

## c-di-GMP 对大肠杆菌生物膜调控的研究进展

何云江, 贾伟娟, 郝珊珊, 孟庆磊, 陈云娇, 王学理

内蒙古民族大学 动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000

何云江, 贾伟娟, 郝珊珊, 孟庆磊, 陈云娇, 王学理. c-di-GMP 对大肠杆菌生物膜调控的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2811-2820.

HE YJ, JIA WJ, CHI SS, MENG QL, CHEN YJ, WANG XL. Research progress of c-di-GMP in the regulation of *Escherichia coli* biofilm. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2811-2820.

**摘要:** 大肠杆菌生物膜是由聚集于特定介质上的大肠杆菌菌体细胞相互黏附并分泌胞外基质聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 而产生的一种结构复杂的膜状聚集物。感染宿主后的致病性大肠杆菌在形成生物膜后会极大地避免免疫系统以及环境中各种有害因素对其的影响, 对宿主造成持续甚至致命的伤害。环二鸟苷酸 (cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP) 是广泛存在于细菌中的第二信使, 在调节生物膜形成过程中起到至关重要的作用。基于此, 本文对近年来有关 c-di-GMP 对大肠杆菌生物膜形成过程中菌体的运动、黏附以及 EPS 产生机制的研究进行了综述, 以期从 c-di-GMP 角度抑制大肠杆菌生物膜提供依据和思路。

**关键词:** 大肠杆菌; 生物膜; 环二鸟苷酸; 第二信使

## Research progress of c-di-GMP in the regulation of *Escherichia coli* biofilm

HE Yunjiang, JIA Weijuan, CHI Shanshan, MENG Qinglei, CHEN Yunjiao, WANG Xueli

Animal Science and Technology College, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

**Abstract:** *Escherichia coli* biofilm is a complex membrane aggregation produced by the adhesion and secretion of extracellular polymeric substances by *E. coli* cells aggregated on specific media. Pathogenic *E. coli* will evade the immune system and the impact of various harmful factors in the environment after

Received: February 9, 2022; Accepted: March 7, 2022; Published online: April 28, 2022

Supported by: Natuwral Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, China (2021LHMS03008)

Corresponding author: WANG Xueli. E-mail: wangxueli@imun.edu.cn

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (2021LHMS03008)

the formation of biofilm, causing sustained and even fatal damage to the host. Cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP) is a second messenger ubiquitous in bacteria and plays a crucial role in regulating biofilm formation. This paper reviewed the recent studies about the role of c-di-GMP in the movement, adhesion, and EPS production mechanism of *E. coli* during biofilm formation, aiming to provide a basis for inhibiting *E. coli* biofilm from the perspective of c-di-GMP.

**Keywords:** *Escherichia coli*; biofilm; c-di-GMP; second messenger

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*), 俗名大肠杆菌, 是一种革兰氏阴性短杆菌、兼性厌氧、具有运动性或非运动性细菌, 是人类和动物肠道内正常菌群的成员之一, 以益生或共生的方式存在于机体内。此外, 该菌的一些菌株具有致病性, 在一定条件下 (继发感染、机体免疫力下降等) 会引起人类或动物发病甚至死亡, 例如许多与医疗器械相关的感染 (尿道和血管内导管、假肢关节、分流管和假肢移植等)<sup>[1]</sup>。已有研究表明, 引起胃肠炎和肠外感染的 8 种大肠杆菌 (肠致病性大肠杆菌、肠出血性大肠杆菌、产肠毒素大肠杆菌、肠侵袭性大肠杆菌、肠黏附性大肠杆菌、弥散黏附性大肠杆菌、尿道致病性大肠杆菌和新生儿脑膜炎大肠杆菌) 中的每一种都以特殊的黏附机制在宿主的特定部位定居<sup>[2]</sup>。大多数致病菌株借助鞭毛和卷曲附属物黏附于宿主细胞表面, 借助于各种毒力因子以及通过分泌生物膜基质成分来致病<sup>[3-4]</sup>。近年来本研究团队一直致力于大肠杆菌的流调、耐药性与生物膜的研究, 2020 年本实验室从山东省枣庄市某鸭养殖场病死鸭体内分离出一株大肠杆菌, 经检测该菌携带有 *phoA*、*luxS*、*pfs*、*fimC*、*ompA*、*iss*、*tsh*、*ompT*、*iroN* 等 9 种毒力基因, 并对 17 种药物呈不同程度的耐药性, 由此可见大肠杆菌耐药性现象十分严重<sup>[5]</sup>。此外, 越来越多的研究表明, 生物膜的形成与细菌的耐药性产生以及对机体持续感染有关<sup>[6-7]</sup>, 最近还发现生物膜的形成与膀胱癌有关<sup>[8]</sup>, 值

得引起关注和重视。

生物膜是由微生物组成的共生体, 处于其中的细胞会相互黏附并分泌产生胞外基质聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS), 水为其主要成分之一, 另外还包括胞外多糖、蛋白质、脂类和核酸<sup>[9]</sup>。生物膜可在生物或非生物表面形成, 也可在宿主细胞表面甚至是宿主细胞中形成。由于其具有三维结构且代表着微生物群落的生活方式, 被形象的比喻为“微生物的城市”。身处生物膜中的细菌可以共享营养物质, 抵抗宿主免疫系统和环境中有害因素的影响, 如干燥、抗生素等<sup>[10]</sup>。近年来, 许多引起人类和动物感染的大肠杆菌菌株都有形成生物膜的能力, 其中包括从儿童急性胃肠炎患者的粪便中分离到的致病性大肠杆菌<sup>[11]</sup>、从尿路感染患者的尿液中分离到的致病性大肠杆菌<sup>[12]</sup>、从儿童菌血症患者的血液中分离到的致病性大肠杆菌<sup>[13]</sup>、从禽致病性大肠杆菌病病例 (大肠败血症、蜂窝织炎、气囊病、腹膜炎、输卵管炎、脐炎和骨髓炎等) 中分离到的致病性大肠杆菌<sup>[14]</sup>以及从牛和猪粪便中分离到的致病性大肠杆菌等<sup>[15-16]</sup>。

环二鸟苷酸 (cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP) 是广泛存在于细菌中的第二信使, 在调节菌体生物膜形成过程中起到至关重要的作用。基于此, 本文对近些年来有关 c-di-GMP 对大肠杆菌生物膜形成过程中菌体的运动、黏附以及 EPS 产生机制的研究

进行了综述, 以期从 c-di-GMP 角度抑制大肠杆菌生物膜形成提供依据和思路。

## 1 大肠杆菌生物膜的形成

### 1.1 生物膜形成的过程

在大多数细菌的浮游-附着转变过程中, 生物膜的形成始于浮游微生物对生物和非生物表面的附着, 结束于成熟生物膜中菌体单个细胞或细胞簇的主动或被动扩散, 各种黏附因子、调控网络以及细胞外基质成分共同负责调控整个过程<sup>[17]</sup>。大肠杆菌可在各种环境中生存并形成生物膜, 例如营养稀少的水和土壤中<sup>[18-19]</sup>、肉制品中<sup>[7]</sup>以及新鲜农产品上<sup>[20]</sup>等。大肠杆菌在环境中形成生物膜的过程具体由以下几个步骤组成 (图 1): 浮游的大肠杆菌可逆地附着于生物或非生物表面彼此聚集并继续生长、菌体与表面发生不可逆附着形成微集落并且释放大量的胞外基质、生物膜完全成熟、单个细胞或细胞集落离开生物膜发生分散<sup>[21]</sup>。此外, 在生物或非生物表面形成的大肠杆菌生物膜会以各种方式被宿主摄入, 进而造成食源性感染。除在生物或非生物表面形成生物膜外, 致病性和共生性大肠杆菌还能在调节网络、粘附分子和细胞外基质调控下在胃肠道形成生物膜 (图 2)<sup>[22]</sup>。此外, 尿致病性大肠杆菌 (uropathogenic *E. coli*, UPEC) 甚至能在宿主细胞内形成生物膜, 其过程为 (图 3): 膀胱管腔中的浮游细胞通过与细

菌细胞表面的相关粘附素作用, 共同粘附在膀胱细胞上, 随后 UPEC 侵入膀胱细胞迅速增殖, 形成一个松散的复合体, 使膀胱中的细菌数量激增, 增加了 UPEC 菌株传播到其他部位并持续存在的机会, 在细菌感染后数小时, UPEC 菌株分化为平均长度为 2  $\mu\text{m}$  的异常杆状菌株, UPEC 菌株还能从尿路上皮细胞中分离出来并进入膀胱的管腔, 从而导致菌尿症, 此外还可侵入膀胱的其他细胞<sup>[23]</sup>。

### 1.2 生物膜形成的机制

大肠杆菌细胞的鞭毛运动性在宿主定殖及生物膜形成早期阶段起着重要的作用, 而在生物膜成熟阶段受到抑制<sup>[24]</sup>。浮游的菌体细胞在高水平的生物膜形成时表现出高水平的鞭毛运动性<sup>[25]</sup>, 并且受到小分子系统的调节, 如群体感应 (quorum sensing, QS) 信号分子<sup>[22]</sup>。

QS 是细菌通过分泌物信号 (自体诱导物) 进行交流的过程, 一旦诱导因子的浓度达到阈值, 信号就会被检测到, 进而造成基因表达水平的改变<sup>[26]</sup>。QS 具有多种多样的功能, 其中包括种群密度检测、毒力、应激反应维持以及生物膜形成<sup>[27]</sup>。大肠杆菌有多个 QS 通路, 其中一个是基于自诱导子 2 (autoinducer 2, AI-2) 的系统, 主要用于大肠杆菌在胃肠道内 (37  $^{\circ}\text{C}$ ) 的通信, 可增加菌体生物膜的形成; 另一个是基于吡啶的系统, 主要用于大肠杆菌在宿主之外 (30  $^{\circ}\text{C}$  或更低) 时的通信, 降低菌体生物膜的形成<sup>[28]</sup>。

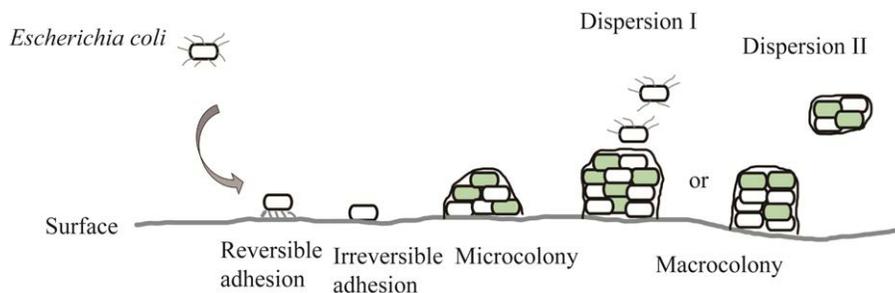


图 1 大肠杆菌在环境中生物被膜形成<sup>[21]</sup>

Figure 1 Biofilm formation of *Escherichia coli* in the environment<sup>[21]</sup>.

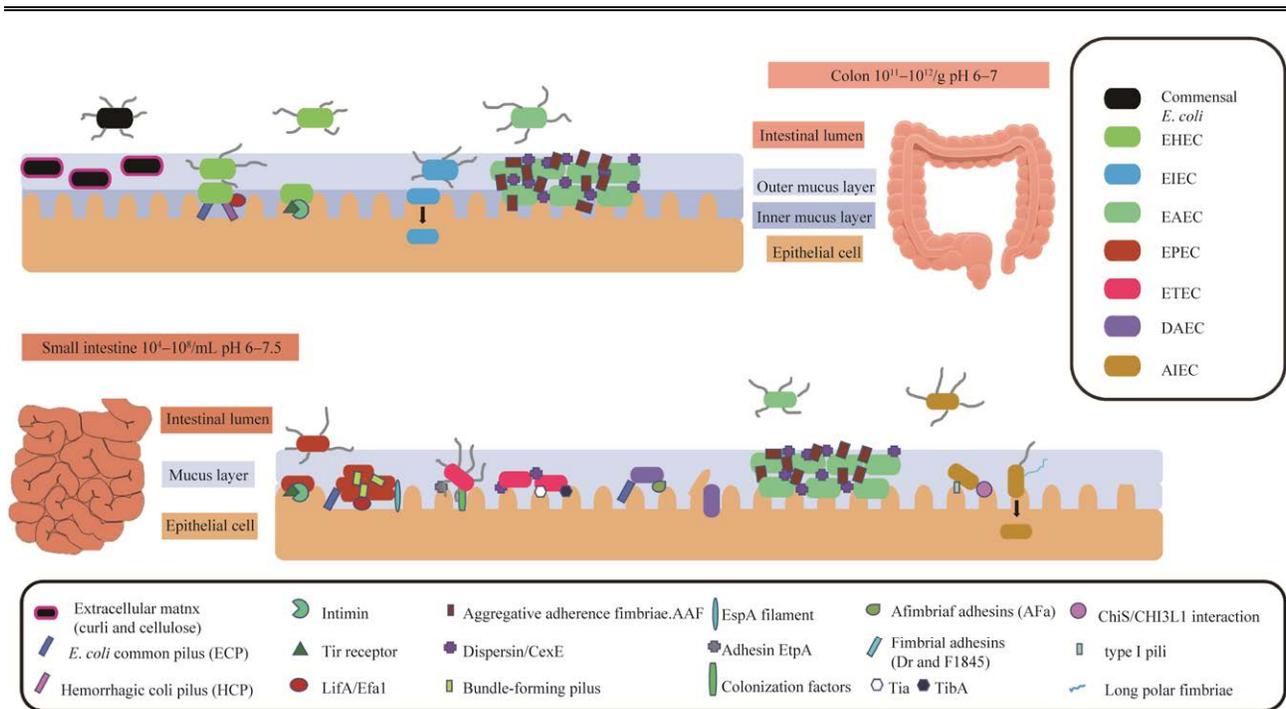


图 2 大肠杆菌在胃肠道中生物被膜形成<sup>[22]</sup>

Figure 2 Biofilm formation of *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract<sup>[22]</sup>.

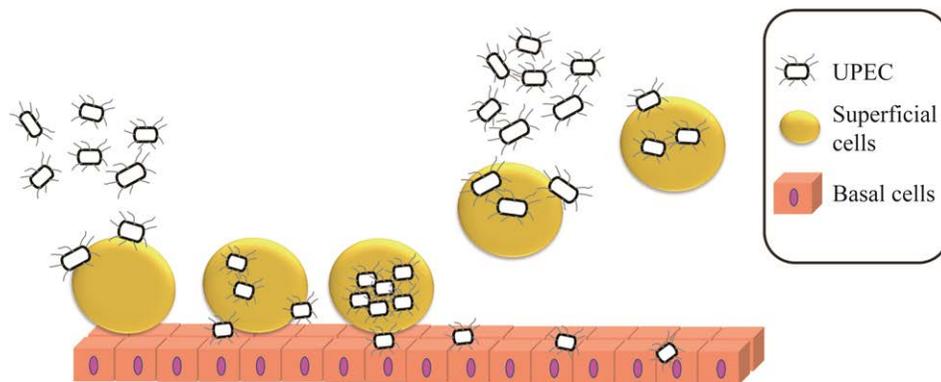


图 3 尿致病性大肠杆菌在膀胱细胞内生物被膜形成<sup>[23]</sup>

Figure 3 Intracellular biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli*<sup>[23]</sup>.

EPS 基质是生物膜成分中非常重要的部分, 而卷曲菌毛和纤维素是构成 EPS 基质的两个主要成分, 卷曲菌毛负责细胞的定殖以及生物膜的发育, 纤维素则是大肠杆菌在生物膜中分泌的主要胞外多糖之一, 生物膜的存在与纤维素生成息息相关<sup>[29]</sup>。卷曲菌毛是蛋白质类细

胞外纤维, 产生卷曲菌毛细菌的标志性表型是卷曲淀粉样纤维在含有刚果红的培养基上形成红色菌落<sup>[30]</sup>。

除以上介绍的相关机制外, 还有包括在菌体生物膜形成过程中起关键作用的各种黏附素、鞭毛、菌毛、两种胞外多糖 ( $\beta$ -1,6-N-乙酰

-D-葡糖胺聚合物、荚膜异多糖酸), 以及本文着重介绍的第二信使 c-di-GMP<sup>[21]</sup>。

## 2 c-di-GMP 的调控和分布特点

c-di-GMP 可在二鸟苷酸环化酶 (diguanylate cyclase, DGC) 的催化下, 由两分子的三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 环化而成。c-di-GMP 是一种在细菌中普遍存在的第二信使, 在细菌的生物膜形成、分化、运动等多种生物学过程中起着重要的调节作用<sup>[31]</sup>, 其调节方式为调控生物膜形成的相关基因, 或直接刺激细菌生物膜细胞外基质中胞外多糖的合成和分泌。菌体细胞内 c-di-GMP 水平由含 GGDEF 结构域的 DGCs 和含 EAL 或 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 调控<sup>[32]</sup>。c-di-GMP 在介导各种生物学功能时需先与相应的效应蛋白结合, 然后作用于其特定的下游靶点, 效应蛋白主要包括转录因子、核糖开关、GGDEF/EAL 结构域和 PILZ 结构域<sup>[33]</sup>。含特定信号传导结构的 DGCs 和 PDEs 可通过捕捉不同信号, 进而调控 c-di-GMP 浓度, 最终通过 c-di-GMP 进一步调控菌体相关的各种功能, 其中包括用于感受细胞膜的 MASE 膜相关感受结构域<sup>[34]</sup>; 用于感受环境信号变化的  $\gamma$ -变形菌纲细胞周质/胞外感受结构域和环化酶/组氨酸激酶相关的胞外感受结构域<sup>[35]</sup>; 用于调节 PDEs 酶活性的 CSS 基序结构域等<sup>[36]</sup>。目前的研究表明, 大肠杆菌模式菌株 K-12 含有 29 个 GGDEF/EAL 结构域蛋白, 包括 12 个 DGCs、13 个 PDEs 以及 4 种无酶活性蛋白, 研究人员对蛋白相互作用模式进行了系统性分析, 数据显示 c-di-GMP 信号比预期的要复杂得多, 调节机制为几个中枢控制器在一个复杂的分层蛋白质网络中互作, 而非简单的几个并行工作的小模块<sup>[37-38]</sup>。

## 3 c-di-GMP 对大肠杆菌生物膜的调控

### 3.1 c-di-GMP 对运动的调控

大肠杆菌的运动性依赖于鞭毛马达(基底部)、鞭毛丝以及鞭毛钩的参与, 具有环状结构和转动轴的鞭毛马达由转子蛋白 (FliG、FliM 和 FliN) 和定子蛋白 (MotA 和 MotB) 构成, 通过两种蛋白的互作产生动力, 使鞭毛以逆时针方向旋转 (counterclockwise, CCW) 而运动<sup>[39-40]</sup>。在大多数细菌的浮游-附着转变过程中, c-di-GMP 起到关键的调控作用, 高水平 c-di-GMP 促进表面附着及生物膜形成, 而低水平有利于菌体移动<sup>[33]</sup>。在大肠杆菌中, 含有 PilZ 结构域的鞭毛制动蛋白 YcgR 作为 c-di-GMP 的效应物, 当菌体细胞处于高 c-di-GMP 水平时, 鞭毛制动蛋白 YcgR 会与鞭毛转子蛋白产生相互作用, 从而影响鞭毛的正常运转状态, 通过促进表面附着参与生物膜的形成<sup>[41]</sup>。

到目前为止, 已经报道了马达内的几个靶蛋白, 包括 MotA、FliG 和 FliM, 以及它们各自不同的调控机制。Paul 等<sup>[42]</sup>研究发现, 在 c-di-GMP 存在下, YcgR 与 FliG 和 FliM 相互作用最强, 这种相互作用降低了 FliG C-末端结构域与 MotA 相互作用而产生扭矩力的效率, 并导致了 CCW 的偏置。Fang 等<sup>[43]</sup>基于免疫共沉淀、双杂交和突变分析得出, 大肠杆菌 c-di-GMP 受体 YcgR 与鞭毛开关复合体的 FliG 亚基结合, c-di-GMP 增强了 YcgR-FliG 的相互作用。FliG 的中心片段既与 FliM 结合又与 YcgR 结合, 表明 YcgR-c-di-GMP 通过改变 FliG-FliM 相互作用而偏向鞭毛旋转, 这种相互作用需要 YcgR 的 N 端 YcgR/PilZ 结构域的参与。

这些研究极大地提高了研究人员对 c-di-GMP 调节鞭毛运动的认识, Hou 等<sup>[44]</sup>以 YcgR 如何作用于这些靶蛋白继续展开研究, 发

现被激活的 YcgR 在 MotA-FliG 界面稳定地与 MotA 结合,从而调节细菌的游动。生化和结构分析显示, c-di-GMP 重排了 PilZ 结构域, 形成了一个由 RXXXXR 基序和 C 端  $\alpha 3$  螺旋组成的 MotA 结合片。此外还发现, 运动调节还依赖于 YcgR-N 结构域中的一个与 MotA 相互作用无关的保守区域。由此推断出, YcgR-N 结构域是其他运动蛋白活动所必需的, 激活的 YcgR 通过其 PilZ 结构域结合到 MotA 上, 从而中断 MotA 和 FliG 相互作用, 同时通过 YcgR-N 结构域与其他运动蛋白相互作用, 抑制鞭毛运动 (图 4), 促进表面附着及生物膜的形成。此种 YcgR 与运动蛋白相互作用的模式, 可能为其他 PilZ 家族蛋白所共有。该研究为进一步探究 YcgR 介导的鞭毛运动奠定了基础, 并为研究其他 PilZ 蛋白提供了新的线索。

### 3.2 c-di-GMP 对附着的调控

生物膜的形成是一个渐进的过程, 菌体对生物或非生物表面的识别和附着是第一步, 当浮游细菌细胞从液体向生物或非生物表面运动时, 可以感知到 3 种不同的信号: 理化性质的变化、细胞附属物的附着和细胞体的附着, 为了感知 pH、离子强度、渗透压和养分利用率的变化, 细菌通常采用由膜结合的组氨酸激酶 (感受刺激) 和细胞质反应调节因子 (介导细胞

反应) 组成的双组分信号转导系统, 对这些信号作出反应的多个系统具有与生物膜形成相关的下游靶基因, 在大肠杆菌中, 感知理化特性并具有下游靶在生物膜形成中起作用的系统是 EnvZ/OmpR、RcsCDB, 可能还有 BasSR<sup>[45]</sup>。当细菌接近表面时, 细胞附属物就会附着在生物或非生物表面上, 粘附是由鞭毛支持的, 由于其疏水的性质, 粘附疏水表面效果更强, 此外菌毛也附着在生物或非生物表面并支持生物膜的形成<sup>[46]</sup>。除了通过细胞附属物附着于生物或非生物表面外, 细胞体也可通过自身的机制附着于生物或非生物表面<sup>[47]</sup>。

总的来说, 从浮游的生活方式转变为固定的附着状态是一个由细菌所处的环境和附着表面, 以及细菌细胞的生物、化学和物理性质共同决定的过程<sup>[47]</sup>。Suchanek 等<sup>[48]</sup>分析了大肠杆菌在非生物和仿生甘露糖表面附着过程中受趋化途径和 c-di-GMP 的影响, 发现在没有 c-di-GMP 信号的情况下, 可以增强菌毛介导的大肠杆菌的表面附着作用; 敲除 c-di-GMP 依赖的 YcgR 或 DgcE 的基因可进一步增强附着力。这些结果表明, c-di-GMP 对大肠杆菌的表面附着有负调节作用, 低水平的 c-di-GMP 和低活性的趋化途径协同促进大肠杆菌的表面附着。

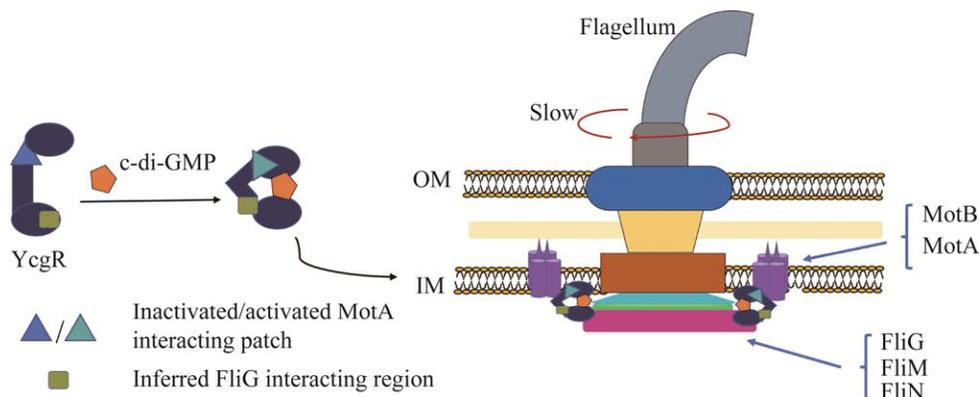


图 4 c-di-GMP 调节 YcgR 介导的鞭毛制动行为的模型<sup>[44]</sup>

Figure 4 The proposed model of c-di-GMP regulating the YcgR-mediated flagella brake behavior<sup>[44]</sup>.

为了有效地附着在不同的生物或非生物表面上,大肠杆菌会利用鞭毛作为粘附的结构成分,并在表面附着过程中调节鞭毛的活动,鞭毛速度由 c-di-GMP 通过 YcgR 控制,与 c-di-GMP 结合后, YcgR 会与鞭毛马达相互作用,导致旋转速度减慢<sup>[41]</sup>。除此之外,胞外多聚  $\beta$ -1,6-N-乙酰氨基葡萄糖 (poly- $\beta$ -1,6-N-acetylglucosamine, PGA) 是大肠杆菌附着的另一个重要因素<sup>[49]</sup>。PGA 的产生由 PgaABCD 复合体介导,受 c-di-GMP 调控<sup>[50]</sup>。DgcZ 是 c-di-GMP 产生的 DGCs 之一,主要负责控制 PGA 的生物合成。目前已经对 DgcZ 复杂的调控机制进行了初步的研究,例如 DgcZ 转录受 CpxR 的调控<sup>[51]</sup>,DgcZ 除含特有的 GGDEF 结构域外,还具有锌结合结构域 (CZB),活性受  $Zn^{2+}$  的调节等<sup>[52]</sup>。为探究 DgcZ 主要作用以及蛋白活性所需生理条件, Lacanna 等<sup>[53]</sup> 继续开展研究,发现 DgcZ 可通过抑制 CpxR 的突变和促进 NlpE 的过表达来形成生物膜,免疫共沉淀数据和细菌双杂交实验都显示了 DgcZ 在表面附着调控中的重要作用。该研究加深了科研人员对 DgcZ 主要功能的认识,并且阐释了表面感知和附着在生物膜形成过程中共同调控的重要性,为今后有关 DgcZ 的研究奠定了基础。

### 3.3 c-di-GMP 对生物被膜形成过程中 EPS 的调控

c-di-GMP 在大肠杆菌中的另一个生物学功能是调控生物膜形成过程中 EPS 的产生,其中包括淀粉样纤维素和磷乙醇胺纤维素<sup>[54]</sup>等, EPS 的产生通常发生在已进入稳定期缓慢生长的细菌细胞中,并受到转录因子级联的控制。

DgcE 是大肠杆菌中产生 c-di-GMP 的 12 种 DGCs 之一,具有 6 个复杂的结构域,先前已被证明参与生物膜胞外基质的产生<sup>[55]</sup>。Pfiiffer 等<sup>[34]</sup>以 DgcE 本身的信号调控机制继续展开研

究,发现 DgcE 的活性由一种新型的 GTPase 所调控,它直接与 DgcE 的 N 端膜固有的 MASE1 结构域相互作用。这种 MASE1 结构域具有对 DgcE 激活和持续蛋白水解的双重功能,GTPase 系统的信号表明,DgcE 在进入稳定期时,细胞 GTP 水平的下降可能会刺激 c-di-GMP 的产生,而稳定期正是生物膜基质开始产生的时期。该研究揭示了一个新的 GTP/c-di-GMP 连接信号通路。

在包括大肠杆菌在内的革兰氏阴性细菌中,细菌纤维素的分泌还需要内膜、c-di-GMP 依赖的合成酶、外膜孔蛋白(BcsC),以及调节合成酶组装和功能的各种附属亚基以及胞外多糖的化学成分和机械作用<sup>[56]</sup>。Krasteva 等<sup>[57]</sup>的研究表明,大肠杆菌具有复杂的 Bcs 分泌系统,BcsF 和胞浆 BcsERQ 组分均能稳定地与 BcsAB 内膜形成 Bcs 复合物。Zouhir 等<sup>[58]</sup>基于 Bcs 复合物对其单个调控成分的作用和结构展开更加深入的研究,确定了分泌纤维素的关键成分为 BcsR 和 BcsQ,二者相互作用决定彼此的折叠性和稳定性,并通过 c-di-GMP 感应 BcsE 及其操纵子内伴侣 BcsF,并聚集到内膜;晶体学和功能数据显示,BcsE 具有特殊的结构域,能在多个水平上调节细菌纤维素的产生,这项工作为更全面地模拟细菌生物膜中多糖分泌的机制奠定了重要的基础。

## 4 总结与展望

目前,我国动物源细菌耐药现象非常普遍,多重耐药甚至泛耐药的菌株不断出现严重威胁着我国以及全球的公共健康,细菌耐药性已逐渐成为现代医学和制药企业面临的最大问题<sup>[59-60]</sup>。耐药性的产生是一个多因素造就的结果,包括人为的抗生素的大量滥用以及细菌自身应激反应和生理代谢的调节等<sup>[61]</sup>。而菌体生物膜的形

成同样也在细菌耐药性的产生上起到不同程度的作用<sup>[8]</sup>。大肠杆菌生物膜是菌体细胞为抵御外界不利因素影响而形成的保护措施，一旦细菌聚集且形成生物膜，将对抗菌剂具有极高的耐受性，难以彻底清除。除了极大地影响医疗外，还给工业、食品加工行业、水产养殖等造成困扰。生物膜的形成受诸多因素的影响，且受到复杂调控网络的控制。其中，第二信使 c-di-GMP 在生物膜形成过程中发挥着重要的作用。现在的研究已表明 c-di-GMP 在大肠杆菌生物膜形成过程中负责调控菌体运动、附着以及胞外基质聚合物的分泌等。c-di-GMP 对菌体生物膜的调控发生在早期的附着阶段，通常在前期展开针对性处理都是最有效的，因此以该机制为基础而研究的药物和清除方案，将在很大程度上抑制生物膜的产生。虽然 c-di-GMP 具有复杂的调控网络，但现如今也仅发现一部分在大肠杆菌生物膜调控过程中发挥作用的机制，未来将需要更多相关机制的研究和阐明。此外，有关 c-di-GMP 的研究依旧在进行中，越来越多的相关信号机制将被发现，随着信号机制调节的表型被阐明，并且各表型对细菌生理的具体调控被研究透彻，在未来会有更多有关细菌信号通路的新发现，以这些通路而设计的药靶将会成为抵抗细菌感染和生物膜危害的有利武器。

## REFERENCES

- [1] Reisner A, Maierl M, Jörger M, et al. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2014, 196(5): 931-939.
- [2] Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1): 26-38.
- [3] Carter MQ, Feng D, Li HH. Curli fimbriae confer shiga toxin-producing *Escherichia coli* a competitive trait in mixed biofilms. *Food Microbiol*, 2019, 82: 482-488.
- [4] Carter MQ, Louie JW, Feng D, et al. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol*, 2016, 57: 81-89.
- [5] 张玲艳, 宋丽丽, 贾伟娟, 等. 一株鸭源大肠埃希菌的分离鉴定及毒力基因的检测. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(2): 152-157, 163.  
Zhang LY, Song LL, Jia WJ, et al. Isolation and identification of a duck *Escherichia coli* strain and detection of virulence genes. *J Pathog Biol*, 2020, 15(2): 152-157, 163 (in Chinese).
- [6] Chen XP, Ali L, Wu LY, et al. Biofilm formation plays a role in the formation of multidrug-resistant *Escherichia coli* toward nutrients in microcosm experiments. *Front Microbiol*, 2018, 9: 367.
- [7] Kim HJ, Oh T, Baek SY. Multidrug resistance, biofilm formation, and virulence of *Escherichia coli* isolates from commercial meat and vegetable products. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 15(12): 782-789.
- [8] Nadler N, Kvich L, Bjarnsholt T, et al. The discovery of bacterial biofilm in patients with muscle invasive bladder cancer. *APMIS*, 2021, 129(5): 265-270.
- [9] Kavanaugh JS, Flack CE, Lister J, et al. Identification of extracellular DNA-binding proteins in the biofilm matrix. *mBio*, 2019, 10(3): e01137- e01119.
- [10] Wang Y, Reardon CP, Read N, et al. Attachment and antibiotic response of early-stage biofilms studied using resonant hyperspectral imaging. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2020, 6(1): 57.
- [11] Rodrigues RS, Lima NCDS, Tabora RLM, et al. Antibiotic resistance and biofilm formation in children with Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Brazilian Amazon. *J Infect Dev Ctries*, 2019, 13(8): 698-705.
- [12] Miranda-Estrada LI, Ruíz-Rosas M, Molina-López J, et al. Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2017, 35(7): 426-433.
- [13] Riveros M, García W, García C, et al. Molecular and phenotypic characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from bacteremic children. *Am J Trop Med Hyg*, 2017, 97(5): 1329-1336.
- [14] Newman DM, Barbieri NL, De Oliveira AL, et al. Characterizing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from colibacillosis cases, 2018. *PeerJ*, 2021, 9: e11025.
- [15] Bumunang EW, McAllister TA, Zaheer R, et al. Characterization of non-O157 *Escherichia coli* from cattle faecal samples in the north-west province of South Africa.

- Microorganisms, 2019, 7(8): 272.
- [16] Barilli E, Vismarra A, Villa Z, et al. ESβL *E. coli* isolated in pig's chain: genetic analysis associated to the phenotype and biofilm synthesis evaluation. *Int J Food Microbiol*, 2019, 289: 162-167.
- [17] Hartmann R, Singh PK, Pearce P, et al. Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms. *Nat Phys*, 2019, 15(3): 251-256.
- [18] Moreira S, Brown A, Ha R, et al. Persistence of *Escherichia coli* in freshwater periphyton: biofilm-forming capacity as a selective advantage. *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 79(3): 608-618.
- [19] Ahmed D, Islam MS, Begum YA, et al. Presence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in biofilms formed in water containers in poor households coincides with epidemic seasons in Dhaka. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(4): 1223-1229.
- [20] Verma P, Saharan VV, Nimesh S, et al. Phenotypic and virulence traits of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from vegetables and fruits from India. *J Appl Microbiol*, 2018, 125(1): 270-281.
- [21] Sharma G, Sharma S, Sharma P, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(2): 309-319.
- [22] Rossi E, Cimmins A, Luthje P, et al. "It's a gut feeling"-*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol*, 2018, 44(1): 1-30.
- [23] Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Sholeh M, et al. The importance of intracellular bacterial biofilm in infectious diseases. *Microb Pathog*, 2020, 147: 104393.
- [24] Liu F, Fu JY, Liu CY, et al. Characterization and distinction of two flagellar systems in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* PCN<sub>033</sub>. *Microbiol Res*, 2017, 196: 69-79.
- [25] Horne SM, Saylor J, Scarberry N, et al. Spontaneous mutations in the *flhD* operon generate motility heterogeneity in *Escherichia coli* biofilm. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 262.
- [26] Muras A, Mayer C, Otero-Casal P, et al. Short-chain N-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules promote periodontal pathogens in *in vitro* oral biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(3): e01941- e01919.
- [27] García-Contreras R, Nuñez-López L, Jasso-Chávez R, et al. Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *ISME J*, 2015, 9(1): 115-125.
- [28] Song S, Wood TK. The primary physiological roles of autoinducer 2 in *Escherichia coli* are chemotaxis and biofilm formation. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 386.
- [29] Nair MS, Upadhyay A, Fancher S, et al. Inhibition and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by selenium. *J Food Prot*, 2018, 81(6): 926-933.
- [30] Kan A, Birnbaum DP, Praveschotinunt P, et al. Congo red fluorescence for rapid *in situ* characterization of synthetic curli systems. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(13): e00434- e00419.
- [31] Foletti C, Kramer RA, Mauser H, et al. Functionalized proline-rich peptides bind the bacterial second messenger c-di-GMP. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(26): 7729-7733.
- [32] Kazmierczak BI. Synthesis of [<sup>32</sup>P]-c-di-GMP for diguanylate cyclase and phosphodiesterase activity determinations. *Methods Mol Biol*, 2017, 1657: 23-29.
- [33] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5): 271-284.
- [34] Pfiffer V, Sarenko O, Possling A, et al. Genetic dissection of *Escherichia coli*'s master diguanylate cyclase DgcE: role of the N-terminal MASE1 domain and direct signal input from a GTPase partner system. *PLoS Genet*, 2019, 15(4): e1008059.
- [35] Hengge R, Galperin MY, Ghigo JM, et al. Systematic nomenclature for GGDEF and EAL domain-containing cyclic di-GMP turnover proteins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2015, 198(1): 7-11.
- [36] Herbst S, Lorkowski M, Sarenko O, et al. Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase. *EMBO J*, 2018, 37(8): e97825.
- [37] Povolotsky TL, Hengge R. Genome-based comparison of cyclic di-GMP signaling in pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol*, 2015, 198(1): 111-126.
- [38] Sarenko O, Klauck G, Wilke FM, et al. More than enzymes that make or break cyclic di-GMP-local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of *Escherichia coli*. *mBio*, 2017, 8(5): e01639-e01617.
- [39] Wang FB, Burrage AM, Postel S, et al. A structural model of flagellar filament switching across multiple bacterial species. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 960.
- [40] Laganenka L, López ME, Colin R, et al. Flagellum-mediated mechanosensing and RflP control motility state of pathogenic *Escherichia coli*. *mBio*, 2020, 11(2): e02269-e02219.
- [41] Boehm A, Kaiser M, Li H, et al. Second

- messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, 2010, 141(1): 107-116.
- [42] Paul K, Nieto V, Carlquist WC, et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Mol Cell*, 2010, 38(1): 128-139.
- [43] Fang X, Gomelsky M. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol*, 2010, 76(5): 1295-1305.
- [44] Hou YJ, Yang WS, Hong Y, et al. Structural insights into the mechanism of c-di-GMP-bound YcgR regulating flagellar motility in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2020, 295(3): 808-821.
- [45] Kimkes TEP, Heinemann M. How bacteria recognise and respond to surface contact. *FEMS Microbiol Rev*, 2020, 44(1): 106-122.
- [46] Yoshihara A, Nobuhira N, Narahara H, et al. Estimation of the adhesive force distribution for the flagellar adhesion of *Escherichia coli* on a glass surface. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 131: 67-72.
- [47] Berne C, Ellison CK, Ducret A, et al. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(10): 616-627.
- [48] Suchanek VM, Esteban-López M, Colin R, et al. Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2020, 113(4): 728-739.
- [49] Agladze K, Wang X, Romeo T. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol*. 2005, 187(24): 8237-8246.
- [50] Steiner S, Lori C, Boehm A, et al. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *EMBO J*, 2013, 32(3): 354-368.
- [51] Raivio TL, Leblanc SKD, Price NL. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *J Bacteriol*, 2013, 195(12): 2755-2767.
- [52] Zähringer F, Lacanna E, Jenal U, et al. Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure*, 2013, 21(7): 1149-1157.
- [53] Lacanna E, Bigosch C, Kaefer V, et al. Evidence for *Escherichia coli* diguanylate cyclase DgcZ interlinking surface sensing and adhesion via multiple regulatory routes. *J Bacteriol*, 2016, 198(18): 2524-2535.
- [54] Thongsomboon W, Serra DO, Possling A, et al. Phosphoethanolamine cellulose: a naturally produced chemically modified cellulose. *Science*, 2018, 359(6373): 334-338.
- [55] Hengge R. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1707): 20150498.
- [56] McNamara JT, Morgan JLW, Zimmer J. A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 895-921.
- [57] Krasteva PV, Bernal-Bayard J, Travier L, et al. Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2065.
- [58] Zouhir S, Abidi W, Caleechurn M, et al. Structure and multitasking of the c-di-GMP-sensing cellulose secretion regulator BcsE. *mBio*, 2020, 11(4): e01303-e01320.
- [59] 孙坚, 刘雅红, 冯友军. 动物源细菌耐药性研究现状与对策. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1246-1258.  
Sun J, Liu YH, Feng YJ. Towards understanding antibiotic resistance in animals-borne bacterial pathogens. *Chin J Biotech*, 2018, 34(8): 1246-1258 (in Chinese).
- [60] 尹业师, 陈华海, 曹林艳, 等. 细菌耐药性应对策略研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1346-1360.  
Yin YS, Chen HH, Cao LY, et al. Progress in strategies to combat antimicrobial resistance. *Chin J Biotech*, 2018, 34(8): 1346-1360 (in Chinese).
- [61] 黄璐璐, 谷宇锋, 吴翠蓉, 等. 细菌的应激反应和生理代谢与耐药性及其控制策略. *生物工程学报*, 2020, 36(11): 2287-2297.  
Huang LL, Gu YF, Wu CR, et al. Bacterial stress response, physiological metabolism and antimicrobial tolerance and the control strategies. *Chin J Biotech*, 2020, 36(11): 2287-2297 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)