

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19178

嗜水气单胞菌 QseC 在响应去甲肾上腺素中的作用

孟雨潇^{1,2}, 秦婷², 习丙文^{1,2}, 陈凯², 谢骏^{1,2}, 潘良坤²

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: QseBC 是一种普遍存在于细菌的双组分调控系统(two-component regulatory system, TCS), 能感应细胞外环境因子信号, 在调控细菌毒力中发挥着重要作用。为了研究嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) QseC 在识别和响应宿主应激激素去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)及其对毒力因子表达的调控作用, 本实验首先构建了嗜水气单胞菌 NJ-35 缺失突变株 $\Delta qseC$ 与互补株 $qseC^+$, 分析了在 NE 诱导下野生株和突变株的体外毒力因子表达和鱼体死亡率的变化。结果表明, $qseC$ 的缺失抑制了 NE 对嗜水气单胞菌的促生长作用, 降低了 NE 对生物膜形成能力和溶血活性的增强作用及其对罗非鱼的致死率, 而对运动性、脂肪酶与蛋白酶活性没有产生显著影响。本实验明确了嗜水气单胞菌 QseC 能够响应 NE, 从而调节菌株的毒力, 对全面认识嗜水气单胞菌的致病机理及其与宿主的互作机制有着重要意义, 并为探索疾病防控新技术奠定相关理论基础。

关键词: 嗜水气单胞菌; QseBC 双组分调控系统; 去甲肾上腺素; $\Delta qseC$; 毒力因子

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)02-0250-10

嗜水气单胞菌广泛存在于水体和土壤中, 不仅能引起水生动物暴发运动性气单胞菌败血症(motile aeromonad septicemia, MAS), 造成大量死亡, 还能引发人体肠胃炎和出血病, 威胁人类健康^[1]。嗜水气单胞菌是条件致病菌, 往往在水生动物处于急剧变化的外界因素下, 如温度、溶氧、捕捞等, 侵染宿主并在宿主体内快速增殖, 造成疾病的发生^[2]。研究表明, 宿主在应激条件下(损伤、炎症、环境改变等)对细菌的易感性明显增强^[3]; 同时, 机体内的病原菌可识别并响应宿主产生的神经激素信号, 如儿茶酚胺类激素, 调节细菌生长和毒力相关基因的表达^[4]。因此, 越来越多的研究关注病原菌的毒力调控系统及其对外界环境因素的响应机制。

在细菌中, 双组分调控系统是广泛使用的信号转导机制, 能够感受外界环境变化, 通过磷酸

化信号的传递, 调节体内相关基因的转录, 从而对刺激作出应答以适应环境, 得以生存^[5]。QseBC 双组分调控系统广泛存在于革兰氏阴性菌中, 是一种毒力调控系统^[6-7], 由 Sperandio 等^[8]在肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)中首次发现。随后在许多病原菌中也发现了该系统的存在, 如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Stm)^[9]、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[10]、尿道大肠杆菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)^[11]等。2006 年 Clarke 等^[12]发现 QseBC 系统中组氨酸激酶(histidine protein kinases, HK)QseC 可感应环境中的信号分子, 如自体诱导物-3(autoinducer-3, AI-3)、肾上腺素(epinephrine, Epi)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE), 激活反应调控蛋白(response regulator, RR)QseB, 调控相关毒力基因表达, 实

收稿日期: 2019-06-17; 修订日期: 2019-07-10.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20171152); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费资助项目(2019JBFZ08); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-45).

作者简介: 孟雨潇(1995-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物病害防治研究. E-mail: myx99@qq.com

通信作者: 谢骏, 研究员, E-mail: xiej@ffrc.cn; 习丙文, 研究员, E-mail: xibw@ffrc.cn

现细菌与宿主之间的信息交流^[13-17]。2010年 Moreira等^[18]发现 QseC 可以感应 AI-3/Epi/NE 信号系统,在体外和体内鼠伤寒沙门氏菌的致病性中发挥重要作用。2011年 Wang等^[10]发现迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的 QseBC 系统能够调控鞭毛运动、纤毛血凝和 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)相关基因的表达;最新研究表明, QseBC 系统中 QseB 通过调节大肠杆菌鞭毛基因的表达影响细菌运动与生物膜形成之间的关系^[19]。

Dong等^[20]和 Gao等^[21]发现 NE 能够显著促进嗜水气单胞菌 NJ-35 的生长,提高细菌毒力。但是, QseBC 双组分调控系统是否参与嗜水气单胞菌 NJ-35 对 NE 的识别和响应过程,调控细菌毒力尚未清楚。

因此,本研究以嗜水气单胞菌 NJ-35 为研究对象,构建缺失突变株 $\Delta qseC$,利用去甲肾上腺素进行体外诱导,分析野生株和突变株的体外毒力因子表达和鱼体死亡率的变化,为全面认识嗜水气单胞菌与宿主间的互作机制提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

嗜水气单胞菌(菌株 NJ-35)由南京农业大学刘永杰教授馈赠;自杀质粒 pRE112、互补质粒 pVLT33、缺失株 $\Delta qseC$ 、互补株 $qseC^+$ 、大肠杆菌(*Escherichia coli*) S17-1 (λpir)等由本实验室购置或构建。本实验所涉及的嗜水气单胞菌和大肠杆菌如无特殊说明均用 LB 培养基(Luria Bertani broth)分别在 28 °C 或 37 °C 培养,根据培养需求加入适宜浓度的抗生素:氨苄青霉素(ampicillin, Amp) 100 $\mu g/mL$,氯霉素(chloramphenicol, Cm) 34 $\mu g/mL$ 。Serum-SAPI 培养基^[22]用于研究 NE 对嗜水气单胞菌毒力的影响。

1.2 主要试剂和实验动物

实验用鱼为中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉实验基地提供的奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*),体重(11.1 ± 0.5) g。LB 培养基购自英国 Oxoid 公司;无噬菌体低内毒素胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州天杭生物科

技股份有限公司;限制性内切酶 *Kpn* I、*Xma* I、*Xba* I 与 *Hind* III 购自赛默飞世尔公司。细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;重酒石酸去甲肾上腺素(norepinephrine bitartrate)购自 Aladdin 公司。

1.3 $\Delta qseC$ 缺失株和互补株的构建

1.3.1 重组自杀质粒的构建 根据嗜水气单胞菌 NJ-35 基因组(GenBank 序列号: CP006870.1)中 *qseC* 基因及其两翼序列设计两对引物 *qseC* AF 和 *qseC* AR, *qseC* BF 和 *qseC* BR (表 1)。用试剂盒提取菌株基因组 DNA,通过 PCR 扩增分别获得 *qseC* 基因的上下游片段(上下游片段末端有部分重叠区)。将上下游片段扩增产物混合作为模板,采用引物 *qseC* AF 和 *qseC* BR 进行 overlap PCR,获得 *qseC* 开放阅读框(open reading frame, ORF)内缺失片段,将该片段与自杀质粒 pRE112 同时进行 *Kpn* I 和 *Xma* I 双酶切,连接后获得重组自杀质粒 pRE-del*qseC*,转化至感受态细胞 *E. coli* S17-1 (λpir),获得阳性克隆 *E. coli* S17-1 (pRE-del*qseC*)。

1.3.2 接合转移 将阳性重组子 *E. coli* S17-1 (λpir) (pRE-del*qseC*)作为供体菌,野生株 NJ-35 作为受体菌,进行接合转移。将供体菌于 LB(Cm)培养液中 37 °C 振荡培养至对数生长期($OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$);受体菌于 LB(Amp)培养液中 28 °C 培养至相同的生长状态。各取 1 mL 菌液,5000 r/min 离心 5 min 后,去上清,用无抗 LB 洗涤两次,分别用 100 μL 无抗 LB 重悬菌体,制成混合菌液。将无菌硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜贴于 LB 平板中央,将 100 μL 混合菌液点种在 NC 膜中央,28 °C 培养 24 h 后,洗下菌液,连续 10 倍梯度稀释,各取 100 μL 涂布 LB (Amp + Cm)双抗平板,28 °C 静置培养 24 h。

1.3.3 缺失株 $\Delta qseC$ 的筛选和鉴定 挑取双抗平板中长出的第一次同源重组子,接种于无抗 LB 培养液中,28 °C 振荡培养至对数生长期,在此期间菌株发生二次同源重组。将菌液 10 倍梯度稀释,涂布于含 10%蔗糖的 LB 平板,挑取单克隆同时划线 LB (Amp + Cm)、LB (Amp)平板,28 °C 培养 24 h,选择只在氨苄平板中生长的单克隆,分别用内引物 inner F 和 inner R,外引物 outer F 和

outer R (表 1)进行 PCR 鉴定, 获得缺失株 $\Delta qseC$ 。

1.3.4 互补株的构建 以嗜水气单胞菌 NJ-35 基因组为模板, 设计 1 对引物 comp F 和 comp R (表 1), 进行 PCR 扩增, 获得包含 *qseBC* 开放阅读框及其启动子的片段, 将该片段与穿梭质粒 pVLT33 同时进行 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切, 连接后转化至感受态细胞 *E.coli* S17-1(λ pir), 获得阳性克隆 *E.coli* S17-1 (pVLT33-*qseBC*), 与突变株 $\Delta qseC$ 进行接合转移, 涂布 LB(Amp+Kan)平板, 获得的克隆用引物 comp F 和 comp R 进行 PCR 鉴定, 筛选正确的互补菌株 *qseC*⁺。

表 1 实验所需引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<i>qseC</i> AF	CCGGGGT <u>ACCGGCTT</u> TGGTGATGACGAGAAGG
<i>qseC</i> AR	GGTTGTGGATGTCGAGATCGGCGTTGGCCTCCA GATAACCGATG
<i>qseC</i> BF	CATCGGTTATCTGGAGGCCAACGCCGATCTCGA CATCCACAACC
<i>qseC</i> BR	TCCCCCGGGGGAACAGGACATCCTTGAAC
inner F	GGATCAGTGGCAGAAGGA
inner R	GCTCGTCTGGTTGTAGA
outer F	TTGGTGGAAGATGATGTGAT
outer R	AGGTGTATGAGGAGTGGTT
comp F	CTAGTCTAGATTCTTCTACGGCGACTTC
comp R	CCCAAGCTTAGGTGTATGAGGAGTGGT

注: 本表中引物序列的下划线部分为人工引入的 *Kpn* I、*Xma* I、*Xba* I 与 *Hind* III 酶切位点。
Note: The underlined portion of the primer sequence in this table is an artificially introduced restriction site.

1.4 体外生长曲线的测定

挑取野生株 NJ-35 及缺失株 $\Delta qseC$ 单克隆于新鲜的 LB 培养基中, 28 ℃, 180 r/min, 过夜培养, 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 溶液洗涤 2 次, 制成 10⁴ CFU/mL 的菌悬液。在 serum-SAPI 培养基中加入 1% 的菌液(V/V), 至初始接种量为 10² CFU/mL。当初始接种量>10³ CFU/mL 时, NE 对嗜水气单胞菌没有显著的促生长作用, 排除了细菌的促生长作用对后续实验的影响; NE 终浓度为 100 μmol/L 时, 对该菌的促生长作用最适宜^[21]。实验组加入终浓度为 100 μmol/L 的 NE (0.01 mol/L PBS 作为溶剂, pH 7.2~7.4), 对照组添加等体积

PBS, 28 ℃, 180 r/min 振荡培养 72 h, 每隔 2 h 测定 OD₆₀₀ 值。

1.5 泳动能力与群集能力分析

分别配制含 0.3% 和 0.5% 琼脂的 serum-SAPI 平板测定细菌的泳动和群集能力, 实验组平板加入终浓度为 100 μmol/L 的 NE, 对照组加入等体积的 PBS。将过夜培养的野生株 NJ-35 和缺失株 $\Delta qseC$ 用 PBS 重悬成 1×10⁶ CFU/mL 的菌悬液, 取 5 μL 点种在平板中央, 28 ℃ 静置培养 48 h 后测量菌落的直径。

1.6 生物膜形成能力分析

将野生株 NJ-35 及缺失株 $\Delta qseC$ 培养至对数期(OD₆₀₀=0.6), PBS 洗涤 3 次, 用 serum-SAPI 培养基(含 NE 和不含 NE)稀释至 5×10⁶ CFU/mL, 取 200 μL 菌液于 96 孔板, 每个样品 5 个重复, 28 ℃ 培养 48 h, 在 Thermo ScientificMultiskan GO 酶标仪 600 nm 波长处测定样品的吸光度。倒出内容物, 用 300 μL 无菌 PBS 洗涤 3 次, 200 μL 甲醛固定 15 min, 去甲醛, 干燥 5~10 min, 再用 200 μL 结晶紫溶液(1%, W/V)染色 15 min, 双蒸水洗涤 5 次, 干燥 5~10 min, 最后用无水乙醇溶解, 570 nm 波长处测定样品的吸光度。生物膜相对值=OD₅₇₀(测量值)/OD₆₀₀(细菌浓度值)。

1.7 脂肪酶活性检测

按 1.4 制成 1×10⁶ CFU/mL 的菌悬液, 配制含有 1.5% 琼脂和 1% 吐温的 serum-SAPI 平板, 实验组加入终浓度为 100 μmol/L 的 NE, 对照组加入等量 PBS, 取 5 μL 细菌重悬液点种在平板的正中央, 培养 48 h 后分别测量菌落和白色沉淀环的直径, 沉淀环与菌落直径之比即为细菌脂肪酶活性。

1.8 蛋白酶活性检测

按 1.4 将野生株 NJ-35 和缺失株 $\Delta qseC$ 接至新鲜的 serum-SAPI 培养基中至初始接种量为 1×10² CFU/mL, 实验组添加终浓度为 100 μmol/L 的 NE, 对照组添加相同剂量的 PBS, 培养至对数期(OD₆₀₀=0.6), 4 ℃ 离心, 取上清, 过滤除菌, 即为细菌分泌的胞外蛋白(extracellular proteins, ECP)。取 150 μL ECP 至 2 mL 无菌离心管中, 加入 1 mL 0.3% azocasein (Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5),

37 °C 孵育 30 min 后, 加入 500 μ L 预冷的 10% 三氯乙酸(V/V)室温放置 10 min, 终止反应, 4 °C, 12000 g 离心 10 min, 取 100 μ L 上清液至 96 孔酶标板中, 每孔加入 100 μ L 1 mol/L NaOH(中和酸碱度), 每个样品 5 个重复, 400 nm 波长处测定样品的吸光度。

1.9 溶血活性试验

1.9.1 血平板溶血圈分析 在 serum-SAPI 培养基中加入 5% 绵羊血细胞(V/V), 实验组加入终浓度为 100 μ mol/L 的 NE, 对照组加入等量 PBS, 制平板。取 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液 5 μ L 点种, 28 °C 静置培养 48 h, 测定溶血圈大小。

1.9.2 血细胞溶血分析 将绵羊血红细胞用 4 °C 预冷的 PBS 缓冲液(pH 7.0)多次洗涤, 离心弃上清液(4 °C、1000 r/min), 保留下层的红细胞。取 245 μ L 上述菌株分泌的胞外蛋白于 2 mL 离心管中, 每管加入 5 μ L 洗涤后的红细胞, 37 °C 孵育 30 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取 200 μ L 上清液至酶标板中, 测 OD₅₄₀ 值。阴性对照为 PBS, 阳性对照为 1% 曲拉通 X-100(溶血活性为 100%), 溶血百分比=(样品 OD₅₄₀-阴性对照 OD₅₄₀)/阳性对照 OD₅₄₀。

1.10 动物试验

罗非鱼暂养 1 周后, 平均分为 4 个组, 随机分配至 12 个玻璃鱼缸中, 每缸 30 尾鱼, 共 360 尾鱼, 水温保持 25 °C。根据预实验获得的嗜水气单胞菌 NJ-35 的半数致死浓度(lethal concentration 50, LC₅₀) 6.5×10^6 CFU/mL, 将过夜培养的野生株 NJ-35 和缺失株 $\Delta qseC$ 按 1 : 100 转接至新鲜的 LB 培养基中, 振荡培养至 OD₆₀₀=0.6, PBS 洗涤 3 次, 重悬菌液至 5×10^6 CFU/mL, 每尾鱼腹腔注射 100 μ L, 两组注射野生株 NJ-35, 另外两组注射缺失株 $\Delta qseC$, 4 h 后在感染同种菌株的两组玻璃缸内各选 1 组注射 100 μ L 浓度为 100 μ mol/L 的 NE 溶液, 另一组注射等体积 PBS, 以此时刻记为实验的 0 h, 在 7 d 内及时记录实验鱼死亡数量。

1.11 数据处理

所有实验数据均用 Excel 2010 进行统计, 以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。实验数据采用 Excel

2010 与 GraphPad Prism 5 软件进行分析和制图, 用双尾 *T* 检验法进行数据分析。 $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 嗜水气单胞菌 NJ-35 缺失突变株 $\Delta qseC$ 与互补株的构建

受体菌株 NJ-35 和供体菌株 *E. coli* S17-1 (pRE112-*qseC*) 经过接合转移、两次同源重组、蔗糖复筛和两性平板筛选后, 得到的菌株可能为缺失株, 也可能是回复突变的野生株, 需通过 PCR 方法进行确认。以野生株 NJ-35 为模板作为阳性对照, 待检测菌株的扩增结果如果与阳性对照相同则说明目的基因敲除不成功。如图 1 所示, 经内引物检测, 待检测菌株无条带; 经外引物检测, 待检测菌株和野生株获得的 DNA 片段大小相差约 1 kb, 经测序验证, 与本实验敲除的 *qseC* 开放阅读框内缺失片段大小相同, 说明 *qseC* 部分片段被成功敲除, 获得缺失株 $\Delta qseC$ 。

在鉴定互补株时, 分别以野生株 NJ-35 与缺失株 $\Delta qseC$ 为模板作为阳性对照, 若待检测菌株的扩增结果有两条带, 一条与野生株 NJ-35 扩增条带大小相同, 一条与缺失株 $\Delta qseC$ 相同, 则说明目的基因回补成功。经 comp F 和 comp R 引物对检测与测序验证, 本实验菌株与阳性对照 DNA 片段大小均一致, 说明回补成功(图 1B)。

2.2 嗜水气单胞菌在 serum-SAPI 培养基中的生长情况

如图 2 所示, 与 PBS 对照组相比, NE 的添加均显著促进了野生株 NJ-35、突变株 $\Delta qseC$ 和互补株 *qseC*⁺ 的生长($P < 0.01$)。12 h 前, 3 株菌在 PBS 组和 NE 组的生长没有显著差异($P > 0.05$); 培养至 24 h, 各菌株的生长表现出不同程度的变化。野生株 NJ-35 的生长显著高于缺失株 $\Delta qseC$ ($P < 0.01$), 互补株 *qseC*⁺ 的生长速率与野生株 NJ-35 没有明显差异, 说明突变株 $\Delta qseC$ 的生长缺陷成功得到回补。这些结果表明, NE 的添加可以促进嗜水气单胞菌的生长, 但是 *qseC* 基因的敲除一定程度上减弱了 NE 对嗜水气单胞菌 NJ-35 的促生长作用。

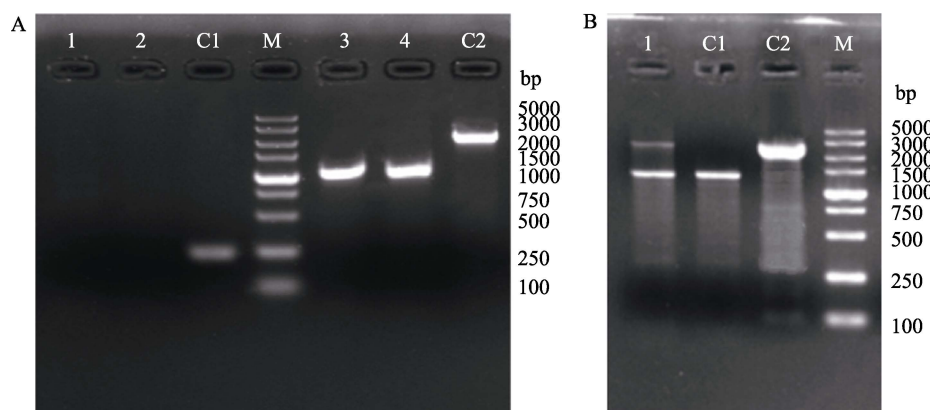


图 1 PCR 方法鉴定缺失株 $\Delta qseC$ (A) 与互补株 $qseC+$ (B)

M: DL5000 marker; 图 A 中泳道 1、2、C1 和 3、4、C2 分别为待检测菌株内外引物(inner F/R 和 outer F/R)的 PCR 检测结果; 泳道 1-4 为待检测菌株; C1 和 C2 为野生株 NJ-35, 作为阳性对照. 图 B 中泳道 1、C1、C2 分别为待检测菌株、缺失株 $\Delta qseC$ 、野生株 NJ-35 的 PCR 检测结果.

Fig. 1 Identification of the mutant $\Delta qseC$ (A) and its complementation strain $qseC+$ (B) by PCR
M: DL5000 marker. A: lanes 1, 2, C1 and 3, 4, C2 are PCR amplifications using two pairs of primers inner F/R and outer F/R, respectively; lanes 1-4 are the strains to be detected; lanes C1 and C2 are wild-type *A. hydrophila* NJ-35 as positive control. B: lane 1 is the strain to be detected; lane C1 is the mutant $\Delta qseC$, lane C2 is wild-type *A. hydrophila* NJ-35 as positive control.

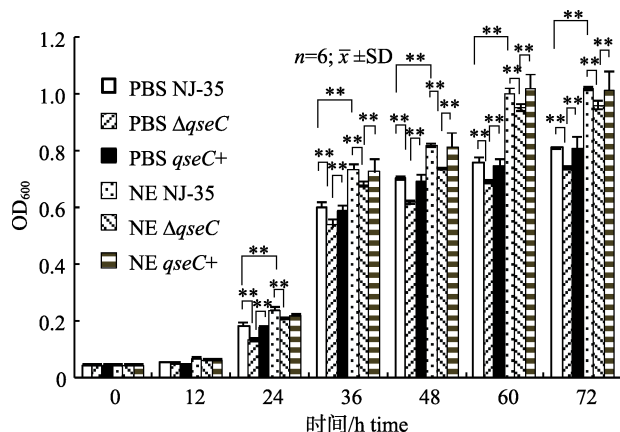


图 2 嗜水气单胞菌在 serum-SAPI 培养基中的生长趋势

**表示差异极显著($P < 0.01$).

Fig. 2 Growth trend of *Aeromonas hydrophila* in serum-SAPI medium
** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

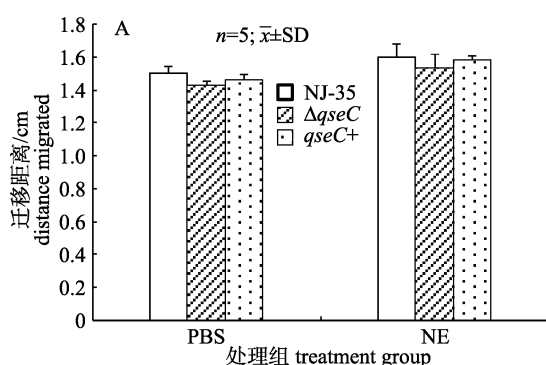


图 3 NE 处理后嗜水气单胞菌泳动能力(A)和群集能力(B)的变化

Fig. 3 Swimming (A) and swarming (B) motility of the wild-type *Aeromonas hydrophila* NJ-35 and the mutant $\Delta qseC$ in the presence of NE

2.3 NE 对嗜水气单胞菌运动能力的影响

如图 3 所示, 与 PBS 对照组相比, 嗜水气单胞菌野生株 NJ-35、缺失株 $\Delta qseC$ 与互补株 $qseC+$ 的泳动能力在 NE 处理后均无显著差异($P > 0.05$); 在 PBS 对照组和 NE 处理组中, 3 株菌的泳动能力也没有显著差异($P > 0.05$, 图 3A)。从图 3B 可看出, 3 株菌之间的群集能力也没有显著差异($P > 0.05$)。表明 NE 不影响嗜水气单胞菌 NJ-35 的泳动能力与群集能力, $qseC$ 不影响嗜水气单胞菌 NJ-35 的运动能力。

2.4 NE 对嗜水气单胞菌生物膜形成能力的影响

在进行细菌生物膜形成能力实验之前, 本研究验证了在 5×10^6 CFU/mL 的初始接种浓度下,

NE 的添加不会使野生株 NJ-35 与缺失株 $\Delta qseC$ 的生长发生显著差异。这一结果排除了 NE 的促生长作用对细菌生物膜形成能力的影响。因此, 本研究在 5×10^6 CFU/mL 初始接种浓度下比较了细菌的生物膜形成能力。从图 4 中可以发现, 与 PBS 对照组相比, NE 的添加显著增强了野生株 NJ-35 的生物膜形成能力($P < 0.01$); 此外, 无论是否添加 NE, $\Delta qseC$ 的生物膜形成能力均显著低于野生株($P < 0.01$), 而互补株 $qseC^+$ 回补了 $qseC$ 的缺失所造成的生物膜形成能力的降低。由此推测, QseC 在嗜水气单胞菌 NJ-35 的生物膜形成中发挥着重要作用, 而且 QseC 是 NE 调控该菌生物膜形成所必需的。

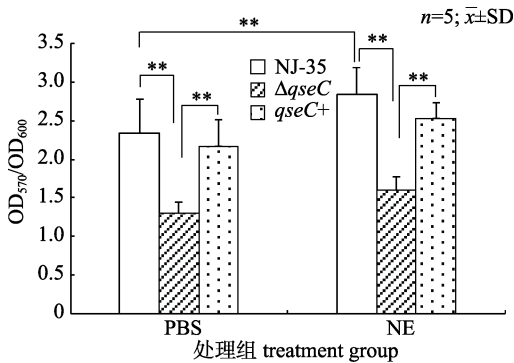


图 4 NE 处理后嗜水气单胞菌生物膜形成的变化
**表示差异极显著($P < 0.01$).
Fig. 4 Changes in biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* in the presence of NE
** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.5 NE 对嗜水气单胞菌脂肪酶与蛋白酶活性的影响

如图 5 所示, 与 PBS 对照组相比, 嗜水气单

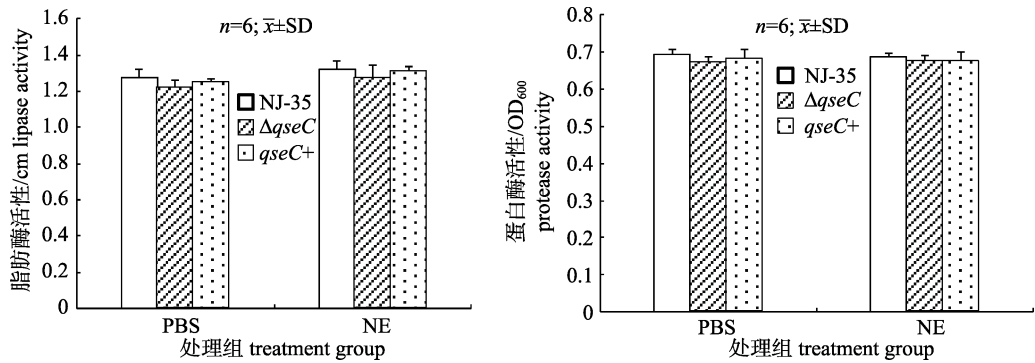


图 5 NE 处理后嗜水气单胞菌脂肪酶活性与蛋白酶活性的变化
Fig. 5 Changes of lipase activity and protease activity of *Aeromonas hydrophila* in the presence of NE

胞菌野生株 NJ-35、缺失株 $\Delta qseC$ 与互补株 $qseC^+$ 的脂肪酶活性和蛋白酶活性在 NE 处理后均无显著差异($P > 0.05$); 在对照组和 NE 处理组中, 野生株 NJ-35 与缺失株 $\Delta qseC$ 相比, 两株菌之间的脂肪酶活性和蛋白酶活性也无显著差异($P > 0.05$); 表明 NE 不影响嗜水气单胞菌 NJ-35 脂肪酶与蛋白酶的活性, 且该菌脂肪酶与蛋白酶的活性也不受 QseC 的调控。

2.6 NE 对嗜水气单胞菌溶血活性的影响

如图 6A 所示, 在血平板中, 与 PBS 对照组相比, NE 的添加分别显著增强了野生株 NJ-35 与缺失株 $\Delta qseC$ 的溶血活性($P < 0.05$); 在 NE 处理组中, 缺失株 $\Delta qseC$ 的溶血活性显著低于野生株 NJ-35 ($P < 0.01$), 互补株 $qseC^+$ 与野生株 NJ-35 的溶血活性没有显著差异。在对绵羊血细胞的溶血实验中 (图 6B), NE 的添加显著增加了野生株 NJ-35 的溶血活性($P < 0.05$), 而对缺失株 $\Delta qseC$ 没有显著影响; 在 NE 处理组中, 缺失株 $\Delta qseC$ 的溶血活性也显著低于野生株 NJ-35 ($P < 0.01$), 互补株 $qseC^+$ 与野生株 NJ-35 的溶血活性没有显著差异。结果表明, $qseC$ 的缺失可能影响了 NE 对嗜水气单胞菌溶血活性的增强作用。

2.7 动物试验结果

嗜水气单胞菌腹腔注射感染罗非鱼后, 鱼体游动速度减缓, 反应迟钝。如图 7 所示, 在 PBS 对照组中, 野生株 NJ-35 与缺失株 $\Delta qseC$ 在正常情况下对罗非鱼的致死率没有显著差异。添加 NE 后, 第 1 天内野生株组的死亡率为 33.33%, 缺失株组则为 13.33%; 第 3~7 天内各组基本没有出现

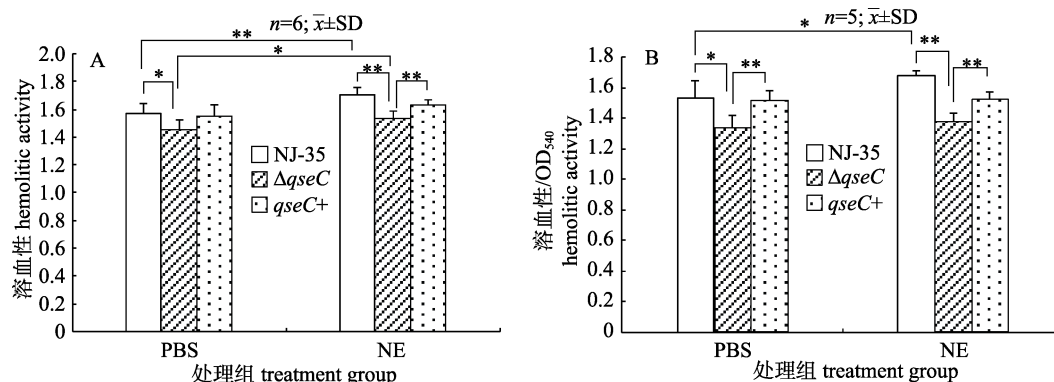


图 6 NE 处理后嗜水气单胞菌溶血活性的变化

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

A. 表示野生株 NJ-35 和突变株 $\Delta qseC$ 在绵羊血平板中形成的溶血圈大小;

B. 表示菌株分泌的胞外蛋白对绵羊血细胞的溶血活性.

Fig. 6 Hemolytic activity of *Aeromonas hydrophila* in the presence of NE

* indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

A. The size of the hemolysis circle formed by the wild type strain NJ-35 and the mutant strain $\Delta qseC$ in the sheep blood plate.

B. The hemolytic activity of the extracellular protein secreted by the strains on the sheep blood cells.

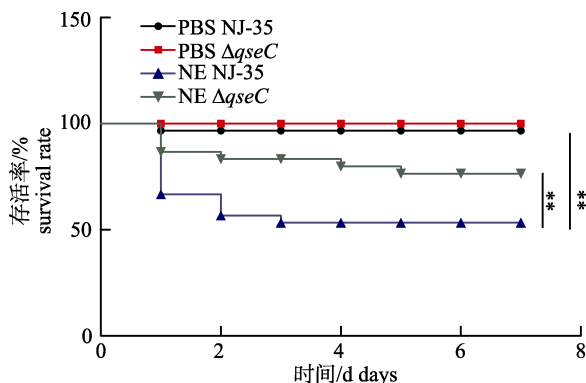


图 7 NE 与嗜水气单胞菌 NJ-35 处理后的体内毒性试验

**表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 7 In vivo toxicity test of *Aeromonas hydrophila* in the presence of NE

** indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

死亡; 7 d 内野生株组的死亡率为 46.67%, 缺失株组则为 23.33%。t 检验分析发现, 注射 NE 后, 野生株和突变株对罗非鱼的死亡率均存在差异, 其中 NE 极显著增强了野生株的致死率; 且缺失株的死亡率显著低于野生株 ($P<0.01$)。这些结果表明, NE 能够显著提高嗜水气单胞菌 NJ-35 对罗非鱼的死亡率, 而 $qseC$ 的缺失抑制了 NE 对该菌毒力增强的作用, 降低了对罗非鱼的死亡率; 由此推测, 双组分调控系统 QseBC 在 NE 调控嗜水气单胞菌毒力中可能发挥重要作用。

3 讨论

在微生物和宿主协同进化过程中, 许多微生物已形成特定的调控系统来感知和响应宿主微环境的变化。微生物能够感应宿主在应激状态下释放的激素, 并将其作为环境信号分子, 调控自身的致病性和生长等行为。研究表明, 宿主产生的应激激素 NE 能促进大多数病原菌的生长, 如空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)^[23]、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)^[24-25]和内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)^[26]等。实验室前期研究发现 NE 也能够显著促进嗜水气单胞菌 NJ-35、AH196 的生长, 增强细菌毒力^[22]。本研究进一步发现, $qseC$ 的缺失可以降低 NE 对嗜水气单胞菌 NJ-35 生长和部分毒力因子的促进作用。

在运动性实验分析中, $qseC$ 的缺失没有显著影响嗜水气单胞菌 NJ-35 的运动能力。然而, 在鼠伤寒沙门氏菌中, NE 能显著增加野生株的运动性, $\Delta qseC$ 突变株的运动能力显著降低^[27]; 在 *E. tarda* 中, 与野生型菌株相比, 缺失突变株 $\Delta qseC$ 和 $\Delta qseB$ 的泳动能力均显著降低^[10]。这可能是由于 QseBC 在不同细菌中对运动能力的调控存在着差异。

细菌生物膜形成是一个复杂的多因素过程,

涉及依从性、群体感应、细胞壁合成、代谢和应激反应^[28-29]。在不可分型 H 型流感(nontypeable *haemophilus influenza*, NTHi)中, *qseC* 可以调控生物膜形成^[30]; 血清 13 型副猪嗜血杆菌临床分离株 EP3(*Haemophilus parasuis* serovar 13 clinical strain EP3)的生物膜形成也与 QseC 密切相关^[31]; Yang 等^[32]发现 Epi/NE 的添加可以促进 *E. coli* K-12 MC1000 野生株的生物膜形成, 却没有影响 $\Delta qseC$ 突变株的生物膜形成。本实验发现, NE 诱导下, *qseC* 的敲除显著降低了嗜水气单胞菌 NJ-35 生物膜的形成能力, 由此推测, QseC 在嗜水气单胞菌 NJ-35 的生物膜形成中发挥着重要作用。

溶血活性是病原菌的主要毒力特性, 在致病过程中发挥着重要作用。*E. tarda* EIB202 能够通过 QseBC 双组分调控系统感应宿主细胞分泌的信号分子(如肾上腺素等), 从而调控该菌的溶血素的合成, 影响溶血活性^[33-34]。Khajanchi 等^[35]在 *A. hydrophila* SSU 的溶血活性实验中发现, 在无 NE 诱导下, $\Delta qseB$ 的溶血活性显著低于野生株。在本实验中, 经 NE 诱导后, *qseC* 的缺失降低了嗜水气单胞菌 NJ-35 的溶血活性, 关于 QseC 对嗜水气单胞菌 NJ-35 溶血活性的影响还需进一步探索。

嗜水气单胞菌的致病是多功能和多因子协同作用的结果, 包括溶血素、胞外蛋白酶、生物膜形成和运动性等。罗非鱼攻毒试验结果表明, NE 的添加均能增强嗜水气单胞菌野生株 NJ-35 和突变株 $\Delta qseC$ 对罗非鱼的致死率, 但由于 *qseC* 基因的缺失, NE 对 $\Delta qseC$ 毒力的增强作用受到了一定抑制。Moreira 等^[36]在研究鼠伤寒沙门氏菌时, 发现 *qseC* 的缺失也进一步降低了小鼠的死亡率, 这与本实验的结果一致。由此推测当 *qseC* 基因缺失时, 非 QseC 途径的调控通路可能影响了包括细菌黏附等相关基因的表达, 同时降低了溶血活性, 减弱细菌毒力。

综上所述, *qseC* 基因的缺失抑制了 NE 对嗜水气单胞菌 NJ-35 的促生长作用和细菌毒力。这些结果均表明 *qseC* 可通过感应 NE 来促进嗜水气单胞菌的生长、生物膜形成能力和溶血活性, 增强对罗非鱼的致病力, 而 QseC 在识别和响应去甲肾上腺素过程中依靠的分子机制则需要更深入地解析。

参考文献:

- [1] Galindo C L, Gutierrez C Jr, Chopra A K. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis[J]. Microbial Pathogenesis, 2006, 40(2): 56-68.
- [2] Parker J L, Shaw J G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease[J]. Journal of Infection, 2011, 62(2): 109-118.
- [3] Xu F Z, Wu C, Lin J. Microbial endocrinology: Impact of interactions between microbes and neuroendocrine hormones on infection—A review[J]. Acta microbiologica Sinica, 2013, 53(9): 901-907. [徐福洲, 吴村, 林军. 微生物内分泌学: 揭示微生物与激素相互作用对感染的影响机制[J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 901-907.]
- [4] Sperandio V, Torres A G, Jarvis B, et al. Bacteria-host communication: The language of hormones[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(15): 8951-8956.
- [5] Peng Q, Wu J B, Chen X M, et al. Disruption of two-component system LytSR affects forespore engulfment in *Bacillus thuringiensis*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 468.
- [6] Gao R, Stock A M. Biological insights from structures of two-component proteins[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63(1): 133-154.
- [7] Mitrophanov A Y, Groisman E A. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems[J]. Genes & Development, 2008, 22(19): 2601-2611.
- [8] Sperandio V, Torres A G, Kaper J B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): A novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(3): 809-821.
- [9] Bearson B L, Bearson S. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 44(4): 271-278.
- [10] Wang X, Wang Q Y, Yang M J, et al. QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella tarda*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 944-953.
- [11] Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Pinkner J S, et al. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2009, 73(6): 1020-1031.
- [12] Clarke M B, Hughes D T, Zhu C, et al. The QseC sensor

- kinase: A bacterial adrenergic receptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(27): 10420-10425.
- [13] Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, et al. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(6): 649-653.
- [14] Alverdy J, Holbrook C, Rocha F, et al. Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host[J]. Annals of Surgery, 2000, 232(4): 480-489.
- [15] Yuan X Z, Du X D, Qin S S, et al. Research progress on the QseBC two-component regulatory system[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(11): 204-208. [元雪滨, 杜向党, 秦上尚, 等. QseBC 双组份调控系统研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(11): 204-208.]
- [16] Hughes D T, Clarke M B, Yamamoto K, et al. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(8): e1000553.
- [17] Clarke M B, Sperandio V. Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and σ^{28} (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 57(6): 1734-1749.
- [18] Moreira C G, Weinshenker D, Sperandio V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(3): 914-926.
- [19] Gou Y, Liu W Q, Wang J J, et al. CRISPR-Cas9 knockout of *qseB* induced asynchrony between motility and biofilm formation in *Escherichia coli*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(9): 691-702.
- [20] Dong Y H, Liu J, Pang M D, et al. Catecholamine-stimulated growth of *Aeromonas hydrophila* requires the TonB2 energy transduction system but is independent of the amonabactin siderophore[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 183.
- [21] Gao J W, Xi B W, Chen K, et al. The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(4): e00664.
- [22] Yang Q, Anh N D Q, Bossier P, et al. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 584.
- [23] Wu C. Effects of norepinephrine on growth promotion and gene expression profiling of *Campylobacter jejuni*[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014: 1235-1238. [吴村. 去甲肾上腺素对空肠弯曲菌的促生长作用鉴定及表达谱分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014: 1235-1238.]
- [24] Gonzales X F, Castillo-Rojas G, Castillo-Rodal A I, et al. Catecholamine norepinephrine diminishes lung epithelial cell adhesion of *Streptococcus pneumoniae* by binding iron[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt11): 2333-2341.
- [25] Sandrini S, Alghofaili F, Freestone P, et al. Host stress hormone norepinephrine stimulates *pneumococcal* growth, biofilm formation and virulence gene expression[J]. BMC Microbiology, 2014, 14: 180.
- [26] Roberts A, Matthews J B, Socransky S S, et al. Stress and the periodontal diseases: Effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*[J]. Oral Microbiology and Immunology, 2002, 17(5): 296-303.
- [27] Bearson B L, Bearson S, Lee I S, et al. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium QseB response regulator negatively regulates bacterial motility and swine colonization in the absence of the QseC sensor kinase[J]. Microbial Pathogenesis, 2010, 48(6): 214-219.
- [28] Kendall M M, Rasko D A, Sperandio V. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(10): 4875-4884.
- [29] Deslandes V, Nash J H, Harel J, et al. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 72.
- [30] Ünal C M, Singh B, Fleury C, et al. QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2012, 302(6): 261-269.
- [31] He L, Wen X T, Yan X F, et al. Effect of *cheY* deletion on growth and colonization in a *Haemophilus parasuis* serovar 13 clinical strain EP3[J]. Gene, 2016, 577(1): 96-100.
- [32] Yang K, Meng J, Huang Y C, et al. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 70(1): 391-398.
- [33] Wang X, Wang Q Y, Xiao J F, et al. *Edwardsiella tarda* T6SS component *evpP* is regulated by *esrB* and iron, and plays essential roles in the invasion of fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(3): 469-477.
- [34] Wang X, Wang Q Y, Xiao J F, et al. Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion *in vivo* and *in vitro* and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein Hha_{Et}[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(6): 1082-1091.
- [35] Khajanchi B K, Kozlova E V, Sha J, et al. The two-component QseBC signalling system regulates *in vitro* and *in vivo* virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbiology, 2012, 158(1): 259-271.
- [36] Moreira C G, Sperandio V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(12): 4344-4353.

Role of sensor histidine kinase QseC of *Aeromonas hydrophila* in response to norepinephrine

MENG Yuxiao^{1,2}, QIN Ting², XI Bingwen^{1,2}, CHEN Kai², XIE Jun^{1,2}, PAN Liangkun²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214081, China

Abstract: To date, microbial endocrinology has revealed that many microorganisms have evolved specific mechanisms to sense and respond to stress hormones. Catecholamine stress hormones have been demonstrated to stimulate bacterial growth and virulence-related gene expression. In bacteria, the QseBC two-component system is widely used in signal transduction mechanisms, which have an important impact on bacterial virulence. In this signaling system, the sensor histidine kinase QseC is a bacterial receptor for the host epinephrine (Epi)/norepinephrine (NE), which activates virulence genes in response to interkingdom cross-signaling. In *Aeromonas hydrophila* NJ-35, NE exhibited the strongest growth stimulation and enhanced virulence. However, it remains poorly understood whether the QseBC two-component system is involved in the recognition and response process of *A. hydrophila* NJ-35 to NE. To determine whether QseC recognizes NE and regulates bacterial virulence, in this study, we constructed a *qseC* gene deletion mutant of *A. hydrophila* NJ-35 ($\Delta qseC$) and a complement strain (*qseC*⁺), which were tested in both *in vitro* and *in vivo* toxicity under NE induction. Our data provide evidence that the growth-promoting effect of NE on $\Delta qseC$ was significantly higher than that of the wild-type strain NJ-35, and the biofilm formation ability of $\Delta qseC$ was remarkably decreased compared to that of the wild-type strain and complement strain *qseC*⁺ ($P < 0.01$), with or without NE. Notably, $\Delta qseC$ was completely deficient in the promotion of the biofilm formation activity by NE, revealing that QseC was necessary for NE to regulate the biofilm formation of *A. hydrophila* NJ-35. Additionally, the hemolytic activity of $\Delta qseC$ was strikingly increased ($P < 0.01$), but still lower than that of the wild strain NJ-35 and complement strain *qseC*⁺ caused by NE, showing that except for QseC, NE could regulate the hemolytic activity of *A. hydrophila* NJ-35 through another non-QseC pathway. Furthermore, NE can dramatically increase the mortality of the wild-type strain NJ-35 against tilapia, while the deletion of the *qseC* gene inhibited the enhanced-virulence by NE. However, there were no significant differences in the motility, lipase activity, or protease activity between the wild type strain and mutant $\Delta qseC$. In conclusion, the deletion of the *qseC* gene inhibited the NE-stimulated growth and virulence of *A. hydrophila* NJ-35, indicating that QseC could regulate the pathogenicity of *A. hydrophila* by recognizing and responding to NE. It is crucial for our study to comprehensively understand the pathogenesis of *A. hydrophila* and the mechanisms behind the interactions between pathogens and their hosts. This study provides the theoretical foundations for new technologies for prevention and control strategies against bacterial diseases.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; QseBC two-component regulatory system; norepinephrine; $\Delta qseC$; virulence

Corresponding author: XIE Jun, E-mail: xiej@ffrc.cn; XI Bingwen, xibw@ffrc.cn