



鼠伤寒沙门菌六型分泌系统效应蛋白 Clpv 对巨噬细胞极化的影响

杜付熙^{1,2,3#}, 王文婕^{1,2,3#}, 尚珂^{1,2,3}, 余祖华^{1,2,3}, 李静^{1,2,3}, 贾艳艳^{1,2,3},
廖成水^{1,2,3}, 丁轲^{1,2,3}, 张春杰^{1,2,3}, 程相朝^{1,2,3*}, 陈松彪^{1,2,3*}

1 河南科技大学 洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室, 河南 洛阳 471003

2 河南科技大学 功能微生物与畜禽健康实验室, 河南 洛阳 471003

3 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003

杜付熙, 王文婕, 尚珂, 余祖华, 李静, 贾艳艳, 廖成水, 丁轲, 张春杰, 程相朝, 陈松彪. 鼠伤寒沙门菌六型分泌系统效应蛋白 Clpv 对巨噬细胞极化的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2620-2632.

DU Fuxi, WANG Wenjie, SHANG Ke, YU Zuhua, LI Jing, JIA Yanyan, LIAO Chengshui, DING Ke, ZHANG Chunjie, CHENG Xiangchao, CHEN Songbiao. Effect of T6SS effector protein Clpv of *Salmonella typhimurium* on macrophage polarization[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2620-2632.

摘要: 【目的】探讨 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)效应蛋白 Clpv 在鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica serovar Typhimurium*)致病过程中的功能。【方法】以鼠伤寒沙门菌 SL1344 基因组为模板克隆 *clpv* 基因, 并比较与其他革兰氏阴性菌台湾假单胞菌(*Pseudomonas taiwanensis*)、植生拉乌尔菌(*Raoultella planticola*)、鳎利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)、菠萝多源菌(*Pantoea ananatis*)、粘放线菌(*Actinomyces viscosus*)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)的同源性; 将 *clpv* 基因克隆至 pEGFP-N1 载体构建重组质粒 pEGFP-Clpv, 利用 Western blotting、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, q-PCR)、荧光显微镜以及流式细胞术检测蛋白表达、定位及诱导小鼠巨噬细胞 M1 型和 M2 型极化水平。【结果】*clpv* 基因全长为 2 637 bp, 与台湾假单胞菌的同源性最高; Western blotting、qPCR 和免疫荧光检测表明重组蛋白大小约 120 kDa, 在细胞中有明显绿色荧光并且主要定位于细胞膜; q-PCR 和流式细胞术结果发现 Clpv 转染组巨噬

资助项目: 河南省自然科学基金(232300421263); 国家自然科学基金(31572489); 河南科技大学博士研究启动专项基金(13480104)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Henan Province (232300421263), the National Natural Science Foundation of China (31572489), and the Earmarked Fund for Doctoral Research Start-up Fund of Henan University of Science and Technology (13480104).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CHENG Xiangchao, chengxch@126.com; CHEN Songbiao, chensongbiao@126.com

Received: 2022-10-08; Accepted: 2023-01-01; Published online: 2023-01-05

细胞 M1 型极化显著增加($P<0.01$), M2 型巨噬细胞极化显著减少($P<0.01$)。【结论】成功克隆表达鼠伤寒沙门菌 T6SS 效应蛋白 Clpv, 并明确其胞内表达定位以及对巨噬细胞极化的影响。

关键词: 鼠伤寒沙门菌; VI 型分泌系统; Clpv 蛋白; 表达定位; 极化

Effect of T6SS effector protein Clpv of *Salmonella typhimurium* on macrophage polarization

DU Fuxi^{1,2,3#}, WANG Wenjie^{1,2,3#}, SHANG Ke^{1,2,3}, YU Zuhua^{1,2,3}, LI Jing^{1,2,3}, JIA Yanyan^{1,2,3}, LIAO Chengshui^{1,2,3}, DING Ke^{1,2,3}, ZHANG Chunjie^{1,2,3}, CHENG Xiangchao^{1,2,3*}, CHEN Songbiao^{1,2,3*}

1 Luoyang Key Laboratory of Live Carrier Biomaterial and Animal Disease Prevention and Control, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

2 Laboratory of Functional Microbiology and Animal Health, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

3 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

Abstract: [Objective] To investigate the role of type VI secretion system (T6SS) effector protein Clpv in the pathogenesis of *Salmonella typhimurium*. **[Methods]** We cloned the *clpv* gene from SL1344 genome of *S. typhimurium* and compared it with the *clpv* genes of other Gram-negative bacteria (*Pseudomonas taiwanensis*, *Raoultella planticola*, *Listonella anguillarum*, *Pantoea ananatis*, *Actinomyces viscosus*, and *Escherichia coli*). The *clpv* gene was cloned into pEGFP-N1 vector to construct the recombinant plasmid pEGFP-Clpv. The protein expression, localization, and the induced M1 and M2 polarization of mouse macrophages were detected by Western blotting, q-PCR, fluorescence microscopy, and flow cytometry. **[Results]** The *clpv* gene was 2 637 bp, showing the highest homology to *clpv* of *P. taiwanensis*. Western blotting, q-PCR, and immunofluorescence showed that the recombinant protein was about 120 kDa and apparent green fluorescence in cells was found. The protein was located primarily in cell membrane. The results of q-PCR and flow cytometry indicated that Clpv enhanced M1 polarization ($P<0.01$) but weakened M2 polarization of mouse macrophages ($P<0.01$). **[Conclusion]** The T6SS effector protein Clpv of *S. typhimurium* was cloned and expressed, and its intracellular localization and effect on macrophage polarization were clarified.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; type VI secretion system; Clpv; expression localization; polarization

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)是一种重要的人畜共患病病原菌^[1], 临床上感染发病率居沙门菌首位, 约占沙门菌感染的40%–80%, 具有重要的公共卫生学意义。

沙门菌常将巨噬细胞作为生存场所, 来逃避机体的免疫杀伤^[2]。目前已确定沙门菌基因组编码 5 套效应蛋白分泌系统, 分别是 I 型分泌系统(type I secretion system, T1SS)、III 型分

泌系统(T3SS)、IV型分泌系统(T4SS)、V型分泌系统(T5SS)和VI型分泌系统(T6SS)^[3]。Pukatzki等^[4]于2006年在霍乱弧菌中首次报道T6SS,其能够参与霍乱弧菌杀灭阿米巴原虫,并进一步证实该功能需要细菌-变形虫、细胞-细胞接触以及毒力相关分泌系统(virulence associated secretion, VAS)参与。T6SS在其他革兰氏阴性菌中也被相继发现^[5-6],沙门菌T6SS包含3种核心蛋白组分^[7],分别为溶血素协同调节蛋白(haemolysin coregulated protein, Hcp)、缬氨酸-甘氨酸重复G蛋白(valine-glycine repeat G, VgrG)和AAA+类ATP酶超级家族Clpv蛋白。Hcp与T4噬菌体尾管具有显著结构同源性,对于T6SS系统的组装和效应蛋白的合成分泌是必不可少的,常作为T6SS激活的指示分子^[8]。VgrG是一个三聚体结构,位于T6SS管道结构的尖端,一般可作为受体与相应效应因子结合,将之转运到宿主靶细胞内。Clpv被报道与细菌对宿主细胞侵袭、细菌竞争优势以及环境适应性相关^[9],但具体调控机制不明。

沙门菌感染致病与其诱导组织炎症因子过度激活密切相关,而巨噬细胞极化在炎症形成过程发挥关键调节作用。鼠伤寒沙门菌感染能够显著增强巨噬细胞诱导性一氧化氮合酶(iNOS)表达^[10],促进巨噬细胞向M1型极化,此过程可能与其在巨噬细胞内存活以及持续性感染相关。研究发现,鼠伤寒沙门菌SPI-6毒力岛突变后不影响细菌在肠系膜淋巴结、肝脏及脾脏中的定殖能力,但是其效应蛋白Clpv突变显著降低沙门菌同肠道其他病原菌竞争力,进而降低病原菌致病性。此外,T6SS还能够参与细菌定殖过程中所诱导的肠道炎症免疫反应^[11]。然而,Clpv是否参与此过程进而调控沙门菌致病性尚不清楚。

因此,本研究首先克隆Clpv蛋白编码基因,构建真核表达载体pEGFP-Clpv,并对重组蛋白

表达和定位进行分析,最后将其转染至巨噬细胞检测对巨噬细胞极化影响,为进一步研究鼠伤寒沙门菌分子致病机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要菌株、质粒和细胞

鼠伤寒沙门菌SL1344、真核表达载体pEGFP-N1、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、人胚肾细胞HEK293T、小鼠巨噬细胞RAW264.7均由本实验室保存。

1.2 主要试验试剂

DNA快速纯化试剂盒以及胶回收试剂盒均购自北京全氏金生物公司;高保真DNA聚合酶、EcoR I和BamH I限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶等均购自大连宝生物技术有限公司;DMEM细胞培养基、脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;胎牛血清购自Gibico公司;Western blotting和IP细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、DAPI染料、蛋白定量试剂盒(BCA)、鼠抗 β -actin单克隆抗体和羊抗鼠HRP-IgG购自碧云天生物技术公司;蛋白Marker购自GenScript公司;鼠抗GFP单克隆抗体(MAb)、鼠抗CD206、鼠抗CD80和鼠抗F4/80均购自Biolegend公司。

1.3 鼠伤寒沙门菌与其他革兰氏阴性菌clpv基因同源性分析

根据GenBank已经公布的鼠伤寒沙门菌clpv基因(登录号为NC_016810),采用Primer Premier 5.0软件设计clpv基因引物clpv-F1/clpv-R1(表1),以SL1344基因组作为模板扩增clpv基因并连接至pMD-19T载体,测序后利用MEGA 6软件与GenBank公布其他革兰氏阴性致病菌[台湾假单胞菌(*Pseudomonas taiwanensis*)、植生拉乌尔菌(*Raoultella planticola*)、曼利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)、菠萝多源

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers and sequences used in this study

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Enzyme
<i>clpv</i>	<i>clpv</i> -F1	ATGGAAACTCCTGTTTCACGCAG	–
	<i>clpv</i> -R1	GCAAACGATCTCAAAAACAATCT	–
<i>clpv</i>	<i>clpv</i> -F2	TAT <i>GAATTC</i> ATGGAAACTCCTGTTTCACGCAG	<i>Bam</i> H I
	<i>clpv</i> -R2	ATT <i>GGATCC</i> GCAAACGATCTCAAAAACAATCT	<i>Eco</i> R I
q- <i>clpv</i>	q-PCR- <i>clpv</i> -F	TGACAGCAGAGGATGGAACA	–
	q-PCR- <i>clpv</i> -R	CCTGGATATTGGCACTGGTAAC	–
iNOS	q-PCR-miNOS-F	GTTTCTAGCCCAACAATACAAGA	–
	q-PCR-miNOS-R	GTGGACGGGTTCGATGTCAC	–
mCD80	q-PCR-mCD80-F	ACCCCAACATAACTGAGTCT	–
	q-PCR-mCD80-R	TTCCAACCAAGAGAAGCGAGG	–
mIFN- γ	q-PCR-mIFN- γ -F	TTAACTCAAGTGGCATAG	–
	q-PCR-mIFN- γ -R	TGATTCAATGACGCTTAT	–
CD206	q-PCR-CD206-F	CTGCAGATGGGTGGGTATT	–
	q-PCR-CD206-R	GGCATTGATGCTGCTGTTATG	–
IL10	q-PCR-mIL10-F	ACTGGCATGAGGATCAGCAG	–
	q-PCR-mIL10-R	CTCCTTGATTTCTGGGCCAT	–
Arg1	q-PCR-mArg1-F	GATTATCGGAGCGCCTTTCT	–
	q-PCR-mArg1-R	CCACACTGACTCTTCCATTCTT	–
β -actin	β -actin-F	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	–
	β -actin-R	GCCGGACTCATCGTACTCC	–

–: No restriction sites. Restriction sites are underlined in bold italics.

菌(*Pantoea ananatis*)、粘放线菌(*Actinomyces viscosus*)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)以及不同血清型来源沙门菌进行遗传进化关系比对分析。

1.4 pEGFP-Clpv 重组质粒构建

以 pMD-19T-Clpv 为模板, 用特异性引物 *clpv*-F2/*clpv*-R2 扩增 *clpv* 全长基因, 经 PCR 及测序鉴定正确后克隆至 pEGFP-N1 真核表达载体构建重组质粒, 将构建成功重组质粒命名为 pEGFP-Clpv。

1.5 pEGFP-Clpv 重组蛋白表达鉴定

1.5.1 荧光显微镜鉴定 pEGFP-Clpv 重组蛋白表达

pEGFP-Clpv 重组质粒和脂质体分别加入无血清无双抗 DMEM 培养基稀释后静置转染至生长状态良好 HEK293T 细胞, 转染后 24 h

置于荧光显微镜观察荧光。

1.5.2 q-PCR 鉴定 pEGFP-Clpv 重组蛋白表达

按照上述方法将重组质粒转染至 HEK293T 细胞, 转染后 24 h 收集细胞, 使用 TRIzol 试剂 (Thermo Fisher Scientific, Inc) 提取各转染组的总 RNA, 微量分光光度计检测 RNA 质量和浓度, 并反转录为 cDNA 进行 q-PCR。各样本中 *clpv* 基因的相对转录量以 β -actin 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 Clpv 表达的相对定量。

1.5.3 Western blotting 鉴定 pEGFP-Clpv 重组蛋白表达

参照 Zheng 等^[12]所描述方法进行, 简述如下: 将 pEGFP-Clpv 重组质粒转染至 HEK293T 细胞, 转染后 24 h 收集各处理组细胞蛋白, 冰浴裂解后收集细胞蛋白, 用 BCA 试剂盒定量, 上样量为 30 μ g/孔, 300 mA 恒流冰浴

转膜 90 min, 转膜结束后取出将 PVDF 膜置于封闭液(5%脱脂奶粉的 PBS 液)中, 室温封闭 2 h, 加入稀释过鼠抗 GFP 单克隆抗体(或 β -actin) 4 °C 摇晃过夜孵育, PBS-T 洗涤 3 遍, 再加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠二抗室温孵育 2 h, PBS-T 洗涤 3 遍, 干燥滤纸吸净多余液体, 采用化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)鉴定目的蛋白表达。

1.6 pEGFP-Clpv 重组蛋白亚细胞定位

参照 Steiner 等^[13]和张辉等^[14]所描述方法进行, 简述如下: 将 RAW264.7 细胞按照 10^5 个/孔接种至提前放置细胞爬片的 24 孔细胞培养板, 次日按照 1 μ g/孔转染 pEGFP-Clpv 重组质粒, 转染后 24 h 弃去培养基, 无菌 PBS 轻轻洗涤 3 遍, 加入 4%多聚甲醛室温固定 10 min, 弃去甲醛后加入 0.3% Triton-X 100 处理 10 min, 弃去 Triton-X 100 后再加入 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入特异细胞膜红色探针 Dil 染色 10 min, 回收后无菌 PBS 轻轻洗涤 3 遍, 最后 DAPI 室温染色 10 min, 洗涤后封片置于激光共聚焦显微镜观察。

1.7 pEGFP-Clpv 重组蛋白对巨噬细胞 M1 免疫表型影响

参照 Mantovani 等^[15]和尹超等^[16]所描述方法进行, 简述如下: 将生长状态良好新鲜 RAW264.7 细胞按照 10^7 个/孔接种至 60 mm 皿, 次日按照 8 μ g/孔量转染 pEGFP-Clpv 重组质粒, 在转染后 24 h 收集细胞样品, 一份提取 RNA 并反转录, 利用 q-PCR 检测 iNOS、CD80 和 IFN- γ 等 M1 型基因的转录水平。另外一份按照 10^6 个/管加入流式管并根据组别进行编号, 用 FITC 标记的 F4/80 抗体以及相应的同型对照抗体进行胞外因子染色, 用 PE 标记的 CD80 抗体和 CD20 抗体分别进行膜蛋白染色, 用 350 μ L

Staining Buffer 洗涤重悬, 流式细胞仪上机进行检测。通过前向散射角和侧向散射角确定巨噬细胞群, 应用 FlowJo 10.8.1 软件分析 F4/80⁺ CD80⁺ M1 型巨噬细胞数量。

1.8 pEGFP-Clpv 重组蛋白对巨噬细胞 M2 免疫表型影响

参照 1.7 所述方法, 利用 q-PCR 检测 CD206、IL-10 和 Arg-1 等 M2 型基因的转录水平; 在流式细胞仪上机检测后应用 FlowJo 10.8.1 软件分析 F4/80⁺ CD206⁺ M2 型巨噬细胞数量。

1.9 数据统计分析

所有试验重复 3 次, 应用 GraphPad 8.0 软件进行数据分析, 运用独立样品 *t* 检验进行统计学分析(*: $P < 0.05$ 表示数据具有统计学意义, **: $P < 0.01$ 表示数据具有显著差异, ns 表示无显著差异)。

2 结果与分析

2.1 鼠伤寒沙门菌与其他革兰氏阴性菌 *clpv* 基因同源性分析

将测序鼠伤寒沙门菌 *clpv* 基因序列与其他常见的革兰氏阴性菌(台湾假单胞菌、植生拉乌尔菌、鳎利斯顿氏菌、菠萝多源菌、粘放线菌和大肠埃希菌)的 *clpv* 基因同源性进行比对, 结果显示鼠伤寒沙门菌 *clpv* 基因和台湾假单胞菌(GenBank: KE384450) *clpv* 基因的遗传关系最近(图 1)。

2.2 pEGFP-Clpv 重组质粒鉴定

将 *clpv* 基因克隆至 pEGFP-N1 真核表达载体, 并进行 PCR 和酶切鉴定。PCR 结果显示在 2 637 bp 出现与预期大小一致的目的条带(图 2A), 对 PCR 产物进行测序, 测序结果与预期一致。BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定结果出现 4 733 bp 载体片段和 2 637 bp 基因片段(图 2B)。以上结果表明 pEGFP-Clpv 重组质粒构建成功。

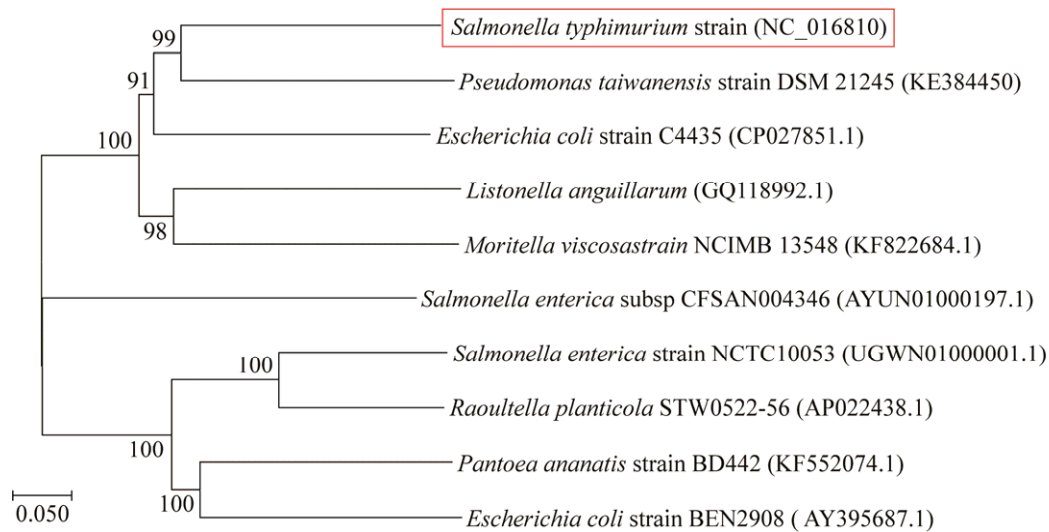


图1 鼠伤寒沙门菌 *clpv* 基因和其他革兰氏阴性菌 *clpv* 基因的系统发育树分析

Figure 1 Phylogenetic tree analysis of the *clpv* gene of *Salmonella typhimurium* and other Gram-negative bacteria. The box shows the *clpv* sequence of *Salmonella typhimurium* obtained in this experiment. Phylogenetic tree based on nucleotides sequence of homology. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.050% sequence divergence.

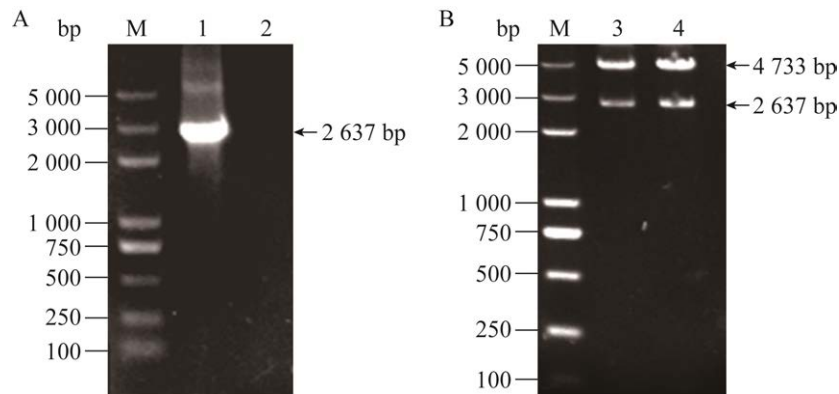


图2 pEGFP-Clpv 重组质粒鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid pEGFP-Clpv. A: PCR identification of *clpv* recombinant plasmid. B: Identification of *clpv* recombinant plasmid by enzyme digestion. M: DL5000 DNA marker; 1: PCR amplification of *clpv* gene; 2: Negative control; 3-4: Identification of *clpv* recombinant plasmids *EcoR* I and *Bam*H I by double digestion.

2.3 Clpv 重组蛋白表达鉴定

将 pEGFP-Clpv 质粒转染至 HEK293T 细胞, 转染后 24 h 检测蛋白的表达。荧光显微镜结果显示相较于未转染对照组, pEGFP-Clpv 和空载体

pEGFP-N1 组均出现明显绿色荧光信号(图 3A); Image J 量化分析结果显示重组质粒 Clpv 绿色荧光强度和空载体组无明显差异(图 3B); q-PCR 检测结果显示, 相较于未转染对照组和空载体

pEGFP-N1 组, pEGFP-Clpv 组的 *clpv* 基因转录水平显著升高(图 3C); Western blotting 结果显示, pEGFP-Clpv 和空载体 pEGFP-N1 组出现 120 kDa 和 26 kDa 左右的目的条带(图 3D)。以上结果表明 Clpv 重组蛋白成功表达。

2.4 Clpv 重组蛋白亚细胞定位鉴定

将 pEGFP-Clpv 质粒转染至 RAW264.7 细胞, 转染后 24 h 用激光共聚焦检测 Clpv 蛋白在细胞中表达定位, 结果显示空载体 pEGFP-N1 组在细胞核质中均匀分布, 而 pEGFP-Clpv 重组蛋白主要在胞膜上表达, 与红色探针所标记

细胞膜二者存在明显共定位(图 4A、4B)。

2.5 Clpv 重组蛋白诱导巨噬细胞 M1 型免疫表型鉴定

收集 pEGFP-Clpv 质粒转染后细胞样品, q-PCR 检测 M1 型标志性分子 CD80、iNOS、和 IFN- γ 的 mRNA 表达水平, 结果显示重组蛋白组处理后 M1 型免疫表型显著增加($P < 0.01$) (图 5); 同时流式细胞术结果也显示 F4/80⁺ CD80⁺ 双阳性巨噬细胞数量显著增加($P < 0.01$) (图 6A、6B)。结果表明 Clpv 重组蛋白能够显著诱导 M1 型巨噬细胞数量增加。

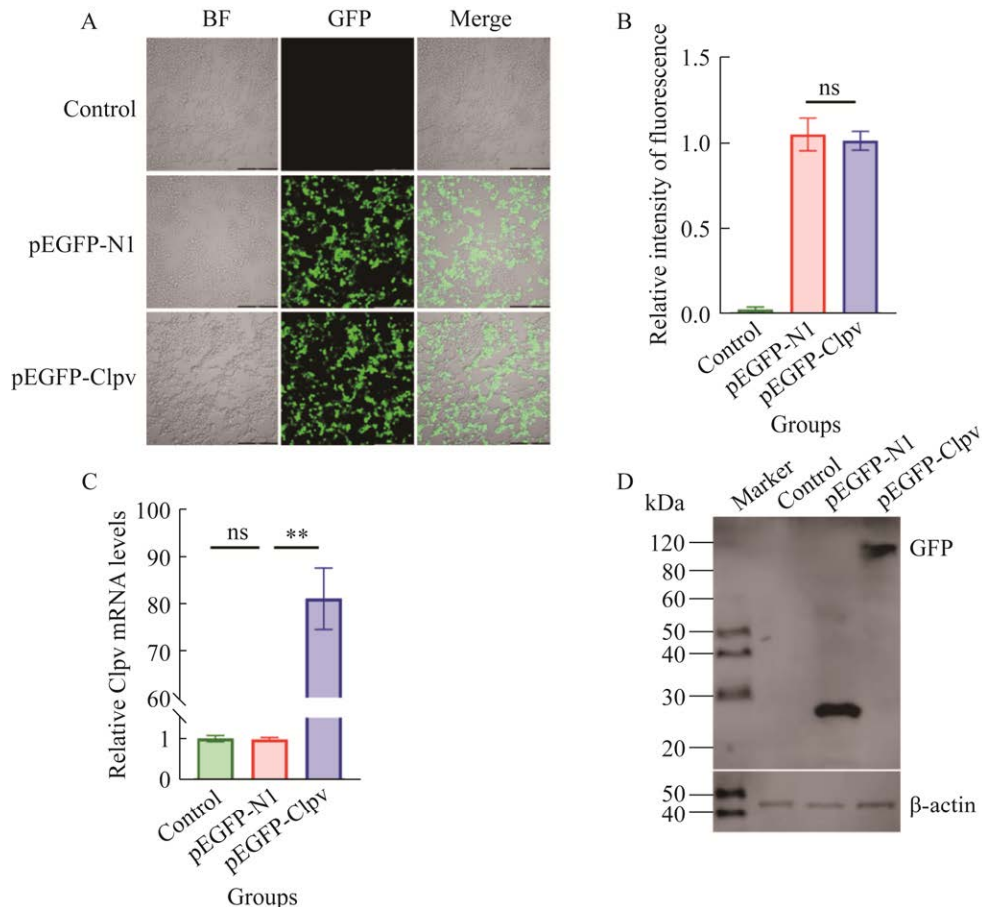


图 3 Clpv 重组蛋白的表达鉴定

Figure 3 Expression and identification of Clpv recombinant protein. A: Fluorescence microscopy was used to detect the expression of Clpv recombinant protein. B: Quantitative analysis of Clpv recombinant protein expression by Image J. C: The expression of Clpv was detected by q-PCR. D: The expression of Clpv was detected by Western blotting. ns: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$; Scale bar=20 μ m.

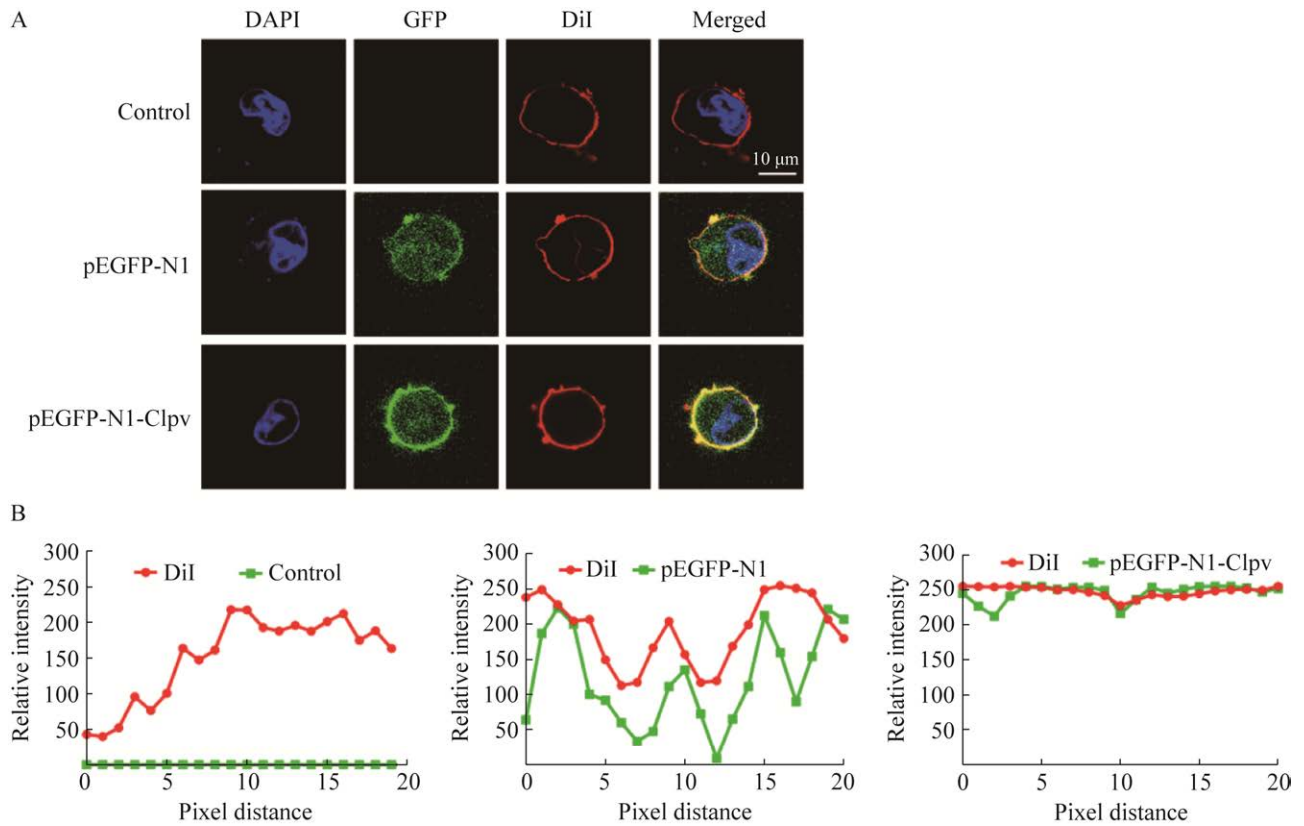


图 4 Clpv 重组蛋白亚细胞定位分析

Figure 4 Subcellular localization analysis of Clpv recombinant protein. A: Laser confocal identification of Clpv recombinant protein subcellular localization. B: Colocalization analysis of Clpv recombinant protein and cell membrane by Image J. Scale bar=10 μm.

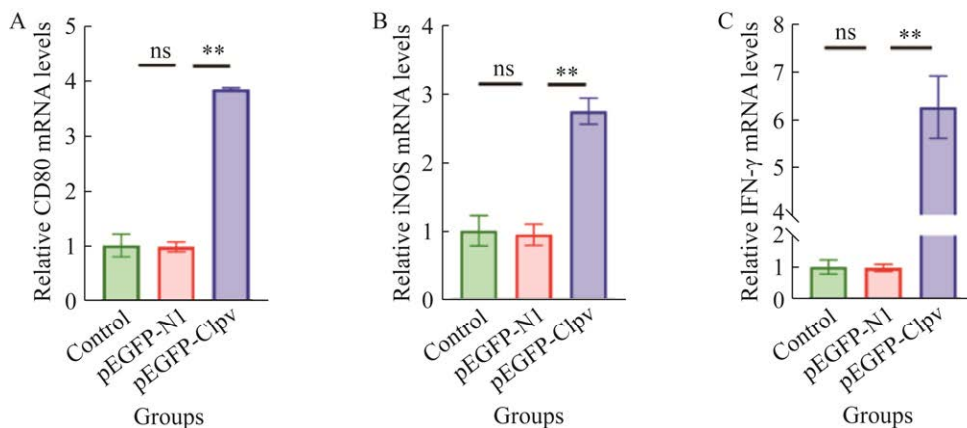


图 5 q-PCR 检测巨噬细胞 M1 型极化相关分子水平变化

Figure 5 The changes of M1 polarization related molecules in macrophages were detected by q-PCR. A: The change of CD80 level was detected by q-PCR. B: The change of iNOS level was detected by q-PCR. C: The change of IFN-γ level was detected by q-PCR. ns: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$.

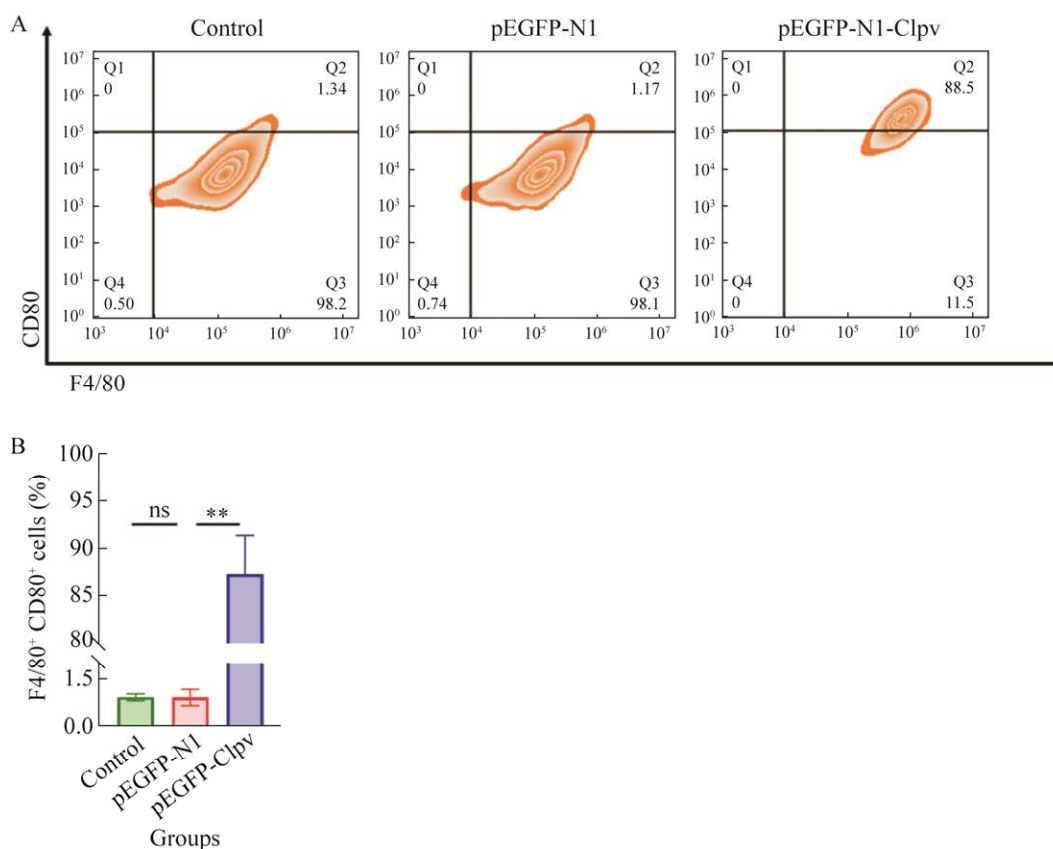


图 6 流式细胞术检测巨噬细胞 M1 型极化相关分子水平变化

Figure 6 Flow cytometry was used to detect the changes of M1 polarization related molecules in macrophages. A: The number of F4/80⁺ CD80⁺ double positive macrophages was detected by flow cytometry. B: Quantitative analysis of F4/80⁺ CD80⁺ double positive macrophages. ns: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.6 Clpv 重组蛋白诱导巨噬细胞 M2 型免疫表型鉴定

按照上述方法利用 q-PCR 检测 M2 型标志性分子 CD206、Arg-1 和 IL-10 的 mRNA 表达水平, 结果显示 Clpv 蛋白处理后巨噬细胞 M2 型免疫表型细胞数量显著降低($P < 0.01$) (图 7); 流式细胞术结果也显示 F4/80⁺ CD260⁺ 双阳性巨噬细胞数量显著降低($P < 0.01$) (图 8A、8B)。以上结果表明 Clpv 蛋白会促使 M1 巨噬细胞的极化, 并抑制 M2 巨噬细胞的极化。

3 讨论

鼠伤寒沙门菌是一种重要的人畜共患病原

菌, 宿主感染谱广泛, 能够导致急性肠炎、败血症甚至死亡, 在医学、兽医学以及公共卫生学上具有重要的意义^[17]。

沙门菌在自然界中广泛存在, 能够抵抗各种不利的环境因素, 而 T6SS 被报道与细菌的生物被膜形成、细菌的竞争性优势以及致病过程密切相关^[18]。沙门菌 T6SS 包含 13 种关键核心蛋白, 而 Clpv 是构成 T6SS 结构和介导其发挥功能重要蛋白之一^[19], 它是一种细胞质 AAA⁺ ATP 酶蛋白, 能够特异性结合于 T6SS “噬菌体”结构末端的收缩鞘, 从而使 T6SS 装置再循环; 同时 Clpv 在假单胞菌^[20]、支气管波士杆菌^[21]、野油菜黄单胞菌^[22]以及弗氏柠檬酸杆菌^[23]

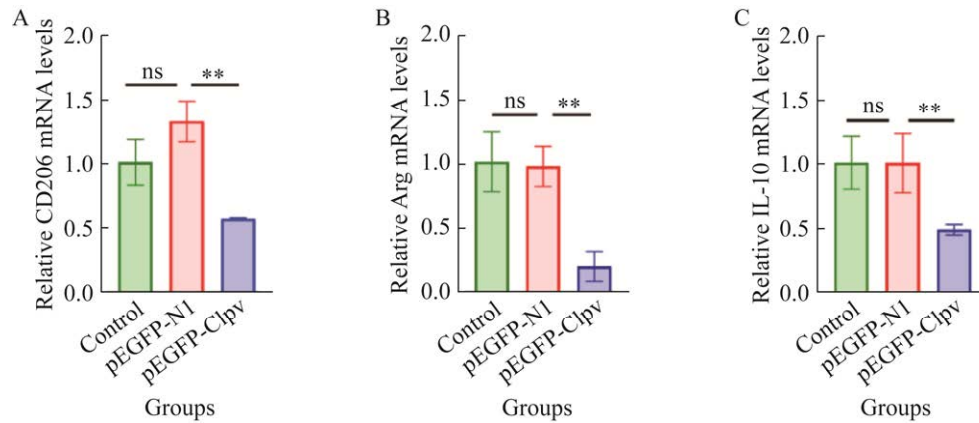


图 7 q-PCR 检测巨噬细胞 M2 型极化相关分子水平变化

Figure 7 The changes of M2 polarization related molecules in macrophages were detected by q-PCR. A: CD206 levels were detected by q-PCR. B: The change of Arg-1 level was detected by q-PCR. C: The changes of IL-10 levels were detected by q-PCR. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$.

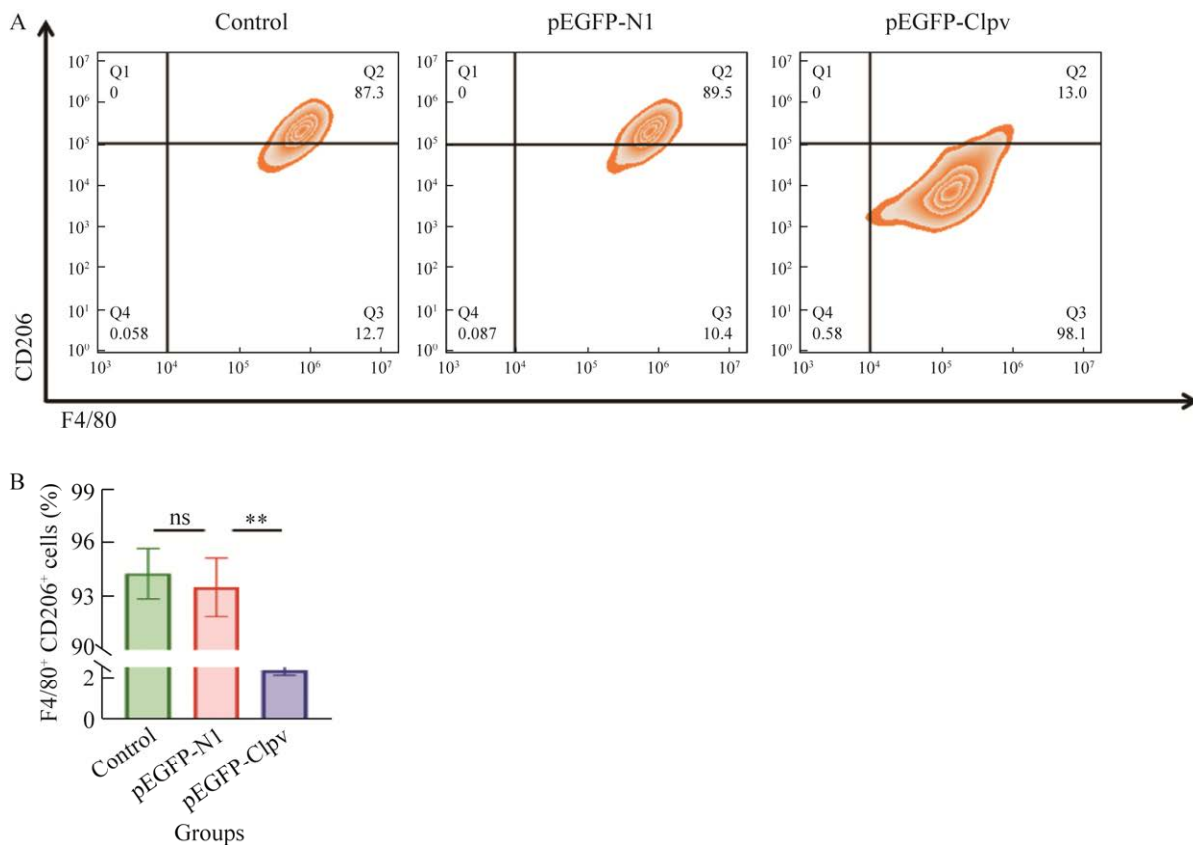


图 8 流氏细胞术检测巨噬细胞 M2 型极化相关分子水平变化

Figure 8 Changes of M2 type polarization related molecules of macrophages detected by flow cytometry. A: The number of $F4/80^+ CD206^+$ double positive macrophages was detected by flow cytometry. B: Quantitative analysis of $F4/80^+ CD206^+$ double-positive macrophages. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$.

等多种革兰氏阴性菌的致病过程中发挥重要作用。研究表明鼠伤寒沙门菌诱导炎症来维持其在肠道内的持续性复制^[24]，同时发现 T6SS 能够激活宿主炎性小体来促进宿主细胞焦亡^[25]，但是 Clpv 是否参与 T6SS 所诱导的炎症反应尚不清楚。

本研究克隆了鼠伤寒沙门菌 *clpv* 基因，将其与其他常见革兰氏阴性菌的 *clpv* 基因进行序列比对，发现其与台湾假单胞菌的 *clpv* 基因有较高的同源性。蛋白发挥功能与其在靶细胞内表达定位密不可分，对 Clpv 重组蛋白的胞内定位结果显示，该蛋白主要定位于细胞膜上，少量分布在胞浆中。沙门菌在感染过程中能够诱导巨噬细胞发生极化^[26-28]，巨噬细胞极化是免疫细胞接收外界环境讯号所表现的不同功能过程^[29]，巨噬细胞可分化为经典活化 M1 型和选择性活化的 M2 型。M1 型和 M2 型具有不同的免疫功能，M1 型巨噬细胞促进 Th1 反应，在细菌感染早期阶段，细菌中病原体相关分子模式被机体病原体受体识别时，M1 型巨噬细胞活化后产生大量促炎介质，从而杀灭入侵病原微生物或进一步激活适应性免疫过程；而 M2 型巨噬细胞促进 Th2 反应，具有抑制炎症的作用，二者平衡对维持机体正常生理功能至关重要^[30]。为了确定 Clpv 蛋白是否与鼠伤寒沙门菌感染过程中所诱导巨噬细胞极化相关，通过检测 Clpv 重组蛋白转染巨噬细胞后 M1 型标志性分子 (CD80、iNOS 和 IFN- γ) 变化水平，结果显示相比于未处理对照组以及空载体组 Clpv 能够显著增加 (CD80、iNOS 和 IFN- γ) 表达水平，同时 F4/80⁺ CD80⁺ 双阳性 M1 型巨噬细胞数量和比例显著增加；与之相反的是 M2 型标志性分子 (CD206、Arg-1 和 IL-10) 以及 F4/80⁺ CD260⁺ 阳性 M2 型巨噬细胞数量和比例显著降低。然而，后续还需要进一步回归至鼠伤寒沙门菌构建 Clpv 缺失后对巨噬细胞极化的影响。

4 结论

本研究克隆了鼠伤寒沙门菌 *clpv* 基因，构建真核表达载体 pEGFP-Clpv，并检测 Clpv 蛋白在细胞中表达定位以及对巨噬细胞极化影响。结果表明 Clpv 蛋白主要定位于细胞膜上，少量分布于胞浆；Clpv 蛋白能够显著诱导 M1 型巨噬细胞活化以及促进 M2 型向 M1 型转换。该研究为后续深入研究 T6SS 核心蛋白 Clpv 功能奠定理论基础。

参考文献

- [1] KNODLER LA. *Salmonella enterica*: living a double life in epithelial cells[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 23: 23-31.
- [2] YANG FF, SHENG XM, HUANG XX, ZHANG Y. Interactions between *Salmonella* and host macrophages-dissecting NF- κ B signaling pathway responses[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 154: 104846.
- [3] 薛颖, 郭荣显, 钱珊珊, 安树敏, 焦新安, 耿士忠. 沙门菌毒力岛的研究进展[J]. *微生物与感染*, 2015, 10(6): 381-389.
XUE Y, GUO RX, QIAN SS, AN SM, JIAO XA, GENG SZ. Research progress on *Salmonella* pathogenicity islands[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2015, 10(6): 381-389 (in Chinese).
- [4] PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRSTINS B, SARRACINO D, NELSON WC, HEIDELBERG JF, MEKALANOS JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1528-1533.
- [5] LEUNG KY, SIAME BA, SNOWBALL H, MOK YK. Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(1): 9-15.
- [6] 蒋玲艳, 周启星, 王培胜, 江小涵, 冯露. 假定调控蛋白 STM14_3514 可降低鼠伤寒沙门菌对上皮细胞的侵袭力[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 500-512.
JIANG LY, ZHOU QX, WANG PS, JIANG XH, FENG L. Putative regulatory protein STM14_3514 decreases

- Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 500-512 (in Chinese).
- [7] JOURNET L, CASCALES E. The type VI secretion system in *Escherichia coli* and related species[J]. *EcoSal Plus*, 2016, 7(1). DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015. PMID: 27223818.
- [8] CERRAK Y, FLAUGNATTI N, DURAND E, JOURNET L, Cascales E. Structure and activity of the type VI secretion system[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0031-2019>.
- [9] BÖNEMANN G, PIETROSIUK A, DIEMAND A, ZENTGRAF H, MOGK A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(4): 315-325.
- [10] 廖成水, 王晓利, 牛晓婉, 邵文超, 王楠, 孙召金, 程相朝, 刘明远. 甘草多糖对鼠伤寒沙门菌诱导的巨噬细胞氧化-抗氧化平衡紊乱的调解[J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(6): 941-945.
LIAO CS, WANG XL, NIU XW, SHAO WC, WANG N, SUN ZJ, CHENG X(C/Z), LIU MY. Effect of radix glycyrrhiza polysaccharide on the imbalance of oxidation/antioxidation induced by *Salmonella typhimurium* murine peritoneal macrophages[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(6): 941-945 (in Chinese).
- [11] CHOW J, MAZMANIAN SK. A path obiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7(4): 265-276.
- [12] ZHENG J, XUE H, ZHANG H, WANG L, ZHENG L, WANG X, LIN X, JIN S, WU J. The influence of therapeutic vaccine candidate against HBeAg pEGFP-N1-C (472-507)-ecdCD40L on dendritic cells[J]. *Acta Virologica*, 2018, 62(2): 157-163.
- [13] STEINER F, PAVLOVIC J. Subcellular localization of MxB determines its antiviral potential against influenza A virus[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(22): e00125-e00120.
- [14] 张辉, 胡茂志, 顾志强, 焦新安, 耿士忠, 张晓明, 潘志明. 减毒鼠伤寒沙门菌体内定位分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(1): 80-84.
ZHANG H, HU MZ, GU ZQ, JIAO XA, GENG SZ, ZHANG XM, Pan ZM. Localization analysis of attenuated *Salmonella typhimurium* with oral immunization[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(1): 80-84 (in Chinese).
- [15] MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, ALLAVENA P, SICA A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes[J]. *Trends in Immunology*, 2002, 23(11): 549-555.
- [16] 尹超, 徐黎娟, 李求春, 潘志明, 耿士忠, 焦新安. 禽沙门菌诱导宿主免疫应答的特性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(4): 612-620.
YIN C, XU LJ, LI QC, PAN ZM, GENG SZ, JIAO XA. Characteristics of immune response induced by avian *Salmonella*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(4): 612-620 (in Chinese).
- [17] 曹莉, 程如楠, 武周慧, 王家伟, 王瑜, 张永红, 吴清民, 王真. 鼠伤寒沙门菌 *sapC* 基因缺失株的构建及生物学特性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(7): 2282-2289.
CAO L, CHENG RN, WU ZH, WANG JW, WANG Y, ZHANG YH, WU QM, WANG Z. Construction and biological characteristics of *sapC* gene deletion strain of *Salmonella typhimurium*[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2022(7): 2282-2289 (in Chinese).
- [18] WANG M, LUO Z, DU H, XU SG, NI B, ZHANG HF, SHENG XM, XU HX, HUANG XX. Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi[J]. *Current Microbiology*, 2011, 63(1): 22-31.
- [19] BARRETTO LAF, FOWLER CC. Identification of a putative T6SS immunity islet in *Salmonella typhi*[J]. *Pathogens: Basel, Switzerland*, 2020, 9(7): E559.
- [20] LUO G, XU XJ, ZHAO LM, QIN YX, HUANG LX, SU YQ, YAN QP. *clpV* is a key virulence gene during *in vivo* *Pseudomonas plecoglossicida* infection[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(7): 991-1000.
- [21] WEYRICH LS, ROLIN OY, MUSE SJ, PARK J, SPIDALE N, KENNETT MJ, HESTER SE, CHEN C, DUDLEY EG, HARVILL ET. A type VI secretion system encoding locus is required for *Bordetella bronchiseptica* immunomodulation and persistence *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45892.
- [22] LIU LY, HAO S, LAN RT, WANG GX, XIAO D, SUN H, XU JG. The type VI secretion system modulates flagellar gene expression and secretion in *Citrobacter freundii* and contributes to adhesion and cytotoxicity to host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(7): 2596-2604.
- [23] GALÁN JE. *Salmonella typhimurium* and

- inflammation: a pathogen-centric affair[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(11): 716-725.
- [24] COHEN H, BARAM N, FRIDMAN CM, EDRY-BOTZER L, Salomon D, Gerlic M. Post-phagocytosis activation of NLRP3 inflammasome by two novel T6SS effectors[J]. *eLife*, 2022, 11: e82766.
- [25] BRODSKY IE. JAK-ing into M1/M2 polarization SteErs *Salmonella*-containing macrophages away from immune attack to promote bacterial persistence[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(1): 3-5.
- [26] SALIBA AE, LI L, WESTERMANN AJ, APPENZELLER S, STAPELS DA, SCHULTE LN, HELAINE S, VOGEL J. Single-cell RNA-seq ties macrophage polarization to growth rate of intracellular *Salmonella*[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 2: 16206.
- [27] PANAGI I, JENNINGS E, ZENG J, GÜNSTER RA, STONES CD, MAK H, JIN E, STAPELS DAC, SUBARI NZ, PHAM THM, BREWER SM, ONG SYQ, MONACK DM, HELAINE S, THURSTON TLM. *Salmonella* effector SteE converts the mammalian serine/threonine kinase GSK3 into a tyrosine kinase to direct macrophage polarization[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(1): 41-53.e6.
- [28] ESSANDOH K, LI Y, HUO J, FAN GC. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response[J]. *Shock*, 2016, 46(2): 122-131.
- [29] BOUTILIER AJ, ELSAWA SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6995.
- [30] 席静, 王月丽, 邓肖玉, 杨琴, 李培东, 张江伟, 孙天浩, 朱良全, 易继海, 陈创夫. STAT6 介导的巨噬细胞极化对布鲁氏菌胞内存活的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 59(1): 263-271.
- XI J, WANG YL, DENG XY, YANG Q, LI PD, ZHANG JW, SUN TH, ZHU LQ, YI JH, CHEN CF. Effect of STAT6 mediated macrophage polarization on intracellular survival of *Brucella*[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2022, 59(1): 263-271 (in Chinese).