tracheal epithelial cells. ***: $P<0.001$.

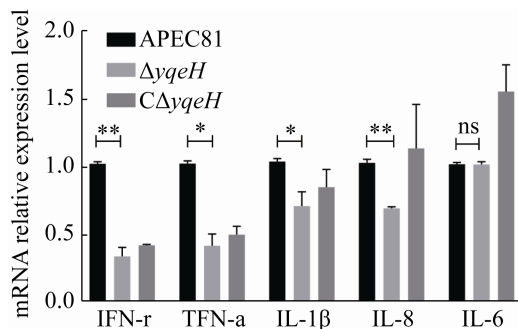


图 9 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 感染对炎性细胞因子转录水平的影响 *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无统计学意义

Figure 9 Effects of APEC81, $\Delta yqeH$ and $C\Delta yqeH$ infection on transcription levels of inflammatory cytokines. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ns: No statistical significance.

2.11 组织切片病理变化

HE 染色结果如图 11 所示, APEC81 气管(图 11A)黏膜下层水肿, 黏膜上纤毛脱落; $\Delta yqeH$ (图 11B)黏膜下层未见水肿, 纤毛状态良好; $C\Delta yqeH$ 气管(图 11C)黏膜下层水肿, 纤毛脱落; 对照组(图 11D)结构无明显改变。APEC81 肝脏(图 11E)发生肝细胞水泡变性; $\Delta yqeH$ (图 11F)和 $C\Delta yqeH$

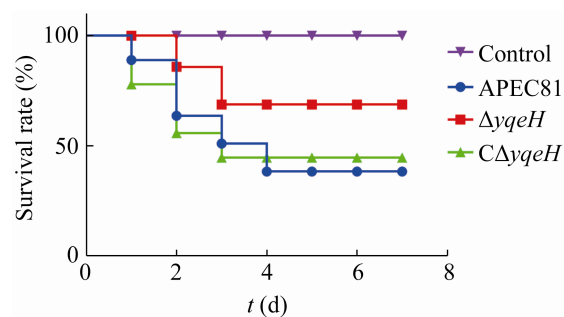


图 10 APEC81、 $\Delta yqeH$ 和 $C\Delta yqeH$ 感染雏鸡后的存活率

Figure 10 Survival rate of APEC81, $\Delta yqeH$ and $C\Delta yqeH$ after infection in chicks.

(图 11G)肝细胞间隙增宽;对照组(图 11H)结构无明显改变。

3 讨论与结论

禽致病性大肠杆菌病是由 APEC 引起的一种原发性或继发性的禽类传染病, APEC 可以感染各种类型和年龄段的禽类, 给世界各地的养禽业造成了严重的经济损失^[12-13]。要想防控 APEC 就需要了解其致病机制。近年来对 APEC 致病机制的研究集中在毒力分泌系统上, ETT2

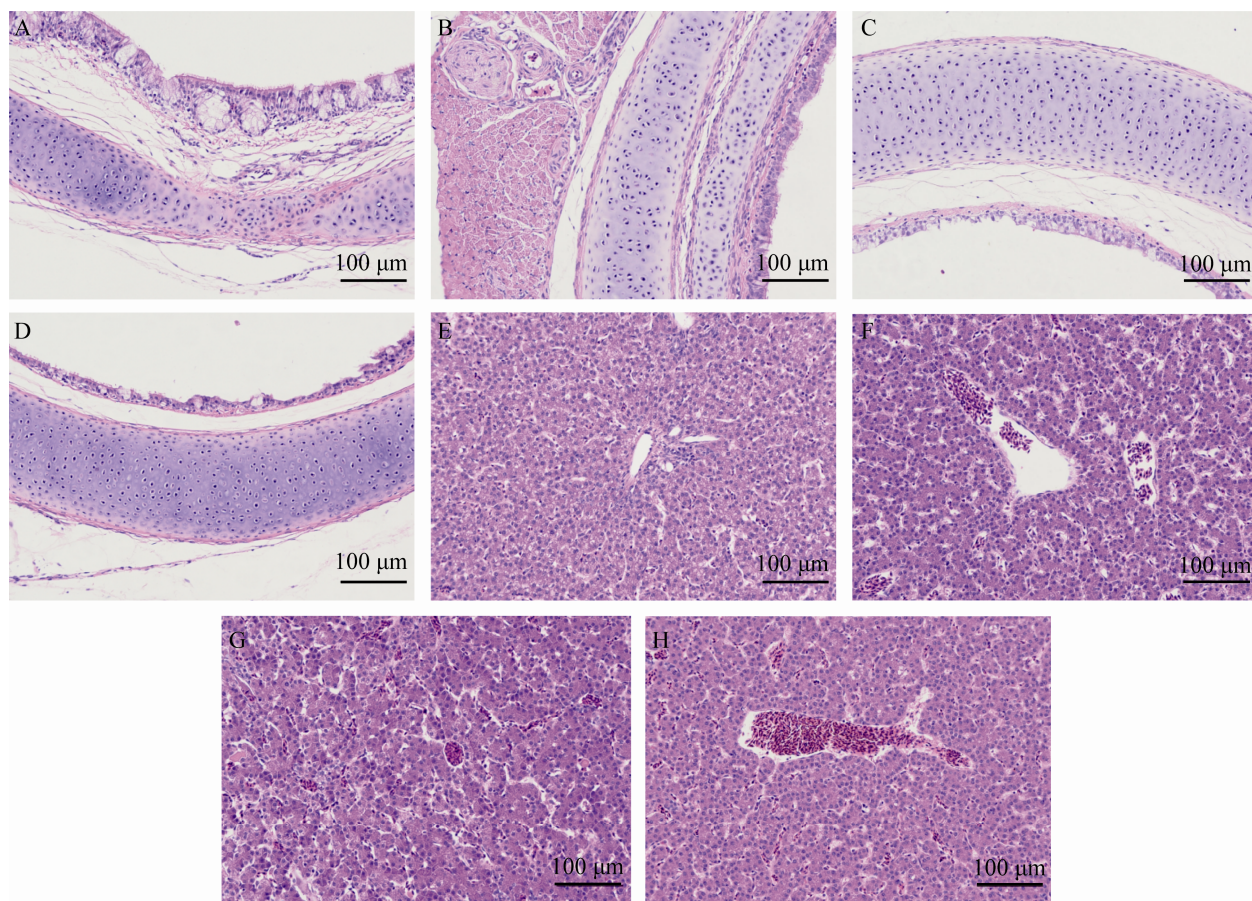


图 11 各菌株感染宿主的组织切片(200×) A–D: APEC81、 $\Delta yqeH$ 、 $C\Delta yqeH$ 及对照的气管组织切片; E–H: APEC81、 $\Delta yqeH$ 、 $C\Delta yqeH$ 及对照的肝脏组织切片

Figure 11 Tissue slice of the host infected by each strain (200×). A–D: Trachea tissue slice of APEC81, $\Delta yqeH$, $C\Delta yqeH$ and the control; E–H: Liver tissue slice of APEC81, $\Delta yqeH$, $C\Delta yqeH$ and the control.

毒力岛作为一个新发现的III型分泌系统,已经在多种大肠杆菌中被检测到,但其在 APEC 对宿主的致病过程中发挥的功能尚不明确^[14-16]。本研究选取 ETT2 毒力岛中普遍存在的转录调控子基因 *yqeH* 进行研究,探究 ETT2 在致病过程中的作用。

细菌生物被膜是由胞外多糖、分泌蛋白和 DNA 组成的表面相关微生物的异质聚集体,其能增强细菌抵抗宿主免疫系统及在不利环境中生存的能力,可将菌体与外部不利环境隔绝^[17-18]。本研究中,*yqeH* 基因缺失后 *mlrA*、*lpxA* 等生物被膜形成相关的基因转录水平下降,导致 APEC81 生物膜形成能力显著下降,同时可能由于生物被膜减少导致其在酸休克、渗透压休克中的存活率极显著降低,在氧化休克和碱休克中的存活率也有不同程度的下降。此外,本研究结果显示,*yqeH* 基因缺失后部分鞭毛合成基因转录水平显著降低,这解释了 APEC81 运动能力显著降低这一现象。因此,*yqeH* 可通过调控生物被膜形成基因和鞭毛合成基因的转录影响 APEC 生物被膜形成能力及运动能力,从而有助于细菌的抗逆性及致病性。

禽致病性大肠杆菌最初通过呼吸道感染家禽,因此,对鸡气管黏膜上皮细胞的黏附和侵袭是细菌致病的基础。有研究发现,*eivA* (*ECs3732*) 突变株与原始菌株 K12-EC10 相比,其对细胞的入侵率下降 50%,表明 ETT2 毒力岛在大肠杆菌 K12 与宿主互动中发挥着主要的致病作用^[7]。本研究结果显示 *yqeH* 基因缺失后 APEC81 对鸡气管黏膜上皮细胞的黏附和侵袭能力显著降低,并且对宿主的致病能力降低,与 HE 染色结果相符。感染发生后,识别大肠杆菌等革兰氏阴性菌和 LPS 所必需的受体 TLR4 识别病原,并通过激活免疫分子触发信号转导通路(NF- κ B 通路和 TLRs 通路)^[19-20],诱导炎性细胞因子 IL-8、

TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 等的表达和分泌^[21]。有研究表明,参与细胞入侵的细菌效应体能够诱导炎症反应^[22],肠致病性大肠杆菌(*enteropathogenic Escherichia coli*)和肠出血性大肠杆菌(*enterohemorrhagic Escherichia coli*)对宿主的感染依赖 III 型分泌系统效应子 Map、EspM 和 EspT 等的易位, EspT 在体内会激活 Rac1,参与 EspT 诱导 IL-8 和 IL-1 β 的表达,并且调节细菌入侵上皮细胞^[23]。同时,炎症的诱导对沙门氏菌在肠道中生长的能力至关重要,如果没有炎症反应的刺激,沙门氏菌在这个部位无法获得必需的营养素^[24]。本研究结果显示,*yqeH* 基因缺失株较野生株 APEC81 感染鸡气管黏膜上皮细胞 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 相对转录水平下降,这提示 APEC 中 *yqeH* 可能通过调控某些黏附因子的转录水平来增强其对宿主细胞的黏附入侵功能,并通过诱导炎性因子的表达促进 APEC 的入侵和定殖,从而有利于自身感染增殖。

评价 APEC 毒力有多种参数,其中对血清的敏感性尤为重要,细菌抵抗血清补体系统杀伤作用是其在宿主体内存活及发挥致病性的基础^[25]。本研究结果显示, $\Delta yqeH$ 较 APEC81 有更高的血清敏感性,然而在灭活血清中这种敏感性差异消失。灭活血清对 APEC 产生宿主营养免疫抑制作用,其中铁氧含量极低,而非灭活血清中则不仅存在这种营养免疫,更存在补体等一系列天然免疫活性物质,这些天然免疫因子将入侵宿主血液中的细菌杀死。这提示 *yqeH* 可能通过调控某些血清抗性基因的表达来抵抗宿主血清中补体等天然免疫因子的杀菌作用,这对 APEC 在宿主体内的存活和扩散具有重要辅助作用。

基于以上研究结果,本研究初步揭示了 *yqeH* 对 APEC 在致病性相关的生物学表型及细胞致病性中具有重要作用,为深入了解禽致病性大肠杆菌的致病机制提供了理论基础。然而 *yqeH*

在 APEC 致病性中的表观作用,以及在病原学水平与病原宿主互作水平上具体是基于哪些因子的改变,并通过何种作用机制和通路产生,仍存在诸多疑问,需要更多深入的研究探索。

REFERENCES

- [1] Dou XH, Gong JS, Han XG, Xu M, Shen HY, Zhang D, Zhuang LL, Liu JS, Zou JM. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China[J]. Gene, 2016, 576(1): 244-248
- [2] Song XJ, Hou MM, Tu J, Xue M, Shao Y, Jiang HY, Liu HM, Xue T, Wang GJ, Qi KZ. Outer membrane proteins YbjX and PagP co-regulate motility in *Escherichia coli* via the bacterial chemotaxis pathway[J]. Research in Veterinary Science, 2019, 125: 279-284
- [3] Mu XH, Gao RX, Xiao WH, Gao QQ, Cao CG, Xu H, Gao S, Liu XF. EntE, EntS and TolC synergistically contributed to the pathogenesis of APEC strain E058[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 141: 103990
- [4] Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12[J]. DNA Research, 2001, 8(1): 11-22
- [5] Hartleib S, Prager R, Hedenström I, Löfdahl S, Tschäpe H. Prevalence of the new, SPI₁-like, pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2003, 292(7/8): 487-493
- [6] Wang SH, Liu X, Xu X, Yang DH, Wang D, Han XG, Shi YH, Tian MX, Ding C, Peng DX, et al. *Escherichia coli* type III secretion system 2 ATPase EivC is involved in the motility and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1387
- [7] Yao YF, Xie Y, Perace D, Zhong Y, Lu J, Tao J, Guo XK, Kim KS. The type III secretion system is involved in the invasion and intracellular survival of *Escherichia coli* K1 in human brain microvascular endothelial cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 300(1): 18-24
- [8] 尹磊. ETT2 和 *phoP* 在禽致病性大肠杆菌生物被膜形成及致病性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文, 2019
- Yin L. The roles of ETT2 and *phoP* in the biofilm formation and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [9] 白光兴, 孙志伟, 黄莺, 俞炜源. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 *clpP* 基因的敲除[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 35-38
- Bai GX, Sun ZW, Huang Y, Yu WY. Deletion of *clpP* in chromosome of *E. coli* by red recombination[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 21(1): 35-38 (in Chinese)
- [10] 熊丹. 肠炎沙门菌新型抑炎效应蛋白 TepS 逃逸宿主天然免疫的机制研究[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2020
- Xiong D. Molecular mechanisms of innate immune evasion by a novel anti-inflammatory effector TepS of *Salmonella* Enteritidis[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2020 (in Chinese)
- [11] Wang SH, Xu X, Liu X, Wang D, Liang H, Wu XJ, Tian MX, Ding C, Wang GJ, Yu SQ. *Escherichia coli* type III secretion system 2 regulator EtrA promotes virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2017, 163(10): 1515-1524
- [12] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. Veterinary Research, 1999, 30(2/3): 299-316
- [13] Carson CA, Shear BL, Ellersieck MR, Asfaw A. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1503-1507
- [14] Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12[J]. DNA Research, 2001, 8(1): 11-22
- [15] Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Nature, 2001, 409(6819): 529-533
- [16] Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Akaza H, Hayashi H. Identification of a type III secretion system in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 212(2): 221-228
- [17] Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance[J]. Nature, 2003, 426(6964): 306-310
- [18] Zhang DL, Wang FJ, Yu Y, Ding S, Chen TP, Sun WJ,

- Liang CC, Yu B, Ying HJ, Liu D, et al. Effect of quorum-sensing molecule 2-phenylethanol and ARO genes on *Saccharomyces cerevisiae* biofilm[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(9): 3635-3648
- [19] Herath S, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2006, 69(1): 13-22
- [20] O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know[J]. Current Opinion in Immunology, 2006, 18(1): 3-9
- [21] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397
- [22] Fukazawa A, Alonso C, Kurachi K, Gupta S, Lesser CF, McCormick BA, Reinecker HC. GEF-H1 mediated control of NOD1 dependent NF-kappaB activation by *Shigella* effectors[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(11): e1000228
- [23] Raymond B, Crepin VF, Collins JW, Frankel G. The WxxxE effector EspT triggers expression of immune mediators in an Erk/JNK and NF-κB-dependent manner[J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(12): 1881-1893
- [24] Stecher B, Robbani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, MacPherson AJ, Buer J, Parkhill J, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota[J]. PLoS Biology, 2007, 5(10): e244
- [25] Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, Brown PK, Arné P, Brée A, Desautels C, Fairbrother JM. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(1): 536-540