

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20222447

· 论 著 ·

磷酸二酯酶 PA4781 对铜绿假单胞菌运动能力及毒力的影响

宋瑾莹, 张倩楠, 王秀青

(宁夏医科大学临床医学院, 宁夏 银川 750004)

[摘要] **目的** 探讨磷酸二酯酶 PA4781 对细菌运动能力及毒力的影响。**方法** 通过测量菌苔的直径检测细菌的运动能力, 利用刚果红染色和苯酚-硫酸显色法检测细菌生物膜分泌胞外多糖的能力。通过实时荧光定量 PCR 检测介导蹭行运动的基因 *PilZ*、与胞外多糖合成有关的基因 *PelA* 以及控制绿脓菌素的基因 *PhzM* 的 mRNA 表达量。利用琼脂糖凝胶电泳检测细菌不同时间段内产生的胞外 DNA 量, 通过测量菌斑在牛奶平板中透明圈的直径检测胞外蛋白酶的总活性。**结果** 相比于 PA03 野生型菌株, PA4781 敲除菌株的运动能力及 *PilZ* 的 mRNA 表达量降低, PA4781 过表达菌株的运动能力及 *PilZ* 的 mRNA 表达量增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 相比于 PA03 野生型菌株, PA4781 敲除菌株分泌的胞外多糖及 *PelA* 的 mRNA 表达量增多, PA4781 过表达菌株分泌的胞外多糖及 *PelA* 的 mRNA 表达量减少, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); PA4781 敲除菌株和 PA4781 过表达菌株的胞外 DNA 分泌量、绿脓菌素基因 *PhzM* 的表达量及胞外蛋白酶的水解能力均低于 PA03 野生型菌株, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** PA4781 可能通过促进基因 *PilZ* 的表达, 从而促进铜绿假单胞菌的运动能力。PA4781 可能通过抑制基因 *PelA* 的表达, 抑制胞外多糖的分泌。同时, PA4781 可能不直接影响胞外 DNA 分泌量, 毒力因子绿脓菌素和胞外蛋白酶的产生。

[关键词] 铜绿假单胞菌; PA4781; 运动能力; 胞外多糖; 胞外 DNA; 绿脓菌素

[中图分类号] R378.99⁺1

Effect of phosphodiesterase PA4781 on motility and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*

SONG Jin-xuan, ZHANG Qian-nan, WANG Xiu-qing (School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of phosphodiesterase PA4781 on bacterial motility and virulence. **Methods** Motility of bacteria was detected by measuring the diameter of bacterial lawn, the ability of bacterial biofilm to secrete extracellular polysaccharides was detected by Congo-red staining and phenol-sulphate colorimetry. The expression levels of mRNA of twitching motility-mediating gene *PilZ*, extracellular polysaccharide synthesis relevant gene *PelA* and pyocyanin-controlling gene *PhzM* were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Extracellular DNA produced by bacteria during different periods was detected by agarose gel electrophoresis, the overall activity of extracellular protease was detected by measuring the diameter of transparent circle of plaque in milk plate. **Results** Compared with PA03 wild-type strain, motility and mRNA expression of *PilZ* of PA4781 knockout strain decreased, motility and mRNA expression of *PilZ* of PA4781 overexpressed strain increased, differences were both significant (both $P < 0.05$); compared with PA03 wild-type strain, secretion of extracellular polysaccharide and mRNA expression of *PelA* of PA4781 knockout strain increased, secretion of extracellular polysaccharide and mRNA expression of *PelA* of PA4781 overexpressed strain decreased, differences were both significant (both $P < 0.05$); extracellular DNA secretion, expression of pyocyanine gene *PhzM*,

[收稿日期] 2022-01-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81760661); 宁夏自然科学基金(2022AAC03185)

[作者简介] 宋瑾莹(1997-), 女(汉族), 宁夏固原市人, 硕士研究生, 主要从事微生物基础研究。

[通信作者] 王秀青 E-mail: xiuqingwang1979@163.com

and hydrolysis ability of extracellular protease of PA4781 knockout strain and overexpressed strain were all lower than PA03 wild-type strain, differences were all significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** PA4781 may promote the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by promoting the expression of gene *PilZ*. PA4781 may inhibit the secretion of extracellular polysaccharide by inhibiting the expression of gene *PelA*. PA4781 may not directly affect the secretion of extracellular DNA, as well as the production of virulence factor pyocyanine and extracellular protease.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; PA4781; motility; extracellular polysaccharide; extracellular DNA; pyocyanine

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是假单胞菌属中的主要种别,在自然界中普遍存在,是极易引起医院感染的革兰阴性条件致病菌。该菌感染主要见于免疫力低下者,如幼儿、年老体弱者,患有恶性肿瘤、艾滋病等免疫功能受损的患者。

环二鸟苷酸(cyclic-diguanosine monophosphate, c-di-GMP)作为细菌内广泛存在的一类第二信使分子,参与调节细菌运动、黏附、毒力以及生物膜形成等多种生理活动,在微生物感染过程中发挥重要作用^[1]。细菌胞内 c-di-GMP 浓度取决于其在胞内的合成与分解速率。含 GGDEF 结构域的鸟苷酸环化酶(DGCs)可将两分子的 GTP 合成 c-di-GMP,而含 EAL 和 HD-GYP 结构域的特异性磷酸二酯酶(PDEs)又可将合成的 c-di-GMP 催化水解^[2]。HD-GYP 是参与细菌第二信使分子 c-di-GMP 水解的蛋白质结构域。在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) El Tor 体内,HD-GYP 蛋白过表达降低胞内 c-di-GMP 浓度,减少胞外多糖的产生和生物膜形成^[3]。铜绿假单胞菌 PAO1 基因组编码三种具有 HD-GYP 结构域的蛋白:PA4781、PA4108 和 PA2572。并且 PA4781、PA4108 和 PA2572 的突变对铜绿假单胞菌的生物膜形成及运动能力有明显的影晌^[4]。

PA4781 是 c-di-GMP 的磷酸二酯酶,参与 c-di-GMP 降解,c-di-GMP 影响细菌的运动、生物膜的形成等生理生化过程^[4]。众多生理过程中,运动能力尤为重要,铜绿假单胞菌的运动能力包括泳动(swimming)、丛动(swarmling)和蹭行运动(twitching),已被证明与其生物膜形成和致病力都具有显著的联系^[5]。胞外多糖是细菌生物膜最主要的组成成分,在生物膜发育中具有关键作用。铜绿假单胞菌可以分泌 3 种胞外多糖,即 Psl、Pel 和藻酸盐^[6]。Pel 多糖和 Psl 多糖都可以作为生物被膜基质的关键结构成分,不同的胞外多糖对铜绿假单胞菌的毒力因子及形成生物被膜的能力都有不同的影响。胞外 DNA 与胞外多糖一样,在细菌生物膜形成的初始阶段也发挥重要作用。胞外积累的 DNA 构成生

物膜的骨架,与胞外多糖共同作用来维持生物膜的稳定性^[7]。此外,铜绿假单胞菌能够分泌许多的胞外毒力因子导致宿主细胞的感染,比如绿脓菌素、外毒素 A、弹性蛋白酶、鼠李糖脂等^[8]。绿脓菌素不但易渗透细胞膜,而且能干扰来自宿主细胞内过氧化氢酶和电子的转移过程,产生活性氧(ROS)^[9],被认为是主要的毒力因子。弹性蛋白酶是铜绿假单胞菌产生的 3 种具有广泛特异性底物蛋白酶中的一种,这种酶具有组织损伤活性,在局部感染中起重要作用^[10]。因此,铜绿假单胞菌的毒力因子及运动能力在病原菌感染时起重要作用,研究其机制对防治铜绿假单胞菌感染具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 铜绿假单胞菌 PA03 为临床分离株,由宁夏医科大学总医院实验中心提供,PA4781 过表达株 pMP2444-PA4781 及敲除株 pn-CasPA-BEC-ΔPA4781 为本实验室构建和保存^[11],均为单株。

1.1.2 培养基 LB 培养基;丛动培养基(g/L):LB 培养基,葡萄糖 5 g,琼脂粉 5 g,定容至 1 L,10⁵ Pa 灭菌 20 min;泳动培养基(g/L):胰蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂粉 3 g,定容至 1 L,10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 试剂及仪器设备 硫酸庆大霉素,北京 Solarbio 公司;细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;RNA 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒,购自北京全式金生物技术有限公司;引物,生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪、凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;电泳仪,北京六一仪器厂;ABI7500 PCR 仪,美国 Thermo 公司。

1.1.4 引物设计与合成 利用 NCBI 数据库及 Primer Premier 6.0 软件,设计相关基因及 1 个内参基因(*RpoD*)的引物序列,用 BLAST 检验引物的特异性,并送由上海生工公司合成。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR

基因	序列(5'→3')	引物长度 (bp)
RpoD	F: AAGAGCAAGCCGAAGTACGC	134
	R: ATCGCGCGGTTGATTTCCCTT	
PilZ	F: GCGTAACGGCATCTGTCTTG	149
	R: CCATCAGGTTGAGCAGCATGAAGAC	
PelA	F: CATCAAGCCCTATCCGTTCTCAC	130
	R: CACCTTCTCGTCGGCAAGATG	
PhzM	F: GCTGGTGGCCTTCGAGATCT	128
	R: ACTCCTCGCCGTAGAACAGC	

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 复苏铜绿假单胞菌野生型菌株 PA03、敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 及过表达菌株 pMP2444-PA4781 于 LB 平板上 37℃ 倒置培养 15 h 后,挑取单个菌落接种于 LB 液体培养基中,37℃ 180 r/min 震荡过夜培养(为维持质粒稳定性,需在敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 及过表达菌株 pMP2444-PA4781 培养基中加入庆大霉素),取 1% 菌液进行放大培养约 2.5 h,调整菌液浓度至 0.5 麦氏单位。

1.2.2 细菌运动试验 提前配制好 3 种运动所用的培养基,灭菌后冷却至 40℃ 倾注平板,室温放置,使培养皿盖上的水蒸气蒸发后备用;泳动和丛动试验分别吸取 2 μL 调好浓度的菌液点在平板标记位点;蹭行运动试验先用枪头将培养基穿透,于穿透的地方轻点 2 μL 调好浓度的菌液。待菌液被培养基吸收后,平稳移入 37℃ 培养箱,培养 24 h 后观察结果。

1.2.3 刚果红染色法检测胞外多糖 提前准备好 LB 平板,其中含有 20 μg/mL 的考马斯亮蓝、40 μg/mL 的刚果红;吸取 5 μL 调好浓度的菌液轻点于 LB 平板中央,待菌液稍干后移入 37℃ 培养箱,培养 48 h 后观察结果。

1.2.4 苯酚-硫酸法检测胞外多糖 取调好浓度的菌液于 4℃ 下 13 000 r/min 离心 20 min,上清液用 0.22 μm 过滤器除菌,向过滤后的上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇,4℃ 过夜沉淀,次日 4℃ 下 13 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 1 mL 蒸馏水

重悬管壁上的胞外多糖沉淀。

称取 2.5 mg 标准葡萄糖,于 25 mL 的容量瓶中,制成 100 mg/L 的标准葡萄糖溶液。准确吸取标准葡萄糖溶液 10、20、30、40 μL,加蒸馏水补足至 100 μL,配制成浓度分别为 10、20、30、40 μg/mL 的葡萄糖溶液,加入 200 μL 6% 苯酚溶液,摇匀,迅速滴加 500 μL 浓硫酸,混匀后室温放置 10 min,40℃ 水浴锅加热 15 min,取出室温静置 5 min 冷却后于 490 nm 处测定吸光度值。以标准葡萄糖溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程和相关系数。

分别取不同菌株的胞外多糖沉淀,按同样的方法进行显色,将所得值带入标准曲线计算得到相应的多糖含量。

1.2.5 生长曲线测定 分别取过夜培养的菌液,用酶标仪测量其在 600 nm 的 OD 值,用 LB 培养基稀释至菌液 OD 初始值为 0.05,接种至 96 孔板,放置于摇床 180 r/min,37℃ 培养,每隔 2 h 用酶标仪测量其在 600 nm 处的 OD 值,至 24 h。用不同时间测定获得的不同 OD 值绘制菌株生长曲线。

1.2.6 胞外 DNA 试验 分别取培养 6、12、24、36 h 的野生型菌株 PA03、敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 及过表达菌株 pMP2444-PA4781 的菌液 1.5 mL 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液与两倍体积冰冻保存的无水乙醇充分混匀后放入 -20℃ 冰箱 30 min,取出后 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 70% 乙醇(-20℃ 预冷),随即 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,放入超净工作台吹干多余液体,向其中加入 20 μL 双蒸水 -20℃ 保存。次日取各个样品在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,观察结果。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测基因转录水平的变化 取复苏后野生型菌株 PA03、敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 及过表达菌株 pMP2444-PA4781 于 LB 液体培养基中 37℃,180 r/min 震荡过夜,过夜培养后,取 1% 菌液放大培养 5 h,按照细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明操作,提取细菌总 RNA,并测定其浓度在合适范围内。

加入各 RNA 样品 500 ng,按 RNA 反转录试剂盒说明操作,42℃ 孵育 15 min,85℃ 加热 5 s 失活 EasyScript RT/RI 与 gDNA Remover,将提取出的 RNA 反转录为 cDNA,-20℃ 冷冻保存。

以 RpoD 为内参,以 cDNA 为模板,引物序列见表 1,按照 RT-qPCR 试剂盒说明进行操作。反应条件为:94℃ 预变性 30 s;94℃ 5 s,60℃ 30 s,45 cycles,60℃ 单次采集荧光,绘制熔解曲线,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析。

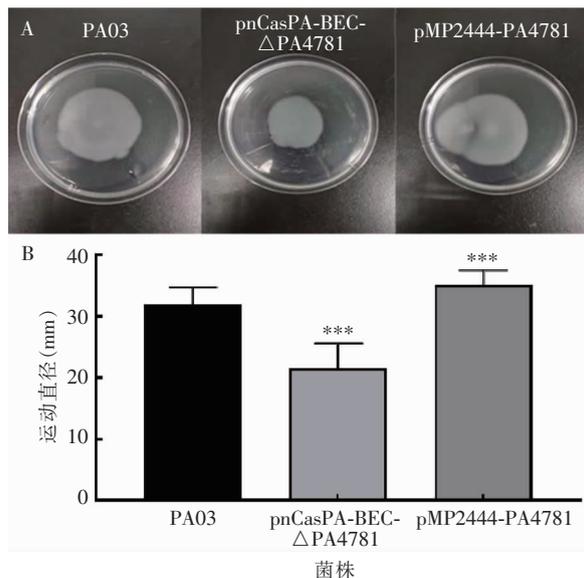
1.2.8 胞外蛋白酶检测 在 LB 培养基中加入 20% 的脱脂奶粉溶液 10 mL,混匀后倾注平板;将不同检测菌株调成 0.5 麦氏单位菌液,吸取菌液 5 μ L 轻点于牛奶平板中央,待菌液干燥后将平板正置于 37℃ 培养 24 h。观察牛奶平板中蛋白被水解的透明圈,并测量、记录其直径,即为蛋白酶水解能力。

1.3 统计学方法 每组试验重复三次,应用 GraphPad Prism 8.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVO), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA4781 对细菌运动能力的影响 为研究 PA4781 对铜绿假单胞菌运动能力的影响,分别测定野生型菌株 PA03、敲除菌株 pnCasPA-BEC- Δ PA4781 及过表达菌株 pMP2444-PA4781 的泳动、丛动和蹭行运动能力。测量细菌运动直径并进行统计分析,相比于野生型菌株 PA03,PA4781 敲除菌株的泳动能力减弱,PA4781 过表达菌株的泳动能力增强,差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见图 1。与 PA03 野生型菌株相比,PA4781 敲除菌株的丛动能力减弱,PA4781 过表达菌株的丛动能力增强,差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见图 2。相比于 PA03 野生型菌株,PA4781 敲除菌株的蹭行运动能力减弱,PA4781 过表达菌株的蹭行运动能力增强,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。

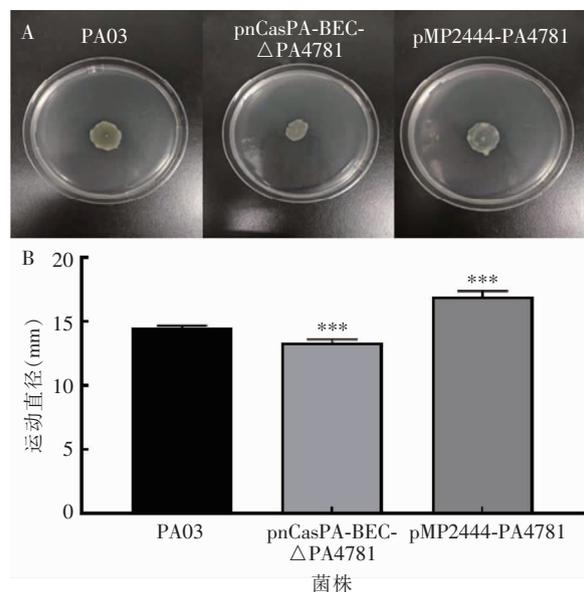
进一步研究 PA4781 与蹭行运动相关的 *PilZ* 基因转录水平的影响,结果表明,与野生型菌株 PA03 相比,敲除菌株 pnCasPA-BEC- Δ PA4781 的 *PilZ* mRNA 的相对表达量下降,过表达菌株 pMP2444-PA4781 的 *PilZ* mRNA 的相对表达量增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 4。



注:***为与 PA03 比较, $P < 0.001$ 。

图 1 PA03、pnCasPA-BEC- Δ PA4781 和 pMP2444-PA4781 的泳动情况和泳动直径统计图

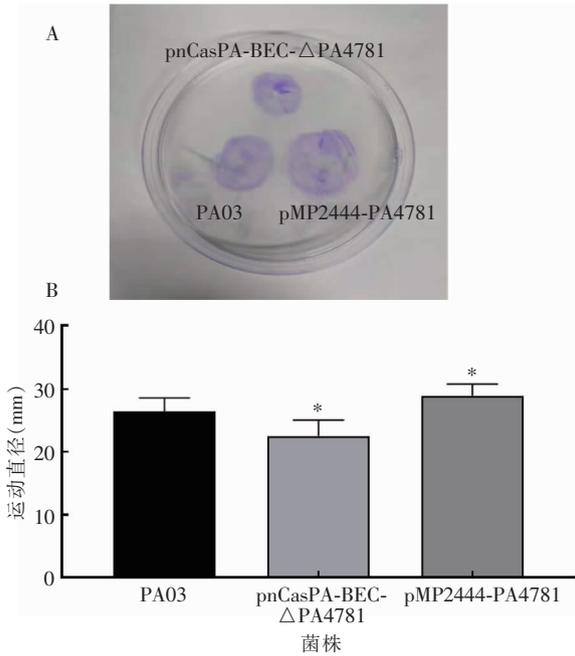
Figure 1 Statistical chart of swimming motility and swimming diameter of PA03, pnCasPA-BEC- Δ PA4781 and pMP2444-PA4781



注:***为与 PA03 比较, $P < 0.001$ 。

图 2 PA03、pnCasPA-BEC- Δ PA4781 和 pMP2444-PA4781 的丛动情况和丛动直径统计图

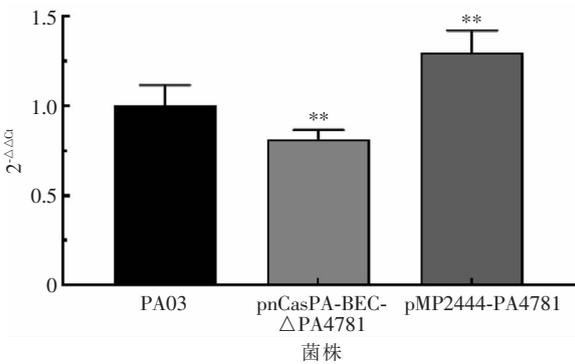
Figure 2 Statistical chart of swarming motility and swarming diameter of PA03, pnCasPA-BEC- Δ PA4781 and pMP2444-PA4781



注：* 为与 PA03 比较, $P < 0.05$ 。

图 3 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 的蹭行运动情况和蹭行运动直径统计图

Figure 3 Statistical chart of twitching motility and twitching diameter of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781



注：* * 为与 PA03 比较, $P < 0.01$ 。

图 4 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 *PilZ* 的表达量

Figure 4 Expression level of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781 *PilZ*

2.2 PA4781 对细菌胞外多糖的影响 对铜绿假单胞菌胞外多糖的表型进行观察,结果显示,相比于野生型菌株 PA03, 敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 刚果红染色加深,分泌的胞外多糖增多;过表达菌株 pMP2444-PA4781 染色变浅,分泌的胞外多糖减少,见图 5。

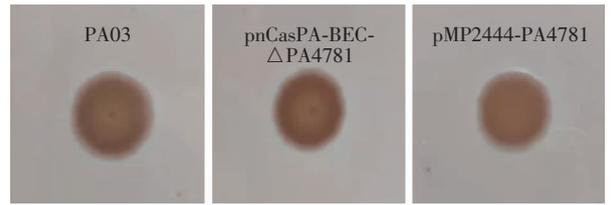


图 5 刚果红平板法检测 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 的胞外多糖

Figure 5 Detection of extracellular polysaccharide of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781 by Congo-red plate

采用苯酚-硫酸法定量测定铜绿假单胞菌胞外多糖的量,绘制葡萄糖溶液的标准曲线,见图 6。标准回归曲线方程为 $y = 0.00089x + 0.1084$,相关系数 $R^2 = 0.9924$,多糖含量的高低与吸光度呈线性关系。然后由标准曲线回归方程计算出野生型菌株 PA03、敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 及过表达菌株 pMP2444-PA4781 的糖浓度,并计算样品糖含量。结果显示,与野生型菌株 PA03 相比,敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 的胞外多糖产量增多;过表达菌株 pMP2444-PA4781 的胞外多糖产量减少,差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见图 7。

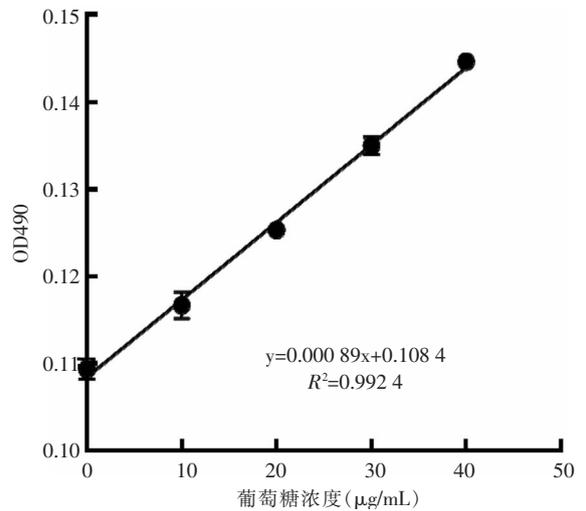
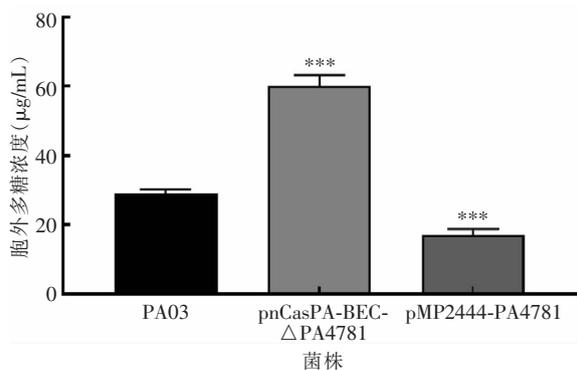


图 6 葡萄糖标准曲线

Figure 6 Standard curve of glucose

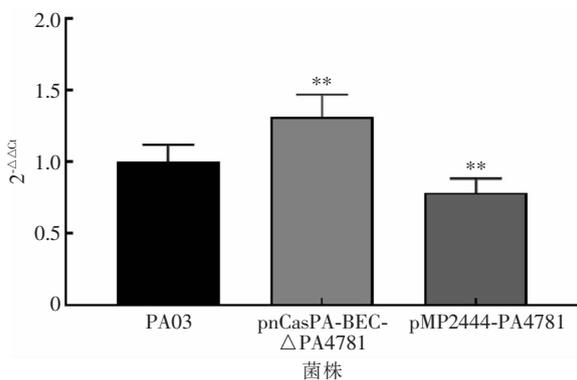
PelA(PA3064)是 *Pel* 多糖合成位点基因之一。通过 RT-qPCR 检测 PA4781 对 *PelA* 基因转录水平的影响。结果显示,与野生型菌株 PA03 相比,敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 的 *PelA* mRNA 的相对表达量增高,过表达菌株 pMP2444-PA4781 的 *PelA* mRNA 的相对表达量下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 8,与胞外多糖的表型变化一致。



注:***为与 PA03 比较, $P < 0.001$ 。

图 7 苯酚-硫酸法检测 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 的胞外多糖

Figure 7 Detection of extracellular polysaccharide of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781 by phenol-sulphate colorimetry



注: **为与 PA03 比较, $P < 0.01$ 。

图 8 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 *PelA* 的相关基因表达量

Figure 8 Expression levels of relevant genes of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781 *PelA*

2.3 PA4781 对细菌胞外 DNA 的影响 绘制野生型菌株 PA03、敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 以及过表达菌株 pMP2444-PA4781 的生长曲线,结果显示,在 0~12 h,3 株菌株均呈对数生长状态,11 h 达到平台期,之后生长趋于平缓。对 3 株菌株生长曲线进行统计学分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 9。电泳结果表明,从 6 h 开始,胞外 DNA 开始积累,随时间推移,含量逐渐增多,24 h 达到最大;36 h 胞外 DNA 含量已下降。在 12、24 h,野生型菌株 PA03 的胞外 DNA 大量积累,相比于野生型菌株 PA03,敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和过表达菌株 pMP2444-PA4781 的含量相对较少,见图 10。

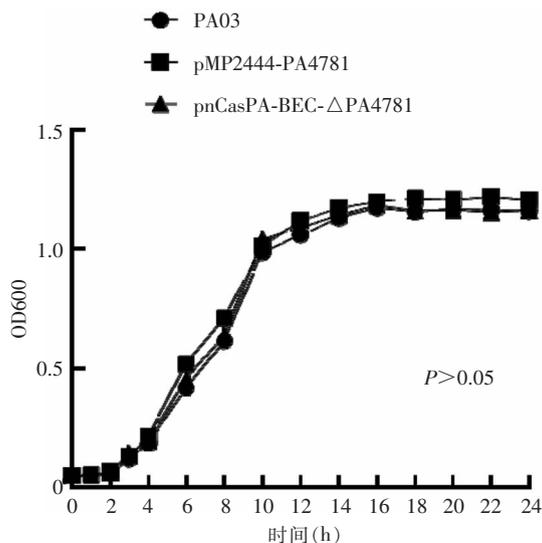


图 9 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 的生长曲线

Figure 9 Growth curves of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781

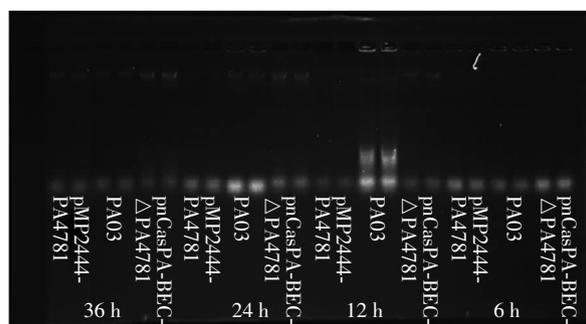
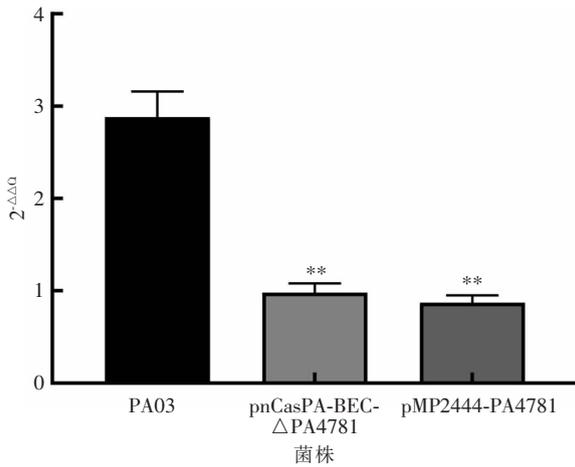


图 10 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 的胞外 DNA 含量

Figure 10 Extracellular DNA levels of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781

2.4 PA4781 对 *PhzM* 基因表达的影响 通过 RT-qPCR 研究控制绿脓菌素产生的基因 *PhzM* (PA4209)mRNA 的变化。结果显示,敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和过表达菌株 pMP2444-PA4781 的 *PhzM* mRNA 的相对表达量低于野生型菌株 PA03,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 11。

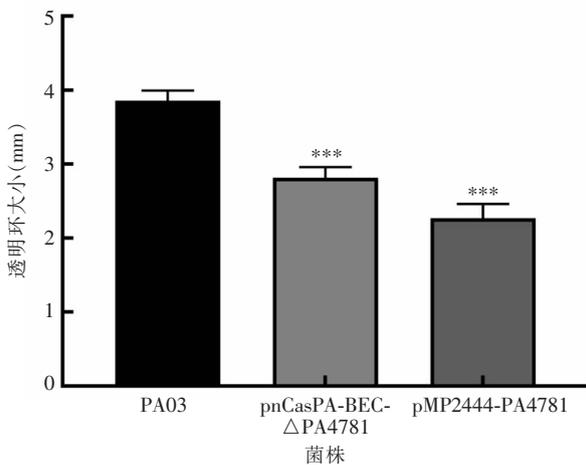
2.5 PA4781 对细菌胞外蛋白酶的影响 通过对菌斑在牛奶平板中透明圈的直径进行测量并统计分析,与野生型菌株 PA03 相比,敲除菌株 pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和过表达菌株 pMP2444-PA4781 的蛋白酶水解能力均有下降,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 12。



注: ** 为与 PA03 比较, $P < 0.01$ 。

图 11 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 *PhzM* 的表达量

Figure 11 Expression levels of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781 *PhzM*



注: *** 为与 PA03 比较, $P < 0.001$ 。

图 12 PA03、pnCasPA-BEC-ΔPA4781 和 pMP2444-PA4781 胞外蛋白酶总活性

Figure 12 Total activity of extracellular protease of PA03, pnCasPA-BEC-ΔPA4781 and pMP2444-PA4781

3 讨论

铜绿假单胞菌是引起医院感染的主要条件性致病菌之一。c-di-GMP 作为细菌中普遍存在的第二信使,不但能够调控鞭毛和纤毛的形成,而且还能通过调控因子或与蛋白结合来间接或直接地调控细菌的运动性^[12]。铜绿假单胞菌的运动包括泳动、丛动和蹭行运动,这些运动能力在感染过程中发挥着至关重要的作用。细菌的泳动主要依赖于鞭毛提供动力^[13],丛动依赖于鞭毛和 IV 型菌毛的共同作用,

蹭行运动同样依赖于鞭毛的运动和 IV 型菌毛的伸展和收缩,使得铜绿假单胞菌在感染时可以迅速到达感染部位,有利于生物膜的黏附和形成^[14]。生物膜的形成增强了细菌抵御宿主免疫防御系统及抗菌药物的能力,同时鞭毛促进了细菌的迁移和扩散,进而促进病原菌与宿主的相互作用^[15]。铜绿假单胞菌的运动能力、生物膜的形成及毒力因子的产生都对患者的感染及迁延不愈有重要的影响,因此,对于相关表型的研究尤为重要。

PA4781 是铜绿假单胞菌中含有 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶,能够促进 c-di-GMP 水解。细胞表面附属物(主要为鞭毛和 IV 型菌毛)通过影响细菌迁移和固体表面附着,在生物被膜的形成中发挥重要作用^[16]。铜绿假单胞菌能够通过鞭毛的挥鞭运动在液体中泳动,并能够通过 IV 型菌毛的伸展和收缩在固体表面蹭行。细菌的这种迁移能力使其在发育过程中具有广泛的运动性、竞争性和选择性^[17]。*PilZ* 是一种介导蹭行运动的 IV 型菌毛形成所必须的,被 c-di-GMP 结合而激活,帮助生物被膜微生物落的聚集^[18]。本研究利用本实验室前期构建的菌株,对 PA4781 的功能进行进一步研究。通过对其运动能力和 IV 型菌毛基因 *PilZ* 的研究,发现 PA4781 敲除菌株的运动能力弱于野生型菌株,PA4781 过表达菌株的运动能力强于野生型菌株,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),同时 PA4781 敲除菌株 *PilZ* 的 mRNA 相对表达量低于野生型菌株,PA4781 过表达菌株 *PilZ* 的 mRNA 相对表达量高于野生型菌株,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),因此说明 PA4781 可能通过促进基因 *PilZ* 的表达,从而增强细菌的运动能力。

研究^[4]表明,PA4781 对生物膜的形成有一定的影响,因此,应着重于生物膜中两个重要的组成成分,胞外多糖和胞外 DNA。胞外多糖是生物膜细胞外基质的骨架成分,其黏性使菌细胞聚集形成封闭环境以抵御逆境胁迫,而 c-di-GMP 可经合成酶依赖途径参与调控胞外多糖的合成与转运^[19]。研究^[20]表明,细菌内高浓度的 c-di-GMP 可促进生物膜形成,低浓度的 c-di-GMP 可抑制生物膜形成。铜绿假单胞菌可以合成至少 3 种类型的胞外多糖:褐藻多糖、Pel 多糖和 Psl 多糖。Pel 多糖可以将不同菌株连接在一起,从而促进混合生物被膜的形成^[21]。Pel 多糖还可以与生物被膜基质中的另一重要组分,胞外 DNA 通过正负离子间相互吸引而交联在一起,促进生物被膜的稳定性。

胞外 DNA 被认为是促进铜绿假单胞菌生物被膜形成的重要因子,其既可以作为生物被膜的支撑成分,也可以在营养缺乏时期为生物膜内细菌提供营养^[22]。胞外 DNA 的主要结构与细菌基因组染色体 DNA 相似,其主要来源于死亡细菌的裂解、释放或活细菌的主动分泌,参与细菌细胞的初始附着、细胞-细胞的互连和生物被膜大菌落的形成。在铜绿假单胞菌生物被膜形成的初期,胞外 DNA 含量较少,大量 DNA 的释放则是在生物膜形成的晚期,这也与晚期有较多细菌死亡裂解有关^[23]。

通过对胞外多糖和胞外 DNA 的含量进一步分析发现,相比于野生型菌株,PA4781 过表达菌株的胞外多糖产生减少,PA4781 敲除菌株的胞外多糖产生增加,差异有统计学意义($P < 0.001$),且通过对控制 Pel 多糖合成的基因——*PelA* 在转录水平的变化情况发现,相比于野生型菌株,PA4781 敲除菌株 *PelA* 的 mRNA 相对表达量升高,PA4781 过表达菌株 *PelA* 的 mRNA 相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明 PA4781 可能通过抑制基因 *PelA* 的表达,抑制生物膜细胞外基质胞外多糖的产生,从而可能抑制生物膜的形成和稳定性;而对于胞外 DNA 含量,研究发现在细菌增殖能力相同的情况下,12 h 和 24 h(生物膜成熟的阶段)时野生型菌株的胞外 DNA 大量积累,相比于野生型菌株,敲除菌株 pnCasPA-BEC- Δ PA4781 和过表达菌株 pMP2444-PA4781 的含量都相对较少。说明 PA4781 可能不能直接影响胞外 DNA 的分泌。

绿脓菌素是一种具有氧化活性的吩嗪类化合物,也是铜绿假单胞菌的重要致病因子。作为铜绿假单胞菌的主要毒力因子,绿脓菌素不仅是该菌的群体感应信号分子,也是一种电化学活性代谢物。其被认为是细菌呼吸的电子载体,同时也能协调微生物群落对环境变化的反应^[24]。此外,研究^[25]表明,绿脓菌素可以通过诱导 H_2O_2 介导的细胞裂解促进胞外 DNA 的释放,从而促进生物膜的形成。在试验过程中发现,PA4781 过表达菌株绿脓菌素的产生量远低于 PA4781 敲除菌株和野生型菌株,因此检测控制绿脓菌素的基因 *PhzM* 的表达量的变化。结果同样发现,相比于野生型菌株,PA4781 过表达菌株和 PA4781 敲除菌株的基因表达量大幅度下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明 PA4781 可能不能直接影响绿脓菌素的合成,这也可以解释胞外 DNA 有同样的变化,从而引起后期深入的研究。

蛋白水解酶也是铜绿假单胞菌的重要毒力因子之一,包括弹性蛋白酶 A 和 B、碱性蛋白酶等,对于不同的蛋白都有一定的水解能力,在急性感染中发挥重要作用。对野生型菌株 PA03、敲除菌株 pn-CasPA-BEC- Δ PA4781 和过表达菌株 pMP2444-PA4781 的胞外蛋白酶总活性进行检测,发现与野生型菌株 PA03 相比,敲除菌株 pnCasPA-BEC- Δ PA4781 和过表达菌株 pMP2444-PA4781 的蛋白酶水解能力均有下降,差异有统计学意义($P < 0.001$),表明 PA4781 可能不能直接影响铜绿假单胞菌的胞外蛋白水解酶能力。

综上所述,本研究认为,PA4781 可能通过促进基因 *PilZ* 的表达,从而促进铜绿假单胞菌的运动能力;PA4781 可能通过抑制基因 *PelA* 的表达,从而抑制胞外多糖的分泌。同时,PA4781 可能不能直接影响胞外 DNA 分泌量、毒力因子绿脓菌素和胞外蛋白酶的产生。

PA4781 作为 c-di-GMP 的磷酸二酯酶,参与 c-di-GMP 降解,影响细菌的运动、生物膜的形成等众多生理过程。本研究基于课题组前期在 PA4781 对铜绿假单胞菌 c-di-GMP 及生物膜形成的影响方面的研究,初步探明 PA4781 对细菌运动能力及毒力因子的影响,但 PA4781 与其他因素共同作用对细菌致病因子的影响仍有待进一步探讨,以期对铜绿假单胞菌感染的治疗找到新的靶点,为预防和治疗铜绿假单胞菌感染提供新的思路。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Navarro MVAS, De N, Bae N, et al. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX [J]. *Structure*, 2009, 17(8): 1104 - 1116.
- [2] Tamayo R. Cyclic diguanylate riboswitches control bacterial pathogenesis mechanisms [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(2): e1007529.
- [3] Hammer BK, Bassler BL. Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(1): 169 - 177.
- [4] Ryan RP, Lucey J, O'Donovan K, et al. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(5): 1126 - 1136.
- [5] Guttenplan SB, Kearns DB. Regulation of flagellar motility

- during biofilm formation[J]. FEMS Microbiol Rev, 2013, 37(6): 849–871.
- [6] Chew SC, Kundukad B, Seviour T, et al. Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides[J]. mBio, 2014, 5(4): e01536–14.
- [7] Schlafer S, Meyer RL, Dige I, et al. Extracellular DNA contributes to dental biofilm stability[J]. Caries Res, 2017, 51(4): 436–442.
- [8] Iiyama K, Takahashi E, Lee JM, et al. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2017, 364(7): 51–58.
- [9] Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium; relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections [J]. Trends Microbiol, 2013, 21(2): 73–81.
- [10] Wretling B, Pavlovskis OR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in pseudomonas infections[J]. Rev Infect Dis, 1983, 5(Suppl 5): S998–S1004.
- [11] 王雅蓉, 朱明星, 张帆, 等. c-di-GMP 的磷酸二酯酶 PA4781 在抗菌肽 Mercedin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜中的作用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 868–879.
Wang YR, Zhu MX, Zhang F, et al. The role of c-di-GMP phosphodiesterase PA4781 in the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by the antimicrobial peptide mercedin[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 868–879.
- [12] 袁媛, 彭仁. 环二鸟苷酸对细菌运动调控的研究进展[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2020, 44(2): 182–189.
Yuan Y, Peng R. The research progress on regulation of bacterial motility by cyclic diguanosine monophosphate[J]. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science Edition), 2020, 44(2): 182–189.
- [13] Robert-Paganin J, Nonin-Lecomte S, Réty S. Crystal structure of an EAL domain in complex with reaction product 5'-pGpG[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52424.
- [14] Buensuceso RNC, Daniel-ivad M, Kilmury SLN, et al. Cyclic AMP-independent control of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 2017, 199(16): e00188–17.
- [15] Ha DG, O'Toole GA. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review[J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(2): MB-0003–2014.
- [16] Qi LJ, Christopher GF. Role of flagella, type IV pili, biosurfactants, and extracellular polymeric substance polysaccharides on the formation of pellicles by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Langmuir, 2019, 35(15): 5294–5304.
- [17] Semmler AB, Whitchurch CB, Mattick JS. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology, 1999, 145(Pt 10): 2863–2873.
- [18] Alm RA, Boderer AJ, Free PD, et al. Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 1996, 178(1): 46–53.
- [19] Schäper S, Steinchen W, Krol E, et al. AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a *PilZ*-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(24): E4822–E4831.
- [20] Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(4): 893–916.
- [21] Kalia D, Meray G, Nakayama S, et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(1): 305–341.
- [22] Tahrioui A, Duchesne R, Bouffartigues E, et al. Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation [J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2019, 5(1): 15.
- [23] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms [J]. Mol Microbiol, 2006, 59(4): 1114–1128.
- [24] Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(4): 1159–1168.
- [25] Das T, Manfield M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46718.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:宋瑾萱,张倩楠,王秀青.磷酸二酯酶 PA4781 对铜绿假单胞菌运动能力及毒力的影响[J].中国感染控制杂志,2022,21(6):532–540. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20222447.

Cite this article as: SONG Jin-xuan, ZHANG Qian-nan, WANG Xiu-qing. Effect of phosphodiesterase PA4781 on motility and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Infect Control, 2022, 21(6): 532–540. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222447.