· 原 著 ·

铜绿假单胞菌泳动、蹭行能力及Ⅲ型分泌系统与成膜能力的关系

税 剑^{1,2},王海晨¹,陶晓燕¹,闵昌航¹,李 军¹,邹明祥¹

1. 中南大学湘雅医院检验科,湖南 长沙 410008

2. 南华大学附属长沙中心医院检验科,湖南 长沙 410004

[摘 要] 目的:探讨铜绿假单胞菌(PA)泳动及蹭行能力对生物被膜形成的影响,并分析不同成膜能力PA菌株Ⅲ型分泌系统毒力基因差异。方法:收集中南大学湘雅医院临床分离的非重复PA 192株,96孔板法检测菌株成膜能力,平板法检测菌株的泳动及蹭行能力,聚合酶链反应检测Ⅲ型分泌系统毒力基因。结果:192株PA临床分离株中186株(96.9%)具有成膜能力,其中弱成膜36株,中等成膜84株,强成膜66株。不成膜、弱成膜、中等成膜、强成膜组泳动环直径分别为(9.12 ± 6.76)、(18.42 ± 7.51)、(19.10 ± 4.77)、(17.80 ± 5.27)mm;各组蹭行环直径分别为(8.38 ± 1.50)、(17.21 ± 7.42)、(18.49 ± 5.62)、(20.44 ± 6.43)mm,不成膜组泳动和蹭行能力均弱于各成膜组,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。192株PA中,*exoS*、*exoU*、*exoY*和*exoT*阳性分别为163株(84.9%)、40株(20.8%)、183株(95.3%)和189株(98.4%)。不同成膜能力PA毒力基因*exoS*、*exoU*、*exoT*阳性率不同,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中强成膜组*exoS*阳性率低于中等成膜组($\chi^2 = 9.293, P < 0.01$)和弱成膜组($\chi^2 = 9.997, P < 0.01$);强成膜组*exoU*阳性率高于弱成膜组($\chi^2 = 10.803, P < 0.01$)。结论:中南大学湘雅医院临床分离的铜绿假单胞菌多具有生物被膜形成能力;泳动、蹭行能力与是否形成生物被膜相关,而与成膜能力强弱相关不明显;Ⅲ型分泌系统毒力基因与生物被膜形成能力可能相关。

[关键词] 铜绿假单胞菌;细菌生物被膜;泳动能力;蹭行能力;毒力基因

[中图分类号] Q939.11⁺2 [文献标志码] A

Relationship of biofilm-forming ability of *Pseudomonas aeruginosa* with swimming motility, twitching motility and virulence gene distribution

收稿日期:2021-01-21 接受日期:2021-05-16

基金项目:湖南省自然科学基金(2018JJ6058,2020JJ5900);湖南省科技创新项目(湘发改投资[2014]658号);湖南省卫生健康委科研计划(202111000032)

第一作者:税 剑,主管技师,主要从事临床微生物学研究;E-mail:shuijian2005_2005@163.com;https://orcid.org/0000-0001-8809-0175

通信作者:邹明祥,主任技师,教授,硕士生导师,主要从事临床微生物学研究;E-mail:zoumingxiang@126.com;https://orcid.org/0000-0003-2321-4629

SHUI Jian^{1,2}, WANG Haichen¹, TAO Xiaoyan¹, MIN Changhang¹, LI Jun¹, ZOU Mingxiang¹ (1. Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Clinical Laboratory, Affiliated Changsha Central Hospital, University of South China, Changsha 410004, China)

Corresponding author: ZOU Mingxiang, E-mail: zoumingxiang@126.com, <https://orcid.org/0000-0003-2321-4629>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the relationship of biofilm-forming ability of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) with swimming motility, twitching motility and virulence gene distribution. **Methods:** A total of 192 clinical isolates of PA were collected consecutively. Microtiter plate method was used to evaluate the ability to form biofilm. The swimming and twitching motilities were detected by plate method. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect virulence genes. **Results:** Of the 192 PA clinical isolates, 186 (96.9%) showed biofilm-forming ability. Among them, 36 isolates showed weak biofilm-forming ability, 84 exhibited moderate biofilm-forming ability and 66 showed strong biofilm-forming ability. The diameters of the swimming ring for PA with none biofilm-forming ability, weak biofilm-forming ability, moderate biofilm-forming ability, strong biofilm-forming ability were (9.12 ± 6.76) , (18.42 ± 7.51) , (19.10 ± 4.77) and (17.80 ± 5.27) mm, respectively. The diameters of the twitching ring for PA in above groups were (8.38 ± 1.50) , (17.21 ± 7.42) , (18.49 ± 5.62) and (20.44 ± 6.43) mm, respectively. The swimming motility and twitching motility of none biofilm-forming ability group were weaker than biofilm-forming ability groups (all $P < 0.05$). Among 192 PA strains, 163 were *exoS* positive (84.9%), 40 were *exoU* positive (20.8%), 183 were *exoY* positive (95.3%), and 189 were *exoT* positive (98.4%). The positive rate of PA virulence gene *exoS*, *exoU* and *exoT* were different in strains with different biofilm-forming abilities ($P < 0.05$). The rate of *exoS* in the strong biofilm-forming ability group was lower than that in the moderate biofilm-forming ability group ($\chi^2 = 9.293$, $P < 0.01$) and the weak biofilm-forming ability group ($\chi^2 = 9.997$, $P < 0.01$). The rate of *exoU* in the strong biofilm-forming ability group was higher than that in the weak biofilm-forming ability group ($\chi^2 = 10.803$, $P < 0.01$). **Conclusions:** Most clinical isolates of PA can form biofilm. Swimming and twitching motilities are related to the formation of biofilm, but not significantly related to strength of biofilm-forming ability. The virulence genes of type III secretion system for PA may be related to the biofilm-forming ability.

[**Key words**] *Pseudomonas aeruginosa*; Bacterial biofilm; Swimming motility; Twitching motility; Virulence gene

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(3): 345-351.]

[**缩略语**] 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA);聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

PA是临床常见的条件致病菌,易感染免疫力低下及皮肤黏膜受损的患者,且易定植于机体或

生物材料表面形成生物被膜^[1]。生物被膜可阻碍抗菌药物渗透,使细菌的耐药性增加10~1000倍,

导致慢性感染迁延不愈,给临床抗感染治疗带来极大的困难^[2-4]。Ⅲ型分泌系统是PA最重要的毒力因子,其通过效应蛋白引起宿主细胞凋亡和裂解,并协助PA逃避宿主免疫细胞的攻击^[5-7]。研究表明,鞭毛介导的泳动和Ⅳ型菌毛介导的蹭行与PA生物被膜形成的黏附阶段有关。然而,关于PA泳动、蹭行能力对生物被膜形成的影响以及Ⅲ型分泌系统毒力基因是否与生物被膜形成有关仍未明确。本研究收集了192株PA临床菌株,在体外构建生物被膜模型并对成膜能力进行定量测定,同时检测菌株的泳动、蹭行能力以及Ⅲ型分泌系统毒力基因,探讨菌株泳动、蹭行能力对成膜能力的影响,并分析PAⅢ型分泌系统毒力基因与成膜能力的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

192株非重复PA分离自中南大学湘雅医院临床各科室,所有菌株均经VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统鉴定,放置-80℃超低温冰箱冷冻保存。质控菌株ATCC27853购自国家卫生健康委临床检验中心。

1.2 主要仪器及试剂

VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统和比浊仪为法国BioMerieux公司产品;ABI2720基因扩增仪为美国ABI公司产品;紫外凝胶成像分析系统为美国Syngene公司产品;电泳仪及水平电泳槽为美国Hoefer公司产品;多功能酶标仪为奥地利Tecan公司产品。0.1%结晶紫、核酸染料为北京索莱宝科技有限公司产品;2×Taq PCR Master Mix试剂为北京百泰克生物技术有限公司产品;DNA Marker 2000为天根生化科技(北京)有限公司产品;琼脂糖为西班牙Biowest公司产品;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。泳动平板(胰蛋白胨1.0 g、氯化钠1.0 g、琼脂0.3 g溶于100 mL蒸馏水中,121℃高压蒸汽灭菌15 min,待培养基冷却至50~60℃倾注培养皿,4℃保存备用)和蹭行平板(胰蛋白胨1.0 g、氯化钠1.0 g、酵母提取物0.5 g、琼脂1.0 g溶于100 mL蒸馏水中,121℃高压蒸汽灭菌15 min,待培养基冷却至50~60℃后倾注培养皿,厚约3 mm,4℃保存备用)自配。

1.3 结晶紫染色半定量法检测PA成膜能力

参考文献^[8-9]等方法并作改进。将PA临床

分离株转种至哥伦比亚血平板上37℃培养24 h,挑取菌落接种至5 mL LB液体培养基中,37℃、200 r/min振荡培养18 h。用LB液体培养基调整菌液浓度至0.5麦氏浊度,吸取菌液100 μL加入96孔细胞培养板,每株菌做5个复孔,实验重复3次。5个阴性对照孔每孔加入100 μL LB液体培养基,37℃培养24 h。吸去液体培养基,用等渗氯化钠溶液清洗培养孔3次以去除浮游菌,37℃晾干。每孔加入0.1%结晶紫100 μL染色15 min,弃去染液,流水缓慢冲洗3次以除去未结合的染料,37℃晾干。每孔加入95%乙醇100 μL脱色10 min,酶标仪570 nm处测吸光度值。PA成膜能力判断:阴性对照平均吸光度值加上其标准差定义为Ac,其中检测值不超过Ac为不成膜;检测值超过Ac但不超过2倍Ac为弱成膜;检测值超过2倍Ac但不超过4倍Ac为中等成膜;检测值超过4倍Ac为强成膜。

1.4 泳动实验和蹭行运动检测PA运动能力

将PA临床菌株转种至哥伦比亚血平板,37℃培养24 h,挑取单个菌落接种至5 mL LB液体培养基中,37℃条件下200 r/min振荡培养18 h,用LB液体培养基调整菌液浓度至0.5麦氏浊度。取1 μL菌液接种于泳动平板的表面,每株菌接种3个位置,37℃培养24 h,拍照记录PA的泳动环检测泳动能力;取1 μL菌液接种于蹭行平板培养皿与培养基的交界面,每株菌接种3个位置,37℃培养24 h,轻轻弃去蹭行平板培养基,0.1%结晶紫染色10 min,拍照记录PA的蹭行环检测蹭行能力。ImageJ软件计算泳动环直径和蹭行环直径,GraphPad Prism 6.0软件作图并比较不同成膜能力PA泳动及蹭行能力的差异。

1.5 PCR检测PA毒力基因

采用煮沸法提取细菌总DNA。根据文献^[10-11]合成4对引物,引物序列见表1。PCR体系为20 μL,包括2×Taq PCR Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,DNA模板2 μL,蒸馏水6 μL。*exoS*、*exoU*、*exoY*的PCR条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,相应温度退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环,72℃延伸7 min;*exoT*的PCR条件:94℃预变性2 min,94℃变性30 s,58℃退火30 s,68℃延伸60 s,共36个循环,68℃延伸5 min。扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳(100 V)40 min后,凝胶成像系统下观察并拍照。

表 1 毒力基因引物序列

Table 1 PCR primers of virulence genes

基 因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
<i>exoS</i>	正向:ATCCTCAGGCGTACATCC 反向:ACGACGGCTATCTCTCCAC	328	55
<i>exoU</i>	正向:AGTGCTTACATTCCCCAGATTAAG 反向:TGTCAAAATTCTTGTGCGATCATCT	271	53
<i>exoY</i>	正向:CTTTCATCGTTCTGTCTCCTTCTT 反向:GTTAGAAACCACCTGACGATGAC	272	55
<i>exoT</i>	正向:AATCGCCGTCCAACCTGCATGCG 反向:TGTTCCGCCGAGGTACTGCTC	152	58

1.6 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用非参数秩和检验;计数资料用率(%)表示,采用行×列表 χ^2 检验,两两比较采用 χ^2 分割法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PA临床分离株成膜结果

检测结果显示,192株菌中186株能够形成生物被膜(96.9%),中等成膜和强成膜占78.1%,见表2,部分菌株结晶紫染色结果见图1。结果提示,PA临床分离株大多能形成生物被膜,且成膜能力较强。

表 2 192株不同成膜能力铜绿假单胞菌半定量检测结果
Table 2 Biofilm-forming ability of 192 *Pseudomonas aeruginosa*

成膜能力	株数(%)	吸光度值($\bar{x} \pm s$)
不成膜	6(3.1)	0.0956 ± 0.0068
弱成膜	36(18.8)	0.1658 ± 0.0354
中等成膜	84(43.7)	0.3265 ± 0.0647
强成膜	66(34.4)	0.8346 ± 0.5131

3、7、9为不成膜菌株;4、8为弱成膜菌株;5、6、10、12为中等成膜菌株;1、2、11为强成膜菌株;C为阴性对照。

图 1 部分铜绿假单胞菌菌株结晶紫染色结果

Figure 1 Crystal violet quantification of *Pseudomonas aeruginosa* strains

2.2 不同成膜能力PA的泳动能力和蹭行能力

192株PA临床分离株中,不成膜菌株、弱成膜菌株、中等成膜菌株、强成膜菌株泳动环直径分别为(9.12 ± 6.76)、(18.42 ± 7.51)、(19.10 ± 4.77)、(17.80 ± 5.27)mm;各组菌株蹭行环直径分别为(8.38 ± 1.50)、(17.21 ± 7.42)、(18.49 ± 5.62)、(20.44 ± 6.43)mm,部分菌株泳动、蹭行图见图2。不成膜组与各成膜组的泳动及蹭行能力比较差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),而各成膜组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示,PA的泳动和蹭行能力可影响生物被膜形成,但对生物被膜形成能力的强弱程度影响不大。

2.3 PA临床分离株毒力基因检测结果

192株PA中,*exoS*阳性菌株163株(84.9%),*exoU*阳性菌株40株(20.8%),*exoY*阳性菌株183株(95.3%),*exoT*阳性菌株189株(98.4%),部分菌株毒力基因电泳图见图3。不同成膜能力PA毒力基因*exoS*、*exoU*、*exoT*阳性率不同,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而不同成膜能力PA毒力基因*exoY*阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中,强成膜组*exoS*阳性率低于中等成膜组($\chi^2 = 9.293, P < 0.01$)和弱成膜组($\chi^2 = 9.997, P < 0.01$);强成膜组*exoU*阳性率高于弱成膜组($\chi^2 = 10.803, P < 0.01$),见表3。结果提示,PA临床菌株Ⅲ型分泌系统毒力基因与

1:不成膜菌株;2:弱成膜菌株;3:中等成膜菌株;4:强成膜菌株。

图 2 部分铜绿假单胞菌菌株泳动、蹭行实验结果

Figure 2 Swimming motility and twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa* strains

M:Marker 2000;1~16:PA菌株.
图 3 部分铜绿假单胞菌毒力基因电泳图
Figure 3 Virulence genes electrophoregram of *Pseudomonas aeruginosa* strains

表 3 不同成膜能力铜绿假单胞菌毒力基因携带率比较
Table 3 Analysis of difference in virulence genes for *Pseudomonas aeruginosa* strains with different biofilm-forming abilities

		[n(%)]			
成膜能力	n	exoS	exoU	exoY	exoT
不成膜	6	5(83.3)	0(0.0)	5(83.3)	5(83.3)
弱成膜	36	35(97.2)	2(5.6)	35(97.2)	35(97.2)
中等成膜	84	76(90.5)	15(17.9)	79(94.0)	84(100.0)
强成膜	66	47(71.2)*#	23(34.8)*	64(97.0)	65(98.5)
χ ² 值	—	15.349	14.221	3.140	7.072
P值	—	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05

“—”：无相关数据。与弱成膜组比较,*P<0.01;与中等成膜组比较,#P<0.01。

成膜能力强弱具有一定相关性。

3 讨 论

PA广泛存在于自然界及人体皮肤、消化道、呼吸道等部位。免疫力低下、皮肤及腔道黏膜受损患者容易感染此菌,引起急性或慢性感染。PA易黏附于机体或生物材料表面,分泌大量胞外基质形成生物被膜,抵抗外界压力,造成慢性持续性感染。本研究通过96孔板在体外模拟PA临床菌株的生物被膜形成能力,采用结晶紫染色法对PA生物被膜进行定量检测,结果显示96.9%的PA临床菌株能形成生物被膜,与已有研究结果一致^[12-14],且78.1%的菌株成膜能力较强,推测PA临床分离株形成生物被膜能力可能是目前临床治疗失败的

重要因素。
PA形成生物被膜是一个动态复杂的过程,首先需要细菌黏附于接触介质表面,继而不断分泌胞外基质将其紧紧包裹形成致密的膜状聚合物。在起始黏附过程中,PA鞭毛介导的泳动和Ⅳ型菌毛介导的蹭行发挥着重要作用。O'Toole等^[15]研究发现,PA鞭毛基因和Ⅳ型菌毛基因缺陷时,菌株的泳动能力和蹭行能力明显下降,菌株形成生物被膜的能力也显著下降,并证实鞭毛介导的泳动和Ⅳ型菌毛介导的蹭行影响PA的起始黏附,从而影响生物被膜的形成。本文资料显示,不成膜菌株的泳动能力和蹭行能力明显低于成膜菌株,但各成膜组菌株间的泳动、蹭行能力差异无统计学意义,表明PA泳动、蹭行能力可影响生物被膜形成,但对生物被膜形成能力的强弱程度影响较小。这可能与PA的泳动、蹭行能力主要作用于生物被膜形成的起始黏附阶段,而形成成熟的生物被膜还需要分泌大量胞外基质等复杂过程有关。

Ⅲ型分泌系统在PA致病过程中发挥重要作用,由exoS、exoU、exoT、exoY四个基因编码的蛋白ExoS、ExoU、ExoT、ExoY构成主要的毒素蛋白^[16-17]。其中,ExoS、ExoU这两种蛋白的临床意义最为重要,并以此将PA分为侵袭型(exoS)和细胞毒型(exoU)。ExoS蛋白具有腺苷二磷酸核糖转移酶活性,能抑制宿主免疫细胞的吞噬作用,破坏肌动蛋白细胞骨架结构重排,导致细胞凋亡等,与细菌侵袭有关,所致感染相对较轻;而ExoU蛋白具有磷脂酶A2活性,可引起细胞坏死,所致感染相对较

重。研究证实,携带 $exoU$ PA所致感染重,患者病死率高^[18]。本研究中携带 $exoU$ 基因的菌株多来自于重症监护室、神经内科、神经外科等的危重患者。国内外研究报道绝大多数PA携带 $exoT$ 、 $exoY$ 基因^[19-20]。本文资料中 $exoT$ 阳性率为98.4%, $exoY$ 阳性率为95.3%,与已有研究一致。极少数菌株 $exoT$ 、 $exoY$ 阴性,推测可能是菌株进化过程中基因丢失所致。本文资料中, $exoS$ 、 $exoU$ 阳性率分别为84.9%、20.8%,与已有研究结果相近^[21]。部分研究认为 $exoS$ 与 $exoU$ 相互排斥,不会同时出现于同一菌株中^[22-23],而本研究所收集的192株菌中有16株菌同时携带 $exoS$ 和 $exoU$,推测可能与菌株来源不同有关。

Choy等^[24]报道了眼分泌物中分离的强成膜PA的 $exoU$ 携带率高于中等成膜PA和弱成膜PA。本文资料也显示强成膜PA $exoS$ 阳性率低于中等成膜PA和弱成膜PA,而 $exoU$ 阳性率高于弱成膜PA,提示PA临床菌株Ⅲ型分泌系统毒力基因与成膜能力强弱具有一定相关性,但具体关系及机制还有待后续进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] WANG Y, GAO L, RAO X, et al. Characterization of lasR-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Sci Rep**, 2018, 8(1): 13344.
- [2] PUSA T. The importance of biofilm in the context of increasing bacterial resistance to antibiotics[J]. **Pol Merkur Lekarski**, 2019, 47(281): 197-202.
- [3] OLIVARES E, BADEL-BERCHOUX S, PROVOT C, et al. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections[J]. **Front Microbiol**, 2020, 10(1): 2894.
- [4] SHARMA G, RAO S, BANSAL A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets[J]. **Biologicals**, 2014, 42(1): 1-7.
- [5] FOULKES D M, MCLEAN K, HANEEF A S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections[J]. **Microorganisms**, 2019, 7(12): 707.
- [6] HASANNEJAD-BIBALAN M, JAFARI A, SABATI H, et al. Risk of type Ⅲ secretion systems in burn patients with *Pseudomonas aeruginosa* wound infection: a systematic review and meta-analysis[J]. **Burns**, 2021, 47(3): 538-544.
- [7] 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/OL]. **mBio**, 2018, 9(3): e00668.
- [8] 周俊立, 李柏生, 叶小华, 等. 医院分离铜绿假单胞菌多药耐药与细菌生物被膜之间的关系[J]. **广东医学**, 2015, 36(4): 512-513.
- [9] ZHOU Junli, LI Bosheng, YE Xiaohua, et al. The relationship between the multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital and the biofilm of bacteria[J]. **Guangdong Medical Journal**, 2015, 36(4): 512-513. (in Chinese)
- [9] 王政, 刘丁, 黄冬梅, 等. 鲍曼不动杆菌临床分离株生物被膜形成能力与耐药性的研究[J]. **中国病原生物学杂志**, 2010, 5(6): 405-407.
- [9] WANG Zheng, LIU Ding, HUANG Dongmei, et al. Study of the biofilm-forming ability and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. **Journal of Pathogen Biology**, 2010, 5(6): 405-407. (in Chinese)
- [10] PARK M H, KIM S Y, ROH E Y, et al. Difference of type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes ($exoU$ and $exoS$) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media[J]. **Auris Nasus Larynx**, 2017, 44(3): 258-265.
- [11] AJAYI T, ALLMOND L R, SAWA T, et al. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type Ⅲ secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system[J]. **J Clin Microbiol**, 2003, 41(8): 3526-3531.
- [12] 李晓霞, 郭阳, 张瑞琴, 等. 铜绿假单胞菌耐药率与生物膜形成能力之间的相关性分析[J]. **中华医院感染学杂志**, 2014, 24(12): 2868-2870.
- [12] LI Xiaoxia, GUO Yang, ZHANG Ruiqin, et al. Analysis of correlation between biofilm-forming ability and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Chinese Journal of Nosocomiology**, 2014, 24(12): 2868-2870. (in Chinese)
- [13] 李艳华, 刘文恩, 罗珊, 等. 铜绿假单胞菌生物被膜耐药性分析及 $tolA$ 和 $ndvB$ 基因检测[J]. **中华检验医学杂志**, 2015, 38(6): 416-418.
- [13] LI Yanhua, LIU Wenen, LUO Shan, et al. Analysis of the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to biofilm and detection of $tolA$ and $ndvB$ genes[J]. **Chinese Journal of Laboratory Medicine**, 2015, 38(6): 416-418. (in Chinese)
- [14] 杨维青, 刘晓峰, 黄震. 铜绿假单胞菌临床菌株生物被膜的定量分析[J]. **中国抗生素杂志**, 2009, 34(3): 181-183.
- [14] YANG Weiqing, LIU Xiaofeng, HUANG Zhen. Quantification for biofilm-forming of *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2009, 34(3): 181-183. (in Chinese)
- [15] O'TOOLE G A, KOLTER R. Flagellar and twitching

- motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. **Mol MicroBiol**, 1998, 30(2): 295-304.
- [16] LOMBARDI C, TOLCHARD J, BOUILLOT S, et al. Structural and functional characterization of the type three secretion system (T3SS) needle of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Front Microbiol**, 2019, 10: 573.
- [17] HAUSER A R. The type Ⅲ secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. **Nat Rev Microbiol**, 2009, 7(9): 654-665.
- [18] 黎晓强, 卓 超, 廖东江, 等. 铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统毒力相关蛋白的差异表达[J]. **中华医学杂志**, 2010, 90(12): 849-852.
- LI Xiaoqiang, ZHUO Chao, LIAO Dongjiang, et al. Research of differential expression of virulence-related proteins of T3SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **National Medical Journal of China**, 2010, 90(12): 849-852. (in Chinese)
- [19] 张秀彩, 张肖肖, 王忠永, 等. 铜绿假单胞菌中T3SS毒力基因分布、表达及与抗菌药物耐药相关性研究[J]. **临床检验杂志**, 2019, 37(1): 14-18.
- ZHANG Xiucui, ZHANG Xiaoxiao, WANG Zhongyong, et al. Distribution and expression of T3SS virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* and its correlation with drug resistance[J]. **Chinese Journal of Clinical Laboratory Science**, 2019, 37(1): 14-18. (in Chinese)
- [20] POBIEGA M, MACIAG J, POMORSKA-WESOŁOWSKA M, et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in Southern Poland: virulence factors and antibiotic resistance[J/OL]. **J Pediatr Urology**, 2016, 12(1): 36.e1-36.e6.
- [21] 李 昕, 刘 周, 姚 杰, 等. 合肥地区铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统毒力基因检测分析[J]. **中华医院感染学杂志**, 2017, 27(2): 251-254.
- LI Xin, LIU Zhou, YAO Jie, et al. Detection of type Ⅲ secretion system virulence-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* in Hefei[J]. **Chinese Journal of Nosocomiology**, 2017, 27(2): 251-254. (in Chinese)
- [22] 董晨晓, 宋诗铎, 王 悦, 等. 43株临床铜绿假单胞菌 $exoS$ 、 $exoU$ 基因的携带及其耐药性[J]. **中国感染控制杂志**, 2010, 9(2): 93-96.
- DONG Chenxiao, SONG Shiduo, WANG Yue, et al. Carrying of $exoS$ and $exoU$ in 43 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their drug resistance[J]. **Chinese Journal of Infection Control**, 2010, 9(2): 93-96. (in Chinese)
- [23] TANG Y, LI B, DAI J, et al. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Type Ⅲ secretion system using magnetic enrichment multiplex polymerase chain reaction and chemiluminescence[J]. **J Biomed nanotechnol**, 2016, 12(4): 762-769.
- [24] CHOY M H, STAPLETON F, WILLCOX M D P, et al. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis[J]. **J Med MicroBiol**, 2008, 57(12): 1539-1546.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 学术动态 ·

滕理送教授团队描绘出胃癌特殊亚型基因组图谱

2021年6月24日,浙江大学滕理送教授团队通过大规模临床样本回顾和基因组测序分析,描绘出甲胎蛋白(AFP)阳性胃癌的基因组图谱,有望为实现该亚型肿瘤精准治疗提供依据。这一成果“Whole-exome sequencing of alpha-fetoprotein producing gastric carcinoma reveals genomic profile and therapeutic targets”刊发在《自然·通讯》(*Nature Communications*)上(<https://www.nature.com/articles/s41467-021-24170-0>)。

研究人员对2011—2018年浙江大学医学院附属第一医院收治的5000余例胃癌患者信息进行回顾及筛选,构建了105例AFP阳性胃癌患者临床队列,对其中58对AFP阳性胃癌及癌旁标本进行了外显子测序,揭示了AFP阳性胃癌的体细胞突变特征、大片段拷贝数变异、胃癌关键通路基因变异情况等分子特征。针对AFP阳性胃癌中 $ERBB2$ 及 $CCNE1$ 基因拷贝数扩增明显富集的特点,研究人员在胃癌移植瘤PDX模型上进行了单分子靶向及联合靶向治疗探究,获得重要的临床前数据。

卢骏医师、丁永锋医师、陈艳妍医师为论文共同第一作者,研究得到国家自然科学基金、浙江省科技厅重大专项、浙江省自然科学基金等资助。