DOI:10.16016/j.2097-0927.202311040

类鼻疽伯克霍尔德菌Ⅵ型分泌系统的 Hcp1 蛋白转位介导多核巨细胞形成

吴 潘[1],饶承龙[1],南栋琪[1],陈建高[1],张子元[1],刘文正[1],王民洋[1],闫晶敏[1],李 倩[1,2],毛旭虎[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室[1],创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨类鼻疽伯克霍尔德菌Ⅵ型分泌系统溶血素共调节蛋白 1(hemolysin coregulatory protein 1, Hcp1)在感染宿主细胞引起多核巨细胞(multinucleated giant cells, MNGC)形成的作用及机制。**方法** 分别采用同源重组和质粒回补技术构建类鼻疽菌 *hcp*1 基因缺失株(BPC006 Δ*hcp*1)和缺失回补株(BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1);分别用类鼻疽菌 BPC006 野生株、BPC006 Δ*hcp*1 和 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 感染 RAW264.7 细胞,通过激光共聚焦分析 Hcp1 蛋白的定位情况;在 293T 细胞中转染 Hcp1 真核表达载体后进行细胞质膜分离进一步验证定位情况;在细胞感染模型上,通过吉姆萨染色检测抗 Hcp1 多克隆抗体封闭对 MNGC 形成的影响,探究 Hcp1 在类鼻疽菌感染导致的 MNGC 形成中的作用和生物学意义。**结果** Western blot 检测结果显示 BPC006 Δ*hcp*1 不表达 Hcp1 蛋白,而 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 能恢复 Hcp1 蛋白的表达,成功构建类鼻疽菌 BPC006 Δ*hcp*1 和 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1。细胞免疫荧光共定位实验和质膜分离实验都表明 Hcp1 可以定位在宿主细胞膜上,且相较于对照组抗 Hcp1 多克隆抗体能抑制类鼻疽菌感染所诱导的 MNGC 形成($P<0.01$)。**结论** 类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞时 Hcp1 可转位至细胞膜,并在 MNGC 形成中发挥重要作用。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德菌;Hcp1;多核巨细胞;基因缺失与回补
[中图法分类号] R378.99; R392.11; R392.3 [文献标志码] A

Translocation of Hcp1 protein in type Ⅵ secretion system of *Burkholderia pseudomallei* mediates formation of multinucleated giant cells

WU Pan[1], RAO Chenglong[1], NAN Dongqi[1], CHEN Jiangao[1], ZHANG Ziyuan[1], LIU Wenzheng[1], WANG Minyang[1], YAN Jingmin[1], LI Qian[1,2], MAO Xuhu[1,2] [1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory, [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the mechanism that Hcp1 protein in type Ⅵ secretion system of *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) mediates the formation of multinucleated giant cells (MNGCs) when host cells are infected by the bacterium. **Methods** The mutant strain (BPC006 Δ*hcp*1) and complementation strain (BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1) were constructed by homologous recombination and plasmid complement technology, respectively. After RAW264.7 cells were infected with *B. pseudomallei*, the localization of Hcp1 in host cells was analyzed by immunofluorescence staining. The localization was further verified by cytoplasmic-membrane isolation in 293T cells after transfecting pCDNA4.1-Hcp1. The biological significance and effect of Hcp1 were explored by the anti-Hcp1 polyclonal antibody blocking and the formation of MNGC was detected by Giemsa staining. **Results** Western blotting showed that BPC006 Δ*hcp*1 could not express Hcp1, while BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 restored Hcp1 expression. The above results proved that the mutant and complement strains were successfully constructed. Both cellular immunofluorescence co-localization

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82272350)
[通信作者] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and cytoplasmic-membrane isolation experiments showed that Hcp1 localized to host cell membranes. Last but not least, compared with the control group, anti-Hcp1 polyclonal antibodies inhibited the formation of MNGC ($P<0.01$). **Conclusion** Hcp1 protein in type Ⅵ secretion system of *B. pseudomallei* is able to translocate to the RAW264.7 cell membranes and plays an important role in the formation of MNGCs.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; Hcp1; multinuclear giant cells; gene knockout and complementation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82272350). Corresponding author: MAO Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

类鼻疽(melioidosis)作为一种正在扩散的人畜共患传染病,主要流行于东南亚、澳大利亚北部,以及我国广东、海南、香港和台湾等地区[1-2]。临床常表现为肺部炎症及多器官脓肿,严重感染时易发展为败血症、脓毒血症,危及患者生命,其病死率可高达20%~60%[3]。不典型的临床症状常导致类鼻疽的误诊和漏诊,延误患者的治疗时机[4]。除此之外,随着全球变暖和日益频繁的国际交往,类鼻疽正呈现一种全球扩散趋势,故加强类鼻疽的防治迫在眉睫。

研究类鼻疽的发病机制对其防治至关重要。类鼻疽由类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,BP)感染引起。该菌亦被称之为类鼻疽菌,是一种革兰阴性胞内菌,呈短球杆状,两端钝圆,不形成荚膜和芽胞,一端有3根以上鞭毛,运动能力强。主要存在于水和土壤中,极易通过破溃皮肤黏膜、消化道和呼吸道等方式传播感染,引发类鼻疽[5]。研究表明,类鼻疽菌的一些毒力因子在其致病过程中发挥重要作用,如荚膜多糖、脂多糖、Ⅲ型分泌系统、Ⅵ型分泌系统(type Ⅵ secretion system, T6SS)、菌毛等。其中研究人员发现以溶血素共调节蛋白1(hemolysin coregulatory protein 1, Hcp1)为代表的T6SS介导宿主细胞形成多核巨细胞(multinucleated giant cells, MNGC)后导致该菌在宿主体内的快速播散,这可能是类鼻疽进展迅速的主要原因之一[6],但其介导MNGC形成的机制尚不明确。本研究首先拟利用同源重组技术构建类鼻疽菌BPC006 Δ*hcp*1,同时通过质粒回补的方式构建BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1。然后利用上述缺失株、缺失回补株及野生株感染RAW264.7细胞模型观察Hcp1在类鼻疽的定位特点,并通过抗Hcp1多克隆抗体封闭,探讨Hcp1转位对MNGC形成的影响,以期进一步阐释类鼻疽菌Hcp1介导MNGC形成的作用机制,为揭示类鼻疽菌在宿主体内的快速播散机制提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞 类鼻疽伯克霍尔德菌BPC006[7],自杀性质粒pK18mobSacB,真核表达载体pCDNA4.1、pCDNA4.1-Hcp1、pCDNA4.1-Tir,大肠埃希菌感受态BL21(DE3),小鼠巨噬细胞RAW264.7(ATCC:TIB-71)由本实验室保存;大肠埃希菌S17-1λpir由陆军军医大学基础医学院微生物学教研室馈赠;回补质粒pMLS7[8]由中国农业科学院烟草研究所王晓强教授馈赠。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA薄层快速回收试剂盒、氨苄霉素、硫酸卡那霉素、甲氧苄啶霉素购自北京天根生物;*Eco*RⅠ、*Hin*dⅢ和*Xba*Ⅰ限制性内切酶、DNA聚合酶、T4连接酶、DNA Marker和蛋白Marker购自北京宝日生物(TaKaRa);吉姆萨染色试剂盒和infusion连接酶购自上海生工生物;兔抗GAPDH多克隆抗体、HRP标记抗兔IgG抗体、兔抗DnaK抗体、山羊抗兔荧光标记二抗Alexa Flour 488、山羊抗鼠荧光标记二抗Alexa Flour 594、DAPI、Lip3000转染试剂购自Thermo Fisher;细胞质膜分离试剂盒购自Invent;小鼠抗Na^+/K^+-ATPase单克隆抗体购自Santa Cruz;兔抗Hcp1多克隆抗体和兔对照血清由本实验室制备和保存[9]。

1.2 方法

1.2.1 PCR引物的设计和合成 根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中类鼻疽菌BPC006全基因组序列中的*hcp*1基因序列及其上下游序列,并综合对应质粒的多克隆位点,利用Primer Premier 5.0软件设计所用引物(表1),各引物均由深圳华大基因公司合成。引物中下划线部分为酶切位点。

1.2.2 BPC006 Δ*hcp*1的构建 利用同源重组的方法构建缺失株BPC006 Δ*hcp*1。用引物up-F/up-R从BPC006菌株的基因组中扩增*hcp*1基因的上游片段(802 bp),用down-F/down-R从BPC006菌株的基因组中扩增*hcp*1基因的下游片段(550 bp),缺失菌株的具体构建方法参考文献[10]。

表 1 PCR 引物及序列

引物名称	序列(5′→3′)	扩增片段	产物长度
up	正向:TGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGTGACCGATCTGCCGCTCTAC 反向:CCCGCGACGATTCGCGATCAGCCATTCTGAGATATATTCCGGCCAGCATG	*hcp*1 上游序列	802 bp
*hcp*1	正向:GCTCTAGAATGCTGGCCGGAATATATCTCAAGGTCAAAGG 反向:CCAAGCTTTCAGCCATTCGTCCAGTTTGCGGC	*hcp*1	510 bp
down	正向:GCGCCATGCTGGCCGGAATATATCTCAGAATGGCTGATCGCGAATCGTCG 反向:AAACAGCTATGACATGATTACGAATTCAGGCGAACGAGCTCGTCCTCG	*hcp*1 下游序列	550 bp

划线部分为酶切位点

1.2.3 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 的构建 用引物 *hcp*1-F/*hcp*1-R 从 BPC006 菌株的基因组中扩增 *hcp*1 基因全长,通过琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收该基因片段后备用。将回收的 *hcp*1 基因片段和回补载体 pMLS7 分别用 *Hin*d Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切后用 T4 连接酶进行连接,构建以伯克霍尔德菌 P_{S7} 为启动子的重组质粒 pMLS7-*hcp*1。然后将重组的质粒通过细菌间接合的方式导入到 BPC006 缺失株 Δ*hcp*1 中利用含有甲氧苄啶抗性的 LB 平板初步筛选阳性克隆,之后利用 PCR 进一步鉴定出含有 *hcp*1 基因的菌株,即得 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1。

1.2.4 蛋白质免疫印迹验证 *hcp*1 基因的缺失与回补 将在液体培养基中大量扩增的类鼻疽菌 BPC006 野生株、BPC006 Δ*hcp*1 和 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 菌液离心后弃上清,加入适量含有蛋白酶抑制剂 PMSF 的蛋白裂解液(RIPA),4 ℃超声后离心取上清即为所制备的细菌蛋白样品。利用 BCA 法进行蛋白定量之后加入适量的上样缓冲液,然后用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,湿转法转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,兔抗 Hcp1 多克隆抗体 1∶1 000 稀释后 4 ℃摇床孵育过夜,次日 TBST 缓冲液将膜洗涤 3 次后,用山羊抗兔二抗(1∶1 000 稀释)室温孵育 1 h,用 TBST 洗涤 3 次后用化学发光液曝光。

1.2.5 免疫细胞化学染色法检测 Hcp1 的定位特征 将分别感染类鼻疽菌 BPC006 野生株、BPC006 Δ*hcp*1 株和 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 的细胞爬片在 4%多聚甲醛中室温固定 10 min 后用 0.3% Triton-X100 溶液透膜 10 min。透膜后 PBS 清洗 3 遍,然后将一抗(兔抗 Hcp1 多克隆抗体或小鼠抗 Na^+/K^+-ATPase 单克隆抗体)按一定比例稀释后 4 ℃孵育过夜。次日将孵育完一抗的爬片用 PBS 清洗 3 遍后将对应属源的荧光二抗以 1∶2 000 稀释于 1% BSA 溶液中,室温避光孵育 1 h 后用 PBS 清洗 3 遍。将 DAPI 以 1∶2 000 稀释后室温避光孵育 30 min,PBS 清洗 3 遍后用荧光防淬灭剂封片,待上机观察。

1.2.6 质膜分离蛋白免疫印迹验证 Hcp1 的定位特征 将 293T 细胞以 1×10^6 个/孔铺板至 6 cm 细胞培养皿中,37 ℃,5% CO_2 培养过夜。利用 Lip3000 转染试剂分别将 3 种真核表达载体 pCDNA4.1、pCDNA4.1-Hcp1、pCDNA4.1-Tir 转染进 293T 细胞中,24 h 后利用 Invent 公司质膜分离试剂盒分别提取细胞的胞浆和细胞膜部分蛋白质。已有文献报道 Tir 蛋白是一种定位在宿主细胞膜上的大肠埃希菌效应蛋白[11],在本实验中将该蛋白作为阳性对照组。然后通过 Western blot 实验检测 Hcp1 蛋白的定位情况,方法同前[12],分别以 Na^+/K^+-ATPase 蛋白和 GAPDH 蛋白作为细胞膜和细胞浆的内参蛋白。

1.2.7 吉姆萨染色检测 MNGC 的形成 将 RAW264.7 细胞以 5×10^4 个/孔铺板至 24 孔板中,37 ℃,5%CO_2 培养过夜。同时将类鼻疽菌 BPC006 野生株、BPC006 Δ*hcp*1 和 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 接种于 5 mL LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 过夜培养。将处于对数生长期的类鼻疽菌以 10 的感染复数(MOI=10)感染 RAW264.7 细胞 2 h 后,用含有 250 μg/mL 的卡那霉素的培养基培养 2 h 以杀灭胞外菌,更换加入兔抗 Hcp1 多克隆抗体或兔血清(1∶50 稀释)的无抗性细胞培养基再培养 8 h,用吉姆萨染色试剂盒染色后观察 MNGC 形成情况,对 MNGC 的统计方法参考文献[13]。将吉姆萨染色结果在显微镜下每组随机取 10 个视野(400 倍),用 Image J 计数细胞每个视野细胞总数,人工计数 MNGC 细胞数量,然后统计 MNGC 的比例和大小。MNGC=MNGC 细胞数量/细胞总数×100%;MNGC 大小=MNGC 细胞数量/MNGC 数量。

1.3 统计学分析

每个实验结果设置 3 个平行,并进行 3 次重复。采用 GraphPad Prism 9.3 统计软件进行数据分析,多组间比较采用多因素方差分析。以 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　BPC006 Δ*hcp*1 的构建与验证

以 BPC006 全基因组为模板,利用 up-F/up-R 和 down-F/down-R 引物,PCR 扩增 upstream 和 downstream 目的基因片段后利用 infusion 连接的方法构建 pK18mobsacb-Δ*hcp*1 质粒(图 1A)。将构建好的质粒用 up-F/down-R 引物进行 PCR 验证,琼脂糖凝胶电泳鉴定结果符合预期,获得了 1 350 bp 左右的条带,*Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ 双酶切实验也验证了这一点(图 1B)。将鉴定正确的重组自杀性载体通过细菌间接合作用转入 BPC006 后通过 2 次压力筛选诱导其进行同源重组交换。分别挑取多个同源重组交换后长出的单菌落,用引物 *hcp*1-F/*hcp*1-R 进行菌液 PCR 验证,结果如图 1C 所示,发现有一个单菌落未扩增出约 500 bp 的 *hcp*1 基因片段,该菌落可能是缺失成功菌株。将该单菌落于 LB 液体培养基扩增后涂布在 LB 固体培养基上,然后再挑取若干单菌落以 up-F/down-R 引物进行 PCR 验证,结果表明 *hcp*1 基因被成功缺失(图 1D)。最后将 2 对引物同时验证正确的菌株作为 BPC006 Δ*hcp*1 保种(图 1E)。Western blot 结果(图 2C)也显示该菌株不表达 Hcp1 蛋白,在蛋白水平证明了 BPC006 Δ*hcp*1 构建成功。

2.2　BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 的构建与验证

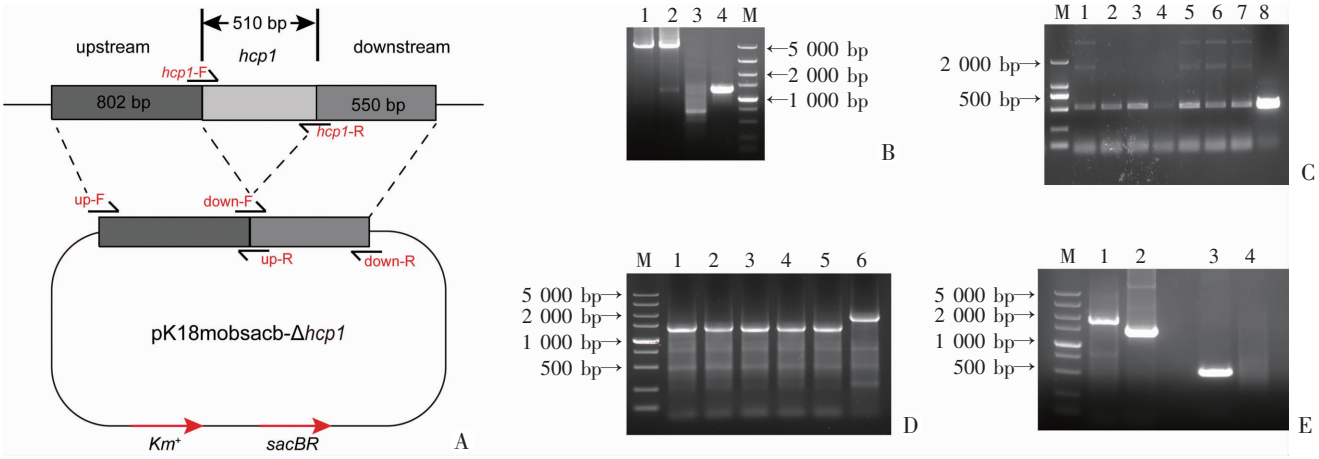
以 BPC006 全基因组为模板,利用 *hcp*1-F/*hcp*1-R 引物,PCR 扩增 *hcp*1 基因片段后利用 T4 连接酶连接后构建重组质粒 pMLS7-*hcp*1,其结构如图 2A 所示。在 BPC006 Δ*hcp*1 的基础上,将验证正确的重组质粒转入缺失株后利用带有甲氧苄啶霉素(50 ng/mL)抗性的 LB 固体平板筛选。在该平板上挑取单菌落,以引物 *hcp*1-F/*hcp*1-R 进行菌液 PCR 验证,结果显示该菌株 *hcp*1 基因片段 PCR 扩增阳性(图 2B)。同时对类鼻疽菌全菌蛋白的 Western blot 检测分析也进一步证明 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 恢复了 Hcp1 蛋白的表达(图 2C)。

2.3　类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞 Hcp1 定位于细胞膜

为明确 Hcp1 在类鼻疽菌感染时的定位情况,分别将 BPC006 野生株、BPC006 Δ*hcp*1、BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1 接种在 LB 液体培养基中过夜培养至对数期,然后分别感染 RAW264.7 细胞(MOI=10)8 h。免疫荧光共定位染色结果发现 Hcp1 在类鼻疽菌感染时主要定位在宿主细胞膜上,且与膜定位蛋白 Na^+/K^+-ATPase 存在共定位现象。见图 3。

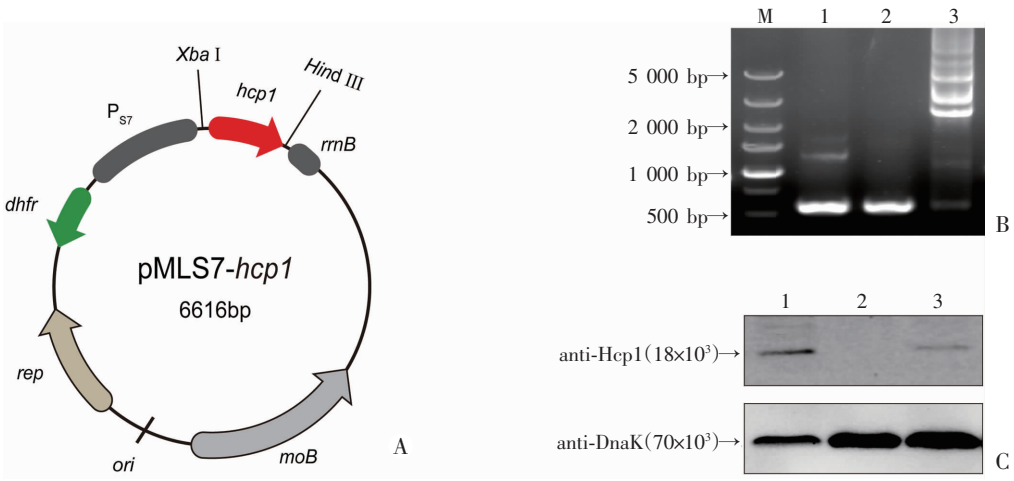
2.4　Hcp1 真核转染 293T 细胞主要定位细胞膜

进一步通过真核转染表达 Hcp1 载体探究 Hcp1 在非感染状态下的定位特点。分别将 pCDNA4.1、pCDNA4.1-Hcp1 和 pCDNA4.1-Tir 载体转染至 293T 细胞,24 h 后质膜分离 Western blot,结果显示,与阳性对照 Tir 蛋白一样,Hcp1 均主要存在分离的细胞膜蛋白样品中(图 4)。



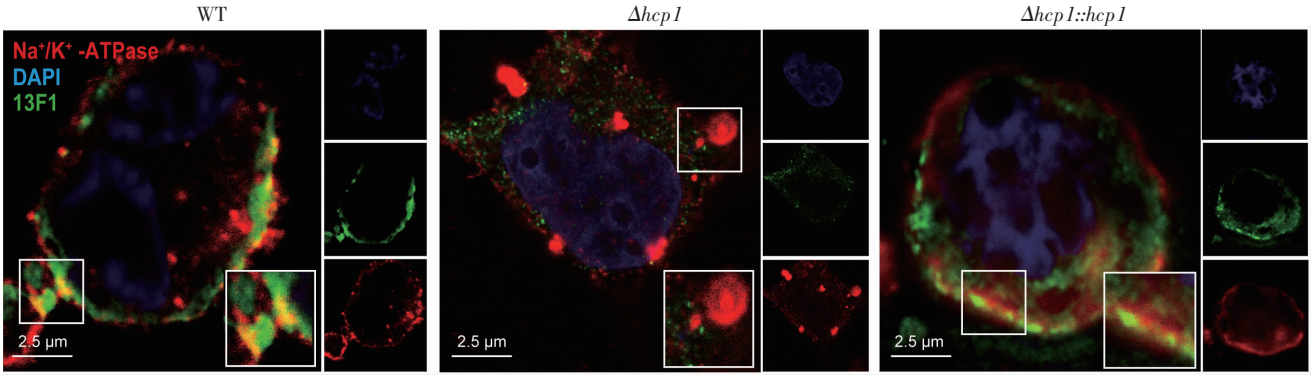
A:BPC006 Δ*hcp*1 相关载体 pK18-Δ*hcp*1 构建示意图　Km^+:卡那霉素抗性基因;*sacBR*:蔗糖致死基因;B:基因缺失载体 pK18-Δ*hcp*1 的酶切与 PCR 验证结果　M:DL5000 DNA Marker;1:pK18 空载 *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ 双酶切;2:pK18-Δ*hcp*1 载体 *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ 双酶切;3:pK18 空载用 *hcp*1 基因内部引物扩增结果;4:pK18-Δ*hcp*1 载体用 *hcp*1 基因内部引物扩增结果;C:*hcp*1-F,R 进行菌液 PCR 对缺失株的初步鉴定结果　M:DL2000 DNA Marker;1、2、3、5、6、7:*hcp*1 基因未成功缺失的菌株;4:*hcp*1 基因成功缺失的菌株;8:野生株 BPC006;D:up-F,down-R 菌液 PCR 进一步鉴定所得缺失株　M:DL5000 DNA Marker;1~5:初步鉴定的 *hcp*1 缺失株;6:野生株 BPC006;E:*hcp*1 缺失株的鉴定　M:DL2000 DNA Marker;1、3:野生株 BPC006;2、4:*hcp*1 缺失株

图 1　BPC006 Δ*hcp*1 的构建与鉴定



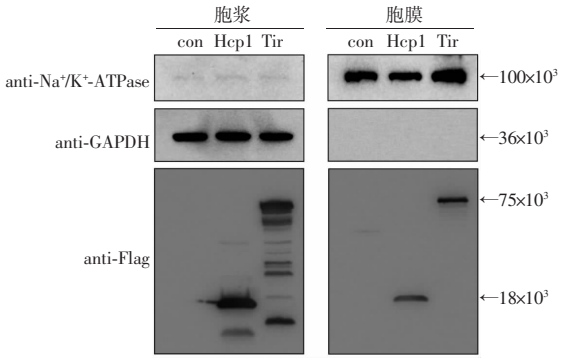
A:*hcp*1 基因回补质粒示意图 该质粒的启动子来自伯克霍尔德菌的 P_{S7} 启动子;*dhfr*:编码甲氧苄氨嘧啶抗性的二氢叶酸还原酶基因;B:PCR 鉴定 *hcp*1 回补株 M:DL5000 DNA Marker;1:野生株 BPC006;2:*hcp*1 回补成功的菌株;3:*hcp*1 未回补成功的菌株;C:Western blot 验证 *hcp*1 基因缺失和回补情况 1:野生株 BPC006;2:BPC006 Δ*hcp*1;3:BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1

图 2 BPC006 *hcp*1 基因回补株的构建与鉴定



蓝色通道为 DAPI;绿色通道为 Hcp1 蛋白;红色通道为 Na^+/K^+-ATPase 蛋白

图 3 Hcp1 在类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞时定位在宿主细胞膜

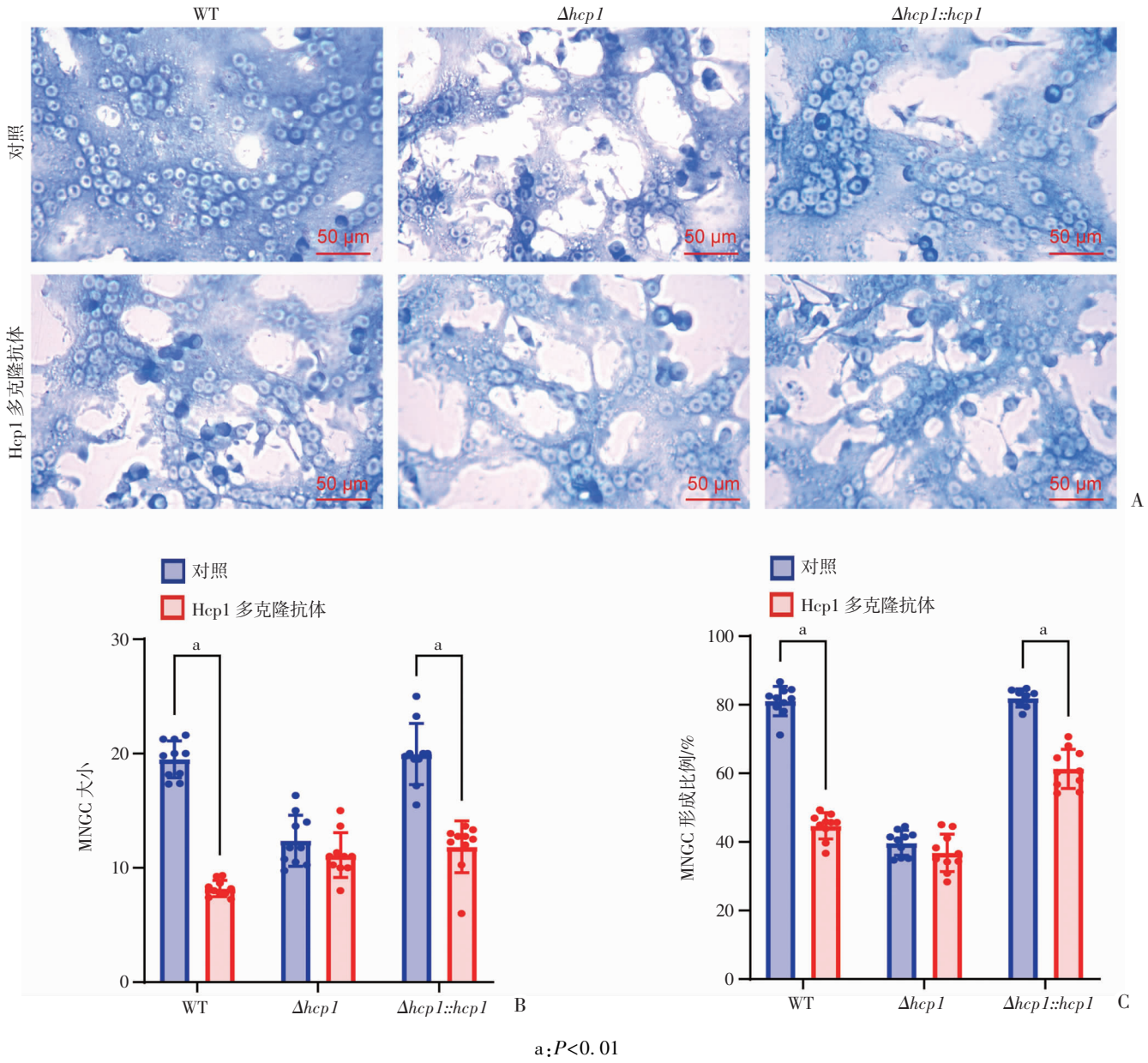


con:转染 pCDNA4.1 空载组(阴性对照);Hcp1:转染 pCDNA4.1-Hcp1 真核表达载体;Tir:转染 pCDNA4.1-Tir 真核表达载体(阳性对照)

图 4 真核表达 Hcp1 蛋白定位在 293T 细胞膜上

2.5 抗 Hcp1 多克隆抗体抑制类鼻疽菌诱导的 MNGC 形成

为进一步探究 Hcp1 定位在宿主细胞膜的生物学意义,观察 Hcp1 抗体对 BPC006 诱导 RAW264.7 细胞形成 MNGC 能力的影响。在 BPC006 感染 RAW264.7 细胞后,利用兔抗 Hcp1 多克隆抗体对定位在宿主细胞膜上的 Hcp1 蛋白进行封闭,检测 MNGC 的形成(图 5A)。结果表明相较于对照组,兔抗 Hcp1 多克隆抗体处理细胞后,可以在一定程度上抑制 MNGC 的形成,而这种抑制效应在 BPC006 Δ*hcp*1 感染组并不明显(图 5B、C)。



a:$P<0.01$

A:吉姆萨染色观察兔抗 Hcp1 多克隆抗体抑制 MNGC 的形成;B:兔抗 Hcp1 多克隆抗体对类鼻疽菌诱导 MNGC 形成大小的统计结果;C:兔抗 Hcp1 多克隆抗体对类鼻疽菌诱导 MNGC 形成比例的统计结果

图 5 兔抗 Hcp1 多克隆抗体抑制 MNGC 形成

3 讨论

类鼻疽菌具有致病性强、对多种抗生素耐药等特性,被美国疾控中心归类为 Ⅰ 类病原体和 B 类生物恐怖剂,对公共卫生安全具有巨大威胁。自 1991 年我国首次报道类鼻疽病例以来,研究人员陆续在海南、广东、广西等地找到类鼻疽菌存在的证据,且该病例在我国有逐年上升趋势[14]。从目前报道的病例来看,类鼻疽病临床表现复杂多样,治疗成本高昂且手段单一,因此急需探索新的临床诊断和治疗方法。随着对该病的致病机制和特点的深入研究,研究人员在类鼻疽菌中鉴定了多种毒力因子和抗原结构,主要包括 Ⅲ 型和 Ⅵ 型分泌系统、脂多糖、荚膜多糖、群体感应系统等[15]。其中,类鼻疽菌 T6SS 在类鼻疽菌细胞毒性、胞内播散和复制以及细菌间竞争等多方面起着关键作用[16]。细菌 T6SS 不同的基因簇发挥着不同的功能,T6SS-1 对于类鼻疽菌感染哺乳动物时的毒力至关重要。类鼻疽菌感染机体后,T6SS-1 可以诱导 MNGC 的形成,促进该菌在宿主细胞间的快速播散和增殖[17]。

T6SS-1 是一个有噬菌体尾巴样结构的大分子跨

膜注射器,Hcp1 和缬氨酸-甘氨酸重复蛋白 G1(valine-glycine repeat protein G1,VgrG1)分别与噬菌体尾部和尾部刺突蛋白具有同源性[18]。类鼻疽菌 Hcp1 蛋白晶体结构显示,该蛋白形成六聚环并可以堆叠成管,这对于 T6SS-1 的装配及多种效应蛋白的分泌都是必不可少的。Hcp1 对于 T6SS-1 功能的重要性决定了其在感染过程中发挥着多种多样的作用[19]。除了作为结构蛋白发挥作用外,研究表明 Hcp1 还极有可能作为效应蛋白被分泌到宿主细胞内发挥作用,但其作为效应蛋白的具体功能尚不明确[20-21]。鉴于该蛋白的重要作用,本研究采用自杀性质粒系统 pK18mobSacb 和同源重组的原理成功构建了 BPC006 Δ*hcp*1。pMLS7 由广宿主质粒 pME6000 改造而来,携带伯克霍尔德菌 P_{S7} 启动子,将 *hcp*1 基因插入改造质粒 pMLS7 并将重组质粒 pMLS7-*hcp*1 转入 BPC006 Δ*hcp*1 后获得相应的 BPC006 Δ*hcp*1::*hcp*1。然后将前面构建的缺失和缺失回补菌株以及野生型类鼻疽菌分别感染 RAW264.7 细胞,细胞免疫荧光结果观察到 Hcp1 蛋白在感染时定位在宿主细胞膜上。除此之外,本研究将 Hcp1 真核表达载体转入 293T 细胞后进行质膜分离,并通过 Western blot 检测发现其也可以定位在细胞膜上。进一步,当用抗 Hcp1 多克隆抗体处理被感染的细胞时,类鼻疽菌诱导 MNGC 形成的能力减弱,而这可能是由定位在宿主细胞膜的 Hcp1 蛋白被多克隆抗体封闭所致。

综上所述,本研究结果表明 Hcp1 作为 T6SS-1 的结构蛋白和效应蛋白,在类鼻疽菌感染宿主细胞时,可能被分泌到宿主细胞内并定位在宿主细胞膜上,而且这种膜定位特点在类鼻疽菌感染诱导 MNGC 形成中发挥着重要作用。本研究获得了类鼻疽菌 T6SS-1 *hcp*1 基因的缺失和缺失回补株,并揭示了 Hcp1 在宿主细胞内的定位特征,为进一步揭示类鼻疽的发病机制提供了直接证据和线索。

参考文献:

[1] CURRIE B J, MEUMANN E M, KAESTLI M. The expanding global footprint of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis[J]. Am J Trop Med Hyg, 2023, 108(6): 1081-1083. DOI: 10.4269/ajtmh.23-0223.

[2] SPEISER L J, GRAF E H, SEVILLE M T, *et al*. *Burkholderia pseudomallei* laboratory exposure, Arizona, USA[J]. Emerg Infect Dis, 2023, 29(5): 1061-1063. DOI: 10.3201/eid2905.221865.

[3] CHAKRAVORTY A, HEATH C. Melioidosis: an updated review[J]. Aust J Gen Pract, 2019, 48(5): 327-332. DOI: 10.31128/AJGP-04-18-4558.

[4] KARUNANAYAKE P. Melioidosis: clinical aspects[J]. Clin Med, 2022, 22(1): 6-8. DOI: 10.7861/clinmed.2022-0014.

[5] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013.
MAO X H. Progress on melioidosis[J]. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(13): 1315-1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013.

[6] KU J W K, CHEN Y H, LIM B J W, *et al*. Bacterial-induced cell fusion is a danger signal triggering cGAS-STING pathway *via* micronuclei formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(27): 15923-15934. DOI: 10.1073/pnas.2006908117.

[7] FANG Y, HUANG Y, LI Q, *et al*. First genome sequence of a *Burkholderia pseudomallei* isolate in China, strain BPC006, obtained from a melioidosis patient in Hainan[J]. J Bacteriol, 2012, 194(23): 6604-6605. DOI: 10.1128/JB.01577-12.

[8] WU X L, LIU X W, WANG Y, *et al*. Optimization of constitutive promoters using a promoter-trapping vector in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11): 9419. DOI: 10.3390/ijms24119419.

[9] 章美娟, 胡治强, 夏瑀培, 等. 类鼻疽杆菌Ⅵ型分泌系统蛋白 Hcp1 的重组表达及免疫学性质鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(23): 2296-2301. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008056.
ZHANG M J, HU Z Q, XIA Y P, *et al*. Recombinant expression and immunological characterization of hemolysin coregulated protein 1, *Burkholderia pseudomallei* type Ⅵ secretion system protein[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(23): 2296-2301. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008056.

[10] 胡治强, 方瑶, 朱攀, 等. 类鼻疽伯克霍尔德菌 BPSL1549 基因敲除株的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(11): 1210-1214. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201602029.
HU Z Q, FANG Y, ZHU P, *et al*. Construction and identification of *Burkholderia pseudomallei* BPSL1549 gene knockout mutant strain[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(11): 1210-1214. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201602029.

[11] MAO C, GU J, WANG H G, *et al*. Translocation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Tir to the plasma membrane *via* host Golgi apparatus[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1544-1550. DOI: 10.3892/mmr.2017.6763.

[12] SANGSRI T, SAIPROM N, TUBSUWAN A, *et al*.

Tetraspanins are involved in *Burkholderia pseudomallei*-induced cell-to-cell fusion of phagocytic and non-phagocytic cells[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 17972. DOI: 10.1038/s41598-020-74737-y.

[13] SUAREZ G, SIERRA J C, SHA J, *et al*. Molecular characterization of a functional type Ⅵ secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* [J]. Microb Pathog, 2008, 44(4): 344-361. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.10.005.

[14] FANG Y, CHEN H, LI Y L, *et al*. Melioidosis in Hainan, China: a restrospective study[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2015, 109(10): 636-642. DOI: 10.1093/trstmh/trv065.

[15] PAAUW A, SCHOLZ H C, MARS-GROENENDIJK R H, *et al*. Expression of virulence and antimicrobial related proteins in *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2023, 17(1): e0011006. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011006.

[16] CHERRAK Y, FLAUGNATTI N, DURAND E, *et al*. Structure and activity of the type Ⅵ secretion system[M]// Protein secretion in Bacteria. Washington, DC: ASM Press, 2019: 329-342. DOI: 10.1128/9781683670285.ch26.

[17] SEMAIL N, HARUN A, AZIAH I, *et al*. Development of multiplex PCR assay for screening of T6SS-5 gene cluster: the *Burkholderia pseudomallei* virulence factor [J]. Diagnostics, 2022, 12(3): 562. DOI: 10.3390/diagnostics12030562.

[18] WANG J, BRODMANN M, BASLER M. Assembly and subcellular localization of bacterial type Ⅵ secretion systems [J]. Annu Rev Microbiol, 2019, 73: 621-638. DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115420.

[19] LIM Y T, JOBICHEN C, WONG J, *et al*. Extended loop region of Hcp1 is critical for the assembly and function of type Ⅵ secretion system in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8235. DOI: 10.1038/srep08235.

[20] ZHU K T, LI G, LI J, *et al*. Hcp1-loaded staphylococcal membrane vesicle vaccine protects against acute melioidosis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1089225. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1089225.

[21] BURTNICK M N, BRETT P J, HARDING S V, *et al*. The cluster 1 type Ⅵ secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei* [J]. Infect Immun, 2011, 79(4): 1512-1525. DOI: 10.1128/IAI.01218-10.

(**收稿**:2023-11-08;**修回**:2024-01-17)

(编辑 邓强庭)