

迟缓爱德华菌 T3SS 转位因子 EseC 促炎反应

赵凯英¹, 刘孝琪¹, 敬吉波¹, 曹育嘉¹, 张聂珂¹, 张仪迪¹, 高大庆¹, 陆承平²

摘要:目的 III型分泌系统(T3SS)是迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*,简称Et)一种重要的毒力因子, EseC是T3SS一个转位因子。通过缺失 *eseC* 基因,探索 Et 菌 T3SS 与该菌感染细胞和组织后,诱导宿主产生炎症反应的关系。**方法**

构建 Et.CD 菌 *eseC* 基因缺失株及其互补株;用菌落计数法比较两菌株在 RAW264.7 巨噬细胞胞内存活数目;用 CCK-8 法比较两菌株感染巨噬细胞后的细胞存活率;利用流式比较野生株和缺失株诱发巨噬细胞的细胞坏死。分别将野生株和缺失株注射小鼠腹腔,用菌落计数法比较两菌株在肝脏、脾脏、肺脏和肾脏中细菌 CFU/mL,以及通过观察这些器官的大小和 HE 染色切片组织,比较两菌株对这些小鼠组织的炎症反应;用 ELISA 比较这些小鼠血清促炎性细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度;用 RT-PCR,比较野生株和缺失株效应蛋白基因转录水平。**结果** *eseC* 基因缺失后,Et 感染巨噬细胞后,胞内细菌数目和细胞存活率均明显降低,说明野生株感染细胞后,可通过其 T3SS 引起更多细胞的死亡,释放出更多细菌成份;野生株可通过其 T3SS 诱导更多巨噬细胞发生坏死,伴有大量促炎症因子的释放;T3SS 有助于野生株在肝、肺、脾和肾中组织中的大量增殖;野生株感染小鼠后,和 *eseC* 基因缺失株相比,它们的肝脏、脾脏和肺脏外观明显肿大,肝、肺、脾和肾组织中有明显的急性炎症反应,野生株诱发产生的促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 浓度明显高于缺失株;RT-PCR 结果显示,*eseC* 基因的缺失使得 Et 菌的 T3SS 效应蛋白的 *eseJ* 和 *eseE* 基因转录水平明显下降。**结论** *eseC* 基因可以通过 T3SS 影响 Et 在组织和细胞的致炎作用。

关键词: *eseC* 基因; 迟缓爱德华菌; III型分泌系统; 炎症

中图分类号:R378.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)10-0865-08

EseC, a translocon manipulates *Edwardsiella tarda* to induce host inflammatory responses by T3SS

ZHAO Kai-ying¹, LIU Xiao-qing¹, JING Ji-bo¹, CAO Yu-jia¹, ZHANG Nie-ke¹,
ZHANG Yi-di¹, GAO Da-qing¹, LU Cheng-ping²

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

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

Abstract: T3SS is an important virulence factor of *Edwardsiella tarda* (Et), and EseC is a translocon of T3SS. We try to study the T3SS how to manipulate Et to induce host inflammatory responses after Et infected the host cells and tissues. Firstly, we construct Δ *eseC* gene mutant and its complementary strain from the wild type of Et.CD. Secondly, after the bacteria have infected RAW264.7 macrophages, bacterial colonies were counted on LB plates, and the cellular survival rates were inspected by CCK-8 method. We found that the reproductive rate of the wild type within macrophages increased obviously than that of the Δ *eseC* mutant, and the survival rate of the cells infected by the wild type was higher than that did by the mutant. The results indicated that the wild type caused more cells to die by its T3SS and to release more bacterial constituents than the mutant did. Moreover, we found that the necrosis rate of the macrophages infected by the wild type was more than that did by the mutant by flow cytometry (FCM). Results indicated that the wild type induced more cells necrosis by its T3SS and to release pro-inflammatory cytokines more than the mutant did. Thirdly, after the wild type and the mutant were injected into mice with an i.p. infection respectively, the CFUs/mL of the wild type in the liver, lungs, spleen and kidney of mice were significantly more

than the ones of the Δ *eseC* strain, and the acute inflammatory responses in the tissues to the Δ *eseC* strain were more intensive than to wild type by HE staining, and the sizes of the liver, lungs, and spleen infected by the wild type were larger than the ones did by the mutant. The concentrations of IL-1 β and TNF- α of

国家自然科学基金项目(No.31570124)资助

通讯作者:高大庆,Email: dgao2@seu.edu.cn

作者单位:1.东南大学医学院,南京 210009;

2.南京农业大学,南京 210095

inflammatory cytokines in the serums of the mice infected by the wild type were more than the ones did by the *ΔeseC* strain by ELISA. Results showed that the transcriptional levels of *eseJ* and *eseE* genes of the effector proteins of T3SS in the wild type were significantly more than those in the mutant by RT-PCR. Therefore, the *eseC* gene may affect Et to induce the inflammatory response in tissues and cells by T3SS.

Keywords: *eseC* gene; *Edwardsiella tarda*; T3SS; inflammation

Supported by the National Nature and Science Foundation (No. 31570124)

Corresponding author: Gao Da-qing, Email: dgao2@seu.edu.cn

迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*,简称Et)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、哺乳类及人类。Et能够侵染多种鱼类,引起败血症为特征的感染,即迟缓爱德华菌病(Edwardsiellasis)^[1-2]。Ⅲ型分泌系统(Type III secretion system, T3SS)是细菌中一种接触依赖性的、向宿主细胞中靶向转运毒力因子的装置,是细菌一种重要的毒力因子^[3]。Et的主要分泌蛋白(Et secretory protein, EseC)是T3SS一种转位因子。

已有研究发现,Et菌*eseC*基因缺失后,引起Et菌毒力的改变^[4]。本研究通过比较*eseC*基因缺失株和野生株分别感染细胞和组织,探讨Et菌T3SS和感染的细胞、组织,产生炎症反应的关系及机制。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基 实验涉及的菌株和质粒见表1,强毒株*Et.CD*由南京农业大学陆承平教授惠赠。细菌采用LB(Luria Broth)培养基来培养。

表1 菌种及质粒

Tab.1 A list of the strains and plasmid used in the study

菌种及质粒	相关表型	来源
菌种		
<i>E. tarda</i>		
<i>Et.CD</i>	野生型, Col ^r	陆承平教授赠送
<i>ΔeseC</i>	缺失了 <i>eseC</i> 基因的野生型, <i>eseC</i> 基因缺失株	本实验构建
<i>ΔeseC+eseC</i>	含有质粒pACYC-eseC的缺失型, <i>eseC</i> 基因互补株	本实验构建
<i>E. coli</i>		
<i>E.coli</i> DH5α	F ⁻ , φ 80dlacZ ΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	购自 TaKaRa公司
<i>E.coli</i> SM10(λpir)	F ⁻ , thi thr leu to Na lacY supE	本实验室保存
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ mB ⁻), gal, dcm	购自 TaKaRa公司
质粒		
pGEM-Teasy	Amp ^r	购自 Invitrogen公司
pHM5	自杀质粒, mob RP4 oriR6K, SacB, Amp ^r	本实验室保存
pACYC184	Tet ^r , Cm ^r	本实验室保存
pACYC-eseC	基因 <i>eseC</i> 与质粒pACYC184重组	本实验构建

1.2 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。TRIzol Reagent试剂,Reverse Transcriptase M-MLV 试剂购自Invitrogen公司。BALB/c 二级小鼠,6周龄,雌性,购自扬州大学动物模式中心。

1.3 *eseC*基因缺失株及其互补株的构建和鉴定

方法参考文献[5],以*Et.CD*的全基因组为模板,用引物*eseC-F1-F/R*和*eseC-F2-F/R*(见表2)进行PCR,扩增*eseC*基因的两侧片段F1和F2,并连接到自杀质粒pHM5,命名重组质粒为pHM-F1F2。用接合方法将该重组质粒从SM10λpir转移到*Et.CD*,在Amp^r和Col^r双抗LB平板上,得到含

pHM-F1F2 的 *Et.CD* 菌落。含重组质粒的 *Et.CD* 菌落接种 LB 液体培养基中,过夜培养,在 Col^r 和 10%蔗糖的 LB 平板上,筛选到自杀性质粒脱离的

eseC 基因缺失株。进一步用 PCR 鉴定 *eseC* 基因缺失株,反复传代后,筛选一株稳定表达的缺失株。

表 2 用于构建和鉴定 *eseC* 基因缺失株和互补株的引物

Tab.2 Primers used to construct and identify the *eseC* mutant and complementary strain

引物设计	核苷酸序列	描述
<i>eseC</i> -F1-F	GAAGATCTGGCGGTAAAGTCACAGAG	同源重组时所需引物序列
<i>eseC</i> -F1-R	GCTCTAGACCAAGGAGCAGACTATGAG	
<i>eseC</i> -F2-F	GCTCTAGAGCTTGAGATTGGCATTTGT	
<i>eseC</i> -F2-R	ATGCATGCTTCGACGCAGAGGACTAT	
<i>eseC</i> -F	GCTCTAGACATAGTCTGCTCCTGGTT	构建互补株时所需引物序列
<i>eseC</i> -R	CCAAGCTTGTCAGCCTCATCAACAGTA	
<i>eseC</i> -ID-F	GGCGGTAAAGTCACAGAG	缺失 <i>eseC</i> 基因时所需引物序列
<i>eseC</i> -ID-R	TTCGACGCAGAGGACTAT	

以 *Et.CD* 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *eseC* 基因的片段,引物序列见表 2,*eseC* 基因和载体 pACYC184 连接,得到重组质粒 pACYC-*eseC*。通过电击法将该质粒转入到 *eseC* 基因缺失株,在 C_m^rLB 平板上,得到含 pACYC-*eseC* 的 *Et.CD* 菌落,PCR 鉴定为 *eseC* 基因互补株。

1.4 细菌在巨噬细胞内存活实验 将对数期 *E.coli* BL21、*Et.CD* 野生株、*eseC* 基因缺失株和互补株分别感染 RAW264.7 巨噬细胞,方法参考文献[6],以培养时间 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 为横坐标,每个细胞内的活菌数(CFU/cell)为纵坐标,取 3 次实验结果的平均值,绘制细菌胞内细菌数目和时间曲线。

1.5 CCK-8 法检测细菌株感染巨噬细胞后的细胞存活率 分别以不同的 MOI(1:1、1:10、1:100) 对数期 *Et.CD* 野生株、*eseC* 基因缺失株和互补株,感染 96 孔板中 RAW264.7 细胞 2 h, PBS 漂洗细胞 3 遍,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,以不加细胞的孔作为空白对照,在细胞培养箱中孵育 1 h。用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的吸光值,取 3 个平行对照孔的平均值。细胞存活率=(处理细胞孔的吸光度-空白对照孔吸光度)/(未处理细胞孔的吸光度-空白对照孔吸光度)×100%。

1.6 Annexin V-FITC 检测细胞坏死 以 10:1 MOI *Et.CD* 野生株、*eseC* 基因缺失株和互补株分别感染 RAW264.7 巨噬细胞 2 h 或 6 h,方法参考文献[7],用流式细胞仪检测:细胞坏死率=坏死细胞/所有细胞×100% (Ex:488 nm; Em:530 nm)。

1.7 细菌在小鼠体内存活实验 方法参考文献[7],实验动物分为 3 组:*Et.CD* 野生株组、*eseC* 基因缺失株组和 PBS 对照组。腹腔注射每只小鼠的细菌剂量 200 μL, 5×10⁶ cfu/mL; 在感染后不同时间点 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d、15 d 和 21 d, 每个时间点断脊处死每组 3 只小鼠, 无菌操作迅速取出肝脏、肺脏、脾脏和肾脏, 各加入 1 mL 含有 0.1% TritonX-100 的 PBS, 用玻璃匀浆器制成匀浆, 取组织匀浆进行 10 倍系列稀释, 选取适当稀释度的匀浆液 100 μL 涂 LB 平板, 计算每个时间点每组不同组织内细菌 CFU/mL 的平均值。

1.8 细菌感染后小鼠组织病理的改变 细菌感染小鼠的方法同 1.7, 断脊处死小鼠, 迅速解剖, 取出小鼠的肝脏、肺脏、脾脏和肾脏进行观察; 先用 PBS 洗去血液, 再浸于 10% 中性福尔马林溶液中固定 48 h; 经冲洗、脱水、常规石蜡包埋, 制成切片后进行苏木素-伊红(HE)染色, Olympus BX50 生物显微镜观察。

1.9 ELISA 检测小鼠血清细胞因子 IL-1β 和 TNF-α 细菌感染小鼠的方法同 1.7, 毛细玻璃管采小鼠眼球血, 方法同试剂说明书, 加入稀释 250 倍的抗相关细胞因子的抗体的包被液, 4 °C 过夜; 洗涤后, 再加入相关细胞因子稀释的标准品, 设空白对照为标准曲线零点。待测血清稀释 10 倍, 37 °C 3 h; 洗涤后, 加入酶标检测抗体, 37 °C 1 h; 加入稀释 250 倍的亲和素-辣根过氧化物酶, 37 °C 30 min; 加底物显色; 终止显色反应; 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值, 设定 570 nm 作为校正波长。

1.10 RT-PCR 按试剂盒说明书,方法参考文献[7],分别提取对数期 *Et.CD* 野生株和 *eseC* 基因缺失株 RNA, 将 RNA 逆转录成 cDNA。再以 cDNA 为模版,用 T3SS 效应蛋白 *eseE* 基因的引物(F-CT-TCCTGGAGAGCGAGTT, R-CAGCATCACAT-CCGTCAG)和 T3SS 效应蛋白 *eseJ* 基因的引物(F-GGAT TATGATGATA CGACACAG, R-GCT-GATACACCTGCTGATT)分别扩增两基因,以扩增 16S rRNA 基因(F-GATTCGCTGGATGT-CAAGA, R-GCTGGTCTGAGAGGATGA)作为内标参照,定量检测各基因的转录水平。

1.11 统计学分析 比较细菌存活率之间、细胞存活率之间和细胞因子浓度之间的差异,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株在巨噬细胞内存活的差异 如图 1 显示, *E.coli* BL21 不能在巨噬细胞内生长繁殖的,随着培养时间的延长,胞内细菌的数目逐渐减少;野生株和 *eseC* 基因缺失株在巨噬细胞内的细菌数目在一段时间内呈上升趋势,野生株在延长培养 12 h 后达到最高;而 *eseC* 基因缺失株在延长培养 24 h 后达到最高。在延长培养到 6 h 和 12 h 时,缺失株胞内细菌数目明显低于野生株($t = 7.046$, $t = 4.406$; $P < 0.05$),互补株的变化趋势接近野生株。这表明 *eseC* 基因对于维持 *Et* 在巨噬细胞内的繁殖速率起重要的作用。

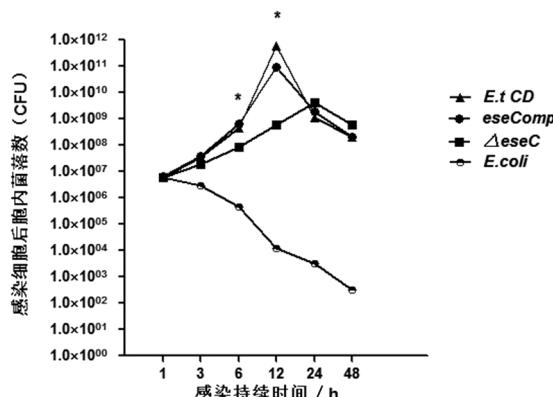
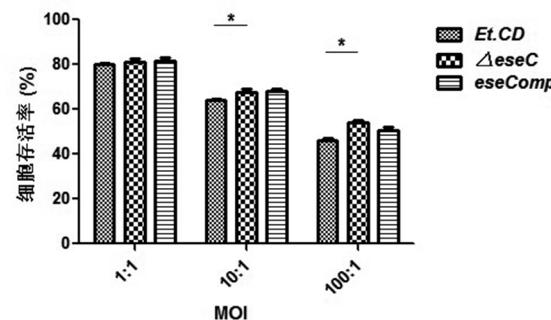


图 1 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株在巨噬细胞内细菌数目的差异

Fig.1 Comparison of the differences between the bacterial numbers of the wild type and Δ *eseC* strains within macrophages

2.2 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株株感染巨噬细

胞后的细胞存活率 结果如图 2 表明,当 MOI 为 10:1 和 100:1 时,野生株感染巨噬细胞后的细胞存活率明显低于缺失株组($t = 27.67$, $t = 27.33$; $P < 0.05$),互补株组与野生株组的细胞存活率没有明显差别($t = 2.48$, $P > 0.05$),说明 *eseC* 基因缺失后, *Et* 感染巨噬细胞后,细胞存活率明显降低。



* 表示 $P < 0.05$

图 2 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株对巨噬细胞毒性的差异

Fig.2 Comparison of the differences between the toxicity to the macrophages infected by the wild type and the one by Δ *eseC* strains

2.3 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株诱发巨噬细胞坏死的差异 细菌感染细胞 2 h 流式结果如图 3 所示:未感染细菌的细胞双染对照组,早期坏死的比率为 0.87% (图 3A); *Et* 野生株组早期细胞坏死率为 11.11% (图 3B), 缺失株组早期细胞坏死率为 3.85%, 互补株组早期细胞坏死率为 4.44% (图 3D)。细菌感染细胞 6 h 流式结果如图 3 所示:未感染细菌的细胞双染对照组,晚期坏死的比率为 1.24% (图 3E); *Et* 野生株组晚期细胞坏死的比率为 38.05% (图 3F); 缺失株组晚期细胞坏死率为 20.36% (图 3G); 互补株组晚期细胞坏死率为 37.10% (图 3H)。因此, *Et* 可通过其三型分泌系统早期或晚期均诱导巨噬细胞发生坏死。

2.4 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株感染小鼠,在肝、肺、脾和肾中细菌存活数目的差异 如图 4 显示,和野生株比较,缺失株虽然也侵入肝脏、脾脏、肾脏和肺脏,但在这些器官内检出的细菌数量低于野生株,表明 *eseC* 基因缺失株在宿主体内的细菌存活数目明显降低。

2.5 比较野生株和缺失株感染小鼠(腹腔注射)后,引起小鼠组织的病理改变的差异 如图 5 所示:野生株和 *eseC* 缺失株分别感染小鼠 3~5 d 时,发现野生株组肝脏、脾脏和肺脏与对照组的外观差异显著,缺失株组与对照组的外观差异无显著;野生株组

的肾脏、缺失株组和对照组的外观在小鼠感染各个时期均未有明显的差别。

PBS 对照组小鼠肝脏(图 6A)、脾脏(图 6D)、肺脏(图 6G)和肾脏(图 6J)的结构清楚,组织细胞无水肿、无坏死。细菌感染小鼠后,组织病理变化最明显的时间是:肝脏(3 d)、脾脏(3 d)、肺脏(5 d)和肾脏(7 d)(见图 6)。野生株感染组织的主要病理改变:大量的炎性细胞浸润,肝细胞水肿和变性(图

6B)、脾窦扩张和充血(图 6E)、肺泡上皮细胞变性和坏死(图 6K)、肾小管上皮细胞变性和坏死(图 6K),这些提示野生株对小鼠的肝脏、脾脏、肺脏和肾脏有明显的急性炎症反应和毒性作用,而 *eseC* 基因缺失株对肝脏(图 6C),脾脏(图 6F)、肺脏(图 6I)肾脏(图 6L)的急性炎症反应和毒性作用均明显减轻。这说明 *eseC* 基因缺失以后,Et 菌对宿主的病理损伤明显减轻。

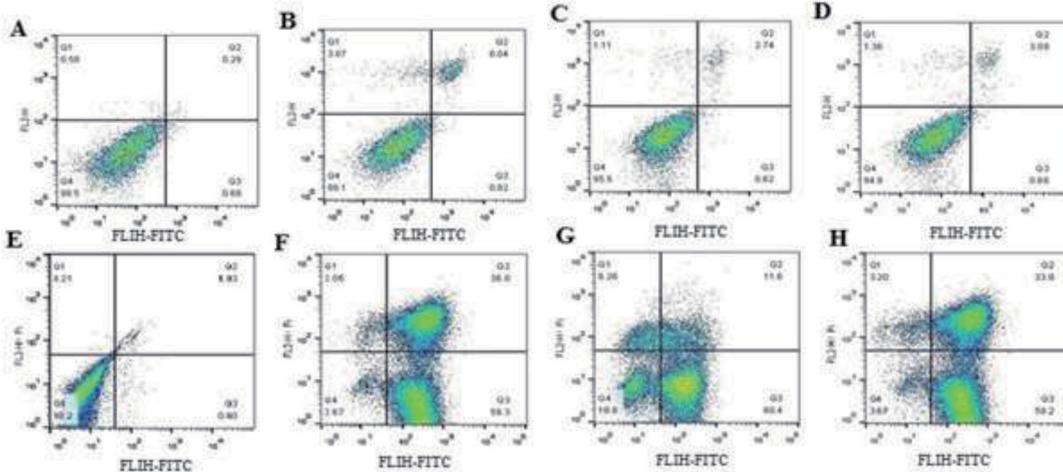


图 3 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株感染巨噬细胞诱发细胞坏死率的差异

Fig.3 Comparison of the differences between the cell necrosis rates of macrophages infected by the wild type and the ones did by the $\Delta eseC$ strain

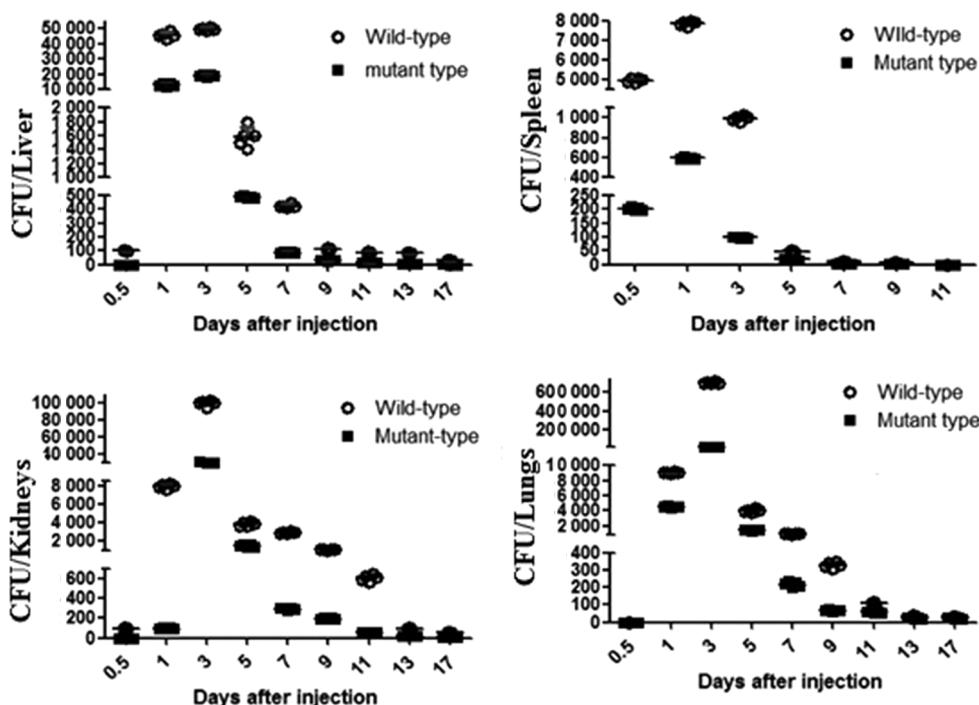


图 4 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株在小鼠组织中存活数的差异

Fig.4 Comparison of differences between the survival numbers of the wild type and the ones of the $\Delta eseC$ strains in the tissues of mice

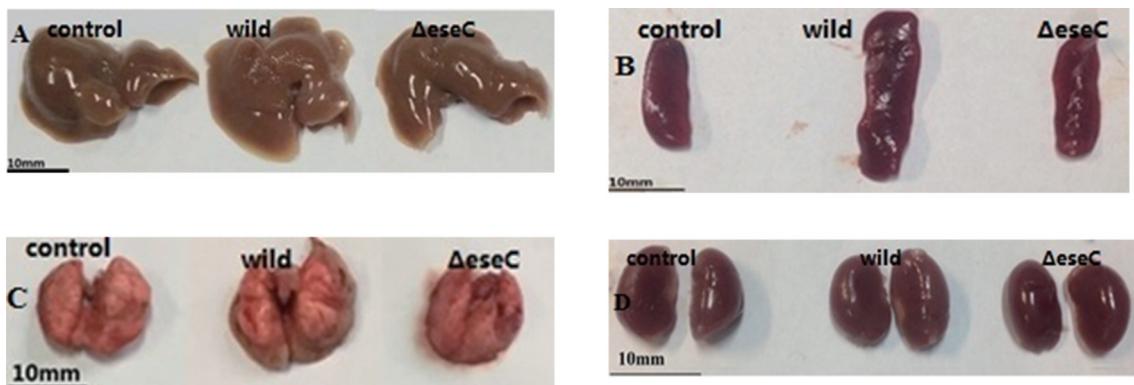


图 5 比较野生株和 *eseC* 缺失株感染小鼠后组织外观的差异

Fig.5 Comparison of difference between the tissue sizes of mice infected by the wild type and ones did by the $\Delta eseC$ strains

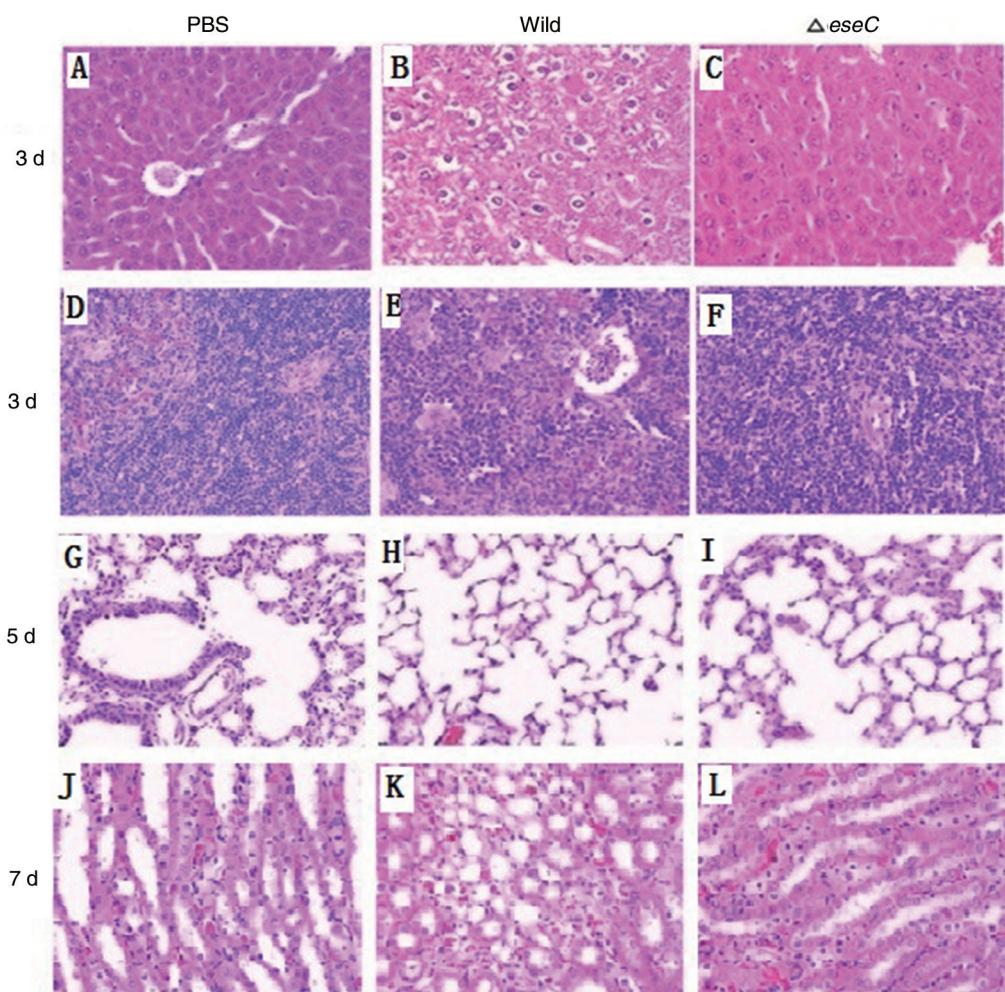


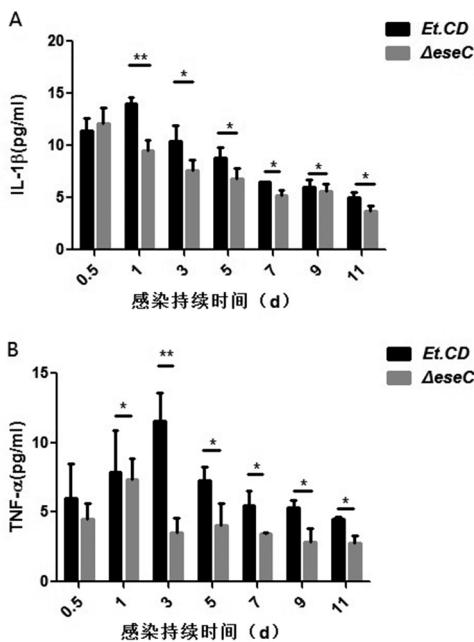
图 6 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株感染小鼠后各组织病理改变的差异 ($\times 400$)

Fig.6 Comparison of difference between pathological damage of the tissues of mice infected by the wild type and the ones did by the $\Delta eseC$ strain ($\times 400$)

2.6 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株感染小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 浓度的差异 感染 1—11 d 后, 野生株组中小鼠血清中的 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度均明显高于缺失株组 ($t = 2.979, t = 3.103; P < 0.05$)。

感染后 1 d 时, 野生株组中小鼠血清中 IL-1 β 的浓度达到了最高, 且明显高于缺失株组 ($t = 6.748, P < 0.05$) (图 7A); 感染后 3 d 时, 野生株组小鼠血清中 TNF- α 的浓度达到了最高, 且明显高于缺失株 ($t =$

5,237, $P < 0.05$) (图 7B)。结果表明, *eseC* 的缺失影响了 Et 诱发炎性细胞因子的产生。



* 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

图 7 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株感染小鼠后血清 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度差异

Fig.7 Comparison of differences between the concentrations of IL-1 β and TNF- α in the serums of mice infected by the wild type and the ones did by the $\Delta eseC$ strain

2.7 RT-PCR 检测 *eseC* 基因对 T3SS 效应蛋白的作用 结果如图 8 所示: *eseC* 基因缺失株 T3SS 效应蛋白基因 *eseE* 和 *eseJ* 的转录水平和野生株相比明显降低,而互补株的 *eseE* 和 *eseJ* 的转录水平与野生株之间并未有明显差别。这表明 *eseC* 基因的缺失影响了效应蛋白 EseE 和 EseJ 分泌到宿主细胞内发挥效应。

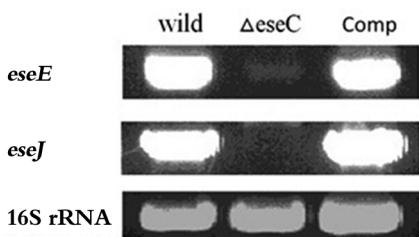


图 8 比较野生株和 *eseC* 基因缺失株的 T3SS 效应蛋白基因 *eseE* 和 *eseJ* 转录水平的差异

Fig.8 Comparison of the differences between the transcriptional levels of *eseE* and *eseJ* of the wild type and the ones of the $\Delta eseC$ strains

3 讨 论

Et 菌 T3SS 的基因簇由 35 个开放阅读框构成,以毒力岛的形式存在于细菌的染色体上,Et 菌的毒力岛与鼠伤寒沙门氏毒力岛 (*Salmonella typhimurium* Pathogenicity island SPI-2) 有较高的同源性^[3]。沙门氏 SPI-2 拷贝的 T3SS 有助于该菌的系统感染^[8],因此,我们选择将 Et 菌腹腔注射途径,研究 Et 菌 T3SS 的功能。

根据 T3SS 功能可大致分为 4 类^[3]:①装置蛋白,其中 EseB、EseC 和 EseD 组成 T3SS 的尖端结构,被称为转位子蛋白(translocon);②效应蛋白,这是 III 型分泌系统发挥毒力的部分,可以直接通过分泌系统进入宿主细胞,实现对宿主细胞的影响;③伴侣蛋白;④调节蛋白。Xie 等研究表明,效应蛋白 EseG 可影响哺乳动物细胞中的微管结构重排,与细菌的致病机制有关^[9];效应蛋白 *eseJ* 基因缺失株不能在上皮细胞和巨噬细胞内增殖,并且其毒力比野生株显著降低^[10]。

Et 菌是一种兼性胞内寄生菌,能够在吞噬细胞存活和繁殖,最终释放出来,扩散到宿主全身。因此,我们比较了 Et.CD 野生株和 *eseC* 基因缺失株在巨噬细胞内存活率和细胞存活率的结果,说明野生株感染细胞后,引起更多细胞的死亡,释放出更多细菌成份,如 LPS 和 T3SS,这些细菌成份为病原体相关模式分子 (Pathogen associated molecular pattern, PAMP) 可以诱导吞噬细胞参与炎症反应^[11]。我们比较野生株和 *eseC* 基因缺失株诱发巨噬细胞坏死的结果表明,野生株可通过其 T3SS 诱导更多巨噬细胞发生坏死。细胞炎性坏死,伴有大量促炎因子的释放^[11]。此外,我们比较野生株和 *eseC* 基因缺失株感染小鼠,在肝、肺、脾和肾中细菌存活数目的结果表明, T3SS 有助于野生株在组织中的大量增殖。

我们采用动物体内的研究表明,野生株感染小鼠后,它们的肝脏,脾脏、肺脏和肾脏有明显的急性炎症反应,外观明显肿大, *eseC* 基因缺失株感染小鼠后,这些组织的急性炎症反应明显减轻。野生株诱发小鼠血清炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 浓度的产生明显高于缺失株。我们进一步用 RT-PCR 检测 *eseC* 基因对 T3SS 效应蛋白 EseE 和 EseJ 的作用,结果表明, *EseC* 缺失影响了效应蛋白 EseE 和 EseJ 分泌到宿主细胞内发挥效应,影响了 Et 的致炎作用。

参考文献:

- [1] 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. DOI:10.3969/j.issn.1002-6681.2011.07.020
- [2] Pressley ME, Phelan PE, Witten PE, et al. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish[J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29 (6): 501-513 DOI: 10.1016/j.dci. 2004.10.007
- [3] Okuda J, Kiriyama M, Suzuki E, et al. Characterization of proteins secreted from system of a type III secretion of *Edwardsiella tarda* and their roles in macrophage infection[J]. Dis Aquat Organ, 2009, 84(2):115-121. DOI: 10.3354/dao02033
- [4] Rao PS, Yamada Y, Tan YP, et al. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis[J]. Mol Microbiol, 2004, 53 (2): 573-586. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04123.x
- [5] Gao D, Cheng J, Zheng E, et al. Eha, a transcriptional regulator of hemolytic activity of *Edwardsiella tarda* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2014, 353 (2): 132-140. DOI: 10.1111/1574-6968.12420
- [6] 徐泽炎,李玉红,成静,等. eha 基因调控迟缓爱德华菌抵抗巨噬细胞氧化杀菌作用[J].中国人兽共患病学报,2015,31(6):497-500. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2015.06.001
- [7] Gao D, Li Y, Xu Z, et al. The role of regulator Eha in *Edwardsiella tarda* pathogenesis and virulence gene transcription [J]. Microb Pathog, 2016, 95: 216-223. DOI: 10.1016/j.micpath. 2016.03.010
- [8] Figueira R, Holden DW. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors[J]. Microbiology, 2012, 158 (5): 1147-1161. DOI: 10.1099/mic. 0. 058115-0
- [9] Xie HX, Yu HB, Zheng J, et al. EseG, an effector of the type III secretion system of *Edwardsiella tarda*, triggers microtubule destabilization[J]. Infect Immun, 2010, 78(12):5011-5021. DOI: 10.1128/IAI.00152-10
- [10] Xie HX, Lu JF, Zhou Y, et al. Identification and functional characterization of a novel *Edwardsiella tarda* effector EseJ [J]. Infect Immun, 2015, 83 (4), 1650-1660. DOI: 10.1128/IAI.02566-14
- [11] Ashida H, Mimuro H, Sasakawa C. Shigella manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific role[J]. Front Immunol, 2015, 6: 219-231. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00219

收稿日期:2017-11-27 编辑:张智芳

参考文献在文内的标注格式

采用顺序编码制时,对引用的文献,按它们在论文中出现的先后用阿拉伯数字连续编码,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或者作为语句的组成部分。

1. 在引用参考文献的地方加标记。这个标记是用方括号括起来的阿拉伯数字,其中的阿拉伯数字是文献的顺序号。比如,在引用第 25 个文献的地方所加的标记为[25]。

2. 给文献编序号要根据以下两点:一是只有文献第一次在文中出现时才编序号,换句话说,一篇文献只有一个序号,即使某文献在文中被多次引用,但在几个引用处都要标注同一个序号。二是以文献第一次出现的前后次序,从 1 开始连续编序号。例如,第一个第一次出现的文献,序号为 1;第二个第一次出现的文献,序号为 2;……。

3. 如果文献的作用是对正文作解释,标注时文献序号连同方括号都要使用比正文字号小,并把它们放在右上方(作为上角标);如果文献是作为句子的成分出现在正文之中,标注时文献序号连同方括号的字号要与正文的字号相同,并且把它们作为正文的一部分来书写(位置与正文平齐,不做为上角标),另外要注意的是一定要方括号前面加上“文献”两个字。

4. 如果在正文的一处引用了多篇文献,标注时只用一个方括号,括号内列写这几篇文献的序号;若几个序号是连续的,只标注起、止序号,两序号之间加半字线“—”号;若几个序号不连续,各序号之间加逗号。