

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.03.004

黄佳琪, 高丽旭, 张璇, 等. Cpx 系统基因缺失对多杀性巴氏杆菌环境响应及免疫保护性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(3): 32-46.

## Cpx 系统基因缺失对多杀性巴氏杆菌 环境响应及免疫保护性的影响

黄佳琪, 高丽旭, 张璇, 黄麟, 张金格,  
杨旭霞, 何芳, 赵光夫, 彭远义, 李能章

西南大学 动物医学院, 重庆 400715

**摘要:** CpxA/R 是一种细菌双组份调控因子, 在细菌毒力、环境适应和抗生素耐药性等方面发挥着重要调控作用, 利用同源重组方法分别构建牛源 A 型多杀性巴氏杆菌 CQ2 株(PmCQ2)*cpxA* 及 *cpxA/R* 基因缺失株, 结果发现: *cpxA* 及 *cpxA/R* 基因缺失对 PmCQ2 的生长繁殖、毒力及耐药性等方面并无显著影响, 对菌株适应不同金属离子浓度、氧化应激、抗菌肽处理及营养方面也无明显影响, 但却能显著增强菌株对高温、酸应激和盐应激的耐受性; 与此同时, *cpxA* 及 *cpxA/R* 基因缺失赋予了菌株较好的交叉免疫保护性, 小鼠模型中, 其缺失株灭活苗对牛源 A 型、B 型和 F 型多杀性巴氏杆菌感染的免疫保护率可分别达 100%、50%、50%, 显著优于野毒株 PmCQ2。

**关键词:** 多杀性巴氏杆菌; Cpx 双组份调控系统; 基因缺失;

环境响应; 交叉免疫保护性

中图分类号: S855.1

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)03-0032-15

## Effects of Cpx System Gene Deletion on Environmental Response and Immunoprotective Efficacy of *Pasteurella multocida*

HUANG Jiaqi, GAO Lixu, ZHANG Xuan, HUANG Lin,  
ZHANG Jingge, YANG Xuxia, HE Fang,  
ZHAO Guangfu, PENG Yuanyi, LI Nengzhang

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

收稿日期: 2025-03-17

基金项目: 重庆市教育委员会项目(CY220232); 重庆市博士后特别资助项目(2023CQBSHTB2030); 新疆维吾尔自治区科学技术厅重点项目(ZYYD2025CG12); 西南大学专利转化培育项目(SWU-ZLPY08)。

作者简介: 黄佳琪, 硕士, 主要从事牛呼吸道细菌病原致病机制研究。

通信作者: 李能章, 教授。

**Abstract:** CpxA/R, a two-component regulatory system in bacteria, plays an important role in modulating virulence, environmental adaptation, and antibiotic resistance. In this study, the *cpxA* and *cpxA/R* gene mutants derived from Bovine *P. multocida* serotype A strain CQ2 were constructed by homologous recombination method. The results showed that the deletion of *cpxA* and *cpxA/R* genes had no significant effects on the growth, reproduction, virulence and drug-resistance of strains, and also had no effects on the strains adapting to different metal ion concentrations, oxidative stress, antimicrobial peptide treatment, and nutritional conditions, but it enhanced the strain's tolerance to high temperature, acid stress, and salt stress. Additionally, the deletion of *cpxA* and *cpxA/R* genes conferred improved cross-protective immunity. In mouse models, the inactivated vaccines derived from the mutants achieved protective efficacy rates of 100%, 50%, and 50% against bovine *P. multocida* type A, B and F, respectively, significantly surpassing the protection offered by the wild-type PmCQ2 strain.

**Key words:** *Pasteurella multocida*; Cpx two-component regulatory system; gene deletion; environmental response; cross-protection

Cpx 双组份调控系统(以下简称 Cpx 系统)广泛存在于细菌中,由内膜组氨酸激酶 CpxA 及胞质反应调节剂 CpxR 组成<sup>[1]</sup>,当细菌面临复杂环境应激时,位于其内膜上的 CpxA 因子发生自磷酸化,将磷酸基团转移到 CpxR,促使 CpxR 蛋白磷酸化,磷酸化的 CpxR 可作为转录激活因子,从而调控下游相关基因的转录,帮助细菌适应不利环境。*cpxA/R* 基因的缺失,对多数细菌的毒力及其在多种环境刺激下的耐受性及存活具有重大影响<sup>[2-5]</sup>,因此,有研究利用 Cpx 系统(*cpxR/lon*)缺失导致的菌株毒力下调制成减毒活疫苗,以此抵御野毒株感染<sup>[6]</sup>。从另一个角度来看,CpxA/R 本身也可作为一个可调控的靶标分子,通过外在因子对其激活或失活,从而达到控制细菌生长的目的。

基因组信息分析发现,多杀性巴氏杆菌中也存在 Cpx 系统,但目前作用并不清楚,需进一步研究。多杀性巴氏杆菌作为一种重要的人畜共患细菌性病原,传染性强,发病率高、死亡率较高<sup>[7]</sup>,目前对其防控主要依靠抗生素,但过多抗生素使用会加剧多杀性巴氏杆菌耐药株的产生,因此需要更多行之有效的方法。本课题组前期通过基因编辑手段,发现多杀性巴氏杆菌部分基因缺失能显著降低菌株毒力,并赋予了菌株较好的交叉免疫保护特性<sup>[8-9]</sup>。基于对 Cpx 系统在其他细菌中功能的了解,本研究选择了多杀性巴氏杆菌 Cpx 系统进行研究,旨在通过同源重组方法实现多杀性巴氏杆菌中 *cpxA* 基因和 *cpxA/R* 双基因的缺失,探讨 Cpx 系统基因缺失对菌株毒力、交叉保护性及环境应激耐受等方面的影响,为多杀性巴氏杆菌的有效防控提供新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

昆明小鼠(雌性、18~22 g)、C57BL/6 小鼠(雌性、18~22 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物饲喂及相关实验操作均由西南大学实验动物伦理审查委员会批准(批准号: IACUC-20210715-03)。牛源 A 型、B 型、F 型多杀性巴氏杆菌(PmCQ2, PmB, PmF)、猪源 A 型多杀性巴氏杆菌(PmP)及禽源 A 型多杀性巴氏杆菌(PmQ),暂存于西南大学动物医学院肉牛疫病防控研究室。小鼠肺泡上皮细胞系存于西南大学动物医学院肉牛疫病防控研究室。用于构建基因缺失株的载体 pUC19oriKan<sup>R</sup> 由实验室前期构建并保存。

### 1.2 主要试剂

卡那霉素、甲酰胺、DMSO、MTT,上海生工生物工程有限公司;马丁肉汤培养基、脑心浸液肉汤培养

基(20211109), 青岛海博生物技术有限公司; 透明质酸、结晶紫染料, Solarbio 公司; 琼脂糖、透明质酸酶、脱脂奶粉, BioFroxx 公司; BamH I、Hind III 限制性核酸内切酶, 宝生物(大连)工程有限公司;  $2 \times$  Taq PCR Mix, Vazyme 公司; 药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司; Stains-All, BBI 公司; 氯化钠、氯化钾、果糖、葡萄糖、氯化铁、氯化镁、氯化钙、硫酸铜(分析纯), 北京科隆生物技术有限公司;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), Alladin 公司; 硫酸鱼精蛋白, 上海源叶生物科技有限公司; DMEM、1640 培养基、PBS 缓冲液、0.25% 胰蛋白酶, Gibco 公司; TMB 显色液, Beyotime 公司; HRP 标记羊抗鼠 IgG、Mouse IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  ELISA Kit, Thermo 公司; 细菌 RNA 提取试剂盒, 北京天漠科技开发有限公司; 改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, Sangon 公司。

### 1.3 基因缺失株的构建

本研究中基因缺失株的构建参照实验室前期 *hyaD* 基因缺失株的构建方法<sup>[9]</sup>, 即通过设计 *cpxA* 及 *cpxR* 基因的上下游同源臂引物, PCR 扩增分别获得各自基因上下游同源臂, 融合上下游同源臂后连接到 pUC19oriKan<sup>R</sup> 基因缺失载体上。选择牛源 A 型多杀性巴氏杆菌 CQ2 株(PmCQ2), 首先对其 *cpxA* 基因进行缺失, 其后对 PmCQ2- $\Delta cpxA$  进行 *cpxR* 基因缺失, 基因的缺失验证采用 DNA 水平及转录水平检测。缺失株构建及验证所用引物见表 1。

表 1 基因缺失株构建所需引物

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
<i>dcpxA</i> -F	GTGATGATAAAGGCTATTAT	1 480
<i>dcpxA</i> -R	TGGCATT TTTCTAACACGCT	
<i>cpxA</i> Up-F	GACCATGATTACGCCA <u>AGCTT</u> ATGCCATTTGCGAAAGAAAG	379
<i>cpxA</i> Up-R	AATCACAATCCAAACACTTTTTTCAAAGGT	
<i>cpxA</i> Down-F	AAAGTGTTTGGATTGTGATTGATGATAATG	232
<i>cpxA</i> Down-R	TTTATCGGTACCCGGGGATCCTTA <sup>ACTGGTAATCCAAAGCG</sup>	
<i>dcpxR</i> -F	AGTAAGCCTGCAATTAACAA	1 080
<i>dcpxR</i> -R	ATAGAAGTGATAATTTCTTG	
<i>cpxR</i> Up-F	GACCATGATTACGCCA <u>AGCTT</u> ATGCGGAGAAGAGTGCCTCA	300
<i>cpxR</i> Up-R	GTGCTATTGATAACGTCTCAACCCATTGA	
<i>cpxR</i> Down-F	TGAGACGTTAGTGCTATTGATATGCATATG	300
<i>cpxR</i> Down-R	TTTATCGGTACCCGGGGATCC <u>CAGAATAAATGCGAGAATCA</u>	
pUC19-F	GAGCGGATAACAATTCACAC	151
pUC19-R	ATTTAAGAATACCTTGCCGC	
KMT-F	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460
KMT-R	GCTGTAAACGAACTCGCCAC	
qPCR <i>cpxA</i> -F	CGTACACCACTGACCCGTTT	107
qPCR <i>cpxA</i> -R	TCTAAACGGCGTGCCTCAAT	
qPCR <i>cpxR</i> -F	CGGTCTCGAACTTGGGGTAG	188
qPCR <i>cpxR</i> -R	GAAATGCCTGTTGTCGACCG	
16 S rRNA-F	ACGCTGGCGGCAGGCTTAAC	101
16 S rRNA-R	ATCCCAAGCATTACTCACCCGTCC	

注: 下划线为限制性核酸内切酶的酶切位点。

#### 1.4 荚膜多糖含量的测定

吸取 1 mL 处于对数生长期的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液, 13 400 r/min 离心 15 min, 弃上清, PBS 洗 2 次, 最后用 1 mL 无菌 PBS 重悬菌体, 将上述液体置于 42 °C 金属浴中处理 1 h (处理前后均吸取 100  $\mu$ L 进行稀释涂板计数)。剩余菌液 13 000 r/min 离心 20 min, 吸取 100  $\mu$ L 上清液加入到 900  $\mu$ L 荚膜染色液中混匀, 测定  $OD_{630}$  值。同时配制不同浓度梯度的透明质酸标准溶液 (每 100  $\mu$ L 含 0、1、3、5、10  $\mu$ g), 分别吸取 100  $\mu$ L 加入到 900  $\mu$ L 荚膜染色液中, 测定  $OD_{630}$  值绘制标准曲线。根据标准曲线计算各菌株的荚膜多糖含量, 每组设置 3 个重复。

#### 1.5 生物膜含量的测定

使用 BHI 培养基将计数后的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液稀释至  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 吸取 400  $\mu$ L 到 48 孔细胞培养板中, 以 BHI 培养基作阴性对照, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 48 h。将培养基吸净, 每孔加入 200  $\mu$ L 无水甲醇固定 1 h, 吸出甲醇固定液, 用 PBS 洗 3 次, 室温晾干 1 h; 随后每孔加入 200  $\mu$ L 1% 结晶紫, 于 37 °C 处理 1 h, 吸出结晶紫染液, PBS 洗 3 次, 室温晾干 1 h; 每孔加入 200  $\mu$ L 33% 冰乙酸, 37 °C 处理 30 min, 测定  $OD_{630}$  值, 每组设置 3 个重复。

#### 1.6 生长曲线的测定

将处于对数生长期的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液浓度调整为  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 吸取 1 mL 菌液至 100 mL 马丁肉汤培养基、LB 肉汤培养基、脑心浸液肉汤培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 置于 37 °C 振荡培养箱中培养 14 h, 每组设置 3 个重复, 每 2 h 取样测定  $OD_{600}$  值, 绘制生长曲线。

#### 1.7 细胞毒性的测定

接种约  $5 \times 10^4$  个/孔小鼠肺泡上皮细胞到 96 孔细胞培养板中, 放于 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中贴壁 2 h。以 1 MOI PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$ 、PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  以及实验室前期构建的毒力显著降低的 PmCQ2- $\Delta qseC\Delta luxS$  感染细胞, 于 37 °C、5%  $CO_2$  的培养箱中处理 12 h, 吸出上清, PBS 洗 2 次, 之后每孔加入 100  $\mu$ L DMEM 培养基和 20  $\mu$ L MTT 溶液 (5 ng/mL), 继续放入培养箱中培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO 溶液, 于水平摇床上避光处理 10 min, 测定  $OD_{570}$  值, 进行细胞毒性的比较。

#### 1.8 脏器定殖量的测定

将处于对数生长期的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液浓度调整为  $4 \times 10^6$  CFU/mL, 将 18 只昆明小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 每只注射 100  $\mu$ L 上述菌液, 进行肌肉攻毒。12 h 后眼球采血, 解剖小鼠, 分离肺脏、肝脏、脾脏, 将组织称量后, 加入 1 mL 无菌生理盐水, 匀浆并稀释涂板计数, 计算脏器定殖量。

#### 1.9 感染小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子分泌能力的比较

接种  $2 \times 10^4$  个/孔小鼠腹腔原代巨噬细胞到 48 孔细胞培养板中, 以“+”晃动, 于 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中贴壁 2 h, 吸出上清, PBS 洗 3 次, 以 1 MOI PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液感染细胞, 于 37 °C、5%  $CO_2$  培养箱中处理 6 h。感染结束后, 收集细胞上清液, 按照 IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  炎症因子 ELISA 试剂盒说明书测定其分泌量。

#### 1.10 灭活苗的制备及交叉免疫保护性评价

吸取 1 mL PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液, 转接至 100 mL 马丁液体培养基中, 于 37 °C 振荡培养箱中培养至对数生长期, 进行稀释平板计数后, 将菌液 13 400 r/min 离心 15 min 后, 加入适量 PBS 重悬菌体。在重悬菌液中加入 0.15% 甲醛溶液, 充分混匀后置于 37 °C 灭活 24 h, 每 6 h 涡旋振荡 1 次。灭活后的菌液、无菌 PBS 分别与 15 VG 矿物油佐剂以 4:1 的比例混匀, 制成  $5 \times 10^9$  CFU/mL PmCQ2- $\Delta cpxA$ 、PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  灭活苗和 PBS 乳化剂。将灭活苗涂布于马丁固体培养基中, 37 °C

培养箱培养 24 h, 检测其是否灭活完全。在进行安全性评价后, 保存于 4 °C 冰箱。

将 90 只昆明小鼠随机分为 15 组, 每组 6 只, 免疫接种程序和攻毒情况见表 2。加强免疫 7 d 后对各组进行肌肉攻毒, 根据各菌株的半数致死量 ( $LD_{50}$ ) 及课题组前期研究, 将菌株浓度调整为 PmCQ2:  $5 \times 10^8$  CFU/mL, PmB:  $1 \times 10^8$  CFU/mL, PmF:  $5 \times 10^9$  CFU/mL, PmP: 100 CFU/mL, PmQ: 100 CFU/mL, 每只小鼠注射 100  $\mu$ L 菌液, 每 12 h 观察 1 次, 连续观察 1 周, 记录小鼠死亡情况。

表 2 免疫程序及攻毒情况

	组别	首免剂量/mL	二免剂量/mL	攻毒菌株
1	PmCQ2- $\Delta cpxA$ 灭活苗			
2	PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$ 灭活苗	0.2	0.1	PmCQ2
3	PBS 乳化剂			
4	PmCQ2- $\Delta cpxA$ 灭活苗			
5	PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$ 灭活苗	0.2	0.1	PmB
6	PBS 乳化剂			
7	PmCQ2- $\Delta cpxA$ 灭活苗			
8	PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$ 灭活苗	0.2	0.1	PmF
9	PBS 乳化剂			
10	PmCQ2- $\Delta cpxA$ 灭活苗			
11	PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$ 灭活苗	0.2	0.1	PmP
12	PBS 乳化剂			
13	PmCQ2- $\Delta cpxA$ 灭活苗			
14	PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$ 灭活苗	0.2	0.1	PmQ
15	PBS 乳化剂			

### 1.11 抗体消长规律的测定

根据灭活苗交叉免疫保护性的评价结果, 仅测定针对牛源 A 型多杀性巴氏杆菌抗原的抗体消长规律, 将 12 只昆明小鼠随机分为 2 组, 每组 6 只, 按照表 2 对小鼠进行免疫。免疫结束后, 尾静脉采血, 之后每隔 30 d, 进行 1 次尾静脉采血, 连续观察 150 d, 测定血清抗体效价, 绘制抗体消长曲线。

### 1.12 药敏试验

将处于对数生长期的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$  菌液浓度调整为  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 吸取 100  $\mu$ L 菌液至马丁固体培养基中, 涂布均匀后, 用无菌镊子夹取药敏片贴于培养基上, 每组 3 个重复。将贴好药敏片的培养基, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h (无需倒置), 测定抑菌圈直径, 判断菌株对抗生素的敏感性。

### 1.13 不良环境下生长曲线的测定

将处于对数生长期的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$  菌液浓度调整为  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 吸取 100  $\mu$ L 菌液到 100 mL 马丁液体培养基 (含 200 mmol/L NaCl、200 mmol/L KCl、4% 葡萄糖、4% 果糖、pH 值为 8.5) 中, 于 37 °C 或特定温度的振荡培养箱中培养 14 h, 每组设置 3 个重复, 每隔 2 h 测定  $OD_{600}$  值, 绘制生长曲线。以同样的方法将其接种至 pH 值为 5.5 的马丁液体培养基中, 于 37 °C 培养, 从第 8 h 开始, 每隔 1 h 测定  $OD_{600}$  值, 第 14 h 结束, 每组设置 3 个重复, 绘制生长曲线。

## 1.14 其他模拟环境中生长状况的观察

将处于对数生长期的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  菌液浓度调整为  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 吸取 50  $\mu$ L 菌液到 5 mL 马丁液体培养基(含 200  $\mu$ mol/L  $C_2H_5O$ 、200  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ 、15 mmol/L  $FeCl_3$ 、5 mmol/L  $MgCl_2$ 、5 mmol/L  $CaCl_2$ 、200  $\mu$ mol/L  $FeSO_4$ 、5  $\mu$ mol/L  $CuSO_4$ )中, 每组设置 3 个重复, 于 37  $^{\circ}C$  振荡培养箱中培养 12 h 后测定  $OD_{600}$  值。

## 1.15 数据统计分析

采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据统计分析,  $p < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果与分析

## 2.1 基因缺失株的构建

Cpx 系统对多数革兰氏阴性菌的毒力、耐药性及环境响应能力等具有显著影响, 但其在多杀性巴氏杆菌(Pm)中的作用尚未揭示。本研究选择实验室前期分离到的一株强毒荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌菌株 PmCQ2, 对其 Cpx 系统基因进行缺失。根据 PmCQ2 全基因组测序结果, 利用在线分析软件 SMART 对其 CpxA 和 CpxR 蛋白结构域进行分析(图 1)。

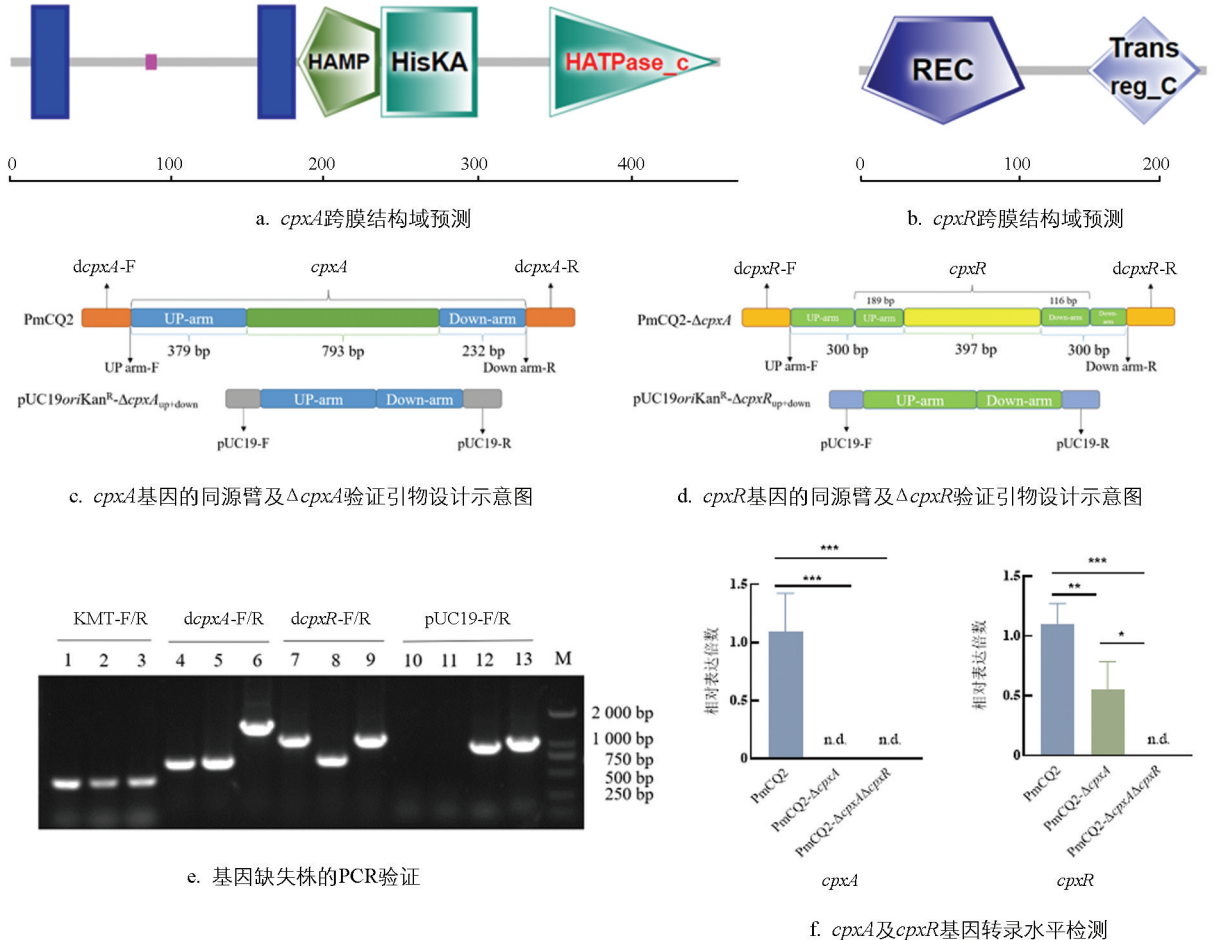


图 1 PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  的构建

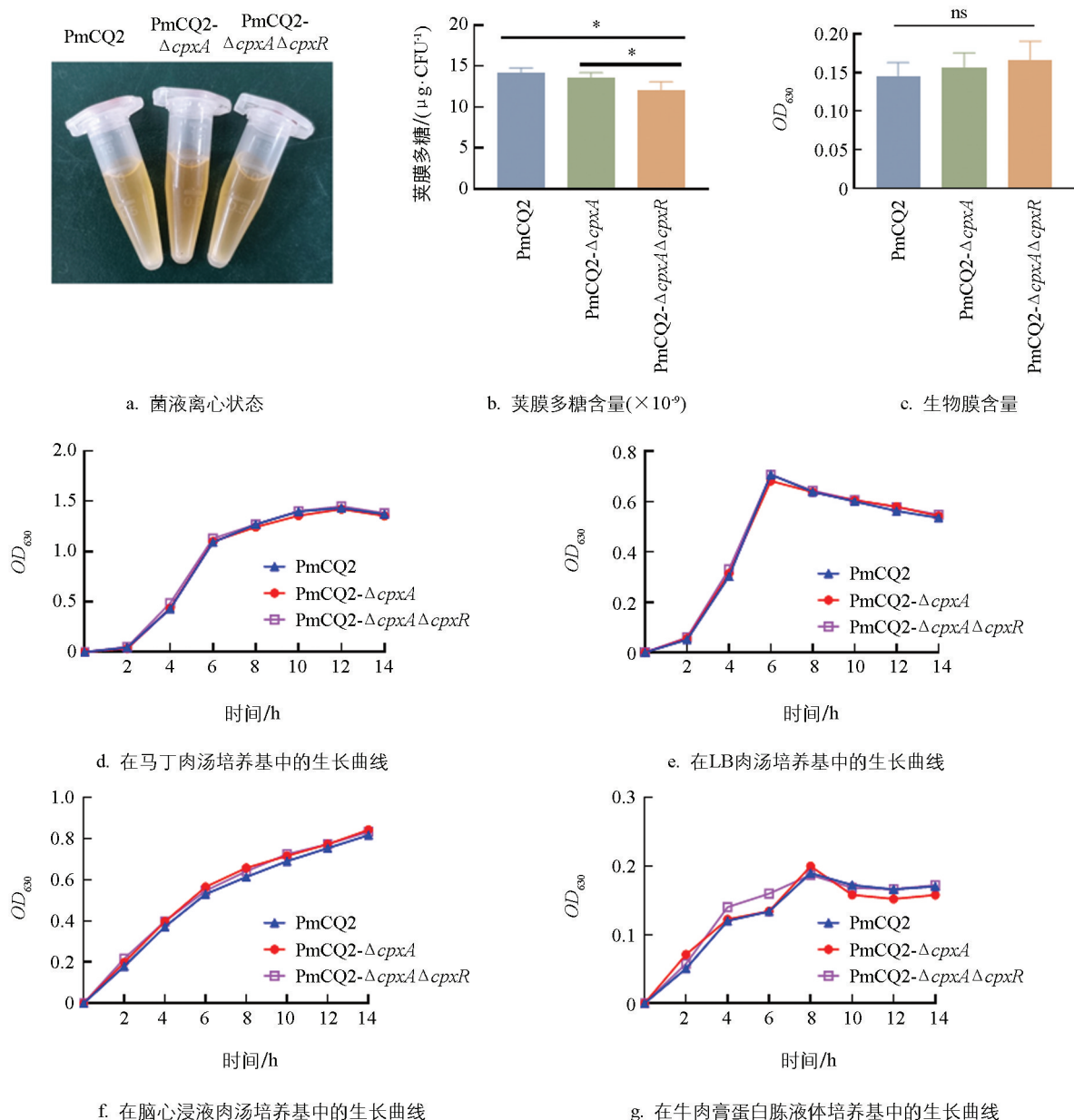
由图 1a 可知, *cpxA* 基因全长 1 404 bp, 其中 15~37 aa、164~186 aa 为跨膜域, 89~96 aa 为低度复杂区域, 189~243 aa 为 HAMP 信号转导域, 244~307 aa 为 HisKA 结构域, 355~465 aa 为 HATPase\_c

M 为 DNA Maker, 泳道 1、4、7、10 为  $\Delta cpxA$ , 泳道 2、5、8、11 为 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$ , 泳道 3、6、9 为 PmCQ2, 泳道 12 为 pUC19oriKan<sup>R</sup>- $\Delta cpxA_{up+down}$ , 泳道 13 为 pUC19oriKan<sup>R</sup>- $\Delta cpxR_{up+down}$ 。\*\*\* 表示  $p < 0.001$ , \*\* 表示  $p < 0.01$ , \* 表示  $p < 0.005$ , 差异有统计学意义, 下同。

结构域。*cpxR* 基因全长 702 bp, 编码蛋白的 2~111 aa 为 CheY 同源接收域, 153~229 aa 为组氨酸激酶的信号接受域(图 1b)。对 CpxA 部分结构域(核酸序列区段为 379~1 172 bp)进行缺失, 筛选获得 PmCQ2- $\Delta cpxA$ (图 1c); 其后对该缺失株中的 CpxR 部分结构域(核酸序列区段为 189~586 bp)进行缺失, 筛选获得 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$ (图 1d), 从 DNA 层面(图 1e)及 RNA 转录层面(图 1f)检测验证, 缺失株构建成功。

## 2.2 基因缺失株的生物学特性分析

为探究 Cpx 系统基因缺失对 Pm 生物学特性的影响, 本研究对菌液离心状态进行观察, 发现 Cpx 系统基因缺失并不会对菌体的离心状态产生影响(图 2a), 但在荚膜多糖产生方面, *cpxA/R* 双基因的缺失能显著降低菌株的荚膜多糖(图 2b)。有研究发现 Pm 具有荚膜多糖含量与生物膜含量呈反比的特点<sup>[9]</sup>, 测定缺失株与野生株生物膜发现, 3 株菌株间差异无统计学意义(图 2c), 同时该系统基因的缺失也并不会影响菌株在多种培养基中的生长速度(图 2d-2g)。



\* 表示  $p < 0.05$ , 差异有统计学意义, ns 表示差异无统计学意义, 下同。

图2 PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  的生物学特性

### 2.3 基因缺失对菌株毒力的影响

分别以相同剂量的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$  通过肌肉途径感染小鼠，3 株菌株导致小鼠死亡的速率差异无统计学意义(图 3a)。

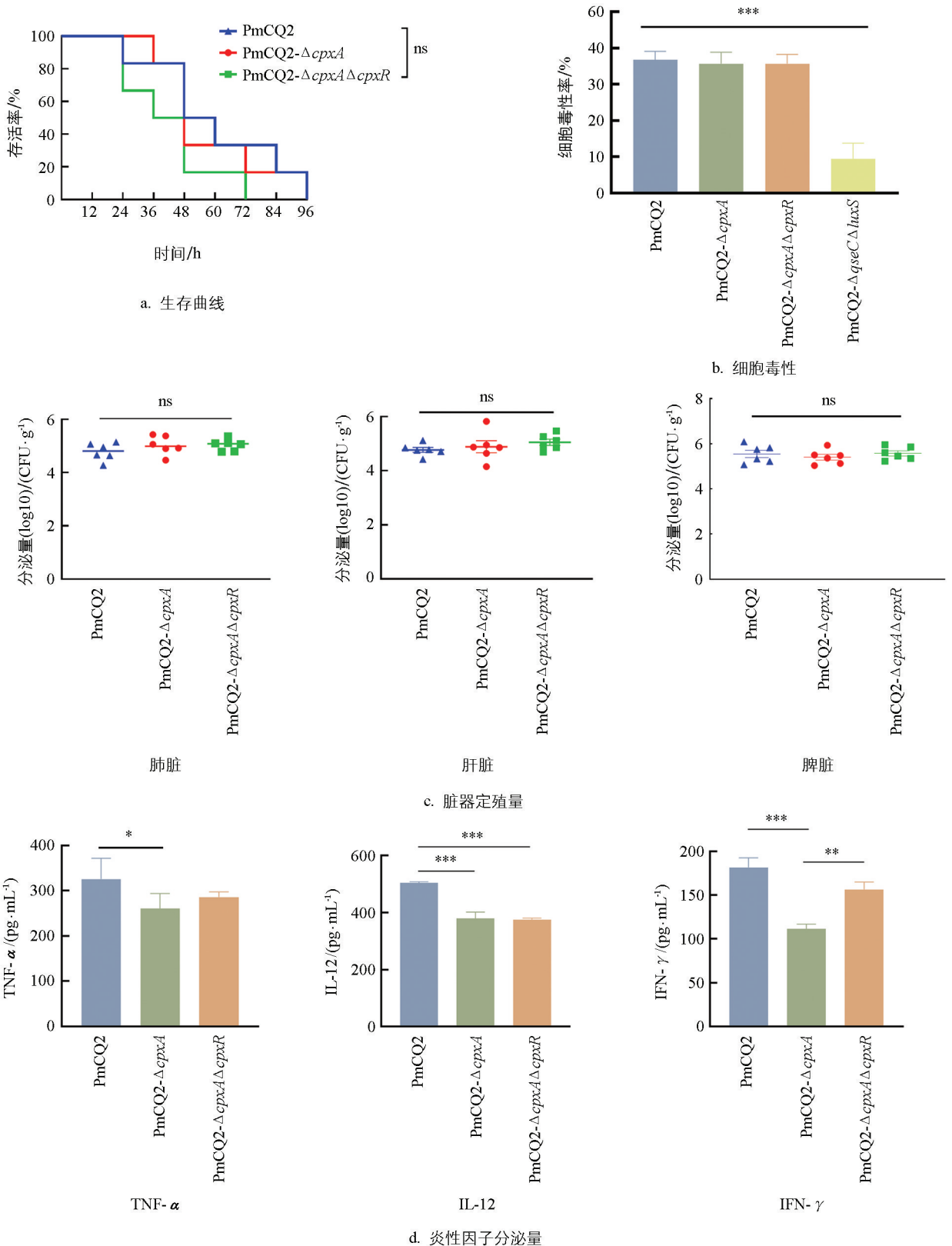


图 3 PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$  的毒力测定

采用小鼠肺上皮细胞来测定各菌株的细胞毒性作用, 并以另一个双基因缺失株 PmCQ2- $\Delta qseC\Delta luxS$  为参照, 发现 Cpx 系统基因缺失株对细胞的毒性和野毒株间差异无统计学意义, 但显著高于 PmCQ2- $\Delta qseC\Delta luxS$  (图 3b)。

以  $4 \times 10^6$  CFU/mL 的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  肌肉攻毒感染小鼠, 发现感染 12 h 后小鼠肺脏、肝脏、脾脏中的载菌量差异无统计学意义 (图 3c)。

以 1 MOI 的 PmCQ2、PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  感染小鼠腹腔巨噬细胞, 6 h 后收集细胞上清, 用 ELISA 试剂盒检测巨噬细胞分泌炎症因子的情况发现, 与野生株相比, PmCQ2- $\Delta cpxA$  感染显著降低了细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-12、IFN- $\gamma$  相关炎症因子的分泌量, 而 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  感染显著降低了细胞 IL-12 的分泌量 (图 3d)。

## 2.4 交叉免疫保护性测定

前期发现, 部分基因缺失会赋予多杀性巴氏杆菌的交叉免疫保护特性<sup>[8-9]</sup>, 为探究  $cpxA/R$  基因缺失是否会同样赋予 Pm 菌株交叉免疫保护能力, 我们通过制备野毒株和基因缺失株灭活苗, 同时以 PBS 乳化剂为对照, 分别免疫小鼠, 首免 14 d 后加强免疫 1 次, 首免 21 d 后进行尾静脉采血并分离血清, 检测抗体水平的产生情况, 随后对小鼠进行攻毒测试。结果发现,  $cpxA$  及  $cpxA/R$  基因缺失株灭活苗均能诱导小鼠产生较高的抗体水平 (图 4a), 两个基因缺失株灭活苗对牛源 A 型 Pm 的保护率为 100%, 对牛源 B 型、F 型 Pm 的保护率为 50%, 但对猪源、禽源 A 型 Pm 无保护性 (图 4b—4f)。用这两个基因缺失株灭活苗免疫小鼠后, 其抗体水平可达 1:25 600~1:102 400, 并能稳定维持 150 d 以上 (图 4g)。

## 2.5 Cpx 系统基因对 Pm 的环境响应能力的影响

有研究表明, Cpx 系统主要通过对下游因子的调节帮助细菌适应自然环境中的各种应激, 从而维持其自身的生存能力<sup>[2-5]</sup>。本研究发现, PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  对绝大多数抗生素敏感性差异无统计学意义, 但对氨苄西林的敏感性显著增加 (表 3)。

表 3 PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  的抗生素敏感性比较

分类	抗生素	抑菌圈直径/mm			结果
		PmCQ2	PmCQ2- $\Delta cpxA$	PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$	
青霉素类	青霉素	30	31	31	S/S/S
	苯唑西林	16	15	15	R/R/R
	氨苄西林	19	24	26	I/S/S
	羧苄西林	35	34	32	S/S/S
	哌拉西林	32	33	30	S/S/S
头孢菌素类	头孢氨苄	22	22	22	S/S/S
	头孢唑林	25	25	22	S/S/S
	头孢拉定	23	24	21	S/S/S
	头孢呋辛	33	34	29	S/S/S
	头孢他啶	21	24	21	S/S/S
	头孢曲松	35	33	34	S/S/S
	头孢哌酮	31	28	27	S/S/S
大环内酯类	红霉素	20	21	20	I/I/I
	麦迪霉素	16	16	16	I/I/I

续表 3

分类	抗生素	抑菌圈直径/mm			结果
		PmCQ2	PmCQ2- $\Delta cpxA$	PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$	
氨基糖苷类	丁胺卡那	12	12	12	R/R/R
	庆大霉素	14	15	13	I/I/I
	卡那霉素	17	17	16	S/S/I
	新霉素	13	14	11	I/I/R
四环素类	四环素	23	23	21	S/S/S
	多西环素	21	20	20	S/S/S
	米诺环素	20	20	20	S/S/S
喹诺酮类	环丙沙星	41	37	36	S/S/S
多肽类	多黏菌素 B	14	13	13	S/S/S
磺胺类	复方新诺明	21	21	16	R/R/R
硝基呋喃类	呋喃唑酮	24	18	18	S/S/S
酰胺醇类	氯霉素	34	29	30	S/S/S
林可霉素类	克林霉素	12	11	11	R/R/R

注：R 表示耐药、I 表示中介、S 表示敏感。

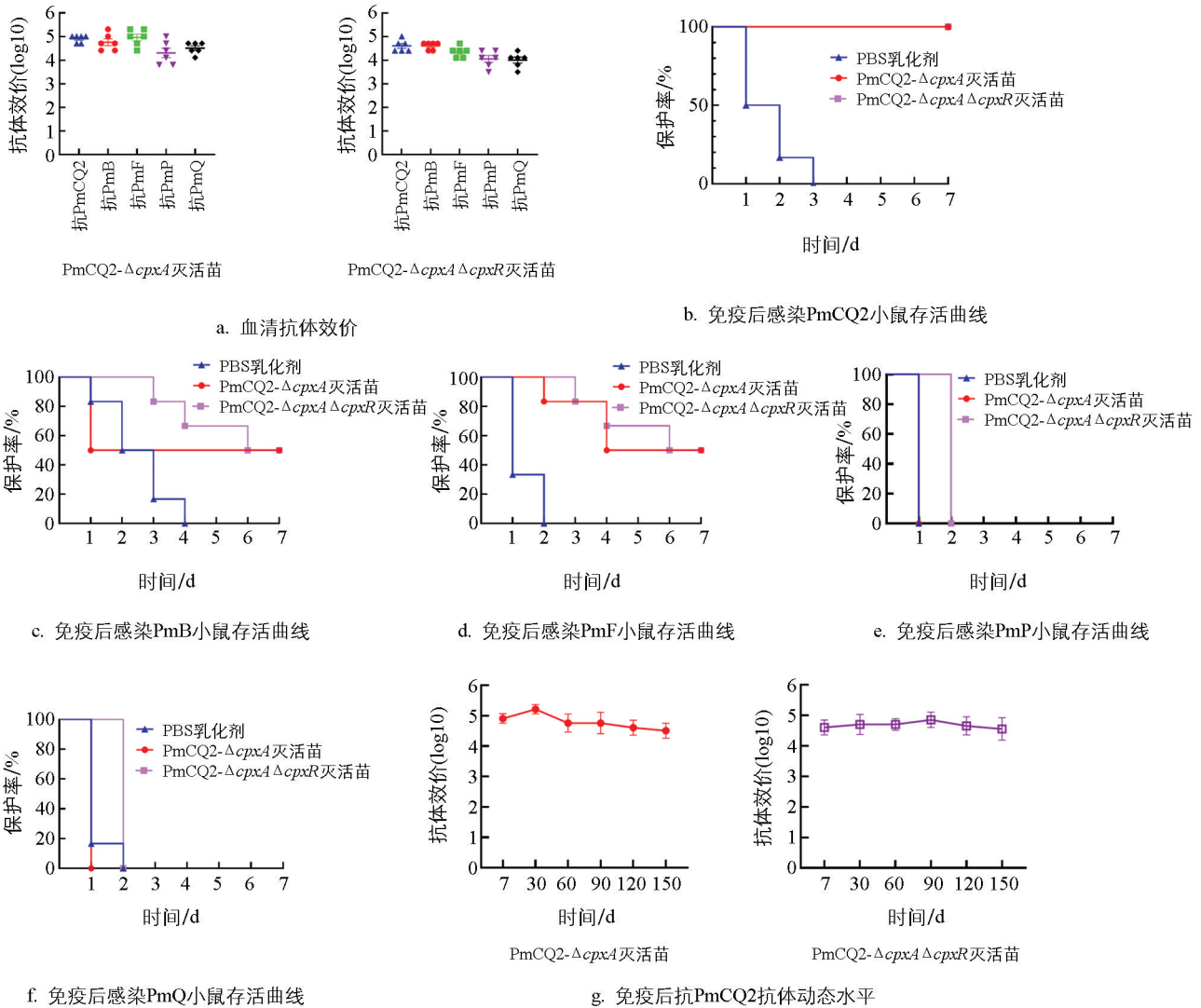


图 4 PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA \Delta cpxR$  灭活苗的交叉免疫保护性

为进一步探究 Cpx 系统基因对 Pm 应对环境刺激能力的影响, 通过在培养基中添加不同的刺激因子或改变培养条件, 模拟各种应激环境测试基因缺失株的生长情况。结果显示: 在添加盐离子及糖的环境中, 基因缺失株仅对高浓度  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  离子的添加有所响应, Cpx 系统基因的缺失能促进菌株的生长(图 5a—5d); 在温度反应测试中, 发现 Cpx 系统基因的缺失促进了菌株在高温环境中的生长, 减缓了菌株在低温环境中的生长(图 5e—5f); 在酸碱耐受性方面, Cpx 系统基因的缺失促使了菌株对酸的耐受性, 降低了菌株对碱的耐受性(图 5g—5h)。

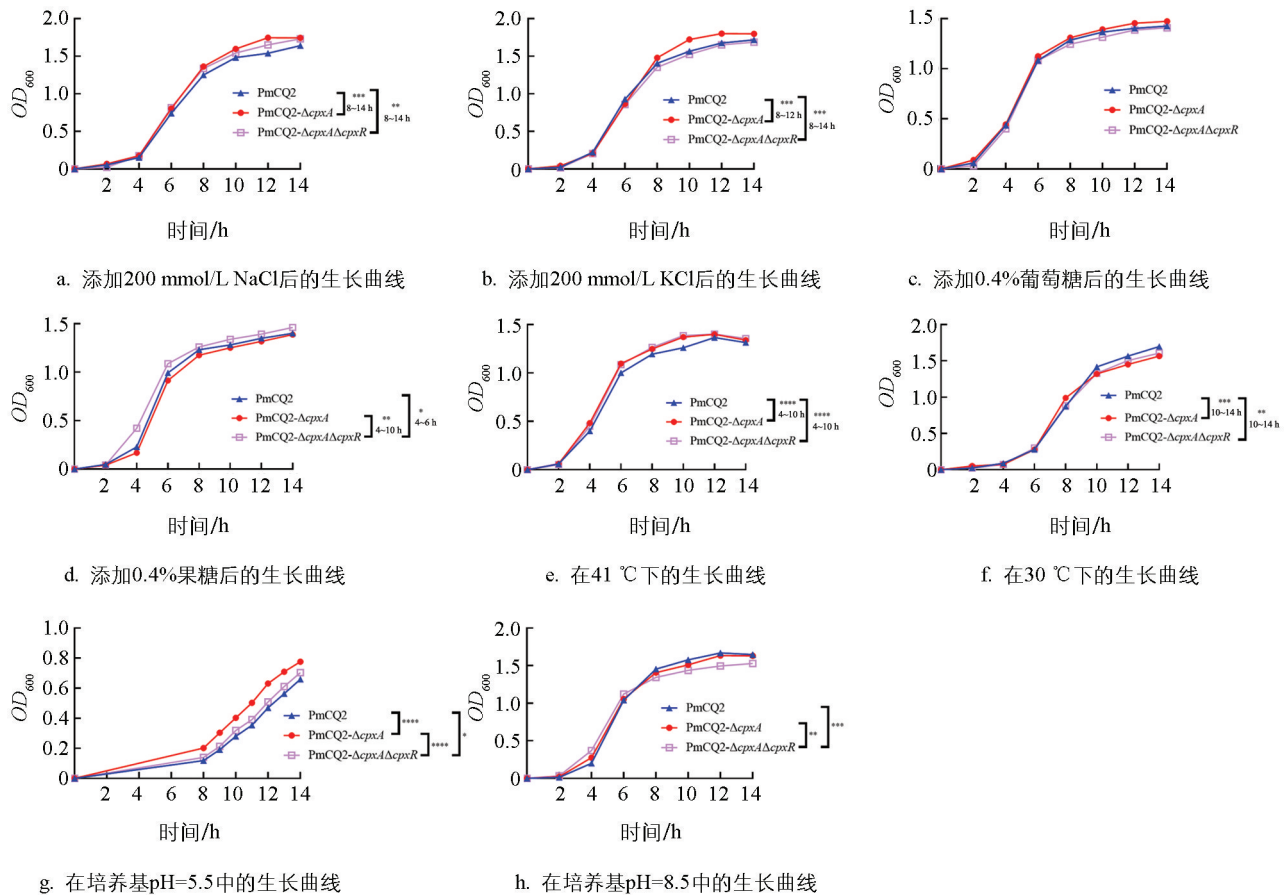


图 5 PmCQ2- $\Delta cpxA$  和 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  在不同条件下的生长曲线

考虑到 Cpx 通路在其他细菌中能够应对氧化应激、金属离子胁迫及抗菌肽毒性, 本研究也在 Pm 中进行了测试, 结果发现, 在添加 15 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$  后, 3 种菌株的生长速度均减缓, PmCQ2- $\Delta cpxA$  的生长情况与野生株差异无统计学意义, 而 PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  的生长速度显著高于 PmCQ2- $\Delta cpxA$ , 其余测试差异无统计学意义, 说明 Cpx 系统基因的缺失并未影响到 Pm 菌株对氧化应激及抗菌肽的敏感性(图 6a—6i)。

### 3 讨论与结论

鉴于 *cpxA/R* 基因对部分细菌毒力、耐药性和应对环境应激等方面的调控, 且未有相关报道表明该系统对 Pm 的影响, 因此本研究对 *cpxA/R* 基因进行了敲除, 但一直未能成功构建 PmCQ2- $\Delta cpxR$ , 课题组也会继续进行构建, 以对本研究的相关数据进一步加以论证。另外, 在基因敲除的过程中发现, *cpxA* 基因的位点对其功能的发挥至关重要, 也有研究发现, *cpxA* 基因某些位点突变或定向缺失, 会导致 HAMP 功能域晶体结构变化, 从而对 CpxA 与 CpxP 的结合或信号转导产生影响<sup>[10-11]</sup>。

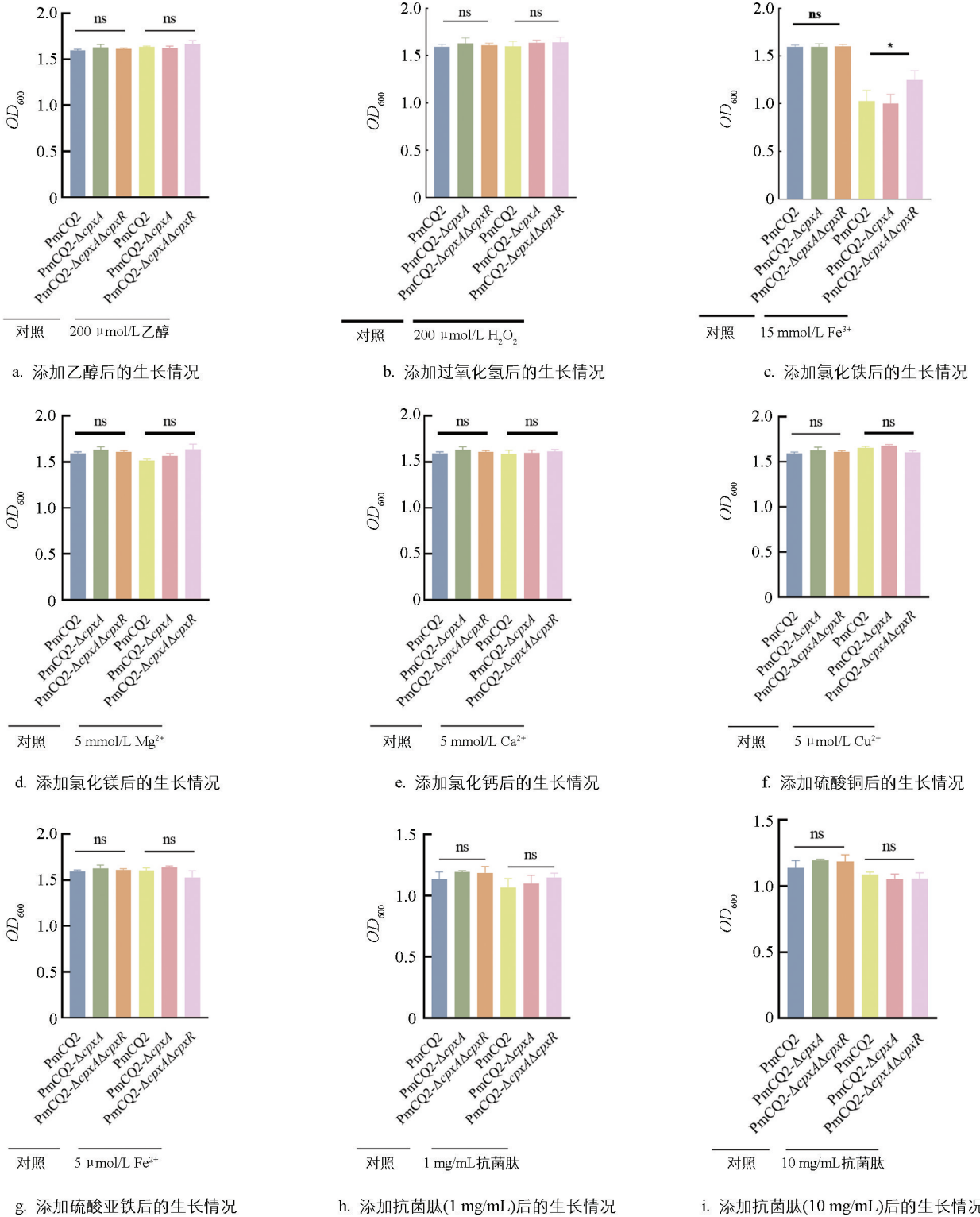


图 6 *PmCQ2-ΔcpxA* 和 *PmCQ2-ΔcpxAΔcpxR* 在其他应激环境中的生长情况

探究细菌毒力最常用且直观的方法是测定半数致死量( $LD_{50}$ )，本研究在前期探索时，测定了 *PmCQ2* 和 *PmCQ2-ΔcpxA* 的  $LD_{50}$ ，但二者毒力差异无统计学意义，且 *PmCQ2* 的  $LD_{50}$  与课题组前期的结果相差 100 倍左右，我们推测这种差异可能源于攻毒方式的不同。生存曲线结果表明，*Cpx* 系统基因缺失株与 *PmCQ2* 毒力差异无统计学意义，仅小鼠死亡时间略微提前。结合这一结果，同时考虑到 *PmCQ2* 在感染早期仅发生肺部脏器定殖，因此我们选择测定感染 12 h 时的脏器定殖量，Pletzer 等<sup>[12]</sup>的研究结果发

现, *baeR* 在定殖早期发挥作用, 而 *cpxR* 在定殖后期发挥作用, 这说明时间点的选择有助于揭示 Cpx 系统在细菌毒力方面的贡献。选择肺上皮细胞进行细胞毒性试验, 并将毒力显著降低的 PmCQ2- $\Delta qseC\Delta luxS$  作为对照, 以证明试验结果的可靠性。结果发现, 与野生株相比, PmCQ2- $\Delta cpxA$ 、PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  的毒力差异无统计学意义。在 Pm 感染过程中, 机体通过免疫系统产生高水平的炎性细胞因子, 以防御细菌入侵<sup>[13]</sup>; Qiu 等<sup>[14]</sup>研究发现, 感染 Pm 的小鼠肺组织, 其炎症因子 MCP-1、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达均显著上调, 高毒力菌株感染所导致的表达水平显著高于低毒力菌株。本研究结果发现, 缺失株感染巨噬细胞后, 上清中部分炎性因子分泌量降低, 我们推测, 这可能与细菌荚膜含量不同导致的炎症反应程度变化有关<sup>[15]</sup>。

敲除沙门氏菌 *lon* 和 *cpxR* 基因, 其菌株毒力显著降低, 但却能刺激机体产生更强的免疫反应<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究也发现, 多杀性巴氏杆菌某些基因如 *qseC*、*hyaD* 等的缺失, 可致使菌株具有较强的交叉免疫保护作用, 其中  $\Delta hyaD$  灭活苗几乎能对本试验所用的攻毒菌株产生完全的保护作用<sup>[9]</sup>, 因此, 我们探究 *cpxA/R* 基因缺失能否发挥与上述菌株相同的作用。由于 *cpxA/R* 基因缺失后细菌毒力无显著变化, 若制备成活苗, 易导致毒力返强, 因此将其制备成灭活苗, 研究表明, 灭活苗的交叉保护作用有限, 仅对牛源 B 型、F 型多杀性巴氏杆菌具有 50% 的免疫保护性。我们推测, 特定的基因缺失才能赋予菌株良好的交叉免疫保护性。对于这些特定基因缺失后引起的菌株灭活苗保护性发生变化的原因, 一方面, 基因缺失可能直接影响保护性抗原的表达, 从而提升疫苗的保护效果; 另一方面, 基因缺失后, 导致细菌表型改变, 使部分抗原裸露在菌体表面更易被识别, 进而增强了保护效力。

在发现 Cpx 系统对牛源 A 型 Pm 的生物膜、毒性、抗生素敏感性等方面均无显著贡献时, 我们通过在培养基中添加相应因子以模拟外界环境压力, 测试 *cpxA/R* 基因缺失株的生长情况, 从而探讨 Cpx 系统对这一方面的影响。结果显示, 不论是 *cpxA* 单基因缺失还是 *cpxA/R* 双基因缺失, 都显著增加了 Pm 在模拟酸性环境中的耐受性, 这与其他细菌截然不同, 如副猪嗜血杆菌 *cpxR* 基因缺失后, 在酸性、碱性、氧化应激条件下的抗性显著降低<sup>[16]</sup>。我们从以下 3 方面对其进行了推测: 1) 在课题组构建的多个缺失株中, 如  $\Delta qseC$ 、 $\Delta hyaD$ 、 $\Delta qseC$ 、 $\Delta luxS$  等, 大多表现为毒力降低的同时, 对环境应激抗性也降低<sup>[8-9]</sup>; 在双组份系统相关基因 *ompR* 缺失后, 毒力与野生株差异不大, 但耐酸性显著增加, 表现出与本研究的两个缺失株相同的特性。这种共性可能表明双组份系统在 Pm 中有特殊作用, 需进一步研究。2) 不同双组份调控系统在环境应激中的作用机制是复杂的, 在本试验中, Cpx 系统在酸性和碱性环境中的表现差异很大。有研究表明, 大肠杆菌仅在  $Na^+$ 、 $K^+$  与碱性环境共同存在的条件下, Cpx 系统才被激活<sup>[17]</sup>, 因此 Cpx 系统在不同 pH 下的表现也许与其多样的触发机制有关。3) 测定方法的不同导致的结果差异。冯芬芬<sup>[18]</sup>发现, 副猪嗜血杆菌在 0.02 mol/L NaOH 处理时, Cpx 系统不发挥作用, 但在 pH 为 8.5、9.5 时, 与野生株相比,  $\Delta cpxA$  差异无统计学意义, 但  $\Delta cpxR$  和  $\Delta cpxA/R$  耐性显著降低; 大肠杆菌的耐酸反应系统, 在指数相细胞中, 被 *Fur* 和 *PhoP/Q* 调控因子激活, 而在固定相细胞中, 被 *RpoS* 和 *OmpR* 激活<sup>[19]</sup>。本研究测试的是菌株在改变 pH 后培养基中的生长情况, 并未考虑极性 pH 胁迫下的细菌存活率。

*cpxA/R* 基因缺失后, 铁摄取和转运相关基因表现为上调, 但不明显。我们推测, 这可能与 Cpx 系统相关基因缺失对金属离子应激的反应有关, 因此在马丁培养基中添加了金属离子进行测试。结果显示, 仅在添加 15 mmol/L  $Fe^{3+}$  时, PmCQ2- $\Delta cpxA\Delta cpxR$  的生长速度显著高于 PmCQ2- $\Delta cpxA$ , 表明 *cpxR* 基因对 Pm 菌株在高浓度铁离子环境下的生长有抑制作用。考虑到宿主对细菌的先天防御限铁策略, 我们在马丁培养基中添加了不同浓度的螯合剂 2, 2'-联吡啶, 结果表明, 缺失株与野生株间差异无统计学意义。分析其原因, 一方面, 我们认为细菌通过不同的双组份系统适应应激<sup>[20]</sup>, 而在多杀性巴氏杆菌中, Cpx 系统可

能并非主要的包膜应激反应;另一方面,有研究表明,在限铁条件下,竞争性金属离子的存在,如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等,会诱导 Cpx 系统的转录<sup>[21]</sup>,且营养条件的改变也会影响其调控。在大肠杆菌中发现,转铁蛋白的调控依赖于酸性环境诱导的 Cpx 系统<sup>[22]</sup>。我们将在后续研究中,通过螯合剂清除培养基中的  $\text{Fe}^{3+}$  并添加其他金属离子,或组合不同应激条件,以探究 Cpx 系统是否发挥作用。

Cpx 系统在 Pm 中的表现与其他革兰氏阴性菌不同, *cpxA/R* 基因缺失后的 Pm 在高温、高渗透压、酸性环境中表现出适应性,在应对氧化应激和抗菌肽处理时无明显反应,仅在对碱应激和低温应激时表现出与其他细菌相似的反应。这种差异性也在霍乱弧菌的研究中被观察到,该研究发现, Cpx 系统仅在氯离子添加后被触发<sup>[23]</sup>,证实霍乱弧菌 Cpx 系统对氯离子的刺激是特异性的。我们推测,在 Pm 中,该系统的触发机制可能显著异于其他革兰氏阴性菌,且在巴氏杆菌 *cpxA/R* 基因缺失株中,可能存在替代的信号转导途径。此外,考虑到牛源 A 型多杀性巴氏杆菌是重要的呼吸道病原体,在体内主要经受呼吸道气体浓度变化及温度策略的环境压力,因此在试验设计时应注重这方面条件的优化和机制探究。

### 参考文献:

- [1] HUNKE S, KELLER R, MÜLLER V S. Signal Integration by the Cpx-Envelope Stress System [J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 326(1): 12-22.
- [2] 谢雪钦,李心瑶,黄婧妍,等. 包膜应激响应蛋白 Cpxa 突变及其对细菌耐药性和毒力的调控 [J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2022-2037.
- [3] LEÓN-MONTES N, NAVA-GALEANA J, RODRÍGUEZ-VALVERDE D, et al. The Two-Component System CpxRA Represses *Salmonella* Pathogenicity Island 2 by Directly Acting on the *ssrAB* Regulatory Operon [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(5): e02710-e02722.
- [4] ZHAO Z, XU Y, JIANG B, et al. Systematic Identification of CpxRA-Regulated Genes and Their Roles in *Escherichia coli* Stress Response [J]. mSystems, 2022, 7(5): e00419-e00422.
- [5] LIU F, PENG W, YAN K, et al. CpxAR of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Contributes to Heat Stress Response by Repressing Expression of Type IV Pilus Gene *apfA* [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e02523.
- [6] KAMBLE M, LEE J H. Characterization and Evaluation of a *Salmonella enterica* Serotype Senftenberg Mutant Created by Deletion of Virulence-Related Genes for Use as a Live Attenuated Vaccine [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2016, 23(10): 802-812.
- [7] 罗东还,吴强,温贵兰,等. 多杀性巴氏杆菌与禽白血病毒亚群混合感染诊断及相关基因分析 [J]. 南方农业学报, 2022, 53(2): 526-537.
- [8] YANG Y, HU P, GAOL X, et al. Deleting *qseC* Downregulates Virulence and Promotes Cross-Protection in *Pasteurella multocida* [J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 140.
- [9] 杨洋,谢黎卿,胡沛,等. 牛源 A 型多杀性巴氏杆菌 *hyaD* 基因缺失株的构建及其在小鼠上的交叉保护性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(10): 3582-3597.
- [10] MASI M, PINET E, PAGÈS J M. Complex Response of the CpxAR Two-Component System to  $\beta$ -Lactams on Antibiotic Resistance and Envelope Homeostasis in *Enterobacteriaceae* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(6): e00291.
- [11] LECURU M, NICOLAS-CHANOINEM H, TANAKA S, et al. Emergence of Imipenem Resistance in a CpxA-H208P-Variant-Producing *Proteus mirabilis* Clinical Isolate [J]. Microbial Drug Resistance, 2021, 27(6): 747-751.
- [12] PLETZER D, STAHL A, OJAA E, et al. Role of the Cell Envelope Stress Regulators BaeR and CpxR in Control of RND-Type Multidrug Efflux Pumps and Transcriptional Cross Talk with Exopolysaccharide Synthesis in *Erwinia amy-*

- lovora* [J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(6): 761-772.
- [13] 伍晨露. 牛源多杀性巴氏杆菌感染小鼠肺组织的转录组学分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [14] QIU R L, WEI H J, HU B, et al. Experimental Pathogenicity and Comparative Genome Analysis of High- and Low-Virulence Strains of Rabbit-Origin *Pasteurella multocida* [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2022, 90(11): 101889.
- [15] FANGR D, LEI G H, JIANG J L, et al. High- and Low-Virulent Bovine *Pasteurella multocida* Induced Differential NLRP3 Inflammasome Activation and Subsequent IL-1 $\beta$  Secretion [J]. Veterinary Microbiology, 2020, 243(4): 108646.
- [16] CAO Q, FENGF F, WANG H, et al. *Haemophilus parasuis* CpxRA Two-Component System Confers Bacterial Tolerance to Environmental Stresses and Macrolide Resistance [J]. Microbiological Research, 2018, 206(1): 177-185.
- [17] KUMAR S, TIWARI V, DOERRLERW T. CPX-Dependent Expression of YqjA Requires Cations at Elevated pH [J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(12): 115.
- [18] 冯芬芬. CpxA/R 双组份系统在副猪嗜血杆菌应对刺激中的作用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [19] XU Y, ZHAO Z, TONGW H, et al. An Acid-Tolerance Response System Protecting Exponentially Growing *Escherichia coli* [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1496.
- [20] KATO A, HIGASHINO N, UTSUMI R. Fe<sup>3+</sup>-Dependent Epistasis between the CpxR-Activated Loci and the PmrA-Activated LPS Modification Loci in *Salmonella enterica* [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2017, 62(6): 286-296.
- [21] ACOSTA N, PUKATZKI S, RAIVIOT L. The *Vibrio cholerae* Cpx Envelope Stress Response Senses and Mediates Adaptation to Low Iron [J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(2): 262-276.
- [22] CAO J N, WOODHALL M R, ALVAREZ J, et al. EfeUOB (YcdNOB) is a Tripartite, Acid-Induced and CpxAR-Regulated, Low-pH Fe<sup>2+</sup> Transporter that Is Cryptic in *Escherichia coli* K-12 but Functional in *E. coli* O157 : H7 [J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(4): 857-875.
- [23] SLAMTI L, WALDORM K. Genetic Analysis of Activation of the *Vibrio cholerae* Cpx Pathway [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(16): 5044-5056.

责任编辑 周仁惠