DOI:10.16016/j.2097-0927.202407056

T3SS 通过 ERK/ROS 信号通路促进铜绿假单胞菌侵袭肺上皮细胞的作用

熊浚智[1],余 华[1],王兴敏[1],何晓梅[1],代 黔[1],邱 静[2] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院:临床医学研究中心[1],药剂科[2]

[摘要] **目的** 探究Ⅲ型分泌型系统(type three secretion system,T3SS)在调控铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)侵袭肺上皮细胞中的作用及具体机制。**方法** 采用 PA 菌株感染人非小细胞肺癌 A549 细胞,分为未处理组、PAO1(PA 实验室标准菌株)组、△*exsA*(缺失与 T3SS 转录激活相关的基因 *exsA*)组、△*pscJ*(缺失与 T3SS 蛋白分泌相关基因 *pscJ*)组和 PAO1-E(经 EGTA 诱导后高表达 T3SS 基因)感染组。采用 U0126 抑制 A549 细胞 ERK 活性或通过 apocynin(APO)/N-acetyl-L-cysteine(NAC)抑制 A549 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生并随后感染 PAO1 或 PAO1-E 菌株,分为未处理组、PAO1 或 PAO1-E 感染组、抑制剂处理组,以及抑制剂联合 PAO1 或 PAO1-E 感染组。选用庆大霉素杀伤胞外细菌并将细胞裂解液倍比稀释后涂布 PA 筛选平板,通过计数菌落形成单位(CFUs),明确 PA 感染后细胞内的细菌量;通过荧光探针标记以及流式细胞术检测感染后细胞内 ROS 水平;通过 Western blot 检测感染后 ERK 通路的活化情况。**结果** 与 PAO1 感染组相比,△*exsA* 和△*pscJ* 感染组的细胞内细菌量减少($P<0.05$,$P<0.01$),且伴随 ROS 产生减少($P<0.01$),而 PAO1-E 感染组则呈现相反趋势($P<0.01$)。PAO1 或 PAO1-E 感染联合 APO/NAC 处理组的细胞内细菌量明显低于 PAO1 或 PAO1-E 感染组($P<0.01$)。相较 PAO1 感染组,△*exsA* 和△*pscJ* 感染组的 ERK 磷酸化水平增加($P<0.01$),而 PAO1-E 感染组的 ERK 磷酸化降低($P<0.01$)。与 PAO1 感染组相比,PAO1 联合 U0126 处理组的细胞 ERK 磷酸化水平降低,伴随 ROS 产生以及细胞内细菌量增加($P<0.01$)。**结论** T3SS 介导 ERK 通路抑制可通过促进肺上皮细胞 ROS 产生,增加 PA 对肺上皮细胞侵袭。

[关键词] 铜绿假单胞菌;Ⅲ型分泌型系统;ERK/ROS 信号通路;PA 对肺上皮细胞的侵袭
[中图法分类号] R363.21; R378.991; R563.9 [文献标志码] A

Role of T3SS in promoting *Pseudomonas aeruginosa* internalization in pulmonary epithelial cells *via* ERK/ROS signaling pathway

XIONG Junzhi[1], YU Hua[1], WANG Xingmin[1], HE Xiaomei[1], DAI Qian[1], QIU Jing[2] [1]Clinical Medical Research Center, [2]Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and underlying mechanism of type Ⅲ secretion system (T3SS) in regulating the internalization of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) into pulmonary epithelial cells. **Methods** The human non-small cell lung cancer A549 cells were infected with or without PA strains, including wild-type PAO1 (a standard experimental PA strain), △*exsA* (knockout of the critical activator for T3SS genes), △*pscJ* (T3SS secretion-defective strain) and PAO1-E (EGTA-induced high expression of T3SS genes). The A549 cells pretreated with ERK inhibitor U0126 or reactive oxygen species (ROS) inhibitor apocynin (APO)/N-acetyl-L-cysteine (NAC) were infected with PAO1 or PAO1-E strain. Thus, the experiment was grouped as follows: the mock-treated group, PAO1- or PAO1-E-infected group, inhibitor-

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0931)
[通信作者] 邱 静,E-mail:375895062@tmmu.edu.cn

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/)

treated group, and PAO1/PAO1-E plus inhibitor-treated group. Extracellular bacteria were killed by gentamicin, and the cell lysates were diluted and then plated on PA screening plates. Bacterial amounts were detected by counting colony-forming units (CFUs). The production of ROS was analyzed using fluorescent probe labeling and flow cytometry. The activation of the ERK pathway was detected by Western blotting. **Results** Compared with the PAO1-infected group, the intracellular bacteria and ROS level in △*exs*A- or △*psc*J-infected cells were lower ($P<0.05$, $P<0.01$), so was the generation of ROS($P<0.01$); In contrast, those of the PAO1-E strain-infected cells displayed an opposite trend ($P<0.01$). Compared with the PAO1- or PAO1-E-infected group, the cells pretreated with APO/NAC followed by PAO1 or PAO1-E infection showed reduced intracellular bacterial amounts ($P<0.01$). Compared to the PAO1-infected A549 cells, the phosphorylation level of ERK was increased in the △*exs*A- or △*psc*J-infected cells ($P<0.01$), while that level was suppressed in the PAO1-E-treated cells ($P<0.01$). Compared with the PAO1-infected group, the PAO1-infected cells pretreated with U0126 displayed reduced ERK activation, elevated ROS production, and increased intracellular counts of PAO1 ($P<0.01$). **Conclusion** T3SS-mediated inhibition of the ERK pathway promotes the production of ROS and the internalization of PA in lung epithelial cells.

[**Key words**] Pseudomonas aeruginosa; type three secretion system; ERK/ROS signaling pathway; internalization of PA in pulmonary epithelial cells

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0931). Corresponding author: QIU Jing, E-mail: 375895062@tmmu.edu.cn

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)是引起医院内获得性感染常见的 G^- 条件致病菌。患有严重基础疾病、免疫功能低下、手术介入或肺囊性纤维化患者尤易感染[1]。长期抗生素治疗极易诱发 PA 耐药,而多重耐药、泛耐药菌株的出现,大大加剧了 PA 感染的防治难度[2]。尽管 PA 被广泛认为是一种胞外菌,但实际上其同样可侵袭并长期定植于被感染的角膜、支气管和肺等上皮细胞内部[3]。PA 侵袭并定植于上皮细胞内可逃逸部分抗生素的杀伤以及免疫细胞的清除,这也是导致 PA 持续性感染及感染复发的关键因素之一。Ⅲ型分泌型系统(type three secretion system,T3SS)是与 PA 急性感染密切相关的毒力调控系统,可通过复杂的针状分泌装置,将毒性效应蛋白(如 ExoS/ExoT/ExoY/ExoU)直接注入真核宿主细胞内致病。研究发现,T3SS 与 PA 侵袭及定植上皮细胞密切相关。KROKEN 等[4]报道,Caspase-4 介导炎性小体活化是上皮细胞抵抗胞内 PA 感染的关键防御机制。然而,ExoS 可通过抑制 Caspase-4 介导的炎性小体活化,干扰上皮细胞对入侵 PA 的清除,以利于细菌在胞内的复制。此外,有研究指出,ExoS 具有 ADP-核糖基转移酶活性,可通过抑制 ExoS 和 ExoT 的 Rho GAP 功能域介导的抗吞噬作用,促进 PA 侵袭上皮细胞[5]。尽管 T3SS 调控 PA 侵袭上皮细胞的机制已有部分揭示,然而 T3SS 结构复杂,调控元件众多,致病环节多样,其相关研究仍有待进一步深入。因此,本研究利用 *exsA*(编码 T3SS 激活关键转录因子 ExsA)[6]、*pscJ*(T3SS 蛋白分泌相关)[7]基因敲除菌株以及 T3SS 基因高表达菌株,进一步探究 T3SS 调控 PA 侵袭肺上皮细胞的潜在机制,相关研究可为 PA 感染的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞

PA 实验室标准菌株 PAO1 保存于陆军军医大学第二附属医院临床医学研究中心实验室。PAO1 基因敲除菌株△*exsA* 和△*pscJ* 为前期实验构建[8]。人非小细胞肺癌 A549 细胞购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

小鼠胎牛血清(fetal bovine serum,FBS;CAT# E510002)和 DMEM(CAT# E600003)购自中国生工生物工程(上海)有限公司;胰酶(CAT# 25300054)购自美国 Hyclone 公司;PA 筛选平板(CAT# HB5183)购自中国海博生物公司;乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(glycol ether diamine tetraacetic acid,EGTA;CAT# A600077)购自中国生工生物工程(上海)有限公司;RNAiso Plus(CAT# 9109)、反转录试剂盒(CAT# RR047A)和荧光定量 PCR 试剂盒(CAT# RR820A)购自中国宝生物工程(大连)有限公司;细菌核酸荧光染料 SYTO9(CAT# S34854)购自美国 Invitrogen 公司;ROS 清除剂 NAC(N-acetyl-L-cysteine;CAT# HY-B0215)、NADPH 氧化酶(reduced nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate oxidase, Nox)抑制剂香草乙酮(apocynin,APO;CAT# HY-N0088)以及 ROS 检测荧光探针 2′,7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯(H_2DCFDA;CAT# HY-D0940)购自美国 MCE 公司;ERK 抑制剂 U0126(CAT# S1102)购自美国 Selleck 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(CAT#P0012S)和 Western 及 IP 细胞裂解液(CAT# P0013)购自中国碧云天生物技术有限公司;兔抗 ERK 抗体(CAT# 4695)和兔抗磷酸化的 ERK 抗体(p-ERK;CAT# 4370)购自美国 CST 公司;兔抗 GAPDH 内参抗体(CAT# 10494-1-AP)购自中国武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔(CAT# ZB-2301)或小鼠(CAT# ZB-2305)抗体购自中杉金桥公司;小鼠抗 ExoS 和 ExoT 抗体为本实验室制备。实验所需引物由中国生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3 实验分组

采用 PA 菌株感染 A549 细胞,分为未处理(CTR)组、PAO1(PA 实验室标准菌株)组、△*exsA*(缺失与 T3SS 转录激活相关的关键基因 *exsA*)组、△*pscJ*(缺失与 T3SS 蛋白分泌相关基因 *pscJ*)组和 PAO1-E(经 EGTA 诱导后高表达 T3SS 基因)感染组。采用 U0126 抑制 A549 细胞 ERK 活性并随后感染 PAO1,分为未处理(CTR)组、PAO1 感染组、U0126 处理组和 U0126 联合 PAO1(U0126+PAO1)感染组。采用 APO 或 NAC 抑制 A549 细胞 ROS 产生并随后感染 PAO1 或 PAO1-E 菌株,分为未处理(CTR)组、PAO1 或 PAO1-E 感染组、APO/NAC 剂联合 PAO1(PAO1+APO 或 PAO1+NAC)处理组以及 NAC 联合 PAO1-E(PAO1-E+NAC)处理组。

1.4 肺上皮细胞的培养

采用人非小细胞肺癌细胞 A549 作为 PAO1 感染的肺上皮细胞株。A549 细胞采用含 10%FBS 的 DMEM(10%FBS/DMEM)完全培养基于 37 ℃、5%CO_2 培养。待细胞生长汇合度达到 80%时,采用无菌 PBS 清洗后加入 0.25%胰酶 37 ℃消化 1 min,立即加入完全培养基终止消化。室温 200×*g* 离心 5 min,弃去上清,细胞沉淀加入 10%FBS/DMEM 重悬。采用细胞计数器计算细胞浓度,并按照 1×10^5 细胞/孔将细胞铺入 12 孔细胞培养板。

1.5 PAO1 基因敲除菌株鉴定

提取前期实验中已通过 Red 同源重组方法构建的△*exsA* 和△*pscJ* 基因敲除菌株基因组 DNA[8]。通过交叉 PCR 方法鉴定,即 PCR 扩增基因组 DNA 打靶片段区域的前臂-四环素抗性(TetR)基因片段(FA-TetR)或 TetR 基因-打靶片段后臂(TetR-RA)基因片段(表 1)。取上述 PCR 产物 5 μL 与等体积溴酚蓝混合,通过 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 T3SS 基因表达的诱导

挑取 PAO1 单菌落接种于 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜。取活化细菌以体积比 1∶50 稀释度接种于含 5 mmol/L EGTA 和 20 mmol/L $MgCl_2$ 的新鲜 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养 12 h,即为 T3SS 基因高表达的 PAO1 菌株(PAO1-E)[8]。

1.7 细菌培养及预处理

挑取 PAO1 野生型、△*exsA*、△*pscJ* 或 PAO1-E 单菌落接种于 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜。取活化细菌以体积比 1∶50 稀释度接种于新鲜 LB 培养基,37 ℃、200 r/min 振荡培养至对数生长期。菌液以 13 800×*g* 室温离心 5 min,收集细菌沉淀,测定细菌吸光度值[*OD*(600)],并用无菌 PBS 将其浓度调整为 5 倍 *OD*(600)以用于后续感染。细菌荧光标记组:取上述 PBS 调整后的 5 倍 *OD*(600)菌液 200 μL,室温 13 800×*g* 离心 5 min 后取沉淀,加入 200 μL 经 PBS 配置的 10 μmol/L SYTO9 荧光染料溶液于室温避光染色 20 min。PBS 洗涤 2 次后,细菌沉淀加入等体积 PBS 重悬以用于后续感染。

1.8 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测基因表达

收集细菌或细胞样本加入 RNAiso Plus(TRIzol)以提取总 RNA。采用微量核酸蛋白浓度检测仪测定 RNA浓度。采用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,

表 1 PAO1 基因敲除菌株鉴定引物

菌株	扩增片段	引物序列(5'→3')
Δ*exsA*	FA-TetR	上游:CCCGGAAGAAAGATCTGGC
		下游:ACCGGGCTTTCAAAAAACGTCAGGTCGAGGTGGCCCG
	TetR-RA	上游:ACGGGAAGTGTTGGGGTTCTTTCTCATGTTTGACAGCTT
		下游:AGGAGAATCTGCCGCACCT
Δ*pscJ*	FA-TetR	上游:ACAGCCACAAACTCGACCTG
		下游:CAACTGGTAGGCCGTCAATGTTCCATTCAGGTCGAGGTG
	TetR-RA	上游:GAAACCCTGATGAAGACCCATTCTCATGTTTGACAGCTTATCAT
		下游:ATGAGCAGGTCGAGCTGCT

通过 qPCR 检测细菌 T3SS 关键基因(*exsA*、*exoS*、*exoT* 和 *exoY*)表达水平,并以 *rplU* 为内参基因。此外,通过 qPCR 检测细胞样本中与 ROS 合成相关的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 1-5(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase,NADPH oxidases,Nox 1-5)和双加氧酶 1-2(dual oxidases,Duox1-2)的基因表达水平,并采用 *gapdh* 为内参基因。具体实验方法参照试剂盒说明书进行。荧光定量 PCR 反应体系:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 1 min,40 个循环,熔解曲线 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因的相对表达量,引物序列见表 2。

表 2 RT-qPCR 检测基因表达相关引物

基因	引物序列(5'→3')
rplU	上游:CGCAGTGATTGTTACCGGTG
	下游:GGTAACCTTCGCACCTTCGA
exsA	上游:GATGCTCGCCTGCCTGAA
	下游:CGAACTCGCGGGAGAAG
exoS	上游:GACGCAAGCCCGGAACT
	下游:CAGGCTGTCTGCCCAGGTAC
exoT	上游:TCGAGGCTTCCCGTACCCA
	下游:CAGGGCGACCTTGTCCATT
exoY	上游:TGGTGGACGCCCTCAATG
	下游:GACTCTTCTCCGACCCGATG
gapdh	上游:CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
	下游:CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG
*Nox*1	上游:GCACACCTGTTTAACTTTGACTG
	下游:GGACTGGATGGGATTTAGCCA
*Nox*2	上游:AACGAATTGTACGTGGGCAGA
	下游:GAGGGTTTCCAGCAAACTGAG
*Nox*3	上游:CGTGGCGCATTTCTTCAACC
	下游:GCTCTCGTTAGGGGTGTTGC
*Nox*4	上游:TGACGTTGCATGTTTCAGGAG
	下游:AGCTGGTTCGGTTAAGACTGAT
*Nox*5	上游:CTATTGGACTCACCTGTCCTACC
	下游:GGAAAAACAAGATTCCAGGCAC
*Duox*1	上游:GCAGCGATTTGATGGGTGGTA
	下游:AGGTGGGGTTCTCCCAAGG
*Duox*2	上游:CTGGGTCCATCGGGCAATC
	下游:GTCGGCGTAATTGGCTGGTA

1.9 荧光标记细菌感染及显微镜观察

A549 细胞生长汇合度达到 80%时,弃去完全培养基,加入 1 mL DMEM 培养基。取上述经 SYTO9 荧光染料标记的 5 倍 *OD*(600)的 PAO1 野生型、△*exsA*、△*pscJ* 或 PAO1-E 菌液 5 μL 加入到已含有 1 mL DMEM 培养基的孔板中,并于 37℃感染 3 h(MOI = 10)。采用无菌 PBS 洗涤细胞 1 次后,每孔细胞加入 1 mL 含 300 μg/mL 庆大霉素抗生素的 DMEM 培养基,37 ℃处理 1 h,以杀伤胞外细菌。将细胞置于倒置荧光显微镜下观察并拍照,激发波长 480 nm。

1.10 细菌感染及细胞内细菌量测定

待 A549 细胞生长汇合度达到 80%时,取未经 SYTO9 标记的 PAO1 野生型、△*exsA*、△*pscJ* 或 PAO1-E 菌液感染 A549 细胞 3 h。弃去上清,加入含庆大霉素抗生素的 DMEM 培养基于 37 ℃处理 1 h 以杀伤胞外细菌。具体细菌感染量及抗生素处理方法参照上述 SYTO9 荧光染料标记细菌进行。取细菌感染后细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 200 μL 含 0.5%Triton X-100 的无菌 PBS 于冰上裂解细胞 5 min。取 10 μL 细胞裂解液以 100 倍稀释,取 100 μL 稀释液涂布 PA 筛选平板,37 ℃培养至细菌单菌落形成。通过计算细菌菌落形成单位(CFUs)进行测定。

1.11 ERK 通路抑制

待 A549 细胞生长汇合度达到 80%时,采用经完全培养基稀释的 U0126 5 μmol/L 预处理 A549 细胞 2 h 后,弃去培养基,加入 DMEM 稀释的 PAO1 于 37 ℃感染 3 h。

1.12 细胞内 ROS 清除及检测

采用 ROS 清除剂 NAC 10 mmol/L 或 Nox 抑制剂 APO 50 μmol/L 预处理 A549 细胞 2 h,随后加入 PAO1 或 PAO1-E 于 37 ℃感染 3 h。将上述细胞采用 PBS 洗涤 2 次,加入 0.25%胰酶于 37 ℃消化 1 min,加入完全培养基终止胰酶反应。细胞悬液以 200×*g* 室温离心 5 min,采用 PBS 洗涤 1 次,加入经 PBS 配制的 5 μmol/L H_2DCFDA,37 ℃避光孵育 30 min。细胞悬液经 200×*g* 室温离心 5 min,PBS 洗涤 1 次,采用流式细胞仪检测。

1.13 Western blot 检测蛋白及磷酸化水平

为考察 PAO1 感染不同时间对 A549 细胞 ERK 通路的活化情况,于 PAO1 感染后 1、2 和 3 h 收集细胞样本。未特别说明的其他实验则在细菌感染 3 h 后收集细胞样本用于 Western blot 检测。样本加入 Western/IP 裂解液裂解细胞,采用 BCA 法进行蛋白定量,并取等量蛋白进行 SDS-PAGE 分离。采用湿转印方法将胶上蛋白转印至 0.22 μm PVDF 膜上。采用 5%脱脂奶粉/TBST 溶液室温封闭 1 h,加入一抗(兔抗 ERK 抗体、兔抗 p-ERK 抗体或兔抗 GAPDH 抗体),4 ℃孵育过夜。采用含 0.1% Tween20 的 TBST 溶液洗涤 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔抗体,室温孵育 1 h。洗涤后,ECL 化学发光法曝光显影。采用 Image J 软件计算蛋白条带的灰度值。

1.14 统计学分析

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两样本间的比较采用配对样本 *t* 检验。多样本间的比较采用 one-way ANOVA 进

行,并使用 GraphPad Prism 5.0 软件作图。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T3SS 相关基因敲除及高表达菌株的鉴定

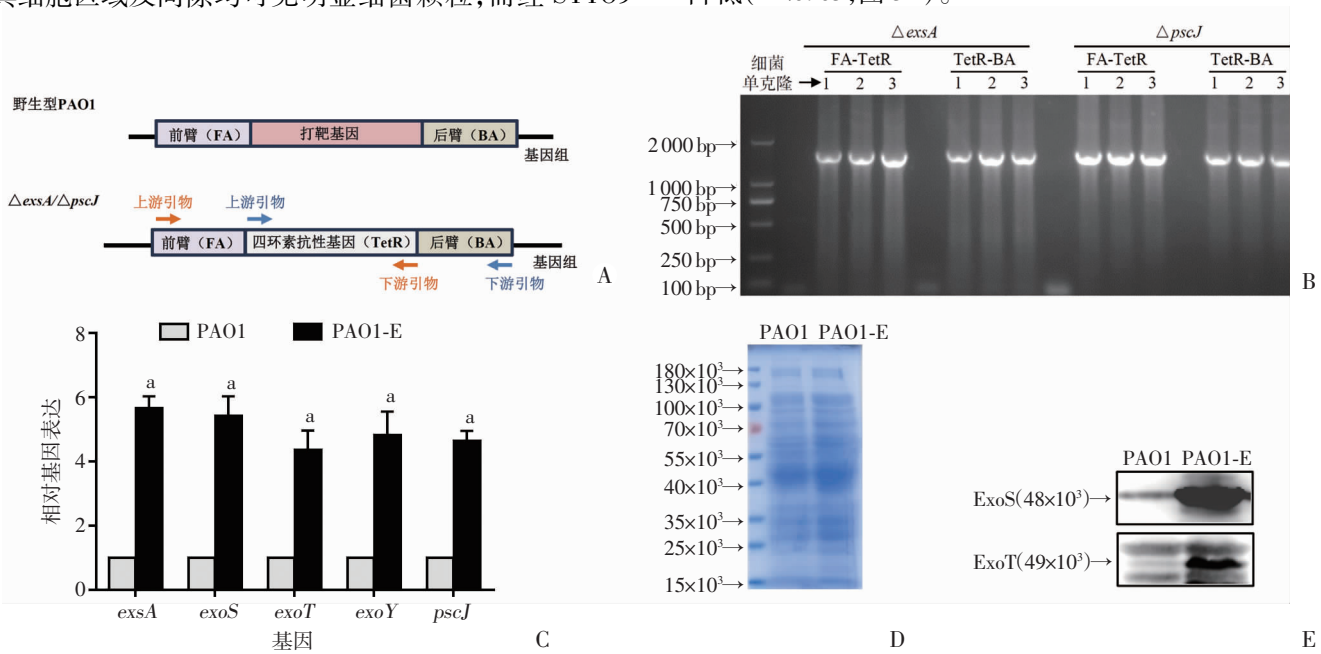
为考察 T3SS 在 PA 侵袭肺上皮细胞中的作用,采用交叉 PCR 鉴定前期实验中构建的△*exsA* 和△*pscJ* 菌株。由电泳结果可见,从△*exsA* 和△*pscJ* 菌株的基因组 DNA 上均能扩增出约 1 600 bp 的 FA-TetR 或 TetR-RA DNA 片段(图 1A、B),证实上述菌株确实是前期构建的相应基因敲除菌株。此外,因 EGTA 可显著诱导 PA T3SS 基因表达,采用 EGTA 处理 PAO1 并通过 RT-qPCR 检测 T3SS 基因表达,结果也证实,与 PAO1 组相比,PAO1-E 组的 *exsA*、*exoS*、*exoT*、*exoY* 和 *pscJ* 基因表达显著增加($P<0.01$,图 1C),表明 EGTA 可诱导 PA T3SS 基因表达。通过蛋白电泳及 Western blot 检测也发现,在总蛋白水平无差异的条件下(图 1D),PAO1-E 组的 ExoS 和 ExoT 蛋白表达水平明显高于未处理的 PAO1 组(图 1E)。

2.2 T3SS 促进 PA 对肺上皮细胞的侵袭

为考察 T3SS 在 PA 侵袭肺上皮细胞中的作用,采用 PAO1、△*exsA* 或△*pscJ* 感染 A549 细胞,通过倒置荧光显微镜观察未标记荧光或经 SYTO9 荧光染料标记后的 PAO1 及突变株感染后的细胞情况。由图 2A 可见,在未经 SYTO9 荧光染料标记的各组细菌感染后,其细胞区域及间隙均可见明显细菌颗粒;而经 SYTO9 绿色荧光染料标记的细菌,其感染的细胞则呈现明显的绿色荧光,且 PAO1-E 感染组最强,PAO1 感染组次之,△*exsA* 和△*pscJ* 感染组较弱(图 2A)。此外,通过细菌感染及采用庆大霉素杀伤胞外细菌,并涂布 PA 筛选平板,结果发现,相较 PAO1 感染组,△*exsA* 特别是△*pscJ* 感染组细胞内的细菌量明显减少($P<0.05$,$P<0.01$,图 2B、C)。相较 PAO1 感染组,PAO1-E 感染组细胞内的细菌量明显增加($P<0.01$,图 2D、E)。上述结果提示,T3SS 可促进 PA 侵袭肺上皮细胞。

2.3 T3SS 可增强 PA 感染诱导的肺上皮细胞 ROS 产生

为考察 T3SS 在 PA 影响肺上皮细胞 ROS 产生中的作用,采用 PAO1、△*exsA* 或△*pscJ* 感染 A549 细胞,并通过 H_2DCFDA 荧光探针标记,检测了细胞内 ROS 水平。结果发现,相较 CTR 组,PAO1 感染组的 ROS 水平明显增加($P<0.01$);与 PAO1 感染组相比,△*exsA* 或△*pscJ* 感染组的 ROS 水平明显降低($P<0.01$,图 3A、B),而 PAO1-E 感染组的 ROS 产生增加($P<0.01$,图 3C、D)。另外,通过 RT-qPCR 检测 ROS 合成的关键酶 Nox1-5 和 Duox1-2 的基因表达发现,相较 CTR 组,PAO1 感染组的 *Nox*1、*Nox*3、*Nox*4、*Duox*1 和 *Duox*2 基因表达上调($P<0.05$),而 *Nox*2 和 *Nox*5 基因表达未有明显改变;与 PAO1 感染组相比,PAO1-E 感染组的 *Duox*1 和 *Duox*2 基因表达水平进一步上调,而 *Duox*1 和 *Duox*2 表达水平在△*exsA* 或△*pscJ* 感染组中则明显降低($P<0.05$,图 3E)。



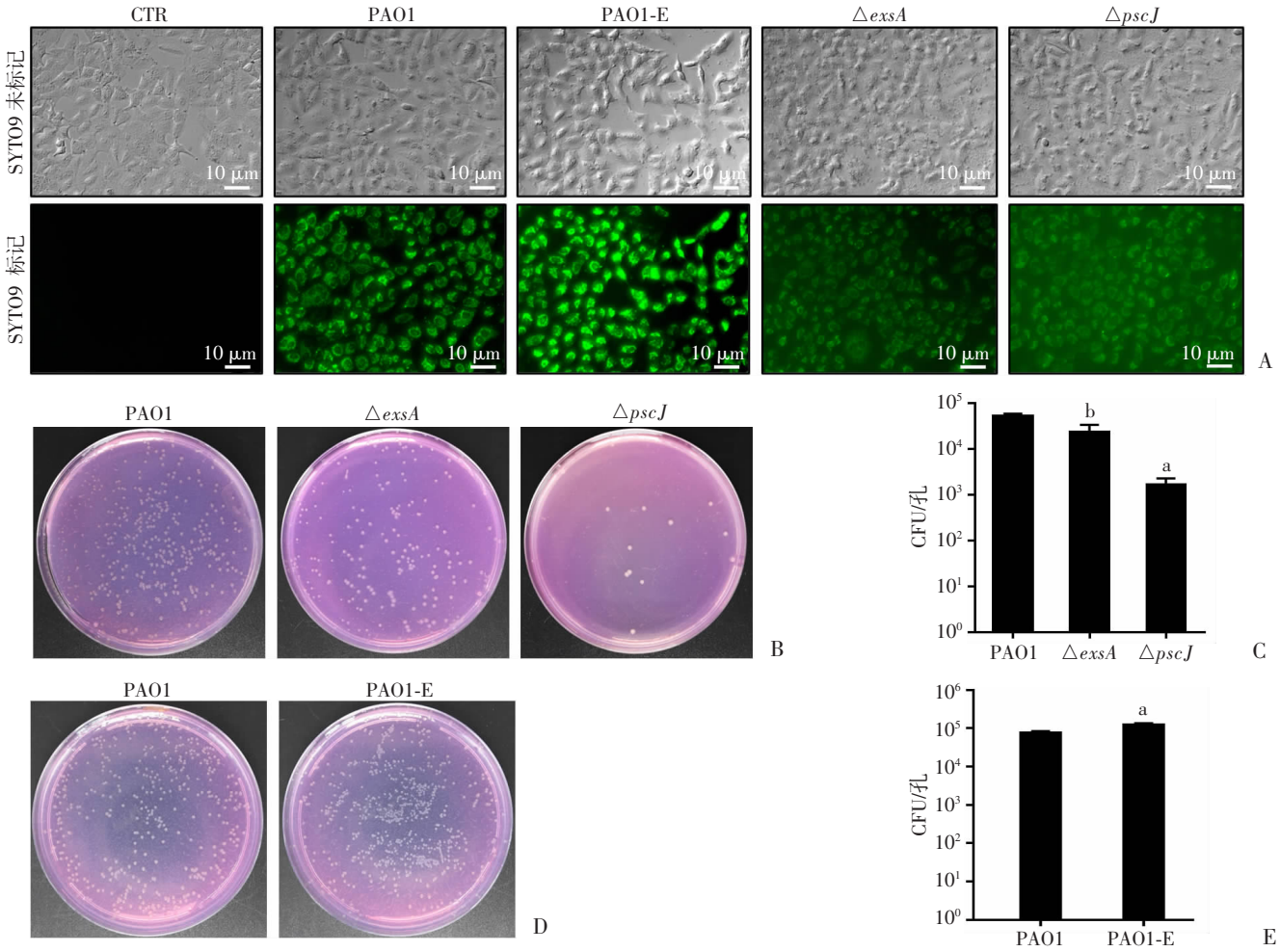
A:△*exsA*/△*pscJ* 基因组 DNA 打靶区示意图;B:交叉 PCR 鉴定基因敲除菌株;C:RT-qPCR 检测 T3SS 基因表达($n=3$)a:$P<0.01$,与 PAO1 组比较;D:SDS-PAGE 电泳检测细菌总蛋白;E:Western blot 检测 T3SS 效应蛋白水平

图 1 PA T3SS 关键基因敲除及高表达菌株鉴定

上述结果提示,T3SS 是 PA 感染诱导肺上皮细胞 ROS 产生的关键因素,且其调控 ROS 的产生可能通过 Duox1 和 Duox2 实现。

2.4 抑制 ROS 产生可减弱 T3SS 介导的 PA 对肺上皮细胞的侵袭

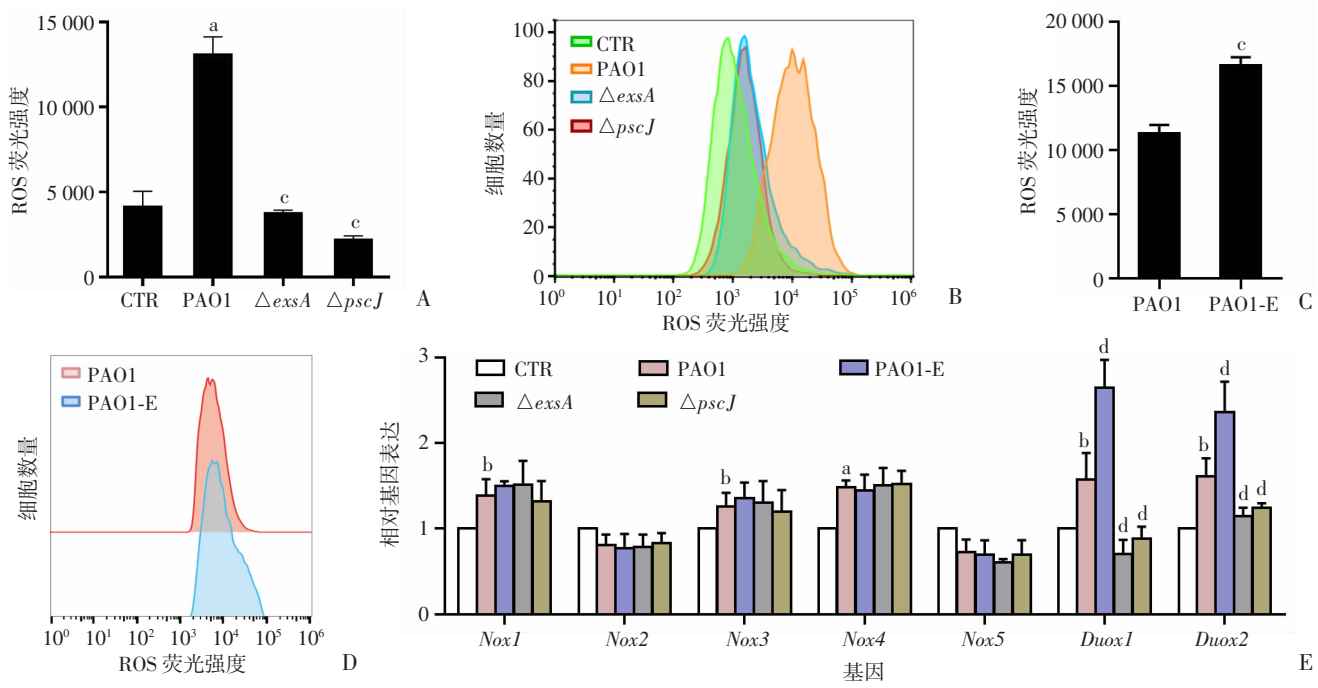
为考察 ROS 在 PA 侵袭肺上皮细胞中的作用,采用 ROS 清除剂 NAC 或 Nox 抑制剂 APO 处理 A549 并联合 PAO1 感染。通过倒置荧光显微镜观察 PAO1 及突变株感染情况,由图 4A 可见,细胞感染后,其未标记荧光组其细胞区域及间隙均可见明显细菌颗粒;而经 SYTO9 标记的 PAO1 或 PAO1-E 感染组其细胞内的绿色荧光明显高于 PAO1 或 PAO1-E 感染联合 APO 或 NAC 处理组。另外,采用 H_2DCFDA 荧光探针标记细菌感染后细胞内 ROS 结果证实,相较 PAO1 感染组,PAO1 感染联合 NAC 或 APO 处理组其 ROS 的产生明显减少($P<0.01$,图 4B、C),提示 NAC 或 APO 能抑制 PA 感染诱导的 ROS 产生。进一步通过庆大霉素杀伤胞外感染的 PAO1 并涂布 PIA 平板,结果发现,与 PAO1 感染组相比,PAO1 感染联合 NAC 或 APO 处理组其感染肺上皮细胞内的细菌量减少($P<0.01$,图 4D、E)。此外,采用 EGTA 诱导 PAO1 的 T3SS 基因表达(PAO1-E 菌株)并联合 NAC 处理,结果发现,PAO1-E 联合 NAC 处理组细胞内的细菌量明显低于 PAO1-E 感染组($P<0.01$,图 4F、G),提示 T3SS 可通过 ROS 促进 PA 侵袭肺上皮细胞。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 PAO1 感染组比较

A:倒置荧光显微镜观察细菌感染情况;B、C:PAO1、△*exsA* 和△*pscJ* 感染后肺上皮细胞内细菌的定量分析($n=3$);D、E:PA 和 PA-E 感染后肺上皮细胞内细菌的定量分析($n=3$)

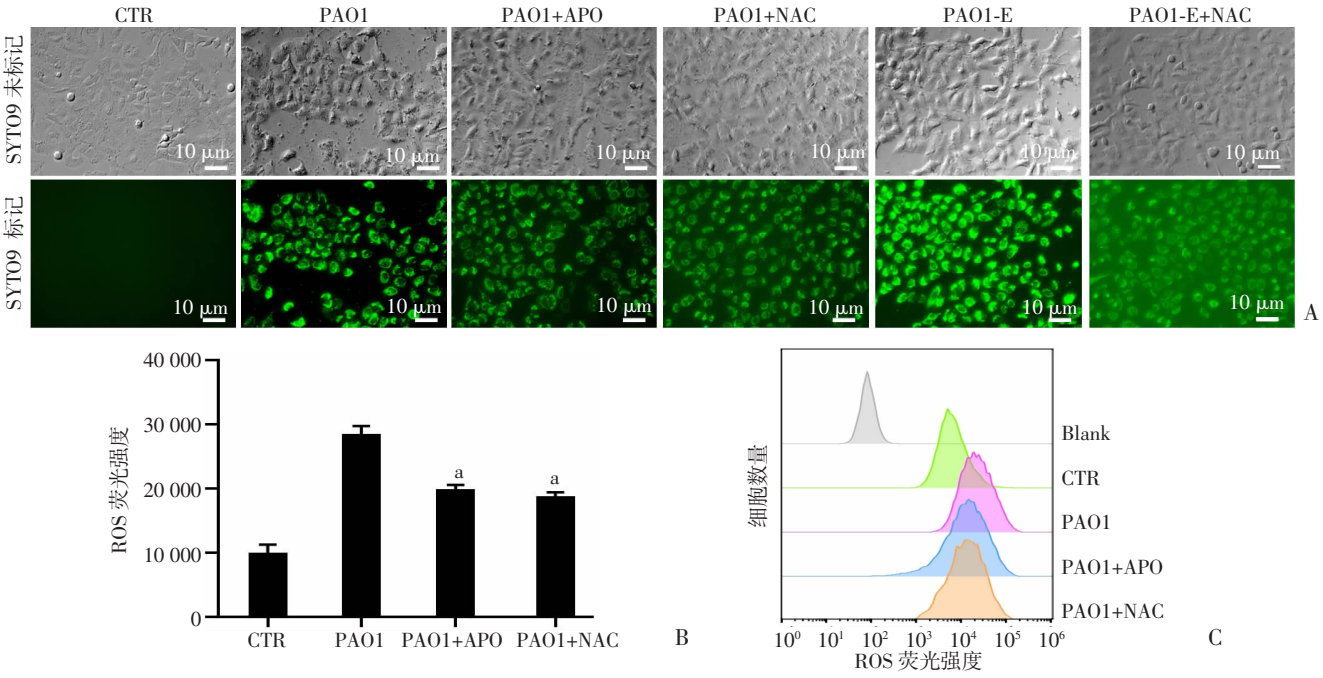
图 2 T3SS 对 PA 侵袭肺上皮细胞作用的检测



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 CTR 组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 PAO1 感染组比较

A~D:流式细胞术检测 PA 感染后肺上皮细胞 ROS 水平;E:RT-qPCR 检测 Nox 和 Duox 相对基因表达

图 3 T3SS 可增强 PA 感染诱导的肺上皮细胞 ROS 产生 ($n=3$)

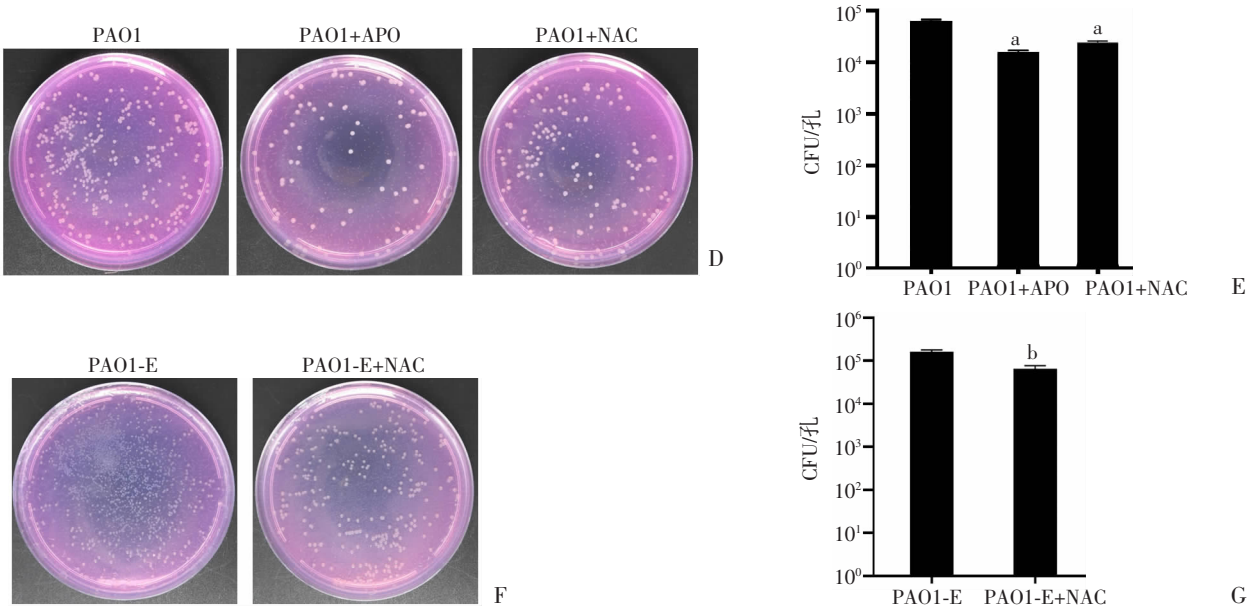


a:$P<0.01$,与 PAO1 感染组比较;b:$P<0.01$,与 PAO1-E 感染组比较

A:倒置荧光显微镜观察细菌感染情况;B、C:流式细胞术检测 PA 感染后肺上皮细胞 ROS 水平($n=3$) Blank 为未经 H_2DCFDA 染色的空白细胞对照

图 4 ROS 在 T3SS 介导的 PA 对肺上皮细胞侵袭作用的检测

(图 4D~G 续下页)



a:$P<0.01$,与 PAO1 感染组比较;b:$P<0.01$,与 PAO1-E 感染组比较

D~G:PA 感染后肺上皮细胞内细菌的定量($n=3$)

续图 4 ROS 在 T3SS 介导的 PA 对肺上皮细胞侵袭作用的检测

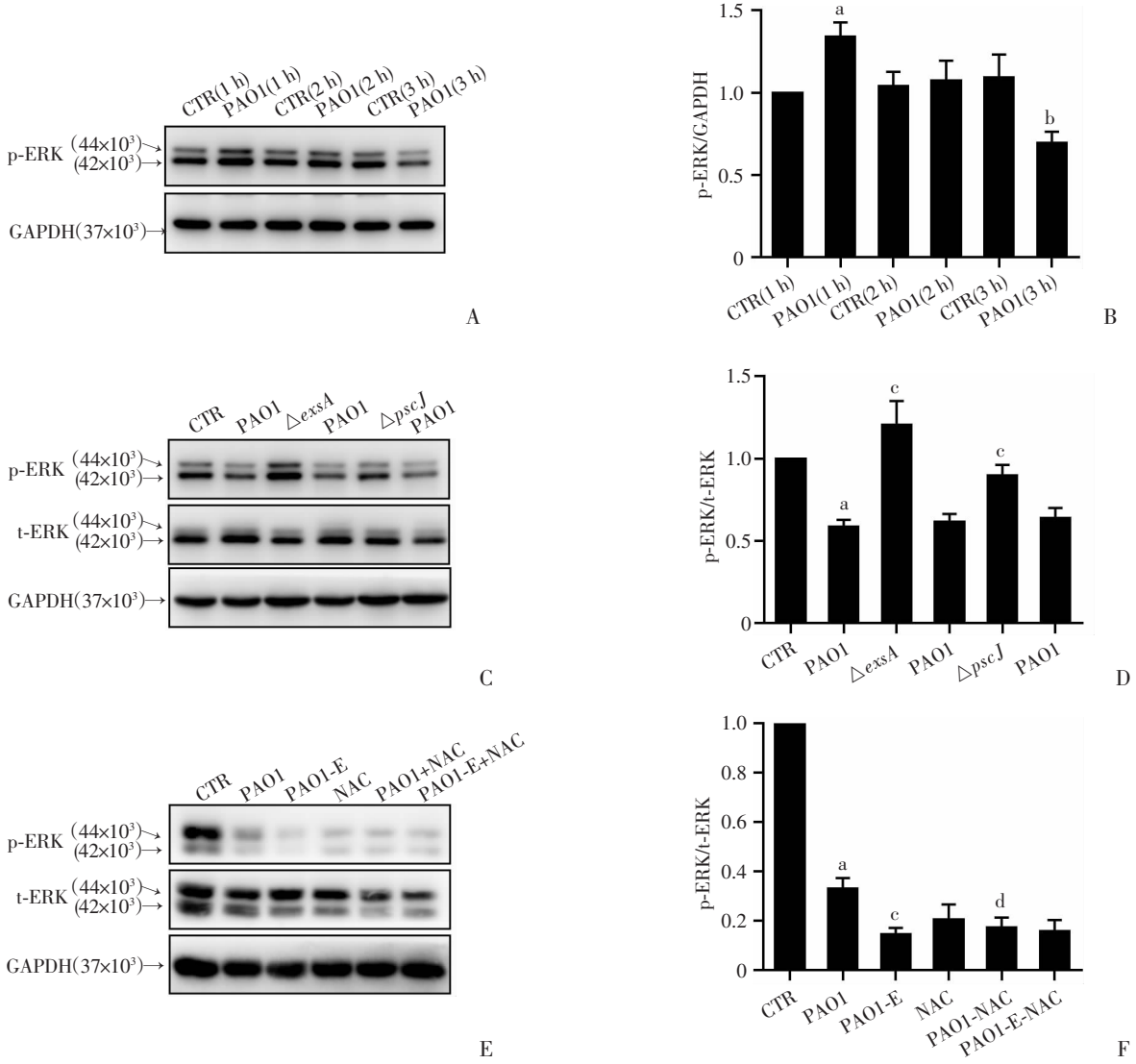
2.5 T3SS 可抑制 PA 感染后肺上皮细胞 ERK 通路活化

为考察 ERK 信号通路是否在 T3SS 介导 PA 侵袭肺上皮细胞以及 ROS 产生中发挥作用,采用 PAO1、△*exsA* 或△*pscJ* 感染 A549 细胞,并通过 Western blot 检测 PA 感染后不同时间点 ERK 的磷酸化水平。结果发现,与未处理组(1 h)相比,PAO1 感染早期(1 h)可增加 ERK 的磷酸化($P<0.01$),而随着感染时间延长反而抑制 ERK 通路活化。与未处理组(3 h)相比,在 PAO1 感染 3 h 时显著抑制 A549 细胞的 ERK 磷酸化($P<0.05$),而对其总蛋白水平没有显著影响(图 5A、B)。相较 PAO1 感染组,△*exsA* 或△*pscJ* 感染组 ERK 磷酸化增加($P<0.01$,图 5C、D)。另外,采用 EGTA 诱导 PAO1 的 T3SS 基因表达并通过 Western blot 检测发现,相较 PAO1 感染组,PAO1-E 感染组 ERK 磷酸化水平减弱($P<0.01$,图 5E、F),提示 T3SS 可抑制 PA 感染后 A549 细胞的 ERK 信号通路活化。

为探讨 ROS 是否通过调控 ERK 发挥效应,进一步通过 NAC 处理并观察了 PA 感染后 ERK 的活化情况。然而,结果却发现,PAO1+NAC 处理组的 ERK 磷酸化水平下降明显低于 PAO1 感染组($P<0.05$,图 5E、F),提示 ROS 并不参与 T3SS 介导的对 ERK 信号通路的抑制。

2.6 ERK 通路抑制可增加 ROS 产生以及 PA 对肺上皮细胞的侵袭

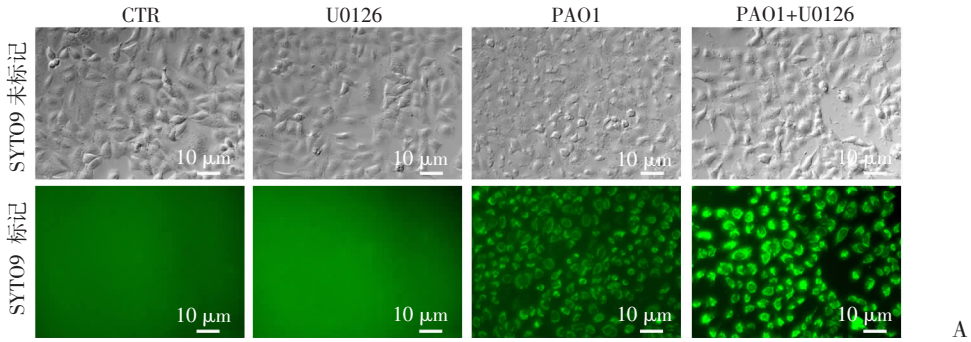
为考察 ERK 通路在 PA 侵袭肺上皮细胞及 ROS 产生中的可能作用,采用 ERK 抑制剂 U0126 预处理 A549 细胞,并随后感染 PAO1 菌株。通过倒置荧光显微镜观察发现,未标记 SYTO9 荧光染料的细菌,其感染后细胞区域及间隙均可见明显细菌颗粒;而经 SYTO9 标记的 PAO1 感染组其细胞内的绿色荧光明显低于 PAO1 联合 U0126 处理组(图 6A)。通过 Western blot 检测 U0126 处理后 ERK 的磷酸化发现,在感染或未感染情况下,U0126 处理组 ERK 的磷酸化水平均低于未处理组($P<0.05$,图 6B),证实 U0126 确实可抑制 ERK 的活化。进一步在上述处理后,通过 H_2DCFDA 荧光探针检测 A549 细胞 ROS 水平,结果发现,相较 PAO1 感染组,PAO1 感染联合 U0126 处理组的 ROS 产生增加($P<0.01$,图 6C)。通过检测抑制剂处理后 PAO1 于 A549 细胞内定植的细菌量,结果显示,PAO1 联合 U0126 处理组细胞内的细菌量明显高于 PAO1 感染组($P<0.01$,图 6D、E)。上述结果提示,ERK 通路抑制可增加 PA 感染诱导的肺上皮细胞 ROS 产生以及细菌的侵袭能力。结果提示,PA 感染时 T3SS 介导 ERK 通路抑制可能通过增加肺上皮细胞 ROS 产生,促进 PA 对肺上皮细胞的侵袭作用。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 CTR 组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 PAO1 感染组比较

A、B:Western blot 检测 PA 感染不同时间点肺上皮细胞 ERK 的磷酸化水平;C、D:Western blot 检测 PA 及突变体感染后肺上皮细胞 ERK 的磷酸化水平;E、F:Western blot 检测 NAC 处理后 PA 及 PA-E 感染后肺上皮细胞 ERK 的磷酸化水平

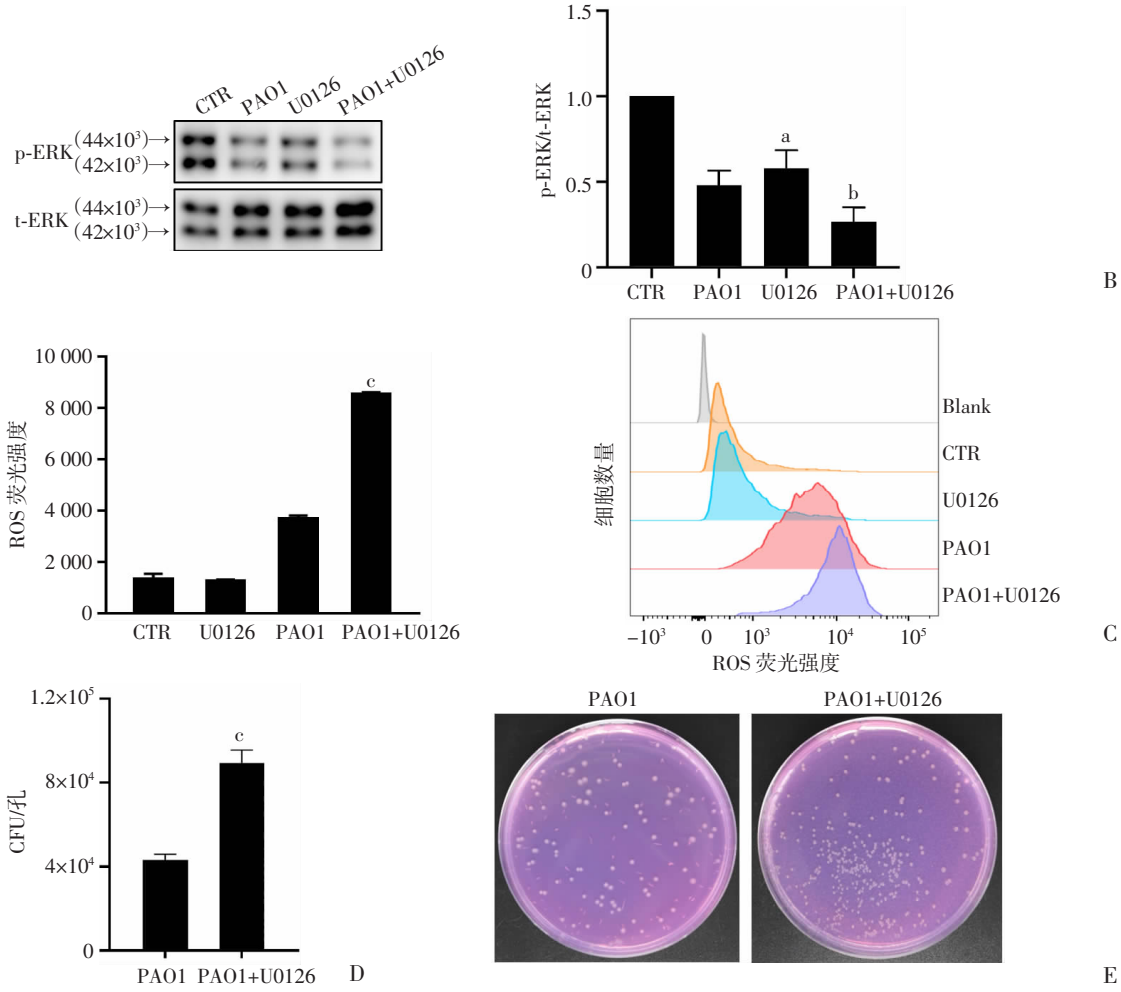
图 5 PA 感染肺上皮细胞后 ERK 通路活化的检测



A:倒置荧光显微镜观察细菌感染情况

图 6 ERK 在 ROS 产生及 PA 对肺上皮细胞的侵袭作用的检测

(图 6B~E 续下页)



a:$P<0.01$,与 CTR 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 PAO1 感染组比较

B:Western blot 检测 ERK 磷酸化;C:流式细胞术检测 PA 感染后肺上皮细胞 ROS 水平　Blank 为未经 H_2DCFDA 染色的空白细胞对照;D、E:PA 感染后肺上皮细胞内细菌的定量

续图 6　ERK 在 ROS 产生及 PA 对肺上皮细胞的侵袭作用的检测

3　讨论

3.1　T3SS 及其效应蛋白诱导 ROS 产生及调控 PA 侵袭肺上皮细胞

T3SS 作为 PA 关键的毒力调控系统,可通过针状结构装置介导的细胞膜通透性改变或通过毒力效应蛋白直接注入宿主细胞内等多种方式发挥致病作用[9]。研究发现,T3SS 除参与对 PA 毒力以及宿主致病性调控外,在 PA 对上皮细胞的侵袭中也发挥至关重要的作用。T3SS 效应蛋白 ExoS 抑制非典型的 Caspase-4 炎症小体活化,可抑制结膜上皮细胞裂解,继而有利于 PA 在上皮细胞内的存活及复制[4]。ExoS 促进 PA 于感染上皮细胞内的侵袭与抑制囊泡酸化,进而逃脱囊泡包裹以及干扰自噬等密切相关,且其相关效应依赖于 ExoS 的 ADP-核糖基转移酶活性[10]。此外,PA 的 T3SS 结构蛋白 PscF 和 PscI 可通过促进巨噬细胞炎症小体活化和焦亡,增加细胞膜通透性,诱导细胞程序性死亡,抑制巨噬细胞对其杀伤[11-12]。本研究发现,T3SS 对于促进 PA 感染后肺上皮细胞 ROS 产生以及细菌对肺上皮细胞的侵袭起到关键作用,且相较 △*exsA* 组,△*pscJ* 感染后肺上皮细胞 ROS 产生以及 PA 于肺上皮细胞内的定植量减少更为明显,其推测的可能影响因素如下:尽管 ExsA 是转录激活 T3SS 基因的关键转录因子,调控了包括编码 T3SS 的结构蛋白、调节因子、分子伴侣以及 4 种效应蛋白的 5 个操纵子[13]。然而,T3SS 基因的转录也同样受到其它转录因子,如 ExsC、ExsD 和 ExsE 的共同调节,且 ExsA/ExsC/ExsD/ExsE 这 4 个转录因子间也存在相互影响[13]。敲除 *exsA* 基因是否可能通过激活其它转录因子,上调部分 T3SS 基因,继而部分逆转因 *exsA* 基因敲

除导致的PA感染后肺上皮ROS产生及侵袭能力的下降,其相关研究仍有待进一步验证。BURNS等[7]发现,PscJ与PscC和PscD共同组成了T3SS针状结构装置的环状结构。PscJ的E26、K52、E105、A107、G126、H133和V189位点突变会导致T3SS蛋白分泌的缺失,上述结果提示,T3SS分泌蛋白可能在诱导肺上皮细胞ROS产生以及增加PA侵袭能力中发挥关键作用。

3.2 T3SS介导ROS产生加剧PA对肺上皮细胞的侵袭作用

JABIR等[14]发现,PA可通过T3SS促进巨噬细胞线粒体损伤,进而增加ROS产生以及线粒体DNA释放,加剧NLRC4炎性小体的活化。尽管如此,VAREECHON等[15]报道,PA感染中性粒细胞时,其效应蛋白ExoS可ADP-核糖化Ras,进而抑制Ras与PI3K结合以及Nox氧化酶介导的ROS产生。上述结果提示,T3SS在PA感染诱导ROS产生中具有的正向或负向的调控作用,其相关效应可能与PA感染的细胞类型以及T3SS的不同组分相关。尽管ROS对清除入侵病原体起到重要作用,但研究也指出,过度的ROS产生可破坏免疫系统并加速微生物的侵袭。OBERLEY-DEEGAN等[16]报道,氧化环境促进脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)在巨噬细胞内的生长。LIU等[17]发现,PA分泌的毒性因子绿脓素,可促进A549细胞ROS产生,以及JNK和ERK MAPKs通路活化,导致肌动蛋白表达和细胞骨架重排,继而有利于PA对上皮细胞的侵袭。鉴于在急性期感染时,T3SS基因表达显著激活;而长期性感染时,T3SS基因表达受到明显抑制[18],提示T3SS诱导ROS产生是促进PA急性期感染并侵袭上皮细胞的一种重要机制。

3.3 ERK信号通路在T3SS介导ROS产生中的调控效应

ERK是有丝分裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)家族重要成员,其与调控细胞增殖、分化、凋亡以及炎症等重要生命活动相关[19-20]。此外,ERK通路在调节细菌与宿主相互作用中也发挥着重要作用[21-22]。采用PD-184161抑制ERK活性可明显促进鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)于HeLa细胞中的存活[23]。JEON等[19]报道,PA分泌蛋白DnaK(热休克蛋白HSP70同源类似物)可通过TLR4介导ERK通路活化,上调模式识别受体PTX3表达,增加巨噬细胞对PA的清除。本研究发现,在感染早期,PA可通过T3SS促进ERK通路活化;而随着感染时间延长,ERK通路受到抑制。ERK通路抑制可诱导ROS产生,促进PA对上皮细胞的侵袭。研究发现,抑制ERK通路活化可通过诱导自噬促进结肠癌细胞ROS产生[24],其相关研究与本研究结果相似。然而,在肝癌或视网膜病变等研究中发现,ERK通路活化可促进肝癌细胞或视网膜色素上皮细胞ROS产生[25-26]。尽管上述报道揭示ROS可位于ERK下游发挥相关效应,多项研究也指出,ROS同样可位于ERK上游并调控其活性。HAN等[22]发现,PA感染可通过抑制ROS介导的ERK通路活化诱导巨噬细胞自噬以抵御细胞凋亡。在肺癌A549或NCL-H292细胞的研究中发现,采用NAC清除Bruceine D诱导的细胞ROS水平可抑制ERK通路活化[20]。尽管本研究证实,抑制ERK通路活化促进了ROS产生。然而,在PA感染时采用NAC清除ROS产生却发现ERK磷酸化进一步下降,提示T3SS主要是通过抑制ERK促进ROS产生并调控PA对肺上皮细胞的侵袭,而并非通过ROS介导的对ERK调控发挥效应。同时,在PA感染时抑制ROS可进一步减弱ERK通路活化也提示,ROS诱导ERK活化可反馈性削弱ERK/ROS通路介导的PA对肺上皮细胞的侵袭。

综上所述,本研究揭示了T3SS通过抑制ERK通路活化促进ROS产生增强PA对肺上皮细胞侵袭的分子机制,其相关研究可为进一步了解PA与宿主间相互作用,以利于其在宿主体内的存活或定植提供新思路,并为PA的感染防治提供新靶标。

参考文献:

[1] SIMONIS A, KREER C, ALBUS A, *et al*. Discovery of highly neutralizing human antibodies targeting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Cell, 2023, 186(23): 5098-5113.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2023.10.002.

[2] QIN S G, XIAO W, ZHOU C M, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 199. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1.

[3] KUMAR N G, NIETO V, KROKEN A R, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* can diversify after host cell invasion to establish multiple intracellular niches[J]. mBio, 2022, 13(6): e0274222. DOI: 10.1128/mbio.02742-22.

[4] KROKEN A R, KLEIN K A, MITCHELL P S, *et al*. Intracellular replication of *Pseudomonas aeruginosa* in epithelial cells requires suppression of the caspase-4 inflammasome[J]. mSphere, 2023, 8(5): e0035123. DOI: 10.1128/msphere.00351-23.

[5] KROKEN A R, CHEN C K, EVANS D J, *et al*. The impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells is independent of *fleQ* and correlates with bistability

of type three secretion system gene expression[J]. mBio, 2018, 9(3): e00668-18. DOI: 10.1128/mBio.00668-18.

[6] LI S Y, WENG Y D, LI X X, *et al*. Acetylation of the CspA family protein CspC controls the type Ⅲ secretion system through translational regulation of exsA in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(12): 6756-6770. DOI: 10.1093/nar/gkab506.

[7] BURNS R E, MCDANIEL-CRAIG A, SUKHAN A. Site-directed mutagenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* type Ⅲ secretion system protein PscJ reveals an essential role for surface-localized residues in needle complex function[J]. Microb Pathog, 2008, 45(3): 225-230. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.05.002.

[8] YU H, XIONG J Z, ZHANG R, *et al*. Ndk, a novel host-responsive regulator, negatively regulates bacterial virulence through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28684. DOI: 10.1038/srep28684.

[9] JOUAULT A, SALIBA A M, TOUQUI L. Modulation of the immune response by the *Pseudomonas aeruginosa* type-Ⅲ secretion system[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1064010. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1064010.

[10] KROKEN A R, GAJENTHRA KUMAR N, YAHR T L, *et al*. Exotoxin S secreted by internalized *Pseudomonas aeruginosa* delays lytic host cell death[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(2): e1010306. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010306.

[11] ZHAO Y, SHAO F. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type Ⅲ secretion apparatus[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 85-102. DOI: 10.1111/imr.12293.

[12] GRANDJEAN T, BOUCHER A, THEPAUT M, *et al*. The human NAIP-NLRC4-inflammasome senses the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS inner-rod protein[J]. Int Immunol, 2017, 29(8): 377-384. DOI: 10.1093/intimm/dxx047.

[13] HORNA G, RUIZ J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiol Res, 2021, 246: 126719. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126719.

[14] JABIR M S, HOPKINS L, RITCHIE N D, *et al*. Mitochondrial damage contributes to *Pseudomonas aeruginosa* activation of the inflammasome and is downregulated by autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(1): 166-182. DOI: 10.4161/15548627.2014.981915.

[15] VAREECHON C, ZMINA S E, KARMAKAR M, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* effector ExoS inhibits ROS production in human neutrophils[J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(5): 611-618.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2017.04.001.

[16] OBERLEY-DEEGAN R E, REBITS B W, WEAVER M R, *et al*. An oxidative environment promotes growth of *Mycobacterium abscessus*[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(11): 1666-1673. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.026.

[17] LIU K Y, WANG X Y, SHA K H, *et al*. Nuclear protein HMGN2 attenuates pyocyanin-induced oxidative stress *via* Nrf2 signaling and inhibits *Pseudomonas aeruginosa* internalization in A549 cells[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 108: 404-417. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.007.

[18] SAVINOVA T, BOCHAROVA Y, MAYANSKIY N, *et al*. The phenomenon of T3SS inactivation for *Pseudomonas aeruginosa* strains from a chronic infection locus: do mutations in T3SS-regulators matter?[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(3): e0049422. DOI: 10.1128/spectrum.00494-22.

[19] JEON J, LEE Y J, YU H, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* DnaK stimulates the production of pentraxin 3 *via* TLR4-dependent NF-κB and ERK signaling pathways[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4652. DOI: 10.3390/ijms22094652.

[20] FAN J J, REN D M, WANG J X, *et al*. Bruceine D induces lung cancer cell apoptosis and autophagy *via* the ROS/MAPK signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 126. DOI: 10.1038/s41419-020-2317-3.

[21] YU H, XIONG J Z, QIU J, *et al*. Type Ⅲ secretion protein, PcrV, impairs *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by increasing M1 macrophage-mediated anti-bacterial activities[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1971. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01971.

[22] HAN L, MA Q M, YU J L, *et al*. Autophagy plays a protective role during *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis *via* ROS-MAPK pathway[J]. Innate Immun, 2020, 26(7): 580-591. DOI: 10.1177/1753425920952156.

[23] FERNANDES S E, SAINI D K. The ERK-p38MAPK-STAT3 signalling axis regulates iNOS expression and *Salmonella* infection in senescent cells[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 744013. DOI: 10.3389/fcimb.2021.744013.

[24] MI W N, WANG C Y, LUO G, *et al*. Targeting ERK induced cell death and p53/ROS-dependent protective autophagy in colorectal cancer[J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 375. DOI: 10.1038/s41420-021-00677-9.

[25] XIONG H J, YU H Q, ZHANG J, *et al*. Elevated FBXL6 activates both wild-type KRAS and mutant $KRAS^{G12D}$ and drives HCC tumorigenesis *via* the ERK/mTOR/PRELID2/ROS axis in mice[J]. Mil Med Res, 2023, 10(1): 68. DOI: 10.1186/s40779-023-00501-8.

[26] YANG Y C, CHIEN Y, YARMISHYN A A, *et al*. Inhibition of oxidative stress-induced epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells of age-related macular degeneration model by suppressing ERK activation[J]. J Adv Res, 2024, 60: 141-157. DOI: 10.1016/j.jare.2023.06.004.

(**收稿**:2024-09-26;**修回**:2024-10-20)

(编辑 张 维)