

CsgD 对沙门氏菌生物膜形成的调控作用及其影响因素的研究进展

黄颖¹, 彭玉倩¹, 王琪², 邱少富^{1,2}, 向莹^{2*}

1 郑州大学 公共卫生学院, 河南 郑州

2 解放军疾病预防控制中心, 北京

黄颖, 彭玉倩, 王琪, 邱少富, 向莹. CsgD 对沙门氏菌生物膜形成的调控作用及其影响因素的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 956-967.

HUANG Ying, PENG Yuqian, WANG Qi, QIU Shaofu, XIANG Ying. Research progress in the mechanism and influencing factors of CsgD regulating the biofilm formation of *Salmonella*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 956-967.

摘要: CsgD 作为沙门氏菌生物膜形成的核心调控蛋白, 通过调控生物膜的关键组成成分——纤维素和卷曲菌毛的表达, 进而影响生物膜的形成。近年来, 科学界在剖析沙门氏菌 CsgD 蛋白的调控网络及其复杂影响因素方面取得了较大进展。本文聚焦于 CsgD 在沙门氏菌生物膜形成过程中的调控功能, 系统梳理了环境因素如何影响 CsgD 的功能表达, 并全面分析了多种调控因子对 CsgD 的多层次调控作用, 旨在加深对沙门氏菌生物膜形成机制及其调控网络的理解, 并为后续研究提供可能的方向。

关键词: 生物膜; 沙门氏菌; CsgD; 环境因素; 调控因子

Research progress in the mechanism and influencing factors of CsgD regulating the biofilm formation of *Salmonella*

HUANG Ying¹, PENG Yuqian¹, WANG Qi², QIU Shaofu^{1,2}, XIANG Ying^{2*}

1 College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China

2 The Chinese PLA Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

Abstract: CsgD, a core regulatory protein for the biofilm formation of *Salmonella*, exerts its function by regulating the expression of key components (curli and cellulose) of the biofilm. In

资助项目: 国家自然科学基金(82202538, 82173580)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82202538, 82173580).

*Corresponding author. E-mail: icicle928@126.com

Received: 2024-09-08; Accepted: 2024-12-02; Published online: 2025-01-22

recent years, significant progress has been achieved in analyzing the regulatory network of *Salmonella* CsgD protein and its complex influencing factors. Focusing on the regulatory function of CsgD in the biofilm formation of *Salmonella*, this paper systematically introduces how environmental factors affect the CsgD expression and comprehensively analyzes the multi-level regulatory effects of various regulatory factors on CsgD, aiming to enrich our understanding about the mechanism and regulatory network of the biofilm formation of *Salmonella* and provide possible research directions.

Keywords: biofilm; *Salmonella*; CsgD; environmental factors; regulatory factor

沙门氏菌(*Salmonella*)属于肠杆菌科, 是一种革兰阴性杆状细菌^[1], 在自然界中广泛存在。沙门氏菌是全球食源性疾病的主要致病菌之一, 相关统计数据显示, 全球范围内约 30% 的食源性疾病病例可归因于沙门氏菌感染, 每年约有 1.31 亿腹泻病例由沙门氏菌引发, 导致约 37 万人死亡^[2-4]。在我国, 2020 年全国发生 7 073 起食源性疾病暴发事件, 其中沙门氏菌作为最常见的细菌性病原体, 造成了 3 446 起食源性疾病^[5-6]。沙门氏菌频繁引发与食物中毒紧密相关的公共卫生突发事件, 不仅严重威胁公众健康, 也凸显了沙门氏菌病防控工作的紧迫性与挑战性。

在沙门氏菌生长过程中, 随着环境中营养物质的消耗, 其生长速度减慢, 并伴随有细胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的分泌, 这些 EPS 促使沙门氏菌形成复杂的多细胞聚集体, 即生物膜(biofilm), 该结构以细胞间紧密交织、增强长期存活能力和耐药性为显著特征^[7-8]。因此, 生物膜的形成被认为是沙门氏菌在极端恶劣环境条件下(如极端干燥和营养匮乏)维持生存能力的重要策略。鉴于此, 深入剖析生物膜的形成过程及其背后的调控机制, 对于制定有效的沙门氏菌防控策略具有重要作用。

CsgD, 作为一个核心调控蛋白, 主要通过激活 *csgB*、*csgA* 和 *adrA* 基因从而影响生物膜中

的关键成分卷曲菌毛(curli)和纤维素(cellulose)的表达, 在生物膜的形成过程中发挥着至关重要的调控作用^[9-11]。同时, CsgD 的表达本身也受到一系列环境因子的精密调控, 如温度、营养条件和渗透压等, 这些环境因素通过改变相关基因的表达水平从而发挥作用, 体现了微生物对外部环境变化的敏锐响应与适应机制^[9,11-13]。近期, 科研界在揭示多调节因子如何协同作用于 CsgD 的调控网络方面取得了显著进展, 这不仅深化了对生物膜形成复杂性的认识, 也为理解 CsgD 在其中的核心作用提供了新的视角^[14-15]。本文通过系统性的文献综述, 对现有关于 CsgD 在沙门氏菌生物膜形成过程中调控机制的研究成果进行归纳与分析, 力图构建一个更为全面和深入的 CsgD 调控网络框架, 为进一步揭示沙门氏菌生物膜形成的分子机制、开发针对性的防控策略提供坚实的理论基础。

1 CsgD 调控沙门氏菌生物膜形成

1.1 CsgD 的核心调控作用

生物膜的核心组成成分之一为 EPS, 该复合物关键组成因素为卷曲菌毛、纤维素、生物膜相关蛋白(biofilm associated proteins, Bap)和 O 抗原多糖等^[16-17]。其中, 卷曲菌毛和纤维素作为 2 个关键成分, 通过增强细菌对宿主细胞及非生物表面的黏附能力, 显著促进了细胞间的

相互作用，在沙门氏菌生物膜的形成及其后续功能实现中扮演着至关重要的角色^[9,18-20]。相比之下，CsgD 作为沙门氏菌生物膜形成中的核心调控因子，通过精细调控卷曲菌毛和纤维素的合成与组装，不仅确保了生物膜结构的完整性，还维护了其功能的稳定性，从而在沙门氏菌生物膜的形成与功能实现中发挥着不可替代的作用^[12,21-23] (图 1)。

1.1.1 卷曲菌毛表达途径

卷曲菌毛作为一种独特的淀粉样蛋白纤维结构，在细菌表面形成并广泛参与细菌与环境的相互作用。这些复杂的纤维结构由特定的基因簇——*csgBAC-csgDEFG* 操纵子编码，体现了基因表达与细胞外基质构建之间的高度协调^[24]。

csgBAC 操纵子负责编码卷曲菌毛的 2 个关键成分：主要亚基 CsgA 和核心蛋白 CsgB，其中，CsgA 是卷曲菌毛的主要构成成分，其高度保守的氨基酸序列使得多个 CsgA 分子能够自组装成 β -折叠的淀粉样纤维结构；相比之下，CsgB 则作为支架蛋白，帮助稳定并引导 CsgA 的组装过程，确保卷曲菌毛的正确形成；CsgE 和 CsgF 蛋白作为转运辅助因子，在内膜与外膜之间形成了一个有效的通道，促进了 CsgA 和 CsgB 从细胞质到外膜的转运，最终，这些蛋白在外膜转运蛋白 CsgG 的协助下，被释放到细胞外空间，开始卷曲菌毛的组装过程^[25]。CsgC 作为一种抑制因子，在细胞内阻止 CsgA 蛋白过早地形成淀粉样纤维结构^[26]。转录因子 CsgD 在卷曲菌

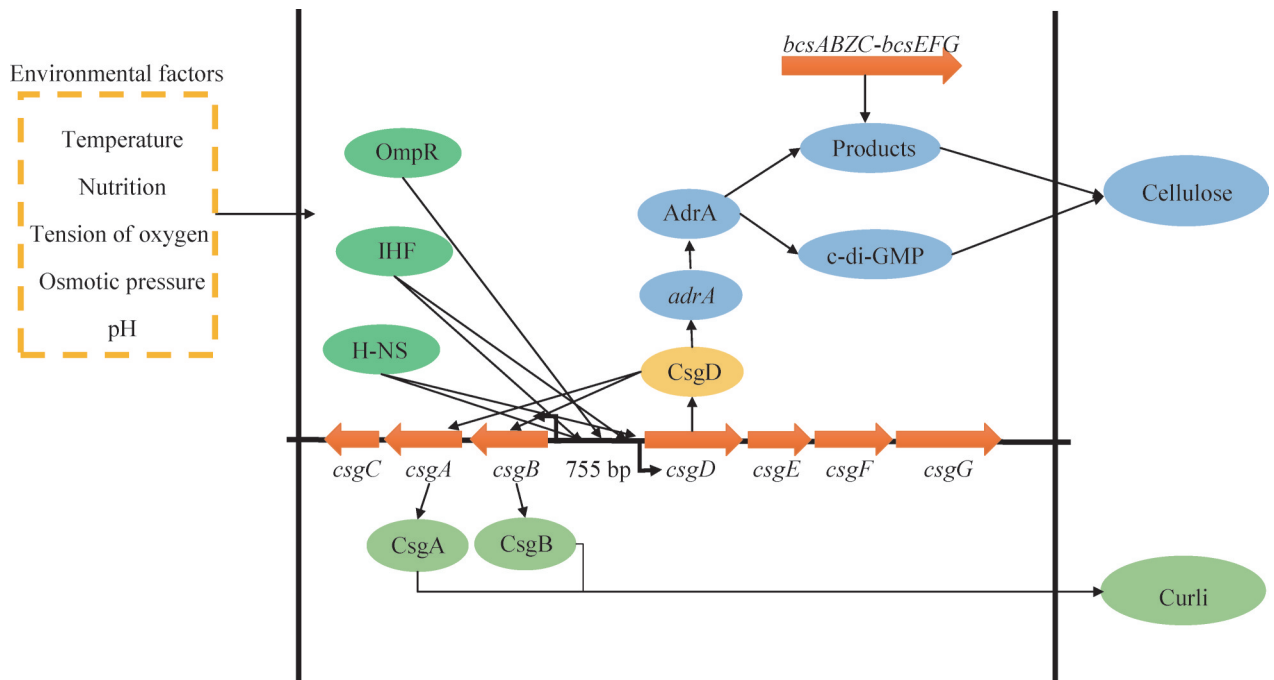


图1 *csgD*对生物膜形成的调控网络和影响*csgD*表达的细胞内外因素。*csgD*调控纤维素和卷曲菌毛的合成，以及影响*csgD*表达的细胞内外因素(温度、营养、氧分压、渗透压、pH等)和OmpR、IHF、H-NS等细胞内调控因子。

Figure 1 Regulatory network of *csgD* on biofilm formation and intracellular and external factors affecting *csgD* expression. *csgD* regulates cellulose and curli, as well as the intracellular and extracellular factors that affect *csgD* expression, including extracellular factors such as temperature, nutrition, oxygen partial pressure, osmolal pressure, pH, and intracellular regulators such as OmpR, IHF, and H-NS.

毛生物合成的调控网络中处于核心地位, 它通过特异性地结合到 *csgBAC* 操纵子的启动子区域, 激活该操纵子的转录, 从而上调 CsgA、CsgB 等关键蛋白的表达水平^[27]。这一过程是卷曲菌毛生物合成的起始步骤, 对于后续蛋白的合成、转运及组装过程具有深远的影响。

1.1.2 纤维素合成途径

纤维素即 $\alpha\beta$ -1,4-D-葡萄糖聚合物, 与生物膜中的其他胞外基质成分相互交织, 共同构建了一个复杂的三维网络结构, 促进细胞间相互作用, 保护细胞使其免受不利环境的影响; 纤维素的合成受到 *bcsABZC-bcsEFG* 操纵子的编码控制, 这一操纵子的精确表达对于细菌在特定生态位(如支持生物膜生长的环境)中构建稳定且功能性的纤维素支架至关重要^[27]。

纤维素的生物合成也受到 CsgD 的正向调控。CsgD 激活 *adrA* 的转录后, AdrA 通过与细菌纤维素合成操纵子 *bcsABZC-bcsEFG* 的一个或多个基因产物的直接相互作用, 在转录后水平上激活纤维素的合成; 或通过其 C 末端的 GGDEF 结构域产生 c-di-GMP, 从而激活纤维素合成酶 BcsA, 激活纤维素的生物合成^[10,27-29]。这一过程在转录后水平实现了对纤维素合成速率的精确调控, 确保了细胞能够根据环境需求适时调整其胞外基质成分的合成与组装。

1.2 CsgD 表达的双稳态特征

CsgD 在生物膜细菌群落中的表达存在双稳态特征, 即 CsgD 的表达水平在细菌群体中呈现出显著的异质性, 细菌群落内自然分化为高表达与低表达 CsgD 的 2 个亚群, 这一独特的表达模式不仅体现了细菌在能量利用上的高效策略, 还可能为细菌群落赋予额外的适应性和进化上的优势^[11]。Grantcharova 等^[13]在单细胞水平通过检测绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的 CsgD 表达水平, 发现 CsgD 在生物

膜发育过程中以双稳态方式表达; 高表达 CsgD 的细菌亚群在生物膜边缘负责合成并分泌大量的胞外基质成分(如卷曲菌毛和纤维素), 这些成分构成了生物膜的物理骨架, 与生物膜的形成与细胞聚集有关, 为细菌群落提供了结构上的稳定性; 生物膜内部低 CsgD 表达的细菌亚群被高表达 CsgD 的细菌亚群包裹, 由于生物膜内部营养物质缺失, 这些细菌可能将资源更多地投入到与其他生存和适应相关的活动中, 如代谢调节和探索新的生态位^[13]。该研究以蛋白标记的方式观察了 CsgD 蛋白在生物膜内的双稳态的表达, 但 CsgD 的双稳态表达模式形成的具体通路目前尚不清楚, CsgD 表达水平不同的细菌亚群之间如何进行物质交流和信号传递也尚不明确。

这种双稳态的 CsgD 表达模式为沙门氏菌生物膜构建了一种精细的资源分配机制, 它确保了生物膜结构的稳固性, 同时保留了细菌群落的多样性和适应性, 使得整个群落能够更灵活地应对环境变化^[11]。从进化生态学的角度来看, 这种表达模式可能促进了细菌在多变环境中的生存和繁衍, 增加了其适应不同生态位的能力。未来的研究可以进一步探索 CsgD 双稳态表达在不同环境条件下的变化规律, 以及其对沙门氏菌适应性和进化潜力的具体影响, 为开发新型抗菌疗法和疫苗提供科学依据。

2 影响 *csgD* 表达的环境因素

环境因素如温度、营养、氧分压、渗透压和 pH 等对生物膜 EPS 的产生及其化学组成的调控具有显著作用^[9,11-13]。*csgD* 基因的转录激活受到低渗透压环境、低温以及营养受限状态等一系列体外环境因素的诱导, 这些诱导作用通过 RNA 聚合酶的 sigma (σ) 因子 RpoS、多样化的转录因子以及小 RNA 分子 (small RNAs, sRNAs) 等

分子的作用于 CsgD 的调控网络(表 1)^[30-32]。

2.1 温度

在沙门氏菌和大肠杆菌中, *csgD* 基因的表达模式与生物膜构建过程紧密关联于环境温度的变化, 具体而言, 当环境温度降至 30 °C 以下时, *csgD* 基因的表达被显著激活, 进而促进生物膜的形成; 相反, 在较高温度条件下, 此过程则受到明显的抑制^[30-32], 这一温度依赖性调控机制已在多项研究中得到确凿证据支持。

Römling 等^[12]观察细菌在不同温度下的生长情况时, 发现一种与细菌生物膜形成相关的特定菌落形态——红色、干燥、粗糙型(red, dry and rough, rdar)仅在低温(28 °C)下表达, 在许多研究中, 是否具有 rdar 形态是评价某些肠杆菌科细菌(如沙门氏菌和大肠杆菌)生物膜形成能力的指标^[7,13]。这意味着温度变化作为上游信号, 在分子水平上直接调控 *csgD* 基因的转录活性, 从而调控生物膜的形成过程。

2.2 营养

葡萄糖在体外环境中被确认为是抑制 *csgD*

表达和生物膜形成的重要因素, 其存在显著削弱了这些过程的启动, 相反, 营养限制状态被视为激活 *csgD* 转录的早期信号之一^[9,33]。在细菌生长的早期阶段, *csgD* 的表达被严格抑制, 然而, 当细菌进入生长稳定期, 伴随着细菌密度的增高和营养的逐渐耗尽, *csgD* 的表达经历了一个显著的诱导过程, 其表达水平可较初期激增高达 370 倍^[34], 标志着细菌向生物膜形成阶段的过渡。

2.3 氧分压

在沙门氏菌中, 氧分压对 *csgD* 转录活性的影响在细菌生物学中展现出复杂的环境依赖性: 在无盐 LB 培养基中, 当菌株在微氧条件下培养时, *csgD* 的转录活性达到最大, 这表明有限的氧气供应对 *csgD* 的表达和沙门氏菌生物膜形成具有的促进作用; 而在好氧和厌氧环境下, *csgD* 的转录活性明显降低, 仅有 0-30% 的活性, 揭示了氧气浓度对 *csgD* 转录的双向调控作用^[9]。然而, 在 M9 基础培养基中, 氧分压对 *csgD* 转录活性的影响模式发生了显著变化, 好

表1 细胞内外因素对*csgD*的调控作用

Table 1 Regulation of *csgD* by intracellular and extracellular factors

Factors	Regulation of <i>csgD</i>		References
	Positive regulation	Negative regulation	
Extracellular factors			
Temperature	Below 30 °C	Higher than 30 °C	[12,30-32]
Nutritional conditions	Nutritional limitation	Glucose	[9,33-34]
Partial pressure of oxygen	Microoxygen condition	Aerobic and anaerobic conditions	[9]
pH	Alkaline condition (pH 8.5)	Acidic conditions (pH 5.5)	[9,35]
Osmotic pressure	Low osmotic pressure	High osmotic pressure	[36-41]
Intracellular factors			
OmpR	D1 and D2 binding sites	D3-D7 binding sites	[12,15,30,43-44]
MltE and MltC	Up-regulation of transcriptional activity	-	[43,45-46]
IHF	IHF1 binding sites	IHF3 binding site	[30,47-48]
H-NS	-	Repression of transcription	[44,49-51]

- means there are no reference.

氧条件成为促进 *csgD* 转录的关键因素, 而在微氧和厌氧环境中, *csgD* 的转录活性显著降低, 降幅约为 35%, 这表明培养基的成分及其所营造的微生物生长环境对氧分压调控 *csgD* 转录的机制具有重要影响, 氧分压对 *csgD* 转录的调控是一个多因素共同作用的结果, 其中包括培养基的成分以及细菌的代谢状况等^[9]。

2.4 pH 值

在沙门氏菌中, pH 值对 CsgD 的表达和生物膜的形成具有重要影响。研究表明, 碱性环境(pH 8.5)显著增强了 *csgD* 启动子的活性, 进而促进了生物膜相关基因的表达, 这对于沙门氏菌在碱性条件下的生存和适应至关重要; 相反, 在酸性环境(pH 5.5)中, *csgD* 启动子的活性受到抑制, 导致生物膜形成减弱, 这反映了沙门氏菌在面对不利 pH 条件时的一种适应性策略^[9]。这种 pH 依赖性的表达调控机制是沙门氏菌高度灵活的环境适应能力的体现。通过精细调控 CsgD 的表达水平, 细菌能够根据不同环境 pH 的变化, 调整其生物膜的形成能力, 进而优化其在不同生态位中的生存和繁衍^[35]。

值得注意的是, 在酸性条件下, 细菌 *csgD* 启动子的活性受到抑制的具体机制尚未完全明确, 但研究发现插入点突变会改变酸性环境对其活性的抑制作用, 如在野生型鼠伤寒沙门氏菌株 14028-4r 的 *csgD* 启动子区域-17 后插入单个 T, 将高度调控的野生型启动子转化为半组成型启动子(emiconstitutive promoter, scP*csgD*), 这种半组成型启动子在酸性条件下(pH 5.5)表现出较高的活性, 而在碱性条件下(pH 8.5)活性相对较低, 同时, 由于 scP*csgD* 的固有活性较高, 即使在不利的环境 pH 下, CsgD 和生物膜形成也能保持一定程度的表达^[9], 这进一步拓宽了沙门氏菌在不同环境条件下的生存策略。

2.5 渗透压

在沙门氏菌中, 渗透压是一个关键的环境因素, 它通过 EnvZ/OmpR 和 CpxA/CpxR 双组分信号系统来精细调控 *csgD* 及其相关基因(如 *csgBAC*)的表达, 这种调控机制在细菌的不同生长阶段展现出不同的效应^[36]。

在细菌生长的迟缓期和对数期, 渗透压对 CsgD 的表达有显著影响: 当处于低渗透压环境时, EnvZ 的活性降低, 导致外膜蛋白 R (outer membrane protein R, OmpR)保持低磷酸化状态, 低水平的 OmpR-P 激活 *ompF* 的转录, OmpF 的较大孔隙有利于外部环境中较低浓度营养物质向细胞内部扩散, 同时低水平的 OmpR-P 结合到 *csgD* 转录起始位点上游的高亲和力结合位点(-50.5 bp), 从而促进 *csgD* 的转录, 随后激活 *csgDEFG* 表达, 进而增加 *csgBA* 的表达, 这种机制有助于细菌在低渗透压条件下增强生物膜的形成能力, 以更好地适应环境; 相反, 在高渗透压条件下, CpxA/CpxR 和 EnvZ/OmpR 这 2 个信号系统均被激活, 从而导致 OmpR-P 和 CpxR-P 水平升高, OmpR-P 的水平升高可以抑制 *ompF* 的转录, 并激活 *ompC* 的转录, 此时, OmpC 的较小孔隙会阻碍细胞外大分子的进入, CpxR-P 和 OmpR-P 分别结合到 *csgD* 启动子的不同位点, 这种结合模式会干扰 RNA 聚合酶的结合, 从而导致 *csgD* 的转录受到抑制^[36-39]。这种抑制机制可能是细菌在高渗透压条件下减少不必要能量消耗的一种策略。

随着细菌的生长进入稳定期(如生长 18 h 后), 渗透压对 CsgD 及其相关基因表达的影响变得有限, 虽然高渗透压仍然能够激活 CpxA/CpxR 信号系统, 但这种激活并不再进一步影响 *csgD* 和 *csgBAC* 的表达^[40]。这表明细菌在稳定期已经建立了稳定的基因表达模式, 不再像生长初期和对数期那样对渗透压变化敏感。

同时, 在 EnvZ/OmpR 和 CpxA/CpxR 双组分信号系统中, 也存在一定的相互作用。CpxA 对 OmpR 有弱磷酸化作用, 但在 EnvZ 存在时, 与 EnvZ 的强磷酸化作用相比, CpxA 对 OmpR 的弱磷酸化作用不显现, 此时, EnvZ 激酶和磷酸酶活性之间的平衡能够使 OmpR 的磷酸化速度和去磷酸化过程都保持在高水平, 使得 OmpR-P 处于中间水平; 当 EnvZ 不存在、CpxR 与 CpxA 同时存在时, CpxA 可对 CpxR 和 OmpR 进行磷酸化, 由于 CpxR 能够与 OmpR 竞争, 从而导致 CpxA 磷酸化 OmpR 的过程被抑制, OmpR-P 水平降低^[41]。EnvZ/OmpR 和 CpxA/CpxR 双组分信号系统这种复杂的调控网络不仅展示了细菌能够巧妙地利用环境信号来调整其生理状态, 还揭示了生物体内在的复杂性和适应性。

3 多种调节因子调控 *csgD* 表达

在细菌生物膜的构建过程中, 多种调节因子发挥着关键作用, 这些调节因子不仅可诱导生物膜的形成, 还深刻影响着关键调控基因 *csgD* 的表达水平。*csgD* 的表达机制复杂且精细, 受到一系列细胞内调节蛋白的严密监控, 每种调节蛋白专门响应特定的环境参数或条件变化^[14]。

在沙门氏菌中, *csgBAC* 和 *csgDEFG* 操纵子之间的基因间区即是 *csgD* 的启动子, 也为多个转录因子提供了结合位点, 这一区域因此成为了一个信息整合的中心, 能够汇集并整合来自不同环境源头的信号, 协调调控生物膜形成相关基因的表达。截至目前, 已发现至少有 48 个转录因子与 *csgD* 启动子区域强结合, 其中 OmpR、裂解性转糖基酶 E (lytic transglycosylase E, MltE)、裂解性转糖基酶 C (lytic transglycosylase C, MltC)、整合作用宿主因子 (integration host

factor, IHF) 和组蛋白样核结构蛋白 (histone-like nucleoid structuring protein, H-NS) 等转录因子的调控作用目前已较为明确(表 1)^[14-15,42]。

3.1 OmpR

反应调节因子 OmpR, 作为 EnvZ/OmpR 双组分系统中的核心响应元件, 其磷酸化状态直接调控着 *csgD* 基因的转录活性, 在面临如低渗透压和酸性环境等外部刺激时, OmpR 经历磷酸化修饰, 随后与 *csgD* 启动子区域的特定序列紧密结合, 显著促进该基因的转录增强^[43]。研究表明, 在鼠伤寒沙门氏菌及大肠杆菌的 *csgD* 启动子上游, 均明确识别出 2 个与 OmpR 高度亲和的推定结合位点 D1 和 D2, 分别定位于启动子上游 -50.5 bp 和 -49.5 bp 的位置, 其中 D1 位点对于 *csgD* 的转录激活尤为关键, 此外, 研究证实, 当 *ompR* 基因缺失时, 这 2 种细菌中 *csgD* 的转录活动受到显著抑制甚至终止, 显示出 OmpR 在 *csgD* 转录调控中的不可或缺性^[12]。

在特定环境条件下, 如有氧环境中, 高水平的 OmpR 通过与位于 *csgD* 启动子上游 -34 bp 至 -220 bp 区间内的 4 个额外结合位点(D3-D6) 的相互作用, 转而抑制 CsgD 的表达, 新近发现的 D7 位点在微需氧条件下也展现出类似的抑制作用, 这种复杂的调控机制使得细菌能够精准且灵活地根据外界环境的变化调整 *csgD* 基因的表达水平, 以优化其生存策略和适应能力^[15,30,44]。

3.2 MltE 和 MltC

MltE 和 MltC 作为 2 种关键的裂解性转糖基酶 (lytic transglycosylase, LTG), 通过调控 *csgD* 的表达来影响生物膜的生成, 在沙门氏菌 $\Delta mltE$ 和 $\Delta mltC$ 双突变体的研究中发现, 相较于野生型菌株, 这些突变体中的 *csgD* 的 mRNA 水平下降至约为野生型的 47%, 且在刚果红琼脂平板上生长 24 h 后出现白色光滑的菌落外观, 这一

结果明确指出了这 2 种酶在 *csgD* 表达调控中的重要作用^[45]。然而, 在 $\Delta mltE$ 和 $\Delta mltC$ 的单突变体中 CsgD 表达变化不大, 且关于 *mltE* 和 *mltC* 如何通过联合作用从而影响生物膜形成的研究尚不十分明确。

尽管已知 RpoS 和 OmpR 是调控沙门氏菌生物膜生成的重要因素, 但研究发现 RpoS 和 OmpR 的过表达未恢复 $\Delta mltE\Delta mltC$ 双突变体的 CsgD 表达, 所以它们并未直接参与 MltE 和 MltC 介导的 *csgD* 表达调控路径; 然而, 在 $\Delta mltE\Delta mltC$ 突变体中过表达二鸟苷酸环化酶时, CsgD 表达上调, 表明细胞内第二信使 c-di-GMP 的积累能够补偿部分 $\Delta mltE\Delta mltC$ 双突变体对 rdar 形态及 CsgD 表达的影响, 这表明了 c-di-GMP 信号传导可能位于 MltE 和 MltC 调控路径的下游, 其作为关键的调控节点, 在调节生物膜相关基因如 *csgD* 的表达中发挥着不可替代的作用^[43]。

Son 等^[46]的研究发现, 当 *mltE* 和 *mltC* 缺失时, 细菌在中性环境下形态及生长情况正常, 但在酸性环境下显示出明显的细胞分离缺陷, 同时细菌生物膜通透性增加, 细菌对抗生素的耐药性下降, 研究表明 MltE 和 MltC 可在酸性条件下促进细菌生存和提高细菌对抗生素的耐药性。

3.3 IHF

IHF 作为一种在细菌中广泛存在且高度丰富的组蛋白样二聚体蛋白, 由 2–10 kDa 的同源亚基构成, 是多种细菌生理活动不可或缺的结构成分, IHF 通过与 *csgD* 启动子区内的特定 DNA 序列特异性结合, 从而调控 *csgD* 基因的转录激活或抑制状态, 进而影响生物膜的形成^[47]。

针对鼠伤寒沙门氏菌的 IHF 突变体研究表明, 与野生型相比, 突变体在刚果红琼脂上展

现出 rdar 形态的细菌数量显著减少, 且这一现象在不同温度条件下均保持稳定, 近年的一些研究还揭示了 IHF 在不同氧气浓度条件下的特定作用模式, 即在液体微氧环境中, IHF 突变株的 *csgD* 转录活性显著下降至野生型菌株的 1/3, 而在充分有氧的培养条件下, 其活性则未见明显变化^[30]。目前已在 *csgD* 基因的上、下游鉴定出 3 个 IHF 的结合位点: IHF1 位于 *csgD* 转录起始位点上游 181 bp 处, IHF2 位于下游 273 bp 处, 而 IHF3 则位于下游 626–666 bp 的位置, 在微需氧条件下, IHF 与 IHF1 位点的结合能够激活 *csgD* 的转录, 而与 IHF2 位点的结合则未观察到对 *csgD* 转录活性的显著影响, 然而, 当 IHF 与 IHF3 位点结合时, *csgD* 和 *scPcsgD* 的转录水平显著下降, 其中对 *scPcsgD* 的影响更为突出^[47-48]。

3.4 H-NS

H-NS 是一种分子量为 15.4 kDa 的 DNA 结构蛋白, 它在细菌(特别是革兰氏阴性菌)中扮演着基因表达调控的重要角色, 主要通过转录水平的沉默机制来实现^[49]。H-NS 蛋白能够直接结合到 *csgD* 基因的启动子区域, 通过其 N 端结构域自聚合, 改变 DNA 的结构, 使得 *csgD* 周围的 DNA 更加紧密, 从而干扰 RNA 聚合酶的结合和转录起始, 抑制 *csgD* 转录^[50]。Kim 等^[51]研究表明, H-NS 缺失会导致 CsgD 及其下游基因的表达上调, 从而增强生物膜的形成。

H-NS 对 *csgD* 基因的调控可能是细菌适应不同环境条件的一种机制, 并且可能因具体环境条件的不同而有所差异; 在细菌生长稳定期, IHF 水平的增加可能会抵消 H-NS 的抑制作用, 从而增加 *csgD* 的转录; 细菌中的第二信使 c-di-GMP 能够通过 H-NS 结合, 封闭其部分 DNA 结合位点, 从而解除 H-NS 对 *csgD* 基因表达的抑制作用^[44,51]。

4 *csgD* 启动子区突变的影响

当前研究表明,沙门氏菌 *csgBAC-csgDEFG* 操纵子基因间区的 755 bp 核苷酸序列内存在多个位点的点突变现象,这些突变对 *csgD* 基因的转录活性产生了显著影响,具体而言, -80A>C 和 -189A>G 双突变导致了 *csgD* 转录活性的降低, -80A>C 和 -189A>G 双突变株在刚果红琼脂培养基中培养后形成淡红色菌落,菌落表面有不完整的皱纹图案; -47T>C 突变直接失活了 *csgD* 的启动子,在刚果红琼脂培养基中培养后呈现 rdar 阴性,形成白色光滑型菌落; -17 至 -18 位之间的 T 插入突变以及 -44G>T 突变均被证实能够显著上调 *csgD* 的转录活性,在刚果红琼脂培养基中培养后表现出明显的菌落形态类型,呈现出较野生株更为巨大的 rdar 菌落形态,这种上调不受温度和 σ 因子 RpoS 表达的影响^[30,52]。在 *csgD* 启动子区发生的点突变通过影响 *csgD* 的转录活性,进而影响生物膜及菌落形态,但这些点突变是如何影响 *csgD* 的转录活性以及进而改变生物膜形态目前尚不明确。

csgD 基因启动子区 -44G>T 点突变是由 Römmling 等在 1998 年首次发现的,这种与沙门氏菌生物膜形成能力增强有关点突变先前仅在极个别的菌株中被发现,但近期有研究报道,携带此点突变的菌株近年来在我国多地广泛流行并已形成独立的流行克隆,具有国际传播的潜力,且该克隆的耐多药能力和生物膜形成能力均显著增强^[12,53]。

5 总结与展望

沙门氏菌生物膜的形成是一个高度复杂的分子过程,这一过程涵盖了纤维素、卷曲菌毛等多种关键组分的参与。其中, CsgD 作为调控生物膜形成的核心转录因子,其表达受到多种

环境因素的精密调控,这些环境因素通过直接或间接的方式作用于 CsgD 的表达,从而显著影响生物膜的结构与功能。

尽管当前已有诸多研究揭示了环境因素和多种调控因子对 CsgD 表达的影响,但大多研究局限于作用的现象层面,缺少调控作用的具体通路的研究。这些因素之间的相互作用模式以及由此构建的复杂调控网络架构,仍缺乏全面而深入的理解。因此,为了透彻阐明沙门氏菌生物膜形成的分子调控机制,并以此为基础探索针对生物膜相关疾病的新型预防与治疗策略,迫切需要开展更为系统、深入的科学研究,这些研究应聚焦于解析调控因子间的互作机制,构建详尽的调控网络模型,以及阐明这些网络如何动态响应环境变化以调控生物膜的形成与功能。

作者贡献声明

黄颖:整体构思与设计,负责收集和整理相关文献,参与文献筛选和数据整理工作,并对文献中的相关数据进行综合分析;彭玉倩:参与相关文献的筛选与整理,在论点构建过程中提供重要支持;王琪:负责图表设计和排版,协助进行校对和语言润色;邱少富:提供专业建议,协助审稿和修改,确保内容的科学性和准确性;向莹:提供专业建议,协助审稿和修改,确保内容的科学性和准确性。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] DARWIN KH, MILLER VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(3): 405-428.
- [2] 李月华,赵格,赵建梅,刘俊辉,王君玮. 欧盟、美国及国

- 内畜禽屠宰环节沙门氏菌监控现状[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(6): 69-75.
- LI YH, ZHAO G, ZHAO JM, LIU JH, WANG JW. Discussion on the monitoring status of *Salmonella* during livestock and poultry slaughtering in EU, the United State and China[J]. China Animal Health Inspection, 2021, 38(6): 69-75 (in Chinese).
- [3] KIRK MD, PIRES SM, BLACK RE, CAIPO M, CRUMP JA, DEVLEESSCHAUWER B, DÖPFER D, FAZIL A, FISCHER-WALKER CL, HALD T, HALL AJ, KEDDY KH, LAKE RJ, LANATA CF, TORGERSON PR, HAVELAAR AH, ANGULO FJ. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis[J]. PLoS Medicine, 2015, 12(12): e1001921.
- [4] WANG ZN, HUANG CH, LIU YH, CHEN JQ, YIN R, JIA CH, KANG XM, ZHOU X, LIAO SH, JIN XY, FENG MY, JIANG ZJ, SONG Y, ZHOU HY, YAO YC, TENG L, WANG BK, LI Y, YUE M. Salmonellosis outbreak archive in China: data collection and assembly[J]. Scientific Data, 2024, 11(1): 244.
- [5] ZHANG YW, LIU KK, ZHANG ZB, TIAN S, LIU ML, LI XG, HAN YR, ZHU KP, LIU HB, YANG CJ, LIU HB, DU XY, WANG Q, WANG H, YANG MJ, WANG LG, SONG HB, YANG HY, XIANG Y, QIU SF. A severe gastroenteritis outbreak of *Salmonella enterica serovar enteritidis* linked to contaminated egg fried rice, China, 2021[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 779749.
- [6] LI HQ, LI WW, DAI Y, JIANG YY, LIANG JH, WANG ST, ZHUANG MQ, HUANG Z, XU LZ, XUE B, LIU JK, HAN HH, PIRES SM, FU P, GUO YC. Characteristics of settings and etiologic agents of foodborne disease outbreaks—China, 2020[J]. China CDC Weekly, 2021, 3(42): 889-893.
- [7] MacKENZIE KD, PALMER MB, KÖSTER WL, WHITE AP. Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2017, 4: 138.
- [8] WALDNER LL, MacKENZIE KD, KÖSTER W, WHITE AP. From exit to entry: long-term survival and transmission of *Salmonella*[J]. Pathogens, 2012, 1(2): 128-155.
- [9] GERSTEL U, RÖMLING U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(10): 638-648.
- [10] ZOGAJ X, NIMTZ M, ROHDE M, BOKRANZ W, RÖMLING U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(6): 1452-1463.
- [11] UHLICH GA, KEEN JE, ELDER RO. Mutations in the *csfD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2367-2370.
- [12] RÖMLING U, SIERRALTA WD, ERIKSSON K, NORMARK S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(2): 249-264.
- [13] GRANTCHAROVA N, PETERS V, MONTEIRO C, ZAKIKHANY K, RÖMLING U. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica serovar typhimurium*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(2): 456-466.
- [14] MA ZM, LI NA, NING CC, LIU YC, GUO Y, JI CH, ZHU XZ, MENG QL, XIA XZ, ZHANG XX, CAI XP, CAI KJ, JUN Q. A novel LysR family factor STM0859 is associated with the responses of *Salmonella typhimurium* to environmental stress and biofilm formation[J]. Polish Journal of Microbiology, 2021, 70(4): 479-487.
- [15] YAN CH, CHEN FH, YANG YL, ZHAN YF, HERMAN RA, GONG LC, SHENG S, WANG J. The transcription factor CsgD contributes to engineered *Escherichia coli* resistance by regulating biofilm formation and stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(18): 13681.
- [16] LATASA C, ROUX A, TOLEDO-ARANA A, GHIGO JM, GAMAZO C, PENADÉS JR, LASA I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica serovar enteritidis*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 58(5): 1322-1339.
- [17] SOLANO C, GARCÍA B, VALLE J, BERASAIN C, GHIGO JM, GAMAZO C, LASA I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(3): 793-808.
- [18] BIAN Z, YAN ZQ, HANSSON GK, THORÉN P, NORMARK S. Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2001, 183(4): 612-619.
- [19] CHEN H, YAN CH, ZHAN YF, GENG LT, ZHU LL, GONG LC, WANG J. Boron derivatives accelerate biofilm formation of recombinant *Escherichia coli* via increasing quorum sensing system autoinducer-2 activity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8059.
- [20] WHITE AP, GIBSON DL, KIM W, KAY WW, SURETTE MG. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(9): 3219-3227.
- [21] CUCARELLA C, SOLANO C, VALLE J, AMORENA B, LASA I, PENADÉS JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(9): 2888-2896.
- [22] 张若楠, 徐诺, 陆游, 冯政, 陈素娟, 秦涛, 阴银燕, 彭大新. 生物被膜形成关键基因 *csfD* 对鼠伤寒沙门菌黏附侵袭上皮细胞能力的影响[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(11): 65-71.

- ZHANG RN, XU N, LU Y, FENG Z, CHEN SJ, QIN T, YIN YY, PENG DX. Effects of the key gene *csgD* related biofilm formation on the abilities of *Salmonella typhimurium* of adhesion to and invasion into epithelial cells[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(11): 65-71 (in Chinese).
- [23] 陈欢, 耿丽恬, 黄婷, 宫璐婵, 吴福安, 王俊. 转录调控因子 CsgD 强化重组大肠埃希菌生物被膜催化转化桑树黄酮苷的研究[J]. *蚕业科学*, 2023, 49(6): 533-543.
- CHEN H, GENG LT, HUANG T, GONG LC, WU FA, WANG J. Study on enhancing conversion of mulberry flavonoid glycoside catalyzed by accelerating recombinant *Escherichia coli* biofilm formation via transcriptional regulator CsgD[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2023, 49(6): 533-543 (in Chinese).
- [24] BARNHART MM, CHAPMAN MR. Curli biogenesis and function[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60: 131-147.
- [25] ROBINSON LS, ASHMAN EM, HULTGREN SJ, CHAPMAN MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(3): 870-881.
- [26] EVANS ML, CHORELL E, TAYLOR JD, ÅDEN J, GÖTHESON A, LI F, KOCH M, SEFER L, MATTHEWS SJ, WITTUNG-STAFSHED P, ALMQVIST F, CHAPMAN MR. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation[J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(3): 445-455.
- [27] LIU Z, NIU H, WU SY, HUANG R. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(1): e1.
- [28] ZORRAQUINO V, GARCÍA B, LATASA C, ECHEVERZ M, TOLEDO-ARANA A, VALLE J, LASA I, SOLANO C. Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(3): 417-428.
- [29] AHMAD I, CIMDINS A, BESKE T, RÖMLING U. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of *csgD* expression in *Salmonella typhimurium*[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 27.
- [30] ZOGAJ X, BOKRANZ W, NIMTZ M, RÖMLING U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(7): 4151-4158.
- [31] GERSTEL U, PARK C, RÖMLING U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(3): 639-654.
- [32] MILLER AL, PASTERNAK JA, MEDEIROS NJ, NICASTRO LK, TURSIS SA, HANSEN EG, KROCHAK R, SOKARIBO AS, MacKENZIE KD, PALMER MB, HERMAN DJ, WATSON NL, ZHANG Y, WILSON HL, WILSON RP, WHITE AP, TÜKEL Ç. *In vivo* synthesis of bacterial amyloid curli contributes to joint inflammation during *S. typhimurium* infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(7): e1008591.
- [33] JACKSON DW, SIMECKA JW, ROMEO T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(12): 3406-3410.
- [34] ARNQVIST A, OLSÉN A, NORMARK S. Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(6): 1021-1032.
- [35] 吴建菊, 冯守帅. 蓝光调控生物膜关键基因提高大肠杆菌耐酸性[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(15): 1-7.
- WU JJ, FENG SS. Enhancing the acid resistance of *Escherichia coli* by blue light-regulated biofilm key genes[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(15): 1-7 (in Chinese).
- [36] JUBELIN G, VIANNEY A, BELOIN C, GHIGO JM, LAZZARONI JC, LEJEUNE P, DOREL C. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(6): 2038-2049.
- [37] COLLINSON SK, EMÖDY L, MÜLLER KH, TRUST TJ, KAY WW. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(15): 4773-4781.
- [38] PASQUA M, COLUCCIA M, EGUCHI Y, OKAJIMA T, GROSSI M, PROSEDA G, UTSUMI R, COLONNA B. Roles of two-component signal transduction systems in *Shigella* virulence[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(9): 1321.
- [39] GOH EB. Discovering new regulon members of the *Escherichia coli* EnvZ/OmpR two-component signal transduction system[D]. Vancouver: University of British Columbia, 2008.
- [40] SOKARIBO AS, HANSEN EG, McCARTHY M, DESIN TS, WALDNER LL, MacKENZIE KD, MUTWIRI G Jr, HERMAN NJ, HERMAN DJ, WANG YJ, WHITE AP. Metabolic activation of CsgD in the regulation of *Salmonella* biofilms[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 964.
- [41] SIRYAPORN A, GOULIAN M. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(2): 494-506.
- [42] MIKA F, HENGGE R. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*[J]. *RNA Biology*, 2014, 11(5): 494-507.
- [43] HAMILTON S, BONGAERTS RJM, MULHOLLAND F, COCHRANE B, PORTER J, LUCCHINI S, LAPPIN-SCOTT HM, HINTON JCD. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 599.
- [44] OGASAWARA H, YAMADA K, KORI A, YAMAMOTO K, ISHIHAMA A. Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 8): 2470-2483.
- [45] MONTEIRO C, FANG X, AHMAD I, GOMELSKY M, RÖMLING U. Regulation of biofilm components in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* by lytic transglycosylases involved in cell wall turnover[J].

- Journal of Bacteriology, 2011, 193(23): 6443-6451.
- [46] SON JE, PARK SH, CHOI U, LEE CR. Lytic transglycosylase repertoire diversity enables intrinsic antibiotic resistance and daughter cell separation in *Escherichia coli* under acidic stress[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2024, 68(7): e0037224.
- [47] GERSTEL U, KOLB A, RÖMLING U. Regulatory components at the *csgD* promoter: additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5' untranslated region[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 261(1): 109-117.
- [48] GERSTEL U, RÖMLING U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*[J]. Research in Microbiology, 2003, 154(10): 659-667.
- [49] DORMAN CJ. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(5): 391-400.
- [50] 王洁, 董新波, 高丽晓, 周冬生, 殷喆, 张义全. H-NS蛋白对副溶血弧菌 *hcp1* 的转录调控[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 143-149.
- WANG J, DONG XB, GAO LX, ZHOUT D, YIN Z, ZHANG YQ. Transcriptional regulation of *hcp1* by H-NS in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 143-149.
- [51] KIM EA, BLAIR DF. Function of the histone-like protein H-NS in motility of *Escherichia coli*: multiple regulatory roles rather than direct action at the flagellar motor[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(19): 3110-3120.
- [52] RÖMLING U, BIAN Z, HAMMAR M, SIERRALTA WD, NORMARK S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(3): 722-731.
- [53] XIANG Y, ZHU KP, MIN KY, ZHANG YW, LIU JF, LIU KK, HAN YR, LI XG, DU XY, WANG X, HUANG Y, LI XP, PENG YQ, YANG CJ, LIU HB, LIU HB, LI XY, WANG H, WANG C, WANG Q, et al. Characterization of a *Salmonella enterica serovar typhimurium* lineage with rough colony morphology and multidrug resistance[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 6123.