

# 硫氧还蛋白 YbbN 调控生物被膜形成及细胞毒性增强副溶血弧菌致病性

芮闯<sup>1#</sup>, 郭容<sup>2#</sup>, 卢淑淇<sup>2</sup>, 吴佩洁<sup>3</sup>, 邱索平<sup>3</sup>, 韩先干<sup>2</sup>, 蒋蔚<sup>2\*</sup>, 李婷婷<sup>1\*</sup>

1 上海健康医学院, 上海

2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海

3 从化海关综合技术服务中心, 广东 广州

芮闯, 郭容, 卢淑淇, 吴佩洁, 邱索平, 韩先干, 蒋蔚, 李婷婷. 硫氧还蛋白 YbbN 调控生物被膜形成及细胞毒性增强副溶血弧菌致病性[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4420-4430.

RUI Chuang, GUO Rong, LU Shuqi, WU Peijie, QIU Suoping, HAN Xiangan, JIANG Wei, LI Tingting. Thioredoxin YbbN regulates biofilm formation and cytotoxicity to enhance the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4420-4430.

**摘要:** 硫氧还蛋白家族在细菌氧化应激防御和毒力调控中具有重要作用, 但其成员 YbbN 蛋白在副溶血弧菌中的功能尚不明确。【目的】揭示 YbbN 蛋白对副溶血弧菌生物学特性和致病性的调控作用, 为开发新型抗感染策略提供潜在靶点。【方法】使用同源重组技术构建副溶血弧菌 SH112 株的 *ybbN* 基因缺失株( $\Delta ybbN$ )和互补株( $C\Delta ybbN$ ), 比较各菌株的生长特性、运动性、生物被膜形成能力、细菌间竞争、细胞黏附、细胞毒性以及对小鼠的致病性。【结果】*ybbN* 缺失不影响细菌生长、运动性、细胞黏附和定殖能力, 削弱了副溶血弧菌的关键致病特性: 生物被膜形成能力降低 19%–30%, 对大肠杆菌的杀伤效率极显著下降(\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ), 对 HeLa 细胞的毒性减弱 27%, 小鼠感染存活率提升 87.5%。【结论】本研究阐明 YbbN 通过调控副溶血弧菌的生物被膜形成、细菌竞争和宿主细胞毒性等关键环节, 显著影响其生物学特性和致病性。这一发现不仅拓展了对硫氧还蛋白家族蛋白功能多样性的认知, 更为防控副溶血弧菌感染提供了新的分子靶标和理论依据。

**关键词:** 副溶血弧菌; 硫氧还蛋白; YbbN; 生物学特性; 毒力调控

资助项目: 国家自然科学基金(32473039); 上海市自然科学基金(21ZR1477000)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32473039) and the Shanghai Natural Science Foundation (21ZR1477000).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: LI Tingting, litt@sumhs.edu.cn; JIANG Wei, jiangwei@shvri.ac.cn

Received: 2025-03-03; Accepted: 2025-05-12; Published online: 2025-07-11

# Thioredoxin YbbN regulates biofilm formation and cytotoxicity to enhance the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*

RUI Chuang<sup>1#</sup>, GUO Rong<sup>2#</sup>, LU Shuqi<sup>2</sup>, WU Peijie<sup>3</sup>, QIU Suoping<sup>3</sup>, HAN Xiangan<sup>2</sup>, JIANG Wei<sup>2\*</sup>, LI Tingting<sup>1\*</sup>

1 Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, China

3 Conghua Customs Comprehensive Technical Service Center, Guangzhou, Guangdong, China

**Abstract:** The thioredoxin family plays crucial roles in bacterial oxidative stress defenses and virulence regulation, while the function of its member YbbN in *Vibrio parahaemolyticus* remains unclear. **[Objective]** To elucidate the regulatory role of YbbN in the biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*, providing potential targets for developing novel anti-infection strategies. **[Methods]** The *ybbN* knockout strain ( $\Delta ybbN$ ) and complementary strain ( $C\Delta ybbN$ ) of *Vibrio parahaemolyticus* SH112 were constructed by homologous recombination. The strains were compared regarding the growth characteristics, motility, biofilm formation, bacterial competition, cell adhesion, cytotoxicity, and pathogenicity in mice. **[Results]** Although the knockout of *ybbN* showed no significant effects on bacterial growth, motility, cell adhesion, or colonization, it markedly attenuated key pathogenic traits. Specifically, it decreased the biofilm formation (by 19%–30%), killing efficiency against competitive bacteria (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ), and cytotoxicity in HeLa cells (by 27%), while increasing the survival rate of mice by 87.5%. **[Conclusion]** This study demonstrates for the first time that YbbN specifically regulates critical aspects involved in biofilm formation, bacterial competition, and cytotoxicity in host cells, significantly influencing the biological characteristics and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. These findings not only expand the understanding about the functional diversity of the thioredoxin family proteins but also provide new molecular targets and a theoretical basis for preventing *Vibrio parahaemolyticus* infections.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; thioredoxin; YbbN; biological characteristics; virulence regulation

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)集中分布于温暖海域及河口环境,并在鱼类、虾类和贝类等水产品中广泛存在,是全球食源性疾病的主要病原体之一<sup>[1-2]</sup>。人类因摄食受副溶血弧菌污染的海鲜可引发急性胃肠炎<sup>[3]</sup>。在极少数情况下,该菌可经创面入侵引发致死性败血症<sup>[4]</sup>。作为全球性的关键食源致病菌,副溶血弧菌不

仅严重制约水产养殖业发展,而且严重威胁公共卫生<sup>[5-6]</sup>。因此,解析副溶血弧菌致病性的潜在机制对于制定有效的控制措施和预防策略具有重要意义。

病原体具有一系列复杂的防御系统,其中硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)超家族的成员在调控氧化还原反应中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。Trx系统

作为一种关键的抗氧化系统，通过其二硫键还原酶活性在防御氧化应激方面发挥核心作用，是细菌感染期间氧化还原调节的关键参与者，并在宿主-病原体相互作用中起到关键调控功能<sup>[8-9]</sup>。此外，Trx 系统能够调控多种生理过程，如新陈代谢、运动性、宿主适应性、毒力表达和生物被膜的形成<sup>[10]</sup>。YbbN 作为 Trx 家族的重要成员，其结构包含典型 Trx 结构域及可能的 TPR 结构域，虽缺乏传统 Trx 蛋白的氧化还原酶活性，但表现出独特的分子伴侣功能<sup>[11-12]</sup>。研究表明 YbbN 可通过直接结合底物或与 GroEL 互作发挥调控作用<sup>[13]</sup>。值得注意的是，Trx 超家族成员功能多样，例如：大肠杆菌 Trx 家族蛋白 DsbC 在蛋白质折叠中发挥作用<sup>[14]</sup>；幽门螺杆菌中 TrxA 能够修复过氧化物损伤，促进胃黏膜定殖<sup>[15]</sup>。然而，目前在副溶血弧菌中关于 Trx 家族中 YbbN 对宿主致病性作用的机制仍知之甚少。

本研究通过同源重组技术构建了副溶血弧菌 SH112 株 *ybbN* (*vp0806*) 基因缺失株及其互补株，通过系统比较各菌株的生长特性、运动能力、生物被膜形成能力、细菌间竞争、细胞黏附、细胞毒性以及对小鼠的致病性，以期阐明 Trx 家族蛋白 YbbN 在副溶血弧菌生物学特性和致病性中的具体作用机制，为开发针对 Trx 系统

的新型抗菌策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒、试剂和实验动物

副溶血弧菌 SH112 株(*tdh*<sup>+</sup>，血清型 O3:K6)、大肠杆菌 HB101 (pRK2013)、CC118λpir、DH5α，质粒 pYAK1 和 pMMB207，以及 HeLa 细胞均由本实验室保存；CytoTox 96®非放射性试剂盒购自 Promega 公司；分子克隆工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司；DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司；institute of cancer research (ICR)小鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司。

### 1.2 引物设计与合成

本研究所用引物(表 1)依据副溶血弧菌 RIMD 2210633 标准株的 *ybbN* 基因序列设计。以 *SacB*-F/R 为引物，通过 PCR 检测鉴定 pYAK1 在细菌中的凋亡情况。

### 1.3 *ybbN* 基因缺失株与互补株的构建

参照文献[16]的方法构建基因缺失株。以野生株(wild type strain, WT)副溶血弧菌 SH112 株的基因组 DNA 为模板，采用引物对 *ybbN*-A/B 和 *ybbN*-C/D 分别扩增目标基因上、下游同源臂。随后，以 *ybbN*-A/D 为引物进行融合 PCR，获得缺失片段 *ybbN*-AD。将此片段双酶切后克

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzyme	Product size (bp)
<i>ybbN</i> -A	ACCGGATCCTCACGCACTAACCAGCAATA	<i>Bam</i> H I	588
<i>ybbN</i> -B	CTGAGTGTCTTGCTTTTAATTCAGGT		
<i>ybbN</i> -C	AGCAAGGACACTCAGGCGCAGAGTTCTTCTA		409
<i>ybbN</i> -D	ACCGCATGCAAATGACCTCTTGTGCTGGA	<i>Pst</i> I	
<i>ybbN</i> -E	GTGCTCAAGGTGAAGGTGCGC		Wide type: 2 538
<i>ybbN</i> -F	TTGAGGATTTCTGCCTGACG		Mutant: 1 683
<i>ybbN</i> -pMMB-F	ATTCTGCAGATGCAATCCCCATTTATCGT	<i>Pst</i> I	873
<i>ybbN</i> -pMMB-R	ACTGAGCTCTTAGTACAAGATGGAGTACA	<i>Sac</i> I	
<i>SacB</i> -F	ACGGCACTGTCGCAAATA		600
<i>SacB</i> -R	TTCCGTCACCGTCAAAGAT		

隆至 pYAK1 载体, 构建重组质粒 pYAK1-*ybbN*, 并转化大肠杆菌 CC118 $\lambda$ pir, 获得重组菌株 pYAK1-*ybbN*-CC118 $\lambda$ pir。通过接合转移将重组菌株 pYAK1-*ybbN*-CC118 $\lambda$ pir 导入 WT, 利用含 10  $\mu$ g/mL 氯霉素的 TCBS 平板和含 20% 蔗糖的 LB 平板筛选接合子, 并使用引物对 *ybbN*-E/F 和 *SacB*-F/R 进行 PCR 验证, 缺失株命名为  $\Delta$ *ybbN*。

使用引物对 *ybbN*-pMMB-F/R 扩增 *ybbN* 基因完整 ORF 片段, 连接至 pMMB207 载体, 转化大肠杆菌 CC118 $\lambda$ pir 感受态细胞, 获得互补质粒 pMMB-*ybbN*。通过接合转移将 pMMB-*ybbN* 导入  $\Delta$ *ybbN*, 经引物 *ybbN*-pMMB-F/R PCR 鉴定阳性克隆, 命名为互补株 C $\Delta$ *ybbN*。

#### 1.4 生长曲线测定

挑取 WT、 $\Delta$ *ybbN* 及 C $\Delta$ *ybbN* 单菌落, 过夜培养后接种至含 3% NaCl 的 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至对数生长期 ( $OD_{600}=0.20\pm 0.02$ )。取 100  $\mu$ L 菌液接种至 96 孔板, 37  $^{\circ}$ C 静态孵育, 每间隔 1 h 测定  $OD_{600}$ , 持续 12 h, 绘制生长曲线。

#### 1.5 运动性测定

各取 1  $\mu$ L 对数生长期菌液, 垂直点样于泳动平板(含 0.3% 琼脂、3% NaCl 的 LB 培养基), 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h; 同法加样于群集运动平板(含 1.5% 琼脂的 BHI 培养基), 30  $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 测定迁移直径并记录表型。

#### 1.6 生物被膜测定

取 200  $\mu$ L 对数生长期菌液接种于 96 孔板, 分别于 30  $^{\circ}$ C 和 37  $^{\circ}$ C 静置培养 48 h, 去除菌悬液, PBS 洗涤后加入甲醇固定、结晶紫染色, PBS 洗涤后自然风干。加入 200  $\mu$ L 95% 乙醇溶解结晶紫, 于酶标仪测定  $OD_{595}$ 。

#### 1.7 细菌竞争试验

采用体外竞争模型评估 WT、 $\Delta$ *ybbN* 和 C $\Delta$ *ybbN* 对携带 pBAD33-Gm 质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的杀伤能力。将各菌株培养至对数生长

期,  $4\times 10^6$  副溶血弧菌和  $1\times 10^6$  大肠杆菌等体积混合。梯度稀释上述混合菌液后涂布 TCBS 培养基(筛选副溶血弧菌)及含庆大霉素(30  $\mu$ g/mL)的 LB 平板(筛选大肠杆菌), 37  $^{\circ}$ C 培养过夜后计数, 得培养前(0 h)的初始菌体浓度; 另取 100  $\mu$ L 菌液涂布 LB 平板, 30  $^{\circ}$ C/37  $^{\circ}$ C 培养 4 h 后回收菌体, 计数得培养 4 h 的菌体浓度(CFU/mL)。

#### 1.8 细胞黏附试验

HeLa 细胞接种于含 10% FBS-DMEM 的 24 孔板, DMEM 洗涤 3 次备用。取对数期 WT、 $\Delta$ *ybbN* 及 C $\Delta$ *ybbN* 菌液, 空白 DMEM 洗涤后按 MOI=100:1 与细胞共孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 加入 0.5% Triton X-100 裂解细胞, 裂解液用无菌 PBS 梯度稀释后涂布 3% NaCl-LB 平板, 统计菌落数以评估相对黏附率。

#### 1.9 细胞毒性检测

取对数期菌悬液, 以 MOI=100:1 感染 HeLa 细胞, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h (设同步对照组)。按 CytoTox96<sup>®</sup> 试剂盒说明书检测细胞上清乳酸脱氢酶释放水平, 量化细胞毒性。

#### 1.10 小鼠存活试验

参照白雪瑞等<sup>[17]</sup>方法, 将 3-4 周龄 ICR 雌鼠分为 WT 组、 $\Delta$ *ybbN* 组、C $\Delta$ *ybbN* 组和空白组, 每组 8 只, 腹腔注射 100  $\mu$ L 对数期菌悬液 ( $3\times 10^8$  CFU/mL) 或生理盐水。每隔 1 h 观察 1 次, 连续记录 7 d 存活率。

本研究动物实验获中国农业科学院上海兽医研究所实验动物福利与伦理管理委员会批准, 编号为 SV-20211231-G04。

#### 1.11 组织载量测定

五周龄 ICR 小鼠随机分为 4 组 (WT、 $\Delta$ *ybbN*、C $\Delta$ *ybbN* 及空白对照,  $n=10$ ), 腹腔注射 100  $\mu$ L 对数期菌液 ( $5\times 10^7$  CFU/mL) 或生理盐水。感染 10 h 后随机处死各组 5 只小鼠, 无菌解剖观察脏器病理变化。取心、肝、脾、肾组织制备匀浆, PBS 梯度稀释后涂布 TCBS 平板, 计算各脏器载菌量。

## 1.12 数据分析

定量数据采用 GraphPad Prism 8 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 结果以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 显著性阈值为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺失株 $\Delta ybbN$ 和互补株 $C\Delta ybbN$ 的鉴定

经 *ybbN*-E/F 引物 PCR 扩增, WT 呈现 2 538 bp 特征条带(图 1, 泳道 1), 而  $\Delta ybbN$  和  $C\Delta ybbN$  均获得 1 683 bp 条带(图 1, 泳道 2、3), 测序比对证实成功缺失 855 bp 的 *ybbN* 基因片段。采用 *ybbN*-pMMB-F/R 引物扩增时, WT 和互补株  $C\Delta ybbN$  均呈现 873 bp 互补载体特征条带(图 1, 泳道 4、6),  $\Delta ybbN$  则无扩增条带(图 1, 泳道 5)。经 20 代传代培养后, *SacB*-F/R 引物在  $\Delta ybbN$  中无扩增(图 1, 泳道 7), 证实自杀载体 pYAK1 已成功消除。上述结果表明 *ybbN* 基因缺失株  $\Delta ybbN$  和互补株  $C\Delta ybbN$  构建成功。

### 2.2 *ybbN* 基因不影响副溶血弧菌的生长特性

如图 2 所示,  $\Delta ybbN$  与 WT、 $C\Delta ybbN$  的生长速率无显著差异( $P > 0.05$ ), 表明 *ybbN* 缺失未显著改变副溶血弧菌的生长特性。

### 2.3 YbbN 不参与副溶血弧菌运动

泳动平板培养 4 h 后各菌株均形成典型半透明迁移环(图 3A),  $\Delta ybbN$  的泳动能力与 WT 和  $C\Delta ybbN$  相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 图 3B)。所有菌株均表现出明显的群集运动能力(图 3C),  $\Delta ybbN$  的群集运动能力与 WT 相比差异也不显著( $P > 0.05$ , 图 3D)。结果表明 *ybbN* 缺失不影响细菌运动性。

### 2.4 生物被膜形成分析

如图 4 所示,  $\Delta ybbN$  在 30 °C 的生物被膜形

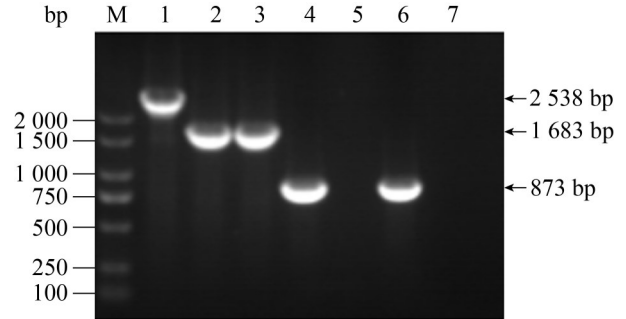


图1 *ybbN* 基因缺失株及其互补株的PCR鉴定结果。M: DL2000 DNA marker; 泳道1-7: WT-*ybbN*-E/F (2 538 bp)、 $\Delta ybbN$ -*ybbN*-E/F (1 683 bp)、 $C\Delta ybbN$ -*ybbN*-E/F (1 683 bp)、WT-*ybbN*-pMMB-F/R (873 bp)、 $\Delta ybbN$ -*ybbN*-pMMB-F/R (无条带)、 $C\Delta ybbN$ -*ybbN*-pMMB-F/R (873 bp)和 $\Delta ybbN$ -*SacB*-F/R (0 bp)片段。Figure 1 PCR identification of *ybbN* gene deletion strain and its complementary strain. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-7: Primers of WT-*ybbN*-E/F (2 538 bp),  $\Delta ybbN$ -*ybbN*-E/F (1 683 bp),  $C\Delta ybbN$ -*ybbN*-E/F (1 683 bp), WT-*ybbN*-pMMB-F/R (873 bp),  $\Delta ybbN$ -*ybbN*-pMMB-F/R (no band),  $C\Delta ybbN$ -*ybbN*-pMMB-F/R (873 bp), and  $\Delta ybbN$ -*SacB*-F/R (0 bp).

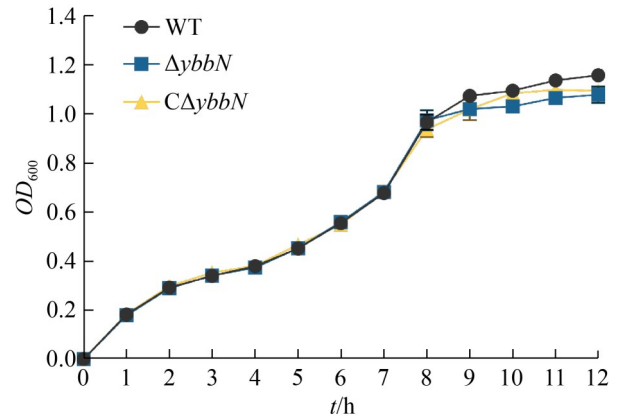


图2 副溶血弧菌野生型与突变株生长动力学分析 Figure 2 Growth kinetics of *Vibrio parahaemolyticus* WT and mutant strains.

成能力较 WT 下降 19% (\*:  $P < 0.05$ ), 在 37 °C 下降 30% (\*\*\*:  $P < 0.001$ ), 且温度升高加剧表型缺失, 而  $C\Delta ybbN$  与 WT 差异无统计学意义

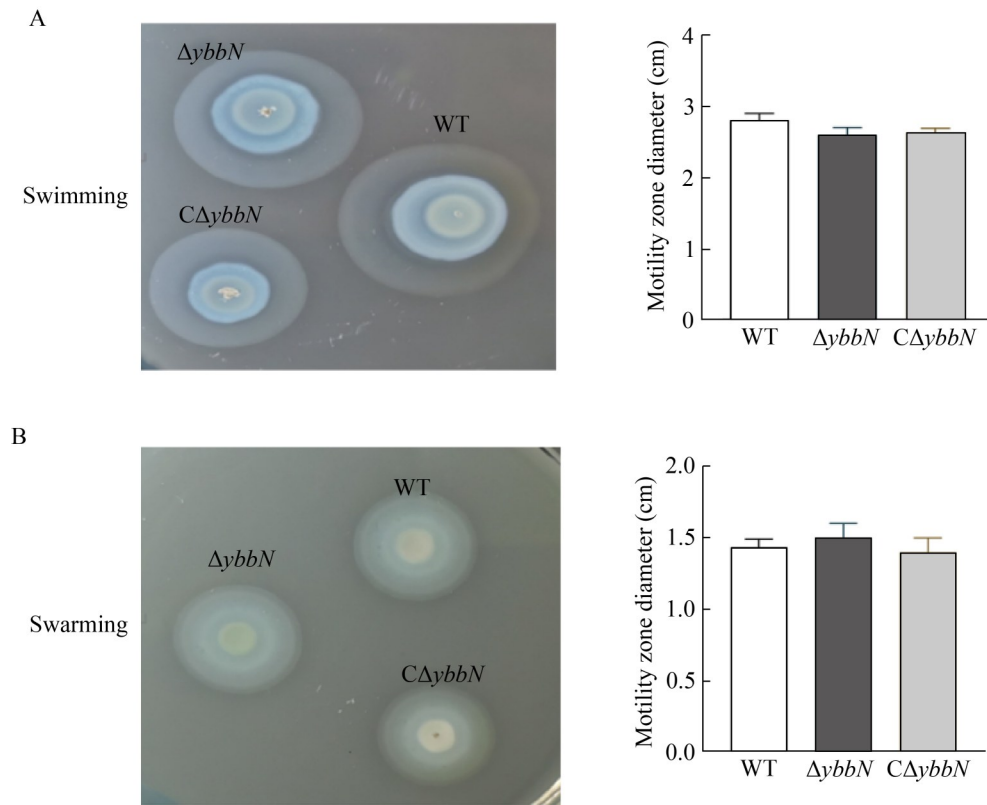


图3 运动性分析。A：菌株的泳动运动；B：菌株的群集运动。

Figure 3 Motility analysis. A: Swimming motility of the strains; B: Swarming motility of the strains.

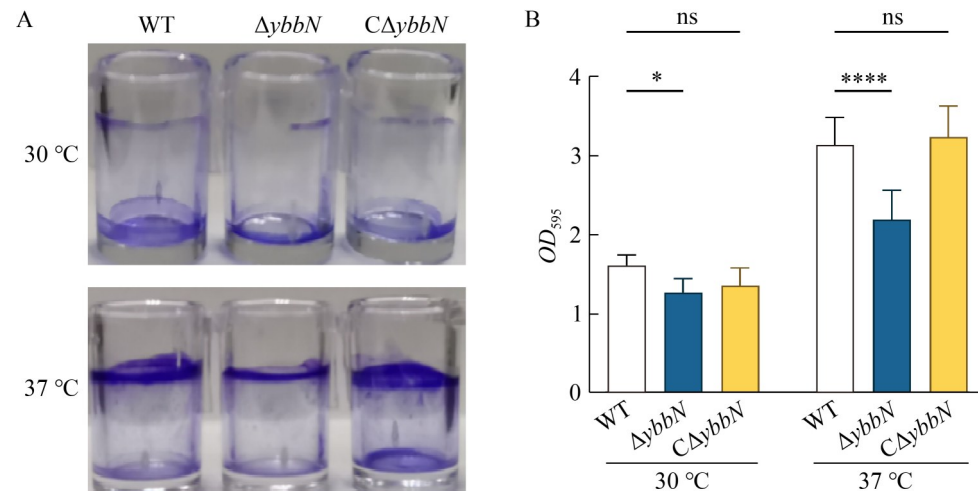


图4 生物被膜形成能力。A：菌株于30 °C和37 °C LB中培养48 h后结晶紫染色；B：3次独立实验测定生物被膜生物量。

Figure 4 Biofilm forming ability. A: Strains grown in LB at 30 °C and 37 °C for 48 h and stained with crystal violet; B: This shows the results of three independent experiments evaluating biofilm biomass (ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ).

( $P>0.05$ )。提示 YbbN 在温暖环境中对生物被膜形成具有关键调控作用。

## 2.5 YbbN 介导副溶血弧菌细菌竞争

细菌竞争试验结果(图 5A、5C)显示, 在 30 °C 和 37 °C 条件下,  $\Delta ybbN$  组大肠杆菌存活率较 WT 显著升高(\*:  $P<0.05$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ )。互补株  $C\Delta ybbN$  在 30 °C 和 37 °C 均恢复抗菌活性。副溶血弧菌活菌计数结果(图 5B、5D)表明, 各组细菌在共培养期间生长速率差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 排除了生长缺陷所致抗菌活性变化的可能。结果提示 *ybbN* 参与了副溶血弧菌对

大肠杆菌的抗菌作用。

## 2.6 *ybbN* 不参与副溶血弧菌细胞黏附作用

细胞黏附实验结果(图 6)显示,  $\Delta ybbN$  与 WT 的宿主细胞黏附效率差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 表明 *ybbN* 缺失未显著改变副溶血弧菌的黏附能力。

## 2.7 *ybbN* 缺失降低副溶血弧菌细胞毒性

细胞毒性结果显示(图 7)表明,  $\Delta ybbN$  的细胞毒性较 WT 显著降低 27% (\*\*\*\*:  $P<0.0001$ ), 证实 *ybbN* 是副溶血弧菌毒力的关键调控因子。

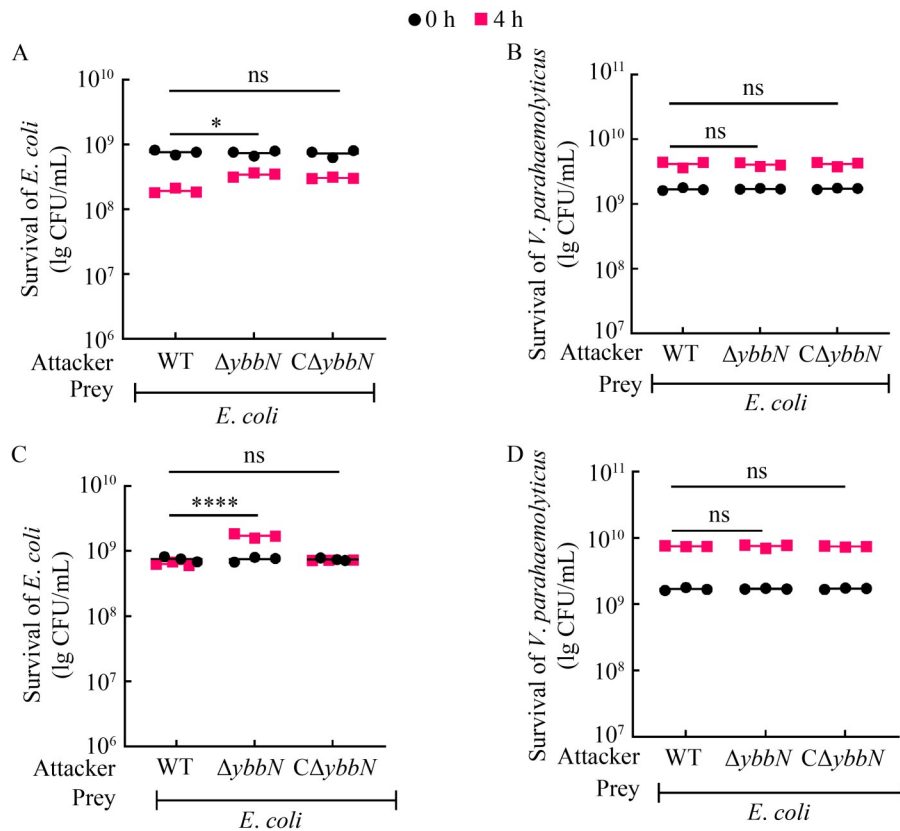


图5 各菌株对大肠杆菌的抗菌作用。30 °C共培养前(0 h)及培养后(4 h)大肠杆菌(A)与副溶血弧菌(B)定量分析; 37 °C共培养前(0 h)及后(4 h)大肠杆菌(C)与副溶血弧菌(D)定量分析。

Figure 5 Antibacterial activity of *Vibrio parahaemolyticus* strains against *Escherichia coli*. Quantitative analysis of *Escherichia coli* (A) and *Vibrio parahaemolyticus* (B) pre- (0 h) and post- (4 h) co-culture at 30 °C; Quantitative analysis of *Escherichia coli* (C) and *Vibrio parahaemolyticus* (D) pre- (0 h) and post- (4 h) co-culture at 37 °C. ns:  $P>0.05$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ .

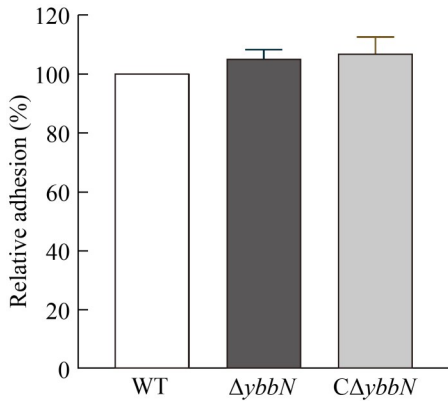


图6 各菌株对HeLa细胞的黏附作用  
Figure 6 Adhesion to HeLa cell monolayers by various strains.

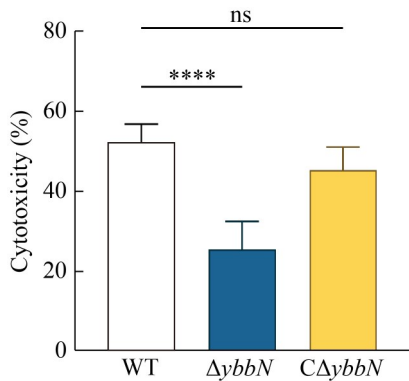


图7 各菌株对HeLa细胞的毒性作用  
Figure 7 Cytotoxic effects of various strains on HeLa cells. ns:  $P > 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

### 2.8 *ybbN* 缺失对副溶血弧菌毒力的影响

如图 8 所示, WT 组小鼠于感染 2 h 出现急性呼吸窘迫伴水样腹泻, 并迅速全部死亡;  $\Delta ybbN$  组临床表现明显减轻, 死亡延迟, 存活率达 87.5%;  $C\Delta ybbN$  组重现 WT 组的表型, 存活率为 12.5%。对照组无异常, 存活率为 100.0%。结果表明 *ybbN* 缺失显著降低副溶血弧菌毒力, 提示该基因参与致病过程。

### 2.9 *ybbN* 缺失不影响副溶血弧菌小鼠组织定殖

如图 9 所示, 与 WT 相比,  $\Delta ybbN$  在小鼠

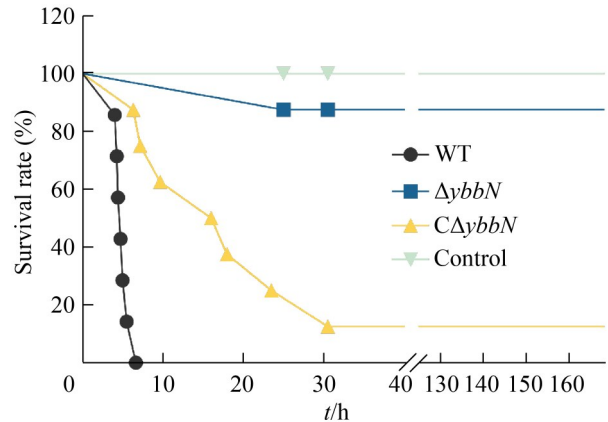


图8 WT、 $\Delta ybbN$ 和 $C\Delta ybbN$ 攻毒后ICR小鼠存活率

Figure 8 Survival rate of ICR mice infected with WT,  $\Delta ybbN$ , and  $C\Delta ybbN$  strains.

心脏、肝脏、脾脏和肾脏的细菌载量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 表明 *ybbN* 不参与副溶血弧菌在小鼠组织的定殖。

## 3 讨论与结论

Trx 家族蛋白在微生物中广泛存在, 不仅在脱氧核糖核苷酸合成等基础代谢中发挥核心作用, 还作为多种还原酶的关键底物参与细胞氧化还原调控<sup>[18]</sup>。Trx 系统不仅调控细菌运动性、宿主适应、毒力表达和生物被膜形成等功能, 还帮助细菌适应环境变化<sup>[19-21]</sup>。例如, 鲍曼不动杆菌 *trxA* 突变体已被提出作为潜在减毒活疫苗<sup>[22]</sup>。目前, 关于 Trx 家族成员 YbbN 在副溶血弧菌环境适应及致病机制中的研究仍明显不足。生物信息学分析显示, 副溶血弧菌 YbbN 具有独特结构, 包含 Trx 结构域及 TPR<sub>19</sub> 和 TPR<sub>20</sub> 两个结构域。本研究构建了 *ybbN* 缺失株和互补株, 系统解析了 YbbN 在副溶血弧菌致病过程中的分子机制。

生物被膜是细菌抵御环境胁迫的关键屏障, 其形成与毒力密切相关并受多因素精细调控<sup>[23]</sup>。研究表明 Trx 是鲍曼不动杆菌和杀鱼爱德华氏菌等多种病原菌生物被膜形成的关键因子<sup>[24-25]</sup>。

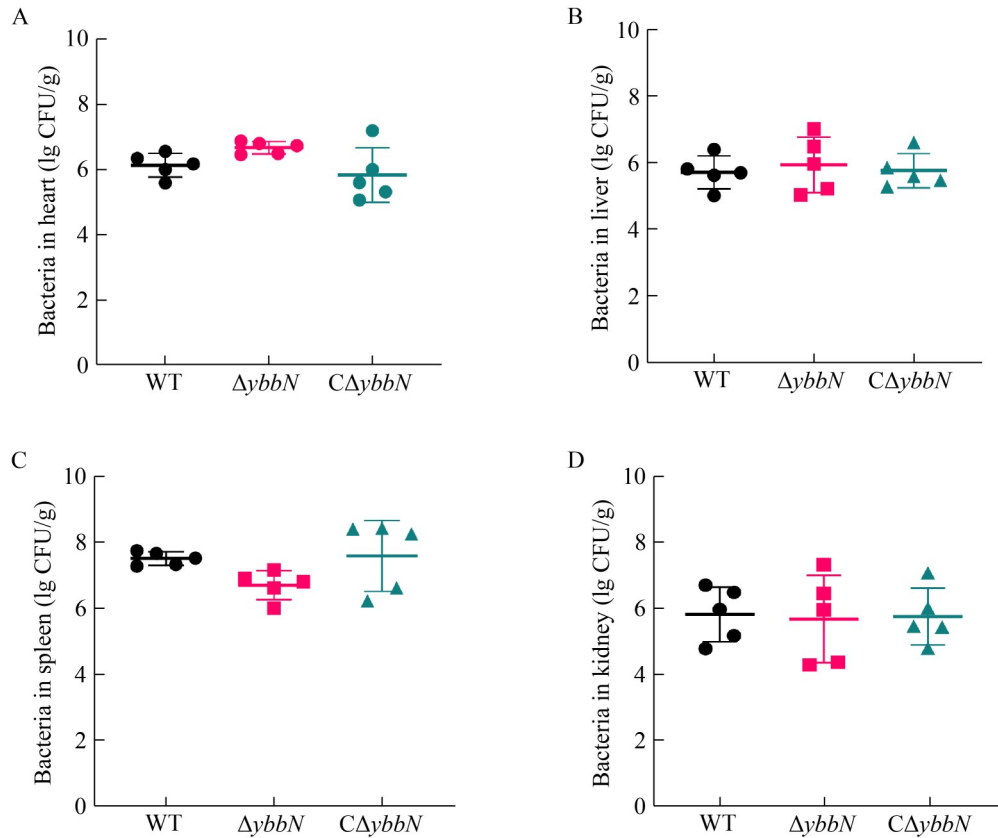


图9 各菌株在小鼠组织的细菌载量

Figure 9 Bacterial loads in mice infected with each strain. A: Heart; B: Liver; C: Spleen; D: Kidney.

本研究发现, *ybbN* 缺失不影响副溶血弧菌生长和运动, 但在 30 °C 和 37 °C 均显著削弱其生物被膜形成; 细菌竞争试验也显示  $\Delta ybbN$  对大肠杆菌的杀伤能力明显下降。Trx 通过向二硫键系统提供电子并帮助错误配对二硫键异构化, 促使蛋白正确折叠, 在毒力调控中起核心作用<sup>[26]</sup>。YbbN 可能借助 Trx 系统影响抗菌物质及生物被膜相关蛋白的折叠, 从而增强副溶血弧菌的环境生存能力。本研究结果证实 YbbN 调控副溶血弧菌生物被膜形成与种间竞争, 提示其可能是副溶血弧菌适应环境的关键因子。

副溶血弧菌通过毒力因子破坏宿主细胞结构, 驱动体内增殖并介导疾病<sup>[5,27]</sup>。研究显示, Trx 可促进特定毒力因子表达、诱导抗氧化应激并触发过度免疫应答, 进而调控细菌毒力<sup>[8,24]</sup>。链球菌中 TrxA 通过维持 T3SS 效应蛋白折叠直

接增强毒力<sup>[10]</sup>。本研究揭示 YbbN 具有独特致病调控模式: 虽然不参与 HeLa 细胞黏附及小鼠组织定殖, 但 *ybbN* 缺失使细胞毒性降低 27%, 小鼠存活率提高至 87.5%, 提示其可能通过底物选择性伴侣机制影响特定毒力因子折叠, 进而促进副溶血弧菌毒力。该发现为理解 Trx 家族蛋白在细菌致病中的多样化功能提供了新视角。

本研究系统阐明了 YbbN 在副溶血弧菌环境适应和致病过程中的作用。*ybbN* 缺失在不影响生长、运动、黏附及定殖的同时, 显著削弱生物被膜形成、抗菌活性、细胞毒力和小鼠致病性。我们推测 YbbN 通过以下机制调控毒力: (1) 维持氧化还原稳态, 确保毒力因子正确折叠; (2) 调控抗菌物质分泌, 增强环境竞争优势; (3) 促进生物被膜形成, 提高环境适应性。鉴于 YbbN 在毒力调控中的独特作用且对基本生理无

明显影响, 该蛋白可作为副溶血弧菌减毒疫苗的理想靶标。本研究拓展了 Trx 家族蛋白功能多样性的认识, 为深入解析副溶血弧菌致病机制提供了新的理论框架和研究方向。

## 作者贡献声明

芮闯: 实验操作、数据收集和撰写文章; 郭容: 实验操作、数据收集与监管、数据分析; 卢淑淇: 数据收集和监督管理; 吴佩洁: 软件程序和监督管理; 邱索平: 数据分析和监督管理; 韩先干: 研究构思和设计; 蒋蔚: 获取基金和项目管理; 李婷婷: 论文审阅和修改。

## 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] De SILVA RS, KOVACIKOVA G, LIN W, TAYLOR RK, SKORUPSKI K, KULL FJ. Crystal structure of the virulence gene activator *AphA* from *Vibrio cholerae* reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(14): 13779-13783.
- [2] SU YC, LIU CC. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 549-558.
- [3] SHIMOHATA T, TAKAHASHI A. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Medical Investigation*, 2010, 57(3/4): 179-182.
- [4] 王凤青, 孙玉增, 任利华, 姜向阳, 姜芳, 崔艳梅, 刘丽娟. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2018, 8(2): 49-56.  
WANG FQ, SUN YZ, REN LH, JIANG XY, JIANG F, CUI YM, LIU LJ. Research progress on the main pathogenic *Vibrio* affecting aquatic animals in mariculture[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2018, 8(2): 49-56 (in Chinese).
- [5] GHENEM L, ELHADI N, ALZHRANI F, NISHIBUCHI M. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on distribution, pathogenesis, virulence determinants and epidemiology[J]. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*, 2017, 5(2): 93-103.
- [6] LI LZ, MENG HM, GU D, LI Y, JIA MD. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. *Microbiological Research*, 2019, 222: 43-51.
- [7] HENRIQUE YOKOMIZO C, GERONIMO ALEGRIA T, de ABREU MEIRELES D, WEISSMANN GAIARSA J, GOMES RAGNONI E, MATEUS DOMINGOS R, NETTO LES. 258 studies of disulfide reductase activity and phylogenetic distribution of *Xyella fastidiosa* YbbN protein[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 100: S115.
- [8] JI CX, PAN YY, LIU BC, LIU JY, ZHAO CJ, NIE ZY, LIAO SM, KUANG GW, WU X, LIU Q, NING J, TANG YL, FANG LH. Thioredoxin C of *Streptococcus suis* serotype 2 contributes to virulence by inducing antioxidative stress and inhibiting autophagy via the MSR1/PI3K-Akt-mTOR pathway in macrophages[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 298: 110263.
- [9] DAGAH OMA, SILAA BB, ZHU MH, PAN Q, QI LL, LIU XY, LIU YQ, PENG WJ, ULLAH Z, YUDAS AF, MUHAMMAD A, ZHANG XQ, LU J. Exploring immune redox modulation in bacterial infections: insights into thioredoxin-mediated interactions and implications for understanding host-pathogen dynamics[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(5): 545.
- [10] ANJOU C, LOTOUX A, MORVAN C, MARTIN-VERSTRAETE I. From ubiquity to specificity: the diverse functions of bacterial thioredoxin systems[J]. *Environmental Microbiology*, 2024, 26(6): e16668.
- [11] De ABREU MEIRELES D, YOKOMIZO CH, SILVA FP, VENÂNCIO TM, de SOUZA DEGENHARDT MF, de Oliveira, Cristiano Luis Pinto, NETTO LES. Functional diversity of YbbN/CnoX proteins: insights from a comparative analysis of three thioredoxin-like oxidoreductases from *Pseudomonas aeruginosa*, *Xyella fastidiosa* and *Escherichia coli*[J]. *Redox Biology*, 2024, 72: 103128.
- [12] CALDAS T, MALKI A, KERN R, ABDALLAH J, RICCHARME G. The *Escherichia coli* thioredoxin homolog YbbN/Trxsc is a chaperone and a weak protein oxidoreductase[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 343(3): 780-786.
- [13] KTHIRI F, LE HT, TAGOURTI J, KERN R, MALKI A, CALDAS T, ABDALLAH J, LANDOULSI A, RICCHARME G. The thioredoxin homolog YbbN functions as a chaperone rather than as an oxidoreductase[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374(4): 668-672.
- [14] VERTOMMEN D, DEPUYDT M, PAN J, LEVERRIER P, KNOOPS L, SZIKORA JP, MESSENS J, BARDWELL JCA, COLLET JF. The disulphide isomerase DsbC cooperates with the oxidase DsbA in a DsbD-independent manner[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(2): 336-349.
- [15] SHI YY, LIU LN, ZHANG T, SHEN LJ, LIU L, ZHANG J, ZHANG YX, WANG XH, YANG SS, LU FM, CHEN XM, DING SG. The involvement of *Helicobacter pylori* thioredoxin-1 in gastric carcinogenesis[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 62(Pt 8): 1226-1234.
- [16] 白雪瑞, 王权, 凌娇, 万莹, 陈永军, 方维焕, 孙卫东, 蒋蔚. T3SS1 和 T3SS2 影响副溶血弧菌生物学特性及细胞致病性的比较[J]. *微生物学报*, 2018, 58(3): 455-466.  
BAI XR, WANG Q, LING J, WAN Y, CHEN YJ, FANG WH, SUN WD, JIANG A. Comparison of biological characteristics and cytopathogenicities between T3SS1 and T3SS2 in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta*

- Microbiologica Sinica*, 2018, 58(3): 455-466 (in Chinese).
- [17] 白雪瑞, 王权, 陈永军, 万莹, 凌娇, 王亚磊, 蒋蔚. 副溶血弧菌 *ompA* 基因缺失株的生物学特性及致病性分析[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 902-910.  
BAI XR, WANG Q, CHEN YJ, WAN Y, LING J, WANG YL, JIANG W. Biological characteristics and pathogenicity of an *ompA* mutant of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5): 902-910 (in Chinese).
- [18] NETTO LES, de OLIVEIRA MA, TAIRUM CA, da SILVA NETO JF. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions[J]. *Free Radical Research*, 2016, 50(2): 206-245.
- [19] HE JJ, LIU S, FANG QJ, GU HJ, HU YH. The thioredoxin system in *Edwardsiella piscicida* contributes to oxidative stress tolerance, motility, and virulence[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(4): 827.
- [20] JALAL N, LEE SF. The MsrAB reducing pathway of *Streptococcus gordonii* is needed for oxidative stress tolerance, biofilm formation, and oral colonization in mice[J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0229375.
- [21] KETTER PM, YU JJ, GUENTZEL MN, MAY HC, GUPTA R, EPPINGER M, KLOSE KE, SESHU J, CHAMBERS JP, CAP AP, ARULANANDAM BP. *Acinetobacter baumannii* gastrointestinal colonization is facilitated by secretory IgA which is reductively dissociated by bacterial thioredoxin A[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01298-18.
- [22] AINSWORTH S, KETTER PM, YU JJ, GRIMM RC, MAY HC, CAP AP, CHAMBERS JP, GUENTZEL MN, ARULANANDAM BP. Vaccination with a live attenuated *Acinetobacter baumannii* deficient in thioredoxin provides protection against systemic *Acinetobacter* infection[J]. *Vaccine*, 2017, 35(26): 3387-3394.
- [23] NAVARRE WW, SCHNEEWIND O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(1): 174-229.
- [24] WANG BY, HUANG HQ, LI S, TANG P, DAI HF, XIAN JN, SUN DM, HU YH. Thioredoxin H (TrxH) contributes to adversity adaptation and pathogenicity of *Edwardsiella piscicida*[J]. *Veterinary Research*, 2019, 50(1): 26.
- [25] MAY HC, YU JJ, SHRIHARI S, SESHU J, KLOSE KE, CAP AP, CHAMBERS JP, GUENTZEL MN, ARULANANDAM BP. Thioredoxin modulates cell surface hydrophobicity in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2849.
- [26] SAYED A, CHAKRABORTY S, LEUNG KY, SUGII S, MOK YK. Trxlp, a thioredoxin-like effector from *Edwardsiella piscicida* inhibits cellular redox signaling and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 148: 89-101.
- [27] YANG H, de SOUZA SANTOS M, LEE JL, LAW HT, CHIMALAPATI S, VERDU EF, ORTH K, VALLANCE BA. A novel mouse model of enteric *Vibrio parahaemolyticus* infection reveals that the type III secretion system 2 effector VopC plays a key role in tissue invasion and gastroenteritis[J]. *mBio*, 2019, 10(6): e02608-19.