

副溶血弧菌毒力因子及致病机理的研究进展

张德福¹, 付绪磊¹, 张明², 杨文慧³, 杨慧盈³, 汤轶伟¹, 高雪¹, 徐永霞¹, 励建荣^{1,*}

(1.渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁 锦州 121013; 2.渤海大学新能源学院, 辽宁 锦州 121013; 3.军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要: 副溶血弧菌为一种嗜盐性革兰氏阴性短杆菌, 是引发人食源性疾病的主要致病菌之一, 主要分布在海洋环境中。副溶血弧菌的毒力因子主要包括黏附因子、侵袭因子、溶血性毒素、尿素酶、脂多糖、外膜蛋白、蛋白酶、III型分泌系统和摄铁系统等。本文就副溶血弧菌的主要毒力因子及其致病机理的研究进展进行综述, 可为进一步研究该菌的分子致病机理、制定快速精确的检测方法等提供参考。

关键词: 副溶血弧菌; 毒力因子; 致病机理; 溶血素; III型分泌系统

Recent Progress in Research on *Vibrio parahaemolyticus* Virulence Factors and Pathogenic Mechanism

ZHANG Defu¹, FU Xulei¹, ZHANG Ming², YANG Wenhui³, YANG Huiying³, TANG Yiwei¹, GAO Xue¹, XU Yongxia¹, LI Jianrong^{1,*}

(1. Food Safety Key Laboratory of Liaoning Province, College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China; 2. College of New Energy, Bohai University, Jinzhou 121013, China; 3. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is one of the key foodborne pathogens and its virulence factors include adherence factors, invasiveness factors, hemolysins, urease, lipopolysaccharide, outer membrane proteins, type III secretion system and ferric uptake system. In this article, *V. parahaemolyticus* virulence factors and its pathogenic mechanism are summarized, which will hopefully provide references for further research of the molecular pathogenesis, and rapid and accurate detection of *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; virulence factors; pathogenesis; hemolysin; type III secretion system

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 07-0216-07

doi:10.7506/spkx1002-6630-201507040

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*) 是一种嗜盐性革兰氏阴性短杆菌, 是世界范围内重要的食源性致病菌, 主要分布在海洋环境中, 尤其是沿海地区的海水、海底沉积物和海产品中^[1-2]。人类食用被致病性 *Vp* 污染的或未煮熟的海产品会引起急性肠胃炎, 通常发病的潜伏期为1~4 d不等, 大多为10 h左右。患者会出现腹泻、腹部痉挛、恶心、呕吐和发热等现象, 严重时甚至出现脱水、昏迷等症状^[2-3]。*Vp*引起的食源性疾病已成为世界范围内的公共卫生问题之一。近年来, 在亚洲 (尤其是东南亚地区)、欧洲和北美洲均多次爆发了 *Vp* 导致的食源性疾病^[4-7]。据我国食源性疾病监测网1992—2001年统计分析数据显示, *Vp*引起的食源性疾病居微生物食源性疾病的首位^[8], 因此 *Vp*的毒力因子和致病机理的研究越来越受到人们的重视。目前, 国内外学者利用现代生

物学技术对 *Vp* 毒力因子及致病机理的研究取得了很大进展, 为科学防治 *Vp* 所引发的疾病奠定了良好的基础。本文拟对 *Vp* 的毒力因子, 包括黏附因子、侵袭因子、溶血性毒素、尿素酶、脂多糖、外膜蛋白、蛋白酶、III型分泌系统和摄铁系统等对宿主的致病性和致病机理的最新研究进展作综合介绍。

1 黏附因子 (adherence factors)

病原菌的黏附作用与其致病性密切相关, 是病原菌接触和感染宿主的第一步, 也是导致感染的首要条件, 其实质就是病原菌表面的特殊结构和蛋白与宿主靶细胞表面受体黏附并相互作用, 但目前对 *Vp* 如何定植于人的肠道还不十分明确^[9]。

收稿日期: 2014-05-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31471639); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD29B06);

辽宁省食品安全重点实验室开放课题 (LNSAKF2013018; LNSAKF2011040); 渤海大学博士科研启动项目 (BSQD022)

作者简介: 张德福 (1983—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食源性病原微生物的检测、控制及致病机理。

E-mail: zhangdf@bhu.edu.cn

*通信作者: 励建荣 (1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品和果蔬贮藏加工, 食品安全。E-mail: lijrb491@163.com

Gingras等^[10]发现神奈川阳性(Kanagawa phenomonon positive, KP⁺)菌株和神奈川阴性(Kanagawa phenomonon negative, KP⁻)菌株对人肠道上皮细胞的黏附没有显著差异,表明*Vp*普遍具有对人肠道上皮细胞的黏附能力。Nakasone等^[11]发现纯化的*Vp* Ha 7株菌毛能够黏附兔肠道上皮细胞,用菌毛抗体的Fab片段处理*Vp*或用纯化的菌毛处理兔肠道后,*Vp*都不能再继续黏附肠道。这表明*Vp*的菌毛在其黏附和定殖于肠道的过程中具有重要作用。

Nagayama等^[12]通过对*Vp*细胞相关血凝素(cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*, cHA)与*Vp*对兔肠上皮细胞黏附能力关系的研究发现,*Vp*细胞经D-甘露糖和经纯化的血凝素免疫球蛋白G的Fab段处理后,能够剂量依赖性地抑制其对兔肠上皮细胞的黏附能力;兔肠上皮细胞经纯化的血凝素预处理后能够抑制*Vp*的黏附,而血凝素位于菌体细胞表面且与菌毛不相关。这些结果表明,cHA参与了*Vp*黏附到肠上皮细胞,血凝素的肠上皮细胞受体可能是含有D-甘露糖的复合物。

O'Boyle等^[13]研究表明,甘露糖敏感血凝素(mannose-sensitive haemagglutinin, MSHA)菌毛是影响细菌-宿主细胞黏附及致病性的一个重要因素。MSHA突变株对Caco-2细胞黏附能力显著下降的同时,诱导Caco-2裂解和IL-8分泌的能力等也明显下降。MSHA对结构相近的唾液酸GM1神经节苷脂等多糖具有高度亲和性,这些物质可能是肠道中MSHA的受体,促进其定殖于肠道上皮细胞。

*o*因子*rpoN*是控制鞭毛合成的调控基因。Whitaker等^[9]发现,敲除*rpoN*的*Vp*突变株对小鼠肠道的定殖能力提高了,表明*RpoN*可能显著影响*Vp*对宿主的定殖。

Jiang Wei等^[14]研究发现,在*Vp*表面表达的烯醇酶具有人血纤维蛋白溶酶原结合活性,通过黏附和抑制实验表明,烯醇酶在上皮细胞黏附中具有重要作用,可以作为候选疫苗。

Krachler等^[15-16]的研究表明,一种广泛分布于革兰氏阴性菌的MAM7通过与宿主细胞膜上的纤连蛋白和膜磷脂酸结合,在宿主细胞表面组装成一个三分子聚合物,介导病原菌黏附宿主细胞的起始阶段。在非致病性大肠杆菌中表达MAM7,可以使大肠杆菌与宿主细胞黏附;抑制MAM7的表达,则可以使*Vp*的黏附能力与毒力均下降。这一现象也存在于其他含MAM7的革兰氏阴性菌中,MAM7的生物学特性为治疗*Vp*和其他革兰氏阴性致病菌的感染提供了理论基础。

对黏附因子的深入研究将为解释*Vp*如何定殖于肠道、导致感染的机理奠定基础,并为进一步的药物与疫苗开发、探索新的治疗方法、寻找细菌的抑制剂或受体阻断剂等提供理论依据。

2 侵袭因子 (invasiveness)

侵袭力是*Vp*的一种细菌毒力,使其可以突破宿主的免疫屏障而进行繁殖和扩散。Boutin等^[17]将具有不同溶血现象的*Vp*海产品和临床分离株分别接种新西兰大白兔结扎回肠中,组织病理学检查发现,所有的菌株都能进入回肠固有层,而且在肝脏、心脏和胰脏组织中都能分离到感染的菌株。这表明*Vp*菌株不仅仅定殖于肠道的表面,还可能通过淋巴系统或者循环系统侵入更深的组织。Akeda等^[18]研究发现,*Vp*的侵袭能够被细胞松弛素D、诺考达唑和染料木黄酮抑制。基于这3种物质的生物学功能推测,酪氨酸蛋白激酶信号转导、肌动蛋白微丝和细胞骨架可能在侵袭过程中具有重要作用。Akeda等^[19]另一研究结果表明,表达Rho家族小GTP酶显性失活的Caco-2细胞可以促进*Vp*侵袭,这说明*Vp*的侵袭机制可能与已报道的其他侵袭性细菌不同。Zhang Lingling等^[20]研究表明,III型分泌系统2(type III secretion system 2, T3SS2)的效应蛋白VopC在介导包括*Vp*在内的弧菌侵袭宿主细胞的过程中具有重要作用。VopC通过61位谷氨酰胺的脱酰基作用活化Rac和CDC42、促进*Vp*侵袭宿主细胞。鉴于其他海洋细菌也有编码VopC同系物的基因,因此T3SS2的效应蛋白VopC可能是弧菌侵袭性致病力的一个新的分子范例。

3 溶血素 (hemolysins)

*Vp*溶血素属于红细胞毒素,可以在莪萘氏血琼脂平板上产生 β -溶血,这种现象称为神奈川现象(KP)^[21],据此可以将*Vp*分为神奈川阳性(KP⁺)菌株和神奈川阴性(KP⁻)菌株^[22-23]。*Vp*的溶血毒素主要有3种:耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)、耐热直接相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)、不耐热溶血素(thermolabile hemolysin, TLH),分别由*tdh*、*trh*、*tlh*基因编码^[23]。TDH和TRH与*Vp*所引起的肠胃炎密切相关,因此目前普遍认为*tdh*、*trh*基因编码产物是*Vp*的主要毒力因子^[24-26],对其进行深入研究可以进一步阐释*Vp*的致病机理。*Vp*流行病学调查发现,环境分离株和水产品分离株极少携带*tdh*、*trh*,所以自然界中大多数的*Vp*为非致病的,只有极少部分具有致病性,而临床分离株大多为KP⁺株,环境分离株中大部分为KP⁻株^[27-28]。

3.1 耐热直接溶血素

TDH是致病性*Vp*产生的一种不含糖或者脂质的蛋白,由189个氨基酸组成,对热耐受,在70~100℃加热10 min仍具有溶血活性^[29]。编码TDH的*tdh*基因是*Vp*最重要的毒力基因,位于染色体2上,编码区长约570 bp。TDH阳性菌株有2个*tdh*基因:*tdh1*和*tdh2*,它们所表达的

蛋白具有相同的溶血活性, 仅仅有7个氨基酸不同, 很难进行区分, 但是 $tdh2$ 比 $tdh1$ 更具有表达优势^[27,30-32]。TDH可直接作用于红细胞, 具有溶血活性、肠毒素活性、心脏毒性和细胞毒性, 但是添加卵磷脂不会增强其溶血活性^[33]。研究表明TDH可使多种红细胞发生溶血, 对人、鼠、兔、狗、豚鼠等的红细胞具有直接溶血活性, 主要原因可能是 GT_1 或 GD_{1a} 神经节苷脂介导破坏细胞膜和溶酶体^[34]。

TDH的溶血过程首先是通过受体介导, 在不依赖温度的条件下使宿主红细胞膜和溶血素结合, 进而在依赖温度的条件下TDH破坏细胞膜和溶酶体并使细胞溶解。TDH的细胞毒性是由于TDH会形成同源四聚体的成孔毒素作用于肠道细胞, 在细胞膜上形成通道, 产生细胞毒效应, 导致细胞膜通透性遭到破坏, 细胞质因渗透作用而膨胀、裂解^[35]。

Naim等^[36]研究人员发现, 葡聚糖和聚乙烯乙二醇能阻断TDH的溶血活性, 但是不会阻断它的细胞毒性, 单丹磺酰尸胺对TDH细胞毒性有拮抗作用, 但是对溶血活性没有拮抗作用, 说明TDH的溶血性和细胞毒性的作用机理不同。高浓度的TDH会破坏上皮细胞, 增加 Vp 的侵袭力, 使得胆汁酸增加, 有利TDH的高效表达^[37], 而TDH会造成细胞内 Ca^{2+} 浓度暂时性的升高, 其浓度变化与TDH自身的浓度成正比^[38]。 Ca^{2+} 的参与不仅使得TDH诱导肠液氯化物分泌增加从而产生了肠毒素^[39], 而且 Ca^{2+} 浓度的升高能引起 Cl^- 通道的开放, 导致结肠上皮细胞 Cl^- 的分泌增加, 从而引起腹泻的发生^[40-42]。TDH与 Ca^{2+} 的关系也得到Karmakar^[43]、Sarty^[44]等的证实, TDH可以诱导 Ca^{2+} 从细胞外环境中流入细胞, 同时使蛋白激酶C磷酸化, 激活的蛋白激酶C可以抑制表皮生长因子受体酪氨酸激酶活性, 下调结直肠癌细胞的增殖, 而这正是结直肠癌疗法的靶点^[43], 因此TDH在治疗结直肠癌方面可能具有潜在的应用价值。

3.2 耐热直接相关溶血素

Nishibuchi等^[45]从临床病例中分离得到一株 $KP^- Vp$ 毒株, 这些毒株不产生TDH, 这表明还存在另一种致病因子。研究发现这种致病因子与TDH类似, 但是溶血谱不同, 且不耐热, 称之为TRH。编码TRH的基因有 $trh1$ 和 $trh2$, 基因相似性为84%。Kishishita等^[32]发现 $trh1$ 基因的表达量高于 $trh2$, 亚洲分离株和美国西海岸分离株中95%携带 $trh2$ 基因的分株不含 tdh 和 $trh1$ 基因, 从而推断 $trh2$ 与 tdh 和 $trh1$ 是难以共存的。研究证明TDH和TRH的氨基酸序列具有67%的相似性且都具有溶血活性和肠毒素作用^[46], 但导致它们溶血的敏感动物红细胞的种类不同。

3.3 不耐热溶血素

Yanagase等^[47]发现TLH在卵磷脂存在条件下才具有溶血活性, 生化实验表明它是一种非典型的磷脂酶, 主要分泌于 Vp 的细胞外, 但TLH的功能和致病性仍不太明

确, 还需要进一步研究。临床分离株和环境分离株中都有 tlh 基因, 而且具有高度保守性, 因此早期的研究认为 tlh 基因在 Vp 的检测中具有很强的实用性, 但随后研究发现 Vp 与溶藻弧菌中的 tlh 基因相似性很高, 仅判定 tlh 基因不足以对 Vp 进行鉴定^[48], 这一发现对提高 Vp 的检测水平具有重要意义。

4 Ⅲ型分泌系统 (T3SS)

细菌通过注射器状的分泌系统把细菌的蛋白(效应蛋白)通过由3个细菌蛋白组成的膜孔(转位子)注入到宿主细胞质内, 从而进一步的调控宿主的生理代谢^[49]。T3SS通常由30~40 kb大小的基因编码, 以毒力岛(pathogenicity island, PAI)的形式存在于细菌的质粒或染色体上。T3SS通常由20种以上的蛋白质组成, 这些蛋白质可以分为4类: 结构蛋白或者称为装置蛋白、转位蛋白、效应蛋白(或称分泌蛋白)和分子伴侣^[50]。全基因组测序发现 Vp 有两套T3SS, 一套位于染色体1上, 称为T3SS1, 另一套位于染色体2的PAI上, 称为T3SS2。T3SS2对毒力具有重要作用, 又分为T3SS2 α 和T3SS2 β 两个完全不同的遗传谱系^[51]。一般认为, Vp 主要由T3SS1贡献细胞毒性, T3SS2具有肠毒性, 但也有实验证实T3SS2对Caco-2和HCT-8细胞具有一定的细胞毒性^[52-54]。

4.1 T3SS1

T3SS1有一系列结构蛋白, 如 $vscA1$ - $vscY1$ 、 $vcrD1$ 、 $vcrG1$ 、 $vcrR1$ 、 $vcrV1$ 等^[55]。Park等^[56]发现敲除编码内膜蛋白的 $VcrD1$ 基因后, Vp 对HeLa细胞的毒性降低, 而将 $VcrD1$ 基因互补表达后 Vp 毒性恢复到亲本菌株水平, 其他T3SS1的结构基因也具有类似的细胞毒性; 对T3SS1和T3SS2系统中的不同结构基因缺失菌株进行兔回肠结扎实验发现, T3SS2结构基因缺失株的回肠液积聚量明显低于亲本株, 而T3SS1结构基因缺失株的回肠液量与亲本株差异不显著。

目前发现T3SS1可以转位4个效应蛋白: $VopQ$ 、 $VopR$ 、 $VopS$ 和 $VPA0450$, 从而导致细胞毒性, 使细胞裂解, 内容物外流^[57-60]。这4个蛋白的作用各不相同, $VopQ$ 是介导T3SS1对真核细胞毒性的最主要蛋白, 可以诱导宿主细胞自噬^[58-60]; $VopR$ 并不直接导致细胞毒性, 但对酵母具有致死作用, 而预测的活性中心残基突变后会失去活性, 目前其具体作用机理还不清楚^[58,60]; $VopS$ 可以使Rho家族的鸟苷三磷酸酶一磷酸腺苷化, 导致细胞骨架破坏、细胞变圆然后裂解^[59]; $VPA0450$ 是一个磷脂酰肌醇磷酸酶, 可以诱导肌动蛋白结合蛋白从质膜上离位, 从而使质膜起泡^[57-58]。

许多效应蛋白的正确分泌需要伴侣蛋白, 它们的编码区通常与同源的效应蛋白的编码区非常接近^[57]。

目前已知的T3SS1特异的伴侣蛋白有2个: VecA和VPA0451, 前者是VopQ的伴侣蛋白, 编码区位于VopQ的上游, 可以与VopQ直接结合, 对其分泌和细胞质稳定性是必需的; 后者是VPA0450的伴侣蛋白, 是VPA0450转位到宿主细胞膜内必需的, VPA0451可以与VPA0450直接结合, 其活性由第25~100个氨基酸决定的^[57,61-62]。

4.2 T3SS2

Noriea等^[51]对142株分离株的调查发现, T3SS2 α 组成基因存在于所有 tdh^+/trh^- 株中, 而109株 tdh^+ 株中则没有, 其中一个T3SS2 α 基因 $vopB2$ 存在于所有 tdh^+/trh^- 临床株中, 而环境分离株中则不存在; T3SS2 β 存在于所有 tdh^-/trh^+ 分离株中, 而 tdh^+/trh^- 分离株中则没有。Gotoh等^[63]研究表明, 胆汁可以诱导T3SS2相关蛋白及毒力岛基因的表达, 但胆汁酸螯合剂消胆胺可以降低其活性, 这对其他 Vp 和霍乱弧菌也有效果, 这为肠道细菌感染提供了新的治疗方法。

目前已知的T3SS2的转位蛋白有3个: VopB2 (VPA1362)、VopD2 (VPA1361)和VopW^[49]。VopW是一种亲水的转位蛋白, 并不插入到宿主细胞膜上, 但是其对于另外两个疏水转位蛋白——VopB2和VopD2的插入是必需的, 这两个蛋白组成了跨膜的孔道。VopW是T3SS2效应蛋白转位到宿主细胞质中所必需的, 缺失突变掉VopW后菌株的毒力有明显的下降; 与其他亲水的转位蛋白不同, VopW可能同时具有转位蛋白和效应蛋白两个功能, 因为它可以自转位到宿主细胞质内^[49]。

T3SS2有6个效应蛋白: VopA (VopP)、VopV、VopL、VopT、VopC、VopZ^[57]。其中, VopV是T3SS2的一个关键效应蛋白, 其具有多个纤维状肌动蛋白结合区, 而且其肠毒性及纤维状肌动蛋白结合活性有关^[64]; VopZ是T3SS2致病性必需的一个新的效应蛋白, 它既可以抑制蛋白激酶I的激活, 也能诱导 Vp 定植于肠道并导致患者腹泻和肠道致病性^[65]。

Akeda等^[61]通过Pull-down技术筛选到了T3SS2特异效应蛋白VopC的伴侣蛋白VocC, 这是目前已知的唯一的T3SS2特异伴侣蛋白, VocC可能对效应蛋白VopC、VopL和VopT的分泌和稳定性具有重要作用^[57], 结合目前已经得到鉴定的T3SS1特异伴侣蛋白VecA, 这些发现为阐释 Vp 通过T3SS分泌的效应蛋白具有特异性提供了依据^[61]。

目前, T3SS或其他分泌系统不断有新的蛋白或者以前功能未知的蛋白得到确定, 这将为进一步揭示 Vp 对宿主造成损伤的机制, 为深入了解 Vp 的致病机理提供新的思路和科学依据。

5 尿素酶 (urease)

尿素酶由 Ure 基因簇编码, 其分子质量为275 kD, 等电点为5.2。Cai Yunlong等^[66]通过对纯化的尿素酶进行研究发现其可以引起乳鼠的肠液积聚现象, 从而表明尿素酶是 Vp 的一个重要的毒力因子。Suthienkul等^[67]通过实验表明, 所有的尿素酶阳性菌都含有 trh 基因, 但是尿素酶阴性菌则没有此基因。Iida等^[46]通过基因组分析进一步发现, Ure 和 trh 基因序列都位于染色体DNA相邻的编码区, Ure 和 trh 在同一NOT I片段上, 并且集中在染色体DNA的一小部分内, 因此认为 Vp 菌株中的 Ure 同 trh 基因在遗传学方面上具有一定的联系, 但尿素酶并不会抑制 tdh 和 trh 基因的表达^[68]。

6 蛋白酶 (proteases)

细菌分泌到菌体细胞外的蛋白酶在形成弧菌毒力中发挥了重要作用, 例如, 在霍乱弧菌中血球凝集素蛋白酶不仅可以激活霍乱肠毒素的A亚基, 而且可以使细菌从宿主细胞膜上分离并且侵染其他宿主^[69], 而 Vp 菌株同样能分泌血球凝集素蛋白酶, 但其作用机制尚不清楚。Sudheesh等^[70]在研究过程中发现了一株特殊的 Vp 菌株, 该菌的胞外产物对虎虾具有明显杀伤作用但很少产生溶血素, 对分离纯化的胞外蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析发现有两种蛋白均对对虾有毒性, 可能与 Vp 的致病性相关。Lee等^[71]从不含 tdh 和 trh 基因的 Vp 临床分离株中得到一种分子质量为43 kD的蛋白酶A, 通过细胞毒理学实验发现纯化后的蛋白酶A对实验细胞具有明显的毒性作用且对红细胞具有溶解活性, 还可造成组织溶血, 严重时可引起小鼠死亡, 可知此蛋白酶A为 Vp 的一种毒力因子。Kim等^[72]对 Vp 中的金属蛋白酶基因进行克隆与表达, 发现此蛋白酶与溶藻弧菌的胶原蛋白酶具有高度同源性, 而溶藻弧菌胶原蛋白酶在细菌对宿主的感染中起到重要的作用, 因此认为该金属蛋白酶在 Vp 感染中可能具有相似作用。

7 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)

LPS是细菌内毒素的主要物质, 为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分之一, 由核心多糖、类脂A和多糖O抗原三部分组成。Bandeekar等^[73]研究证明 Vp 的LPS对鼠类腹膜巨噬细胞致病活性有一定的影响, 通过改变LPS的剂量, 可显著增加细胞的RNA含量及腹膜巨噬细胞的溶酶体酶活性, 并且还能刺激巨噬细胞的活性。

8 外膜蛋白 (outer membrane proteins, OMPs)

外膜蛋白是革兰氏阴性菌细胞壁特有的成分,其在菌体自身结构稳定和物质转运过程中起着重要作用。病原菌OMPs作为一种重要的保护性抗原,可以对不同血清型的菌株感染产生交叉保护^[74]。弧菌OMPs是一种宽宿主的外膜蛋白,位于细胞外膜表面,与外界有广泛的接触机会^[75]。董传甫等^[76]通过对多株*Vp*的OMPs进行分析发现一分子质量为36 kD的外膜蛋白能够被*Vp*抗血清所识别,其所具有的强免疫原性表明该外膜蛋白具备作为疫苗的可能性。李研东等^[77]从*Vp*中提取的全部DNA中获得编码OMPs的基因,并在大肠杆菌中成功表达;免疫印迹分析显示抗血清和重组蛋白产生了一条特异性反应带,表明*Vp*的OMPs具有较好的免疫原性,为其成为弧菌属细菌的检测作用靶点奠定理论基础。

9 摄铁系统 (ferric uptake system)

铁是一些致病性细菌生长和繁殖中必不可少的元素,宿主细胞体内的铁主要存在于红细胞、乳铁蛋白和转铁蛋白中,游离的铁离子极少,无法满足细菌在生长和繁殖中对铁的需求^[78]。病原弧菌获得铁的途径主要有两种:一是产生外毒素破坏红细胞,释放血红素;二是产生一种低分子质量的螯合剂铁载体,对血红素中的铁离子具有高度亲和力,形成的载体螯合物可以通过受体蛋白转运到细胞中从而进行铁的同化^[78]。*Vp*的摄铁系统由铁离子抑制性外膜蛋白和 Fe^{3+} 螯合物组成。*Vp*可以产生一种能够螯合铁离子的载体,称为弧菌铁素(vibrioferrin),形成的铁-铁载体复合物可以通过细菌外膜蛋白弧菌铁素和血红素受体转运到细胞进行铁的同化^[79]。此外,有研究发现在不含铁的培养基中适当增加铁离子可以增强*Vp*对小鼠的致死性,在铁缺乏的培养基中*Vp*产TDH的能力增强^[78]。

10 结 语

由于*Vp*发病率相对较高且毒性也较强,因此其毒力因子及其致病机理受到了国内外许多研究人员的关注,并且进行了广泛和深入的研究。目前研究人员在各种毒力因子致病性及致病机理方面取得了一些成果,但是距离完全解释各种因子的致病性和致病机理及其之间的关系还有一定差距。另外,*Vp*的致病性是多种因子共同作用的结果,所以需要各种毒力因子进行综合分析,但到目前为止,各毒力因子之间的相互作用与关系还不是十分清楚,需要进一步实验与研究方能确定。随着*Vp*的全基因组序列测定结果的完成,必将为*Vp*毒力因子致病

性的研究、*Vp*导致机体损伤的机制等提供新的思路和科学依据,对提高*Vp*的检测水平、开发免疫保护效果的疫苗、疗效更好的药物或细菌特异性的抑制剂与受体阻断剂的、探索新的防治方法等提供很大的帮助。

参考文献:

- [1] KONDO H, TINWONGGER S, PROESPRAIWONG P, et al. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand[J]. Genome Announcements, 2014, 2(2): e00221-00214. doi: 10.1128/genomeA.00221-14.
- [2] WANG Jingjing, SUN Wenshuo, JIN Mengtong, et al. Fate of *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp after acidic electrolyzed water treatment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 179: 50-56.
- [3] ZENG Jing, WEI Haiyan, ZHANG Lei, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 174: 123-128.
- [4] NYDAM SD, SHAH D H, CALL D R. Transcriptome analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in type III secretion system 1 inducing conditions[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2014, 4: 1. doi: 10.3389/fcimb.2014.00001.
- [5] YU Weiting, JONG K J, LIN Yuren, et al. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 185-192.
- [6] ALAM M J, TOMOCHIKA K I, MIYOSHI S I, et al. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 208(1): 83-87.
- [7] MCLAUGHLIN J B, DEPAOLA A, BOPP C A, et al. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters[J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(14): 1463-1470.
- [8] 刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 等. 1992—2001年食源性疾病暴发资料分析: 国家食源性疾病预防网[J]. 卫生研究, 2005, 33(6): 725-727.
- [9] WHITAKER W B, RICHARDS G P, BOYD E F. Loss of sigma factor RpoN increases intestinal colonization of *Vibrio parahaemolyticus* in an adult mouse model[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(2): 544-556.
- [10] GINGRAS S P, HOWARD L V. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* to human epithelial cell lines[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1980, 39(2): 369-371.
- [11] NAKASONE N, IWANAGA M. Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(1): 61-69.
- [12] NAGAYAMA K, OGUCHI T, ARITA M, et al. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(5): 1987-1992.
- [13] O'BOYLE N, HOUEIX B, KILCOYNE M, et al. The MSHA pilus of *Vibrio parahaemolyticus* has lectin functionality and enables TTSS-mediated pathogenicity[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2013, 303(8): 563-573.
- [14] JIANG Wei, HAN Xiang, WANG Quan, et al. *Vibrio parahaemolyticus* enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 98(1): 4937-4948.
- [15] KRACHLER A M, HAM H, ORTH K. Outer membrane adhesion

- factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(28): 11614-11619.
- [16] KRACHLER A M, ORTH K. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(45): 38939-38947.
- [17] BOUTIN B, TOWNSEND S, SCARPINO P, et al. Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits by immunofluorescence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 37(3): 647-653.
- [18] AKEDA Y, NAGAYAMA K, YAMAMOTO K, et al. Invasive phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Infectious Diseases, 1997, 176(3): 822-824.
- [19] AKEDA Y, KODAMA T, KASHIMOTO T, et al. Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of *Vibrio parahaemolyticus* into Caco-2 cells[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(2): 970-973.
- [20] ZHANG Lingling, KRACHLER A M, BROBERG C A, et al. Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species[J]. Cell Reports, 2012, 1(5): 453-460.
- [21] MIYAMOTO Y, KATO T, OBARA Y, et al. *in vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity[J]. Journal of Bacteriology, 1969, 100(2): 1147-1149.
- [22] LIU Ming, CHEN Sheng. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* V110, isolated from shrimp in Hong Kong[J]. Genome Announcements, 2013, 1(3): e00300-13. doi: 10.1128/genomeA.00300-13.
- [23] SHINODA S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections[J]. Biocontrol Science, 2011, 16(4): 129-137.
- [24] MAHONEY J C, GERDING M J, JONES S H, et al. Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(22): 7459-7465.
- [25] PARANJPYE R, HAMEL O S, STOJANOVSKI A, et al. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(24): 8631-8638.
- [26] BAKER-AUSTIN C, STOCKLEY L, RANGDALE R, et al. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective[J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(1): 7-18.
- [27] SHIMOHATA T, TAKAHASHI A. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. The Journal of Medical Investigation, 2010, 57(3/4): 179-182.
- [28] THEETHAKAEW C, FEIL E J, CASTILLO-RAMIREZ S, et al. Genetic relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier, and environmental sources in Thailand, determined by multilocus sequence analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2358-2370.
- [29] SAKURAI J, MATSUZAKI A, MIWATANI T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 1973, 8(5): 775-780.
- [30] NISHIBUCHI M, ISHIBASHI M, TAKEDA Y, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test[J]. Infection and Immunity, 1985, 49(3): 481-486.
- [31] TAKEDA Y, TAGA S, MIWATANI T. Evidence that thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is composed of two subunits[J]. FEMS Microbiology Letters, 1978, 4(5): 271-274.
- [32] KISHISHITA M, MATSUOKA N, KUMAGAI K, et al. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(8): 2449-2457.
- [33] HONDA T, NI Y, MIWATANI T, et al. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(11): 1175-1180.
- [34] 李毅, 朱心强. 副溶血性弧菌及其溶血毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2835-2839.
- [35] RAIMONDI F, KAO J P, FIORENTINI C, et al. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3180-3185.
- [36] NAIM R, IIDA T, TAKAHASHI A, et al. Monodansylcadaverine inhibits cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin on cultured rat embryonic fibroblast cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 196(2): 99-105.
- [37] HARDY S P, NAKANO M, IIDA T. Single channel evidence for innate pore-formation by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct haemolysin (TDH) in phospholipid bilayers[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 240(1): 81-85.
- [38] BAFFONE W, CASAROLI A, CAMPANA R, et al. 'in vivo' studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH⁺-induced secretion[J]. Microbial Pathogenesis, 2005, 38(2): 133-137.
- [39] RAIMONDI F, KAO J P, KAPER J B, et al. Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model[J]. Gastroenterology, 1995, 109(2): 381-386.
- [40] TAKAHASHI A, IIDA T, NAIM R, et al. Chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* depends on colonic cell maturation[J]. Journal of Medical Microbiology, 2001, 50(10): 870-878.
- [41] TAKAHASHI A, KENJYO N, IMURA K, et al. Cl⁻ secretion in colonic epithelial cells induced by the *Vibrio parahaemolyticus* hemolytic toxin related to thermostable direct hemolysin[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(9): 5435-5438.
- [42] TAKAHASHI A, SATO Y, SHIOMI Y, et al. Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line[J]. Journal of Medical Microbiology, 2000, 49(9): 801-810.
- [43] KARMAKAR P, CHAKRABARTI M K. Thermostable direct hemolysin diminishes tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor through protein kinase C dependent mechanism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1820(7): 1073-1080.
- [44] SARTY D, BAKER N T, THOMSON E L, et al. Characterization of the type III secretion associated low calcium response genes of *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(11): 1306-1315.
- [45] NISHIBUCHI M, TANIGUCHI T, MISAWA T, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 1989, 57(9): 2691-2697.
- [46] IIDA T, PARK K S, SUTHIENKUL O, et al. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology, 1998, 144: 2517-2523.

- [47] YANAGASE Y, INOUE K, OZAKI M, et al. Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus*. I. Identification and partial purification of enzymes[J]. Biken Journal, 1970, 13(2): 77-92.
- [48] ROBERT-PILLOT A, GUENOLE A, FOURNIER J M. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 215(1): 1-6.
- [49] ZHOU Xiaohui, RITCHIE J M, HIYOSHI H, et al. The hydrophilic translocator for *Vibrio parahaemolyticus*, T3SS2, is also translocated[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(8): 2940-2947.
- [50] 谭双, 余旭平, 袁佳杰, 等. 革兰氏阴性菌蛋白分泌系统研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(9): 45-48.
- [51] NORIEA N F, 3rd, JOHNSON C N, GRIFFITT K J, et al. Distribution of type III secretion systems in *Vibrio parahaemolyticus* from the northern Gulf of Mexico[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(3): 953-962.
- [52] HIYOSHI H, KODAMA T, IIDA T, et al. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(4): 1772-1780.
- [53] HAM H, ORTH K. The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 719-725.
- [54] KODAMA T, ROKUDA M, PARK K S, et al. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2[J]. Cellular Microbiology, 2007, 9(11): 2598-2609.
- [55] 俞盈, 吴蓓蓓, 方维焕. 副溶血弧菌的III型分泌系统[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 848-852.
- [56] PARK K S, ONO T, ROKUDA M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(11): 6659-6665.
- [57] WADDELL B, SOUTHWARD C M, MCKENNA N, et al. Identification of VPA0451 as the specific chaperone for the *Vibrio parahaemolyticus* chromosome 1 type III-secreted effector VPA0450[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 353(2): 141-150.
- [58] BROBERG C A. Characterization of Vpa0450, a type III secreted effector protein from *Vibrio parahaemolyticus*[D]. Dallas: University of Texas, 2011: 117-142.
- [59] BURDETTE D L, YARBROUGH M L, ORVEDAHL A, et al. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(34): 12497-12502.
- [60] ONO T, PARK K S, UETA M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(2): 1032-1042.
- [61] AKEDA Y, KODAMA T, SAITO K, et al. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2-associated chaperone VocC for the T3SS2-specific effector VopC[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 324(2): 156-164.
- [62] AKEDA Y, OKAYAMA K, KIMURA T, et al. Identification and characterization of a type III secretion-associated chaperone in the type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 296(1): 18-25.
- [63] GOTOH K, KODAMA T, HIYOSHI H, et al. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13365. doi: 10.1371/journal.pone.0013365.
- [64] HIYOSHI H, KODAMA T, SAITO K, et al. VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 10(4): 401-409.
- [65] ZHOU Xiaohui, GEWURZ B E, RITCHIE J M, et al. A *Vibrio parahaemolyticus* T3SS effector mediates pathogenesis by independently enabling intestinal colonization and inhibiting TAK1 activation[J]. Cell Reports, 2013, 3(5): 1690-1702.
- [66] CAI Yunlong, NI Yuxing. Purification, characterization, and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1996, 10(2): 70-73.
- [67] SUTHIENKUL O, ISHIBASHI M, IIDA T, et al. Urease production correlates with possession of the trh gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand[J]. Journal of Infectious Diseases, 1995, 172(5): 1405-1408.
- [68] NAKAGUCHI Y, OKUDA J, IIDA T, et al. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene[J]. Microbiology and Immunology, 2003, 47(3): 233-239.
- [69] FINKELSTEIN R A, BOESMAN-FINKELSTEIN M, CHANG Y, et al. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment[J]. Infection and Immunity, 1992, 60(2): 472-478.
- [70] SUDHEESH P, XU H S. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases[J]. Aquaculture, 2001, 196(1): 37-46.
- [71] LEE C Y, CHENG M F, YU M S, et al. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 31-37.
- [72] KIM S K, YANG J Y, CHA J. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04[J]. Gene, 2002, 283(1): 277-286.
- [73] BANDEKAR J R, NERKAR D P. Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology and Immunology, 1987, 31(7): 683-689.
- [74] 高崧, 吴晓东. 禽大肠杆菌外膜蛋白、脂多糖疫苗的免疫保护试验[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(5): 457-459.
- [75] INOUE T, MATSUZAKI S, TANAKA S. A 26-kDa outer membrane protein, OmpK, common to *Vibrio* species is the receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP40[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 125(1): 101-105.
- [76] 董传甫, 林天龙, 许斌福, 等. 电泳和免疫印迹分析副溶血弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(7): 619-623.
- [77] 李研东, 卢士英, 任洪林, 等. 副溶血弧菌外膜蛋白OmpK基因的克隆及原核表达[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(5): 572-574.
- [78] 杨振泉, 焦新安. 副溶血弧菌毒力因子及其致病机理研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(11): 1070-1073.
- [79] YAMAMOTO S, AKIYAMA T, OKUJO N, et al. Demonstration of a ferric vibrioferrin-binding protein in the outer membrane of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology and Immunology, 1995, 39(10): 759-766.