

# eha 基因对迟缓爱德华菌抵抗巨噬细胞内外压力的影响

李玉红<sup>1</sup>, 郑恩金<sup>1</sup>, 高大庆<sup>1</sup>, 李佳盈<sup>1</sup>, 成 静<sup>2</sup>, 徐泽炎<sup>2</sup>,  
盛安康<sup>1</sup>, 张 坡<sup>1</sup>, 祝如愿<sup>1</sup>, 刁亦非<sup>1</sup>, 周佳莹<sup>1</sup>, 陆承平<sup>3</sup>

**摘要:**目的 *E. tarda* 能够在体内外许多环境包括在巨噬细胞内生存和繁殖, *eha* 基因是该菌一个重要的转录调控基因, 本研究探讨该基因在细菌抵抗巨噬细胞内外压力中的作用及机制。方法 采用体外实验模拟巨噬细胞内氧化和酸杀菌条件、体内血清和胆汁杀菌条件、以及细菌对 SDS 和多粘菌素 B 敏感性试验, 比较 ET-13 毒力株及其  $\Delta eh$ a 缺失株和 *eha* Comp 互补株在这些压力下存活率, 利用 RT-PCR 和 SDS-PAGE 电泳, 比较上述 3 种细菌相关基因的转录和表达的差异。结果 *eha* 基因的缺失使 ET-13 对酸、 $H_2O_2$ 、SDS 和多粘菌素 B 敏感性提高 ( $P < 0.05$ ); 经小鼠血清或鱼胆汁处理后, 3 种菌株的存活率没有明显区别 ( $P > 0.05$ ); RT-PCR 结果显示, *eha* 基因的缺失使得 *E. tarda* 内的超氧化物歧化酶基因 *sodC*、过氧化氢酶基因 *katB* 和鞭毛蛋白基因 *fliC*、III型分泌系统分泌蛋白基因 *eseC* 的转录水平下降。SDS-PAGE 电泳结果显示, 缺失株的主要外膜蛋白比野生株表达降低。结论 *eha* 基因通过调控 *E. tarda* 相关基因的表达, 参与了该菌抵抗巨噬细胞内氧化和酸等的压力, 有助于细菌在巨噬细胞内生存和繁殖。

**关键词:** *eha* 基因; 巨噬细胞; 迟缓爱德华菌

中图分类号:R378.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)03-0295-05

## Effect for the *eha* gene of *Edwardsiella tarda* to resist macrophage stresses

LI Yu-hong<sup>1</sup>, ZHENG En-jin<sup>1</sup>, GAO Da-qing<sup>1</sup>, LI Jia-ying<sup>1</sup>, CHENG Jing<sup>2</sup>, XU Ze-yan<sup>2</sup>, SHENG An-kang<sup>1</sup>, ZHANG Po<sup>1</sup>, ZHU Ru-yuan<sup>1</sup>, DIAO Yi-fei<sup>1</sup>, ZHOU Jia-ying<sup>1</sup>, LU Cheng-ping<sup>3</sup>

(1. School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China;

2. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China;

3. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**ABSTRACT:** *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) could exist and replicate *in vivo* and *in vitro* such as in macrophage. The *eha* gene is an important regulating gene in *E. tarda*. We explored its role and mechanism for *E. tarda* to resist to macrophage stresses in this study. We compared the survival rates of ET-13 virulence strains with their *eha* mutant strains ( $\Delta eh$ a) and complementary strains (*eha*Comp) by a series of stress experiments *in vitro*, which were imitated oxidation and acid condition in macrophage, serum and bile condition *in vivo*. Compared with the wilds, the survival rates of *eha* mutant strains decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in the conditions of acid,  $H_2O_2$ , SDS, and polymyxin B. There's no significant difference ( $P > 0.05$ ) between the survival rates of *eha* mutants and ones of the wild strains with the treatment of mice serum or fish bile. The transcription level of the genes of superoxide dismutase C (*sod C*), catalase B (*katB*), flagellin C (*fliC*), and secretary protein C (*eseC*) of III type secretary system protein in the mutants were lower by RT-PCR. The expression of main outer membranes in the mutants was decreased by SDS-PAGE electrophoresis. The results showed that the *eha* gene may control some related virulence factors for *E. tarda* to resist acid and oxidants to kill in macrophage. The *eha* gene was helpful for *E. tarda* to replicate in macrophage.

**KEY WORDS:** *eha* gene; macrophage; *E. tarda*

Supported by the SRTP Fund Based on Teachers' Scientific Research Projects of the Southeast University (No. T14412011)

Corresponding author: Gao Da-qing, Email:dgao2@yahoo.com

基于教师科研项目的东南大学 SRTP 项目基金 (No. T14412011)资助

通讯作者:高大庆,Email:dgao2@yahoo.com

作者单位:1. 东南大学医学院,南京 210009;

2. 江苏大学医学院,镇江 212000;

3. 南京农业大学动物医学院,南京 210095

迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*,简称*E. tarda*)属于肠杆菌科爱德华菌属,分布广泛,可感染鱼类、两栖类、爬行类、鸟类及哺乳类等。*E. tarda*能够引起多种鱼类感染,是水产养殖业的重要病原体<sup>[1]</sup>。该菌能够在宿主体内外和巨噬细胞环境中生存和繁殖,是病原菌侵染宿主、引发疾病的先决条件。

高大庆等用鸟枪法在*E. tarda*中发现的一个溶血调控基因(*E. tarda* haemolysin activator gene,简称*eha*),前期的研究表明*Eha*蛋白是一个重要的转录调控因子<sup>[2-3]</sup>。我们在体外模拟了巨噬细胞内外杀菌的条件,分析*eha*基因在*E. tarda*适应巨噬细胞内胁迫中的作用,并进一步探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 强毒株*E. tarda* ET-13由南京农业大学陆承平教授惠赠。*E. tarda* ET-13的*eha*缺失株( $\Delta eh$ a)和*eha*互补株(*eha*Comp)由本室保存。弱毒株89602由江苏省临床检验中心程梅主任惠赠。

1.1.2 培养基 细菌采用LB(Luria Broth)培养基来培养,抗生素浓度分别为:氯霉素(Cm)50 μg/mL,多粘菌素(Col)50 μg/mL。

### 1.2 方法

1.2.1 体外应激实验 按参考文献<sup>[4]</sup>的方法检测血清、胆汁、过氧化氢、SDS,多粘菌素B、酸等胁迫条件下细菌的存活率。对数期的菌体用PBS(pH 7.2)漂洗2次后,菌液OD<sub>600</sub>调节为0.5。菌液分为两等份,一组作为对照,另一组经胁迫条件处理,为实验组。然后进行系列稀释,涂平板,计数菌落。菌液浓度=平板菌落数×稀释倍数,细菌存活率=实验组菌液浓度(cfu/mL)/对照组菌液浓度(cfu/mL)×100%。

1.2.2 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)敏感性实验 按参考文献<sup>[4]</sup>的方法,对数期的菌体用PBS(pH7.2)漂洗2次后,LB调节OD<sub>600</sub>为0.5。取200 μL菌液涂布LB平板上,将含不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的纸片轻轻贴在培养基表面,要求纸片间距不小于24 mm,纸片中心距平皿边缘不小于15 mm。37℃静置培养24 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.3 RT-PCR 按Trizol试剂盒说明书,提取细菌RNA,取2 μg RNA逆转录成cDNA。再以cDNA为模版,用超氧化物歧化酶基因(superoxide dismutase C, *sodC*)、过氧化氢酶基因(catalase B,

*katB*)和鞭毛蛋白基因(flagellin C, *fliC*)、Ⅲ型分泌系统的分泌蛋白基因(secretary protein C, *eseC*)的引物扩增各基因,以扩增16S rRNA基因作为内标参照,半定量检测各基因的转录水平。引物序列见表1。

表1 实验用引物名和引物序列

Tab. 1 Experimental primers and their sequences

Gene	Primer	Sequence(5'-3')
<i>katG</i>	<i>katG</i> -F	CTCTTTATTGTCGTCCCTGTGCG
	<i>katG</i> -R	CTATCGAGGTGCCGTTTGC
<i>sodC</i>	<i>sodC</i> -F	CGAACGCCCTATGGTCTG
	<i>sodC</i> -R	AGCGCATGTCCCTTCAGC
<i>fliC</i>	<i>fliC</i> -F	TAGAAGCAGGAAAATGGGG
	<i>fliC</i> -R	ACGCCGTAATGCGCGATAACG
<i>eseC</i>	<i>eseC</i> -F	GCGCAGAAAGCAGGGATT
	<i>eseC</i> -R	GGGTCACGGCGGTATGTAG
16srRNA	16srRNA-F	TGAAGAAGGCCTT CGGTTG
16srRNA	16srRNA-R	TTACTAGCGATTCCGACTTC

1.2.4 细菌外膜蛋白的提取 方法参考文献<sup>[5]</sup>,低速离心细菌培养物,收集菌体,以Tris-Mg缓冲液重洗涤3次,置冰浴中超声波破碎细菌,吸取上清。超速离心,去除上清。沉淀溶于2%十二烷基肌酸钠的Tris-Mg缓冲液中。再超速离心,沉淀溶于Tris-Mg缓冲液外膜蛋白。

1.2.5 10% SDS-PAGE外膜蛋白电泳,检测细菌外膜蛋白,方法参考文献<sup>[5]</sup>。加样量15 μL/孔,在1×Tris-甘氨酸凝胶电泳缓冲液中电泳。样品在浓缩胶中的电泳电压为80伏,在分离胶的电泳电压为120伏。电泳后的凝胶置于考马斯亮兰R-250染色液中染色过夜,脱色液脱色后观察结果。

1.2.6 统计学分析 细菌的存活率之间的比较采用t检验,以P<0.05为有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 细菌经酸处理后的存活率 模拟细菌在巨噬细胞吞噬溶酶体酸性的环境,经pH 5.0的酸处理后,*eha*缺失株的存活率明显低于野生株(P<0.05),互补株的存活率介于缺失株和野生株之间。表明*eha*基因缺失影响*E. tarda*菌对酸的敏感性,结果如图1(A)所示。

2.2 细菌在SDS和多粘菌素B胁迫环境中的存活率 多粘菌素B是一种抗菌肽,它和表面活性剂SDS均干扰细菌细胞膜的合成。如图1(B)和1(C)所示,分别用0.05%(w/v)的SDS处理ET-13菌

10 min 后,以及用  $62.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  的多粘菌素 B 处理 1 h 和 2 h 后,*eha* 缺失株的存活率均明显低于野生株( $P < 0.05$ ),互补株的存活率均处于野生株和缺

失株之间。结果表明 *eha* 基因缺失可能影响细菌细胞壁的合成,从而使缺失株对表面活性剂和抗菌肽的敏感性增高。

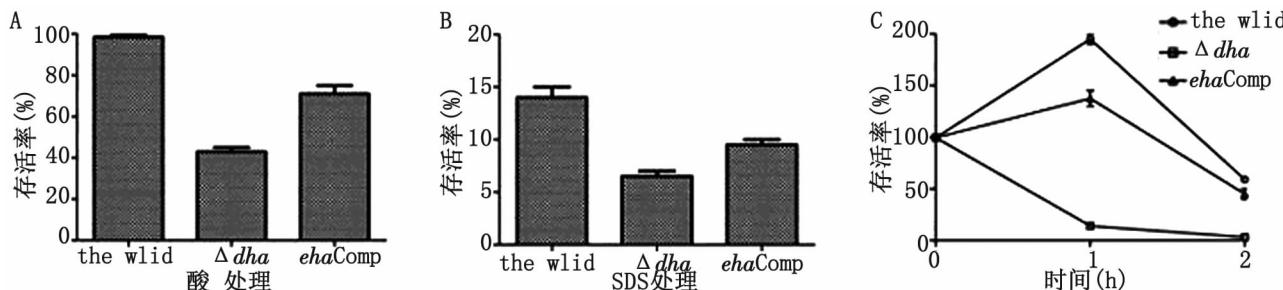


图 1 比较 ET-13 野生株、缺失株和互补株经酸、SDS 和多粘菌素 B 处理后存活率的差异

A 图为野生株、缺失株及互补株经 pH5.0 酸处理 2 h 后的存活率;B 图为野生株、缺失株及互补株经 0.05% 的 SDS 处理 10 min 后的存活率;C 图为野生株、缺失株及互补株经  $62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  的多粘菌素 B 处理 1 h 和 2 h 后的存活率。

Fig. 1 Comparison of the differences of survival rates of the wild, the  $\Delta\text{eha}$  and the *ehaComp* of ET-13 after the treatment with acid, SDS or polymyxin B

A: Survival rates of wild type,  $\Delta\text{eha}$  and *ehaComp* after the treatment with acid pH5.0 for 2 h;

B: Survival rates of wild type,  $\Delta\text{eha}$  and *ehaComp* after the treatment with 0.05% (w/v) SDS for 10 min;

C: Survival rates of wild type,  $\Delta\text{eha}$  and *ehaComp* after the treatment of  $62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  polymyxin B for 1 h or 2 h.

**2.3 细菌在血清或胆汁中的存活率** 小鼠血清或鱼胆汁处理 *E. tarda* 强毒株 ET-13 后,*eha* 缺失株的存活率与野生株的存活率没有明显区别( $P > 0.05$ ),只是胆汁比血清杀菌效果更显著(资料未显)。这结果表明 *eha* 基因不影响 *E. tarda* 在动物体内血清和肠道胆汁中的存活率。而弱毒株 89602 对胆汁和血清的敏感性明显高于强毒株 ET-13( $P < 0.05$ )。

**2.4 细菌经过氧化氢处理后的存活率** 模拟细菌在巨噬细胞吞噬溶酶体氧化的环境,经不同浓度 1 mmol/L、2 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L 的过氧化氢处理 30min 后,*eha* 缺失株的存活率明显低于野生株( $P < 0.05$ ),互补株的存活率介于缺失株和野生株之间,结果如图 2(E)所示。

**2.5 细菌对过氧化氢敏感性实验** 如图 2(A-D)所示,通过测量过氧化氢抑菌环直径,并对结果进行统计学分析显示,纸片上 50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 和 500 mmol/L 不同过氧化氢浓度作用下,中间的纸片为 PBS 对照,缺失株的抑菌环直径明显均大于野生株,有统计学意义( $P < 0.05$ ),因此,*eha* 的缺失使得细菌对过氧化氢的敏感性显著提高。

**2.5 RT-PCR 显示 *eha* 基因对其他基因的调控作用** 如图 3 所示,Δ*eha* 缺失株中超氧化物歧化酶基因 *sodC*、过氧化氢酶基因 *katB* 和鞭毛蛋白基因 *fliC*、Ⅲ型分泌系统分泌蛋白基因 *eseC* 的转录水平比野生株中基因明显降低,互补株 *ehaComp* 中这些

基因的转录水平处于野生株和缺失株之间。结果提示 *eha* 基因对这些和细菌毒力相关的基因有正调控作用。

**2.6 10% SDS-PAGE 外膜蛋白电泳检测** 结果见图 4,比较 ET-13 野生株和 Δ*eha* 缺失株细菌浓度一致的情况下,3 条差异带主要在 15 kD 与 40 kD 之间,从野生株中提取约 37 kD 外膜蛋白的表达明显高于缺失株的表达(资料未显)。

### 3 讨 论

*E. tarda* 致病的关键是能够抵抗巨噬细胞内强氧化及酸性环境的杀伤作用,在宿主巨噬细胞内生存繁殖。巨噬细胞与病原菌接触,细菌表面的多种物质可激活巨噬细胞细胞膜上的 NADPH 氧化酶,从而引起呼吸爆发,产生杀伤病原菌的氧化物(如  $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>[6]</sup>。*E. tarda* 产生的过氧化氢酶(KatB)<sup>[7]</sup>和超氧化物歧化酶(SodB)<sup>[6]</sup>可以帮助细菌将有毒害的氧化物降解为水和氧气。本研究表明,*eha* 基因抑制 *E. tarda* 产生过氧化氢酶和超氧化物歧化酶,有助于缺失株对  $\text{H}_2\text{O}_2$  敏感性增加,其结果降低细菌在巨噬细胞内的存活率。细菌的三型分泌系统(T3SS)拥有一个针状的结构,能够将细菌合成的效应蛋白通过这个结构分泌到宿主细胞的细胞基质中,改变宿主细胞的功能。沙门氏菌(如 *Salmonella typhimurium*)可利用分泌效应蛋白,阻止抗菌效应分子(如 NADPH 氧化酶)的正确转运至含有病

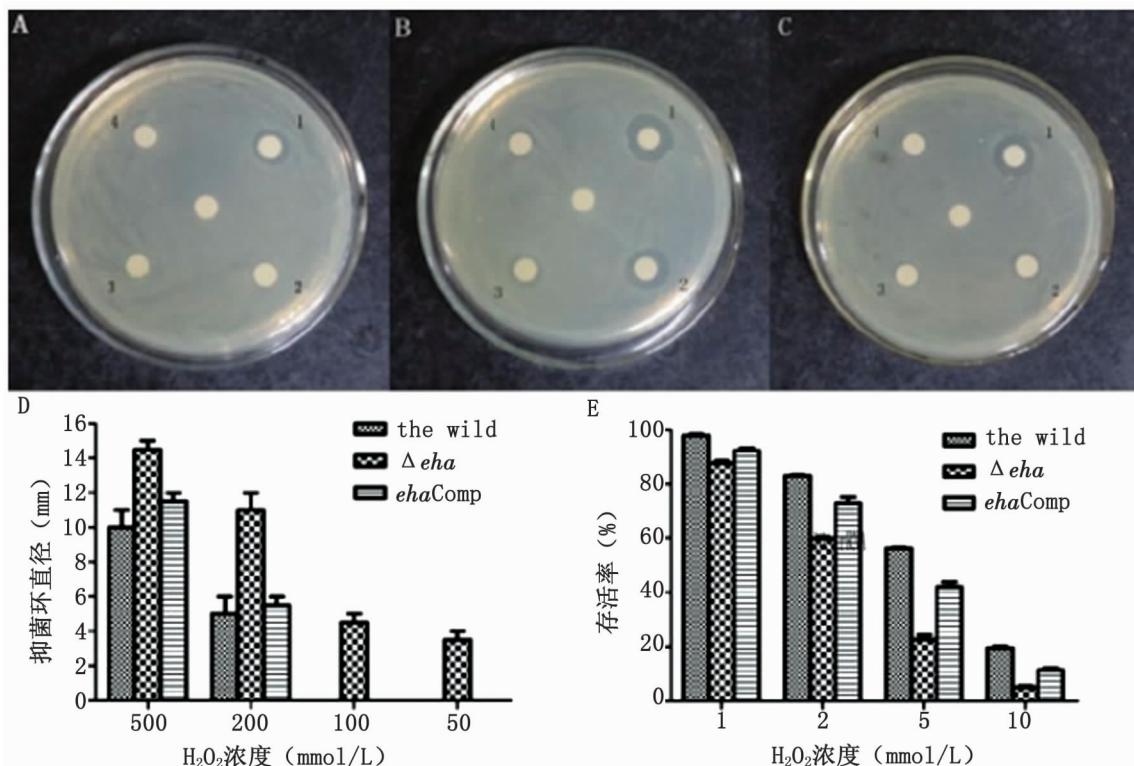


图 2 比较 ET-13 野生株、缺失株和互补株经过氧化氢处理后存活率和对过氧化氢的敏感性的差异

A-C 图显示野生株、缺失株  $\Delta eh$ a 及互补株对过氧化氢抑菌环直径, 1、2、3、4 分别代表纸片上过氧化氢浓度为 500 mmol/L、200 mmol/L、100 mmol/L、50 mmol/L, 中间的纸片为 PBS 对照; D 图为过氧化氢抑菌环直径的统计图; E 图野生株、缺失株及互补株经不同浓度过氧化氢作用 30min 后的存活率。

Fig. 2 Comparison on the differences of survival rates and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>sensitivity of the wild, the  $\Delta eh$ a and the ehaComp of ET-13

A-C: The bacteriostatic ring diameters of the wild,  $\Delta eh$ a and ehaComp of ET-13 to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 1, 2, 3 and 4 showed 500 mmol/L, 200 mmol/L, 100 mmol/L, and 50 mmol/L concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in paper scraps, respectively.

D: The statistical chart of bacteriostatic ring diameters of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

E: Survival rates of the wild,  $\Delta eh$ a and ehaComp after the treatment with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min.

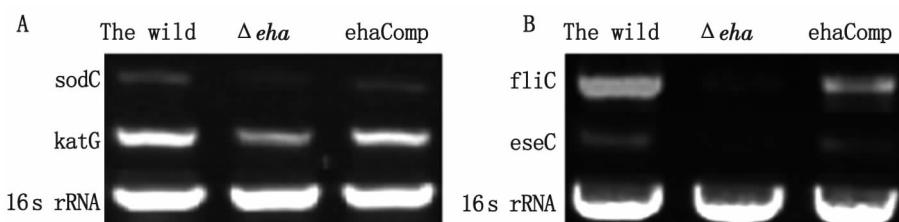


图 3 RT-PCR 结果显示 eha 基因对 ET-13 其他毒力基因的调控作用

A 图为超氧化物歧化酶(sodC)和过氧化氢酶(katB)基因在野生株、缺失株及互补株中的转录水平, 16SrRNA 作为内参; B 图为鞭毛蛋白(fliC)和Ⅲ型分泌系统分泌蛋白(esec)基因在野生株、缺失株及互补株中的转录水平, 16SrRNA 作为内参。

Fig. 3 The eha gene regulated other virulence genes in ET-13 by RT-PCR

A: Transcription levels of superoxide dismutase (sodC) and catalase (katB) in the wild,  $\Delta eh$ a and ehaComp of ET-13, with 16s rRNA as internal reference;

B: Transcription levels of flagellin (fliC) and secretory protein of type III secretion system (esec) in the wild,  $\Delta eh$ a and ehaComp of ET-13, with 16s rRNA as internal reference.

原菌的空泡中, 并可以阻止含有细菌的空泡酸化, 从而达到有利于细菌存活并增殖的目的<sup>[8]</sup>。本研究表明, eha 基因抑制 *E. tarda* 三型分泌系统产生分泌蛋白 EseC 的产生, 可能与缺失株对酸敏感性增加

有关。细菌的鞭毛丝是由鞭毛蛋白(Flagellin, FliC)装配而成的, 本研究用 RT-PCR 证明 eha 基因的缺失可以影响 flic 基因的转录和表达。此外, eha 缺失株在 SDS 和多粘菌素 B 胁迫环境中的存

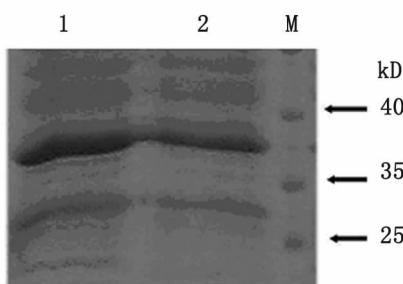


图 4 10% SDS-PAGE 电泳比较 ET-13 野生株和缺失株外膜蛋白表达的差异

1. 野生株, 2. 缺失株, M. 蛋白 marker。

**Fig. 4 Comparison of the differences of the OMP proteins of the wild and  $\Delta eh$ a strains by 10% SDS-PAGE electrophoresis**

1: Wild type; 2:  $\Delta eh$ a; M: Protein marker.

活力降低, 说明 *eha* 基因缺失可能影响细菌细胞外膜蛋白的合成, SDS-PAGE 外膜蛋白电泳也证明这一结果, 其中 37 kD 外膜蛋白, 注射小鼠和鱼后, 可诱导良好的体液和细胞免疫保护<sup>[6]</sup>。

#### 参考文献:

- [1]Chen AP, Jiang YL, Qian D, et al. Edwardsiellasis[J]. China Fisheries, 2011, 7: 49-50. (in Chinese).
- 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 迟缓爱德华氏菌病 [J]. 中国水产, 2011, 7: 49-50.
- [2]Gao DQ, Kan B, Lu CP, et al. Primary analysis and sequencing the hemolytic relative gene of *Edwardsiella tarda* [J]. J Genet Genom, 2001, 25(12): 1162-1167. (in Chinese)
- 高大庆, 阚飚, 陆承平, 等. 迟缓爱德华菌溶血相关基因的测序和

初步的功能分析[J]. 遗传学报, 2001, 25(12): 1162-1167.

- [3]Zheng EJ, Gao DQ, Hong J, et al. *eha*, a regulating virulence gene of *Edwardsiella tarda* [J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(11): 999-1003. (in Chinese)
- 郑恩金, 高大庆, 洪捷, 等. *eha*, 迟缓爱德华菌一个毒力调控基因[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(11): 999-1003.
- [4]Pan HJ, Hao B, Li J, et al. Impact of Cpx on the virulence of *Edwardsiella tarda* [J]. Marine Sci, 2013, 37(2): 17-21. (in Chinese)
- 潘海建, 郝斌, 李杰, 等. Cpx 对迟缓爱德华氏菌毒力的影响 [J]. 海洋科学, 2013, 37(2): 17-21.
- [5]Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, et al. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate[J]. Vaccine, 2004, 22(25-26): 3411-3418. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.02.026

- [6]Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates[J]. Infect Immun, 2001, 69(9): 5689-5697. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5697.2001

- [7]Cheng S, Zhang M, Sun L. The iron-cofactored superoxide dismutase of *Edwardsiella tarda* inhibits macrophage-mediated innate immune response[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(6): 972-978. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.08.004

- [8]Figueira R, Watson KG, Holden DW, et al. Identification of *Salmonella* pathogenicity island type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design[J]. MBio, 2013, 4(2): e00065. DOI: 10.1128/mBio.00065-13

收稿日期:2013-09-29;修回日期:2013-12-20

(上接第 294 页)

- [4]Kröger C, Loschke F, Schwarz N, et al. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- $\alpha$ -mediated desmoplakin phosphorylation[J]. J Cell Biol, 2013, 201(5): 681-692. DOI: 10.1083/jcb.201208162
- [5]Wu J, Meng J, Du Y, et al. RACK1 promotes the proliferation, migration and invasion capacity of mouse hepatocellular carcinoma cell line *in vitro* probably by PI3K/Rac1 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67(4): 313-319. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.01.011
- [6]Sutton P, Borgia JA, Bonomi P, et al. Lyn, a Src family kinase, regulates activation of epidermal growth factor receptors in lung

adenocarcinoma cells[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 76. DOI: 10.1186/1476-4598-12-76

- [7]Gonzalez-Aseguinolaz G, Taladriz S, Marquet A, et al. Molecular replication protein of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum* [J]. Eur J Biochem, 1999, 259(3): 909-916.

- [8]Welburn SC, Murphy NB. Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms [J]. Cell Death Diff, 1998, 5(7): 615-622.

收稿日期:2013-07-29;修回日期:2013-11-30