

DOI:10.13350/j.cjpb.220705

• 论著 •

肺炎克雷伯菌 KbvR 调控 I 型菌毛 FimH 的合成与功能研究*

张福升¹, 徐丽¹, 黄奕诚², 雷飞飞³, 李蓓^{1*}

(1. 湖北医药学院基础医学院, 湖北十堰 442000; 2. 湖北医药学院第二临床学院; 3. 湖北医药学院附属人民医院)

【摘要】 目的 明确 KbvR 对 I 型菌毛顶端蛋白编码基因 *fimH* 的调控作用及其生物学功能。方法 在 *kbvR* 基因敲除株的基础上构建 *kbvR* 与 *fimH* 基因的双敲除株, 通过扫描电镜、RT-PCR、酵母凝集试验、细胞试验等方法分析在 *kbvR* 基因敲除及 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 基因双敲除时细菌 I 型菌毛的形成、生物膜产生、对吞噬细胞的侵袭能力改变。结果 RNA-seq 及 RT-PCR 半定量试验显示 *kbvR* 基因敲除株中 *fimH* 基因表达增加, 扫描电镜及酵母凝集试验显示 *kbvR* 基因敲除株菌毛形成能力增强。通过同源重组的方式在 *kbvR* 基因敲除株的基础上成功获得 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除株。相对于 *kbvR* 基因敲除株, $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除株菌毛形成降低, 对抗巨噬细胞吞噬能力提升, 但生物膜形成能力无明显变化。结论 KbvR 对肺炎克雷伯菌 I 型菌毛 FimH 蛋白合成起负调控作用, 并通过对 I 型菌毛的合成而影响细菌的抗吞噬能力, 但不参与细菌生物膜形成。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; KbvR 调控子; 菌毛; *fimH* 基因

【中图分类号】 R378.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0766-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul. ;17(7):766-769.]

The role and function of KbvR regulation on the FimH of type I fimbriae

ZHANG Fu-sheng¹, XU Li¹, HUANG Yi-cheng², LEI Fei-fei³, LI Bei¹ (1. School of Basic Medical Science, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Second Clinical School, Hubei University of Medicine; 3. Renmin Hospital, Hubei University of Medicine)

【Abstract】 **Objective** To clarify the regulatory effect of KbvR on the type I fimbriae encoding gene *fimH* and the biological function of regulation. **Methods** The double genes knockout strain of *kbvR* and *fimH* ($\Delta kbvR\Delta fimH$) were constructed on the basis of *kbvR* gene knockout strain($\Delta kbvR$). Then the production of type I fimbriae, biofilm formation and anti-phagocytosis ability of WT, $\Delta kbvR$ and $\Delta kbvR\Delta fimH$ strains were detected by scanning electron microscope, RT-PCR, yeast agglutination test and phagocytosis assay. **Results** RNA-seq and RT-PCR showed the expression of *fimH* gene increased in *kbvR* gene knockout strains. Scanning electron microscopy and yeast agglutination test also demonstrated that the fimbriae formation ability of *kbvR* gene knockout strain was significantly increased. The $\Delta kbvR\Delta fimH$ double genes knockout strain was successfully constructed by homologous recombination. Compared to $\Delta kbvR$ strain, the fimbriae of $\Delta kbvR\Delta fimH$ strain was decreased and the uptake by the macrophages was significantly lower than the $\Delta kbvR$ strain. Although the biofilm formation of $\Delta kbvR$ and $\Delta kbvR\Delta fimH$ were decreased than WT strain, there was no significant difference between them. **Conclusion** In *Klebsiella pneumoniae*, KbvR regulator can negatively regulate the synthesis of FimH protein of type I fimbriae, and this regulation take part in the anti-phagocytosis but not the biofilm formation.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; KbvR; fimbriae; *fimH*

***肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是医院内感染和社区获得性肺炎的重要病原菌之一^[1]。由肺炎克雷伯菌引起的社区获得性肺炎率可达 18%~30%。其强致病株(hvKP, 主要为 K1, K2 血清型)能够在正常人群引起肝脓肿、眼内炎及神经系统炎症^[2]。肺炎克雷伯菌“毒力因子”主要有荚膜多糖(CPS)、黏附素、离子摄入系统及脂多糖(LPS)^[3-5]。在肺炎克雷伯菌感染过程中, 黏附素介导细菌与感染部位细胞粘附而有助于细菌定植, 帮助细菌在细胞表面形成生物膜抵抗环境中的各种压力^[6-7]。肺炎克雷伯菌的黏附

素主要包括 I 型菌毛及 III 型菌毛, 其中 I 型菌毛由 Fim 操纵子(*fimBEAICDFGHK*)编码, 由菌毛结构亚单位 FimA 与顶端粘附亚单位 FimH 组成。肺炎克

* **【基金项目】** 湖北省卫生健康委面上项目(No. WJ2021M056); 湖北省教育厅青年人才项目(No. Q20142106)。

** **【通讯作者】** 李蓓, E-mail: libei2381@sina.com

【作者简介】 张福升(1992-), 男, 湖北房县人, 在读研究生。研究方向: 病原生物致病机制与免疫。E-mail: 390949347@qq.com

雷伯菌 I 型菌毛的合成受到其自身调控因子 FimK 的调控作用^[8],除此之外,PecS、YfgL 等也参与 I 型菌毛合成调控^[9-10]。

转录因子 KbvR 是与肺炎克雷伯菌生物膜形成及抗巨噬细胞吞噬相关的一种调控因子,其作用机制不明^[11]。RNA-seq 结果显示,在 KbvR 基因敲除株中编码合成 I 型菌毛 Fim 操纵子上的基因表达均上调^[11]。本研究以 I 型菌毛顶端蛋白 FimH 为对象,在 kbvR 基因敲除株的基础上构建 kbvR 与 fimH 基因双敲除株,分析 KbvR 调控子对 I 型菌毛 FimH 蛋白的调控作用及其生物学功能。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株、质粒 肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 野生株(K1 血清型,从肝脓肿患者体内分离),kbvR 基因敲除株 Δ kbvR 由本室构建^[12];温敏型自杀载体质粒 pKO3-km(含卡那霉素抗性基因和一个 sacB 基因),荧光质粒 pLac-EGFP(卡那霉素抗性)及酿酒酵母菌由本室保存。

1.2 主要试剂 细菌培养基为英国 OXOID 公司产品;酶,蛋白分子质量标准及 DNA 标志物购于日本 Takara 公司和美国 Promega 公司;PCR 纯化试剂盒,PCR 产物切胶回收试剂盒和 RNA 提取试剂盒为德国 Qiagen 公司产品。引物由上海生物工程公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primer

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence
fimH 基因敲除引物	
KP-fimH-A	GTAT <u>GCGGCCG</u> CAGACCAATATTTCTCACTTT
KP-fimH-B	CGAGAGGATATAATCGGTCATCAGGCGTAGGTATAGGTGA
KP-fimH-C	TCACCTATACTACGCTGATGACCGGATATATCTCTCTCG
KP-fimH-D	GTAT <u>GCGGCCG</u> CGGATGACATTCACCAGCTT
fimH 基因敲除鉴定引物	
KP-fimH-RT-F	ATAACGGCACCTCTTACCC
KP-fimH-RT-R	CAGACCAACAACACTACAATAGCG
RT-qPCR 定量引物	
KP-fimH-RT-F	ATAACGGCACCTCTTACCC
KP-fimH-RT-R	CAGACCAACAACACTACAATAGCG
KP-16sRNA-F	ATGACCGCCACTGGAAC
KP-16sRNA-R	CTTCTCCCCGCTGAAAGTA

注(Notes):划线部分为限制性内切酶 Not I 的酶切位点(Underlined sequences indicate the nucleotide sequence recognized by the restriction enzyme)。

2 方 法

2.1 RT-PCR 检测 Δ kbvR 敲除株 fimH 基因表达量变化 将 WT 株、 Δ kbvR 菌株于 37 °C、200 r/min 培养至平台期,稀释至 A_{600} 值为 1.2 后按 1 : 100 的比例接入 LB 培养基中,37 °C 下培养至 A_{600} 值为 1.6。各取菌液 500 μ L,分别置于无菌 EP 管内 4 °C、12 000 g 离心 10 min,弃上清,用 PBS 洗菌 1 次,提取细菌

RNA 并逆转录成 cDNA,以 16sRNA 为内参,以相应引物 RT-PCR 扩增 fimH mRNA,扩增片段进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,分析肺炎克雷伯菌 Δ kbvR 与 WT 株中 fimH mRNA 表达情况。

2.2 Δ kbvR Δ fimH 双基因敲除株的构建 敲除方法参考文献[12]。首先获得 fimH 基因上、下游同源臂片段并通过融合 PCR 扩增得到敲除 fimH 基因的上、下游同源臂融合片段,将融合片段克隆至质粒 pKO3-Km 上,获得重组质粒 pKO3-Km-fimH,电转化入 Δ kbvR 菌株,通过同源重组并利用蔗糖反向筛选获得 Δ kbvR Δ fimH 双基因敲除株。

2.3 生物膜形成试验 将过夜活化的肺炎克雷伯菌 WT 株、 Δ kbvR 株、 Δ kbvR Δ fimH 株调整菌液 A_{600} 值至 1.2 后分别以 1 : 100 的比例转接至含 3 mL 新鲜 LB 培养基的试管中,室温静置培养 48 h,观测不同菌株在液体培养基表面生物膜形成情况。

2.4 酵母凝集试验 将 WT 株、 Δ kbvR 株、 Δ kbvR Δ fimH 株 37 °C 过夜培养,调整菌液 A_{600} 值至 1.2 后按 1 : 100 的比例分别接种至 3 mL 新鲜 LB 培养基中,培养至 A_{600} 值为 1.6 时收集菌液离心,去上清,以 PBS 调整至相应菌浓度。分别将 10^9 CFU 不同菌株悬液与同等量酿酒酵母菌悬液 1 : 1 的比例在干净凹玻片上混匀 10 min,观察酵母凝集情况。

2.5 透射电镜检查 将 WT 株、 Δ kbvR 株、 Δ kbvR Δ fimH 株在 LB 培养基中 37 °C 静置培养 10 h,得到不同菌株的样品悬液,取亲水处理后的载网倒扣在样品悬液上,吸附 3~5 min,用双蒸水对样品漂洗一次,再经乙酸双氧铀负染 3~5 min,干燥后进行电镜观察。

2.6 巨噬细胞吞噬试验 取 10^5 巨噬细胞加入 24 孔细胞培养板培养过夜;将 10^7 CFU 的不同菌株 WT (pLac-EGFP), Δ kbvR (pLac-EGFP), Δ kbvR Δ fimH (pLac-EGFP)加入相应培养孔中,37 °C 培养 90 min,弃上清;加入 300 μ g/mL 的庆大霉素作用 30 min 杀死胞外细菌,继续培养 3 h,PBS 轻洗 3 次;加入多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤;加 0.1% Triton X-100 作用 15 min,PBS 洗涤;依次用 Alexa Fluor 594、DAPI 对细胞染色,使用激光共聚焦显微镜观察并计数,分析细菌抗吞噬能力。

结 果

1 KbvR 负调控肺炎克雷伯菌 I 型菌毛顶端蛋白 FimH 的合成作用

RNA-seq 分析显示,与肺炎克雷伯菌野生株相比 kbvR 基因敲除株 fimH 基因表达量上调 ($\log_2(\Delta$ kbvR/WT)=2.55)^[11]。RT-PCR 和凝胶电泳半定

量试验显示 *kbvR* 基因敲除株 *fimH* 基因表达量增加(图 1),表明 *KbvR* 调控子负调控 *fimH* 基因表达。

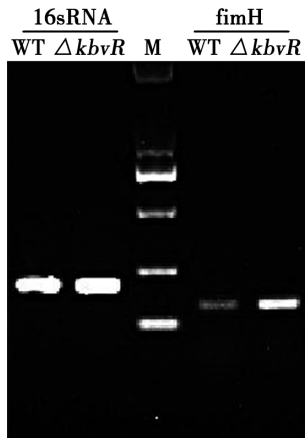
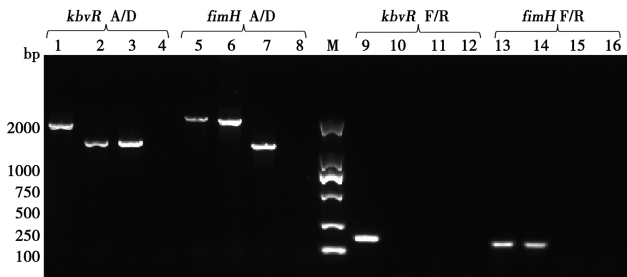


图 1 *KbvR* 基因敲除株 *fimH* 基因表达检测

Fig. 1 Detection of *fimH* gene expression in *KbvR* knockout strains

2 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除株的构建与鉴定

在 $\Delta kbvR$ 菌株基础上采用同源重组的方法构建 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除株。经过重组后,不同菌株分别通过 *kbvR* 及 *fimH* 外部引物(*kbvR*-A/*kbvR*-D、*fimH*-A/*fimH*-D)和内部引物(*kbvR*-F/*kbvR*-R、*fimH*-F/*fimH*-R)进行 PCR 鉴定(图 2),在 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除株中 *fimH* 内部引物未能扩增出片段,外部引物扩增出的片段小于野生株扩增片段, $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除突变株构建正确。



M DL2000 标志物 1,5,9,13 野生株 2,6,10,14 *kbvR* 基因敲除株 3,7,11,15 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 基因双敲除株 4,8,12,16 阴性对照

图 2 *kbvR* 基因及 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 双基因敲除株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR Identification of *KbvR* knockout strains and *kbvR/fimH* Double Gene knockout strain

3 扫描电镜及酵母凝集试验验证 *KbvR* 调控 *fimH* 的合成作用

将肺炎克雷伯菌 WT 株、 $\Delta kbvR$ 株、 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 株通过扫描电镜观察不同菌株菌毛形成情况,结果显示 $\Delta kbvR$ 株菌毛形成能力强于 WT 株;当 *fimH* 基因敲除后, $\Delta kbvR\Delta fimH$ 株菌毛形成能力降低(图 3A)。酵母凝集试验显示,相对于 WT, $\Delta kbvR$ 酵母凝集现象更明显,但 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 菌株

酵母凝集能力相对 $\Delta kbvR$ 降低(图 3B)。表明 *kbvR* 基因负调控肺炎克雷伯菌 I 型菌毛合成。

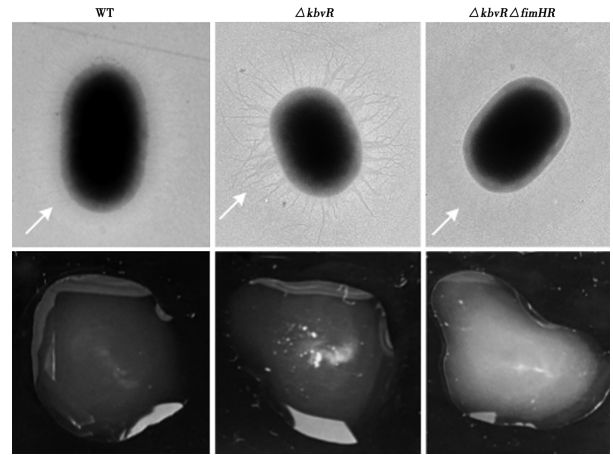


图 3 扫描电镜观察与酵母凝集试验结果

Fig. 3 Scanning electron microscope observation and yeast agglutination test results

4 *KbvR* 调控 *fimH* 对生物膜形成的影响

采用试管法观察 WT 株、 $\Delta kbvR$ 株、 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 株生物膜形成能力,结果发现 WT 在液体培养基表面形成明显的生物膜, $\Delta kbvR$ 和 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 株生物膜形成量少于 WT 株,而两株间无明显区别(图 4)。表明 *kbvR* 基因正调控肺炎克雷伯菌生物膜的形成,但 *KbvR* 对 *fimH* 的调控并不参与 *KbvR* 调控生物膜的形成。

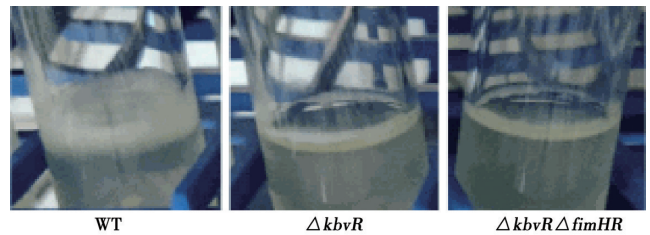


图 4 生物膜形成检测

Fig. 4 Biofilm formation assay

5 *KbvR* 调控 *fimH* 参与巨噬细胞的粘附与吞噬作用

通过激光共聚焦显微镜观察巨噬细胞对携带有绿色荧光质粒 pLac-EGFP 的 WT、 $\Delta kbvR$ 及 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 菌株的吞噬能力,结果显示肺炎克雷伯菌 WT 株抗巨噬细胞吞噬能力较 *kbvR* 基因敲除更强 ($P < 0.01$),每 300 个巨噬细胞吞噬 $\Delta kbvR$ 菌超过 200 个,而只吞噬数 WT 株细菌(图 5A)。 *KbvR* 调控细菌抗吞噬的能力,在此过程中 *KbvR* 调控 *fimH* 影响 I 型菌毛合成参与其中。 $\Delta kbvR\Delta fimH$ 基因双敲除株抗吞噬能力超过 $\Delta kbvR$ 菌株但不及野生株 ($P < 0.01$)(图 5B),表明 *KbvR* 调控 *fimH* 参与巨噬细胞吞噬,但同时可能还存在其它因素参与其中。

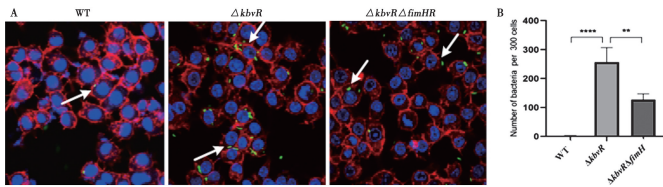


图5 不同菌株抗巨噬细胞吞噬能力检测
Fig.5 Detection of anti-macrophage phagocytic ability of different strains

讨论

肺炎克雷伯菌是一类存在于人体上呼吸道和肠道的正常菌群,在机体免疫力降低或菌群失调时可成为条件致病菌,引起呼吸道、泌尿道、伤口等部位的感染^[1]。过去20年由肺炎克雷伯菌强毒型(主要为K1、K2血清型,LD₅₀<10 CFU)引起的感染如肝脓肿在我国台湾及全球的许多地区都有发生,病死率可达10%~30%^[2,13]。对肺炎克雷伯菌致病因子的研究有助于了解其致病机制和寻找新的预防及治疗手段。

菌毛是肺炎克雷伯菌重要的致病相关因子,被认为在肺炎克雷伯菌生物膜形成早期附着及细菌间相互黏连起作用。肺炎克雷伯菌菌毛分为I型和III型,I型菌毛是细菌细胞壁表面细小的线状突起,其在90%来源于临床和环境中的肺炎克雷伯菌分离株都有表达^[14]。I型菌毛主要由尖端带有黏附分子FimH和FimA重复亚单位组成。I型菌毛可延伸到荚膜外层,介导细菌通过黏附因子FimH粘附到细胞外基质上的含甘露糖结构。肺炎克雷伯菌的I型菌毛在尿道感染初期起重要作用,但与消化道定植、肺部感染及生物膜形成无关。I型菌毛也可能会增强巨噬细胞和中性粒细胞对肺炎克雷伯菌的吞噬作用而有助于机体对肺炎克雷伯菌的清除^[14]。I型菌毛的表达可能受多种因素的调控而在肺炎克雷伯菌致病过程中发挥不同作用。

KbvR调控因子是新发现的肺炎克雷伯菌调控因子,可调控肺炎克雷伯菌另一个重要毒力相关因子荚膜的合成,并参与调控细菌生物膜的形成与细菌抗吞噬细胞吞噬的能力^[11]。这种作用除了通过调控荚膜形成影响外,KbvR能够调控I型菌毛的形成,kbvR基因敲除株后I型菌毛的形成增加并且抗吞噬细胞吞噬的能力下调。在ΔkbvR基因敲除株的基础上敲除fimH基因后的ΔkbvRΔfimH双基因缺失株的抗吞噬能力较ΔkbvR强,说明KbvR能够通过调控I型菌毛的合成而参与抗吞噬过程。然而ΔkbvRΔfimH抗吞噬能力虽较ΔkbvR增强,但较野生株仍然降低,可能由于KbvR对其它致病因子如荚膜的调控所致。虽然kbvR基因缺失后I型菌毛的合成增加,但其生物膜的形成降低,这也可能是KbvR同时调控其他生物膜形成相关因素所致。相对ΔkbvR,ΔkbvRΔfimH双基因

敲除株生物膜形成能力未明显减弱,说明I型菌毛可能不参与生物膜的形成。

本研究结果表明I型菌毛受KbvR调控子的负调控,该调控作用发生在肺炎克雷伯菌的抗吞噬过程。关于KbvR对fimH的具体调控机制有待进一步探讨。

致谢:感谢湖北医药学院基础研究所和李蓓导师对本课题的大力支持。

【参考文献】

- [1] Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(4): 589-603.
- [2] Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3): e00001-19.
- [3] Li B, Zhao Y, Liu C, et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Future Microbiol, 2014, 9(9): 1071-1081.
- [4] Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018(8): 4.
- [5] Wang G, Zhao G, Chao X, et al. The Characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(17): 6278.
- [6] Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation [J]. BMC Microbiol, 2010(10): 179.
- [7] Alcantar-Curiel MD, Blackburn D, Saldana Z, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation [J]. Virulence, 2013, 4(2): 129-138.
- [8] Rosen DA, Pinkner JS, Jones JM, et al. Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression [J]. Infect Immun, 2008, 76(7): 3337-3345.
- [9] Wang ZC, Liu CJ, Huang YJ, et al. PecS regulates the urate-responsive expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43 [J]. Microbiology (Reading), 2015, 161(12): 2395-2409.
- [10] Hsieh PF, Hsu CR, Chen CT, et al. The *Klebsiella pneumoniae* YfgL (BamB) lipoprotein contributes to outer membrane protein biogenesis, type-1 fimbriae expression, anti-phagocytosis, and *in vivo* virulence [J]. Virulence, 2016, 7(5): 587-601.
- [11] Xu L, Wang M, Yuan J, et al. The KbvR regulator contributes to capsule production, outer membrane protein biosynthesis, anti-phagocytosis, and virulence in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Infect Immun, 2021, 89(5): e00016-21.
- [12] 徐丽, 林迪斯, 杨靖, 等. 肺炎克雷伯菌 KbvR 调控因子对细菌生物膜与荚膜形成能力的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(10): 1435-1439.
- [13] Fazili T, Sharngoe C, Endy T, et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: An emerging disease [J]. Am J Med Sci, 2016, 351(3): 297-304.
- [14] Paczosa M K, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2016, 80(3): 629-661.

【收稿日期】 2022-02-14 【修回日期】 2022-05-05