

产气荚膜梭菌 VirS/VirR 双组分系统调控机制研究进展

王艳华, KHAN MUZ, 许笑, 蔡建平

摘要:产气荚膜梭菌是一种重要的人兽共患病病原体,该菌引起各种动物坏死性肠炎、肠毒血症、人畜创伤性气性坏疽及人类食物中毒。该菌产生的毒素和酶协同作用导致病变发生。产气荚膜梭菌毒素和酶的产生受到复杂网络调控。VirS/VirR 系统是产气荚膜梭菌中最重要也是研究最深入的一个双组分调节系统。本文对这一双组分系统的研究进展进行综述,为进一步阐明该菌的致病机制奠定基础。

关键词:产气荚膜梭菌; VirS/VirR 系统; 调控

中图分类号:R382.2 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2019)10-0934-05

Research progress on regulatory mechanism of the VirS/VirR system in *Clostridium perfringens*

WANG Yan-hua, KHAN MUZ, XU Xiao, CAI Jian-ping

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

Abstract: *Clostridium perfringens* is an important zoonotic pathogen. *Clostridium perfringens* causes necrotizing enteritis, enterotoxemia, gas gangrene and food poisoning in humans and livestock, and it produces extracellular enzymes and toxins that are involved in the pathogenesis by complex regulatory network. *C. perfringens* has a complex regulatory network for toxin and enzyme production. The VirS/VirR system is a most important and best studied two-component regulatory system in *C. perfringens*. This article reviews the global regulatory system for an in-depth elucidation of the pathogenesis of *C. perfringens* infections.

Keywords: *Clostridium perfringens*; VirS/VirR system; regulation

Supported by the Science and Technology Innovation Project of China Academy of Agricultural Sciences (No.CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

Corresponding author: Cai Jian-Ping, Email: caijianping@caas.cn

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是一种革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌,广泛存在于自然界,尤其是在土壤、人类和动物的肠道中广泛存在。它可以感染人和各种动物(主要为牛、羊等),造成人类食

物中毒,引起动物坏死性肠炎、肠毒血症以及创伤性气性坏疽等疾病。这些病不仅严重威胁着人类和动物的健康,而且给社会造成了巨大的经济损失^[1-3]。最近,依据产气荚膜梭菌产生的主要毒素和致病性的不同,将其修订为 7 个型(A 至 G 型,见表 1)^[4]。在所有类型的产气荚膜梭菌中 α -毒素(CPA)都是最保守的,其基因位于染色体上,编码 β -、 ϵ -、 ι -、CPE 和 NetB 毒素的基因位于质粒上^[5],A 型菌株被认为是人类最易感染的病原体^[6]。

中国农业科学院科技创新工程项目资助(No.CAAS-ASTIP-IVF-CAAS)

通讯作者:蔡建平,Email: caijianping@caas.cn;

ORCID:0000-0001-7353-4888

作者单位:中国农业科学院兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国

家重点实验室,兰州 730046

表 1 产气荚膜梭菌毒素型
Tab.1 *C. perfringens* toxin-based typing scheme

Toxinotype (toxin gene)	a-toxin (plc or cpa)	β -toxin (cpb)	ϵ -toxin (etx)	i-toxin (iap and ibp)	CPE (cpe)	NetB (netB)
A	+	—	—	—	—	—
B	+	+	+	—	—	—
C	+	+	—	—	+/-	—
D	+	—	+	—	+/-	—
E	+	—	—	+	+/-	—
F	+	—	—	—	+/-	—
G	+	—	—	—	—	+

注:+为 indicates production of that toxin;—为 indicates no production of that toxin.

20世纪80年代以来,人们对产气荚膜梭菌的多种酶、毒素基因及其产物的功能以及它们与宿主的相互作用进行了深入研究。这些毒素和酶具有特定的活性,通常毒素和酶协同作用,从而使其在致宿主组织病变过程中发挥重要作用^[7-9]。20世纪70年代,有人提出产气荚膜梭菌中存在调节毒素产生的特定机制^[7,10]。之后,研究人员报道了一种小信号分子参与穿孔溶血素O产生的调节^[11-12]。1994年产气荚膜梭菌双组分VirS/VirR调节系统得以鉴定,并认为毒素的产生受该系统严格调控^[13-14],例如,A型产气荚膜梭菌仅在芽胞形成过程中产生肠毒素(CPE)。此后,发现许多毒素基因受VirS/VirR双组分调控系统和辅助基因调节因子(agr)群体感应(QS)系统的调控。进一步研究发现几种双组分系统和RNA调节因子形成一个紧密的网络对毒素的产生进行调控^[9]。因此,产气荚膜梭菌毒素产生和调控机制研究成为人们了解和阐明该病原菌致病性的一个最重要的方面。产气荚膜梭菌的几个双组分调控系统已经被广泛分析,本文主要就VirS/VirR系统对产气荚膜梭菌毒素的调控机制进行综述,以期能为今后该菌致病机理研究和抗菌药物的开发奠定新的起点。

1 双组分调控系统组成

双组分系统是细菌最关键的信号转导系统,可以感知环境并将信息传输至细胞中^[15]。一个典型的双组分系统通常由位于膜的传感器组氨酸激酶和充当转录调节因子的细胞质反应调节子组成^[16]。组氨酸激酶是细菌感应各种环境变化必需的,通常是由2个单体组成的同源二聚体膜蛋白,每个单体含有1个可变的传感器结构域(sensor domain)和

1个保守的传递器结构域(transmitter domain),2个跨膜结构域通过1个 α -螺旋相连。其传感器结构域能感应环境变化,并将信号传递到细胞质传递器催化结构区域。反应调节子控制输出信息,反应调节子是双组分信号转导系统中的第2个组分,含有1个或多个保守的N端接受器结构域(receiver domain)和可变的C端效应器结构域(effectuator domain)。组氨酸激酶的传感器结构区域能够检测到体内外刺激,调控组氨酸激酶的活性。组氨酸激酶催化ATP依赖的特定的组氨酸自主磷酸化,然后反应调控蛋白催化组氨酸的磷酸基团转移到它自身的天门冬氨酸残基上,反应调控蛋白的磷酸化激活效应器结构域,从而产生一系列调控反应^[17]。目前研究表明许多双组分系统含有额外的调节伴侣蛋白^[18]。双组分系统信号的终止需通过反应调节子去磷酸化完成,在大多情况下,反应调节子的去磷酸化需要通过另一种蛋白—辅助磷酸酶的催化。双组分调节控系统可调节细菌的多种代谢过程、细菌细胞周期、细菌间的信号交流和细菌毒力因子的表达^[19]。

产气荚膜梭菌VirS/VirR系统中的virR和virS基因位于操纵子中,被转录为单个的2.1 Kb mRNA^[20]。VirR/VirS系统是产气荚膜梭菌最重要和最有特点的1个双组分系统。VirS/VirR系统由传感器组氨酸激酶virS基因和反应调节因子virR基因组成。virS基因产物VirS在N末端具有6个假定的跨膜结构域。C末端结构域包含传感器组氨酸激酶中常见4个基序中的3个。这些基序包括His-255残基是其它传感器激酶中自磷酸化位点^[14]。virR的N-末端结构域含有保守的天冬氨酸残基,其接受来自同源传感器组氨酸激酶的磷酸基团^[13-14]。

2 双组分调控系统调控机制

2.1 VirS/VirR 系统对毒素的调控 VirR/VirS 系统最早于 1994 年被鉴定为 α -毒素基因 *plc*, κ -毒素基因 *colA* 和 θ -毒素基因 *pfoA* 的调节因子^[13,20]。Northern 分析显示, 3 种毒素基因 *plc*, *pfoA* 和 *colA* 在转录水平受到 VirR/VirS 的正调控。VirS/VirR 系统调节 3 种毒素基因的模式不同。*pfoA* 基因具有 2 个启动子, 主要和次要启动子, 其中只有主要启动子依赖于 VirR/VirS。*colA* 基因含有 7 个转录起始位点, 其中 2 个依赖于 VirR/VirS。*plc* 基因仅具有 1 个启动子, 其由 VirR/VirS 部分调节^[20]。由于在 3 种毒素基因的启动子区域中未发现类似的结构, 因此表明 VirR/VirS 系统不直接调节所有这些毒素基因的表达, 并且在 VirR/VirS 调节网络中存在更复杂的系统, 可能涉及其他二级调节因子^[20]。

之后研究发现, VR-RNA 就是上述调控系统的 1 个二级调节因子。通过 VR-RNA, VirS/VirR-VR-RNA 级联反应调控各种基因的表达^[21]。因此, VirS/VirR 系统是一种全局的基因调节因子, 也是产气荚膜梭菌最重要的调节因子之一。

除 α -毒素基因外, 产气荚膜梭菌的主要毒素基因都位于质粒上。VirS/VirR 系统虽位于染色体上, 但它可以调节染色体和质粒上的基因。例如, A 型产气荚膜梭菌菌株 13 中质粒上的胶原粘附素基因(*cna*)和 β -2 毒素基因(*cpb2*)都受 VirS/VirR 系统调节。*cna* 受该体系负调控,*cpb2* 受正调控^[22]。

cpb 编码产气荚膜梭菌 β 毒素(CPB), 它是由 B 型和 C 型菌株产生的主要毒素, 其引起出血性坏死性肠炎。据报道, C 型菌株产生的 CPB 受 VirS/VirR 系统调控^[23]。CPB 是 C 型菌株必需的肠道毒力因子^[24]。VirS/VirR 通过调节 CPB 的产生致使 C 型菌株致病^[23]。VirS/VirR 系统是控制染色体和质粒上基因的关键调节因子。

VirS/VirR 系统还可通过调节蛋白水解所需的蛋白酶活性来调节 iota 毒素的活性。Iota 毒素是 E 型产气荚膜梭菌产生的主要毒素。Iota 毒素以无活性形式产生, 需要蛋白酶的水解来激活。据报道, 未成熟蛋白的裂解是由 VirS/VirR 依赖性蛋白酶来完成的^[25]。

2.2 VirS/VirR 系统对其它基因的调控 VirS/VirR 系统不但调节毒素基因, 还对其它基因进行调节。研究人员通过差异显示法对 VirS/VirR 调节的基因进行了鉴定, 鉴定到 3 个克隆。通过核苷酸测序和 Northern 杂交实验证实: 1 个质粒上的

metB(胱硫醚 γ -合成酶), *cysK*(半胱氨酸合酶)和 *ygaG*(假设蛋白)基因受负调控, 而第 2 个质粒上的 *ptp*(蛋白酪氨酸磷酸酶)和 *cpd*(2', 3'-环核苷酸 2'-磷酸二酯酶)基因显示受 VirR/VirS 系统的正调节。第 3 个质粒上的 *hyp7* 基因受到 VirR/VirS 系统的正调控, *hyp7* 可激活产气荚膜梭菌中 *colA* 和 *plc* 基因的转录, 但不激活 *pfoA* 基因的转录。这些结果表明, 全局调节系统 VirR/VirS 可以正向和负向调节毒素基因以外的各种基因, 并且 *hyp7* 基因可能编码产气荚膜梭菌毒素新的调节因子^[26]。

据报道, VirS/VirR 系统能感知细胞^[27]: C 型产气荚膜梭菌与 Caco-2 细胞接触, 产气荚膜梭菌会迅速上调毒素表达, 而 VirR 突变体即使与菌株相同类型的细胞接触也不能诱导毒素产生。这些数据表明, VirS/VirR 系统对于感知环境(特别是环境中的细胞)和上调毒素产生是非常重要的^[27]。

基因组分析表明产气荚膜梭菌缺少参与氨基酸生物合成相关的基因^[8], 因此, 产气荚膜梭菌在宿主体内生长, 必需降解宿主组织并将产生的营养物质快速转运到细菌细胞中。产气荚膜梭菌的这种能力对于其在宿主中存活和生长是必不可少的, 因此, 它会依据不同环境来上调毒素及酶的产生。当产气荚膜梭菌识别宿主细胞并准备降解宿主细胞时, 通过与 Caco-2 细胞接触而导致的毒素上调很明显是其中的一种反应^[28], 但尚不知道产气荚膜梭菌是如何识别 Caco-2 细胞的。

2.3 VirS/VirR 和 QS 信号合成系统 双组分系统毒力相关基因的表达受 QS 调控, 该系统由 QS 信号合成系统和 VirS/VirR 双组分系统组成。最近发现 *pfoA* 基因在细菌的对数生长中期短暂表达; 此后, 它的表达被迅速关闭, 这表明存在一个自群体淬灭(self-quorum quenching, sQQ)系统。添加静止期培养上清液可诱导该 sQQ 系统发挥作用。sQQ 系统是一种小分子物质, 具有热稳定性, 可通过超滤膜过滤筛选。此外, sQQ 系统也可由浓度上与静止期培养物相同的纯乙酸和丁酸诱导, 表明产气荚膜梭菌产生的有机酸参与 sQQ 系统。在控制 pH 的分批培养物中, sQQ 系统明显减弱;*pfoA* 的表达延长至对数生长后期, 最终增加了 1 个数量级。此外, 与上述有机酸相同 pH 条件下, 盐酸也可诱导 sQQ 系统发挥作用, 静止期培养上清液会抑制 VirS/VirR 调控的基因表达。总的来说, 产气荚膜梭菌的毒力因子的表达受到 sQQ 系统的下调, 而 sQQ 系统是由主要酸性代谢物和酸性环境介导的, 这表明采用控制 pH 将成为抵抗细菌毒力的一种新

策略^[29]。

Singh 等^[30]对靶定 VirS/VirR 双组分系统的 QQ 肽进行了研究。根据构效关系分析结果他们设计了 2 种不同的类型 QQ 肽,这 2 种类型的肽在微摩尔浓度水平时会抑制 pfoA 的转录。利用 QQ 化疗法有望治疗由产气荚膜梭菌引起的传染病,如气坏疽和坏死性肠炎。

3 VirR结合位点的鉴定

为了深入研究 VirS/VirR 的调节机制,鉴定 VirR 结合位点是一项重要工作。对 pfoA 启动子区域的分析显示在该区域中存在不完全的直接重复序列 CCCAGTTNTNCAC^[31]。使用定点诱变, DNase I 足迹分析和凝胶移位分析显示该序列为 VirR 结合基序,这些序列被指定为 VirR 框^[32]。VirR 能独立地结合到位于 pfoA 基因上游的 2 个 VirR 框。此外,这些 VirR 框之间的距离和它们与 pfoA 启动子的 35 区的距离对于 VirR 介导的激活作用是相当重要的。

研究人员对产气荚膜梭菌菌株 13 基因组序列 VirR 框基序搜索发现,只有 5 个基因在其启动子区域具有 VirR 结合位点,包括 pfoA 和编码 VR-RNA 的 vrr 基因^[8]。其它 3 个基因是 ccp 基因(它编码半胱氨酸蛋白酶,a-clostrypain)和 2 个假定基因 virT 和 virU^[7],virT 和 virU 两者都编码 RNA 调节分子^[33]。已经证明这 5 个基因的 VirR 框都是功能性的^[33],VirR 激活这 5 个基因的转录。

virT 基因紧挨着 ccp 基因。对 virT 突变体及其互补衍生物进行分析表明,VirT RNA 在转录水平上负调节 pfoA 和 ccp^[33]。不是所有已知序列的产气荚膜梭菌菌株中都存在 virT 基因,它仅存在菌株 13 和 ATCC3626 中^[34]。VirU 的过表达可激活 pfoA,ccp,vrr 和 virT 的转录^[33]。这两种 RNA 调节子的调节水平并不强烈,它们对由 VirS/VirR 调控的基因的表达进行微调。

研究发现 ATCC13124 中的 2 个 VirR 框,SM101 中的 1 个 VirR 框都与 VirR 结合^[35]。这些基因大多数编码假定蛋白质,但其中一些可能编码调节性 RNA 分子,如 VirT 和 VirU。研究还在位于质粒上的毒素基因启动子区域发现了 VirR 框。例如,发现编码产气荚膜梭菌成孔毒素 NetB 基因上游具有 VirR 框。NetB 的产生受 VirS/VirR 系统的调节,并且 VirR 与 netB 基因上游的 VirR 框结合^[36]。在菌株 JFP718 中 netE 和 netG 毒素基因上游也存在 VirR 框^[37],它们的功能尚不清楚。

NetB 是禽类坏死性肠炎的关键毒力因子^[38]。因此,VirS/VirR 系统通过控制不同菌株中不同毒素的产生来控制不同致病力菌株的毒力。

4 展望

随着细菌基因组序列的公布,运用生物信息学的方法和系统性突变的方法已经成功鉴定几种产气荚膜梭菌毒素和酶的调控系统,并对其功能进行了研究。但是与其它致病菌相比,我们对该菌的毒力调节机制知之甚少。对艰难梭菌和肉毒杆菌的研究发现某些氨基酸、特定氨基酸混合物、葡萄糖和 σ 因子影响或抑制某些细菌毒素的产生^[38-40]。产气荚膜梭菌中也可能存在类似的毒素调控机制。因此,我们需要对产气荚膜梭菌毒力调节机制进行更广泛深入的研究,详尽阐明毒力相关基因的调节网络,为开发新型抗菌制剂提供新的靶点,进而全面地抵抗产气荚膜梭菌感染。

利益冲突:无

引用本文格式:王艳华, KHAN MUZ, 许笑, 等. 产气荚膜梭菌 VirS/VirR 双组分系统调控机制研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(10): 934-938, 956. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.108

参考文献:

- [1] Banawas S, Sarker MR. Lysine (pH 6.0) induces germination of spores of *Clostridium perfringens* type F isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene [J]. *Microb Pathog*, 2018, 123(7): 227-232. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.022
- [2] Silva ROS, Duarte MC, Oliveira Junior CA, et al. Comparison of humoral neutralizing antibody response in rabbits, guinea pigs, and cattle vaccinated with epsilon and beta toxoids from *Clostridium perfringens* and *C. botulinum* types C and D toxoids [J]. *Anaerobe*, 2018, 54(8): 19-22. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2018.07.014
- [3] Parent E, Archambault M, Charlebois A, et al. A chicken intestinal ligated loop model to study the virulence of *Clostridium perfringens* isolates recovered from antibiotic-free chicken flocks [J]. *Avian Pathology*, 2017, 46 (2) :138-149. DOI: 10.1080/03079457.2016.1228825
- [4] Rood JI, Adams V, Lacey J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxinotyping scheme [J]. *Anaerobe*, 2018, pii: S1075-9964(18)30068-4. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011
- [5] Hassan KA, Elbourne LD, Tetu SG, et al. Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes [J]. *Res Microbiol*, 2015, 166 (4): 255-263. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.003
- [6] Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens* [J]. *Annu*

- Rev Microbiol, 1998, 52: 333-360. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.333
- [7] Rood JI, Wilkinson RG. Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* mutants altered in broth hemagglutinin and sialidase production [J]. J Bacteriol, 1975, 123(2): 419-427.
- [8] Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(2): 996-1001. DOI: 10.1073/pnas.022493799
- [9] Ohtani K, Shimizu T. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens* [J]. Toxins, 2016, 8(7): 207-220. DOI: 10.3390/toxins8070207
- [10] Higashi Y, Chazono M, Inoue K, et al. Complementation of theta-toxinogeneity between mutants of two groups of *Clostridium perfringens* [J]. Biken J, 1973, 16(1): 1-9.
- [11] Imagawa T, Tatsuki T, Higashi Y, et al. Complementation characteristics of newly isolated mutants from two groups of strains of *Clostridium perfringens* [J]. Biken J, 1981, 24(1/2): 13-21.
- [12] Imagawa T, Higashi Y. An activity which restores theta toxin activity in some theta toxin-deficient mutants of *Clostridium perfringens* [J]. Microbiol Immunol, 1992, 36(5): 523-527. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02050.x
- [13] Shimizu T, Ba-Thein W, Tamaki M, et al. The virR gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of the perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens* [J]. J Bacteriol, 1994, 176(7): 1616-1623. DOI: 10.1128/jb.176.6.1616-1623.1994
- [14] Lyristis M, Bryant AE, Sloan J, et al. Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in *Clostridium perfringens* [J]. Mol Microbiol, 1994, 12(5): 761-777. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01063.x
- [15] Wanner BL. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria [J]. J Bacteriol, 1992, 174(7): 2053-2058. DOI: 10.1128/jb.174.7.2053-2058.1992
- [16] Gao R, Stock A M. Biological insights from structures of two-component proteins [J]. Annu Rev Microbiol, 2009, 63: 133-154. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073214
- [17] 郝艳华, 张维, 陈明. 细菌双组分系统的研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(2): 67-72. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0864.2012.02.11
- [18] Szurmaj H, Hoch J. Interaction fidelity in two-component signaling [J]. Cur Opin Microbiol, 2010, 13(2): 190-197. DOI: 10.1016/j.mib.2010.01.007
- [19] Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction [J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(2): 165-170. DOI: 10.1016/S1369-5274(00)00070-9
- [20] Ba-Thein W, Lyristis M, Ohtani K, et al. The virr/virs locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens* [J]. J Bacteriol, 1996, 178(9): 2514-2520. DOI: 10.1128/jb.178.9.2514-2520.1996
- [21] Ohtani K, Hirakawa H, Tashiro K, et al. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens* [J]. Anaerobe, 2010, 16(3): 258-264. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2009.10.003
- [22] Ohtani K, Kawasari HI, Okumura K, et al. The virr/virs regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* [J]. FEMS Microbiol, 2003, 222(1): 137-141. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00255-6
- [23] Ma M, Vidal J, Saputo J, et al. The virs/virr two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685 [J]. MBio, 2011, 2(1): 1-9. DOI: 10.1128/mBio.00338-10
- [24] Sayeed S, Uzal FA, Fisher DJ, et al. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model [J]. Mol Microbiol, 2008, 67(1): 15-30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x
- [25] Gibert M, Petit L, Raffestin S, et al. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity [J]. Infect Immun, 2000, 68(7): 3848-3853. DOI: 10.1128/IAI.68.7.3848-3853.2000
- [26] Banu S, Ohtani K, Yaguchi H, et al. Identification of novel virr/virs-regulated genes in *Clostridium perfringens* [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(4): 854-864. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01760.x
- [27] Vidal JE, Ohtani K, Shimizu T, et al. Contact with enterocyte-like caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates [J]. Cell Microbiol, 2009, 11(9): 1306-1328. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x
- [28] Chen J, Ma M, Uzal FA, et al. Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections [J]. Gut Microbes, 2014, 5(1): 1-12. DOI: 10.4161/gmic.26419
- [29] Adachi K, Ohtani K, Kawano M, et al. Metabolic dependent and independent pH-drop shuts down VirSR quorum sensing in *Clostridium perfringens* [J]. J Biosci Bioeng, 2018, 125(5): 525-531. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.019
- [30] Desouky SE, Shojima A, Singh RP, et al. Cyclodepsipeptides produced by actinomycetes inhibit cyclic-peptide-mediated quorum sensing in Gram-positive bacteria [J]. FEMS Microbiol Lett, 2015, 362(14): 1-9. DOI: 10.1093/femsle/fnv109
- [31] Cheung JK, Dupuy B, Deveson DS, et al. The spatial organization of the virr boxes is critical for virr-mediated expression of the perfringolysin O gene, pfoA, from *Clostridium perfringens* [J]. J Bacteriol, 2004, 186(11): 3321-3330. DOI: 10.1128/JB.186.11.3321-3330.2004
- [32] Cheung JK, Rood JI. The VirR response regulator from *Clostridium perfringens* binds independently to two imperfect direct repeats located upstream of the pfoA promoter [J]. J Bacteriol, 2000, 182(2): 57-66. DOI: 10.1128/JB.182.1.57-66.2000